



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1763097 B

(45) 授权公告日 2011.04.13

(21) 申请号 200510106781.3

(22) 申请日 2000.01.14

(30) 优先权数据

60/116,023 1999.01.15 US

(62) 分案原申请数据

00804905.X 2000.01.14

(73) 专利权人 杰南技术公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 伦纳德·G·普雷斯塔

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 巫肖南 封新琴

(56) 对比文件

WO 9823289 A1,1998.06.04, 权利要求 1 和 3.
全文.

GHETIE V 等 .Increasing the serum persistence
of an IgG fragment by random mutagenesis.NATURE
BIOTECHNOLOGY15 7.1997,15(7),637-640.

MEDESAN C 等 .Comparative studies of rat
IgG to further delineate theFc:FcRn interaction site.
Eur. J. Immunol28 7.1998,28(7),2092-2100.

审查员 林峻凯

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 80 页 附图 20 页

(54) 发明名称

具有改变的效应功能的多肽变体

(57) 摘要

本发明涉及包括 Fc 区变体的多肽, 更具体而言, 本发明涉及含 Fc 区的多肽, 由于在其 Fc 区中的一个或多个氨基酸修饰, 所述多肽具有改变的效应功能。

1. 包含变体人 IgG Fc 区的多肽，所述变体人 IgG Fc 区不是天然序列 Fc 区、并具有增高的人新生 Fc 受体 (FcRn) 结合亲和力，其中所述多肽包含在 Fc 区的下述任一或多个氨基酸位点上的氨基酸取代，所述位点为 238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424、或 434，其中 Fc 区残基的编号为如 Kabat 所述的 EU 标号。

2. 权利要求 1 的多肽，其在位点 307 包含氨基酸取代。

3. 权利要求 1 的多肽，其在位点 380 包含氨基酸取代。

4. 权利要求 1 的多肽，其在位点 434 包含氨基酸取代。

5. 权利要求 1 的多肽，其包含抗体。

6. 权利要求 5 的多肽，其包括与血管内皮生长因子 (VEGF)、HER2 受体、CD20、IgE 或 LFA-1 结合的抗体。

7. 权利要求 1 的多肽，其包含免疫粘附素。

8. 包含权利要求 1 中所述多肽及药理上可接受的载体的组合物。

9. 经灭菌的权利要求 8 的组合物。

10. 权利要求 1 的多肽，其中所述变体人 IgG Fc 区是变体人 IgG1 Fc 区。

11. 权利要求 2 的多肽，其中 T307 被取代为 A。

12. 权利要求 2 的多肽，其中 T307 被取代为 Q。

13. 权利要求 4 的多肽，其中 N434 被取代为 A。

14. 权利要求 2 的多肽，其是结合血管内皮生长因子 (VEGF) 的抗体。

15. 权利要求 4 的多肽，其是结合血管内皮生长因子 (VEGF) 的抗体。

具有改变的效应功能的多肽变体

[0001] 本申请是申请日为 2000 年 1 月 14 日、申请号为 00804905.X、发明名称为“具有改变的效应功能的多肽变体”的发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及包括 Fc 区变体的多肽。更具体而言，本发明涉及含 Fc 区的多肽，因为在其 Fc 区中有一个或多个氨基酸改变，其具有改变的效应功能

背景技术

[0003] 抗体是蛋白质，其具有与特定抗原的结合特异性。天然抗体通常是大约 150,000 道尔顿的异四聚体糖蛋白，包括两个相同的轻 (L) 链和两个相同的重 (H) 链。每个轻链通过一个共价二硫键与重链相连，而在不同的免疫球蛋白同种型的重链之间二硫键的数目是不同的。每个重链和轻链还具有规律间隔的链内二硫键。每个重链在其一个末端具有一个可变区 (V_H)，随后是几个恒定区。每个轻链在其一个末端具有一个可变区 (V_L)，在其另一个末端为一个恒定区；轻链的恒定区与重链的第一个恒定区相对，而轻链可变区与重链可变区相对。特殊的氨基酸残基被认为构成轻链和重链可变区之间的相互作用

[0004] 术语“可变”指在抗体之间可变区某些部分的序列差异很大，并且负责每种具体抗体对其特定抗原的结合特异性。然而，可变性不是平均的分布于整个抗体的可变区中。在轻链和重链的可变区中，它集中分布于称为互补决定簇 (CDR) 的三个节段中。可变区中保守性较高的部分称为框架区 (FR)。天然重链和轻链的可变区分别包括四个 FR，主要为 β 片层构象，被三个 CDR 连接，这些 CDR 形成与 β 片层结构相连的环状，在一些情况成为该 β 一片层结构的一部分)。每条链中的 CDR 通过 FR 紧密的结合在一起，并与其它链的 CDR 一起形成抗体的抗原结合位点 (见 Kabat 等，免疫相关蛋白的序列，第 5 版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.(1991))。

[0005] 恒定区不直接参与抗原抗体的结合，但具有各种效应功能。根据抗体或免疫球蛋白重链恒定区的氨基酸序列，可将它们分成不同类。主要有 5 类免疫球蛋白：IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM，其中一些可以进一步分为亚类 (同种型)，例如 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4；IgA1 和 IgA2。相应于免疫球蛋白不同类的重链恒定区分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。在各种人类免疫球蛋白类中，只有人 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgM 已知可激活补体；并且人 IgG1 和 IgG3 介导 ADCC 比 IgG2 和 IgG4 更有效。

[0006] 天然 IgG1 的结构示意图见图 1，其中指出了天然抗体分子的各个部分。用木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段，称为 Fab 段，每个片段带有单个抗原结合位点，以及一个残留的 Fc 片段，其名称反映了其易结晶的性能。人 IgG Fc 区的结晶结构已经被确定 (Deisenhofer, 生物化学 20: 2361-2370(1981))。在人 IgG 分子中，通过木瓜蛋白酶切割 N 末端到 Cys226，产生 Fc 区。Fc 区对于抗体的效应功能是重要的。

[0007] 由抗体 Fc 区介导的效应功能可以分为两种：(1) 在抗体与抗原结合之后发挥作用的效应功能 (这些功能涉及参与补体级联反应或 Fc 受体 (FcR)- 负荷细胞)；和 (2) 不

依赖于抗原结合而发挥作用的效应功能（这些功能提供在血循环中的持续性和通过胞吞作用穿过细胞屏障的能力）。Ward 和 Ghetie, 治疗免疫学 2 : 77-94(1995)。

[0008] 虽然抗体与所需抗原的结合具有中和效应, 这可能阻止外源抗原与其内源靶点（例如受体或配体）的结合, 但仅靠结合可能不能去除外源抗原。为了有效的去除和 / 或破坏外源抗原, 抗体应该同时具备与其抗原的高亲和力和有效的效应功能。

[0009] Fc 受体 (FcR) 结合

[0010] 抗体和抗体 - 抗原复合物与免疫系统细胞的相互作用引起各种反应, 包括抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用 (ADCC) 和补体依赖性细胞毒作用 (CDC) (见 Daeron 的综述, Annu.Rev.Immunol.15 : 203-234(1997);)Ward 和 Ghetie, 治疗免疫学 2 : 77-94(1995); 以及 Ravetch 和 Kinet, Annu.Rev.Immunol.9 : 457-492(1991))。

[0011] 几种抗体效应功能由与抗体 Fc 区结合的 Fc 受体 (FcR) 介导。FcR 根据其对免疫球蛋白同种型的特异性而被限定; IgG 抗体的 Fc 受体被称为 Fc γ R, IgE 的为 Fc ϵ R, IgA 的为 Fc α R 等等。已经鉴定了 Fc γ R 的三个亚类: Fc γ RI (CD64)、Fc γ RII (CD32) 和 Fc γ R (CD16)。因为每个 Fc γ R 亚类是由两个或三个基因编码, 并且由于选择性 RNA 剪接导致形成多种转录本, 所以存在很多种 Fc γ R 同种型。编码 Fc γ RI 亚类的三个基因 (Fc γ RIA、Fc γ RIB 和 Fc γ RIC) 簇集在 1 号染色体长臂的 1q21.1 区域; 编码 Fc γ RII 同种型的三个基因 (Fc γ RIIA、Fc γ RIIB 和 Fc γ RIIC) 和编码 Fc γ RIII 的两个基因 (Fc γ RIIIA、和 Fc γ RIIIB) 均簇集于 1q22 区。这些不同的 FcR 亚型在不同类型的细胞中进行表达 (见 Ravetch 和 Kinet 的综述, Annu.Rev.Immunol.9 : 457-492(1991))。例如, 在人类中, Fc γ RIIIB 仅在中性粒细胞中发现, 而 Fc γ RIIIA 在巨噬细胞、单核细胞、自然杀伤 (NK) 细胞和 T 细胞的一个亚群中发现。值得注意的是, Fc γ RIIIA 是在 NK 细胞上仅有的 FcR 受体, NK 细胞是参与 ADCC 的细胞类型之一。

[0012] Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII 是免疫球蛋白超家族 (IgSF) 受体; Fc γ RI 在其细胞外结构域具有三个 IgSF 结构域, 而 Fc γ RII 和 Fc γ RIII 在它们的细胞外结构域中仅有两个 IgSF 结构域。

[0013] Fc 受体的另一种类型是新生 Fc 受体 (FcRn)。FcRn 在结构上与主要组织相容性复合体 (MHC) 相似, 由与 β_2 微球蛋白非共价结合的 α 链组成。

[0014] 人和鼠抗体的 Fc γ R 结合位点先前定位在所谓的由残基 233-239 组成的“铰链区” (EU 标号见 Kabat 等, 免疫相关蛋白的序列, 5th Ed.Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.(1991))。Woof 等, Molec.Immunol.23 : 319-330(1986); Duncan 等, 自然 332 : 563(1988); Canfield 和 Morrison, 实验医学杂志 .173 : 1483-1491(1991); Chappel 等, 美国国家科学院院刊 88 : 9036-9040(1991)。在残基 233-239 中, P238 和 S239 已经被引证为可能涉及结合过程, 但是还从来没有通过取代或缺失来评价这两个残基。

[0015] 其它先前被引用的可能参与与 Fc γ R 结合的区域是: 针对人 Fc γ RI 的 G316-K338 (人 IgG) (仅通过序列比较, 没有评估取代突变) (Woof 等, Molec.Immunol.23 : 319-330(1986)); 针对人 Fc γ RIII 的 K274-R301 (人 IgG1) (基于肽) (Sarmary 等, Molec.Immunol.21 : 43-51(1984)); 针对人 Fc γ RIII 的 Y407-R416 (人 IgG) (Gergely 等, Biochem.soc.trans.12 : 739-743(1984)); 以及针对鼠 Fc γ RII 的 N297 和

E318(鼠 IgG2b)(Lund 等, Molec.Immunol.29 : 53-59(1992))。

[0016] 将 IgG3 中的 Pro331 变成 Ser, 并且分析此变体与靶点的亲和力。发现其亲和力比未突变的 IgG3 的亲和力低 6 倍, 表明在 Fc γ RI 的结合过程中涉及 Pro331。Morrison 等, 免疫学家, 2 : 119-124(1994); 和 Canfield 和 Morrison, 实验医学杂志 .173 : 1483-91(1991)。

[0017] C1q 结合

[0018] C1q 和两个丝氨酸蛋白酶, C1r 和 C1s, 形成复合物 C1, 其为补体依赖的细胞毒 (CDC) 途径的第一个组分。C1q 为六价分子, 其分子量约为 460000, 结构与一束郁金香花相似, 其中六个胶原状茎与六个球状头相连。Burton 和 Woof, 免疫学进展 .51 : 1-84(1992)。为了激活补体级联反应, C1q 必需结合与抗原性靶点结合的至少两个 IgG1、IgG2 或 IgG3 分子 (其一致性是 IgG4 不能激活补体), 但需要结合一个 IgM 分子。Ward 和 Ghetie, 治疗免疫学 2 : 77-94(1995) 见第 80 页。

[0019] 根据化学修饰和结晶学研究的结果, Burton 等 (自然, 288 : 338-344(1980)) 提出在 IgG 上补体亚组分 C1q 的结合位点涉及至少两个 (C 末端)CH2 结构域的 β 链。Burton (Molec.Immunol.22(3) : 161-206(1985)) 后来提出包括氨基酸残基 318 到 337 的区域可能参与补体的固定。

[0020] Duncan 和 Winter (自然 332 : 738-40(1988)), (利用定点诱变的方法), 报道 Glu318、Lys320 和 Lys322 形成 C1q 的结合位点。Duncan 和 Winter 的资料是通过检测小鼠 IgG2b 同种型与豚鼠 C1q 的结合而得到的。通过含这些残基的短合成肽抑制补体介导的细胞裂解的能力, 证实了 Glu318、Lys320 和 Lys322 残基在结合 C1q 中的作用。在 1997 年 7 月 15 日发布的美国专利号 5648260 和 1997 年 4 月 29 日发布的美国专利号 5624821 中, 也报道了相似的结果。

[0021] 通过分析人 IgG 亚类实施补体介导的细胞溶解的能力, 表明了残基 Pro331 在 C1q 结合中的作用。在 IgG4 中 Ser331 突变为 Pro331 可提供激活补体的能力 (Tao 等, 实验医学杂志, 178 : 661-667(1993); Brekke 等, 欧洲免疫学杂志, 24 : 2542-47(1994))。

[0022] 根据对 Winter 的研究组与 Tao 等和 Brekke 等的论文的比较, Ward 和 Ghetie 在他们的综述文章中总结认为 C1q 的结合涉及至少有两个不同的区域: 一个在携有 Glu318、Lys320 和 Lys322 残基的 CH2 结构域的 β 链上, 另一个在十分靠近相同 β 链的转角上, 并在 331 位上包含一个关键的氨基酸残基。

[0023] 其它报道表明位于人 IgG1 低铰链区的残基 Leu235 和 Gly237 在补体固定和激活中起关键作用。Xu 等, 免疫学 .150 : 152A(摘要)(1993)。1994 年 10 月 22 日公开的 WO94/29351 中报道人 IgG1 的 C1q 和 FcR 结合所必须的氨基酸残基位于 CH2 的 N 末端区域, 即残基 231 到 238。

[0024] 进一步提出 IgG 结合 C1q 并激活补体级联反应的能力也依赖于两个 CH2 结构域之间的糖类组分 (在正常情况下其锚着在 Asn297 上) 的存在、缺失或修饰。Ward 和 Ghetie, 治疗免疫学 2 : 77-94(1995) 见第 81 页。

发明内容

[0025] 本发明提供亲本多肽的含 Fc 区的变体, 此变体在人效应细胞存在的条件下, 比

亲本多肽更有效的介导抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用 (ADCC), 或以更强的亲和力与 Fc γ 受体 (Fc γ R) 结合, 并且在 Fc 区包括至少一个氨基酸修饰。例如, 所述多肽变体可以包括抗体或免疫粘附素。所述亲本多肽的 Fc 区优选包括人 Fc 区; 例如, 人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4Fc 区。优选所述多肽变体以比所述亲本多肽更有效约 1.5-100 倍的效力介导 ADCC 作用。其以比所述亲本多肽更强的亲和力结合 Fc γ RIII。优选其以比所述亲本多肽更弱的亲和力进一步结合 Fc γ RII。优选其 Fc 区包括至少 1 个氨基酸取代。优选其 Fc 区, 而不是其低铰链区, 包括至少 1 个氨基酸修饰。优选其 Fc 区的 CH2 结构域中包括至少 1 个氨基酸修饰。所述多肽变体优选包括在 Fc 区的氨基酸位点 256、290、298、312、326、330、333、334、360、378 或 430 之一或多处的氨基酸修饰 (例如取代), 其中 Fc 区残基的编号为如 Kabat 所述的 EU 标号。优选其包括在所列氨基酸位点上的两个或多个氨基酸取代。

[0026] 另外, 本发明提供了多肽, 其包括带有改变了的 Fc γ 受体 (Fc γ R) 结合亲和力的 Fc 区变体, 此多肽包括在 Fc 区的下述任一或多个氨基酸位点上的氨基酸修饰, 所述位点为 238、239、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、329、330、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438 或 439, 其中 Fc 区残基的编号为如 Kabat 所述的 EU 标号。所述 Fc 区变体优选包括人 IgG Fc 区的变体, 例如, 人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4Fc 区的变体。因此应注意, 在上述领域的工作中, 当亲本多肽具有非人类的鼠 Fc 区时, 不同于在此鉴定的残基的那些被认为影响 FcR 结合。例如, 在鼠 IgG2b/ 鼠 Fc γ RII 系统中, 发现 IgG E318 对结合是重要的 (Lund 等, 分子免疫学 27(1): 53-59(1992)), 而 E318A 对人 IgG/ 人 Fc γ RII 系统没有影响 (下述表六)。

[0027] 在一个具体实施方案中, 具有改变了的 Fc γ R 结合活性的多肽变体显示与 Fc γ R 的结合降低, 并且包括在 Fc 区的下述任一或多个氨基酸位点上的氨基酸修饰, 所述位点为 238、239、248、249、252、254、265、268、269、270、272、278、289、292、293、294、295、296、298、301、303、322、324、327、329、333、335、338、340、373、376、382、388、389、414、416、419、434、435、437、438 或 439, 其中 Fc 区残基的编号为如 Kabat 所述的 EU 标号。

[0028] 例如, 所述多肽变体显示与 Fc γ RI 的结合降低, 并且包括在 Fc 区氨基酸位点 238、265、269、270、327 或 329 的任一或多个上的氨基酸修饰, 其中 Fc 区残基的编号为如 Kabat 所述的 EU 标号。

[0029] 优选其与 Fc γ RII 的结合降低。

[0030] 所述多肽变体显示与 Fc γ RII 的结合降低, 并且包括在 Fc 区的下述任一或多个氨基酸位点上的氨基酸修饰, 所述位点为 238、265、269、270、292、294、295、298、303、324、327、329、333、335、338、373、376、414、416、419、435、438 或 439, 其中 Fc 区残基的编号为如 Kabat 所述的 EU 标号。优选其与 Fc γ RIII 的结合降低。

[0031] 所述多肽变体显示与 Fc γ RIII 的结合降低, 并且包括在 Fc 区的下述任一或多个氨基酸位点上的氨基酸修饰, 所述位点为 238、239、248、249、252、254、265、

268、269、270、272、278、289、293、294、295、296、301、303、322、327、329、338、340、373、376、382、388、389、416、434、435 或 437，其中 Fc 区残基的编号为如 Kabat 所述的 EU 标号。

[0032] 在另一个具体实施方案中，具有改变了的 Fc γ R 结合活性的多肽变体显示与 Fc γ R 的结合增强，并且包括在 Fc 区的下述任一或多个氨基酸位点上的氨基酸修饰：255、256、258、267、268、272、276、280、283、285、286、290、298、301、305、307、309、312、315、320、322、326、330、331、333、334、337、340、360、378、398 或 430，其中 Fc 区残基的编号为如 Kabat 所述的 EU 标号。

[0033] 例如，所述多肽变体显示与 Fc γ RIII 的结合增强，并且还任选进一步呈现与 Fc γ RII 结合降低。这类变体的实例包括在 Fc 区的位点 298 和 / 或 333 上的氨基酸修饰，其中 Fc 区残基的编号为如 Kabat 所述的 EU 标号。

[0034] 优选所述多肽变体与 Fc γ RII 的结合增强。

[0035] 所述多肽变体显示与 Fc γ RII 的结合增强，并且包括在 Fc 区的下述任一或多个氨基酸位点上的氨基酸修饰：255、256、258、267、268、272、276、280、283、285、286、290、301、305、307、309、312、315、320、322、326、330、331、337、340、378、398 或 430，其中 Fc 区残基的编号为如 Kabat 所述的 EU 标号。与 Fc γ RII 结合增强的这些多肽变体可任选进一步显示与 Fc γ RIII 的结合降低，还可以例如包括在 Fc 区的下述任一或多个氨基酸位点上的氨基酸修饰，所述位点为 268、272、298、301、322 或 340，其中 Fc 区残基的编号为如 Kabat 所述的 EU 标号。

[0036] 本发明进一步提供多肽，其包括具有改变了的新生 Fc 受体 (FcRn) 结合亲和力的 Fc 区变体，所述多肽包括在 Fc 区的下述任一或多个氨基酸位点上的氨基酸修饰：238、252、253、254、255、256、265、272、286、288、303、305、307、309、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、386、388、400、413、415、424、433、434、435、436、439 或 447，其中 Fc 区残基的编号为如 Kabat 所述的 EU 标号。任选其与 FcRn 的结合降低。与 FcRn 结合降低的这些多肽可以包括在 Fc 区的下述任一或多个氨基酸位点上的氨基酸修饰，所述位点为 252、253、254、255、288、309、386、388、400、415、433、435、436、439 或 477，其中 Fc 区残基的编号为如 Kabat 所述的 EU 标号。任选其与 FcRn 的结合增强。上述多肽变体可任选显示与 FcRn 的结合增强，并且包括在 Fc 区的下述任一或多个氨基酸位点上的氨基酸修饰：238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424 或 434，其中 Fc 区残基的编号为如 Kabat 所述的 EU 标号。

[0037] 本发明还提供了组合物，其包括所述多肽变体和生理上或药理上可接受的载体或稀释剂。将用于治疗的此组合物灭菌，并且可冻干。

[0038] 本发明还涉及本文公开的多肽变体的诊断和治疗应用。在一个诊断应用中，本发明提供了用于检测目的抗原的存在的方法，所述方法包括将怀疑含有所述抗原的样品暴露于所述多肽变体，并且检测所述多肽变体与该样品的结合。在一个治疗应用中，本发明提供了治疗患有或易患疾病或病症的哺乳动物的方法，包括给哺乳动物施用治疗有效量的本发明多肽变体，或包括所述多肽变体及可药用载体的组合物。

[0039] 本发明进一步提供：分离的编码所述多肽变体的核酸；包含该核酸的载体，

所述核酸可任选与控制序列可操作地连接，该控制序列能被该载体所转化的宿主细胞识别；包含该载体的宿主细胞；产生多肽变体的方法，所述方法包括培养该宿主细胞以使所述核酸表达，并且可任选从所述宿主细胞培养物中回收所述多肽变体（例如从宿主细胞培养基中）。

[0040] 本发明进一步提供制备具有改变的 Fc 受体 (FcR) 亲和力或改变的抗体依赖性细胞介导型细胞毒作用 (ADCC) 的活性的 Fc 区变体的方法，所述方法包括：

[0041] (a) 将一或多个氨基酸修饰引入亲本多肽的 Fc 区以产生 Fc 区变体；

[0042] (b) 检测该 Fc 区变体与 FcR 的结合，或检测该 Fc 区变体的 ADCC 活性

[0043] 所述方法的步骤 (b) 可以包括在体外检测所述 Fc 区与一或多个 FcR 的结合。而且，所述方法在其步骤 (b) 中可以鉴定 FcR 结合亲和力提高或 ADCC 活性提高的 Fc 区变体。当步骤 (b) 包括检测 Fc 区与 FcR 的结合时，所述的 FcR 可以是例如人 Fc γ 受体 III (Fc γ RIII)。当步骤 (b) 包括检测 Fc 区变体与至少两种不同 FcR 的结合时，被检测的所述 FcR 优选包括人 Fc γ 受体 II (Fc γ RII) 和人 Fc γ 受体 III (Fc γ RIII)。

[0044] 在另一方面，本发明包含变体人 IgG Fc 区的多肽，所述变体人 IgG Fc 区不是天然序列 Fc 区、并具有增高的新生 Fc 受体 (FcRn) 结合亲和力，其中所述多肽包含在 Fc 区的下述任一或多个氨基酸位点上的氨基酸修饰，所述位点为 238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424、或 434，其中 Fc 区残基的编号为如 Kabat 所述的 EU 标号。优选所述多肽其在位点 307 包含氨基酸取代。或优选其在位点 380 包含氨基酸取代。或优选其在位点 434 包含氨基酸取代。

[0045] 所述多肽优选其包含抗体。优选抗体与血管内皮生长因子 (VEGF)、HER2 受体、CD20、IgE 或 LFA-1 结合。

[0046] 所述多肽优选其包含免疫粘附素。

[0047] 本发明还包含上述多肽及药理上可接受的载体的组合物。优选上述组合物经灭菌。

附图说明

[0048] 图 1 是天然 IgG 的示意图。CH1 和 CL 结构域以及两个 CH2 结构域之间的二硫键用黑线代表。V 是可变区；C 是恒定区；L 链表示轻链，H 链表示重链。

[0049] 图 2 表示野生型 (wt) C2B8 抗体的 C1q 结合；具有人 IgG2 恒定区 (IgG2) 的 C2B8 抗体；和变体 K322A、K320A 和 E318A。

[0050] 图 3 描述变体 P331A、P329A 和 K322A 的 C1q 结合。

[0051] 图 4A 和 4B 描述 E27 抗 IgE 抗体轻链 (图 4A；SEQ ID NO：1) 和重链 (图 4B；SEQ ID NO：2) 的氨基酸序列。

[0052] 图 5 为在实施例 1 所述 FcR 检测中应用而制备的“免疫复合物”的示意图。其显示含三个抗 IgE 抗体分子 (“含 Fc 区的多肽”) 和三个 IgE 分子 (“第一靶分子”) 的六聚体。IgE 在其 Fc 区中有两个抗 IgE 抗体 (E27) 的“结合位点”。该复合物中每个 IgE 分子能够进一步与两个 VEGF 分子结合 (“第二靶多肽”)。VEGF 具有两个 IgE 结合位点。

- [0053] 图 6 表示与野生型 C2B8 相比变体 D270K 和 D270V 的 C1q 结合结果。
- [0054] 图 7 描述与野生型 C2B8 相比变体 D270K 和 D270V 的补体依赖性细胞毒作用 (CDC)。
- [0055] 图 8 表示 293 细胞产生的野生型 C2B8 抗体 (293-Wt-C2B8)、CHO 细胞产生的野生型 C2B8 抗体 (CHO-Wt-C2B8) 和各种变异抗体的 C1q 结合 ELISA 的结果。
- [0056] 图 9 表示实施例 3 中检测的野生型 (wt) C2B8 和各种变异抗体的 C1q 结合 ELISA 的结果。
- [0057] 图 10 描述人 IgG Fc 区的三维结构, 明示残基: Asp270、Lys326、Pro329、Pro331、Lys322 和 Glu333。
- [0058] 图 11 表示实施例 3 中检测的野生型 C2B8 和各种变异抗体的 C1q 结合 ELISA 的结果。
- [0059] 图 12 表示野生型 C2B8 和双变体 K326M-E333S 和 K326-E333A 的 C1q 结合 ELISA 结果。
- [0060] 图 13 表示野生型 C2B8 和双变体 K326M-E333S 和 K326-E333A 的 CDC 作用。
- [0061] 图 14 描述具有人 IgG4(IgG4) 的 C2B8、野生型 C2B8(Wt-C2B8)、具有人 IgG2 恒定区(IgG2) 的 C2B8 和所述变异抗体的实施例 3 中 C1q 结合 ELISA 的结果。
- [0062] 图 15A 和 15B 表示亲本抗体 (E27) 与 Fc γ RIIB 和 Fc γ RIIIA 的结合模式。

图 15A 表示人源化抗 IgE E27IgG1 的单体 (空心圆圈)、六聚体 (实心方形) 和由多六聚体 (实心三角) 组成的免疫复合物与人 Fc γ RIIB (CD32) 受体 α 亚单位的重组 GST 融合蛋白的结合模式。通过混合等克分子浓度的 E27 (其与人 IgE 的 Fc 区结合) 和人骨髓瘤 IgE, 形成所述六聚体复合物 (实心方形)。此六聚体是由 3 个 IgG 分子 (均为 150KD) 和 3 个 IgE 分子 (均为 200KD) 组成的稳定的 1.1kD 复合物。所述免疫复合物 (实心三角) 为依次形成, 首先通过混合等分子量的 E27 和重组抗 VEGF IgE (具有能结合人 VEGF 的 Fab 可变区结构域的人 IgE) 形成六聚体。然后通过加入 2 \times 克分子浓度的人 VEGF 而连接六聚体, 形成免疫复合物, VEGF 是 44KD 的同型二聚体, 每摩尔 VEGF 有两个抗 VEGF IgE 结合位点。

图 15B 表示与人 Fc γ RIIIA (CD16) 受体 α 亚单位的重组 GST 融合蛋白的结合模式。

[0063] 图 16A 表示利用不同抗原抗体对的免疫复合物与 Fc γ RIIA 受体 α 亚单位的重组 GST 融合蛋白的结合。

图 16B 表示相同抗原抗体对与 Fc γ RIIIA 受体 α 亚单位的重组 GST 融合蛋白的结合。实心圆代表人 IgE: IgE E27IgG1 的结合; 空心圆代表人 VEGF: 人源化抗-VEGF IgG1 的结合。

[0064] 图 17 概括了一些丙氨酸变体对不同 Fc γ R 结合选择性的差异。其显示在 IgE E27IgG1 的 CH2 结构域中丙氨酸的变体与 Fc γ RIIA、Fc γ RIIB 和 Fc γ RIIIA 的结合。1 型与所有三个受体均不结合: D278A (EU 编号方式中的 265)。2 型增强与 Fc γ RIIA 和 Fc γ RIIB 的结合, 而与 Fc γ RIIIA 的结合未受影响: S280A (EU 编号方式中的 267)。3 型增强与 Fc γ RIIA 和 Fc γ RIIB 的结合, 但降低与 Fc γ RIIIA 的结合: H281A (EU 编号方式中的 268)。4 型降低与 Fc γ RIIA 和 Fc γ RIIB 的结合, 而增强与 Fc γ RIIIA 的结合: S317A (EU 编号方式中的 298)。5 型增强与 Fc γ RIIIA 的结合, 而不影响与 Fc γ RIIA 和

Fc γ RIIB 的结合：E352A、K353A(EU 编号方式中的 333 和 334)。

[0065] 图 18A 和 18B 分别比较了 Fc γ RIIA 蛋白 / 蛋白检测和以 CHO GPI-Fc γ RIIA 细胞为基础的检测。

图 18A 说明所选丙氨酸变体与 Fc γ RIIA-GST 融合蛋白的结合。S317A(EU 编号方式中的 298) 和 S317A/K353A(EU 编号方式中的 298 和 334) 比 E27 野生型结合更好，而 D278A(EU 编号方式中的 265) 几乎完全没有结合。

图 18B 说明在表达 Fc γ RIIA 的重组 GPI 相连形式的 CHO 细胞上发现了相似的结合模式。

[0066] 图 19A 和图 19B 分别比较了 Fc γ RIIB 蛋白 / 蛋白检测和以 CHO GPI-Fc γ RIIB 细胞为基础的检测。

图 19A 说明所选丙氨酸变体与 Fc γ RIIB-GST 融合蛋白的结合。H281A(EU 编号方式中的 268) 比 E27 野生型结合更好，而 S317A(EU 编号方式中的 298) 显示结合降低。

图 19B 说明在表达 Fc γ RIIB 的重组膜结合形式的 CHO 细胞上发现了相似的结合模式。

[0067] 图 20 显示抗 HER2 IgG1 (**HERCEPTIN[®]**) 的 CH2 结构域中的单个丙氨酸取代 (在蛋白-蛋白检测和以细胞为基础的检测中均影响 Fc γ RIIA 结合) 改变了与外周血单核细胞 (PBMC) 效应细胞上的 Fc γ RIIA 结合的能力。将 100ng/ml (实心圆) 和 1.25ng/ml (实心方形) 的重组人源化抗 HER2 (**HERCEPTIN[®]**)，与 ⁵¹Cr 标记的 SK-BR-3 细胞预温育 30 分钟 (调理)，其中人源化抗 HER2 与表达 HER2 的 SK-BR-3 乳腺癌细胞结合。保持 SK-BR-3 肿瘤靶细胞的浓度恒定，效应细胞的比例从 0 增加到 100。在效应细胞：靶细胞 (E : T) 比为 100 : 1 时，在无抗体的条件下 (阴影方形) 自发的细胞毒活性为 20%。不影响 Fc γ RIIA 结合的单个丙氨酸突变，即变体 G31 = R309A (EU 编号方式中的 292)，不影响 ADCC (实心三角)。仅轻微增加对 Fc γ RIIA 的结合的单个丙氨酸突变，即变体 G30 = K307A (EU 编号方式中的 290)，也显示在浓度 1.25ng/ml 时的所有 E : T 比条件下 (实心钻石) 与 1.25ng/ml 的野生型抗体 (实心方形) 相比轻微增强 ADCC (即计算曲线下面积为 ADCC 活性增加 1.1 倍)。降低与 Fc γ RIIA 的结合的单个丙氨酸突变，变体 G34 = Q312A (EU 编号方式中的 295)，也显示降低的 ADCC 活性 (实心倒三角)。

[0068] 图 21 说明在 1.25ng/ml 时，变体中对 Fc γ RIIA 的结合具有最大程度增加的单个丙氨酸突变，即变体 G36 = S317A (EU 编号方式中的 298)，在蛋白-蛋白检测和基于细胞的检测中与野生型 (实心方形) 相比，也显示 ADCC 的最大增加 (实心三角)。G36 显示 ADCC 活性有 1.7 倍的增加，如根据曲线下面积所计算。变体 G17 = E282A (EU 编号方式中的 269) 和 G18 = D283A (EU 编号方式中的 270) 均显示与 Fc γ RIIA 的结合降低以及 ADCC 效应的降低。所述效应细胞为 PBMC。

[0069] 图 22A 描述 IgG Fc 区天然序列的对比。其显示人 IgG Fc 区的天然序列，humIgG1 (非 A 和 A 同种异型) (分别为 SEQ ID NO : 3 和 4)、humIgG2 (SEQ ID NO : 5)、humIgG3 (SEQ ID NO : 6) 和 humIgG4 (SEQ ID NO : 7)。人 IgG1 序列是非 A 同种异型，此序列和 A 同种异型之间的差别 (第 356 和 358 位；EU 编号系统) 在人 IgG1 序列的下

面示出。还显示了鼠 IgG Fc 区的天然序列，murIgG1 (SEQ ID NO : 8)、murIgG2A (SEQ ID NO : 9)、murIgG2B (SEQ ID NO : 10) 和 murIgG3 (SEQ ID NO : 11)。

图 22B 显示图 22A 中 Fc 区序列的同一性百分率。

[0070] 图 23 描述了人 IgG Fc 区天然序列 humIgG1 (非 A 和 A 同种异型；分别为 SEQ ID NO : 3 和 4)、humIgG2 (SEQ ID NO : 5)、humIgG3 (SEQ ID NO : 6) 和 humIgG4 (SEQ ID NO : 7) 的序列对比，用星号示出这些序列间的差异。

[0071] 图 24 显示在 4 小时 ADCC 检测中，所选变体与抗 HER2IgG (HERCEPTIN®) 的曲线下面积 (AUC)。效应细胞为 PBMC (N = 5)。与 Fc γ RIIIA 结合已增强的变体 G36 (S317A；EU 编号方式中的 298) 显示 ADCC 活性增加；未显示改变的 Fc γ RIIIA 结合的变体 G31 (R309A；EU 编号方式中的 292) 也未改变 ADCC 活性；与 Fc γ RIIIA 的结合已降低的 G14 (D265A；EU 编号方式中的 278) 其 ADCC 活性也降低。

具体实施方式

[0072] 1. 定义

[0073] 在本说明书和权利要求中，免疫球蛋白重链中残基的编号方式是如在 Kabat 等，免疫相关蛋白的序列，第 5 版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) (在此特别引入本文作为参考) 所述的 EU 标号。“如 Kabat 所述的 EU 标号”指人 IgG1EU 抗体的残基编号。

[0074] “亲本多肽”指包括下述氨基酸序列的多肽，所述氨基酸序列缺少一或多个在此报道的 Fc 区修饰，并且与在此报道的多肽变体相比有不同的效应功能。所述亲本多肽可以包括天然 Fc 区序列或具有先前存在的氨基酸序列修饰 (例如添加、缺失和 / 或取代) 的 Fc 区。

[0075] 术语“Fc 区”用于定义免疫球蛋白重链的 C 末端，如图 1 所示。所述“Fc 区”可以是 Fc 区天然序列或 Fc 区变体。虽然免疫球蛋白重链的 Fc 区的边界可能不同，但人 IgG 重链 Fc 区通常定义为从氨基酸残基 Cys226 或从 Pro230 到其羧基末端的一段序列。免疫球蛋白的 Fc 区通常包括两个恒定区，CH2 和 CH3，例如如图 1 所示。

[0076] 人 IgG Fc 区的“CH2 结构域” (也称为“C γ 2”结构域) 通常从约氨基酸 231 延伸到约氨基酸 340。所述 CH2 结构域的独特性在于它不与其他结构域紧密成对。而是两个 N 连接的分支糖链介于完整的天然 IgG 分子的两个 CH2 之间。推测所述糖可以为结构域-结构域配对提供取代物，并且帮助稳定 CH2 结构域。Burton, 分子免疫学 22 : 161-206 (1985)。

[0077] “CH3 结构域”包括 Fc 区中从 C 末端到 CH2 结构域的一段残基 (即 IgG 中从大约氨基酸残基 341 到约氨基酸残基 447)。

[0078] “功能性 Fc 区”拥有天然 Fc 区的“效应功能”。效应功能的实例包括 C1q 结合；补体依赖性细胞毒作用；Fc 受体结合；抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用 (ADCC)；吞噬作用；细胞表面受体的下调 (例如 B 细胞受体, BCR) 等。此效应功能通常需要 Fc 区与结合结构域 (例如抗体可变结构域) 组合，且能用诸如本文公开的各种检测方法检测。

[0079] “Fc 区天然序列”包括与自然中发现的 Fc 区的氨基酸序列相同的氨基酸序列。

人 Fc 区天然序列在图 23 中给出，其包括人 IgG1Fc 区（非 -A 和 A 同种异型）天然序列；人 IgG2Fc 区天然序列；人 IgG3Fc 区天然序列；人 IgG4Fc 区天然序列以及其自然发生的变体。鼠 Fc 区天然序列见图 22A。

[0080] “Fc 区变体”包括以至少一个在此定义的“氨基酸修饰”而区别于 Fc 区天然序列的氨基酸序列。优选所述 Fc 区变体与 Fc 区天然序列或与亲本多肽的 Fc 区相比，具有至少一个氨基酸取代，如在 Fc 区天然序列或亲本多肽的 Fc 区中约 1-10 个氨基酸取代，优选约 1-5 个氨基酸取代。所述 Fc 区变体优选与 Fc 区天然序列和 / 或与亲本多肽的 Fc 区至少有大约 80% 的同源性，最优选至少与其大约 90% 同源，更优选至少与其大约 95% 同源。

[0081] “同源性”定义为在序列对比和必要时为获得同源性最大百分率而引入空隙后变体的氨基酸序列中相同残基的百分率。用于序列对比的方法和计算机程序在本领域中众所周知。如“Align2”，Genentech Inc 所有，其与用户手册一起于 1991 年 10 月 10 日提交美国软件局，华盛顿特区 20559。

[0082] 术语“含 Fc 区的多肽”指包括 Fc 区的多肽，例如抗体或免疫粘附素（见下述定义）。

[0083] 术语“Fc 受体”或“FcR”用于描述与抗体的 Fc 区结合的受体。优选的 FcR 是人 FcR 天然序列。而且，优选的 FcR 是与 IgG 抗体（ γ 受体）结合并包括 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII 亚类（包括其等位基因变体及这些受体的另一种剪接形式）的 FcR。Fc γ RII 受体包括 Fc γ RIIA（“激活性受体”）和 Fc γ RIIB（“抑制性受体”），其具有相似的主要区别在其细胞浆结构域的氨基酸序列。激活性受体 Fc γ RIIA 在其细胞浆结构域中包含以免疫受体酪氨酸为基础的激活基序 (ITAM)。抑制性受体 Fc γ RIIB 在其细胞浆结构域中包含以免疫受体酪氨酸为基础的抑制基序 (ITIM)。（见综述 M in Daeron, 免疫学年鉴 15 : 203-234(1997)）。在 Ravetch 和 Kinet, 免疫学年鉴 9 : 457-92(1991) ; Capel 等, 免疫方法 4 : 25-34(1994) ; 和 de Haas 等, 实验室临床医学杂志 (J.Lab.Clin. Med.) 126 : 330-41(1995) 中对 FcR 进行了综述。其它 FcR, 包括将来被鉴定的 FcR 均包含在本文术语“FcR”中。该术语还包括负责将母体 IgG 转运给胎儿的新生受体 FcRn。（Guyer 等, 免疫学杂志 117 : 587(1976) 和 Kim 等, 免疫学杂志 .24 : 249(1994)）。

[0084] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒”和“ADCC”指细胞介导的反应，其中表达 FcR 的非特异性细胞毒细胞（例如自然杀伤细胞、中性粒细胞、巨噬细胞）识别在靶细胞上结合的抗体，并且在随后引起该靶细胞的裂解。介导 ADCC 的主要细胞即 NK 细胞仅表达 Fc γ RIII，而单核细胞表达 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII。在 Ravetch 和 Kinet, 免疫学年鉴 9 : 457-92(1991) 中第 464 页上的表 3 总结了在造血细胞上的 FcR 表达。

[0085] “人效应细胞”是白细胞，其表达一或多个 FcR 并且发挥效应功能。优选这些细胞至少表达 Fc γ RIII 并且发挥 ADCC 效应功能。介导 ADCC 的人白细胞的实例包括外周血单核细胞 (PBMC)、自然杀伤 (NK) 细胞、单核细胞、细胞毒 T 细胞和中性粒细胞，优选 PBMC 和 NK 细胞。所述效应细胞可以从其天然来源，例如血液或在此叙述的 PBMC 中分离。

[0086] “改变了” FcR 结合亲和力或 ADCC 活性的多肽变体是指与亲本多肽或含 Fc 区天然序列的多肽相比，提高了或降低了 FcR 结合活性和 / 或 ADCC 活性的变体。所述对

FcR “展示增强的结合”的多肽变体以比亲本多肽更强的亲和力结合至少一个 FcR。所述对 FcR “展示降低的结合”的多肽变体以比亲本多肽更弱的亲和力结合至少一个 FcR。这类展示对 FcR 降低的结合的变体可几乎或完全不与 FcR 结合，例如与 FcR 的结合为 IgG Fc 区天然序列的 0-20%（如本文实施例部分所测）。

[0087] 以比亲本多肽“更强的亲和力”与 FcR 结合的多肽变体，是指当结合试验中多肽变体和亲本多肽的量基本相同时，以比亲本抗体更强的亲和力与上述 FcR 的任一或更多结合的变体。例如，所述与 FcR 结合亲和力增强的多肽变体可展示比亲本多肽强约 1.15-100 倍，例如约 1.2-50 倍的 FcR 结合亲和力（如本文实施例所测的 FcR 结合亲和力）。

[0088] “在人效应细胞存在的条件下比亲本抗体更有效地介导抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用 (ADCC)”的多肽变体是，当试验中多肽变体和亲本抗体的量基本相同时，在体外或体内更有效介导 ADCC 的变体。通常这类变体可用本文公开的体外 ADCC 试验鉴定，但也可用其它测定 ADCC 活性的试验或方法，例如在动物模型中测定。优选变体在例如本文所述体外试验中以比亲本强约 1.5-100 倍，例如约 2-50 倍的效力介导 ADCC。

[0089] “氨基酸修饰”是指预定氨基酸序列中的改变。修饰实例包括氨基酸取代、插入和 / 或缺失。在此优选的氨基酸修饰是取代。

[0090] 特定位点，例如 Fc 区的“氨基酸修饰”指特定残基的取代或缺失，或指在特定残基附近插入至少一个氨基酸残基。在特定残基“附近”插入指在距其一到二个残基之处插入。该插入可在特定残基的 N 端或 C 端。

[0091] “氨基酸取代”是指用另一个不同的“取代”氨基酸残基取代预定氨基酸序列中已存在的至少一个氨基酸。所述取代残基可以是“天然氨基酸残基”（即由遗传密码编码）且选自：丙氨酸 (Ala)、精氨酸 (Arg)、天冬酰胺 (Asn)、天冬氨酸 (Asp)、半胱氨酸 (Cys)、谷氨酰胺 (Gln)、谷氨酸 (Glu)、甘氨酸 (Gly)、组氨酸 (His)、异亮氨酸 (Ile)、亮氨酸 (Leu)、赖氨酸 (Lys)、甲硫氨酸 (Met)、苯丙氨酸 (Phe)、脯氨酸 (Pro)、丝氨酸 (Ser)、苏氨酸 (Thr)、色氨酸 (Trp)、酪氨酸 (Tyr) 和缬氨酸 (Val)。优选所述的取代残基不是半胱氨酸。用一或多个非天然氨基酸残基进行的取代也包含在本文的氨基酸取代的定义中。“非天然氨基酸残基”指除上文所列天然氨基酸残基以外的，能在肽链中与相邻氨基酸残基共价结合的那些。非天然氨基酸残基包括正亮氨酸、鸟氨酸、正缬氨酸、同型丝氨酸和其它氨基酸残基类似物，如 Ellman 等，酶学方法 202：301-336 (1991) 所述的那些。为了制备这些非天然氨基酸，可以应用 Noren 等，科学 244：182 (1989) 和 Ellman 等，出处同上的方法。简言之，这些方法涉及化学激活非天然氨基酸残基的抑制性 tRNA，随后进行该 RNA 的体外转录和翻译。

[0092] “氨基酸插入”是指向预定氨基酸序列中掺入至少一个氨基酸。虽然所述插入通常包括一或二个氨基酸残基的插入，但本发明考虑更大的“肽插入子”，例如约 3-5 个或高达约 10 个氨基酸残基的插入。被插入的残基可以是上述的天然或非天然残基。

[0093] “氨基酸缺失”是指从预定氨基酸序列中除去至少一个氨基酸残基。

[0094] “铰链区”通常定义为从人 IgG1 的 Glu216 到 Pro230 的一段序列 (Burton, 分子免疫学 22：161-206 (1985))。通过将形成重链内 S-S 键的第一个和最后一个半胱氨酸放置在相同的位置上，可以将其它 IgG 同种型的铰链区与 IgG1 序列对比排列。

[0095] Fc 区的“低铰链区”通常定义为从铰链区 C 末端最端处即 Fc 区的残基 233 到残基 239 的一段序列。在本发明之前，Fc γ R 结合通常归因于 IgG Fc 区的低铰链区中的氨基酸残基。

[0096] “C1q”是包括针对免疫球蛋白 Fc 区的结合位点的多肽。C1q 与两个丝氨酸蛋白酶 C1r 和 C1s 共同形成复合物 C1，其是补体依赖性细胞毒 (CDC) 途径中的第一个组分。人 C1q 可从如 Quidel, San Diego, CA 等厂家购得。

[0097] 术语“结合结构域”是指多肽中结合另一分子的区域。对于 FcR，结合结构域可以包括多肽链中负责与 Fc 区结合的部分。一个有用的结合结构域是 FcR α 链的细胞外结构域。

[0098] 术语“抗体”是指最广泛意义上的抗体，特别包括单克隆抗体（包括全长单克隆抗体）、多克隆抗体、多特异性抗体（例如双特异性抗体）和抗体片段，只要它们呈现所需生物学活性。

[0099] 为本发明的目的而定义的“抗体片段”包括完整抗体的一部分，通常包括完整抗体的抗原结合区或可变区，或是抗体中保留 FcR 结合能力的 Fc 区。抗体片段的实例包括线性抗体；单链抗体分子；和由抗体片段形成的多特异性抗体。抗体片段优选至少保留铰链区的部分并可任选保留 IgG 重链的 CH1 区。更优选抗体片段保留一条 IgG 重链的完整恒定区并且包括一条 IgG 轻链

[0100] 在本文中应用的术语“单克隆抗体”是指得自基本同源之抗体群的抗体，即包含所述群体的各个抗体除了可能小量出现的突变外是相同的。单克隆抗体具有高度特异性，直接针对单个抗原性位点。而且，与通常含直接针对不同决定簇（表位）之不同种抗体的传统（多克隆）抗体制剂相反，每种单克隆抗体直接针对抗原上的单个决定簇。修饰语“单克隆”指抗体的得自基本同源性抗体群的特点，不应理解为需要通过任何特定方法产生抗体。例如，根据本发明所用的单克隆抗体可以通过杂交瘤方法制备（此方法首先在 Kohler 等，自然 256：495(1975) 中叙述），或可以通过重组 DNA 方法制备（例如见美国专利 4816567）。还可利用如 Clackson 等，自然 352：624-628(1991) 和 Marks 等，分子生物学杂志 222：581-597(1991) 所述方法，从噬菌体抗体文库中分离“单克隆抗体”。

[0101] 本文中的单克隆抗体尤其包括“嵌合”抗体（免疫球蛋白），其中重链和 / 或轻链的一部分与来自特定物种或属于特定抗体类型或亚类之抗体的相应序列相同或同源，而链的其余部分同源或相同于另一物种或另一抗体类型或亚类的抗体的相应序列，以及这类抗体的片段，只要它们表现所需生物学活性（美国专利 4816567；和 Morrison 等，美国国家科学院院刊 81：6851-6855(1984)）。

[0102] 非人类（例如鼠类）抗体的“人源化”形式是包括非人类免疫球蛋白最小序列的嵌合抗体。大多数情况下，人源化抗体是人免疫球蛋白（受者抗体），其中受者抗体超变区的残基被来自非人物种（供者抗体），例如小鼠、大鼠、家兔或非人类灵长类动物的具有所需特异性、亲和力和能力的超变区残基取代。在一些实例中，人免疫球蛋白 Fv 框架区 (FR) 的残基被相应的非人类残基代替。而且，人源化抗体可以包括在受者抗体或供者抗体中没有的残基。这些修饰用于进一步改进抗体特性。通常，人源化抗体基本上包括至少一个，通常两个可变区的全部，其中所有或基本上所有的超变环均对应

于非人类免疫球蛋白的超变环，而且所有或基本上所有的 FR 区是人免疫球蛋白序列的那些。人源化抗体还任选至少包括免疫球蛋白恒定区 (Fc) 的一部分，通常是人免疫球蛋白的一部分。其细节见 Jones 等，自然 321：522-525(1986)；Riechmann 等，自然 332：323-329(1988)；和 Presta，*Curr.Op.Struct.Biol*2：593-596(1992)。

[0103] 在本文中术语“超变区”是指抗体中负责与抗原结合的氨基酸残基。超变区包括来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸序列（即轻链可变区的残基 24-34(L1)、50-56(L2) 和 89-97(L3)，以及重链可变区的残基 31-35(H1)、50-65(H2) 和 95-102(H3)；Kabat 等，免疫相关蛋白的序列，第 5 版 *Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD*(1991)) 和 / 或来自“超变环”的氨基酸序列（即轻链可变区的残基 26-32(L1)、50-52(L2) 和 91-96(L3)，以及重链可变区的残基 26-32(H1)、53-55(H2) 和 96-101(H3)；Chothia 和 Lesk 分子生物学杂志 196：901-917(1987))。“框架”或“FR”残基是不同于本文定义的超变区残基的那些可变区残基。

[0104] 在本文中术语“免疫粘附素”定义为抗体样分子，其将异源“粘附素”蛋白（例如受体、配体或酶）的结合结构域与免疫球蛋白恒定区组合。结构上，免疫粘附素包括具有所需结合特异性之粘附素氨基酸残基与免疫球蛋白恒定区序列的融合，所述粘附素氨基酸不同于抗体的抗原识别和结合位点（抗原结合位点）（即为“异源性”）。

[0105] 本文中术语“配体结合结构域”是指细胞表面任何天然受体，或者其至少保留了性质上对应于天然受体的配体结合能力的任何区域或衍生物。在具体的实施方案中，所述受体来自具有与免疫球蛋白超家族成员同源的细胞外结构域的细胞表面多肽。其它不属于免疫球蛋白超家族但是明确属于此定义的受体，是细胞因子受体，尤其是具有酪氨酸激酶活性的受体（受体酪氨酸激酶），生血素和神经生长因子受体超家族的成员，和细胞粘附分子，例如 (E-、L- 和 P-) 选择素。

[0106] 术语“受体结合结构域”用于定义受体的任何天然配体，包括细胞粘附分子，或者这类天然配体的至少保留性质上对应于天然配体之受体结合能力的任何区域或衍生物。此定义尤其包括上述受体之配体的结合序列。

[0107] “抗体免疫粘附素嵌合体”包括使抗体的至少一个结合结构域（在本文中定义的）与至少一个免疫粘附素（在本申请中定义的）组合的分子。抗体-免疫粘附素嵌合体的实例是双特异性 CD4-IgG 嵌合体，见 Berg 等，*PNAS (USA)* 88：4723-4727(1991) 和 Chamow 等，免疫学杂志，153：4268(1994)。

[0108] “分离”的多肽是指经鉴定并且被分离和 / 或从其天然环境中的组分中回收的多肽。其天然环境中的污染组分是可能影响所述多肽的诊断或治疗性应用的物质，可以包括酶、激素和其它蛋白或非蛋白溶质。在优选的实施方案中，所述多肽被纯化 (1) 达到用 Lowry 法所测的肽重量大于 95%，更优选大于 99%，(2) 达到足以通过应用 spinning cup 序列分析仪获得至少 15 个残基的 N 末端或内部氨基酸序列的程度，或 (3) 达到匀质性，如还原或非还原条件下的 SDS-PAGE 及考马斯蓝染色或优选银染所测定。分离的多肽包括重组细胞内的原位多肽，因为该多肽天然环境的至少一个组分将不存在。然而，分离的多肽通常通过至少一个纯化步骤制备。

[0109] “治疗”是指治疗性处理以及预防或防止性处理。需要治疗的情况包括那些已

经患病和将被阻止疾病的情况。

[0110] “疾病”是指可能从所述多肽变体的治疗中获益的任何情况。这包括慢性和急性疾病或病症，包括使哺乳动物对所述疾病易感的那些病理状况。在一个实施方案中，所述疾病是癌症。

[0111] 术语“癌症”和“癌的”是指或描述哺乳动物的生理状况，其以不受调节的细胞生长为典型特征。癌症的实例包括但不限于癌、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤和白血病。这些癌的更具体的实例包括鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、肺鳞癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃肠道癌、胰腺癌、成胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌、结直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、肝癌、前列腺癌、外阴部癌、甲状腺癌、肝细胞癌和各种类型的头颈部癌。

[0112] “表达 HER2 的癌”是包含下述细胞的癌症，所述细胞在其表面存在 HER2 受体蛋白 (Semba 等, PNAS (USA) 82: 6497-6501 (1985) 和 Yamamoto 等, 自然 319: 230-234 (1986) (Genebank 登记号 X03363)), 使得 HER2 抗体可以与该癌症结合。

[0113] 本文应用的单词“标记”是指直接或间接与所述多肽相连的可检测的化合物或组合物。所述标记可以是其本身可被检测 (例如放射性同位素标记或荧光标记), 或者在酶标记情况下, 可以催化可检测的底物化合物或组合物之化学变化。

[0114] “分离”的核酸分子是已被鉴定的, 从至少一种污染的核酸分子中分离的核酸, 所述污染的核酸分子通常与所述分离的核酸分子在所述多肽核酸的天然源中相关。分离的核酸分子不同于其天然形式。因此, 分离的核酸分子区别于天然细胞中存在的核酸分子。然而, 分离的核酸分子包括一般性表达所述多肽之细胞中的核酸分子, 例如该核酸分子在染色体上不同于天然细胞中的位置上。

[0115] “调控序列”是指可操作连接的编码序列在特定宿主细胞中表达所必需的序列。适合于原核生物的调控序列有启动子、可任选择操纵子序列和核糖体结合位点。已知真核细胞可利用启动子、聚腺苷酸化位点和增强子。

[0116] 当使核酸与另一核酸序列功能关联时, 该核酸被“可操作地连接”。例如, 如果一种多肽表达为参与该多肽分泌的前蛋白, 则可将前序列或分泌性前导序列的 DNA 可操作地与该多肽的 DNA 连接; 如果一种启动子或增强子可影响编码序列的转录, 则将其可操作地与该编码序列连接; 或可将核糖体结合位点与编码序列连接以利于翻译。通常, “可操作连接的”指待连接的 DNA 序列是连续的, 如果是分泌性前导序列, 则是连续的并为可读取的。但增强子不必连续。可通过在常规限制性位点的连接来实现连接。如果不存在这样的位点, 可按常规实践利用合成的寡核苷酸接头或连接子。

[0117] 本文中, “细胞”“细胞系”“细胞培养物”可互换使用并且所有这些定义包括子代。因此, 单词“转化体”和“转化细胞”包括原代受试者细胞及其衍生的培养物而不考虑传代次数。还应该理解由于有意和非有意的突变, 所有子代细胞的 DNA 含量可能不完全相同。与在原始转化细胞中所筛选之功能或生物活性相同的突变子代也包括在内。需要指出差别之处可根据上下文明确。

[0118] 本文中, 术语“分子复合物”是指当两个或多个异源分子 (例如多肽) 与另一个分子结合时形成地相对稳定地结构。在本文中优选的分子复合物是免疫复合物。

[0119] “免疫复合物”是指当至少一个靶分子和至少一个含异源 Fc 区的多肽与另一个

分子结合形成大分子量复合物而形成的相对稳定的结构。免疫复合物的实例是抗原抗体聚合物和靶分子-免疫粘附素聚合物。除非指明，在本文中术语“免疫复合物”是指体外 (ex vivo) 复合物 (即非天然形式)。然而，所述免疫复合物可以给哺乳动物施用，例如用来检测哺乳动物中免疫复合物的清除

[0120] 术语“靶分子”是指能够被异源分子结合并具有针对该异源分子的一个或多个结合位点的分子，通常是多肽。术语“结合位点”是指该分子中另外一个分子能够与之结合的区域。在本文中“第一靶分子”包括至少两个不同的分析物 (例如含 Fc 区的多肽) 的结合位点 (例如，两个到五个独立的结合位点)，以使第一靶分子可以结合至少两个分析分子。在本发明的优选实施例中，所述两个或更多的结合位点是相同的 (例如具有相同的氨基酸序列，此时靶分子是多肽)。下述的实施例 1 中，所述第一靶分子是 IgE，并且在其 Fc 区中具有两个独立的能与含 Fc 区多肽结合的结合位点。其它的第一靶分子包括基本上相同的单体的二聚体 (例如神经营养素，IL8 和 VEGF)，或者是包括两个或更多的基本上相同的多肽链的多肽 (例如抗体或免疫粘附素)。“第二靶分子”包括针对第一靶分子的至少两个不同结合位点 (例如两个至五个独立的结合位点)，以使第二靶分子能够与至少两个第一靶分子结合。优选所述两个或更多的结合位点相同 (例如具有相同的氨基酸序列，此时所述靶分子是多肽)。在实施例 2 中，第二靶分子是 VEGF，其具有一对不同的能与 IgE 抗体可变区结合的结合位点。也可包括其它第二靶分子，例如基本上相同的单体的其它二聚体 (例如神经营养素或 IL8) 或包括两个或更多的基本上相同的结构域的多肽 (例如抗体或免疫粘附素)。

[0121] “分析物”是将要被分析的物质。优选的分析物是将要对其结合 Fc 区受体的能力进行分析的含 Fc 区的多肽。

[0122] “受体”是能够结合至少一个配体的多肽。优选的受体是具有细胞外配体结合结构域，并任选其它结构域 (例如跨膜结构域，细胞内结构域和 / 或膜锚定结构域) 的细胞表面受体。在本文所述试验中被检测的受体可以是完整受体或其片段或衍生物 (例如融合蛋白，其包括该受体的与一个或多个异源多肽融合的结合结构域)。而且，所述待检测其结合特性的受体可以存在于细胞中，或已被分离并可选择包被在试验板或某些其它固相上。

[0123] 短语“低亲和力受体”指与目的配体有较弱结合亲和力的受体，例如结合常数为大约 50nM 或更低。低亲和力受体的实例包括 Fc γ RII 和 Fc γ RIII。

[0124] II. 实施本发明的模式

[0125] 本发明涉及制备多肽变体的方法。“亲本”、“起始”、“非变体”多肽利用本领域中制备含 Fc 区的多肽的可行技术制备。在本发明的优选实施方案中，所述亲本多肽是抗体，下文详述了抗体制备方法的实例。然而所述亲本多肽可以是包括 Fc 区的任何其它多肽，例如免疫粘附素。免疫粘附素制备方法详见下文。

[0126] 在另一实施方案中，可根据本文所述方法制备 Fc 区变体，此“Fc 区变体”可以与所选异源多肽，例如抗体可变区或受体或配体的结合结构域融合

[0127] 亲本多肽包括 Fc 区，通常亲本多肽的 Fc 区将包括 Fc 区天然序列，优选人类 Fc 区天然序列。然而，所述亲本多肽的 Fc 区可以在 Fc 区天然序列中具有一或多个已存在的氨基酸序列改变或修饰。例如，Fc 区的 C1q 结合活性已改变 (Fc 区修饰的其它类型详

见下文)。在另一个实施方案中,所述亲本多肽 Fc 区是“概念上的”,并且虽然它在实际上不存在,但可根据所需 Fc 区变体的氨基酸序列实施抗体工程,产生含此序列的多肽或编码所需 Fc 区变体氨基酸序列的 DNA。

[0128] 在本发明优选实施方案中,已有编码亲本多肽 Fc 区的核酸,且此核酸序列已被改变以产生编码所述 Fc 区变体的变异性核酸序列。

[0129] 编码起始多肽之氨基酸序列变体的 DNA 可通过本领域已知的各种方法制备。这些方法包括,但不限于,通过对已制备的该多肽的 DNA 进行定点(或寡核苷酸介导的)诱变、PCR 诱变和盒式诱变来制备。

[0130] 定点诱变是制备取代变体的优选方法。此技术在本领域中众所周知(见例如 Carter 等,核酸研究 13:4431-4443(1985)和 Kunkel 等美国国家科学院院刊 82:488(1987))。简言之,在进行 DNA 的定点诱变中,首先将编码所需突变的 DNA 和起始 DNA 的单链杂交,以改变起始 DNA。杂交之后,利用所述杂交的寡核苷酸作为引物并利用该起始 DNA 的单链作为模板,应用 DNA 聚合酶来合成完整的第二链。从而将编码所需突变的寡核苷酸掺入到所得双链 DNA 中。

[0131] PCR 诱变也适合于制备起始多肽的氨基酸序列变体。见 Higuchi, PCR 实验方法, pp.177-183(Academic Press, 1990); 和 Vallette 等核酸研究 .17:723-733(1989)。简言之,当少量模板 DNA 被用作 PCR 的起始物质时,可以利用与模板 DNA 相应区有略微差异的引物,扩增相对大量的特异性 DNA 片段,其只在引物与模板不相同的位点上与模板的序列不相同。

[0132] 用于制备变体的另外一种方法,盒式诱变,是以 Well 等,基因 34:315-323(1985)中叙述的方法为基础。起始材料是包括用来突变的起始多肽的质粒(或其它载体)。鉴定用来突变的起始 DNA 中的密码子。在确定的突变位点的每侧必须有一个唯一的限制性内切酶位点。如果没有这样的限制性位点,可以利用上述寡核苷酸介导的诱变产生并将其引入起始多肽 DNA 中适当位点。将质粒 DNA 在这些位点切割,使其线性化。利用标准方法合成编码限制性位点之间但包括所需突变的 DNA 序列的双链寡核苷酸,其中寡核苷酸的双链被分别合成,然后利用标准技术使其杂交。此双链寡核苷酸被称为盒。此盒被设计成具有与线性质粒的末端相适合的 5' 和 3' 末端,以使它可以直接与质粒相连接。此时此质粒包含了突变的 DNA 序列。

[0133] 或者或另外,可以确定编码多肽变体的所需氨基酸序列,并且可以合成编码此氨基酸序列变体的核酸序列。

[0134] 为了制备具有改变了的体外和/或体内 Fc 区受体结合亲和力或活性,和/或改变了的体外和/或体内抗体依赖性细胞介导的细胞毒(ADCC)活性的 Fc 区变体,对所述亲本多肽的氨基酸序列进行修饰。

[0135] 通常,所述的修饰需要一或多个氨基酸取代。在一个实施方案中,取代残基不对应于图 22A 中任何 Fc 区天然序列中相同位点上存在的残基。例如,根据本发明该实施方案,将人 IgG3 或 IgG1Fc 区的 Pro331 用除 Ser(在人 IgG4 天然序列中相应位点发现的残基)以外的残基代替。在一个实施方案中,在亲本多肽中被取代残基所取代的残基不是丙氨酸和/或不是 Fc 区的残基 Ala339。在氨基酸取代的情况中,亲本多肽中的残基优先用丙氨酸残基取代。然而,本发明考虑了用任何其它氨基酸残基取代亲本多肽的残

基。例如所述取代可以是保守取代。这些保守取代见题为“优选取代”的表 1 所示。通过制备一或多个非表 1 优选的“取代举例”可获得更多的实质变化。

[0136] 表 1

[0137]

原始残基	取代举例	优选取代
Ala(A)	val ; leu ; ile	val
Arg(R)	lys ; gln ; asn	lys
Asn(N)	gln ; his ; lys ; arg	gln
Asp(D)	glu	glu
Cys(C)	ser	ser
Gln(Q)	asn	asn
Glu(E)	asp	asp

[0138]

Gly(G)	pro ; ala	ala
His(H)	asn ; gln ; lys ; arg	arg
Ile(I)	leu ; val ; met ; ala ; phe ; 正亮氨酸	leu
Leu(L)	正亮氨酸 ; ile ; val ; met ; ala ; phe	ile
Lys(K)	arg ; gln ; asn	arg
Met(M)	leu ; phe ; ile	leu
Phe(F)	leu ; val ; ile ; ala ; tyr	leu
Pro(P)	ala	ala
Ser(S)	thr	thr
Thr(T)	ser	ser
Trp(W)	tyr ; phe	tyr
Tyr(Y)	trp ; phe ; thr ; ser	phe
Val(V)	ile ; leu ; met ; phe ; ala ; 正亮氨酸	leu

[0139] 对 Fc 区生物学特性的实质修饰，可以通过选择下述取代而完成，所述取代的效应明显不同于在维持：(a) 取代区中多肽主链的结构，例如片层或螺旋构象，(b) 靶位点上该分子的电荷或疏水性，或 (c) 侧链的体积这几方面的效应。天然残基根据共有侧链特性被分成几种：

[0140] (1) 疏水性：正亮氨酸，met，ala，val，leu，ile；

[0141] (2) 中性亲水：cyc，ser，thr；

[0142] (3) 酸性：asp，glu；

[0143] (4) 碱性：asn，gln，his，lys，arg；

[0144] (5) 影响链方向的残基：gly，pro；

[0145] (6) 芳香族：trp，tyr，phe。

[0146] 非保守取代需要将这些类型的一个成员与另一类的成员互换。下表 8 中列举了保守和非保守的氨基酸取代。

[0147] 在本文实施例 4 中证实，可通过工程手段制备对一或多个 FcR 的结合亲和力已改变的 Fc 区变体。如该实施例中所示，可以制备 Fc 区变体的不同类型，例如下述表中的总结。当 Fc 区变体具有多于一个的氨基酸取代时，通常，但并非必须，将相同类型中的氨基酸取代组合以得到所需结果。

[0148] 表 2 Fc 区变体的类型

[0149]

类型	FcR 结合特性	Fc 区取代的位置
1A	与所有 Fc γ R 的结合均降低	238、265、269、270、297*、327、329
1B	与 Fc γ R II 和 Fc γ R III 的结合均降低	239、294、295、303、338、373、376、416、435
2	与 Fc γ R II 和 Fc γ R III 的结合增强	256、290、312、326、330、339#、378、430
3	与 Fc γ R II 结合的增强，不影响与 Fc γ R III 的结合	255、258、267、276、280、283、285、286、305、307、309、315、320、331、337、398
4	与 Fc γ R II 的结合增强，与 Fc γ R III 的结合降低	268、272、301、322、340
5	与 Fc γ R II 的结合降低，不影响与 Fc γ R III 的结合	292、324、335、414、419、438、439
6	与 Fc γ R II 的结合降低，与 Fc γ R III 的结合增强	298、333
7	不影响与 Fc γ R II 的结合，与 Fc γ R III 的结合降低。	248、249、252、254、278、289、293、296、338、382、388、389、434、437
8	不影响 Fc γ R II 的结合，与 Fc γ R III 的结合增强	334、360

[0150] * 去糖基化类型

[0151] # 优选与其它 Fc 区修饰联合（例如如本文中报道）

[0152] 除了氨基酸取代，为了制备具有改变了的效应功能的 Fc 区变体，本发明考虑对亲本 Fc 区氨基酸序列的其它修饰。

[0153] 例如，为了降低与 FcR 的结合，可以删掉 Fc 区的一或多个氨基酸残基。通常，为了制备此 Fc 区变体，去除 Fc 区中在此鉴定的影响 FcR 段结合的一个或多个残基（见下文实施例 4）。通常，根据本发明的这个实施例，不超过大约 1-10 个的 Fc 区残基将被删除。包括一个或更多氨基酸缺失的所述 Fc 区优选保留人 Fc 区天然序列或亲本 Fc 区的至少约 80%，更优选保留至少大约 90%，最优选保留至少大约 95%。

[0154] 可以制备改变了效应功能的氨基酸插入型 Fc 区变体。例如可以在一个或多个在此鉴定为影响 FcR 结合的 Fc 区位点附近引入至少一个氨基酸残基（例如 1-2 氨基酸残基，通常不超过 10 个）。“附近”是指距在此鉴定的 Fc 区残基在 1-2 个氨基酸残基之内。这类 Fc 区变体可以呈现增强或降低的 Fc 区结合和 / 或 ADCC 活性。为了制备这类插入型变体，可评估含 FcR 结合区（例如目的 FcR 的细胞外结构域）之多肽与待插入氨基酸残基之 Fc 区的共结晶结构，以便涉及具有，例如增强的 FcR 结合能力的 Fc 区变体（例见 Deisenhofer, 生物化学 20(9) : 2361-2370(1981) ; Burnmeister 等, 自然 342 : 379-383(1994)）。这类插入通常被置于 Fc 区环中，但不在 Fc 区的二级结构（即 β 链）中。

[0155] 通过在亲本 Fc 区中引入适当的氨基酸序列修饰，能够制备在人效应细胞存在的条件下比亲本多肽更有效地介导抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用（ADCC）和 / 或以更强地亲和力结合 Fc γ 受体（Fc γ R）的 Fc 区变体。此 Fc 区变体通常在 Fc 区中包括至少一个氨基酸修饰。优选组合多个氨基酸修饰。例如，Fc 区变体可包括 2、3、4、5 等个取代，如在此鉴定的特异性 Fc 区位点。

[0156] 所述亲本多肽 Fc 区优选人 Fc 区，例如人 IgG1(A 或非 A 同种型)、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 Fc 区天然序列。这类序列见图 23。

[0157] 为了制备 ADCC 活性增强的 Fc 区，亲本多肽优选预先存在 ADCC 活性，例如它包括人 IgG1 或人 IgG3Fc 区。在一个实施方案中，ADCC 活性增强的变体比具有 IgG1 或 IgG3Fc 区天然序列及该变体抗原结合区域的抗体实质上更有效地介导 ADCC。优选所述变体包含 Fc 区 298、333 和 334 位上的 2-3 个残基取代，或基本由这些取代组成。最优选位点 298、333 和 334 上的残基被取代（例如用丙氨酸残基取代）。而且，为了制备 ADCC 活性增强的 Fc 区变体，通常通过工程化手段产生对 Fc γ R III 的结合亲和力增强的 Fc 区变

体, Fc γ RIII 被认为是在介导 ADCC 时重要的 FcR。例如, 可以在亲本 Fc 区 256、290、298、312、326、330、333、334、360、378 或 430 的任何一或多个氨基酸位点上引入氨基酸修饰, 以产生这类变体。对 Fc γ RIII 的结合亲和力已增强的变体可以进一步具有对 Fc γ RII 的降低的结合亲和力, 尤其是对 Fc γ RIIB 受体的降低的结合亲和力。

[0158] 优选将氨基酸修饰引入 Fc 区的 CH2 结构域, 因为本文实验表明 CH2 结构域对于 FcR 结合活性很重要。而且, 与上述领域的介绍不一样, 本申请考虑了将修饰引入 Fc 区而不是引入其低铰链区。

[0159] 适于修饰以产生与 Fc γ 受体 (Fc γ R) 结合亲和力或活性已降低的 IgG Fc 区变体的氨基酸位点包括 Fc 区中下述氨基酸位点的任何一个或多个: 238、239、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、329、330、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438 或 439。作为产生此类变体的模板的亲本 Fc 区优选包括人 IgG Fc 区。当残基 331 被取代时, 所述亲本 Fc 区优选非人 IgG3 天然序列, 或者含位点 331 处之取代的 Fc 区变体优选呈现增强的 FcR 结合, 例如与 Fc γ RII 的结合。

[0160] 为了产生与 Fc γ R 的结合降低的 Fc 区变体, 可以在所述 Fc 区的下述任何一个或多个位点上引入氨基酸修饰, 所述位点为 238、239、248、249、252、254、265、268、269、270、272、278、289、292、293、294、295、296、298、301、303、322、324、327、329、333、335、338、340、373、376、382、388、389、414、416、419、434、435、437、438 或 439。

[0161] 呈现与 Fc γ RI 的结合降低的变体包括在 Fc 区的 238、239、269、270、327、或 329 之任一或多个氨基酸位点上含有氨基酸修饰的那些变体。

[0162] 呈现与 Fc γ RII 的结合降低的变体包括在 Fc 区的 238、265、269、270、292、294、295、298、303、324、327、329、333、335、338、373、376、414、416、419、435、438 或 439 之任一或多个氨基酸位点上含有氨基酸修饰的那些变体。

[0163] 呈现与 Fc γ RIII 的结合降低的变体包括在 Fc 区的 238、239、248、249、252、254、265、268、269、270、278、289、293、294、295、296、301、303、322、327、329、338、340、373、376、382、388、389、416、434、435 或 437 之任一或多个氨基酸位点上含有氨基酸修饰的那些变体。

[0164] 还可以制备与一或多个 Fc γ R 结合增强的变体。这类 Fc 区变体可以在 Fc 区的 255、256、258、267、268、272、276、280、283、285、286、290、298、301、305、307、309、312、315、320、322、326、330、331、333、334、337、340、360、378、398 或 430 之任一或多个氨基酸位点上含有氨基酸修饰的那些变体。

[0165] 例如, Fc γ R 结合活性增强的变体可以呈现与 Fc γ RIII 结合的增强, 并可任选另呈现与 Fc γ RII 结合的降低; 例如所述变体可在 Fc 区的 298 和 / 或 333 位上包含氨基酸修饰。

[0166] 与 Fc γ RII 的结合增加的变体包括在 Fc 区的 255、256、258、267、268、272、276、280、283、285、286、290、301、305、307、309、312、315、320、322、326、

330、331、337、340、378、398 或 430 之任一或多个氨基酸位点上含有氨基酸修饰的那些变体。这类变体可以进一步呈现与 Fc γ R III 结合的降低。例如它们可以在 Fc 区的 268、272、298、301、322 或 340 之任一或多个氨基酸位点上含有氨基酸修饰。

[0167] 虽然优选改变与 Fc γ R 的结合，但是本发明也考虑了对新生受体 (FcRn) 的结合亲和力已改变的 Fc 区变体。预计 FcRn 亲和力提高的 Fc 区变体具有更长的血清半衰期，因此这类分子可在要求所用多肽之半衰期较长的动物治疗方法，例如慢性疾病的治疗中应用。相反，预计 FcRn 结合亲和力降低的 Fc 区变体具有较短的半衰期，因此这类分子可在例如缩短循环时间有利的情况，如体内诊断显影或当多肽在血循环中长期存在将具有副作用时，给哺乳动物服用。预计 FcRn 结合亲和力降低的 Fc 区变体不太可能通过胎盘，因此可以用于治疗孕期妇女的疾病或病症。

[0168] 改变了与 FcRn 的结合亲和力的 Fc 区变体包括在 Fc 区的 238、252、253、254、255、256、265、272、286、288、303、305、307、309、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、386、388、400、413、415、424、433、434、435、436、439 或 447 之任一或多个氨基酸位点上含有氨基酸修饰的那些变体。与 FcRn 的结合降低的变体通常包括在 Fc 区的 252、253、254、255、288、309、386、388、400、415、433、435、436、439 或 477 之任一或多个氨基酸位点上含有氨基酸修饰的那些变体；与 FcRn 的结合增强的变体通常包括在 Fc 区的 238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424 或 434 之任一或多个氨基酸位点上含有氨基酸修饰的那些变体。

[0169] 按上述方法制备的多肽变体，可以进行进一步的修饰，其通常依赖于多肽的应用目的。这样的修饰可以涉及氨基酸序列的进一步改变（氨基酸的取代、插入和 / 或缺失）、与异源多肽的融合和 / 或共价修饰。此“进一步修饰”可以在进行上述导致 Fc 受体结合和 / 或 ADCC 活性改变的氨基酸修饰之前、同时或之后进行。在一个实施方案中，将本文的 Fc 区修饰与本申请“相关领域”部分所引用文献中公开的 Fc 区取代组合。

[0170] 或者或另外，将上述氨基酸修饰与改变 Fc 区的 C1q 结合和 / 或补体依赖性细胞毒作用的一个或多个氨基酸修饰联合，可能是有用的。

[0171] 特定目的的起始多肽通常是与 C1q 结合且呈现补体依赖性细胞毒作用 (CDC) 的多肽。本文所述“进一步的氨基酸修饰”通常用于改变起始多肽与 C1q 结合的能力和 / 或改变其补体依赖性细胞毒作用，例如降低且优选消除这些功能。然而，本文亦涉及在一个或多个所需位置上含有取代并增强了 C1q 结合和 / 或补体依赖性细胞毒作用 (CDC) 的多肽。例如，起始多肽可能不能结合 C1q 和 / 或介导 CDC，可以根据本文对其进行修饰，以使其获得这些进一步的效应功能。此外，可以对已具有 C1q 结合活性并可能还具有介导 CDC 之能力的多肽进行修饰，以增强这些活性中的一个或两个。

[0172] 为了制备改变了 C1q 结合和 / 或补体依赖性细胞毒 (CDC) 作用的 Fc 区，被修饰的氨基酸位点通常选自重链位点 270、322、326、327、329、331、333 和 334，其中 IgG 重链的残基编号是 EU 标号，见 Kabat 等，免疫相关蛋白的序列，第 5 版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991)。在一个实施方案中，仅改变上述 8 个位点中的一个来制备改变了 C1q 结合和 / 或补体依赖性细胞毒 (CDC) 功能的多肽变异区。这种情况下，优选仅改变残基 270、329 或 322。或者，对上述位点的两个

或多个进行修饰。如果想使多个取代组合，通常使增加人 C1q 结合的取代（例如在氨基酸位点 326、327、333 和 334）或降低人 C1q 结合的取代（例如在 270、322、329 和 331 上）组合。在后一实施方案中，可取代所有四个位点（即 270、322、329 和 331）。优选组合 326、327、333 或 334 位中的两个、三个或所有位点上的进一步取代，还可任选组合其它 Fc 区取代，以制备体内或体外增强了人 C1q 结合并优选增强了 CDC 活性的多肽。

[0173] 脯氨酸在人 IgG 中 329 位上是保守的。该残基优选丙氨酸取代，但本发明也涉及用任何其它氨基酸进行取代，例如丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、甘氨酸或缬氨酸。

[0174] 脯氨酸在人 IgG1、IgG2 和 IgG3 的 331 位上是保守的，但在 IgG4 中不是（其在位点 331 上是丝氨酸）。残基 331 优选丙氨酸或另一氨基酸如丝氨酸（用于 IgG 区域而不是 IgG4）、甘氨酸或缬氨酸等取代。

[0175] 人 IgG 中赖氨酸 322 是保守氨基酸，该残基优选丙氨酸残基取代，但也可用任何其它氨基酸，例如丝氨酸、苏氨酸、甘氨酸或缬氨酸取代。

[0176] 人 IgG 中 D270 是保守氨基酸，此残基可以被另一氨基酸，如丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、甘氨酸、缬氨酸或赖氨酸取代。

[0177] 人 IgG 中 K326 是保守氨基酸，此残基可以被其它氨基酸残基取代，这些氨基酸包括但不限于缬氨酸、谷氨酸、丙氨酸、甘氨酸、天冬氨酸、甲硫氨酸或色氨酸，优选色氨酸。

[0178] 同样，人 IgG 中 E333 是保守氨基酸。E333 优选被具有较小侧链的氨基酸残基取代，例如缬氨酸、甘氨酸、丙氨酸或丝氨酸，优选丝氨酸。

[0179] 人 IgG 中 K334 是保守氨基酸，且可以用如丙氨酸或其它残基将其取代

[0180] 在人 IgG1 和 IgG3 中，残基 327 是丙氨酸。为了制备 C1q 结合增强的变体，可以用甘氨酸等其它残基取代此丙氨酸。在人 IgG2 和 IgG4 中，残基 327 是甘氨酸，可以用丙氨酸（或其它残基）取代此甘氨酸，来降低 C1q 的结合。

[0181] 如上所述，可以通过例如修饰 C1q 结合和 / 或 FcR 结合，并因此改变 CDC 活性和 / 或 ADCC 活性而设计改变了效应功能的 Fc 区。例如，可以制备 C1q 结合增强和 Fc γ RIII 结合增强的 Fc 区变体；例如，ADCC 活性和 CDC 活性均增强。或者，在需要降低或消除效应功能时，可以设计其 CDC 活性和 / 或 ADCC 活性降低的 Fc 区变体。在另一个实施方案中，可以仅增加这些活性中的一个活性，并且还可任选降低另一种活性，例如，来制备 ADCC 活性增强而 CDC 活性降低的 Fc 区变体，反之亦然。

[0182] 在进一步的氨基酸改变中，不参与维持多肽变体正确构象的任何半胱氨酸残基还可以被取代，通常用丝氨酸取代，来提高该分子的氧化稳定性并且防止异常交联。

[0183] 另一类型的氨基酸取代用于改变多肽的糖基化模式。这可以通过删除一个或多个在多肽中发现的糖组分，和 / 或增加一个或多个在多肽中不存在的糖基化位点来完成。典型的多肽糖基化是 N- 连接或 O- 连接。N- 连接是指将糖基部分连接于天冬酰胺残基的侧链。三肽序列，天冬酰胺 -X- 丝氨酸和天冬酰胺 -X- 苏氨酸，是糖基部分与天冬酰胺侧链进行酶性连接的识别序列，其中 X 是除了脯氨酸之外的任何氨基酸。因此，多肽中任何一种所述三肽序列的存在产生了一个潜在的糖基化位点。O- 连接糖基化是指将 N 乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖与羟基氨基酸结合，虽然可以利用 5- 羟基脯氨酸或 5- 羟基 赖氨酸，但丝氨酸或苏氨酸最为常用。通过改变氨基酸序列，以使多肽中包括

一个或多个上述三肽序列，可以方便地将糖基化位点引入多肽（用于 N 连接的糖基化位点）。通过将一或多个丝氨酸或苏氨酸插入或取代原始多肽的序列，也可以产生改变（用于 O- 连接的糖基化位点）。糖基化变体的一个实例具有重链残基 Asn297 的氨基酸取代。

[0184] 而且，通过一个或多个进一步的氨基酸取代，可以改变 Fc 区的类、亚类或同种型，产生与所需另一类、亚类或同种型有同源性更高的氨基酸序列的 Fc 区。例如，可以改变鼠 Fc 区，产生与人 Fc 区同源性更高的氨基酸序列；可以对人非 -A 型同种型 IgG1Fc 区进行修饰，得到人 A 型同种型 IgG1Fc 区。在一个实施方案中，在 Fc 区的 CH2 结构域中进行能改变 FcR 结合和 / 或 ADCC 活性的所述氨基酸修饰，并且将 CH3 缺失或将其用其他二聚体结构域取代。然而，优选保留 CH3 结构域（除了本文中所述的改变效应功能的氨基酸修饰）。

[0185] 可以对多肽变体进行一个或多个试验来检测与起始多肽相比其生物学活性的任何变化。

[0186] 所述多肽变体与非变异多肽相比，优选基本上保留与抗原结合的能力，即结合能力不低于非变异多肽的约 20 倍，例如不低于 5 倍。利用例如荧光激活的细胞分类分析 (FACS) 或放射免疫沉淀 (RIA) 等技术，可以检测多肽变体的结合能力。

[0187] 多肽变体的与 FcR 结合的能力可以被估测。在 FcR 为 Fc γ RI、FcRn 或 Fc γ RIII A-V158 等高亲和力 Fc 受体的情况中，可在标准的 ELISA 实验中，通过利用特异性结合所述多肽变体的抗体滴定单体多肽变体并且测定结合的多肽，而测定结合（见下述实施例 2）。用于低亲和力 FcR 的另一个 FcR 结合试验在实施例 1 和 4 中叙述。

[0188] 为了检测所述多肽变体的 ADCC 活性，用各种效靶比进行体外 ADCC 检测，例如实施例 4 中所述。对于此类检测有用的“效应细胞”包括外周血单核细胞 (PBMC) 和自然杀伤 (NK) 细胞。或者或另外，可以在体内对所述多肽变体的 ADCC 活性进行检测，例如在 Clynes 等 .PNAS(USA) 95 : 652-656(1998) 中所述的动物模型体内。

[0189] 变体结合 C1q 和介导补体依赖性细胞毒 (CDC) 的能力可以被估测。

[0190] 为了检测 C1q 结合，可以进行 C1q 结合 ELISA 试验。简言之，用多肽变体或起始多肽（对照）将试验板在包被缓冲液中包被过夜。然后洗涤并封闭所述平板。洗涤之后，每孔中加入一份人的 C1q 并且在室温温育 2 小时。随后再次洗涤，然后每孔中加入 100 μ l 绵羊抗补体 C1q 过氧化物酶偶联型抗体，并室温温育 1 小时。再次用洗涤缓冲液洗板，然后每孔加入含 OPD（邻苯二胺二氢氯化物 (Sigma)）的底物缓冲液。进行 30 分钟氧化反应，观察黄色的出现，然后通过加入 100 μ l 4.5N H₂SO₄ 终止反应。在 (492-405) nm 处测定吸收率。

[0191] 多肽的实例是在此检测中呈现“C1q 结合显著降低”的多肽。这意味着约 100 μ g/ml 多肽变体与 100 μ g/ml 具有未突变的 IgG1Fc 区的对照抗体相比，其 C1q 结合下降约 50 倍或更多倍。在最优选的实施方案中，多肽变体“不结合 C1q”，即 100 μ g/ml 多肽变体与 100 μ g/ml 对照抗体相比，其 C1q 结合下降约 100 倍或更多倍。

[0192] 另一个变体实例是“对人 C1q 的结合亲和力比亲本多肽更高”的变体。例如，此类分子与亲本多肽相比，对人 C1q 的结合可以提高约 2 倍或以上，优选约 5 倍或以上（例如这两个分子的 IC₅₀ 值）。例如，与亲本多肽相比，对人 C1q 的结合可以提高大约

2-500 倍，优选从约 2 或 5 倍至约 1000 倍。

[0193] 为了检测补体激活，可以进行补体依赖性细胞毒 (CDC) 检测，例如在 Gazzano-Santoro 等，免疫学方法杂志 202 : 163 (1996) 中所述。简言之，用缓冲液稀释各种浓度的多肽变体和人补体。将表达与所述多肽变体结合的抗原的细胞稀释成 $\sim 1 \times 10^6$ 细胞 /ml。将多肽变体、稀释的人补体和表达所述抗原的细胞的混合物加入 96 孔平底组织培养板中，在 37°C 和 5% CO₂ 条件下培养 2 小时，以促进补体介导的细胞裂解。然后向每孔中加入 50 μ l alamarblue (Accumed International)，并 37°C 培养过夜。用 96 孔荧光光度计在激发光 530nm 和发射光 590nm 处，测定吸光度。结果可以用相对荧光单位 (RFU) 表示。样品的浓度可以根据标准曲线进行计算，并用与非变异多肽相比的活性百分率报道目的多肽变体的活性。

[0194] 还有另一个变体实例“不激活补体”。例如，在这个检测中，与 0.6 μ g/ml 具有未突变 IgG1Fc 区的对照抗体相比，0.6 μ g/ml 多肽变体呈现大约 0-10% CDC 活性。所述变体优选在上述 CDC 检测中没有任何 CDC 活性。

[0195] 本发明还涉及与亲本多肽相比 CDC 增强的多肽变体，例如在体内或体外 CDC 活性增加大约 2-100 倍（例如每个被比较的分子的 IC₅₀ 值）。

[0196] A. 受体结合检测和免疫复合物

[0197] 本发明发展了受体结合检测，其尤其利于检测目的分析物对受体的亲和力相对弱时该分析物与该受体的结合，例如对 Fc γ RIIA、Fc γ RIIB、Fc γ RIIC 或 Fc γ RIID 而言在微克分子范围内。所述方法包括分子复合物的形成，与非复合的分析物相比，所述分子复合物对受体的亲和力增加。优选分子复合物是免疫复合物，其包括：(a) 含 Fc 区的多肽（例如抗体或免疫粘附素）；(b) 第一靶分子，其包括针对含 Fc 区多肽的至少两个结合位点；和 (c) 第二靶分子，其包括针对第一靶分子的至少两个结合位点。

[0198] 下述实施例 1 中，所述含 Fc 区的多肽是抗 IgE 抗体，例如 E27 抗体（图 4A-4B）。当将 E27 与人的 IgE 以 1 : 1 的克分子比率混合时，形成稳定的由三个 E27 分子和三个 IgE 分子组成的六聚体。在下述的实施例 1 中，所述“第一靶分子”是嵌合形式的 IgE，其中抗 VEGF 抗体的 Fab 部分与人 IgE Fc 部分融合，而所述“第二靶分子”是与 Fab 结合的抗原（即 VEGF）。每个 IgE 分子结合两个 VEGF 分子。每分子 VEGF 也结合两个 IgE 分子。当重组人 VEGF 以 2 : 1 的克分子比率加入到 IgE : E27 六聚体中时，通过 IgE : VEGF 的相互作用，所述六聚体连接成更大分子量的复合物（图 5）。得到的免疫复合物的抗 IgE 抗体的 Fc 区结合 FcR 的亲和力比非复合物抗 IgE 或 IgE : E27 六聚体均更高。

[0199] 考虑了用于受体检测的其他形式的分子复合物。仅包括含 Fc 区多肽：第一靶分子结合物的实例包括免疫粘附素：配体的结合物，例如 VEGF 受体 (KDR)- 免疫粘附素：VEGF，以及全长双特异性抗体 (bsAb)：第一靶分子。另一个含 Fc 区多肽：第一靶分子：第二靶分子的实例包括非封闭抗体：可溶性受体：配体的结合物，例如抗 Trk 抗体：可溶性 Trk 受体：神经营养因子 (Urfer 等，生物化学杂志 .273(10) : 5829-5840 (1998))。

[0200] 除了在受体结合检测中的应用，上述免疫复合物还有进一步应用包括估测含 Fc 区的多肽功能和在体内免疫复合物的清除。因此，可以将免疫复合物给哺乳动物施用

(例如前临床动物研究)并检测其半衰期。

[0201] 为了检测受体结合,可以将包括目的受体的至少两个结合结构域的多肽(例如 FcR 的 α 亚单位的细胞外结构域)包被在固相,例如试验板上。利用标准方法,可以将单独的受体结合结构域或受体融合蛋白包被在平板上。受体融合蛋白的实例包括受体-谷胱甘肽 S 转移酶(GST)融合蛋白、受体-壳多糖结合结构域融合蛋白、受体-六聚 His 标签融合蛋白(分别包被在谷胱甘肽、壳多糖和镍包被的平板上)。或者,可以在检测平板上包被捕获分子,用于通过融合蛋白的非受体部分结合受体-融合蛋白。实例包括包被在检测平板上用于捕获受体-六聚 His 尾融合蛋白的抗六聚 His F(ab')₂, 或者包被在检测平板上用于捕获受体-GST 融合蛋白的抗 GST 抗体。在另一个实施方案中,检测了与至少表达所述受体的结合结构域的细胞的结合。所述细胞可以是表达目的 FcR 的天然造血细胞,或者可以用编码 FcR 或其结合结构域的核酸转化,以使结合结构域表达在被检测细胞的表面的细胞。

[0202] 将上述免疫复合物加到受体包被的平板中,并温育足够长的时间,以使分析物与受体结合。然后洗涤平板以去除未结合的复合物,并根据已知的方法检测分析物的结合。例如,可以利用与分析物特异性结合并任选与可检测的标记物结合的试剂(例如抗体或其片段)进行检测(可检测标记物和将其与多肽连接的方法,在下述标题为“多肽变体的非治疗应用”的章节中叙述)。

[0203] 为了方便,所述试剂可以以试剂盒的形式提供,即在检测分析物与目的受体结合能力的检测中用于与分析物包装在一起。试剂盒的成分通常以预先确定的比例提供。所述试剂盒可以提供第一靶分子和/或第二靶分子,或任选将它们组合在一起。所述试剂盒进一步包括用所述受体或其结合结构域(例如 FcR 的 α 亚单位的细胞外结构域)包被的检测平板。通常在所述试剂盒中还提供用酶性标记物直接或间接标记的其它试剂,例如与被检测的分析物特异性结合的抗体。在可检测的标记物是酶时,所述试剂盒包括酶所需要的底物和辅因子(例如提供可检测的发色基团或荧光基团的底物前体)。另外,可以包括其它衍生物,例如稳定剂、缓冲液(例如检测和/或洗涤裂解缓冲液)等等。各种试剂的相对量可以广泛的变化,以提供基本上优化了检测敏感性的试剂溶液的浓度。具体地,所述试剂可以是干粉,通常为冻干剂,包含溶解后能产生适当浓度的试剂溶液的赋形剂。所述试剂盒最好包括实施该检测的说明书。

[0204] B. 抗体制备

[0205] 在本发明的优选实施方案中,根据本文中所述进行修饰的含 Fc 区的多肽是抗体。用于制备抗体的技术如下:

[0206] (i) 抗原筛选和制备

[0207] 在所述多肽为抗体时,其直接针对目的抗原。抗原优选为生物学上重要的多肽,给患有疾病或病症的哺乳动物施用该抗体可以导致此哺乳动物在治疗上受益。然而,也考虑了直接针对非多肽抗原(例如肿瘤相关糖脂抗原;见美国专利 5091178)的抗体。

[0208] 在抗原是多肽时,其可以是跨膜分子(例如受体)或例如生长因子等配体。抗原的实例包括如肾素等分子;生长激素,包括人生长激素和牛生长激素;生长激素释放因子;甲状旁腺激素;甲状腺刺激激素;脂蛋白; α -1-抗胰蛋白酶;胰岛素 A-链;胰

胰岛素-B链；前胰岛素；卵泡刺激激素；降钙素；黄体激素；胰高血糖素；因子 VIIIc、因子 IX、组织因子 (TF) 和 von Willebrands 因子等凝血因子；蛋白 C 等抗凝血因子；心房利钠激素；肺表面活性物质；纤溶酶原激活剂，例如尿激酶或人尿或组织型纤溶酶原激活剂 (t-PA)；蛙皮素；凝血酶；造血生长因子；肿瘤坏死因子 α 和 β ；脑啡肽酶；RANTES (调节对 T 细胞表达和分泌的正常激活)；人巨噬细胞炎症蛋白 (MIP-1- α)；血清白蛋白，例如人血清白蛋白；Muellerian 抑制物质；松弛素 A 链；松弛素 B 链；前松弛素；小鼠绒毛膜促性腺激素相关肽；微生物蛋白，例如 β 内酰胺酶；DNase；IgE；细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原 (CTLA)，例如 CTLA-4；抑制素；激活素；血管内皮生长因子 (VEGF)；激素或生长因子的受体；蛋白 A 或 D；类风湿因子；神经营养因子，例如骨衍生神经营养因子 (BDNF)，神经营养素 -3、-4、-5 或 6 (NT-3、NT-4、NT-5 或 NT-6) 或神经生长因子，例如 NGF- β ；血小板衍生生长因子 (PDGF)；成纤维细胞生长因子，例如 aFGF 和 bFGF；表皮生长因子 (EGF)；转化生长因子 (TGF)，例如 TGF- α 和 TGF- β ，包括 TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4 或 TGF- β 5；胰岛素样生长因子 I 和 II (IGF-I 和 IGF-II)；des (1-3)-IGF-I (脑 IGF-I)，胰岛素样生长因子结合蛋白；CD 蛋白，例如 CD3、CD4、CD8、CD19 和 CD20；促红细胞生成素；骨诱导因子；免疫毒素；骨形态发生 (morphogenetic) 蛋白 (BMP)；干扰素，例如干扰素 - α 、- β 和 γ ；集落刺激因子 (CSF)，例如 M-CSF、GM-CSF 和 G-CSF；白细胞介素 (IL)，例如 IL-1 到 IL-10；超氧化物歧化酶；T 细胞受体；表面膜蛋白；衰变 (decay) 加速因子；病毒抗原，例如 AIDS 包膜的一部分；转运蛋白；归巢受体；粘着素；调节蛋白；整合素，例如 CD11a、CD11b、CD11c、CD18、ICAM、VLA-4 和 VCAM；肿瘤相关抗原，例如 HER2、HER3 或 HER4 受体；以及上述任何多肽的片段。

[0209] 本发明所述抗体的优选分子靶点包括 CD 蛋白，例如 CD3、CD4、CD8、CD19、CD20 和 CD34；ErbB 受体家族成员，例如 EGF 受体，HER2、HER3 或 HER4 受体；细胞粘附分子，例如 LFA-1、Mac1、p150.95、VLA-4、ICAM-1、VCAM、 α 4/ β 3 整合素和 α v/ β 3 整合素包括其 α 或 β 亚单位 (例如抗-CD11a、抗 CD18 或抗 CD11b 抗体)；生长因子，例如 VEGF；组织因子 (TF)； α 干扰素 (α -IFN)；白细胞介素，例如 IL-8；IgE；血型 (bloodgroup) 抗原；flk2/flt3 受体；肥胖 (OB) 受体；mpl 受体；CTLA-4；蛋白 C 等。

[0210] 可溶性抗原或其片段可任选与其它分子结合用作制备抗体的免疫原。对于跨膜分子，如受体，其片段 (例如受体的细胞外结构域) 可以用作免疫原。或者，表达跨膜分子的细胞可以用作免疫原。此类细胞可以衍生自天然来源细胞 (例如肿瘤细胞系)，或者可以是通过重组技术转化而表达跨膜分子的转化细胞。用于制备抗体的其它抗原和形式对本领域中的人员是显而易见的。

[0211] (ii) 多克隆抗体

[0212] 多克隆抗体优选通过动物中多次皮下 (sc) 或腹膜内 (ip) 注射相关抗原和佐剂进行制备。利用双功能或衍生试剂将相关抗原与在被免疫物种中有免疫原性的蛋白结合可能是有用的，所述蛋白包括例如匙孔血蓝蛋白、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂，所述试剂包括马来酰亚氨基苯甲酰基磺基琥珀酰亚胺 (通过半胱氨酸残基结合)、N 羟基琥珀酰亚胺 (通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酐、 SOCl_2 或 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}$

= NR, 其中 R 和 R¹ 是不同的烷基基团。

[0213] 通过将 100 μg 或 5 μg 蛋白或结合物 (分别对家兔或小鼠) 与 3 倍体积的弗氏完全佐剂混合并将此溶液在多个位点进行皮内注射, 可使动物针对抗原、免疫原性结合物或衍生物被免疫。一个月之后, 用溶于弗氏完全佐剂中的肽或结合物通过多位点皮下注射加强免疫, 其用量为初次注射量的 1/5-1/10。7-14 天之后, 将动物放血并检测其血清的抗体滴度。对动物进行加强免疫直到滴度稳定 (plateaus)。优选相同抗原与另一蛋白的结合物和 / 或通过另一交联剂结合的结合物给动物进行加强免疫。结合物也可以是重组细胞培养物中的蛋白融合体。可以适当应用如明矾等聚集试剂, 来提高免疫应答。

[0214] (iii) 单克隆抗体

[0215] 可以利用 Kohler, 自然 256 : 495 (1975) 中所述的杂交瘤方法或者通过重组 DNA 方法 (美国专利号 4816567) 制备单克隆抗体。

[0216] 在杂交瘤方法中, 按上述方法免疫小鼠或其它适当的宿主动物, 例如仓鼠或恒河猴 (macaque monkey), 来诱导出产生或能够产生抗体的淋巴细胞, 所述抗体可与免疫中应用的蛋白特异性结合。或者, 可以将淋巴细胞在体外进行免疫。然后, 用聚乙二醇等适当的融合试剂将淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合, 形成杂交瘤细胞 (Goding, 单克隆抗体: 原理与应用, pp.59-103 (Academic Press, 1986))。

[0217] 在适当的培养基中接种并培养如此制备的杂交瘤细胞, 所述培养基优选包括一种或多种抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞生长或存活物质。例如, 如果亲本骨髓瘤细胞缺少次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (HGPRT 或 HPRT), 那么用于杂交瘤的所述培养基通常包括次黄嘌呤、氨基嘌呤和胸腺嘧啶核苷 (HAT 培养基), 这些物质可防止 HGPRT 缺陷型细胞的生长。

[0218] 优选的骨髓瘤细胞是那些可有效融合、支持所选抗体产生细胞稳定产生高水平抗体、并且对 HAT 等培养基敏感的骨髓瘤细胞。其中, 优选的骨髓瘤细胞系是鼠骨髓瘤细胞系, 例如来源于 MOPC-21 和 MPC-11 小鼠肿瘤的细胞系 (得自 Salk Institute Cell Distribution Center, 圣迭戈, 加利福尼亚, 美国) 和 SP-2 或 X63-Ag8-653 细胞 (美国典型培养物保藏中心, Rockville, 马里兰, 美国)。还有报道将人杂交瘤细胞和小鼠-人异质性杂交瘤细胞系用于制备人单克隆抗体 (Kozbor, 免疫学杂志, 133 : 3001 (1984); Brodeur 等, 单克隆抗体制备技术和应用, 51-63 页 (Marcel Dekker, Inc., 纽约, 1987))。

[0219] 测定杂交瘤细胞培养基中直接针对所述抗原的单克隆抗体的产生。优选免疫沉淀或体外结合试验, 例如放射免疫分析 (RIA) 或酶联免疫吸附试验 (ELISA), 检测由杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性。

[0220] 在产生具有所需的特异性、亲和力和 / 或活性之抗体的杂交瘤细胞被鉴定之后, 用有限稀释方法将所述克隆进行亚克隆, 并用标准方法进行培养 (Goding, 单克隆抗体: 原理和应用, pp.59-103, Academic Press, 1986)。用于此目的的适当培养基包括例如 D-MEM 或 RPMI-1640 培养基。另外, 杂交瘤细胞可以在动物体内生长形成腹水瘤。

[0221] 用常规免疫球蛋白纯化方法, 例如蛋白 A-Sepharose, 羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析, 将亚克隆分泌的单克隆抗体从培养基、腹水或血清中适当分离。

[0222] 用传统的方法可容易的分离编码单克隆抗体的 DNA 并测定其序列（例如，利用能够与编码单克隆抗体重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针）。所述杂交瘤细胞可作为此类 DNA 的优选来源。所述 DNA 一经分离，将其连接入表达载体，然后将载体转化入宿主细胞，例如大肠杆菌细胞、猿猴 COS 细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞或不产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞，在重组宿主细胞中合成单克隆抗体。下面将详细叙述抗体的重组制备。

[0223] 在另一个实施方案中，抗体或抗体片段可以从抗体噬菌体文库中分离，所述抗体噬菌体文库用在 McCafferty 等，自然 348 : 552-554 中所述技术制备。在 Clackson 等，自然 352 : 624-628(1991) 和 Marks 等，生物化学杂志 222 : 581-597(1991) 中分别叙述了利用噬菌体文库对鼠和人的抗体的分离。随后的文献叙述了高亲和力 (nM 范围) 人抗体的产生，其通过链改组 (chainshuffling) (Marks 等，生物 / 技术，10 : 779-783(1992)) 以及组合感染和体内重组作为构建很大的噬菌体文库的策略 (Waterhouse 等，核酸研究，21 : 2265-2266(1993))。因此，对于单克隆抗体的分离，这些技术是传统的单克隆抗体杂交瘤技术的可替代方法。

[0224] 也可以对 DNA 进行修饰，例如，用编码人重链和轻链恒定区的序列取代其鼠同源序列（美国专利号 4816567 ; Morrison 等，美国国家科学院院刊 81 : 6851(1984)），或通过非免疫球蛋白多肽的全部或部分编码序列共价连接至免疫球蛋白的编码序列。

[0225] 通常这类免疫球蛋白多肽将取代抗体恒定区，或取代抗体的一个抗原结合位点的可变区已产生嵌合型二价抗体，其包括特异性针对一个抗原的抗原结合位点，和特异性针对另一个抗原的抗原结合位点。

[0226] (iv) 人源化和人抗体

[0227] 人源化抗体具有一个或多个被引入的非人类来源的氨基酸残基。这些非人类氨基酸残基通常是“重要”的残基，其典型地来源于“重要地”可变区。根据 Winter 和其同事的方法 (Jones 等，自然，321 : 522-525(1986) ; Riechmann 等，自然 332 : 323-327(1988) ; Verhoeyen 等，科学 239 : 1534-1536(1988))，通过用人抗体的相应序列取代鼠类 CDR 或 CDR 序列，可以基本上进行人源化。因此，此“人源化”抗体是嵌合抗体（美国专利号 4816567），其中基本上少于完整的人可变区的序列被来源于非人类物种的相应序列代替。实际上，人源化抗体是典型的人抗体，其中一些 CDR 残基和一些 FR 残基被鼠抗体类似位点的残基代替。

[0228] 在制备人源化抗体中应用的人重链和轻链可变区的选择对于降低抗原性非常重要。根据所谓的“最适”方法，可在已知人可变区序列的完整文库中筛选啮齿类抗体的可变区序列。然后，将与啮齿类序列最相近的人的序列作为人源化抗体的框架 (FR) (Sims 等，免疫学杂志 .151 : 2296(1993) ; Chothia 等，分子生物学杂志 .196 : 901(1987))。另一种方法应用于来源于特定轻链或重链之所有人类抗体共同序列的特定框架。相同的框架可以用于若干不同的人源化抗体 (Carter 等，美国国家科学院院刊 89 : 4285(1992) ; Presta 等，免疫学杂志 ., 151 : 2623(1993))。

[0229] 更为重要的是抗体被人源化且保留对抗原的高亲和力和其它良好的生物学活性。为了达到此目的，根据优选的方法，利用亲本和人源化序列的三维模型分析亲本序列和各种概念上的人源化产物，通过此方法制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型为公

众可获得且为本领域技术人员所熟知。已有能说明并显示所选候选免疫球蛋白序列可能的三维构象结构的计算机程序。观察这些显示结果可以分析所述残基在候选免疫球蛋白序列的功能中可能的作用，即分析能影响候选免疫球蛋白与抗原结合能力的残基。这样，可以从受体筛选 FR 残基，并将其与重要的序列组合，以得到所需抗体特性，例如对靶抗原的亲和力增强。通常，CDR 残基直接并且主要涉及对抗原结合的影响。

[0230] 或者，现在可以制备转基因动物（如小鼠），所述转基因动物可以通过免疫，在没有内源性免疫球蛋白产生的情况下产生全套人抗体。例如，已指出在嵌合和胚系（germ-line）突变小鼠中，抗体重链连接区（JH）基因的纯合性缺失导致内源性抗体产生的完全抑制。将人胚系免疫球蛋白基因阵列转移到此胚系突变小鼠，将导致产生针对抗原攻击的人抗体。例如，见 Jakobovits 等，美国国家科学院院刊，90：2551（1993）；Jakobovits 等，自然，362：255-258（1993）；Bruggermann 等，Year in Immuno，7：33（1993）；Duchosal 等，自然 355：258（1992）。人抗体还可以来源于噬菌体展示文库（Hoogenboom 等，分子生物学杂志 227：381（1991）；Marks 等，分子生物学杂志，222：581-597（1991）；Vaughan 等，自然生物技术 14：309（1996））。

[0231] (V) 多特异性抗体

[0232] 多特异性抗体具有至少两个不同抗原的结合位点。虽然这样的分子通常仅结合两个抗原（即双特异性抗原，BsAb），但在本文中应用时，此定义包括具有另外的特异性的抗体，例如三特异性抗体。BsAb 的实例包括如下抗体，一个臂直接抗肿瘤细胞抗原而另外一个臂直接抗细胞毒作用触发分子的 BsAb，例如抗 Fc γ RI/抗 CD15、抗 p185^{HER2}/Fc γ RIII（CD16）、抗 CD3/抗恶性 B 细胞（1D10）、抗 CD3/抗 p185^{HER2}、抗 CD3/抗 p97、抗 CD3/抗肾细胞癌、抗 CD3/抗 OVCAR-3、抗 CD3/L-D1（抗结肠癌）、抗 CD3/抗黑色素细胞刺激激素类似物、抗 EGF 受体/抗 CD3、抗 CD3/抗 CAMA1、抗 CD3/抗 CD19、抗 CD3/MoV18、抗神经细胞粘附分子（NCAM）/抗 CD3、抗叶酸结合蛋白（FBP）/抗 CD3、抗 pan 肿瘤相关抗原（AMOC-31）/抗 CD3；一个臂特异性结合肿瘤抗原而另一个臂结合毒素的 BsAb，例如抗 saporin/抗 Id-1、抗 CD22/抗 saporin、抗 CD27/抗 saporin、抗 CD38/saporin、抗 CEA/抗蓖麻蛋白 A 链、抗干扰素 α （IFN- α ）/抗杂交瘤独特型、抗 CEA/抗长春花生物碱；使酶活化型前体药物转化的 BsAb，例如抗 CD30/抗碱性磷酸酶（其催化丝裂霉素磷酸酯前体药物转化为丝裂霉素醇）；可以作为纤维蛋白溶解试剂的 BsAb，例如抗血纤蛋白/抗组织型纤溶酶原激活剂（tPA）、抗血纤蛋白/抗尿激酶型纤溶酶原激活剂（uPA）；将免疫复合物靶向于细胞表面受体的 BsAb，例如抗低密度脂蛋白（LDL）/抗 Fc 受体（例如 Fc γ RI、Fc γ RII、Fc γ RIII）；用于治疗感染性疾病的 BsAb，例如抗 CD3/抗单纯疱疹病毒（HSV）、抗 T 细胞受体：CD3 复合物/抗流感、抗 Fc γ R/抗 HIV；用于体内或体外肿瘤检测的 BsAb，例如抗 CEA/抗 EOTUBE、抗 CEA/抗 DPTA、抗 p185^{HER2}/抗半抗原；作为疫苗佐剂的 BsAb；和作为诊断工具的 BsAb，例如抗兔 IgG/抗铁蛋白、抗马辣根过氧化物酶（HRP）/抗激素、抗生长激素抑制因子/抗 P 物质、抗 HRP/抗 FITC、抗 CEA/抗 β 半乳糖苷酶。三特异性抗体的实例包括抗 CD3/抗 CD4/抗 CD37、抗 CD3/抗 CD5/抗 CD37 和抗 CD3/抗 CD8/抗 CD37。双特异性抗体可制备成全长抗体或抗体片段（例如（Fab'）₂ 双特异性抗体）。

[0233] 用于制备双特异性抗体的方法在本领域已知。全长双特异性抗体的传统制备方

法是以两个免疫球蛋白重链-轻链对的共表达为基础，在此处所述两条链具有不同的特异性 (Millstein 等，自然 305 : 537-539 (1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分类，这些杂交瘤 (细胞杂交瘤 (quadromas)) 产生可能有 10 种不同抗体分子的混合物，其中只有一个具有正确的双特异性结构。通常用亲和层析方法完成正确分子的纯化更为麻烦，并且产量低。在 WO 93/08829 和 Traunecker 等 EMBO J.10 : 3655-3659 (1991) 中报道了相似的方法

[0234] 根据另一种方法，将具有所需结合特异性 (抗体-抗原结合位点) 的抗体可变区与免疫球蛋白恒定区融合。所述融合抗体优选具有免疫球蛋白重链恒定区，至少包括部分铰链区、CH2、CH3 区。优选在至少一个融合抗体中存在具有第一重链恒定区 (CH1)，其包括轻链结合所必需的位点。将编码免疫球蛋白重链融合蛋白 (如果需要还包括免疫球蛋白轻链) 的 DNA 插入不同表达载体，并且共转染到适当的宿主生物中。这在构建中应用不等比的三种多肽提供最佳产量的实施方案中，为调节三条多肽链片段的相互比例提供了很大的弹性。然而，当相同比例的至少两条多肽链的表达导致高产量或当所述比例不特别重要时，也可以将两条或所有三条多肽链的编码序列插入一个表达载体中。

[0235] 在此方法的优选实施方案中，双特异性抗体由在一个臂中具有第一结合特异性的杂合型免疫球蛋白重链和在另一个臂中具有杂合型重链-轻链对 (提供第二结合特异性) 组成。发现此不对称结构易于从不需要的免疫球蛋白链组合物中分离所需双特异性化合物，因为在仅为双特异性分子一半的部分中免疫球蛋白轻链的存在提供了简捷的分离方法。此方法在 WO94/04690 中公开。制备双特异性抗体的进一步细节参见如 Suresh 等，酶学方法，121 : 210 (1986)。根据在 WO096/27011 中所述另一个方法，可以设计一对抗体分子之间的界面，来使从重组细胞培养基中回收的异源二聚体的百分率最大。优选的界面至少包括抗体恒定区的 CH3 结构域的一部分。在这个方法中，用较大侧链 (例如酪氨酸或色氨酸) 代替第一抗体界面中的一个或多个小氨基酸侧链。通过用较小氨基酸侧链 (如丙氨酸或前氨酸) 代替大氨基酸侧链，可在第二个抗体分子的界面上构建相同或类似大侧链的互补“沟”。这使异二聚体的产量超过其它不必要的终产物如同源二聚体。

[0236] 双特异性抗体包括交联的或“异源结合”的抗体。例如，可以将异源结合物中的一种抗体与亲和素偶联，将另一种抗体与生物素偶联。例如，有人称这样的抗体可以将免疫系统细胞靶向非必要细胞 (美国专利 4,676,980)，和用于治疗 HIV 感染 (WO91/00360，WO92/200373 和 EP03089)。适当的交联试剂和多种交联技术在本领域中众所周知，见美国专利号 4676980。

[0237] 本发明还涉及双价以上的抗体，例如，可以制备三特异性抗体。Tutt 等，免疫学杂志 147 : 60 (1991)。

[0238] 虽然本文中的相关多肽优选抗体，但也包括根据本文所述方法修饰的含 Fc 区的多肽。这种分子的实例是免疫粘附素。

[0239] C. 免疫粘附素的制备

[0240] 最简单最直接的免疫粘附素设计是将粘附素的结合结构域 (例如受体的细胞外结构域 (ECD)) 与免疫球蛋白重链的 Fc 区结合。通常，当制备本发明的免疫粘附素时，

将编码所述粘附素的结合结构域的核酸在 C 末端与编码免疫球蛋白恒定区序列的 N 末端融合，然而 N 末端融合也是可能的。

[0241] 通常在此融合中，编码的嵌合多肽至少保留免疫球蛋白重链恒定区的功能性铰链区、CH2 和 CH3 结构域。还可以与恒定区的 Fc 区的 C 末端或者紧邻重链 CH1 的 N-末端处或轻链的相应区域进行融合。进行所述融合的确切位点并不重要；特殊位点是众所周知的，并且为了使免疫粘附素的生物活性、分泌或结合特性最佳，可以对这些位点进行选择。

[0242] 在优选实施方案中，所述粘附素序列与免疫球蛋白 G1 (IgG1) Fc 区的 N 末端融合。可以将整个重链恒定区与粘附素序列融合。然而，更优选在融合中应用起始于铰链区中正好在木瓜蛋白酶切割位点（即残基 216，使重链恒定区的第一个残基成为 114）上游或其它免疫球蛋白类似位点的序列，所述木瓜蛋白酶切割位点在化学上定义 IgG Fc 区。在具体优选实施方案中，粘附素氨基酸序列与 IgG 重链的 (a) 铰链区和 CH2 和 CH3，或者 (b) CH1、铰链、CH2 和 CH3 结构域融合。

[0243] 对于双特异性免疫粘附素，所述免疫粘附素均组装为多聚体，尤其是异源二聚体或异源四聚体。通常，这些组装好的免疫粘附素具有已知的单位结构。在 IgG、IgD 和 IgE 中形成基本的四链结构单位。四链单位在较高分子量免疫球蛋白中重复；通常 IgM 以通过二硫键维持的四个基本单位的五聚体形式存在。IgA 球蛋白，偶尔也包括 IgG，在血清中也以多聚体的形式存在。在多聚体的情况中，每个四单位可以相同或不同。

[0244] 在本文范围之内组装的免疫粘附素的实例图示如下：

[0245] (a) AC_L-AC_L ；

[0246] (b) $AC_H-(AC_H, AC_L-AC_H, AC_L-V_HC_H \text{ 或 } V_LC_L-AC_H)$ ；

[0247] (c) $AC_L-AC_H-(AC_L-AC_H, AC_L-V_HC_H, V_LC_L-AC_H \text{ 或 } V_LC_L-V_HC_H)$ ；

[0248] (d) $AC_L-V_HC_H-(AC_H \text{ 或 } AC_L-V_HC_H \text{ 或 } V_LC_L-AC_H)$ ；

[0249] (e) $V_LC_L-AC_H-(AC_L-V_HC_H \text{ 或 } V_LC_L-AC_H)$ ；

[0250] (f) $(A-Y)_n-(V_LC_L-V_HC_H)_2$ ；

[0251] 其中每个 A 代表相同或不同粘附素氨基酸序列；

[0252] V_L 是免疫球蛋白轻链可变区；

[0253] V_H 是免疫球蛋白重链可变区；

[0254] C_L 是免疫球蛋白轻链恒定区；

[0255] C_H 是免疫球蛋白重链恒定区；

[0256] n 是大于 1 的整数；

[0257] Y 是共价交联试剂的残基。

[0258] 为了简短，上述结构仅显示了关键特征；它们即没有表明免疫球蛋白的连接结构域 (J) 或其它结构域，也没有显示二硫键。然而，在结合活性需要此结构域时，可对其进行构建，使其出现在它们在免疫球蛋白分子中占据的常规位置上。

[0259] 或者，可将粘附素序列插入免疫球蛋白重链和轻链序列之间，以得到包括嵌合重链的免疫球蛋白。在这个实施方案中，在免疫球蛋白每个臂中，在铰链和 CH2 结构域之间或在 CH2 和 CH3 结构域之间，将粘附素序列与免疫球蛋白重链的 3' 末端融合。在 Hoogenboom 等，分子免疫学 28：1027-1037 (1991) 中报道了相似的构建体。

[0260] 虽然在本发明的免疫粘附素中不需要免疫球蛋白轻链的存在，但也可使免疫球蛋白轻链与粘附素 - 免疫球蛋白重链融合多肽共价结合，或直接与粘附素融合。在前一种情况中，编码免疫球蛋白轻链的 DNA 通常与编码粘附素 - 免疫球蛋白重链融合蛋白的 DNA 共表达。通过分泌，杂合重型链和轻链被共价结合，从而提供包括两个二硫键连接的免疫球蛋白重链 - 轻链对的免疫球蛋白样结构。例如，在美国专利号 4816567 (1989 年 3 月 28 日公布) 中报道了适合制备此类结构的方法。

[0261] 通过将编码粘附素部分的 cDNA 序列与免疫球蛋白 cDNA 序列融合在同一阅读框架内，可最方便地构建免疫球蛋白粘附素。然而，还可以应用与基因组免疫球蛋白片段的融合 (例如，Aruffo 等，细胞 61 : 1303-1313 (1990) ; Stamenkovic 等，细胞 66 : 1133-1144)。后一种类型的融合需要存在用于表达的 Ig 调节序列。通过杂交或聚合酶链式反应 (PCR)，可以根据来源于脾或外周血淋巴细胞 cDNA 文库的公开序列，分离编码 IgG 重链恒定区的 cDNA。将编码免疫粘附素中“粘附素”和免疫球蛋白部分的 cDNA 串联插入质粒载体，所述载体可在所选的宿主细胞中指导有效的表达。

[0262] D. 载体、宿主细胞和重组方法

[0263] 本发明还提供了经分离的编码本文所述多肽变体的核酸、含有该核酸的载体和宿主细胞，制备所述多肽变体的重组技术。

[0264] 为了多肽变体的重组制备，分离编码此多肽的核酸，并将其插入用于进一步克隆 (DNA 的扩增) 或表达的可复制载体中。利用常规方法可以很容易地分离和测序编码所述多肽变体的 DNA (例如，通过利用能与编码所述多肽变体的基因特异性结合的寡核苷酸探针)。所述载体通常包括但不限于一个或多个下述成分：信号序列、复制起点、一个或多个标记基因、增强子元件、启动子和转录终止序列。

[0265] (i) 信号序列成分

[0266] 本发明的多肽变体不但可以直接重组制备，还可以制备成带有异源性多肽的融合多肽，所述异源多肽优选信号序列或在成熟蛋白或多肽的 N 末端具有特异性切割位点的其它多肽。所选异源信号序列优选是能被宿主细胞识别并加工 (即被信号肽酶切割) 的序列。对于不能识别并加工天然多肽变体信号序列的原核宿主细胞，用原核信号序列代替所述信号序列，所述原核信号序列例如选自碱性磷酸酶、青霉素酶、Ipp 或热稳定肠毒素 II 前导序列。对于酵母分泌，天然信号序列可以用下述序列代替，例如酵母转化酶前导序列， α 因子前导序列 (包括糖酵母属和克鲁维酵母属 α 因子前导序列)，或者酸性磷酸酶前导序列，白色念珠菌 (*C.albicans*) 葡萄糖淀粉酶前导序列，或者在 WO90/13646 中所述信号。在哺乳动物细胞表达中，可以利用哺乳动物信号序列以及病毒分泌前导序列，例如单纯疱疹病毒 gD 信号。

[0267] 将这类前体区域的 DNA 与编码所述多肽变体的 DNA 连接在同一阅读框架内。

[0268] (ii) 复制起始成分

[0269] 表达载体和克隆载体均包含能使所述载体在一个或多个所选的宿主细胞中复制的核酸序列。通常，在克隆载体中，此序列是能使载体独立于宿主染色体 DNA 而复制的序列，包括复制起始点或自主复制序列。在各种细菌、酵母和病毒中这样的序列众所周知。来源于质粒 pBR322 的复制起始点适合于大部分革兰氏阴性菌，2 μ 质粒复制起始点适合于酵母，而各种病毒 (SV40、多瘤病毒、腺病毒、VSV 或 BPV) 复制起始点可用于

在哺乳动物中克隆载体。通常，复制起始点成分对于哺乳动物表达载体不是必须的（通常应用 SV40 复制起始点，只是因为其包括早期启动子）。

[0270] (iii) 筛选基因成分

[0271] 表达载体和克隆载体可以包括筛选基因，其也被称为可筛选标记。典型的筛选基因编码蛋白，所述蛋白 (a) 提供对抗生素或其它毒素，例如氨基青霉素、新霉素、氨基嘌呤或四环素的抗性，(b) 弥补营养缺陷，或 (c) 提供从复合培养基中不能得到的关键营养物质，例如编码芽孢杆菌 D 丙氨酸消旋酶的基因。

[0272] 筛选方案的一个实例中利用药物来抑制宿主细胞的生长。那些用异源基因成功转化的细胞产生能够提供药物耐受性的蛋白，并因此在筛选中存活。此类显性筛选的实例应用了新霉素、霉酚酸和潮霉素。

[0273] 另一个适合用于哺乳动物细胞的可筛选标记是那些能够鉴定竞争摄取所述多肽变体核酸的细胞的筛选标记，例如 DHFR、胸苷激酶、金属硫蛋白 -I 和 II (优选灵长类金属硫蛋白基因)，腺苷脱氨酶、鸟苷脱羧酶等。

[0274] 例如，首先通过在含氨基嘌呤 (Mtx, DHFR 的竞争性拮抗剂) 的培养基中培养所有的转化体，鉴定用 DHFR 筛选基因转化的细胞。当使用野生型 DHFR 时，适当的宿主细胞为 DHFR 活性缺陷的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系。

[0275] 或者，通过在含针对所述可筛选标记的筛选试剂（如氨基糖苷类抗生素，例如卡那霉素、新霉素或 G418）的培养基中培养细胞，可以筛选用编码多肽变体、野生型 DHFR 蛋白，和另一种筛选标记如氨基葡萄糖 3' 磷酸转移酶 (APH) 转化或共转化的宿主细胞（尤其是含内源性 DHFR 的野生型宿主细胞）。见美国专利号 4965199。

[0276] 适合于在酵母中应用的筛选基因是在酵母质粒 YRp7 (Stinchcomb 等，自然，282 : 39 (1979)) 中存在的 *trp1* 基因。所述 *trp1* 基因为不能在色氨酸中生长的酵母突变株提供了可筛选标记，所述突变株例如 ATCC44076 或 PEP4-1, Jones 等，遗传学，85 : 12 (1977)。通过无色氨酸的培养基中培养，在酵母宿主细胞基因组中 *trp1* 损伤的存在，为检测转化提供了有效的环境。同样，可以用有 *Lue2* 基因的已知质粒互补 *Leu2* 缺陷型酵母株 (ATCC20622 或 38626)。

[0277] 另外，可以将来源于 1.6 μ m 环状质粒 pKD1 的载体用于转化克鲁维酵母属酵母。另外，用于大规模产生重组小牛凝乳酶的乳酸克鲁维酵母 (K.Lactis) 表达系统已被报道，Van den Berg, 生物 / 技术，8 : 135 (1990)。还有用于克鲁维酵母属工业菌株分泌成熟重组人血清白蛋白的稳定型多拷贝表达载体的报道。Fleer 等，生物 / 技术，9 : 968-975 (1991) (47 页)。

[0278] (iv) 启动子成分

[0279] 表达载体和克隆载体通常包括被宿主生物识别并与多肽变体核酸可操作地连接的启动子。适合于在原核宿主细胞中应用的启动子包括 *phoA* 启动子、 β 内酰胺酶和乳糖启动子系统、碱性磷酸酶、色氨酸 (*trp*) 启动子系统、和杂合启动子如 *tac* 启动子。然而，其它已知地细菌启动子也是适合的。用于细菌系统的启动子还包括与编码所述多肽变体的 DNA 可操作地连接的 Shine-Dalgarno (SD) 序列。

[0280] 已经知道用于真核细胞的启动子序列。实际上，所有的真核基因均具有富含 AT 的区域，其位于转录起始位点上游约 25-30 个碱基处。在许多基因的转录起始位点上游

70-80 个碱基处发现的另一个序列是 CNCAAT，其中 N 可以是任何核苷酸。在大部分真核基因的 3' 末端是 AATAAA 序列，它是在编码序列的 3' 末端加 polyA 尾的信号序列。将所有这些序列适当的插入真核表达载体。

[0281] 用于酵母宿主的适合的启动序列的实例包括 3- 磷酸甘油激酶或其它糖酵解酶的启动子，例如烯醇化酶、甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶、己糖激酶、丙酮酸脱羧酶、磷酸果糖激酶、葡萄糖 -6- 磷酸异构酶、3- 磷酸甘油变位酶、丙酮酸激酶、磷酸丙糖异构酶、磷酸葡萄糖异构酶和葡糖激酶的启动子。

[0282] 其它具有由生长条件控制的附加转录优势的诱导型酵母启动子，是下述酶的启动子区：乙醇脱氢酶 2、异细胞色素 (isocytochrome) C、酸性磷酸酶、与氮代谢相关的降解酶、金属硫蛋白、甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶和负责麦芽糖和半乳糖利用的酶。在 EP73657 中进一步叙述了用于酵母表达的适合的载体和启动子。酵母增强子也被方便的与酵母启动子一起应用。

[0283] 通过启动子对在哺乳动物宿主细胞中载体的多肽变体转录进行控制，只要所述启动子与宿主细胞相容，其可以来源于病毒基因组如多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒（例如腺病毒 2）、牛乳头瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙型肝炎病毒，并且最优选猴 40 (SV40)；异源哺乳动物的启动子，例如肌动蛋白或免疫球蛋白启动子；热休克启动子。

[0284] SV40 病毒的早期和晚期启动子可以作为另包括 SV40 病毒复制起始点的 SV40 限制性片段方便的获得。人巨细胞病毒的即早启动子可以作为 HindIII E 限制性片段方便的得到。在美国专利号 4419446 中叙述了在哺乳动物宿主中用牛乳头瘤病毒作为载体的 DNA 表达系统。在美国专利号 4601978 中叙述了此系统的改良版本。另见 Reyes 等，自然 297：598-601 (1982) 中所述的在来自单纯疱疹病毒的胸苷激酶启动子的控制下，在小鼠细胞中人 β 干扰素 cDNA 的表达。另外，劳氏肉瘤病毒长末端重复序列可以被用作启动子。

[0285] (v) 增强子元件成分

[0286] 通过将增强子序列插入所述载体，通常可提高编码本发明多肽变体的 DNA 在高等真核细胞中的转录。已知很多来自哺乳动物基因（珠蛋白、弹性蛋白、白蛋白、甲胎蛋白和胰岛素）的增强子序列。然而，通常应用来自真核细胞病毒的增强子。实例包括在复制起始点晚期侧的 SV40 增强子 (bp100-270)、巨细胞病毒早期启动子增强子、在复制起始点晚期侧的多瘤增强子、以及腺病毒增强子。另见 Yaniv 等，自然 297：17-18 中所述的用于激活真核启动子的增强元件。所述增强子可以剪接入载体中多肽变体编码序列的 5' 端或 3' 端，但是优选位于启动子的 5' 端。

[0287] (vi) 转录终止成分

[0288] 用于真核宿主细胞（酵母、真菌、昆虫、植物、动物、人或来自其它多细胞生物的有核细胞）的表达载体还包括对终止转录和稳定 mRNA 必须的序列。此类序列通常可从真核或病毒 DNA 或 cDNA 的 5'（偶尔从 3'）非翻译区得到。这些区域包括被转录为多肽变体 mRNA 的非翻译部分中多腺苷酸化片段的核苷酸片段。一个有用的转录终止成分是牛生长激素聚腺苷酸化区。见 WO94/11026 和其中所述表达载体。

[0289] (vii) 宿主细胞的筛选和转化

[0290] 用于克隆或表达本发明载体中 DNA 的合适的宿主细胞是上述原核细胞、酵母或高等真核细胞。用于此目的的适合的原核细胞包括革兰氏阴性或革兰氏阳性细菌等真细菌，如肠杆菌科 (Enterobacteriaceae) 的埃希菌属 (例如大肠杆菌)、肠杆菌属、欧文菌属、克雷白菌属、变形菌杆属、沙门菌属 (例如鼠伤寒沙门菌)、沙雷菌属 (粘质沙雷菌) 和志贺菌属等，以及芽孢杆菌属的枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌 (例如 1989 年 4 月 12 日出版的 DD266710 中所述地衣芽孢杆菌 41P) 等，假单胞菌属的铜绿菌假单胞菌，及链霉菌。优选大肠杆菌克隆宿主是大肠杆菌 294 (ATCC31446)，虽然大肠杆菌 B、大肠杆菌 X177 (ATCC31537) 和大肠杆菌 W3110 (ATCC27325) 等其它菌株也适合。这些实例是用于说明而不是限制于此。

[0291] 除了原核生物，丝状真菌或酵母等真核微生物也是对多肽变体编码载体适合的克隆或表达宿主。酿酒酵母，或常用的面包酵母，在低等真核宿主微生物中最为常用。然而，多种其它属、种和株也是可公开得到的并可用于本发明，例如粟酒裂殖酵母；克鲁维酵母属，例如乳酸克鲁维酵母 (*K.lactis*)、脆壁克鲁维酵母 (*K.fragilis*) (ATCC12424)、保加利亚克鲁维酵母 (*K.bulgaricus*) (ATCC16045)、威克曼氏克鲁维酵母 (*K.wickerhamii*) (ATCC24178)、*K.waltii* (ATCC56500)、果蝇克鲁维酵母 (*K.drosophilarum*) (ATCC36906)、耐热克鲁维酵母 (*K.thermotolerans*) 和马克斯克鲁维酵母 (*K.marxianus*) 等；*yarrowia* (EP402226)；巴斯德毕赤酵母 (*pichia pastoris*) (EP183070)；念珠菌属；*Trichoderma reesia* (EP244234)；粗糙链孢霉；许旺氏酵母属 (*schwanniomyces*) 如西方许旺氏酵母 (*schwanniomyces occidentalis*) 等；和丝状真菌，例如链孢霉属、青霉属、*Tolypocladium* 以及曲霉属如构巢曲霉和黑曲霉等。

[0292] 用于表达糖基化多肽变体的适合宿主细胞来自多细胞生物。无脊椎动物细胞的实例包括植物和昆虫细胞。已经从下述宿主中鉴定了大量的杆状病毒株和变体以及相应的容许型昆虫宿主细胞，所述宿主包括草地夜蛾 (毛虫)、埃及伊蚊 (蚊子)、白纹伊蚊 (蚊子)、*Drosophila melanogaster* (果蝇) 和家蚕蛾等。用于转染的各种病毒株可以公开地获得，例如加利福尼亚 Y 级夜蛾 (*autographa californica*) NPV 的 L-1 变体和家蚕蛾 NPV 的 Bm-5 株，并且这些病毒可以在此用作为根据本发明的病毒，尤其是用于草地夜蛾细胞的转化。

[0293] 棉花、玉米、土豆、大豆、牵牛花、西红柿和烟草的植物细胞培养物也可以用作宿主。

[0294] 然而，关注最多的是脊椎动物细胞，而且在培养 (组织培养) 中繁殖脊椎动物细胞已经成为常规方法。有效哺乳动物宿主细胞的实例是用 SV40 转化的猴肾 CV1 细胞系 (COS-7, ATCC CRL1651)；人胚肾细胞系 (293 细胞或亚克隆培养成悬浮培养液的 293 细胞, Graham 等, 普通病毒新杂志 (J.Gen Virol.) 36 : 59 (1977))；幼仓鼠肾细胞 (BHK, ATCC CCL10)；中国仓鼠卵巢细胞 /-DHFR (CHO, Urlaub 等, 美国国家科学院院刊 77 : 4216 (1980))；小鼠足细胞 (TM4, Mather, Biol.Reprod.23 : 243-251 (1980))；猴肾细胞 (CV1 ATCC CCL70)；非洲绿猴肾细胞 (VERO-76, ATCC CRL-1587)；人宫颈癌细胞 (HELA, ATCC CCL2)；犬肾细胞 (MDCK ATCC CCL34)；布法罗 (buffalo) 大鼠肝细胞 (BRL3A, ATCC CRL1442)；人肺细胞 (W138, ATCC CCL75)；人肝细胞 (HepG2, HB8065)；小鼠乳腺肿瘤 (MMT060562, ATCC CCL51)；TRI 细胞 (Mather 等, 纽约科

学院年鉴 (Annals N.Y.Acad.Sci.) 383 : 44-68 (1982)) ; MRC5 细胞 ; FS4 细胞 ; 和人肝细胞癌细胞系 (Hep G2)。

[0295] 宿主细胞用上述用于多肽变体制备的表达或克隆载体转化, 并在改进型传统营养培养基上培养, 所述培养基经改进已适于诱导启动子、筛选转化体或扩增编码所需序列的基因。

[0296] (viii) 宿主细胞的培养

[0297] 用于产生本发明多肽变体的宿主细胞可以在各种培养基中培养。市售培养基如 Ham' s F10 (Sigma)、最小基本培养基 ((MEM) (Sigma)、RPMI-1640 (Sigma) 和 Dulbecco 氏改良型 Eagle 氏培养基 ((DMEM), Sigma) 均适合于培养所述宿主细胞。另外, 在 Ham 等, 酶学方法 58 : 44 (1979) ; Barnes 等, 生物化学年鉴 102 : 255 (1980) ; 美国专利 4767704、4657866、4927762、4560655 或 5122469 ; WO 90/03430 ; WO 87/00195 ; 或美国专利 Re.30985 中所述任何培养基可作为所述宿主细胞的培养基。任何所述培养基可在需要时补充激素和 / 或其它生长因子 (例如胰岛素、转铁蛋白或表皮生长因子)、盐 (如氯化钠, 钙, 镁, 和磷酸)、缓冲液 (例如 HEPES), 核苷酸 (例如腺苷和胸苷嘧啶)、抗生素 (例如遗传霉素 (GENTAMYCINTM))、痕量元素 (定义为通常以微摩尔级终浓度出现的无机化合物)、葡萄糖或一种等价能源。还包括任何其它必须补充物, 其相应浓度为本领域已知。培养条件如温度、pH 等是现有技术中应用于表达型宿主细胞的那些, 本领域技术人员对此很熟悉。

[0298] (ix) 多肽变体的纯化

[0299] 当应用重组技术时, 所述多肽变体可以在细胞内胞质空间中产生, 或直接分泌到培养基中。如果所述多肽变体在细胞内产生, 第一步通过离心或超滤除去颗粒状碎片, 即宿主细胞或其裂解片段。Carter 等, 生物 / 技术 10 : 163-167 (1992) 中叙述了用于分离分泌到大肠杆菌周质空间中的抗体的方法。简言之, 在醋酸钠 (pH3.5)、EDTA 和苯甲基磺酰氟 (PMSF) 存在的条件下融解细胞团超过 30 分钟。通过离心可以将细胞碎片除去。在所述多肽分泌到培养基的情况中, 通常首先用市售的蛋白浓缩滤膜 (例如 Amicon 或 Millipore Pellicon 超滤单位) 浓缩此类表达系统的上清。在任何上述步骤中可以包括抑制蛋白裂解的 PMSF 等蛋白酶抑制剂, 并且可以包括抑制外来污染物生长的抗生素。

[0300] 从所述细胞中制备的多肽变体组合物可利用例如羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析和亲和层析等方法纯化, 优选亲和层析。蛋白 A 作为亲和配体的适合性取决于该多肽变体上任何免疫球蛋白 Fc 区的种类和同种型。蛋白 A 可用于纯化基于人 γ 1、 γ 2 或 γ 4 重链的多肽变体 (Lindmark 等, 免疫学方法杂志, 62 : 1-13 (1983))。蛋白 G 被建议用于所有的小鼠同种型和人 γ 3 (Guss 等, EMBO J.5 : 1567-1575 (1986))。与亲和配体结合的基质最常用琼脂糖, 但也可利用其它基质。具有机械稳定性的基质如控制孔径的玻璃或聚 (苯乙烯二乙烯) 苯等, 比琼脂糖允许更快的流速且耗时更短。在所述多肽变体包括 CH3 结构域的情况中, Bakerbond ABXTM 树脂 (J.T.Baker, PhilliPBSurg, NJ) 有利于纯化。根据待回收的多肽变体, 还可以应用其它蛋白纯化技术, 例如在离子交换柱上的分级分离、乙醇沉淀、反向 HPLC、硅层析、在阳离子或阴离子交换树脂层析 (例如聚天冬氨酸柱) 上进行的肝素 SEPHAROSETM 层析、聚焦层析、SDS-PAGE 和硫酸铵沉淀。

[0301] 在任何最初纯化步骤之后, 利用 pH 约 2.5-4.5 的洗脱缓冲液, 可以对包括所述目

的多肽变体和污染物的混合物进行低 pH 疏水相互作用层析，优选在低盐浓度条件下进行（例如大约 0-0.25M 盐浓度）。

[0302] E. 药物配制

[0303] 通过将具有所需纯度的所述多肽变体与可选择的生理上可接受的载体、赋形剂或稳定剂（Remington 氏药学，第 16 版，Osol, A. 编（1980））混合，可制备用于储存的多肽变体的治疗剂型，其为冻干剂型或水溶液形式。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在使用剂量或浓度下对受体没有毒性，并且包括缓冲液，例如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸；抗氧化剂，包括抗坏血酸和甲硫氨酸；防腐剂（例如十八烷基二甲基苯甲酰氯化铵；氯化己烷双胺；氯化盐酸脍胺，苯索氯铵；酚、丁基或苄基醇；烷基对羟基苯甲酸酯如甲基或丙基对羟基苯甲酸酯；邻苯二酚；间苯二酚；环乙醇；3-戊醇；和间甲酚）；低分子量（少于 10 个残基）多肽；蛋白质，如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水性多聚体，例如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸；单糖、双糖或其它碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合剂如 EDTA；糖类，例如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇；形成盐的反离子如钠；金属复合物（例如 Zn 蛋白复合物）；和 / 或非离子表面活性剂，例如吐温（TWEEN™）、PLURONICS™ 或聚乙二醇（PEG）。

[0304] 所述剂型还可以包括一种以上对被治疗的特殊适应症必须的活性化合物，优选那些具有不相互抑制的互补活性的化合物。这些分子以对所需目的有效的量适当的组合。

[0305] 还可以将所述活性成分装入通过例如团聚技术或界面聚合作用制备的微胶囊中，分别如在胶体药物运送系统（例如脂质体、白蛋白微球、微乳液（microsphere）、极小颗粒（nano-particle）和极小胶囊（nanocapsule）或巨乳液（macroemulsion）中的羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚（甲基丙烯酸甲酯（methacrylate））微胶囊。所述技术见 Remington 氏药学第 16 版，Osol, A. 编（1980）。

[0306] 用于体内施用的所述制剂必须无菌。这可通过除菌滤膜过滤容易地完成。

[0307] 可以制备控释制剂。控释制剂的适当实例包括含所述变体的固体疏水性多聚体的半渗透基质，所述基质具有一定形状例如薄膜或微胶囊。控释基质包括聚脂、水凝胶（例如聚（2-羟乙基甲基丙烯酸酯），或聚乙烯醇）、聚交脂（美国专利 3773919）、L-谷氨酸和 γ 乙基-L-谷氨酸的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙酯、LUPRON DEPOT™（由乳酸-羟基乙酸共聚体和亮氨酸脯氨酸乙酸（leuprolide acetate）组成的可注射微球体）等可降解的乳酸-羟基乙酸共聚物、聚-D-(-)-3-羟基丁酸。乙烯-乙酸乙酯和乳酸-羟基乙酸等多聚体能使分子的释放超过 100 天，而某些水凝胶释放蛋白的时间较短。当装入胶囊中的抗体在体内长时间存留时，由于暴露于 37℃ 潮湿环境，其可能变性或凝聚，导致生物活性的丧失并可能导致免疫原性的改变。根据所涉及的机制，可以针对稳定性设计合理的策略。例如，如果发现所述凝聚机制是通过硫-二硫化物互换而形成分子内 S-S 键，那么通过修饰巯基、从酸性溶液中冻干、控制湿度、利用适当添加剂和开发特异性多聚体基质组合物等方法，可以获得稳定性。

[0308] F. 所述多肽的非治疗应用

[0309] 本发明多肽变体可以用作亲和纯化试剂。在这个方法中，可利用本领域熟知的

方法将多肽变体固定于 Sephadex 树脂或滤纸等固相上。使固相化多肽变体与含有待纯化抗原的样品接触，然后用适当的溶剂洗涤支持相，所述溶剂可以基本上除去样品中除了所要纯化的抗原之外的所有物质，其中所述抗原已与固相化多肽变体结合。最终，用另一种适当的溶剂，例如 pH5.0 的甘氨酸缓冲液等洗涤支持相，使抗原从多肽变体中释放。

[0310] 所述多肽变体还可以用于诊断试验，例如，检测特定的细胞、组织或血清中相关抗原的表达。

[0311] 对于诊断应用，通常用可检测物质对所述多肽变体进行标记。可以应用各种标记物，其通常分为以下几种：

[0312] (a) 放射性同位素，例如 ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 和 ^{131}I 。利用例如在免疫学最新方案 (Current Protocols in Immunology)，卷 1 和 2，Coligen 等编，Wiley-interscience，纽约，New York Pubs.(1991) 中所述方法，用放射性同位素对所述多肽进行标记，并且可以利用闪烁计数器检测放射活性。

[0313] (b) 可以应用荧光标记，例如稀土元素螯合物（钆螯合物）或荧光素及其衍生物，例如罗丹明及其衍生物、丹磺酰、丽丝胺、藻红蛋白和得克萨斯红。可以利用例如在免疫学最新方案，出处同上，中所述技术，将所述荧光标记物与所述多肽变体连接。利用荧光计定量荧光。

[0314] (c) 可以应用各种酶 - 底物标记，在美国专利号 4275149 中提供了对其中一些的综合。所述酶通常催化发色底物的化学变化，可以利用各种技术测定这些变化。例如，所述酶可以催化底物的颜色变化，其可以被分光光度计所检测。或者，所述酶可以改变底物的荧光或化学发光。用于定量荧光改变的技术见上面的叙述。化学发光底物通过化学反应激发电子，然后发出可以被检测（例如，用化学发光仪）或给荧光受体提供能量的光。酶标记的实例包括萤光素酶（例如萤火虫萤光素酶或细菌萤光素酶，美国专利号 4737456）、萤光素、2, 3- 二氢二氮杂萘二酮、苹果酸酯脱氢酶、脲酶、辣根过氧化物酶 (HRPO) 等过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β 半乳糖苷酶、葡萄糖淀粉酶、溶菌酶、糖氧化酶（例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶和葡萄糖 -6- 磷酸脱氢酶）、杂环氧化酶（例如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶）、乳过氧化物酶、微过氧化物酶等。在 O' Sullivan 等，制备酶免疫分析所用酶 - 抗体偶联物的方法，酶学方法，(J.Langone 和 H.Van Vunakis 编)，Academic press，纽约，73：147-166(1981) 中叙述了将酶与抗体偶联的技术。

[0315] 酶 - 底物组合的实例包括：

[0316] (i) 辣根过氧化物酶 (HRPO)，氢过氧化物酶为底物，由氢过氧化物酶氧化染料前体（例如邻苯二胺 (OPD) 或 3, 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺氢氯化物 (TMB)）'

[0317] (ii) 碱性磷酸酶 (AP)，以对硝基苯磷酸盐为发色底物；和

[0318] (iii) β -D- 半乳糖苷酶 (β -D-Gal)，有发色底物（例如对硝基苯 - β -D- 半乳糖苷酶）或发荧光底物 4- 甲基伞形基 (umbelliferyl) - β -D- 半乳糖苷酶。

[0319] 本领域技术人员可以应用其它多种酶 - 底物组合。其综述见美国专利号 4275149 和 4318980。

[0320] 有时，标记物与多肽变体间接连接。技术人员知道用于此的各种技术。例如，可使多肽与生物素偶联，并使上述三类标记物之任一与抗生物素蛋白结合，反之亦然。生物素与抗生物素蛋白选择性结合，使标记物能以这种方式间接与多肽变体偶联。或

者，为使标记物与多肽变体间接连接，将多肽变体与小分子半抗原（例如地高辛）偶联，并将上述不同类型标记物之一与抗半抗原多肽变体（例如抗地高辛抗体）偶联。如此可实现标记物与多肽变体的间接偶联。

[0321] 在本发明另一实施方案中，多肽变体不需要标记，其存在可利用与该多肽变体结合的标记抗体检测。

[0322] 本发明多肽变体可用于任何已知的试验方法，如竞争结合试验、直接和间接夹心试验，及免疫沉淀试验。Zola, 单克隆抗体：技术指南，147-158 页 (CRC Press, Inc.1987)。

[0323] 所述多肽变体还可以用于体内诊断试验。通常用放射性核素（例如 ^{111}In 、 ^{99}Tc 、 ^{14}C 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{32}P 或 ^{35}S ）标记所述多肽变体，以便该抗原或其表达细胞可利用免疫闪烁成像术定位。

[0324] G. 多肽变体的体内应用

[0325] 可以将本发明的多肽变体用于治疗哺乳动物，例如患有（或易感）疾病或病症，并可以从所述多肽体的施用中获益的患者。可以用所述多肽变体治疗的疾病很多，包括肿瘤（例如在多肽变体结合 HER2 受体、CD20 或血管内皮生长因子 (VEGF) 时）；过敏性疾病如哮喘等（用抗 IgE 抗体）；和 LFA-1 介导的疾病（例如在所述多肽变体是抗 LFA-1 或抗 ICAM-1 抗体时）等。

[0326] 在抗体结合 HER2 受体的情况中，所述疾病优选表达 HER2 的肿瘤，例如以 HER2 受体过表达为特点的良好或恶性肿瘤。这样的肿瘤包括但不限于：乳腺癌、鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、胃肠道肿瘤、胰腺癌、成胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、膀胱癌、肝细胞瘤、结肠癌、结直肠癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、肾癌、肝癌、前列腺癌、外阴部癌、甲状腺癌、肝癌和各种类型的头颈部肿瘤。

[0327] 根据本文所述，可以制备具有 ADCC 活性增强或降低的 Fc 区变体的多肽。这类分子可以在不同疾病的治疗中应用。

[0328] 例如，在需要破坏或消除组织或外来微生物的疾病或病症的治疗中，可以使用 ADCC 活性增强的多肽变体。例如，所述多肽可以用于治疗：癌症；炎症性疾病；感染（例如细菌、病毒、真菌或酵母感染）；和其它需要去除组织的疾病（例如甲状腺肿）等。

[0329] 在所述多肽的 ADCC 活性被降低的情况中，这类变体可在需要含 Fc 区的具有较长半衰期的多肽的疾病或病症治疗中应用，而且所述多肽优选无不必要的效应功能。例如，含 Fc 区多肽可以是抗组织因子 (TF) 抗体；抗 IgE 抗体；和抗整合素抗体（例如抗 $\alpha 4 \beta 7$ 抗体）。所述含 Fc 区多肽的作用的可能机制可以是阻断配体 - 受体结合对。而且，所述 ADCC 活性降低的含 Fc 区多肽可以是激动剂抗体。

[0330] 所述多肽变体可通过任何适当的方式给药，包括胃肠外、皮下、腹膜内、肺内和鼻内给药，需要进行局部免疫抑制治疗时伤患处内部给药。胃肠外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下给药。另外，所述多肽变体可以通过脉冲输注适当给药，尤其多肽变体剂量渐低的情况。优选所述剂量通过注射给药，最优选静脉或皮下注射，部分地依据所述给药是简短还是持续。

[0331] 对于疾病的预防或治疗，所述多肽变体的适当剂量取决于待治疗疾病的类型、

疾病的严重程度和进程、所述多肽是用于预防还是治疗目的、先前的治疗、患者的病史和对所述多肽变体的应答、以及主治医师的判断。所述多肽变体适于给患者一次给药或系列给药。

[0332] 根据疾病的严重程度和类型，给患者用药时，不管是一次或多次单独给药还是连续输注，首剂可以是约 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ - $15\text{mg}/\text{kg}$ (如 0.1 - $20\text{mg}/\text{kg}$) 多肽变体。通常每日剂量可能约 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ - $100\text{mg}/\text{kg}$ 或更多，这取决于上述因素。数日或更长时间的重复给药，可根据情况将治疗持续至对疾病症状的所需抑制出现为止。但也可使用其它剂量方案。此治疗的进程可通过传统技术和试验轻易监控。

[0333] 所述多肽变体组合物的配制、用量和给药方式应与良好医疗实践一致。这方面考虑的因素包括具体所治疾病、具体所治哺乳动物、每个患者的临床状况、病因、给药部位、给药方法、给药方案和医务人员知道的其它因素。所给多肽变体的“治疗有效量”可以根据这些考虑控制，且是预防、缓解或治疗疾病或病症所必须的最小量。所述多肽变体不必，但可选择与目前常用于预防或治疗所述疾病的一或多种试剂进行配伍。这些其它试剂的有效剂量取决于制剂中多肽变体的量、疾病或治疗的类型、和上述其它因素。这些试剂的应用与以前所用剂量和给药途径相同，或者是以前使用剂量的 1 - 99% 。

[0334] 通过参考下述实施例，本发明将被充分理解。但是，它们不应该被理解为限制本发明的范围。本文中提及的文献和专利均引入本文作为参考。

[0335] 实施例 1 低亲和力受体结合试验

[0336] 该试验测定 IgG Fc 区与被表达为 His₆-谷胱甘肽 S 转移酶 (GST)-标签融合蛋白的重组 Fc γ RIIA、Fc γ RIIB 和 Fc γ RIIIA α 亚单位的结合。因为 IgG1Fc 区对 Fc γ RI 的亲和力在纳摩尔范围内，可以在标准 ELISA 中通过滴定单体 IgG 并用多克隆抗 IgG 测定结合型 IgG 而测定 IgG1Fc 区变体的结合 (见实施例 2)。然而 Fc γ R 家族其它成员 (即 Fc γ RIIA、Fc γ RIIB 和 Fc γ RIIIA) 对 IgG 的亲和力在微摩尔范围内，单体 IgG1 与这些受体的结合不能在 ELISA 试验中可靠地测定。

[0337] 以下试验利用了重组抗-IgE E27 (图 4A 和 4B) 的 Fc 变体，当与人 IgE 以 $1 : 1$ 摩尔浓度混合时，其形成由三个抗 IgE 分子和三个 IgE 分子组成的稳定的六聚体。构建 IgE 的重组嵌合形式 (嵌合 IgE)，它由人 IgE Fc 区和抗 VEGF 抗体的 Fab 段组成 (Presta 等, 癌症研究 57 : 4593-4599 (1997))，每分子抗 VEGF 抗体结合两个 VEGF 分子。当将重组人 VEGF 以 $2 : 1$ 的摩尔比加到嵌合型 IgE : E27 六聚体中时，所述六聚体通过嵌合型 IgE Fab : VEGF 相互作用连接成更大分子量的复合物。此复合物的 E27 组分与 Fc γ RIIA、Fc γ RIIB 和 Fc γ RIIIA α 亚单位以高亲和力结合，其可用 ELISA 试验检测。

[0338] 材料和方法

[0339] 受体包被：Fc γ 受体 α 亚单位表达为 293 细胞中 His₆ 标记的细胞外结构域 (ECD) 的 GST 融合蛋白，其产生 ECD-6His-GST 融合蛋白 (Graham 等, 普通病毒学杂志 36 : 59-74 (1977) 和 Gorman 等 DNA Prot.Eng.Tech.2 : 3-10 (1990))，用 Ni-NTA 柱层析 (Qiagen, Australia) 将缓冲液换成磷酸盐缓冲液而使其纯化。其浓度可利用氨基酸组分分析所得消光系数以 280nm 处的吸收值确定。受体通过加入 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 受体-GST 融合蛋白的 PBS 溶液 $100 \mu\text{l}$ ，并 4°C 保温 48 小时，以 $100 \mu\text{l}$ /孔包被到 Nunc F96maxisorb 平板 (目

录号 439454) 上。 试验前, 用 250 μ l 洗涤缓冲液 (含 0.5% TWEEN20TM 的 PBS pH7.4) 将培养板洗涤 3 次, 并用 250 μ l 试验缓冲液 (50mM Tris 盐缓冲液, 0.05% TWEEN20TM, 0.5% RIA 级牛白蛋白 (Sigma A7888), 和 2mM EDTA pH7.4) 进行封闭。

[0340] 免疫复合物形成: 将溶于 PBS 的等摩尔量 (1 : 1) 的 E27 和重组嵌合 IgE 加到 12 \times 75mm 聚丙烯试管中 (其中每分子嵌合 IgE 结合两分子重组人 VEGF), 25 $^{\circ}$ C 旋转混合 30 分钟。E27 (抗 IgE) / 嵌合 IgE (IgE) 六聚体在此保温期间形成。加入重组人 VEGF (165 型, MW44000) 使其相对于 IgE 浓度为摩尔比 2 : 1, 并且于 25 $^{\circ}$ C 再旋转混合 30 分钟。VEGF- 嵌合 IgE 的结合将 E27 : 嵌合 IgE 六聚体连接成更大分子量的复合物, 其通过 E27 抗体的 Fc 区与 Fc γ R α 亚单位 ECD 包被的平板结合。

[0341] E27 : 嵌合 IgE : VEGF : 以 E27 浓度 5 μ g 将 (摩尔比为 1 : 1 : 2) 复合物加入 Fc γ R α 亚单位包被的平板, 试验缓冲液中四份的总 IgG 为 1 μ g, 在环形 (orbital) 摇床 (shaker) 上 25 $^{\circ}$ C 保温 120 分钟。

[0342] 复合物检测: 平板用洗涤缓冲液洗 5 次以去除未结合的复合物, 加入 100 μ l 特异性为 1 : 10000 试验缓冲液的马辣根过氧化物酶 (HRP) 偶联型山羊抗人 IgG (γ) 重链 (Boehringer Mannheim 1814249), 在环形摇床上 25 $^{\circ}$ C 保温 90 分钟, 从而检测 IgG 的结合。平板用洗涤缓冲液洗 5 次以去除未结合的 HRP 山羊抗人 IgG, 加入 100 μ l 底物溶液 (0.4mg/ml 邻苯二胺二氢氯化物, Sigma P6912, 6mM H₂O₂ 的 PBS 溶液), 25 $^{\circ}$ C 保温 8 分钟, 从而检测结合的抗 IgG。加入 100 μ l 4.5N H₂SO₄ 终止酶反应, 在 96 孔板密度仪 (Molecular Devices) 上于 490nm 波长处测定显色产物。E27 变体复合物的结合用含野生型 E27 的复合物的百分率表示。

[0343] 实施例 2 对人 IgG 抗体中唯一 C1q 结合位点的鉴定

[0344] 在本研究中, 鉴定了人 IgG1 抗体 “C2B8” 的 CH2 结构域中的突变 (Reff 等, 血液 83 : 435 (1994)), 其消除了抗体与 C1q 的结合, 但不改变抗体的构象, 也不影响与各个 Fc γ R 的结合。用丙氨酸扫描诱变方法在人 IgG1 中鉴定了 5 个变体, D270K、D270V、K322A、P329A 和 P331, 其为非裂解型且与 C1q 的结合降低。所述资料显示人 IgG1 的核心 C1q 结合位点不同于鼠 IgG2b 的。另外, 发现 K322A、P329A 和 P331A 与 CD20 抗原及 4 种 Fc 区受体, Fc γ RI、Fc γ RII、Fc γ RIII 和 FcRn, 能够正常地结合。

[0345] 材料和方法

[0346] C2B8 变体的构建: 应用了分别区克隆到前述 PRK 载体 (Gorman 等, DNA 蛋白工程技术 2 : 3 (1990)) 上的抗 CD-20 抗体 C2B8 (Reff 等, 血液 83 : 435 (1994)) 的嵌合轻链和重链。通过定点诱变方法 (Kunkel 等, 美国国家科学院院刊 82 : 488 (1987)), 构建重链 Fc 区的丙氨酸扫描变体。如前述 (Werther 等, 免疫学杂志 157 : 4986 (1996)) 将重链和轻链质粒共转染到腺病毒转化的人胚肾细胞系中。转染的 24 小时后, 将培养基换成无血清培养基, 并在 5 天后收集分泌型抗体。所述抗体用 Protein A-SEPHAROSE CL-4BTM (Pharmacia) 纯化, 更换缓冲液, 并利用 Centricon-30 (Amicon) 浓缩至 0.5ml PBS 溶液, 4 $^{\circ}$ C 保存。应用总 Ig 结合 ELISA 测定所述抗体浓度。

[0347] C1q 结合 ELISA: 用 pH9 的包被缓冲液 (0.05M 碳酸钠缓冲液) 中指定浓度的 C2B8 将 Costar96 孔板 4 $^{\circ}$ C 包被过夜。然后将平板用 PBS/0.05% TWEEN20TM (pH7.4) 洗 3 次, 并用 200 μ l 不含乙基硫代汞水杨酸钠的 ELISA 稀释剂 (0.1M NaPO₄/0.1M NaCl/0.1%

明胶 /0.05% TWEEN20TM/0.05% ProClin300) 室温封闭 1 小时。平板用洗涤缓冲液洗 3 次, 每孔加入 100 μ l 2 μ g/ml C1q (Quidel, San Diego, CA), 室温保温 2 小时。然后平板用洗涤缓冲液洗 6 次。每孔加入 100 μ l 1 : 1000 稀释的绵羊抗补体 C1q 过氧化物酶偶联型抗体 (Bioscience Resource Project), 室温保温 1 小时。平板再用洗涤缓冲液洗 6 次, 并每孔加入 100 μ l 含 OPD (邻苯二胺二氢氯化物 (Sigma)) 的底物缓冲液 (PBS/0.012% H₂O₂)。氧化反应进行 30 分钟, 通过黄色的出现实施观察, 然后加入 100 μ l 4.5N H₂SO₄ 终止反应。用微滴板记录仪 (SPECTRA MAX250TM, Molecular Devices Corp) 在 (492-405) nm 波长处读取吸收值。平行进行相应对照的反应 (即对各个浓度的 C2B8 进行无 C1q 的 ELISA 反应, 还进行无 C2B8 的 ELISA 反应)。对于各个变体, 通过利用 4 参数曲线拟合程序 (KALEIDAGRAPHTM) 绘制吸光度 (492-405nm) 比 C2B8 浓度 (μ g/ml) 的曲线, 并比较 EC₅₀ 值, 可测定 C1q 结合。

[0348] 补体依赖性细胞毒 (CDC) 试验: 本试验基本按文献 (Gazzano-Santoro 等, 免疫学方法 202 : 163(1996)) 进行。用 RHB 缓冲液 (RPMI1640/20mMHEPES (pH7.2)/2mM 谷氨酰胺 /0.1% BSA/100 μ g/ml 庆大霉素) 将 C2B8 稀释成各种浓度 (0.08-20 μ g/ml)。用 RHB 缓冲液将人补体 (Quidel) 稀释成 1 : 3, 并用 RHB 缓冲液将表达 CD20 抗原的 WIL2-S 细胞 (可从 ATCC 获得, Manassas, VA) 稀释至 1 \times 10⁶ 细胞 /ml。将含等体积 C2B8、稀释的人补体和 WIL2-S 细胞的混合物 150 μ l 加到 96 孔平底组织培养板中, 在 37 $^{\circ}$ C 和 5% CO₂ 条件下培养 2 小时, 以促进补体介导的细胞裂解。然后每孔加入 50 μ l alamar blue (Accumed International), 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。用 96 孔荧光计以 530nm 激发光和 590nm 发射光测定吸光度。按 Gazzano-Santoro 等所述, 用相对荧光单位 (RFU) 表示结果。根据 C2B8 标准曲线计算样品的浓度, 并给出各个变体相对于野生型 C2B8 的活性百分率。

[0349] C2B8 变体的 CD20 结合能力: 用文献 (Reff 等, (1994), 出处同上; Gazzano-Santoro 等的综述 (1996), 出处同上) 所述方法测定 C2B8 及其变体与 CD20 抗原的结合。将 WIL2-S 细胞培养 3-4 天, 使其密度达到 1 \times 10⁶ 细胞 /ml。用 FACS 缓冲液 (PBS/0.1% BSA/0.02NaN₃) 洗涤并离心细胞两次, 将细胞重悬, 使其浓度为 5 \times 10⁶ 细胞 /ml。将 200 μ l 细胞 (5 \times 10⁶ 细胞 /ml) 和 20 μ l 稀释的 C2B8 样品加到 5ml 试管中, 并在室温搅拌保温 30 分钟。然后用 2ml 冷 FACS 缓冲液洗涤混合物, 离心后用 200 μ l 冷 FACS 缓冲液重悬。向悬浮液中加入 10 μ l 山羊抗人 IgG-FITC (American Qualex Labs) 并将所述混合物在室温下避光搅拌保温 30 分钟。保温之后, 用 2ml FACS 缓冲液洗涤所述混合物, 离心后重悬于 1ml 冷的固定缓冲液 (1% 福尔马林的 PBS 溶液)。用流式细胞术分析样品, 结果用相对荧光单位 (RFU) 表示, 利用 4 参数曲线拟合程序 (KALEIDAGRAPHTM) 绘制针对抗体浓度的曲线。EC₅₀ 值以其对 C2B8 参考物的百分比表示。

[0350] Fc γ R 结合 ELISA: Fc γ RI α 亚单位 -GST 融合蛋白通过加入受体 -GST 融合蛋白的 1 μ g/ml PBS 溶液 100 μ l 而包被到 Nunc F96maxisorb 平板 (目录号 439454) 上。试验前, 平板用 250 μ l 洗涤缓冲液 (PBS pH7.4, 含 0.5% TWEENTM) 洗 3 次, 并用 250 μ l 试验缓冲液 (50mM Tris 盐缓冲液, 0.05% TWEENTM, 0.5% RIA 级牛白蛋白 (Sigma A7888), 和 2mM EDTA pH7.4) 封闭。将在 1ml 试验缓冲液中稀释为 10 μ g/ml 的样品加到 Fc γ RI α 亚单位包被的平板中, 并在环形摇床上 25 $^{\circ}$ C 保温 120 分钟。平板用洗涤缓冲液洗 5 次以

去除未结合的复合物，加入 100 μ l 特异性为 1 : 10000 试验缓冲液的马辣根过氧化物酶 (HRP) 偶联型山羊抗人 IgG (γ) 重链 (Boehringer Mannheim 1814249)，在环形摇床上 25°C 保温 90 分钟，从而检测 IgG 的结合。平板用洗涤缓冲液洗 5 次以去除未结合的 HRP 山羊抗人 IgG，加入 100 μ l 底物溶液 (0.4mg/ml 邻苯二胺二氢氯化物，Sigma P6912, 6mM H₂O₂ 的 PBS 溶液)，25°C 保温 8 分钟，从而检测结合的抗 IgG。加入 100 μ l 4.5N H₂SO₄ 终止酶反应，在 96 孔板密度仪 (MolecularDevices) 上于 490nm 波长处测定显色产物。变体的结合表示为野生型分子的百分率。

[0351] Fc γ RII 和 III 结合 ELISA 按实施例 1 所述进行。

[0352] 对于 IgG 变体的 FcRn 结合活性检测，在 50mM 碳酸缓冲液 (pH9.6) 中用 2 μ g/ml 链亲合素 (Zymed, South San Francisco) 将 ELISA 平板 4°C 包被过夜，并用 PBS-0.5% BSA (pH7.2) 室温封闭 1 小时。将溶于 PBS-0.5% BSA、0.05% 吐温 20、pH7.2 中的生物素化 FcRn (利用来自 Research Organics, Cleveland, OH 的生物素-X-NHS 进行制备，使用时浓度为 1-2 μ g/ml) 加到平板中，并保温 1 小时。将溶于 PBS-0.5% BSA、0.05% 吐温 20、pH6.0 中的倍比稀释的 IgG 标准品 (1.6-100ng/ml) 或变体，加到所述平板中，并保温 2 小时。以 3, 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺 (Kirgaard&Perry Laboratories) 为底物，利用过氧化物酶标记的山羊 F(ab')₂ 抗人 IgG F(ab')₂，在上述 pH6.0 缓冲液 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) 中测定结合的 IgG。在各步骤之间，用 PBS-0.05% 吐温 20 (pH7.2 或 pH6.0) 洗涤平板。在 Vmax 平板记录仪 (Molecular Devices, MenloPark, CA) 上于 450nm 波长处测定吸光度。用 4 参数非直线回归曲线拟和程序 (KaleidaGraph, Synergy software, Reading, PA) 绘制滴定曲线。计算相当于滴定曲线中点吸收值的 IgG 变体浓度，然后除以相当于标准滴定曲线中点吸收值的标准浓度。

[0353] 结果和讨论

[0354] 通过丙氨酸扫描诱变，在 C2B8 的 CH2 结构域中构建了以 E318A、K320A 和 K322A 起始 d 几个单点突变。所有构建的变体均与 CD20 抗原正常结合 (表 3)。

[0355] 表 3

[0356]

	wt	E318A	K320A	K322A	P329A	P331A
--	----	-------	-------	-------	-------	-------

[0357]

FcRn	+	+	+	+		
CD20	+	+	+	+	+	+
Fc γ RI	+	+	+	+	+	+
Fc γ RII	+	+	+	+	+	+
Fc γ RIII	+	+	+	+	+	+
*C1q	+++	++	+++			
CDC	+	+	+			

[0358] (+) 表示结合，(-) 表示结合消失

[0359] * 对于 C1q 结合，每个 + 号相当于约 33% 的结合。

[0360] 在分析人补体与具有人 Fc 区的抗体的结合时，E318A 和 K320A 激活补体的能力基本上与野生型 C2B8 相同 (表 3)。E318A 和 K320A 对 C1q 的结合与野生型 C2B8 相比差别很小。K320A 与 C1q 的结合仅降低 10%，而 E318A 与 C1q 的结合约降低 30% (图 2)。所述结果表明 E318A 和 K320A 取代对补体激活和 C1q 结合的影响很小。另外，在

C1q 结合研究中, C2B8 的人 IgG1 被 IgG2 代替, 并作为阴性对照。IgG2 变体的 C1q 亲和力和 E318A 和 K320A 变体低很多(图 2)。故这些结果证实, E318 和 K320 不构成人 IgG1 的 C1q 结合核心位点。相反, K322A 取代对补体激活和 C1q 结合均有显著影响。K322A 变体用上述 CDC 试验检测没有 CDC 活性, 其对 C1q 的结合比野生型 C2B8 低 100 倍(图 2)。在人类系统中, K322 是唯一被提为对补体激活和 C1q 结合具有显著影响之 C1q 结合核心位点的残基。

[0361] 由于 Duncan 和 Winter 的研究是用小鼠 IgG2b 进行的, 且上述结果表明人 IgG1 中 K320 和 E318 不参与 C1q 结合, 在不依附于任何理论的前提下, 上述资料提示鼠 IgG 的 C1q 结合区与人的不同。为对此作进一步研究并鉴定不与 C1q 结合并因此不激活补体的其它变体, 根据对 C2B8Fc 的三维结构的评估, 在 K322 附近构建了几个点突变。检测了所构建变体 K274A、N276A、Y278A、S324A、P329A、P331A、K334A 和 T335A 结合 C1q 和激活补体的能力。这些取代中多数对 C1q 结合和补体激活的影响很小或无影响。在上述试验中, P329A 和 P331A 变体不激活补体且与 C1q 的结合降低。P331A 变体不激活补体, 且对 C1q 的结合比野生型 C2B8 低 60 倍(图 3)。将图 3 中所用抗体的浓度范围扩展到 100 μ g/ml 以观察 C1q 与 P331A 变体的结合饱和度。突变 P329A 产生一种不激活补体的抗体, 其对 C1q 的结合比野生型 C2B8(图 2)降低 100 倍(图 3)。

[0362] 检测不与 C1q 结合并因此不激活补体的变体与 Fc 受体: Fc γ RI、Fc γ RIIA、Fc γ RIIB、Fc γ RIIIA、和 FcRn 结合的能力。该研究利用人源化抗 IgE 抗体, 即具有这些突变的 IgG1(见实施例 1)进行。结果表明变体 K322A 和 P329A 与所有 Fc 受体的结合程度等同于野生型蛋白(表 4)。但 P331A 与 Fc γ RIIB 的结合略有下降。

[0363] 总之, 经鉴定人 IgG1CH2 结构域 COOH 末端的两个氨基酸取代 K322A 和 P329A 导致 C1q 结合下降 100 多倍且不能激活 CDC 途径。这两个变体, K322A 和 P329A, 以等同于野生型抗体的亲和力结合所有 Fc 受体。根据表 4 的结果, 在不依附于任何理论的前提下, 我们认为人 IgG1 的 C1q 结合中心在 K322、P329 和 P331 附近, 其不同于鼠 IgG2b 的结合中心, 后者由 E318、K320 和 K322 组成。

[0364] 表 4

[0365]

	wt	E318A	K320A	K322A	P329A	P331A
CD20	100	89	102	86	112	103
^a Fc γ RI	100	93	102	90	104	74
^a Fc γ RIIA	100	113	94	109	111	86
^a Fc γ RIIB	100	106	83	101	96	58
^a Fc γ RIII	100	104	72	90	85	73
CDC	100	108	108	无	无	无

[0366] ^a 与 Fc γ Rs 的结合中, 所述变体以 E27(抗 IgE)为背景制备。

[0367] 上述结果表示为野生型的百分率。

[0368] 利用本实施例所述方法检测了在人 C1q 结合中所涉及的另一残基。用赖氨酸和缬氨酸取代残基 D270, 分别产生变体 D270K 和 D270V。这些变体与人 C1q 的结合均降低(图 6), 且为非裂解型(图 7)。这两个变体与 CD20 抗原正常结合, 并恢复 ADCC 作用。

[0369] 实施例 3C1q 结合增强的变体

[0370] 下述研究表明，位点 K326、A327、E333 和 K334 的残基取代导致产生对 C1q 的结合比野生型抗体至少增加约 30% 的变体。这表明 K326、A327、E333 和 K334 是通过 CDC 途径提高抗体功效的潜在位点。本研究的目的是通过增加与 C1q 的结合而提高抗体的 CDC 活性。通过在 K326 和 E333 上的定点诱变，构建了几个与 C1q 结合增强的变体。在 K326 位点上增加结合的残基依次是 K<V<E<A<G<D<M<W，在 E333 位点上增加结合的残基依次是 E<Q<D<V<G<A<S。构建了四个变体 K326M、K326D、K326E 和 E333S，它们对 C1q 的结合比野生型抗体至少增加 2 倍。变体 K326W 与 C1q 的结合增加了约 5 倍。

[0371] 按上述实施例 2 的方法制备野生型 C2B8 抗体的变体。在 C1q 结合 ELISA 中包括另一个对照抗体，即基本上按美国专利 5736137 中所述方法在中国仓鼠卵巢细胞 (CHO) 中制备的野生型 C2B8，以其证实在 293 肾细胞系中产生的野生型 C2B8 与在 CHO 中产生的抗体 (见图 8 中 “CHO-wt-C2B8”) 具有相同的 C1q 结合活性。本实例中 C1q 结合 ELISA、CDC 分析和 CD20 结合潜力分析按实施例 2 所述进行。

[0372] 如图 8 所示，在 C2B8 中 K326 和 E333 位点上的丙氨酸取代导致产生与 C1q 的结合增加了 30% 的变体。

[0373] 构建了其它几个在 K326 和 E333 位点上的单点突变变体，并且检测了其结合 C1q 和激活补体的能力。构建的所有抗体与 CD20 抗原结合正常。

[0374] 对于 K326，构建的其它单点变体是 K326A、K326D、K326E、K326G、K326V、K326M 和 K326W。如图 9 所示，这些变体与 C1q 的结合亲和力均比野生型抗体增加。K326W、K326M、K326D 和 K326E 的 C1q 结合至少增加两倍 (表 5)。在 K326 的各种变体中，K326W 对 C1q 的亲和力最强。

[0375] 表 5

[0376]

变体	EC ₅₀ 值
野生型	1.53
K326V	1.30
K326A	1.03
K326E	1.08
K326G	0.95
K326D	0.76
K326M	0.67
K326W	0.47
E333S	0.81
E333A	0.98

[0377]

E333G	1.14
E333V	1.18
E333D	1.22
E333Q	1.52
K334A	1.07

[0378] 用疏水性以及带电荷的残基进行的取代可产生与 C1q 结合增强的变体。甚至用甘氨酸进行的取代 (已知其赋予链弹性，且在自然中相当保守) 可产生对 C1q 的亲和力比野生型抗体更高的变体。这表明该位点上的任何氨基酸取代可产生对 C1q 的亲和力增强

的变体。根据对三维结构的评估，K326 和 E333 位于所述 C1q 结合核心位点的附近（图 10）。

[0379] 除了丙氨酸，也可以用其它氨基酸残基取代 E333。这些变体，即 E333S、E333G、E333V、E333D 和 E333Q，与 C1q 的结合均比野生型抗体增强（图 11）。如表 5 所示，对 C1q 结合亲和力的顺序如下：E333S>E333A>E333G>E333V>E333D>E333Q。与具有大侧链氨基酸残基的其它变体（E333V、E333D、E333Q）相比，用小侧链氨基酸残基（即丝氨酸、丙氨酸和甘氨酸）取代产生的变体对 C1q 具有更高的亲和力。变体 E333S 对 C1q 的亲和力最高，其结合比野生型抗体高两倍。这（不局限于任何理论）表明 333 位点对 C1q 结合的影响也可能部分归因于残基的极性。

[0380] 还制备了双变体。如图 12 和 13 所示，双变体 K326M-E333S 和 K326A-E333A 与野生型 C2B8 相比，对人 C1q 的结合至少强三倍（图 12），在介导 CDC 方面至少强两倍（图 13）。可加性表明这些是独立作用的变体。

[0381] 如图 14 所示，通过将人 IgG1 恒定区中 A327 变成甘氨酸，可制备 C1q 结合增加的另一种变体。相反，在人 IgG2 恒定区中，将 G327 变成丙氨酸可降低所述 IgG2 抗体的 C1q 结合。

[0382] 实施例 4 对人 IgG 抗体中 FcR 结合位点的鉴定

[0383] 在本研究中，评估了 IgG1 抗体中 Fc 区各个残基的突变对其与 Fc γ RI、Fc γ RIIA、Fc γ RIIB、Fc γ RIIIA 以及 FcRn 结合的影响。鉴定了与 FcR 的结合增强及降低的抗体变体。

[0384] 材料和方法

[0385] IgG1 变体的构建：将分别具有图 4A 和 4B 中轻链和重链序列的重组抗 IgE E27 作为下述实验的亲本抗体。此抗体结合抗原 IgE，且具有非 A 同种型 IgG1Fc 区。通过定点诱变（Kunkel 等，美国国家科学院院刊 82：488(1987)），在上述亲本抗体的重链中构建 Fc 区的变体。如前述（Werther 等，免疫学杂志，157：4986(1996)），将重链和轻链质粒共转染到腺病毒转化的人胚肾细胞系中。在共转染 24 小时后，将培养基变成无血清培养基，并在 5 天后收集分泌的抗体。所述抗体用蛋白 **G-SEPHAROSE[®]**（Pharmacia）纯化，更换缓冲液，并利用 Centricon-30（Amicon）浓缩成 0.5ml PBS 溶液，4℃保存。浓度用氨基酸组成分析所得消光系数以 280nm 处吸收值确定。

[0386] 高亲和力 Fc γ RIA 结合 ELISA：Fc γ RIA 在 293 细胞中被表达为 His6 标记的细胞外结构域的 GST 融合蛋白，用 Ni-NTA 柱层析纯化。

[0387] 为了纯化 Fc γ RIA，三天后去除转染的 293 细胞的上清。加入蛋白酶抑制剂：50 μ l 抑酶肽（Sigma）/50ml 上清和 PMSF(1mM)。在搅拌室（stirred cell）（Amicon）中将上清浓缩到 10ml，并对 1 升柱缓冲液（50mM Tris pH8.0，20mM 咪唑，300mM NaCl）4℃透析过夜。第二天早上对新鲜柱缓冲液 4℃再透析 4 小时。将所述溶液上样至已用 10ml 柱缓冲液平衡的 1ml Ni⁺⁺ 柱（NTA 超流树脂，Qiagen）上。用 10ml 柱缓冲液洗柱，并用 2.5ml 洗脱缓冲液（50mM Tris pH8.0，250mM 咪唑，300mM NaCl）洗脱蛋白。将蛋白浓缩到 0.5ml，并将缓冲液更换为 PBS。浓度用氨基酸组成分析所得消光系数以 280nm 处吸收值确定。

[0388] 每孔加入 1.5 μ g/ml 受体的 PBS 溶液 100 μ l，4℃保温 24 小时，从而使纯化的受

体以每孔约 150ng 包被到 Nunc F96maxisorb 平板 (目录号 439454) 上。试验前, 平板用 250 μ l 洗涤缓冲液 (含 0.5% **TWEEN 20**[®] 的 PBS pH7.4) 洗 3 次, 并用 250 μ l 试验缓冲液 (50mM Tris 盐缓冲液, 0.05% **TWEEN 20**[®], 0.5% RIA 级牛白蛋白 (Sigma A7888), 和 2mM EDTA pH7.4) 封闭。

[0389] 向 Fc γ RIA 亚单位包被板的最前面 4 个孔中加入 100 μ l IgE, 其浓度为 10 μ g/ml。在随后四个孔中加入 80 μ l 试验缓冲液, 然后加入 10 μ g/ml E27IgG 至终浓度为 2 μ g/ml。平板在环形摇床上 25 $^{\circ}$ C 保温 2 小时。

[0390] 为了进行检测, 用洗涤缓冲液洗涤平板 5 次以去除未结合的抗体。通过加入 100 μ l 与蛋白 G (BIORAD) 偶联的马辣根过氧化物酶 (HRP) 1 : 5000, 可检测 IgG 与 GST-Fc γ RIA 的结合。将 HRP 偶联物在环形摇床上 25 $^{\circ}$ C 保温 1.5 小时。用洗涤缓冲液将平板洗涤 5 次, 去除未结合的 HRP 偶联物。结合通过加入 100 μ l 底物溶液 (0.4mg/ml 邻苯二胺二氢氯化物, Sigma P6912, 6mM H₂O₂ 的 PBS 溶液) 并在 25 $^{\circ}$ C 保温 10 分钟以检测。加入 100 μ l 4.5N H₂SO₄ 终止酶反应, 在 96 孔板密度仪 (Molecular Devices) 上于 490nm 波长处测定显色产物。

[0391] 2 μ g/ml IgG 时 E27 变体的结合表示为野生型 E27 的比率。

[0392] Fc γ RIA THP-1 试验: 向 serocluster 平板 (Costar) 的前三个孔中加入 100 μ l E27, 其在试验缓冲液 (1 \times PBS, 0.1% BSA, 0.01% NaN₃) 中的浓度为 20 μ g/ml。向随后三个孔中加入 92.5 μ l 试验缓冲液, 然后加入 7.5 μ l 20 μ g/ml E27IgG 至终浓度 1.5 μ g/ml。每孔加入 100 μ l THP-1 细胞, 其在 FACS 试验缓冲液中的浓度为 5 百万细胞/ml。将平板在冰上保持 30 分钟。

[0393] 为了检测, 用洗涤缓冲液将细胞洗涤 2 次以去除未结合的抗体。加入 100 μ l FITC 偶联型山羊抗人 IgG 重链特异性 F(ab')₂ 片段 (JacksonImmunoResearch) 1 : 200, 检测 IgG 与 Fc γ RIA 的结合。使 FITC 偶联物与细胞在冰上保持 30 分钟。用试验缓冲液洗涤细胞三次以去除未结合的 FITC 偶联物。细胞用 2.5 μ g/ml P.I. (SIGMA) 染色, 并进行流式细胞术分析。

[0394] 1.5 μ g/ml IgG 时 E27 变体的结合表示为野生型 E27 的比率。

[0395] 将来自平板试验 (Fc γ RIA ELISA) 和基于细胞的试验 (Fc γ RIA THP-1 试验) 的数据平均, 得到 Fc γ RIA 结合活性。

[0396] 低亲和力 Fc γ R 结合 ELISA: 按实施例 1 所述进行 Fc γ RIIA、Fc γ RIIB 和 Fc γ RIIA 结合 ELISA, 并检测稳定的六聚体 (由三个抗 IgE 分子和三个 IgE 分子组成)。

[0397] FcRn 结合 ELISA: 在检测 IgG 变体的 FcRn 结合活性时, 用在 50mM 碳酸缓冲液 (pH9.6) 中浓度为 2 μ g/ml 的链亲和素将 ELISA 平板 4 $^{\circ}$ C 包被过夜, 并用 PBS-0.5BSA (pH7.2) 室温封闭 1 小时。将溶于 PBS-0.5% BSA, 0.05% 吐温 20 (pH7.2) 中的生物素化 FcRn (用来自 Research Organics, Cleveland, OH 的生物素-X-NHS 制备, 使用浓度为 1-2 μ g/ml。) 加到所述平板, 并保温 1 小时。将溶于 PBS-0.5% BSA、0.05% 吐温 20 (pH6.0) 的倍比稀释的 IgG 标准品 (1.6-100ng/ml) 或变体加到所述平板中, 保温 2 小时。结合的 IgG 用上述 pH6.0 缓冲液 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) 中的过氧化物酶标记的山羊 F(ab')₂ 抗人 IgG F(ab')₂, 及随后的 3, 3', 5, 5'-四甲

基联苯胺 (Kergaard&PerryLaboratories) 底物测定。在各步骤之间, 平板用 PSB-0.05% 吐温 20 (pH7.2 或 pH6.0) 洗涤。在 Vmax 平板记录仪 (Molecular Devices, Menlo Park, CA) 上于 450nm 波长处测定吸光度。用 4 参数非直线回归曲线拟和程序 (KaleidaGraph, Synergy software, Reading, PA) 绘制滴定曲线。计算对应于标准品滴定曲线中点吸收值的 IgG 变体浓度, 然后用除以标准品滴定曲线的中点吸收值所对应的标准品浓度。

[0398] 体外 ADCC 试验: 为了制备铬 51 标记的靶细胞, 在组织平板中培养肿瘤细胞, 并将其收集于 10mM EDTA 的无菌 PBS 溶液中。在所有试验中用 SK-BR-3 细胞, 一种 3+HER2- 过表达的人乳腺癌细胞系, 作为靶细胞。用细胞培养基将脱壁细胞洗涤两次。将细胞 (5×10^6) 用 $200 \mu\text{Ci}$ 铬 51 (NewEngland Nuclear/DuPont) 37°C 标记 1 小时, 并间或搅拌。用细胞培养液将标记的细胞洗涤三次, 然后将其重新悬浮至浓度为 1×10^5 细胞 / ml。细胞在试验前不调理, 或如下调理, 即与 rhuMAb HER2 野生型 (HERCEPTIN) 或 7 种 Fc 突变体 (G14、G18、G17、G36、G30、G31 和 G34) 保温, 它们在 PBMC 试验中浓度分别是 100ng/ml 和 1.25ng/ml, 在 NK 试验中浓度分别为 20ng/ml 和 1ng/ml。

[0399] 通过收集正常健康供体的肝素抗凝血细胞, 制备外周血单核细胞, 并用等体积磷酸盐缓冲液 (PBS) 稀释。然后将所述血细胞置于淋巴细胞分离液 (LYMPHOCYTE SEPARATION MEDIUM) (LSM: Organon Teknika) 上层并按说明书离心。在 LSM 血浆分界面上收集单核细胞, 并用 PBS 洗涤三次。将效应细胞悬浮于细胞培养基中, 终浓度为 1×10^7 细胞 / ml。

[0400] 通过 LSM 纯化之后, 用 NK 细胞分离试剂盒和磁柱 (Miltenyi Biotech) 按说明书, 通过阴性选择从 PBMC 中分离自然杀伤 (NK) 细胞。收集分离的 NK 细胞, 洗涤, 重悬于细胞培养基至终浓度 2×10^6 细胞 / ml。通过流式细胞术证实 NK 细胞同一性。

[0401] 通过将效应细胞 (PBMC 或 NK) 用细胞培养基沿着微滴定板 ($100 \mu\text{l}$ 终体积) 的各行进行倍比稀释, 制备各种效靶比。对于 PBMC, 效应细胞的浓度范围为 1.0×10^7 / ml 到 2.0×10^4 / ml, 而对于 NK, 其范围为 2.0×10^6 / ml 到 3.9×10^3 / ml。滴定效应细胞之后, 向平板的每孔中加入 $100 \mu\text{l}$ 浓度为 1×10^5 细胞 / ml 的铬 51 标记的靶细胞 (调理的或未调理的)。这导致 PBMC 细胞的起始效靶比为 100 : 1, NK 细胞的起始效靶比为 20 : 1。所有试验均做双份, 每个平板均包括自发裂解对照 (无效应细胞) 和总裂解对照 (靶细胞加 $100 \mu\text{l}$ 1% 十二烷基硫酸钠, 1N 氢氧化钠)。将平板 37°C 保温 18 小时, 其后用上清收集系统 (Skatron Instrument, Inc.) 收集细胞培养上清, 并在 Minaxi auto- γ 5000 系列 γ 计数器上计数 1 分钟。结果用下式表示为细胞毒百分率:

[0402] $\% \text{细胞毒} = (\text{样品 cpm} - \text{自发裂解}) / (\text{总裂解} - \text{自发裂解}) \times 100$

[0403] 然后用 4 参数曲线拟和程序评价所述资料 (KaleidaGraph3.0.5)。

[0404] 结果

[0405] 制备了各种抗体, 其具有不同于亲本抗体的 FcR 结合活性。所述变体的 FcR 结合资料见下表 6 和表 7。与 E27 亲本抗体相比, 另一抗体, T370Q, 也呈现增强的 FcRn 结合。

[0406]

表 6
CH2 结构域变体

IG2	Res#EU (Kabat)	FcRn 均值	sd	n	FcγRI 均值	sd	n	FcγRIIA 均值	sd	FcγRIIB 均值	sd	FcγRIIIA 均值	sd	
对所有FcγR的结合降低														
1	233-236 ELLG > PVA-	0.54	(0.20)	3	0.12	(0.06)	6	0.08	(0.01)	0.12	(0.01)	0.04	(0.02)	n=2
2	P238A(251)	1.49	(0.17)	3	0.60	(0.05)	5	0.38	(0.14)	0.36	(0.15)	0.07	(0.05)	n=4
14	D265A(278)	1.23	(0.14)	4	0.14	(0.04)	6	0.07	(0.01)	0.13	(0.05)	0.09	(0.06)	n=4
17	E269A(282)	1.05			0.52	(0.03)	6	0.65	(0.18)	0.75	(0.29)	0.45	(0.13)	n=5
18	D270A(283)	1.05			0.76	(0.12)	6	0.06	(0.01)	0.11	(0.05)	0.14	(0.04)	n=5
58	N297A(314)	0.80	(0.18)	8	0.15	(0.06)	7	0.05	(0.00)	0.10	(0.02)	0.03	(0.01)	n=3
52	A327Q(346)	0.97			0.63	(0.15)	7	0.13	(0.03)	0.14	(0.03)	0.06	(0.01)	n=4
64	P329A(348)	0.80			0.48	(0.10)	6	0.08	(0.02)	0.12	(0.08)	0.21	(0.03)	n=4
对FcγRII和FcγRIII的结合降低														
3	S239A(252)	1.06			0.81	(0.09)	7	0.73	(0.25)	0.76	(0.36)	0.26	(0.08)	n=3
33	E294A(311)	0.75			0.90	(0.08)	4	0.87	(0.19)	0.63	(0.17)	0.66	(0.14)	n=5
34	Q295A(312)	0.79			1.00	(0.11)	4	0.62	(0.20)	0.50	(0.24)	0.25	(0.09)	n=5
39	V303A(322)	1.26	(0.21)	3	0.91	(0.11)	5	0.86	(0.10)	0.65	(0.17)	0.33	(0.09)	n=8
对FcγRII和FcγRIII的结合增加														
11	T256A(269)	1.91	(0.43)	6	1.14	(0.14)	4	1.41	(0.27)	2.06	(0.66)	1.32	(0.18)	n=9
30	K290A(307)	0.79	(0.14)	3	1.01	(0.08)	4	1.29	(0.21)	1.40	(0.18)	1.28	(0.21)	n=7

[0407]

44	D312A(331)	1.50 (0.06)	4	1.01 (0.12)	5	1.20 (0.24)	1.19 (0.07)	1.23 (0.14)	n=3
51	K326A(345)	1.03		1.04 (0.05)	4	1.26 (0.21)	1.49 (0.27)	1.22 (0.28)	n=5
197	A330(349)K			1.28		1.25	1.28		n=1
273	A339(359)T			1.23		1.11	1.23	1.42	n=1
影响 FcyRII									
10	R255A(268)	0.59 (0.19)	4	1.26 (0.26)	8	1.30 (0.20)	1.59 (0.42)	0.98 (0.18)	n=5
12	E258A(271)	1.18		1.18 (0.13)	4	1.33 (0.22)	1.65 (0.38)	1.12 (0.12)	n=5
15	S267A(280)	1.08		1.20 (0.14)	4	1.64 (0.18)	2.06 (0.35)	1.14 (0.25)	n=7
16	H268A(281)	1.02 (0.22)	3	1.05 (0.11)	4	1.22 (0.14)	1.45 (0.23)	0.52 (0.09)	n=12
19	E272A(285)	1.34 (0.24)	4	1.04 (0.06)	4	1.24 (0.11)	1.58 (0.19)	0.74 (0.12)	n=4
21	N276A(289)	1.15 (0.21)	3	1.05 (0.14)	4	1.29 (0.20)	1.34 (0.40)	0.95 (0.04)	n=4
23	D280A(295)	0.82		0.97 (0.06)	4	1.34 (0.14)	1.60 (0.31)	1.09 (0.20)	n=10
25	E283A(300)	0.71		0.97 (0.03)	4	1.24 (0.23)	1.20 (0.17)	1.01 (0.14)	n=5
26	H285A(302)	0.85		0.96 (0.07)	4	1.26 (0.12)	1.23 (0.15)	0.87 (0.04)	n=4
27	N286A(303)	1.24 (0.04)	2	0.94 (0.20)	13	1.28 (0.23)	1.39 (0.14)	1.03 (0.08)	n=5
31	R292A(309)	0.81 (0.18)	4	0.93 (0.02)	4	0.27 (0.14)	0.18 (0.07)	0.90 (0.18)	n=9
36	S298A(317)	0.80		1.10 (0.04)	3	0.40 (0.08)	0.21 (0.11)	1.30 (0.18)	n=12
38	R301A(320)	0.86		1.06 (0.10)	4	1.12 (0.12)	1.26 (0.14)	0.21 (0.08)	n=6
38B	R301M(320)	0.88		1.06 (0.12)	4	1.29 (0.17)	1.56 (0.12)	0.48 (0.21)	n=4
40	V305A(324)	1.46 (0.48)	6	1.04 (0.19)	10	1.12 (0.12)	1.23 (0.22)	0.84 (0.15)	n=4
41	T307A(326)	1.81 (0.32)	6	0.99 (0.14)	4	1.19 (0.37)	1.35 (0.33)	1.12 (0.18)	n=12

[0408]

42	L309A(328)	0.63 (0.18)	4	0.93 (0.18)	6	1.13 (0.08)	1.26 (0.12)	1.07 (0.20)	n=3
45	N315A(334)	0.76 (0.14)	3	1.27 (0.36)	6	1.15 (0.06)	1.30 (0.17)	1.07 (0.21)	n=5
48	K320A(339)	1.10		0.98 (0.09)	5	1.12 (0.11)	1.22 (0.05)	0.87 (0.17)	n=4
49	K322A(341)	0.98		0.94 (0.05)	6	1.15 (0.11)	1.27 (0.24)	0.61 (0.14)	n=5
50	S324A(343)	1.08		0.95 (0.05)	4	0.82 (0.22)	0.70 (0.12)	1.12 (0.17)	n=4
65	P331A(350)	0.85		1.30 (0.34)	8	1.29 (0.14)	1.47 (0.28)	1.03 (0.19)	n=3
54	E333A(352)	1.03 (0.01)	2	0.98 (0.15)	5	0.92 (0.12)	0.76 (0.11)	1.27 (0.17)	n=10
56	T335A(354)	0.98		1.00 (0.05)	4	0.79 (0.22)	0.65 (0.26)	0.92 (0.54)	n=3
57	S337A(356)	1.03		1.17 (0.23)	3	1.22 (0.30)	1.26 (0.06)	0.94 (0.18)	n=4

影响 FcγRIII

5	K248A(261)	0.87		0.95 (0.05)	5	1.06 (0.12)	1.01 (0.12)	0.71 (0.05)	n=4
6	D249A(262)	0.93		1.04 (0.10)	4	1.02 (0.12)	0.94 (0.02)	0.66 (0.07)	n=5
7	M252A(265)	0.64 (0.13)	4	0.99 (0.10)	5	1.01 (0.18)	1.15 (0.22)	0.65 (0.17)	n=6
9	S254A(267)	< 0.10		0.96 (0.08)	4	0.97 (0.24)	1.15 (0.38)	0.73 (0.14)	n=3
16	H268A(281)	1.02 (0.22)	3	1.05 (0.11)	4	1.22 (0.14)	1.45 (0.23)	0.52 (0.09)	n=12
19	E272A(285)	1.34 (0.24)	4	1.04 (0.06)	4	1.24 (0.11)	1.58 (0.19)	0.74 (0.12)	n=4
22	Y278A(291)	0.90		0.96 (0.02)	4	1.11 (0.08)	1.10 (0.16)	0.67 (0.11)	n=4
29	T289A(306)	0.86		0.93 (0.03)	4	0.96 (0.33)	0.83 (0.22)	0.62 (0.19)	n=7
32	E293A(310)	0.85		1.11 (0.07)	4	1.08 (0.19)	1.07 (0.20)	0.31 (0.13)	n=6
35	Y296F(313)	0.79		1.07 (0.12)	4	0.97 (0.26)	0.84 (0.18)	0.52 (0.09)	n=5
36	S298A(317)	0.85		1.10 (0.04)	3	0.40 (0.08)	0.21 (0.11)	1.30 (0.18)	n=12

[0409]

38	R301A(320)	0.86	1.06 (0.10)	4	1.12 (0.12)	1.26 (0.14)	0.21 (0.08)	n=6	
38B	R301M(320)	0.88	1.06 (0.12)	4	1.29 (0.17)	1.56 (0.12)	0.48 (0.21)	n=4	
49	K322A(341)	0.98	0.94 (0.05)	6	1.15 (0.11)	1.27 (0.24)	0.61 (0.14)	n=5	
54	E333A(352)	1.03 (0.01)	2	0.98 (0.15)	5	0.92 (0.12)	0.76 (0.11)	1.27 (0.17)	n=10
55	K334A(353)	1.05 (0.03)	2	1.10 (0.06)	4	1.01 (0.15)	0.90 (0.12)	1.39 (0.19)	n=17
对 γ R无影响									
4	K246A(259)	1.03	0.94 (0.06)	4	1.02 (0.10)	0.92 (0.15)	1.14 (0.38)	n=4	
4B	K246M(259)	0.69	0.83 (0.05)	5	0.83 (0.06)	0.76 (0.05)	0.95 (0.09)	n=3	
5B	K248M(261)	0.79	0.95 (0.06)	4	0.89 (0.09)	0.83 (0.04)	1.01 (0.23)	n=3	
8	I253A(266)	< 0.10	0.96 (0.05)	4	1.14 (0.02)	1.18 (0.06)	1.08 (0.14)	n=3	
13	T260A(273)	1.09	0.93 (0.09)	4	0.89 (0.14)	0.87 (0.10)	0.89 (0.08)	n=4	
20	K274A(287)	1.18	1.02 (0.04)	4	0.86 (0.09)	0.96 (0.10)	1.11 (0.08)	n=3	
24	V282A(299)	1.13 (0.07)	2	0.96 (0.02)	4	1.15 (0.13)	1.00 (0.18)	n=4	
28	K288A(305)	0.38 (0.12)	5	0.88 (0.15)	15	1.15 (0.26)	1.06 (0.04)	n=4	
37	Y300F(319)	0.74 (0.10)	2	1.07 (0.15)	4	1.11 (0.04)	1.01 (0.10)	n=3	
43	Q311A(330)	1.62 (0.25)	4	0.93 (0.05)	4	1.11 (0.06)	0.93 (0.17)	n=3	
46	K317A(336)	1.44 (0.18)	4	0.92 (0.17)	6	1.13 (0.05)	1.10 (0.23)	n=4	
47	E318A(337)	0.85	0.92 (0.07)	4	1.04 (0.10)	1.17 (0.23)	1.01 (0.05)	n=3	
53	A330Q(349)	0.76	0.96 (0.10)	4	1.01 (0.12)	1.02 (0.02)	0.75 (0.18)	n=3	

[0410]

表 7
CH3 结构域变体

IG2	Res#EU (Kabat)	FcRn 均值	sd	n	FcYRI 均值	sd	n	FcYRIIA 均值	sd	FcYRIIB 均值	sd	FcYRIIA 均值	sd	FcYRIIA 均值	sd
B1	K338(358)A	1.14		3	0.90 (0.05)		3	0.78 (0.09)		0.63 (0.08)		0.15 (0.01)		n=2	
B1A	K338(358)M	0.78		3	0.99 (0.08)		3	0.99 (0.13)		0.93 (0.15)		0.49 (0.04)		n=2	
B2	K340(360)A	1.02		3	1.04 (0.07)		3	1.05 (0.18)		0.96 (0.20)		0.84 (0.11)		n=2	
B2A	K340(360)M	1.20		3	1.17 (0.11)		3	1.10 (0.12)		1.20 (0.19)		0.75 (0.12)		n=2	
B3	Q342(363)A	1.09		3	1.13 (0.11)		3	1.01 (0.10)		1.09 (0.23)		0.98 (0.10)		n=2	
B4	R344(365)A	0.77		3	1.04 (0.08)		3	0.89 (0.14)		0.91 (0.04)		0.97 (0.07)		n=4	
B5	E345(366)A	1.18		3	1.06 (0.05)		3	1.03 (0.10)		0.98 (0.10)		0.97 (0.13)		n=4	
B6	Q347(368)A	0.95		3	1.04 (0.06)		3	1.00 (0.03)		0.92 (0.02)		1.04 (0.12)		n=4	
B7	R355(376)A	1.06		3	1.09 (0.07)		3	0.84 (0.09)		0.87 (0.11)		0.98 (0.09)		n=4	
B8	E356(377)A	1.21 (0.11)		2	1.05 (0.04)		3	0.90 (0.02)		0.99 (0.13)		0.92 (0.03)		n=3	
B9	M358(381)A	0.96		3	1.06 (0.07)		3	1.11 (0.06)		1.16 (0.25)		0.91 (0.09)		n=3	
B10	T359(382)	1.04		3	1.04 (0.05)		3	1.13 (0.10)		1.15 (0.04)		1.23 (0.26)		n=3	
B11	K360(383)A	1.30 (0.08)		4	1.02 (0.04)		3	1.12 (0.10)		1.12 (0.08)		1.23 (0.16)		n=6	
B12	N361(384)A	1.16		3	1.00 (0.03)		3	0.82 (0.07)		0.82 (0.12)		1.08 (0.06)		n=3	
B13	Q362(385)A	1.25 (0.24)		3	1.00 (0.04)		3	1.03 (0.10)		1.02 (0.03)		1.03 (0.16)		n=4	
B14	Y373(396)A	0.86		3	0.98 (0.07)		3	0.84 (0.11)		0.75 (0.08)		0.67 (0.04)		n=5	
B15	S375(398)A	1.17 (0.19)		5	0.95 (0.02)		3	1.08 (0.06)		1.14 (0.11)		1.04 (0.05)		n=6	
B16	D376(399)A	1.45 (0.36)		4	1.00 (0.05)		3	0.80 (0.16)		0.68 (0.14)		0.55 (0.10)		n=5	

[0411]

[0412]

B17	A378(401)Q	1.32 (0.13)	3	1.06 (0.05)	3	1.40 (0.17)	1.45 (0.17)	1.19 (0.17)	1.19 (0.17)	n=5
B18	E380(405)A	2.19 (0.29)	6	1.04 (0.06)	3	1.18 (0.01)	1.07 (0.05)	0.92 (0.12)	0.92 (0.12)	n=2
B19	E382(407)A	1.51 (0.18)	4	1.06 (0.03)	3	0.95 (0.11)	0.84 (0.04)	0.76 (0.17)	0.76 (0.17)	n=3
B20	S383(408)A	0.74		1.03 (0.03)	3	0.92 (0.04)	0.94 (0.05)	0.88 (0.07)	0.88 (0.07)	n=3
B21	N384(410)A	0.88		1.00 (0.01)	3	1.05 (0.19)	1.10 (0.18)	0.96 (0.18)	0.96 (0.18)	n=8
B22	Q386(414)A	0.70 (0.10)	2	1.14 (0.08)	3	1.08 (0.13)	1.19 (0.25)	0.98 (0.14)	0.98 (0.14)	n=9
B23	E388(416)A	0.64 (0.12)	2	1.15 (0.09)	3	0.87 (0.03)	0.94 (0.09)	0.62 (0.04)	0.62 (0.04)	n=3
B24	N389(417)A	0.73		1.00 (0.02)	3	0.98 (0.15)	0.81 (0.04)	0.75 (0.02)	0.75 (0.02)	n=3
B25	N390(418)A	0.87		1.06 (0.04)	3	0.99 (0.10)	0.94 (0.02)	0.87 (0.09)	0.87 (0.09)	n=3
B26A	Y391(419)A	1.14		1.00 (0.08)	3	0.97 (0.10)	0.94 (0.02)	0.86 (0.05)	0.86 (0.05)	n=3
B26B	Y391(419)F	0.81 (0.10)	2	1.00 (0.01)	3	1.05 (0.12)	1.11 (0.08)	1.01 (0.15)	1.01 (0.15)	n=5
B27	K392(420)A	0.97		1.01 (0.08)	3	0.92 (0.20)	0.94 (0.01)	0.79 (0.22)	0.79 (0.22)	n=3
B28	L398(426)A	0.94 (0.04)	2	1.13 (0.15)	6	1.17 (0.11)	1.20 (0.08)	0.94 (0.04)	0.94 (0.04)	n=3
B29	S400(428)A	0.64 (0.07)	3	1.10 (0.09)	3	0.95 (0.04)	0.99 (0.08)	0.83 (0.07)	0.83 (0.07)	n=2
B30	D401(430)A	1.10 (0.09)	3	1.13 (0.16)	6	1.11 (0.12)	1.19 (0.11)	0.97 (0.10)	0.97 (0.10)	n=5
B31	D413(444)A	1.21 (0.07)	2	1.00 (0.01)	3	0.83 (0.08)	0.84 (0.06)	0.90 (0.16)	0.90 (0.16)	n=2
B32	K414(445)A	1.02		1.00 (0.04)	3	0.64 (0.15)	0.58 (0.18)	0.82 (0.27)	0.82 (0.27)	n=3
B33	S415(446)A	0.44		1.04 (0.03)	3	0.90 (0.11)	0.88 (0.05)	0.86 (0.18)	0.86 (0.18)	n=2
B34	R416(447)A	1.08		0.96 (0.04)	3	0.68 (0.05)	0.80 (0.05)	0.71 (0.08)	0.71 (0.08)	n=2
B35	Q418(449)A	0.77 (0.03)	2	0.98 (0.01)	3	1.00 (0.01)	0.96 (0.02)	0.96 (0.05)	0.96 (0.05)	n=2
B36	Q419(450)A	0.76 (0.01)	2	0.97 (0.02)	3	0.68 (0.09)	0.63 (0.07)	0.86 (0.08)	0.86 (0.08)	n=3

[0413]

B37	N421(452)A	0.98		0.99 (0.01)	3	0.90 (0.03)	0.81 (0.0)	0.87 (0.12)	n=2
B38	V422(453)A	1.01		0.98 (0.02)	3	0.89 (0.0)	0.83 (0.05)	0.83 (0.12)	n=2
B39	S424(455)A	1.41 (0.14)	3	0.98 (0.03)	3	1.04 (0.06)	1.02 (0.02)	0.88 (0.09)	n=2
B40	E430(461)A	0.93 (0.03)	2	1.05 (0.02)	3	1.24 (0.11)	1.28 (0.10)	1.20 (0.18)	n=5
B41	H433(464)A	0.41 (0.14)	2	0.98 (0.03)	3	0.92 (0.18)	0.79 (0.18)	1.02 (0.15)	n=3
B42	N434(465)A	3.46 (0.37)	7	1.00 (0.04)	3	0.97 (0.07)	0.98 (0.13)	0.74 (0.12)	n=5
B43	H435(466)A	< 0.10	4	1.25 (0.09)	3	0.77 (0.05)	0.72 (0.05)	0.78 (0.03)	n=3
B44	Y436(467)A	< 0.10	2	0.99 (0.02)	2	0.93 (0.05)	0.91 (0.06)	0.91 (0.15)	n=3
B45	T437(468)A	0.99 (0.07)		1.00 (0.02)	3	1.12 (0.18)	1.00 (0.22)	0.77 (0.19)	n=5
B46	Q438(469)A	0.79 (0.05)	2	1.02 (0.05)	3	0.80 (0.10)	0.72 (0.16)	1.01 (0.17)	n=5
B47	K439(470)A	0.70 (0.04)	2	0.98 (0.04)	3	0.78 (0.16)	0.68 (0.22)	0.86 (0.19)	n=4
B48	S440(471)A	0.99		1.01 (0.02)	3	1.10 (0.15)	1.11 (0.26)	0.93 (0.01)	n=3
B49	S442(473)A	0.86		1.02 (0.02)	3	0.98 (0.08)	0.91 (0.11)	0.95 (0.10)	n=5
B50	S444(475)A	0.80		1.01 (0.02)	3	1.07 (0.03)	1.03 (0.03)	0.88 (0.12)	n=2
B51	K447(478)A	0.62 (0.12)	3	1.02 (0.03)	3	0.95 (0.05)	0.91 (0.05)	0.84 (0.09)	n=2

对Fc γ R的结合增加了的变体在本实施例中所测的结合值大都 >1.20 ，对Fc γ R的结合降低了的那些变体在本实施例中所测的结合值大都 ≤ 0.80 。

对Fc γ Rn的结合增加了的变体在本实施例中所测的结合值大都 >1.30 ，对Fc γ Rn的结合降低了的那些变体在本实施例中所测的结合值大都 ≤ 0.70 。

除了丙氨酸变体，还制备了各种非丙氨酸取代型变体，它们的FcR结合活性总结在下表中。

表 8
非丙氨酸变体

IG2	Res ^{EU} (Kabat)	FcRn 均值 sd n	FcYRI 均值 sd n	FcYRIIA 均值 sd n	FcYRIIB 均值 sd n	FcYRIIIA 均值 sd n	FcYRIIIB 均值 sd n
222	D249(262)E		0.97	0.99	0.84	n=1	n=1
176	T256(269)G		1.10 (0.03)	1.06 (0.07)	0.96 (0.27)	n=2	n=2
254	T256(269)N		1.03	0.89	1.13	n=1	n=1
157	D265(278)N		0.02 (0.01)	0.03 (0.01)	0.02 (0.01)	n=3	n=3
158	D265(278)E		0.11 (0.04)	0.03 (0.01)	0.02 (0.01)	n=3	n=3
189	S267(280)G		R131 1.21 (0.05) H131 0.59 (0.09)	0.97 (0.16)	0.09 (0.02)	n=3	n=3
84	H268(281)N		1.33	1.41	0.56	n=1	n=1
85	H268(281)S		1.35	1.38	0.81	n=1	n=1
87	H268(281)Y		1.19	1.29	0.76	n=1	n=1
168	E269(282)D		0.89 (0.10)	0.73 (0.07)	1.13 (0.21)	n=2	n=2
169	E269(282)Q		0.08 (0.01)	0.16 (0.00)	0.28 (0.03)	n=2	n=2
92	D270(283)N		0.06 (0.01)	0.10 (0.02)	0.04 (0.00)	n=2	n=2
93	D270(283)E		0.55 (0.05)	0.38 (0.05)	1.17 (0.01)	n=2	n=2
223	E272(285)Q		1.93	1.81	0.82	n=1	n=1
224	E272(285)N		0.43	0.23	0.50	n=1	n=1
167	K274(287)Q		0.86	0.94	0.62	n=1	n=1
165	N276(289)K		0.81	0.77	0.61	n=1	n=1

[0414]

[0415]

233	N276(289)Q	1.09	0.79	0.91	n=1
79	D280(295)N	1.26 (0.07)	1.38 (0.04)	1.13 (0.13)	n=2
149	D280(295)S	1.07 (0.06)	1.04 (0.08)	1.09 (0.06)	n=2
226	E283(300)Q	1.12	1.24	1.19	n=1
227	E283(300)S	1.03	1.07	0.85	n=1
228	E283(300)N	1.18	1.28	0.94	n=1
229	E283(300)D	1.14	1.23	0.95	n=1
23	N286(303)Q	1.52	1.13	0.96	n=1
237	N286(303)S	1.72	1.38	1.32	n=1
238	N286(303)D	1.41	1.23	0.98	n=1
73	K290(307)Q	1.17	1.26	1.40	n=1
75	K290(307)S	1.27	1.34	1.26	n=1
77	K290(307)E	1.10	1.20	1.30	n=1
78	K290(307)R	1.05	1.15	1.08	n=1
177	K290(307)G	1.07	1.21	1.23	n=1
80	R292(309)K	0.71 (0.17)	0.75 (0.10)	1.15 (0.18)	n=3
81	R292(309)H	0.21 (0.09)	0.12 (0.01)	0.92 (0.08)	n=2
82	R292(309)Q	0.47 (0.12)	0.25 (0.06)	0.45 (0.09)	n=3
83	R292(309)N	0.54 (0.16)	0.29 (0.07)	0.88 (0.02)	n=3
144	E293(310)Q	0.85 (0.03)	0.77 (0.13)	0.99 (0.04)	n=2
145	E293(310)D	0.90 (0.02)	0.88 (0.07)	0.37 (0.07)	n=2
147	E293(310)K	1.13 (0.04)	1.31 (0.17)	0.72 (0.08)	n=4

173 E294(311)Q	1.01	0.95	0.84	n=1
174 E294(311)D	0.37	0.26	0.14	n=1
185 Y296(313)H	0.90	0.81	0.92	n=1
186 Y296(313)W	0.96	0.93	1.38	n=1
70 S298(317)G	0.87 (0.17)	0.63 (0.33)	0.46 (0.09)	n=4
71 S298(317)T	0.41 (0.21)	0.40 (0.19)	0.89 (0.20)	n=3
72 S298(317)N	0.08 (0.01)	0.16 (0.03)	0.06 (0.01)	n=2
218 S298(317)V	0.11 (0.06)	0.17 (0.01)	0.33 (0.19)	n=3
219 S298(317)L	1.14 (0.12)	1.42 (0.31)	0.34 (0.04)	n=3
150 V303(322)L	0.89 (0.05)	0.73 (0.10)	0.76 (0.09)	n=4
151 V303(322)T	0.64 (0.11)	0.34 (0.05)	0.20 (0.05)	n=4
217 E318(337)K	1.03	1.08	0.72	n=1
172 K320(339)R	0.71	0.66	0.68	n=1
202 K320(339)M	1.34	1.40	1.27	n=1
204 K320(339)Q	1.23	1.12	1.17	n=1
205 K320(339)E	1.29	1.34	1.12	n=1
235 K320(339)R	1.24	0.95	0.86	n=1
155 K322(341)R	0.87 (0.07)	0.87 (0.21)	0.92 (0.15)	n=3
156 K322(341)Q	0.87 (0.02)	0.92 (0.23)	0.78 (0.18)	n=3
206 K322(341)E	1.38	1.34	0.81	n=1
207 K322(341)N	0.57	0.36	0.04	n=1

[0416]

213	S324(343)N	1.15	1.09	0.97	n=1
214	S324(343)Q	0.82	0.83	0.78	n=1
215	S324(343)K	0.66	0.37	0.77	n=1
216	S324(343)E	0.82	0.73	0.81	n=1
208	K326(345)S	1.44	1.62	1.37	n=1
209	K326(345)N	1.04	1.00	1.27	n=1
210	K326(345)Q	1.36	1.41	1.15	n=1
211	K326(345)D	1.68	2.01	1.36	n=1
212	K326(345)E	1.34 (0.27)	1.47 (0.33)	1.26 (0.04)	n=2
131	A327(346)S	0.23 (0.06)	0.22 (0.05)	0.06 (0.01)	n=4
159	A327(346)G	0.92 (0.09)	0.83 (0.10)	0.36 (0.05)	n=3
196	A330(349)D	0.18	0.08	0.07	n=1
197	A330(349)K	1.28	1.25	1.28	n=1
198	P331(350)S	1.00	0.86	0.86	n=1
199	P331(350)N	0.86	0.65	0.23	n=1
200	P331(350)E	1.06	0.91	0.42	n=1
203	P331(350)K	0.94	0.71	0.33	n=1
141	E333(352)Q	0.70 (0.05)	0.64 (0.09)	1.10 (0.03)	n=2
142	E333(352)N	0.59 (0.04)	0.52 (0.07)	0.56 (0.10)	n=2
143	E333(352)S			0.94	n=1
152	E333(352)K			0.85 (0.14)	n=3
153	E333(352)R	0.75 (0.04)	0.66 (0.03)	0.84 (0.05)	n=2

[0417]

[0418]

154 E333(352)D			1.26 (0.04)	n=3
178 E333(352)G	0.87	0.76	1.05	n=1
179 K334(353)G	0.76 (0.08)	0.60 (0.13)	0.88 (0.22)	n=5
135 K334(353)R	1.15 (0.09)	1.33 (0.18)	0.68 (0.07)	n=5
136 K334(353)Q	1.08 (0.11)	1.10 (0.21)	1.31 (0.26)	n=7
137 K334(353)N	1.16 (0.11)	1.29 (0.30)	1.15 (0.16)	n=7
138 K334(353)S	1.01 (0.11)	1.03 (0.05)	1.19 (0.08)	n=3
139 K334(353)E	0.74 (0.15)	0.72 (0.12)	1.30 (0.09)	n=4
140 K334(353)D	0.51 (0.09)	0.40 (0.03)	1.13 (0.09)	n=4
190 K334(353)M	1.18	1.01	1.35	n=1
191 K334(353)Y	1.15	1.05	1.31	n=1
192 K334(353)W	1.16	0.91	1.07	n=1
193 K334(353)H	1.11	1.07	1.26	n=1
220 K334(353)V	1.13 (0.11)	1.09 (0.15)	1.34 (0.18)	n=3
221 K334(353)L	1.05	1.09	1.38	n=1
171 T335(354)Q	0.86	0.79	0.84	n=1
194 T335(354)E	1.24	1.30	1.19	n=1
195 T335(354)K	1.19	1.14	1.30	n=1
273 A339(359)T	1.23	1.23	1.42	n=1

下表总结了各种组合变体的FcR结合活性。

表 9
组合变体

IG2	Res#EU (Kabat)	FCRn 均值 sd n	FCyRI 均值 sd n	FCyRIIA 均值 sd n	FCyRIIB 均值 sd n	FCyRIIIA 均值 sd n
96	S267(280)A H268(281)A			1.41	1.72	0.84
134	E333(352)A K334(353)A			0.72 (0.08)	0.63 (0.13)	1.30 (0.12)
1059	T256(269)A S298(317)A			0.44 (0.03)	0.22 (0.04)	1.41 (0.06)
1051	T256(269)A D280(295)A S298(317)A T307(326)A			0.47 (0.01)	0.30 (0.03)	1.21 (0.26)
106	T256(269)A D280(295)A R292(309)A S298(317)A T307(326)A			0.11	0.08	0.90
107	S298(317)A E333(352)A			0.34 (0.05)	0.16 (0.08)	1.53 (0.24)
109	S298(317)A K334(353)A			0.41 (0.07)	0.19 (0.08)	1.62 (0.34)
110	S298(317)A E333(352)A K334(353)A			0.35 (0.13)	0.18 (0.08)	1.66 (0.42)
246	S267(280)A E258(271)A			1.62 (0.15)	2.01 (0.45)	1.04 (0.12)
247	S267(280)A R255(268)A			1.60 (0.18)	1.72 (0.13)	0.88 (0.07)

[0419]

248	S267(280)A D280(295)A	1.54 (0.08)	1.96 (0.37)	1.13 (0.07)	n=2		
250	S267(280)A E272(285)A	1.51 (0.13)	1.82 (0.32)	0.95 (0.05)	n=3		
251	S267(280)A E293(310)A	1.67 (0.11)	1.85 (0.10)	0.92 (0.09)	n=3		
264	S267(280)A E258(271)A D280(295)A R255(268)A	1.48 (0.12)	2.03 (0.30)	0.89 (0.04)	n=2		
269	E380(405)A N434(465)A	8.55 (0.94)	3	1.02 (0.07)	1.05 (0.11)	1.02	n=2
270	E380(405)A N434(465)A T307(326)A	12.6 (1.7)		0.99 (0.06)	0.99 (0.11)	0.96	n=2
271	E380(405)A L309(328)A	1.01 (0.01)	2	0.98	1.04	0.92	n=1
272	N434(465)A K288(305)A	3.15 (0.42)	2	0.94 (0.11)	0.96 (0.17)	0.88	n=2

[0420] 讨论

[0421] 本研究包括人 IgG1 对人 Fc γ RI、Fc γ RIIA、Fc γ RIIB、Fc γ RIIIA 和 FcRn 的完整图谱。根据人 Fc 区晶体结构 (Deisenhofer, 生物化学 20: 2361-2370(1981)) 对人 IgG1Fc(CH2 和 CH3 结构域) 中暴露于溶质的所有氨基酸实施丙氨酸扫描。将 CH2 和 CH3 中各个暴露的氨基酸分别变成丙氨酸, 分析变体 IgG 与所有 5 种人类受体的结合; 用人源化抗 IgE E27IgG1 作为亲本多肽评价所有变体。Fc γ RI 和 FcRn 是高亲和力受体, 可在试验中评估 IgG 单体对这两种受体的结合。Fc γ RIIA、Fc γ RIIB 和 Fc γ RIII 是低亲和力受体, 需要应用免疫复合物。因此, 对于 Fc γ RIIA、Fc γ RIIB 和 Fc γ RIII 使用 ELISA 型试验, 其中将预先形成的六聚体 (由三个抗 IgE E27 和三个 IgE 分子组成) 与 Fc γ R 和作为检测试剂的抗人 IgG Fc-HRP 或蛋白 G-HRP 结合, 所述六聚体。为了增强结合, 通过加入人 VEGF 可以将所述六聚体连接成多聚体 (利用抗 VEGF IgE)。所述六聚体结合

低亲和力 $Fc\gamma R$ 的能力明显强于 IgG 单体，而多聚体则强于六聚体（图 15A 和 15B）。应用六聚体复合物是因为其可提供充分的结合，并且需要较少的 IgG。利用其它抗体：抗原形成的复合物也是可能的试剂，只要所述每个抗原分子包括至少两个相同的抗体结合位点。例如，每个 VEGF 二聚体包括两个抗 VEGF A.4.6.1 结合位点（Kim 等，生长因子 7：53(1992) 和 Kim 等，自然 362：841(1993)）。VEGF：抗 VEGF 多聚体也与低亲和力 $Fc\gamma RIIA$ 和 $Fc\gamma RIIIA$ 结合（图 16A 和 16B）。

[0422] 一旦实施完整的丙氨酸扫描，就可发现若干种丙氨酸变体。部分变体与所有 $Fc\gamma R$ 的结合均降低（G14，图 17），而其它变体显示仅与一种 $Fc\gamma R$ 的结合降低（G36，图 17）、仅与一种 $Fc\gamma R$ 的结合增强（G15、G54、G55，图 17），或与一种 $Fc\gamma R$ 的结合降低同时与另一种 $Fc\gamma R$ 的结合增强（G16，图 17）。

[0423] 还可以在单个 Fc 区变体中将各个丙氨酸变体进行组合；例如 S298(317)A 和 K334(353)A 的组合结合 $Fc\gamma RIIIA$ 的能力强于单独的 S298(317)A 或 K334(334)A（图 18A 和 B；并比较表 6 和 9 中的变体 36、55 和 109）（括号内的残基序号为 EU 标号，与 Kabat 一样）。同样，S298(317)A 和 E333(352)A 的组合结合 $Fc\gamma RIIIA$ 的能力强于单独的 S298(317)A 或 E333(352)A（比较表 6 和 9 中变体 36、54 和 107）。

[0424] 还检测了所选 IgG 变体与转染到哺乳动物细胞中的 $Fc\gamma R$ 的结合。利用 GPI-link，将人 $Fc\gamma RIIIA$ α 链细胞外部分转染到 CHO 细胞，而对于人 $Fc\gamma RIIB$ 则将其全长受体转染到 CHO 细胞。对于所测的变体，其结合细胞的模式与在蛋白：蛋白（ELISA）试验中的相同（图 18A-B 和 19A-B）。

[0425] 这些变体的一个应用是提高抗体的 ADCC 效应。这可通过修饰 Fc 区中导致与 $Fc\gamma RIIIA$ 的结合增强的一个或多个残基而实现。 $Fc\gamma RIIIA$ 结合增强可以导致对 NK 细胞的结合增强，NK 细胞仅携带 $Fc\gamma RIIIA$ 并且能够介导 ADCC。所筛选的丙氨酸变体，无论是与 $Fc\gamma RIIIA$ 结合降低型（变体 17、18、34；见表 6）、对 $Fc\gamma RIIIA$ 结合无影响型（变体 31；见表 6），或与 $Fc\gamma RIIIA$ 结合增强型（变体 30、36；见表 6），均利用人 PBMC 作为效应细胞在体外 ADCC 试验中检测。因为靶细胞是 HER2 过表达的 SKBR3 细胞，可用抗 HER2 抗体的 V_H/V_L 结构域 HERCEPTIN[®]（Carter 等，PNAS(USA) 89：4285-4289(1992) 的表 1 中 humAb4D5-8）取代抗 IgE E27 的 V_H/V_L 来制备此试验所用 IgGFc 变体。这些变体显示的 ADCC 模式与其 $Fc\gamma RIIIA$ 结合模式十分相关（图 20 和 21）。应注意蛋白：蛋白试验中与 $Fc\gamma RIIIA$ 结合的增强程度最大的变体，变体 36S298(317)A，在 1.25ng/ml 时 ADCC 效应也强于野生型 HERCEPTIN[®]（图 21）。

[0426] 实施例 5Fc 变体与多形态 Fc 受体的结合

[0427] 在人群中发现了几种人型 $Fc\gamma R$ 的等位基因变体。这些等位基因变体形式在与人和鼠的 IgG 的结合中存在差异，多项相关研究揭示与特定等位基因的存在相关的临床表现（Lehrnbecher 等，血液 94(12)：4220-4232(1999) 综述）。对两种 $Fc\gamma RIIA$ 形式，R131 和 H131，及其与临床表现的相关性进行了几项研究（Hatta 等，基因和免疫 1：53-60(1999)；Yap 等，Lupus 8：305-310(1999)；和 Lorenz 等，欧洲免疫遗传学 22：397-401(1995)）。只有 $Fc\gamma RIIIA$ 的两个等位基因形式，F158 和 V158，正处于研究中（Lehrnbecher 等，出处同上；和 Wu 等，临床研究杂志 100(5)：1059-1070(1997)）。在该实施例中，检测了所筛选的针对 $Fc\gamma RIIA$ 或 $Fc\gamma RIIIA$ 的两种等位基因形式的 IgG 变

体。Fc 受体结合试验基本按上述实施例所述进行。然而，对于 Fc γ RIIIA-V158，实施了 (a) 实施例 1 的低亲和力受体结合试验（其分析 IgG 复合物与 Fc γ RIIIA-V158 的结合）；和 (b) 实施例 4 的高亲和力 Fc γ R 结合试验（其分析 IgG 单体与 Fc γ RIIIA-V158 的结合）。这些结果总结于表 10 中。

[0428]

表 10
变体对 Fc γ RIIA 和 Fc γ RIIIA 多形受体的结合

IG2 Res#EU (Kabat)	IgG 复合物 Fc γ RIIA-R131		IgG 复合物 Fc γ RIIA-H131		IgG 复合物 Fc γ RIIIA-F158		IgG 复合物 Fc γ RIIIA-V158		IgG 单体 Fc γ RIIIA-V158	
	均值	sd n	均值	sd n	均值	sd n	均值	sd n	均值	sd n
11 T256(269)A	1.41	(0.27) 9			1.32	(0.18) 9	0.97	(0.03) 2	1.20	1
254 T256(269)N	1.03	1			1.13	1	0.95	1	0.88	1
14 D265(278)A	0.07	(0.01) 4			0.09	(0.06) 4	0.01	1		
15 S267(280)A	1.64	(0.18) 7	1.05	(0.03) 2	1.14	(0.25) 7				
189 S267(280)G	1.21	(0.05) 3	0.59	(0.09) 3	0.09	(0.02) 3				
16 H268(281)A	1.22	(0.14)12	1.09	(0.01) 2	0.52	(0.09)12				
25 E283(300)A	1.24	(0.23) 5			1.01	(0.14) 5			0.78	1
226 E283(300)Q	1.12	1			1.19	1			0.89	1
227 E283(300)S	1.03	1			0.85	1			0.83	1
228 E283(300)N	1.18	1			0.94	1			0.63	1
229 E283(300)D	1.14	1			0.95	1			0.67	1
30 K290(307)A	1.29	(0.21) 7			1.28	(0.21) 7	1.12	(0.05) 2	1.13	1
73 K290(307)Q	1.17	1			1.40	1	1.02	1	1.30	1
75 K290(307)S	1.27	1			1.26	1	1.05	1	1.62	1
77 K290(307)E	1.10	1			1.30	1	0.98	1	1.50	1
78 K290(307)R	1.05	1			1.08	1	1.07	1	1.24	1
177 K290(307)G	1.07	1			1.23	1	1.11	1	2.29	1

[0429]

[0430]

31	R292(309)A	0.27 (0.14)	9	0.90 (0.18)	9	0.94	1
80	R292(309)K	0.71 (0.17)	3	1.15 (0.18)	3	1.64	1
81	R292(309)H	0.21 (0.09)	2	0.92 (0.08)	2	1.21	1
82	R292(309)Q	0.47 (0.12)	3	0.45 (0.09)	3	0.56	1
83	R292(309)N	0.54 (0.16)	3	0.88 (0.02)	3	0.91	1
144	E293(310)Q	0.85 (0.03)	2	0.99 (0.04)	2	1.00	1
33	E294(311)A	0.87 (0.19)	5	0.66 (0.14)	5	0.68	1
173	E294(311)Q	1.01	1	0.84	1	0.79	1
174	E294(311)D	0.37	1	0.14	1	0.26	1
36	S298(317)A	0.40 (0.08)	12	1.30 (0.18)	12	1.02 (0.04)	2
70	S298(317)G	0.87 (0.17)	4	0.46 (0.09)	4	0.88	1
71	S298(317)T	0.41 (0.21)	3	0.89 (0.20)	3	0.96	1
72	S298(317)N	0.08 (0.01)	2	0.06 (0.01)	2	0.66	1
218	S298(317)V	0.11 (0.06)	3	0.33 (0.19)	3	0.88	1
219	S298(317)L	1.14 (0.12)	3	0.34 (0.04)	3	0.83	1
40	V305(324)A	1.12 (0.12)	4	1.04	1	0.84 (0.15)	4
41	T307(326)A	1.19 (0.37)	12	1.37 (0.13)	2	1.12 (0.18)	12
45	N315(334)A	1.15 (0.06)	5	1.11 (0.06)	2	1.07 (0.21)	5
46	K317(336)A	1.13 (0.05)	4	1.04	1	1.10 (0.23)	4
48	K320(339)A	1.12 (0.11)	4	1.16	1	0.87 (0.17)	4
54	E333(352)A	0.92 (0.12)	10	1.27 (0.17)	10	1.10 (0.10)	2
						1.29	1

[0431]

141	E333(352)Q	0.70 (0.05)	2	1.10 (0.03)	2	1.05	1	1.00	1
142	E333(352)N	0.59 (0.04)	2	0.56 (0.10)	2	0.64	1	0.56	1
143	E333(352)S			0.94	1	0.99	1	1.07	1
152	E333(352)K			0.85 (0.14)	3	0.88	1	0.81	1
153	E333(352)R	0.75 (0.04)	2	0.84 (0.05)	2	0.93	1	0.83	1
154	E333(352)D			1.26 (0.04)	3	1.00	1	1.70	1
178	E333(352)G	0.87	1	1.05	1			1.23	1
55	K334(353)A	1.01 (0.15)	17	1.39 (0.19)	17	1.07 (0.09)	3	1.60 (0.01)	2
135	K334(353)R	1.15 (0.09)	5	0.68 (0.07)	5			0.88	1
136	K334(353)Q	1.08 (0.11)	7	1.31 (0.26)	7	1.27 (0.01)	2	1.92	1
137	K334(353)N	1.16 (0.11)	7	1.15 (0.16)	7	1.19 (0.06)	2	1.70	1
138	K334(353)S	1.01 (0.11)	3	1.19 (0.08)	3	1.25	1	1.82	1
139	K334(353)E	0.74 (0.15)	4	1.30 (0.09)	4	1.17	1	2.75	1
140	K334(353)D	0.51 (0.09)	4	1.13 (0.09)	4	1.07	1		
179	K334(353)G	0.76 (0.08)	5	0.88 (0.22)	5	0.94	1	1.28	1
190	K334(353)M	1.06	1	1.35	1	0.99	1	2.08	1
191	K334(353)Y	1.08	1	1.31	1	0.98	1	1.72	1
192	K334(353)W	0.94	1	1.07	1	0.96	1	1.53	1
193	K334(353)H	1.09	1	1.26	1	0.97	1	2.06	1
220	K334(353)V	1.13 (0.11)	3	1.34 (0.18)	3	1.00	1	2.89	1
221	K334(353)L	1.05	1	1.38	1	0.96	1	3.59	1

65	P331(350)A	1.29 (0.14)	3	1.03 (0.19)	3	0.96	1	0.78	1
198	P331(350)S	1.00	1	0.86	1			0.54	1
199	P331(350)N	0.86	1	0.23	1			0.24	1
200	P331(350)E	1.06	1	0.42	1			0.36	1
203	P331(350)K	0.94	1	0.33	1			0.26	1
96	S267(280)A H268(281)A	1.54 (0.12)	3	1.07 (0.06)	2	0.84	1		
110	S298(317)A E333(352)A K334(353)A	0.35 (0.13)	11	1.66 (0.42)	11	1.19 (0.18)	3		
271	E380(405)A L309(328)A	0.98	1	0.92	1			1.10	1

[0432] 对于 Fc γ RIIIA, 所筛选的 IgG1 变体与相对较高亲和力的 Fc γ RIIIA-V158 的结合模式等同于与相对较低亲和力的 Fc γ RIIIA-F158 的 (F158 形式用于分析所有变体)。显示与 Fc γ RIIIA-F158 形式的结合增强的 IgG1 变体, 其与 Fc γ RIIIA-V158 形式的结合也增强, 但不明显。对于 Fc γ RIIA-R131 (用于分析所有变体) 和 Fc γ RIIA-H131, 所筛选的 IgG1 变体的结合模式有显著差异。与天然 IgG1 相比, S267(280)A、H268(281)A 和 S267(280)A/H268(281)A 显示与 Fc γ RIIA-R131 的结合增加, 但未显示与 Fc γ RIIA-H131 的结合增加。相反, S267(280)G 与 Fc γ RIIA-R131 的结合增加, 但与 Fc γ RIIA-H131 的结合降低 (表 10)。其他变体与 Fc γ RIIA 的两种等位基因形式的结合相似: V305(324)A、T307(326)A、N315(324)A、K317(336)A 和 K320(339)A。

[0433] 序列表

- [0434] <110>Genentech, Inc.
 [0435] <120> 具有改变的效应功能的多肽变体
 [0436] <130>P1726R1PCT
 [0437] <141>2000-01-14
 [0438] <150>US60/116,023
 [0439] <151>1999-01-15
 [0440] <160>11
 [0441] <210>1
 [0442] <211>218
 [0443] <212>PRT
 [0444] <213> 人工序列
 [0445] <220>
 [0446] <223> 序列完全由人工合成
 [0447] <400>1
 [0448]

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

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Pro Val Asp
 20 25 30

Gly Glu Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 35 40 45

[0449]

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Tyr Leu Glu Ser
 50 55 60
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 65 70 75
 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
 80 85 90
 Tyr Cys Gln Gln Ser His Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly
 95 100 105
 Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
 110 115 120
 Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
 125 130 135
 Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
 140 145 150
 Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 155 160 165
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 170 175 180
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 185 190 195
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 200 205 210
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 215

- [0450] <210>2
- [0451] <211>451
- [0452] <212>PRT
- [0453] <213> 人工序列
- [0454] <220>
- [0455] <223> 序列完全由人工合成
- [0456] <400>2
- [0457]

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

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

Ser Gly Tyr Ser Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly

[0458]

	35	40	45
Leu Glu Trp Val	Ala Ser Ile Lys Tyr	Ser Gly Glu Thr Lys Tyr	
	50	55	60
Asn Pro Ser Val	Lys Gly Arg Ile Thr	Ile Ser Arg Asp Asp Ser	
	65	70	75
Lys Asn Thr Phe	Tyr Leu Gln Met Asn	Ser Leu Arg Ala Glu Asp	
	80	85	90
Thr Ala Val Tyr	Tyr Cys Ala Arg Gly	Ser His Tyr Phe Gly His	
	95	100	105
Trp His Phe Ala	Val Trp Gly Gln Gly	Thr Leu Val Thr Val Ser	
	110	115	120
Ser Ala Ser Thr	Lys Gly Pro Ser Val	Phe Pro Leu Ala Pro Ser	
	125	130	135
Ser Lys Ser Thr	Ser Gly Gly Thr Ala	Ala Leu Gly Cys Leu Val	
	140	145	150
Lys Asp Tyr Phe	Pro Glu Pro Val Thr	Val Ser Trp Asn Ser Gly	
	155	160	165
Ala Leu Thr Ser	Gly Val His Thr Phe	Pro Ala Val Leu Gln Ser	
	170	175	180
Ser Gly Leu Tyr	Ser Leu Ser Ser Val	Val Thr Val Pro Ser Ser	
	185	190	195
Ser Leu Gly Thr	Gln Thr Tyr Ile Cys	Asn Val Asn His Lys Pro	
	200	205	210
Ser Asn Thr Lys	Val Asp Lys Lys Val	Glu Pro Lys Ser Cys Asp	
	215	220	225
Lys Thr His Thr	Cys Pro Pro Cys Pro	Ala Pro Glu Leu Leu Gly	
	230	235	240
Gly Pro Ser Val	Phe Leu Phe Pro Pro	Lys Pro Lys Asp Thr Leu	
	245	250	255
Met Ile Ser Arg	Thr Pro Glu Val Thr	Cys Val Val Val Asp Val	
	260	265	270
Ser His Glu Asp	Pro Glu Val Lys Phe	Asn Trp Tyr Val Asp Gly	
	275	280	285
Val Glu Val His	Asn Ala Lys Thr Lys	Pro Arg Glu Glu Gln Tyr	
	290	295	300

[0459]

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 305 310 315
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 320 325 330
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 335 340 345
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
 350 355 360
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 365 370 375
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 380 385 390
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 395 400 405
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 410 415 420
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 425 430 435
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 440 445 450

Lys

[0460] <210>3
 [0461] <211>218
 [0462] <212>PRT
 [0463] <213> 人
 [0464] <400>3
 [0465]

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

[0466]

Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser
				65					70					75
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr
				80					85					90
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys
				95					100					105
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr
				110					115					120
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
				125					130					135
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val
				140					145					150
Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr
				155					160					165
Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys
				170					175					180
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
				185					190					195
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys
				200					205					210
Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys							
				215										

- [0467] <210>4
 [0468] <211>218
 [0469] <212>PRT
 [0470] <213> 人
 [0471] <400>4
 [0472]

	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	
	1				5					10					15	
	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	
					20					25					30	
	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	
					35					40					45	
	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	
					50					55					60	
[0473]	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	
					65					70					75	
	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	
					80					85					90	
	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	
					95					100					105	
	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	
					110					115					120	
	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	
					125					130					135	
	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	
					140					145					150	
	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	
					155					160					165	
	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	
					170					175					180	
	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	
					185					190					195	
	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	
					200					205					210	
	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys								
					215											

[0474] <210>5

[0475] <211>217

[0476] <212>PRT

[0477] <213> 人

[0478] <400>5

[0479]

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

[0480]

Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
				80					85					90
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr
				95					100					105
Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr
				110					115					120
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
				125					130					135
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
				140					145					150
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro
				155					160					165
Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu
				170					175					180
Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
				185					190					195
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser
				200					205					210
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys								
				215										

[0481] <210>6

[0482] <211>218

[0483] <212>PRT

[0484] <213>人

[0485] <400>6

[0486]

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

[0487]

Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr
				80					85					90
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys
				95					100					105
Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr
				110					115					120
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
				125					130					135
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val
				140					145					150
Glu	Trp	Glu	Ser	Ser	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Asn	Thr	Thr
				155					160					165
Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys
				170					175					180
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Ile	Phe	Ser
				185					190					195
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	Arg	Phe	Thr	Gln	Lys
				200					205					210
Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys							
				215										

[0488] <210>7

[0489] <211>218

[0490] <212>PRT

[0491] <213> 人

[0492] <400>7

[0493]

Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 1 5 10 15

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

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
 35 40 45

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 65 70 75

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

[0494]

80 85 90

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
 95 100 105

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 110 115 120

Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 125 130 135

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 140 145 150

Glu Trp Glx Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 155 160 165

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg
 170 175 180

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 185 190 195

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 200 205 210

Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 215

[0495] <210>8

[0496] <211>215

[0497] <212>PRT

[0498] <213> 鼠

[0499] <400>8

[0500]

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

[0501]

Val	Asn	Ser	Ala	Ala	Phe	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser
				95					100					105
Lys	Thr	Lys	Gly	Arg	Pro	Lys	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Ile	Pro
				110					115					120
Pro	Pro	Lys	Glu	Gln	Met	Ala	Lys	Asp	Lys	Val	Ser	Leu	Thr	Cys
				125					130					135
Met	Ile	Thr	Asp	Phe	Phe	Pro	Glu	Asp	Ile	Thr	Val	Glu	Trp	Gln
				140					145					150
Trp	Asn	Gly	Gln	Pro	Ala	Glu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Gln	Pro	Ile
				155					160					165
Met	Asp	Thr	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Val	Tyr	Ser	Lys	Leu	Asn	Val
				170					175					180
Gln	Lys	Ser	Asn	Trp	Glu	Ala	Gly	Asn	Thr	Phe	Thr	Cys	Ser	Val
				185					190					195
Leu	His	Glu	Gly	Leu	His	Asn	His	His	Thr	Glu	Lys	Ser	Leu	Ser
				200					205					210
His	Ser	Pro	Gly	Lys										
				215										

[0502] <210>9

[0503] <211>218

[0504] <212>PRT

[0505] <213> 鼠

[0506] <400>9

[0507]

Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 1 5 10 15

Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val
 20 25 30

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln
 35 40 45

Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr
 50 55 60

Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser
 65 70 75

Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe
 80 85 90

[0508]

Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg
 95 100 105

Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr
 110 115 120

Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr
 125 130 135

Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val
 140 145 150

Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr
 155 160 165

Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys
 170 175 180

Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser
 185 190 195

Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys
 200 205 210

Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 215

[0509] <210>10

[0510] <211>218

[0511] <212>PRT

[0512] <213> 鼠

[0513] <400>10

[0514]

Pro Ala Pro Asn Leu Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 1 5 10 15

Pro Asn Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Thr Pro Lys Val
 20 25 30

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln
 35 40 45

Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr
 50 55 60

Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser
 65 70 75

His Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe
 80 85 90

Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg
 95 100 105

[0515]

Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Leu Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr
 110 115 120

Thr Leu Pro Pro Pro Ala Glu Gln Leu Ser Arg Lys Asp Val Ser
 125 130 135

Leu Thr Cys Leu Val Val Gly Phe Asn Pro Gly Asp Ile Ser Val
 140 145 150

Glu Trp Thr Ser Asn Gly His Thr Glu Glu Asn Tyr Lys Asp Thr
 155 160 165

Ala Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys
 170 175 180

Leu Asn Met Lys Thr Ser Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser
 185 190 195

Cys Asn Val Arg His Glu Gly Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys
 200 205 210

Thr Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys
 215

[0516] <210>11

[0517] <211>218

[0518] <212>PRT

[0519] <213> 鼠

[0520] <400>11

[0521]

Pro Pro Gly Asn Ile Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 1 5 10 15

Pro Lys Pro Lys Asp Ala Leu Met Ile Ser Leu Thr Pro Lys Val
 20 25 30

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

Val Ser Trp Phe Val Asp Asn Lys Glu Val His Thr Ala Trp Thr
 50 55 60

Gln Pro Arg Glu Ala Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
 65 70 75

Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Arg Gly Lys Glu Phe
 80 85 90

Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg
 95 100 105

[0522]

Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Arg Ala Gln Thr Pro Gln Val Tyr
 110 115 120

Thr Ile Pro Pro Pro Arg Glu Gln Met Ser Lys Lys Lys Val Ser
 125 130 135

Leu Thr Cys Leu Val Thr Asn Phe Phe Ser Glu Ala Ile Ser Val
 140 145 150

Glu Trp Glu Arg Asn Gly Glu Leu Glu Gln Asp Tyr Lys Asn Thr
 155 160 165

Pro Pro Ile Leu Asp Ser Asp Gly Thr Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys
 170 175 180

Leu Thr Val Asp Thr Asp Ser Trp Leu Gln Gly Glu Ile Phe Thr
 185 190 195

Cys Ser Val Val His Glu Ala Leu His Asn His His Thr Gln Lys
 200 205 210

Asn Leu Ser Arg Ser Pro Gly Lys
 215

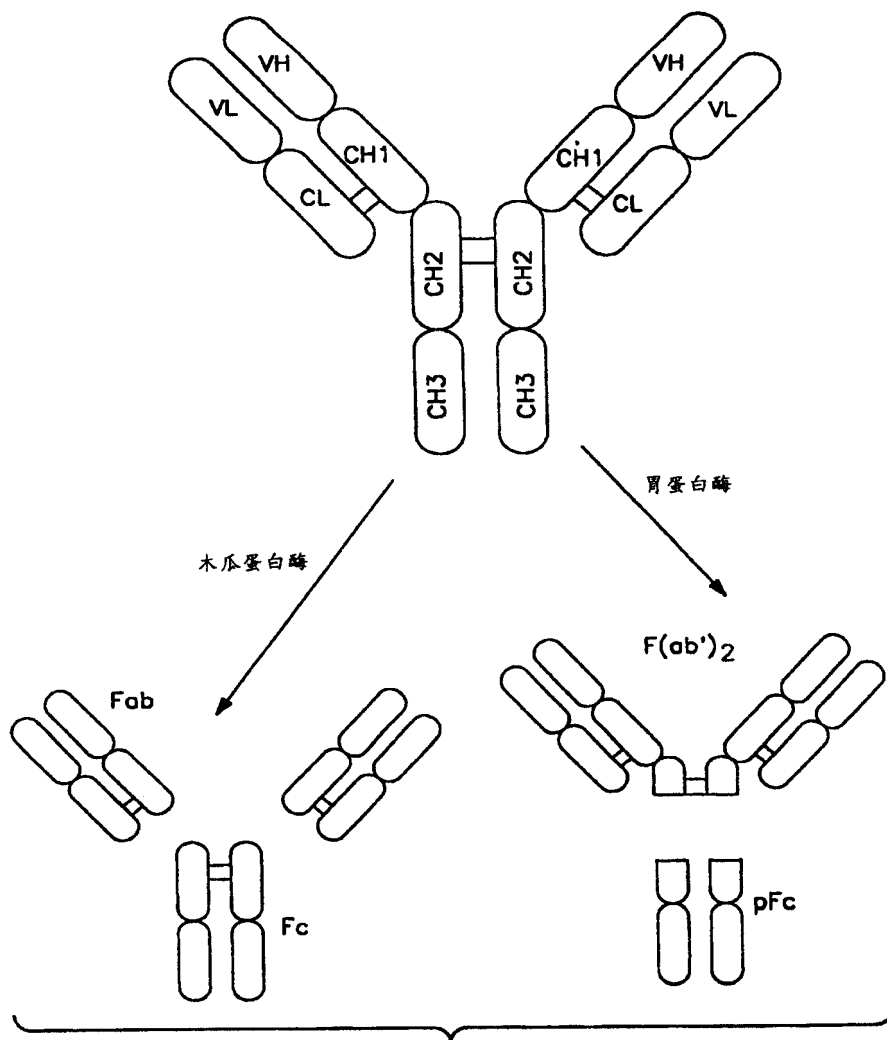


图 1

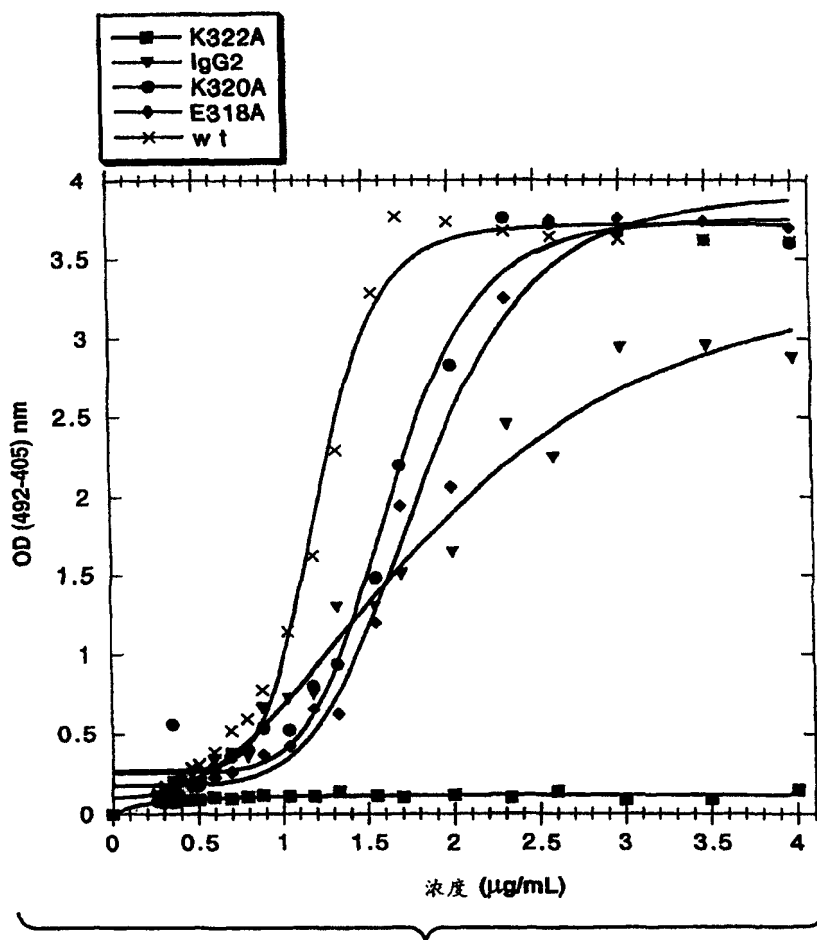


图 2

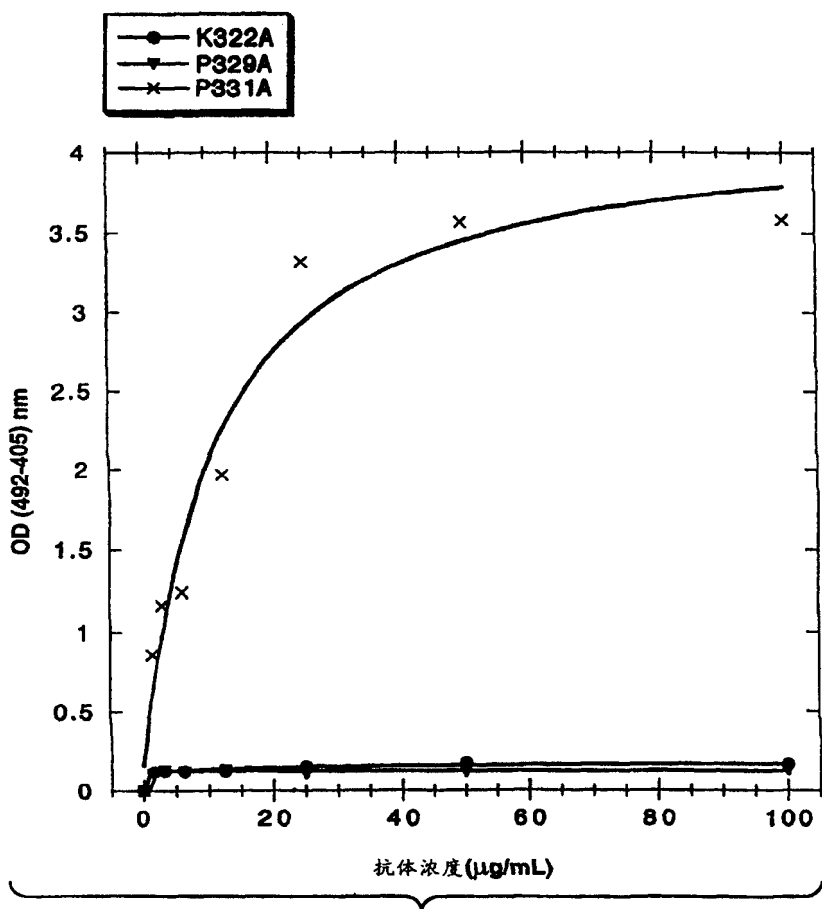


图 3

(E27) - 轻链

DIQLTQSPSS LSASVGRVT ITCRASKPVD GEGDSYMWY QQKPGKAPKL LIYAASYLEG GVPSPFSGSG
 SGTDFLTIS SLQPEDFAY YCQSHEDFY TFGQTKVEI KRTVAAPSVF IFFPSDEQLK SGTASVVCLL
 NNIFYREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYLSL STLTLKADY ERHKVYACEV THQGLSSPVT
 KSFNRGEC

图 4A

(E27) - 重複

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGYSIT SGYSWNWIRQ APGKGLEWVA SIKYSGETKY NPSVKGRITL
 SRDSSKNTFY LQMNSLRAED TAVYICARGS HYFGHWHFVAV WQQGTLVTVS SASTKGPVSF FLAPSSKSTS
 CGTAAALGCLV KQYFPEPVTV SMNSGALTSG VHTFPVAVLQS SGLYSLSSVV TWPSSSLGTQ TYICNVNHRP
 SNTKVDKRVKVE PKSCDKTHTC PPCRPAPPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISSRT PEVTCVWVDV SHEDEEVKFN
 WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP
 QVYTLPPSRE EMTRNQVSLT CLVKGFPYPSD LAVENESNGQ PENNYKTIPTP VLDSDSGSFFL YSKLTVDKSR
 WQQGNVFPSCS VMBEALHNHY TQKSLSLSPG K

图 4B

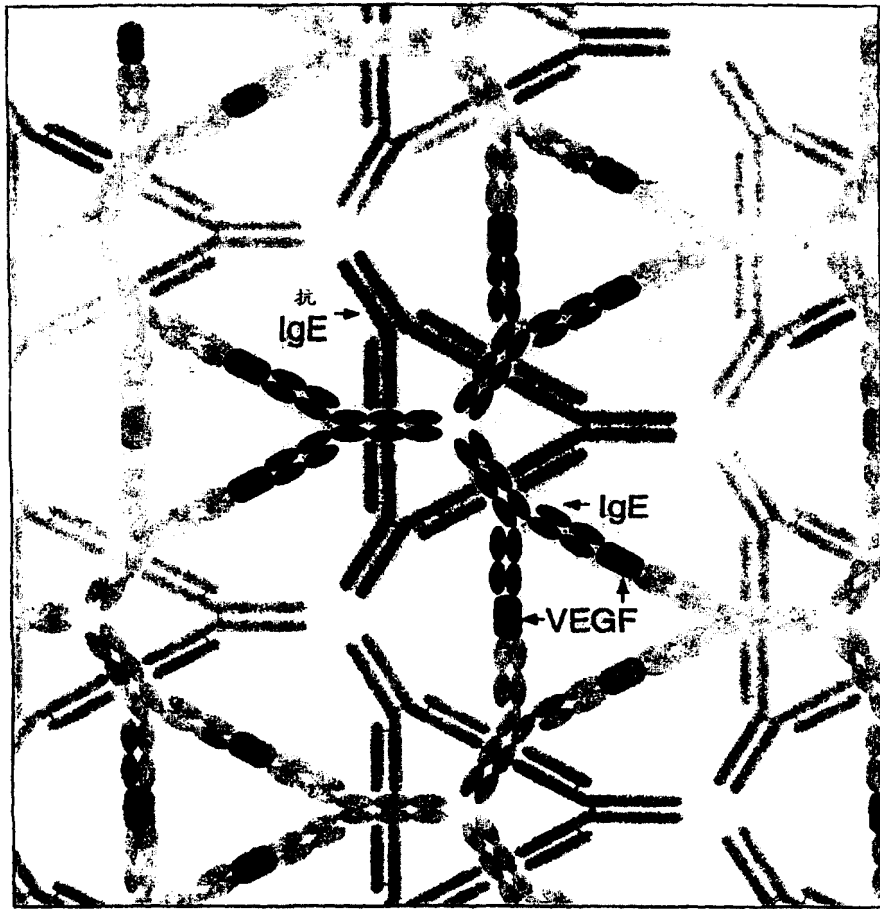


图 5

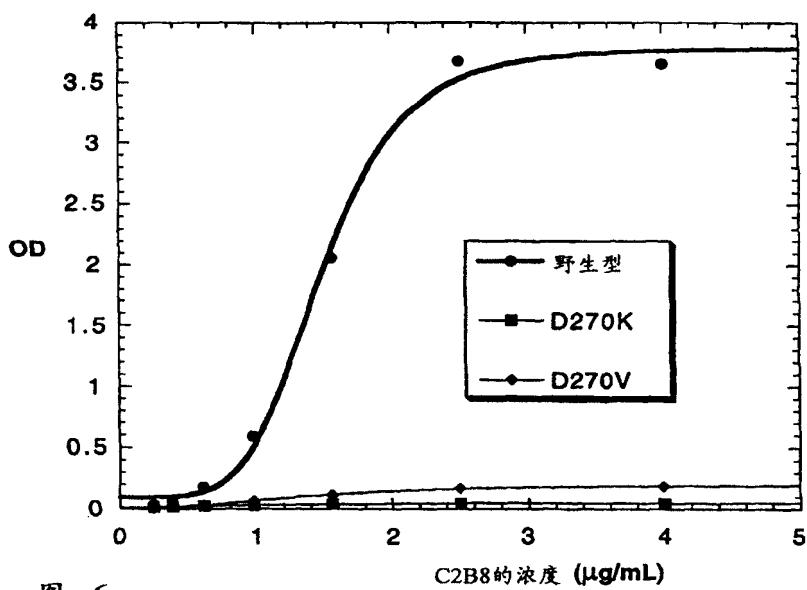


图 6

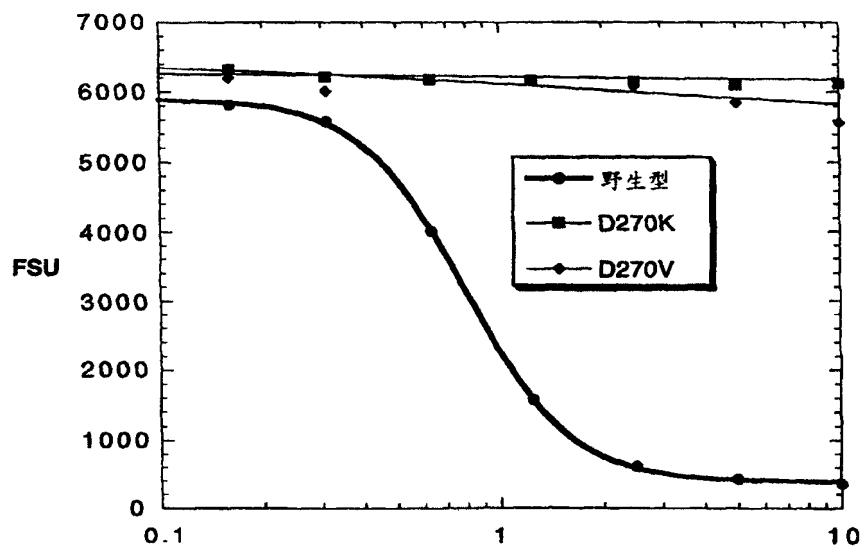


图 7

C2B8 的浓度 (µg/mL) 的对数

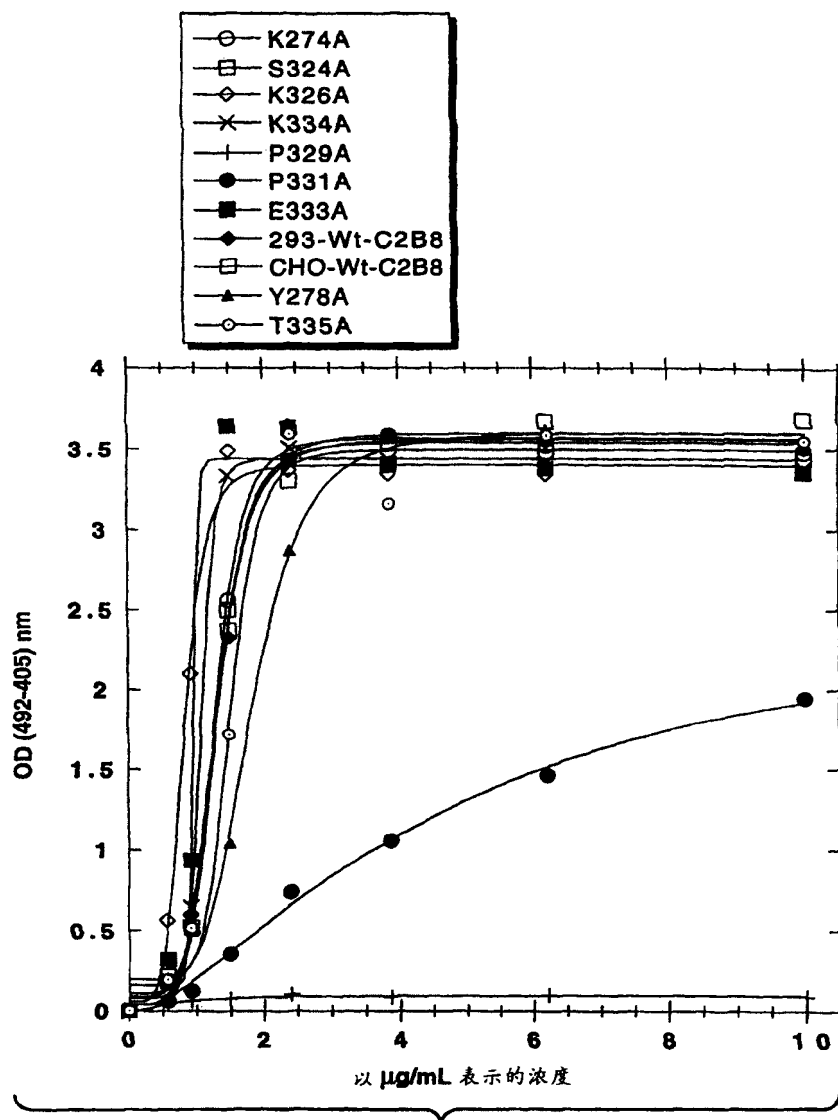


图 8

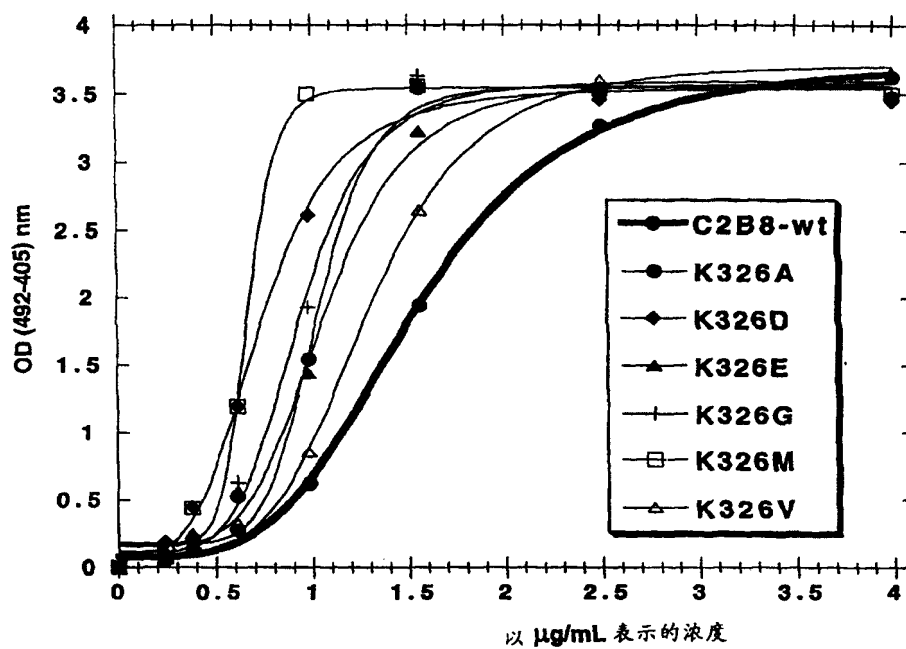


图 9

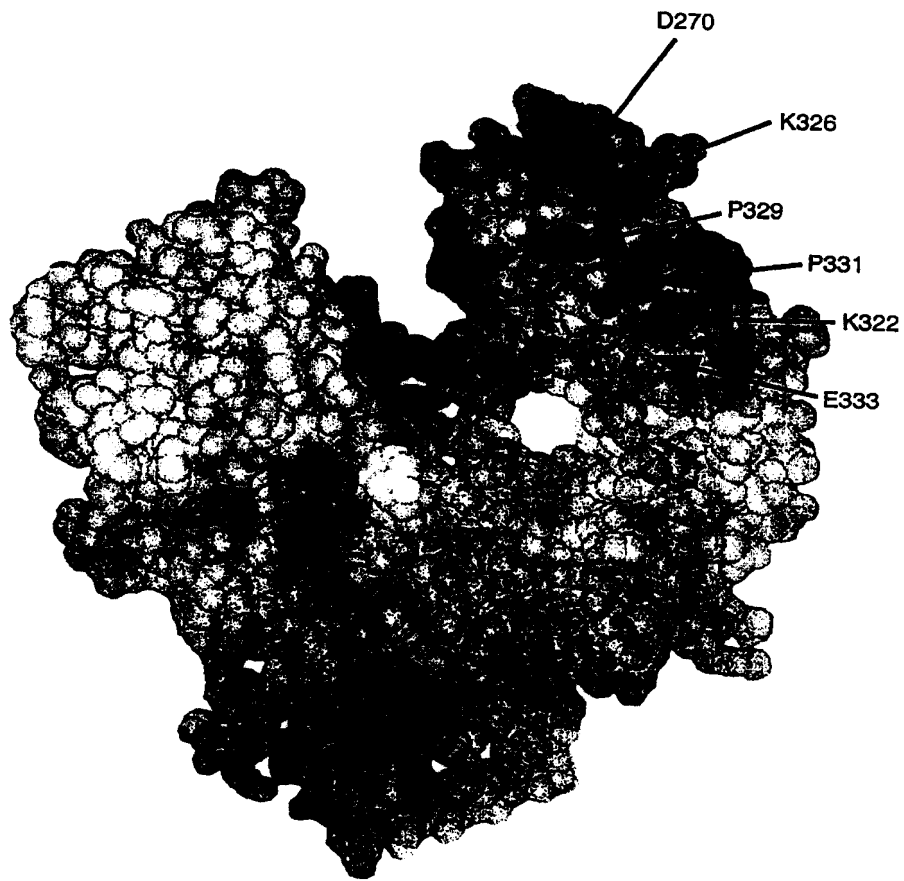


图 10

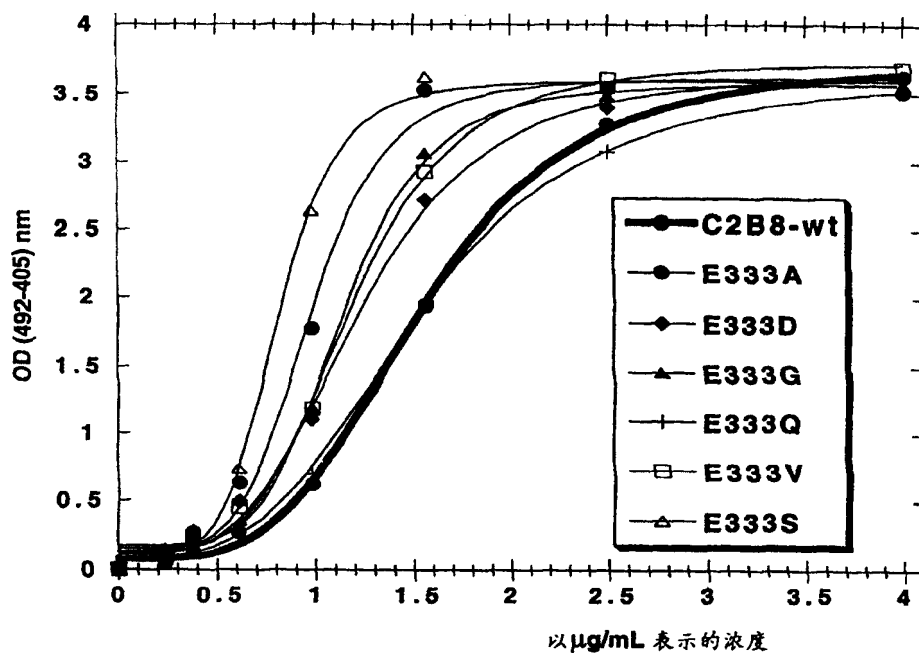


图 11

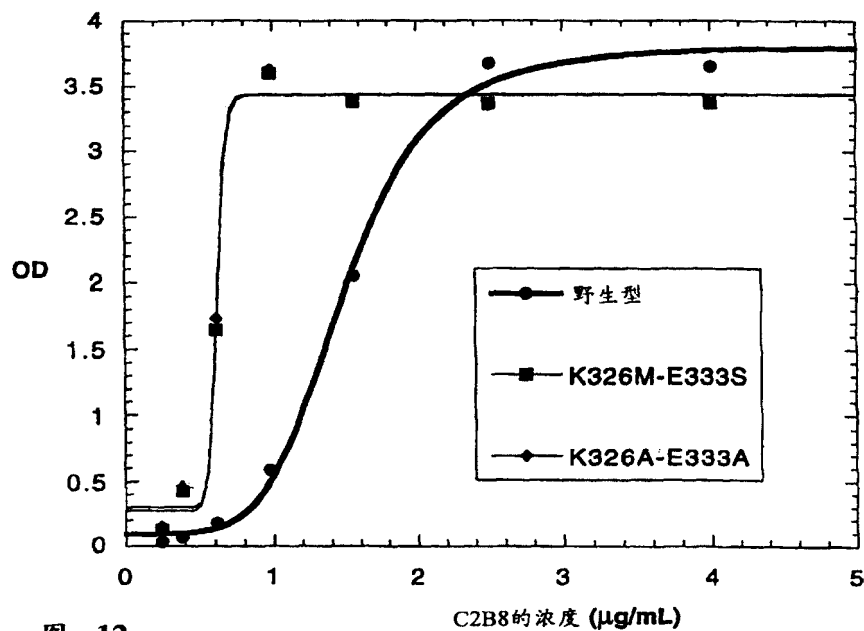


图 12

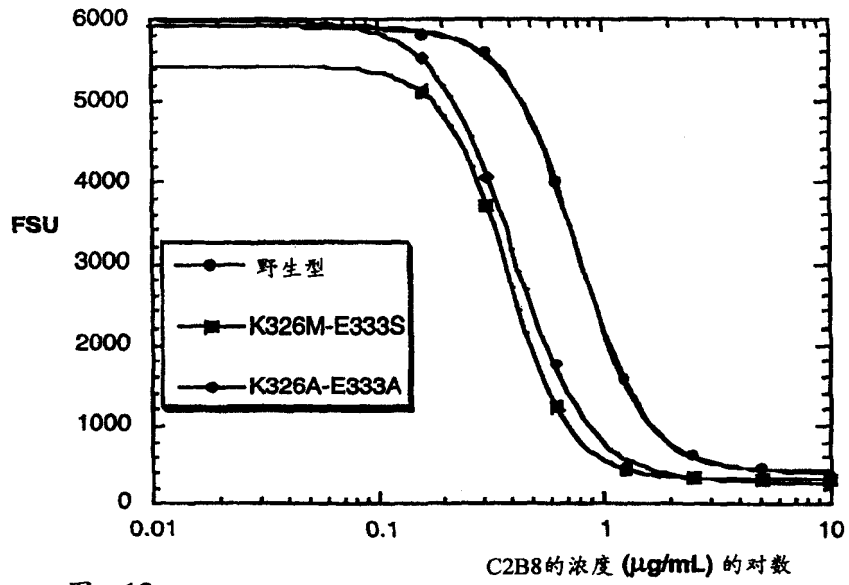


图 13

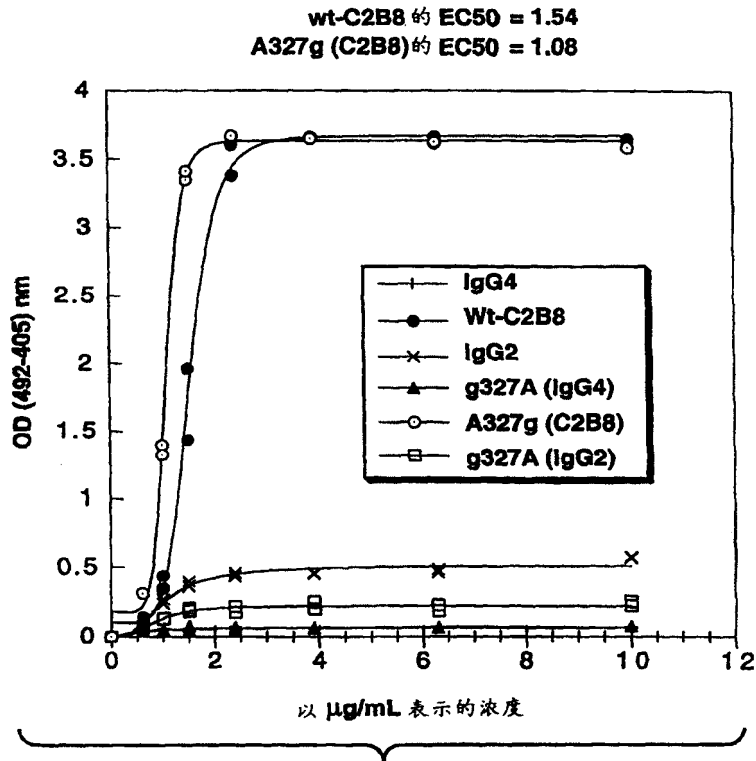


图 14

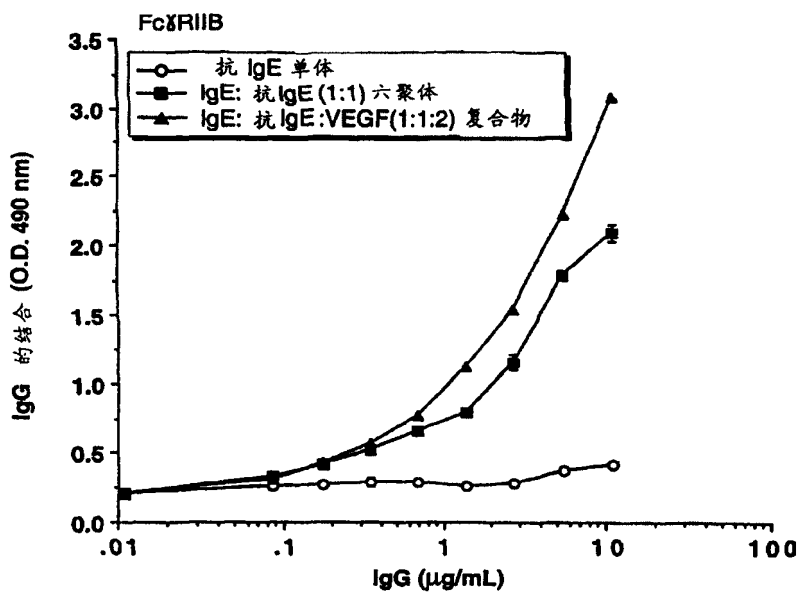


图 15A

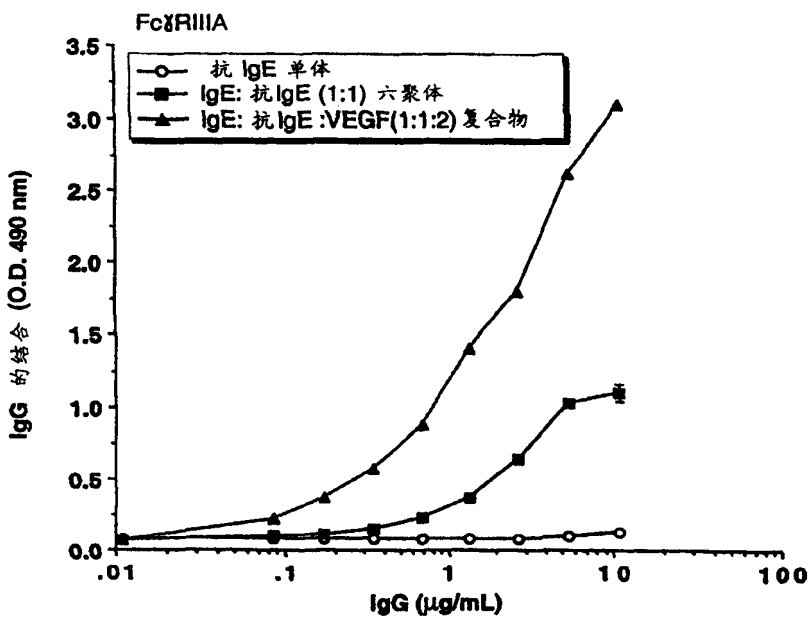


图 15B

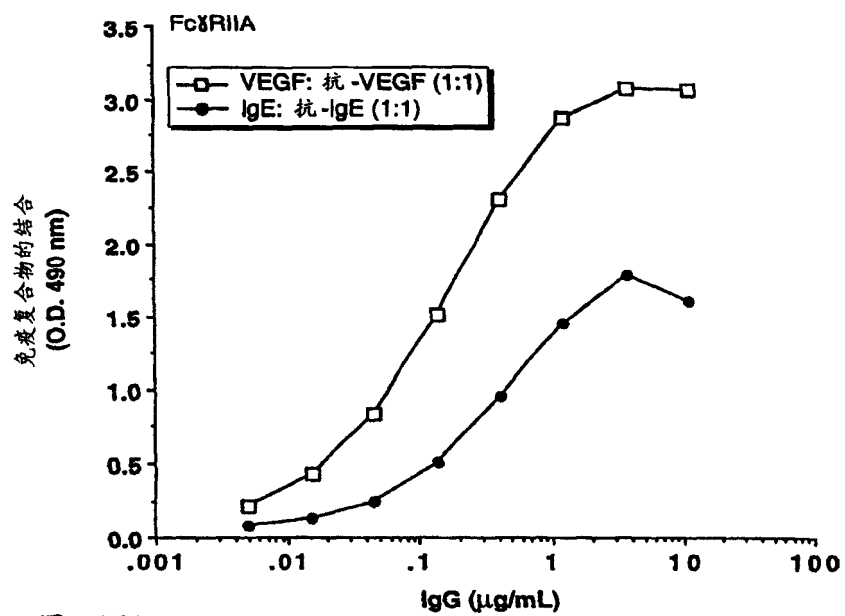


图 16A

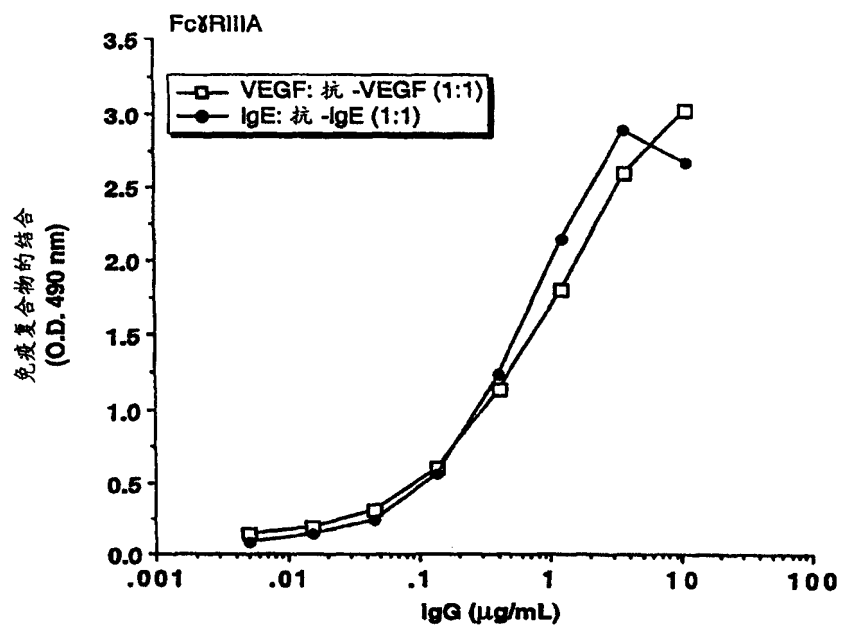


图 16B

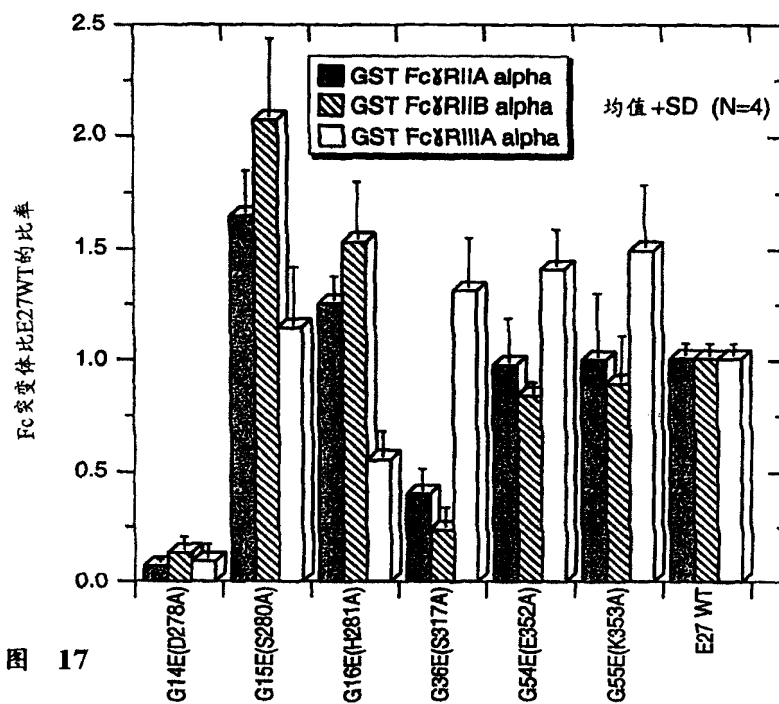


图 17

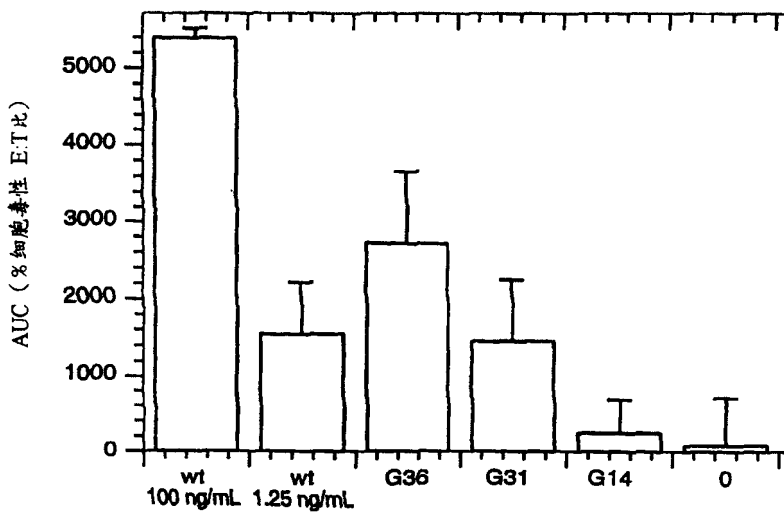


图 24

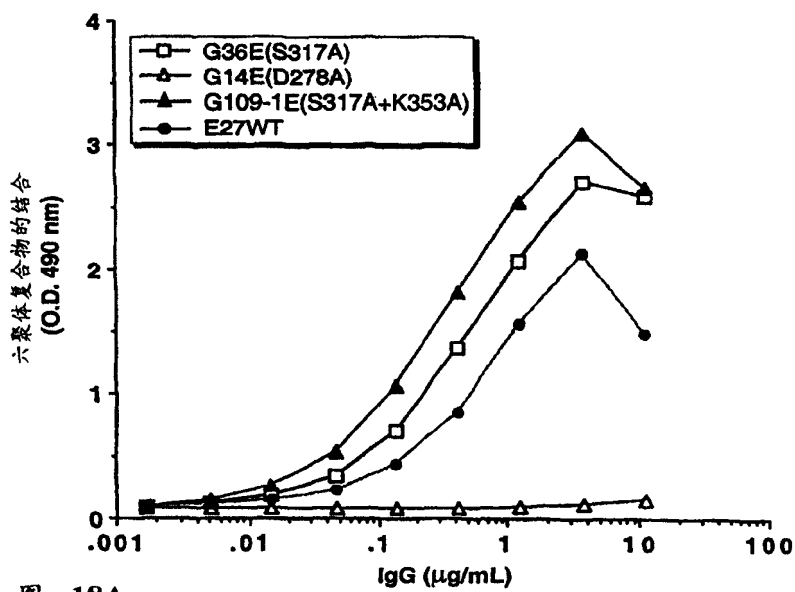


图 18A

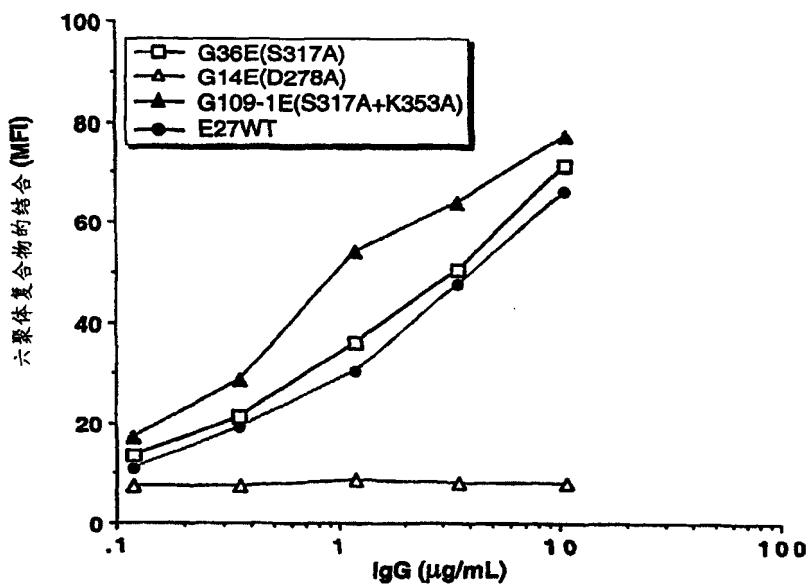


图 18B

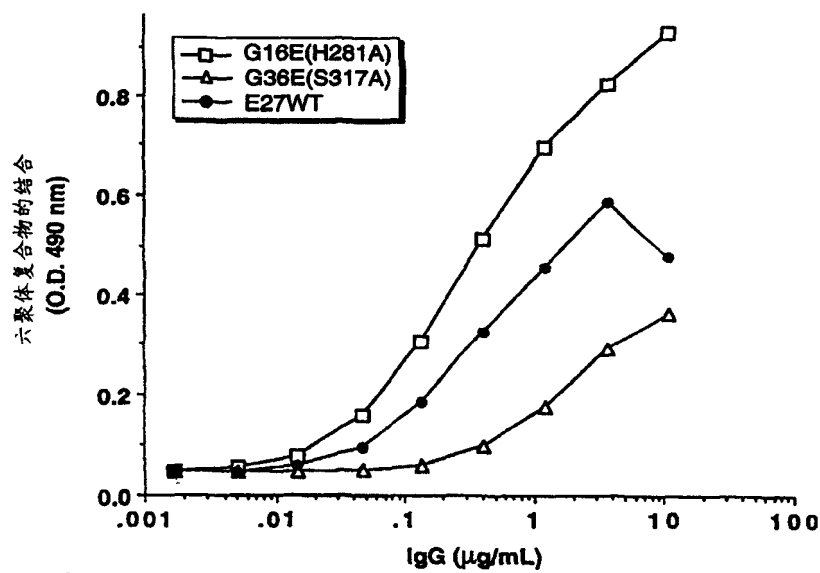


图 19A

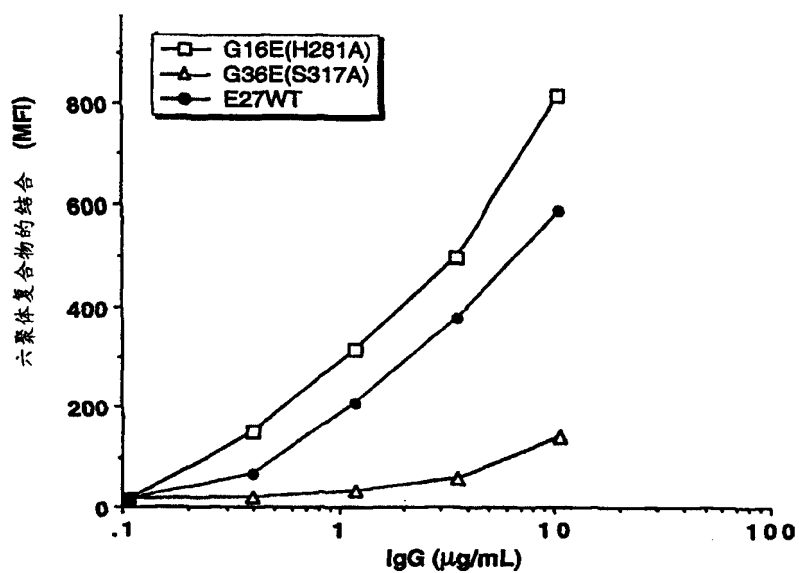


图 19B

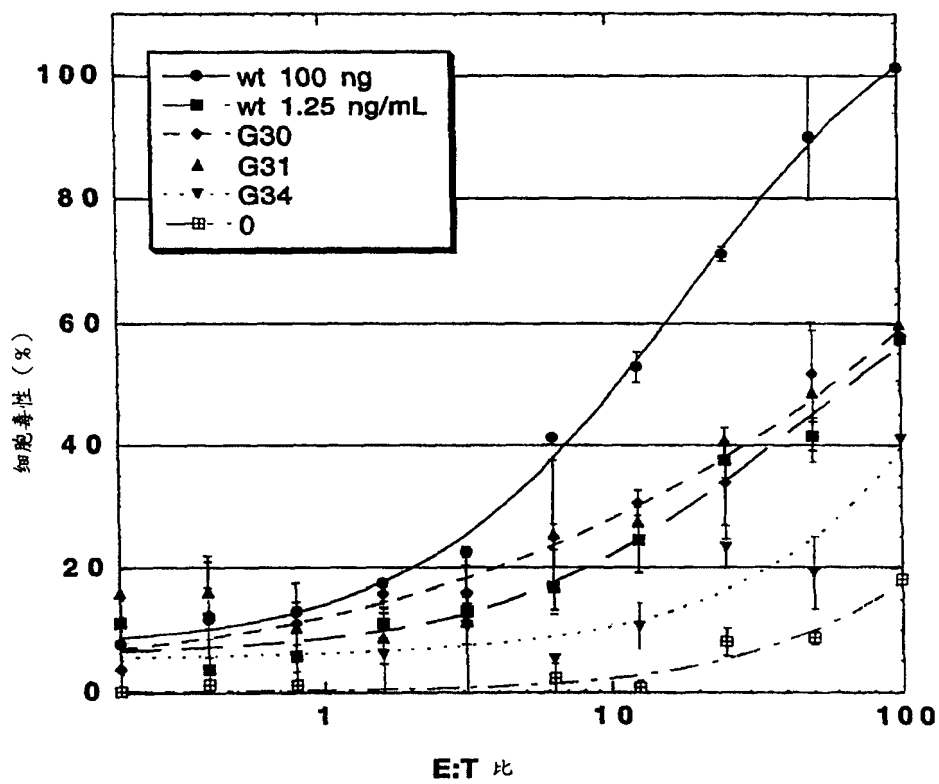


图 20

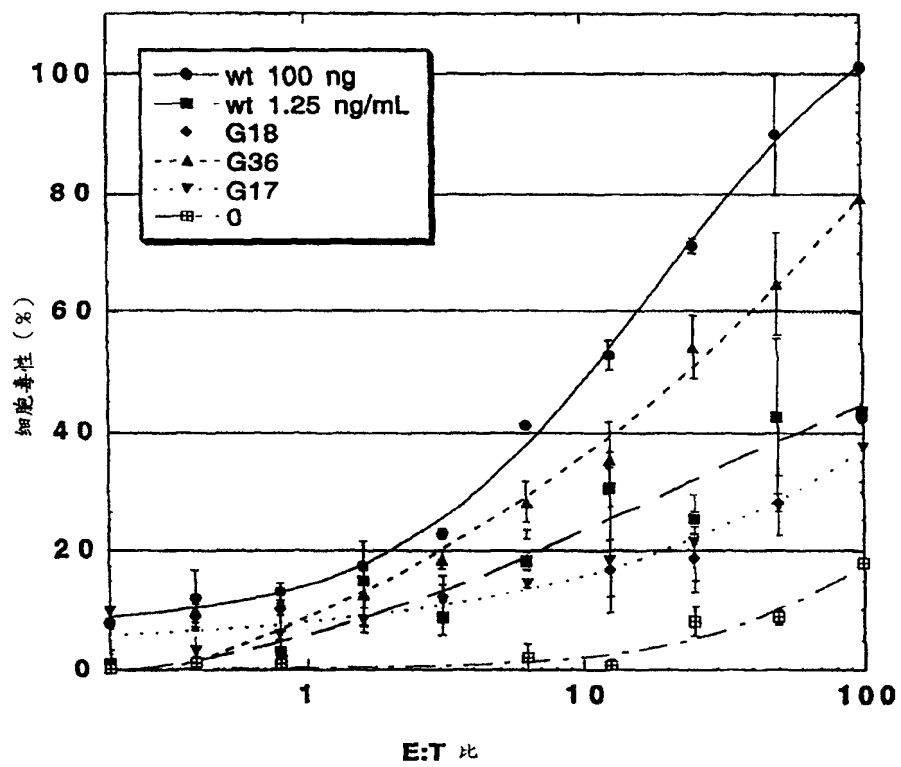


图 21

```

230      240      250      260      270
人 IgG1  PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
人 IgG2  PAP-FVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV
人 IgG3  PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYV
人 IgG4  PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYV
小鼠 IgG1  ---TVPEVSSVFI FPPKPKDVLTTITLTPKVTTCVVVDISKDDPEVQFSWFV
小鼠 IgG2A  PAPNLLGGPSVFI FPPKI KDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFV
小鼠 IgG2B  PAPNLEGGPSVFI FPPNI KDVLMISLTPKVTTCVVVDVSEDDPDVQISWFV
小鼠 IgG3  PPGNILGGPSVFI FPPKPKDALMISLTPKVTTCVVVDVSEDDPDVHVSWFV

280      290      300      310      320
人 IgG1  DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
人 IgG2  DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
人 IgG3  DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
人 IgG4  DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
小鼠 IgG1  DDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDCLNGKEFKCRVNSAAFP
小鼠 IgG2A  NNVEVHTAQTQTHREDYNS TLRVVSALPIQH QDWMSGKEFKCKVNNKDLF
小鼠 IgG2B  NNVEVHTAQTQTHREDYNS TIRVVSHLPIQH QDWMSGKEFKCKVNNKDLF
小鼠 IgG3  DNKEVHTAWTQPREAQYNSTFRVVSALPIQH QDWMRGKEFKCKVNNKALP

330      340      350      360      370
人 IgG1  APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
          D L
人 IgG2  APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
人 IgG3  APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
人 IgG4  SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
小鼠 IgG1  APIEKTISKTKGRPKAPQVYTI PPKKQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITV
小鼠 IgG2A  APIERTISKPKGSVRAPQVYVLP PPEEEMTKKQVILTTCMVTDFMPEDIYV
小鼠 IgG2B  SPIERTISKPKGLVRAPQVYTL PPAEQLSRKDVSLTCLVVGFNPGDISV
小鼠 IgG3  APIERTISKPKGRAQTPOVYTI PPREEQMSKRVSLTCLVTNFFSEALISV

380      390      400      410      420
人 IgG1  EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMH
人 IgG2  EWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMH
人 IgG3  EWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSVSMH
人 IgG4  EWZSNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSVSMH
小鼠 IgG1  EWQWNGQPAENYKNTQPI MDTDGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLH
小鼠 IgG2A  EWTNNGKTELNYKNTPEVLDSDGSYFMYSKLVEKKNWVERNSYSCSVVH
小鼠 IgG2B  EWTNSNGHTEENYKDTAPVLDSDGSYFIYSKLVNMTSKWEKTDTSFSCNVRH
小鼠 IgG3  EWERNGELEQDYKNTPPILDSDGTYFLYSKLVDTDSWLQGEIFTCSVVH

430      440
人 IgG1  EALHNHYTQKSLSLSPGK
人 IgG2  EALHNHYTQKSLSLSPGK
人 IgG3  EALHNRFTQKSLSLSPGK
人 IgG4  EALHNHYTQKSLSLSLGGK
小鼠 IgG1  EGLHNHHTKSLSHSPGK
小鼠 IgG2A  EGLHNHHTTKSFSRTPGK
小鼠 IgG2B  EGLKNYYLKKTISRSPGK
小鼠 IgG3  EALHNHHTQKNLSRSPGK
    
```

图 22A

FC序列之间的同一性百分率

	1	2	3	4	5	6	7	8
1. 人 IgG1	-	94	94	94	64	66	63	68
2. 人 IgG2		-	93	92	65	63	60	67
3. 人 IgG3			-	91	64	64	61	67
4. 人 IgG4				-	62	64	61	64
5. 小鼠 IgG1					-	65	61	67
6. 小鼠 IgG2A						-	77	70
7. 小鼠 IgG2B							-	68
8. 小鼠 IgG3								-

图 22B

	230	240	250	260	270
人 IgG1	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV				
人 IgG2	PAP-FVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV				
人 IgG3	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYV				
人 IgG4	PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYV				
		****			* * *
	280	290	300	310	320
人 IgG1	DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP				
人 IgG2	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSIVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP				
人 IgG3	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSIVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP				
人 IgG4	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP				
			*	*	*
	330	340	350	360	370
人 IgG1	APIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
				D L	
人 IgG2	APIEKTISKTKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
人 IgG3	APIEKTISKTKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
人 IgG4	SSIIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
	**	*		*	
	380	390	400	410	420
人 IgG1	EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH				
人 IgG2	EWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH				
人 IgG3	EWESNGQPENNYNTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH				
人 IgG4	EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH				
		*	*	*	* *
	430	440			
人 IgG1	EALHNHYTQKSLSLSPGK				
人 IgG2	EALHNHYTQKSLSLSPGK				
人 IgG3	EALHNRFTQKSLSLSPGK				
人 IgG4	EALHNHYTQKSLSLSLGK				
		**	*		

图 23