



(10) 申请公布号 CN 118139877 A

(43) 申请公布日 2024. 06. 04

(21) 申请号 202280070199.8

(22) 申请日 2022.10.17

(30) 优先权数据

10-2021-0138530 2021.10.18 KR

10-2021-0138763 2021.10.18 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.04.18

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2022/015765 2022.10.17

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/068710 KO 2023.04.27

(71) 申请人 高丽大学校产学协力团

地址 韩国

(72) 发明人 郑相泽 庆文洙 高翔焕 曹美京

金修延 高宇炯

(74) 专利代理机构 上海弼兴律师事务所 31283

专利代理师 水文钰 徐婕超

(51) Int.Cl.

C07K 16/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

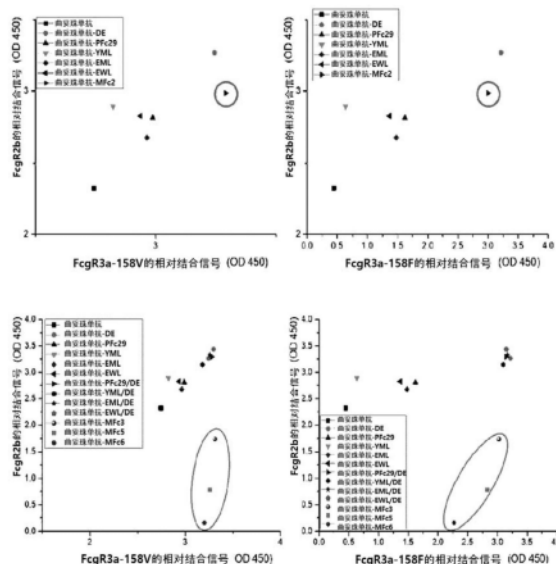
A61K 39/00 (2006.01)

(54) 发明名称

具有提高的pH依赖性FcRn结合力以及Fc γ R IIIa结合选择性的Fc变体

(57) 摘要

本发明涉及一种Fc变体,其通过以pH依赖性方式与FcRn结合以及解离而具有提高的半衰期并具有提高的对Fc γ 受体的选择性结合力,本发明的新型人抗体Fc结构域变体为使血液中半衰期最大化的变体,其与野生型人抗体Fc结构域以及现有的被批准为抗体治疗剂的抗体相比,具有减少的与作为免疫抑制性受体的Fc γ R II b的结合力,并且具有提高的与作为免疫激活性受体的Fc γ R IIIa的结合力(A/I比例增加),因此具有显著提高的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)诱导能力,并表现出优异的pH-选择性FcRn结合以及解离能力,因此可以通过在体内与具有低半衰期以及维持时间的许多肽药物治疗剂结合以增加的血中半衰期发挥长时间的药效,并且可以使治疗用蛋白药物的免疫作用机制最大化,因此可以用地用作改善的抗体药物。



1. 一种人抗体Fc结构域变体,其特征在于,在野生型人抗体Fc结构域中,根据Kabat编号系统进行编号的第235位、第239位、第248位、第259位、第268位、第270位、第298位、第309位、第311位、第330位、第332位、第356位、第378位以及第428位的氨基酸被与野生型氨基酸不同的序列取代。

2. 根据权利要求1所述的人抗体Fc结构域变体,其特征在于,包含选自由L235P、S239D、K248M、V259I、H268L、D270Y、S298G、L309E、Q311R、A330V、I332E、D356G、A378V以及M428L组成的组中的一个以上氨基酸取代。

3. 根据权利要求1所述的人抗体Fc结构域变体,其特征在于,包含L235P、V259I、Q311R、I332E、A378V以及M428L的氨基酸取代。

4. 根据权利要求1所述的人抗体Fc结构域变体,其特征在于,包含S239D、H268L、Q311R、A330V、I332E以及M428L的氨基酸取代。

5. 根据权利要求1所述的人抗体Fc结构域变体,其特征在于,包含S239D、K248M、H268L、L309E、Q311M、A330V、I332E以及M428L的氨基酸取代。

6. 根据权利要求1所述的人抗体Fc结构域变体,其特征在于,包含L235P、S239D、D270Y、S298G、Q311R、I332E、D356G以及M428L的氨基酸取代。

7. 根据权利要求1所述的人抗体Fc结构域变体,其特征在于,与人Fc γ R II b相比,选择性增强对人Fc γ R III a的结合性。

8. 根据权利要求1所述的人抗体Fc结构域变体,其特征在于,与野生型人抗体Fc结构域相比,增强抗体依赖性细胞介导的细胞毒性诱导能力。

9. 根据权利要求1所述的人抗体Fc结构域变体,其特征在于,与野生型人抗体Fc结构域相比,在pH7.0至7.8时对FcRn表现出低结合亲和力。

10. 根据权利要求1所述的人抗体Fc结构域变体,其特征在于,与野生型人抗体Fc结构域相比,在pH5.6至6.5时对FcRn表现出高结合亲和力。

11. 根据权利要求1所述的人抗体Fc结构域变体,其特征在于,与野生型人抗体Fc结构域相比,具有增加的体内半衰期。

12. 一种抗体或其具有免疫活性的片段,其特征在于,对包含权利要求1所述的Fc结构域变体的Fc γ 受体具有特异性。

13. 根据权利要求12所述的抗体或其具有免疫活性的片段,其特征在于,与野生型人抗体相比,具有增加的体内半衰期。

14. 一种生物活性多肽缀合物,其特征在于,因权利要求1所述的人抗体Fc结构域变体和生物活性多肽结合而具有增加的体内半衰期。

15. 根据权利要求14所述的生物活性多肽缀合物,其特征在于,生物活性多肽选自由人生长激素、生长激素释放激素、生长激素释放肽、干扰素、集落刺激因子、白细胞介素、可溶性白细胞介素受体、可溶性TNF受体、葡萄糖脑苷脂酶、巨噬细胞活化因子、巨噬细胞肽、B细胞因子、T细胞因子、蛋白A、过敏抑制因子、细胞坏死糖蛋白、免疫毒素、淋巴毒素、肿瘤坏死因子、肿瘤抑制因子、转化生长因子、 α -1抗胰蛋白酶、白蛋白、载脂蛋白-E、促红细胞生成素、高度糖基化促红细胞生成素、血液因子VII、血液因子VIII、血液因子IX、纤维蛋白溶酶原激活剂、尿激酶、链激酶、蛋白C、C-反应蛋白、肾素抑制剂、胶原酶抑制剂、超氧化物歧化酶、瘦素、血小板衍生生长因子、表皮生长因子、成骨生长因子、骨形态发生蛋白、降钙素、胰

胰岛素、胰岛素衍生物、胰高血糖素、胰高血糖素样肽-1、心房肽、软骨诱导因子、缔结组织生长因子、卵泡刺激素、黄体生成素、卵泡刺激素释放激素、神经生长因子、甲状旁腺激素、松弛素、促胰液素、生长调节素、胰岛素样生长因子、肾上腺皮质激素、胆囊收缩素、胰多肽、胃泌素释放肽、促肾上腺皮质激素释放因子、促甲状腺激素、受体类、受体拮抗物质、细胞表面抗原、单克隆抗体、多克隆抗体、抗体片段类以及病毒源性疫苗抗原组成的组中。

16. 一种核酸分子,其特征在于,编码权利要求1所述的人抗体Fc结构域变体、权利要求12所述的抗体或其具有免疫活性的片段。

17. 一种载体,其特征在于,包含权利要求16所述的核酸分子。

18. 一种宿主细胞,其特征在于,包含权利要求17所述的载体。

19. 一种用于预防或治疗癌症的药物组合物,其特征在于,包含权利要求1所述的人抗体Fc结构域变体、权利要求12所述的抗体或其具有免疫活性的片段或权利要求14所述的生物活性多肽缀合物作为有效成分。

20. 根据权利要求19所述的用于预防或治疗癌症的药物组合物,其特征在于,癌症为选自自由脑肿瘤、黑色素瘤、骨髓瘤、非小细胞肺癌、口腔癌、肝癌、胃癌、结肠癌、乳腺癌、肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头颈癌、宫颈癌、卵巢癌、大肠癌、小肠癌、直肠癌、输卵管癌、肛门周围癌、子宫内膜癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金病、食道癌、淋巴瘤、膀胱癌、胆囊癌、内分泌癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、前列腺癌、慢性或急性白血病、淋巴细胞淋巴瘤、肾癌或输尿管癌、肾细胞癌、肾盂癌、中枢神经系统肿瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、脊髓瘤、脑干胶质瘤以及垂体腺瘤组成的组中的任一种。

21. 一种人抗体Fc结构域变体的制备方法,其特征在于,包括:

步骤a), 培养包含载体的宿主细胞,上述载体含有编码权利要求1所述的人抗体Fc结构域变体的核酸分子;以及

步骤b), 回收由宿主细胞表达的多肽。

22. 一种对Fc γ 受体具有特异性的抗体的制备方法,其特征在于,包括:

步骤a), 培养包含载体的宿主细胞,上述载体含有编码权利要求12所述的抗体或其具有免疫活性的片段的核酸分子;以及

步骤b), 纯化从宿主细胞表达的抗体。

23. 一种包含权利要求1所述的Fc结构域变体的抗体或其具有免疫活性的片段在制备抗体治疗剂中的用途。

24. 一种包含权利要求1所述的Fc结构域变体的抗体或其具有免疫活性的片段在预防或治疗癌症中的用途。

25. 一种癌症治疗方法,其特征在于,包括将药学上有效量的包含权利要求1所述的Fc结构域变体的抗体或其具有免疫活性的片段给药到患有癌症的个体的步骤。

具有提高的pH依赖性FcRn结合力以及Fc γ RIIIa结合选择性的Fc变体

技术领域

[0001] 本发明涉及一种通过以pH依赖性方式与FcRn结合以及解离而具有提高的半衰期,并具有提高的对Fc γ 受体的选择性结合力的Fc变体。

背景技术

[0002] 由于蛋白质治疗剂对疾病靶标表现出非常高的特异性以及低副作用及毒性,因此通过快速代替非特异性低分子化合物治疗剂来广泛应用于临床,并且在目前用于临床的蛋白质治疗剂中,主要使用融合抗体治疗剂和抗体Fc区的Fc融合蛋白治疗剂。抗体提供体液免疫系统与细胞免疫系统之间的联系,抗体的Fab区识别抗原,而Fc结构域部分与针对因所有免疫活性细胞而不同地表达的细胞上的抗体(免疫球蛋白)的受体(Fc受体或FcR)结合。抗体Fc区上的Fc受体结合部位与细胞上的Fc受体(FcR)结合,从而当通过Fc区与细胞结合,并且抗体与细胞表面上的Fc受体结合时,触发包括吞噬以及破坏抗体包被粒子、消除免疫复合物、通过杀伤细胞裂解抗体包被靶细胞(抗体依赖性细胞介导的细胞毒性,antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity或ADCC)、释放炎症介质、胎盘迁移以及抑制免疫球蛋白的产生在内的多种重要的生物反应(Deo, Y.M. et al., Immunol. Today 18(3):127-135 (1997))。像这样,Fc结构域在免疫细胞的募集、ADCC以及抗体依赖性细胞吞噬作用(antibody dependent cellular phagocytosis, ADCP)中发挥关键作用,尤其,作为抗体的效应子功能(effector function)的ADCC以及ADCP功能取决于与存在于细胞表面的Fc受体的相互作用。人类的Fc受体分为5种,并且所募集的免疫细胞的种类取决于抗体与哪一种Fc受体结合。因此,可以说尝试修饰抗体使得能够募集特定细胞在治疗领域非常重要。

[0003] 与现有的低分子药物相比,治疗用抗体对靶标变出非常高的特异性,不仅生物毒性低且副作用小,还具有约3周的优异的血液中半衰期,因此被认为是最有效的癌症治疗方法之一。事实上,全球的大型制药公司以及研究所正在致力于研发通过特异性结合于包括致癌因素在内的癌细胞来有效消灭它们的治疗用抗体。治疗用抗体药物开发企业主要包括罗氏、安进、强生、雅培、百时美施贵宝(BMS)等制药公司,尤其,罗氏在2012年通过作为代表性产品的用于抗癌治疗的赫赛汀(Herceptin)、阿瓦斯汀(Avastin)、利妥昔单抗(Rituxan)等这三种治疗用抗体在全球市场上实现约195亿美元的销售额,不仅创造了巨额利润,还引领全球的抗体药物市场。众所周知,开发英夫利昔单抗(Remicade)的强生公司也因销量增加而在全球抗体市场中快速成长,并且雅培以及百时美施贵宝(BMS)等制药公司也具有多种处于开发最后阶段的治疗用抗体。由此导致的结果是,包含对疾病靶标具有特异性且副作用低的治疗用抗体的生物药物正在快速代替以低分子药物占据主导权的全球制药市场。

[0004] 据报道,免疫球蛋白(抗体)在血液中/体内的半衰期以及持续性很大程度上取决于IgG结合配体之一的新生儿Fc受体(neonatal Fc receptor, FcRn)与Fc的结合,FcRn主要在内皮(endothelial)细胞以及上皮(epithelial)细胞中表达,通过与抗体Fc区的CH2-CH3边界区域结合来保持体内抗体浓度的稳态,并通过移动到细胞内部并释放到血浆中的再循

环过程来增加血液中抗体的半衰期。具体地,免疫球蛋白的Fc片段通过非特异性细胞吸收作用而被内皮细胞摄取(uptake),随后被引入酸性内体中。FcRn在内体中在酸性pH(<6.5)条件下与免疫球蛋白结合,在血流中在碱性pH(>7.4)条件下释放免疫球蛋白。因此,FcRn从溶酶体降解途径中回收免疫球蛋白。当血清免疫球蛋白水平减少时,可以通过利用更多的FcRn分子进行免疫球蛋白结合来增加免疫球蛋白的量。相反,当血清免疫球蛋白水平上升时,可以增加因FcRn饱和而退化的细胞吸收的免疫球蛋白的比例(Ghetie以及Ward, Annu.Rev.Immunol.18:739-766,2000)。即,抗体的血液中半衰期以及持续性很大程度上取决于抗体的Fc部位与IgG结合配体之一的新生儿Fc受体(neonatal Fc receptor,FcRn)的结合。抗体的Fc部位为C γ 2以及C γ 3结构域之间的部位,其负责募集免疫白细胞或血清补体分子使得能够消除如癌细胞或感染细胞等损伤的细胞,介导与新生儿(neonatal)受体FcRn的相互作用,它们的结合使细胞内吞抗体从内体(endosome)向血流(bloodstream)再循环(Raghavan et al.,1996,Annu Rev Cell Dev Biol 12:181-220;Ghetie et al., 2000,Annu Rev Immunol 18:739-766)。由于全长分子的巨大尺寸而导致肾脏过滤(kidney filtration)受到抑制,因此此过程具有1周至3周范围的有利的抗体血清半衰期(antibody serum half-life)。并且,FcRn与Fc的结合在抗体转运中也发挥重要作用。因此,Fc部位通过细胞内运输(intracellular trafficking)以及再循环机制使抗体循环而在维持延长的血清持续性(prolonged serum persistence)方面发挥重要作用,因此应提高与FcRn的pH医疗性结合力,以改善抗体的血液中半衰期。

[0005] 另一方面,目前,抗体作为药品的作用包括直接方式,其通过与抗原结合并抑制抗原的作用,以及通过效应细胞(自然杀伤细胞、巨噬细胞等)的间接去除抗原的方式,上述效应细胞具有与抗原结合的抗体的Fc γ 部位以及Fc γ 受体(Fc gamma receptor,FCGR)。在最近正在研发的抗体治疗剂的情况下,通过ADCC机制提高药剂的效果,其阻止由于与抗原的结合而引起的抗原的作用的同时由效应细胞识别抗体的Fc γ 部位进行攻击以及消除。最近与ADCC相关的研究表明,Fc γ 与Fc γ 受体的结合力受到Fc γ 部位受体的基因型,并且多项研究表明,基于抗体的治疗剂的效率根据作为患者的Fc γ 受体的FCGR2A蛋白(Fc γ RIIIa)的第131位氨基酸以及FCGR3A蛋白的第158位氨基酸的氨基酸序列的多样性而变化。例如,在作为乳腺癌治疗剂的赫赛汀(trastuzumab)的情况下,由Musolino等人在2008年报道称,在临床前研究中,抗体依赖性细胞毒性在FCGR2A 131H/H或FCGR3A 158V/V基因型中表现出显著的差异并增加。然而,尽管通过修饰哺乳动物的抗体的Fc部位来增加对特Fc受体的结合力,但也保持对其他Fc受体的结合力,因此存在仍然保持不良免疫反应的问题。5种人类的主要Fc γ R中的4种诱导免疫激活或炎症反应,Fc γ R II b诱导免疫抑制或抗炎反应,大多数天然产生的抗体或重组的糖基化抗体与激活性以及抑制性Fc受体都结合。通过ADCC最强烈地诱导治疗用IgG抗体的癌细胞杀伤功效的免疫细胞为自然杀伤细胞(NK细胞),不同于其他免疫细胞(例如,单核细胞(monocytes)、巨噬细胞(macrophages)、树突状细胞(dendritic cells)等),NK细胞在表面表达Fc γ RIIIa,并且不表达Fc γ RI、Fc γ R II a、Fc γ R II b以及Fc γ RIIIb,因此为了使癌细胞杀伤作用机制最大化,必须通过优化IgG抗体的Fc部位来提高与NK细胞表面表达的Fc γ RIIIa的亲合力。并且,不仅是NK细胞,还考虑到存在于血液中的各种免疫细胞的复合免疫反应,由于抗体的Fc结构域与激活性Fc γ R结合的能力(A)与抗体的Fc结构域与抑制性Fc γ R II b结合的能力(I)的比例(A/I ratio)越高越表现出优

异的ADCC诱导能力,因此与作为抑制性受体的Fc γ R II b结合力相比,非常迫切地需要选择性提高激活性受体结合力(Boruchov et al, J Clin Invest, 115(10):2914-23, 2005)。

发明内容

[0006] 技术问题

[0007] 本发明的目的在于,提供一种新型人抗体Fc结构域变体。

[0008] 并且,本发明的目的在于,提供一种对Fc γ 受体具有特异性的抗体或其具有免疫活性的片段。

[0009] 并且,本发明的目的在于,提供一种编码上述Fc结构域变体或上述抗体或其具有免疫活性的片段的核酸分子、包含上述核酸分子的载体以及包含上述载体的宿主细胞。

[0010] 并且,本发明的目的在于,提供一种生物活性多肽缀合物,其具有增加的体内半衰期。

[0011] 并且,本发明的目的在于,提供一种用于预防或治疗癌症的药物组合物。

[0012] 并且,本发明的目的在于,提供一种人抗体Fc结构域变体的制备方法。

[0013] 并且,本发明的目的在于,提供一种对Fc γ 受体具有特异性的抗体的制备方法。

[0014] 并且,本发明的目的在于,提供一种抗体或其具有免疫活性的片段在制备抗体治疗剂中的用途。

[0015] 并且,本发明的目的在于,提供一种抗体或其具有免疫活性的片段在预防或治疗癌症中的用途。

[0016] 另外,本发明的目的在于,提供一种癌症治疗方法,上述方法包括将药学上有效量的抗体或其具有免疫活性的片段给药到患有癌症的个体的步骤。

[0017] 技术方案

[0018] 为了解决上述问题,本发明提供一种新型人抗体Fc结构域变体,其具有增加的体内半衰期以及增加的与特定Fc γ 受体的选择性结合力。

[0019] 并且,本发明提供一种抗体或其具有免疫活性的片段,其包含上述新型人抗体Fc结构域变体。

[0020] 并且,本发明提供一种生物活性多肽缀合物,其包含上述新型人抗体Fc结构域变体。

[0021] 并且,本发明提供一种编码上述Fc结构域变体或上述抗体或其具有免疫活性的片段的核酸分子、包含上述核酸分子的载体以及包含上述载体的宿主细胞。

[0022] 并且,本发明提供一种用于预防或治疗癌症的药物组合物,其包含上述Fc结构域变体、上述生物活性多肽缀合物或上述抗体或其具有免疫活性的片段作为有效成分。

[0023] 并且,本发明提供一种人抗体Fc结构域变体的制备方法。

[0024] 并且,本发明提供一种对Fc γ 受体具有特异性的抗体的制备方法。

[0025] 并且,本发明提供一种本发明的抗体或其具有免疫活性的片段在制备抗体治疗剂中的用途。

[0026] 并且,本发明提供一种本发明的抗体或其具有免疫活性的片段在预防或治疗癌症中的用途。

[0027] 另外,本发明提供一种癌症治疗方法,上述方法包括将药学上有效量的本发明的

抗体或其具有免疫活性的片段给药到患有癌症的个体的步骤。

[0028] 发明的效果

[0029] 本发明的新型人抗体Fc结构域变体为使血液后半衰期最大化的变体,其与野生型人抗体Fc结构域以及现有的被批准为抗体治疗剂的抗体相比,表现出与作为免疫抑制性受体的Fc γ R II b的结合力减少,并且具有提高的作为免疫激活性受体的Fc γ R III a的结合力(A/I比例增加),因此具有显著提高的ADCC诱导能力,并表现出优异的pH-选择性FcRn结合以及解离能力,因此可以通过在体内与具有低半衰期以及维持时间的许多肽药物治疗剂结合以增加的血液后半衰期发挥长时间的药效,并且可以使治疗用蛋白药物的免疫作用机制最大化,因此可以有用地用作改善的抗体药物。

附图说明

[0030] 图1为示出表达以及纯化hFc γ R III a-158V-链霉亲和素-His、hFc γ R II b-链霉亲和素-His、hFc γ R III a-158V-GST、hFc γ R III a-158F-GST、hFc γ R II b-GST以及hFcRn-GST后进行SDS-PAGE分析的结果的图。

[0031] 图2为示出用于分选具有提高的pH依赖性FcRn结合力以及Fc γ R III a结合选择性的Fc变体的酵母展示文库构建示意图的图。

[0032] 图3为示出利用FACS对酵母展示文库进行分选(sorting)的每轮的Alexa647缀合四聚体(conjugated tetrameric)Fc γ R III a、无荧光四聚体Fc γ R II b以及Alexa488缀合蛋白A(Protein A)的浓度以及圈门(gating)策略的图。

[0033] 图4为示出用FACS分析通过酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)细胞壁展示进行筛选的每轮的Fc亚(sub)文库与Fc γ R III a-Alexa647结合的荧光强度(A)以及与由无荧光Fc γ R II b掩蔽(masking)的状态下的Fc γ R III a-Alexa647结合的荧光强度(即,对Fc γ R III a的选择性结合强度)(B)的结果的图。

[0034] 图5为示出表达以及纯化包含Fc变体的曲妥珠单抗Fc变体后进行SDS-PAGE分析的结果的图。

[0035] 图6为通过ELISA分析包含Fc变体的曲妥珠单抗Fc变体在pH6.0以及7.4时的FcRn结合力的结果。

[0036] 图7为通过ELISA分析分别包含本发明的MFC2、MFC3、MFC5以及MFC6的Fc变体的曲妥珠单抗Fc变体对Fc γ Rs(hFc γ R III a-158V、hFc γ R III a-158F以及hFc γ R II b)的结合力的图。

[0037] 图8为通过生物层干涉测量法(Biolayer Interferometry, BLI)分析测定曲妥珠单抗-Fc变体对pFc γ R III a的定量结合力的结果。

[0038] 图9为示出表达以及纯化包含引入新型突变的Fc变体的曲妥珠单抗Fc变体后进行SDS-PAGE分析的结果的图。

[0039] 图10为通过ELISA分析包含引入新型突变的Fc变体的曲妥珠单抗Fc变体对Fc γ Rs的结合力的图。

[0040] 本发明的实施方式

[0041] 以下,将参考附图通过本发明的实例详细说明本发明。然而,提供下述示例作为本发明的示例,当判断本领域的普通技术人员公知的技术以及结构的具体说明可能不必要地

模糊本发明的主旨时,可以省略其详细说明,并且本发明不限于此。本发明可以在后述的发明要求保护范围的记载以及由此解释的等同范围内进行各种变形以及应用。

[0042] 并且,本说明书中所使用的术语(terminology)为用于适当表达本发明的优选实施例的术语,其可以根据使用者、操作者的意图或本发明所属领域的惯例而改变。因此,应基于本说明书全文的内容而对本术语进行定义。在整个说明书中,当某一部分“包括”某一结构要素时,除非另有特别相反的记载,否则意味着还可以包括其他结构要素而不是排除其他结构要素。

[0043] 在本发明中,除非另有定义,否则所使用的所有技术术语均具有与本发明相关领域的普通技术人员通常理解的含义。并且,本说明书中记载的优选的方法或试样,或与其相似或同等物也包括在本发明的范围内。在本说明书中作为参考文献记载的所有刊物的内容均纳入本发明。

[0044] 在整个本说明中,不仅使用针对天然存在的氨基酸的通常的单字以及三字代码,还使用如Aib(α -氨基异丁酸)、Sar(N-甲基甘氨酸(N-methylglycine))等对其他氨基酸普遍接受的三字代码。并且,在本发明中作为缩写提及的氨基酸根据IUPAC-IUB命名法如下记载:

[0045] 丙氨酸:A、精氨酸:R、天冬酰胺:N、天冬氨酸:D、半胱氨酸:C、谷氨酸:E、谷氨酰胺:Q、甘氨酸:G、组氨酸:H、异亮氨酸:I、亮氨酸:L、赖氨酸:K、蛋氨酸:M、苯丙氨酸:F、脯氨酸:P、丝氨酸:S、苏氨酸:T、色氨酸:W、酪氨酸:Y以及缬氨酸:V。

[0046] 在一方面,本发明涉及一种人抗体Fc结构域变体,其在野生型(Wild type)人抗体Fc结构域中,根据Kabat编号系统(Kabat numbering system)进行编号的第235位、第239位、第248位、第259位、第268位、第270位、第298位、第309位、第311位、第330位、第332位、第356位、第378位以及第428位的氨基酸被与野生型氨基酸不同的序列取代。

[0047] 在一实例中,本发明的人抗体Fc结构域变体可以包含选自由L235P、S239D、K248M、V259I、H268L、D270Y、S298G、L309E、Q311R、A330V、I332E、D356G、A378V以及M428L组成的组中的一种以上氨基酸取代。

[0048] 在一实例中,本发明的人抗体Fc结构域变体可以包含Q311M或Q311R的氨基酸取代,其在野生型人抗体Fc结构域中,根据Kabat编号系统进行编号的第311位的氨基酸可以被与野生型氨基酸不同的序列取代。

[0049] 在一实例中,本发明的人抗体Fc结构域变体可以为包含L235P、V259I、Q311R、I332E、A378V以及M428L的氨基酸取代的人抗体Fc结构域变体MFc2,人抗体Fc结构域变体MFc2可以包含序列1的氨基酸序列,其可以用包含序列2的碱基序列的核酸分子进行编码。

[0050] 在一实例中,本发明的人抗体Fc结构域变体可以为包含S239D、H268L、Q311R、A330V、I332E以及M428L的氨基酸取代的人抗体Fc结构域变体MFc3,人抗体Fc结构域变体MFc3可以序列3的氨基酸序列,其可以用包含序列4的碱基序列的核酸分子进行编码。

[0051] 在一实例中,本发明的人抗体Fc结构域变体可以为包含S239D、K248M、H268L、L309E、Q311M、A330V、I332E以及M428L的氨基酸取代的人抗体Fc结构域变体MFc5,人抗体Fc结构域变体MFc5可以包含序列5的氨基酸序列,其可以用包含序列6的碱基序列的核酸分子进行编码。

[0052] 在一实例中,本发明的人抗体Fc结构域变体可以为包含L235P、S239D、D270Y、

S298G、Q311R、I332E、D356G以及M428L的氨基酸取代的人抗体Fc结构域变体MFc6,人抗体Fc结构域变体MFc6可以包含序列7的氨基酸序列,其可以用包含序列8的碱基序列的核酸分子进行编码。

[0053] 在一实例中,野生型人抗体Fc结构域可以由序列9的氨基酸序列组成,其可以用序列10的核酸分子进行编码。

[0054] 在一实例中,与野生型Fc结构域相比,本发明的人抗体Fc结构域变体可以表现出提高的与Fc γ RIIIa的结合力。

[0055] 在一实例中,与野生型Fc结构域相比,本发明的人抗体Fc结构域变体具有提高的与Fc γ RIIIa的结合力,具有减少的与Fc γ RIIb的结合力,与人Fc γ RIIb相比,可以选择性增强对人Fc γ RIIIa的结合性。

[0056] 在一实例中,与野生型人抗体Fc结构域相比,本发明的人抗体Fc结构域变体可以增强抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) 诱导能力。

[0057] 在一实例中,本发明的人抗体Fc结构域变体可以具有pH敏感性,与野生型人抗体Fc结构域相比,可以在pH7.0至7.8时对FcRn表现出低结合亲和力,在pH5.6至6.5时对FcRn表现出高结合亲和力。

[0058] 在一实例中,与野生型免疫球蛋白Fc区相比,本发明的Fc变体可以在pH5.6至6.5时对FcRn表现出高结合亲和力,可以在内体中处于弱酸性条件,可以为pH5.8至6.0。在上述pH范围内,与野生型Fc结构域相比,本发明的pH敏感性Fc变体对FcRn的结合亲和力可以增加10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上或100%以上,或者,与野生型Fc结构域相比,可以增加2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上、9倍以上、10倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上或100倍以上。

[0059] 在一实例中,与野生型免疫球蛋白Fc区相比,本发明的Fc变体可以在pH7.0至7.8时对FcRn表现出低结合亲和力,可以为血液的正常pH范围,可以为pH7.2至7.6。在上述pH范围内,与野生型Fc结构域相比,本发明的Fc变体从FcRn解离 (dissociation) 的程度可以相同或基本上没有变化。

[0060] 在一实例中,与野生型人抗体Fc结构域相比,本发明的人抗体Fc结构域变体可以具有增加的体内半衰期 (Half-life)。

[0061] 在一实例中,与野生型人抗体Fc结构域相比,本发明的人抗体Fc结构域变体的半衰期可以增加10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上或100%以上,或者,与野生型Fc结构域相比,可以增加2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上、9倍以上或10倍以上。

[0062] 在一实例中,人抗体 (免疫球蛋白) 可以为IgA、IgM、IgE、IgD或IgG,或者它们的修饰,可以为IgG1、IgG2、IgG3或IgG4,优选为抗HER2抗体,更优选为曲妥珠单抗。抗体通过木瓜蛋白酶切割形成2个Fab结构域以及1个Fc结构域,在人IgG分子中,Fc区由木瓜蛋白酶切割Cys 226的N-末端而形成 (Deisenhofer, Biochemistry 20:2361-2370, 1981)。

[0063] 在本发明中,本发明的人抗体Fc区中包含氨基酸的突变的变体根据构成亲本抗体Fc区的氨基酸修饰来定义,并且通常的抗体编号遵循根据kabat的EU索引 (Kabat et al.,

Sequence of proteins of immunological interest, 5th Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, 1991)。

[0064] 本发明中所使用的术语“Fc结构域变体”可以与“Fc变体”互换使用。

[0065] 本发明中所使用的术语“野生型(wild-type)多肽”是指随后被修饰并产生衍生物的未修饰型多肽。野生型多肽可以为自然界中发现的多肽或自然界中发现的多肽的衍生物或改造形式。野生型多肽可以是指多肽本身、包含上述野生型多肽的组合物或编码其的氨基酸序列。因此,本发明中所使用的术语“野生型抗体”是指因氨基酸残基被修饰而产生衍生物的未修饰的抗体多肽。意味着因引入氨基酸修饰而产生衍生物的未修饰的抗体多肽的“亲本(parent)抗体”可以与上述术语互换使用。

[0066] 本发明中所使用的术语“氨基酸修饰/突变”是指多肽序列的氨基酸的取代、插入和/或缺失,优选地,是指取代。本发明中所使用的术语“氨基酸取代”或“取代”是指在野生型人抗体Fc结构域的多肽序列的特定位置中的氨基酸被其他氨基酸取代。例如,意味着在包含Q311R取代的Fc变体中,作为野生型抗体的Fc结构域的氨基酸序列中第311位氨基酸残基的谷氨酰胺被精氨酸取代。

[0067] 本说明书中所使用的术语“Fc变体”是指与野生型抗体Fc结构域相比包含一个以上氨基酸残基的修饰。

[0068] 与野生型抗体Fc结构域(区域或片段)相比,本发明的Fc变体包含一个以上氨基酸修饰,由此导致氨基酸序列中存在差异。本发明的Fc变体的氨基酸序列与野生型抗体Fc结构域的氨基酸序列实际上相同。例如,与野生型抗体Fc结构域的氨基酸序列相比,本发明的Fc变体的氨基酸序列将具有约80%以上,优选地,约90%以上,最优选地,约95%以上的同源性。氨基酸修饰可以利用分子生物学方法以遗传方式进行,或者可以利用酶促或化学方法进行。

[0069] 本发明的Fc变体可以通过本技术领域公知的任何方法来制备。在一实施例中,本发明的人抗体的Fc变体在编码包含特定氨基酸修饰的多肽序列后,根据需求,用于形成向宿主细胞内克隆、表达以及验证的核酸。用于此目的的各种方法记载于文献(Molecular Cloning-A Laboratory Manual, 3rd Ed., Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001; Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons)中。

[0070] 编码本发明的Fc变体的核酸可以插入到表达载体中用于蛋白表达。表达载体包含常规调节序列或调控(regulatory)序列、分选标记物、任何融合伴侣或/或与附加因素可操作连接的蛋白质,即,处于功能关系中的蛋白质。在合适的状态下,可以通过培养用核酸转化的宿主细胞,优选为含有编码本发明的Fc变体的核酸的表达载体来诱导蛋白表达的方法产生本发明的Fc变体。可以使用包括哺乳类细胞、细菌、昆虫细胞以及酵母在内的各种合适的宿主细胞,但不限于此。将外源性核酸导入宿主细胞的方法是本技术领域公知的,并且将根据所使用的宿主细胞而变化。优选地,可以将生产成本低廉且产业利用价值高的大肠杆菌作为宿主细胞来产生本发明的Fc变体。

[0071] 因此,本发明的范围中包括Fc变体的制备方法,上述方法包括如下步骤:在适合蛋白表达的条件下,培养引入编码Fc变体的核酸的宿主细胞;以及纯化或分离从宿主细胞表达的Fc变体。

[0072] 本发明中所使用的术语“FcRn”或“新生儿Fc受体”是指与IgG抗体Fc区结合的蛋白质,其至少一部分由FcRn基因编码。上述FcRn不限于此,可以来源于包括人类、小鼠、大鼠、兔以及猴在内的任何生物体。如本技术领域所公知的,功能性FcRn蛋白包含通常被称为轻链以及重链的2个多肽。轻链为 β -2-微球蛋白(β -2-microglobulin),重链由FcRn基因编码。在本说明书中,除非另有说明,否则FcRn或一个FcRn蛋白是指FcRn重链和 β -2-微球蛋白的复合物。

[0073] 在一方面,本发明涉及一种抗体或其具有免疫活性的片段,其对包含本发明的Fc结构域变体的Fc γ 受体具有特异性。

[0074] 在一实例中,与野生型人抗体相比,本发明的抗体可以具有增加的体内半衰期。

[0075] 在一实例中,抗体可以为多克隆抗体、单克隆抗体、微抗体(minibody),结构域抗体、双特异性抗体、抗体模拟物、嵌合抗体、抗体缀合物(conjugate)、人抗体或人源化抗体,具有免疫活性的片段可以为上述抗体的Fab、Fd、Fab'、dAb、F(ab')、F(ab')₂、单链可变区片段(single chain fragment variable, scFv)、Fv、单链抗体、Fv聚合物、互补决定区片段或双链抗体(diabody)。

[0076] 在一实例中,包含本发明的Fc结构域变体的抗体或其具有免疫活性的片段可以增加效应子作用,并且与野生型Fc结构域相比,与Fc γ R IIIa的结合力提高,与Fc γ R II b的结合力减少,导致具有高Fc γ R IIIa结合选择性而具有A/I比例高的特性,因此可以增加抗体介导的细胞毒性作用(antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC)。

[0077] 在本发明中,A/I比例为抗体的Fc结构域与激活性Fc γ R结合的能力(A)与抗体的Fc结构域与抑制性Fc γ R II b结合的能力(I)的比例(A/I ratio),A/I比例越高越表现出优异的ADCC诱导能力,因此重要的是与作为抑制性受体的Fc γ R II b结合力相比选择性提高激活性受体结合力。

[0078] 可以通过本技术领域公知的各种方法分离或纯化抗体。标准纯化方法包括色谱技术、电泳、免疫、沉淀、透析、过滤、浓缩以及色谱聚焦(chromatofocusing)技术。如本技术领域所公知的,如细菌蛋白A、G以及L等各种天然蛋白质与抗体结合,上述蛋白质可以用于纯化。通常,可以通过特定融合伴侣进行纯化。

[0079] 上述抗体不仅包括全(whole)抗体形式,还包括抗体分子的功能性片段。全抗体为具有2条全长的轻链(light chain)以及2条全长的重链(heavy chain)的结构,每条轻链通过二硫键(disulfide bond)与重链连接。抗体分子的功能性片段是指具有抗原结合功能的片段,抗体片段的例子包括:(i)由轻链的可变区(V_L)、重链的可变区(V_H)、轻链的恒定区(C_L)以及重链的第一恒定区(C_H1)组成的Fab片段;(ii)由V_H以及CH1结构域组成的Fd片段;(iii)由单一抗体的V_L以及V_H结构域组成的Fv片段;(iv)由V_H结构域组成的dAb片段(Ward ES et al., Nature 341:544-546 (1989));(v)分离的CDR区域;(vi)作为包含两个连接的Fab片段的二价片段的F(ab')₂片段;通过肽接头结合的单链Fv分子(scFv),结合V_H结构域和V_L结构域以形成抗原结合部位;(viii)双特异性单链Fv聚合物(PCT/US92/09965)以及(ix)作为通过基因融合制备的多价或多特异性片段的双链抗体(diabody) W094/13804等。

[0080] 本发明的抗体或其具有免疫活性的片段可以选自由动物来源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体以及其具有免疫活性的片段组成的组中。上述抗体可以通过重组或合成产生。

[0081] 上述抗体或其具有免疫活性的片段可以为从活体分离的(不存在于活体中)或非天然产生的(non-naturally occurring),例如,可以通过合成或重组产生。

[0082] 在本发明中,“抗体”是指在免疫系统中由于抗原的刺激而产生的物质,其种类没有特别的限制,可以天然或非天然(例如,合成或重组)地得到。由于抗体不仅是体外,还在体内非常稳定且半衰期长,因此有利于大量表达以及生产。并且,由于抗体本质上具有二聚体(dimer)结构,因此具有非常高的亲和力(avidity)。完全的抗体为具有2条全长(full length)的轻链以及2条全长的重链的结构,每条轻链与重链通过二硫键连接。抗体的恒定区分为重链恒定区以及轻链恒定区,重链恒定区具有伽马(γ)、缪(μ)、阿尔法(α)、德耳塔(δ)以及伊普西隆(ϵ)型,并具有伽马1(γ 1)、伽马2(γ 2)、伽马3(γ 3)、伽马4(γ 4)、阿尔法1(α 1)以及阿尔法2(α 2)作为亚类。轻链的恒定区具有卡帕(κ)以及兰布达(λ)型。

[0083] 本发明中的术语“重链(heavy chain)”被解释为包括可变结构域 V_H 以及3个恒定区结构域 C_H1 、 C_H2 及 C_H3 以及铰链(hinge)的全长重链以及其片段,其包含具有足以对抗原赋予特异性的可变区序列的氨基酸序列。并且,术语“轻链(light chain)”被解释为包括可变结构域 V_L 以及恒定区结构域 C_L 的全长轻链以及其片段,其包含具有足以对抗原赋予特异性的可变区序列的氨基酸序列。

[0084] 本发明中的术语“Fc结构域”、“Fc片段”或“Fc区”与Fab结构域/片段一起组成抗体,Fab结构域/片段由轻链的可变区(V_L)、重链的可变区(V_H)、轻链的恒定区(C_L)以及重链的第一恒定区(C_H1)组成,Fc结构域/片段由重链的第二恒定区(C_H2)以及第三恒定区(C_H3)组成。

[0085] 在一方面,本发明涉及一种编码本发明的Fc结构域变体或包含其的抗体或其具有免疫活性的片段的核酸分子。

[0086] 在一实例中,编码本发明的Fc变体的核酸分子可以包含序列2、序列4、序列6或序列8的碱基序列。

[0087] 在一方面,本发明涉及一种包含上述核酸分子的载体、包含上述载体的宿主细胞。

[0088] 本发明的核酸分子可以为分离的或重组的,不仅包括单链以及双链形式的DNA及RNA,还包括相应的互补序列。当分离的核酸为从天然产生来源分离的核酸时,在从天然产生来源分离的核酸的情况下,所分离的核酸为从存在于分离该核酸的个体的基因组中的周围遗传序列分离的核酸。在从模板通过酶促或化学合成的如PCR产物、cDNA分子或寡核苷酸等核酸的情况下,通过这种程序产生的核酸可以被理解为分离的核酸分子。分离的核酸分子表示单独片段形式或作为更大的核酸构建体的成分的核酸分子。当与其他核酸序列以功能关系排列时,核酸可操作地连接。例如,当多肽以作为分泌前的形式的前蛋白(preprotein)表达时,全序列或分泌前导序列(leader)的DNA与多肽的DNA可操作地连接,当启动子或增强子影响多肽序列的转录时,与编码序列可操作地连接,或者当核糖体结合部位被配置为促进翻译时,与编码序列可操作地连接。通常,可操作地连接是指待连接的DNA序列处于相邻的位置,分泌前导序列是指相邻并存在于相同的读码框中。然而,增强子不需要处于相邻的位置。连接通过在方便的限制酶位点处进行连接来实现。当这种位点不存在时,根据常规方法使用合成寡核苷酸连接物或接头。

[0089] 由于密码子的简并性(degeneracy)或考虑到上述待表达其的生物中具有偏好的密码子,编码本发明的Fc结构域变体或包含其的抗体或其具有免疫活性的片段的分离的核

酸分子可以在不改变从编码区表达的Fc结构域变体或包含其的抗体或其具有免疫活性的片段的氨基酸序列的范围内,对编码区进行各种修饰,并且在除了编码区以外的部分,也可以在不影响基因的表达的范围内进行各种修饰或修改,并且本领域的普通技术人员可以很好地理解这种修饰基因也包括在本发明的范围内。即,只要本发明的核酸分子编码具有与其等价的活性的蛋白质,一个以上的核酸碱基可以通过取代、缺失、插入或它们的组合而发生突变,这也包括在本发明的范围内。这些核酸分子的序列可以为单链或双链,可以为DNA分子或RNA(mRNA)分子。

[0090] 本发明的编码本发明的Fc结构域变体或包含其的抗体或其具有免疫活性的片段的分离的核酸分子可以插入到表达载体中用于蛋白表达。表达载体包含常规调节序列或调控(regulatory)序列、分选标记物、任何融合伴侣或/或与附加因素可操作连接的蛋白质,即,处于功能关系中的蛋白质。在合适的状态下,可以通过培养用核酸转化的宿主细胞,优选为含有编码本发明的Fc结构域变体或包含其的抗体或其具有免疫活性的片段的分离的核酸分子的表达载体来诱导蛋白表达的方法产生本发明的Fc结构域变体或包含其的抗体或其具有免疫活性的片段。可以使用包括哺乳类细胞、细菌、昆虫细胞以及酵母在内的各种合适的宿主细胞,但不限于此。将外源性核酸导入宿主细胞的方法是本技术领域公知的,并且将根据所使用的宿主细胞而变化。优选地,可以将生产成本低廉且产业利用价值高的大肠杆菌作为宿主细胞来产生。

[0091] 本发明的载体包括质粒载体、粘粒载体、噬菌体载体以及病毒载体等,但不限于此。除了如启动子、操纵子、起始密码子、终止密码子、聚腺苷酸化信号以及增强子等表达调控元件以外,合适的载体还包括用于膜靶向或分泌的信号序列或前导序列,并且可以根据目的以各种方式制备。载体的启动子可以为组成型或诱导型。当宿主为埃希氏菌属(*Escherichia* sp.)菌株时,可以利用PhoA信号序列、OmpA信号序列等,当宿主为芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)菌株时,可以利用 α -淀粉酶信号序列、枯草杆菌蛋白酶信号序列等,当宿主为酵母(yeast)时,可以利用MF α 信号序列、SUC2信号序列等,当宿主为动物细胞时,可以利用胰岛素信号序列、 α -干扰素信号序列、抗体分子信号序列等作为上述信号序列,但不限于此。并且,载体可以包含用于选择包含载体的宿主细胞的选择标记,在可复制的表达载体的情况下包含复制起点。

[0092] 本发明中的术语“载体”是指可以插入核酸序列以引入能够复制核酸序列的细胞中的转运体。核酸序列可以为外源性(exogenous)或异源性(heterologous)。载体可以包括质粒、粘粒以及病毒(例如,噬菌体),但不限于此。本领域的普通技术人员可以通过标准重组技术来构建载体(Maniatis, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988; 以及 Ausubel et al., In: *Current Protocols in Molecular Biology*, John, Wiley & Sons, Inc, NY, 1994等)。

[0093] 在一实例中,在制备上述载体时,根据待产生上述Fc结构域变体或包含其的抗体或其具有免疫活性的片段的宿主细胞的类型适当选择如启动子(promoter)、终止子(terminator)、增强子(enhancer)等表达调控序列、用于膜靶向或分泌的序列等,并且可以根据目的以各种方式组合。

[0094] 在本发明中,术语“表达载体”是指包含编码待转录的基因产物中的至少一部分的核酸序列的载体。在一些情况下,RNA分子随后被翻译成蛋白质、多肽或肽。表达载体可以包

含各种调控序列。除了调控转录以及翻译的调控序列以外,载体以及表达载体还可以包含提供其他功能的核酸序列。

[0095] 在本发明中,术语“宿主细胞”包括真核生物以及原核生物,是指能够复制上述载体或能够表达由载体编码的基因的任何可转化生物。宿主细胞可以被上述载体转染(transfected)或转化(transformed),这是指将外源核酸分子传递或引入宿主细胞内的过程。

[0096] 在一实例中,上述宿主细胞可以为细菌或动物细胞,动物细胞系可以为CHO细胞、HEK细胞或NS0细胞,细菌可以为大肠杆菌。

[0097] 在一方面,本发明涉及一种生物活性多肽缀合物,其通过将本发明的人抗体Fc结构域变体和生物活性多肽结合而具有增加的体内半衰期。

[0098] 在一实例中,生物活性多肽可以选自由人生长激素、生长激素释放激素、生长激素释放肽、干扰素、集落刺激因子、白细胞介素、可溶性白细胞介素受体、可溶性TNF受体、葡萄糖脑苷脂酶、巨噬细胞活化因子、巨噬细胞肽、B细胞因子、T细胞因子、蛋白A、过敏抑制因子、细胞坏死糖蛋白、免疫毒素、淋巴毒素、肿瘤坏死因子、肿瘤抑制因子、转化生长因子、 α -1抗胰蛋白酶、白蛋白、载脂蛋白-E、促红细胞生成素、高度糖基化促红细胞生成素、血液因子VII、血液因子VIII、血液因子IX、纤维蛋白溶酶原激活剂、尿激酶、链激酶、蛋白C、C-反应蛋白、肾素抑制剂、胶原酶抑制剂、超氧化物歧化酶、瘦素、血小板衍生生长因子、表皮生长因子、成骨生长因子、骨形态发生蛋白、降钙素、胰岛素、胰岛素衍生物、胰高血糖素、胰高血糖素样肽-1(Glucagon Like Peptide-1)、心房肽、软骨诱导因子、缔结组织生长因子、卵泡刺激素、黄体生成素、卵泡刺激素释放激素、神经生长因子、甲状旁腺激素、松弛素、促胰液素、生长调节素、胰岛素样生长因子、肾上腺皮质激素、胆囊收缩素、胰多肽、胃泌素释放肽、促肾上腺皮质激素释放因子、促甲状腺激素、受体类、受体拮抗物质、细胞表面抗原、单克隆抗体、多克隆抗体、抗体片段类以及病毒源性疫苗抗原组成的组中,只要是需要增加血液中半衰期的任何生物活性多肽都可以没有限制地使用。

[0099] 在一实例中,本发明的人抗体Fc结构域变体可以有用地用作载体(carrier),其用于增加如蛋白质药物等生物活性多肽的体内半衰期,包含上述载体的生物活性多肽缀合物可以用作体内半衰期显著增加的持续性药物制剂。

[0100] 在一实例中,本发明的人抗体Fc结构域变体与生物活性多肽可以通过非肽基聚合物连接,可用于本发明的非肽基聚合物可以选自由如聚乙二醇、聚丙二醇、乙二醇和丙二醇的共聚物、聚氧乙烯多元醇、聚乙烯醇、多糖、葡聚糖、聚乙烯基乙基醚、聚乳酸(poly lactic acid, PLA)以及聚乳酸-乙醇酸(poly lactic-glycolic acid, PLGA)等可生物降解的聚合物、脂质聚合物、甲壳质、透明质酸以及它们的组合组成的组中,优选为聚乙二醇。本技术领域公知的它们的衍生物以及可以在本技术领域的水平上容易制备的衍生物也包括在本发明的范围内。

[0101] 在一实例中,包含本发明的人抗体Fc结构域变体的生物活性多肽缀合物可以与抗体药物结合,用于治疗癌症的抗体药物可以为曲妥珠单抗(Trastuzumab)、西妥昔单抗(cetuximab)、贝伐珠单抗(bevacizumab)、利妥昔单抗(rituximab)、巴利昔单抗(basiliximab)、英夫利昔单抗(infliximab)、伊匹木单抗(Ipilimumab)、帕博利珠单抗(Pembrolizumab)、纳武单抗(Nivolumab)、阿替利珠单抗(Atezolizumab)或阿维单抗

(Avelumab)。

[0102] 在抗体治疗剂中,向靶标抗原募集并递送免疫细胞的机制为最重要的机制之一,由于抗体的Fc结构域在免疫细胞的募集以及抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity,ADCC)中发挥关键作用,因此本发明的对Fc γ 受体具有增加的选择性结合力的Fc变体有利于用作治疗用抗体。尤其,抗体的ADCC功能取决于与存在于许多细胞表面上的Fc γ 受体(Fc γ R)的相互作用,并且由于所募集的免疫细胞的种类取决于抗体与人类的5种Fc受体中的哪一种Fc受体结合,因此尝试修饰抗体使得能够募集特定细胞在治疗领域非常重要。

[0103] 本发明包括通过将上述本发明的人抗体Fc结构域变体通过非肽基聚合物共价键连接至生物活性多肽来制备持续性药物制剂的方法。

[0104] 本发明的制备方法可以包括如下步骤:通过末端具有反应基团的非肽基聚合物将生物活性多肽与人抗体Fc结构域变体进行共价键连接;以及将生物活性多肽、非肽基聚合物以及人抗体Fc结构域变体通过共价键连接的缀合物进行分离。

[0105] 在一方面,本发明涉及一种用于预防或治疗癌症的药物组合物,其包含本发明的人抗体Fc结构域变体、包含其的抗体或其具有免疫活性的片段或包含其的生物活性多肽缀合物作为有效成分。

[0106] 在一实例中,癌症可以为选自由脑肿瘤、黑色素瘤、骨髓瘤、非小细胞肺癌、口腔癌、肝癌、胃癌、结肠癌、乳腺癌、肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头颈癌、宫颈癌、卵巢癌、大肠癌、小肠癌、直肠癌、输卵管癌、肛门周围癌、子宫内膜癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金病(Hodgkin's disease)、食道癌、淋巴瘤、膀胱癌、胆囊癌、内分泌癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、前列腺癌、慢性或急性白血病、淋巴细胞淋巴瘤、肾癌或输尿管癌、肾细胞癌、肾盂癌、中枢神经系统肿瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、脊髓瘤、脑干胶质瘤以及垂体腺瘤组成的组中的任一种。

[0107] 在一实例中,包含本发明的Fc结构域变体的抗体或其具有免疫活性的片段具有高Fc γ RIIIa结合选择性并具有高A/I比例,因此可以通过自然杀伤细胞(NK细胞)增加效应子作用来增加抗体介导的细胞毒性作用(antibody dependent cellular cytotoxicity,ADCC)。具有最强烈的癌细胞杀伤功效的自然杀伤细胞(NK细胞)不同于其他免疫细胞(例如,单核细胞(monocytes)、巨噬细胞(macrophages)、树突状细胞(dendritic cells)),在表面表达Fc γ RIIIa,并且不表达Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb以及Fc γ RIIB,因此包含具有本发明的Fc γ RIIIa结合选择性的Fc结构域变体的抗体或其具有免疫活性的片段可以通过NK细胞使癌细胞杀伤作用机制最大化。

[0108] 在一实例中,本发明的组合物还可以包含免疫原性细胞凋亡诱导剂,免疫原性细胞凋亡诱导剂可以为选自由蒽环类抗癌剂、紫杉烷类抗癌剂、抗EGFR抗体、BK通道激动剂、硼替佐米(Bortezomib)、强心苷(cardiac glycoside)、环磷酰胺类抗癌剂、GADD34/PP1抑制剂、LV-tSMAC、麻疹(Measles)病毒、博来霉素(bleomycin)、米托蒽醌(mitoxantrone)或奥沙利铂(oxaliplatin)组成的组中的一种以上,蒽环类抗癌剂可以为柔红霉素(daunorubicin)、阿霉素(doxorubicin)、表阿霉素(epirubicin)、伊达比星(idarubicin)、匹杉琼(pixantrone)、沙巴霉素(sabarubicin)或戊柔比星(valrubicin),紫杉烷类抗癌剂可以为紫杉醇(paclitaxel)或多西他赛(docetaxel)。

[0109] 将本发明的用于预防或治疗癌症的药物组合物与化学抗癌药物(抗癌剂)等一起给药,从而可以通过癌细胞杀伤效果来增加现有的抗癌剂的癌症治疗效果。联合给药可以与上述抗癌剂同时或依次进行。上述抗癌剂的例子包括:DNA烷化剂(DNA alkylating agents),如甲氯乙胺(mechloethamine)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、苯丙氨酸(phenylalanine)、氮芥(mustard)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、异环磷酰胺(ifosfamide)、卡莫司汀(carmustine:BCNU)、洛莫司汀(lomustine:CCNU)、链脲佐菌素(streptozotocin)、白消安(busulfan)、噻替哌(thiotepa)、顺铂(cisplatin)以及卡铂(carboplatin)等;抗癌抗生素(anti-cancer antibiotics),如放线菌素D(dactinomycin: actinomycin D)、普卡霉素(plicamycin)以及丝裂霉素C(mitomycin C)等;以及植物生物碱(plant alkaloids),如长春新碱(vincristine)、长春花碱(vinblastine)、依托泊苷(etoposide)、替尼泊甙(teniposide)、拓扑替康(topotecan)以及伊立替康(iridotecan)等,但不限于此。

[0110] 在本发明中,术语“预防”是指通过给药本发明的药物组合物来抑制或延缓癌症的发生、扩散以及复发的所有行为。

[0111] 本发明中所使用的术语“治疗”是指通过给药本发明的组合物使癌细胞凋亡或使癌症的症状好转或有益地改变的所有行为。只要是本发明所属领域的普通技术人员均可以通过参考韩国医药协会等提供的资料来了解本申请的组合物对其有效的疾病的标准并判断改善、提高以及治疗的程度。

[0112] 在本发明中,与有效成分结合使用的术语“治疗有效量”有效预防或治疗目标疾病的组合物的药学上可接受的盐的量,本发明的组合物的治疗有效量可以根据如给药方法、目标部位、患者的状态等而改变。因此,用于人体时的给药量应兼顾安全性以及效率性而确定适当量。也可以通过由动物实验确定的有效量来推定用于人类的量。当确定有效量时应考虑的这些事项记述于例如,Hardman and Limbird,eds.,Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics,10th ed. (2001),Pergamon Press;以及E.W.Martin ed.,Remington's Pharmaceutical Sciences,18th ed. (1990),Mack Publishing Co.中。

[0113] 本发明的药物组合物以药学上有效量给药。本发明中所使用的术语“药学上有效量”是指足以以可应用于医学治疗的合理的收益/风险比来治疗疾病而不引起副作用的程度的量,有效剂量水平可以取决于包括患者的健康状态、癌症的种类、严重程度、药物的活性、对药物的敏感性、给药方法、给药时间、给药途径及排泄率、治疗期间、联合或同时使用的药物在内的因素以及其他在医学领域公知的因素。本发明的组合物可以作为单独的治疗剂给药或与其他治疗剂联合给药,可以与现有的治疗剂依次或同时给药,可以单次或多次给药。考虑到上述所有因素,重要的是以最小的量获得最大效果而没有副作用的量进行给药,这可以有本领域的普通技术人员容易地确定。

[0114] 本发明的药物组合物还可以包含药学上可接受的添加剂,在此情况下,可以使用淀粉、糊化淀粉、微晶纤维素、乳糖、聚维酮、胶态二氧化硅、磷酸氢钙、乳糖、甘露醇、饴糖、阿拉伯树胶、预胶化淀粉、玉米淀粉、粉末纤维素、羟丙基纤维素、欧巴代、羧基乙酸淀粉钠、巴西棕榈蜡、合成硅酸铝、硬脂酸、硬脂酸镁、硬脂酸铝、硬脂酸钙、白糖、葡萄糖、山梨糖醇以及滑石粉等作为药学上可接受的添加剂。本优选地,相对于上述组合物,本发明的药学上

可接受的添加剂的含量为0.1重量份至90重量份,但不限于此。

[0115] 本发明的组合物还可以包含常用于生物制剂的载体、稀释剂、赋形剂或两种以上它们的组合。药学上可接受的载体只要是适合将组合物递送至体内的就没有特别的限制,例如,可以利用Merck Index, 13th ed., Merck&Co. Inc. 中记载的化合物、盐水、无菌水、林格氏液、缓冲盐水、葡萄糖溶液、麦芽糖糊精溶液、甘油、乙醇以及混合这些成分中1种成分以上的混合物,并且可以根据需求添加抗氧化剂、缓冲液、抑菌剂等其他常规的添加剂。并且,可以通过额外添加稀释剂、分散剂、表面活性剂、粘合剂以及润滑剂来配制成如水溶液、悬浮液、乳浊液等注射用剂型、药丸、胶囊、颗粒或片剂。另外,优选地,可以通过本领域的合适的方法或Remington's Pharmaceutical Science (Mack Publishing Company, Easton PA, 18th, 1990) 中公开的方法根据各疾病或成分进行配制。

[0116] 本发明的组合物可以根据所需的方法进行肠胃外给药(例如,用于静脉内、皮下、腹腔内或局部的注射剂型)或口服给药,给药量的范围根据患者的体重、年龄、性别、健康状况、饮食、给药时间、给药方法、排泄率以及疾病的严重程度而不同。本发明的组合物的一天给药量为0.0001 ~ 10mg/mL,优选为0.0001 ~ 5mg/mL,更优先地,可以一天一次或分数次给药。

[0117] 用于口服给药本发明的组合物的液体制剂包括混悬剂、内用液剂、乳剂、糖浆剂等,并且除了水或液体石蜡等常用的简单稀释剂以外还可以包含如润湿剂、甜味剂、芳香剂、保存剂等各种赋形剂。用于肠胃外给药的制剂包括无菌水溶液、非水溶液、混悬剂、乳剂、冻干制剂、栓剂等。

[0118] 在一方面,本发明涉及一种人抗体Fc结构域变体的制备方法,上述方法包括:步骤a),培养包含载体的宿主细胞,上述载体含有编码本发明的人抗体Fc结构域变体的核酸分子;以及步骤b),回收由宿主细胞表达的多肽。

[0119] 在一方面,本发明涉及一种对Fc γ 受体具有特异性的抗体的制备方法,上述方法包括:步骤a),培养包含载体的宿主细胞,上述载体含有编码本发明的抗体或其具有免疫活性的片段的核酸分子;以及步骤b),纯化从宿主细胞表达的抗体。

[0120] 在一实例中,抗体的纯化可以包括过滤、HPLC、阴离子交换或阳离子交换、高效液相色谱(HPLC)、亲和色谱或它们的组合优选地,可以采用利用蛋白A(Protein A)的亲和色谱。

[0121] 在一方面,本发明涉及一种包含本发明的Fc结构域变体的抗体或其具有免疫活性的片段在制备抗体治疗剂中的用途。

[0122] 在一方面,本发明涉及一种包含本发明的Fc结构域变体的抗体或其具有免疫活性的片段在预防或治疗癌症中的用途。

[0123] 在一方面,本发明涉及一种癌症治疗方法,上述方法包括将药学上有效量的包含本发明的Fc结构域变体的抗体或其具有免疫活性的片段给药到患有癌症的个体的步骤。

具体实施方式

[0124] 将通过下述实施例更详细地说明本发明。然而,下述实施例仅用于具体化本发明,本发明并不限于此。

[0125] 实施例1. 表达以及纯化靶物质

[0126] 为了发掘具有提高的对Fc γ RIIIa的选择性结合力的Fc变体、分析Fc变体的Fc γ Rs以及FcRn结合力,表达并纯化靶物质。具体地,制备pMAZ-hFc γ RIIIa-158V-链霉亲和素-His、pMAZ-hFc γ RIIb-链霉亲和素-His、pMAZ-hFc γ RIIIa-158V-GST、pMAZ-hFc γ RIIIa-158F-GST、pMAZ-hFc γ RIIb-GST以及pMAZ-hFcRn-GST的6种表达载体,将聚乙烯亚胺(PEI, polyethylenimine, Polyscience, 23966)和上述表达载体基因以4:1的比例混合在30ml的Freestyle 293表达(expression)培养液(Gibco, 12338-018)中并在常温下培养20分钟,然后转染至以 2×10^6 个细胞(cells)/ml的密度培养的Expi293F动物细胞,并在37°C、125rpm以及8%CO₂的条件下培养7天。培养后,以 $6000 \times g$ 离心15分钟来得到上清液,并将12.5ml的25 $\times$ PBS和30ml的上述培养上清液混合后用0.2 μ m的瓶顶过滤器(bottle top filter)(康宁(Corning), 430513)过滤。在分别转染过滤后的pMAZ-hFc γ RIIIa-158V-链霉亲和素-His以及pMAZ-hFc γ RIIb-链霉亲和素-His的培养液中添加500 μ l的Ni-NTA树脂(resin)(QIAGEN, 40724)并在4°C的温度下搅拌16小时,然后装入(packing)一次性聚丙烯柱(disposable polypropylene column)中以回收树脂。依次用100ml的PBS(pH7.4)、25ml的稀释到PBS中的10mM的咪唑(imidazole)缓冲液以及25ml的稀释到PBS中的20mM的咪唑缓冲液清洗,并用4ml的稀释到PBS中的250mM的咪唑缓冲液洗脱(elution)。并且,在分别转染过滤后的pMAZ-hFc γ RIIIa-158V-GST、pMAZ-hFc γ RIIIa-158F-GST、pMAZ-hFc γ RIIb-GST以及pMAZ-hFcRn-GST的培养液中添加500 μ l的GST树脂(Incosparm, 1101-3)并在4°C的温度下搅拌16小时,然后装入一次性聚丙烯柱中以回收树脂。用100ml的1 $\times$ PBS(pH7.4)清洗,并用4ml的稀释到1 $\times$ PBS中的50mM的Tris-HCl以及10mM的GSH缓冲液(pH8.0)洗脱。然后,利用Amicon Ultra-4离心过滤装置(centrifugal filter units)3K(默克密理博(Merck Millipore), UFC800324)将缓冲液更换为1 $\times$ PBS(pH7.4),结果,通过SDS-PAGE凝胶确认成功纯化高纯度的hFc γ RIIIa-158V-链霉亲和素-His、hFc γ RIIb-链霉亲和素-His、hFc γ RIIIa-158V-GST、hFc γ RIIIa-158F-GST、hFc γ RIIb-GST以及hFcRn-GST(图1)。其中,利用Alexa Fluor™ 647蛋白标记试剂盒(Protein Labeling Kit)(英杰公司(Invitrogen), A20173)将纯化的hFc γ RIIIa-158V-链霉亲和素-His制备成与Alexa647缀合(conjugated)的四聚体(tetrameric)的Fc γ RIIIa。

[0127] 实施例2. 制备用于分选具有提高的pH依赖性FcRn结合力以及Fc γ RIIIa结合选择性的Fc变体的酵母展示文库

[0128] 为了有效分选同时具有提高的pH依赖性FcRn结合力以及对Fc γ RIIIa的选择性结合力的Fc变体,制备总共12个模板,其在分别引入提高对FcRn的pH依赖性结合的Q311R/M428L、L309Y/Q311M/M428L、L309E/Q311M/M428L以及L309E/Q311W/M428L的抗体Fc序列中分别引入能够提高Fc γ RIIIa结合力的S239D、I332E以及S239D/I332E的突变,通过易错PCR(error-prone PCR)制备以整个Fc序列中0.68%的概率引入突变的DNA文库。通过利用微脉冲电穿孔仪(MicroPulser Electroporator)(伯乐(Bio-Rad), #1652100)的电穿孔法将总共24 μ g的所制备的DNA文库和8 μ g的编码作为用于酵母展示的酵母细胞壁锚定蛋白的Aga2蛋白以及转化选择标记基因(Trp1)的pCTCON载体一起递送到800 μ l的酵母种酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)感受态(Competent)细胞中,然后在500ml的缺乏色氨酸(tryptophan)的SD培养基[6.7g/l的Difco酵母氮基(Difco Yeast nitrogen base)(BD, 291940)、5.0g/l的细菌酪蛋白氨基酸(Bacto casamino acid)(BD, 223050)、5.4g/l的

Na_2HPO_4 (JUNSEI, 7558-79-4)、8.56g/l的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (SAMCHUN, 10049-21-5)以及20g/l的葡萄糖 (Glucose) (德山 (DUKSAN), 50-99-7)]中培养,从而使得仅选择性地存活转化的酵母种来制备总共 5.5×10^7 个抗体Fc的确保多样性的酵母展示文库 (图2)。

[0129] 实施例3.发掘具有提高的对Fc γ RIIIa的选择性结合力的Fc变体

[0130] 将所构建的酵母文库的 5.5×10^8 个细胞在100ml的缺乏色氨酸的SD培养基中以30°C的条件培养16小时,然后将 7×10^8 个细胞在100ml的缺乏色氨酸的SG培养基[6.7g/l的Difco酵母氮基 (Difco Yeast nitrogen base) (BD, 291940)、5.0g/l的细菌酪蛋白氨基酸 (Bacto casamino acid) (BD, 223050)、5.4g/l的 Na_2HPO_4 (JUNSEI, 7558-79-4)、8.56g/l的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (SAMCHUN, 10049-21-5)以及20g/l的半乳糖 (Galactose) (西格玛奥德里奇 (西格玛奥德里奇 (Sigma-Aldrich)), 59-23-4)]中以20°C的条件培养48小时来提高所展示的Fc文库的表达量。在所培养的细胞中,将 1×10^8 个细胞在4°C的温度下以 $14000 \times g$ 离心30秒后去除上清液,然后用1ml的PBSB (1×PBS、0.1%的牛血清白蛋白 (bovine serum albumin) (gibco, 30063-572)) (pH7.4)清洗,然后在1ml的稀释有40nM的Alexa488缀合蛋白A (conjugated Protein A)、10nM的Alexa647缀合四聚体Fc γ RIIIa (Alexa647 conjugated tetrameric Fc γ RIIIa)以及40nM的无荧光四聚体Fc γ RIIb的PBSB (pH7.4)中培养1小时。培养后,用1ml的PBSB (pH7.4)清洗,然后重悬于1ml的PBSB (pH7.4)中来诱导Alexa488缀合蛋白A (Protein A)、Alexa647缀合四聚体Fc γ RIIIa以及无荧光Fc γ RIIb的竞争性结合,然后通过流式细胞分选仪 (Bio-Rad S3 sorter, 伯乐 (Bio-Rad), #1451029)回收表现出高荧光信号的细胞。回收的子文库以相同方式降低Alexa647缀合四聚体Fc γ RIIIa的浓度或提高无荧光四聚体Fc γ RIIb的浓度,经过总共4轮的分选 (sorting) 过程,富集 (enrichment) 展示具有优异的对Fc γ RIIIa的选择性结合力的Fc变体的细胞 (图3以及图4), 通过从精选的最终子库中随机选择,最终获得了四种经过pH依赖性FcRn结合力和Fc γ RIIIa/Fc γ RIIb选择性结合力全面提升的Fc变体,分别是MFC2 (MFC2:L235P/V259I/Q311R/I332E/A378V/M428L)、MFC3 (S239D/H268L/Q311R/A330V/I332E/M428L)、MFC5 (S239D/K248M/H268L/L309E/Q311M/A330V/I332E/M428L) 和MFC6 (L235P/S239D/D270Y/S298G/Q311R/I332E/D356G/M428L) (图4以及表1)。

[0131] 表1

[0132]	变体名称	引入的突变
	MFC2	L235P/V259I/Q311R/I332E/A378V/M428L
	MFC3	S239D/H268L/Q311R/A330V/I332E/M428L
	MFC5	S239D/K248M/H268L/L309E/Q311M/A330V/I332E/M428L
	MFC6	L235P/S239D/D270Y/S298G/Q311R/I332E/D356G/M428L

[0133] 实施例4.表达以及纯化具有提高的Fc γ RIIIa选择性结合力的曲妥珠单抗Fc变体
 为了表达以及纯化分别包含上述实施例3中分选的3种Fc变体的曲妥珠单抗 (Trastuzumab) Fc变体,通过将作为4种曲妥珠单抗Fc变体的表达载体的pMAZ-曲妥珠单抗 (Trastuzumab) -HC-MFC2、pMAZ-曲妥珠单抗-HC-MFC3、pMAZ-曲妥珠单抗-HC-MFC5以及pMAZ-曲妥珠单抗-HC-MFC6、具有提高的对用作文库制备的模板的现有FcRn的pH依赖性结合的变体的突变以及具有提高的Fc γ RIIIa结合的DE变体的突变组合来制备引入曲妥珠单抗抗体的Fc区 (region) 的pMAZ-曲妥珠单抗-HC-Pfc29/DE (Pfc29/DE:S239D/Q311R/I332E/M428L)、pMAZ-

曲妥珠单抗-HC-YML/DE (YML/DE: S239D/L309Y/Q311M/I332E/M428L)、pMAZ-曲妥珠单抗-HC-EML/DE (EML/DE: S239D/L309E/Q311M/I332E/M428L) 以及pMAZ-曲妥珠单抗-HC-EWL/DE (EWL/DE: S239D/L309E/Q311W/I332E/M428L) 的4种表达载体。首先将每个变体的重链基因以及轻链基因以1:1的比例混合在3ml的Freestyle 293表达 (expression) 培养液 (Gibco, 12338-018) 中, 并以PEI: 变体基因=4:1的比例混合后在常温下静置20分钟, 并转染至前一天以 2×10^6 个细胞 (cells)/ml的密度传代培养的Expi293F细胞。然后, 在CO₂振荡培养箱中以37°C、125rpm以及8%CO₂的条件培养7天并以6000×g离心15分钟来收集上清液。然后, 混合30ml的所收集的培养上清液和1.25ml的25×PBS后用0.2μm的瓶顶过滤器 (康宁 (Corning) 430513) 过滤。在过滤后的培养液中添加100μl的蛋白A树脂 (Protein A resin) 并在4°C的温度下搅拌16小时, 然后装入一次性聚丙烯柱中以回收树脂。用5ml的1×PBS (pH7.4) 清洗并用3ml的100mM甘氨酸 (pH2.7) 缓冲液洗脱后, 利用1M的Tris-HCl (pH8.0) 中和。利用Amicon Ultra-4离心过滤装置 (centrifugal filter units) 3K (默克密理博 (Merck Millipore), UFC800324) 将缓冲液更换为1×PBS (pH7.4), 并通过SDS-PAGE凝胶确认成功纯化高纯度的抗体曲妥珠单抗-Fc变体 (图5)。

[0134] 实施例5. 分析曲妥珠单抗-Fc变体的FcRn结合力

[0135] 利用ELISA分析分别包含上述实施例4中表达以及纯化的Fc变体MFC2、MFC3、MFC5以及MFC6的曲妥珠单抗-Fc变体的pH依赖性人FcRn结合力。具体地, 在平底聚苯乙烯高结合96孔微孔板 (flat bottom polystyrene High Bind 96well microplate) (柯仕达 (Costar), 3590) 中将分别50μl的以4μg/ml的浓度稀释至0.05M的Na₂CO₃ (pH9.6) 中的HER2在4°C的温度下培养16小时并固定后, 用100μl的用1×PBS (pH7.4) 稀释的4%脱脂牛奶 (skim milk) (GenomicBase, SKI400) 在常温下封闭2小时。用150μl的0.05% PBST (pH7.4) 清洗4次后, 将在用1×PBS (pH7.4) 稀释的1%脱脂牛奶中以20μg/ml的浓度稀释的曲妥珠单抗Fc变体以50μl的量接种于每孔中并在常温下反应1小时。用100μl的0.05% PBST (pH6.0/pH7.4) 清洗4次后, 将以1μg/ml的浓度稀释于用1×PBS稀释的1%脱脂牛奶 (pH6.0/pH7.4) 中的hFcRn-GST以50μl的量接种于每孔中并在常温下反应1小时。用100μl的0.05% PBST清洗4次后, 利用50μl的稀释于用1×PBS稀释的1%脱脂牛奶 (pH6.0/pH7.4) 中的抗GST-HRP缀合物 (conjugate) (GE医疗 (GE Healthcare), RPN1236V) 在常温下分别进行1小时的抗体反应, 并用100μl的0.05% PBST (pH6.0/pH7.4) 清洗4次。分别添加50μl的1-Step Ultra TMB-ELISA底物溶液 (substrate solution) (赛默飞世尔科技公司 (Thermo Fisher Scientific), 34028) 来显色后, 分别添加50μl的2M H₂SO₄来终止反应, 并利用Epoch微孔板分光光度计 (Epoch microplate spectrophotometer) (BioTek) 分析吸光度。结果, 确认到与野生型曲妥珠单抗或引入DE (S239D/I332E) 变体的曲妥珠单抗-Fc变体相比, 包含本发明的Fc变体的4种曲妥珠单抗变体 (曲妥珠单抗-Fc变体) 对hFcRn的依赖性结合与pH7.4时相比在pH6.0时显著提高 (图6)。并且, 确认到即使与分别引入本发明人研发的PFc29 (Q311R/M428L)、YML (L309Y/Q311M/M428L)、EML (L309E/Q311M/M428L)、EWL (L309E/Q311W/M428L)、PFc29/DE、YML/DE、EML/DE以及EWL/DE变体的曲妥珠单抗-Fc变体相比, 所有4种曲妥珠单抗变体对hFcRn的pH依赖性与pH7.4时相比在pH6.0时显著提高 (图6)。

[0136] 实施例6. 分析曲妥珠单抗-Fc变体对Fc γ Rs的结合力

[0137] 进行ELISA分析, 以确认分别包含Fc变体MFC2、MFC3、MFC5以及MFC6的曲妥珠单抗-

Fc变体对Fc γ Rs的结合力。具体地,将分别50 μ l的以4 μ g/ml的浓度稀释至0.05MNa₂CO₃ (pH9.6)中的HER2在平底聚苯乙烯高结合96孔微孔板(flat bottom polystyrene High Bind 96well microplate) (柯仕达 (Costar), 3590) 中在4°C的温度下培养16小时并固定后,用100 μ l的用1 $\times$ PBS (pH7.4) 稀释的4%脱脂牛奶(GenomicBase, SKI400) 在常温下封闭2小时。用150 μ l的0.05%PBST (1 $\times$ PBS、0.05%吐温20 (Tween 20) (西格玛奥德里奇 (Sigma-Aldrich), P1379-1L) (pH7.4) 清洗4次后,将以20 μ g/ml的浓度稀释于用1 $\times$ PBS (pH7.4) 稀释的1%脱脂牛奶中的曲妥珠单抗-Fc变体以50 μ l的量接种于每孔中并在常温下反应1小时。用100 μ l的0.05%PBS清洗4次后,将以1 μ g/ml的浓度稀释于用1 $\times$ PBS (pH7.4) 稀释的1%脱脂牛奶中的hFc γ Rs-GST (hFc γ RIIIa-158V-GST、hFc γ RIIIa-158F-GST或hFc γ RIIb-GST) 分别以50 μ l的量接种于每孔中并在常温下培养1小时。用100 μ l的0.05%PBST (pH7.4) 清洗4次后,利用50 μ l的抗GST-HRP缀合物(GE医疗 (GE Healthcare), RPN1236V) 在常温下进行1小时的抗体反应,并用100 μ l的0.05%PBST (pH7.4) 清洗4次。分别添加50 μ l的1-Step Ultra TMB-ELISA底物溶液(substrate solution) (赛默飞世尔科技公司 (Thermo Fisher Scientific), 34028) 来显色后,分别添加50 μ l的2M H₂SO₄来终止反应,然后利用Epoch微孔板分光光度计(Epoch microplate spectrophotometer) (BioTek) 分析吸光度。

[0138] 结果,确认到与分别引入PFc29、YML、EML以及EWL变体的曲妥珠单抗-Fc变体以及野生型曲妥珠单抗相比,所有4种分别包含本发明的Fc变体MFc2、MFc3、MFc5以及MFc6的曲妥珠单抗-Fc变体对hFc γ RIIIa-158V的结合力以及对hFc γ RIIIa-158F的结合力均显著提高,并且确认到与分别引入本发明人的现有的DE、PFc29/DE、YML/DE、EML/DE以及EWL/DE变体的曲妥珠单抗-Fc变体相比,所有4种本发明的曲妥珠单抗-Fc变体具有显著提高的对hFc γ RIIIa-158V的结合力以及对hFc γ RIIIa-158F的结合力(图7)。并且,已知DE以及PFc29与野生型曲妥珠单抗相比显著提高对作为抑制免疫细胞活性的受体的Fc γ RIIb的结合力,PFc29、YML、EML以及EWL为本发明人以往研发的具有提高的pH依赖性FcRn结合力的Fc变体,即使与分别引入DE、PFc29以及将PFc29、YML、EML、EWL和DE组合的PFc29/DE、YML/DE、EML/DE以及EWL/DE变体的曲妥珠单抗-Fc变体相比,所有4种本发明的曲妥珠单抗-Fc变体均表现出与DE以及野生型曲妥珠单抗相比显著减少的Fc γ RIIb结合力(图7)。因此,确认到与DE、PFc29、YML、EML以及EWL变体相比,在本发明中确保的4种Fc变体与Fc γ RIIb相比的Fc γ RIIIa选择性结合力显著提高。

[0139] 实施例7. 分析曲妥珠单抗-Fc变体对Fc γ RIIIa的结合力

[0140] 为了确认分别包含本发明的MFc2 (L235P/V259I/Q311R/I332E/A378V/M428L)、MFc3 (S239D/H268L/Q311R/A330V/I332E/M428L)、MFc5 (S239D/K248M/H268L/L309E/Q311M/A330V/I332E/M428L) 以及MFc6 (L235P/S239D/D270Y/S298G/Q311R/I332E/D356G/M428L) 的Fc变体的4种曲妥珠单抗变体对Fc γ RIIIa的定量结合力,利用Octet R8 (赛多利斯 (Sartorius)) 仪器以及Octet Ni-NTA (NTA) 生物传感器(Biosensors) (赛多利斯 (Sartorius), 18-5101) 进行生物层干涉测量法(Biolayer Interferometry, BLI) 分析。具体地,在96孔板的孔中添加200 μ l的去离子水并插入生物传感器以水合10分钟。然后,将分别200 μ l的去离子水、以4 μ g/ml的浓度稀释于1 $\times$ PBS (pH7.4) 中的hFc γ RIIIa-158V-链霉亲和素-His或hFc γ RIIIa-158F-链霉亲和素-His以及以2倍连续稀释至1000nM至15.6nM的对照组或曲妥珠单抗-Fc变体按顺序接种于96孔板的每排孔中以组成样品板,然后将生物传

感器以及样品板放入Octet R8仪器中,将生物传感器与去离子水反应60秒(基线(baseline))、与hFc γ RIIIa反应300秒(加载/loading)、与1 $\times$ PBS (pH7.4)反应120秒(基线(baseline))、与曲妥珠单抗-Fc变体反应90秒(结合(association))以及与1 $\times$ PBS (pH7.4)反应150秒(解离(dissociation))来测定结合力。

[0141] 结果,确认到与Xencor公司的曲妥珠单抗-DE (S239D/I332E) 相同地,与具有野生型Fc的曲妥珠单抗相比,本发明的曲妥珠单抗Fc变体(曲妥珠单抗-MFc2、曲妥珠单抗-MFc3、曲妥珠单抗-MFc5以及曲妥珠单抗-MFc6)对hFc γ RIIIa-158V以及hFc γ RIIIa-158Fdp的结合力显著提高,尤其,与Xencor公司的DE相比,曲妥珠单抗-MFc2变体对hFc γ RIIIa-158V以及hFc γ RIIIa-158Fdp的结合力分别提高14.1倍以及23.4倍,并且确认到与Xencor公司的DE相比,曲妥珠单抗-MFc3或曲妥珠单抗-MFc6对hFc γ RIIIa-158V以及hFc γ RIIIa-158F的结合力显著提高(图8)。

[0142] 实施例8.分析突变具有提高的pH依赖性FcRn结合力以及Fc γ RIIIa选择性结合力的原因

[0143] 8-1.表达以及纯化仅引入新型突变的曲妥珠单抗-Fc变体

[0144] 为了确认本发明的4种Fc变体具有的显著提高的pH依赖性FcRn结合特性以及与Fc γ RIIb相比的Fc γ RIIIa选择性结合特性是否归因于现有的具有提高的pH依赖性FcRn结合的突变以及具有提高的Fc γ RIIIa结合的突变(DE),在本发明中发掘的3种曲妥珠单抗-Fc变体中,将每个已知的具有提高的pH依赖性FcRn结合的突变以及已知的具有提高的Fc γ RIIIa结合的DE变体突变再次取代为各自的野生型(表2)来制备仅引入新型突变的3种表达载体pMAZ-曲妥珠单抗-HC-MFc3-PFc29/DE(-) (MFc3-PFc29/DE(-):H268L/A330V),pMAZ-曲妥珠单抗-HC-MFc5-EML/DE(-) (MFc5-EML/DE(-):K248M/H268L/A330V)以及pMAZ-曲妥珠单抗-HC-MFc6-PFc29/DE(-) (MFc6-PFc29/DE(-):L235P/D270Y/S298G/D356G)。首先将每个变体的重链基因以及轻链基因以1:1的比例混合在3ml的Freestyle 293表达(expression)培养液(Gibco,12338-018)中,并以PEI:变体基因=4:1的比例混合后在常温下静置20分钟,并转染至前一天以 2×10^6 个细胞(cells)/ml的密度传代培养的Expi293F细胞。然后,在CO₂振荡培养箱中以37°C、125rpm以及8%CO₂的条件培养7天并以6000 $\times$ g离心15分钟来仅收集上清液。然后,混合30ml的所收集的培养上清液和1.25ml的25 $\times$ PBS后用0.2 μ m的瓶顶过滤器(康宁(Corning) 430513)过滤。在过滤后的培养液中添加100 μ l的蛋白A树脂(Protein A resin)并在4°C的温度下搅拌16小时,然后装入一次性聚丙烯柱中以回收树脂。用5ml的1 $\times$ PBS (pH7.4)清洗并用3ml的100mM甘氨酸(pH2.7)缓冲液洗脱后,利用1M的Tris-HCl (pH8.0)中和。利用Amicon Ultra-4离心过滤装置(centrifugal filter units) 3K(默克密理博(Merck Millipore),UFC800324)将缓冲液更换为1 $\times$ PBS (pH7.4),并通过SDS-PAGE凝胶确认成功纯化高纯度的抗体曲妥珠单抗-Fc变体(图9)。

[0145] 表2

[0146]	变体名称	引入的突变
	MFc3-PFc29/DE(-)	H268L/A330V
	MFc5-EML/DE(-)	K248M/H268L/A330V
	MFc6-PFc29/DE(-)	L235P/D270Y/S298G/D356G

[0147] 8-2.确认对Fc γ Rs的结合力

[0148] 进行ELISA分析,以确认分别包含本发明的MFc3 (S239D/H268L/Q311R/A330V/I332E/M428L)、MFc5 (S239D/K248M/H268L/L309E/Q311M/A330V/I332E/M428L) 以及MFc6 (L235P/S239D/D270Y/S298G/Q311R/I332E/D356G/M428L)Fc变体的曲妥珠单抗变体以及分别包含仅引入新型突变的MFc3-PFc29/DE (-) (H268L/A330V)、MFc5-EML/DE (-) (K248M/H268L/A330V) 以及MFc6-PFc29/DE (-) (L235P/D270Y/S298G/D356G)的曲妥珠单抗变体对Fc γ Rs的结合力。具体地,将分别50 μ l的以4 μ g/ml的浓度稀释至0.05MNa₂CO₃ (pH9.6) 中的HER2在平底聚苯乙烯高结合96孔微孔板(flat bottom polystyrene High Bind 96well microplate) (柯仕达(Costar), 3590) 中在4°C的温度下培养16小时并固定后,用100 μ l的用1 $\times$ PBS (pH7.4) 稀释的4%脱脂牛奶(GenomicBase, SKI400) 在常温下封闭2小时。用150 μ l的0.05%PBST(1 $\times$ PBS、0.05%吐温20(Tween 20) (西格玛奥德里奇(Sigma-Aldrich), P1379-1L)) (pH7.4) 清洗4次后,将以20 μ g/ml的浓度稀释于用1 $\times$ PBS (pH7.4) 稀释的1%脱脂牛奶中的曲妥珠单抗-Fc变体分别以50 μ l的量接种于每孔中并在常温下反应1小时。用100 μ l的0.05%PBS清洗4次后,将以1 μ g/ml的浓度或0.1 μ g/ml的浓度稀释于用1 $\times$ PBS (pH7.4) 稀释的1%脱脂牛奶中的hFc γ Rs-GST(hFc γ RIIIa-158V-GST、hFc γ RIIIa-158F-GST或hFc γ RIIb-GST) 分别以50 μ l的量接种于每孔中并在常温下反应1小时。用100 μ l的0.05%PBST (pH7.4) 清洗4次后,利用50 μ l的抗GST-HRP缀合物(GE医疗(GE Healthcare), RPN1236V) 在常温下进行1小时的抗体反应,并用100 μ l的0.05%PBST (pH7.4) 清洗4次。分别添加50 μ l的1-Step Ultra TMB-ELISA底物溶液(substrate solution) (赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific), 34028) 来显色后,分别添加50 μ l的2MH₂SO₄来终止反应,然后利用Epoch微孔板分光光度计(Epoch microplate spectrophotometer) (BioTek) 分析吸光度。结果,确认到与作为本发明的曲妥珠单抗-Fc变体的曲妥珠单抗-MFc3、曲妥珠单抗-MFc5以及曲妥珠单抗-MFc6相比,所有仅引入新型突变的3种曲妥珠单抗-Fc变体对hFc γ RIIIa-158V、hFc γ RIIIa-158F以及Fc γ RIIb的结合力显著减少(图10)。由此可知,本发明的Fc变体具有的显著提高的对hFcRn的pH依赖性结合特性以及与Fc γ RIIb相比的对Fc γ RIIIa的选择性结合特性是通过引入每个变体的突变起到组合作用而形成的。

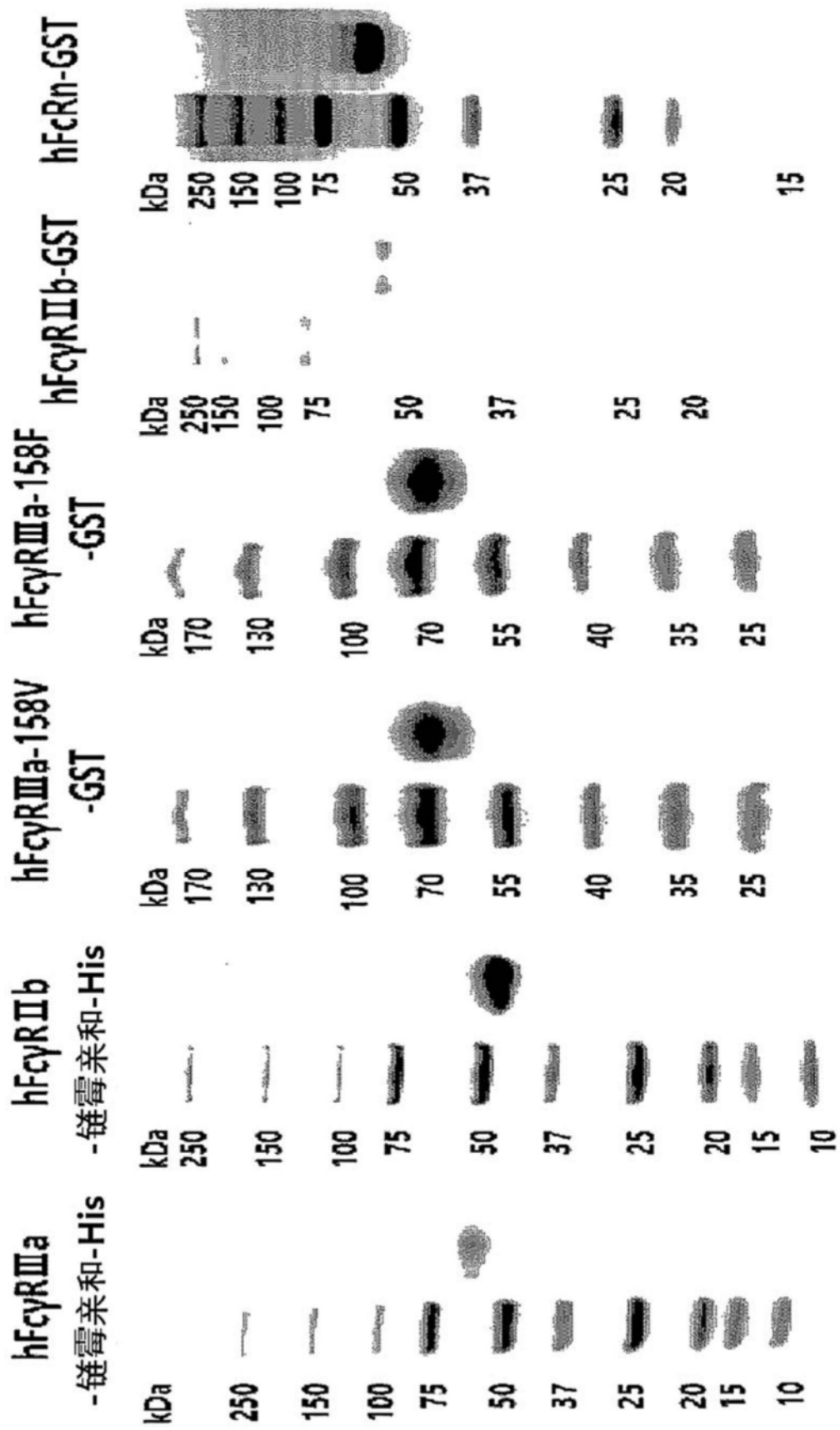


图1

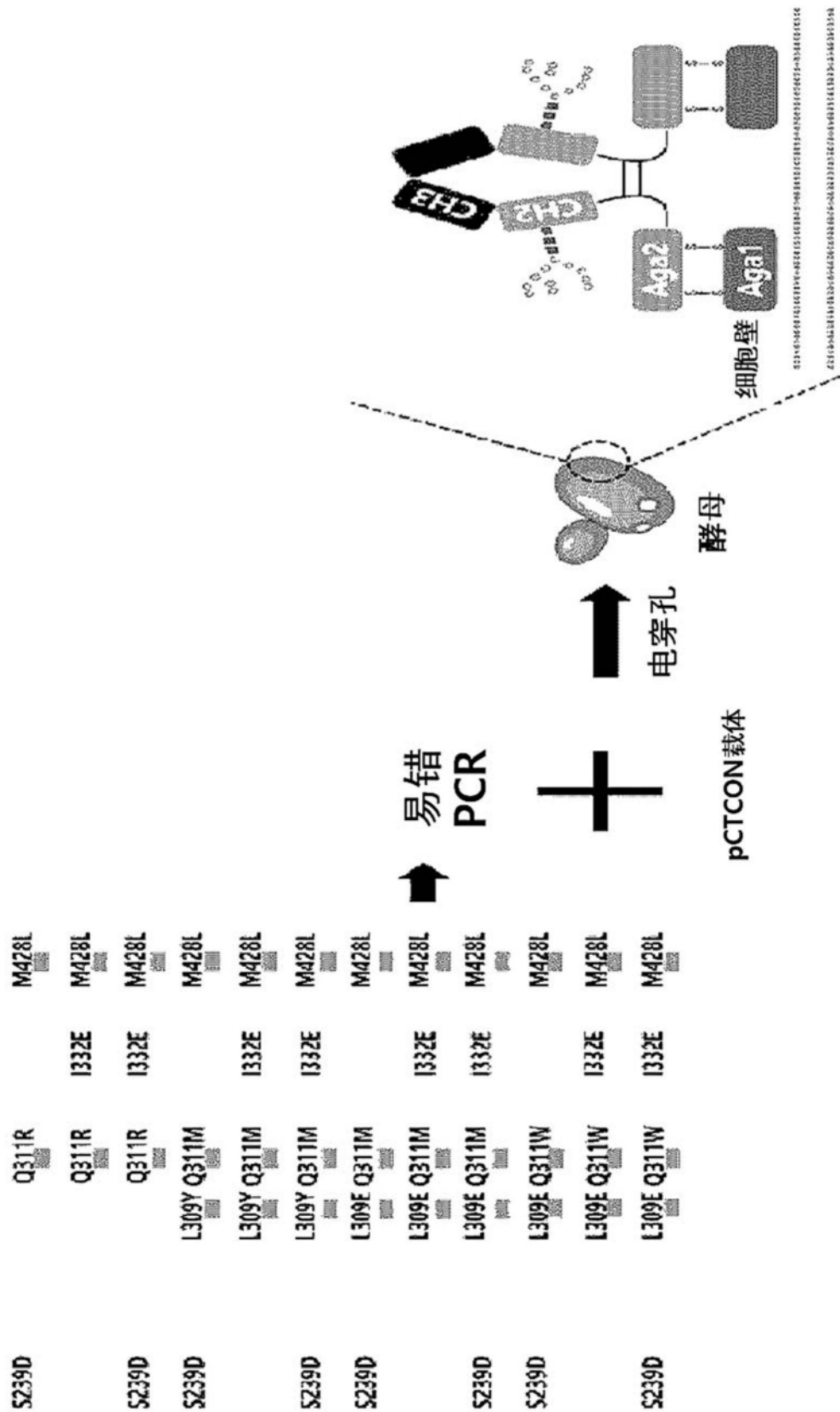


图2

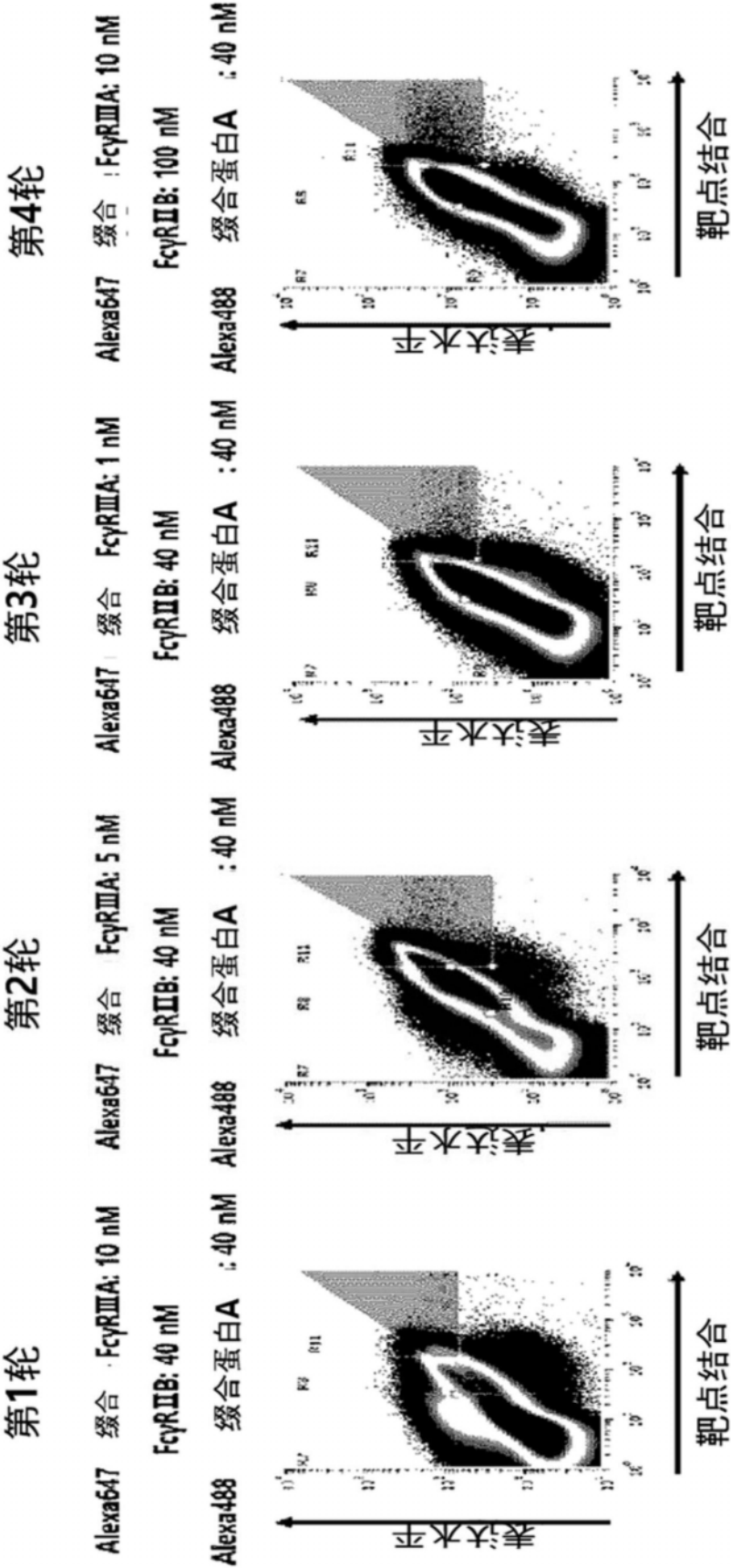


图3

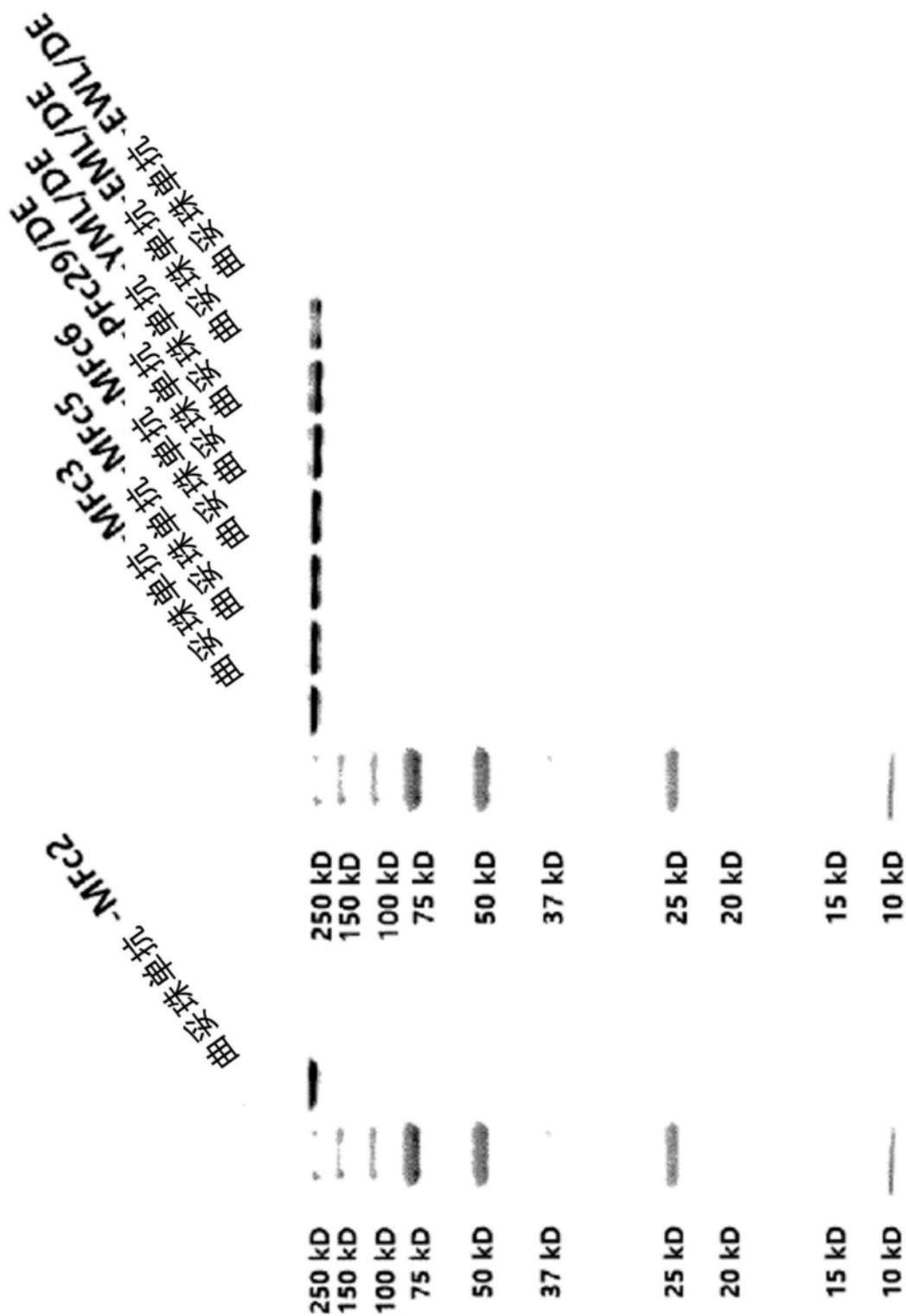


图5

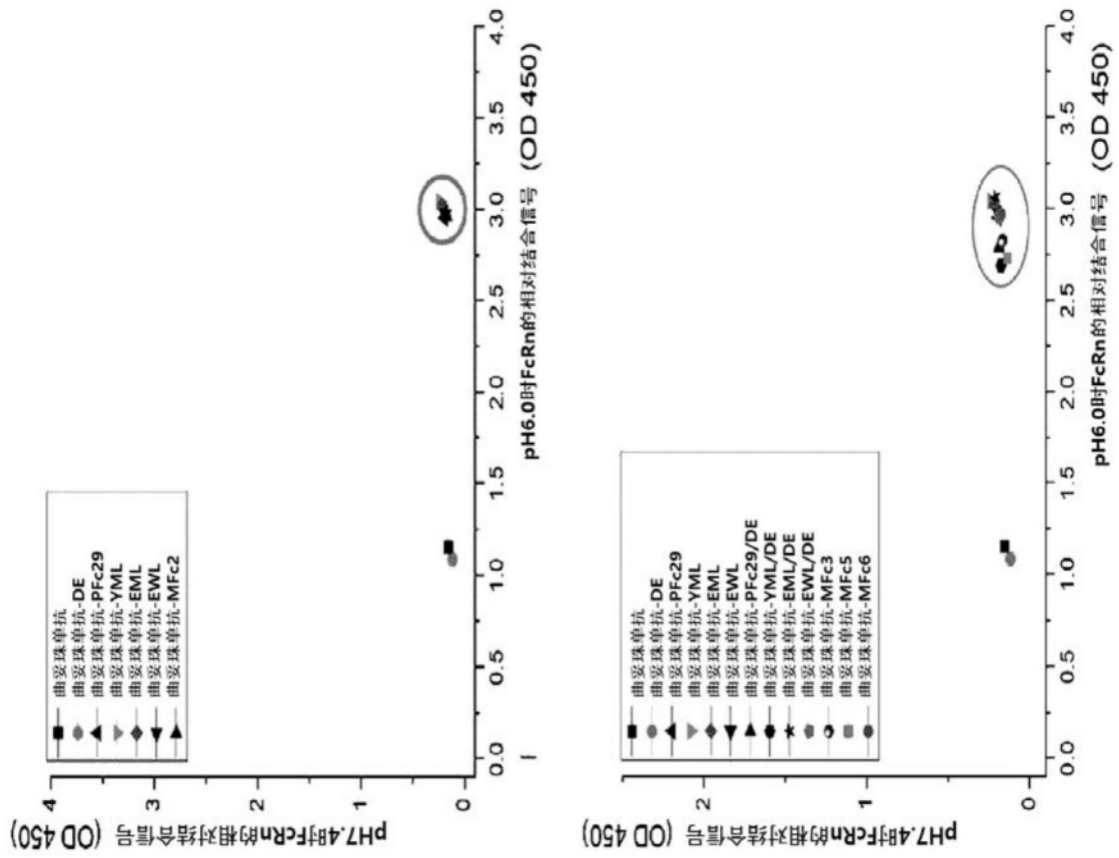


图9

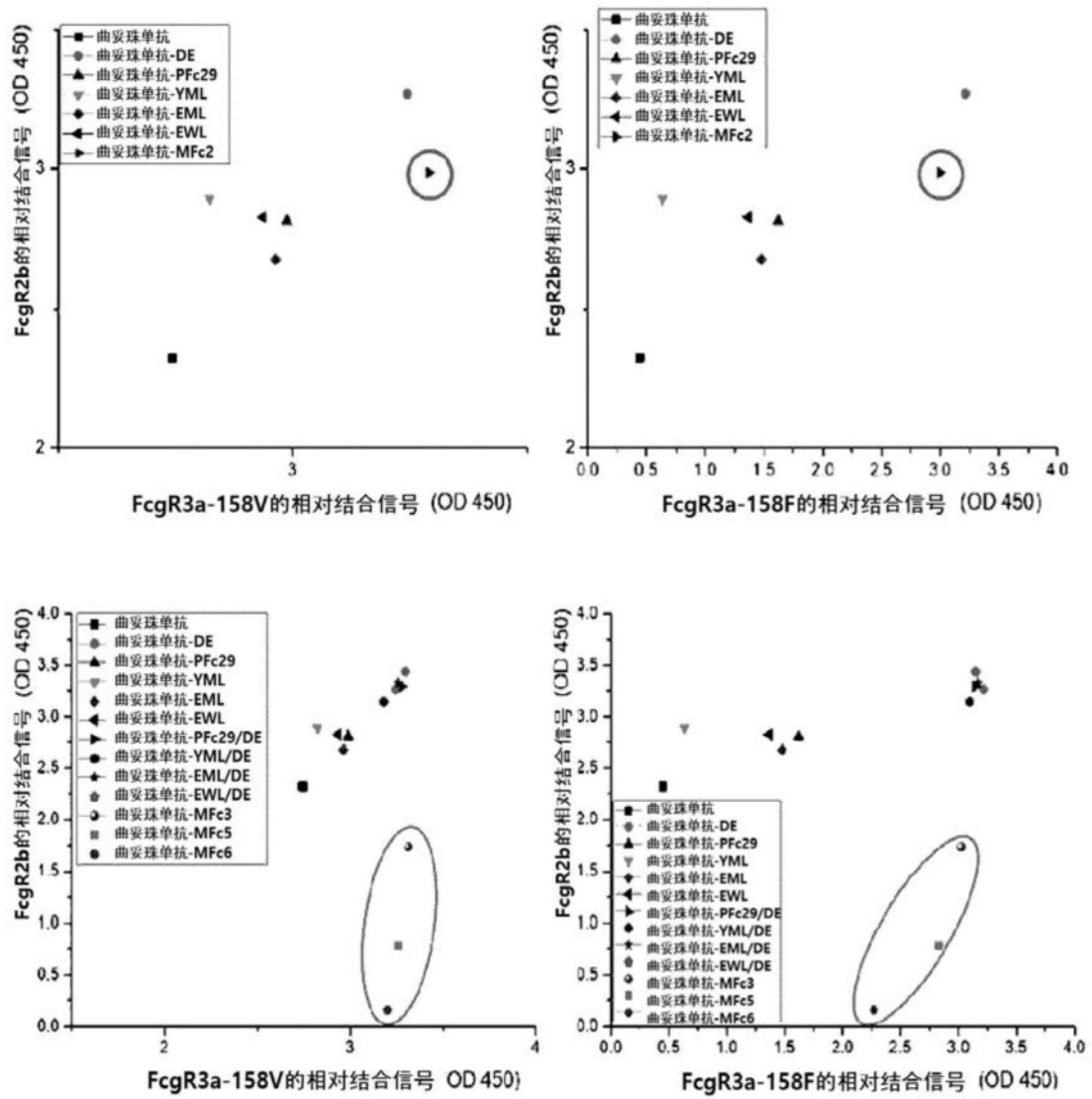


图7

	hFcγRIIIa-158V					hFcγRIIIa-158F				
	KD (M)	Kon (1/Ms)	Kdis (1/s)	Full R^2	KD (M)	Kon (1/Ms)	Kdis (1/s)	Full R^2		
曲妥珠单抗	9.04E-07	9.04E-07	4.68E-03	0.9952	1.33E-06	6.66E+03	8.84E-03	0.9889		
曲妥珠单抗-DE	4.65E-08	2.71E+04	1.26E-03	0.9968	6.73E-08	2.72E+04	1.83E-03	0.997		
曲妥珠单抗-MFc2	6.39E-08	4.42E+04	2.83E-03	0.988	5.68E-08	5.65E+04	3.20E-03	0.9847		
曲妥珠单抗-MFc3	3.24E-08	2.69E+04	8.72E-04	0.9982	3.85E-08	3.57E+04	1.37E-03	0.9953		
曲妥珠单抗-MFc5	8.50E-08	2.89E+04	2.45E-03	0.994	7.56E-08	3.79E+04	2.86E-03	0.9892		
曲妥珠单抗-MFc6	2.89E-08	3.16E+04	9.13E-04	0.9983	2.99E-08	3.73E+04	1.12E-03	0.9979		

图8

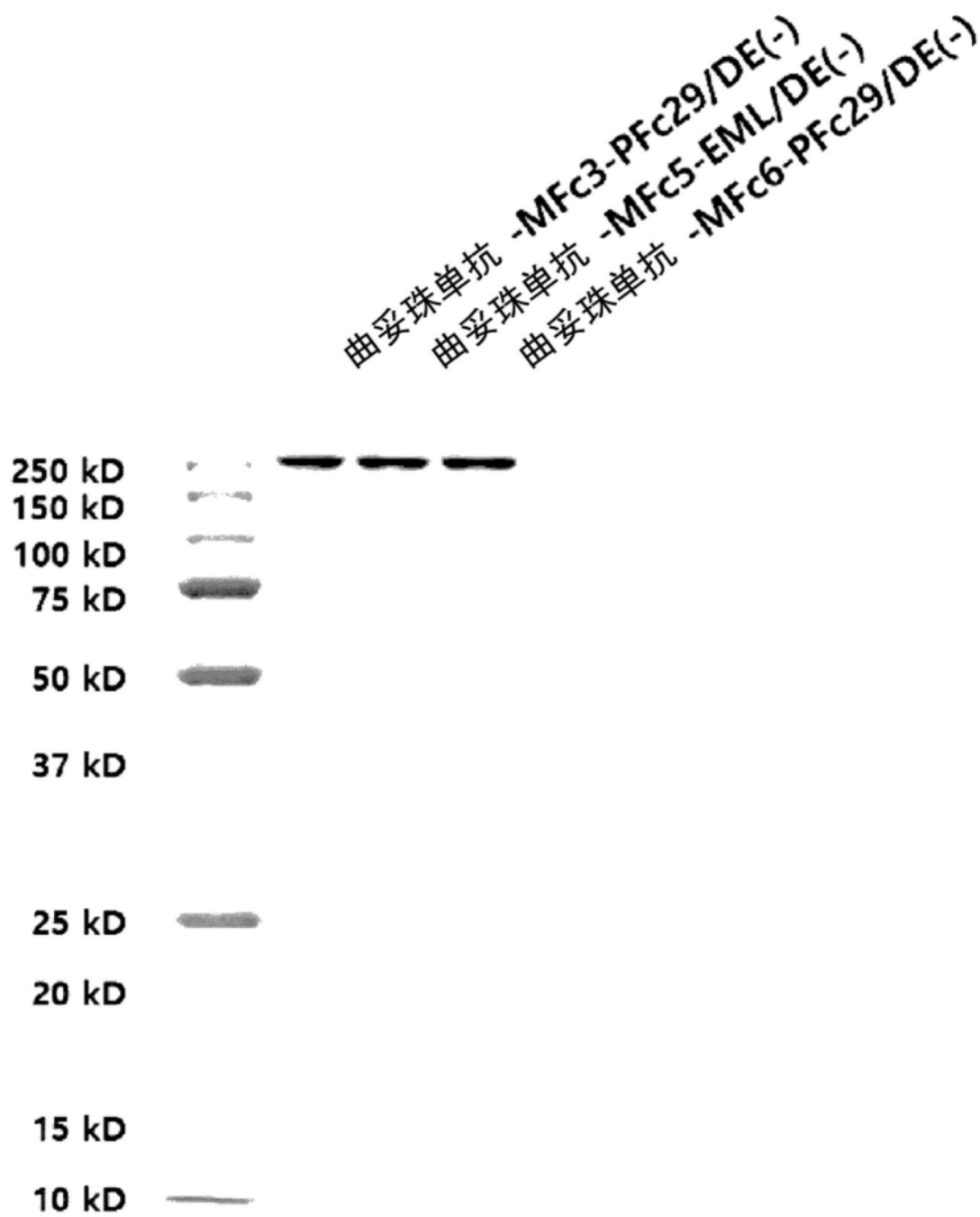


图9

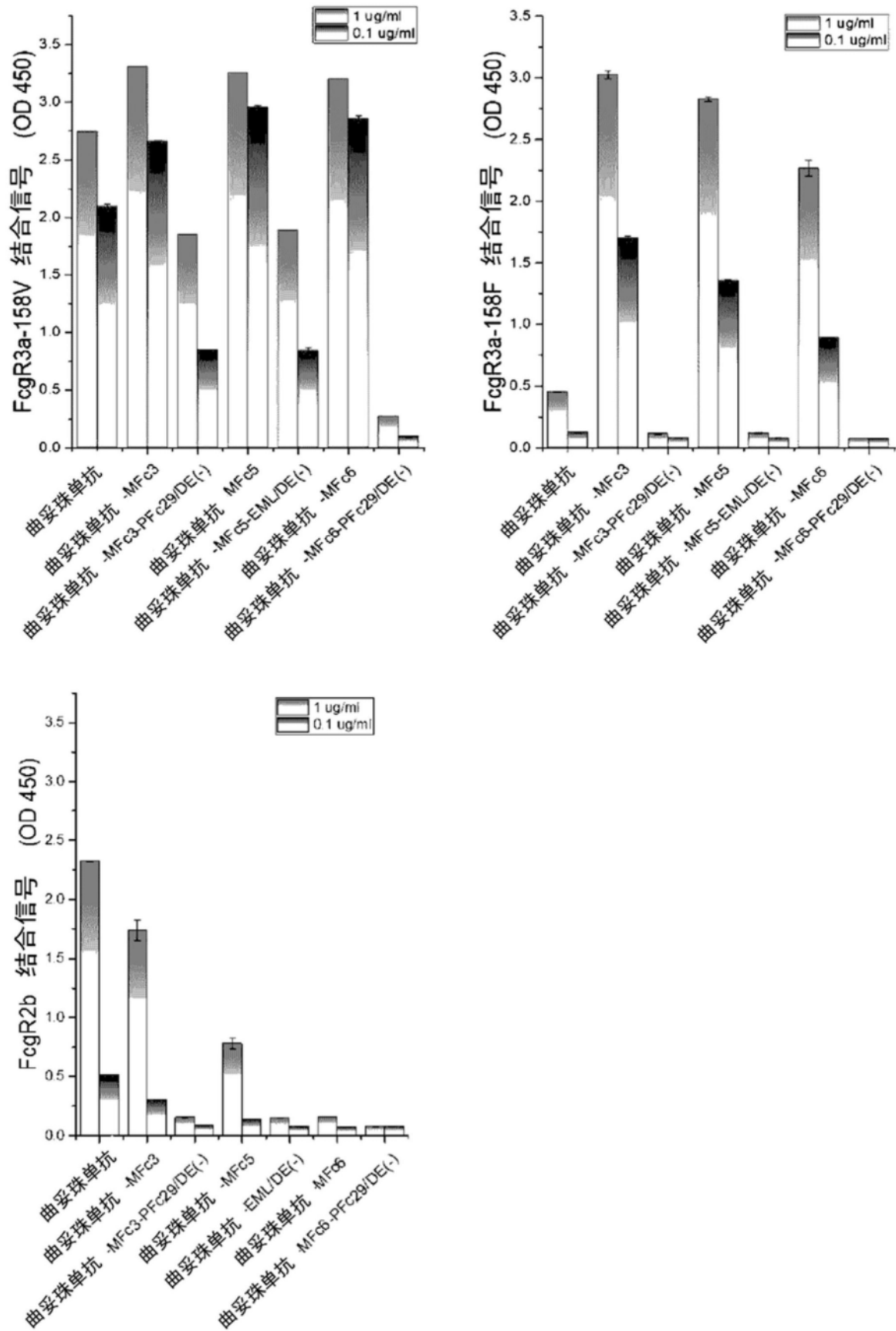


图10