



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101987871 A

(43) 申请公布日 2011. 03. 23

(21) 申请号 201010271262. 3

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2003. 09. 26

C07K 16/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

60/414, 433 2002. 09. 27 US

60/442, 301 2003. 01. 23 US

60/467, 606 2003. 05. 02 US

60/477, 839 2003. 06. 12 US

(62) 分案原申请数据

03825450. 6 2003. 09. 26

(71) 申请人 赞科股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 格雷戈里·A·拉扎尔

阿瑟·J·奇里诺 党伟

约翰·R·德斯贾莱斯

斯蒂芬·K·多伯斯坦

罗伯特·J·海斯 希尔·B·卡基

奥米德·韦法

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张红春

权利要求书 2 页 说明书 122 页 附图 25 页

(54) 发明名称

优化的 Fc 变体及其产生方法

(57) 摘要

本发明涉及优化的 Fc 变体、产生它们的方法、以及包含优化的 Fc 变体的抗体和 Fc 融合体。

1. 一种包含 Fc 变体部分的抗体, 在所述的亲本 Fc 多肽的 Fc 区中包含至少一种氨基酸修饰, 与亲本 Fc 多肽比较其中所述 Fc 变体调节与 Fc γ R 的结合。

2. 根据项 1 所述的抗体, 其中所述调节是所述抗体对所述 Fc γ R 亲和力的增加。

3. 根据项 1 所述的抗体, 其中所述 Fc 变体部分在相应于人序列位置的位置包含至少一种取代, 所述人序列位置选自 234、235、239、240、241、243、244、245、247、262、263、264、265、266、267、269、296、297、298、299、313、325、326、327、328、329、330、332、333 和 334 组成的组。

4. 根据项 1 所述的抗体, 其中所述 Fc 变体在相应于人序列位置的位置包含至少一种取代, 所述人序列位置选自 240、244、245、247、262、263、266、299、313、325、328 和 332 组成的组。

5. 根据项 1 所述的抗体, 其中所述 Fc 变体包含在位置 332 的取代。

6. 根据项 1 所述的抗体, 其中至少一种取代位于选自 239、264、297 和 330 的位置, 附带条件是如果所述序列基本上是人的, 所述取代不是 S239A、V264A、N297A、N297Q、A330D、A330Q、A330K, 或 A330S。

7. 根据项 1 所述的抗体, 其中所述 Fc 变体包含至少一种取代, 选自 234D、234E、234N、234Q、234T、234H、234Y、234I、234V、234F、235D、235S、235N、235Q、235T、235H、235Y、235I、235V、235F、239D、239E、239N、239Q、239F、239T、239H、239Y、240I、240A、240T、240M、241W、241L、241Y、241E、241R、243W、243L、243Y、243R、243Q、244H、245A、247V、247G、262I、262A、262T、262E、263I、263A、263T、263M、264L、264I、264W、264T、264R、264F、264M、264Y、264E、265G、265N、265Q、265Y、265F、265V、265I、265L、265H、265T、266I、266A、266T、266M、267Q、267L、269H、269Y、269F、269R、296E、296Q、296D、296N、296S、296T、296L、296I、296H、297S、297D、297E、298H、299I、299L、299A、299S、299V、299H、299F、299E、313F、325Q、325L、325I、325D、325E、325A、325T、325V、325H、327N、327L、328M、328D、328E、328N、328Q、328F、328I、328V、328T、328H、328A、329F、330L、330Y、330V、330I、330F、330R、330H、332D、332E、332N、332Q、332T、332H、332Y 和 332A 组成的组。

8. 根据项 1 所述的抗体, 其中所述 Fc 变体选自 264L、264I、241W、241L、243W、243L、241L/243L/262I/264I、241W/243W、241W/243W/262A/264A、241L/262I、243L/264I、243L/262I/264W、241Y/243Y/262T/264T、241E/243R/262E/264R、241E/243Q/262T/264E、241R/243Q/262T/264R、241E/243Y/262T/264R、328M、328E、328F、332E、328M/332E、244H、245A、247V、313F、244H/245A/247V、247G、264I/332E、241E/243R/262E/264R/332E、241E/243Q/262T/264E/332E、241R/243Q/262T/264R/332E、241E/243Y/262T/264R/332E、298A/332E、239E/332E、239Q/332E、239E、265G、265N、239E/265G、239E/265N、239E/265Q、296E、296Q、299I、327N、267Q/327S、267L/327S、327L、329F、330L、330Y、332D、297S、297D、297S/332E、297D/332E、297E/332E、265Y/297D/332E、265Y/297D/299L/332E、265F/297E/332E、328I/332E、328Q/332E、332N、332Q、264T、264F、240I、263I、266I、299A、299S、299V、325Q、325L、325I、239D、239N、239F、239D/332D、239D/332E、239D/332N、239D/332Q、239E/332D、239E/332N、239E/332Q、239N/332D、239N/332E、239N/332N、239N/332Q、239Q/332D、239Q/332N、239Q/332Q、296D、296N、241Y/243Y/262T/264T/297D/332E、330Y/332E、264I/330Y/332E、330L/332E、

264I/330L/332E、234D、234E、234N、234Q、234T、234H、234Y、234I、234V、234F、235D、235S、235N、235Q、235T、235H、235Y、235I、235V、235F、239T、239H、239Y、240A、240T、240M、263A、263T、263M、264M、264Y、266A、266T、266M、269H、269Y、269F、269R、296S、296T、296L、296I、298H、299H、330V、330I、330F、330R、330H、325D、325E、325A、325T、325V、325H、328D/332E、328E/332E、328N/332E、328Q/332E、328V/332E、328T/332E、328H/332E、328I/332E、328A、332T、332H、332Y、332A、239E/264I/332E、239Q/264I/332E、239E/264I/330Y/332E、239E/264I/298A/330Y/332E、239D/297D/332E、239E/297D/332E、239D/265V/297D/332E、239D/265I/297D/332E、239D/265L/297D/332E、239D/265F/297D/332E、239D/265Y/297D/332E、239D/265H/297D/332E、239D/265T/297D/332E、264E/297D/332E、296D/297D/332E、296E/297D/332E、296N/297D/332E、296Q/297D/332E、296H/297D/332E、296T/297D/332E、297D/299V/332E、297D/299I/332E、297D/299L/332E、297D/299F/332E、297D/299H/332E、297D/299E/332E、297D/330Y/332E、297D/298A/330YI332E、239D/330Y/332E、239N/330Y/332E、239D/330L/332E、239N/330L/332E、264I/298A/332E、239D/298A/332E、239N/298A/332E、239D/264I/332E、239D/264I/298A/332E 和 239D/264I/330L/332E 组成的组。

9. 根据项 7 所述的抗体,其中所述 Fc 变体部分在相应于人序列位置组成的组的位置,进一步包含至少一种取代,所述人序列位置选自由 256、270、290、298、312、322、326、329、331、333、334 和 339 组成的组。

10. 根据项 1 所述的抗体,其中所述 Fc γ R 是 Fc γ RIIa。

优化的Fc变体及其产生方法

[0001] 本申请是申请日为2003年09月26日、申请号为03825450.6(国际申请号为PCT/US2003/030249)、发明名称为“优化的Fc变体及其产生方法”的发明申请的分案申请。

[0002] 本申请根据35U.S.C. § 199(e), 要求于2003年6月12日提交的USSNs 60/477, 839 ;2003年5月2日提交的60/467, 606 ;2002年9月27日提交的60/414, 433 ;和2003年1月23日提交的60/442, 301的权益, 所有它们全文内容在此明确引用作为参考。

发明领域

[0003] 本发明涉及新的优化的Fc变体, 产生它们的工程改造(engineering)方法, 以及它们的应用, 具体而言用于治疗目的。

[0004] 发明背景

[0005] 抗体是结合特异性抗原的免疫蛋白。在包括人和小鼠的大多数哺乳动物中, 抗体由配对的多肽重链和多肽轻链构成。每条链由分离的免疫球蛋白(Ig)结构域组成, 因此上述蛋白通称免疫球蛋白。每条链由两个不同的区组成, 称为可变区及恒定区。在抗体间轻链和重链可变区显示了明显的序列多样性, 并负责结合靶抗原。恒定区显示了较少的序列多样性, 并负责结合许多天然蛋白以引发重要的生化反应。在人类中有五种不同类型的抗体, 包括IgA(其包括亚类IgA1和IgA2)、IgD、IgE、IgG(其包括亚类IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)以及IgM。尽管在V区可能存在微小的差异, 但是在这些类型的抗体间区别特征是它们的恒定区。图1显示了IgG1抗体, 在此用于举例说明免疫球蛋白的大致结构特征, IgG抗体是由两条重链和两条轻链组成的四聚体蛋白。IgG重链由四个相连的免疫球蛋白结构域组成, 从N-末端到C-末端依次为 V_H -C γ 1-C γ 2-C γ 3, 分别称为重链可变区结构域、恒定区 γ 1结构域、恒定区 γ 2结构域和恒定区 γ 3结构域。IgG轻链由两个相连的免疫球蛋白结构域组成, 从N-末端到C-末端依次为 V_L -C λ , 分别称为轻链可变区结构域和轻链恒定区结构域。

[0006] 抗体的可变区含有该分子的抗原结合决定基, 并因此决定了抗体对其靶抗原的特异性。因为其与同一类型中其它抗体序列差别最明显, 所以命名为可变区。大多数序列可变性存在于互补决定区(CDRs)。总共有6个CDRs, 每条重链和轻链各有3个, 命名为 V_H CDR1、 V_H CDR2、 V_H CDR3、 V_L CDR1、 V_L CDR2及 V_L CDR3。在CDRs外的可变区称为骨架(FR)区。尽管不像CDRs一样变化众多, 但是在不同抗体间FR区存在序列可变性。总的来说, 抗体的结构特征提供了稳定的支架(FR区), 在其上真正的抗原结合多样性(CDRs)能得到暴露, 通过免疫系统以获得对广泛抗原的特异性。可获得来自多种不同生物体可变区片段的许多高分辨率结构, 一些可变区是非结合状态的, 一些与抗原形成复合物。抗体可变区的序列和结构特征得到充分鉴定(Morea等., 1997, Biophys Chem 68:9-16; Morea等., 2000, Methods 20:267-279), 抗体的保守特征已用于发展许多抗体工程技术(Maynard等., 2000, Annu Rev Biomed Eng 2:339-376)。例如, 可将来自一种抗体, 如鼠抗体的CDRs移植入另一种抗体的骨架区, 如人抗体。在本领域称为“人源化”的该过程能从非人抗体中能产生具更低免疫原性的抗体治疗剂。存在着包含可变区的片段, 其缺少抗体其它区域, 包括诸如包含

V_H - $C\gamma 1$ 和 V_H - C_L 的抗原结合片段 (Fab)、包含 V_H 和 V_L 的可变区片段 (Fv)、包含在同一链中连接在一起的 V_H 和 V_L 的单链可变区片段 (scFv) 以及多种其它可变区片段 (Little 等., 2000, Immunol Today 21:364-370)。

[0007] 抗体的 Fc 区与许多 Fc 受体及配体相互作用,行使一系列重要的功能,称为效应器功能。如图 1 所示, IgG Fc 区包含 Ig 结构域 $C\gamma 2$ 、 $C\gamma 3$ 和进入 $C\gamma 2$ 的 N-末端铰链。对于 IgG 类而言,一类重要的 Fc 受体家族是 $Fc\gamma$ 受体 ($Fc\gamma Rs$)。这些受体介导抗体与免疫系统的细胞臂之间的识别 (Raghavan 等., 1996, Annu Rev Cell Dev Biol 12:181-220; Ravetch 等., 2001, Annu Rev Immunol 19:275-290)。在人类中,该蛋白质家族包含 $Fc\gamma RI$ (CD64), 包括同种型 (isoform) $Fc\gamma RIa$ 、 $Fc\gamma RIb$ 和 $Fc\gamma RIc$; $Fc\gamma RII$ (CD32), 包括同种型 $Fc\gamma RIIa$ (包含同种异型 (allotype) H131 和 R131)、 $Fc\gamma RIIb$ (包含 $Fc\gamma RIIb-1$ 和 $Fc\gamma RIIb-2$) 以及 $Fc\gamma RIIC$; 和 $Fc\gamma RIII$ (CD16), 包括同种型 $Fc\gamma RIIIa$ (包含同种异型 V158 和 F158) 和 $Fc\gamma RIIIb$ (包含同种异型 $Fc\gamma RIIIb-NA1$ 和 $Fc\gamma RIIIb-NA2$) (Jefferis 等., 2002, Immunol Lett 82:57-65)。这些受体通常具有介导与 Fc 结合的胞外结构域、跨膜区和可介导某些细胞内信号事件的胞内结构域。这些受体在不同的免疫细胞中表达,包括单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、树突细胞、嗜酸性细胞、肥大细胞、血小板、B 细胞、大颗粒淋巴细胞、朗罕氏细胞,自然杀伤 (NK) 细胞以及 $\gamma\gamma T$ 细胞。 $Fc/Fc\gamma R$ 复合物的形成招募这些效应细胞至结合抗原的位点,通常导致细胞内信号事件以及随后重要的免疫应答发生,诸如释放炎症介质、B 细胞活化、细胞内吞作用、吞噬作用及细胞毒性攻击。介导细胞毒性和吞噬细胞效应器功能的能力是抗体破坏靶细胞的一种可能机制。在细胞介导反应中表达 $Fc\gamma Rs$ 的非特异性细胞毒性细胞识别靶细胞上的结合的抗体并随后导致靶细胞溶胞作用,称为抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用 (ADCC) (antibody dependent cell-mediated cytotoxicity) (Raghavan 等., 1996, Annu Rev Cell Dev Biol 12:181-220; Ghetie 等., 2000, Annu Rev Immunol 18:739-766; Ravetch 等., 2001, Annu Rev Immunol 19:275-290)。在细胞介导反应中表达 $Fc\gamma Rs$ 的非特异性细胞毒性细胞识别靶细胞上的结合的抗体并随后导致对靶细胞的吞噬作用,称为抗体依赖性细胞介导的细胞吞噬作用 (ADCP) (antibody dependent cell-mediated phagocytosis)。已解出人 $Fc\gamma Rs$ 的胞外结构域的许多结构,包括 $Fc\gamma RIIa$ (pdb 登记号 1H9V) (Sondermann 等., 2001, J Mol Biol 309:737-749) (pdb 登记号 1FCG) (Maxwell 等., 1999, Nat Struct Biol 6:437-442), $Fc\gamma RIIb$ (pdb 登记号 2FCB) (Sondermann 等., 1999, Embo J 18:1095-1103); 以及 $Fc\gamma RIIIb$ (pdb 登记号 1E4J) (Sondermann 等., 2000, Nature 406:267-273.)。所有 $Fc\gamma Rs$ 结合 Fc 上相同区域,位于 $C\gamma 2$ 结构域的 N-末端和前述铰链区,如图 2 所示。该相互作用可很容易地通过结构来鉴定 (Sondermann 等., 2001, J Mol Biol 309:737-749), 并已解出与人 $Fc\gamma RIIIb$ 胞外结构域结合的人 Fc 的数种结构 (pdb 登记号 1E4K) (Sondermann 等., 2000, Nature 406:267-273.) (pdb 登记号 1IIS 和 1IIX) (Radaev 等., 2001, J Biol Chem 276:16469-16477), 也解出人 IgE Fc/ $Fc\epsilon RI\alpha$ 复合物结构 (pdb 登记号 1F6A) (Garman 等., 2000, Nature 406:259-266)。

[0008] 不同 IgG 亚类对 $Fc\gamma Rs$ 具有不同亲和力, IgG1 和 IgG3 一般较 IgG2 和 IgG4 能更充分地 与受体结合 (Jefferis 等., 2002, Immunol Lett 82:57-65)。所有 $Fc\gamma Rs$ 结合 IgG Fc 上相同的区域,亦具有不同的亲和力:高亲和力受体 $Fc\gamma RI$ 对 IgG 具有 $10^{-8}M^{-1}$ 的 Kd,

反之低亲和力受体 Fc γ RII 和 Fc γ RIII 通常分别以 10^{-6} 和 10^{-5}M^{-1} 的 Kd 结合。Fc γ RIIIa 与 Fc γ RIIIb 胞外结构域具有 96% 同一性,但是 Fc γ RIIIb 没有胞内信号域。此外,尽管 Fc γ RI、Fc γ RIIa/c 和 Fc γ RIIIa 是免疫复合物触发激活作用的正调节物,通过具有含有免疫受体酪氨酸激活基序 (ITAM) 的胞内结构域而得到鉴定,但是 Fc γ RIIb 含有免疫受体酪氨酸抑制基序列 (ITIM) 并因此而具有抑制性。因此,前者称为激活性受体而 Fc γ RIIb 称为抑制性受体。在不同的免疫细胞中受体也具有不同的表达谱和表达水平。然而,在人蛋白质组中另一种复杂性水平是存在着许多 Fc γ R 多态性。与临床意义特别相关的多态性是 V158/F158Fc γ RIIIa。人 IgG1 与 V158 同种异型的结合较与 F158 同种异型的结合具更高亲和力。不同亲和力以及推测其对 ADCC 和 / 或 ADCP 的影响已显示了是抗 -CD20 抗体利妥昔单抗 (Rituxan[®], IDEC Pharmaceuticals Corporation 的注册商标) 功效的重要决定因素。具有 V158 同种异型的患者对利妥昔单抗治疗响应良好;然而,具有低亲和力 F158 同种异型的患者响应不良 (Cartron 等, 2002, Blood 99 :754-758)。大约 10-20% 的人是 V158/V158 纯合子, 45% 是 V158/F158 杂合子, 以及 35-45% 的人是 F158/F158 纯合子 (Lehrnbecher 等., 1999, Blood 94 :4220-4232 ;Cartron 等., 2002, Blood 99 :754-758)。因此 80-90% 的人是不良应答者,它们具有至少一个 F158 Fc γ RIIIa 等位基因。

[0009] 图 1 显示了 Fc 上重叠但分离的位点,其作为与补体蛋白 C1q 作用的界面。同样地, Fc/Fc γ R 结合介导了 ADCC, Fc/C1q 结合介导了补体依赖性细胞毒作用 (CDC)。C1q 与丝氨酸蛋白酶 C1r 形成复合物,再与 C1s 形成 C1 复合物。虽然 C1q 与两种 IgGs 的结合就足以激活补体级联,但是其能结合 6 种抗体。类似于 Fc 与 Fc γ Rs 的相互作用,不同 IgG 亚类对 C1q 具有不同亲和力, IgG1 和 IgG3 一般较 IgG2 和 IgG4 能更充分地与 Fc γ Rs 结合 (Jefferis 等., 2002, Immunol Lett 82 :57-65)。当前没有获得 Fc/C1q 复合物结构;但是,诱变研究已将人 IgG 上与 C1q 的结合位点定位于包含残基 D270、K322、K326、P329 和 P331, 以及 E333 的区域 (Idusogie 等., 2000, J Immunol 164 :4178-4184 ;Idusogie 等, 2001, J Immunol 166 :2571-2575)。

[0010] 图 1 显示了 Fc 上 C γ 2 和 C γ 3 结构域之间的位点,其介导与新生受体 FcRn 的相互作用,它们的结合使胞吞的抗体从内涵体再循环回血液中 (Raghavan 等., 1996, Annu Rev Cell Dev Biol 12 :181-220 ;Ghetie 等., 2000, Annu Rev Immunol 18 :739-766)。该过程结合基于较大尺寸的全长分子不被肾滤过,产生了有利的抗体血清半衰期,该半衰期变化范围从一周到三周。在抗体转运中 Fc 与 FcRn 的结合也扮演着关键角色。Fc 上结合 FcRn 的结合位点也是细菌蛋白 A 和 G 的结合位点。通过在蛋白纯化过程中使用蛋白 A 或蛋白 G 亲和层析,这些蛋白质的牢固结合通常用作纯化抗体的手段。因此,对于抗体的临床性能及其纯化而言, Fc 上该区域的保真度具有重要作用。已获得的大鼠 Fc/FcRn 复合物结构 (Martin 等., 2001, Mol Cell 7 :867-877), 以及 Fc 与蛋白 A 和 G 的复合物结构 (Deisenhofer, 1981, Biochemistry 20 :2361-2370 ;Sauer-Eriksson 等., 1995, Structure 3 :265-278 ;Tashiro 等., 1995, Curr Opin Struct Biol 5 :471-481) 提供了对 Fc 与这些蛋白相互作用的了解。

[0011] 在 Fc 区起关键作用的是存在于 N297 的保守的 N-糖基化,如图 1 所示。对于抗体而言,该糖,或有时称为寡糖的,扮演着关键的结构和功能角色,并且是使用哺乳动物表达系统产生抗体的主要原因之一。虽然不应限制于一种理论,但据信该糖结构上的用途可稳

定或增溶 Fc, 决定 C γ 3 与 C γ 2 结构域间特定角度或柔性程度, 阻止两个 C γ 2 结构域横越中心轴的相互聚集, 或这些的组合。Fc 与 Fc γ R 以及 C1q 的有效结合需要这种修饰, N297 糖组成的改变或消除影响这些蛋白的结合 (Umana 等., 1999, *Nat Biotechnol* 17:176-180; Davies 等., 2001, *Biotechnol Bioeng* 74:288-294; Mimura 等., 2001, *J Biol Chem* 276:45539-45547.; Radaev 等., 2001, *J Biol Chem* 276:16478-16483; Shields 等., 2001, *J Biol Chem* 276:6591-6604; Shields 等., 2002, *J Biol Chem* 277:26733-26740; Simmons 等., 2002, *J Immunol Methods* 263:133-147)。然而, 即使与 Fc γ Rs 有任何特异性接触, 该糖的参与也少 (Radaev 等., 2001, *J Biol Chem* 276:16469-16477), 表明在介导 Fc/Fc γ R 结合中 N297 糖的功能角色可能是通过在决定 Fc 构象中其所扮演的结构角色来实现的。该结论通过所收集到的四个不同 Fc 糖型的晶体结构而得到支持, 这些结构显示了寡糖影响了 C γ 2 构象并因此影响 Fc/Fc γ R 界面 (Krapp 等., 2003, *J Mol Biol* 325:979-989)。

[0012] 上述所讨论的抗体特征—特异于靶, 能介导免疫效应机制及在血清中的长半衰期—使得抗体可有效地用于治疗。单克隆抗体可用于治疗多种疾病, 包括癌症、炎症和心血管病。目前已有超过 10 种抗体产品上市, 并有数百种产品正在开发中。除抗体外, 在研究和治疗中发现 Fc 融合体这类抗体样蛋白用途广泛 (Chamow 等., 1996, *Trends Biotechnol* 14:52-60; Ashkenazi 等., 1997, *Curr Opin Immunol* 9:195-200)。Fc 融合体是一种蛋白质, 其中一个或多个多肽可操作地连接 Fc。Fc 融合体使抗体的 Fc 区与受体的靶结合区、配体或一些其它蛋白或蛋白结构域结合, 并因此有利于其效应器功能和药物代谢动力学。后者的角色是用于介导靶识别, 并因而在功能上与抗体可变区相似。因为 Fc 融合体与抗体在结构和功能上重叠, 所以在本发明中对于抗体的讨论可直接扩展至 Fc 融合体。

[0013] 尽管具有这样广泛的用途, 对于临床使用而言, 抗体并不是优化的。抗体的两个主要缺点是它们并不理想的抗癌效力和它们过分苛求的生产必备条件。本发明解决了这些缺陷。

[0014] 存在许多可能的抗体破坏肿瘤细胞机制, 包括通过阻断必需的生长途径以抗增殖、导致细胞凋亡的胞内信号、增强的下调作用和 / 或受体的转换 (turnover)、CDC、ADCC、ADCP 以及启动获得性免疫应答 (adaptive immune response) (Cragg 等., 1999, *Curr Opin Immunol* 11:541-547; Glennie 等., 2000, *Immunol Today* 21:403-410)。抗肿瘤效力可基于这些机制的组合, 而且在临床治疗中它们各自的重要性依肿瘤的不同而不同。尽管是抗肿瘤武器的兵工厂, 但是抗体作为抗癌剂的效果却并不令人满意, 具体而言是它们的高成本。患者肿瘤响应数据显示了相对于常规的单一试剂细胞毒素化学疗法而言, 在治疗成功率上单克隆抗体仅提供了很少的改善。举例来说, 在全部复发的低度非霍奇金淋巴瘤患者中只有一半对抗 -CD20 抗体利妥昔单抗响应 (McLaughlin 等., 1998, *J Clin Oncol* 16:2825-2833)。在 166 个临床患者中, 6% 显示了完全响应, 42% 显示了部分响应, 中值响应持续时间大约为 12 个月。曲妥单抗 (Herceptin[®], Genentech 的注册商标), 一种用于治疗乳腺癌转移的抗 -HER2/neu 抗体, 具有较低的疗效。对 222 个受试患者使用曲妥单抗的总响应率仅有 15%, 其中 8 个完全响应, 26 个部分响应, 中值响应持续时间和存活时间为 9-13 个月 (Cobleigh 等., 1999, *J Clin Oncol* 17:2639-2648)。目前对于抗癌治疗而言, 在死亡率上任何小的改善都意味着成功。因此, 特别需要增强抗体破坏靶癌细胞的能力。

[0015] 一种用于增强抗体抗肿瘤效力的有希望的方法是通过增加它们介导诸如 ADCC、

ADCP 和 CDC 的细胞毒性效应器功能的能力。对于抗体抗癌活性而言, Fc γ R-介导的效应器功能的重要性已在小鼠中得到证实 (Clynes 等., 1998, *Proc Natl Acad Sci USA* 95 : 652-656 ;Clynes 等., 2000, *Nat Med* 6 :443-446), 并在基于细胞的测定中证实了与靶细胞毒性相关的 Fc 与特定 Fc γ Rs 之间相互作用的亲和力 (Shields 等., 2001, *J Biol Chem* 276 :6591-6604 ;Presta 等., 2002, *Biochem Soc Trans* 30 :487-490 ;Shields 等., 2002, *J Biol Chem* 277 :26733-26740)。此外, 已观察到人临床疗效与它们的同种异型—Fc γ RIIIa 的高亲和力多态型 (V158) 或低亲和力多态型 (F158) 之间的相互关系 (Cartron 等., 2002, *Blood* 99 :754-758)。综合起来, 这些数据暗示了对于与特定 Fc γ Rs 结合而言, 在患者体内具有 Fc 区优化的抗体能更好地介导效应器功能并因此能更有效地破坏癌细胞。在激活与抑制受体之间的平衡要得到重点考虑, 并应由 Fc 产生最佳的效应器功能, 对诸如 Fc γ RI、Fc γ RIIa/c 以及 Fc γ RIIIa 的激活受体而言应具有增强的亲和力, 还应减少对抑制性受体 Fc γ RIIb 的亲和力。此外, 因为 Fc γ Rs 能介导抗原摄入和通过抗原呈递细胞的加工过程, 所以增强 Fc/Fc γ R 亲和力也能改善抗体治疗能力以引发获得性免疫应答。

[0016] 具有不同目的的诱变研究已用于 Fc, 通常对丙氨酸进行取代 (称为丙氨酸扫描) 或通过序列同源性取代指导操作 (Duncan 等., 1988, *Nature* 332 :563-564 ;Lund 等., 1991, *J Immunol* 147 :2657-2662 ;Lund 等., 1992, *Mol Immunol* 29 :53-59 ;Jefferis 等., 1995, *Immunol Lett* 44 :111-117 ;Lund 等., 1995, *Faseb J* 9 :115-119 ;Jefferis 等., 1996, *Immunol Lett* 54 :101-104 ;Lund 等., 1996, *J Immunol* 157 :4963-4969 ;Armour 等., 1999, *Eur J Immunol* 29 :2613-2624 ;Shields 等., 2001, *J Biol Chem* 276 :6591-6604 ;Jefferis 等., 2002, *Immunol Lett* 82 :57-65) (US 5,624,821 ;US 5,885,573 ;PCT WO 00/42072 ;PCT WO 99/58572)。大多数取代减少或消除了与 Fc γ Rs 的结合。另一方面, 在获得具有更高 Fc γ R 亲和力的 Fc 变体方面已取得了一些成功 (参见例如 US 5,624,821 和 PCT WO 00/42072)。例如, Winter 及其同事在小鼠 IgG2b 抗体的 235 位上用氨基酸进行取代 (谷氨酸到亮氨酸突变), 该小鼠抗体与人 Fc γ RI 的结合增加了 100 倍 (Duncan 等., 1988, *Nature* 332 :563-564) (US 5,624,821)。Shields 等使用丙氨酸扫描诱变来定位对 Fc γ R 结合起重要作用的 Fc 残基, 然后通过用非丙氨酸突变对所选定的残基进行取代 (Shields 等., 2001, *J Biol Chem* 276 :6591-6604 ;Presta 等., 2002, *Biochem Soc Trans* 30 :487-490) (PCT WO 00/42072)。该研究公开了一些突变, 包括 S298A、E333A 和 K334A, 显示了与激活受体 Fc γ RIIIa 增强的结合以及减少了与抑制性受体 Fc γ RIIb 的结合。组合这些突变以获得双重和三重突变的变体, 在结合方面其显示了累加的改善。在该研究中所公开的最好的变体是 S298A/E333A/K334A 三重突变体, 其与 F158 Fc γ RIIIa 的结合大约增加了 1.7 倍, 与 Fc γ RIIb 的结合减少了 5 倍, 且 ADCC 增加了 2.1 倍。

[0017] 使用工程改造后的糖型 (engineered glycoform) 也已实现了 Fc 对 Fc γ R 增强的亲和力, 该糖型产生自工程改造的或变异的细胞系中抗体的表达 (Umana 等., 1999, *Nat Biotechnol* 17 :176-180 ;Davies 等., 2001, *Biotechnol Bioeng* 74 :288-294 ;Shields 等., 2002, *J Biol Chem* 277 :26733-26740 ;Shinkawa 等., 2003, *J Biol Chem* 278 :3466-3473)。该方法产生了实质上增加的抗体与 Fc γ RIIIa 结合并介导 ADCC 的能力。尽管在实践中存在诸如在大规模生产条件下表达菌株生长效率的局限性, 用于增强 Fc/Fc γ R 亲和力以及效应器功能的该方法仍然是有前途的。实际上, 对于优化效应器功能来说, 将这

些可选的糖型技术与本发明的 Fc 变体结合可提供累加效应或协同效应。

[0018] 尽管需要更强的效应器功能,对于某些抗体治疗剂而言,减少或消除效应器功能也许是其所需的。通常认为治疗性抗体其作用机理包括阻断或拮抗但不杀死具有靶抗原的细胞。这样的话耗尽靶细胞并不是所需的并认为存在着副作用。例如,抗 CD4 抗体阻断 T 细胞上 CD4 受体的能力使其能有效地抗炎,甚至它们招募 Fc γ R 受体的能力也可指导免疫系统攻击靶细胞,导致 T 细胞损耗 (Reddy 等.,2000, J Immunol 164:1925-1933)。对于称为放射缀合物的放射标记的抗体以及称为免疫毒素的缀合毒素的抗体而言,效应器功能也许是一道难题。这些药物可用于破坏癌细胞,但是通过 Fc 与 Fc γ R 相互作用所招募的免疫细胞使得健康的免疫细胞接近致死性的负载物(放射物或毒素),导致正常淋巴组织连同靶癌细胞一起损耗 (Hutchins 等.,1995, Proc Natl Acad Sci USA 92:11980-11984; White 等.,2001, Annu Rev Med 52:125-145)。通过使用 IgG 同种型有可能解决该问题,该 IgG 同种型无法充分地招募补体或效应细胞,例如 IgG2 及 IgG4。可选的解决方案是开发能减少或消除结合能力的 Fc 变体 (Alegre 等.,1994, Transplantation 57:1537-1543; Hutchins 等.,1995, Proc Natl Acad Sci USA 92:11980-11984; Armour 等.,1999, Eur J Immunol 29:2613-2624; Reddy 等.,2000, J Immunol 164:1925-1933; Xu 等.,2000, Cell Immunol 200:16-26; Shields 等.,2001, J Biol Chem 276:6591-6604) (US 6,194,551; US 5,885,573; PCT WO 99/58572)。对于减少或消除效应器功能而言,主要的考虑是其它重要的抗体特性不被干扰。应改造 Fc 变体,以不仅消除与 Fc γ Rs 和 / 或 C1q 的结合,而且还能保持抗体的稳定性、可溶性和结构的整体性 (integrity),以及能保持与诸如 FcRn 和蛋白 A 及 G 的其它重要 Fc 配体相互作用的能力。

[0019] 本发明解决了抗体的另一个主要缺点,即它们过分苛求的生产必备条件 (Garber, 2001, Nat Biotechnol 19:184-185; Dove, 2002, Nat Biotechnol 20:777-779)。抗体应当在哺乳动物细胞中表达,且目前市售抗体与其它高度需求的生物治疗药物基本上耗尽了所有可用的制造能力。有数百种生物制剂正在开发中,其中大多数是抗体,迫切需要更有效及更便宜的生产方法。不足的抗体制造能力具有三方面的下游效应。首先,对于生产者而言显著增加了产品成本,即传递给患者的成本。其次,其阻碍了批准的抗体产品的工业化生产,限制了患者高度需求的治疗剂的可用性。最后,因为临床试验需要大量还无利可图的蛋白质,所以不足的供给阻止了抗体市场化的成长过程。

[0020] 已研究用于尝试解决该问题的可选的生产方法。正寻求将转基因植物和动物作为可能的更便宜及更高产的系统 (Chadd 等.,2001, Curr Opin Biotechnol 12:188-194)。然而,该表达系统可产生明显不同于人糖蛋白的糖基化型 (glycosylation patterns)。其可导致效应器功能减少或甚至缺失,因为如上所讨论,该糖结构能显著地影响 Fc γ R 和补体的结合。非人糖型潜在的巨大问题可能是免疫原性;对于免疫系统来说,糖是抗原性的关键来源,并且非人糖型的存在具有相当大的引发抗体中和治疗的机率,或更严重地引起有害的免疫反应。因此,通过转基因植物和动物生产的抗体的疗效和安全性仍无法确定。细菌表达是另一种引人注目的解决抗体生产难题的方案。在诸如大肠杆菌的细菌中表达提供了一种用于生产蛋白质的节省成本和高效的方法。对于诸如抗体等复合物蛋白质而言,在细菌表达中存在许多障碍,包括这些复合物分子的折叠和组装、正确形成二硫键以及缺乏糖基化时的溶解性、稳定性和功能性,因为在细菌中表达的蛋白质不被糖基化。已成功地在大

肠杆菌中表达出能结合抗原的全长非糖基化抗体 (Simmons 等., 2002, J Immunol Methods 263 :133-147), 因此在缺乏真核伴侣蛋白手段下, 细菌性表达抗体的折叠、组装和正确形成二硫键可能发生。然而, 用于治疗细菌性表达抗体的最终功效仍为缺乏糖基化而困扰, 其导致缺乏效应器功能并可导致不良的稳定性和溶解性。对于在高浓度下需要长期临床使用的剂型而言, 很可能存在更多问题。

[0021] 对于上述可选的生产方法而言, 具有有利溶解特性 (solution property) 以及介导效应器功能的能力的非糖基化 (aglycosylated) Fc 将有效地使之成为可能。通过克服非糖基化 Fc 结构和功能上的缺点, 抗体可在细菌中以及转基因植物和动物中生产, 具有减少的免疫原性危险, 以及在诸如癌症的临床应用中具有所需细胞毒性的效应器功能。本发明描述了利用蛋白质工程方法来开发具有效应器功能的稳定、可溶的 Fc 变体。当前, 在本领域中并不存在这样的 Fc 变体。

[0022] 总之, 需要具有增强的治疗特性的抗体。设计优化或增强的 Fc 变体是符合该需求的有前途的方法。虽然, 设计具有所需特性的 Fc 变体的真正障碍在于预测无数可能性中的哪些氨基酸修饰可实现所需目的, 和对于抗体而言效率低的生产和筛选方法。实际上, 对于不完全成功的现有技术而言, 其基本前提之一是使用类似于 Fc 设计的方法, 因此更多地涉及诸如丙氨酸扫描的尝试 (hit-or-miss) 方法或使用不同的表达菌株来产生糖型。在这些研究中, 可进行完全或部分随机的 Fc 修饰希望能获得具有有利特性的变体。本发明提供了多种工程方法, 其中许多基于更完善和更有效的技术, 可用于克服这些障碍以便开发对于所需特性优化的 Fc 变体。所述的工程方法提供了指导 Fc 修饰的设计策略、用于设计有利 Fc 变体的计算筛选方法、用于确定对试验研究有用的抗体的文库产生方法以及用于确定具有有利特性 Fc 变体的一系实验生产和筛选方法。

[0023] 发明概述

[0024] 本发明提供了 Fc 变体, 其许多与治疗相关的特性得到优化。

[0025] 本发明的一个目的是提供新的 Fc 位置, 在该位置上氨基酸修饰可用于产生优化的 Fc 变体。所述 Fc 位置包括 240、244、245、247、262、263、266、299、313、325、328 和 332, 其中 Fc 区中残基编号方式是 Kabat 的 EU 标引方式。本发明描述在任一所述新的 Fc 位置上的任何氨基酸修饰, 以便产生优化的 Fc 变体。

[0026] 本发明的另一个目的是提供计算筛选的 Fc 变体。计算筛选的 Fc 变体是一种通过在本文中所描述的计算筛选计算所预测的变体, 对于优化所需特性而言, 计算筛选较随机方法具有更有效的潜力。可见, 计算筛选可作为试验筛选的前奏或替代品, 因此所述的计算筛选的 Fc 变体被认为是新的。

[0027] 本发明的另一个目的是提供使用一种或多种本文所述的实验方法鉴定的 Fc 变体。在一个实施方案中, 所述 Fc 变体包含至少一种氨基酸取代, 该取代所位于的位置选自: 234、235、239、240、241、243、244、245、247、262、263、264、265、266、267、269、296、297、298、299、313、325、327、328、329、330 或 332, 其中 Fc 区中残基编号方式是 Kabat 的 EU 标引方式。在一个优选的实施方案中, 所述 Fc 变体包含至少一种取代, 选自: L234D、L234E、L234N、L234Q、L234T、L234H、L234Y、L234I、L234V、L234F、L235D、L235S、L235N、L235Q、L235T、L235H、L235Y、L235I、L235V、L235F、S239D、S239E、S239N、S239Q、S239F、S239T、S239H、S239Y、V240I、V240A、V240T、V240M、F241W、F241L、F241Y、F241E、F241R、F243W、F243L、

F243Y、F243R、F243Q、P244H、P245A、P247V、P247G、V262I、V262A、V262T、V262E、V263I、V263A、V263T、V263M、V264L、V264I、V264W、V264T、V264R、V264F、V264M、V264Y、V264E、D265G、D265N、D265Q、D265Y、D265F、D265V、D265I、D265L、D265H、D265T、V266I、V266A、V266T、V266M、S267Q、S267L、E269H、E269Y、E269F、E269R、Y296E、Y296Q、Y296D、Y296N、Y296S、Y296T、Y296L、Y296I、Y296H、N297S、N297D、N297E、A298H、T299I、T299L、T299A、T299S、T299V、T299H、T299F、T299E、W313F、N325Q、N325L、N325I、N325D、N325E、N325A、N325T、N325V、N325H、A327N、A327L、L328M、L328D、L328E、L328N、L328Q、L328F、L328I、L328V、L328T、L328H、L328A、P329F、A330L、A330Y、A330V、A330I、A330F、A330R、A330H、I332D、I332E、I332N、I332Q、I332T、I332H、I332Y 和 I332A, 其中 Fc 区中残基编号方式是 Kabat 的 EU 标引方式。在一个最优化的实施方案中, 所述 Fc 变体选自: V264L、V264I、F241W、F241L、F243W、F243L、F241L/F243L/V262I/V264I、F241W/F243W、F241W/F243W/V262A/V264A、F241L/V262I、F243L/V264I、F243L/V262I/V264W、F241Y/F243Y/V262T/V264T、F241E/F243R/V262E/V264R、F241E/F243Q/V262T/V264E、F241R/F243Q/V262T/V264R、F241E/F243Y/V262T/V264R、L328M、L328E、L328F、I332E、L328M/I332E、P244H、P245A、P247V、W313F、P244H/P245A/P247V、P247G、V264I/I332E、F241E/F243R/V262E/V264R/I332E、F241E/F243Q/V262T/V264E/I332E、F241R/F243Q/V262T/V264R/I332E、F241E/F243Y/V262T/V264R/I332E、S298A/I332E、S239E/I332E、S239Q/I332E、S239E、D265G、D265N、S239E/D265G、S239E/D265N、S239E/D265Q、Y296E、Y296Q、T299I、A327N、S267Q/A327S、S267L/A327S、A327L、P329F、A330L、A330Y、I332D、N297S、N297D、N297S/I332E、N297D/I332E、N297E/I332E、D265Y/N297D/I332E、D265Y/N297D/T299L/I332E、D265F/N297E/I332E、L328I/I332E、L328Q/I332E、I332N、I332Q、V264T、V264F、V240I、V263I、V266I、T299A、T299S、T299V、N325Q、N325L、N325I、S239D、S239N、S239F、S239D/I332D、S239D/I332E、S239D/I332N、S239D/I332Q、S239E/I332D、S239E/I332N、S239E/I332Q、S239N/I332D、S239N/I332E、S239N/I332N、S239N/I332Q、S239Q/I332D、S239Q/I332N、S239Q/I332Q、Y296D、Y296N、F241Y/F243Y/V262T/V264T/N297D/I332E、A330Y/I332E、V264I/A330Y/I332E、A330L/I332E、V264I/A330L/I332E、L234D、L234E、L234N、L234Q、L234T、L234H、L234Y、L234I、L234V、L234F、L235D、L235S、L235N、L235Q、L235T、L235H、L235Y、L235I、L235V、L235F、S239T、S239H、S239Y、V240A、V240T、V240M、V263A、V263T、V263M、V264M、V264Y、V266A、V266T、V266M、E269H、E269Y、E269F、E269R、Y296S、Y296T、Y296L、Y296I、A298H、T299H、A330V、A330I、A330F、A330R、A330H、N325D、N325E、N325A、N325T、N325V、N325H、L328D/I332E、L328E/I332E、L328N/I332E、L328Q/I332E、L328V/I332E、L328T/I332E、L328H/I332E、L328I/I332E、L328A、I332T、I332H、I332Y、I332A、S239E/V264I/I332E、S239Q/V264I/I332E、S239E/V264I/A330Y/I332E、S239E/V264I/S298A/A330Y/I332E、S239D/N297D/I332E、S239E/N297D/I332E、S239D/D265V/N297D/I332E、S239D/D265I/N297D/I332E、S239D/D265L/N297D/I332E、S239D/D265F/N297D/I332E、S239D/D265Y/N297D/I332E、S239D/D265H/N297D/I332E、S239D/D265T/N297D/I332E、V264E/N297D/I332E、Y296D/N297D/I332E、Y296E/N297D/I332E、Y296N/N297D/I332E、Y296Q/N297D/I332E、Y296H/N297D/I332E、Y296T/N297D/I332E、N297D/T299V/I332E、N297D/T299I/I332E、N297D/T299L/I332E、N297D/T299F/I332E、N297D/T299H/

I332E、N297D/T299E/I332E、N297D/A330Y/I332E、N297D/S298A/A330Y/I332E、S239D/A330Y/I332E、S239N/A330Y/I332E、S239D/A330L/I332E、S239N/A330L/I332E、V264I/S298A/I332E、S239D/S298A/I332E、S239N/S298A/I332E、S239D/V264I/I332E、S239D/V264I/S298A/I332E 和 S239D/V264I/A330L/I332E, 其中 Fc 区中残基编号方式是 Kabat 的 EU 标引方式。

[0028] 本发明的另一个目的是提供与一种或多种 Fc γ Rs 的结合具有更强亲和力的 Fc 变体。在一个实施方案中, 所述 Fc 变体较亲本 Fc 多肽对 Fc γ R 的亲和力增加超过 1 倍。在一个可选的实施方案中, 所述 Fc 变体较亲本 Fc 多肽对 Fc γ R 的亲和力增加超过 5 倍。在一个优选的实施方案中, 所述 Fc 变体较亲本 Fc 多肽对 Fc γ R 的亲和力增加在 5 倍至 300 倍之间。在一个实施方案中, 所述 Fc 变体包含至少一种氨基酸取代, 该取代所位于的位置选自 :234、235、239、240、243、264、266、328、330、332 和 325, 其中 Fc 区中残基编号方式是 Kabat 的 EU 标引方式。在一个优选的实施方案中, 所述 Fc 变体包含至少一种氨基酸取代, 选自 :L234E、L234Y、L234I、L235D、L235S、L235Y、L235I、S239D、S239E、S239N、S239Q、S239T、V240I、V240M、F243L、V264I、V264T、V264Y、V266I、L328M、L328I、L328Q、L328D、L328V、L328T、A330Y、A330L、A330I、I332D、I332E、I332N、I332Q 和 N325T, 其中 Fc 区中残基编号方式是 Kabat 的 EU 标引方式。在一个最优选的实施方案中, 所述 Fc 变体选自 :V264I、F243L/V264I、L328M、I332E、L328M/I332E、V264I/I332E、S298A/I332E、S239E/I332E、S239Q/I332E、S239E、A330Y、I332D、L328I/I332E、L328Q/I332E、V264T、V240I、V266I、S239D、S239D/I332D、S239D/I332E、S239D/I332N、S239D/I332Q、S239E/I332D、S239E/I332N、S239E/I332Q、S239N/I332D、S239N/I332E、S239Q/I332D、A330Y/I332E、V264I/A330Y/I332E、A330L/I332E、V264I/A330L/I332E、L234E、L234Y、L234I、L235D、L235S、L235Y、L235I、S239T、V240M、V264Y、A330I、N325T、L328D/I332E、L328V/I332E、L328T/I332E、L328I/I332E、S239E/V264I/I332E、S239Q/V264I/I332E、S239E/V264I/A330Y/I332E、S239D/A330Y/I332E、S239N/A330Y/I332E、S239D/A330L/I332E、S239N/A330L/I332E、V264I/S298A/I332E、S239D/S298A/I332E、S239N/S298A/I332E、S239D/V264I/I332E、S239D/V264I/S298A/I332E 和 S239D/V264I/A330L/I332E, 其中 Fc 区中残基编号方式是 Kabat 的 EU 标引方式。

[0029] 本发明的另一个目的是提供具有 Fc γ RIIIa- 倍数 : Fc γ RIIb- 倍数比率大于 1 : 1 的 Fc 变体。在一个实施方案中, 所述 Fc 变体具有 Fc γ RIIIa- 倍数 : Fc γ RIIb- 倍数比率大于 11 : 1。在一个优选的实施方案中, 所述 Fc 变体具有在 11 : 1 至 86 : 1 之间的 Fc γ RIIIa- 倍数 : Fc γ RIIb- 倍数比率。在一个实施方案中, 所述 Fc 变体包含至少一种氨基酸取代, 该取代所位于的位置选自 :234、235、239、240、264、296、330 和 I332, 其中 Fc 区中残基编号方式是 Kabat 的 EU 标引方式。在一个优选的实施方案中, 所述 Fc 变体包含至少一种氨基酸取代, 选自 :L234Y、L234I、L235I、S239D、S239E、S239N、S239Q、V240A、V240M、V264I、V264Y、Y296Q、A330L、A330Y、A330I、I332D 和 I332E, 其中 Fc 区中残基编号方式是 Kabat 的 EU 标引方式。在一个最优选的实施方案中, 所述 Fc 变体选自 :I332E、V264I/I332E、S239E/I332E、S239Q/I332E、Y296Q、A330L、A330Y、I332D、S239D、S239D/I332E、A330Y/I332E、V264I/A330Y/I332E、A330L/I332E、V264I/A330L/I332E、L234Y、L234I、L235I、V240A、V240M、V264Y、A330I、S239D/A330L/I332E、S239D/S298A/I332E、S239N/

S298A/I332E、S239D/V264I/I332E、S239D/V264I/S298A/I332E 和 S239D/V264I/A330L/I332E,其中 Fc 区中残基编号方式是 Kabat 的 EU 标引方式。

[0030] 本发明的另一个目的是提供在存在效应细胞条件下能更有效地介导效应器功能的 Fc 变体。在一个实施方案中,所述 Fc 变体较亲本 Fc 多肽更能介导 ADCC。在一个优选的实施方案中,所述 Fc 变体较亲本 Fc 多肽介导 ADCC 增加超过 5 倍。在一个最优选的实施方案中,所述 Fc 变体较亲本 Fc 多肽介导 ADCC 增加 5-50 倍。在一个实施方案中,所述 Fc 变体包含至少一种氨基酸取代,该取代所在位置选自:234、235、239、240、243、264、266、328、330、332 和 325,其中 Fc 区中残基编号方式是 Kabat 的 EU 标引方式。在一个优选的实施方案中,所述 Fc 变体包含至少一种氨基酸取代,选自:L234E、L234Y、L234I、L235D、L235S、L235Y、L235I、S239D、S239E、S239N、S239Q、S239T、V240I、V240M、F243L、V264I、V264T、V264Y、V266I、L328M、L328I、L328Q、L328D、L328V、L328T、A330Y、A330L、A330I、I332D、I332E、I332N、I332Q 和 N325T,其中 Fc 区中残基编号方式是 Kabat 的 EU 标引方式。在一个最优选的实施方案中,所述 Fc 变体选自:V264I、F243L/V264I、L328M、I332E、L328M/I332E、V264I/I332E、S298A/I332E、S239E/I332E、S239Q/I332E、S239E、A330Y、I332D、L328I/I332E、L328Q/I332E、V264T、V240I、V266I、S239D、S239D/I332D、S239D/I332E、S239D/I332N、S239D/I332Q、S239E/I332D、S239E/I332N、S239E/I332Q、S239N/I332D、S239N/I332E、S239Q/I332D、A330Y/I332E、V264I/A330Y/I332E、A330L/I332E、V264I/A330L/I332E、L234E、L234Y、L234I、L235D、L235S、L235Y、L235I、S239T、V240M、V264Y、A330I、N325T、L328D/I332E、L328V/I332E、L328T/I332E、L328I/I332E、S239E/V264I/I332E、S239Q/V264I/I332E、S239E/V264I/A330Y/I332E、S239D/A330Y/I332E、S239N/A330Y/I332E、S239D/A330L/I332E、S239N/A330L/I332E、V264I/S298A/I332E、S239D/S298A/I332E、S239N/S298A/I332E、S239D/V264I/I332E、S239D/V264I/S298A/I332E 和 S239D/V264I/A330L/I332E,其中 Fc 区中残基编号方式是 Kabat 的 EU 标引方式。

[0031] 本发明的另一个目的是提供与一种或多种 Fc γ Rs 的结合具有较弱亲和力的 Fc 变体。在一个实施方案中,所述 Fc 变体包含至少一种氨基酸取代,该取代所在位置选自:234、235、239、240、241、243、244、245、247、262、263、264、265、266、267、269、296、297、298、299、313、325、327、328、329、330 和 332,其中 Fc 区中残基编号方式是 Kabat 的 EU 标引方式。在一个优选的实施方案中,所述 Fc 变体包含一种氨基酸取代,所在位点选自:L234D、L234N、L234Q、L234T、L234H、L234V、L234F、L235N、L235Q、L235T、L235H、L235V、L235F、S239E、S239N、S239Q、S239F、S239H、S239Y、V240A、V240T、F241W、F241L、F241Y、F241E、F241R、F243W、F243L、F243Y、F243R、F243Q、P244H、P245A、P247V、P247G、V262I、V262A、V262T、V262E、V263I、V263A、V263T、V263M、V264L、V264I、V264W、V264T、V264R、V264F、V264M、V264E、D265G、D265N、D265Q、D265Y、D265F、D265V、D265I、D265L、D265H、D265T、V266A、V266T、V266M、S267Q、S267L、E269H、E269Y、E269F、E269R、Y296E、Y296Q、Y296D、Y296N、Y296S、Y296T、Y296L、Y296I、Y296H、N297S、N297D、N297E、A298H、T299I、T299L、T299A、T299S、T299V、T299H、T299F、T299E、W313F、N325Q、N325L、N325I、N325D、N325E、N325A、N325V、N325H、A327N、A327L、L328M、L328E、L328N、L328Q、L328F、L328H、L328A、P329F、A330L、A330V、A330F、A330R、A330H、I332N、I332Q、I332T、I332H、I332Y 和 I332A,其中 Fc 区中残基编号方式是 Kabat 的 EU 标引方式。在一个最优选的实施方案中,所述 Fc 变体选

自 :V264L、F241W、F241L、F243W、F243L、F241L/F243L/V262I/V264I、F241W/F243W、F241W/F243W/V262A/V264A、F241L/V262I、F243L/V262I/V264W、F241Y/F243Y/V262T/V264T、F241E/F243R/V262E/V264R、F241E/F243Q/V262T/V264E、F241R/F243Q/V262T/V264R、F241E/F243Y/V262T/V264R、L328M、L328E、L328F、P244H、P245A、P247V、W313F、P244H/P245A/P247V、P247G、F241 E/F243R/V262E/V264R/I332E、F241E/F243Y/V262T/V264R/I332E、D265G、D265N、S239E/D265G、S239E/D265N、S239E/D265Q、Y296E、Y296Q、T299I、A327N、S267Q/A327S、S267L/A327S、A327L、P329F、A330L、N297S、N297D、N297S/I332E、I332N、I332Q、V264F、V263I、T299A、T299S、T299V、N325Q、N325L、N325I、S239N、S239F、S239N/I332N、S239N/I332Q、S239Q/I332N、S239Q/I332Q、Y296D、Y296N、L234D、L234N、L234Q、L234T、L234H、L234V、L234F、L235N、L235Q、L235T、L235H、L235V、L235F、S239H、S239Y、V240A、V263T、V263M、V264M、V266A、V266T、V266M、E269H、E269Y、E269F、E269R、Y296S、Y296T、Y296L、Y296I、A298H、T299H、A330V、A330F、A330R、A330H、N325D、N325E、N325A、N325V、N325H、L328E/I332E、L328N/I332E、L328Q/I332E、L328H/I332E、L328A、I332T、I332H、I332Y 和 I332A,其中 Fc 区中残基编号方式是 Kabat 的 EU 标引方式。

[0032] 本发明的另一个目的是提供在存在效应细胞条件下能更低效地介导 ADCC 的 Fc 变体。在一个实施方案中,所述 Fc 变体包含至少一种氨基酸取代,该取代所在位置选自 :234、235、239、240、241、243、244、245、247、262、263、264、265、266、267、269、296、297、298、299、313、325、327、328、329、330 和 332,其中 Fc 区中残基编号方式是 Kabat 的 EU 标引方式。在一个优选的实施方案中,所述 Fc 变体包含至少一种氨基酸取代,该取代所在位置选自 :L234D、L234N、L234Q、L234T、L234H、L234V、L234F、L235N、L235Q、L235T、L235H、L235V、L235F、S239E、S239N、S239Q、S239F、S239H、S239Y、V240A、V240T、F241W、F241L、F241Y、F241E、F241R、F243W、F243L、F243Y、F243R、F243Q、P244H、P245A、P247V、P247G、V262I、V262A、V262T、V262E、V263I、V263A、V263T、V263M、V264L、V264I、V264W、V264T、V264R、V264F、V264M、V264E、D265G、D265N、D265Q、D265Y、D265F、D265V、D265I、D265L、D265H、D265T、V266A、V266T、V266M、S267Q、S267L、E269H、E269Y、E269F、E269R、Y296E、Y296Q、Y296D、Y296N、Y296S、Y296T、Y296L、Y296I、Y296H、N297S、N297D、N297E、A298H、T299I、T299L、T299A、T299S、T299V、T299H、T299F、T299E、W313F、N325Q、N325L、N325I、N325D、N325E、N325A、N325V、N325H、A327N、A327L、L328M、328E、L328N、L328Q、L328F、L328H、L328A、P329F、A330L、A330V、A330F、A330R、A330H、I332N、I332Q、I332T、I332H、I332Y 和 I332A,其中 Fc 区中残基编号方式是 Kabat 的 EU 标引方式。在一个最优选的实施方案中,所述 Fc 变体选自 :V264L、F241W、F241L、F243W、F243L、F241L/F243L/V262I/V264I、F241W/F243W、F241W/F243W/V262A/V264A、F241L/V262I、F243L/V262I/V264W、F241Y/F243Y/V262T/V264T、F241E/F243R/V262E/V264R、F241E/F243Q/V262T/V264E、F241R/F243Q/V262T/V264R、F241E/F243Y/V262T/V264R、L328M、L328E、L328F、P244H、P245A、P247V、W313F、P244H/P245A/P247V、P247G、F241E/F243R/V262E/V264R/I332E、F241E/F243Y/V262T/V264R/I332E、D265G、D265N、S239E/D265G、S239E/D265N、S239E/D265Q、Y296E、Y296Q、T299I、A327N、S267Q/A327S、S267L/A327S、A327L、P329F、A330L、N297S、N297D、N297S/I332E、I332N、I332Q、V264F、V263I、T299A、T299S、T299V、N325Q、N325L、N325I、S239N、S239F、S239N/I332N、S239N/I332Q、S239Q/I332N、S239Q/I332Q、Y296D、Y296N、

L234D、L234N、L234Q、L234T、L234H、L234V、L234F、L235N、L235Q、L235T、L235H、L235V、L235F、S239H、S239Y、V240A、V263T、V263M、V264M、V266A、V266T、V266M、E269H、E269Y、E269F、E269R、Y296S、Y296T、Y296L、Y296I、A298H、T299H、A330V、A330F、A330R、A330H、N325D、N325E、N325A、N325V、N325H、L328E/I332E、L328N/I332E、L328Q/I332E、L328H/I332E、L328A、I332T、I332H、I332Y 和 I332A,其中 Fc 区中残基编号方式是 Kabat 的 EU 标引方式

[0033] 本发明的另一个目的是提供相对于亲本 Fc 多肽的非糖型具有改良的功能和 / 或溶解特性的 Fc 变体。本文中改良的功能性包括但不限于与 Fc 配体的结合亲和力。本文中改良的溶解特性包括但不限于稳定性和溶解性。在一个实施方案中,所述非糖基化 Fc 变体较糖基化亲本 Fc 多肽与 Fc γ R 的结合所具有的亲和力是可比的或更大。在一个可选的实施方案中,所述 Fc 变体与 Fc γ R 的结合所具有的亲和力是在亲本 Fc 多肽糖基化型的 0.4- 倍范围内。在一个实施方案中,所述 Fc 变体包含至少一种氨基酸取代,该取代所在位置选自: 239、241、243、262、264、265、296、297、330 和 332,其中 Fc 区中残基编号方式是 Kabat 的 EU 标引方式。在一个优选的实施方案中,所述 Fc 变体包含一种氨基酸取代,选自: S239D、S239E、F241Y、F243Y、V262T、V264T、V264E、D265Y、D265H、Y296N、N297D、A330Y 和 I332E,其中 Fc 区中残基编号方式是 Kabat 的 EU 标引方式。在一个最优选的实施方案中,所述 Fc 变体选自: N297D/I332E、F241Y/F243Y/V262T/V264T/N297D/I332E、S239D/N297D/I332E、S239E/N297D/I332E、S239D/D265Y/N297D/I332E、S239D/D265H/N297D/I332E、V264E/N297D/I332E、Y296N/N297D/I332E 和 N297D/A330Y/I332E,其中 Fc 区中残基编号方式是 Kabat 的 EU 标引方式。

[0034] 本发明也提供了用于设计优化的 Fc 变体的方法。本发明的一个目的是提供可用于指导 Fc 优化的设计策略。本发明的另一个目的是提供可用于设计 Fc 变体的计算筛选方法。本发明的另一个目的是提供产生用于实验测试文库的方法。本发明的另一个目的是提供用于获得优化的 Fc 变体的实验生产和筛选方法。

[0035] 本发明提供了编码本文所述 Fc 变体的分离的核酸。本发明提供了包含所述核酸的载体,任选地,可操作地连接调控序列。本发明提供了包含该载体的宿主细胞,以及用于生产和任选地回收该 Fc 变体的方法。

[0036] 本发明提供了包含本文所公开的 Fc 变体的新抗体及 Fc 融合体。所述新抗体及 Fc 融合体可在治疗产品中使用。

[0037] 本发明提供了包含抗体及 Fc 融合体以及生理学上或药理学上可接受的载体或稀释剂的组合物,所述抗体及 Fc 融合体包含本文所述的 Fc 变体。

[0038] 本发明提供了包含本文所公开的 Fc 变体的抗体及 Fc 融合体的治疗与诊断用途。

[0039] 本发明还涉及:

[0040] 1. 一种包含 Fc 变体部分的抗体,在所述的亲本 Fc 多肽的 Fc 区中包含至少一种氨基酸修饰,与亲本 Fc 多肽比较其中所述 Fc 变体调节与 Fc γ R 的结合。

[0041] 2. 根据项 1 所述的抗体,其中所述调节是所述抗体对所述 Fc γ R 亲和力的增加。

[0042] 3. 根据项 1 所述的抗体,其中所述 Fc 变体部分在相应于人序列位置的位置包含至少一种取代,所述人序列位置选自 234、235、239、240、241、243、244、245、247、262、263、264、265、266、267、269、296、297、298、299、313、325、326、327、328、329、330、332、333 和 334 组成

的组。

[0043] 4. 根据项 1 所述的抗体,其中所述 Fc 变体在相应于人序列位置的位置包含至少一种取代,所述人序列位置选自 240、244、245、247、262、263、266、299、313、325、328 和 332 组成的组。

[0044] 5. 根据项 1 所述的抗体,其中所述 Fc 变体包含在位置 332 的取代。

[0045] 6. 根据项 1 所述的抗体,其中至少一种取代位于选自 239、264、297 和 330 的位置,附带条件是如果所述序列基本上是人的,所述取代不是 S239A、V264A、N297A、N297Q、A330D、A330Q、A330K,或 A330S。

[0046] 7. 根据项 1 所述的抗体,其中所述 Fc 变体包含至少一种取代,选自 234D、234E、234N、234Q、234T、234H、234Y、234I、234V、234F、235D、235S、235N、235Q、235T、235H、235Y、235I、235V、235F、239D、239E、239N、239Q、239F、239T、239H、239Y、240I、240A、240T、240M、241W、241L、241Y、241E、241R、243W、243L、243Y、243R、243Q、244H、245A、247V、247G、262I、262A、262T、262E、263I、263A、263T、263M、264L、264I、264W、264T、264R、264F、264M、264Y、264E、265G、265N、265Q、265Y、265F、265V、265I、265L、265H、265T、266I、266A、266T、266M、267Q、267L、269H、269Y、269F、269R、296E、296Q、296D、296N、296S、296T、296L、296I、296H、297S、297D、297E、298H、299I、299L、299A、299S、299V、299H、299F、299E、313F、325Q、325L、325I、325D、325E、325A、325T、325V、325H、327N、327L、328M、328D、328E、328N、328Q、328F、328I、328V、328T、328H、328A、329F、330L、330Y、330V、330I、330F、330R、330H、332D、332E、332N、332Q、332T、332H、332Y 和 332A 组成的组。

[0047] 8. 根据项 1 所述的抗体,其中所述 Fc 变体选自 264L、264I、241W、241L、243W、243L、241L/243L/262I/264I、241W/243W、241W/243W/262A/264A、241L/262I、243L/264I、243L/262I/264W、241Y/243Y/262T/264T、241E/243R/262E/264R、241E/243Q/262T/264E、241R/243Q/262T/264R、241E/243Y/262T/264R、328M、328E、328F、332E、328M/332E、244H、245A、247V、313F、244H/245A/247V、247G、264I/332E、241E/243R/262E/264R/332E、241E/243Q/262T/264E/332E、241R/243Q/262T/264R/332E、241E/243Y/262T/264R/332E、298A/332E、239E/332E、239Q/332E、239E、265G、265N、239E/265G、239E/265N、239E/265Q、296E、296Q、299I、327N、267Q/327S、267L/327S、327L、329F、330L、330Y、332D、297S、297D、297S/332E、297D/332E、297E/332E、265Y/297D/332E、265Y/297D/299L/332E、265F/297E/332E、328I/332E、328Q/332E、332N、332Q、264T、264F、240I、263I、266I、299A、299S、299V、325Q、325L、325I、239D、239N、239F、239D/332D、239D/332E、239D/332N、239D/332Q、239E/332D、239E/332N、239E/332Q、239N/332D、239N/332E、239N/332N、239N/332Q、239Q/332D、239Q/332N、239Q/332Q、296D、296N、241Y/243Y/262T/264T/297D/332E、330Y/332E、264I/330Y/332E、330L/332E、264I/330L/332E、234D、234E、234N、234Q、234T、234H、234Y、234I、234V、234F、235D、235S、235N、235Q、235T、235H、235Y、235I、235V、235F、239T、239H、239Y、240A、240T、240M、263A、263T、263M、264M、264Y、266A、266T、266M、269H、269Y、269F、269R、296S、296T、296L、296I、298H、299H、330V、330I、330F、330R、330H、325D、325E、325A、325T、325V、325H、328D/332E、328E/332E、328N/332E、328Q/332E、328V/332E、328T/332E、328H/332E、328I/332E、328A、332T、332H、332Y、332A、239E/264I/332E、239Q/264I/332E、239E/264I/330Y/332E、

239E/264I/298A/330Y/332E、239D/297D/332E、239E/297D/332E、239D/265V/297D/332E、239D/265I/297D/332E、239D/265L/297D/332E、239D/265F/297D/332E、239D/265Y/297D/332E、239D/265H/297D/332E、239D/265T/297D/332E、264E/297D/332E、296D/297D/332E、296E/297D/332E、296N/297D/332E、296Q/297D/332E、296H/297D/332E、296T/297D/332E、297D/299V/332E、297D/299I/332E、297D/299L/332E、297D/299F/332E、297D/299H/332E、297D/299E/332E、297D/330Y/332E、297D/298A/330Y/332E、239D/330Y/332E、239N/330Y/332E、239D/330L/332E、239N/330L/332E、264I/298A/332E、239D/298A/332E、239N/298A/332E、239D/264I/332E、239D/264I/298A/332E 和 239D/264I/330L/332E 组成的组。

[0048] 9. 根据项 7 所述的抗体,其中所述 Fc 变体部分在相应于人序列位置组成的组的位置,进一步包含至少一种取代,所述人序列位置选自 256、270、290、298、312、322、326、329、331、333、334 和 339 组成的组。

[0049] 10. 根据项 1 所述的抗体,其中所述 Fc γ R 是 Fc γ RIIIa。

[0050] 11. 根据项 10 所述的抗体,其中所述 Fc γ RIIIa 是 V158 或 F158Fc γ RIIIa 的同种异型。

[0051] 12. 根据项 2 所述的 Fc 变体,其中所述亲本 Fc 多肽基本上是人的,以及所述亲和力较所述的亲本 Fc 多肽高约 5 倍。

[0052] 13. 根据项 12 所述的抗体,其中所述亲本 Fc 多肽基本上是人的,以及所述亲和力较所述亲本 Fc 多肽高约 5- 约 300 倍。

[0053] 14. 根据项 12 所述的抗体,其中所述 Fc 变体部分在相应于人序列位置的位置包含至少一种取代,所述人序列位置选自 234、235、239、240、243、264、266、328、330、332 和 325 组成的组。

[0054] 15. 根据项 14 所述的抗体,其中所述 Fc 变体包含至少一种取代,选自 234E、234Y、234I、235D、235S、235Y、235I、239D、239E、239N、239Q、239T、240I、240M、243L、264I、264T、264Y、266I、328M、328I、328Q、328D、328V、328T、330Y、330L、330I、332D、332E、332N、332Q 和 325T 组成的组。

[0055] 16. 根据项 15 所述的抗体,其中所述 Fc 变体选自 264I、243L/264I、328M、332E、328M/332E、264I/332E、298A/332E、239E/332E、239Q/332E、239E、330Y、332D、328I/332E、328Q/332E、264T、240I、266I、239D、239D/332D、239D/332E、239D/332N、239D/332Q、239E/332D、239E/332N、239E/332Q、239N/332D、239N/332E、239Q/332D、330Y/332E、264I/330Y/332E、330L/332E、264I/330L/332E、234E、234Y、234I、235D、235S、235Y、235I、239T、240M、264Y、330I、325T、328D/332E、328V/332E、328T/332E、328I/332E、239E/264I/332E、239Q/264I/332E、239E/264I/330Y/332E、239D/330Y/332E、239N/330Y/332E、239D/330L/332E、239N/330L/332E、264I/298A/332E、239D/298A/332E、239N/298A/332E、239D/264I/332E、239D/264I/298A/332E 和 239D/264I/330L/332E 组成的组。

[0056] 17. 根据项 15 所述的抗体,其中所述 Fc 变体在选自 256、270、290、298、312、322、326、329、331、333、334 和 339 组成的组组成的组的位置,进一步包含至少一种取代。

[0057] 18. 根据项 1 或 2 所述的抗体,其中所述亲本 Fc 多肽基本上是人的、小鼠的、大鼠

的或猴子的。

[0058] 19. 根据项 1 或 2 所述的抗体,其中与一种或多种 Fc 配体的结合是未改变的。

[0059] 20. 根据项 19 所述的抗体,其中所述 Fc 配体选自由 C1q、FcRn、蛋白 A 和蛋白 G 组成的组。

[0060] 21. 根据项 1 或 2 所述的抗体,其中 CDC 不受影响。

[0061] 22. 根据项 1 或 2 所述的抗体,其中与一种或多种 Fc 配体的结合是改变的。

[0062] 23. 根据项 1 所述的抗体,其中所述 Fc 变体具有的 Fc γ RIIIa 倍数 : Fc γ RIIb 倍数比率大于 1。

[0063] 24. 根据项 23 所述的抗体,其中所述 Fc 变体具有的 Fc γ RIIIa 倍数 : Fc γ RIIb 倍数比率大于约 11 : 1。

[0064] 25. 根据项 24 所述的抗体,其中所述 Fc 变体具有的 Fc γ RIIIa 倍数 : Fc γ RIIb 倍数比率在约 11 : 1- 约 86 : 1。

[0065] 26. 根据项 23 所述的抗体,其中所述 Fc 变体部分在相应于人序列位置的位置包含至少一种取代,所述人序列位置选自由 234、235、239、240、264、296、330 和 I332 组成的组。

[0066] 27. 根据项 26 所述的抗体,其中所述 Fc 变体包含至少一种取代,选自由 234Y、234I、235I、239D、239E、239N、239Q、240A、240M、264I、264Y、296Q、330L、330Y、330I、332D 和 332E 组成的组。

[0067] 28. 根据项 27 所述的抗体,其中所述 Fc 变体选自由 332E、264I/332E、239E/332E、239Q/332E、296Q、330L、330Y、332D、239D、239D/332E、330Y/332E、264I/330Y/332E、330L/332E、264I/330L/332E、234Y、234I、235I、240A、240M、264Y、330I、239D/330L/332E、239D/298A/332E、239N/298A/332E、239D/264I/332E、239D/264I/298A/332E 和 239D/264I/330L/332E 组成的组。

[0068] 29. 根据项 26 所述的抗体,其中所述 Fc 变体在选自由 256、270、290、298、312、322、326、329、331、333、334 和 339 组成的组的位置,进一步包含一种或多种取代。

[0069] 30. 根据项 1 所述的抗体,其中相对于亲本 Fc 多肽所述 Fc 变体与至少一种 Fc γ R 的结合具有减少的亲和力。

[0070] 31. 根据项 1 所述的抗体,其中所述 Fc γ R 是 Fc γ RIIIa。

[0071] 32. 根据项 31 所述的抗体,其中所述 Fc 变体包含至少一种取代,选自由 234D、234N、234Q、234T、234H、234V、234F、235N、235Q、235T、235H、235V、235F、239E、239N、239Q、239F、239H、239Y、240A、240T、241W、241L、241Y、241E、241R、243W、243L、243Y、243R、243Q、244H、245A、247V、247G、262I、262A、262T、262E、263I、263A、263T、263M、264L、264I、264W、264T、264R、264F、264M、264E、265G、265N、265Q、265Y、265F、265V、265I、265L、265H、265T、266A、266T、266M、267Q、267L、269H、269Y、269F、269R、296E、296Q、296D、296N、296S、296T、296L、296I、296H、297S、297D、297E、298H、299I、299L、299A、299S、299V、299H、299F、299E、313F、325Q、325L、325I、325D、325E、325A、325V、325H、327N、327L、328M、328E、328N、328Q、328F、328H、328A、329F、330L、330V、330F、330R、330H、332N、332Q、332T、332H、332Y 和 332A 组成的组。

[0072] 33. 根据项 31 所述的抗体,其中所述 Fc 变体选自由 264L、241W、241L、243W、243L、241L/243L/262I/264I、241W/243W、241W/243W/262A/264A、241L/262I、

243L/262I/264W、241Y/243Y/262T/264T、241E/243R/262E/264R、241E/243Q/262T/264E、241R/243Q/262T/264R、241E/243Y/262T/264R、328M、328E、328F、244H、245A、247V、313F、244H/245A/247V、247G、241E/243R/262E/264R/332E、241E/243Y/262T/264R/332E、265G、265N、239E/265G、239E/265N、239E/265Q、296E、296Q、299I、327N、267Q/327S、267L/327S、327L、329F、330L、297S、297D、297S/332E、332N、332Q、264F、263I、299A、299S、299V、325Q、325L、325I、239N、239F、239N/332N、239N/332Q、239Q/332N、239Q/332Q、296D、296N、234D、234N、234Q、234T、234H、234V、234F、235N、235Q、235T、235H、235V、235F、239H、239Y、240A、263T、263M、264M、266A、266T、266M、269H、269Y、269F、269R、296S、296T、296L、296I、298H、299H、330V、330F、330R、330H、325D、325E、325A、325V、325H、328E/332E、328N/332E、328Q/332E、328H/332E、328A、332T、332H、332Y 和 332A 组成的组。

[0073] 34. 一种包含亲本 Fc 多肽变体的抗体,在所述的亲本 Fc 多肽的 Fc 区中包含至少一种氨基酸修饰,与亲本 Fc 多肽比较其中所述 Fc 变体调节效应器功能。

[0074] 35. 根据项 34 所述的抗体,其中所述效应器功能是 ADCC。

[0075] 36. 根据项 35 所述的抗体,其中所述 Fc 变体的 ADCC 较所述亲本 Fc 多肽改善。

[0076] 37. 根据项 36 所述的抗体,其中所述 Fc 变体的 ADCC 较所述亲本 Fc 多肽提高约 5 倍。

[0077] 38. 根据项 37 所述的抗体,其中所述 Fc 变体的 ADCC 较所述亲本 Fc 多肽提高约 5- 约 50 倍。

[0078] 39. 根据项 37 所述的抗体,其中所述 Fc 变体部分在相应于人序列位置的位置包含至少一种取代,所述人序列位置选自 234、235、239、240、243、264、266、328、330、332 和 325 组成的组。

[0079] 40. 根据项 39 所述的抗体,其中所述 Fc 变体包含至少一种取代,选自 234E、234Y、234I、235D、235S、235Y、235I、239D、239E、239N、239Q、239T、240I、240M、243L、264I、264T、264Y、266I、328M、328I、328Q、328D、328V、328T、330Y、330L、330I、332D、332E、332N、332Q 和 325T 组成的组。

[0080] 41. 根据项 39 所述的抗体,其中所述 Fc 变体选自 264I、243L/264I、328M、332E、328M/332E、264I/332E、298A/332E、239E/332E、239Q/332E、239E、330Y、332D、328I/332E、328Q/332E、264T、240I、266I、239D、239D/332D、239D/332E、239D/332N、239D/332Q、239E/332D、239E/332N、239E/332Q、239N/332D、239N/332E、239Q/332D、330Y/332E、264I/330Y/332E、330L/332E、264I/330L/332E、234E、234Y、234I、235D、235S、235Y、235I、239T、240M、264Y、330I、325T、328D/332E、328V/332E、328T/332E、328I/332E、239E/264I/332E、239Q/264I/332E、239E/264I/330Y/332E、239D/330Y/332E、239N/330Y/332E、239D/330L/332E、239N/330L/332E、264I/298A/332E、239D/298A/332E、239N/298A/332E、239D/264I/332E、239D/264I/298A/332E 和 239D/264I/330L/332E 组成的组。

[0081] 42. 根据项 39 所述的抗体,其中所述 Fc 变体在选自 256、270、290、298、312、322、326、329、331、333、334 和 339 组成的组的位置,进一步包含至少一种取代。

[0082] 43. 根据项 39 所述的抗体,其中所述亲本 Fc 多肽基本上是人、小鼠的、大鼠的或猴子的。

[0083] 44. 根据项 35 所述的抗体,与所述亲本 Fc 多肽比较其中所述 Fc 变体减弱了 ADCC。

[0084] 45. 根据项 44 所述的抗体,其中所述 Fc 变体包含至少一种取代,选自由 234D、234N、234Q、234T、234H、234V、234F、235N、235Q、235T、235H、235V、235F、239E、239N、239Q、239F、239H、239Y、240A、240T、241W、241L、241Y、241E、241R、243W、243L、243Y、243R、243Q、244H、245A、247V、247G、262I、262A、262T、262E、263I、263A、263T、263M、264L、264I、264W、264T、264R、264F、264M、264E、265G、265N、265Q、265Y、265F、265V、265I、265L、265H、265T、266A、266T、266M、267Q、267L、269H、269Y、269F、269R、296E、296Q、296D、296N、296S、296T、296L、296I、296H、297S、297D、297E、298H、299I、299L、299A、299S、299V、299H、299F、299E、313F、325Q、325L、325I、325D、325E、325A、325V、325H、327N、327L、328M、328E、328N、328Q、328F、328H、328A、329F、330L、330V、330F、330R、330H、332N、332Q、332T、332H、332Y 和 332A 组成的组。

[0085] 46. 根据项 44 所述的抗体,其中所述 Fc 变体选自由 264L、241W、241L、243W、243L、241L/243L/262I/264I、241W/243W、241W/243W/262A/264A、241L/262I、243L/262I/264W、241Y/243Y/262T/264T、241E/243R/262E/264R、241E/243Q/262T/264E、241R/243Q/262T/264R、241E/243Y/262T/264R、328M、328E、328F、244H、245A、247V、313F、244H/245A/247V、247G、241E/243R/262E/264R/332E、241E/243Y/262T/264R/332E、265G、265N、239E/265G、239E/265N、239E/265Q、296E、296Q、299I、327N、267Q/327S、267L/327S、327L、329F、330L、297S、297D、297S/332E、332N、332Q、264F、263I、299A、299S、299V、325Q、325L、325I、239N、239F、239N/332N、239N/332Q、239Q/332N、239Q/332Q、296D、296N、234D、234N、234Q、234T、234H、234V、234F、235N、235Q、235T、235H、235V、235F、239H、239Y、240A、263T、263M、264M、266A、266T、266M、269H、269Y、269F、269R、296S、296T、296L、296I、298H、299H、330V、330F、330R、330H、325D、325E、325A、325V、325H、328E/332E、328N/332E、328Q/332E、328H/332E、328A、332T、332H、332Y 和 332A 组成的组。

[0086] 47. 一种包含亲本 Fc 多肽的非糖基化 Fc 变体的抗体,在所述的亲本 Fc 多肽的 Fc 区中包含至少一种氨基酸修饰,相对于所述亲本 Fc 多肽的非糖基化型,所述非糖基化 Fc 变体具有改善的稳定性、溶解性或对 Fc 配体的结合亲和力。

[0087] 48. 根据项 47 所述的抗体,与亲本 Fc 多肽的非糖基化型比较,所述非糖基化 Fc 变体具有改善的对 Fc 配体的结合亲和力。

[0088] 49. 根据项 48 所述的抗体,其中所述 Fc 配体是 Fc γ R。

[0089] 50. 根据项 49 所述的抗体,其中所述 Fc γ R 是 Fc γ RIIIa。

[0090] 51. 根据项 48 所述的抗体,其中所述改善的结合亲和力在亲本 Fc 多肽的糖基化型的 0.4 倍范围内。

[0091] 52. 根据项 47 所述的抗体,其中所述 Fc 变体部分在相应于人序列位置的位置包含至少一种取代,所述人序列位置选自由 239、241、243、262、264、265、296、297、330 和 332 组成的组。

[0092] 53. 根据项 52 所述的抗体,其中所述 Fc 变体包含一种或多种取代,选自由 239D、239E、241Y、243Y、262T、264T、264E、265Y、265H、296N、297D、330Y 和 332E 组成的组。

[0093] 54. 根据项 52 所述的抗体,其中所述 Fc 变体选自由 297D/332E、241Y/243Y/262T/264T/297D/332E、239D/297D/332E、239E/297D/332E、

239D/265Y/297D/332E、239D/265H/297D/332E、264E/297D/332E、296N/297D/332E 和 297D/330Y/332E 组成的组。

[0094] 55. 根据项 53 所述的抗体,其中所述非糖基化 Fc 变体部分在相应于人序列位置的位置包含至少一种取代,所述人序列位置选自:256、270、290、298、312、322、326、329、331、333、334 和 339。

[0095] 56. 根据项 1 所述的抗体,包含含有所述 Fc 变体的 Fc 融合体。

[0096] 57. 根据项 1 或 56 所述的抗体,其中所述抗体进一步包含工程改造的糖型。

[0097] 58. 根据项 57 所述的抗体,其中所述工程改造的糖型改善了效应器功能。

[0098] 59. 一种药物组合物,包含根据项 1 所述的抗体和药学上可接受的载体。

[0099] 60. 一种治疗需要所述治疗的哺乳动物的方法,包含施用项 1 的抗体。

[0100] 61. 一种包含 Fc 变体的抗体,所述 Fc 变体包含至少一种取代,选自 332D、332E、332N 或 332Q 组成的组,其中所述位置相应于人序列位置,其中所述抗体对靶抗原具有特异性,所述靶抗原选自 CD20、CD22、CD33、CD52、Her2/neu、EGFR、EpCAM、MUC1、GD3、CEA、CA 125、HLA-DR、TNF α 和 VEGF 组成的组。

[0101] 62. 一种包含 Fc 变体的抗体,所述 Fc 变体包含至少一种取代,选自 264I、264T 或 264Y 组成的组,其中所述位置相应于人序列位置,其中所述抗体或 Fc 融合体对靶抗原具有特异性,所述靶抗原选自 CD20、CD22、CD33、CD52、Her2/neu、EGFR、EpCAM、MUC1、GD3、CEA、CA 125、HLA-DR、TNF α 和 VEGF 组成的组。

[0102] 63. 一种包含 Fc 变体的抗体,所述 Fc 变体包含至少一种取代,选自 239D、239E、239N、239Q 或 239T 组成的组,其中所述位置相应于人序列的位置,其中所述抗体或 Fc 融合体对靶抗原具有特异性,所述靶抗原选自 CD20、CD22、CD33、CD52、Her2/neu、EGFR、EpCAM、MUC1、GD3、CEA、CA 125、HLA-DR、TNF α 和 VEGF 组成的组。

[0103] 64. 一种包含 Fc 变体的抗体,所述 Fc 变体包含至少一种取代,选自 330Y、330L 或 330I 组成的组,其中所述位置相应于人序列的位置,其中所述抗体或 Fc 融合体对靶抗原具有特异性,所述靶抗原选自 CD20、CD22、CD33、CD52、Her2/neu、EGFR、EpCAM、MUC1、GD3、CEA、CA 125、HLA-DR、TNF α 和 VEGF 组成的组。

[0104] 65. 一种包含 Fc 变体的抗体,所述 Fc 变体包含至少一种取代,选自 240I 或 240M 组成的组,其中所述位置相应于人序列的位置,其中所述抗体或 Fc 融合体对靶抗原具有特异性,所述靶抗原选自 CD20、CD22、CD33、CD52、Her2/neu、EGFR、EpCAM、MUC1、GD3、CEA、CA 125、HLA-DR、TNF α 和 VEGF 组成的组。

[0105] 66. 一种包含 Fc 变体的抗体,所述 Fc 变体包含一种取代,选自 297D,其中所述位置相应于人序列的位置,其中所述抗体或 Fc 融合体对靶抗原具有特异性,所述靶抗原选自 CD20、CD22、CD33、CD52、Her2/neu、EGFR、EpCAM、MUC1、GD3、CEA、CA 125、HLA-DR、TNF α 和 VEGF 组成的组。

[0106] 67. 一种根据项 61、62、63、64、65 或 66 所述的抗体,其中所述 Fc 变体还包含取代 298A。

[0107] 附图简述

[0108] 图 1. 抗体结构与功能。显示的是全长人 IgG1 抗体的模型,模型使用了来自 pdb 登记号 1CE1 (James 等., 1999, J Mol Biol 289 :293-301) 的人源化 Fab 结构和来自 pdb 登

记号 1DN2 (DeLano 等., 2000, Science 287:1279-1283) 的人 IgG1 Fc 结构。未显示连接 Fab 和 Fc 区的柔性铰链。IgG1 是异二聚体的同二聚体, 由两条轻链和两条重链组成。标记了抗体包含的 Ig 结构域, 对于轻链而言包括 V_L 和 C_L , 对于重链而言包括 V_H 、 $C\gamma 1$ 、 $C\gamma 2$ 和 $C\gamma 3$ 。标记了 Fc 区。标记了相关蛋白的结合位点, 包括可变区中的抗原结合位点, 以及 Fc 区中 $Fc\gamma Rs$ 、 $FcRn$ 、 Clq 和蛋白 A 和 G 的结合位点。

[0109] 图 2. Fc/Fc γ RIIIb 复合物结构 1IIS。Fc 显示为灰色飘带图, Fc γ RIIIb 显示为黑色飘带图。N297 糖显示为黑色棒状。

[0110] 图 3. 阿仑单抗 (alemtuzumab) (Campath[®], Illex Pharmaceuticals LP 的注册商标) 抗体的重链氨基酸序列, 阐明了位置编号顺序 (在氨基酸序列上的 2 行) 和依照 Kabat 的 EU 标引方式的位置编号 (在氨基酸序列下的 2 行)。Ig 结构域 $VH1$ 、 $C\gamma 1$ 、铰链、 $C\gamma 2$ 和 $C\gamma 3$ 大致的起点也标记于上述连续编号中。已观察到许多 Fc 位点上的多态性, 包括但不限于 Kabat 270、272、312、315、356 和 358, 因此此处显示的序列与现有技术序列之间可能存在着微小的差异。

[0111] 图 4. 定位在 Fc/Fc γ RIIIb 复合物结构 1IIS 上的实验文库残基。Fc 显示为灰色飘带图, Fc γ RIIIb 显示为黑色飘带图。实验文库残基显示为黑色球状和棒状。N297 糖显示为黑色棒状。

[0112] 图 5. 人 IgG1 Fc 序列, 显示了与 Fc 变体实验文库设计相关的位点。该序列包括铰链区、 $C\gamma 2$ 结构域和 $C\gamma 3$ 结构域。残基编号依照 Kabat 的 EU 标引方式。与实验文库相关的位点加下划线。因为观察到许多 Fc 位点上的多态性突变, 所以此处显示的序列与文献序列之间可能存在着微小的差异。

[0113] 图 6. 293T 细胞中阿仑单抗的 Fc 变体和野生型 (WT) 蛋白的表达。含有阿仑单抗重链基因 (野生型或变体) 的质粒与含有阿仑单抗轻链基因的质粒共转染。转染 5 天后收获培养液。对于每个转染的样品而言, 在 SDS-PAGE 凝胶上加载 10 μ l 培养液进行蛋白质印迹分析 (Western analysis)。用于蛋白质印迹的探针是过氧化物酶偶联的羊抗人 IgG (Jackson Immuno-Research, 产品目录 #109-035-088)。WT: 野生型阿仑单抗; 1-10: 阿仑单抗变体。H 和 L 分别表示抗体重链和轻链。

[0114] 图 7. 使用蛋白 A 层析纯化阿仑单抗。在 293T 细胞中表达野生型阿仑单抗蛋白, 转染 5 天后收获培养液。将培养液用 PBS 稀释到 1 : 1, 并用蛋白 A (Pierce, 产品目录 #20334) 纯化。0: 纯化前原始样品; FT: 流出液; E: 洗脱液; C: 浓缩的最终样品。左图显示了 Simple 蓝染色的 SDS-PAGE 凝胶, 右图显示了使用过氧化物酶偶联的羊抗人 IgG 标记的蛋白质印迹。

[0115] 图 8. 去糖基化抗体的产生。在 293T 细胞中表达阿仑单抗的野生型和变体, 并用蛋白 A 层析纯化。抗体与肽-N-糖苷酶 (PNGase F) 在 37 $^{\circ}$ C 温育 24 小时。对于每个抗体来说, 平行进行模拟处理样品 (-PNGase F) 的试验。WT: 野生型阿仑单抗; #15、#16、#17、#18、#22: 分别为阿仑单抗变体 F241E/F243R/V262E/V264R、F241E/F243Q/V262T/V264E、F241R/F243Q/V262T/V264R、F241E/F243Y/V262T/V264R 和 I332E。相对于模拟处理的样品, PNGase F 处理的样品迁移更快, 代表了去糖基化重链。

[0116] 图 9. 表达自 293T 细胞的阿仑单抗与其抗原的结合。融合有 GST 的 CD52 肽抗原在 IPTG 诱导下表达自大肠杆菌 BL21 (DE3)。未诱导和诱导的样品都继续跑 SDS-PAGE 凝胶,

并转移到 PVDF 膜上。对于蛋白质印迹来说,来自 Sotec(α -CD52, Sotec) 的阿仑单抗(终浓度为 2.5ng/u1) 或经转染的 293T 细胞(Campath, Xencor) 的培养液(阿仑单抗终浓度约为 0.1-0.2ng/u1) 作为一抗,过氧化物酶偶联的羊抗人 IgG 作为二抗。M:预染色的标记物;U:未诱导 GST-CD52 的样品;I:诱导 GST-CD52 的样品。

[0117] 图 10. 人 V158Fc γ RIIIa 胞外区的表达和纯化。标记的 Fc γ RIIIa 转染入 293T 细胞中,3 天后收获含有分泌的 Fc γ RIIIa 的培养液并用亲和层析纯化。1:培养液;2:流出液;3:洗涤液;4-8:连续的洗脱液。simple 蓝染色的 SDS-PAGE 凝胶和蛋白质印迹的结果都得到显示。对于蛋白质印迹而言,膜用抗 -GST 抗体探针探测。

[0118] 图 11. 使用实施例 2 所述的 AlphaScreen™ 分析法确定实验文库选择的阿仑单抗 Fc 变体与人 V158Fc γ RIIIa 的结合。在存在竞争性抗体(Fc 变体或野生型阿仑单抗) 情况下,当发光信号减少时观察到特征性抑制曲线。磷酸盐缓冲液(PBS) 单独作为阴性对照。这些数据对最大和最小发光信号归一化,所述最大和最小发光信号分别提供自低和高浓度竞争性抗体的基线。曲线代表了数据对单位点竞争性模型的拟合,所述拟合使用了非线性回归。这些拟合提供了每个抗体的 IC50s,野生型和 S239D 用点线说明。

[0119] 图 12. AlphaScreen™ 分析法显示了选择的阿仑单抗 Fc 变体与人 Fc γ RIIb 的结合。归一化数据,曲线代表了数据对单位点竞争性模型的拟合。PBS 作为阴性对照。

[0120] 图 13. AlphaScreen™ 分析法显示了选择的阿仑单抗 Fc 变体与人 Val158Fc γ RIIIa 的结合。归一化数据,曲线代表了数据对单位点竞争性模型的拟合。PBS 作为阴性对照。

[0121] 图 14. AlphaScreen™ 分析法测量了在背景利妥昔单抗(rituximab) 中选择的 Fc 变体与人 V158Fc γ RIIIa 的结合。归一化数据,曲线代表了数据对单位点竞争性模型的拟合。PBS 作为阴性对照。

[0122] 图 15. AlphaScreen™ 分析法测量了在背景曲妥单抗(trastuzumab) 中选择的 Fc 变体与人 V158 Fc γ RIIIa 的结合。归一化数据,曲线代表了数据对单位点竞争性模型的拟合。PBS 作为阴性对照。

[0123] 图 16a-16b. AlphaScreen™ 分析法比较了选择的阿仑单抗 Fc 变体与人 V158 Fc γ RIIIa(图 16a) 及人 Fc γ RIIb(图 16b) 的结合。归一化数据,曲线代表了数据对单位点竞争性模型的拟合。PBS 作为阴性对照。

[0124] 图 17. AlphaScreen™ 分析法测量了在背景曲妥单抗中选择的 Fc 变体与人 V158 Fc γ RIIIa 的结合。归一化数据,曲线代表了数据对单位点竞争性模型的拟合。

[0125] 图 18. AlphaScreen™ 分析法显示了选择的阿仑单抗 Fc 变体与人 R131 Fc γ RIIa 的结合。归一化数据,曲线代表了数据对单位点竞争性模型的拟合。

[0126] 图 19a 和 19b. AlphaScreen™ 分析法显示了选择的阿仑单抗 Fc 变体与人 V158 Fc γ RIIIa 的结合。归一化数据,曲线代表了数据对单位点竞争性模型(one site competition model) 的拟合。PBS 作为阴性对照。

[0127] 图 20. AlphaScreen™ 分析法显示了非糖基化阿仑单抗 Fc 变体与人 V158 Fc γ RIIIa 的结合。归一化数据,曲线代表了数据对单位点竞争性模型的拟合。PBS 作为阴性对照。

[0128] 图 21. AlphaScreen™ 分析法比较了选择的阿仑单抗 Fc 变体糖基化型(实心符号,实线) 及非糖基化型(空心符号,打点的线) 与人 V158 Fc γ RIIIa 的结合。归一化数据,

曲线代表了数据对单位点竞争性模型的拟合。

[0129] 图 22a-22b. AlphaScreen™ 分析法显示了选择的阿仑单抗 Fc 变体与人 Fc γ RIIIa 的 V158(图 22a) 及 F158(图 22b) 同种异型的结合。归一化数据, 曲线代表了数据对单位点竞争性模型的拟合。PBS 作为阴性对照。

[0130] 图 23a-23d. 图 23a 和 23b 显示了选择的阿仑单抗 Fc 变体与 V158 Fc γ RIIIa(图 23a) 及 F158 Fc γ RIIIa(图 23b) 结合的 SPR K_d ' s 与 AlphaScreen™ IC50' s 之间的相关性。图 23c 和 23d 显示了对于选择的阿仑单抗 Fc 变体与 V158 Fc γ RIIIa(图 23c) 及 F158 Fc γ RIIIa(图 23d) 结合而言, SPR 与 AlphaScreen™ 测定的较野生型改良的倍数的结果之间的相关性。结合数据列于表 62 中。通过数据的线代表了数据的线性拟合, r^2 值表示这些拟合的显著性。

[0131] 图 24a-24b. 在背景阿仑单抗中选择的 Fc 变体基于细胞的 ADCC 测定。使用基于 DELFIA EuTDA 的细胞毒性测定法 (Perkin Elmer, MA) 测量 ADCC, 描述于实施例 7, 使用 DoHH-2 淋巴靶细胞和 50 倍过量的人 PBMCs。

[0132] 图 24a 是显示了用于指示 10ng/ml 阿仑单抗抗体的原始荧光数据的条形图。PBMC 条显示了在缺乏抗体条件下细胞毒性的基础水平。对于指明的阿仑单抗抗体而言, 图 24b 显示了 ADCC 对抗体浓度的剂量依赖性, 对最小和最大荧光信号归一化, 所述最小和最大荧光信号分别提供自低和高浓度抗体的基线。曲线代表了数据对 S 形剂量-响应模型的拟合, 所述拟合使用了非线性回归。

[0133] 图 25a-25b. 在背景利妥昔单抗中选择的 Fc 变体基于细胞的 ADCC 测定。使用 DELFIA® EuTDA 的细胞毒性测定法 (Perkin Elmer, MA) 测量 ADCC, 描述于实施例 7, 使用 WIL2-S 淋巴靶细胞和 50 倍过量的人 PBMCs。图 25a 是显示了用于指示 1ng/ml 利妥昔单抗抗体的原始荧光数据的条形图。PBMC 条显示了在缺乏抗体条件下细胞毒性的基础水平。对于指明的利妥昔单抗抗体而言, 图 25b 显示了 ADCC 对抗体浓度的剂量依赖性, 对最小和最大荧光信号归一化, 所述最小和最大荧光信号分别提供自低和高浓度抗体的基线。曲线代表了数据对 S 形剂量-响应模型的拟合, 所述拟合使用了非线性回归。

[0134] 图 26a-26c. 在背景曲妥单抗中选择的 Fc 变体基于细胞的 ADCC 测定。使用 DELFIA® EuTDA 的细胞毒性测定法 (Perkin Elmer, MA) 测量 ADCC, 描述于实施例 7, 使用 BT474 和 Sk-Br-3 乳腺癌靶细胞和 50 倍过量的人 PBMCs。图 26a 是显示了用于指示 1ng/ml 曲妥单抗抗体的原始荧光数据的条形图。PBMC 条显示了在缺乏抗体的条件下细胞毒性的基础水平。对于指明的曲妥单抗抗体而言, 图 26b 和 26c 显示了 ADCC 对抗体浓度的剂量依赖, 对最小和最大荧光信号归一化, 所述最小和最大荧光信号分别提供自低和高浓度抗体的基线。曲线代表了数据对 S 形剂量-响应模型的拟合, 所述拟合使用了非线性回归。

[0135] 图 27a-27b. 选择的 Fc 变体介导结合和激活补体的能力。图 27a 显示 AlphaScreen™ 分析法测量的选择的阿仑单抗 Fc 变体与 C1q 的结合。数据对最大和最小发光信号归一化, 所述最大和最小发光信号分别提供自低和高浓度竞争性抗体的基线。曲线代表了数据对单位点竞争性模型的拟合, 所述拟合使用了非线性回归。图 27b 显示了基于细胞测定法测量的选择的利妥昔单抗 Fc 变体介导 CDC 的能力。使用 Amar 蓝 (Amar Blue) 来监测人血清补体 (Quidel, San Diego, CA) 对 Fc 变体和野生型利妥昔单抗调理的 WIL2-S 淋巴细胞的溶胞作用而实现 CDC 测定。对于指明的利妥昔单抗抗体而言, 显示了补体介导

的溶胞作用对抗体浓度的剂量依赖性,对最小和最大荧光信号归一化,所述最小和最大荧光信号分别提供自低和高浓度抗体的基线。曲线代表了数据对 S 形剂量-响应模型的拟合,所述拟合使用了非线性回归。

[0136] 图 28. AlphaScreen™ 分析法测量的选择的阿仑单抗 Fc 变体与细菌蛋白 A 的结合,描述于实施例 9。归一化数据,曲线代表数据对单位点竞争性模型的拟合。PBS 作为阴性对照。

[0137] 图 29. AlphaScreen™ 分析法测量的选择的阿仑单抗 Fc 变体与小鼠 Fc γ RIII 的结合,描述于实施例 10。归一化数据,曲线代表数据对单位点竞争性模型的拟合。PBS 作为阴性对照。

[0138] 图 30. AlphaScreen™ 分析法测量的选择的曲妥单抗 Fc 变体与人 V158Fc γ RIIIa 的结合,所述曲妥单抗 Fc 变体在 293T 和 CHO 细胞中表达,描述于实施例 11。归一化数据,曲线代表数据对单位点竞争性模型的拟合。PBS 作为阴性对照。

[0139] 图 31a-31c. 显示了改良的抗-CD20 抗体的序列。利妥昔单抗的轻链和重链序列分别呈现于图 31a 和图 31b 中,获得自 US 5,736,137 的翻译的序列 3。图 31b 中相关位置用粗体表示,包括 S239、V240、V2641、N297、S298、A330 和 I332。图 31c 显示了改良的抗-CD20 抗体重链序列,具有粗体 X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆ 和 Z₁ 所指定的可变区位置。序列下的表格提供了对于那些位置而言可能的取代。改良的抗-CD20 抗体序列包含至少一种非野生型氨基酸,可能的取代选自对 X₁、X₂、X₃、X₄、X₅ 和 X₆ 的取代。这些改良的抗-CD20 抗体序列也可包含 Z₁ 的取代。这些位置依照 Kabat 的 EU 标记方式编号,因此并不相应于序列中连续的顺序。

[0140] 发明详述

[0141] 为了能更彻底地理解发明,以下列出一些定义。上述定义意在包含语法等同成分。

[0142] 本文中使用的“ADCC”或“抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用”意指细胞介导的反应,其中表达 Fc γ Rs 的非特异性细胞毒性细胞识别靶细胞上的结合抗体并随后引起对靶细胞的溶胞作用。

[0143] 本文中使用的“ADCP”或“抗体依赖性细胞介导的细胞吞噬作用”意指细胞介导的反应,其中表达 Fc γ Rs 的非特异性细胞毒性细胞识别靶细胞上的结合抗体并随后引起对靶细胞的吞噬作用。

[0144] 本文中的“氨基酸修饰”意指多肽序列中氨基酸取代、插入和 / 或缺失。本文中优选的氨基酸修饰是取代。^{**TT}

[0145] 本文中“抗体”意指由基本上为公认的免疫球蛋白基因的全部或部分所编码的一种或多种多肽组成的蛋白质。所述公认的免疫球蛋白基因,例如在人中,包括 kappa(κ) κ、lambda(λ) λ 和重链基因座,其中包含了无数的可变区基因,以及分别编码 IgM、IgD、IgG、IgE 和 IgA 同种型的恒定区基因 mu(μ) μ、delta(δ) δ、gamma(γ) γ、sigma(σ) σ、alpha(α) α。本文中的抗体意指包括全长抗体和抗体片段,和来自任意生物体可称为天然抗体的,工程抗体,或为试验、治疗目的或其它如下所进一步规定的目的而重组产生的抗体。因此,“抗体”包括多克隆和单克隆抗体(mAb)。制备和纯化单克隆及多克隆抗体的方法为本领域所公知,描述于如 Harlow 和 Lane, Antibodies :A Laboratory Manual 中(New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press,1988)。如本文所概述,“抗体”明确地包括

本文中所描述的 Fc 变体,“全长”抗体包括本文中描述的 Fc 变体片段,以及本文中描述的与其它蛋白质融合的 Fc 变体。

[0146] 在一些实施方案中,抗体可以是中和性的、或抑制性的、或刺激性的抗体,在优选的实施方案中,如本文所描述,与亲本抗体(如,当非天然存在变体用作为本文中的计算分析的出发点时)相比时,或与原始的野生型抗体相比时,通过变体抗体与受体亲和力的增加来测定刺激活性。因此,本文中“中和(neutralization)”、“中和(neutralize)”、“中和(neutralizing)”以及语法等同成分意指抑制或减少抗体的生物效应,在一些情况下通过与抗原结合(如竞争性地)消除或减弱结合的生物效应,或通过结合以导致结合的生物效应减弱。

[0147] 术语“抗体”包括抗体片段,为本领域所公知,诸如 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fc 或抗体的抗原结合的其它亚序列,例如,单链抗体(例如 Fv)、嵌合抗体等,或通过修饰完整抗体或使用重组 DNA 技术重新合成的那些抗体而产生的抗体片段。具体优选的是如本文所述的 Fc 变体。术语“抗体”还包含能做为激动剂或拮抗剂抗体的多克隆抗体和单克隆抗体(mAbs)。

[0148] 如本文所概述,本发明的抗体特异性结合 Fc 受体。本文中“特异性结合”意指具有结合常数至少为 10^{-4} – 10^{-6} M⁻¹,优选为 10^{-7} – 10^{-9} M⁻¹ 的 LC 抗体。在一个优选的实施方案中,本发明的抗体是人源化的。使用通用的单克隆抗体技术,人们可制备事实上抗已得到鉴定的任意靶抗原的人源化抗体 [Stein, Trends Biotechnol. 15 :88–90(1997)]。非人(如,鼠)抗体的人源化型是免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(诸如 as Fv, Fc, Fab, Fab', F(ab')₂ 或其它抗体的抗原结合序列)的嵌合分子,所述片段含有衍生自非人免疫球蛋白的最小序列。人源化抗体包括人免疫球蛋白(接受者的抗体),其中接受者的互补决定区(CDR)的残基为来自诸如具有所需特异性、亲和力以及能力的小鼠、大鼠或兔的非人物种(供体的抗体)CDR 的残基所取代。在一些情况下,人免疫球蛋白的 Fv 骨架区残基为相应的非人残基所取代。人源化抗体也可包含既不在接受者抗体中也不在被引入的 CDR 或骨架区序列中发现的残基。一般而言,人源化的抗体可包含至少一个、以及通常为两个可变区的基本上全部的结构,其中全部或基本上全部的 CDR 区相应于非人免疫球蛋白的那些 CDR 区,全部或基本上全部的 FR 区是人免疫球蛋白的共有序列。人源化抗体最好也包含至少一部分的免疫球蛋白恒定区(Fc),通常为人免疫球蛋白的恒定区 [Jones 等., Nature 321 :522–525(1986); Riechmann 等., Nature 332 :323–329(1988); 和 Presta, Curr. Op. Struct. BIOL. 2 :593–596(1992)]。人源化非人抗体的方法为本领域众所周知。一般而言,人源化抗体引入了一个或多个非人来源的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常称为引入残基(import residues),其一般来自引入的可变区。采用 Winter 与其同事的方法 [Jones 等., 同上; Riechmann 等., 同上; 以及 Verhoeyen 等., Science, 239 :1534–1536(1988)], 通过用啮齿动物 CDRs 或 CDR 序列取代人抗体的相应序列,人源化可基本上得到完成。人源化小鼠单克隆抗体的其它实例也为本领域所公知,例如,结合人蛋白 C[0' Connor 等., Protein Eng. 11 :321–8(1998)], 白介素 2 受体 [Queen 等., Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A. 86 :10029–33(1989)], 以及人表皮生长因子受体 2 的抗体 [Carter 等., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89 :4285–9(1992)]。因此,上述人源化抗体为嵌合抗体(美国专利第 4,816,567 号),其中基本上小于完整的人可变区已为来自非人物种的相应序列所

取代。实际中,人源化抗体通常是人抗体,其中一些 CDR 残基和可能有一些 FR 残基为来自啮齿动物抗体中的相似位点所取代。

[0149] 在一个优选的实施方案中,本发明的抗体是基于人序列的,因此人序列被用作为“碱基”序列,抗诸如大鼠、小鼠和猴子的序列。为确定与原序列或结构的同源性,前体或亲本 Fc 的氨基酸序列与本文所列的人 Fc 序列直接比较。在序列比对后,使用一种或多种本文所述的同源性比对程序(例如在物种之间使用保守残基)来确定与人 Fc 原序列中特定氨基酸等价的残基,为维持比对的进行应考虑到必需的插入和缺失(即,避免通过任意的缺失或插入而排除保守残基)。保守残基的排列优选上述残基应 100% 保守。然而,大于 75% 或少至 50% 的保守残基的比对也足够用于确定等价残基(在本文中有时称为“相应的残基”)。

[0150] 对于已通过 X-射线结晶学测定三维结构的 Fc 片段而言,等价残基也可通过确定三维结构水平上的同源性而得到确定。等价残基确定为亲本或前体特定氨基酸残基的两个或更多个主链原子的原子坐标(N 对 N, CA 对 CA, C 对 C 以及 O 对 O)在比对后处于 0.13nm 范围内以及优选在 0.1nm 内的那些。在最佳模型已定向并定位以给出 Fc 变体片段非氢蛋白质原子的原子坐标的最大重叠后,比对得到实现。

[0151] 明确地包括于“抗体”定义范围内的是非糖基化抗体。本文使用的“非糖基化抗体”意指在 Fc 区 297 位缺少糖附着的抗体,其中编号方式依照 Kabat 的 EU 系统。非糖基化的抗体可以是去糖基化的抗体,其是一种 Fc 糖已去除的抗体,例如以化学或酶的方法去除。可选地,所述非糖基化抗体可以是非糖基化或未糖基化的抗体,其是一种无 Fc 糖表达的抗体,例如通过突变一种或多种编码糖基化型的残基或通过诸如细菌的不将糖附着到蛋白质上的生物体中表达。

[0152] 明确地包括于“抗体”定义范围内的是含有 Fc 变体部分的全长抗体。本文中“全长抗体”意指构成抗体的天然生物学类型的结构,包括可变区和恒定区。举例来说,在包括人和小鼠的大多数哺乳动物中,IgG 类的全长抗体是一种四聚体并由相同的两对两条免疫球蛋白链组成,每对具有一条轻链和一条重链,每条轻链包含免疫球蛋白结构域 V_L 和 C_L ,每条重链包含免疫球蛋白结构域 V_H 、 $C\gamma 1$ 、 $C\gamma 2$ 和 $C\gamma 3$ 。在一些哺乳动物中,例如在骆驼(camel)和美洲驼(llamas)中,IgG 抗体可仅由两条重链组成,每条重链包含一个附着在 Fc 区上的可变区。本文中使用的“IgG”意指属于抗体类的多肽,其基本上为公认的免疫球蛋白 γ 基因所编码。在人中,该类包含 IgG1、IgG 2、IgG3 和 IgG4。在小鼠中,该类包含 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG 3。

[0153] 本文中使用的“氨基酸”和“氨基酸同一性”意指 20 种天然存在的氨基酸之一或任一非天然类似物,它们可位于特别规定的位置。本文中“蛋白质”意指至少两个共价连接的氨基酸,其包括蛋白质、多肽、寡肽和肽。蛋白质可由天然存在的氨基酸和肽键构成,或由合成的肽模拟物结构构成,该肽模拟物即“类似物”,特别是当将 LC 肽施用于患者时,如类肽(peptoid)(参见,Simon 等.,PNAS USA 89(20):9367(1992))。因此本文中使用的“氨基酸”或“肽残基”意指天然存在和合成的氨基酸。举例来说,对于本发明目的而言,高苯基丙氨酸、瓜氨酸和降亮氨酸被认为是用于本发明目的的氨基酸。“氨基酸”也包括诸如脯氨酸和羟脯氨酸的亚氨基酸残基。侧链可以是(R)或(S)构型。在优选的实施方案中,氨基酸以(S)或 L-构型存在。如果使用非天然存在的侧链,可使用非氨基酸取代,例如以阻止

或延迟体内降解。

[0154] 本文中“计算筛选方法 (computational screening method)”意指用于设计蛋白质中一种或多种突变的任何方法,其中所述方法使用了计算机来评估可能的氨基酸侧链取代相互之间和/或与蛋白质的其它部分相互作用的能量。本领域技术人员可以理解,能量评估涉及能量计算,能量计算涉及一些对一种或多种氨基酸修饰的打分方法。所述方法可涉及物理或化学能项 (energy term),或可涉及基于已有知识-、统计学-、序列的能项等。所述计算由在本文中称为“计算筛选计算 (computational screening calculations)”的计算筛选方法组成。

[0155] 本文中使用的“效应器功能”意指由抗体 Fc 区与 Fc 受体或配体相互作用产生的生化反应。效应器功能包括但不限于 ADCC、ADCP 和 CDC。本文中使用的“效应细胞”意指表达一种或多种 Fc 受体并介导一种或多种效应器功能的免疫系统细胞。效应细胞包括但不限于单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、树突细胞、嗜酸性细胞、肥大细胞、血小板、B 细胞、大颗粒淋巴细胞、朗罕氏细胞,自然杀伤 (NK) 细胞以及 T 细胞,以及可来自任何生物体包括但不限于人、小鼠、大鼠、兔子和猴子。本文中“文库”意指任意形式的一组 Fc 变体,包括但不限于一系列核酸或氨基酸序列,一系列在可变位置的核酸或氨基酸取代,包含编码库序列的核酸的物理文库,或包含 Fc 变体蛋白质的物理文库,所述 Fc 变体蛋白质以纯化或未纯化的形式存在。

[0156] 本文中使用的“Fc”、“Fc 区”、“Fc 多肽”等意指于本文定义的抗体,其包括包含除免疫球蛋白结构域第一恒定区外的抗体恒定区的多肽。因此,Fc 指 IgA、IgD 和 IgG 免疫球蛋白结构域的最后两个恒定区,IgE 和 IgM 免疫球蛋白的最后三个恒定区,和这些结构域的 N-末端连接的柔性铰链。对于 IgA 和 IgM 而言,可包括 J 链。对于 IgG 来说,如图 1 所示,Fc 包含免疫球蛋白结构域 C γ 2 和 C γ 3 以及 C γ 1 和 C γ 2 之间的铰链。尽管 Fc 区的边界可改变,人 IgG 重链 Fc 区通常规定为在其羧基末端包含残基 C226 或 P230,其中编号方式依照 Kabat 的 EU 标引方式。Fc 可指分离的该区域,或在上下文的抗体、抗体片段或 Fc 融合体中的该区域。Fc 可以是抗体、Fc 融合体,或包含 Fc 的蛋白质或蛋白质结构域。特别优选的是 Fc 变体,其是非天然存在的 Fc 变体。

[0157] 本文中使用的“Fc 融合体”意指其中一个或更多个多肽可操作地连接 Fc 的蛋白质。在本文中 Fc 融合体与现有技术中所使用的术语“免疫粘合素”、“Ig 融合体”、“Ig 嵌合体”以及“受体球蛋白”(有时加破折号)(Chamow 等.,1996,Trends Biotechnol 14:52-60; Ashkenazi 等.,1997,Curr Opin Immunol 9:195-200) 的含义是相同的。Fc 融合体将免疫球蛋白 Fc 区与融合伴侣 (fusion partner) 结合,一般而言,所述融合伴侣可以是任何蛋白质,包括但不限于,受体的靶结合区、粘合素分子、配体、酶或某些其它蛋白质或蛋白质结构域。Fc 融合体非 Fc-部分的作用是介导靶结合,因此其功能类似于抗体的可变区。

[0158] 本文中使用的“Fc γ 受体”或“Fc γ R”意指结合 IgG 抗体 Fc 区并且基本上为 Fc γ R 基因所编码的蛋白质家族的任何成员。在人类中,该家族包括但不限于 Fc γ RI (CD64),包含亚类 Fc γ RIa、Fc γ RIb 和 Fc γ RIc;Fc γ RII (CD32),包含 Fc γ RIIa(包括同种异型 H131 和 R131)、Fc γ RIIb(包括 Fc γ RIIb-1 和 Fc γ RIIb-2) 和 Fc γ RIIC;以及 Fc γ RIII (CD16),包含但不限于发 Fc γ RIIIa(包括同种异型 V158 和 F158) 和 Fc γ RIIIb(包括同种异型 Fc γ RIIIb-NA1 和 Fc γ RIIIb-NA2)(Jefferis 等.,2002,Immunol Lett 82:57-65),也包括

任何未被发现的人 Fc γ Rs 或 Fc γ R 亚类或同种异型。Fc γ R 可来自任何生物体,包括但不限于人、小鼠、大鼠、兔子和猴子。小鼠 Fc γ Rs 包括但不限于 Fc γ RI (CD64)、Fc γ RII (CD32)、Fc γ RIII (CD16) 以及 Fc γ RIII-2 (CD16-2),也包括任何未被发现的小鼠 Fc γ Rs 或 Fc γ R 亚类或同种异型。

[0159] 本文中使用的“Fc 配体”意指来自任何生物体的一种分子,优选一种多肽,其与抗体的 Fc 区结合以形成 Fc-配体复合物。Fc 配体包括但不限于 Fc γ Rs、Fc γ Rs、Fc γ Rs、FcRn、C1q、C3、甘露聚糖结合凝集素、甘露糖受体、葡萄球菌蛋白 A、葡萄球菌蛋白 G 以及病毒 Fc γ R。Fc 配体可包括未被发现的能结合 Fc 的分子。

[0160] 本文中使用的“IgG”意指一种属于抗体类的多肽,其基本上为公认的免疫球蛋白 γ 基因所编码。在人类中,该类包含 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。在小鼠中,该类包含 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3。本文中“免疫球蛋白 (Ig)”意指由基本上为免疫球蛋白基因所编码的一个或多个多肽组成的蛋白质。免疫球蛋白包括但不限于抗体。免疫球蛋白可具有许多结构型,包括但不限于全长抗体、抗体片段和单个免疫球蛋白结构域。本文中“免疫球蛋白 (Ig) 结构域”意指为蛋白质结构领域技术人员所确定的作为分离的结构实体而存在的免疫球蛋白的区域。Ig 结构域通常具有特征性的 β -多层 (sandwich) 折叠拓扑结构。抗体 IgG 类中已知的 Ig 结构域 V_H 、C γ 1、C γ 2、C γ 3、 V_L 以及 C_L 。

[0161] 本文中使用的“亲本多肽”或“前体多肽”(包括 Fc 亲本或前体)意指一种随后被修饰以产生变体的多肽。所述亲本多肽可以是天然存在多肽,或天然存在多肽的变体或工程型。亲本多肽可指该多肽自身、包含该亲本多肽的组合物或编码其的氨基酸序列。因此,本文中使用的“亲本 Fc 多肽”意指未修饰的 Fc 多肽,其可修饰以产生变体,在本文中使用的“亲本抗体”意指未修饰的抗体,其可修饰以产生抗体变体。

[0162] 如上所概述,Fc 分子的某些位置可得到改变。本文中使用的“位置”意指在蛋白质序列中的位置。位置可按顺序编号,或依据已确定的方式编号,例如 Kabat 的 EU 标引方式。举例来说,位置 297 是人抗体 IgG1 中的一个位置。如上所述,一般通过与其它亲本序列比对确定相应的位置。

[0163] 本文中使用的“残基”意指在蛋白质中的位置以及与之相关的氨基酸同一性。例如,Daragine 297 (也称为 N297) 是在人抗体 IgG1 中的一种残基。

[0164] 本文中使用的“靶抗原”意指与给定抗体可变区特异性结合的分子。靶抗原可以是蛋白质、糖类、脂质或其它化合物。

[0165] 本文中使用的“靶细胞”意指表达靶抗原的细胞。

[0166] 本文中使用的“可变区”意指包含一个或多个基本上为任一 V_K 、 V_L 和 / 或 V_H 基因所编码的 Ig 结构域的免疫球蛋白区域,所述的 V_K 、 V_L 和 / 或 V_H 基因分别构成了免疫球蛋白 κ 、 λ 和重链的基因座。

[0167] 本文中使用的“变体多肽”意指由于至少一个氨基酸修饰而不同于亲本多肽序列的多肽序列。变体多肽可指多肽自身、包含该多肽的组合物或编码其的氨基酸序列。优选地,与亲本多肽相比该变体多肽具有至少一个氨基酸修饰,如与亲本多肽相比约 1 到约 10 个氨基酸修饰,以及优选约 1 到约 5 个氨基酸修饰。本文中该变体多肽序列与亲本多肽序列优选具有至少约 80% 的同源性,最优选至少约 90% 的同源性,更优选至少约 95% 的同源性。因此,本文中使用的“Fc 变体”意指由于至少一个氨基酸修饰而不同于亲本 Fc 序列的 Fc 序

列。Fc 变体可以仅包含 Fc 区,或可存在于上下文的抗体、Fc 融合体或其它基本上由 Fc 编码的多肽中。Fc 变体可指 Fc 多肽自身、包含该 Fc 变体多肽的组合物或编码其的氨基酸序列。

[0168] 对于本发明中讨论的所有位置而言,免疫球蛋白重链的编号方式依照 EU 标引方式 (Kabat 等.,1991,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版.,United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda)。“Kabat 的 EU 标引方式”指人 IgG1EU 抗体的残基编号方式。

[0169] 本发明的 Fc 变体可对不同的特性进行优化。可优化的特性包括但不限于对 Fc γ R 增强或减少的亲合力。在一个优选的实施方案中,优化本发明的 Fc 变体对人激活的 Fc γ R、优选 Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIC、Fc γ RIIa 和 Fc γ RIIb,最优选 Fc γ RIIa 具有增强的亲合力。在一个可选地优选的实施方案中,优化 Fc 变体对人抑制性受体 Fc γ RIIb 具有减少的亲合力。这些优选的实施方案预期能提供在人中具有增强治疗特性的抗体和 Fc 融合体,例如增强的效应器功能以及更强的抗癌效力。在一个可选的实施方案中,优化本发明的 Fc 变体以对人 Fc γ R,包括但不限于 Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIIC、Fc γ RIIa 和 Fc γ RIIb 具有减少或消除的亲合力。这些实施方案预期能提供在人中具有增强治疗特性的抗体和 Fc 融合体,例如减少的效应器功能以及减少的毒性。优选的实施方案包含优化结合人 Fc γ R 的 Fc,另一方面,在可选的实施方案中本发明的 Fc 变体对于来自非人生物体的 Fc γ Rs 具有增强或减少的亲合力,非人生物体包括但不限于小鼠、大鼠、兔子和猴子。对与非人 Fc γ R 的结合进行优化的 Fc 变体可用于试验目的。举例来说,对于不同疾病而言,所获得的小鼠模型能够测试诸如有效性、毒性和药物代谢动力学的特定候选药物特性。在本领域中公知一种称为异种移植术的方法可将癌细胞移植或注射如小鼠中以模拟人癌症。对包含对一种或多种小鼠 Fc γ Rs 优化的 Fc 变体的抗体或 Fc 融合体进行测试可提供与该抗体或 Fc 融合体有效性、其作用机理等相关的有价值的信息。本发明的 Fc 变体也可优化以增强非糖基化型的功能性和 / 或溶解性。在一个优选的实施方案中,本发明的非糖基化 Fc 变体较亲本 Fc 多肽的非糖基化型对 Fc 配体的结合具有更大的亲合力。所述 Fc 配体包括但不限于 Fc γ Rs、C1q、FcRn 以及蛋白 A 和 G,且可来自任何来源包括但不限于人、小鼠、大鼠、兔子或猴子,优选人。在一个可选地优选的实施方案中,该优化的 Fc 变体较亲本 Fc 多肽的非糖基化型可更稳定和 / 或更易溶解。得到改造或预测显示任一上述优化特性的 Fc 变体在本文中称为“优化的 Fc 变体”。

[0170] 本发明的 Fc 变体可来自不同来源的亲本 Fc 多肽。该亲本 Fc 多肽可基本上为一种或多种 Fc 基因所编码,所述 Fc 基因来自任意生物体,包括但不限于人、小鼠、大鼠、兔子、骆驼、美洲驼、单峰骆驼、猴子,优选哺乳动物,最优选人和小鼠。在一个优选的实施方案中,该亲本 Fc 多肽包含抗体,称为亲本抗体。所述亲本抗体可以是完全人抗体,例如获得自使用转基因小鼠 (Bruggemann 等.,1997,Curr Opin Biotechnol 8:455-458) 或人抗体文库外加选择方法所产生的抗体 (Griffiths 等.,1998,Curr Opin Biotechnol 9:102-108)。所述亲本抗体无需天然存在。举例来说,该亲本抗体可以是工程抗体,包括但不限于嵌合抗体和人源化抗体 (Clark,2000,Immunol Today 21:397-402)。所述亲本抗体可以是基本上为一种或多种天然抗体基因所编码的抗体的工程变体。在一个实施方案中,该亲本抗体已得到亲和力成熟,所述技术为本领域所公知。可选地,该抗体可以用某些其它方法进行修饰,

例如于 2003 年 3 月 3 日提交的 USSN 10/339788 中所描述的方法。

[0171] 本发明的 Fc 变体可基本上为属于任一抗体类型的免疫球蛋白基因所编码。在一个优选的实施方案中,在抗体或 Fc 融合体中使用的本发明的 Fc 变体包含属于抗体 IgG 类型的序列,该 IgG 类型包括 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4。在一个可选的实施方案中,在抗体或 Fc 融合体中使用的本发明的 Fc 变体包含属于抗体 IgA(包括亚类 IgA1 和 IgA2)、IgD、IgE、IgG 或 IgM 类型的序列。本发明的 Fc 变体可包含超过一条的蛋白链。换句话说,在抗体或 Fc 融合体中使用的本发明的 Fc 变体是单体或寡聚体,包括同-或异-寡聚体。

[0172] 本发明的 Fc 变体可以与其它 Fc 变体结合,包括但不限于改变了效应器功能的变体。在抗体或 Fc 融合体中上述结合可提供附加的、协同的或新的特性。在一个实施方案中,本发明的 Fc 变体可以与其它已知的 Fc 变体结合(Duncan 等,1988, Nature 332:563-564;Lund 等,1991, J Immunol 147:2657-2662;Lund 等.,1992, Mol Immunol 29:53-59;Alegre 等.,1994, Transplantation 57:1537-1543;Hutchins 等.,1995, Proc Natl Acad Sci USA 92:11980-11984;Jefferis 等.,1995, Immunol Lett 44:111-117;Lund 等.,1995, Faseb J 9:115-119;Jefferis 等.,1996, Immunol Lett 54:101-104;Lund 等.,1996, J Immunol 157:4963-4969;Armour 等.,1999, Eur J Immunol 29:2613-2624;Idusogie 等.,2000, J Immunol 164:4178-4184;Reddy 等., J Immunol 2000, 164:1925-1933;Xu 等.,2000, Cell Immunol 200:16-26;Idusogie 等.,2001, J Immunol 166:2571-2575;Shields 等,2001, J Biol Chem 276:6591-6604;Jefferis 等.,2002, Immunol Lett 82:57-65;Presta 等.,2002, Biochem Soc Trans 30:487-490)(US 5,624,821;US 5,885,573;US 6,194,551;PCT WO 00/42072;PCT WO 99/58572)。在一个可选的实施方案中,本发明的 Fc 变体掺入到包含一种或多种工程糖型的抗体或 Fc 融合体中。本文中使用的“工程糖型(engineered glycoform)”意指与 Fc 多肽其价连接的糖组合物,其中所述糖组合物在化学特性上与亲本 Fc 多肽不同。工程糖型可用于不同用途,包括但不限于增强或减少效应器功能。可通过任何方法产生工程糖型,例如通过使用工程的或变体表达菌株,通过与一种或多种酶共表达,例如 β 1-4-N-乙酰葡萄糖氨基转移酶 III(GnTIII),通过在不同生物体或来自不同生物体的细胞系中表达 Fc 多肽,或通过 Fc 多肽得到表达后修饰糖类。用于产生工程糖型的方法为本领域所公知,包括但不限于(Umaña 等.,1999, Nat Biotechnol 17:176-180;Davies 等,2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294;Shields 等.,2002, J Biol Chem 277:26733-26740;Shinkawa 等.,2003, J Biol Chem 278:3466-3473)US 6,602,684;USSN 10/277,370;USSN 10/113,929;PCT WO 00/61739A1;PCT WO 01/29246A1;PCT WO 02/31140A1;PCT WO 02/30954A1;Potelligent™ 技术(Biowa, INC., Princeton, N.J.);GlycoMAb™ 糖基化工程技术(GLYCART biotechnology AG, Zurich, Switzerland))。工程糖型通常指不同的糖或寡糖;因此 Fc 多肽,例如抗体或 Fc 融合体可包含工程糖型。可选地,工程糖型可指包含不同糖或寡糖的 Fc 多肽。因而,本发明的 Fc 变体与其它 Fc 修饰的组合,以及与未被发现的 Fc 修饰的组合预期可达到产生新的具有优化特性的抗体或 Fc 融合体的目的。

[0173] 本发明的 Fc 变体可供抗体使用。本文中使用的“本发明的抗体”意指包含本发明 Fc 变体的抗体。实际上,本发明可供包含 Fc 的任何蛋白质使用,因此本发明的 Fc 变体的应用不限于抗体。本发明 Fc 变体可供 Fc 融合体使用。本文中使用的“本发明的 Fc 融合体”指

的是包含本发明Fc变体的Fc融合体。Fc融合体可包含可操作地与细胞因子、可溶性受体结构域、粘附分子、配体、酶、肽或其它蛋白质或蛋白质结构域连接的本发明Fc变体,对Fc融合体的描述包括但不限于US 5,843,725;US 6,018,026;US 6,291,212;US 6,291,646;US 6,300,099;US 6,323,323;PCT WO 00/24782;以及(Chamow等.,1996,Trends Biotechnol 14:52-60;Ashkenazi等.,1997,Curr Opin Immunol 9:195-200)。

[0174] 事实上本发明的抗体和融合体可靶向于任何抗原,包括但不限于如下所列的蛋白质、属于下列蛋白质的亚基、结构域、基序和表位:CD2;CD3, CD3E, CD4, CD11, CD11A, CD14, CD16, CD18, CD19, CD20, CD22, CD23, CD25, CD28, CD29, CD30, CD32, CD33(p67 蛋白), CD38, CD40, CD40L, CD52, CD54, CD56, CD80, CD147, GD3, IL-1, IL-1R, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-12, IL-15, IL-18, IL-23, α -干扰素、 β -干扰素、 γ -干扰素;TNF- α , TNF β 2, TNFc, TNF $\alpha\beta$, TNF-RI, TNF-RII, FasL, CD27L, CD30L, 4-1BBL, TRAIL, RANKL, TWEAK, APRIL, BAFF, LIGHT, VEGI, OX40L, TRAIL 受体-1, A1 腺苷受体, 淋巴毒素 β 受体, TACI, BAFF-R, EPO;LFA-3, ICAM-1, ICAM-3, EPCAM, β 1-整联蛋白、 β 2-整联蛋白、 α 4/ β 7-整联蛋白、 α 2-整联蛋白、 α 3-整联蛋白、 α 4-整联蛋白、 α 5-整联蛋白、 α 6-整联蛋白、 α v-整联蛋白、 α v β 3-整联蛋白、FGFR-3, 角质化细胞生长因子、VLA-1, VLA-4, L-选择蛋白, 抗独特型抗体(anti-id), E-选择蛋白, HLA, HLA-DR, CTLA-4, T细胞受体, B7-1, B7-2, VNR 整联蛋白(VNR integrin), TGF- β 1, TGF- β 2, 嗜酸细胞活化趋化因子1, BlyS(B-淋巴细胞刺激物), 补体C5, IGE, 因子VII, CD64, CBL, NCA 90, EGFR(ErbB-1), Her2/neu(ErbB-2), Her3(ErbB-3), Her4(ErbB-4), 组织因子, VEGF, VEGFR, 内皮素受体, VLA-4, 半抗原NP-加帽或NIP-加帽蛋白, T细胞受体 α/β , E-选择蛋白, 地高辛, 胎盘碱性磷酸酶(PLAP)和睾丸类PLAP碱性磷酸酶, 铁传递蛋白受体, 癌胚抗原(CEA), CEACAM5, HMFG PEM, 粘蛋白MUC1, MUC18, 类肝素酶(heparanase)I, 人心脏肌球蛋白, 肿瘤相关糖蛋白-72(TAG-72), 肿瘤相关抗原CA 125, 前列腺特异性膜抗原(PSMA), 高分子量黑色素瘤相关抗原(HMW-MAA), 癌相关抗原, Gcoprotein IIb/IIIa(GPIIb/IIIa), 表达Lewis Y相关糖的肿瘤相关抗原(tumor-associated antigen expressing Lewis Y related carbohydrate), 人巨细胞病毒(HCMV)gH包膜糖蛋白, HIV GP120, HCMV, 呼吸合胞病毒RSV F, RSVF Fgp, VNR 整联蛋白, IL-8, 细胞角蛋白肿瘤相关抗原, Hep B GP120, CMV, gpIIbIIIa, HIV IIIB GP120 V3环, 呼吸合胞病毒(RSV)Fgp, 单纯疱疹病毒(HSV)gD糖蛋白, HSV gB糖蛋白, HCMV gB包膜糖蛋白和产气荚膜梭菌毒素。

[0175] 本领域技术人员应当理解上述列出的靶不仅指特定的蛋白质及生物分子,而且还指包含它们的生化途径或各种途径。例如,当提及的CTLA-4作为靶抗原时,意味着配体和受体组成了T细胞共刺激途径,包括CTLA-4、B7-1、B7-2、CD28,并且任何其它未被发现的配体或受体也是靶对象。因此本文中使用的靶不仅指特定的生物分子,也指与所述靶以及所述靶所属的生化途径的成员相互作用的一组蛋白。本领域技术人员应当进一步理解任一上述的靶抗原、配体或它们相应的生化途径能可操作地与本发明的Fc变体连接以便产生Fc融合体。因此,举例来说,靶向EGFR的Fc融合体可通过可操作地将Fc变体与EGF、TGF α 或任何其它已发现或未被发现的能结合EGFR的配体连接而得到构建。因此,本发明的Fc变体能可操作地与EGFR连接以便产生能结合EGF、TGF α 或任何其它已发现或未被发现的能结合EGFR的配体的Fc融合体。因而,事实上任何多肽,无论是配体、受体或一些其它蛋

白质或蛋白质结构域,包括但不限于上述靶和组成它们相应的生化途径的蛋白质,能可操作地与本发明的 Fc 变体连接以便开发 Fc 融合体。

[0176] 在临床试验或在开发研制中批准使用的许多抗体和 Fc 融合体都可受益于本发明的 Fc 变体。所述抗体和 Fc 融合体在本文中称为“临床产物和候选物”。因此在一个优选的实施方案中,本发明的 Fc 变体可供一系列临床产物和候选物使用。例如,靶向 CD20 的许多抗体可受益于本发明 Fc 变体。例如本发明的 Fc 变体可供抗体使用,所述抗体基本上类似于利妥昔单抗 (Rituxan® IDEC/Genentech/Roche) (参见,例如 US 5,736,137),一种批准用于治疗非霍奇金淋巴瘤的嵌合抗 CD20 抗体;HuMax-CD20,一种目前正由 Genmab 开发的抗 CD20 抗体,一种描述于 US 5,500,362 的抗 CD20 抗体,AME-133 (Applied Molecular Evolution), hA20 (Immunomedics, Inc.), 以及 HumaLYM (Intracel)。许多抗体,其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),可受益于本发明的 Fc 变体。例如本发明的 Fc 变体可供抗体使用,所述抗体基本上类似于曲妥单抗 (Herceptin®, Genentech) (参见,例如 US 5,677,171),一种批准用于治疗乳腺癌的人源化抗 Her2/neu 抗体;目前正由 Genentech 开发的 pertuzumab (rhuMab-2C4, Omnitarg™);一种描述于 US 4,753,894 的抗 Her2 抗体;西妥昔单抗 (Erbix®), Imclone (US 4,943,533;PCT WO 96/40210),一种在临床试验中用于治疗多种癌症的嵌合抗 EGFR 抗体;目前正由 Abgenix/Immunex/Amgen 开发的 ABX-EGF (US 6,235,883);目前正由 Genmab 开发的 HuMax-EGFr (USSN 10/172,317);425、EMD55900、EMD62000 和 EMD72000 (Merck KgaA) (US 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) (US 5,891,996;US 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 01/62931A2);以及 SC100 (Scancell) (PCT WO 01/88138)。在另一个优选的实施方案中,本发明的 Fc 变体可供阿仑单抗 (Campath®, Millenium) 使用,阿仑单抗是一种目前已批准用于治疗 B 细胞慢性淋巴细胞性白血病的人源化单克隆抗体。本发明的 Fc 变体可供多种抗体或 Fc 融合体使用,所述抗体或 Fc 融合体基本上类似于其它临床产物和候选物,包括但不限于莫罗单抗 (muromonab)-CD3 (Orthoclone OKT3®),一种由 Ortho Biotech/Johnson&Johnson 开发的抗 CD3 抗体,替伊莫单抗 (ibritumomab tiaxetan) (Zevalin®),一种由 IDEC/Schering AG 开发的抗 CD20 抗体,吉姆单抗奥佐米星 (gemtuzumab ozogamicin) (Mylotarg®) 一种由 Celltech/Wyeth 开发的抗 CD33 (p67 蛋白) 抗体, alefacept (Amevive®),一种由 Biogen 开发的抗 LFA-3 Fc 融合体,由 Centocor/Lilly 开发的阿昔单抗 (abciximab) (ReoPro®),由 Novartis 开发的巴利昔单抗 (basiliximab) (Simulect®),由 MedImmune

开发的帕利珠单抗 (palivizumab) (Synagi®), 英夫利昔单抗 (infliximab) (Remicade®), 一种由 Centocor 开发的抗 TNF α 抗体, 阿达木单抗 (adalimumab) (Humira®), 一种由 Abbott 开发的抗 TNF α 抗体, Humicade™, 一种由 Celtech 开发的抗 TNF α 抗体, 依那西普 (etanercept) (Enbrel®), 一种由 Immunex/Amgen 开发的抗 TNF α Fc 融合体, ABX-CBL, 一种正由 Abgenix 开发的抗 CD147 抗体, ABX-IL8, 一种正由 Abgenix 开发的抗 IL8 抗体, ABX-MA1, 一种正由 Abgenix 开发的抗 MUC18 抗体, Pentumomab (R1549, ⁹⁰Y-muHMF1), 一种正由 Antisoma 开发的抗 MUC1 抗体, Therex (R1550), 一种正由 Antisoma 开发的抗 MUC1 抗体, 正由 Antisoma 开发的 AngioMab (AS1405), 正由 Antisoma 开发的 HuBC-1, 正由 Antisoma 开发的 Thioplatin (AS1407), Antegren® (那他珠单抗), 一种正由 Biogen 开发的抗 α -4- β -1 (VLA-4) 和 α -4- β -7 抗体, VLA-1 单抗, 一种正由 Biogen 开发中的抗 VLA-1 整联蛋白抗体, LTBR 单抗, 一种正由 Biogen 开发的抗淋巴毒素 β 受体 (LTBR) 抗体, CAT-152, 一种正由 Cambridge Antibody Technology 开发的抗 TGF β 2 抗体, J695, 一种正由 Cambridge Antibody Technology 和 Abbott 开发的抗 IL-2 抗体, CAT-192, 一种正由 Cambridge Antibody Technology 和 Genzyme 开发的抗 TGF β 1 抗体, CAT-213, 一种正由 Cambridge Antibody Technology 开发的抗嗜酸细胞活化趋化因子 1 抗体, LymphoStat-B™, 一种正由 Cambridge Antibody Technology 和 Human Genome Sciences INC 开发的抗 Blys 抗体, TRAIL-R1mAb, 一种正由 Cambridge Antibody Technology 和 Human Genome Sciences, INC 开发的抗 TRAIL-R1 抗体, Avastin™ (贝伐单抗, rhuMab-VEGF), 一种正由 Genentech 开发的抗 VEGF 抗体, 一种正由 Genentech 开发的抗 HER 受体家族抗体, 抗组织因子 (ATF), 一种正由 Genentech 开发的抗组织因子抗体, Xolair™ (Omalizumab), 一种正由 Genentech 开发的抗 IgE 抗体, Raptiva™ (Efalizumab), 一种正由 Genentech 和 Xoma 开发的抗 CD11a 抗体, 正由 Genentech 和 Millenium Pharmaceuticals 开发的 MLN-02 抗体 (以前称为 LDP-02), HuMax CD4, 一种正由 Genmab 开发的抗 CD4 抗体, HuMax-IL15, 一种正由 Genmab 和 Amgen 开发的抗 IL15 抗体, 正由 Genmab 和 Medarex 开发的 HuMax-布洛芬 (Inflam), HuMax-Cancer, 一种正由 Genmab 和 Medarex 以及 Oxford GcoSciences 开发的抗类肝素酶 I 抗体, 正由 Genmab 和 Amgen 开发的 HuMax-Lymphoma, 正由 Genmab 开发的 HuMax-TAC, IDEC-131, 一种正由 IDEC Pharmaceuticals 开发的抗 CD40L 抗体, IDEC-151 (克立昔单抗), 一种正由 IDEC Pharmaceuticals 开发的抗 CD4 抗体, IDEC-114, 一种正由 IDEC Pharmaceuticals 开发的抗 CD80 抗体, IDEC-152, 一种正由 IDEC Pharmaceuticals 开发的抗 CD23 抗体, 正由 IDEC Pharmaceuticals 开发的抗巨噬细胞移动因子 (MIF) 抗体, BEC2, 一种正由 Imclone 开发的抗独特型抗体, IMC-1C11, 一种正由 Imclone 开发的抗 KDR 抗体, DC101, 一种正由 Imclone 开发的抗 flk-1 抗体, 正由 Imclone 开发的抗 VE 钙粘蛋白抗体, CEA-Cide™ (labetuzumab), 一种正由 Immunomedics 开发的抗癌胚抗原 (CEA) 抗体, LymphoCide™ (依帕珠单抗), 一种正由 Immunomedics 开发的抗 CD22 抗体, 正由 Immunomedics 开发的 AFP-Cide, 正由 Immunomedics 开发的 MyelomaCide, 正由 Immunomedics 开发的 LkoCide, 正由 Immunomedics 开发的 ProstaCide, MDX-010, 一种正由 Medarex 开发的抗 CTLA4 抗体, MDX-060, 一种正由 Medarex 开发的抗 CD30 抗体, 正由 Medarex 开发的 MDX-070, 正由 Medarex 开发的 MDX-018, Oside™ (IDM-1), 一种正由 Medarex 和 Immuno-Designed Molecules 开发的抗 Her2 抗体, HuMaX™-CD4, 一种正由

Medarex 和 Genmab 开发的抗 CD4 抗体, HuMax-IL15, 一种正由 Medarex 和 Genmab 开发的抗 IL-15 抗体, CNTO 148, 一种正由 Medarex 和 Centocor/J&J 开发的抗 TNF α 抗体, CNTO 1275, 一种正由 Centocor/J&J 开发的抗细胞因子抗体, MOR101 和 MOR102, 正由 MorphoSys 开发的抗细胞间粘附因子-1 (ICAM-1) (CD54) 抗体, MOR201, 一种正由 MorphoSys 开发的抗成纤维细胞生长因子受体 3 (FGFR-3) 抗体, Nuvion (visilizumab), 一种正由 Protein Design Labs 开发的抗 CD3 抗体, HuZAFTM, 一种正由 Protein Design Labs 开发的抗 γ 干扰素抗体, 正由 Protein Design Labs 开发的抗 $\alpha 5\beta 1$ 整联蛋白抗体, 正由 Protein Design Labs 开发的抗 IL-12, ING-1, 一种正由 Xoma 开发的抗 Ep-CAM 抗体, 以及 MLN01, 一种正由 Xoma 开发的抗 $\beta 2$ 整联蛋白抗体。

[0177] 应用 Fc 变体于上述抗体及 Fc 融合体的临床产物和候选物中不应受它们明确组成所约束。本发明的 Fc 变体可掺入到上述临床候选物和产物中, 或掺入到基本上与它们类似的抗体和 Fc 融合体中。本发明的 Fc 变体可掺入到上述临床候选物和产物的人源化的、亲和力和成熟的、工程的或以一些其它方法修饰的型式。此外, 无需使用上述临床产物和候选物的完整多肽来构建掺入本发明的 Fc 变体的新的抗体或 Fc 融合体; 例如仅使用临床产物或候选物抗体的可变区, 基本上相似的可变区, 或可变区的人源化的、亲和力和成熟的、工程的或修饰的型式。在另一个实施方案中, 本发明的 Fc 变体可供抗体或 Fc 融合体使用, 所述抗体或 Fc 融合体能结合上述临床产物和候选物之一的相同表位、抗原、配体或受体。

[0178] 本发明的 Fc 变体可供不同抗体和 Fc 融合体使用。在一个实施方案中, 本发明的抗体或 Fc 融合体是一种治疗、诊断或研究试剂, 优选是一种治疗试剂。可选地, 本发明的抗体和 Fc 融合体可用于农业或工业用途。在一个可选的实施方案中, 本发明的 Fc 变体组成可用实验方法筛选的文库。该文库可以是一列核苷酸或氨基酸序列, 或可以是编码文库序列的核酸或多肽的物理组合物。Fc 变体可供单克隆或多克隆抗体组合物使用。在一个优选的实施方案中, 本发明的抗体和 Fc 融合体可用于杀死具有靶抗原的靶细胞, 例如癌细胞。在一个可选的实施方案中, 本发明的抗体和 Fc 融合体用于阻断、拮抗 (antagonize) 或激动 (agonize) 靶抗原, 例如用于拮抗细胞因子或细胞因子受体。在一个可选地优选的实施方案中, 本发明的抗体和 Fc 融合体用于阻断、拮抗或对抗靶抗原并杀死具有该靶抗原的靶细胞。

[0179] 本发明的 Fc 变体可用于不同的治疗目的。在一个优选的实施方案中, 施用 Fc 变体蛋白质于患者以治疗与抗体相关的病症。对于本发明的目的而言, “患者”包括人和其它动物, 优选哺乳动物, 最优选人。因此本发明的抗体和 Fc 融合体可用于治疗人和牲畜。在优选的实施方案中, 患者是哺乳动物, 在最优选的实施方案中, 患者是人。本发明中术语“治疗”意指对于疾病或病症包括治疗性处理, 也包括预防性或抑制性方法。因此, 举例来说, 在疾病发作前成功施用抗体或 Fc 融合体以产生疾病治疗作用。如其它实例, 在疾病临床表现后成功施用优化的抗体或 Fc 融合体以抗疾病症状, 包含了疾病的治疗。“治疗”也包含在疾病发作后施用优化的抗体或 Fc 融合体蛋白质以便根除疾病。在发作以及临床症状发生后成功地施用试剂, 有可能消除临床症状并改善疾病, 包含了治疗该疾病。那些“需要治疗的”包括已经患有疾病或病症的哺乳动物, 也包括那些易患疾病或病症的那些, 包括疾病或病症要得到预防的那些。本文中“抗体相关的病症”或“抗体应答的病症”或“病症”或“疾病”意指通过施用包含本发明的抗体或 Fc 融合体的药物组合物可得到改善的病症。抗体相关的

病症包括但不限于自身免疫性疾病、免疫性疾病、传染病、炎性疾病、神经系统疾病、和包括癌症的肿瘤性以及瘤形成疾病。本文中“癌症”和“癌性的”指的是或描述为哺乳动物中的生理状态,其一般通过未调节的细胞生长得到鉴定。癌症的实例包括但不限于癌、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤(包括脂肉瘤)、神经内分泌肿瘤、间皮瘤、神经鞘瘤、脑膜瘤、腺瘤、黑素瘤以及非白血性白血病或淋巴恶性肿瘤。上述癌症更具体的实例包括鳞状细胞癌(如,鳞状上皮细胞癌)、肺癌包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌以及肺鳞状细胞癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃癌包括胃肠癌、胰腺癌、恶性胶质瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌、肛门癌、阴茎癌、睾丸癌、食道癌、胆管肿瘤,也包括头癌和颈癌。此外,本发明的Fc变体可用于治疗的病症包括但不限于:充血性心力衰竭(CHF)、血管炎、红斑痤疮、痤疮、湿疹、心肌炎和其它心肌病症、系统性红斑狼疮、糖尿病、脊椎病、滑液成纤维细胞增生以及骨髓基质瘤;骨质丢失;变形性骨炎(paget's disease)、破骨细胞瘤;多发性骨髓瘤、乳腺癌、失用型骨质减少;营养不良、牙周病、家族性脾性贫血、朗罕氏细胞组织细胞增多病、脊髓损伤、急性脓毒性关节炎、骨软化症、皮质醇增多症、单骨纤维性骨发育不良、多发性骨纤维性发育不良、牙周重建以及骨折;肉样瘤病;多发性骨髓瘤;溶骨癌(osteolytic bone cancers)、乳腺癌、肺癌、肾癌和直肠癌;骨转移、骨痛治疗和体液恶性高钙血症、强直性脊椎炎和其它脊椎关节病;移植排斥、病毒感染、血液瘤以及类瘤形成病症例如何杰金氏淋巴瘤;非何杰金淋巴瘤(Burkitt's 淋巴瘤、小淋巴细胞淋巴瘤/慢性淋巴细胞性白血病、蕈样肉芽肿病、外套细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、弥漫性巨大B细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、毛细胞性白血病以及淋巴浆细胞性白血病)、淋巴细胞前体细胞肿瘤、包括B细胞急性成淋巴细胞性非白血性白血病/淋巴瘤、也T细胞急性成淋巴细胞性非白血性白血病/淋巴瘤、胸腺瘤、成熟T和NK细胞肿瘤,包括外周T细胞非白血性白血病、成熟T细胞非白血性白血病/T细胞淋巴瘤以及大颗粒状淋巴细胞性白血病、朗罕氏细胞组织细胞增多症、诸如急性骨髓性粒细胞性白血病的骨髓瘤形成,包括成熟的急性骨髓性白血病(AML)、分化的急性骨髓性白血病、急性前髓细胞性白血病、急性骨髓单核细胞性白血病、和急性单核细胞性白血病、脊髓发育不良综合征、慢性骨髓增生病,包括慢性髓细胞性白血病、中枢神经系统肿瘤,如脑肿瘤(神经胶质瘤、成神经细胞瘤、星细胞瘤、成神经管细胞瘤、室管膜细胞瘤和视网膜成神经细胞瘤)、实体瘤(鼻咽癌、基底细胞癌、胰腺癌、胆管癌、卡波氏肉瘤、睾丸癌、子宫、阴道或宫颈癌、卵巢癌、原发性肝癌或子宫内膜癌、以及血管系统肿瘤(血管肉瘤和hemangiopericytoma)、骨质疏松症、肝炎、HIV、AIDS、脊椎关节炎、类风湿性关节炎、炎性肠疾病(IBD)、败血症和败血症性休克、节段性回肠炎、牛皮癣、硬皮病、移植抗宿主病(GVHD)、异源胰岛移植排斥(allogenic islet graft rejection)、血液恶性肿瘤诸如多发性骨髓瘤(MM)、骨髓增生异常综合征(MDS)和急性骨髓性白血病(AML)、肿瘤相关的炎症、周围神经损伤或脱髓鞘性病。

[0180] 在一个实施方案中,将本发明的抗体或Fc变体施用于患病的患者,所述疾病涉及蛋白质的不适当表达。在本发明范围内,其意指包括以异常蛋白质为特征的疾病和病症,例如基于改变蛋白质存在的数量、存在突变蛋白质,或两者的疾病或病症。蛋白质过量可基于任何原因,包括但不限于在分子水平上过表达、在作用部位出现持续很久或蓄积、或相对于正常增加了蛋白质活性。以蛋白质减少为特征的疾病和病症也包括在该定义内。所述减少

可基于任何原因,包括但不限于在分子水平上减少的表达、在作用部位出现减小或减少、蛋白质的突变体形式、或相对于正常减少了蛋白质活性。上述相对于蛋白质正常表达、出现或活性的蛋白质过多或减少可得到测定,所述的测定在开发和 / 或临床试验本发明的抗体和 Fc 变体中可扮演一个重要角色。

[0181] 在一个实施方案中,本发明的抗体或 Fc 融合体仅作为治疗活性剂施用于患者。可选地,本发明的抗体或 Fc 融合体与一种或多种其它治疗剂联合施用,包括但不限于细胞毒素剂、化学治疗剂、细胞活素类、生长抑制剂、抗激素剂、激酶抑制剂、抗血管生成剂、保心药或其它治疗剂。上述分子以合适的化合物形式和量存在,以有效地用于预期目的。有经验的医师可凭经验确定其它用于本文治疗剂的合适剂量。本发明的抗体和 Fc 融合体可伴随一种或多种其它治疗方案施用。举例来说,本发明的抗体或 Fc 融合体随同化学疗法、放射疗法或两者一起施用于患者。在一个实施方案中,本发明的抗体或 Fc 融合体可联合一种或多种可能包含或可能不包含本发明 Fc 变体的抗体或 Fc 融合体施用。

[0182] 在一个实施方案中,本发明的抗体和 Fc 融合体与化学治疗剂一起施用。本文中使用的“化学治疗剂”意指在癌症治疗中使用的化合物。化学治疗剂的实例包括但不限于诸如硫替派和环磷酰胺 (cyclophosphamide) (CYTOXAN™) 的烷基化剂;诸如白消安、英丙舒凡和噻消安的烷基磺酸盐类;诸如苯并多巴 (benzodopa)、卡波醌、美妥多巴 (meturedopa) 和乌瑞多巴 (uredopa) 的氮丙啶类;乙烯亚胺类和甲基蜜胺类 (methylamelamines) 包括六甲密胺、三亚胺嗪、trietylenephosphoramidate、三亚乙基硫磺化磷酰胺和 trimethylolomelamine;氮芥类诸如苯丁酸氮芥、蔡氮芥、cholophosphamide、磷雌氮芥、异磷酰胺、二氯甲基二乙胺、氧氮芥盐酸化物、苯丙氨酸氮芥、新氮芥、苯芥胆甾醇、泼尼莫司汀、氯乙环磷酰胺、尿嘧啶氮芥;诸如卡氮芥、氯脲菌素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀、雷莫司汀的硝脲类;诸如 aclacinomysins、放线菌素、authramycin、重氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素 C、刺孢霉素、carabycin、caminomycin、嗜癌霉素、色霉素、更生霉素、柔红霉素、地托比星、6-重氮基-氧代-L-正亮氨酸、阿霉素、表柔比星、依索比星、伊达比星、麻西罗霉素、丝裂霉素、霉酚酸、诺加霉素、橄榄霉素、派来霉素、potfiromycin、嘌呤霉素、三铁阿霉素、罗比多星、链黑霉素、链唑霉素,杀结核菌素、乌苯美司、新制癌菌素、佐柔比星的抗生素;诸如甲氨蝶呤和 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 的抗代谢物;诸如二甲叶酸、氨甲叶酸、蝶酰三谷氨酸、曲美沙特的叶酸类似物;诸如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤的嘌呤类似物;诸如盐酸环胞苷、氮杂胞苷、6-氮尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、二去氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷、5-FU 的嘧啶类似物;诸如卡普唑酮、丙酸屈他雄酮、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯的雄激素;诸如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦的抗肾上腺素;诸如 frolic acid 的叶酸补充剂;乙酰葡萄糖酸内酯;醛磷酰胺糖苷;氨基戊酮酸;安吡啶;bestrabucil;比山群;依达曲沙;地磷酰胺;秋水仙胺;地吡醌;elformithine;依利醋铵;依托格鲁;硝酸镓;羟基脲;蘑菇多糖;氯尼达明;米托胍脲;米托蒽醌;莫派达醇;二胺硝吡啶;喷司他丁;蛋氨酸氮芥;吡柔比星;鬼臼酸;2-乙基酰肼 (2-ethyl hydrazide);丙卡巴肼;PSK®;雷佐生;施佐非兰;锗螺胺;细格孢氮杂酸;三亚胺醌;2,2',2''-三氯三乙胺;乌拉坦;长春地辛;达卡巴嗪;甘露莫司汀;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;哌泊溴烷;gacytosine;阿糖胞苷 ("Ara-C");环磷酰胺;塞替派;紫杉烷类,例如紫杉醇 (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N. J.) 和紫杉萜 (TAXOTERE®, Rhne-Poulenc Rorer, Antony,

France) ; 苯丁酸氮芥 ; 吉西他滨 ; 6- 硫代鸟嘌呤 ; 巯基嘌呤 ; 甲氨蝶呤 ; 诸如顺铂和卡铂的铂类似物 ; 长春碱 ; 铂 ; 依托泊苷 (VP-16) ; 异环磷酰胺 ; 丝裂霉素 ; 米托蒽醌 ; 长春新碱 ; 长春瑞滨 ; 诺维本 ; 诺消灵 ; 替尼泊苷 ; 道诺霉素 ; 氨基蝶呤 ; 希罗达 ; 伊班膦酸盐 ; CPT-11 ; 拓扑异构酶抑制剂 RFS 2000 ; 二氟甲基鸟氨酸 (DMFO) ; 维甲酸 ; esperamicins ; 卡培他滨 ; 胸腺嘧啶核苷酸合酶抑制剂 (诸如拓优得) ; 诸如 celicoxib (CELBREX, MK-0966 (VIOXX[®])) 的 cox-2 抑制剂 ; 以及任一上述的药理学上可接受的盐、酸或衍生物。在肿瘤上产生调节或抑制激素结果的抗激素剂也包括于该定义中, 诸如抗雌激素类包括例如他莫昔芬、雷洛昔芬、抑制 4(5)-咪唑的芳香酶、4- 羟泰米芬、曲沃昔芬、keoxifene、LY 117018, 奥那司酮和托瑞米芬 (法乐通) ; 以及抗雄激素类诸如氟他胺, 尼鲁米特, 比卡鲁胺, 醋酸亮丙瑞林和戈舍瑞林 ; 以及任一上述的药理学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0183] 化学治疗剂或其它细胞毒素剂可作为前药施用。本文中使用的“前药”意指药理学上活性物质的前体或衍生物形式, 与母体药物相比其对肿瘤细胞具有较小的细胞毒性, 并且可被酶活化或转化为更具活性的母体形式。参见, 例如 Wilman, 1986, Biochemical Society Transactions, 615th Meeting Belfast, 14 : 375-382 ; 和 Stella 等., " Prodrugs : A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery, " Directed Drug Delivery, Borchardt 等., (ed.) : 247-267, Humana Press, 1985. 可供本发明使用的前药包括但不限于含有磷酸盐前药、含有硫代硫酸盐前药、含有硫酸盐前药、含肽前药、D- 氨基酸修饰的前药、糖基化前药、含有 β - 内酰胺前药、含有任选地取代的苯氧基乙酰胺前药或含有任选地取代的苯乙酰胺前药、5- 氟胞嘧啶和其它的 5- 氟尿嘧啶前药, 上述前药能转化为更具活性的细胞毒性游离药物。用于与本发明的抗体和 Fc 融合体一起使用并衍生自前药形式的细胞毒性药物的实例包括但不限于任一上述化学治疗剂。

[0184] 本发明的抗体和 Fc 融合体可结合其它治疗方案。例如, 在一个实施方案中, 要用抗体或 Fc 融合体治疗的患者也可接受放射治疗。放射治疗可依据本领域所采用的和本领域技术人员所公知的常规实验设计进行。上述治疗包括但不限于铯、铱、碘或钴辐射。该放射治疗可全身照射, 或可对体内或体表上特定部位或组织局部定向照射, 该特定部位或组织例如肺、膀胱或前列腺。一般而言, 放射治疗每隔约 1-2 周时间以脉冲形式进行。然而, 放射治疗可间隔更长时间进行。例如, 对患有头癌和颈癌的患者进行放射治疗可间隔约 6-7 周。任选地, 放射治疗可以单剂量或多剂量、连续剂量的形式进行。有经验的医师可凭经验确定用于本文的放射治疗的合适剂量。依照本发明的另一个实施方案, 本发明的抗体或 Fc 融合体以及一种或多种其它抗癌疗法用于治疗离体癌细胞。应当预计到上述离体治疗可应用于骨髓移植, 以及具体地应用于自体骨髓移植。举例来说, 如上所述在受体患者中可用抗体或 Fc 融合体与一种或多种其它抗癌疗法治疗含有癌细胞的细胞或组织, 以在移植前排除或基本上排除癌细胞。当然, 应当预计到本发明的抗体和 Fc 融合体还可与诸如外科手术的其它治疗技术联合使用。

[0185] 在一个可选的实施方案中, 本发明的抗体和 Fc 融合体与细胞因子一起施用。本文中使用的“细胞因子”意指一种细胞群所释放的对其它细胞起细胞间介质作用的蛋白质的通称。上述细胞因子的实例是淋巴因子、单核因子以及传统的多肽激素。细胞因子包括诸如人生长激素、N- 甲硫氨酰基人生长激素和牛生长激素的生长激素 ; 甲状旁腺素 ; 甲状腺素 ; 胰岛素 ; 胰岛素原 ; 松弛素 ; 松弛素原 ; 诸如促卵泡激素 (FSH)、促甲状腺激素 (TSH) 和黄体

生成素 (LH) 的糖蛋白激素 ; 肝生长因子 ; 成纤维细胞生长因子 ; 催乳素 ; 胎盘催乳素 ; 肿瘤坏死因子 - α 和 β ; 苗勒氏抑制物质 ; 小鼠促性腺激素相关肽 ; 抑制素 ; 活化素 ; 血管内皮生长因子 ; 整联蛋白 ; 血小板生成素 (TPO) ; 诸如 NGF- β 的神经生长因子 ; 血小板生长因子 ; 诸如 RGF- α 和 TGF- β 的转化生长因子 (TGFs) ; 胰岛素样生长因子 -I 和 II ; 促红细胞生成素 (EPO) ; 骨诱导因子 ; 诸如 α 、 β 、 γ -干扰素的干扰素 ; 诸如巨噬细胞-CSF (M-CSF)、粒细胞巨噬细胞-CSF (GM-CSF) 和粒细胞-CSF (G-CSF) 的集落刺激因子 (CSFs) ; 诸如 IL-1、IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-15 的白介素 (ILs) ; 诸如 TNF- α 或 THF- β 的肿瘤坏死因子 ; 以及其它多肽因子, 包括 LIF 和试剂盒配体 (kit ligand) (KL)。当在本文中使用时, 术语细胞因子包括天然来源或重组细胞培养基来源的蛋白质, 以及天然序列细胞因子生物学上的活性等价物。

[0186] 其它许多治疗剂可供与本发明的抗体和 Fc 融合体一起施用。在一个实施方案中, 抗体或 Fc 融合体与抗血管生成剂一起施用。本文中使用的“抗血管生成剂”意指一种可阻断或以某种程度干扰血管发育的化合物。例如, 抗血管生成因子可以是一种小分子或蛋白质, 例如是一种抗体、Fc 融合体或细胞因子, 其能结合与血管发生有关的生长因子或生长因子受体。本文中优选的抗血管生成因子是能结合血管内皮生长因子 (VEGF) 的一种抗体。在一个可选的实施方案中, 抗体或 Fc 融合体与能诱导或增强获得性免疫应答的治疗剂一起施用, 例如一种能靶向 CTLA-4 的抗体。在一个可选的实施方案中, 抗体或 Fc 融合体与酪氨酸激酶抑制剂一起施用。本文中使用的“酪氨酸激酶抑制剂”意指一种在某种程度上抑制酪氨酸激酶的酪氨酸激酶活性的分子。上述抑制剂的实例包括但不限于喹唑啉 (quinazoline), 诸如 PD153035, 4-(3-氯苯胺基) 喹唑啉 ; 吡啶并嘧啶 ; 嘧啶并嘧啶 ; 吡咯并嘧啶, 诸如 CGP 59326, CGP 60261 和 CGP 62706 ; 吡唑并嘧啶, 4-(苯基氨基)-7H-吡咯并 (2,3-d) 嘧啶 ; 姜黄素 (curcumin) (姜黄素, 4,5-双 (4-氟代苯胺基) 邻苯二甲酰二胺) ; 含有硝基噻吩部分的酪氨酸磷酸化抑制剂 ; PD-0183805 (Warner-Lambert) ; 反义分子 (如, 与 ErbB 编码核酸结合的那些) ; 喹啉 (US 5,804,396) ; tryphostins (US 5,804,396) ; ZD6474 (Astra Zeneca) ; PTK-787 (Novartis/Schering A G) ; 诸如 C1-1033 (Pfizer) 的全 ErbB 抑制剂 ; Affinitac (ISIS 3521 ; Isis/Lilly) ; 甲磺酸伊马替尼 (STI571, Gleevec[®] ; Novartis) ; PKI166 (Novartis) ; GW2016 (GLAXO SmithKline) ; C1-1033 (Pfizer) ; EKB-569 (Wyeth) ; Semaxinib (Sugen) ; ZD6474 (AstraZeneca) ; PTK-787 (Novartis/Schering AG) ; INC-1 C11 (Imclone) ; 或如在下列任一专利申请中所述的抑制剂 : US 5,804,396 ; PCT WO 99/09016 (American Cyanimid) ; PCT WO 98/43960 (American Cyanamid) ; PCT WO 97/38983 (Warner-Lambert) ; PCT WO 99/06378 (Warner-Lambert) ; PCT WO 99/06396 (Warner-Lambert) ; PCT WO 96/30347 (Pfizer, Inc) ; PCT WO 96/33978 (AstraZeneca) ; PCT W096/3397 (AstraZeneca) ; PCT WO 96/33980 (AstraZeneca), gefitinib (IRESSA[™], ZD1839, AstraZeneca), 和 OSI-774 (Tarceva[™], OSI Pharmaceuticals/Genentech)。

[0187] 在一个可选的实施方案中, 本发明的抗体或 Fc 融合体与另外的治疗化合物偶联或可操作地连接。所述治疗化合物可以是一种细胞毒素剂、化学治疗剂、毒素、放射性同位素、细胞因子或其它治疗活性剂。可使用多种双功能蛋白质偶联剂制备抗体或 Fc 融合体与细胞毒素剂的偶联物, 所述偶联剂诸如 N-琥珀酰-3-(2-联硫基吡啶)-丙酸盐 (SPDP)、

琥珀酰-4-(N-maleimidomethyl) 环己烷-1-羧酸盐、硫醇亚胺 (IT)、亚氨酸酯的双功能衍生物 (诸如二甲基己二亚酰胺氯化氢)、活化酯类 (诸如二琥珀酰辛二酸盐)、醛类 (诸如戊二醛)、二叠氮基化合物 (诸如二 (对-叠氮基苯甲酰基) 己二胺)、二重氮基衍生物 (诸如二-(对-重氮基苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸盐类 (诸如 tolyene 2,6-二异氰酸盐) 以及双活化氟化合物 (诸如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如,可根据 Vitetta 等., 1971, Science 238:1098 中所述方法制备蓖麻毒素免疫毒素。碳 14 标记的 1-异硫代氰氧基苄基-3-甲基二乙烯三胺五乙酸 (MX-DTPA) 是一种用于将放射性核苷酸与抗体偶联的典型的螯合剂 (cheating agent)。参见 PCT WO 94/11026。接头可以是便于在细胞中释放细胞毒类药物的可裂解接头。举例来说,可使用对酸敏感的接头、对肽酶敏感的接头、二甲基接头或含有二硫化物的接头 (Chari 等., 1992, Cancer Research 52:127-131)。可选地,所述抗体或 Fc 融合体可操作地与治疗剂连接,如通过重组技术或肽合成。

[0188] 如上已描述了用于偶联到本发明抗体和 Fc 融合体上的化学治疗剂。在一个可选的实施方案中,所述抗体或 Fc 融合体偶联到或可操作地连接到毒素上,包括但不限于小分子毒素和细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素,包括其片段和 / 或变体。小分子毒素包括但不限于刺孢毒素 (calicheamicin)、美登素 (US 5,208,020)、trichothene 和 CC1065。在本发明的一个实施方案中,所述抗体或 Fc 融合体偶联到一种或多种美登素分子上 (如,每抗体分子约 1-10 个美登素分子)。例如,美登素也可转化为 May-SS-Me,其可还原为 May-SH3 并与修饰的抗体或 Fc 融合体反应 (Chari 等., 1992, Cancer Research 52:127-131) 以产生美登素-抗体或美登素-Fc 融合体偶联物。另一种感兴趣的偶联反应包含将抗体或 Fc 融合体偶联到一种或多种刺孢毒素分子上。所述刺孢毒素抗生素家族在亚皮摩尔浓度下能产生双链 DNA 断裂物。可使用的刺孢毒素的结构类似物包括但不限于 γ_1^1 、 α_2^1 、 α_3 、N-乙酰基- γ_1^1 、PSAG 和 Θ^1 , (Hinman 等., 1993, Cancer Research 53:3336-3342; Lode 等., 1998, Cancer Research 58:2925-2928) (US 5,714,586; US 5,712,374; US 5,264,586; US 5,773,001)。多拉司他汀 (Dolastatin) 10 类似物,——如可供本发明 Fc 变体偶联使用的 auristatin E (AE) 和 monomethylauristatin E (MMAE) (Doronina 等., 2003, Nat Biotechnol 21(7):778-84; Francisco 等., 2003 Blood 102(4):1458-65)。有用的酶活性毒素包括但不限于白喉毒素 A 链、白喉毒素非结合活性片段、外毒素 A 链 (来自铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒素 A 链、相思豆毒素 A 链、莨菪根毒素 A 链、 α -八叠球菌、油桐蛋白、石竹素蛋白、美国商陆蛋白 (PAPI、PAPII 和 PAP-S)、苦瓜抑制物、麻疯树毒蛋白、巴豆毒素、sapaonaria officinalis 抑制物、白树毒素、mitogellin、局限曲菌素、酚霉素、依诺霉素以及单端孢霉烯族毒素。参见,例如, PCT WO 93/21232。本发明也涉及一种本发明的抗体或 Fc 融合体与具有溶核活性的化合物形成的偶联物或融合体,所述化合物例如核糖核酸酶或诸如脱氧核糖核酸酶 (Dnase) 的 DNA 核酸内切酶。

[0189] 在一个可选的实施方案中,本发明的抗体或 Fc 融合体可偶联或可操作地连接放射性同位素以形成放射性偶联物。许多放射性同位素可用于产生抗体和 Fc 融合体的放射性偶联物。实例包括但不限于, At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 和 Lu 的放射性同位素。

[0190] 在另一个实施方案中,本发明的抗体或 Fc 融合体可偶联“受体”(诸如链霉抗生物

素蛋白) 用作肿瘤前靶 (pretargeting), 其中所述抗体-受体或 Fc 融合体-受体偶联物施用于患者, 接着使用清除剂从循环系统中除去未结合的偶联物, 然后施用偶联细胞毒素剂 (如, 放射性核苷酸) 的“配体” (如, 抗生物素蛋白)。在一个可选的实施方案中, 所述抗体或 Fc 融合体偶联或可操作地连接于酶以便进行抗体依赖性酶介导前药疗法 (ADEPT)。ADEPT 可通过将所述抗体或 Fc 融合体与前药激活酶偶联或可操作地连接而进行, 该前药激活酶可转化前药 (如, 肽酰化学治疗剂, 参见 PCT WO 81/01145) 为活化的抗癌药物。参见, 例如 PCT WO 88/07378 和 US 4, 975, 278。用于 ADEPT 的免疫偶联物的酶组分包括任何能以使得前药转化为更具活性、细胞毒性形式的这样一种方式激活前药的酶。用于本发明方法中的酶包括但不限于用于将含有磷酸盐的前药转化为游离药物的碱性磷酸酶; 用于将含有硫酸盐的前药转化为游离药物的芳香基硫酸酯酶; 用于将无毒 5- 氟胞嘧啶转化为抗癌药物 (5- 氟尿嘧啶) 的胞嘧啶脱氨酶; 诸如沙雷氏菌蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、羧肽酶以及组织蛋白酶 (如组织蛋白酶 B 和 L) 的蛋白酶, 其可用于将含肽前药转化为游离药物 (free drug); D- 丙氨酰基羧肽酶, 用于转化含 D- 氨基酸取代物的前药; 诸如 β - 半乳糖苷酶和神经氨酸酶的糖裂解酶, 用于将糖基化前药转化为游离药物; β - 内酰胺酶, 用于将 α - 内酰胺衍生的药物转化为游离药物; 以及青霉素酰胺酶, 如青霉素 V 酰胺酶或青霉素 G 酰胺酶, 用于将在其胺的氮原子处分别用苯氧基乙酰基或苯乙酰基取代衍生的药物转化为游离药物。可选地, 在本领域中已知为“抗体酶 (abzymes)” 的具有酶活性的抗体可用于将本发明的前药转化为活性的游离药 (参见, 例如 Massey, 1987, Nature 328 :457-458)。可制备抗体- 抗体酶和 Fc 融合体- 抗体酶偶联物用于递送抗体酶至肿瘤细胞群中。应当预料到在本文中还有本发明抗体和 Fc 融合体的其它修饰。例如, 所述抗体或 Fc 融合体可连接有多种非蛋白质聚合物之一, 如聚乙二醇、聚丙二醇、聚氧化烯或聚乙二醇和聚丙二醇的共聚物。

[0191] 应当预料到用本发明抗体或 Fc 融合体与一种或多种治疗活性剂配制的药物组合物。通过将所述具有所需纯度的抗体或 Fc 融合体与任选的药理学上可接受载体、赋形剂或稳定剂混合制备用于存储的本发明的抗体和 Fc 融合体的剂型 (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed., 1980), 为冻干剂型或水溶液形式。可接受载体、赋形剂或稳定剂所使用的剂量或浓度对于接受者是无毒的, 包括缓冲液诸如磷酸盐、柠檬酸盐、醋酸盐和其它有机酸; 抗氧化剂包括抗坏血酸和甲硫氨酸; 防腐剂 (诸如十八烷基二甲基苄基氯化铵、氯己双铵、氯化苄甲羟铵、氯化苄乙氧铵、苯酚、丁基 orbenzyl 醇、诸如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯的烷基对羟基苯甲酸酯类、儿茶酚、雷琐酚、环己醇、3- 戊醇以及间甲酚); 低分子量 (低于约 10 个残基) 多肽; 蛋白质, 诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白; 诸如聚乙烯吡咯酮的亲水聚合物、诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸的氨基酸、单糖、二糖和其它糖类包括葡萄糖、甘露糖或糊精、诸如 EDTA 的螯合剂、诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇的糖类、甜味剂和其它调味剂、诸如微晶纤维素、乳糖、玉米及其它淀粉的充填剂、粘合剂、添加剂、着色剂、诸如钠的成盐反离子金属复合物 (如锌- 蛋白质复合物) 和 / 或诸如 TWEEN™、PLURONICS™ 或聚乙二醇 (PEG) 的非离子表面活性剂。在一个优选的实施方案中, 所述包含本发明的抗体或 Fc 融合体的药物组合物以水溶形式存在, 诸如以药理学上可接受的盐存在, 其意指包括酸和碱加成盐。“药理学上可接受的酸加成盐” 指的是那些保持游离碱生物有效性且是非生物学或在其它方面不需要

的盐类,与诸如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等的无机酸以及诸如乙酸、丙酸、羟乙酸、丙酮酸、草酸、马来酸、丙二酸、琥珀酸、延胡索酸、酒石酸、枸橼酸、苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、甲磺酸、乙磺酸、对甲苯磺酸、水杨酸等的有机酸所加成的。“药学上可接受的碱加成盐”包括那些衍生自诸如钠、钾、锂、铵、钙、镁、铁、锌、铜、锰、铝盐等的无机碱类的那些。特别优选的是铵、钾、钠、钙和镁盐。衍生自药学可接受的有机无毒碱类包括伯、仲和叔胺、取代的胺包括天然存在的取代的胺、环胺以及阳离子交换树脂,诸如异丙胺、三甲胺、二乙胺、三乙胺、三丙胺和乙醇胺。用于体内给药的剂型优选无菌的。通过无菌过滤膜或其它方法可容易地达到无菌目的。

[0192] 本文所公开的抗体和 Fc 融合体也可配制为免疫脂质体。脂质体是一种小的囊状体,包含不同类型脂质、磷脂和 / 或表面活性剂,用于递送治疗剂予哺乳动物。通过诸如描述于 Epstein 等., 1985, Proc Natl Acad Sci USA, 82 :3688 ;Hwang 等., 1980, Proc Natl Acad Sci USA, 77 :4030 ;US 4, 485, 045 ;US 4, 544, 545 ;和 PCT WO 97/38731 中的本领域公知方法可制备含有所述抗体或 Fc 融合体的脂质体。具有增强的循环时间的脂质体公开于 US5, 013, 556。脂质体的组分通常以双分子层的形式排列,类似于生物膜的脂质排列方式。可将包含卵磷脂、胆固醇和 PEG 衍生的磷脂酰乙醇胺 (PEG-PE) 的脂质组合物通过反相蒸发法制备得到特别有用的脂质体。通过具有确定孔径的过滤器将脂质体挤出以产生具有所需直径的脂质体。化学治疗剂或其它治疗活性剂可任选地包含于脂质体中 (Gabizon 等., 1989, J National Cancer Inst 81 :1484)。

[0193] 抗体、Fc 融合体和其它治疗活性剂也可包被于微胶囊中,通过包括但不限于凝聚技术、界面聚合法 (例如使用羟甲基豆素或明胶微胶囊或聚 (甲基丙烯酸酯) 微胶囊)、胶体给药系统 (例如,脂质体、白蛋白微胶囊、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊) 以及粗乳状液 (macroemulsion) 的方法制备得到。上述技术公开于 Remington' s Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed., 1980。可制备持续释放制剂。持续释放制剂合适的实例包括固相疏水聚合物的半透性基质,所述基质以成型制品的形式存在,如薄膜或微胶囊。持续释放基质的实例包括聚酯、水凝胶 (例如聚 (2- 羟乙基 - 异丁烯酸酯) 或聚 (乙烯醇))、聚交酯 (US 3, 773, 919)、L- 谷氨酸和 L- 谷氨酸酯的共聚物、非降解乙烯 - 醋酸乙烯酯、诸如 LUPRON DEPOT™ (由乳酸 - 乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林组成的可注射微球体) 的可降解乳酸 - 乙醇酸共聚物、聚 -D-(-)-3- 羟基丁酸以及 ProLease®, (可从 Alkermes 购得), 其是一种由所需生物活性分子掺入聚 -DL- 丙交酯 - 共 - 乙交酯 (PLG) 基质组成的基于微球体的递药系统。

[0194] 在制剂中本发明的治疗活性抗体或 Fc 融合体的浓度可从约 0.1 变化为 100 重量%。在一个优选的实施方案中,所述抗体或 Fc 融合体的浓度在 0.003-1.0 摩尔的范围内。为了治疗患者,可给予本发明的抗体或 Fc 融合体的治疗有效剂量。本文中“治疗有效剂量”意指对于其所施用的能产生效果的剂量。精确的剂量将依赖于治疗的目的,并可为本领域技术人员通过使用公知技术所确定。剂量范围可为 0.01-100mg/kg 体重或更大,例如 0.1、1、10 或 50mg/kg 体重,优选 1-10mg/kg。如本领域所公知,对于抗体或 Fc 融合体降解、全身性或局部性递药和新蛋白酶合成速率,以及年龄、体重、大致健康状况、性别、饮食、给药时间、药物相互作用以及病症的严重程度而言,调整可以是必须的,并可由本领域那些技术人员通过常规的实验方法来确定。

[0195] 包含本发明抗体或 Fc 融合体的药物组合物优选以无菌水溶液形式施用, 可以进行多种方法, 包括但不限于经口、皮下、静脉内、鼻内、耳内 (intraotically)、经皮、局部 (如凝胶剂、油膏剂、洗剂、霜剂等)、腹膜内、肌内、肺内 (如, AERx[®] 吸入技术, 购自 Aradigm, 或 Inhance[™] 肺递药系统, 购自 Inhale Therapeutics)、经阴道、肠胃外、经直肠或眼内施用。在一些实例中, 例如对于治疗创伤、炎症等而言, 所述抗体或 Fc 融合体可直接以溶液或喷雾剂的形式应用。如本领域所公知, 可依据导入方式相应地配制所述药物组合物。

[0196] 工程方法

[0197] 本发明提供了可用于产生 Fc 变体的工程方法。阻碍先前 Fc 工程尝试的主要障碍在于仅有随机修饰已成为可能, 部分是由于无效的工程策略及方法, 以及由于抗体生产和筛选的低通量特性。本发明描述了能克服这些缺陷的工程方法。涉及多种设计策略、计算筛选方法、文库产生方法和实验生产和筛选方法。这些策略、途径、技术和方法可单独应用或以不同的组合方式应用以设计优化的 Fc 变体。

[0198] 设计策略

[0199] 产生对所需特性优化的 Fc 变体的最有效方法是针对目的指导工程研究计划。因此, 本发明教导了可用于设计优化的 Fc 变体的设计策略。设计策略的使用意在指导 Fc 工程改造, 但基于用于设计 Fc 变体的设计策略, 并不意在将其限制为特定的优化特性。初一想, 其可能看来像是违反直觉, 然而其有效性是得自可确定蛋白质以及蛋白质-蛋白质复合物的结构、稳定性、溶解性和功能的微妙相互作用的庞大的复杂性。尽管可尽力预测对于设计目的而言重要的蛋白质位置、残基、相互作用等, 但是时常地关键的某些因素却无法预测。通常无法预测对蛋白质结构、稳定性、溶解性以及功能的影响是否是有利的或不利的。然而却有无数的对蛋白质有损或有害的氨基酸修饰存在。因此通常地, 最好的工程方法来自产生可通常聚焦于设计目的而不导致有害效应的蛋白质变体。因此, 设计策略主要的目标在于产生特性多样性 (quality diversity)。在一个过分简单化的水平 (simplistic level) 上, 其可被认为是人们所偏爱的可能性的叠加。例如, 对如下所述的 Fc 糖或特定的结构域-结构域夹角的微扰, 对于产生优化的 Fc 变体而言是有效的设计策略, 尽管事实上无法充分理解糖和结构域-结构域夹角如何决定 Fc 的特性。减少有害氨基酸数量的修饰即为筛选, 即通过特性多样性筛选, 这些设计策略可具有实用性。因此本发明中所教导的设计策略的真实价值在于它们能直接将工程研究计划应用于产生有价值的 Fc 变体。在实验后可确定任一所产生变体的特定价值。

[0200] 提供了一种用于设计 Fc 变体的设计策略, 其中在 Fc 与所述的 Fc 配体的界面上通过设计氨基酸修饰改变了 Fc 与一些 Fc 配体的相互作用。本文中 Fc 配体可包括但不限于 Fc γ Rs、C1q、FcRn、蛋白 A 或 G 等。通过在能量方面探查位于对结合界面产生影响的 Fc 位置的有利取代, 可设计变体, 对新的界面构象采样, 其中一些与 Fc 配体的结合可得到改善, 一些与 Fc 配体的结合减少了, 以及一些可具有其它有利特性。上述新的界面构象起因可能在于, 例如, 形成该界面的残基与 Fc 配体的直接作用, 或由于诸如侧链或主链构象微扰的氨基酸修饰所引起的间接作用。可选择据信在确定界面的构象中扮演重要角色的位置为可变位置。例如, 可选择这样一组残基作为可变位置, 该残基与 Fc 配体直接接触的任意残基在一定距离范围内, 例如 5 埃 (Å), 优选 1-10Å。

[0201] 提供了一种用于产生 Fc 变体的额外设计策略, 其中在 N297 的 Fc 糖构象得到

优化。在上下文中使用的优化意在包括 N297 糖构象和组成的改变,其产生了所需特性,例如增加或减少了对 Fc γ R 的亲和力。通过所观察到的糖结构和构象显著地影响了 Fc/Fc γ R 以及 Fc/C1q 结合,支持了上述策略 (Umana 等.,1999,Nat Biotechnol 17:176-180; Davies 等.,2001,Biotechnol Bioeng 74:288-294;Mimura 等.,2001,J Biol Chem 276:45539-45547.;Radaev 等.,2001,J Biol Chem 276:16478-16483;Shields 等.,2002,J Biol Chem 277:26733-26740;Shinkawa 等.,2003,J Biol Chem 278:3466-3473)。但是,该糖并不具体接触 Fc γ Rs。通过在能量方面探查对糖有影响的位置上的有利取代,可设计变体的特性多样性,对新的糖类构象采样,其中一些改善了与一种或多种 Fc 配体的结合,但另一些减少了。虽然大多数接近 Fc/糖界面的突变似乎改变了糖构象,但是已显示了一些突变改变了糖基化组合物 (Lund 等.,1996,J Immunol 157:4963-4969;Jefferis 等.,2002,Immunol Lett 82:57-65)。

[0202] 提供了另一种用于产生 Fc 变体的设计策略,其中 C γ 2 和 C γ 3 结构域之间的夹角得到优化。在上下文中使用的优化意在描述 C γ 2-C γ 3 结构域夹角的构象改变,其产生了所需特性,例如增加或减少了对 Fc γ R 的亲和力。所述夹角是 Fc/Fc γ R 亲和力的重要决定因素 (Radaev 等.,2001,J Biol Chem 276:16478-16483),且许多 Fc/Fc γ R 界面远端的突变通过调节该夹角而影响了结合的可能性 (Shields 等.,2001,J Biol Chem 276:6591-6604)。通过在能量方面探查在确定 C γ 2-C γ 3 夹角以及相对于彼此之间的结构域柔性中似乎扮演着一种关键角色的有利取代位置,可设计变体的特性多样性,对新的夹角和柔性水平采样,对于所需 Fc 特性而言其中一些得到了优化。

[0203] 提供了另一种用于产生 Fc 变体的设计策略,其中再改造 Fc 以消除对糖基化的结构与功能依赖性。该设计策略包括在缺乏 N297 糖的条件下优化 Fc 结构、稳定性、溶解性和/或 Fc 功能 (例如 Fc 对一种或多种 Fc 配体的亲和力)。在一种方法中,暴露于溶剂的位置在缺乏糖基化的条件下得到改造,使它们稳定、在结构上与 Fc 结构相容、且不具有聚集的倾向。在抗体中 C γ 2 仅是未配对的 Ig 结构域 (参见图 1)。因此 N297 糖覆盖了通常作为蛋白质-蛋白质与其它 Ig 结构域相互作用界面的暴露的疏水区,维持了 Fc 稳定性以及结构整体性,并阻止了 C γ 2 结构域越过中心轴的聚集。用于优化非糖基化 Fc 的方法可包括但不限于设计通过掺入在内部面向 C γ 2-C γ 2 二聚体轴的极性和/或荷电的残基以增强非糖基化 Fc 稳定性和/或溶解性的氨基酸修饰,以及通过设计直接增加非糖基化 Fc/Fc γ R 界面或非糖基化 Fc 与其它一些 Fc 配体的界面的氨基酸修饰。

[0204] 提供了另一种用于设计 Fc 变体的设计策略,其中 C γ 2 结构域的构象得到优化。在上下文中使用的优化意在描述 C γ 2 结构域夹角的构象改变,其产生了所需特性,例如增加或减少了对 Fc γ R 的亲和力。通过在能量方面探查对 C γ 2 构象发生影响的 C γ 2 位置上的有利取代,可设计变体的特性多样性,对新的 C γ 2 构象采样,其中一些可达到设计目的。上述新的 C γ 2 构象起因可能在于,例如,通过对变体采样所得的可选的主链构象。可选择如任意位置的可变位置,据信在确定 C γ 2 结构、稳定性、溶解性、柔性、功能等的过程中其扮演着一种重要角色。例如,C γ 2 疏水核心残基,其是部分或全部地与溶剂隔绝的 C γ 2 残基,可得到再改造。可选地,可考虑非核心 (noncore) 残基,或认为对决定主链结构、稳定性或柔性重要的残基。

[0205] 提供了另一种用于 Fc 优化的设计策略,其中通过调节 Fc 与所述 Fc 配体之间的静

电作用的修饰改变了与 Fc γ R、补体或其它一些 Fc 配体的结合。上述修饰可认为是对 Fc 的整体静电特性的优化,并包括了用荷电氨基酸取代中性氨基酸、用中性氨基酸取代荷电氨基酸或用带相反电荷(即反向电荷)的氨基酸取代荷电氨基酸。上述修饰可用于影响 Fc 和一种或多种 Fc 配体之间的结合亲和力的改变,所述 Fc 配体例如 Fc γ Rs。在一个优选的实施方案中,使用用于计算静电势的多种众所周知的方法之一来选择可影响结合的静电取代位置。在最简单的实施方案中,库仑定律用于产生作为在蛋白质中该位置功能的静电势。另外的实施方案包括了使用德拜-休克尔标度(Debye-Huckel scaling)来计算离子强度的影响,以及在更复杂的实施方案中使用诸如泊松-玻耳兹曼(Poisson-Boltzmann)计算。上述静电计算可使位置突出并暗示了可达到设计目的特定氨基酸修饰。在某些情况下,可预计这些取代对结合不同的 Fc 配体具有不同的影响,例如可增强与激活性的 Fc γ Rs 的结合,或减少对抑制性 Fc γ Rs 的结合亲和力。

[0206] 计算筛选

[0207] 在数量庞大的可能发生的修饰中预测何种氨基酸修饰能达到所需目的的过程中,主要障碍是很难获得有价值的 Fc 变体。实际上,对先前已失败的产生具有重要临床价值 Fc 变体的 Fc 工程尝试而言,一个主要的原因是迄今为止 Fc 工程方法都与尝试(hit-or-miss)方法相关。本发明提供了使 Fc 变体定量和系统工程改造成为可能的计算筛选(computational screening)方法。这些方法通常使用原子水平打分函数、侧链旋转异构体采样(side chain rotamer sampling)以及先进的优化方法以精确获取蛋白质序列、结构和功能之间的相互关系。计算筛选通过对产生的庞多样性过滤使探查靶位置完整序列区的可能性能够实现。对于允许激活性 Fc 优化以达到所需目的的稳定的、合适的折叠以及功能性序列而言,计算筛选变体文库可有效地使之富集。因为重叠序列约束了蛋白质结构、稳定性、溶解性和功能,而在文库中大量候选物却占据着“无用的”序列区。举例来说,大部分序列区编码未折叠、错误折叠、无完全折叠、部分折叠或聚集的蛋白质。其对于 Fc 工程特别相关,因为 Ig 结构域是小 β 片层结构,已证实其的工程是非常必需的(Quinn 等., 1994, Proc Natl Acad Sci USA 91:8747-8751;Richardson 等., 2002, Proc Natl Acad Sci USA 99:2754-2759)。甚至看上去在 β 片层表面上无害的取代都能导致严重的堆积冲突,明显地破坏了折叠平衡(Smith 等., 1995, Science 270:980-982);顺便提及,丙氨酸是一种最不利的 β 片层构成者 Minor 等., 1994, Nature 371:264-267)。 β 片层稳定性和特异性的决定因素是处于极大数量的微妙相互作用之间的一种微妙平衡。计算筛选能够产生主要由有效序列区组成的文库,并因此增加了鉴定对设计目的优化的蛋白质的机率。事实上计算筛选产生了增加的命中率,从而减少了应用实验方法筛选的变体数量。Fc 工程的另外障碍是需要有效设计具相互关系或联系的突变。例如,迄今为止所观察到的具有最大 Fc/Fc γ R 亲和力增加的是 S298A/E333A/K334A,可通过将三种分别在丙氨酸扫描中得到的较好突变结合而获得之(Shields 等., 2001, J Biol Chem 276:6591-6604)。计算筛选在一次试验中就能产生上述三重变体而无须进行三次单独的试验,此外还能测试在那些位置所有 20 种氨基酸而不仅是丙氨酸的功能性。计算筛选可通过将组合问题减少到实验上所能处理的数量以处理上述复杂性。

[0208] 从广义上看,计算筛选具有四个步骤:1) 选择并制备蛋白质模板结构,2) 选择可变位置、在那些位置应当考虑的氨基酸和/或选择旋转异构体以模拟所考虑的氨基酸,

3) 计算能量,以及 4) 优化组合。该计算筛选更详细过程描述如下。将蛋白质三维结构作为起点 (starting point)。鉴定要被优化的位置,其可以是完整蛋白序列或其子集 (subset(s))。在每个位置上选择所考虑的氨基酸。在一个优选的实施方案中,每个被考虑的氨基酸可为具有称为旋转异构体的容许 (allowed) 构象的离散集合所代表。计算所考虑的每个氨基酸与其它所考虑的每个氨基酸之间、以及其与蛋白质的其余部分,包括与该蛋白质主链和不变残基之间相互作用能量。在一个优选的实施方案中,计算所考虑的每个氨基酸侧链旋转异构体与其它所考虑的每个氨基酸侧链旋转异构体 (amino acid side chain rotamer) 之间、以及其与蛋白质的其余部分,包括与该蛋白质主链和不变残基之间相互作用能量。接着用一或更多组合搜索算法来鉴定具有最低能量的序列和 / 或具有低能量的序列。

[0209] 在一个优选的实施方案中,所用的计算筛选方法基本上类似于 Protein Design Automation® (PDA®) 技术,该技术描述于 US 6,188,965;US 6,269,312;US 6,403,312;USSN 09/782,004;USSN 09/927,790;USSN 10/218,102;PCT WO 98/07254;PCT WO 01/40091 和 PCT WO 02/25588 中。在另一个优选的实施方案中,所用的计算筛选方法基本上类似于 Sequence Prediction Algorithm™ (SPA™) 技术,该技术描述于 (Raha 等., 2000, Protein Sci 9:1106-1119)、USSN 09/877,695 和 USSN 10/071,859 中。在另一个优选的实施方案中,所用的计算筛选方法描述于 2003 年 3 月 3 日提交的,标题为“抗体优化”的 USSN 10/339788 中。在一些实施方案中,可使用不同计算筛选方法的组合,包括 PDA® 技术与 SPA™ 技术的组合,也包括这些计算方法与其它设计工具的组合。同样地,这些计算方法可同时使用或以任一次序顺序使用。

[0210] 模板结构作为计算筛选计算的输入量。本文中“模板结构”意指要被优化的蛋白质的部分或全部结构坐标。所述模板结构可以是任何三维结构 (即,一组蛋白质原子的三维坐标) 已公知或可计算、估计、模拟、创造或测定的蛋白质。使用包括但不限于 X-射线晶体学技术、核磁共振 (NMR) 技术、从头建模法以及同源建模法可测定蛋白质的三维结构。如果对于没有用实验方法解出结构的蛋白质而言优化是所需的,那么可产生一种合适的结构模型以作为计算筛选计算的模板。用于产生蛋白质同源模型的方法为本领域所公知,这些方法可供本发明使用。参见例如, Luo, 等., 2002, Protein Sci 11:1218-1226, Lehmann 和 Wyss, 2001, Curr Opin Biotechnol 12(4):371-5.; Lehmann 等., 2000, Biochim Biophys Acta 1543(2):408-415; Rath 和 Davidson, 2000, Protein Sci, 9(12):2457-69; Lehmann 等., 2000, Protein Eng 13(1):49-57; Desjarlais 和 Berg, 1993, Proc Natl Acad Sci USA 90(6):2256-60; Desjarlais 和 Berg, 1992, Proteins 12(2):101-4; Henikoff 和 Henikoff, 2000, Adv Protein Chem 54:73-97; Henikoff 和 Henikoff, 1994, J Mol Biol 243(4):574-8; Morea 等., 2000, Methods 20:267-269。使用对接 (docking) 方法也可获得蛋白质 / 蛋白质复合物。可作为模板结构的合适的蛋白质结构包括但不限于,所有那些在 Protein Data Base 中所发现的,该 Protein Data Base 数据库为 Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB, 原来称为 Brookhaven National Lab) 所编辑和维护。

[0211] 所述模板结构可以是天然存在或工程蛋白质的。所述模板结构也可以是基本上为来自任意生物体的蛋白质所编码的蛋白质的,所述任意生物体优选人、小鼠、大鼠、兔子和

猴子。所述模板结构可包含许多蛋白质结构型的任意一种。在一个优选的实施方案中,所述模板结构包含 Fc 区或 Fc 结构域或 Fc 片段。在一个可选地优选的实施方案中,所述模板结构包含结合有一种或多种 Fc 配体的 Fc 或 Fc 结构域或 Fc 片段,优选为 Fc/Fc γ R 复合体。模板结构中的 Fc 可糖基化或不糖基化。所述模板结构可包含多于一条的蛋白链。所述模板结构可额外含有非蛋白质组分,包括但不限于小分子、底物、辅因子、金属、水分子、辅基、聚合物以及糖。在一个优选的实施方案中,所述模板结构是多个或一组模板蛋白质,例如诸如获得自 NMR 的一组结构。可选地,所述一组模板结构可产生自一组相关的蛋白质或结构,或人工创建的结构集合。所述组合物和模板结构的来源基于工程目的。举例来说,对于增加人 Fc/Fc γ R 亲和力而言,人 Fc/Fc γ R 复合体结构或其衍生物可作为模板结构。可选地,非组合的 Fc 结构可作为模板结构。如果所述目的是为了增加人 Fc 对小鼠 Fc γ R 的亲和力,则模板结构可以是与小鼠 Fc γ R 结合的人 Fc 结构或模型。

[0212] 在设计计算前可修饰或改变所述模板结构。用于制备模板结构的许多方法描述于 US 6,188,965;US 6,269,312;US 6,403,312;USSN 09/782,004;USSN 09/927,790;USSN 09/877,695;USSN 10/071,859, USSN 10/218,102;PCT WO 98/07254;PCT WO 01/40091 以及 PCT WO 02/25588 中。举例来说,在一个优选的实施方案中,如果其不包括在所述结构中,则可添加额外的氢原子。在一个可选的实施方案中,对结构进行能量最小化以释放张力(strain),包括基于范德华冲突(clashes)、不利键角以及不利键长的张力。可选地,所述模板结构可用其它方法改变,诸如手动地改变,包括受控或随机微扰。也可在计算筛选后的步骤中进行模板修饰,包括能量计算以及组合优化步骤。在一个可选的实施方案中,所述模板结构在计算筛选计算前或过程中不被修饰。

[0213] 一旦获得模板结构,可变位置就被选定。本文中“可变位置”意指在计算筛选计算中氨基酸同一性允许得到改变的位置。如本领域所公知,仅在某些可变位置上允许考虑氨基酸修饰,可减少计算的复杂性并使计算筛选能更直接适应设计目的。在计算筛选中一种或多种残基可位于可变位置。选定作为可变位置的位置可以是有助于或推测有助于要优化的蛋白质特性的那些,所述蛋白质特性例如对 Fc γ R 的 Fc 亲和力、Fc 稳定性、Fc 溶解性等等。可变位置上的残基对特定的蛋白质特性可有利亦可不利。例如,位于 Fc/Fc γ R 界面处的残基与介导结合相关,因此该位置在设计计算中可改变旨在提高 Fc/Fc γ R 亲和力。如另一实例,具有暴露疏水侧链的残基可能是导致不利聚集的原因,因此在设计计算中该位置可改变旨在增加溶解性。可变位置可以是与作为特定蛋白质特性决定因素的相互作用直接相关的那些位置。例如,Fc 的 Fc γ R 结合位点可规定为包括能接触特定 Fc γ R 的所有残基。本文中“接触”意指在 Fc 残基的至少一个原子与所结合的 Fc γ R 的至少一个原子之间的某些化学相互作用,所具有的化学相互作用包括但不限于范德华相互作用、氢键相互作用、静电相互作用以及疏水相互作用。在一个可选的实施方案中,可变位置可包括与蛋白质性质间接相关的那些位置,即上述位置可邻近于已知或推测有助于 Fc 性质的残基。例如,Fc 的 Fc γ R 结合位点可规定为包括所有位于特定距离内的 Fc 残基,例如 4-10Å Fc γ R 范德华接触内的任一 Fc 残基。因此在该情况下,不但可选择直接与 Fc γ R 接触的残基作为可变位置,也可选择与接触 Fc γ R 的残基接触并因此间接影响结合的那些作为可变位置。所述特定位置的选定依赖于所要采用的设计策略。

[0214] 在模板结构中一个或多个不是可变的位置可以是漂浮的(floated)。本文中“漂

浮位置“意指在计算筛选计算中于此允许改变氨基酸构象而非氨基酸同一性的位置。在一个实施方案中,所述漂浮位置可具有亲本氨基酸同一性。例如,漂浮位置可位于与可变位置残基具有极小距离内的位置,例如 5A。在一个可选的实施方案中,漂浮位置可具有非亲本氨基酸同一性。举例来说,当目的是为了评估特定突变的能量或结构结果时,上述实施方案可供本发明。

[0215] 既不是可变的位置也不是漂浮的位置的那些位置称为固定的 (fixed) 位置。本文中“固定位置”意指在计算筛选计算中于此氨基酸同一性和构象保持不变的位置。可以是固定的位置包括与所要优化的性质不相关的已知或推测的残基。在该情况下,推测通过改变这些位置,几乎不会或完全不会获得所要优化的性质。固定位置也可包括已知或推测该处残基对维持固有的折叠、结构、稳定性、溶解性和 / 或生物学功能起重要作用的位置。例如,对于与特定 Fc 配体相互作用的残基或编码糖基化位点的残基而言,位置可以是固定的以便确保与 Fc 配体的结合及适当的糖基化各自不受微扰。同样地,如果稳定性得到优化,其可有益于使直接或间接与诸如 Fc γ R 的 Fc 配体相互作用的位置固定,使得结合不受微扰。固定位置也可包括结构上重要的残基,诸如二硫键中的半胱氨酸,对于决定主链构象而言起关键作用的残基,如脯氨酸或甘氨酸,关键的氢键结合残基以及形成有利堆积相互作用的残基。

[0216] 在计算筛选中下一个步骤是在每个特定可变位置选择一组考虑认为可能的氨基酸同一性。在可变位置的该组可能的氨基酸在本文中称为“考虑的氨基酸”。本文中使用的“氨基酸”指 20 种天然氨基酸和任何非天然或合成类似物的组。在一个实施方案中,考虑到所有 20 种天然氨基酸。可选地,在给定的可变位置上也考虑氨基酸的子集或甚至仅考虑一种氨基酸。本领域技术人员应当理解,在可变位置上仅考虑特定氨基酸的同一性有利于计算,因为其减少了搜寻的组合复杂性。此外,在可变位置上仅考虑特定氨基酸可适用于针对特定设计策略的计算。例如,对于优化非糖基化 Fc 稳定性而言,在糖基化不存在情况下暴露于溶剂的非极性 Fc 残基处仅允许考虑极性氨基酸是有利于计算的。非天然氨基酸,包括合成的氨基酸以及天然氨基酸的类似物,也可以是考虑的氨基酸。例如参见,Chiri 等., 2003, Science, 301(5635):964-7;和 Chin 等., 2003, Chem Biol. 10(6):511-9。

[0217] 许多方法可单独或组合地使用以选择在每个位置上应当考虑的氨基酸。举例来说,可基于暴露于溶剂的程度来选择在给定可变位置处考虑的氨基酸组。疏水或非极性氨基酸通常位于蛋白质的内部或核内 (core), 其难以接近或几乎难以接近溶剂。因此在核内可变位置,有利之处在于可仅考虑或主要考虑非极性氨基酸,诸如丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸以及甲硫氨酸。亲水或极性氨基酸通常位于蛋白质的外部或表面,其具有显著程度的溶剂可及性。因此在可变表面位置,有利之处在于可仅考虑或主要考虑极性氨基酸,诸如丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、谷氨酸、精氨酸、赖氨酸以及组氨酸。某些位置是部分暴露或部分埋藏的,无法明确是蛋白质核内或表面位置,在某种意义上作为位于核内与表面残基之间的边界残基。因此在上述可变边界位置,有利之处在于可同时考虑非极性和极性氨基酸,诸如丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、谷氨酸、精氨酸、赖氨酸、组氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸以及甲硫氨酸。可通过蛋白质结构生物学领域技术人员主观评价或图像检查 (visual inspection) 模板结构来确定可变位置处溶剂暴露的

程度,或可通过使用本领域公知的多种算法进行之。通过计算方法,诸如计算溶剂可及表面区域或使用评估相对于溶剂可及表面的 $C\alpha-C\beta$ 向量方向的算法,可辅助或完全决定可变位置所要考虑的氨基酸类型的选择,上述计算方法概述于 US 6,188,965 ;6,269,312 ;US 6,403,312 ;USSN 09/782,004 ;USSN 09/927,790 ;USSN 10/218,102 ;PCT WO 98/07254 ;PCT WO 01/40091 和 PCTWO 02/25588 中。在一个实施方案,每个可变位置可明确地分类为核内、表面或边界位置,或是基本上类似于核内 (core)、表面或边界的分类。

[0218] 在一个可选的实施方案中,允许在可变位置通过假设驱动一组氨基酸的选择。由于蛋白质结构生物学领域的技术人员通过主观评价或图像检查模板结构,所以应当考虑在可变位置所假设的氨基酸类型。例如,如果推测在可变位置氢键相互作用有利,则可考虑具有形成氢键能力的极性残基,即使该位置位于核内。同样地,如果猜测在可变位置疏水堆积相互作用有利,则可考虑具有形成有利堆积相互作用的非极性残基,即使该位置在表面上。其它通过假设驱动方法的实例可涉及主链柔性或蛋白质折叠的结果。本领域公知某些残基,例如脯氨酸、甘氨酸以及半胱氨酸在蛋白质结构与稳定性中起重要作用。较所有其它氨基酸而言,甘氨酸能加强主链柔性,脯氨酸对主链的约束超过了所有其它氨基酸,以及半胱氨酸可形成二硫键。因此,包括一种或多种这些氨基酸类型可有利于实现所需的设计目的。可选地,从所考虑的氨基酸列表中排除一种或多种这些氨基酸类型也是有利于实现所需的设计目的。

[0219] 在一个可选的实施方案中,氨基酸的子集可被选择以使覆盖范围最大化。在该情况下,在可变位置可考虑具有类似于模板结构中氨基酸性质的额外氨基酸。例如,如果模板结构中可变位置的所述残基是大疏水残基。则在该位置可考虑额外的大疏水氨基酸。可选地,氨基酸的子集可被选择以使多样性最大化。在该情况下,在可变位置可考虑具有不同于模板结构中那些氨基酸性质的氨基酸。例如,如果模板结构中可变位置的所述残基是大疏水残基,则可考虑小疏水性、极性等的氨基酸。

[0220] 本领域公知在设计计算过程中,一些计算筛选方法仅需要确定所考虑氨基酸的同一性。即,不需要关于所述氨基酸侧链的构象或可能构象的信息。其它优选的方法利用了一组离散的侧链构象,称为旋转异构体,其对于每个氨基酸而言是要考虑的。因此,在每个可变和漂浮位置可考虑一组旋转异构体。旋转异构体可获得自公开的旋转异构体文库(参见例如, Lovel 等., 2000, *Proteins: Structure Function and Genetics* 40 :389-408 ; Dunbrack 和 Cohen, 1997, *Protein Science* 6 :1661-1681 ;Demaeyer 等., 1997, *Folding and Design* 2 :53-66 ;Tuffery 等., 1991, *J Biomol Struct Dyn* 8 :1267-1289, Ponder 和 Richards, 1987, *J Mol Biol* 193 :775-791)。本领域公知旋转异构体文库可以是不依赖于主链的或依赖于主链的。旋转异构体也可获得自分子力学或从头计算,以及使用其它方法。在一个优选的实施方案中,使用了一种柔性旋转异构体模型(参见 Mendes 等., 1999, *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 37 :530-543)。同样地,可使用人工产生的旋转异构体,或对于每个氨基酸和 / 或可变位置扩大所设置的选择。在一个实施方案中,至少一种不是能量低的构象包括于旋转异构体列中。在一个可选的实施方案中,模板结构中可变位置残基的所述旋转异构体包括于该可变位置许可的旋转异构体列中。在一个可选的实施方案中,仅提供了在可变位置所考虑的每个氨基酸的同一性,在设计计算过程中并不使用每个氨基酸的特定构象态。即,对于计算筛选而言,旋转异构体的使用不是必需的。

[0221] 实验信息可用于指导可变位置的选择和 / 或在可变位置所考虑的氨基酸的选择。本领域公知诱变实验通常用于确定在蛋白质结构和功能中某些残基的作用,例如,哪几个蛋白质残基在决定稳定性中起作用,或哪几个残基构成了蛋白质-蛋白质相互作用的界面。获得自上述实验的数据在本发明中是有用的。例如,对于增加 Fc/Fc γ R 亲和力而言,可变位置可包括其上突变已显示能影响结合的可变的所有位置。同样地,上述实验的结果可用于指导在可变位置所容许的氨基酸类型的选择。例如,如果发现某些类型的氨基酸取代是有利的,可考虑相似类型的那些氨基酸。在一个实施方案中,在可变位置可考虑额外氨基酸,其具有类似于那些实验中发现是有利的氨基酸的性质。举例来说,如果在 Fc/Fc γ R 界面可变位置的根据实验突变为大疏水残基被认为是有利的话,那么在计算筛选中,使用者可选择在该位置包括额外的大疏水氨基酸。本领域公知展示和其它选择技术可结合随机诱变以产生一系列或多列对所选定特性有利的氨基酸取代。获得自上述实验工作中的上述一系列或数列氨基酸取代可供本发明使用。例如,在上述实验中所发现的不变位置在计算筛选计算中可排除作为可变位置,反之发现能更容易接受突变或能顺利响应突变的位置可选择作为可变位置。同样地,来自上述实验的结果可用于指导在可变位置所容许的氨基酸类型的选择。例如,如果某些类型的氨基酸在实验淘选中出现更频繁,可考虑那些氨基酸的相似类型。在一个实施方案中,在可变位置可考虑额外的氨基酸,其具有类似于那些实验中发现是有利的氨基酸的性质。例如,如果在位于 Fc/Fc γ R 界面的可变位置所选择的突变被发现是不荷电的极性氨基酸,使用者可选择在该位置上包括额外的不荷电的极性氨基酸,或可能包括荷电的极性氨基酸。

[0222] 序列信息也可用于指导可变位置的选择和 / 或在可变位置所考虑的氨基酸的选择。本领域公知一些蛋白质具有共同的结构骨架 (scaffold) 以及在序列上是同源的。该信息可用于获得对蛋白质家族中特定位置的了解。本领域公知序列比对通常用于确定哪几个蛋白质残基是保守的以及哪几个是非保守的。换言之,通过蛋白质序列的比较和对比比对,可观察到位置上的可变性程度,亦可观察到位置上天然出现的氨基酸类型。获得自上述分析的数据在本发明中是有用的。使用序列信息来选择可变位置及在可变位置所考虑的氨基酸的好处具有几方面。对于可变位置的选择而言,使用序列信息主要的优点在于可获得对哪几个位置是更能容许突变以及哪几个位置是较少容许突变的了解。因此序列信息可帮助确保特性多样性,即对蛋白质结构、稳定性等无害的突变在计算上被采样。所述相同的优点适用于在可变位置使用序列信息来选择所考虑的氨基酸类型。即,出现在蛋白质序列比对中的氨基酸组可视为根据进化预筛选的,对于与蛋白质的结构、稳定性、溶解性、功能等的相容性而言,其较随机筛选的具有更高机率。因此更高的特性多样性在计算上被采样。在可变位置使用序列信息来选择所考虑的氨基酸类型的第二种好处是某些比对可提供较随机序列可具有较小免疫原性的序列。举例来说,如果在给定可变位置所考虑的氨基酸是在人蛋白质序列比对中在该位置所出现的氨基酸组,则那些氨基酸可视为根据性质 (nature) 预筛选的,如果所述优化的蛋白质用作为人治疗剂,则那些氨基酸用于不产生或产生低的免疫应答。

[0223] 序列的来源可广泛多变,包括一种或多种已知的数据库,包括但不限于 Kabat 数据库 (Johnson 和 Wu, 2001, Nucleic Acids Res 29 :205-206 ;Johnson 和 Wu, 2000, Nucleic Acids Res 28 :214-218)、IMGT 数据库 (IMGT, the international ImMunoGeneTics

information system ®; Lefranc 等., 1999, Nucleic Acids Res 27 :209-212; Ruiz 等., 2000 Nucleic Acids Re. 28 :219-221; Lefranc 等., 2001, Nucleic Acids Res 29 :207-209; Lefranc 等., 2003, Nucleic Acids Res 31 :307-310) 和 VBASE、SwissProt、GenBank 和 Entrez、以及 EMBL 核苷酸序列数据库。蛋白质序列信息可获得自、编译自和/或产生自来自任意生物体的天然存在的蛋白质的序列比对, 所述生物体包括但不限于哺乳动物。蛋白质序列信息可获得自私人编译的数据库。在本领域中公知众多基于序列的比对程序和方法, 所有的这些程序和方法可供本发明使用以产生包含 Fc 和 Fc 配体的蛋白质的序列比对。

[0224] 一旦进行了比对, 序列信息可用于指导可变位置的选择。上述序列信息可固有地或以其它方式涉及所给定位置的可变性。本文中的可变性应区别于可变位置。可变性指在序列比对中在所给定位置出现的氨基酸类型显示出的变化程度。可变位置, 再次重申, 是使用者所选择的在计算筛选计算过程中以改变氨基酸同一性的位置。可变性可为生物信息学领域的技术人员所定性确定。也有为本领域所公知的定量确定可变性的方法, 其可供本发明使用。最优选的实施方案测量了信息熵 (Information Entropy) 或香农熵 (Shannon Entropy)。可变位置可基于获得自密切相关的蛋白质序列或较不密切相关的序列的序列信息以选择。

[0225] 使用序列信息来选择可变位置可广泛地供本发明使用。例如, 如果在模板结构中 Fc/Fc γ R 界面位置是色氨酸, 且在比对中观察到在多于 90% 的序列中色氨酸位于该位置, 可能有益于该位置的固定。反之, 如果发现另一个界面位置具有较高水平的可变性, 例如如果在该位置观察到五种不同的氨基酸, 每种具有大约 20% 的频率, 则该位置可被选择作为可变位置。在另一个实施方案中, 对排列的蛋白质序列的图像检查可取代或有助于对蛋白质结构的图像检查。序列信息也可用于在可变位置指导所考虑的氨基酸的选择。上述序列信息可涉及在给定的位置一个氨基酸、多个氨基酸或氨基酸类型 (例如极性或非极性、荷电或不荷电) 固有地或以其它方式出现的频率的多少。在一个实施方案中, 在可变位置所考虑的氨基酸组可包含在比对中在该位置所观察到的氨基酸组。因此, 在计算筛选计算中所述位置特异性比对信息可直接用于产生在可变位置上所考虑的氨基酸列。上述策略为本领域众所周知; 参见例如 Lehmann 和 Wyss, 2001, Curr Opin Biotechnol 12(4) :371-5; Lehmann 等., 2000, Biochim Biophys Acta 1543(2) :408-415; Rath 和 Davidson, 2000, Protein Sci, 9(12) :2457-69; Lehmann 等., 2000, Protein Eng 13(1) :49-57; Desjarlais 和 Berg, 1993, Proc Natl Acad Sci USA 90(6) :2256-60; Desjarlais 和 Berg, 1992, Proteins 12(2) :101-4; Henikoff 和 Henikoff, 2000, Adv Protein Chem 54 :73-97; Henikoff 和 Henikoff, 1994, J Mol Biol 243(4) :574-8。在一个可选的实施方案中, 在一个或多个可变位置所考虑的氨基酸组可包含于比对中最频繁观察到的氨基酸组。因此, 特定标准应用于在确定是否氨基酸或氨基酸类型的频率能证明其包含于该氨基酸组中, 所述氨基酸组为可变位置上所考虑的。本领域公知在比对中使用统计学方法来计算在任一位置序列多样性以及在某一位置每个氨基酸出现的频率或概率, 可对序列比对分析。接着, 上述数据可用于确定哪几种氨基酸类型要考虑。在最简单的实施方案中, 通过对一个比对位置所观察到的一种氨基酸次数的数量计数, 然后除以该比对中的序列的总数而计算出这些出现频率。在其它的实施方案中, 通过多种可能的机制对每个序列、位置或氨基酸对计数程序

的贡献进行权重 (weighted)。在一个优选的实施方案中,根据在所述比对中相对于其它序列的其多样性权重进行每个比对序列对频率统计的贡献的权重。用于实现该目的的常用策略是 Henikoff 和 Henikoff (Henikoff 和 Henikoff, 2000, *Adv Protein Chem* 54:73-97; Henikoff 和 Henikoff, 1994, *J Mol Biol* 243:574-8) 所推荐的序列权重系统。在一个优选的实施方案中,所述每个序列对所述统计表的贡献依赖于其对靶序列的相似性程度,即所使用的模板结构,使得对该靶序列具有更高相似性的序列得到更高的权重。相似性测量方法的实例包括,但不限于,序列同一性、BLOSUM 相似性打分、PAM 矩阵相似性打分和 BLAST 打分。在一个可选的实施方案中,所述每个序列对统计表的贡献依赖于其已知的物理或功能特性。这些特性包括但不限于热和化学稳定性、活性的贡献以及溶解性。举例来说,当优化非糖基化 Fc 的溶解性时,在比对中的那些序列应当是已知最能溶解的 (例如参见 Ewert 等., 2003, *J Mol Biol* 325:531-553), 可对所计算的频率贡献更多。

[0226] 在序列比对中无论什么标准在可变位置用于选择所考虑的氨基酸组,使用序列信息来选择考虑的氨基酸可广泛地应用于本发明中。例如,通过置换暴露的非极性表面残基以优化 Fc 溶解性,所考虑的氨基酸可被选择作为氨基酸组,或那些符合某一标准的氨基酸的子集,就是在蛋白质序列比对中在该位置所观察到的。作为另一个实例,可主观地对源自序列比对的一系列氨基酸添加或删除一个或多个氨基酸以最大化覆盖范围。例如,在可变位置可考虑具有类似于那些在序列比对中发现的氨基酸的性质的额外氨基酸。例如,如果在序列比对中观察到已知的或推测能结合 Fc γ R 的 Fc 位置具有不荷电的极性氨基酸,则在计算筛选计算中使用者可选择在该位置以包括额外不荷电的极性氨基酸,或荷电的极性氨基酸。

[0227] 在一个实施方案中,将序列比对信息与能量计算组合,讨论如下。例如,拟能量 (pseudo energies) 可源自产生打分函数的序列信息。使用基于序列的打分函数可明显有助于减少计算的复杂性。然而,本领域技术人员应当理解单独使用基于序列的打分函数可能是不适当的,因为在突变之间序列信息通常显示易误解的相互关系,在实际上可导致结构上的不一致。因此,在一个优选的实施方案中,单独使用基于结构的能量计算方法或与基于序列的打分函数组合使用。即,优选的实施方案并不单独依赖于序列比对信息作为分析步骤。

[0228] 能量计算涉及氨基酸修饰打分方法。通过一种或多种打分函数,相互作用的能量得到测量。多种打分函数可供本发明用于计算能量。打分函数可包括许多势 (potentials), 在本文中称为打分函数的能项,包括但不限于范德华势、氢键势、原子溶剂化势或其它溶剂化势、二级结构倾向势、静电势、扭角势和熵势。至少一种能项被用于对每个可变或漂浮位置打分,尽管取决于所述位置、所考虑的氨基酸以及其它需要考虑的事项,所述能项可能不同。在一个实施方案中,利用了使用一种能项的打分函数。在最优选的实施方案中,使用含有多于一种能项的打分函数计算能量,例如描述范德华、溶剂化、静电和氢键相互作用的能项,以及它们的组合。在额外的实施方案中,额外的能项包括但不限于熵项、扭角能以及基于已知的能量。

[0229] 在 US 6,188,965; US 6,269,312; US 6,403,312; USSN 09/782,004; USSN 09/927,790; USSN 09/877,695; USSN 10/071,859, USSN 10/218,102; PCT WO 98/07254; PCT WO 01/40091 以及 PCT WO 02/25588 中描述了多种打分函数。本领域技术人员应当

理解, 打分函数无需受限于物理化学能项。例如, 基于所知的势可供本发明的计算筛选方法学应用。上述基于所知的势可源自蛋白质序列和 / 或结构统计, 包括但不限于穿织 (threading) 势、参考能量、拟能量、基于同源性的能量以及源自序列比对的序列偏移。在一个优选的实施方案中, 一种打分函数得到改良以包括用于免疫原性的模型, 诸如源自肽与 MHC (主要组织相容性复合体) 结合数据的函数, 其可用于鉴定潜在的免疫原性序列 (参见例如 USSN 09/903, 378 ; USSN 10/039, 170 ; USSN 60/222, 697 ; USSN 10/339788 ; PCT WO 01/21823 和 PCT WO 02/00165)。在一个实施方案中, 序列比对信息能用于对氨基酸取代物打分。举例来说, 不管所述蛋白质的来源是否是人类、猴子、小鼠或其它, 蛋白质序列的比较结果在本发明的计算筛选方法学中可用于提示氨基酸突变或对氨基酸突变打分。在一个实施方案中, 本领域公知在计算分析过程中一种或多种打分函数可得到优化或“训练”, 接着使用优化的系统再运行分析过程。上述改变的打分函数可获得自例如, 通过使用实验数据训练的打分函数。本领域技术人员应当理解, 许多力场, 其由一种或多种能项组成, 可作为打分函数。力场包括但不限于从头 (ab initio) 力场或量子力场、半经验 (semi-empirical) 力场以及分子力场。基于已知的或使用统计学方法的打分函数可供本发明使用。这些方法可用于评估序列和三维蛋白质结构之间的匹配, 并因此对于蛋白质结构的保真度而言, 可用于对氨基酸取代打分。在一个实施方案中, 通过分别计算突变序列打分的分子动力学计算可用于计算筛选序列。

[0230] 可用多种方式来表示氨基酸以便进行有效的能量计算。在一个优选的实施方案中, 所考虑的氨基酸表示为如前所述的旋转异构体, 在每个可变以及漂浮位置上计算每个可能的旋转异构体与其它可变以及漂浮异构体、固定位置残基、以及主链结构和任何非蛋白质原子的相互作用的能量 (或分数)。在一个优选的实施方案中, 对每个可变和漂浮位置上每条侧链旋转异构体的两组相互作用能量: 在旋转异构体和固定原子之间的相互作用能量 (“单重” 能量), 以及在可变和漂浮位置旋转异构体与在每个其它可变和漂浮位置上的所有其它可能的旋转异构体之间的相互作用能量 (“双重” 能量) 进行计算。在一个可选的实施方案中, 对于固定位置以及可变和漂浮位置计算单重和双重能量。在一个可选的实施方案中, 所考虑的氨基酸并不表示为旋转异构体。

[0231] 计算筛选的一个重要组成部分是鉴定一种或多种具有有利分数的序列, 即具有低能量的序列。从极大数量的可能性中确定一组低能量序列是非同寻常的, 组合优化算法可用于解决该难题。对于组合优化算法而言, 通过调查在典型的计算筛选计算中所考虑的可能性的数量来阐明其所需要的。对于所给定的设计问题而言, 旋转构象集合 (rotamer sets) 的离散 (discrete) 特性容许对可能的旋转异构体序列进行简单计算。主链长度 n 与 m (每个位置可能的旋转异构体数) 组合可具有 m^n 条可能的旋转异构体序列, 具有随着序列长度而指数式增长的数量。对于特别简单计算而言, 有可能去检查每条可能的序列以便鉴定最优序列和 / 或一种或多种有利序列。然而, 对于典型的设计问题而言, 可能序列的数量 (高达 10^{80} 或更多) 是足够大的, 以致很难对每条可能序列进行检查。然后, 多种组合优化算法可用于鉴定优化序列和 / 或一种或多种有利序列。组合优化算法可分为两类: (1) 如果它们收敛 (converge) 的话, 能保证返回全局极小值能量构型的那些, 和 (2) 并不能保证返回全局极小值能量构型, 但总是能返回溶液构型的那些。第一类算法的实例包括但不限于死端消除法 (Dead-End Elimination) (DEE) 和分支与边界法 (Branch&Bound)

(B&B) (包括分支 (Branch) 和终止 (Terminate)) (Gordon 和 Mayo, 1999, Structure Fold Des 7:1089-98)。第二类算法的实例包括但不限于蒙特卡罗法 (Monte Carlo) (MC)、自洽平均法 (self-consistent mean field) (SCMF)、玻耳兹曼采样法 (Boltzmann sampling) (Metropolis 等., 1953, JChem Phys 21:1087)、模拟退火法 (Kirkpatrick 等., 1983, Science, 220:671-680)、遗传算法 (GA) 以及快速和精确侧链拓扑学及能量精化 (FASTER) (Desmet, 等., 2002, Proteins, 48:31-43)。一种组合优化算法可单独使用或与其它组合优化算法共同使用。

[0232] 在本发明的一个实施方案中, 适用于组合优化算法的策略用于寻找全局极小值能量构型 (global minimum energy configuration)。在一个可选的实施方案中, 所述策略用于寻找一种或多种低能量或有利序列。在一个可选的实施方案中, 所述策略用于寻找全局极小值能量构型, 接着用于寻找一种或多种低能量或有利序列。例如, 概述于 USSN 6, 269, 312, 优选的实施方案利用了死端消除 (DEE) 法和蒙特卡罗法。在其它实施方案中, 在其它搜索方法中使用禁忌搜索算法 (tabu search algorithms) 或将其与死端消除法 (DEE) 和 / 或蒙特卡罗法组合 (参见 Modern Heuristic Search Methods, V. J. Rayward-Smith 等编辑, 1996, John WILEY&Sons Ltd. ; USSN 10/218, 102 ; 和 PCT WO 02/25588)。在另一个优选的实施方案中, 可使用遗传算法; 参见例如 USSN 09/877, 695 和 USSN 10/071, 859。作为另外的实例, 其更充分地描述于 US 6, 188, 965 ; US 6, 269, 312 ; US 6, 403, 312 ; USSN 09/782, 004 ; USSN 09/927, 790 ; USSN 10/218, 102 ; PCT WO 98/07254 ; PCT WO 01/40091 和 PCT WO 02/25588 中, 可达到全局 (global) 最优值, 接着进一步对可能出现的进行计算处理, 其产生了额外的优化序列。在最简单的实施方案中, 设计计算无需组合。即, 在单个可变位置能量计算单独用于评估氨基酸取代。对于其它计算而言, 优选在多于一个的可变位置上评估氨基酸取代。在一个优选的实施方案中, 在组合优化前计算所有可能的相互作用能。在一个可选地优选的实施方案中, 在组合优化过程中视需要可进行能量计算。

[0233] 文库产生

[0234] 本发明提供了用于产生文库的方法, 所述文库可随后用实验方法筛选以挑选优化的 Fc 变体。本文中使用的“文库”意指一种或多种 Fc 变体的组。文库可指以任何形式存在的变体组。在一个实施方案中, 所述文库是一列核酸或氨基酸序列, 或在可变位置的一列核酸或氨基酸取代物。例如, 如下用于说明本发明的实例提供了在可变位置的氨基酸取代物的文库。在一个实施方案中, 文库是至少一种序列的一列 (a list), 所述序列是对所需特性优化的 Fc 变体。例如参见, Filikov 等., 2002, Protein Sci 11:1452-1461 和 Luo 等., 2002, Protein Sci 11:1218-1226。在一个可选的实施方案中, 文库可确定为组合的列, 意指对于每个可变位置产生一系列氨基酸取代物, 暗示每个取代物要与在所有其它可变位置上所有其它设计的取代物组合。在该情况下, 在所有可变位置的所有可能性的组合的扩大产生了大的清楚定义的文库。文库可指多肽的物理组合物, 所述多肽包含 Fc 区或一些结构域或该 Fc 区片段。因此文库可指以纯化或未纯化形式存在的抗体或 Fc 融合体的物理组合物。文库可指编码该文库序列的核酸的物理组合物。所述核酸可以是编码该文库成员的基因、具有任意可操作连接的核酸的编码该文库成员的基因、或编码该文库成员和任意其它可操作地连接的调节序列、可选标记、融合构建体和 / 或其它元件的表达载体。例如, 所述文库

可以是一组编码 Fc 文库成员的哺乳动物表达载体,其蛋白质产物可随后通过实验方法得到表达、纯化及筛选。作为另一个实例,所述文库可以是展示文库。上述文库可以,例如,包含一组编码可操作地连接有一些融合伴侣的文库成员的表达载体,所述融合伴侣能实现噬菌体展示、核糖体展示、酵母展示、细菌表面展示等等。

[0235] 可使用输出序列或来自计算筛选的序列产生所述文库。如上所讨论,计算产生的文库明显具有更多的稳定性、正确折叠以及相对于随机产生的文库更多的功能序列。因此,计算筛选增加了对所述设计目的优化的蛋白质的鉴别机率。文库中的序列组通常,但不总是,明显地不同于亲本序列,尽管在一些例子中所述文库优选含有亲本序列。本领域公知具有多种可使文库源自计算筛选计算输出的方法。例如,描述于 US 6,403,312 ;USSN 09/782,004 ;USSN 09/927,790 ;USSN 10/218,102 ;PCT WO 01/40091 和 PCT WO 02/25588 中的产生文库的方法可供本发明使用。在一个实施方案中,序列分数在一定范围内的全局最优化序列(global optimum sequence)可包括于文库中。例如,所有序列都在 10kcal/mol 内的最低能量序列可作为文库。在一个可选的实施方案中,可以使用序列分数在一定范围内的一种或多种局部极小值序列(local minima sequence)。在一个优选的实施方案中,所述文库序列获得自过滤组(filtered set)。通过多种方法可产生上述列或组,为本领域所公知,例如使用诸如蒙特卡罗、B&B 或 SCMF 的算法。例如,在过滤组中上限为 10^3 或上限为 10^5 的序列可包含在所述文库。可选地,通过所有突变组合所限定的序列总数可用于终止文库的评判标准。对于重组序列的总数而言,优选值范围在 10 – 10^{20} ,特别优选值范围在 100 – 10^9 。可选地,当预先确定每个位置突变数达到时可强迫终止。在一些实施方案中,并不进行终止的序列包括在文库中。在一些情况下其是所需的,例如以评估产生文库的方法,以提供对照或比较,或对额外序列空间采样。例如,在文库中可包括亲本序列,即使其没有进行终止(cutoff)。

[0236] 聚类算法(Clustering algorithms)可用于将来自计算筛选方法的序列分类为具有代表性的组。举例来说,描述于 USSN 10/218,102 和 PCT WO 02/25588 的聚类方法及其应用可供本发明使用。例如通过相似性可定义具有代表性的组。相似性的测量包括,但不限于对序列相似性和能量相似性的测量。因此计算筛选的输出序列可在局部极小值(local minima)周围聚类,在本文中称为序列的聚类组(clustered set)。例如,封闭序列空间的序列组可与其它组区分。在一个实施方案中,通过在文库中包括了一些、大多数或所有的序列,在一聚类组或其子集范围内覆盖范围可最大化,所述序列组成一种或多种序列聚类组。例如,通过在这些组所在文库的范围内包括大多数的序列,有利于在一、二或三最低能量聚类组范围内最大化覆盖范围。在一个可选的实施方案中,通过在文库范围内仅包括在每一聚类组范围内的序列子集,可对贯穿于序列聚类组多样性采样。例如,通过在文库中包括来自每个聚类组的最低能量序列,可对所有或大多数聚类组广泛地采样。

[0237] 序列信息可用于指导用于文库产生的过滤计算筛选结果。如所讨论的,通过比较和对比蛋白质序列的比对,在位置上的可变性程度以及可自发出现在该位置的氨基酸类型可得到观察。在本发明中获得自上述分析的数据是有用的。已讨论了使用序列信息的好处,那些好处可同样地适用于指导文库产生的序列信息的使用。序列比对中出现的氨基酸组可视为通过进化预筛选的,对于与蛋白质的结构、稳定性、溶解性、功能以及免疫原性的相容性而言,其较随机的具有更高机率。已讨论了序列来源的多样性,以及用于产生序列比对

的方法,其可用在以序列信息来指导文库的产生。同样地,如上所讨论,在比对中各种标准可应用于确定某些残基的重要性或权重。这些方法也可供用序列信息来指导文库的产生。使用序列信息从计算筛选结果中指导文库产生可供本发明广泛使用。在一个实施方案中,序列信息用于从计算筛选输出中过滤序列。换言之,一些取代从计算输出 (computational output) 中减去以产生文库。例如所产生的计算筛选计算或各种计算的输出可被过滤使得该文库仅包括符合某些标准的那些氨基酸,或那些氨基酸的子集,例如在序列比对中在该位置上所观察到的。在一个可选的实施方案中,序列信息用于将序列添加到计算筛选输出中。即,序列信息用于指导额外氨基酸的选择,所述氨基酸被添加到计算输出中以产生文库。例如,对于给定位置而言,来自计算筛选计算的氨基酸输出组可得到扩大以包括一种或多种氨基酸,所述氨基酸在蛋白质序列比对中在该位置被观察到。在一个可选的实施方案中,基于序列比对信息,一种或多种氨基酸可添加到或从计算筛选序列输出中减去以便最大化覆盖范围或多样性。举例来说,具有类似于那些在序列比对中所发现的氨基酸的性质的额外的氨基酸可添加入文库中。例如,如果在序列比对中观察到位置上具有不荷电极性氨基酸,在该位置的额外的不荷电极性氨基酸可包括于该文库中。

[0238] 可对文库处理以进一步产生随后文库。因此,来自计算筛选计算的输出可视为初级文库 (primary library)。所述初级文库可与来自其它计算或其它文库的其它初级文库组合,使用随后的计算、序列信息或其它分析或实验处理以产生随后文库,在本文中称为二级文库。从所述描述中应当理解,上述讨论的使用序列信息以指导或过滤文库自身是从初级文库产生二级文库的一种方法。在文库范围内,二级文库的产生给使用者以对参数更多的控制。能使实验筛选更有效率,并可容许来自实验结果的反馈以更容易得到解释,提供了更有效的设计 / 实验循环。

[0239] 许多方法可用于从初级文库产生二级文库。例如 USSN 10/218,102 和 PCT WO 02/25588 中所描述的用于产生二级文库的方法可供本发明使用。通常出现在初级文库中的一些选择步骤以一些方式进行处理。例如,在一个实施方案中,出现了选择步骤,在该步骤中一些组的初级序列被选择以形成二级文库。在一个可选的实施方案中,选择步骤是计算步骤,通常还包括一个选择步骤,其中一些初级文库的子集被选择并接着进行进一步的计算分析,包括进一步的计算筛选和诸如“在计算机环境中”改组或重组的技术 (参见,例如 US 5,830,721 ;US 5,811,238 ;US 5,605,793 和 US 5,837,458、易错 PCR,例如使用修饰的核苷酸;包括使用多个盒式的已知诱变技术;以及 DNA 改组 (Cramer 等.,1998, Nature 391 :288-291 ;Coco 等.,2001, Nat Biotechnol 19 :354-9 ;Coco 等.,2002, Nat Biotechnol,20 :1246-50),异源 DNA 采样 (US 5,939,250) ;ITCHY (Ostermeier 等.,1999, Nat Biotechnol 17 :1205-1209) ;StEP (Zhao 等.,1998, Nat Biotechnol 16 :258-261), GSSM (US 6,171,820 和 US 5,965,408) ;体内同源重组,连接酶辅助基因装配,末端互补 PCR,前融合 (profusion) (Roberts 和 Szostak,1997, Proc Natl Acad Sci USA 94 :12297-12302) ;酵母 / 细菌表面展示 (Lu 等.,1995, Biotechnology 13 :366-372) ;Seed 和 Aruffo,1987, Proc Natl Acad Sci USA 84(10) :3365-3369 ;Boder 和 Wittrup,1997, Nat Biotechnol 15 :553-557)。在一个可选的实施方案中,出现的选择步骤是一种实验步骤,例如如下的任一文库筛选步骤,其中一些初级文库的子集被选择并接着用实验方法重新组合,例如使用一种如下讨论的定向进化 (directed evolution) 方法,以形成二级文库。在

一个优选的实施方案中,如 US 6,403,312 所概述的产生并处理初级文库。

[0240] 二级和随后文库的产生可供本发明广泛使用。在一个实施方案中,不同的初级文库可组合产生二级或随后文库。在另一个实施方案中,二级文库可通过在高度突变或高度保守的位置对序列多样性采样而产生。可分析该初级文库以确定在模板蛋白质中哪些氨基酸位置具有高突变频率,以及哪些位置具有低突变频率。例如,在计算筛选中显示了大量突变多样性的蛋白质中的位置在后一轮设计计算中可得到固定。当在第一轮时,同样大小的过滤组在第一文库中很大程度上保守的位置上将显示多样性。可选地,二级文库可通过在具有众多突变的位置上改变氨基酸而产生,但是使突变频率不超过某水平的位置保持不变。

[0241] 该讨论并不意味着约束文库的产生,即初级文库随后产生二级文库。应当理解,初级和二级文库可进一步得到处理以产生三级文库、四级文库等。可见,文库产生是一种迭代过程。例如,将多种额外步骤应用于一种或多种二级文库可构建三级文库;例如,可进行进一步计算处理,二级文库可得到重组,或不同二级文库的子集可得到组合。在一个优选的实施方案中,可通过组合二级文库产生三级文库。举例来说,分析了蛋白质不同部分的初级和/或二级文库可组合产生三级文库,该文库处理蛋白质的组合的部分。在一个可选的实施方案中,来自初级文库的变体可与来自另一个初级文库的变体组合以提供组合的三级文库,具有较创建一个极长过滤组更低的计算成本。这些组合可用于,例如,分析大的蛋白质,特别是大的多结构域的蛋白质,Fc 就是一个实例。因此将对上述二级文库产生的描述应用于产生初级文库之后的任意文库,最后结果是得到最终文库,该文库可用实验方法筛选以获得对设计目的而言优化的蛋白质变体。这些实例并不意在将二级文库的产生限制于要针对任何特定应用或本发明操作理论。反而,这些实例意在举例说明二级文库,以及诸如三级文库等的随后文库的产生,其可广泛地用于计算筛选方法学中,用于产生文库。

[0242] 实验生产和筛选

[0243] 本发明提供了用于生产和筛选 Fc 变体文库的方法。所述的方法无意将本发明限制于任何特定应用或操作理论。反而,所提供的方法意在举例说明通常一种或多种 Fc 变体或一种或多种 Fc 变体文库可用实验方法产生并筛选以获得最优化的 Fc 变体。Fc 变体可在任意背景中得到生产和筛选,无论 Fc 区、结构域或其片段,或包含 Fc 的更大的多肽是否在本文中明确定义为抗体或 Fc 融合体。用于抗体分子生物学、表达、纯化以及筛选的常规方法描述于 Antibody Engineering, Duebel 和 Kontermann 编辑, Springer-Verlag, Heidelberg, 2001; 以及 Hayhurst 和 Georgiou, 2001, Curr Opin Chem Biol 5:683-689; Maynard 和 Georgiou, 2000, Annu Rev Biomed Eng 2:339-76 中。

[0244] 在本发明的一个实施方案中,文库序列用于创建编码序列成员的核酸,接着所述核酸可克隆入宿主细胞,如果需要的话,表达并分析。因此,编码每个成员蛋白质序列的核酸,特别是 DNA 可得到制备。使用众所周知的方法完成这些实验。例如,描述于 Molecular Cloning-A Laboratory Manual, 第 3 版。(Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001), 以及 Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley&Sons) 的多种方法可供本发明使用。本领域技术人员应当理解对于包含大量序列的文库而言,恰当序列的产生可能花费巨大并且耗费时间。因此,有多种技术可用于有效产生本发明的文库。可供本发明使用的上述方法描述于或引用于 US 6,403,312; USSN

09/782,004 ;USSN 09/927,790 ;USSN 10/218,102 ;PCT WO 01/40091 和 PCT WO 02/25588 中。上述方法包括但不限于基因装配方法、基于 PCR 的方法和使用 PCR 变化形式的方法、基于连接酶链式反应的方法、诸如那些用于改组合成的汇集寡核苷酸的方法 (pooled oligo method)、易错扩增方法和使用具有随机突变寡聚物的方法、经典的定位诱变方法、盒式突变以及其它扩增和基因合成方法。本领域公知有多种商业上可获得的试剂盒以及用于基因装配、诱变、载体亚克隆等等的方法,上述商品可供本发明使用以产生编码文库 Fc 变体成员的核酸。

[0245] 通过培养用核酸转化的宿主细胞,优选含有编码 Fc 变体的核酸的表达载体转化,在合适条件下诱导或引发蛋白质的表达可生产本发明的 Fc 变体。所述适于表达的条件可随着表达载体和宿主细胞的选择而变化,并可容易地为本领域技术人员通过常规实验方法而确定。可使用许多合适的宿主细胞,包括但不限于哺乳动物细胞、细菌、昆虫细胞以及酵母。例如,多种可供本发明使用的细胞系描述于 ATCC® 细胞系目录,可从美国典型培养物保藏中心获得。

[0246] 在一个优选的实施方案中,在哺乳动物表达系统中表达 Fc 变体,包括在该系统中使用诸如逆转录病毒或腺病毒的病毒将表达构建体导入哺乳动物细胞。可使用任何哺乳动物细胞,特别优选人、小鼠、大鼠、仓鼠以及灵长类动物细胞。合适的细胞也包括已知的研究细胞,包括但不限于 Jurkat T 细胞、NIH3T3、CHO、COS 和 293 细胞。在一个可选地优选的实施方案中,文库蛋白质可在细菌细胞中得到表达。细菌表达系统为本领域所众所周知,包括大肠杆菌 (*E. coli*)、枯草芽孢杆菌、乳脂链球菌 (*Streptococcus cremoris*) 和链锁状球菌 (*Streptococcus lividans*)。在可选的实施方案中,Fc 变体在昆虫细胞或酵母细胞中产生。在一个可选的实施方案中,使用无细胞翻译系统在体外表达 Fc 变体。体外翻译系统源自原核细胞(例如,大肠杆菌)和真核细胞(如,小麦胚 (wheat germ)、兔网织红细胞),所述细胞可获得并可基于表达水平以及感兴趣蛋白质的功能而得到选择。例如,本领域技术人员应当理解,体外翻译是一些展示技术所必需的,例如核糖体展示。此外,Fc 变体可通过化学合成方法产生。

[0247] 编码本发明 Fc 变体的核酸可掺入表达载体中以便表达蛋白质。许多表达载体可用于蛋白质表达。表达载体可包含染色体外自主复制载体或整合入宿主基因组的载体。应构建与宿主细胞类型相容的表达载体。因此可供本发明使用的表达载体包括但不限于能使蛋白质在哺乳动物细胞、细菌、昆虫细胞、酵母以及体外系统中表达的那些。本领域公知多种表达载体可从商业上或以其它方式获得,可供本发明用于表达 Fc 变体蛋白。

[0248] 表达载体通常包含与控制或调节序列、可选标记、任意融合伴侣和 / 或额外元件可操作地连接的蛋白质。本文中“可操作地连接”意指所述核酸与其它核酸序列以功能关系放置。一般来说,包括转录和翻译调节核酸可操作地连接于编码 Fc 变体的核酸的这些表达载体,其通常适于宿主细胞使用以表达蛋白质。一般而言,所述转录和翻译调节序列可包括启动子序列、核糖体结合位点、转录起始和终止序列、翻译起始和终止序列,以及增强子或激活子序列。本领域也公知,表达载体通常含有选择基因或标记以容许对含有表达载体的转化宿主细胞选择。选择基因为本领域众所周知并可随着所使用的宿主细胞而改变。

[0249] Fc 变体能可操作地连接于融合伴侣,使所表达的蛋白质的靶向、纯化、筛选、展示等能够实现。融合伴侣可通过接头序列与 Fc 变体序列连接。所述接头序列通常包含较少

数量的氨基酸,一般少于 10,尽管也可使用更长的接头。一般地,所选择的接头序列应具有柔性并能抗降解。本领域技术人员应当理解,许多序列可用作接头。例如,常用的接头序列包含氨基酸序列 GGGGS。融合伴侣可具有靶向作用或可以是信号序列,将 Fc 变体蛋白质与任一相关的融合伴侣送往所需的细胞位置或细胞外介质。本领域公知某些信号序列可将蛋白质靶向分泌到培养基或位于细胞的内外膜之间的壁膜间隙。融合伴侣也可以是编码使纯化和/或筛选可能的肽或蛋白质的序列。上述融合伴侣包括但不限于多组氨酸标签(His 标签)(例如 H₆ 和 H₁₀ 或其它用于固定化金属亲和层析(IMAC)系统(如, Ni⁺² 亲和柱)的标签)GST 融合体、MBP 融合体、Strep 标签、细菌酶 BirA 的 BSP 生物素化靶序列以及靶向抗体的附加表位(例如 c-myc 标签、flag 标签等等)。本领域技术人员应当理解上述标记可用于纯化、筛选、或两者。例如, Fc 变体可通过使用 His 标签将其固定在 Ni⁺² 亲和柱上而得到纯化,接着在纯化后同样的 His 标签可用于将抗体固定在 Ni⁺² 包被的培养板上,以进行 ELISA 或其它结合测定(如下所述)。融合伴侣可使利用选择方法筛选 Fc 变体成为可能(参见如下)。能用于多种选择方法的融合伴侣为本领域众所周知,所有这些融合伴侣都可供本发明使用。举例来说,通过将 Fc 变体文库的成员融合到基因 III 蛋白质上,噬菌体展示能得到使用(Kay 等., Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual, Academic Press, San Diego, CA, 1996; Lowman 等, 1991, Biochemistry 30:10832-10838; Smith, 1985, Science 228:1315-1317)。融合伴侣能使 Fc 变体得到标记。可选地,融合伴侣可结合表达载体上的特定序列,能使该融合伴侣和相关的 Fc 变体与编码它们的核酸共价或非共价连接。例如, USSN 09/642,574; USSN 10/080,376; USSN 09/792,630; USSN 10/023,208; USSN 09/792,626; USSN 10/082,671; USSN 09/953,351; USSN 10/097,100; USSN 60/366,658; PCT WO 00/22906; PCT WO 01/49058; PCT WO 02/04852; PCT WO 02/04853; PCT WO 02/08023; PCT WO 01/28702; 和 PCT WO 02/07466 描述了这样的融合伴侣和技术,其可供本发明使用。

[0250] 本领域众所周知向宿主细胞中导入外源核酸的方法,所述方法可随着所使用的宿主细胞而变化。技术包括但不限于葡聚糖介导的转染、磷酸钙沉淀、氯化钙处理、1,5-二甲基-1,5-二氮十一亚甲基聚甲溴化物介导的转染、原生质体融合、电穿孔、病毒或噬菌体感染、在脂质体中多核苷酸的胶囊化(encapsulation)、以及直接将 DNA 微注射入细胞核。就哺乳动物而言,转染可以是瞬时的或稳定的。

[0251] 在一个优选的实施方案中, Fc 变体蛋白质在表达后得到纯化或分离。以本领域技术人员公知的各种方法可分离或纯化蛋白质。标准的纯化方法包括色谱技术,包括离子交换、疏水相互作用、亲和力、大小或凝胶过滤、以及反相,在大气压或高压下使用诸如 FPLC 和 HPLC 的系统进行。纯化方法还包括电泳、免疫学技术、沉淀、透析以及色谱聚焦技术。超滤和渗滤技术与蛋白质浓缩也是有用的。本领域众所周知许多天然蛋白质结合 Fc 和抗体,这些蛋白质可供本发明用于纯化 Fc 变体。例如,细菌蛋白 A 和 G 结合 Fc 区。同样地,细菌蛋白 L 结合某些抗体的 Fab 区,当然抗体的靶抗原也能结合 Fab 区。通过特定的融合伴侣纯化通常能得到实施。例如,如果采用 GST 融合,则 Fc 变体蛋白质可使用谷胱甘肽树脂进行纯化,如果使用 His 标签,则可使用 Ni⁺² 亲和层析,或如果使用 flag 标签,则可使用固定化抗-flag 抗体。关于适合的纯化技术的常规指导,参见 Protein Purification: Principles and Practice, 第 3 版., Scopes, Springer-Verlag, NY, 1994。所需的纯化程度可基于 Fc 变

体的筛选或用途而变化。在一些情况下无需要纯化。例如在一个实施方案中,如果 Fc 变体被分泌,可直接从培养基中筛选。本领域众所周知,一些选择方法并不包括蛋白质的纯化。因此,举例来说,如果 Fc 变体文库制成噬菌体展示文库,则不需要进行蛋白质纯化。

[0252] Fc 变体可使用多种方法筛选,包括但不限于使用体外分析法、体内和基于细胞分析法以及选择技术的那些。在筛选程序中可利用自动化和高通量筛选技术。可使用融合伴侣或标记进行筛选。如上已讨论了融合伴侣的使用。本文中“标记的”意指本发明的 Fc 变体具有一种或多种附在其上使筛选中的检测成为可能的元件、同位素或化合物。一般而言,标记分成三类:a) 免疫标记,可以是掺入作为融合伴侣的表位,该表位被抗体识别,b) 同位素标记,可以是放射性同位素或重同位素,以及 c) 小分子标记,可包括荧光和比色染料,或诸如生物素的使其它标记方法运作的分子。标记可以掺入化合物中任何位置,并可在蛋白质表达过程中在体外或体内掺入。

[0253] 在一个优选的实施方案中,在体外分析法中 Fc 变体的功能和 / 或生物物理特性得到筛选。对于筛选感兴趣的特性而言,体外分析法可给予广阔的动态范围。可筛选的 Fc 变体特性包括但不限于稳定性、溶解性和对 Fc 配体的亲和力,例如对 Fc γ Rs 的。可同时或分别筛选多种特性。取决于测定所需,蛋白质可以是纯化的或未纯化的。在一个实施方案中,所述筛选是用于 Fc 变体与蛋白质或非蛋白质分子的结合的定性或定量的结合测定,这些非蛋白质分子已知或视为结合 Fc 变体。在一个优选的实施方案中,所述筛选是用于测量抗体或 Fc 融合体的靶抗原结合的结合测定。在一个可选地优选的实施方案中,所述筛选是用于 Fc 变体与 Fc 配体结合的测定, Fc 配体包括但不限于 Fc γ Rs 家族、新生受体 FcRn、补体蛋白 C1q、以及细菌蛋白 A 和 G。所述 Fc 配体可来自任何生物体,优选人、小鼠、大鼠、兔子和猴子。可使用多种本领域公知的方法进行结合分析,包括但不限于基于 FRET(荧光能量共振转移)和 BRET(生物发光能量共振转移)的分析法、AlphaScreen™(增强发光均质邻近分析法 (Amplified luminescent proximity homogeneous Assay))、闪烁邻近分析法 (Scintillation proximity Assay)、ELISA(酶联免疫吸附测定)、SPR(表面胞质团共振 (Surface plasmon Resonance),也已知为 BIACORE®)、等温滴定量热法 (isothermal titration calorimetry)、差示扫描量热法 (differential scanning calorimetry)、凝胶电泳以及包括凝胶过滤的色谱法。这些方法和其它方法可利用某些 Fc 变体的融合伴侣或标记。可使用多种检测方法进行测定,包括但不限于发色的、荧光的、发光的或同位素标记。

[0254] Fc 变体蛋白质的生物物理特性,例如稳定性和溶解性,通过使用多种本领域已知的方法可得到筛选。蛋白质稳定性通过测量在折叠和非折叠状态之间的热力学平衡可得到确定。例如,使用化学变性剂、加热或 pH 方法,本发明的 Fc 变体蛋白质可以解折叠,该转换可使用包括但不限于圆二色谱法、荧光光谱法、吸收光谱法、NMR 波谱法、热量测定法以及蛋白质水解法的方法来监测。本领域技术人员应当理解,通过使用这些技术和其它技术,折叠和解折叠转换的动力学参数也可得到监测。通过使用许多本领域公知的方法, Fc 变体蛋白质的溶解性和总体结构完整性可得到定量或定性测定。可供本发明用于鉴定 Fc 变体蛋白质生物物理特性的方法包括凝胶电泳、诸如大小排阻层析和反相高效层析的色谱法、质谱法、紫外吸收光谱分析法、荧光光谱法、圆二色谱法、等温滴定量热法、差示扫描量热法、超速离心分析法、动态光散射法、蛋白质水解法以及交联法、浊度测量法、过滤阻滞分析法 (filter retardation assays)、免疫分析法、荧光染料结合分析法、蛋白质染色法、显微镜

法以及通过 ELISA 或其它结合分析法对聚集的检测。使用 X-射线晶体学技术分析结构,也可使用 NMR 波谱法。在一个实施方案中,通过在规定的一段时间后测定溶液蛋白质量,可测定稳定性和 / 或溶解性。在该测定中,蛋白质可以暴露于或可以不暴露于某些极端条件下,例如提高温度、低 pH 或存在变性剂。因为行使功能通常需要稳定、可溶和 / 或适当折叠 / 结构的蛋白质,前述的功能和结合分析法也提供了用于执行上述测量的方法。例如,包含 Fc 变体的溶液可对其与靶抗原的结合能力进行测定,接着在极端温度下暴露一段或多段规定的时间,然后再测定与抗原的结合。因为预期解折叠和聚集的蛋白质无法结合抗原,所以保留的活性量提供了对 Fc 变体的稳定性和溶解性的量度。

[0255] 在一个优选的实施方案中,使用一种或多种基于细胞或体内分析法对文库进行筛选。对于上述分析法,纯化的或未纯化的 Fc 变体蛋白质通常作为外源物添加,使得细胞暴露于属于文库的单个变体或变体库。这些分析法通常,但并不总是,基于包含 Fc 变体的抗体或 Fc 融合体的功能;即抗体或 Fc 融合体结合靶抗原和介导某些生化反应的能力,例如效应器功能、配体 / 受体结合抑制、细胞凋亡等等。上述分析法通常包括监测细胞对抗体或 Fc 融合体的应答,例如细胞生存、细胞死亡、细胞形态学变化或诸如天然基因或报道基因细胞表达的转录激活。例如,上述分析法可测量 Fc 变体引发 ADCC、ADCP 或 CDC 的能力。对于某些分析法而言,可能需要添加除靶细胞之外的额外的细胞或组分,例如血清组分或诸如外周血单个核细胞 (PBMCs)、NK 细胞、巨噬细胞等的效应细胞。上述额外的细胞可来自任何生物体,优选人、小鼠、大鼠、兔子和猴子。抗体和 Fc 融合体可引发表达了所述抗体靶抗原的某些细胞系的细胞凋亡,或它们可通过已添加到该分析中的免疫细胞介导对靶细胞的攻击。用于监测细胞死亡或生存能力的方法为本领域所公知,包括使用染料、免疫化学、细胞化学和放射性试剂。例如,半胱天冬酶染色分析法能测定细胞凋亡,摄取或释放放射性底物或诸如 alamar 蓝的荧光染料能监测细胞生长或激活。在一个优选的实施方案中,使用了基于 EuTDA 的 DELFIA® 细胞毒性测定法 (Perkin Elmer, MA)。可选地,可通过测量一种或多种天然胞内蛋白质的释放,例如乳酸脱氢酶的释放,以监测死亡或损伤的靶细胞。在基于细胞的测定法中转录激活也可用作分析功能的方法。在该情况下,通过对可能是增量调节的天然基因或蛋白质的分析以监测应答,例如可测定某些白细胞介素的释放,或可选地通过报道构建体读出结果。基于细胞的测定法也可包括对细胞形态学改变的测定,该形态学改变作为 Fc 变体存在的应答。用于上述测定法的细胞类型可以是原核或真核的,可采用本领域公知的多种细胞系。

[0256] 可选地,使用已转化或转染编码所述 Fc 变体核酸的细胞,可进行基于细胞的筛选。即, Fc 变体蛋白质并不作为外源物添加到细胞中。例如,在一个实施方案中,所述基于细胞的筛选使用了细胞表面展示。可使用融合伴侣以使 Fc 变体在细胞表面得到展示 (Wittrup, 2001, Curr Opin Biotechnol, 12:395-399)。可供本发明使用的细胞表面展示方法包括但不限于在细菌 (Georgiou 等., 1997, Nat Biotechnol 15:29-34; Georgiou 等., 1993, Trends Biotechnol 11:6-10; Lee 等., 2000, Nat Biotechnol 18:645-648; Jun 等., 1998, Nat Biotechnol 16:576-80)、酵母 (Boder 和 Wittrup, 2000, Methods Enzymol 328:430-44; Boder 和 Wittrup, 1997, Nat Biotechnol 15:553-557) 以及哺乳动物细胞 (Whitehorn 等., 1995, Bio/technology 13:1215-1219) 上展示。在一个可选的实施方案中, Fc 变体蛋白质并不在细胞表面展示,反而在细胞内或在某些其它细胞区室中被筛选。例

如,周质表达和细胞计数筛选 (Chen 等.,2001,Nat Biotechnol 19 :537-542)、蛋白质片段互补测定 (Johnsson 和 Varshavsky,1994, Proc Natl Acad Sci USA 91 :10340-10344. ; Pelletier 等,1998, Proc Natl Acad Sci USA 95 :12141-12146) 以及酵母双杂交筛选 (Fields 和 Song,1989, Nature 340 :245-246) 可供本发明使用。可选地,如果多肽包含所述 Fc 变体,例如抗体或 Fc 融合体,可赋予细胞一些可选择的增长有利条件,所述特性可用于对 Fc 变体筛选或选择。

[0257] 本领域公知,筛选方法的子集是对文库的有利成员进行选择的那些。所述方法在本文中称为“选择方法”,这些方法可供本发明用于筛选 Fc 变体文库。当使用选择方法筛选文库时,仅有那些有利的文库成员,即符合某些筛选标准,得到增殖、分离和 / 或观察。应当理解,因为仅有最恰当的变体得到观察,所以通过单独测定文库成员的适合度 (fitness) 的方法,能使大于该方法可筛选的那些的文库得到筛选。通过任何方法、技术,或共价或非共价地连接的融合伴侣、具有其基因型的 Fc 变体的表型 (即具有编码其核酸的 Fc 变体的功能),能使选择得到实施。例如通过将文库成员与基因 III 蛋白质融合,能使噬菌体展示用作选择方法。可见,变体蛋白质的选择或分离符合某些标准,例如对 Fc γ R 的结合亲和力,也用于选择或分离编码其的核酸。一旦分离了,所述编码 Fc 变体的基因可接着被扩增。该分离和扩增过程,称为淘选 (panning),可重复进行,容许有利的 Fc 变体在文库中得到富集。最后对附在其上的核酸进行测序的核酸可供基因鉴定使用。

[0258] 本领域公知的多种选择方法可供本发明用于筛选 Fc 变体文库。这些方法包括但不限于噬菌体展示 (Phage display of peptides and proteins;a laboratory manual, Kay 等.,1996, Academic Press, San Diego, CA,1996 ;Lowman 等.,1991, Biochemistry 30 :10832-10838 ;Smith,1985, Science 228 :1315-1317) 和其衍生的方法,诸如选择性噬菌体感染 (Malmberg 等.,1997, J Mol Biol 273 :544-551)、选择性感染噬菌体 (Krebber 等.,1997, J Mol Biol 268 :619-630) 以及延迟感染性淘选 (Benhar 等,2000, J Mol Biol 301 :893-904)、细胞表面展示 (Wittrup,2001, Curr Opin Biotechnol,12 :395-399)、如在细菌 (Georgiou 等,1997, Nat Biotechnol 15 :29-34 ;Georgiou 等,1993, Trends Biotechnol 11 :6-10 ;Lee 等,2000, Nat Biotechnol 18 :645-648 ;Jun 等.,1998, Nat Biotechnol 16 :576-80)、酵母 (Boder 和 Wittrup,2000, MethodsEnzymol 328 :430-44 ;Boder 和 Wittrup,1997, Nat Biotechnol 15 :553-557) 和哺乳动物细胞 (Whitehorn 等.,1995, Bio/technology 13 :1215-1219) 上展示、以及体外展示技术 (Amstutz 等.,2001, Curr Opin Biotechnol 12 :400-405),如多核糖体展示 (Mattheakis 等.,1994,Proc Natl Acad Sci USA 91 :9022-9026)、核糖体展示 (Hanes 等.,1997, Proc Natl Acad Sci USA 94 :4937-4942)、mRNA 展示 (Roberts 和 Szostak,1997, Proc Natl Acad Sci USA 94 :12297-12302 ;Nemoto 等.,1997, FEBS Lett 414 :405-408) 和核糖体失活展示系统 (Zhou 等,2002, J Am Chem Soc 124,538-543)。

[0259] 其它可供本发明使用的选择方法包括但不限于展示的方法,诸如体内方法,包括但不限于周质表达和细胞计数筛选 (cytometric screening) (Chen 等,2001,Nat Biotechnol 19 :537-542)、蛋白质片段互补测定 (Johnsson 和 Varshavsky,1994, Proc Natl Acad Sci USA 91 :10340-10344 ;Pelletier 等,1998,Proc Natl Acad Sci USA 95 :12141-12146) 和在选择模式中使用的 (Visintin 等,1999,Proc Natl Acad Sci USA 96 :11723-11728) 酵母

双杂交筛选 (Fields 和 Song, 1989, Nature 340 :245-246)。在一个可选的实施方案中, 可通过在表达载体上结合有特定序列的融合伴侣使选择能够进行, 因此能使该融合伴侣和相关的 Fc 变体文库成员与编码它们的核酸共价或非共价连接。例如, USSN 09/642, 574 ; USSN 10/080, 376 ; USSN 09/792, 630 ; USSN 10/023, 208 ; USSN 09/792, 626 ; USSN 10/082, 671 ; USSN 09/953, 351 ; USSN 10/097, 100 ; USSN 60/366, 658 ; PCT WO 00/22906 ; PCT WO 01/49058 ; PCT WO 02/04852 ; PCT WO 02/04853 ; PCT WO 02/08023 ; PCT WO 01/28702 ; 和 PCT W002/07466 中描述了上述可供本发明使用的融合伴侣和技术。在一个可选的实施方案中, 如果诸如抗体或 Fc 融合体的包含 Fc 变体的多肽表达可赋予细胞一些生长、复制或生存的优点, 则可进行体内选择。

[0260] 称为“定向进化 (directed evolution)”方法的选择方法的子集是在选择过程中包括有利序列杂交 (mating) 或传代 (breeding) 的那些, 有时有新突变掺入。本领域技术人员应当理解, 定向进化方法能使在文库中最有利序列的鉴定更容易, 并能增加所筛选的序列的多样性。许多定向进化方法为本领域所公知, 并可供本发明用于筛选 Fc 变体文库, 包括但不限于 DNA 改组 (PCT WO 00/42561 A3 ; PCT WO 01/70947 A3)、外显子改组 (US 6, 365, 377 ; Kolkman 和 Stemmer, 2001, Nat Biotechnol 19 :423-428)、家族改组 (Cramer 等., 1998, Nature 391 :288-291 ; US 6, 376, 246)、RACHITT™ (Coco 等., 2001, Nat Biotechnol 19 :354-359 ; PCT WO 02/06469)、STEP 和随机引发体外重组 (Zhao 等., 1998, Nat Biotechnol 16 :258-261 ; Shao 等., 1998, Nucleic Acids Res 26 :681-683)、核酸外切酶介导的基因装配 (US 6, 352, 842 ; US 6, 361, 974)、基因定位饱和诱变 (Gene Site Saturation) Mutagenesis™ (US 6, 358, 709)、基因重装配 (Gene Reassembly™) (US 6, 358, 709)、SCRATCHY (Lutz 等., 2001, Proc Natl Acad Sci USA 98 :11248-11253)、DNA 断裂法 (DNA fragmentation method) (Kikuchi 等., Gene 236 :159-167)、单链 DNA 改组 (Kikuchi 等., 2000, Gene 243 :133-137) 以及 AMESystem™ 定向进化蛋白质工程技术 (应用分子进化) (US 5, 824, 514 ; US 5, 817, 483 ; US 5, 814, 476 ; US 5, 763, 192 ; US 5, 723, 323)。

[0261] 在细胞、组织以及全生物体实验中, 包含本发明 Fc 变体的抗体和 Fc 融合体的生物学特性可得到鉴定。本领域公知, 药物常在动物中测试, 包括但不限于小鼠、大鼠、兔子、狗、猫、猪和猴子, 以便测定药物对疾病或疾病模型的处理的有效性, 或测定药物的药物代谢动力学、毒性以及其它特性。所述动物可称为疾病模型。治疗剂通常在小鼠中测试, 包括但不限于裸鼠、SCID 小鼠、异种移植小鼠和转基因小鼠 (包括敲进和敲除)。例如, 预计作为抗癌治疗剂的本发明的抗体或 Fc 融合体可在小鼠癌模型中测试, 例如在异种移植小鼠中。在该方法中, 肿瘤或肿瘤细胞系移植或注射入小鼠, 随后该小鼠用治疗剂处理以测定抗体或 Fc 融合体减缓或抑制癌生长的能力。上述实验方法可提供有意义的数据用于确定所述抗体或 Fc 融合体用作为治疗剂的可能性。任何生物体, 优选哺乳动物, 皆可用于测试。例如因为猴子与人的遗传相似性, 所以它们可以是合适的治疗模型, 并因此可用于测试本发明抗体和 Fc 融合体的有效性、毒性、药物代谢动力学或其它特性。对于正式批准药物而言, 最终必需在人类中测试本发明的抗体和 Fc 融合体, 因此当然要考虑这些实验。因此本发明的抗体和 Fc 融合体可在人类中测试以确定它们的疗效、毒性、药物代谢动力学和 / 或其它临床特性。

实施例

[0262] 提供如下实施例以举例说明本发明。这些实施例无意将本发明限制于任何特定应用或操作理论。

[0263] 对于所有讨论于本发明中的位置而言,编号方式依照Kabat的EU标引方式(Kabat等.,1991,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版.,United States Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda)。本领域技术人员应当理解该惯例由免疫球蛋白序列的特定区域中非连续编号方式组成,能够得到免疫球蛋白家族保守位置的标准化参考。因此,通过EU标引方式规定的任何给定免疫球蛋白的位置无需与其连续序列对应。图3显示了对于阿仑单抗抗体而言的连续的和EU标引的编号方案,以便更清楚地阐明该主题。也应当指出在许多Fc位置上已观察到多态性,包括但不限于Kabat 270、272、312、315、356和358,因此在本发明序列和科学文献序列之间可能存在微小差别。

[0264] 实施例1.Fc文库的计算筛选和设计

[0265] 进行计算筛选计算以设计优化的Fc变体。在几次计算/实验循环中,对Fc变体进行计算筛选、构建和实验研究。对于每次连续循环而言,提供的实验数据反馈入下一组计算筛选计算和文库设计中。所有的计算筛选计算和文库设计呈现于实施例1中。对于每组计算而言,提供了列出结果和提供有关信息和参数的表格。

[0266] 结合Fc γ Rs胞外域的Fc的几种不同结构作为模板结构用于计算筛选计算。可公开获得的Fc/Fc γ R复合物结构包括pdb登记号1E4K(Sondermann等.,2000,Nature 406:267-273.),以及pdb登记号1IIS和1IIX(Radaev等.,2001,J Biol Chem 276:16469-16477)。Fc γ RIIIb和Fc γ RIIIa的胞外区具有96%同一性,因此使用Fc/Fc γ RIIIb结构与使用Fc γ RIIIa基本上等效。虽然如此,对于某些计算而言,通过在1IIS和1E4K结构中对D129G突变建模(称为D129G 1IIS和D129G 1E4K模板结构),构建更精确的Fc/Fc γ RIIIa模板结构。此外,使用标准方法,可获得的Fc γ R序列信息,前述的Fc/Fc γ R结构,以及未结合复合物(pdb登记号1H9V)(Sondermann等.,2001,J Mol Biol 309:737-749)(pdb登记号1FCG)(Maxwell等.,1999,Nat Struct Biol 6:437-442)、Fc γ RIIb(pdb登记号2FCB)(Sondermann等.,1999,Embo J 18:1095-1103)和Fc γ RIIIb(pdb登记号1E4J)(Sondermann等.,2000,Nature 406:267-273.)的结构信息,对与人Fc γ RIIb、人F158 Fc γ RIIIa和小鼠Fc γ RIII胞外结构域结合的人Fc结构建模。

[0267] 通过图像检查前述Fc/Fc γ R和Fc γ R结构,并使用溶剂可接触性信息及序列信息,可变位置和在那些位置要被考虑的氨基酸得到选择。对于确定在此处取代可提供激活性和抑制性受体之间区别的亲和力的可变位置而言,Fcs和Fc γ Rs的序列信息是特别有用的。事实上,对所有的C γ 2位置都用计算方法进行筛选。Fc结构是两条重链的同型二聚体(在1IIS、1IIX和1E4K结构中标记的链A和B),每条链包括铰链和C γ 2-C γ 3结构域(显示于图2)。因为Fc γ R(在1IIS、1IIX和1E4K结构中标记的链C)不对称结合Fc同型二聚体,所以在设计计算中通常分别考虑每条链。对于某些计算而言,邻近可变位置残基的Fc和/或Fc γ R残基是漂浮的,即在蛋白质设计计算中容许氨基酸构象改变,但不容许氨基酸同一性改变,以供构象调整使用。在下表中列出了对每组计算相关的这些残基。除

非另有指示,所考虑的氨基酸通常属于核内(Core)、核内 XM(Core XM)、表面(Surface)、边界(Boundary)、边界 XM(Boundary XM) 或所有 20 种分类的任一种。这些分类定义如下:核内(Core)=丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸以及甲硫氨酸;核内 XM(Core XM)=丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸以及色氨酸;表面(Surface)=丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、谷氨酸、精氨酸、赖氨酸以及组氨酸;边界(Boundary)=丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、谷氨酸、精氨酸、赖氨酸、组氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸以及甲硫氨酸;边界 XM(Boundary XM)=边界(Boundary)=丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、谷氨酸、精氨酸、赖氨酸、组氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸以及色氨酸;所有 20 种=所有 20 种天然存在的氨基酸。

[0268] 大多数计算依照两种常规类型计算筛选方法之一进行。在一种方法中,在可变位置氨基酸的构象表示为一组不受主链约束的侧链旋转异构体,其来自 Dunbrack&Cohen 的旋转异构体文库(Dunbrack 等.,1997,Protein Sci 6:1661-1681)。通过使用含有描述范德华、溶剂化、静电和氢键相互作用的项(term)的力场(force field),以及使用死端消除(Dead End Elimination)(DEE)算法所确定的最优(基态)序列,在所选可变位置计算所考虑的氨基酸的所有可能组合的能量。本领域技术人员应当理解,由于主要在打分函数(scoring function)中存在错误,外加蛋白质中细小的构象差异能导致明显的稳定性差异的事实,所以所预测的最低能量序列并不必然是真实的最低能量序列。但是,所预测的基态序列可能接近真实的基态,因此通过评估序列的能量(所述序列在序列空间和围绕所预测基态的能量方面是接近的),额外有利的多样性可得到探查。为实现该目的并产生文库序列多样性,蒙特卡罗(Monte Carlo)(MC)算法可用于评估在所预测基态附近的 1000 个相似序列的能量。在序列中可变区位置由取代占据,这样的序列在 1000 个序列的组中的数量值可反映该取代是如何有利。该计算筛选方法基本上类似于 Protein Design Automation®(PDA®)技术,描述于 US 6,188,965;US 6,269,312;US 6,403,312;US 6,782,004;US 6,927,790;US 6,218,102;PCT WO 98/07254;PCT WO 01/40091;和 PCT WO 02/25588,为便于描述,在所有实施例中称为 PDA®技术。列出这些计算结果的表格提供了在所指定链上的每个可变位置(栏 1)、在每个可变位置上所考虑的氨基酸(栏 2)、在每个可变位置上野生型(WT)Fc 氨基酸同一性(栏 3)、在 DEE 基态(ground state)序列中每个可变位置上氨基酸同一性(栏 4)、以及在蒙特卡罗输出中观察到的氨基酸组和相应的取代占据(栏 5)。

[0269] 其它计算方法利用了遗传算法(GA)来筛选低能量序列,对于序列被采样的那些,在每轮“进化”过程中计算能量。可变和漂浮位置(floated position)的氨基酸构象表示为一组侧链旋转异构体,所述侧链旋转异构体源自不受主链约束的旋转异构体文库,所述文库使用了柔性旋转异构体模型(Mendes 等.,1999,Proteins 37:530-543)。使用含有描述范德华、溶剂化(solvation)、静电和氢键相互作用的项的力场计算能量。该计算产生了具有 300 个序列的列表(list),预测其应具有低能量。为便于结果分析和文库产生,使用最近邻居单键分级聚类算法(nearest neighbor single linkage hierarchical clustering algorithm)基于相似性分数将序列分为相关的组,所述 300 个输出序列通过计算聚类分为 10 组相似序列(Diamond,1995,Acta Cryst D51:127-135)。即,所有组内序列是最相

似于同组内所有其它的序列,并较少相似于其它组中的序列。来自这些十个簇(cluster)的每一个中的最低能量序列用来代表每组,并作为结果呈现。该计算筛选方法基本上类似于 Sequence Prediction Algorithm™(SPA™) 技术,描述于(Raha 等.,2000, Protein Sci 9:1106-1119);USSN 09/877,695;和 USSN 10/071,859,为便于描述,在所有实施例中称为 SPA™ 技术。

[0270] 应用计算筛选设计能量有利的相互作用,所述相互作用位于可变位置组的 Fc/Fc γ R 界面,其介导或可能介导与 Fc γ R 的结合。因为所述结合界面包括了在两条不同链上的大量 Fc 残基,并因为 Fc γ Rs 不对称地结合 Fc,所以残基分为不同的相互作用可变位置组,并设计为独立的计算组。在许多情况下,选择这些组作为将耦合的(coupled)残基组,即一种或多种残基的能量取决于与一种或多种其它残基的同一性。可使用不同的模板结构,在许多情况下,计算研究了在两条链上的取代。对于大多数可变位置组而言,使用所描述的利用了 PDA ®和 SPA™ 技术的计算筛选方法进行计算。这些计算的结果和有关参数以及信息列于如下表 1-30。

[0271] 列出这些计算结果的表格提供了在所指定链上的每个可变位置(栏 1)、在每个可变位置上所考虑的氨基酸(栏 2)、在每个可变位置上的野生型(WT)Fc 氨基酸同一性(栏 3)、以及对于来自每个聚类组的最低能量序列而言在可变位置上的氨基酸同一性(栏 4-13)。表 1-59 分为两组,标记如下,PDA ®和 SPA™ 技术。PDA ®表的栏 4 显示了在 PDA ®运行过程中每个残基在上限 1000 个序列中的出现频率。因此,在表 1 的第一行,在位置 328 处,当使用边界氨基酸作为该位置可变残基组运行时,在上限 1000 个序列中 L 出现 330 次、M 出现 302 次等。

[0272] 此外,包括在本发明组合物范围内的是在所列位置中具有任一所列氨基酸残基的抗体,所述抗体可单独或以任意组合存在(注意优选的组合列于权利要求、说明书概述和附图中)。一个优选的组合是处于基态的所列位置中所列的氨基酸残基(有时在本文中称为“全局解(global solution)”,以区别于野生型)。同样地,表格之间的残基位置和在那些残基位置上的特定氨基酸可进行组合。

[0273] 对于 SPA™ 技术的表格而言,诸如表 4、栏 4 是 SPA™ 运行结果,其产生了在六个所列位置具有六个所列氨基酸的蛋白质(例如,栏 4 是具有除 239E、265G、267S、269Y、270T 和 299S 外的野生型序列的单一蛋白质)。因此,每一个这些单独的蛋白质都包括在本发明范围内。此外,在表格内及表格间 SPA™ 蛋白质之间的组合也包括在本发明范围内。

[0274] 此外,每张表显示了糖的存在或不存在,但明确包括的是相反序列;如表 1 列出了非糖基化变体,但这些同样的氨基酸改变可在糖基化变体上进行。

[0275] 而且,每张表列出了所使用的模板结构,以及“漂浮的”残基,例如,

[0276] 表 2 使用了 PDA ®运行漂浮的 C120, C132 和 C134。

[0277] 表 1

[0278]

位置	考虑的氨基酸	野生型	基态	基态附近序列
328 A	边界	L	L	L:330 M:302 E:111 K:62 A:45 Q:39 D:36 S:30 T:28 N:10 R:7
332 A	表面	I	R	R:247 K:209 Q:130 H:95 E:92 T:59 D:51 N:51 S:42 A:24
328 B	边界	L	L	L:321 M:237 T:166 K:73 R:72 S:55 Q:20 D:17 E:13 A:12 V:10 N:4
332 B	表面	I	E	E:269 Q:180 R:145 K:111 D:97 T:78 N:65 S:28 A:14 H:13

[0279] PDA®技术, 111S 模板结构; - 糖

[0280] 表 2

[0281]

位置	考虑的氨基酸	野生型	基态	基态附近序列
239 A	表面	S	K	E:349 D:203 K:196 A:95 Q:83 S:63 N:10 R:1
265 A	边界 XM	D	D	D:616 N:113 L:110 E:104 S:25 A:23 Q:9
299 A	边界 XM	T	I	I:669 H:196 V:135
327 A	边界 XM	A	S	A:518 S:389 N:67 D:26
265 B	边界 XM	D	Q	Q:314 R:247 N:118 I:115 A:63 E:55 D:34 S:22 K:21 V:11

[0282] PDA®技术; 111S 模板结构; + 糖; 漂浮的 120C, 132C, 134C

[0283] 表 3

[0284]

位置	考虑的氨基酸	野生型	基态	基态附近序列
239 A	表面	S	E	E:872 Q:69 D:39 K:16 A:4
265 A	边界 XM	D	Y	Y:693 H:111 E:69 D:62 F:29 K:19 R:14 W:2 Q:1
267 A	边界 XM	S	S	S:991 A:9
269 A	核内 XM	E	F	F:938 E:59 Y:3
270 A	表面	D	E	E:267 T:218 K:186 D:89 Q:88 R:46 S:34 N:29 H:23 A:20
299 A	边界 XM	T	H	H:486 T:245 K:130 E:40 S:39 D:27 Q:27 A:4 N:2

[0285] PDA®技术; 111S 模板结构; - 糖; 漂浮的 120C, 122C, 133C, 134C

[0286] 表 4

[0287]

位置	考虑的氨基酸	野生型	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 A	表面	S	E	Q	Q	Q	E	E	E	Q	E	E
265 A	所有 20 种	D	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
267 A	所有 20 种	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
269 A	核内	E	Y	Y	A	A	V	Y	A	A	A	A
270 A	表面	D	T	S	A	S	T	T	T	A	A	A
299 A	所有 20 种	T	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

[0288] SPA™ 技术; 111S 模板结构; + 糖; 漂浮的 120C, 122C, 132C, 133C, 134C

[0289] 表 5

[0290]

位置	考虑的氨基酸	野生型	基态	基态附近序列
235 A	边界 XM	L	T	T:195 V:131 L:112 W:107 K:85 F:66 Y:56 E:52 Q:38 S:37 I:34 R:29 H:26 N:23 D:9
296 A	表面	Y	N	N:322 D:181 R:172 K:76 Y:70 Q:59 E:48 S:40 H:20 T:11 A:1
298 A	表面	S	T	T:370 R:343 K:193 A:55 S:39
235 B	边界 XM	L	L	L:922 I:78

[0291] PDA®技术 ;111S 模板结构 ; - 糖 ; 漂浮的 119C, 128C, 157C

[0292] 表 6

[0293]

位置	考虑的氨基酸	野生型	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
235 A	所有20种	L	S	S	P	S	S	S	S	S	S	S
296 A	表面	Y	Q	Q	Q	E	E	Q	E	Q	Q	N
298 A	表面	S	S	K	K	K	K	S	S	S	K	S
235 B	所有20种	L	K	K	K	L	L	L	L	L	L	K

[0294] SPA™技术 ;111S 模板结构 ; + 糖 ; 漂浮的 119C, 128C, 157C

[0295] 表 7

[0296]

位置	考虑的氨基酸	野生型	基态	基态附近序列
239 B	表面	S	E	K:402 E:282 H:116 T:67 R:47 Q:39 D:26 A:11 S:7 N:3
265 B	边界 XM	D	W	Y:341 W:283 I:236 V:77 F:36 H:9 T:7 E:4 K:4 A:2 D:1
327 B	边界 XM	A	R	R:838 K: 86 H:35 E:12 T:10 Q:7 A:6 D:3 N:3
328 B	核内 XM	L	L	L:1000
329 B	核内 XM	P	P	P:801 A:199
330 B	核内 XM	A	Y	Y:918 F:42 L:22 A:18
332 B	表面	I	I	I:792 E:202 Q:5 K:1

[0297] PDA®技术 ;111S 模板结构 ; - 糖 ; 漂浮的 88C, 90C, 113C, 114C, 116C, 160C, 161C

[0298] 表 8

[0299]

位置	考虑的氨基酸	野生型	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 B	表面	S	D	T	E	E	E	E	E	E	E	E
265 B	所有20种	D	G	G	K	G	K	G	G	K	K	G
327 B	所有20种	A	K	M	L	L	N	L	K	L	L	L
328 B	核内	L	M	M	M	L	A	M	L	M	L	L
329 B	核内	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
330 B	核内	A	L	A	A	A	A	A	A	A	A	A
332 B	表面	I	I	Q	I	I	Q	Q	E	D	I	I

[0300] SPA™技术 ;111S 模板结构 ; + 糖 ; 漂浮的 88C, 90C, 113C, 114C, 116C, 160C, 161C

[0301] 表 9

[0302]

位置	考虑的氨基酸	野生型	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 A	表面	S	Q	Q	Q	E	Q	E	Q	E	Q	Q
265 A	所有20种	D	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
299 A	所有20种	T	S	S	A	S	S	S	S	S	S	S
327 A	所有20种	A	A	S	S	S	S	S	S	S	A	S
265 B	所有20种	D	N	G	G	G	G	G	G	G	G	G

[0303] SPA™ 技术 ;111S 模板结构 ; - 糖 ; 漂浮的 120C, 132C, 134C

[0304] 表 10

[0305]

位置	考虑的氨基酸	野生型	基态	基态附近序列
234 A	边界 XM	L	K	Y:401 L:260 F:151 I:82 K:63 H:17 Q:11 W:7 R:3 T:2 E:2 V:1
235 A	边界 XM	L	L	W:777 L:200 K:12 Y:5 I:3 F:2 V:1
234 B	边界 XM	L	W	W:427 Y:203 L:143 F:74 I:59 E:32 K:23 V:14 D:10 T:7 H:4 R:4
235 B	边界 XM	L	W	W:380 Y:380 F:135 K:38 L:26 E:15 Q:12 H:8 R:4 T:2

[0306] PDA® 技术 ;D129G 1E4K 模板结构 ; - 糖 ; 漂浮的 113C, 116C, 132C, 155C, 157C

[0307] 表 11

[0308]

位置	考虑的氨基酸	野生型	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
234 A	所有20种	L	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
235 A	所有20种	L	T	L	L	L	L	L	L	L	T	L
234 B	所有20种	L	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
235 B	所有20种	L	S	A	S	A	A	S	S	S	A	A

[0309] SPA™ 技术 ;D129G 1E4K 模板结构 ; + 糖 ; 漂浮的 113C, 116C, 132C, 155C, 157C

[0310] 表 12

[0311]

位置	考虑的氨基酸	野生型	基态	基态附近序列
239 A	边界 XM	S	E	E:235 S:122 D:94 Q:93 A:74 K:70 L:67 T:63 N:57 R:51 I:29 V:18 W:15 H:12
328 A	边界 XM	L	L	L:688 E:121 K:43 Q:41 A:33 D:26 S:14 T:14 N:12 R:8
332 A	边界 XM	I	W	I:155 W:95 L:82 K:79 E:74 Q:69 H:67 V:63 R:57 T:57 D:45 S:43 N:42 A:35 F:19 Y:18

[0312] PDA® 技术 ;D129G 111S 模板结构 ; - 糖 ; 漂浮的 120C

[0313] 表 13

[0314]

位置	考虑的氨基酸	野生型	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 A	所有20种	S	L	E	E	Q	E	E	K	K	K	K
328 A	所有20种	L	L	Q	L	Q	K	L	L	Q	K	L
332 A	所有20种	I	K	K	L	Q	A	K	L	Q	A	Q

[0315] SPA™ 技术 ;D129G 111S 模板结构 ; + 糖 ; 漂浮的 120C

[0316] 表 14

[0317]

位置	考虑的氨基酸	野生型	基态	基态附近序列
239 B	边界 XM	S	I	R:195 I:169 L:126 V:91 K:89 E:61 H:52 T:50 Q:42 N:35 S:34 D:30 A:26
328 B	边界 XM	L	L	L:671 T:165 K:40 S:38 E:28 R:17 Q:17 V:11 A:8 D:5
332 B	边界 XM	I	I	I:387 E:157 L:151 V:78 Q:63 K:50 R:33 T:29 D:25 A:12 N:8 S:6 W:1

[0318] PDA®技术 ;D129G 111S 模板结构 ; - 糖 ; 漂浮的 90C, 160C, 161C

[0319] 表 15

[0320]

位置	考虑的氨基酸	野生型	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 B	所有20种	S	T	L	L	L	L	L	L	L	L	L
328 B	所有20种	L	M	R	M	D	T	M	L	Q	D	L
332 B	所有20种	I	I	D	Q	Q	Q	L	L	T	Q	L

[0321] SPA™技术 ;D129G 111S 模板结构 ; + 糖 ; 漂浮的 90C, 160C, 161C

[0322] 表 16

[0323]

位置	考虑的氨基酸	野生型	基态	基态附近序列
239 B	边界 XM	S	T	T:164 S:159 L:156 E:86 W:76 K:71 D:65 A:52 R:43 H:38 Q:38 N:31 I:14 V:7
328 B	边界 XM	L	L	L:556 E:114 T:84 K:80 S:69 Q:36 A:31 D:15 R:11 N:4
332 B	边界 XM	I	W	I:188 W:177 E:97 L:94 T:59 Q:57 V:54 K:52 F:51 D:34 H:33 S:27 R:26 N:18 A:17 Y:16

[0324] PDA®技术 ;D129G 1E4K 模板结构 ; - 糖 ; 漂浮的 117C

[0325] 表 17

[0326]

位置	考虑的氨基酸	野生型	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 B	所有20种	S	P	S	P	E	L	L	L	L	L	L
328 B	所有20种	L	K	K	K	K	K	L	K	K	K	L
332 B	所有20种	I	S	S	E	L	L	L	E	L	L	L

[0327] SPA™技术 ;D129G 1E4K 模板结构 ; + 糖 ; 漂浮的 117C

[0328] 表 18

[0329]

位置	考虑的氨基酸	野生型	基态	基态附近序列
239 A	边界 XM	S	L	K:196 L:171 I:146 E:88 V:76 R:75 T:50 H:45 D:43 Q:39 S:30 N:22 A:19
328 A	边界 XM	L	W	L:517 F:230 W:164 H:40 K:29 E:11 R:5 T:4
332 A	边界 XM	I	E	I:283 L:217 E:178 Q:81 V:64 D:47 T:35 K:27 W:18 R:12 A:10 Y:7 N:7 F:6 S:5 H:3

[0330] PDA®技术 ;D129G 1E4K 模板结构 ; - 糖 ; 漂浮的 87C, 157C, 158C

[0331] 表 19

[0332]

位置	考虑的氨基酸	野生型	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 A	所有20种	S	F	Q	E	T	P	P	T	P	P	P
328 A	所有20种	L	K	R	R	K	K	M	R	K	M	R
332 A	所有20种	I	L	L	I	I	E	I	E	E	I	I

[0333] SPA™ 技术 ;D129G 1E4K 模板结构 ;+ 糖 ;漂浮的 87C,157C,158C

[0334] 表 20

[0335]

位置	考虑的氨基酸	野生型	基态	基态附近序列
240 A	核内 + Thr	V	V	V:698 M:162 T:140
263 A	核内 + Thr	V	V	V:966 T:34
266 A	核内 + Thr	V	V	V:983 T:17
325 A	边界	N	N	N:943 T:40 A:17
328 A	边界	L	L	L:610 M:363 K:27
332 A	Glu	I	E	E:1000

[0336] PDA® 技术 ;D129G 111S 模板结构 ;− 糖 ;漂浮的 273A,275A,302A,323A,134C

[0337] 表 21

[0338]

位置	考虑的氨基酸	野生型	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
240 A	所有20种	V	V	A	V	V	V	V	V	V	V	V
263 A	所有20种	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
266 A	所有20种	V	I	V	I	I	T	V	V	V	V	I
325 A	所有20种	N	A	N	N	N	Q	T	T	Q	N	T
328 A	所有20种	L	K	K	L	K	L	K	L	L	L	L
332 A	Glu	I	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D

[0339] SPA™ 技术 ;D129G 111S 模板结构 ;+ 糖 ;漂浮的 273A,275A,302A,323A,134C

[0340] 表 22

[0341]

位置	考虑的氨基酸	野生型	基态	基态附近序列
240 B	核内 + Thr	V	V	V:713 T:287
263 B	核内 + Thr	V	V	V:992 T:8
266 B	核内 + Thr	V	V	V:976 T:24
325 B	边界	N	N	N:453 T:296 A:116 D:96 S:30 V:9
328 B	边界	L	L	L:623 M:194 T:100 R:72 K:11
332 B	Glu	I	E	E:1000

[0342] PDA® 技术 ;D129G 111S 模板结构 ;− 糖 ;漂浮的 273B,275B,302B,323B,161C

[0343] 表 23

[0344]

位置	考虑的氨基酸	野生型	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
240 B	所有20种	V	A	T	A	T	T	A	A	T	T	T
263 B	所有20种	V	V	A	A	T	T	V	V	T	A	T
266 B	所有20种	V	V	V	V	V	V	V	V	V	I	V
325 B	所有20种	N	N	K	K	N	K	K	N	N	N	N
328 B	所有20种	L	R	L	L	L	L	L	L	L	L	L
332 A	Glu	I	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D

[0345] SPA™ 技术 ;D129G 111S 模板结构 ;+ 糖 ;漂浮的 273B, 275B, 302B, 323B, 161C

[0346] 表 24

[0347]

位置	考虑的氨基酸	野生型	基态	基态附近序列
240 B	核内 + Thr	V	M	V:715 M:271 T:12 I:2
263 B	核内 + Thr	V	V	V:992 T:8
266 B	核内 + Thr	V	V	V:996 T:4
325 B	边界	N	N	N:651 T:232 D:64 A:53
328 B	边界	L	M	M:556 L:407 K:37
332 B	Glu	I	E	E:1000

[0348] PDA® 技术 ;D129G 1E4K 模板结构 ;− 糖 ;漂浮的 273B, 275B, 302B, 323B, 131C

[0349] 表 25

[0350]

位置	考虑的氨基酸	野生型	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
240 B	所有 20 种	V	T	A	T	A	A	A	A	T	A	A
263 B	所有 20 种	V	T	W	T	T	A	T	T	T	L	L
266 B	所有 20 种	V	L	A	T	T	V	L	T	T	L	V
325 B	所有 20 种	N	A	N	A	A	N	A	A	A	A	A
328 B	所有 20 种	L	L	K	L	L	L	L	L	L	L	L
332 A	Glu	I	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D

[0351] SPA™ 技术 ;D129G 1E4K 模板结构 ;+ 糖 ;漂浮的 273B, 275B, 302B, 323B, 131C

[0352] 表 26

[0353]

位置	考虑的氨基酸	野生型	基态	基态附近序列
240 A	核内 + Thr	V	V	V:876 T:109 M:15
263 A	核内 + Thr	V	V	V:913 T:87
266 A	核内 + Thr	V	V	V:969 T:31
325 A	边界	N	V	V:491 N:236 T:187 A:35 D:32 S:19
328 A	边界	L	L	L:321 W:290 M:271 F:49 K:46 R:23
332 A	Glu	I	E	E:1000

[0354] PDA® 技术 ;D129G 1E4K 模板结构 ;− 糖 ;漂浮的 273A, 275A, 302A, 323A, 158C

[0355] 表 27

[0356]

位置	考虑的氨基酸	野生型	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
240 A	所有 20 种	V	A	T	A	A	T	T	A	A	A	T
263 A	所有 20 种	V	T	T	V	V	T	V	L	L	V	T
266 A	所有 20 种	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
325 A	所有 20 种	N	Q	N	Q	Q	Q	Q	Q	Q	N	N
328 A	所有 20 种	L	K	M	K	K	K	K	K	K	K	K
332 A	Glu	I	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D

[0357] SPA™ 技术 ;D129G 1E4K 模板结构 ;+ 糖 ;漂浮的 273A, 275A, 302A, 323A, 158C

[0358] 针对 Fc 变体设计进行计算筛选计算以优化 N297 糖和 C_γ2 结构域的构象。通过在与糖相互作用的位置上探查能量有利的取代, 对新的、可能有利的糖构象采样, 变体可得到改造。Fc 残基 F241、F243、V262 和 V264 介导 Fc/ 糖相互作用并因此作为靶位置。这些

设计计算的结果列于表 28 中。

[0359] 表 28

[0360]

位置	考虑的氨基酸	野生型	基态	基态附近序列
241 A	核内	F	Y	Y:172 M:162 L:144 F:140 W:110 I:97 A:91 V:84
243 A	核内	F	Y	Y:211 L:204 W:199 F:160 M:141 A:85
262 A	核内	V	M	M:302 I:253 V:243 A:202
264 A	核内	V	F	I:159 M:152 V:142 L:140 W:136 F:120 Y:104 A:47

[0361] PDA®技术, 111S 模板结构; - 糖

[0362] 针对 Fc 变体设计进行计算筛选计算以优化 C γ 3 和 C γ 2 结构域之间的夹角。位于 C γ 2/C γ 3 界面的残基 P244、P245、P247 和 W313 似乎在决定 C γ 2-C γ 3 夹角和相对于彼此的结构域柔性中扮演关键角色。通过在这些位置上扫描能量有利的取代, 对新的、可能有利的夹角和柔性 (flexibility) 水平采样, 可设计变体。这些设计计算的结果列于表 29 中。

[0363] 表 29

[0364]

位置	考虑的氨基酸	野生型	基态	基态附近序列
244 A	边界	P	H	K:164 H:152 R:110 M:100 S:92 N:57 A:54 D:50 Q:49 T:46 E:37 V:30 L:27 W:23 F:9
245 A	边界	P	A	A:491 S:378 N:131
247 A	边界	P	V	V:156 T:125 K:101 E:87 Q:79 R:78 S:76 A:72 D:72 H:60 M:47 N:47
313 A	边界	W	W	W:359 F:255 Y:128 M:114 H:48 K:29 T:24 A:11 E:10 V:10 S:9 Q:3

[0365] PDA®技术, 111S 模板结构; - 糖

[0366] 除了使用 PDA® SPA™ 计算筛选方法的上述计算外, 单独使用静电势的额外计算被用于计算筛选 Fc 变体。使用库仑定律和德拜-休克尔标度的计算显示了 Fc 中的许多位置, 对于该位置而言, 氨基酸取代可对与一种或更多种 Fc γ Rs 结合起有利作用, 包括用荷负电氨基酸取代中性氨基酸可增强与 Fc γ RIIIa 结合的位置, 以及用中性或荷负电氨基酸取代荷正电氨基酸可增强与 Fc γ RIIIa 结合的位置。这些结果列于表 30 中。

[0367] 表 30

[0368]

用 - 残基取代 + 残基	用 - 残基取代中性残基
H268	S239
K326	Y296
K334	A327

I332

[0369] 库仑定律和德拜-休克尔标度 ;111S 模板结构 ;+ 糖

[0370] 进行计算筛选以优化非糖基化 Fc, 即在缺少 N297 糖的条件下优化 Fc 结构、稳定性、溶解性和 Fc/Fc γ R 亲和力。为了设计在非糖基化 Fc 模板结构的背景下残基 297、邻近 297 的残基、位于 Fc/Fc γ R 界面的残基以及位于 Fc/ 糖界面的残基的有利取代, 进行设计计算。将可变位置分为相互作用可变位置的不同的组, 并在使用不同模板结构的分组计算中得到设计。对于许多可变位置组而言, 使用 PDA $\otimes$ SPATM 计算筛选方法进行计算。这些计算的结果和有关信息列于下表 31-53 中。

[0371] 表 31

[0372]

位置	考虑的氨基酸	野生型	基态	基态附近序列
265 A	边界 XM	D	Y	Y:531 F:226 W:105 H:92 K:21 D:16 E:6 T:3
297 A	边界 XM	N	D	A:235 S:229 D:166 E:114 N:92 Y:57 F:55 Q:25 H:10 T:7 K:6 L:3 R:1
299 A	边界 XM	T	L	L:482 Y:186 F:131 T:55 S:51 K:31 H:22 A:18 E:14 Q:10
297 B	边界 XM	N	I	I:299 K:147 V:85 R:82 W:71 N:65 D:35 E:35 Q:34 S:32 L:31 H:30 T:28 A:26

[0373] PDA $\otimes$ 技术 ;111S 模板结构 ; - 糖 ; 漂浮的 122C, 129C, 132C, 155C

[0374] 表 32

[0375]

位置	考虑的氨基酸	野生型	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
265 A	所有 20 种	D	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
297 A	所有 20 种	N	A	T	A	E	K	K	A	A	N	N
299 A	所有 20 种	T	S	K	S	K	F	F	F	F	F	S
297 B	所有 20 种	N	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K

[0376] SPATM 技术 ;111S 模板结构 ; - 糖 ; 漂浮的 122C, 129C, 132C, 155C

[0377] 表 33

[0378]

位置	考虑的氨基酸	野生型	基态	基态附近序列
239 A	表面	S	E	E:928 Q:65 D:7
265 A	边界 XM	D	W	W:709 Y:248 F:43
296 A	表面	Y	H	H:449 Y:146 E:137 D:89 K:64 N:32 T:30 R:25 Q:23 S:5
297 A	表面	N	E	E:471 H:189 D:102 T:97 K:96 R:22 Q:15 S:8
298 A	边界 XM	S	R	R:353 T:275 K:269 A:56 S:38 E:5 Q:2 H:2
299 A	边界 XM	T	F	Y:398 F:366 L:217 H:15 K:4

[0379] PDA $\otimes$ 技术 ;D129G 111S 模板结构 ; - 糖 ; 漂浮的 120C, 122C, 128C, 132C, 155C

[0380] 表 34

[0381]

位置	考虑的氨基酸	野生型	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 A	所有20种	S	E	Q	Q	E	Q	Q	Q	Q	Q	Q
265 A	所有20种	D	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
296 A	所有20种	Y	D	Q	N	N	Q	N	N	N	Q	N
297 A	所有20种	N	A	A	N	A	D	D	E	N	N	E
298 A	所有20种	S	K	K	K	S	K	K	K	K	S	K
299 A	所有20种	T	S	Y	F	S	Y	F	K	F	S	K

[0382] SPA™ 技术 ;D129G 111S 模板结构 ; - 糖 ; 漂浮的 120C, 122C, 128C, 132C, 155C

[0383] 表 35

[0384]

位置	考虑的氨基酸	野生型	基态	基态附近序列
239 B	表面	S	E	E:417 T:122 D:117 Q:94 R:84 S:63 K:47 H:29 N:19 A:8
265 B	边界 XM	D	W	W:865 Y:79 F:55 K:1
296 B	表面	Y	Y	Y:549 H:97 D:80 S:75 N:48 E:45 K:32 R:30 Q:28 A:16
297 B	表面	N	R	R:265 H:224 E:157 K:154 Q:75 D:47 T:34 N:24 S:13 A:7
298 B	边界 XM	S	V	V:966 D:10 T:8 A:8 N:4 S:4
299 B	边界 XM	T	Y	Y:667 F:330 H:3

[0385] PDA® 技术 ;D129G 1E4K 模板结构 ; - 糖 ; 漂浮的 117C, 119C, 125C, 129C, 152C

[0386] 表 36

[0387]

位置	考虑的氨基酸	野生型	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 B	所有20种	S	S	R	E	K	S	S	E	E	E	K
265 B	所有20种	D	A	D	K	Y	A	A	F	F	K	Y
296 B	所有20种	Y	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
297 B	所有20种	N	T	S	T	T	E	E	E	S	E	E
298 B	所有20种	S	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
299 B	所有20种	T	L	F	E	E	Y	F	Y	F	Y	Y

[0388] SPA™ 技术 ;D129G 1E4K 模板结构 ; - 糖 ; 漂浮的 117C, 119C, 125C, 129C, 152C

[0389] 表 37

[0390]

位置	考虑的氨基酸	野生型	基态	基态附近序列
239 A	表面	S	E	E:868 Q:92 D:38 K:1 N:1
265 A	边界 XM	D	W	W:575 Y:343 F:66 H:15 K:1
296 A	表面	Y	H	H:489 Y:103 R:98 K:97 Q:64 D:63 T:41 N:38 E:7
297 A	Asp	N	D	D:1000
298 A	边界 XM	S	R	R:340 K:262 T:255 A:59 S:57 E:11 Q:10 H:6
299 A	边界 XM	T	F	Y:375 F:323 L:260 H:24 K:18

[0391] PDA® 技术 ;D129G 111S 模板结构 ; - 糖 ; 漂浮的 120C, 122C, 128C, 132C, 155C

[0392] 表 38

[0393]

位置	考虑的氨基酸	野生型	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 A	所有20种	S	E	Q	E	E	E	E	E	E	Q	E
265 A	所有20种	D	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
296 A	所有20种	Y	E	N	Q	E	N	Q	Q	Q	Q	N
297 A	Asp	N	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
298 A	所有20种	S	K	S	K	S	K	K	K	S	K	K
299 A	所有20种	T	S	K	Y	S	F	F	F	F	F	K

[0394] SPA™ 技术 ;D129G 111S 模板结构 ; - 糖 ; 漂浮的 120C, 122C, 128C, 132C, 155C

[0395] 表 39

[0396]

位置	考虑的氨基酸	野生型	基态	基态附近序列
239 B	表面	S	E	E:318 Q:123 T:109 D:108 R:93 S:89 K:69 N:40 H:38 A:13
265 B	边界 XM	D	W	W:745 Y:158 F:85 K:9 E:1 R:1 H:1
296 B	表面	Y	Y	Y:390 H:127 S:83 R:81 K:78 N:65 D:55 E:49 Q:44 A:26 T:2
297 B	Asp	N	D	D:1000
298 B	边界 XM	S	V	V:890 T:35 A:29 D:19 S:16 N:10 E:1
299 B	边界 XM	T	Y	Y:627 F:363 H:10

[0397] PDA® 技术 ;D129G 1E4K 模板结构 ; - 糖 ; 漂浮的 117C, 119C, 125C, 129C, 152C

[0398] 表 40

[0399]

位置	考虑的氨基酸	野生型	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 B	所有20种	S	K	E	E	Q	E	K	Q	E	K	Q
265 B	所有20种	D	F	K	K	A	K	Y	W	K	L	F
296 B	所有20种	Y	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
297 B	Asp	N	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
298 B	所有20种	S	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
299 B	所有20种	T	Y	Y	Y	Y	Y	Y	F	F	Y	Y

[0400] SPA™ 技术 ;D129G 1E4K 模板结构 ; - 糖 ; 漂浮的 117C, 119C, 125C, 129C, 152C

[0401] 表 41

[0402]

位置	考虑的氨基酸	野生型	基态	基态附近序列
239 A	边界 XM	S	E	E:312 L:148 D:102 Q:98 K:64 I:61 S:57 A:44 T:39 N:29 R:23 V:18 W:5
265 A	边界 XM	D	W	W:363 Y:352 F:139 H:77 K:39 R:14 D:11 E:4 Q:1
297 A	Asp	N	D	D:1000
299 A	边界 XM	T	Y	Y:309 F:224 L:212 H:96 K:92 E:28 Q:20 R:16 T:2 S:1

[0403] PDA® 技术 ;D129G 111S 模板结构 ; - 糖 ; 漂浮的 120C, 122C, 132C, 155C

[0404] 表 42

[0405]

位置	考虑的氨基酸	野生型	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 A	所有20种	S	E	L	L	L	E	E	E	Q	L	E
265 A	所有20种	D	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
297 B	Asp	N	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
299 A	所有20种	T	S	K	K	F	F	F	K	F	K	F

[0406] SPA™ 技术 ;D129G 111S 模板结构 ; - 糖 ; 漂浮的 120C, 122C, 128C, 132C, 155C

[0407] 表 43

[0408]

位置	考虑的氨基酸	野生型	基态	基态附近序列
239 B	边界 XM	S	L	L:194 T:122 S:120 E:111 D:79 K:71 A:62 Q:57 R:43 H:43 N:37 I:24 W:24 V:13
265 B	边界 XM	D	W	Y:248 W:233 F:198 K:84 D:57 E:55 H:42 R:28 Q:20 A:10 T:10 N:8 S:7
297 B	Asp	N	D	D:1000
299 B	边界 XM	T	Y	Y:493 F:380 H:76 T:31 E:10 D:4 A:3 S:3

[0409] PDA® 技术 ;D129G 1E4K 模板结构 ; - 糖 ; 漂浮的 117C, 119C, 129C, 152C

[0410] 表 44

[0411]

位置	考虑的氨基酸	野生型	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 B	所有20种	S	R	E	P	L	L	F	P	P	L	L
265 B	所有20种	D	D	K	S	F	S	Y	A	M	A	D
297 B	Asp	N	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
299 B	所有20种	T	Y	Y	Y	Y	E	Y	Y	Y	Y	Y

[0412] SPA™ 技术 ;D129G 1E4K 模板结构 ; - 糖 ; 漂浮的 117C, 119C, 129C, 152C

[0413] 表 45

[0414]

位置	考虑的氨基酸	野生型	基态	基态附近序列
239 A	边界 XM	S	E	E:251 L:125 D:120 Q:112 S:73 K:65 I:61 A:58 T:45 N:35 R:28 V:23 W:4
265 A	边界 XM	D	Y	Y:216 H:153 K:135 D:109 W:104 F:86 R:54 T:38 E:29 Q:22 A:21 N:17 S:13 L:3
297 A	Asp	N	D	D:1000

[0415] PDA® 技术 ;D129G 111S 模板结构 ; - 糖 ; 漂浮的 299A, 120C, 122C, 132C, 155C

[0416] 表 46

[0417]

位置	考虑的氨基酸	野生型	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 A	所有20种	S	S	L	E	L	Q	Q	E	Q	Q	E
265 A	所有20种	D	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
297 A	Asp	N	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D

[0418] SPA™ 技术 ;D129G 111S 模板结构 ; - 糖 ; 漂浮的 299A, 120C, 122C, 132C, 155C

[0419] 表 47

[0420]

位置	考虑的氨基酸	野生型	基态	基态附近序列
239 B	边界 XM	S	L	L:158 S:137 T:125 E:115 D:86 K:75 A:62 Q:56 H:43 R:39 N:35 W:30 I:24 V:15
265 B	边界 XM	D	Y	Y:188 W:159 F:156 D:122 K:77 E:71 H:61 Q:44 R:39 A:24 S:22 N:19 T:18
297 B	Asp	N	D	D:1000

[0421] PDA®技术 ;D129G 1E4K 模板结构 ; - 糖 ; 漂浮的 299B, 117C, 119C, 129C, 152C

[0422] 表 48

[0423]

位置	考虑的氨基酸	野生型	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 B	所有20种	S	S	E	P	P	E	S	P	L	F	L
265 B	所有20种	D	A	K	A	M	K	F	Y	D	F	F
297 B	Asp	N	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D

[0424] SPA™技术 ;D129G 1E4K 模板结构 ; - 糖 ; 漂浮的 299B, 117C, 119C, 129C, 152C

[0425] 表 49

[0426]

位置	考虑的氨基酸	野生型	基态	基态附近序列
297 A	Asp	N	D	D:1000
299 A	边界 XM	T	Y	T:123 Y:64 H:64 K:64 Q:64 F:64 R:63 D:63 E:63 S:63 L:63 N:62 I:57 A:54 V:52 W:17

[0427] PDA®技术 ;D129G 111S 模板结构 ; - 糖 ; 漂浮的 239A, 265A, 120C, 122C, 132C, 155C

[0428] 表 50

[0429]

位置	考虑的氨基酸	野生型	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
297 A	Asp	N	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
299 A	所有20种	T	K	K	K	K	F	F	K	K	K	K

[0430] SPA™技术 ;D129G 111S 模板结构 ; - 糖 ; 漂浮的 239A, 265A, 120C, 122C, 132C, 155C

[0431] 表 51

[0432]

位置	考虑的氨基酸	野生型	基态	基态附近序列
297 B	Asp	N	D	D:1000
299 B	边界 XM	T	Y	T:123 F:64 Y:64 H:64 S:63 N:61 Q:61 D:61 E:60 K:58 V:57 A:57 R:54 I:52 L:51 W:50

[0433] PDA®技术 ;D129G 1E4K 模板结构 ; - 糖 ; 漂浮的 239B, 265B, 117C, 119C, 129C, 152C

[0434] 表 52

[0435]

位置	考虑的氨基酸	野生型	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
297 B	Asp	N	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
299 B	所有20种	T	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y

[0436] SPA™技术 ;D129G 1E4K 模板结构 ; - 糖 ; 漂浮的 239B, 265B, 117C, 119C, 129C, 152C

[0437] 进行计算筛选以优化非糖基化 Fc, 在不存在糖基化的条件下通过在暴露于溶剂的

残基处设计有利的取代,使它们稳定、保持 Fc 结构以及不具有聚集趋势。N297 糖覆盖了暴露的疏水部分 (hydrophobic patch),所述疏水部分通常是与其它 Ig 结构域蛋白质-蛋白质相互作用的界面,维持 Fc 的稳定性和结构完整性并阻止 C γ 2 结构域横越中心轴的聚集。用于设计的关键残基是 F241、F243、V262 和 V264,在 C γ 2 上它们位于该糖的背面,除了诸如 L328、I332 和 I336 的残基外,它们是暴露的非极性残基,向内面向相对的 C γ 2 结构域,在先前介绍的计算中考虑到了该情况。这些 C γ 2 残基的重要性并不是依据在 C γ 3 结构域中通过序列比对所得的相应残基而得到支持的,所述相应的残基介导两个 C γ 3 结构域之间的非极性相互作用或埋藏于 C γ 3 核内。这些设计计算的结果列于表 53 中。

[0438] 表 53

[0439]

位置	考虑的氨基酸	野生型	基态	基态附近序列
241 A	表面	F	E	E:190 R:172 K:138 H:117 T:93 Q:91 D:85 S:49 N:49 A:16
243 A	表面	F	R	R:190 H:164 Q:152 E:149 K:92 T:71 D:64 N:58 S:42 A:18
262 A	表面	V	D	D:416 E:164 N:138 Q:87 T:83 R:44 S:32 K:24 A:11 H:1
264 A	表面	V	H	R:368 H:196 K:147 E:108 Q:68 T:34 N:33 D:25 S:15 A:6

[0440] PDA @技术 ;111S 模板结构 ;— 糖

[0441] 在最后一组计算中,应用 SPA™ 计算筛选方法评估所有 20 种氨基酸对所有选定可变位置的取代。确定了所有 20 种氨基酸的能量最低旋转异构体构象,该能量定义为在该可变位置处该氨基酸取代的能量。因此这些计算提供了在每个可变位置处对于 20 种氨基酸每一种取代的能量。对于以糖基化和非糖基化 Fc 为目标的各种设计目的,包括 Fc/Fc γ R 亲和力的优化、Fc 稳定性、Fc 溶解性、糖构象以及铰链构象而言,这些数据是有用的。此外,因为这些计算提供了有利和不利取代的能量,所以它们可以指导取代,该取代可实现与激活性 Fc γ Rs 和抑制性 Fc γ Rs 的差异结合。使用不同的模板结构,并计算两条链上暴露的取代。1IIS 模板结构链 A 和 B 上这些计算结果和相关参数及信息列于下表 54-59 中。栏 1 列出了 1IIS 模板结构链 A 和 B 上的可变位置。栏 2 列出了在每个可变位置的野生型氨基酸同一性。其余 20 栏提供了每种天然 20 种氨基酸的能量 (显示于顶行)。相对于能量最低取代,归一化所有取代,能量最低取代设定为 0 能量。例如在表 54 中,对于链 A 上 L235 而言,丝氨酸是能量最低取代, L235A 是 0.9kcal/mol,稳定性较 L235S 低。对于 20-50kcal/mol 之间的能量,极高的能量设定为 20kcal/mol,对于高于 50kcal/mol 的能量,设定为 50kcal/mol。有利的取代可考虑应为每个位置的能量最低取代,以及与能量最低取代具有较小能量差异的取代,例如差异在 1-2, 1-3, 1-5, 或 1-10kcal/mol 范围内的取代。

[0442]

表 54

位置	野生型	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
235 A	L	0.9	2.8	2.8	1.5	3.2	3.2	3.4	4.9	1.6	2.1	3.2	0.9	0.3	1.3	0.7	0.0	1.7	4.3	6.5	3.2
236 A	G	0.0	1.9	5.1	6.7	10.0	2.3	4.3	17.2	5.7	20.0	4.6	3.2	12.6	5.6	6.1	0.6	6.2	12.0	6.7	20.0
237 A	G	20.0	20.0	20.0	50.0	50.0	0.0	50.0	50.0	20.0	50.0	20.0	20.0	50.0	50.0	50.0	20.0	20.0	50.0	50.0	50.0
239 A	S	0.2	4.3	2.6	0.0	12.8	4.5	6.9	11.3	1.7	0.1	2.1	1.7	7.9	1.2	2.6	0.3	5.7	11.0	20.0	20.0
265 A	D	9.0	8.1	6.3	7.8	5.1	0.0	7.3	50.0	8.2	9.9	7.7	6.0	50.0	9.0	8.5	7.8	20.0	50.0	20.0	5.8
267 A	S	2.1	3.3	7.3	1.4	50.0	7.3	20.0	20.0	0.9	2.2	5.0	4.8	0.0	2.2	3.1	2.9	20.0	20.0	50.0	50.0
269 A	E	0.5	2.1	1.3	0.6	1.6	3.9	2.0	1.2	1.1	1.3	2.7	0.0	50.0	0.6	1.1	0.3	0.8	1.0	5.6	1.2
270 A	D	0.3	2.8	2.3	2.0	4.0	4.0	3.4	2.4	1.2	0.0	2.3	2.1	20.0	2.0	2.3	1.4	1.8	4.2	5.4	6.0
296 A	Y	2.7	2.0	1.4	0.0	50.0	0.0	50.0	4.6	2.1	2.4	3.3	1.2	50.0	0.2	1.5	1.3	4.6	4.4	16.3	18.2
298 A	S	0.7	2.4	6.7	3.4	20.0	3.9	20.0	6.7	0.0	4.1	1.4	4.1	50.0	1.8	1.1	0.2	2.2	6.3	17.8	20.0
299 A	T	0.6	2.8	11.5	10.1	20.0	6.1	20.0	10.7	7.1	20.0	4.3	6.8	50.0	6.3	12.0	0.0	3.0	7.1	14.8	20.0
234 B	L	2.1	3.2	4.1	4.2	1.6	5.3	0.1	0.7	0.6	1.0	2.0	1.7	50.0	2.8	0.3	2.3	1.7	2.6	13.0	0.0
235 B	L	0.6	2.3	2.5	0.7	5.4	4.8	1.4	3.6	0.1	0.0	2.0	1.7	16.6	0.5	1.2	0.7	0.7	5.3	6.8	5.5
236 B	G	3.1	1.3	4.4	8.2	5.2	0.0	1.9	20.0	3.1	20.0	4.1	2.7	50.0	3.7	16.0	1.2	20.0	20.0	20.0	11.3
237 B	G	20.0	50.0	50.0	50.0	50.0	0.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
239 B	S	0.9	2.4	3.4	1.8	5.4	5.6	2.7	3.0	0.9	0.0	2.0	1.6	50.0	1.8	1.8	1.4	1.4	5.1	20.0	5.3
265 B	D	4.5	5.1	4.6	4.6	4.9	0.0	3.8	9.0	2.0	2.5	4.1	2.1	50.0	4.5	5.1	4.4	5.9	9.2	11.4	5.8
327 B	A	1.8	3.4	4.7	3.9	20.0	7.0	20.0	20.0	0.8	0.0	1.9	1.5	20.0	3.0	2.6	3.2	20.0	20.0	20.0	20.0

[0443]

表 55

位置	野生型	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
235 A	L	0.9	2.8	2.6	1.7	3.3	3.3	3.4	5.0	1.6	2.1	3.3	1.0	0.3	1.4	1.8	0.0	1.9	3.6	6.6	3.3
236 A	G	0.0	1.7	5.2	6.0	11.3	2.3	4.4	17.2	5.8	19.0	4.9	3.3	8.2	5.6	6.0	0.8	5.6	11.8	6.6	20.0
237 A	G	20.0	20.0	20.0	50.0	50.0	0.0	50.0	50.0	20.0	50.0	20.0	20.0	50.0	50.0	50.0	20.0	20.0	50.0	50.0	50.0
238 A	P	8.6	8.0	10.5	13.4	6.4	0.0	5.0	50.0	12.4	11.3	9.7	9.3	3.2	12.4	20.0	8.6	50.0	50.0	20.0	8.4
239 A	S	0.1	4.2	2.5	0.0	20.0	4.5	9.0	10.8	1.8	0.2	2.1	1.8	9.1	1.3	2.5	0.3	5.7	10.7	20.0	19.7
240 A	V	1.3	2.4	2.3	6.3	20.0	7.2	20.0	5.1	10.8	6.2	5.7	2.0	1.1	9.5	13.1	2.5	0.5	0.0	20.0	20.0
241 A	F	0.1	1.6	1.2	0.3	0.2	4.1	1.2	10.0	1.3	0.1	2.1	0.4	14.7	0.5	1.1	0.1	0.0	8.3	3.6	0.4
242 A	L	3.0	3.4	5.5	8.3	14.4	8.5	11.1	3.3	13.9	2.2	2.7	5.5	0.9	7.9	17.1	3.8	2.3	0.0	20.0	17.5
243 A	F	1.6	2.2	2.7	0.2	1.4	5.6	2.5	0.0	2.2	2.0	3.0	2.3	10.2	0.5	1.6	1.3	0.9	1.2	5.3	1.6
244 A	P	1.2	1.8	3.8	0.8	10.2	3.8	4.6	20.0	0.2	2.9	2.0	2.8	2.0	0.9	1.7	0.0	19.3	20.0	7.6	12.2
245 A	P	3.9	20.0	20.0	20.0	20.0	9.1	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	0.0	20.0	20.0	8.0	20.0	50.0	20.0	20.0
246 A	K	1.3	2.7	2.0	2.0	2.9	5.7	2.9	1.4	1.4	1.5	3.1	0.2	0.0	1.2	1.5	1.7	1.4	1.2	5.4	3.0
247 A	P	1.2	2.1	0.3	0.7	4.0	3.9	3.7	1.8	1.6	1.7	3.3	0.0	0.5	0.9	1.5	0.7	1.1	1.3	6.9	3.7
248 A	K	0.9	2.7	1.5	0.8	3.1	4.7	3.4	3.3	2.0	1.9	2.6	1.2	3.6	1.5	2.3	0.7	0.0	2.5	5.6	2.7
249 A	D	1.2	3.7	1.6	0.0	20.0	7.3	19.7	50.0	1.7	20.0	2.2	1.4	20.0	1.5	3.4	2.5	18.3	50.0	20.0	20.0
250 A	T	0.0	1.8	3.8	5.8	50.0	6.0	20.0	4.5	6.3	6.3	0.3	3.2	50.0	8.7	9.3	1.8	1.3	1.9	20.0	50.0
251 A	L	1.1	1.9	1.2	0.5	5.8	5.1	1.9	5.6	0.9	0.7	2.4	1.4	50.0	0.0	1.4	0.5	0.8	6.9	8.9	5.8
252	M	0.3	1.2	0.6	0.0	3.0	3.8	3.4	3.9	1.0	0.3	2.2	0.3	17.0	0.1	1.1	0.1	0.2	4.6	4.2	3.3

表 55 (续)

位置	野生型	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
271	P	0.0	5.3	8.1	9.3	20. 0	3.1	9.1	20. 0	6.0	9.5	5.3	7.3	5.9	5.9	5.9	1.6	4.1	15. 2	20. 0	20.
272	Q	0.8	1.9	0.9	1.2	3.0	3.2	3.7	3.7	1.6	1.8	3.2	0.3	50. 0	1.1	1.6	0.0	1.0	3.5	4.0	3.4
273	V	1.2	2.9	1.8	20. 0	20. 0	7.1	20. 0	6.8	20. 0	20. 0	20. 0	0.0	2.8	20. 0	20. 0	2.1	1.4	1.7	20. 0	20.
274	K	0.4	1.8	1.4	0.8	1.9	3.9	2.4	1.4	0.7	1.1	2.9	0.9	20. 0	0.0	0.1	0.0	0.4	0.7	3.3	2.3
275	F	8.0	9.5	10. 3	9.5	0.0	13. 5	5.1	10. 1	6.2	6.3	6.0	9.1	6.1	9.1	15. 1	9.6	7.2	6.1	13. 5	4.3
276	N	1.3	2.4	2.4	2.2	0.8	5.1	0.8	1.2	0.6	2.3	2.5	1.8	50. 0	1.6	2.5	1.2	0.0	0.3	4.2	3.6
277	W	5.5	7.4	8.4	6.4	15. 4	11. 2	3.2	8.2	1.9	3.9	3.6	6.6	3.5	5.5	15. 4	6.9	6.1	14. 1	20. 0	20.
278	Y	1.6	2.7	3.9	1.6	1.0	7.3	3.4	17. 7	1.4	7.5	2.1	0.0	50. 0	1.9	2.2	2.6	9.9	20. 0	15. 8	1.4
279	V	3.1	4.1	4.0	2.2	20. 0	8.1	9.7	8.5	0.0	1.4	3.1	3.3	20. 0	1.9	4.6	4.3	3.4	4.2	20. 0	20.
280	D	1.8	2.6	2.7	0.2	11. 5	2.9	8.8	20. 0	3.4	3.2	2.8	3.8	50. 0	0.0	3.7	0.6	6.8	12. 7	11. 9	11.
281	G	50. 0	50. 0	50. 0	50. 0	50. 0	0.0	50. 0	50. 0	50. 0	50. 0	50. 0	0.0	50. 0	50. 0	50. 0	50. 0	50. 0	50. 0	50. 0	50.
282	V	0.9	2.1	1.6	1.1	2.9	4.2	3.5	1.4	1.5	1.8	3.6	0.4	18. 9	0.5	1.0	0.0	0.6	0.9	4.7	3.1
283	E	0.7	1.6	0.7	0.5	1.0	4.4	1.4	0.4	1.2	1.8	1.9	0.0	0.4	0.6	1.5	0.4	0.3	1.2	4.1	0.9
284	V	0.0	2.2	3.1	1.2	20. 0	5.0	20. 0	4.0	0.7	2.6	0.8	2.6	50. 0	0.8	0.7	0.8	0.1	1.5	20. 0	20.
285	H	0.2	1.4	3.1	1.3	3.0	2.0	2.4	3.6	1.1	2.6	3.0	0.7	2.2	0.2	0.8	0.0	1.1	4.7	4.9	4.0
286	N	0.8	2.5	1.2	1.1	2.4	4.7	2.7	2.1	0.0	0.7	1.8	0.6	20. 0	1.2	0.7	0.9	1.7	2.1	5.2	2.7
287	A	0.6	2.6	5.8	3.3	10. 4	5.4	9.1	11. 3	0.0	4.4	1.3	3.6	50. 0	2.6	2.3	1.0	1.9	12. 5	9.1	10. 4
288	K	0.8	2.6	2.0	1.3	3.0	3.4	3.8	2.3	1.4	1.7	2.5	0.3	50. 0	0.5	1.3	0.0	0.4	2.0	4.5	3.6

表 55 (续)

位置	野生型	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
306 A	L	4.3	6.2	7.1	5.9	2.8	10. 4	3.4	13. 7	3.0	0.0	3.5	6.0	50. 0	5.9	9.9	6.2	5.3	11. 4	9.6	10. 3
307 A	T	1.4	3.2	3.8	2.2	6.5	5.5	4.2	0.5	0.3	4.2	3.0	2.2	0.0	1.9	1.3	1.4	0.9	1.2	6.2	6.5
308 A	V	1.8	5.5	6.5	8.0	50. 0	7.9	20. 0	4.5	20. 0	5.5	19. 4	7.6	50. 0	7.7	15. 5	0.0	0.7	5.9	50. 0	50. 0
309 A	L	1.1	2.7	0.7	0.7	1.3	4.6	2.7	0.7	1.7	1.0	2.8	0.0	1.6	0.7	1.3	1.0	0.6	0.5	5.0	2.1
310 A	H	2.0	2.6	0.9	4.1	50. 0	5.6	0.2	6.8	4.0	7.1	4.0	0.0	0.2	4.9	10. 0	2.0	2.5	6.4	50. 0	50. 0
311 A	Q	0.6	2.5	1.6	1.6	2.5	4.3	1.6	1.4	0.6	0.9	2.9	0.9	1.7	0.8	0.9	0.0	0.3	2.2	4.6	2.0
312 A	N	5.4	5.1	5.9	1.3	20. 0	0.0	20. 0	10. 0	3.4	4.8	3.3	7.1	50. 0	2.7	3.9	4.1	3.2	11. 9	20. 0	20. 0
313 A	W	4.6	6.4	5.5	5.6	1.1	10. 8	5.0	11. 0	5.8	5.2	7.6	5.4	50. 0	4.8	12. 9	6.0	3.8	6.6	0.0	2.6
314 A	L	2.1	2.9	4.3	2.2	5.7	6.1	7.9	5.4	0.7	0.0	1.7	2.3	50. 0	1.6	1.6	3.0	4.7	6.3	8.0	6.0
315 A	D	0.3	1.4	1.5	0.1	3.3	4.2	1.9	1.8	0.8	0.5	1.8	0.6	50. 0	0.0	0.7	0.0	0.9	2.4	6.2	3.7
316 A	G	50. 0	50. 0	50. 0	50. 0	50. 0	0.0	50. 0	50. 0	50. 0	50. 0	50. 0	50. 0	50. 0	50. 0	50. 0	50. 0	50. 0	50. 0	50. 0	50. 0
317 A	K	0.0	14. 0	18. 4	17. 9	50. 0	5.0	50. 0	20. 0	8.5	12. 5	12. 7	20. 0	15. 9	17. 2	13. 5	2.8	9.2	20. 0	50. 0	50. 0
318 A	E	2.0	3.0	2.7	1.7	2.7	6.7	2.6	0.0	1.1	1.6	1.3	1.7	20. 0	1.4	2.6	2.2	1.3	0.0	6.1	9.5
319 A	Y	2.9	4.4	3.9	3.4	0.0	8.8	1.8	20. 0	0.5	5.2	0.7	3.2	50. 0	3.1	5.6	3.4	3.6	20. 0	20. 0	0.2
320 A	K	2.3	3.1	3.0	2.7	20. 0	7.8	20. 0	9.4	0.0	0.6	2.7	1.3	50. 0	2.4	1.9	3.3	3.3	7.2	20. 0	20. 0
321 A	C	0.0	3.2	20. 0	18. 8	20. 0	6.9	20. 0	20. 0	20. 0	20. 0	10. 4	20. 0	50. 0	19. 6	20. 0	1.5	8.7	18. 3	20. 0	20. 0
322 A	K	2.0	2.5	3.5	2.8	2.7	6.4	2.1	0.2	0.1	1.2	2.7	2.7	50. 0	2.1	0.0	2.3	1.6	0.9	14. 5	2.8
323	V	1.5	2.8	7.3	11.	20.	8.1	20.	6.0	9.6	20.	4.9	8.5	50.	13.	20.	2.8	1.6	0.0	20.	20.

[0449]

A						9	0		0		0		0			0	6	0			1.9		2.1	0	0
324 A	S	2.0	2.1	0.6		0.0	1.9	4.9	3.9	1.5	2.8	0.7	1.9	0.9		50.0	0.8	2.9	2.7					3.8	2.5
325 A	N	2.8	3.9	8.4		3.0	20.0	8.3	20.0	0.0	7.7	20.0	6.2	1.6		13.4	0.5	20.0	3.1					20.0	20.0
326 A	K	1.0	2.7	3.0		1.6	3.7	4.1	3.1	3.2	1.7	2.4	3.7	1.2		0.0	0.6	1.4	1.0					5.6	3.6
327 A	A	0.9	2.8	5.8		3.1	20.0	6.3	16.7	14.7	2.8	20.0	2.5	5.3		20.0	1.3	4.1	0.0					20.0	20.0
328 A	L	6.0	6.3	7.0		4.1	50.0	8.6	20.0	50.0	5.7	0.0	7.1	6.0		50.0	3.7	8.2	6.6					20.0	50.0
329 A	P	1.0	2.5	0.9		0.6	4.0	3.4	3.3	1.7	1.9	2.5	3.6	0.0		0.3	0.7	1.5	0.1					6.2	3.6
330 A	A	0.9	2.0	1.3		0.7	3.4	3.8	3.0	2.0	1.4	2.0	3.4	0.0		20.0	0.6	1.2	0.2					7.0	3.4
331 A	P	50.0	50.0	50.0		50.0	50.0	0.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0		50.0	50.0	50.0	50.0					50.0	50.0
332 A	I	1.9	3.7	4.6		1.7	5.0	7.0	1.9	3.8	1.8	0.0	2.5	3.9		20.0	0.8	2.4	2.3					20.0	5.9
333 A	E	0.0	3.1	3.2		0.8	4.1	4.4	4.2	16.9	3.6	2.8	2.8	2.5		1.6	1.3	3.2	1.3					4.0	4.8
334 A	K	1.7	2.9	2.5		0.0	1.0	6.1	3.3	1.0	1.5	0.5	3.5	1.5		4.4	0.1	2.7	2.2					4.9	1.8
335 A	T	0.5	3.2	4.5		2.7	4.2	4.9	4.1	20.0	2.1	3.1	3.0	1.2		0.0	2.3	2.8	1.4					5.1	4.5
336 A	I	1.2	1.6	5.0		1.5	20.0	6.1	16.8	0.7	3.4	7.8	2.5	3.2		20.0	2.8	1.4	0.7					20.0	20.0
337 A	S	4.8	4.8	7.5		11.5	10.1	0.0	5.5	50.0	9.9	7.0	7.9	5.0		50.0	11.4	12.7	4.5					19.3	10.6
338 A	K	1.0	2.7	2.3		2.2	4.6	5.9	2.4	50.0	0.0	2.1	1.9	1.0		50.0	1.5	0.9	0.7					5.4	4.9
339 A	A	1.0	2.5	0.8		1.1	4.4	3.7	3.7	2.1	1.8	2.6	3.6	0.0		0.8	0.6	1.6	0.6					6.8	3.8
340 A	K	1.3	2.4	2.3		2.0	1.7	4.1	2.3	1.9	0.0	2.3	1.8	1.0		1.9	0.9	1.3	0.5					4.9	2.4

[0450]

表 55 (续)

位置	野生型	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
232 B	P	1.3	3.2	2.2	2.2	4.1	2.9	3.6	1.8	2.1	2.8	3.9	1.1	0.0	1.1	1.6	0.7	1.4	3.0	6.2	4.1
233 B	E	0.5	2.2	1.7	0.5	2.6	3.7	2.9	4.4	1.4	1.1	3.2	0.6	2.7	0.4	1.6	0.0	1.2	6.9	5.5	2.6
234 B	L	2.9	4.0	4.8	4.9	2.0	6.1	0.8	1.5	0.0	1.9	2.7	2.6	20. 0	3.6	1.2	3.1	2.5	3.4	13. 4	0.5
235 B	L	0.6	2.3	2.4	0.9	5.7	4.9	1.4	3.7	0.0	0.0	1.9	1.9	17. 3	0.6	1.4	0.8	0.7	5.2	7.8	5.3
236 B	G	3.6	2.5	5.1	11. 8	6.8	0.0	2.8	20. 0	5.0	20. 0	4.5	3.5	50. 0	5.5	19. 9	2.6	20. 0	20. 0	20. 0	14. 1
237 B	G	20. 0	50. 0	50. 0	50. 0	50. 0	0.0	50. 0	50. 0	50. 0	50. 0	50. 0	50. 0	50. 0	50. 0	50. 0	50. 0	50. 0	50. 0	50. 0	50. 0
238 B	P	3.5	4.7	8.5	4.2	20. 0	9.8	20. 0	0.0	5.6	9.6	4.6	8.1	1.3	5.8	20. 0	4.9	4.4	1.3	20. 0	20. 0
239 B	S	1.0	2.5	3.4	2.0	7.2	5.7	3.1	3.1	0.6	0.0	2.0	1.9	50. 0	1.7	1.1	1.5	1.5	5.2	20. 0	5.2
240 B	V	0.1	2.3	7.0	11. 9	20. 0	6.5	20. 0	8.1	12. 7	20. 0	12. 0	7.6	0.0	11. 6	20. 0	1.2	1.9	0.8	20. 0	20. 0
241 B	F	0.0	2.0	1.4	0.8	1.0	4.0	2.0	6.5	1.1	0.6	2.3	0.2	50. 0	0.3	1.5	0.1	0.9	5.7	4.1	1.1
242 B	L	2.2	3.3	6.5	6.6	6.9	7.9	4.3	0.0	8.7	3.9	4.8	5.3	0.0	9.1	6.8	2.9	1.1	0.5	20. 0	8.7
243 B	F	0.8	2.6	1.9	1.7	0.8	4.9	2.0	3.6	1.2	0.8	2.5	0.0	50. 0	1.6	2.7	0.1	1.8	3.9	4.3	1.0
244 B	P	1.1	2.1	4.0	1.1	11. 9	3.5	5.4	20. 0	1.4	3.2	3.0	2.0	1.8	1.2	1.3	0.0	19. 6	20. 0	9.1	11. 0
245 B	P	3.2	20. 0	20. 0	20. 0	20. 0	8.6	20. 0	20. 0	20. 0	20. 0	20. 0	20. 0	0.0	20. 0	20. 0	6.0	20. 0	50. 0	20. 0	20. 0
246 B	K	0.5	2.6	1.4	1.2	2.1	4.4	1.6	0.6	0.9	1.4	2.5	0.2	0.3	0.2	0.3	0.1	0.0	2.0	4.9	2.4
247 B	P	0.8	2.5	0.7	1.0	3.6	3.9	2.6	6.2	1.8	2.1	2.9	0.3	0.0	0.8	1.5	0.3	0.7	9.5	6.6	3.4
248 B	K	0.2	2.2	0.2	0.6	2.2	4.1	2.5	2.4	1.7	1.0	2.2	0.0	1.3	0.8	1.7	0.5	0.7	2.8	4.7	2.3
249	D	2.8	3.3	0.0	4.6	10.	8.2	6.5	50.	4.6	6.2	4.4	0.5	50.	4.7	6.3	3.5	6.1	50.	20.	7.2

[0451]

[illegible]

[0452]

表 55 (续)

位置	野生型	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
268 B	H	2.6	3.7	5.1	4.1	4.9	6.0	1.8	2.6	0.0	2.5	3.8	2.6	3.4	2.1	1.8	2.5	3.8	2.7	7.8	5.5
269 B	E	0.4	2.4	1.7	0.8	2.8	3.7	2.6	1.0	1.0	1.6	3.0	0.0	12. 8	0.5	0.7	0.3	0.7	0.6	5.1	2.7
270 B	D	0.0	1.6	1.1	7.3	4.8	4.3	2.6	20. 0	3.8	14. 5	3.8	1.2	5.9	6.3	2.1	0.3	1.9	5.4	16. 3	5.6
271 B	P	1.1	3.3	5.6	3.4	4.1	5.5	4.2	20. 0	1.9	3.6	3.9	3.3	7.4	2.7	0.0	1.5	2.2	5.2	4.8	4.4
272 B	Q	0.9	1.9	1.0	0.6	3.0	3.9	2.9	1.5	1.7	2.2	3.5	0.6	4.9	0.0	1.4	0.2	0.6	1.4	3.9	3.2
273 B	V	3.5	4.8	6.2	8.3	20. 0	9.2	20. 0	4.6	8.4	3.1	3.5	7.4	50. 0	10. 6	20.	2.0	0.0	4.8	20. 0	20.
274 B	K	0.1	1.6	0.4	0.9	1.7	3.8	1.8	1.9	0.4	0.5	2.4	0.3	15. 6	0.1	0.0	0.0	0.2	1.6	2.2	1.9
275 B	F	5.7	7.0	8.4	9.2	0.0	11. 2	3.5	9.2	7.9	5.7	5.1	7.0	4.1	9.7	12. 3	6.9	4.5	3.3	10. 3	5.0
276 B	N	0.0	6.2	6.9	6.4	20. 0	4.7	12. 1	20. 0	9.3	10. 0	7.4	3.8	50. 0	6.4	9.2	2.8	20. 0	20.	20. 0	20.
277 B	W	8.3	10. 0	10. 6	9.2	2.6	14. 2	7.4	12. 7	6.7	7.4	6.4	10. 8	6.8	9.3	11. 9	9.7	8.0	14. 4	0.0	15. 9
278 B	Y	0.0	2.3	17. 4	4.0	50. 0	5.1	50. 0	20. 0	2.8	20. 0	2.1	12. 6	11. 0	4.4	2.0	0.8	2.5	19. 8	20. 0	4.2
279 B	V	3.1	3.5	4.2	2.9	20. 0	8.5	13. 9	0.4	0.0	2.9	2.0	3.4	20. 0	1.4	4.0	4.2	2.4	1.2	20. 0	20.
280 B	D	0.5	3.0	2.1	1.5	6.7	3.1	4.7	12. 6	2.9	1.6	2.9	1.6	20. 0	1.4	3.1	0.0	2.7	5.5	8.1	7.3
281 B	G	5.6	5.8	5.5	4.8	7.9	0.0	7.2	6.5	5.3	5.7	7.1	3.4	50. 0	4.0	5.3	3.6	3.2	6.4	10. 3	7.6
282 B	V	0.4	1.9	1.1	0.6	2.9	4.1	2.1	1.3	1.0	1.4	2.9	0.2	50. 0	0.0	0.7	0.0	0.4	0.7	6.1	2.8
283 B	E	0.6	1.9	4.3	1.7	6.7	4.2	5.2	2.9	0.5	4.4	0.3	2.5	0.0	1.5	1.6	1.0	1.5	3.9	7.9	6.7
284 B	V	0.4	2.4	2.5	1.1	20. 0	5.9	20. 0	1.1	1.2	6.2	0.8	2.4	50. 0	1.5	3.3	0.0	1.5	1.8	20. 0	20.
285 B	H	1.3	2.4	2.1	1.7	2.4	3.4	1.2	1.8	0.7	2.3	2.7	0.0	1.6	0.9	0.8	0.5	0.4	2.0	5.8	2.4

[0453]

[illegible]

[0454]

0
0
0
0
0
0
0
0
0
0
0
0
0
B

[0455]

表 55 (续)

位置	野生型	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
304 B	S	1.5	2.3	8.2	20. 0	20. 0	7.6 0	20. 0	7.6 0	20. 0	20. 0	20. 0	6.3	50. 0	20. 0	20. 0	0.0	2.7	3.8 0	20. 0	20. 0
305 B	V	0.1	1.2	3.3	20. 0	20. 0	4.6 0	20. 0	3.2	1.1 0	11. 0	1.5	1.8	50. 0	0.6	2.0	0.6	0.0	0.7 0	20. 0	20. 0
306 B	L	4.7	6.8	6.3	10. 4	11. 1	7.8 0	4.2	3.0	3.0	0.0	3.8	5.7	13. 4	4.4	14. 1	5.5	4.3	6.0 0	20. 0	12. 1
307 B	T	1.5	3.0	2.7	1.7	4.1	5.2	3.0	1.6	1.9	3.1	3.4	1.7	0.0	1.7	1.9	1.5	1.4	2.0	4.4	4.3
308 B	V	0.0	0.6	7.6	20. 0	20. 0	6.6 0	20. 0	20. 0	16. 1	15. 1	20. 0	12. 4	50. 0	20. 0	20. 0	1.2	3.6	4.3 0	20. 0	20. 0
309 B	L	1.4	3.0	2.2	1.1	3.0	6.0	3.5	20. 0	2.4	1.7	3.6	0.2	0.0	1.6	2.3	1.8	14. 3	20. 0	5.1	3.3
310 B	H	2.4	2.9	2.7	4.9 0	20. 0	6.8 0	4.4	4.8	3.1	15. 0	3.4	0.0	2.3	4.6	7.0	1.8	1.6	3.8 0	20. 0	20. 0
311 B	Q	0.0	2.2	1.3	0.7	2.1	3.3	2.4	12. 6	0.6	0.9	2.3	0.6	3.2	0.4	0.8	0.2	1.6	18. 8	4.6	2.0
312 B	N	0.0	1.0	0.2	0.3	6.0	5.4	2.3	12. 0	2.1	2.9	1.6	0.9	50. 0	1.3	5.7	0.1	5.6	3.8	8.0	7.8
313 B	W	5.3	6.6	7.3	5.4	0.0	11. 4	6.2	20. 0	4.0	5.2	4.3	8.0	50. 0	6.5	8.9	6.6	17. 2	20. 0	2.1	0.9
314 B	L	1.7	2.2	3.1	0.0	6.4	5.6	1.5	2.1	0.6	0.2	1.1	1.9	50. 0	0.8	1.0	1.7	0.9	3.1	3.7	11. 3
315 B	D	1.4	2.3	2.4	0.7	6.0	5.5	2.3	4.8	2.2	1.0	2.9	1.8	50. 0	1.0	2.2	0.2	0.0	4.5	8.5	6.8
316 B	G	50. 0	50. 0	50. 0	50. 0	50. 0	0.0 0	50. 0	50. 0	50. 0	50. 0	50. 0	50. 0	50. 0	50. 0	50. 0	50. 0	50. 0	50. 0	50. 0	50. 0
317 B	K	0.9	2.3	4.3	2.8	1.2	4.0	0.6	13. 9	0.0	4.8	1.6	1.3	50. 0	4.2	0.9	0.4	13. 8	10. 1	20. 0	1.7
318 B	E	0.7	1.2	3.1	1.0	7.0	5.1	8.2	0.4	1.0	5.7	1.7	2.3	3.8	1.0	1.6	0.4	0.0	1.0	3.8	7.7
319 B	Y	6.5	7.1	8.5	8.8	0.0	12. 5	3.9	3.1	5.2	5.4	8.4	7.2	50. 0	9.0	13. 7	7.2	5.8	3.9 0	20. 0	1.7
320 B	K	3.1	4.3	7.3	4.3	20. 0	8.6 0	15. 0	1.4	0.0	11. 6	3.6	6.6	50. 0	2.9	2.4	4.0	3.3	2.0 0	20. 0	20. 0
321 C	C	0.0	6.5	20.	20.	20.	6.6	20.	20.	20.	20.	20.	20.	19.	20.	20.	3.1	11.	20.	20.	20.

[0456]

B					0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	2	0	0	0
322 B	K	2.3	3.2	3.5	1.8	20. 0	7.9	20. 0	1.1	0.6	4.9	3.7	2.2	50. 0	0.9	0.3	3.3	1.6	0.0	20. 0
323 B	V	4.0	4.6	6.9	8.1	20. 0	10. 6	20. 0	9.0	17.	7.9	8.1	10. 5	50. 0	8.7	20. 0	5.6	4.6	0.0	20. 0
324 B	S	1.3	3.0	1.4	0.0	2.1	6.0	4.4	1.3	2.4	0.6	2.7	2.2	50. 0	1.3	3.6	1.5	1.6	1.8	3.6
325 B	N	3.4	5.1	9.0	4.7	20. 0	8.2	20. 0	16. 6	16.	20.	20. 0	0.0	50. 0	6.3	20. 0	4.6	8.8	17. 8	20. 0
326 B	K	0.3	2.1	2.0	0.9	1.0	3.5	2.0	2.9	0.9	2.9	2.8	0.1	4.4	0.0	1.1	0.1	3.2	2.1	5.2
327 B	A	1.9	3.3	4.7	3.5	20. 0	7.0	20. 0	20. 0	0.3	0.0	1.9	1.9	20. 0	3.0	2.3	3.3	20. 0	20. 0	20. 0
328 B	L	3.7	3.6	3.8	4.4	50. 0	8.4	7.0	50. 0	3.8	0.0	2.6	4.0	50. 0	4.2	8.7	4.8	2.9	12. 3	50. 0
329 B	P	3.3	8.5	20. 0	20. 0	50. 0	8.0	16. 5	50. 0	18.	20. 0	14. 7	20. 0	0.0	20. 0	20. 0	1.4	17. 1	16. 4	50. 0
330 B	A	0.5	2.0	2.8	0.5	2.4	3.9	1.2	4.0	0.0	2.0	2.1	0.8	20. 0	0.0	0.5	0.8	0.2	4.6	8.2
331 B	P	1.7	3.8	6.4	10. 1	20. 0	4.7	11. 0	10. 1	7.5	20. 0	5.5	5.0	0.0	7.6	7.4	2.6	20. 0	10. 1	17. 6
332 B	I	1.7	2.9	1.3	1.7	14. 8	7.0	13. 9	1.7	3.1	0.0	1.7	1.7	50. 0	1.8	5.3	2.0	1.9	3.4	20. 0
333 B	E	1.9	2.5	1.9	0.0	8.9	5.9	8.2	1.2	3.0	6.4	3.4	2.0	3.1	1.1	2.3	1.8	1.6	1.6	8.9
334 B	K	2.9	3.9	3.7	2.6	20. 0	8.3	12. 1	1.5	2.6	5.3	3.7	4.3	50. 0	1.9	0.0	3.4	1.8	1.4	9.9
335 B	T	0.0	2.1	7.2	7.0	4.2	0.4	3.3	17. 3	6.5	7.7	5.2	5.5	3.5	7.0	5.7	0.2	5.5	11. 5	5.2
336 B	I	0.5	1.6	2.1	0.7	20. 0	5.0	6.1	0.0	1.3	5.3	2.1	1.8	20. 0	0.6	3.1	1.1	0.8	0.7	19. 4
337 B	S	1.1	2.1	4.0	2.0	3.1	3.2	2.0	50. 0	0.0	1.6	0.9	1.9	15. 8	1.1	2.2	1.4	50. 0	50. 0	5.5
338 B	K	0.6	2.3	3.0	3.0	9.4	5.3	10. 6	2.2	1.1	0.0	3.2	1.5	16. 2	2.7	2.7	1.1	2.8	3.5	8.1
339 B	A	1.1	2.4	1.2	0.8	4.3	3.6	3.7	2.6	1.8	2.6	3.5	0.0	2.3	0.5	1.3	0.2	0.8	2.0	6.7
340 B	K	0.9	2.0	1.4	0.8	3.0	3.4	2.9	2.1	0.8	2.5	2.3	0.2	1.0	0.1	1.2	0.0	0.5	2.0	5.5

[0457]

[0458]

[illegible]

表 56

位置	野生型	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
239 A	S	0.2	4.6	2.7	0.0	20.0	4.6	14.5	11.0	1.9	0.3	2.0	1.9	8.1	1.4	2.6	0.4	5.7	11.6	20.0	20.0
240 A	V	1.5	2.4	2.4	6.9	20.0	7.4	20.0	5.1	9.9	5.9	5.5	2.4	1.1	12.3	13.1	2.6	0.5	0.0	20.0	20.0
263 A	V	2.3	2.8	6.3	16.5	20.0	8.8	20.0	9.6	7.3	7.3	15.3	4.8	50.0	16.4	17.4	2.8	1.4	0.0	20.0	20.0
264 A	V	1.8	3.1	2.6	1.8	0.0	6.3	1.9	0.6	2.4	0.8	2.7	2.1	1.6	2.3	2.7	2.3	1.1	0.5	3.5	0.0
266 A	V	4.9	5.2	6.9	12.3	20.0	11.1	20.0	0.8	11.9	20.0	8.5	6.6	50.0	12.5	20.0	6.1	3.7	0.0	20.0	20.0
296 A	Y	3.4	2.7	1.1	0.0	50.0	0.7	50.0	5.0	3.6	3.5	4.2	0.9	50.0	0.9	2.9	2.2	5.3	5.5	16.1	18.4
299 A	T	0.7	3.2	9.9	10.4	20.0	6.2	20.0	10.7	6.7	20.0	4.1	12.9	50.0	5.9	11.8	0.0	2.5	8.2	13.3	20.0
325 A	N	2.5	3.5	7.7	2.5	20.0	8.0	20.0	0.0	6.1	20.0	7.8	1.2	12.8	0.8	20.0	2.7	0.0	1.0	20.0	20.0
328 A	L	6.1	6.3	7.1	4.2	50.0	8.8	20.0	50.0	4.6	0.0	7.2	6.1	50.0	4.0	8.3	6.7	50.0	50.0	20.0	50.0
330 A	A	0.9	1.8	1.2	0.0	2.5	4.0	2.9	1.7	1.2	1.6	2.8	0.0	20.0	0.4	1.0	0.2	0.5	1.7	6.2	2.9
332 A	I	1.9	3.8	4.6	1.3	5.1	7.1	1.8	3.4	0.2	0.0	2.6	3.8	20.0	0.6	2.4	2.3	2.5	4.2	20.0	5.6
239 B	S	1.0	2.4	3.5	2.0	6.7	5.6	2.9	3.1	0.3	0.0	1.9	2.1	50.0	1.5	1.8	1.4	1.4	5.2	20.0	4.2
240 B	V	0.3	2.4	6.9	11.7	20.0	6.6	20.0	8.3	12.3	20.0	14.2	7.4	0.0	13.4	20.0	1.3	1.9	0.9	20.0	20.0
263 B	V	2.4	3.9	4.5	12.5	20.0	9.3	20.0	15.8	17.1	2.1	20.0	5.3	50.0	13.8	20.0	3.9	2.2	0.0	20.0	20.0
264 B	V	2.2	3.2	4.8	2.7	7.4	6.9	6.0	0.0	1.9	1.9	3.8	3.7	9.9	3.1	2.2	2.7	2.4	0.9	14.7	18.2
266 B	V	5.4	5.5	7.5	13.2	20.0	12.1	20.0	2.6	20.0	20.0	20.0	5.4	50.0	16.1	20.0	6.0	4.7	0.0	50.0	50.0
296 B	Y	1.5	2.7	1.3	1.2	4.0	4.1	3.6	1.1	1.9	2.6	3.5	0.0	20.0	0.7	1.8	1.1	1.4	1.3	6.5	4.2
299	T	0.0	2.2	7.5	10.0	20.0	4.8	20.0	7.7	5.8	20.0	10.0	5.1	50.0	10.0	18.0	0.3	1.1	5.4	20.0	20.0

[0459]

[0460]

B						2	0		0		0	3	0	2	4			0	0
325 B	N	3.4	5.1	8.6	5.0	20.	0	8.2	20. 0	16. 7	20. 0	20. 0	19. 7	6.3	20. 0	4.6	8.6	18. 2	20. 0
328 B	L	3.6	3.5	3.8	3.9	50.	0	8.3	7.0	50. 0	2.9	0.0	3.8	3.4	8.4	4.7	2.9	12. 5	50. 0
330 B	A	0.7	2.1	2.9	0.7	2.7	2.7	4.0	1.4	4.8	0.0	2.2	2.3	0.2	0.8	1.1	0.2	4.7	7.8
332 B	I	1.8	2.9	1.2	1.8	13. 5	13. 5	7.0	9.9	1.7	3.2	0.0	1.7	1.2	5.4	2.0	2.0	3.3	20. 0

SPA™ 技术; D129G 111S 模板结构; +糖

表 57

位置	野生型	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
239 A	S	1.2	3.5	1.7	0.0	20.0	5.8	11.0	6.6	2.9	3.9	3.9	2.7	8.5	1.3	2.7	0.6	3.5	5.4	20.0	20.0
240 A	V	1.2	2.4	6.0	14.0	20.0	7.1	20.0	6.7	9.4	10.1	7.5	4.4	1.8	14.8	20.0	2.0	0.4	0.0	20.0	20.0
263 A	V	0.0	0.4	1.0	8.7	20.0	6.9	4.4	11.7	4.9	16.0	19.2	0.8	50.0	11.7	20.0	1.4	0.1	1.0	20.0	20.0
264 A	V	2.9	3.7	6.3	2.8	11.6	7.6	13.2	0.0	3.2	3.4	4.1	4.2	7.1	2.9	3.4	3.1	1.9	0.8	12.8	16.3
266 A	V	4.8	5.9	6.8	9.5	50.0	10.3	20.0	3.5	12.7	12.2	12.7	4.1	50.0	11.9	11.9	5.2	2.9	0.0	50.0	50.0
296 A	Y	0.8	2.0	1.5	0.1	0.2	3.4	1.5	6.6	1.7	0.6	1.8	1.2	2.6	0.0	1.6	0.2	2.5	5.6	3.8	0.0
299 A	T	1.9	3.7	7.5	0.0	20.0	7.9	14.2	2.9	0.8	3.4	4.4	2.3	50.0	1.9	3.0	3.5	4.1	3.3	20.0	20.0
325 A	N	1.0	1.4	3.1	2.8	20.0	7.4	20.0	8.5	7.7	10.4	6.1	2.8	15.4	5.4	20.0	0.0	0.1	3.8	20.0	20.0
328 A	L	2.5	5.3	4.0	1.9	50.0	7.5	20.0	20.0	1.6	0.2	0.0	2.9	50.0	0.4	4.8	3.2	2.9	7.0	50.0	50.0
330 A	A	0.9	2.1	1.8	1.2	2.4	2.7	3.1	3.1	1.4	2.1	3.5	0.5	20.0	0.8	1.0	0.0	0.5	2.9	5.2	2.9
332 A	I	2.9	3.7	3.9	0.9	6.1	7.8	2.5	0.0	2.7	0.8	2.8	3.5	50.0	0.7	3.7	2.9	2.5	1.0	8.1	6.9
239 B	S	1.9	3.1	3.0	1.9	1.5	6.2	2.3	14.1	1.8	1.4	2.9	1.8	0.0	1.9	3.2	1.9	2.3	7.7	6.6	15.8
240 B	V	0.5	1.7	5.0	13.3	20.0	6.6	20.0	1.2	12.4	12.1	8.8	4.6	6.3	20.0	20.0	1.0	0.2	0.0	20.0	20.0
263 B	V	2.9	3.2	6.4	18.2	10.1	9.2	6.9	12.8	6.0	20.0	10.3	5.7	50.0	17.5	20.0	3.2	2.2	0.0	20.0	20.0
264 B	V	2.9	3.6	4.4	3.0	8.8	7.1	6.2	0.0	2.3	1.9	4.5	3.4	1.7	3.2	3.5	3.5	2.0	0.9	12.0	16.4
266 B	V	4.4	4.6	2.6	6.6	20.0	10.7	20.0	0.0	4.9	1.7	8.5	5.6	50.0	6.0	12.4	5.3	4.6	1.5	20.0	50.0
296 B	Y	0.0	7.1	6.7	7.2	20.0	0.1	18.6	50.0	7.0	2.7	6.6	6.8	50.0	7.2	9.3	2.3	50.0	50.0	20.0	14.1
299	T	0.0	3.2	10.	6.0	20.	5.5	20.	15.	3.2	5.9	4.4	6.4	50.	5.7	9.4	1.2	1.4	13.	20.	20.

[0461]

B			4		0	0	9				0					7	0	0
325 B	N	1.4	2.5	5.0	0.0	20. 0	7.0	20. 0	1.0	2.2	1.0	0.3	1.9	1.1	20. 0	2.6	5.1	20. 0
328 B	L	0.4	1.3	5.6	0.0	50. 0	4.5	50. 0	1.9	2.4	2.4	8.3	50. 0	0.8	16. 4	1.0	1.2	50. 0
330 B	A	0.6	1.4	2.5	0.9	3.1	2.5	1.2	20. 0	2.4	2.1	0.3	20. 0	0.4	0.6	0.0	4.0	20. 0
332 B	I	4.3	5.3	5.7	0.0	11. 4	9.3	4.3	2.5	2.0	4.0	6.5	17. 9	3.7	5.9	4.6	4.2	20. 0

SPA™ 技术; D129C 11X 模板结构; +糖

表 58

位置	野生型	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
239 A	S	1.2	2.3	2.2	1.8	7.9	5.5	7.6	0.5	0.2	1.8	2.6	1.4	0.9	1.3	1.9	1.5	0.8	0.0	8.6	9.6
240 A	V	0.7	2.9	6.8	4.3	20.	6.5	20.	0.0	10.	20.	3.1	9.1	2.1	7.7	20.	1.4	1.1	2.4	20.	20.
263 A	V	1.7	2.9	4.6	18.	20.	8.4	5.8	15.	2.3	14.	2.1	3.2	50.	20.	15.	3.6	1.2	0.0	20.	20.
264 A	V	2.7	3.3	3.6	13.	13.	6.7	5.9	0.0	2.3	4.9	3.7	3.2	1.9	2.5	3.0	3.0	2.5	0.7	19.	19.
266 A	V	3.5	3.5	5.7	12.	20.	10.	20.	5.7	6.3	7.8	7.4	5.2	50.	16.	20.	4.2	1.7	0.0	20.	50.
296 A	Y	2.6	50.	50.	50.	50.	0.0	50.	50.	18.	18.	50.	50.	50.	50.	50.	50.	50.	50.	50.	13.
299 A	T	0.2	0.7	6.6	1.2	20.	5.6	9.6	1.6	0.8	1.5	1.8	4.8	50.	1.0	9.2	0.0	0.0	1.6	20.	20.
325 A	N	3.1	3.6	7.3	2.4	20.	7.7	20.	20.	20.	10.	13.	3.6	50.	0.0	20.	4.0	9.7	20.	20.	20.
328 A	L	0.6	0.0	1.5	5.4	50.	1.6	50.	50.	3.1	4.2	9.6	1.4	50.	6.9	9.6	0.6	0.1	50.	50.	50.
330 A	A	1.9	2.5	4.1	2.8	4.5	4.1	3.0	3.2	1.0	2.7	3.5	2.1	20.	2.4	2.6	1.3	0.0	3.9	7.6	5.3
332 A	I	2.3	3.5	2.2	0.8	20.	6.8	9.6	0.0	3.4	0.2	2.6	2.8	14.	3.3	4.6	2.6	1.3	0.9	10.	20.
239 B	S	1.4	3.6	2.5	1.4	16.	5.8	6.2	5.0	2.5	1.4	2.0	3.8	0.3	0.5	2.4	0.0	1.6	5.3	20.	19.
240 B	V	0.0	2.6	12.	18.	20.	5.7	20.	12.	10.	20.	8.5	15.	3.1	20.	20.	1.0	0.2	2.4	20.	20.
263 B	V	1.1	2.4	3.6	20.	20.	7.8	17.	11.	4.5	20.	6.3	3.3	50.	20.	20.	3.2	1.2	0.0	20.	20.
264 B	V	3.3	4.0	5.0	2.9	14.	7.5	4.8	0.0	2.6	3.6	4.6	3.5	1.7	3.1	4.1	3.9	2.9	1.3	6.9	20.
266 B	V	2.9	3.3	4.9	11.	50.	9.5	20.	20.	20.	7.9	15.	4.5	50.	4.9	20.	1.9	0.0	3.6	50.	50.
296 B	Y	2.8	50.	50.	50.	50.	0.0	50.	50.	17.	18.	50.	50.	50.	50.	50.	50.	50.	50.	50.	11.
299	T	0.0	3.8	12.	9.2	20.	5.9	20.	7.3	4.8	3.2	4.3	8.0	50.	12.	8.8	0.2	2.1	4.4	20.	20.

[0463]

[0464]

B				6		0		0						0	3									0	0
325 B	N	0.3	2.0	5.5	2.2	50. 0	6.1	20. 0	0.0	10. 5	15. 5	14. 6	1.3	10. 0	2.4	20. 0	2.3	2.0	1.0	20. 0	50. 0			0	0
328 B	L	5.4	5.7	7.3	4.4	50. 0	9.8	20. 0	50. 0	2.5	0.0	5.1	5.9	50. 0	2.8	7.4	6.1	6.4	50. 0	50. 0			0	0	
330 B	A	0.6	1.4	3.2	1.3	3.9	3.2	2.7	4.0	1.3	3.7	3.1	0.7	20. 0	0.6	1.3	0.0	0.4	4.2	8.2	3.6				
332 B	I	1.9	3.1	2.7	1.7	5.2	6.9	3.1	0.4	1.3	0.0	1.9	2.6	7.7	1.3	2.2	2.3	1.6	2.0	10. 4	5.6				

SPA™ 技术; D129G 1E4K 模板结构; +糖

表 59

位置	野生型	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
239 A	S	1.4	2.6	3.1	1.0	20.0	5.7	4.8	3.4	2.0	1.2	2.6	1.6	4.8	0.0	2.1	1.3	2.1	3.3	13.8	19.6
240 A	V	2.9	3.5	3.7	4.6	20.0	8.2	10.8	0.0	9.1	3.2	5.4	3.1	4.8	5.5	17.5	4.0	1.8	1.2	20.0	20.0
263 A	V	3.6	4.9	6.2	8.7	20.0	9.9	20.0	3.7	4.2	0.5	6.7	6.1	50.0	9.5	20.0	5.1	3.6	0.0	20.0	20.0
264 A	V	1.8	2.8	3.3	2.0	2.9	6.2	3.1	0.0	2.4	0.8	3.0	2.4	6.1	1.4	2.8	2.4	1.9	0.8	10.2	2.2
266 A	V	4.4	5.2	4.9	7.1	20.0	10.6	20.0	1.0	12.1	4.8	9.1	4.6	50.0	7.9	12.6	5.8	3.5	0.0	20.0	20.0
296 A	Y	1.2	2.9	0.7	1.4	3.1	3.9	2.7	2.4	2.3	1.9	2.2	0.0	1.6	1.4	3.0	0.9	1.0	3.5	6.0	2.6
299 A	T	0.0	2.6	6.0	11.5	20.0	5.3	20.0	20.0	6.0	20.0	4.4	3.0	50.0	14.1	13.2	0.9	3.8	15.1	15.0	20.0
325 A	N	5.2	7.0	6.6	6.9	50.0	11.3	20.0	1.3	14.3	13.5	13.9	0.0	5.0	6.0	20.0	6.0	4.6	3.2	20.0	50.0
328 A	L	4.8	5.5	7.0	3.2	20.0	10.5	20.0	50.0	5.1	0.0	8.5	5.5	50.0	3.5	8.2	5.5	13.4	50.0	20.0	50.0
330 A	A	0.9	1.8	1.1	0.9	3.5	4.0	3.0	2.3	1.2	1.6	2.8	0.0	14.5	0.9	1.1	0.1	0.4	2.0	6.4	3.2
332 A	I	5.3	6.4	6.7	4.8	8.2	9.9	5.2	3.1	0.0	3.6	5.2	6.8	20.0	3.5	4.6	5.5	4.8	4.0	11.2	7.1
239 B	S	0.7	2.3	2.6	2.0	5.3	5.1	3.3	1.7	0.0	0.0	2.0	0.8	15.5	0.9	0.8	0.7	0.7	3.3	8.2	6.0
240 B	V	2.3	3.0	4.1	7.3	20.0	8.1	20.0	5.1	20.0	11.8	10.9	3.8	2.0	17.0	20.0	3.6	1.3	0.0	20.0	20.0
263 B	V	3.2	4.3	7.3	8.3	20.0	9.6	20.0	13.3	8.5	0.6	20.0	6.0	50.0	8.5	20.0	4.6	4.0	0.0	20.0	20.0
264 B	V	2.1	3.2	3.7	2.7	17.8	6.6	11.5	0.0	2.0	0.8	3.5	3.0	7.8	2.0	1.5	2.5	1.3	1.0	13.9	20.0
266 B	V	5.0	5.0	5.2	16.3	20.0	11.2	20.0	2.3	20.0	14.3	17.3	2.5	50.0	11.6	20.0	5.4	3.9	0.0	20.0	20.0
296 B	Y	0.9	2.3	1.0	0.5	2.7	3.7	2.5	1.2	1.3	2.1	3.0	0.0	7.0	0.4	1.1	0.3	0.8	1.8	6.0	2.4
299	T	1.1	2.2	7.6	5.4	20.0	6.4	12.0	1.8	3.9	17.0	6.9	3.9	20.0	4.6	10.0	0.8	0.0	1.9	20.0	20.0

[0465]

基酸。例如,变体 18 具有如下四个突变:F241E、F243Y、V262T 和 V264R。组成该组 Fc 变体的可变位置残基在结构上阐明于图 3 中,并表示为图 4 中人 IgG1 背景下的 Fc 序列。

[0467]

表 60

位置	234	235	239	240	241	243	244	245	247	262	263	264	265	266	267	269	296	297	298	299	313	325	326	327	328	329	330	332	333	334
野生型	L	L	S	V	F	F	P	P	P	V	V	V	D	V	S	E	Y	N	S	T	W	N	K	A	L	P	A	I	E	K
1												A																		
2												L																		
3												I																		
4					W																									
5					L																									
6						W																								
7						L																								
8					L	L				I		I																		
9					W	W				A		A																		
10					W	W				I																				
11					L							I																		
12						L						W																		
13						L				I		T																		
14					Y	Y				T		R																		
15					E	R				E		E																		
16					E	Q				T		R																		
17					R	Q				T		R																		
18					E	Y				T		R																		
19																								M						
20																								E						
21																								F						
22																												E		
23																								M				E		
24						H																								
25							A																							
26								V																						
27																					F									
28						H	A	V																						
29								G																						
30										I																	E			

[0468]

表 60 (续)

位置	234	235	239	240	241	243	244	245	247	262	263	264	265	266	267	269	296	297	298	299	313	325	326	327	328	329	330	332	333	334
野生型	L	L	S	V	F	F	P	P	P	V	V	V	D	V	S	E	Y	N	S	T	W	N	K	A	L	P	A	I	E	K
31					E	R				E		R																E		
32					E	Q				T		E																E		
33					R	Q				T		R																E		
34					E	Y				T		R																E		
35																		A												
36																		A									E			
37																		A												
41			E																A									E	A	A
42			Q																									E		
43			E																									E		
44																														
45													G	N																
46			E										G	N																
47			E										N																	
48			E										Q																	
49																E														
50																Q														
51																			T											
52																			N											
53																				I										
54																								S						
55																								N						
56															Q									S						
57															L									S						
58																								S						
59																								L						
60																									F					
61																										L				
62																											Y		D	

[0469]

表 60 (续)

位置	234	235	239	240	241	243	244	245	247	262	263	264	265	266	267	269	296	297	298	299	313	325	326	327	328	329	330	332	333	334
野生型	L	L	S	V	F	F	P	P	P	V	V	V	D	V	S	E	Y	N	S	T	W	N	K	A	L	P	A	I	E	K
62																											D			
63																	S													
64																	D													
65																	S											E		
66																	D											E		
67																	E											E		
68													Y				D											E		
69													Y				D											E		
70													F				E											E		
71																									I			E		
72																									Q			E		
73																												E		
74																												Z		
75																												Q		
76												T																		
77												F																		
78				I																										
79											I																			
80																														
81																				A										
82																			S											
83																			V											
84																						Q								
85																						L								
86																						I								
87			D																											
88			N																											
89			F																											
90			D																									D		
91			D																									E		
92			D																									Z		

[0470]

表 60 (续)

位置	234	235	239	240	241	243	244	245	247	262	263	264	265	266	267	269	296	297	298	299	313	325	326	327	328	329	330	332	333	334
野生型	L	L	S	V	F	F	P	P	P	V	V	V	D	V	S	E	Y	N	S	T	W	N	K	A	L	P	A	I	E	K
93			E																								D			
94			E																									N		
95			E																									Q		
96			N																									D		
97			N																									E		
98			N																									N		
99			N																									Q		
100			Q																									D		
101			Q																									N		
102			Q																									Q		
103																							E							
104																	D													
105																	N													
106										T		T						D										E		
107																											Y	E		
108												I															Y	E		
109																											L	E		
110												I															L	E		
111	D																													
112	E																													
112	N																													
114	Q																													
115	T																													
116	H																													
117	Y																													
118	I																													
119	V																													
120	F																													
121																														
122																														

[0471]

表 60 (续)

位置	234	235	239	240	241	243	244	245	247	262	263	264	265	266	267	269	296	297	298	299	313	325	326	327	328	329	330	332	333	334
野生型	L	L	S	V	F	F	P	P	P	V	V	V	D	V	S	E	Y	N	S	T	W	N	K	A	L	P	A	I	E	K
123		N																												
124		Q																												
125		T																												
126		H																												
127		Y																												
128		I																												
129		V																												
130		F																												
131			T																											
132			H																											
133			Y																											
134				A																										
135				T																										
136				M																										
137										A	T																			
138										M																				
139																														
140											M																			
141											Y																			
142																														
143															A															
144														T	M															
145																														
146																H														
147																Y														
148																F														
149																R														
150																	S													
151																	T													
152																	L													

[0472]

表 60 (续)

位置	234	235	239	240	241	243	244	245	247	262	263	264	265	266	267	269	296	297	298	299	313	325	326	327	328	329	330	332	333	334
野生型	L	L	S	V	F	F	P	P	P	V	V	V	D	V	S	E	Y	N	S	T	W	N	K	A	L	P	A	I	E	K
153																			H											
154																				H										
155																										V				
156																										I				
157																										F				
158																										R				
159																										H				
160																														
161																														
162																														
163																														
164																														
165																														
166																														
167																														
168																														
169																														
170																														
171																														
172																														
173																														
174																														
175																														
176																														
177																														
178																														
179			E									I																		
180			Q									I																		
181			E									I																		
182			E									I							A											

[0473]

表 60 (续)

位置	234	235	239	240	241	243	244	245	247	262	263	264	265	266	267	269	296	297	298	299	313	325	326	327	328	329	330	332	333	334
野生型	L	L	S	V	F	F	P	P	P	V	V	V	D	V	S	E	Y	N	S	T	W	N	K	A	L	P	A	I	E	K
183			D															D										E		
184			E															D										E		
185			D										V					D										E		
186			D										I					D										E		
187			D										L					D										E		
188			D										F					D										E		
189			D										Y					D										E		
190			D										H					D										E		
191			D									T						D										E		
192											E							D										E		
193																	D	D										E		
194																	E	D										E		
195																	N	D										E		
196																	Q	D										E		
197																	H	D										E		
198																	T	D										E		
199																		D		V								E		
200																		D		I								E		
201																		D		L								E		
202																		D		F								E		
203																		D		H								E		
204																		D		E								E		
205																		D								Y	Y	E		
206																		D	A							Y	Y	E		
207			D																							Y	Y	E		
208			N																							Y	Y	E		
209			D																							L	L	E		
210			N																							L	L	E		
211											I								A									E		
212			D																A									E		

[0474]

表 60 (续)

位置	234	235	239	240	241	243	244	245	247	262	263	264	265	266	267	269	296	297	298	299	313	325	326	327	328	329	330	332	333	334	
野生型	L	L	S	V	F	F	P	P	P	V	V	V	D	V	S	E	Y	N	S	T	W	N	K	A	L	P	A	I	E	K	
213			N																A								E				
214			D									I																E			
215			D									I							A									E			
216			D									I														L	E				

[0475] 实施例 2 :Fc 文库的实验生产和筛选

[0476] 涉及 Fc 变体的大多数实验在抗癌抗体阿仑单抗 (Campath®，IlexPharmaceuticals LP 的注册商标) 中进行。阿仑单抗结合其靶抗原 CD52 中短线性

表位 (Hale 等., 1990, Tissue Antigens 35 :118-127 ;Hale, 1995, Immunotechnology 1 : 175-187)。已选定阿仑单抗作为初级工程模板结构, 是因为其效力是部分基于其招募效应细胞的能力 (Dyer 等., 1989, Blood 73 :1431-1439 ;Fridend 等., 1991, Transplant Proc 23 :2253-2254 ;Hale 等., 1998, Blood 92 :4581-4590 ;Glennie 等., 2000, Immunol Today 21 :403-410), 并因为在生产和结合测定中使用其抗原是相对直观的。为了在其它抗体背景下评估本发明优化的 Fc 变体, 在抗 -CD20 抗体利妥昔单抗 (Rituxan®, IDEC Pharmaceuticals Corporation 的注册商标) 和抗 -Her2 抗体曲妥单抗 (Herceptin®, Genentech 的注册商标) 中评估所选择的 Fc 变体。对于筛选目的而言, 使用阿仑单抗、利妥昔单抗和曲妥单抗并不意在将本发明限制为任何特定抗体。

[0477] 构建阿仑单抗、利妥昔单抗和曲妥单抗的 IgG1 全长轻链 (V_L-C_L) 和重链 ($V_H-C\gamma 1-C\gamma 2-C\gamma 3$) 抗体基因, 该构建过程利用了合适的末端限制性位点以便于亚克隆。将该基因连接入哺乳动物表达载体 pcDNA3.1Zeo (Invitrogen) 中。pcDNA3.1Zeo 中的 $V_H-C\gamma 1-C\gamma 2-C\gamma 3$ 克隆作为 Fc 区诱变的模板。使用基于 PCR 的诱变技术将突变导入该克隆中。对 Fc 变体测序以证实该序列的保真度。将含有重链基因 ($V_H-C\gamma 1-C\gamma 2-C\gamma 3$) (野生型或变体) 的质粒与含有轻链基因 (V_L-C_L) 的质粒共转染入 293T 细胞中。转染 5 天后收获培养基。使用蛋白质印迹筛选转染瘤 (transfectomas) 的培养上清液以监测免疫球蛋白表达, 所述蛋白质印迹使用了过氧化物酶偶联的羊抗人 IgG (Jackson Immuno Research, 目录 #109-305-088)。图 6 显示了野生型阿仑单抗和变体 1-10 在 293T 细胞中的表达。使用蛋白 A 亲和层析 (Pierce, 目录 #20334) 从上清液中纯化抗体。图 7 显示了野生型阿仑单抗蛋白纯化的结果。抗体 Fc 变体显示了类似于野生型的表达和纯化结果。对一些 Fc 变体去糖基化以便在无糖存在的条件下测定它们的溶解和功能特性。为获得去糖基化抗体, 纯化的阿仑单抗抗体与肽 -N- 糖苷酶 (PNGase F) 在 37°C 下温育 24 小时。图 8 显示的 SDS PAGE 凝胶证实了几个 Fc 变体和野生型阿仑单抗的去糖基化结果。

[0478] 为了证实这些条件下生产的阿仑单抗的功能保真度, 抗原 CD52 肽融合至 GST, 在 IPTG 诱导下在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中表达。未诱导和诱导的样品跑 SDS PAGE 凝胶。并转移到 PVDF 膜上。为了进行蛋白质印迹, 将来自 Sotec (终浓度 2.5ng/u1) 的阿仑单抗或转染的 293T 细胞的培养基 (阿仑单抗终浓度约为 0.1-0.2ng/u1) 作为一抗, 将过氧化物酶偶联的羊抗人 IgG 作为二抗。图 9 显示了这些结果。结合靶抗原的能力证实了所表达的阿仑单抗的结构和功能保真度。预计与野生型阿仑单抗具有相同可变区的 Fc 变体对抗原能保持相当的结合亲和力。

[0479] 为了对 Fc/Fc γ R 结合进行筛选, 表达并纯化人 V158 Fc γ RIIIa、人 F158 Fc γ RIIIa、人 Fc γ RIIb、人 Fc γ RIIa 和小鼠 Fc γ RIII 的胞外区。图 10 呈现的 SDS PAGE 凝胶显示了人 V158 Fc γ RIIIa 表达和纯化的结果。通过对获得自哺乳动物基因库 (Mammalian Gene Collection) (MGC :22630) 的克隆进行 PCR 得到该受体的胞外区。将该受体与谷胱甘肽 S- 转移酶 (GST) 融合以便筛选。将带标签的 Fc γ RIIIa 转染入 293T 细胞, 3 天后收获并纯化含有分泌 Fc γ RIIIa 的培养基。为了进行蛋白质印迹, 用抗 -GST 抗体作为探针探查膜。

[0480] 使用 AlphaScreen™ 分析法 (增强发光均质邻近分析法 (ALPHA), PerkinElmer, Wellesley, MA), 一种基于珠的非放射性发光邻近分析法, 对所有设计的 Fc 变体测量其与

Fc γ RIIIa 和 Fc γ RIIb 的结合亲和力。激光激发供体珠以激发氧,如果供体珠足够接近受体珠,则产生化学发光反应级联,最终导致 520–620nm 处的荧光发射。AlphaScreen™ 分析法作为一种竞争性分析法应用于筛选 Fc 变体。通过标准方法生物素化的野生型阿仑单抗抗体用于附着在链霉抗生物素蛋白供体珠上,带 GST 标签的 Fc γ R 结合在谷胱甘肽螯合的受体珠上。在缺少竞争性 Fc 变体条件下,野生型抗体和 Fc γ R 相互作用并在 520–620nm 处产生信号。不带标签的 Fc 变体的添加与野生型竞争 Fc/Fc γ R 相互作用,减少了荧光数量从而实现相对结合亲和力的测定。对所有 Fc 变体使用 AlphaScreen™ 分析法筛选能结合 V158 Fc γ RIIIa 的变体。所选择的 Fc 变体接着筛选能结合 Fc γ RIIb 的变体,也筛选能结合其它 Fc γ Rs 和 Fc 配体的变体。

[0481] 图 11 显示了所选择的 Fc 变体与人 V158 Fc γ RIIIa 结合的 AlphaScreen™ 数据。结合数据对最大和最小发光信号归一化,该最大和最小发光信号分别提供自低和高浓度竞争性抗体的基线。数据使用非线性回归对单位点竞争模型拟合,这些拟合在该图中通过曲线表现。对于每种抗体这些拟合提供了 50% 抑制浓度 (IC50) (即达到 50% 抑制所需要的浓度),通过图 11 中点线说明,因此使得 Fc 变体的相对结合亲和力能够定量测定。于此,野生型阿仑单抗具有 $(4.63 \times 10^{-9}) \times (2) = 9.2 \text{ nM}$ 的 IC50,而 S239D 具有 $(3.98 \times 10^{-10}) \times (2) = 0.8 \text{ nM}$ 的 IC50。因此 S239D 阿仑单抗较野生型阿仑单抗对人 V158 Fc γ RIIIa 具有 $9.2 \text{ nM} / 0.8 \text{ nM} = 11.64$ 倍的更紧密的结合。对于所有 Fc 变体与人 V158 Fc γ RIIIa 的结合进行类似的计算。也筛选与人 Fc γ RIIb 结合的所选择的 Fc 变体,这些 AlphaScreen™ 结合数据的实例示于图 12 中。表 61 呈现了通过 AlphaScreen™ 分析法所测定的 Fc 变体与人 V158 Fc γ RIIIa (栏 3) 及人 Fc γ RIIb (栏 4) 的结合相对于亲本抗体增加的倍数或减少的倍数。对于这些数据来说,相对于野生型 Fc,倍数大于 1 表示结合亲和力增加,倍数小于 1 表示结合亲和力减少。除标有星号 (*) 的那些外,其在曲妥单抗 (trastuzumab) 中测试,所有数据均获得自在阿仑单抗背景下测试。

[0482] 表 61

变体	取代 (s)	FcγRIIIa 倍数	FcγRIIb 倍数	FcγRIIIa- 倍数: FcγRIIb- 倍数
1	V264A	0.53		
2	V264L	0.56		
3	V264I	1.43		
4	F241W	0.29		
5	F241L	0.26		
6	F243W	0.51		
7	F243L	0.51		
8	F241L/F243L/V262I/V264I	0.09		
9	F241W/F243W	0.07		
10	F241W/F243W/V262A/V264A	0.04		
11	F241L/V262I	0.06		
12	F243L/V264I	1.23		
13	F243L/V262I/V264W	0.02		
14	F241Y/F243Y/V262T/V264T	0.05		
15	F241E/F243R/V262E/V264R	0.05		
16	F241E/F243Q/V262T/V264E	0.07		
17	F241R/F243Q/V262T/V264R	0.02		
18	F241E/F243Y/V262T/V264R	0.05		
19	L328M	0.21		
20	L328E	0.12		
21	L328F	0.24		
22	I332E	6.72	3.93	1.71
[0483] 23	L328M/I332E	2.60		
24	P244H	0.83		
25	P245A	0.25		
26	P247V	0.53		
27	W313F	0.88		
28	P244H/P245A/P247V	0.93		
29	P247G	0.54		
30	V264I/I332E	12.49	1.57*	7.96
31	F241E/F243R/V262E/V264R/I332E	0.19		
32	F241E/F243Q/V262T/V264E/I332E			
33	F241R/F243Q/V262T/V264R/I332E			
34	F241E/F243Y/V262T/V264R/I332E	0.10		
35	S298A	2.21		
36	S298A/I332E	21.73		
37	S298A/E333A/K334A	2.56		
41	S239E/I332E	5.80	3.49	1.66
42	S239Q/I332E	6.60	4.68	1.41
43	S239E	10.16		
44	D265G	<0.02		
45	D265N	<0.02		
46	S239E/D265G	<0.02		
47	S239E/D265N	0.02		
48	S239E/D265Q	0.05		
49	Y296E	0.73	1.11	0.66
50	Y296Q	0.52	0.43	1.21

[0484] 表 61(续)

变体	取代 (s)	FcγRIIIa 倍数	FcγRIIb 倍数	FcγIIIa- 倍数: FcγIIb- 倍数
51	S298T	0.94	<0.02	
52	S298N	0.41	<0.02	
53	T299I	<0.02		
54	A327S	0.23	0.39	0.59
55	A327N	0.19	1.15	0.17
56	S267Q/A327S	0.03		
57	S267L/A327S	<0.02		
58	A327L	0.05		
59	P329F	<0.02		
60	A330L	0.73	0.38	1.92
61	A330Y	1.64	0.75	2.19
62	I332D	17.80	3.34	5.33
63	N297S	<0.02		
64	N297D	<0.02		
65	N297S/I332E	<0.02		
66	N297D/I332E	0.08	<0.02	
67	N297E/I332E	<0.02		
68	D265Y/N297D/I332E	<0.02		
69	D265Y/N297D/T299L/I332E	<0.02		
70	D265F/N297E/I332E	<0.02		
71	L328I/I332E	7.03		
72	L328Q/I332E	1.54		
73	I332N	0.39		
74	I332Q	0.37		
75	V264T	2.73		
76	V264F	0.16		
77	V240I	3.25		
78	V263I	0.10		
79	V266I	1.86		
80	T299A	0.03		
81	T299S	0.15		
82	T299V	<0.02		
83	N325Q	<0.02		
84	N325L	<0.02		
85	N325I	<0.02		
86	S239D	11.64	4.47*	2.60
87	S239N	<0.02		
88	S239F	0.22	<0.02	
89	S239D/I332D	14.10		
90	S239D/I332E	56.10	19.71*	2.85
91	S239D/I332N	7.19		
92	S239D/I332Q	9.28		
93	S239E/I332D	9.33		
94	S239E/I332N	11.93		
95	S239E/I332Q	3.80		
96	S239N/I332D	3.08		
97	S239N/I332E	14.21		
98	S239N/I332N	0.43		

[0485] 表 61 (续)

变体	取代 (s)	FcγRIIIa	FcγRIIb	FcγIIa- 倍数: FcγIIb- 倍数
		倍数	倍数	
99	S239N/I332Q	0.56		
100	S239Q/I332D	5.05		
101	S239Q/I332N	0.39		
102	S239Q/I332Q	0.59		
103	K326E	3.85		
104	Y296D	0.62		
105	Y296N	0.29		
106	F241Y/F243Y/V262T/V264T/N297D/I332E	0.15		
107	A330Y/I332E	12.02	4.40	2.73
108	V264I/A330Y/I332E	12.00	3.54	3.39
109	A330L/I332E	10.34	2.03	5.09
110	V264I/A330L/I332E	11.15	1.79	6.23
111	L234D	0.21		
112	L234E	1.34	2.21	0.61
113	L234N	0.56	1.39	0.40
114	L234Q	0.37		
115	L234T	0.35		
116	L234H	0.33		
117	L234Y	1.42	1.08	1.31
118	L234I	1.55	1.14	1.36
119	L234V	0.38		
120	L234F	0.30		
[0487] 121	L235D	1.66	3.63	0.46
122	L235S	1.25		
123	L235N	0.40		
124	L235Q	0.51		
125	L235T	0.52		
126	L235H	0.41		
127	L235Y	1.19	10.15	0.12
128	L235I	1.10	0.94	1.17
129	L235V	0.48		
130	L235F	0.73	3.53	0.21
131	S239T	1.34		
132	S239H	0.20		
133	S239Y	0.21		
134	V240A	0.70	0.14	5.00
135	V240T			
136	V240M	2.06	1.38	1.49
137	V263A			
138	V263T	0.43		
139	V263M	0.05		
140	V264M	0.26		
141	V264Y	1.02	0.27	3.78
142	V266A	<0.02		
143	V266T	0.45		
144	V266M	0.62		
145	E269H	<0.02		
146	E269Y	0.12		

[0488] 表 61 (续)

变体	取代 (s)	FcγRIIIa 倍数	FcγRIIb 倍数	FcγIIIa- 倍数: FcγIIb- 倍数
147	E269F	0.16		
148	E269R	0.05		
149	Y296S	0.12		
150	Y296T	<0.02		
151	Y296L	0.22		
152	Y296I	0.09		
153	A298H	0.27		
154	T299H	<0.02		
155	A330V	0.43		
156	A330I	1.71	0.02	85.5
157	A330F	0.60		
158	A330R	<0.02		
159	A330H	0.52		
160	N325D	0.41		
161	N325E	<0.02		
162	N325A	0.11		
163	N325T	1.10		
164	N325V	0.48		
165	N325H	0.73		
166	L328D/I332E	1.34		
167	L328E/I332E	0.20		
168	L328N/I332E	<0.02		
169	L328Q/I332E	0.70		
170	L328V/I332E	2.06		
171	L328T/I332E	1.10		
172	L328H/I332E	<0.02		
173	L328I/I332E	3.49		
174	L328A	0.20		
175	I332T	0.72		
176	I332H	0.46		
177	I332Y	0.76		
178	I332A	0.89		
179	S239E/V264I/I332E	15.46		
180	S239Q/V264I/I332E	2.14		
181	S239E/V264I/A330Y/I332E	8.53		
182	S239E/V264I/S298A/A330Y/I332E			
183	S239D/N297D/I332E	0.28		
184	S239E/N297D/I332E	0.06		
185	S239D/D265V/N297D/I332E			
186	S239D/D265I/N297D/I332E			
187	S239D/D265L/N297D/I332E	<0.02		
188	S239D/D265F/N297D/I332E	<0.02		
189	S239D/D265Y/N297D/I332E	0.02		
190	S239D/D265H/N297D/I332E	0.04		
191	S239D/D265T/N297D/I332E	<0.02		
192	V264I/N297D/I332E	0.05		
193	Y296D/N297D/I332E			
194	Y296E/N297D/I332E	<0.02		

[0489] 表 61(续)

变体	取代 (s)	FcγRIIIa 倍数	FcγRIIb 倍数	FcγIIIa- 倍数: FcγIIb- 倍数
195	Y296N/N297D/I332E	0.04		
196	Y296Q/N297D/I332E	<0.02		
197	Y296H/N297D/I332E	<0.02		
198	Y296T/N297D/I332E	<0.02		
199	N297D/T299V/I332E	<0.02		
200	N297D/T299I/I332E	<0.02		
201	N297D/T299L/I332E	<0.02		
202	N297D/T299F/I332E	<0.02		
203	N297D/T299H/I332E	<0.02		
204	N297D/T299E/I332E	<0.02		
[0491] 205	N297D/A330Y/I332E	0.43		
206	N297D/S298A/A330Y/I332E			
207*	S239D/A330Y/I332E	129.58		
208*	S239N/A330Y/I332E	14.22		
209*	S239D/A330L/I332E	138.63	7.50	18.48
210*	S239N/A330L/I332E	12.95		
211*	V264I/S298A/I332E	16.50		
212*	S239D/S298A/I332E	295.16	6.16	47.92
213*	S239N/S298A/I332E	32.14	5.15	6.24
214*	S239D/V264I/I332E	36.58	14.39	2.54
215*	S239D/V264I/S298A/I332E			
216*	S239D/V264I/A330L/I332E			

[0492] 实施例 3 :对 Fc γ Rs 选择性增强的结合

[0493] 许多具有优化特性的有价值 Fc 变体获得自 Fc γ RIIIa 及 Fc γ RIIb 筛选。表 61 提供了对 Fc γ RIIIa 结合更紧密的 Fc 变体,并因此作为候选物用于改良抗体和 Fc 融合体的效应器功能。这些候选物包括了许多变体,所述变体包含了在 239、264、330 和 332 位的取代。图 13 显示了一些候选 Fc 变体的 AlphaScreen™ 结合数据。这些 Fc 变体中大多数提供了基本上较 S298A/E333A/K334 为多的 Fc γ RIIIa 结合增加。

[0494] 尽管大多数 Fc 变体在阿仑单抗背景中筛选,选择的 Fc 变体也可在利妥昔单抗和曲妥单抗背景中筛选。在利妥昔单抗和曲妥单抗背景中,选择的 Fc 变体与人 V158 Fc γ RIIIa 结合的 AlphaScreen™ 数据分别显示于图 14 和 15 中。结果表明 Fc 变体显示了一致的结合增加,与抗体背景无关,因此本发明的 Fc 变体可广泛应用于抗体和 Fc 融合体。

[0495] 已获得 Fc 变体,其显示与 Fc γ RIIIa 结合较与 Fc γ RIIb 不同的增加。如所讨论的,最优的效应器功能由 Fc 变体产生,其中对激活 Fc γ Rs 的亲和力大于对抑制性 Fc γ RIIb 的亲和力。AlphaScreen™ 数据直接比较了与 Fc γ RIIIa 及 Fc γ RIIb 的结合,对于两种 Fc 变体而言,图 16a 和 16b 中显示了特异性曲线图。在本文中称为 Fc γ RIIIa 倍数 :Fc γ RIIb 倍数比率 (Fc γ RIIIa-fold :Fc γ RIIb-fold ratio) 的概念,其在数量上定义为激活的 Fc γ R 的增加的倍数或减少的倍数 (表 61, 栏 3) 除以抑制性 Fc γ R 增加的倍数或减少的倍数 (表 61, 栏 4)。该值提供于表 61 栏 5。表 61 显示了提供该特异性曲线图的 Fc 变体具有高达 86 : 1 的 Fc γ RIIIa 倍数 : Fc γ RIIb 倍数比率。

[0496] 一些用于增强效应器功能的本发明最有前景的 Fc 变体能大幅度增加对 Fc γ RIIIa 的亲和力及有利的 Fc γ RIIIa 倍数 : Fc γ RIIb 倍数比率。这些变体包括,例如, S239D/I332E (Fc γ RIIIa 倍数 = 56, Fc γ RIIIa 倍数 : Fc γ RIIb 倍数 = 3)、S239D/A330Y/I332E (Fc γ RIIIa 倍数 = 130)、S239D/A330L/I332E (Fc γ RIIIa 倍数 = 139, Fc γ RIIIa 倍数 : Fc γ RIIb 倍数 = 18) 以及 S239D/S298A/I332E (Fc γ RIIIa 倍数 = 295, Fc γ RIIIa 倍数 : Fc γ RIIb 倍数 = 48)。图 17 显示了这些变体和其它 Fc 变体与人 V158

Fc γ IIIa 的 AlphaScreen™ 结合数据。

[0497] 因为许多 Fc γ Rs 有助于效应器功能,所以另外筛选抗其它受体的 Fc 变体可值得进行。图 18 显示了选择的 Fc 变体与人 R131 Fc γ RIIa 结合的 AlphaScreen™ 数据。可以看到,那些具有有利的结合增强作用和特征曲线的前述变体也显示了与该激活受体增强的结合。使用 Fc γ RIIIa、Fc γ RIIb 和 Fc γ IIc 并不意在将实验测试限制为这些特定的 Fc γ Rs; 预计可用于筛选的其它 Fc γ Rs,包括但不限于如前所述的来自人、小鼠、大鼠、猴子等的 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII 的无数同种型和同种异型。

[0498] 总的来说,对于改良抗体和 Fc 融合体的效应器功能而言,图 11-18 和表 61 所提供的 Fc γ R 结合数据表明了位置 234、235、239、240、243、264、266、325、328、330 和 332 上的许多取代是有价值的候选物。因为其中一些取代物的组合通常能导致叠加的或协同的结合改良,应当预计到,迄今为止未探查过的表 61 中的 Fc 变体的组合也能提供有利的结果。因此表 61 中所有的 Fc 变体的组合应当考虑。同样地,表 61 中任一 Fc 变体与其它公开的或未公开的 Fc 变体的组合也能提供有利特性,且这些组合也应当考虑。此外,从这些结果中应当预计到,在位置 234、235、239、240、243、264、266、325、328、330 和 332 上的其它取代也可提供有利的结合增强作用和特征,因此在这些位置上不同于那些列于表 61 中的取代应当考虑。

[0499] 实施例 4 :对 Fc γ Rs 减少的结合

[0500] 如所讨论的,尽管需要更强的效应器功能,但是对于某些抗体治疗剂,所需的是减少或消除效应器功能。表 61 中的几个 Fc 变体基本上减少或消除了与 Fc γ R 的结合,因此可供其中不需要效应器功能的抗体和 Fc 融合体使用。上述变体的某些实例的 AlphaScreen™ 结合数据显示于图 19a 和 19b 中。这些 Fc 变体以及它们在组合中的使用,可供在所需时用于消除效应器功能,例如在作用机理涉及抑制或拮抗而不是杀死携带靶抗原的细胞的抗体和 Fc 融合体中。

[0501] 实施例 5 :非糖基化 Fc 变体

[0502] 如所讨论的,当前实验的一个目的是为获得优化的非糖基化 Fc 变体。对于该目的而言,一些 Fc 变体提供了朝这一目标的显著的进展。因为是在糖基化位点 N297 取代产生了非糖基化的 Fc。尽管所有其它包含 N297 取代的 Fc 变体完全消除了与 Fc γ R 的结合,但 N297D/I332E 对 Fc γ RIIIa 仍具有显著的结合亲和力,显示于表 61 并阐明于图 20 中。由于缺少该变体的高分辨率结构,因此该结果的确切原因尚不明了,尽管计算筛选预测暗示其可能是由于新的有利的 Fc/Fc γ R 相互作用与有利的静电特性的组合。实际上,其它静电学取代可预想用于非糖基化 Fc 的进一步优化。表 61 显示了其它非糖基化 Fc 变体,例如提供了结合增强作用的 S239D/N297D/I332E 和 N297D/A330Y/I332E,其对 Fc γ RIIIa 的亲和力分别为糖基化野生型阿仑单抗的 0.28 倍和 0.43 倍。应当考虑这些变体与能增强与 Fc γ R 结合的其它 Fc 变体的组合,该组合目的在于获得能结合一种或多种 Fc γ Rs 的非糖基化 Fc 变体,该变体所具有亲和力大约相当于或甚至更好于糖基化的亲本 Fc。在缺少糖的条件下,额外一组有价值的 Fc 变体提供了增强的稳定性和溶解性。包含在位置 241、243、262 和 264 取代的 Fc 变体消除了与 Fc γ R 的结合,所述位置并不介导与 Fc γ R 的结合但决定糖和 Fc 之间的界面,推测是由于它们干扰了糖的构象。但是,在去糖基化型中,Fc 变体 F241E/F243R/V262E/V264R、F241E/F243Q/V262T/V264E、F241R/F243Q/V262T/V264R 和 F241E/F243Y/

V262T/V264R 较糖基化型显示了与 Fc γ RIIIa 的较强结合,通过图 21 中的 AlphaScreen™ 数据显示了该结果。该结果表明对于非糖基化 Fc 的结构、稳定性、溶解性及功能而言,这些位置是关键位置。这些结果共同暗示了蛋白质工程可用于在无糖的情况下恢复抗体和 Fc 融合体的有利功能和溶解特性,并为产生具有有利溶解特性和完整功能的包含在这些和其它 Fc 位置取代的非糖基化抗体和 Fc 融合体开辟了一条途径。

[0503] 实施例 6 :Fc 变体对 Fc γ RIIIa 多态型的亲和力

[0504] 如上所讨论,Fc 介导的效应器功能的一个重要参数是 Fc 对 Fc γ RIIIa 的 V158 和 F158 多态型的亲和力。AlphaScreen™ 数据比较了选择的变体对两种同种异型受体的结合,结果显示于图 22a(V158 Fc γ RIIIa) 和图 22b(F158 Fc γ RIIIa) 中。可以看到,所有变体都改良了与两种 Fc γ RIIIa 同种异型的结合。这些数据表明本发明那些具有增强效应器功能的 Fc 变体可广泛地应用于全部患者群体中,对于最需要其的低应答患者群体而言,临床疗效可潜在地最大增强。

[0505] 使用表面胞质共振技术 (SPR) (Biacore, Uppsala, Sweden) 进一步研究这些 Fc 变体的 Fc γ R 结合亲和力。SPR 是一种非常灵敏的定量方法,可用于蛋白质-蛋白质相互作用结合亲和力的测量,并已有效地用于测量 Fc/Fc γ R 的结合 (Radaev 等,2001, J Biol Chem 276:16478-16483)。因此对 AlphaScreen™ 分析法而言,SPR 提供了一种极好的互补结合分析法。带有 His 标签的 V158 Fc γ RIIIa 固定在 SPR 芯片上,接着一定浓度范围的野生型和 Fc 变体阿仑单抗抗体流过该芯片。使用标准曲线拟合方法拟合数据获得结合常数。表 62 呈现了使用 SPR 获得的所淘选的 Fc 变体与 V158 Fc γ RIIIa 及 F158 Fc γ RIIIa 结合的解离常数 (Kd),接着与获得自 AlphaScreen™ 分析法的 IC50 比较。用每个变体的 Kd 和 IC50 除野生型阿仑单抗的 Kd 和 IC50,获得较野生型 (倍数) 提高的倍数。

[0506] 表 62

[0507]

	SPR V158 Fc γ RIIIa Kd (nM) 倍数		SPR F158 Fc γ RIIIa Kd (nM) 倍数		AlphaScreen™ V158 Fc γ RIIIa IC50 (nM) 倍数		AlphaScreen™ F158 Fc γ RIIIa IC50 (nM) 倍数	
野生型	68		730		6.4		17.2	
V264I	64	1.1	550	1.3	4.5	1.4	11.5	1.5
I332E	31	2.2	72	10.1	1.0	6.4	2.5	6.9
V264I/I332E	17	4.0	52	14.0	0.5	12.8	1.1	15.6
S298A	52	1.3	285	2.6	2.9	2.2	12.0	1.4
S298A/E333A/ K334A	39	1.7	156	4.7	2.5	2.6	7.5	2.3

[0508] SPR 数据确证了通过 AlphaScreen™ 分析法所观察到的对 Fc γ RIIIa 亲和力的提高。S298A/E333A/K334A 分别提高了 1.7 倍和 4.7 倍的 Fc 与 V158 及 F158 Fc γ RIIIa 的结合, I332E 显示了上述结合分别增加了 2.2 倍和 10.1 倍,以及 V264I/I332E 显示了上述结合分别增加了 4.0 倍和 14 倍;因此表 62 进一步描述了 V264I/I332E 和 I332E 较 S298A 及 S298A/E333A/K334A 的优越性。也值得注意的是 V264I/I332E 对 F158 Fc γ RIIIa 的亲和力 (52nM) 优于野生型对 V158 同种异型的亲合力 (68nM),暗示该 Fc 变体以及那些对结合甚至具有更多提高的变体,可使抗体对低应答患者群体的临床疗效能够达到当前高应答者所可能的水平。SPR 和 AlphaScreen™ 结合测量法之间的相关性显示于图 23a-23d 中。对

于与 V158 Fc γ RIIIa 及 F158 Fc γ RIIIa 结合而言,图 23a 和 23b 分别显示了 Kd-IC50 相关性,图 23c 和 23d 分别显示了对于给合 V158 Fc γ RIIIa 和 F158 Fc γ RIIIa 的改良倍数 (fold-improvement) 的相关性。这些数据令人满意地拟合为直线 ($r^2 = 0.9$, $r^2 = 0.84$, $r^2 = 0.98$ 以及 $r^2 = 0.90$) 证明了 AlphaScreen™ 测量法的精确性,并确认其能用于测定 Fc 变体的相对 Fc γ R 结合亲和力。

[0509] 实施例 7. Fc 变体的 ADCC

[0510] 为了测定对效应器功能的影响,对选择的 Fc 变体进行基于细胞的 ADCC 分析法。使用 DELFIA® 基于 EuTDA 的细胞毒性分析法 (Perkin Elmer, MA) 测量 ADCC,纯化的人外周血单个核细胞 (PBMCs) 作为效应细胞。在密度为 1×10^6 细胞 / 毫升的靶细胞中加入 BATDA,洗涤 4 次并接种入 96 孔培养板,密度为 10,000 细胞 / 毫升。接着使用 Fc 变体或野生型抗体在指示的终浓度下调理靶细胞。人 PBMCs 以所指示的靶细胞过量倍数添加,并在 37℃ 温育培养板 4 小时。共培养的细胞在 500xg 离心,上清液转移至单独的培养板上并与 Eu 溶液温育,使用 Packard Fusion 阅读仪 (Packard Biosciences, IL) 测量相对荧光单位。样品以平行三份测量以提供误差估计 ($n = 3$, +/-S.D.)。对于 V158 或 F158 Fc γ RIIIa 同种异型而言,使用 PCR 证实 PBMCs 是同种异型的。

[0511] 使用 DoHH-2 淋巴瘤靶细胞对 Fc 变体及野生型阿仑单抗进行 ADCC 分析法。图 24a 是条形图,显示了在 10ng/ml 抗体浓度这些蛋白质的 ADCC。结果显示了与野生型阿仑单抗相比,阿仑单抗 Fc 变体 I332E, V264I 和 I332E/V264I 具有实质上增强的 ADCC,ADCC 的增强与它们同 Fc γ RIIIa 的结合的改善成正比,所述的结合增强如 AlphaScreen™ 分析法和 SPR 所描述的。ADCC 对抗体浓度的剂量依赖显示于图 24b 中。这些数据对最大和最小发光信号归一化,该最大和最小发光信号分别提供自低和高浓度抗体的基线。数据使用非线性回归对 S 形剂量 - 反应模型拟合,在图中表示为曲线。该拟合使半数有效浓度 (EC50) (即 50% 有效需要的浓度) 能够测定,提供了每种 Fc 变体的 ADCC 相对增加量。对于这些结合数据而言,EC50s 类似于获得自 AlphaScreen™ 竞争数据的 IC50,因此由这些数值所引出的结果类似于实施例 2 和图 11 中所述的。在图 24b 中,log (EC50) s,获得自对数据的拟合,对于野生型、V264I/I332E 以及 S239D/I332E 阿仑单抗而言,分别为 0.99、0.60 和 0.49,因此它们各自的 EC50s 为 9.9、4.0 和 3.0。因此,通过使用表达杂合的 V158/F158 Fc γ RIIIa 的 PBMCs, V264I/I332E 和 S239E/I332E 较野生型阿仑单抗分别提供了 2.5 倍和 3.3 倍的 ADCC 增加。这些数据总结于下表 63 中。

[0512] 表 63

[0513]

	log (EC50)	EC50 (ng/ml)	较野生型改良的倍数
野生型	0.99	9.9	
V264I/I332E	0.60	4.0	2.5
S239D/I332E	0.49	3.0	3.3

[0514] 为了确定这些 ADCC 增强作用是否能广泛地应用于抗体中,在利妥昔单抗和曲妥

单抗背景中评估选择的 Fc 变体。使用 WIL2-S 淋巴瘤靶细胞对利妥昔单抗的 V264I/I332E、野生型以及 S298A/D333A/K334A 进行 ADCC 分析。图 25a 所呈现的条形图显示了在 1ng/ml 抗体浓度这些蛋白质的 ADCC。结果表明相对于野生型利妥昔单抗，V264I/I332E 利妥昔单抗提供了实质上增强的 ADCC，也高于 S298A/D333A/K334A 的 ADCC，与 AlphaScreen™ 分析法和 SPR 所观察到的对 Fc γ RIIIa 结合的改善结果一致。图 25b 显示了 ADCC 对抗体浓度的剂量依赖。获得自这些数据拟合结果的 EC50s 以及相对的 ADCC 倍数提高提供于下表 64 中。可以看到，对于表达纯合的 F158/F158 Fc γ RIIIa 的 PBMCs 而言，V264I/I332E 利妥昔单抗较野生型 EC50 值增加了 11.3 倍。所观察到的利妥昔单抗相对于阿仑单抗更多的增加很可能是由于使用纯合的 F158/F158 Fc γ RIIIa，而不是使用杂合的 V158/F158 Fc γ RIIIa 的 PBMCs 的缘故，也可能是由于使用不同的抗体和靶细胞系。

[0515] 表 64

[0516]

	log (EC50)	EC50 (ng/ml)	较野生型改良的倍数
野生型	0.23	1.7	
S298A/E333A/K334A	-0.44	0.37	4.6
V264I/I332E	-0.83	0.15	11.3

[0517] 使用两种乳腺癌靶细胞系 BT474 和 Sk-Br-3 对曲妥单抗 Fc 变体和野生型进行 ADCC 分析。图 26a 显示的条形图说明了在 1ng/ml 抗体浓度的 ADCC。结果表明与野生型曲妥单抗比较，V264I 和 V264I/I332E 曲妥单抗提供了实质上增加的 ADCC，ADCC 的增加与它们同 Fc γ RIIIa 的结合的改善成正比，所述结合的改善如 AlphaScreen™ 分析法和 SPR 所描述的。图 26b 显示了 ADCC 对抗体浓度的剂量依赖。获得自这些数据拟合结果的 EC50s 和相对的 ADCC 倍数提高提供于下表 65 中。对 I332E 曲妥单抗而言，当与 A330L 及 A330Y 组合时，观察到 ADCC 显著提高。

[0518] 表 65

[0519]

	log (EC50)	EC50 (ng/ml)	较野生型改良的倍数
野生型	1.1	11.5	
I332E	0.34	2.2	5.2
A330Y/I332E	-0.04	0.9	12.8
A330L/I332E	0.04	1.1	10.5

[0520] 对于曲妥单抗变体而言，图 26c 显示了在不同抗体浓度下另外一组剂量应答 ADCC

数据。获得自这些数据拟合结果的 EC50s 以及相对的 ADCC 倍数提高提供于下表 66 中。结果显示相对于野生型曲妥单抗及 S298A/E333A/K334A, 曲妥单抗 Fc 变体 S239D/I332E、S239D/S298A/I332E、S239D/A330Y/I332E 以及 S239D/A330L/I332E/ 提供了实质上增加的 ADCC, 与 AlphaScreen™ 分析法和 SPR 所观察到的对 FcγR 结合的数据结果一致。在迄今为止所观察到的效应器功能中, S239D/A330L/I332E 曲妥单抗显示了最大增加, 对于表达纯合的 F158/F158 Fc γ RIIIa 的 PBMCs 而言, 其提供了较野生型在 EC50 方面大约 50 倍的增强。

[0521] 表 66

[0522]

	log (EC50)	EC50 (ng/ml)	较野生型改良的倍数
野生型	0.45	2.83	
S298A/E333A/K334A	-0.17	0.67	4.2
S239D/I332E	-0.18	0.66	4.3
S239D/A330Y/I332E	-0.29	0.51	5.5
S239D/S298A/I332E	-0.52	0.30	9.4
S239D/A330L/I332E	-1.22	0.06	47.2

[0523] 实施例 8. 通过 Fc 变体结合并激活补体

[0524] 补体蛋白 C1q 结合 Fc 上的位点, 即邻近 Fc γ R 结合位点的位点, 因此需要谨慎地确定 Fc 变体是否能保持其招募并激活补体的能力。AlphaScreen™ 分析法用于测量选择的 Fc 变体与补体蛋白 C1q 的结合。使用如实施例 2 所描述的附着在链霉抗生物素蛋白供体珠上的生物素化野生型阿仑单抗抗体以及直接偶联在受体珠上的 C1q 进行该分析。选择的 Fc 变体的结合数据显示于图 27a 中, 表明与 C1q 的结合未受损害。也对选择的 Fc 变体执行基于细胞的 CDC 分析法以调查 Fc 变体是否保持激活补体的能力。Amar 蓝用于监测 Fc 变体和野生型利妥昔单抗调理的 WIL2-S 淋巴瘤细胞通过人血清补体 (Quidel, San Diego, CA) 的溶解。结果显示于图 27b 中, 对于所选择的 Fc 变体而言, 表明 CDC 未受损害。

[0525] 实施例 9. Fc 变体的蛋白 A 结合

[0526] 如所讨论的, 细菌蛋白 A 结合位于 C γ 2 和 C γ 3 结构域之间的 Fc 区, 因此通常用作抗体纯化。AlphaScreen™ 分析法用于测量选择的 Fc 变体与蛋白 A 的结合, 使用如实施例 2 所描述的附着在链霉抗生物素蛋白供体珠上的生物素化野生型阿仑单抗抗体以及直接偶联在受体珠上的蛋白 A 进行该分析。所选择的 Fc 变体的结合数据显示于图 28 中, 表明 Fc 变体结合蛋白 A 的能力未受损害。这些结果暗示 Fc 变体对于结合相同于蛋白 A 的 Fc 位点的其它 Fc 配体的亲和力也未受影响, 所述其它 Fc 配体例如新生 Fc 受体 FcRn 和蛋白 G。

[0527] 实施例 10. Fc 变体结合小鼠 Fc γ Rs 的能力

[0528] Fc 对非人 Fc γ Rs 的优化可用于在动物模型中实验测试 Fc 变体。例如, 当在小鼠

(例如裸鼠、SCID 小鼠、异种移植小鼠和 / 或转基因小鼠) 中测试时, 包含 Fc 变体的抗体和 Fc 融合体可对一种或多种小鼠 Fc γ Rs 优化, 可提供关于效力、作用机理等的有价值信息。为了评估是否本发明的 Fc 变体可用于上述实验中, 使用 AlphaScreen™ 分析法测量所挑选的 Fc 变体对于小鼠 Fc γ RIII 的亲合力。使用如实施例 2 所描述的附着在链霉抗生物素蛋白供体珠上的生物素化野生型阿仑单抗抗体以及如实施例 2 所述的结合到谷胱甘肽螯合的受体珠的带有 GST 标签的小鼠 Fc γ RIII 进行 AlphaScreen™ 分析, 表达和纯化如实施例 2 所述。这些结合数据显示于图 29 中。结果显示了某些能增强与人 Fc γ RIIIa 结合的 Fc 变体也能增强与小鼠 Fc γ RIII 的结合。该结果表明本发明的 Fc 变体, 或对非人 Fc γ Rs 优化的其它 Fc 变体, 可在动物模型的实验中使用。

[0529] 实施例 11. Fc 变体在 CHO 细胞中表达的确认

[0530] 尽管在 293T 细胞中表达用于筛选目的本发明的 Fc 变体, 但是抗体的大规模生产通常是通过在中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系中表达来进行。为了评估 CHO 表达的 Fc 变体的特性, 如实施例 2 所述在 CHO 中表达并纯化所选择的 Fc 变体和野生型阿仑单抗。图 30 显示了比较 CHO 和 293T 表达的 Fc 变体及野生型阿仑单抗与人 V158Fc γ RIIIa 结合的 AlphaScreen™ 数据。该结果表明无论在 293T 或 CHO 中表达, 本发明的 Fc 变体显示了相当的 Fc γ R 结合增强。

[0531] 实施例 12. Fc 变体的治疗应用

[0532] 许多描述于本发明中的 Fc 变体具有用于改善抗癌抗体疗效的明显效力。对于例证目的而言, 许多本发明的 Fc 变体可掺入利妥昔单抗的序列中。描述于 US 5, 736, 137 的野生型利妥昔单抗的轻链和重链, 提供于图 31a 和 32b 中。改良的抗 -CD20 抗体序列提供于图 31c 中。所述改良的抗 -CD20 抗体序列包含至少选自下组的非野生型氨基酸: X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 和 X_6 。这些改良的抗 -CD20 抗体序列也包含 Z_1 取代。于此使用的利妥昔单抗仅作为实例, 并不意在将 Fc 变体的应用限制于该抗体或任何其它特定的抗体或 Fc 融合体。

[0533] 本文中所有的参考文献明确地引入作为参考。

[0534] 尽管如上已描述了用于例证目的的本发明的特定实施方案, 本领域技术人员应当理解可得到细节的无数变化而不背离如所附权利要求所描述的本发明。

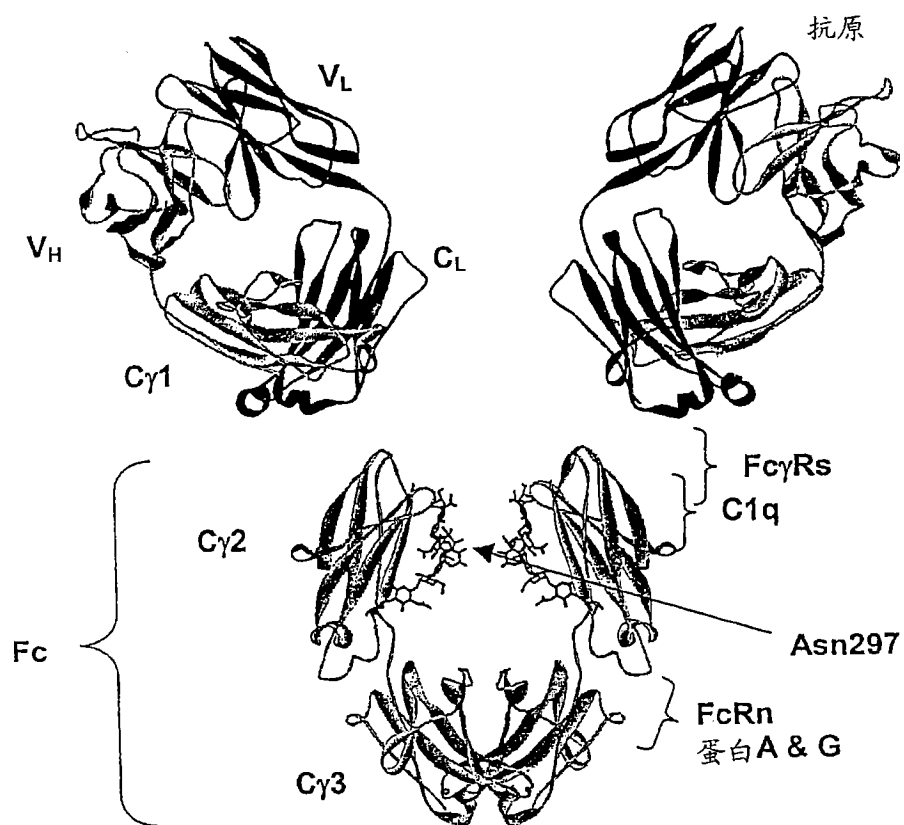


图 1

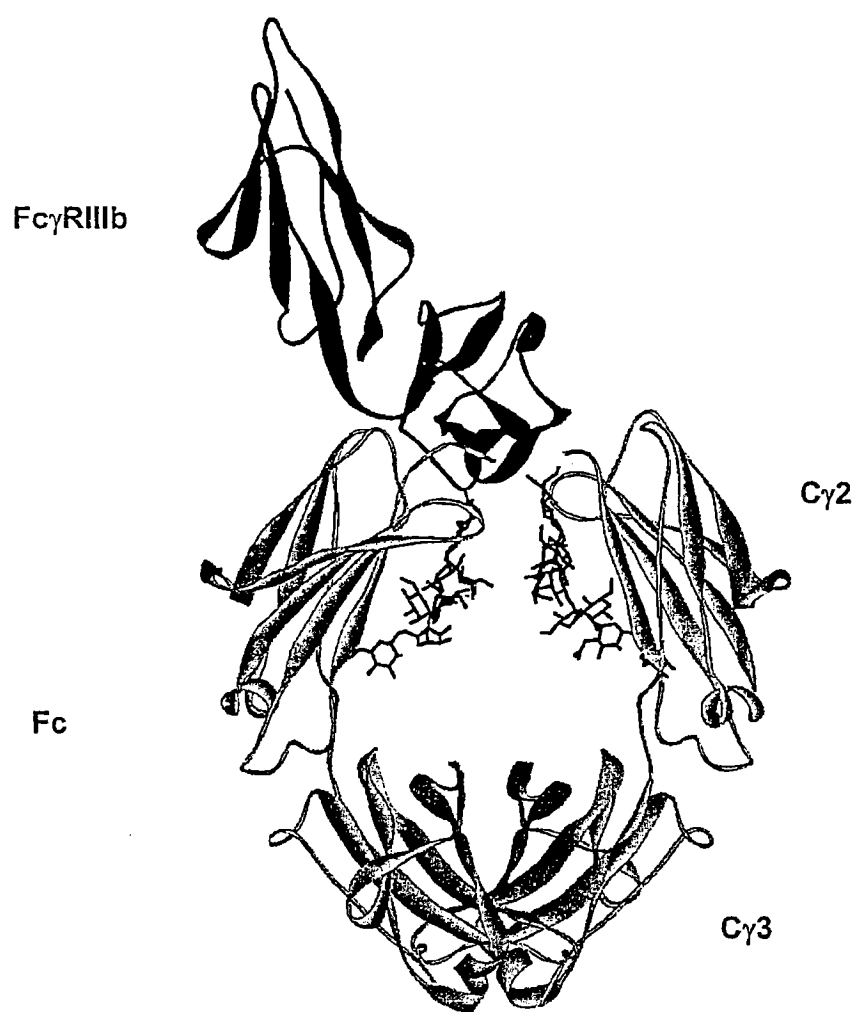


图 2

VH1->

1	10	20	30	40	50	60
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890						
QVQLQESGPGLV RPSQ T L S L T C T V S G F T F T D F Y M N W V R Q P P G R G L E W I G F I R D K A K G Y T T						

70	80	90	100	110	120
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890					
E Y N P S V K G R V T M L V D T S K N Q F S L R L S S V T A A D T A V Y Y C A R E G H T A A P F D Y W G Q G S L V T V S					

Cy1->

130	140	150	160	170	180
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890					
S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S					

HINGE->

190	200	210	220	230	240
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890					
S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G					

	1234567890123456
KABAT	22 23

Cy2->

250	260	270	280	290	300
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890					
G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y					

789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456
240 250 260 270 280 290

?Cy3?->

310	320	330	340	350	360
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890					
N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D					

789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456
300 310 320 330 340 350

370	380	390	400	410	420
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890					
E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R					

789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456
360 370 380 390 400 410

430	440	450
1234567890123456789012345678901		
W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K		

7890123456789012345678901234567
420 430 440

图 3

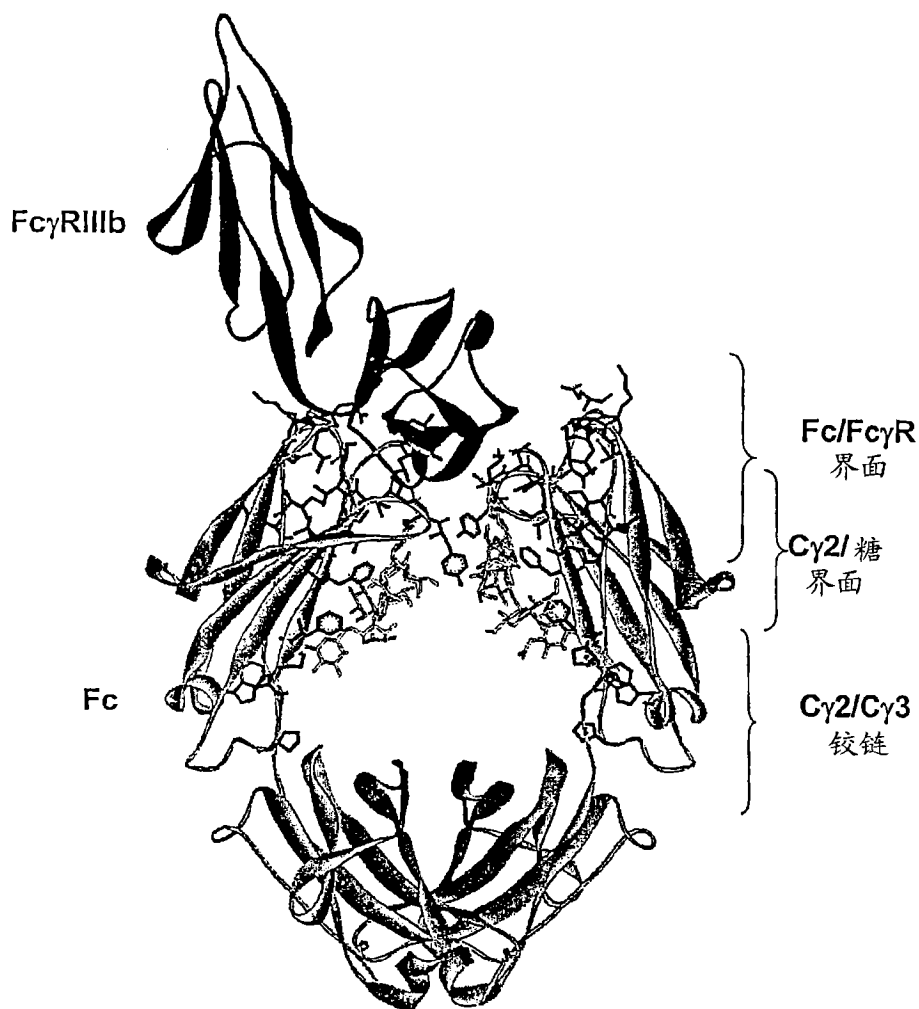


图 4

```

22      23      24      25      26      27      28
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD

29      30      31      32      33      34
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

35      36      37      38      39      40
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDS

41      42      43      44
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

```

图 5

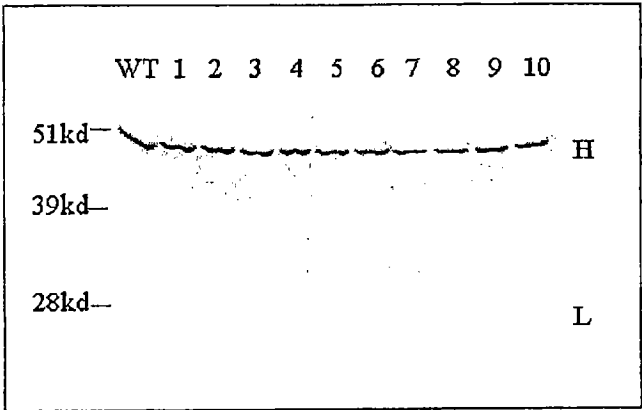


图 6

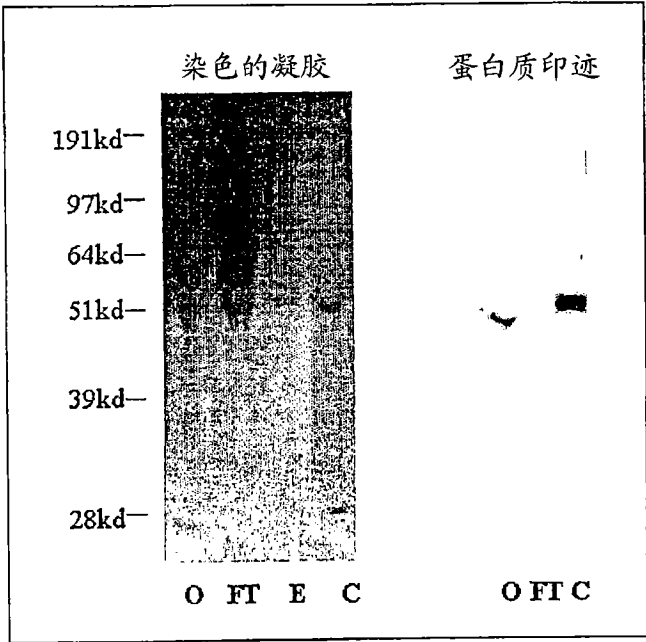


图 7

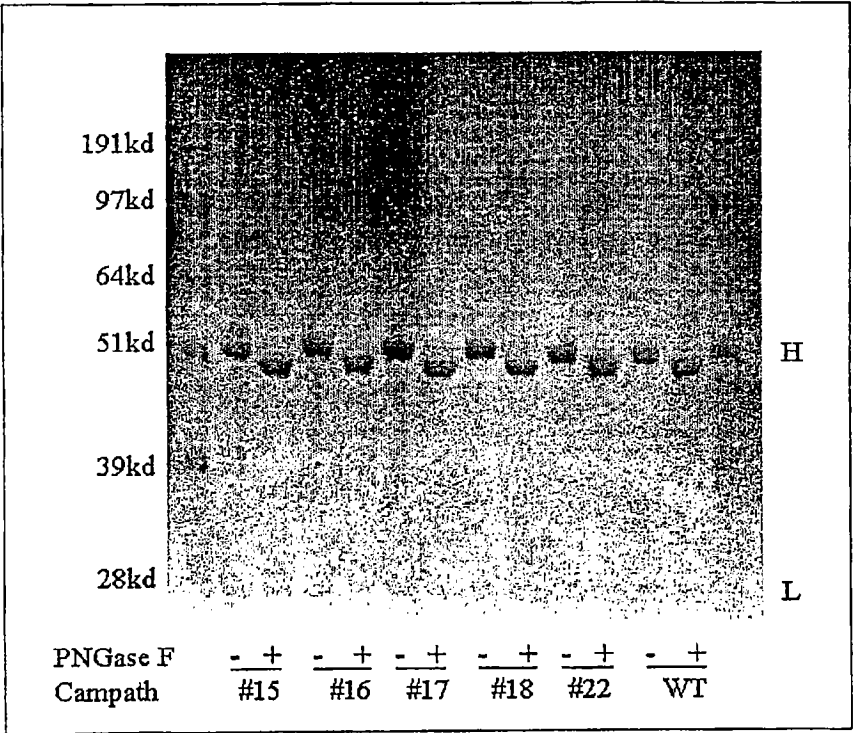


图 8

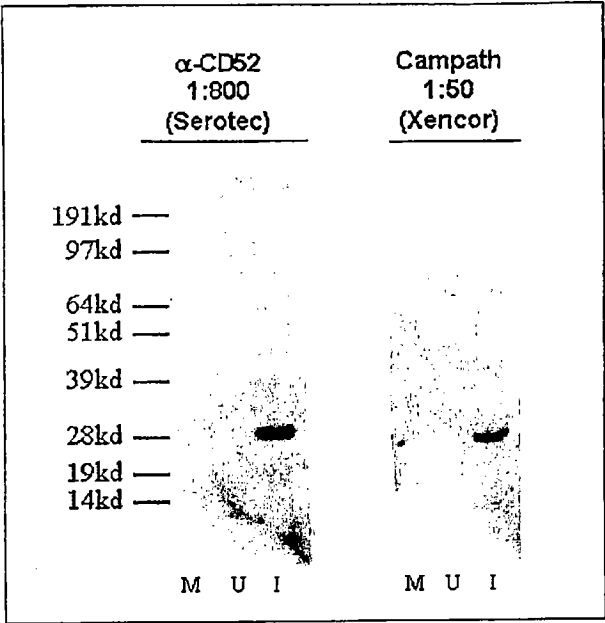


图 9

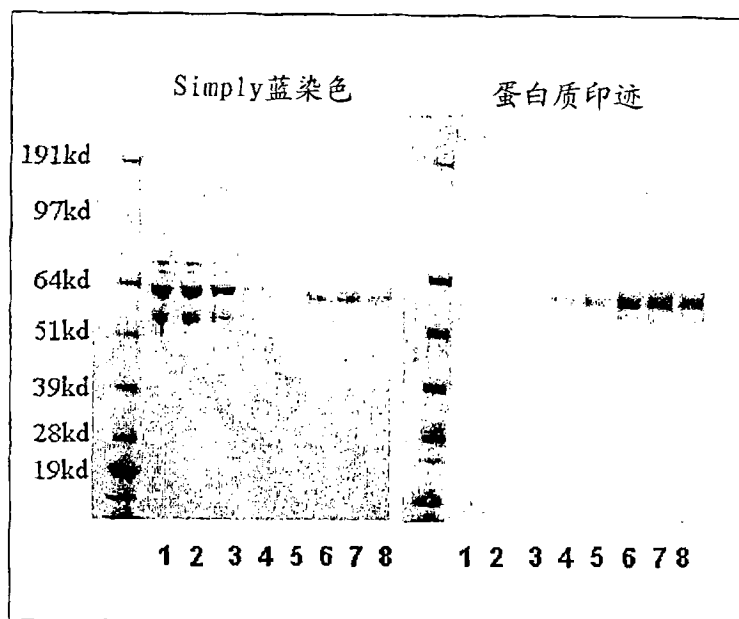


图 10

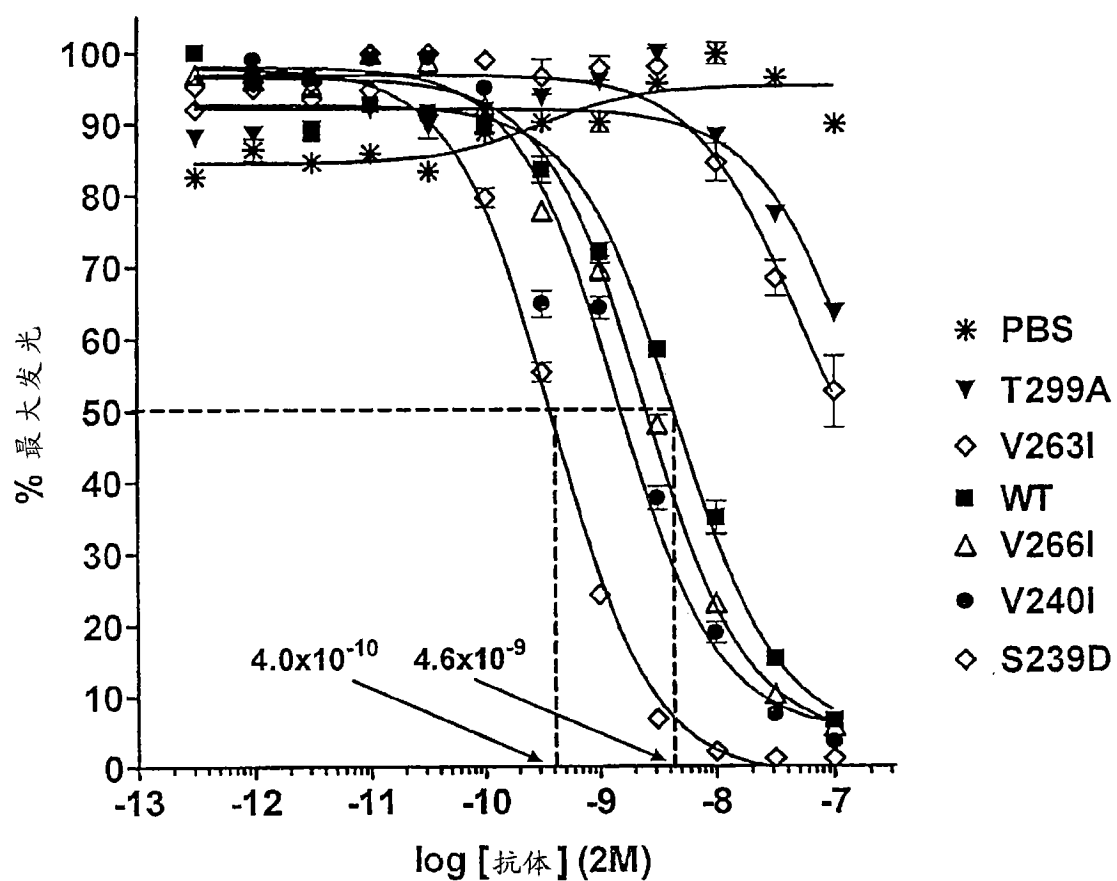


图 11

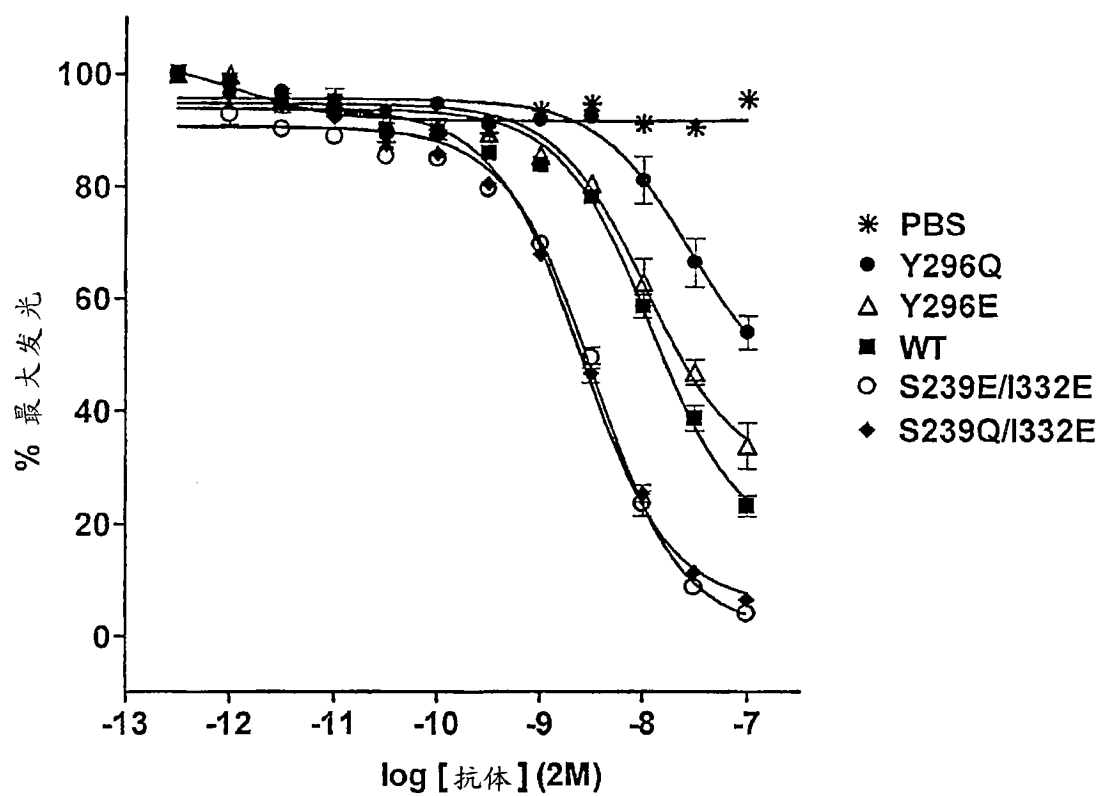


图 12

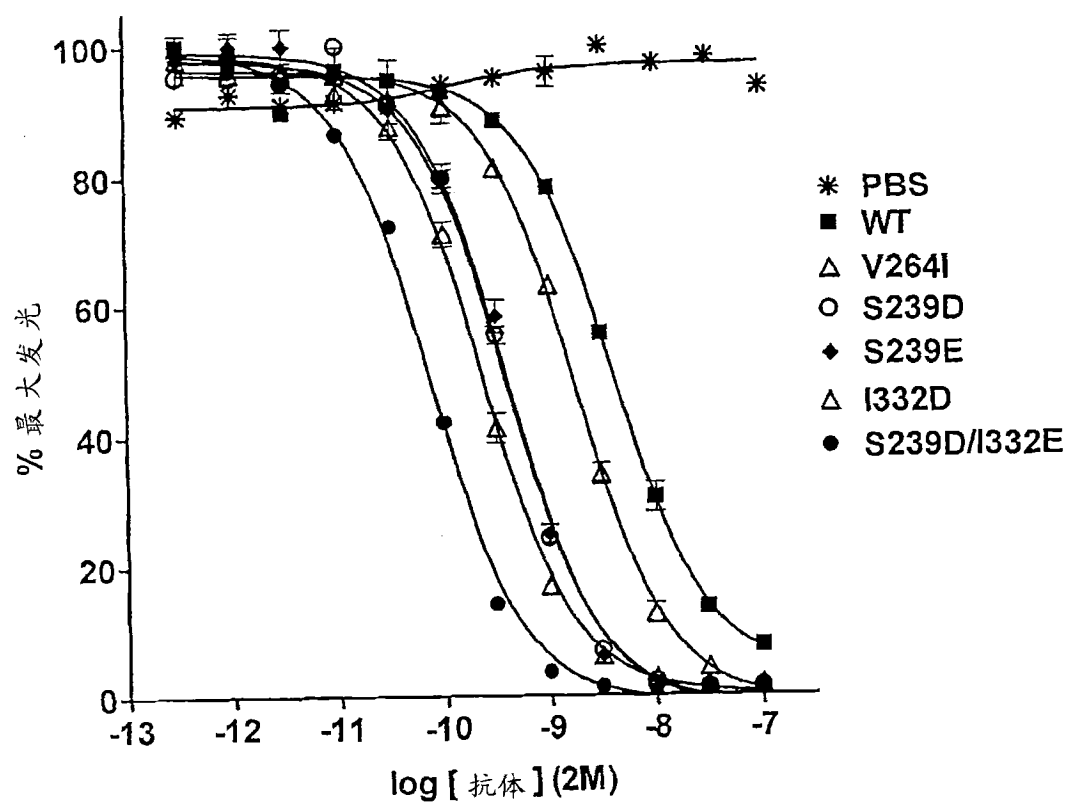


图 13

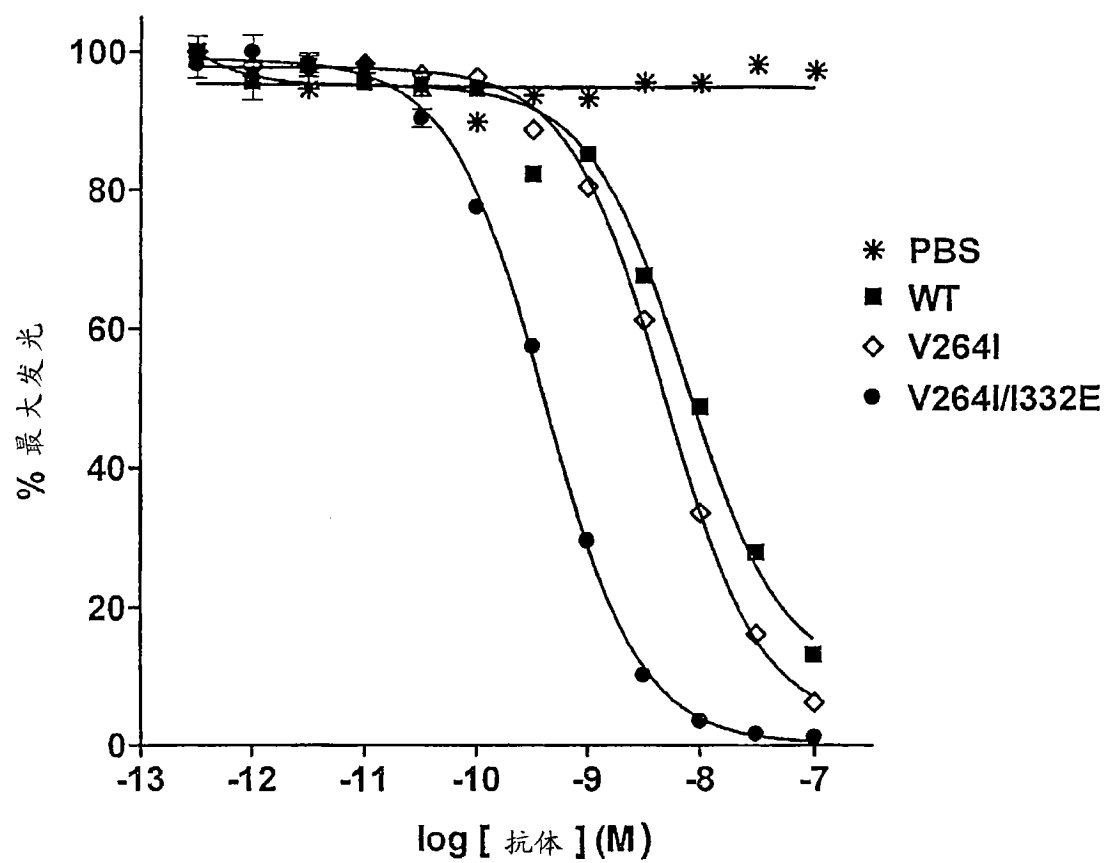


图 14

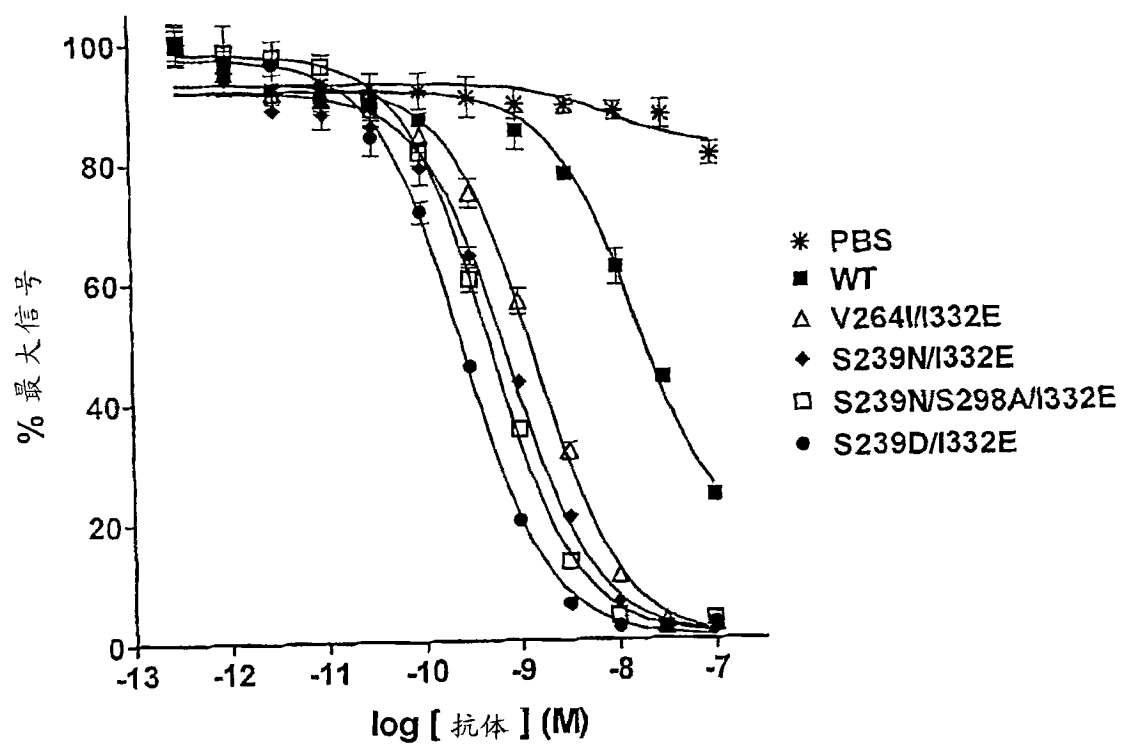


图 15

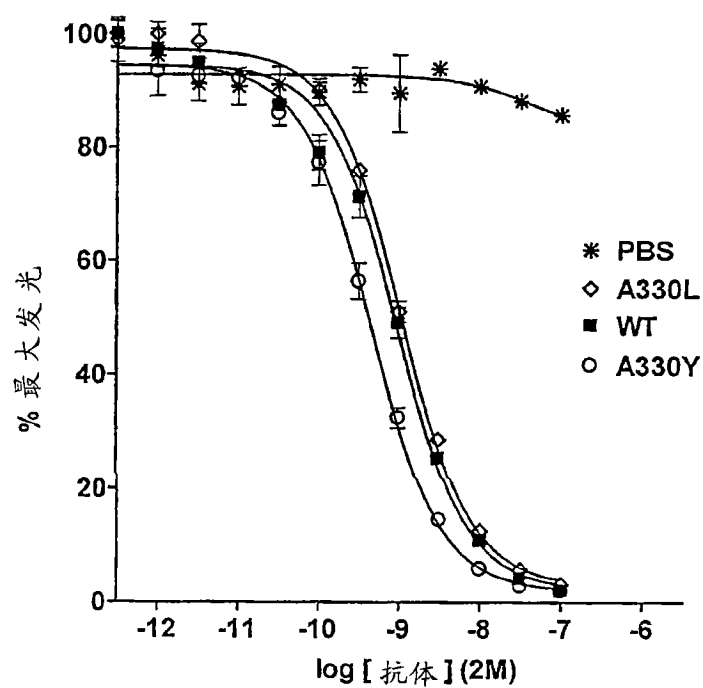


图 16a

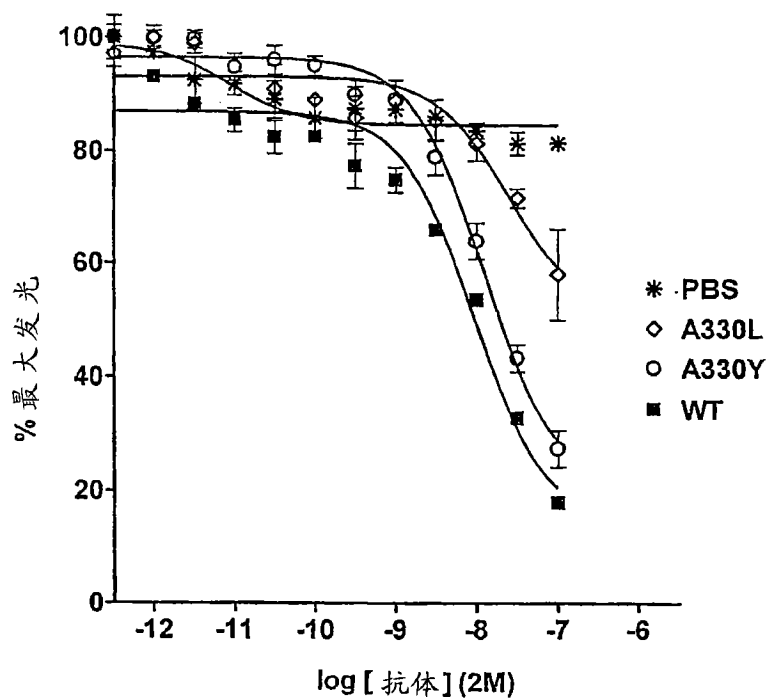


图 16b

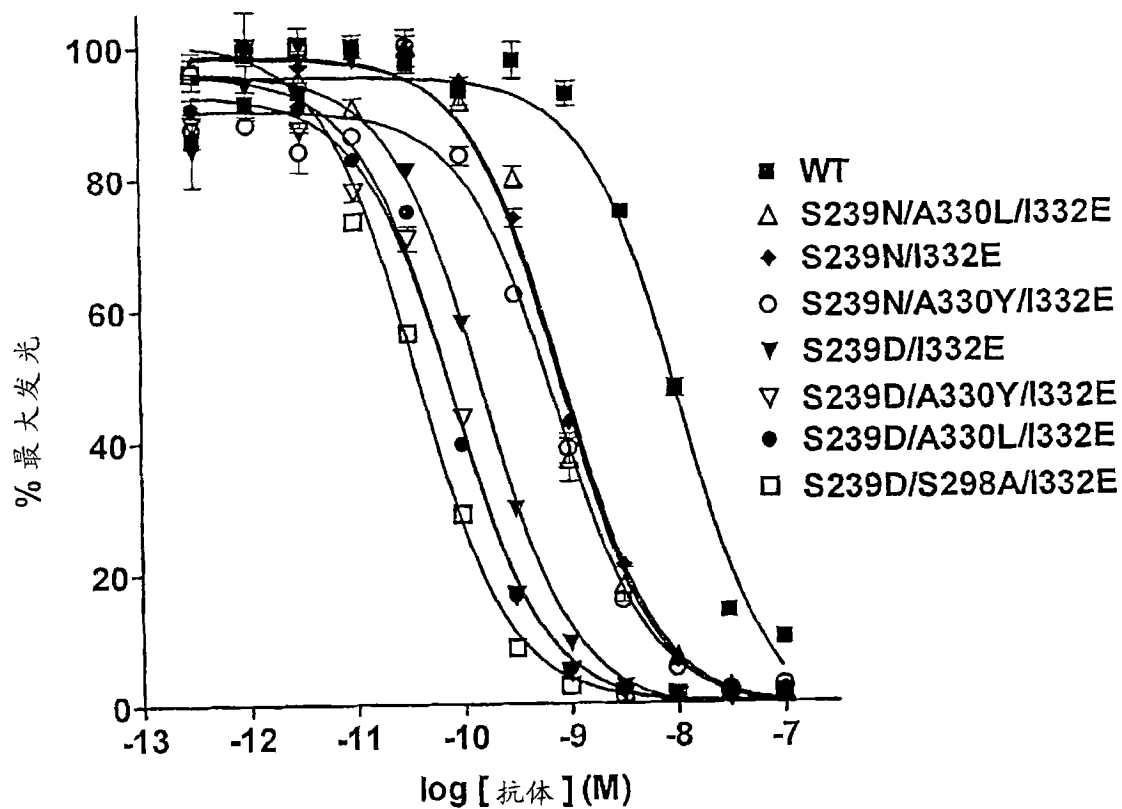


图 17

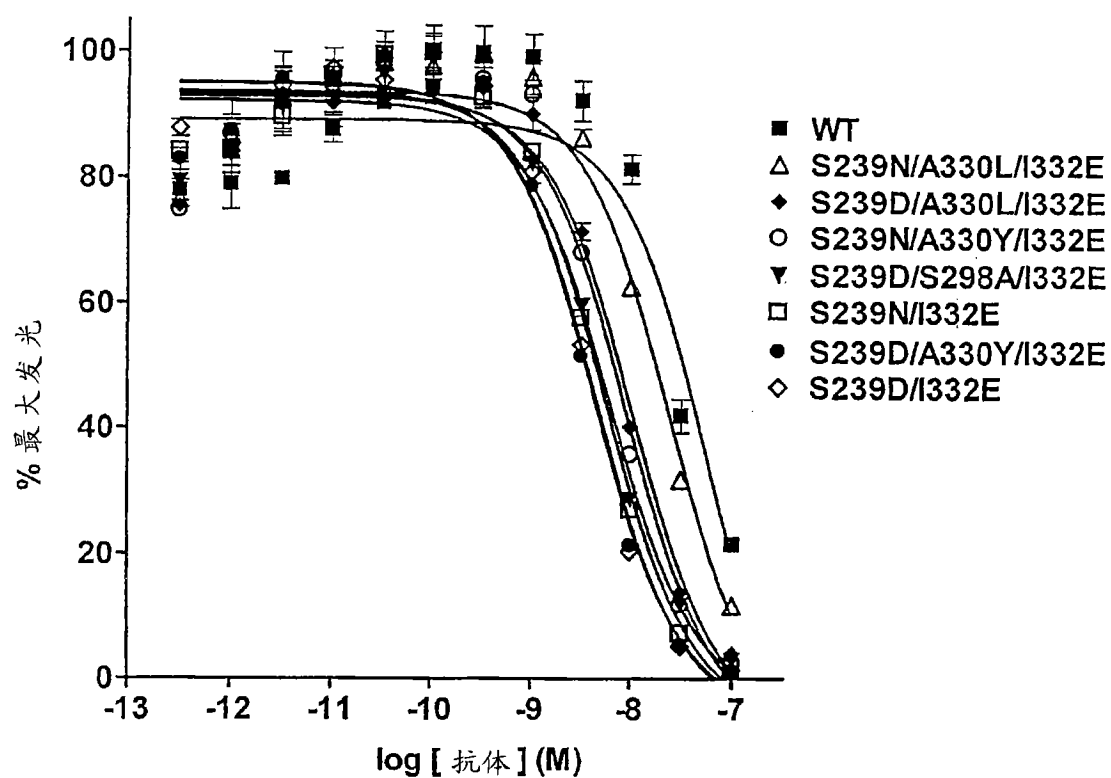


图 18

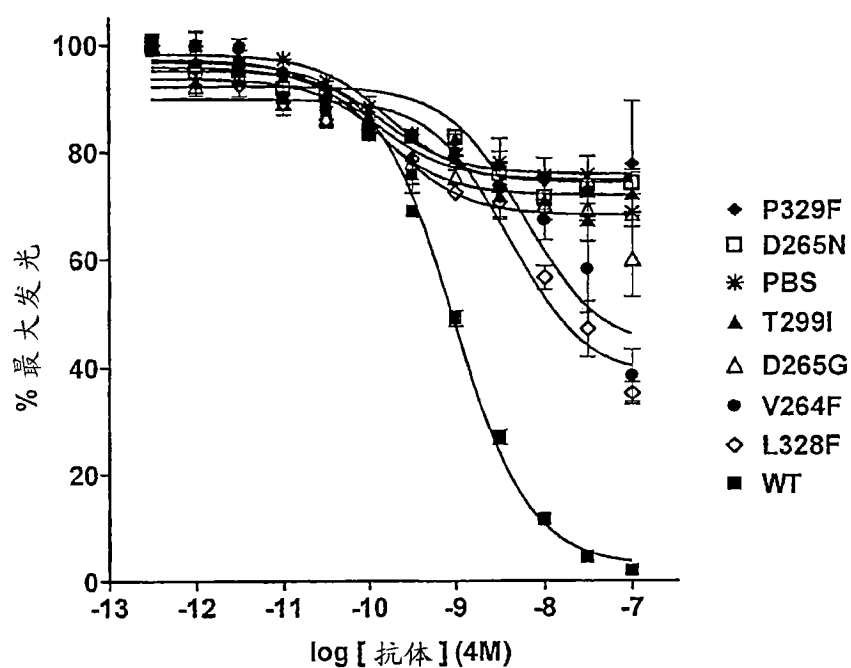


图 19a

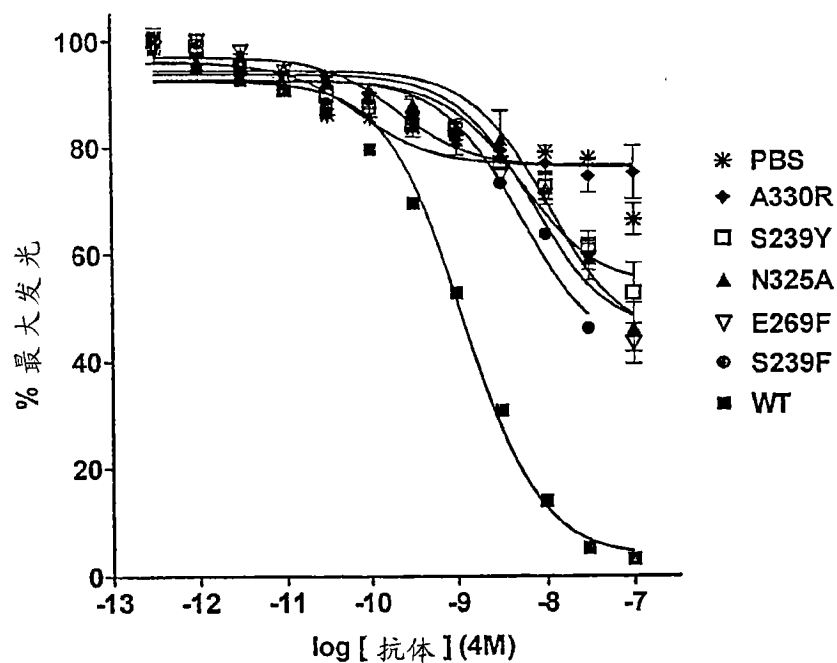


图 19b

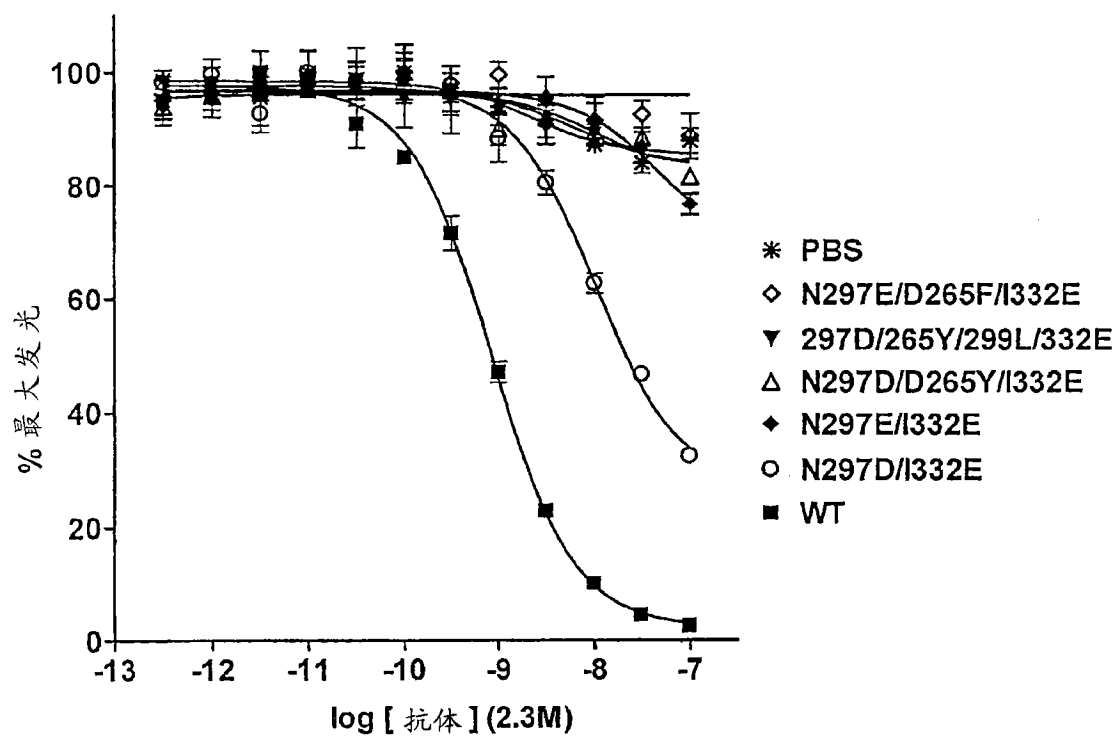


图 20

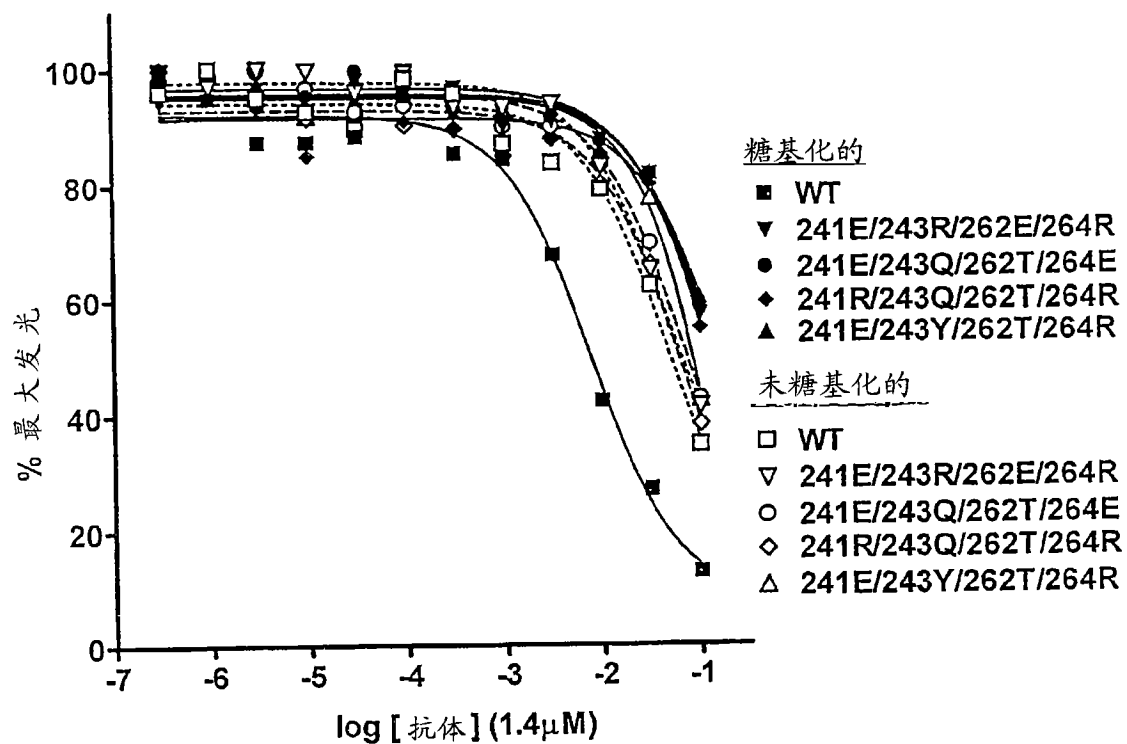


图 21

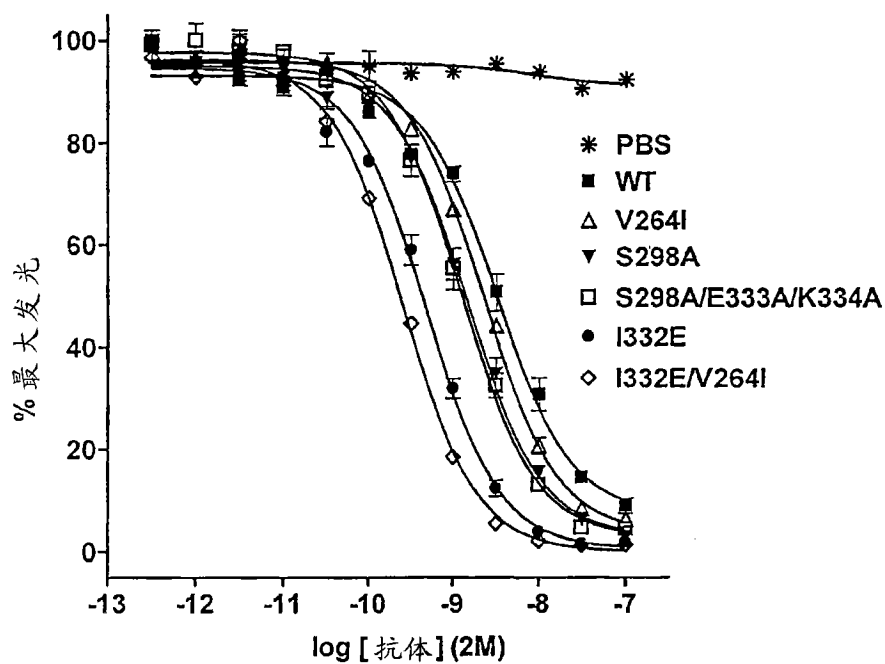


图 22a

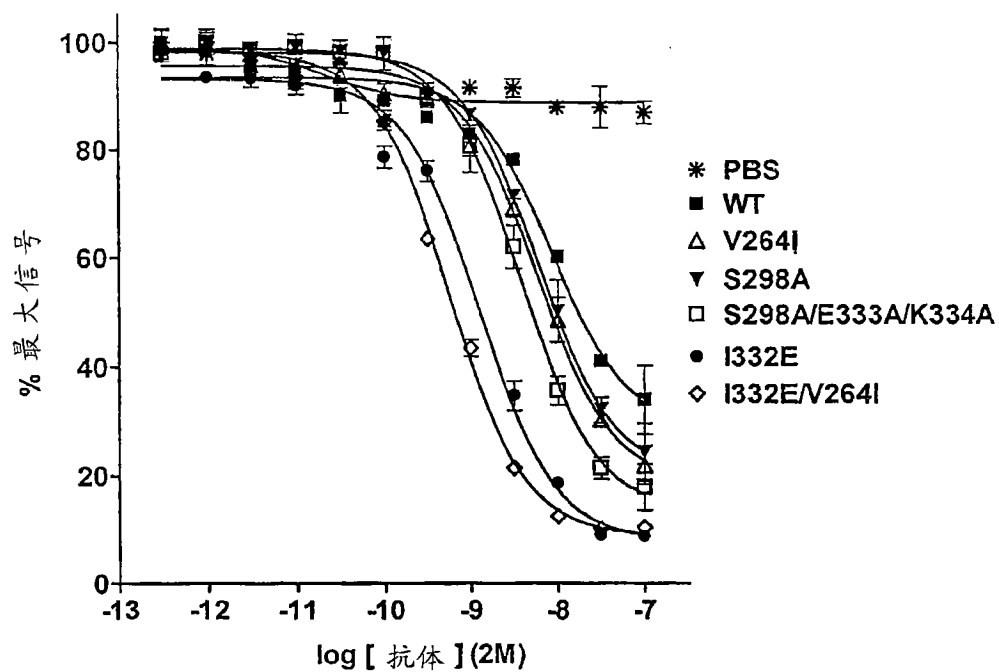


图 22b

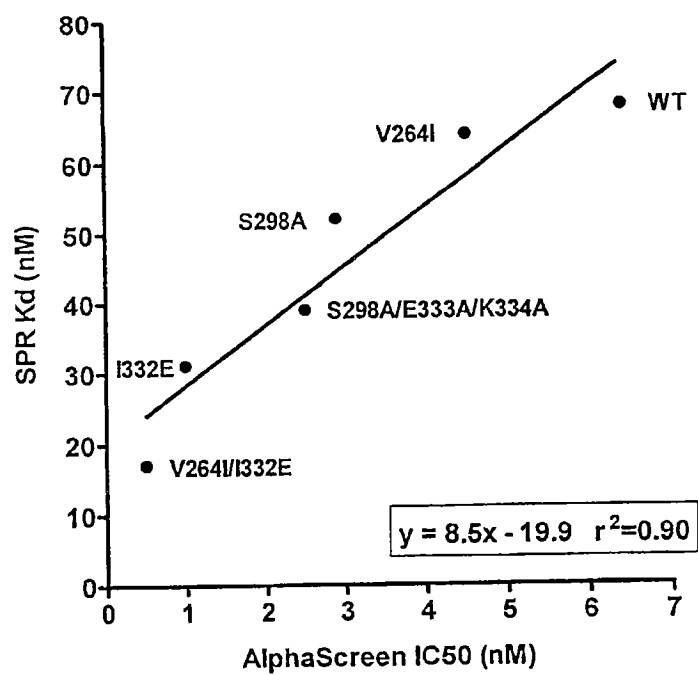


图 23a

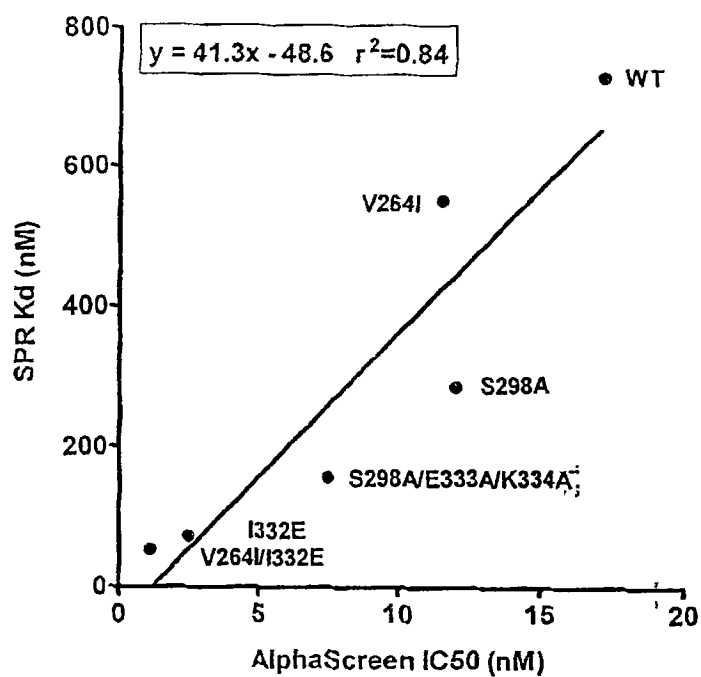


图 23b

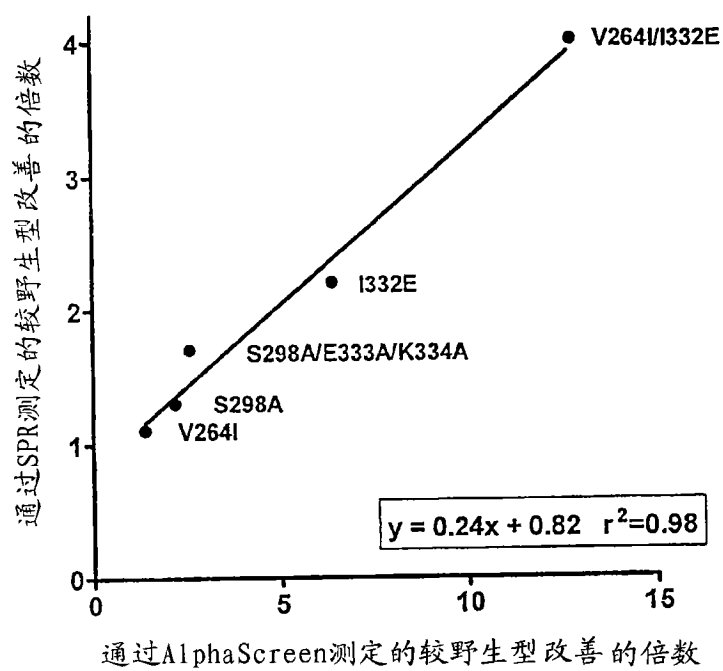


图 23c

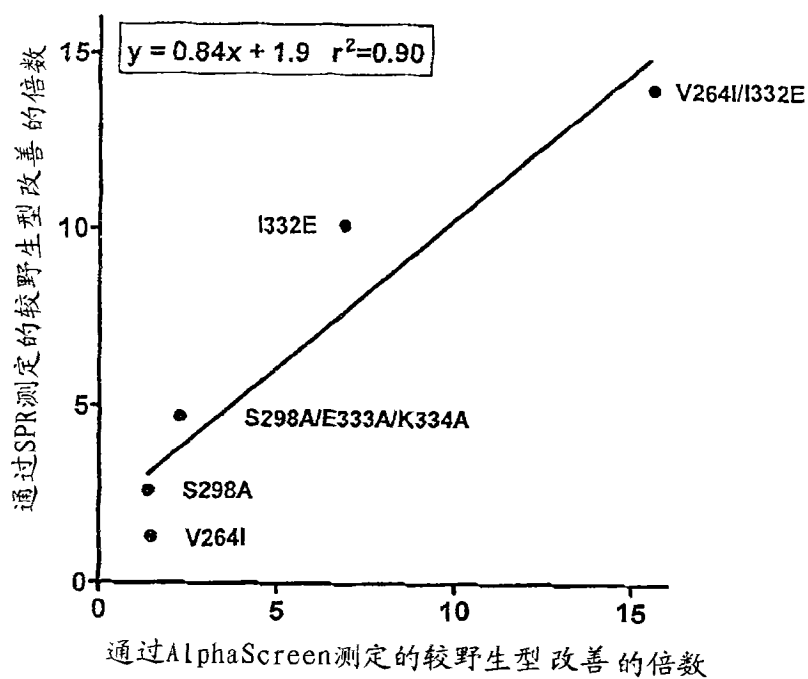


图 23d

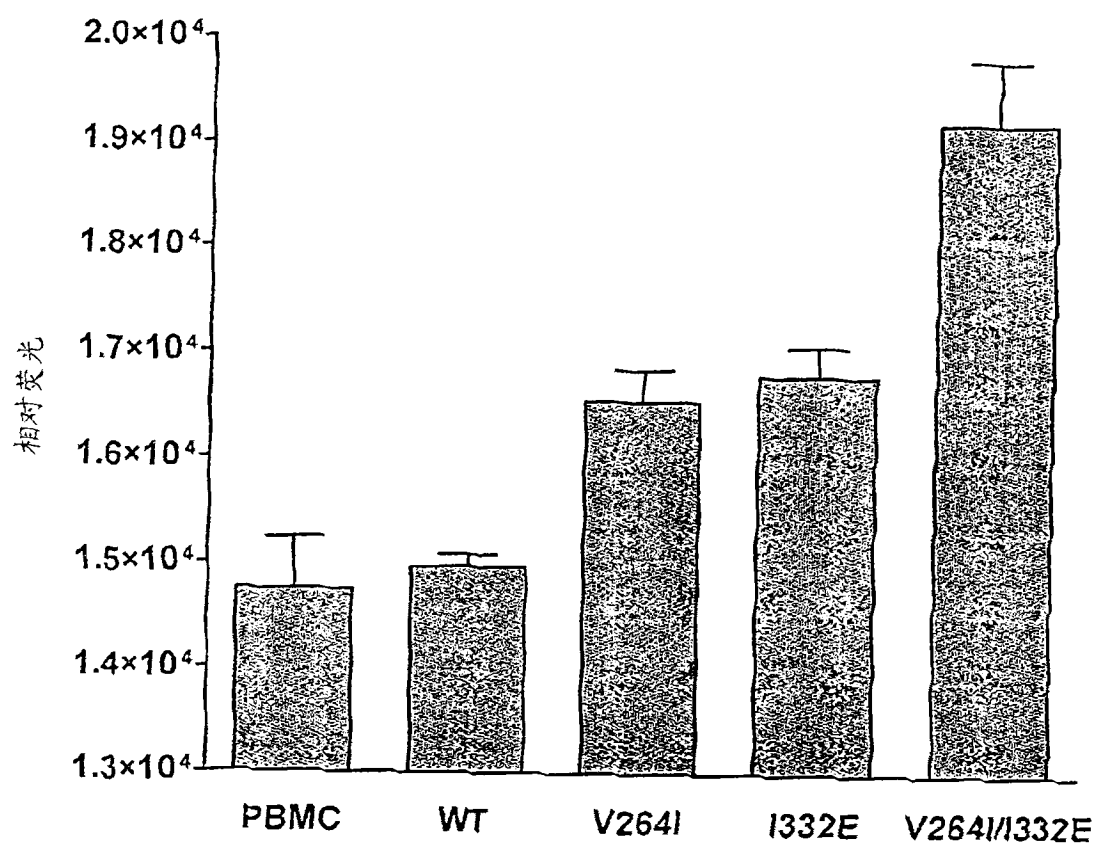


图 24a

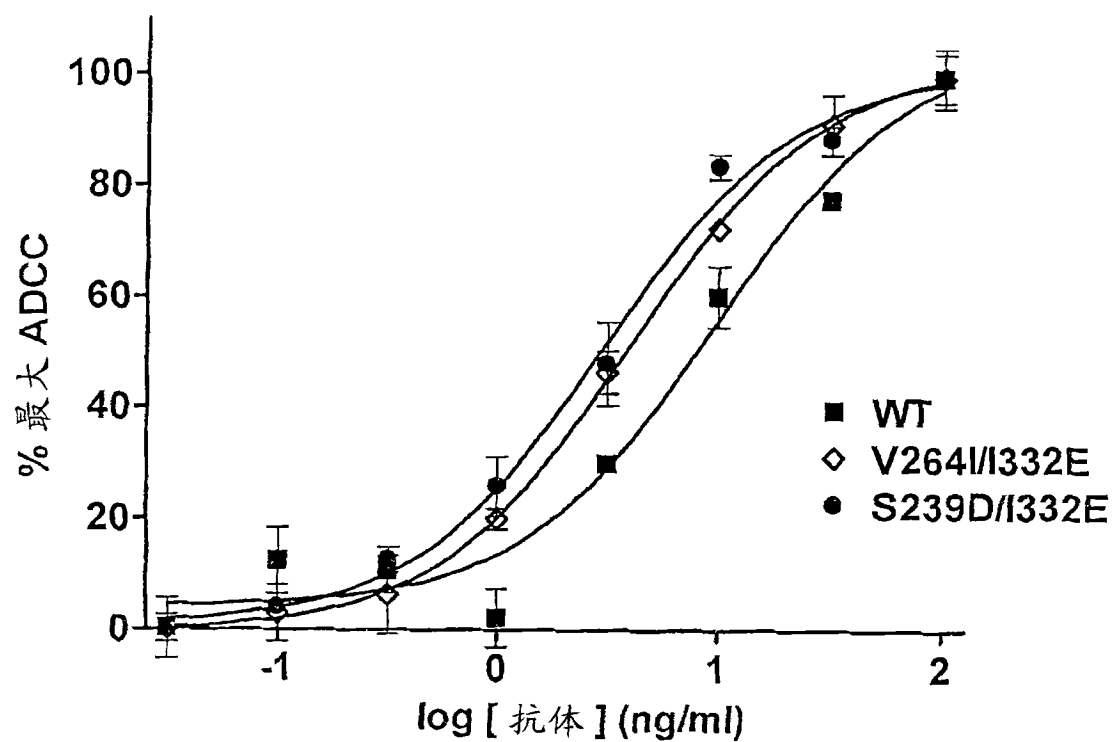


图 24b

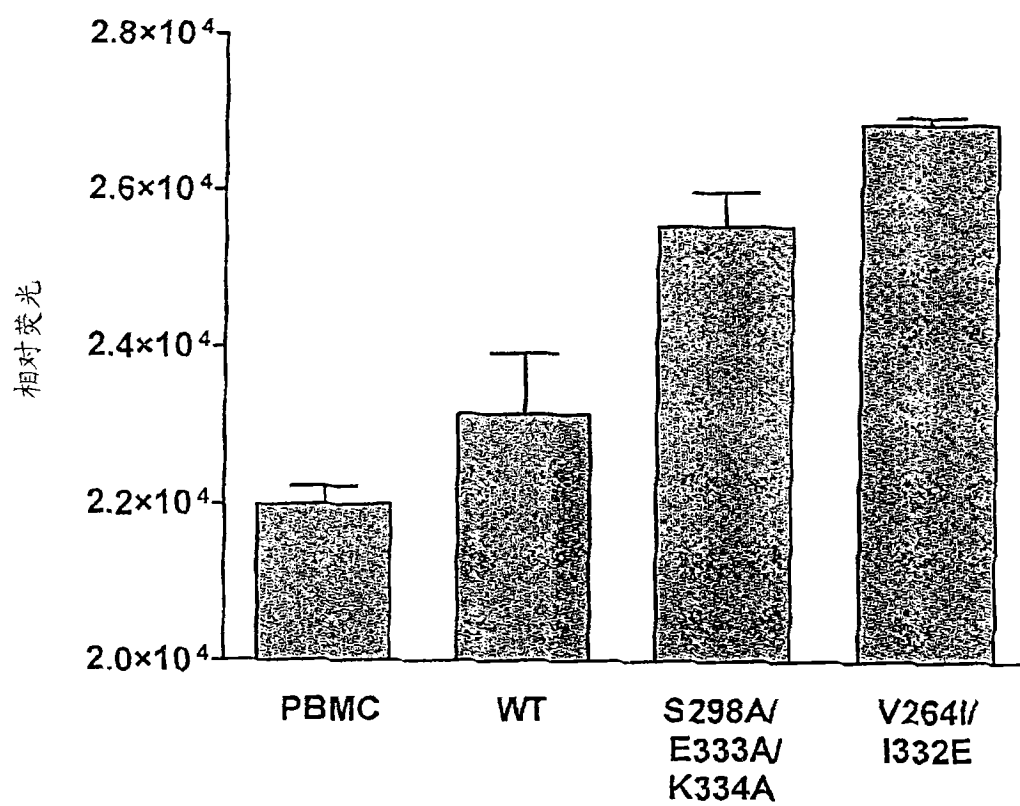


图 25a

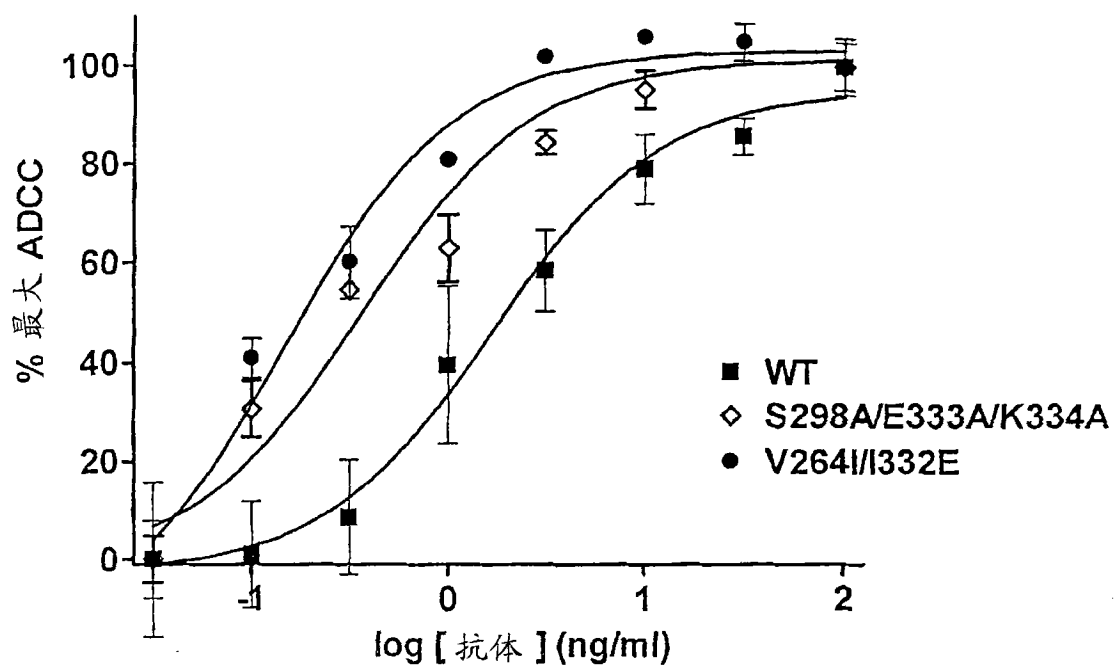


图 25b

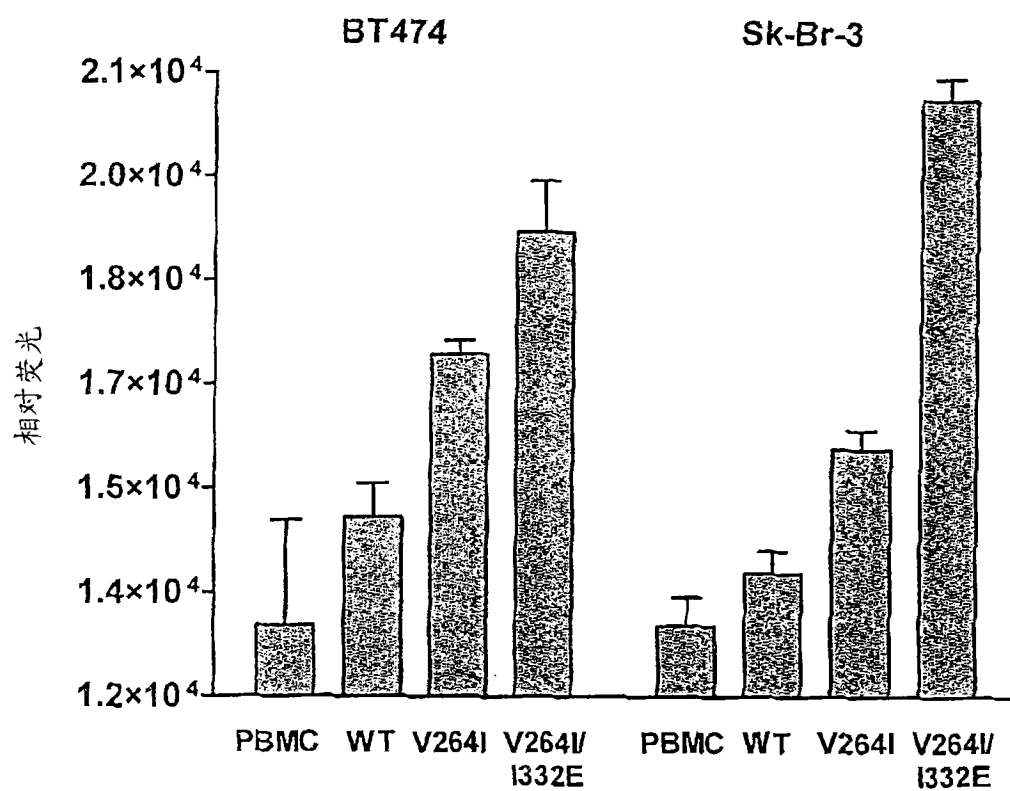


图 26a

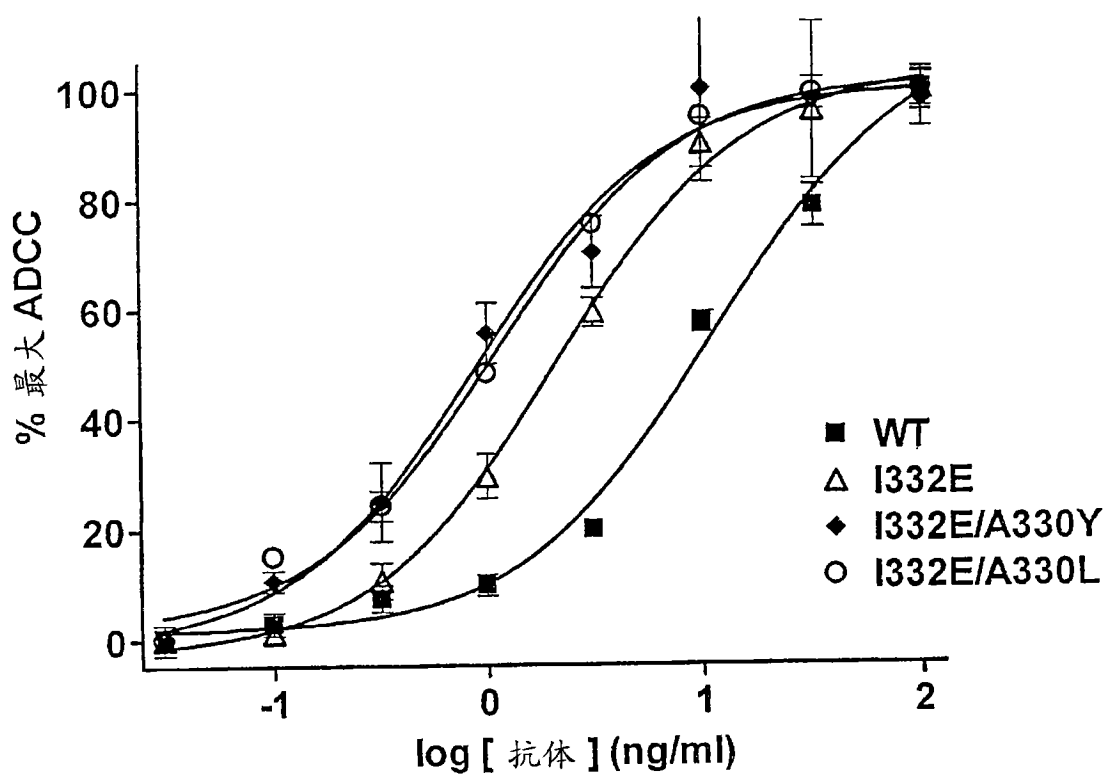


图 26b

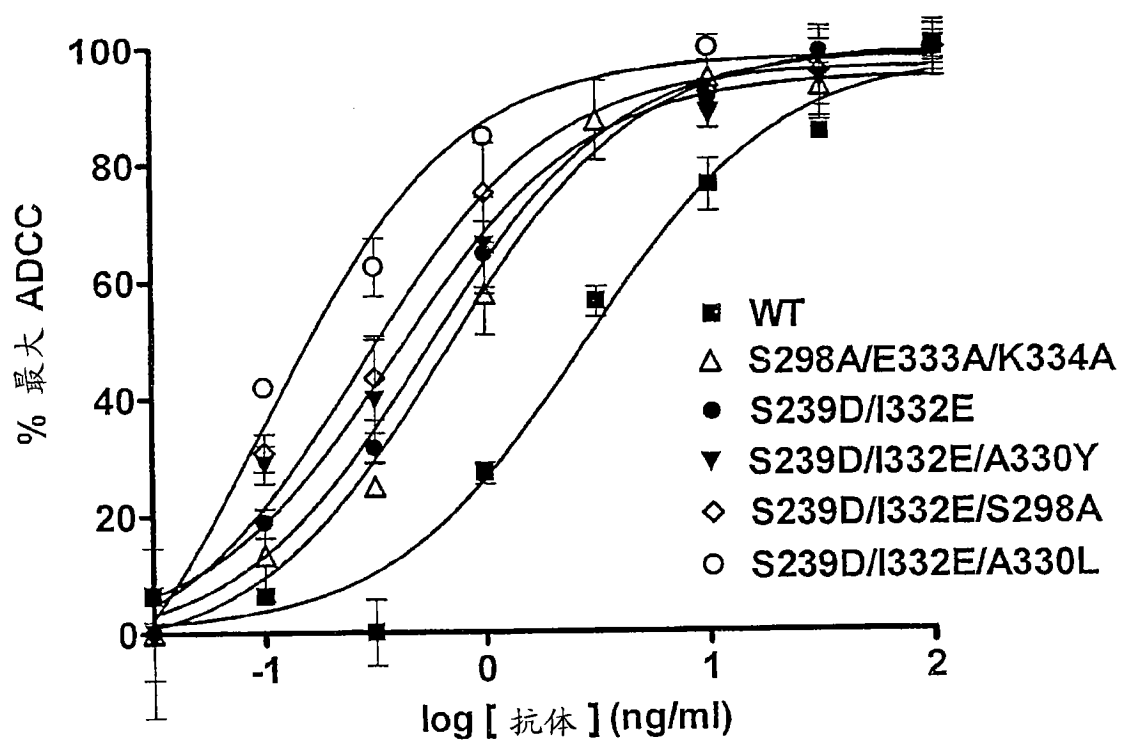


图 26c

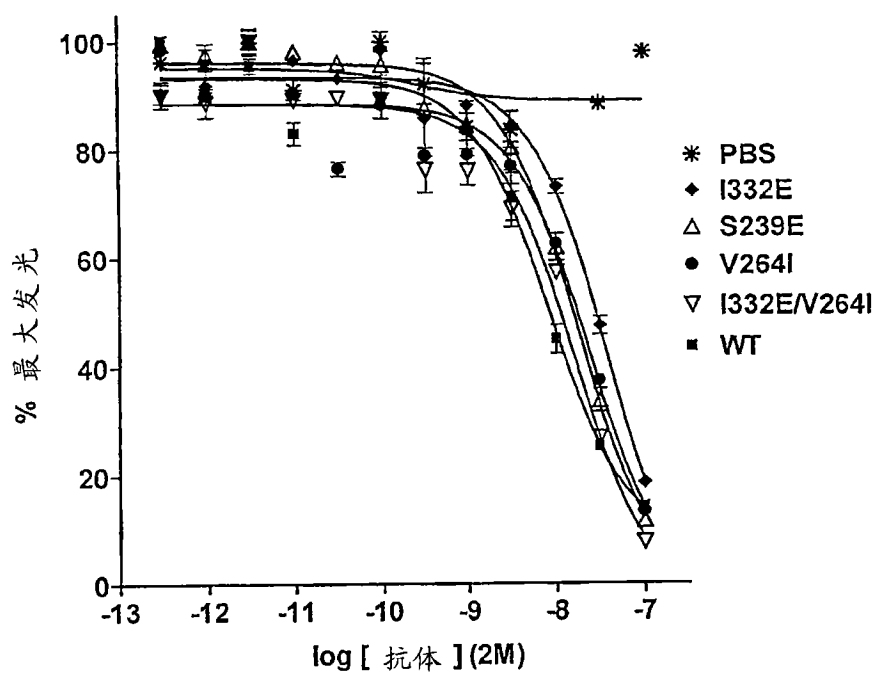


图 27a

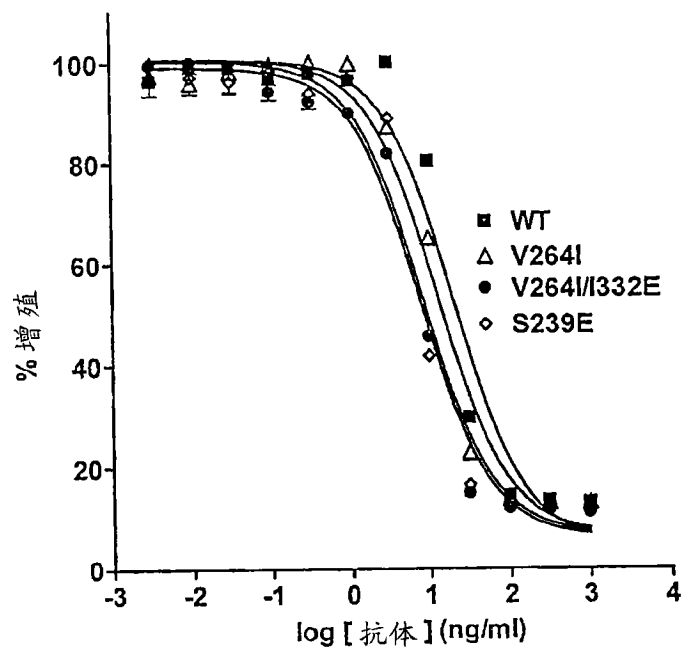


图 27b

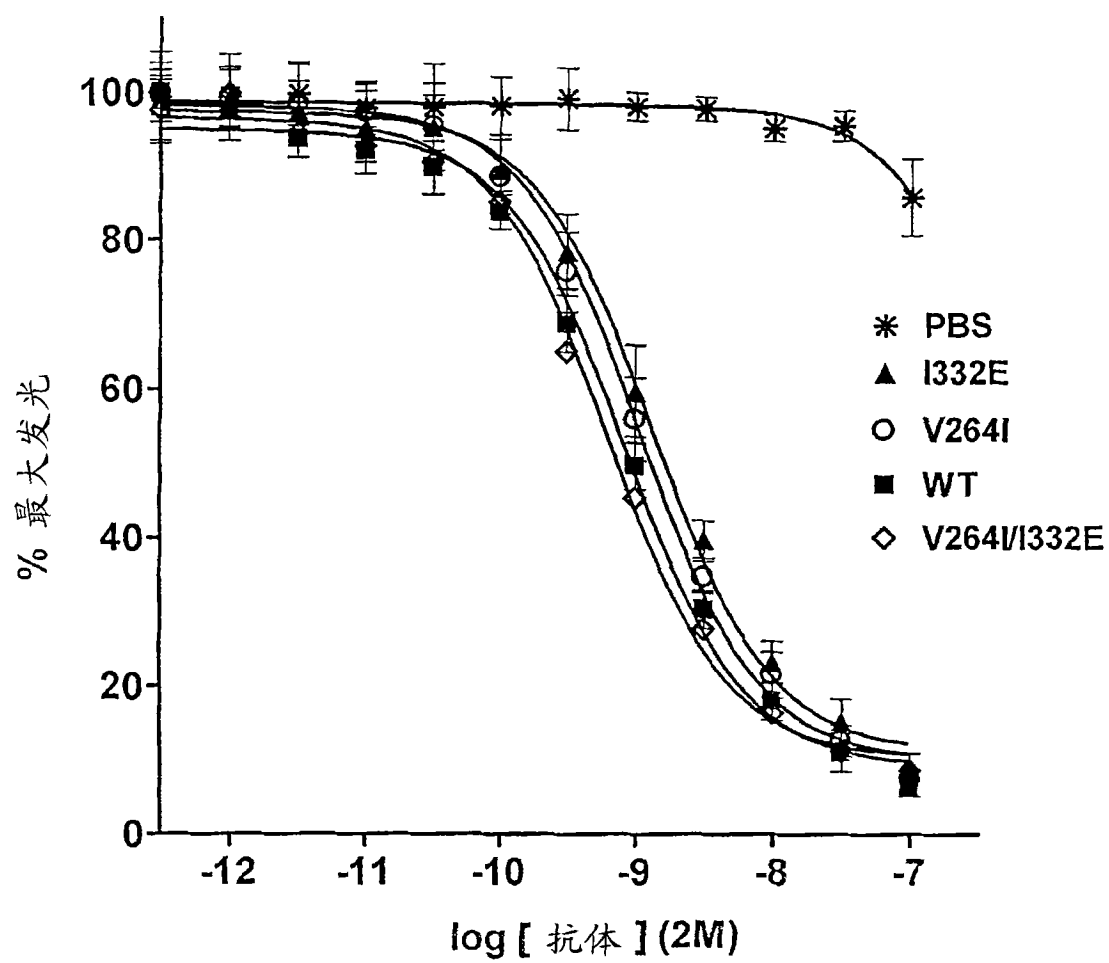


图 28

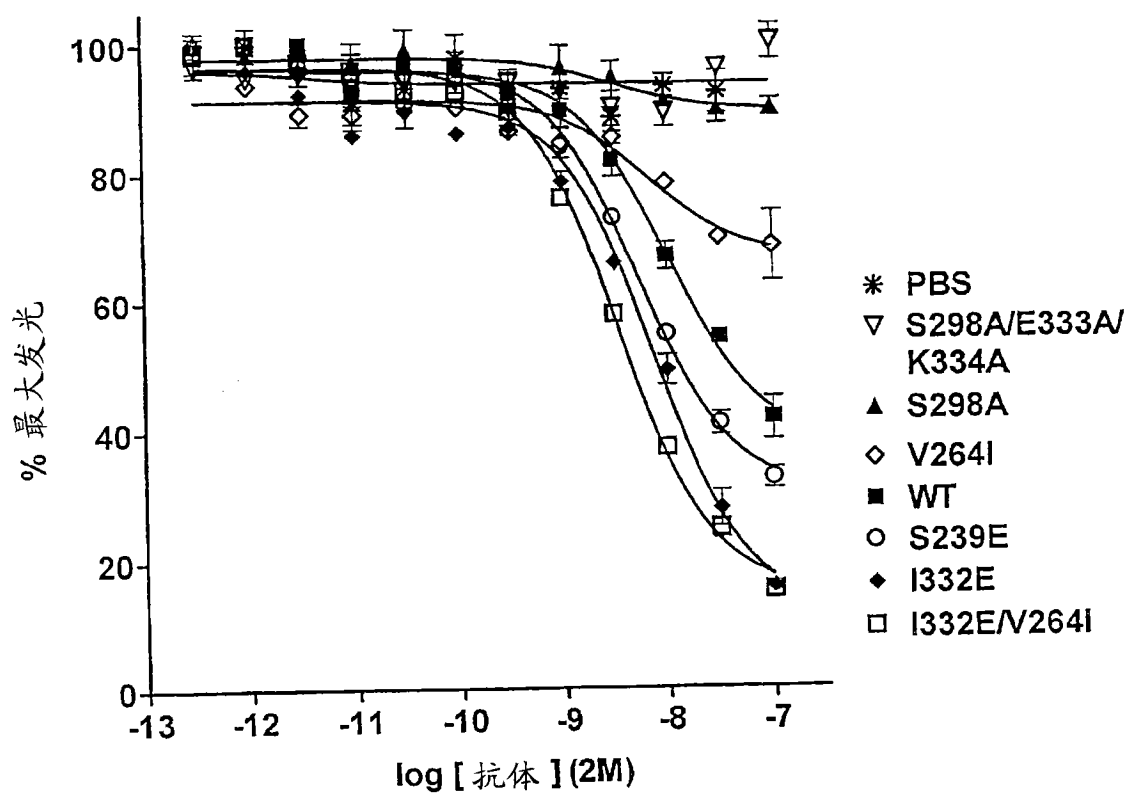


图 29

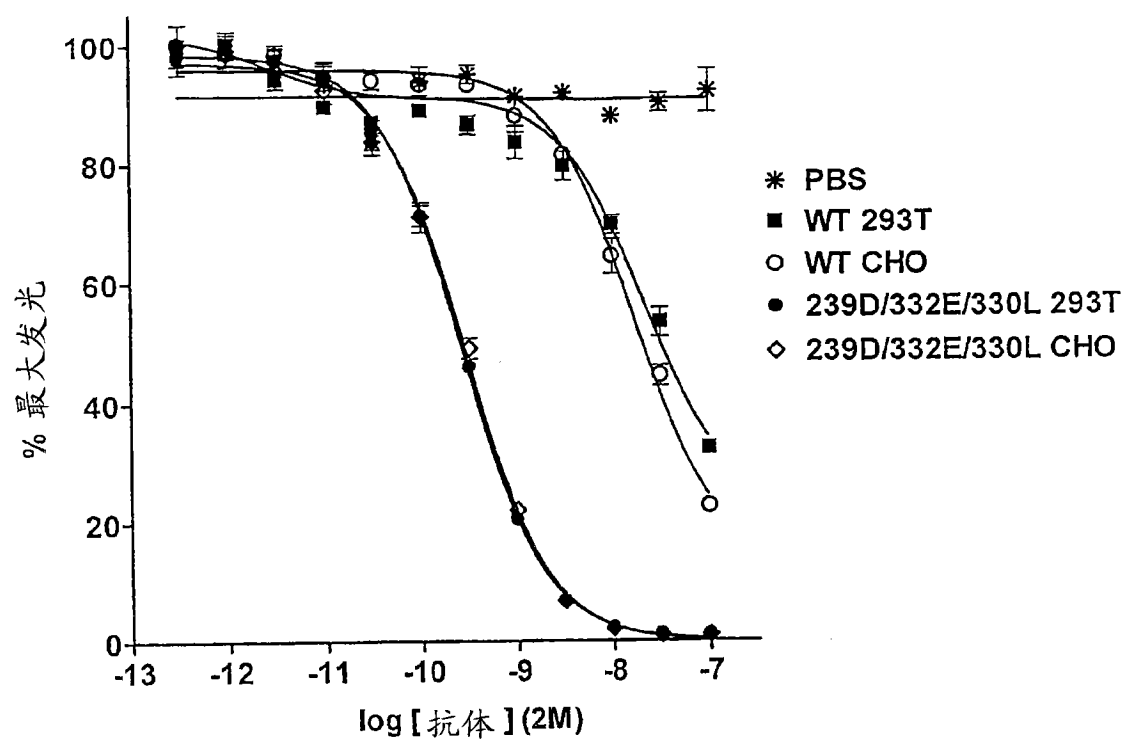


图 30

抗-CD20轻链

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKWIYATSNLASGVPVRFSGSGSG
 TSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLL
 NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
 SPVTKSFNRGEC

图 31a

抗-CD20重链

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFK
 GKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFP
 LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
 TQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
 VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
 LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
 PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

图 31b

包含可能的Fc变体的抗-CD20重链

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFK
 GKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFP
 LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
 TQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPX₁X₂FLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
 VX₃DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYX₄Z₁TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
 KALPX₅PX₆EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
 KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

位置	野生型	可能的取代
X ₁	S	D, E, N, Q, T
X ₂	V	I, M
X ₃	V	I, T, Y
X ₄	N	D
X ₅	A	Y, L, I
X ₆	I	D, E, N, Q
Z ₁	S	A

图 31c