



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 117295760 A

(43) 申请公布日 2023. 12. 26

(21) 申请号 202280033488.0

(22) 申请日 2022.05.06

(66) 本国优先权数据

202110495363.7 2021.05.07 CN

202210436873.1 2022.04.25 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.11.07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2022/091187 2022.05.06

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/233320 ZH 2022.11.10

(71) 申请人 信达生物制药(苏州)有限公司

地址 215123 江苏省苏州市苏州工业园区
东平街168号

(72) 发明人 付凤根 周帅祥 吴志海

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

专利代理师 陈迎春 黄革生

(51) Int.Cl.

C07K 16/00 (2006.01)

(54) 发明名称

与Fc受体结合改变的Fc突变体

(57) 摘要

涉及经过修饰的具有降低的与Fc γ R或C1q结合的免疫球蛋白恒定区 (Fc) 突变分子, 该分子可以在机体内显著降低不期望的ADCC和/或ADCP和/或CDC效应子功能。此外, 还涉及上述Fc突变分子的用途、包含所述突变分子的融合蛋白以及其用途。

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(10) 国际公布号

WO 2022/233320 A1

(43) 国际公布日
2022 年 11 月 10 日 (10.11.2022)

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/00 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
C12N 9/16 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/091187

(22) 国际申请日: 2022 年 5 月 6 日 (06.05.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202110495363.7 2021年5月7日 (07.05.2021) CN
202210436873.1 2022年4月25日 (25.04.2022) CN

(71) 申请人: 信达生物制药(苏州)有限公司 (INNOVENT BIOLOGICS (SUZHOU) CO., LTD.)
[CN/CN]; 中国江苏省苏州市苏州工业园区东平街168号, Jiangsu 215123 (CN)。

(72) 发明人: 付凤根 (FU, Fenggen); 中国江苏省苏州市苏州工业园区东平街168号, Jiangsu 215123 (CN)。周帅祥 (ZHOU, Shuaixiang); 中国江苏省苏州市苏州工业园区东平街168号, Jiangsu 215123 (CN)。吴志海 (WU, Zhihai); 中国江苏省苏州市苏州工业园区东平街168号, Jiangsu 215123 (CN)。

(74) 代理人: 北京市中咨律师事务所 (ZHONGZI LAW OFFICE); 中国北京市西城区平安里西大街26号新时代大厦7层, Beijing 100034 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(54) Title: FC MUTANT WITH ALTERED BINDING TO FC RECEPTOR

(54) 发明名称: 与Fc受体结合改变的Fc突变体

(57) Abstract: The present invention relates to a modified immunoglobulin constant region (Fc) mutant molecule having reduced binding to FcγR or C1q. The molecule can significantly reduce undesired ADCC and/or ADCP and/or CDC effector function in vivo. In addition, the present invention relates to a use of the Fc mutant molecule, a fusion protein comprising the mutant molecule and a use thereof.

(57) 摘要: 涉及经过修饰的具有降低的与FcγR或C1q结合的免疫球蛋白恒定区(Fc)突变分子, 该分子可以在机体内显著降低不期望的ADCC和/或ADCP和/或CDC效应子功能。此外, 还涉及上述Fc突变分子的用途、包含所述突变分子的融合蛋白以及其用途。



WO 2022/233320 A1

与 Fc 受体结合改变的 Fc 突变体

技术领域

本发明总体上涉及免疫学和抗体工程领域，具体而言，本发明涉及 IgG 免疫球蛋白的变体，其制备方法及其应用。

背景技术

随着近年来治疗性抗体的开发，研究人员一方面不断探索寻找新的靶标，一方面对成药性抗体进行不断的升级改造，以努力提高或增强其有益效果，其中研究的焦点之一集中在对抗体 Fc 区的改造。

众所周知，虽然抗体的 Fc 区无抗原结合活性，但是却是抗体与细胞表面 Fc 受体相互作用的部位，因此对抗体的效应子功能发挥至关重要的作用，Fc 区通过与不同的 Fc 受体的相互作用，使得抗体可以发挥多种效应子功能，例如抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用（ADCC）、抗体依赖的细胞吞噬作用（ADCP）、补体依赖性细胞毒性（CDC）。关于 ADCC、ADCP、CDC 效应子功能，对于识别表达在肿瘤细胞或病原体上的抗原并以清除恶性细胞为目标的抗体而言，有效甚至强化的 ADCC、ADCP、CDC 效应子功能有利于抗体的治疗效果，然而对于针对例如表达在 T 细胞上的抗原以阻断细胞表面受体/细胞因子或者免疫调节为目标的抗体而言，则往往需要降低的甚至消除的 ADCC、ADCP、CDC 效应子功能，因为靶向细胞表面抗原的抗体可对免疫细胞诱发不必要的免疫刺激以及相关的效应子功能及补体活化，从而产生不利后果，这一点特别是对于需要目标细胞低损耗的免疫检查点抑制剂抗体，尤其重要。

人 IgG 亚类（IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4）具有不同的免疫功能，例如不同亚类的 IgG 抗体具有不同的 ADCC 活性，相比较于其他亚类，IgG1 和 IgG3 具有较强的 ADCC 活性；IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 具有抗体依赖细胞吞噬作用（ADCP）。由于治疗性抗体和 Fc 融合构建体往往需要靶向和活化或中和靶配体功能区，但又不能破坏或损害所需的局部细胞或组织，因此在实际生

产应用中，一直存在渴望降低或者消除 Fc 效应子功能（例如降低或者消除 ADCC 和/或 ADCP 活性、降低或者消除 CDC 活性）的 Fc 突变体的实际需求，本申请满足了这种需求。

据已有文献报道，Fc 区的部分氨基酸突变可能产生降低或者消除 ADCC 和/或 ADCP 活性、降低或者消除 CDC 活性的效果，例如，XENCOR 的专利家族 US8734791B2、US10183999B2、US8883147B2，Roche 的专利家族 CN103476795B 等，多数能够达到降低 ADCC、CDC 活性的效果，然而，能够达到完全消除 ADCC 和 CDC 效应的突变较为少见，本申请通过对野生型 Fc 氨基酸序列进行定向改造，获得了能够完全消除 ADCC 和 CDC 效应的 Fc 突变分子。

发明概述

本发明提供了经过修饰的免疫球蛋白恒定区（Fc 区）的突变分子，其可用于工程化改造抗体或抗体类治疗剂。

通过在 Fc 区包含本申请公开的突变和/或其组合，使得与包含野生型 Fc 区的分子相比，包含本申请突变 Fc 区的抗体、抗体类治疗剂以及包含突变 Fc 区的其他分子与 FcγR 或 C1q 的结合作用极大降低，从而在机体内显著降低不期望的 ADCC 和/或 ADCP 和/或 CDC 效应子功能。进一步地，本申请公开的 Fc 突变并没有影响包含本申请突变 Fc 区的抗体、抗体类治疗剂以及包含突变 Fc 区的其他分子与 FcRn 的结合能力，因而并不影响相应分子的半衰期。因此，本申请提供了携带特定突变的 Fc 区多肽分子、具有降低或者消除的 ADCC 和/或 ADCP 和/或 CDC 效应子功能，但仍保留了结合 FcRn 的能力的包含上文所述突变 Fc 区的抗体分子或类似结构分子。

第一方面，本申请提供了具有不同修饰的 Fc 突变体，与野生型 Fc 区相比，该 Fc 突变体显示降低的与 Fc 受体和/或 C1q 的亲合力，进而降低或者消除该 Fc 突变体诱导的 ADCC、CDC 和 ADCP 效应子功能。在一个实施方案中，Fc 突变体诱导的 ADCC、CDC 和 ADCP 效应子功能降低至相应野生型 Fc 所诱导的 ADCC、CDC 和 ADCP 效应子功能的至少 80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、2%、1%或完全消除。

在一个实施方案中，本申请提供的 Fc 突变体包含一个或者多个氨基酸缺失。在一个具体实施方案中，本申请提供的 Fc 突变体包含依据 Kabat 中的 EU 索引编号的第 329 位氨基酸的缺失 ($\Delta 329$)。在一个具体实施方案中，本申请提供的 Fc 突变体与相应野生型 Fc 的区别在于依据 Kabat 中的 EU 索引编号的第 329 位的缺失 ($\Delta 329$)。在另一个具体实施方案中，本申请提供的 Fc 突变体包含依据 Kabat 中的 EU 索引编号的第 329 位和第 330 位氨基酸的缺失 ($\Delta 329$ 和 $\Delta 330$)。在一个具体实施方案中，本申请提供的 Fc 突变体与相应野生型 Fc 的区别在于依据 Kabat 中的 EU 索引编号的第 329 位和第 330 位氨基酸的缺失 ($\Delta 329$ 和 $\Delta 330$)。

在一个实施方案中，本申请提供的 Fc 突变体包含一个或者多个氨基酸取代。在一个具体实施方案中，本申请提供的 Fc 突变体包含依据 Kabat 中的 EU 索引编号的第 234 位和/或第 235 位氨基酸的取代，其中采用 A、V、L、I 分别取代第 234 位的 L、V、F 和/或第 235 位的 L。在一个优选的实施方案中，所述 Fc 突变体包含 L234A+L235A、V234A 或 F234A+L235A。在一个具体实施方案中，本申请提供的 Fc 突变体与相应野生型 Fc 的区别在于 L234A+L235A、V234A 或 F234A+L235A。

在一个实施方案中，本申请提供的 Fc 突变体包含一个或者多个氨基酸缺失和一个或多个氨基酸取代。在一个具体实施方案中，本申请提供的 Fc 突变体包含依据 Kabat 中的 EU 索引编号的第 329 位氨基酸的缺失和第 330 位的取代，其中采用 G、D 或者 Q 对第 330 位进行取代。在一个优选的实施方案中，所述 Fc 突变体包含 $\Delta 329$ +A330G 或 $\Delta 329$ +S330G。在一个具体实施方案中，本申请提供的 Fc 突变体与相应野生型 Fc 的区别在于 $\Delta 329$ +A330G 或 $\Delta 329$ +S330G。

在一个具体实施方案中，本申请提供的 Fc 突变体包含依据 Kabat 中的 EU 索引编号的第 329 位氨基酸的缺失和第 234 位和第 235 位氨基酸的取代，其中采用 A、V、L、I 分别取代第 234 位的 L、V、F 和/或第 235 位的 L。在一个优选的实施方案中，所述 Fc 突变体包含 L234A+L235A+ $\Delta 329$ 、V234A+ $\Delta 329$ 或 F234A+L235A+ $\Delta 329$ 。在一个具体实施方案中，本申请提供的 Fc

突变体与相应野生型 Fc 的区别在于 L234A+L235A+ Δ 329、V234A+ Δ 329 或 F234A+L235A+ Δ 329。

在另一个具体实施方案中，本申请提供的 Fc 突变体包含依据 Kabat 中的 EU 索引编号的第 329 位和第 330 位氨基酸的缺失以及第 234 位和第 235 位氨基酸的取代，其中采用 A、V、L、I 分别取代第 234 位的 L、V、F 和/或第 235 位的 L。在一个优选的实施方案中，所述 Fc 突变体包含 L234A+L235A+ Δ 329+ Δ 330、V234A+ Δ 329+ Δ 330 或 F234A+L235A+ Δ 329+ Δ 330。在一个具体实施方案中，本申请提供的 Fc 突变体与相应野生型 Fc 的区别在于 L234A+L235A+ Δ 329+ Δ 330、V234A+ Δ 329+ Δ 330 或 F234A+L235A+ Δ 329+ Δ 330。

在另一个具体实施方案中，本申请提供的 Fc 突变体包含依据 Kabat 中的 EU 索引编号的第 329 位氨基酸的缺失和第 234 位、235 位、330 位氨基酸的取代，其中采用 A、V、L、I 分别取代第 234 位的 L、V、F 和/或第 235 位的 L，采用 G、D 或者 Q 对第 330 位进行取代。在一个优选的实施方案中，所述 Fc 突变体包含 L234A+L235A+A330G+ Δ 329、L234A+L235A+S330G+ Δ 329、V234A+L235A+A330G+ Δ 329、V234A+L235A+S330G+ Δ 329、F234A+L235A+S330G+ Δ 329 或 F234A+L235A+A330G+ Δ 329。在一个具体实施方案中，本申请提供的 Fc 突变体与相应野生型 Fc 的区别在于 L234A+L235A+A330G+ Δ 329、L234A+L235A+S330G+ Δ 329、V234A+L235A+A330G+ Δ 329、V234A+L235A+S330G+ Δ 329、F234A+L235A+S330G+ Δ 329 或 F234A+L235A+A330G+ Δ 329。

在一些实施方案中，本发明提供的 Fc 突变体为 IgG1 型 Fc 突变体，与相应的野生型 Fc 区相比，所述突变体具有降低甚至消除的结合 Fc γ R 的能力。在另一些实施方案中，本发明提供的 Fc 突变体为 IgG2、IgG3、IgG4 型 Fc 突变体，与相应的野生型 Fc 区相比，所述突变体具有降低甚至消除的结合 Fc γ R 的能力。优选地，本发明提供的 Fc 突变体保留了与 FcRn 的结合能力。

本申请公开的 Fc 突变体可以作为一个平台构件，应用于任何需要降低甚至消除 ADCC/ADCP/CDC 效应子功能的场景中，例如应用于任何类型的期望降低甚至消除 ADCC/ADCP/CDC 效应子功能的抗体分子中，具有类似抗体结构的分子中。

在一个实施方案中，所述 Fc 突变体基本上基于 IgG 序列，在一个优选的

实施方案中，所述 Fc 突变体基本上基于人 IgG 序列，在另一个实施方案中，所述 Fc 突变体基本上基于人 IgG1 序列。

在另一个实施方案中，所述 Fc 突变体还可以包含其他修饰，例如现有技术中已知的用于降低免疫原性、提高稳定性、溶解性、功能和临床益处的其他修饰。

在一个具体的实施方案中，Fc 突变体包含如下序列：

1) SEQ ID NO :2 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列，或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列，或者由该序列组成，或

2) SEQ ID NO :3 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列，或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列，或者由该序列组成，或

3) SEQ ID NO :4 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列，或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列，或者由该序列组成，或

4) SEQ ID NO :5 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列，或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列，或者由该序列组成，或

5) SEQ ID NO :6 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列，或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列，或者由该序列组成，或

6) SEQ ID NO :7 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列，或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列，或者由该序列组成，或

7) SEQ ID NO :8 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列，或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列，或者由该序列组成，或

8) SEQ ID NO :11 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列，或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列，或者由该序列组成，或

9) SEQ ID NO :12 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列，或者与

该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列，或者由该序列组成，或

10) SEQ ID NO :13 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列，或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列，或者由该序列组成，或

11) SEQ ID NO :14 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列，或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列，或者由该序列组成，或

12) SEQ ID NO :15 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列，或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列，或者由该序列组成，或

13) SEQ ID NO :16 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列，或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列，或者由该序列组成，或

14) SEQ ID NO :17 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列，或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列，或者由该序列组成，或

15) SEQ ID NO :19 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列，或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列，或者由该序列组成，或

16) SEQ ID NO :20 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列，或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列，或者由该序列组成，或

17) SEQ ID NO :21 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列，或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列，或者由该序列组成，或

18) SEQ ID NO :22 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列，或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列，或者由该序列组成，或

19) SEQ ID NO :23 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列，或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列，或者由该序列组成，或

20) SEQ ID NO :24 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列，或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列，或者由该序列组成，或

21) SEQ ID NO :25 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列，或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列，或者由该序列组成，或

22) SEQ ID NO :27 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列，或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列，或者由该序列组成，或

23) SEQ ID NO :28 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列，或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列，或者由该序列组成，或

24) SEQ ID NO :29 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列，或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列，或者由该序列组成，或

25) SEQ ID NO :30 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列，或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列，或者由该序列组成，或

26) SEQ ID NO :31 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列，或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列，或者由该序列组成，或

27) SEQ ID NO :32 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列，或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列，或者由该序列组成，或

28) SEQ ID NO :33 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列，或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列，或者由该序列组成。

第二个方面，本发明提供了包含第一方面所述 Fc 突变体的多肽，与包含野生型 Fc 区的多肽相比，所述多肽具有降低或消除的 ADCC 和/或 ADCP 和

/或 CDC 效应子功能,优选地,所述多肽不引起 ADCC 和/或 ADCP 和/或 CDC 效应。在一个具体实施方案中,所述多肽同时具有延长的半衰期。在一个实施方案中,包含第一方面所述 Fc 突变体的多肽诱导的 ADCC、CDC 和 ADCP 效应子功能降低至包含相应野生型 Fc 的多肽所诱导的 ADCC、CDC 和 ADCP 效应子功能的至少 80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、2%、1%或完全消除。

在一些实施方案中,所述多肽是抗体分子,优选地,所述抗体分子是 IgG 类抗体分子。在另一个实施方案中,所述抗体分子是多特异性抗体(例如,双特异性抗体)、人源化抗体、嵌合抗体、抗体融合体。与相应的野生型抗体分子相比,本申请获得的包含所述 Fc 突变体的抗体分子与 Fc γ R 的能力得到降低甚至消除,因此具有降低或消除的 ADCC 和/或 ADCP 和/或 CDC 效应子功能。

在一些实施方案中,所述多肽是融合蛋白,其包含与 Fc 突变体有效连接的一个或者多个融合配偶体,所述融合配偶体通常可以为任何蛋白质或小分子,例如任何抗体的可变区、受体的靶结合区、粘附分子、配体、酶、细胞因子、趋化因子、或一些其他的蛋白或蛋白结构域。在一个实施方案中,所述融合蛋白例如是免疫粘附素。

在一个实施方案中,本申请提供包含 Fc 突变体的 IgG 抗体,其包含依据 Kabat 中的 EU 索引编号的第 329 位氨基酸的缺失($\Delta 329$)。在另一个具体实施方案中,本申请提供包含 Fc 突变体的 IgG 抗体,其包含依据 Kabat 中的 EU 索引编号的第 329 位和第 330 位氨基酸的缺失($\Delta 329$ 和 $\Delta 330$)。

在一个实施方案中,本申请提供包含 Fc 突变体的 IgG 抗体,其包含依据 Kabat 中的 EU 索引编号的第 234 位和/或第 235 位氨基酸的取代,其中采用 A、V、L、I 分别取代第 234 位的 L、V、F 和/或第 235 位的 L。在一个优选的实施方案中,所述 IgG 抗体包含 L234A+L235A、V234A 或 F234A+L235A。

在一个实施方案中,本申请提供包含 Fc 突变体的 IgG 抗体,其包含依据 Kabat 中的 EU 索引编号的第 329 位氨基酸的缺失和第 330 位的取代,其中采用 G、D 或者 Q 对第 330 位进行取代。在一个优选的实施方案中,所述 IgG 抗体包含 $\Delta 329$ +A330G 或 $\Delta 329$ +S330G。

在一个实施方案中,本申请提供包含 Fc 突变体的 IgG 抗体,其包含依据 Kabat 中的 EU 索引编号的第 329 位氨基酸的缺失和第 234 位和第 235 位氨基

酸的取代, 其中采用 A、V、L、I 分别取代第 234 位的 L、V、F 和/或第 235 位的 L。在一个优选的实施方案中, 所述 IgG 抗体包含 L234A+L235A+ Δ 329、V234A+ Δ 329 或 F234A+L235A+ Δ 329。

在一个实施方案中, 本申请提供包含 Fc 突变体的 IgG 抗体, 其包含依据 Kabat 中的 EU 索引编号的第 329 位和第 330 位氨基酸的缺失以及第 234 位和第 235 位氨基酸的取代, 其中采用 A、V、L、I 分别取代第 234 位的 L、V、F 和/或第 235 位的 L。在一个优选的实施方案中, 所述 IgG 抗体包含 L234A+L235A+ Δ 329+ Δ 330、V234A+ Δ 329+ Δ 330 或 F234A+L235A+ Δ 329+ Δ 330。

在一个实施方案中, 本申请提供包含 Fc 突变体的 IgG 抗体, 其包含依据 Kabat 中的 EU 索引编号的第 329 位氨基酸的缺失和第 234 位、235 位、330 位氨基酸的取代, 其中采用 A、V、L、I 分别取代第 234 位的 L、V、F 和/或第 235 位的 L, 采用 G、D 或者 Q 对第 330 位进行取代。在一个优选的实施方案中, 所述 IgG 抗体包含 L234A+L235A+A330G+ Δ 329、L234A+L235A+S330G+ Δ 329、V234A+L235A+A330G+ Δ 329、V234A+L235A+S330G+ Δ 329、F234A+L235A+S330G+ Δ 329 或 F234A+L235A+A330G+ Δ 329。

在一些实施方案中, 本发明提供的 IgG 抗体为 IgG1 型抗体, 与相应的野生型抗体相比, 所述抗体具有降低甚至消除的结合 Fc γ R 的能力。在另一些实施方案中, 本发明提供的 IgG 抗体为 IgG2、IgG3、IgG4 型抗体, 与相应的野生型抗体相比, 所述抗体具有降低甚至消除的结合 Fc γ R 的能力。优选地, 本发明提供的抗体保留了与 FcRn 的结合能力。

在一些实施方案中, 所述抗体分子是抗 claudin18.2 的 IgG 抗体。

在一个具体的实施方案中, 本发明提供的包含 Fc 突变体的 IgG 抗体包含如下的重链和轻链:

- 1) 包含 SEQ ID NO :2 所示的重链和 SEQ ID NO :9 所示的轻链; 或
- 2) 包含 SEQ ID NO :3 所示的重链和 SEQ ID NO :9 所示的轻链; 或
- 3) 包含 SEQ ID NO :4 所示的重链和 SEQ ID NO :9 所示的轻链; 或
- 4) 包含 SEQ ID NO :5 所示的重链和 SEQ ID NO :9 所示的轻链; 或
- 5) 包含 SEQ ID NO :6 所示的重链和 SEQ ID NO :9 所示的轻链; 或
- 6) 包含 SEQ ID NO :7 所示的重链和 SEQ ID NO :9 所示的轻链; 或

- 7) 包含 SEQ ID NO :8 所示的重链和 SEQ ID NO :9 所示的轻链；或
- 8) 包含 SEQ ID NO : 11 所示的重链和 SEQ ID NO :9 所示的轻链；或
- 9) 包含 SEQ ID NO : 12 所示的重链和 SEQ ID NO :9 所示的轻链；或
- 10) 包含 SEQ ID NO : 13 所示的重链和 SEQ ID NO :9 所示的轻链；或
- 11) 包含 SEQ ID NO : 14 所示的重链和 SEQ ID NO :9 所示的轻链；或
- 12) 包含 SEQ ID NO : 15 所示的重链和 SEQ ID NO :9 所示的轻链；或
- 13) 包含 SEQ ID NO : 16 所示的重链和 SEQ ID NO :9 所示的轻链；或
- 14) 包含 SEQ ID NO : 17 所示的重链和 SEQ ID NO :9 所示的轻链；或
- 15) 包含 SEQ ID NO : 19 所示的重链和 SEQ ID NO :9 所示的轻链；或
- 16) 包含 SEQ ID NO : 20 所示的重链和 SEQ ID NO :9 所示的轻链；或
- 17) 包含 SEQ ID NO : 21 所示的重链和 SEQ ID NO :9 所示的轻链；或
- 18) 包含 SEQ ID NO : 22 所示的重链和 SEQ ID NO :9 所示的轻链；或
- 19) 包含 SEQ ID NO : 23 所示的重链和 SEQ ID NO :9 所示的轻链；或
- 20) 包含 SEQ ID NO : 24 所示的重链和 SEQ ID NO :9 所示的轻链；或
- 21) 包含 SEQ ID NO : 25 所示的重链和 SEQ ID NO :9 所示的轻链；或
- 22) 包含 SEQ ID NO : 27 所示的重链和 SEQ ID NO :34 所示的轻链；或
- 23) 包含 SEQ ID NO : 28 所示的重链和 SEQ ID NO :34 所示的轻链；或
- 24) 包含 SEQ ID NO : 29 所示的重链和 SEQ ID NO :34 所示的轻链；或
- 25) 包含 SEQ ID NO : 30 所示的重链和 SEQ ID NO :34 所示的轻链；或
- 26) 包含 SEQ ID NO : 31 所示的重链和 SEQ ID NO :34 所示的轻链；或
- 27) 包含 SEQ ID NO : 32 所示的重链和 SEQ ID NO :34 所示的轻链；或
- 28) 包含 SEQ ID NO : 33 所示的重链和 SEQ ID NO :34 所示的轻链。

在另一个实施方案中，本申请提供的包含所述 Fc 突变体的多肽（例如抗体）在 Fc 区还可以包含其他修饰，例如现有技术中已知的用于降低多肽（例如抗体）免疫原性、增加半衰期、提高稳定性、溶解性、功能和临床益处的其他修饰。

在另一个实施方案中，本申请提供的包含所述 Fc 突变体的抗体具有现有技术已知的针对不同靶抗原的重链可变区和轻链可变区。本领域技术人员可以容易地将现有技术中已知的重链可变区和轻链可变区接枝到本申请公开的 Fc 突变体上，从而获得具有期望特性（例如降低或消除的 ADCC 和/或 ADCP

和/或 CDC 效应子功能) 的抗体变体。

第三方面, 本发明提供了一种药物组合物, 其包含第二方面所述的多肽及可药用载体。在一个实施方案中, 所述药物组合物包含携带本发明所述 Fc 突变体的抗体分子。在一个实施方案中, 所述药物组合物包含携带本发明所述 Fc 突变体的 IgG 抗体。在另一个实施方案中, 所述药物组合物包含携带本发明所述 Fc 突变体的 IgG1 型抗体、IgG2 型抗体、IgG3 型抗体或 IgG4 型抗体。

第四方面, 本发明提供了根据本申请所述 Fc 区修饰减少或者消除抗体的 ADCC/ADCP/CDC 效应子功能, 且保留甚至提高半衰期的方法。在一个实施方案中, 通过对需要减少或者消除 ADCC/ADCP/CDC 效应子功能的抗体 Fc 区进行如本申请所公开的一种或者多种修饰, 从而减少或者消除抗体的 ADCC/ADCP/CDC 效应子功能。

第五方面, 本发明提供了 Fc 突变体在制备药物中的用途。在一个实施方案中, 所述药物用于免疫治疗, 辅助免疫治疗。在一个实施方案中, 所述药物具有降低或消除的 ADCC/ADCP/CDC 效应子功能作用。在一个具体的实施方案中, 例如所述药物是包含本申请 Fc 突变体的融合蛋白, 例如是 IL-2 Fc 融合蛋白。在另一个具体的实施方案中, 例如所述药物是包含本申请 Fc 突变体的靶向免疫细胞表面分子的抗体, 其具有降低或消除的 ADCC/ADCP/CDC 效应子功能作用。在另一个实施方案中, 所述药物用于治疗受试者中的肿瘤, 例如在一个实施方案中, 所述药物在不激活 ADCC/ADCP/CDC 作用且半衰期延长的情况下激活患者的免疫细胞, 从而达到抗肿瘤的效果。

第六方面, 本发明提供了治疗受试者疾病的方法, 包括将有效量的包含本申请所述 Fc 突变体的针对相应疾病的药物组合物施用给受试者。在一个实施方案中, 所述疾病是需要免疫治疗或者免疫辅助治疗的疾病。对于靶向细胞表面分子的抗体, 特别是免疫细胞上的抗体, 消除效应子功能是有利的。在一个实施方案中, 本发明提供了治疗受试者疾病的方法, 包括将有效量的包含本申请所述 Fc 突变体的针对相应免疫细胞上的抗原的抗体施用给受试

者。

第七方面，本发明提供了一种试剂盒，其包含本申请公开的 Fc 突变体、包含所述 Fc 突变体的多肽或者包含所述 Fc 突变体的免疫球蛋白分子。在一个实施方案中，本发明提供了一种检测试剂盒，通过将功能分子（如酶、抗原、受体、配体、细胞因子等）与 Fc 融合后，不仅可以提高融合蛋白的稳定性，还可以应用于流式细胞、免疫组化、体外活性检测和蛋白质微阵列检测等非临床领域。

本申请提供的携带具体 Fc 突变的抗体分子具有降低或者消除的 ADCC、ADCP 和 CDC 效应子功能，但仍保留了结合 FcRn 的能力，因此可以作为改良型抗体突变体，不仅提高了抗体的疗效，还确保了抗体的安全性，稳定性和低免疫原性。令人惊奇地发现，将 Fc 区的第 329 位脯氨酸残基缺失将显著降低 Fc 区与受体 FcγRIII、FcγRII、FcγRI、C1q 的结合、由此显著降低或消除 ADCC、ADCP 和 CDC 活性。此外，Fc 区的 Pro329 与例如选自 A330 缺失、A330G、L234A 和 L235A 中一种或者多种的组合突变导致显著降低与受体 FcγRIII、FcγRII、FcγRI、C1q 的结合，并由此显著降低或消除 ADCC、ADCP 和 CDC 活性。

附图说明：

图 1：人 IgG1 Fc 与人 CD16A 的晶体结构（PDB:3SGJ）。

图 2：显示了本发明的 Fc 突变体与各种 FcγR 结合的情况，图 2a：Fc 突变体与 CD16A(F176)的结合曲线（pH 7.4）；图 2b：Fc 突变体与 CD16A(V176)的结合曲线（pH 7.4）；图 2c：Fc 突变体与 CD16B(NA1)的结合曲线（pH 7.4）；图 2d：Fc 突变体与 CD16B(NA2)的结合曲线（pH 7.4）；图 2e：Fc 突变体与 CD32A (H167)的结合曲线（pH 7.4）；图 2f：Fc 突变体与 CD32A (R167)的结合曲线（pH 7.4）；图 2g：Fc 突变体与 CD32B 的结合曲线（pH 7.4）；图 2h：Fc 突变体与 CD64 的结合曲线（pH 7.4）；图 2i：Fc 突变体与 FcRn 在 pH6.0 的结合曲线；图 2j：Fc 突变体与 FcRn 在 pH 7.0 的结合曲线；图 2k. Fc 突变体与 C1q 的结合与解离曲线。

图 3 显示了基于生物膜薄层干涉技术测定的 Fc 突变体与各种 FcγR 结合的情况，其中溶液中包含 200nM 的抗体。图 3a：Fc 突变体与 CD16A(V176)

的结合曲线(pH 7.4);图 3b:Fc 突变体与 CD16A(F176)的结合曲线(pH 7.4);图 3c: Fc 突变体与 CD16B(NA1)的结合曲线 (pH 7.4) ;图 3d: Fc 突变体与 CD16B(NA2)的结合曲线 (pH 7.4) ;图 3e: Fc 突变体与 CD32A (H167)的结合曲线 (pH 7.4) ;图 3f: Fc 突变体与 CD32A (R167)的结合曲线 (pH 7.4) ;图 3g: Fc 突变体与 CD32B 的结合曲线 (pH 7.4) ;图 3h: Fc 突变体与 CD64 的结合曲线 (pH 7.4) ;图 3i: Fc 突变体与 FcRn 在 pH6.0 的结合曲线。

图 4 显示了抗体的 ADCC 活性。

发明详述

除非明确指出相反,否则本发明的实施将采用本领域技术内的常规化学、生物化学、有机化学、分子生物学、微生物学、重组 DNA 技术、遗传学、免疫学和细胞生物学的方法。这些方法的描述可以参见,例如, Sambrook 等人, Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第 3 版,2001); Sambrook 等人, Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第 2 版,1989);Maniatis 等人, Molecular Cloning:A Laboratory Manual(1982); Ausubel 等人, Current Protocols in Molecular Biology(John Wiley 和 Sons,2008 年 7 月更新); Short Protocols in Molecular Biology:A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, GreenePub.Associates 和 Wiley-Interscience ; Glover,DNA Cloning:A Practical Approach,vol.I&II(IRL Press,Oxford,1985); Anand,Techniques for the Analysis of Complex Genomes,(Academic Press,New York,1992); Transcription and Translation(B.Hames&S.Higgins,Eds.,1984); Perbal,A Practical Guide to Molecular Cloning(1984) ; Harlow 和 Lane,Antibodies,(Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,1998)Current Protocols in Immunology Q.E.Coligan, A.M.Kruisbeek,D.H.Margulies, E.M.Shevach 和 W.Strober,eds.,1991); Annual Review of Immunology; 以及期刊专著如 Advances in Immunology。

定义

在下文详细描述本发明前,应理解本发明不限于本文中描述的特定方法学、方案和试剂,因为这些可以变化。还应理解本文中使用的术语仅为了描述具体实施方案,而并不意图限制本发明的范围,其仅会由所附权利要求书

限制。除非另外定义，本文中使用的所有技术和科学术语与本发明所属领域中普通技术人员通常的理解具有相同的含义。

为了解释本说明书，将使用以下定义，并且只要适当，以单数形式使用的术语也可以包括复数，并且反之亦然。要理解，本文所用的术语仅是为了描述具体的实施方案，并且不意欲是限制性的。

术语“约”在与数字数值联合使用时意为涵盖具有比指定数字数值小 5% 的下限和比指定数字数值大 5% 的上限的范围内的数字数值。

术语“和/或”意指当用于连接两个或多个可选项时，应理解为意指可选项中的任一项或可选项中的任意两项或更多项。

术语“包含”或“包括”意指包括所述的要素、整数或步骤，但是不排除任意其它要素、整数或步骤。在本文中，当使用术语“包含”或“包括”时，除非另有指明，否则也涵盖由所述及的要素、整数或步骤组合的情形。例如，当提及“包含”某个具体序列的抗体可变区时，也旨在涵盖由该具体序列组成的抗体可变区。

术语“抗体”在本文中以最广意义使用并且涵盖多种抗体结构物，包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、人源化抗体、嵌合抗体、多特异性抗体(例如，双特异性抗体)、单链抗体、完整抗体或其显示出所需的抗原结合活性的抗体片段。完整抗体通常将包含至少两条全长重链和两条全长轻链，但在某些情况下可包括较少的链，例如骆驼中天然存在的抗体可仅包含重链。

如本文所用，术语“结合”和“特异性结合”意指抗体的结合作用对抗原是选择性的，并且可以与不想要的或非特异的相互作用区别开。抗体与特定抗原结合的能力可以通过酶联免疫吸附测定法(ELISA)、表面等离子共振法(SPR)或生物膜层光学干涉技术(ForteBio)或本领域已知的其它常规结合测定法测定。例如在 SPR 中，抗体以大约 1×10^{-7} 或更低的 KD，大约 1×10^{-8} 或更低的 KD，大约 1×10^{-9} 或更低的 KD，大约 1×10^{-10} 或更低的 KD、大约 1×10^{-11} 或更低的 KD 与 BCMA 或 CD3 结合，则该抗体是“与 BCMA 或 CD3 特异性结合”的抗体。然而，特异性结合人 BCMA 或 CD3 的抗体可以与来自其它物种的 BCMA 或 CD3 蛋白具有交叉反应性。例如，特异于人 BCMA 或 CD3 的抗体，在一些实施方案中，可以与食蟹猴 BCMA 或 CD3 发生交叉反应。测定交叉反应性的方法包括实施例所述的方法以及本领域已知的标准测定法，例如通过使用生物光干涉，或流式细胞术技术。

术语“Kabat 的可变结构域残基编号方式”、“Kabat 编号系统”或“根

据 Kabat 的氨基酸位置编号方式”及其变化形式指根据 Kabat 等人的用于抗体重链可变域或轻链可变域编辑的编号系统(参见 Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。Kabat 编号系统一般适用于抗体的可变域中的残基(大约第 1-107 位的轻链残基和第 1-113 位的重链残基)。

术语“EU 编号系统”、“如 Kabat 中的 EU 索引”或“EU 索引”一般适用于免疫球蛋白重链恒定区中的残基(例如参见 Kabat 等人, 参见上文)。除非本文中另有说明, 否则本文的抗体可变结构域中的残基编号是根据 Kabat 编号系统的残基编号; 抗体恒定结构域中的残基编号根据 EU 编号系统的残基编号方式。

抗体“效应子功能”指归因于抗体 Fc 区(天然序列 Fc 区或氨基酸序列变体 Fc 区)且随抗体同种型而变化的生物学活性。抗体效应子功能的例子包括: 补体依赖的细胞毒性作用(CDC)、抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用(ADCC)、抗体依赖的细胞吞噬作用(ADCP)、细胞表面受体(例如 B 细胞受体)下调、B 细胞活化等。

术语“效应细胞”指表达一种或者多种 FcR 并行行使效应子功能的细胞, 例如表达 FcγRIIIA 并行行使 ADCC 效应子功能的细胞, 在一个实施方案中, 介导 ADCC 功能的细胞例如是 NK 细胞、外周血单个核细胞、单核细胞、细胞毒 T 细胞、嗜中性粒细胞。效应细胞可以来源于天然环境, 例如血液。

术语“抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”或“ADCC”指是细胞介导的免疫反应, 其中某些细胞毒性细胞表面上存在的 Fc 受体识别靶细胞上结合的抗体, 使得细胞毒性细胞可以特异性结合携带抗原的靶细胞, 并激活免疫系统的效应细胞从而裂解靶细胞的作用。经典的 ADCC 作用由自然杀伤细胞(NK)介导, 巨噬细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞(嗜酸性球)也能介导 ADCC 作用。比如嗜酸性粒细胞(嗜酸性球)能通过 ADCC 作用杀死某些特定的寄生虫。

术语“抗体依赖性细胞吞噬”或“ADCP”指一种细胞反应, 其中通过结合靶细胞的抗体与巨噬细胞表面的 FcγRIIIa 结合, 诱导激活巨噬细胞, 从而使靶细胞内化和被吞噬体酸化降解。ADCP 也可由 FcγRIIa 和 FcγRI 介导, 但是占比较小。

补体系统是由一系列蛋白质组成的先天免疫系统的一部分。补体系统的

蛋白质称为“补体”，以缩写符号 C1、C2、C3 等表示，其是存在于人或脊椎动物血清、组织液中的一组不耐热的，经活化后具有酶活性的蛋白质。C1q 是依赖补体的细胞毒性（CDC）途径的第一成分，其能够结合六个抗体，但与两个 IgG 结合就足以活化补体级联。

术语“依赖补体的细胞毒性”或“CDC”指补体参与的细胞毒性作用，其中结合靶标的抗体的 Fc 效应子结构域活化一系列补体级联反应，在靶细胞膜中形成孔洞，从而导致靶细胞死亡。

术语“Fc 区”指免疫球蛋白重链的 C 端区域，包括天然序列 Fc 区和变异 Fc 区。人 IgG 重链 Fc 区通常定义为自其 Cys226 或 Pro230 位置的氨基酸残基至羧基末端的区段，Fc 区的 C 末端 447 位的赖氨酸残基（依照 EU 编号系统）可以存在或者缺失。因而，完整抗体组合物可以包括所有 K447 残基都被消除的抗体群、无 K447 残基被消除的抗体群、或者混合了有 K447 残基的抗体和没有 K447 残基的抗体的抗体群。

在某些实施方案中，免疫球蛋白的 Fc 区包含两个恒定结构域，即 CH2 和 CH3，在另一些实施方案中，免疫球蛋白的 Fc 区包含三个恒定结构域，即 CH2、CH3 和 CH4。

IgG 与 Fcγ 受体或 C1q 的结合依赖于定位在铰链区和 CH2 结构域中的残基。CH2 结构域的两个区域对 FcγR 和补体 C1q 结合至关重要，并且在 IgG2 和 IgG4 中具有唯一的序列。已显示取代人 IgG1 和 IgG2 中 233-236 位的残基和取代人 IgG4 中 327、330 和 331 位的残基可大幅降低 ADCC 和 CDC 活性（Armour 等人, Eur. J. Immunol. 29(8), 1999, 2613-2624; Shields 等人, J. Biol. Chem. 276(9), 2001, 6591-6604）。此外，Idusogie 等人表明在包括 K322 在内的不同位置上的丙氨酸取代显著降低了补体激活（Idusogie EE 等人, J. Immunol 164 (8), 2000 , 4178-84）。

“功能性 Fc 区”与“有功能 Fc 区”等类似术语可以互换使用，指具有野生型 Fc 区的效应子功能的 Fc 区。

“变异 Fc 区”、“Fc 突变体”、“携带突变的 Fc 区”、“突变 Fc 区”、“Fc 区变体”、“Fc 变体”、“变体 Fc 区”和“突变的 Fc 区”等类似术语可以互换使用，指包含至少一处氨基酸修饰而区别于天然序列 Fc 区/野生型 Fc 区的 Fc 区。

在一些实施方案中，变异 Fc 区包含与天然序列 Fc 区的氨基酸序列相差一处或多处氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列。在一些实施方案中，变异 Fc 区与野生型 IgG 的 Fc 区相比具有至少一处氨基酸缺失。在一些实施方案中，变异 Fc 区与野生型 IgG 的 Fc 区相比具有至少一处氨基酸取代。在一些实施方案中，变异 Fc 区在野生型抗体的 Fc 区中具有一个或多个氨基酸取代以及一个或者多个氨基酸缺失。在一些实施方案中，变异 Fc 区具有至少一处或两处本文所述 Fc 区氨基酸缺失。在一些实施方案中，变异 Fc 区具有至少一处、两处、三处或更多处本文所述 Fc 区氨基酸取代。在一些实施方案中，变异 Fc 区具有至少一处、两处、三处或更多处本文所述 Fc 区氨基酸取代和至少一处、两处本文所述 Fc 区缺失。在一些实施方案中，变异 Fc 区与野生型 Fc 区和/或亲本 Fc 区具有至少约 80%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高的同源性。

“Fc 受体”或“FcR”指结合抗体 Fc 区的分子。在一些实施方案中，FcR 是天然人 FcR。在一些实施方案中，FcR 是结合 IgG 抗体的受体，即 FcγR，包括 FcγRI (CD64)、FcγRII (CD32) 和 FcγRIII (CD16) 三种受体，以及这些受体的等位变体和可变剪接形式。FcγRII 受体包括 FcγRIIA 和 FcγRIIB，FcγRIII 受体包括 FcγRIIIA 和 FcγRIIIB。

根据受体功能，可以将 FcγR 分为激活型受体 (FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIC, FcγRIIIA, FcγRIIIB，又称为 CD64, CD32A, CD32C, CD16A, CD16B) 和抑制型受体 (FcγRIIB，又称为 CD32B)。激活型受体在其胞质结构域中包含免疫受体基于酪氨酸的活化基序 (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif, 或 ITAM)，该基序起传递活化信号，促进细胞激活的作用，抑制型受体在其胞质结构域中包含免疫受体基于酪氨酸的抑制基序 (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif, 或 ITIM)，该基序起抑制细胞激活的作用。激活性 FcγR 的效应功能主要有 ADCC、ADCP 和抗原呈递；而抑制性 FcγR 的效应功能主要有抑制、清扫等功能。FcγRIIB 是人类和小鼠表达的唯一抑制性 FcγR，在直接靶向肿瘤的抗体中，FcγRIIB 的表达与抗体疗效降低有关。

不同的 FcγR 具有不同的细胞表达谱，例如 FcγRIIIA (CD16A) 在巨噬细胞、单核细胞、自然杀伤细胞 (NK 细胞) 等细胞上均有表达。FcγRIIIA 受体是 NK 细胞上仅表达唯一受体，可以介导 ADCC 功能。

术语“FcR”还包括新生儿受体（FcRn），FcRn 是一种位于细胞膜表面的 IgG 抗体受体。FcRn 负责将母体 IgG 转移给胎儿，并调节免疫球蛋白在体内的稳态。FcRn 可以和 IgG 的 Fc 部分结合，阻止 IgG 分子被溶酶体裂解，可以起到增长 IgG 体内半衰期的作用，参与到 IgG 的体内转运、维持和分布代谢过程中。

IgG1-IgG4 亚类结合 Fc 受体的能力不尽相同，针对不同的 FcγR，IgG1 和 IgG3 是通用的配体，它们结合所有的 FcγR，具有很强的 ADCC 作用。IgG2 或 IgG4，通常又被称为“惰性”IgG 亚类，采用这两种亚类可以避免免疫激活效应。事实上，许多单抗都选择以 IgG4 作为抗体的主干，以避免 ADCC 效应。然而 IgG2 和 IgG4 并非完全“惰性”，其分别可以结合激活型的 FcγRIIa-H131 和 FcγRI，从而启动中性粒细胞激活。

此外，实际情况中，存在降低 IgG1 亚类引起的 ADCC 效应的需求，现有技术中，广泛采用 IgG1 的“LALA”（L234A+L235A）突变，该突变可以将抗体 Fc 区与 FcγR 的结合亲和力降低 100 倍。而通过本申请获得的 Fc 突变体，相比较于“LALA”突变，与 FcγR 的结合亲和力更低，因此更强地降低了 ADCC 的作用。

在涉及 ADCC/ADCP/CDC 的语境中，表述“降低的 ADCC 和/或 ADCP 和/或 CDC 效应子功能”或“降低的 ADCC/ADCP/CDC 效应子功能”以及类似表述指与相应的野生型分子引起的 ADCC 和/或 ADCP 和/或 CDC 效应子功能的数值相比，本申请所述的 Fc 突变体、包含 Fc 突变体的多肽等所引起的 ADCC 和/或 ADCP 和/或 CDC 效应子功能的数值具有足够高的降低，使得本领域技术人员将认为所述降低在相应的生物学背景内具有统计学显著性。例如，在某些实施方案中，所述两个数值的降低例如大于约 10%、大于约 20%、大于约 30%、大于约 40%、大于约 50%、大于约 60%、大于约 70%、大于约 80%、大于约 90%、或者大于约 100%甚至更高。

“氨基酸取代”指，将预定的氨基酸序列中存在的至少一个氨基酸残基替换为另外的不同“取代”氨基酸残基。

术语“保守取代”是指一个氨基酸经相同类别内的另一氨基酸取代，例如一个酸性氨基酸经另一酸性氨基酸取代，一个碱性氨基酸经另一碱性氨基酸取代，或一个中性氨基酸经另一中性氨基酸取代。示例性的取代如下表所示：

原始残基	示例性取代	优选保守取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	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)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; 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

按照共同的侧链性质分组：(1) 疏水性：Ile、Met、Ala、Val、Leu、Ile；(2) 中性亲水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；(3) 酸性：Asp、Glu；(4) 碱性：His、Lys、Arg；(5) 影响链取向的残基：Gly、Pro；(6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。非保守取代将需要将这一些种类之一的成员换为另一种类。

“氨基酸缺失”指从预定的氨基酸序列去除至少一个氨基酸残基。

术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可交换地使用且是指其中引入外源核酸的细胞，包括这种细胞的后代。宿主细胞包括“转

化体”和“转化的细胞”，其包括最初原代转化的细胞和来源于其的后代，而不考虑传代的数目。后代在核酸内容上可能与亲本细胞不完全相同，而是可以包含突变。本文中包括在最初转化的细胞中筛选或选择的具有相同功能或生物学活性的突变体后代。

如下进行序列之间序列同一性的计算。

为确定两个氨基酸序列或两个核酸序列的同一性百分数，将所述序列出于最佳比较目的比对(例如，可以为了最佳比对而在第一和第二氨基酸序列或核酸序列之一或二者中引入空位或可以为比较目的而抛弃非同源序列)。在一个优选实施方案中，为比较目的，所比对的参考序列的长度是至少 30%、优选地至少 40%、更优选地至少 50%、60%和甚至更优选地至少 70%、80%、90%、100%的参考序列长度。随后比较在对应氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置由第二序列中对应位置处的相同氨基酸残基或核苷酸占据时，则所述分子在这个位置处是相同的。

可以利用数学算法实现两个序列间的序列比较和同一性百分数的计算。在一个优选实施方案中，使用已经集成至 GCG 软件包的 GAP 程序中的 Needleman 和 Wunsch ((1970) J. Mol. Biol. 48:444-453) 算法 (在 <http://www.gcg.com> 可获得)，使用 Blossum 62 矩阵或 PAM250 矩阵和空位权重 16、14、12、10、8、6 或 4 和长度权重 1、2、3、4、5 或 6，确定两个氨基酸序列之间的同一性百分数。在又一个优选的实施方案中，使用 GCG 软件包中的 GAP 程序(在 <http://www.gcg.com> 可获得)，使用 NWSgapdna.CMP 矩阵和空位权重 40、50、60、70 或 80 和长度权重 1、2、3、4、5 或 6，确定两个核苷酸序列之间的同一性百分数。特别优选的参数集合(和除非另外说明否则应当使用的一个参数集合)是采用空位罚分 12、空位延伸罚分 4 和移码空位罚分 5 的 Blossum 62 评分矩阵。

还可以使用 PAM120 加权余数表、空位长度罚分 12，空位罚分 4)，利用已经并入 ALIGN 程序(2.0 版)的 E. Meyers 和 W. Miller 算法, ((1989) CABIOS, 4:11-17)确定两个氨基酸序列或核苷酸序列之间的同一性百分数。

抗体的靶抗原

本申请所提供的包含 Fc 突变体的抗体可以靶向任何抗原，包括但不限于属于下列靶抗原中的蛋白、亚基、结构域、基序、和/或表位，所述靶抗原例如是细胞因子、膜结合因子、酶、受体、配体、病原体及其毒素、病毒颗粒、

肿瘤相关因子、信号通路成员分子等等。合适的抗原取决于所需的应用。对于抗癌治疗，期望具有表达限制在癌细胞内的靶。已证明特别适于抗体治疗的一些靶是具有信号传导功能的那些。其他治疗抗体通过抑制受体与其辄合配体之间的结合阻断受体的信号传导来发挥其作用。

已经被批准用于临床试验或正在开发的许多抗体可获益于本发明的 Fc 突变体。因此，可以将这些抗体的可变区与本申请公开的 Fc 突变体整合形成具有改进的优良性质的产品。在一个实施方式中，可以将本申请公开的 Fc 突变体整合到人源化抗体、亲和力成熟的抗体、工程化的抗体中，例如与其重链可变区融合。

Fc 区的其他修饰

可以利用现有技术中已经公开的多种方法，对本申请提供的 Fc 突变体、包含 Fc 突变体的融合蛋白（例如抗体）等进行进一步的修饰，例如以用于降低免疫原性、提高稳定性、溶解性、功能和临床益处的其他修饰。此类修饰包括但不限于下列修饰，例如可以延长血清半衰期的在位置 252, 254 和 256 处的修饰。

实施例

以下实施例进一步说明本发明，然而，应理解实施例以说明而非限定的方式来描述，并且本领域技术人员可以进行多种修改。

除非明确指明相反，否则本发明的实施将采用本领域技术内的常规化学、生物化学、有机化学、分子生物学、微生物学、重组 DNA 技术、遗传学、免疫学和细胞生物学的方法。

实施例 1. Fc 突变体设计

鉴于抗体 Fc 区与 Fc 受体的相互作用可能产生不利影响，在单克隆抗体应用中有时需要消除 Fc 区的效应子功能（例如 ADCC、CDC）。例如对于 IgG1 亚类抗体，其主要通过 Fc 区结合 FcγRIIIA 而实现 ADCC 功能。针对需要降低 ADCC、CDC 功能的 IgG1 亚类抗体，则需要对其 Fc 区加以改造，以降低其与 Fcγ 受体的结合。因此，本实施例基于人 IgG1 Fc 与 FcγR 的共结晶结构，探讨了人 IgG1 Fc 与 FcγR 相互作用的关键位点，并设计了相应的 Fc 突变体，

以降低其与 Fc γ R 的相互作用。

人 IgG1 Fc 与人 CD16A (Fc γ RIII) 的晶体结构 (PDB:3SGJ) 如图 1 所示, 其中 Fc 的两个区段 P232-V240 和 N325-E333 构成了与 CD16A 表位结合的位点, 其中 Fc 的氨基酸 P329 与 CD16A 的氨基酸 W90 和 W113 之间形成的 π 键相互作用, 是它们相互结合界面上的关键氨基酸。基于该关键区段和氨基酸, 发明人基于分子间作用界面设计了如表 1 所示的 Fc 突变体。

在本实施例中, 以信达制药内部筛选获得的针对人 claudin18.2 蛋白的一个 IgG1 单克隆抗体 (Fcmut-01) 作为示例, 进行相关设计和研究。即, 基于作为亲本和对照的 Fcmut-01, 获得了表 1 所示的一系列具有 Fc 不同突变的突变体 (Fcmut-02 ~ Fcmut-024)。Fcmut-25 是 Herceptin (Genentech), Fcmut-26 ~ Fcmut-32 是对 Herceptin 的 Fc 进行的不同改造。

表 1.Fc 突变体设计

分子名称	Fc 亚型	SEQ ID NO		Fc 突变位点(根据 Kabat 中的 EU 索引)			
		重链	轻链	234	235	329	330
Fcmut-01	IgG1-WT	SEQ ID NO :1	SEQ ID NO :9	L	L	P	A
Fcmut-02	IgG1-mut	SEQ ID NO :2	SEQ ID NO :9	L	L	缺失	A
Fcmut-03	IgG1-mut	SEQ ID NO :3	SEQ ID NO :9	L	L	缺失	G
Fcmut-04	IgG1-mut	SEQ ID NO :4	SEQ ID NO :9	L	L	缺失	缺失
Fcmut-05	IgG1-mut	SEQ ID NO :5	SEQ ID NO :9	A	A	P	A
Fcmut-06	IgG1-mut	SEQ ID NO :6	SEQ ID NO :9	A	A	缺失	A
Fcmut-07	IgG1-mut	SEQ ID NO :7	SEQ ID NO :9	A	A	缺失	G
Fcmut-08	IgG1-mut	SEQ ID NO :8	SEQ ID NO :9	A	A	缺失	缺失
Fcmut-09	IgG2-WT	SEQ ID NO :10	SEQ ID NO :9	V	A	P	A
Fcmut-10	IgG2-mut	SEQ ID NO :11	SEQ ID NO :9	V	A	缺失	A
Fcmut-11	IgG2-mut	SEQ ID NO :12	SEQ ID NO :9	V	A	缺失	G
Fcmut-12	IgG2-mut	SEQ ID NO :13	SEQ ID NO :9	V	A	缺失	缺失
Fcmut-13	IgG2-mut	SEQ ID NO :14	SEQ ID NO :9	A	A	P	A
Fcmut-14	IgG2-mut	SEQ ID NO :15	SEQ ID NO :9	A	A	缺失	A
Fcmut-15	IgG2-mut	SEQ ID NO :16	SEQ ID NO :9	A	A	缺失	G
Fcmut-16	IgG2-mut	SEQ ID NO :17	SEQ ID NO :9	A	A	缺失	缺失
Fcmut-17	IgG4-S228P	SEQ ID NO :18	SEQ ID NO :9	F	L	P	S
Fcmut-18	IgG4-mut	SEQ ID NO :19	SEQ ID NO :9	F	L	缺失	S
Fcmut-19	IgG4-mut	SEQ ID NO :20	SEQ ID NO :9	F	L	缺失	G
Fcmut-20	IgG4-mut	SEQ ID NO :21	SEQ ID NO :9	F	L	缺失	缺失
Fcmut-21	IgG4-mut	SEQ ID NO :22	SEQ ID NO :9	A	A	P	S
Fcmut-22	IgG4-mut	SEQ ID NO :23	SEQ ID NO :9	A	A	缺失	S
Fcmut-23	IgG4-mut	SEQ ID NO :24	SEQ ID NO :9	A	A	缺失	G
Fcmut-24	IgG4-mut	SEQ ID NO :25	SEQ ID NO :9	A	A	缺失	缺失

Fcmut-25	IgG1-WT	SEQ ID NO :26	SEQ ID NO :34	L	L	P	A
Fcmut-26	IgG1-mut	SEQ ID NO :27	SEQ ID NO :34	L	L	缺失	A
Fcmut-27	IgG1-mut	SEQ ID NO :28	SEQ ID NO :34	L	L	缺失	G
Fcmut-28	IgG1-mut	SEQ ID NO :29	SEQ ID NO :34	L	L	缺失	缺失
Fcmut-29	IgG1-mut	SEQ ID NO :30	SEQ ID NO :34	A	A	P	A
Fcmut-30	IgG1-mut	SEQ ID NO :31	SEQ ID NO :34	A	A	缺失	A
Fcmut-31	IgG1-mut	SEQ ID NO :32	SEQ ID NO :34	A	A	缺失	G
Fcmut-32	IgG1-mut	SEQ ID NO :33	SEQ ID NO :34	A	A	缺失	缺失

实施例 2：携带 Fc 突变的抗体的表达和纯化

质粒构建：根据常规实验方法，获得上述重链 Fc 突变和轻链的核苷酸序列，并分别克隆到 pcDNA3.1 载体中获得各个质粒。

蛋白质表达及纯化

瞬时转染质粒准备：取 1/10（以转染体积计算）的减血清培养基 Opti-MEM™（Gibco，货号 31985-070），加入质粒混合物（50ug/50mL，其中重链和轻链质量比 1:1），将含有质粒的 Opti-MEM™培养基过滤至新的 50ml 离心管中，并向该离心管中加入已过滤的 PEI(1g/L, Polysciences)（质量比(质粒：PEI)=1:3），混匀静置 20min。

细胞转染：将上述获得的 DNA/PEI 混合物轻柔倒入 Expi293 细胞(Gibco)并混匀，在 37℃，8% CO₂ 的条件下转染 14h，随后分别按转染细胞体积计，补加 0.1% 丙戊酸钠盐（VPA）（2.2M, Sigma），补加 2.5% 的葡萄糖（200 g/L，Sigma）以及 2.5% 的 Feed 溶液（1 g/L Phytone Peptone + 1g/L Difco Select Phytone），再次将细胞置于 37℃，8% CO₂ 的条件培养 7d。

纯化产物：将培养后的细胞培养液以 4000 rpm 离心 50 min，收集上清，用预装柱 Hitrap Mabselect Sure（GE, 11-0034-95）纯化上清液。具体操作如下：纯化前用 5 倍柱体积的平衡液（20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH7.2）平衡填料柱；将收集的上清液通过柱子，再用 10 倍柱体积的平衡液清洗填料柱，消除非特异性结合蛋白；用 5 倍柱体积的洗脱缓冲液（100 mM 柠檬酸钠，pH 3.5）冲洗填料，收集洗脱液。将洗脱液用 2M Tris 调节 pH 至 6.0，并测定浓度，获得纯化的抗体产物。

将收集的抗体产物超滤浓缩交换到 PBS（Gibco，70011-044）中，然后用 superdex200 increase（GE, 10/300GL, 10245605）进一步分离纯化，收集单体的洗脱峰，柱子的平衡和洗脱缓冲液为 PBS（Gibco，70011-044）。

实施例 3. Fc 突变体与 Fc 受体的亲和力测定

一、SPR 法测定携带 Fc 突变体的抗体的亲和力

采用表面等离子共振法（SPR）测定本发明获得的携带 Fc 突变体的抗体与人 Fc γ R 结合的情况，其中具体检测了各个抗体突变体与 Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, Fc γ RIIIa, Fc γ RIIIb 及 FcRn 的平衡解离常数（KD）。基于 SPR 原理，当一束偏振光以一定的角度入射到棱镜端面，在棱镜与金膜的界面将产生表面等离子波，引起金属膜内自由电子产生共振，即表面等离子共振。分析时，先在传感芯片表面固定一层生物分子识别膜，然后将待测样品流过芯片表面，若样品中有能够与芯片表面的生物分子识别膜相互作用的分子，则会引起金膜表面折射率变化，最终导致 SPR 角度变化，通过检测 SPR 角度变化，获得被分析物的亲和力、动力学常数等信息。

本实施例通过 Biacore（Cytiva, T200）测定实施例 2 获得的携带 Fc 区突变的抗体与人 Fc γ R 的 KD，具体方法如下：将含有组氨酸标签的各个 Fc γ R 及 FcRn 蛋白（各个 Fc 受体的信息参见下文的表 2）捕获到偶联有抗组氨酸抗体的芯片表面，然后通过检测芯片表面蛋白与流动相中的抗体之间的结合与解离获得亲和力及动力学常数。该方法包括芯片制备和亲和力检测。测定过程使用 10 倍稀释后的 10 $\times$ HBS-EP+ (BR-1006-69, Cytiva) 作为实验缓冲液。

表 2 检测用受体信息

受体名称	标签	货号	厂商
人 Fc γ RIIIB/CD16B (NA1)	his	CDB-H5227	Acro
人 Fc γ RIIIB/CD16B (NA2)	his	CDB-H5222	Acro
人 FcRn / FCGR2A 异二聚体蛋白	His, Strep II	FCM-H5286	Acro
人 Fc γ RIIIA / CD16A (V176) 蛋白	his	CD8-H52H4	Acro
人 Fc γ RIIIA / CD16A (F176) 蛋白	his	CDA-H5220	Acro
人 CD32A/FCGR2A 蛋白(167his)	his	10374-H27H1	SINO
人 CD32A/FCGR2A 蛋白(167 Arg)	his	10374-H27H	SINO
人 CD32B/FCGR2B 蛋白	his	10259-H08H	SINO
人 CD64/FCGR1A 蛋白	his	10256-H08S-B	SINO

根据厂商说明，具体方法如下：

芯片制备：使用氨基偶联试剂盒（BR-1006-33, Cytiva）和组氨酸捕获试剂盒（28995056, Cytiva），将组氨酸捕获试剂盒中的抗组氨酸抗体偶联在 CM5 芯片（29-1496-03, Cytiva）表面，偶联后注入 1 M 乙醇胺，对剩余的活化位点进行封闭。

亲和力检测：每个循环包括捕获受体、结合一定浓度的本申请携带 Fc 区突变的抗体及芯片再生。将梯度稀释后的各个抗体突变体溶液（与 Fc γ Rs 结合时，稀释梯度为 0, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400nM；与 FcRn 结合时，稀释梯度为 0, 50, 100, 200, 400, 800, 1600nM），以从低浓度到高浓度的顺序分别完成各个亲和力检测循环。在每个循环中，以 30 μ l/min 的流速使抗体突变体溶液流过芯片表面，结合时间 60 s，解离时间 60 s。最后使用 10 mM Glycine pH 1.5（BR-1003-54, Cytiva）对芯片进行再生。获得的数据使用 Biacore T200 分析软件（版本号 3.1），采用分析 1:1 结合或稳态分析模型进行分析，获得相应结果。

下表 3 给出了本研究各个抗体突变体与各个 Fc 受体的亲和力数据，图 2 示出了相应的分子的拟合曲线。

从结果可知：作为本研究的对照抗体，IgG1 野生型 Fcmut-01 抗体与 CD64 有很高的亲和力， K_D 值为 $1.07E-09$ ；与 CD32A 的两个亚型 H167 和 R167 都结合， K_D 值分别为 $2.01E-07$ 和 $4.60E-08$ ；与 CD16A 的两个亚型 F176 和 V176 的亲和力分别为 $1.57E-07$ 和 $2.44E-08$ ；而对 CD16B(NA1), CD16B(NA2) 和 CD32B 为弱结合。

除了突变体 Fcmut-05 与 CD16A(V176)有较弱的亲和力（ $3.06E-07$ ），其他携带 Fc 突变的抗体分子都不与 CD16A(F176)、CD16A(V176)、CD16B(NA1)、CD16B(NA2)、CD32A(H167)、CD32A(R167)和 CD32B 结合。关于与野生型 IgG1 有强结合的 CD64，突变体 Fcmut-06/07/08 都不与 CD64 结合，而 Fcmut-02/03/04/05 对 CD64 的结合也得到大幅度降低，与对照 Fcmut-01 相比，分别减弱了 8.7 倍，12.9 倍，14.02 倍和 50.75 倍。此外，Fcmut-26~Fcmut-32 也显示出相似的结果，与 Fcmut-25 相比，除 Fcmut-29 外，其他携带 Fc 突变的抗体分子都不与 CD16A(F176)、CD16A(V176)、CD16B(NA1)、CD16B(NA2)、CD32A(H167)、CD32A(R167)和 CD32B 结合。

F176 和 V176 是 CD16A 主要的基因型，并且根据晶体结构可知 CD16A 的 176 位氨基酸位于与 Fc 的结合区中，因此对 CD16A 与 Fc 的亲和力有重要影响。本申请获得的 Fc 突变体基本上不与 CD16A 的基因型 F176 和 V176 相互作用，因此可以明确本申请获得的 Fc 突变体将基本上不与所有的功能性 CD16A 相互作用，由此不引发 ADCC 效应。包含本申请 Fc 突变体的蛋白质分子（例如抗体）分子因此基本上不具有 ADCC 效应子功能。

已知抗体的 Fc 区与 FcRn 在 pH 中性条件下不结合，仅在酸性条件下结合，这是抗体分子具体较长半衰期的主要机制。经检测可知，对照抗体 Fcmut-01 在 pH6.0 与 FcRn 的亲和力是 $3.86E-07$ ，而在 pH7.0 条件下不与 FcRn 结合，本研究获得的携带 Fc 突变的抗体分子在相同条件下与 FcRn 的结合与对照抗体 Fcmut-01 一致（图 2i, 2j），说明本研究获得的 Fc 突变体不影响与 FcRn 的结合。

FcRn 在体内多种细胞上表达，且 FcRn 与 Fc 区的结合是 pH 依赖型的，只在弱酸性 pH6.0 左右结合，而在中性 pH 无结合，由此可以延长相应抗体的半衰期。本申请的实验数据表明抗体所携带的 Fc 区突变并没有影响抗体分子与 FcRn 的结合，因此，FcRn 依然能够延长本申请抗体突变体的体内半衰期。

本申请获得的抗体突变体不与 CD32B 结合，表明通过对抗体的 Fc 区进行突变，可以增强抗体的疗效。

现有技术中广泛采用的“LALA”突变（Fcmut-05）将抗体 Fc 区与 FcγR 的结合亲和力降低 100 倍。而通过本申请获得的 Fc 突变体，相比较于“LALA”突变，与 FcγR 的结合亲和力更低，因此更强地降低了 ADCC 的作用。

野生型 IgG2 和 IgG4 具有弱的 ADCC 效应或者没有 ADCC 效应，因此许多期望避免 ADCC 效应的抗体分子在生产中选择 IgG2 亚型或者 IgG4 亚型的 Fc 区。然而在有些情况下，仍然希望进一步降低 IgG2 亚型或者 IgG4 亚型的 ADCC 效应功能。为此，申请人进一步探讨了对 IgG2 和 IgG4 亚型的 Fc 区相应位点（参见表 1）进行相应突变后，其与各种 FcR 结合的情况。数据表明，包含本申请相应突变的 IgG2 亚型或者 IgG4 亚型 Fc 突变体相对于野生型的 Fc，减弱了对 FcγR 的结合。

表 3. Fc 突变体与 Fc 受体的结合常数

patent-ID	CD16A (F176)	CD16A (V176)	CD16B (NA1)	CD16B (NA2)	CD32A (H167)	CD32A (R167)	CD32B	CD64	FcRn (6.0)	FcRn (7.0)
Fcmut-01	1.57E-07	2.44E-08	weak	weak	2.01E-07	4.60E-08	weak	1.07E-09	3.86E-07	N.B.
Fcmut-02	N.B.	N.B.	N.B.	N.B.	N.B.	N.B.	N.B.	9.31E-09	4.47E-07	N.B.
Fcmut-03	N.B.	N.B.	N.B.	N.B.	N.B.	N.B.	N.B.	1.38E-08	3.17E-07	N.B.
Fcmut-04	N.B.	N.B.	N.B.	N.B.	N.B.	N.B.	N.B.	1.50E-08	5.05E-07	N.B.
Fcmut-05	N.B.	3.06E-07	N.B.	N.B.	N.B.	N.B.	N.B.	5.43E-08	4.19E-07	N.B.
Fcmut-06	N.B.	N.B.	N.B.	N.B.	N.B.	N.B.	N.B.	N.B.	2.84E-07	N.B.
Fcmut-07	N.B.	N.B.	N.B.	N.B.	N.B.	N.B.	N.B.	N.B.	3.74E-07	N.B.
Fcmut-08	N.B.	N.B.	N.B.	N.B.	N.B.	N.B.	N.B.	N.B.	4.02E-07	N.B.

N. B.: 不结合

二、生物膜薄层干涉技术测定本发明 Fc 突变体与 Fc 受体的结合

采用生物膜薄层干涉测定技术(BLI)测定本发明 Fc 突变体结合人 Fc 受体的亲和力 (KD)。

实验开始前半个小时，根据样品数量，取合适数量的 HIS1K 传感器 (18-5120, Sartorius,)浸泡于 SD 缓冲液(1x PBS, 0.1% BSA, 0.05% Tween-20)中，与 FcRn 结合时，实验所用缓冲液更改为 10 mM HEPS, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% P20, pH 6.0。将抗体稀释至 200 nM, Fc 受体(样品信息见表 2)稀释至 100 nM。

分别将 200 μ l 的 SD 缓冲液、200ul 标记的抗体溶液、200ul Fc 受体加入到 96 孔黑色聚苯乙烯微孔板 (Greiner, 655209) 中。使用 ForteBio Octet Red96e 进行检测，根据样品位置布板，选择传感器位置。仪器设置参数如下：运行步骤：平衡基线 120 s、固化 Fc 受体 100 s、平衡基线 120 s、结合抗体 60 s 和解离 60 s, 转速为 1000 rpm, 温度为 30°C。实验完成后，使用 ForteBio Octet 分析软件分析 KD 值。

结果见下表 4 和图 3。与 Fcmut-25 相比，除 Fcmut-29 外，其他携带 Fc 突变的抗体分子都不与 CD16A(F176)、CD16A(V176)、CD16B(NA1)、CD16B(NA2)结合。突变体 Fcmut-26/27/28/29/30/31/32 突变体都不与 CD32A H167、CD32A R167、CD32B 结合。突变体 Fcmut-30/31/32 都不与 CD64 结合，而 Fcmut-/26/27/28/29 对 CD64 的结合也得到大幅度降低。

Fc-25 是结合 HER2 的抗体，其抗体的恒定区为野生型的 IgG1 序列；从结果可知，删除 P329 可以降低分子对 Fc gamma 受体的结合，但对 FcRn(pH6.0)的结合不受影响。

表 4a 突变体与 HIS1K 传感器上的 CD16A V176 结合

Sample ID	Response	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
Fc-25	0.297	9.43E-08	1.64E+05	1.54E-02
Fc-26	0.0029	N.B		
Fc-27	0.007	N.B		
Fc-28	0.0156	N.B		
Fc-29	0.0909	1.55E-07	1.43E+05	2.22E-02
Fc-30	0.0211	N.B		
Fc-31	0.0241	N.B		
Fc-32	0.0141	N.B		

表 4b 突变体与 HIS1K 传感器上的 CD16A F176 结合

Sample ID	Response	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
Fc-25	0.1082	1.02E-07	1.98E+05	2.01E-02
Fc-26	0.0018	N.B		
Fc-27	0.0023	N.B		
Fc-28	0.0118	N.B		
Fc-29	0.0439	2.06E-07	1.72E+05	3.54E-02
Fc-30	0.0232	N.B		
Fc-31	0.0262	N.B		
Fc-32	0.0166	N.B		

表 4c 突变体与 HIS1K 传感器上的 CD16B NA1 结合

Sample ID	Response	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
Fc-25	0.0531	6.45E-07	7.74E+04	4.99E-02
Fc-26	-0.002	N.B		
Fc-27	0.0017	N.B		
Fc-28	0.0115	N.B		
Fc-29	0.0346	2.21E-07	2.35E+05	5.21E-02
Fc-30	0.0204	N.B		
Fc-31	0.028	N.B		
Fc-32	0.0184	N.B		

表 4d 突变体与 HIS1K 传感器上的 CD16B NA2 结合

Sample ID	Response	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
Fc-25	0.0801	1.05E-06	5.40E+04	5.68E-02
Fc-26	-0.0022	N.B		
Fc-27	0.0037	N.B		
Fc-28	0.0103	N.B		
Fc-29	0.0331	4.82E-07	1.50E+05	7.23E-02
Fc-30	0.024	N.B		
Fc-31	0.0269	N.B		
Fc-32	0.0172	N.B		

表 4e 突变体与 HIS1K 传感器上的 CD32A H167 结合

Sample ID	Response	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
Fc-25	0.2124	6.12E-06	1.11E+04	6.81E-02
Fc-26	0.0058	N.B		
Fc-27	0.0058	N.B		
Fc-28	0.0142	N.B		
Fc-29	0.0301	N.B		
Fc-30	0.0171	N.B		

Fc-31	0.0214	N.B
Fc-32	0.0097	N.B

表 4f 突变体与 HIS1K 传感器上的 CD32A R167 结合

Sample ID	Response	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
Fc-25	0.1615	4.28E-06	1.66E+04	7.13E-02
Fc-26	0.0044	N.B		
Fc-27	0.0028	N.B		
Fc-28	0.0089	N.B		
Fc-29	0.0293	N.B		
Fc-30	0.0181	N.B		
Fc-31	0.0199	N.B		
Fc-32	0.0099	N.B		

表 4g 突变体与 HIS1K 传感器上的 CD32B 结合

Sample ID	Response	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
Fc-25	0.0799	2.57E-07	2.18E+05	5.61E-02
Fc-26	-0.003	N.B		
Fc-27	-0.0037	N.B		
Fc-28	0.0066	N.B		
Fc-29	0.0269	N.B		
Fc-30	0.0171	N.B		
Fc-31	0.0214	N.B		
Fc-32	0.0083	N.B		

表 4h 突变体与 HIS1K 传感器上的 CD64 结合

Sample ID	Response	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
Fc-25	0.8932	9.48E-09	2.92E+05	2.77E-03
Fc-26	0.6477	5.33E-08	2.63E+05	1.40E-02
Fc-27	0.4326	1.13E-07	3.15E+05	3.56E-02
Fc-28	0.5144	4.66E-08	2.37E+05	1.10E-02
Fc-29	0.2287	4.45E-08	3.61E+05	1.61E-02
Fc-30	0.0202	N.B		
Fc-31	0.0274	N.B		
Fc-32	0.0162	N.B		

表 4i 突变体与 HIS1K 传感器上的 FcRn 结合

Sample ID	Response	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
Fc-25	0.2392	2.84E-08	4.30E+05	1.22E-02
Fc-26	0.3488	5.09E-08	4.19E+05	2.13E-02
Fc-27	0.2855	6.23E-08	4.57E+05	2.84E-02

Fc-28	0.3545	4.55E-08	3.80E+05	1.73E-02
Fc-29	0.6114	3.28E-08	4.26E+05	1.40E-02
Fc-30	0.4914	2.21E-08	4.49E+05	9.93E-03
Fc-31	0.5716	2.58E-08	4.34E+05	1.12E-02
Fc-32	0.4803	2.39E-08	4.44E+05	1.06E-02

实验例 4. 生物膜薄层干涉技术测定本发明 Fc 突变体与 C1q 的亲合力

抗体 Fc 与 C1q 的亲合力的强弱直接决定了抗体是否具有 CDC 效应子功能, 因此本实施例通过检测各个 Fc 突变体与 C1q 的亲合力来判断该 Fc 突变体是否还具有 CDC 效应子功能。

采用生物膜薄层干涉测定技术(BLI)测定本发明抗体结合人 C1q 的亲合力(KD)。BLI 法亲合力测定按照现有的方法 (Estep, P 等人, High throughput solution Based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning. MAbs, 2013.5(2): 第 270-8 页) 进行。

首先使用 EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin (21327, Thermo Scientific) 生物素与抗体按摩尔比 3: 1 混合后静置进行生物素标记, 离心去除未标记的生物素, 并将抗体等体积置换至 PBS 溶液中。

实验开始前半个小时, 根据样品数量, 取合适数量的 SA 传感器 (Foretbio, 18-5019) 浸泡于 SD 缓冲液 (1x PBS, 0.1% BSA, 0.05% Tween-20) 中。将抗体稀释至约 100 nM, C1q (A099, Complement Technology) 稀释至 40 nM。

分别将 200 μ l 的 SD 缓冲液、200ul 标记的抗体溶液、200ul C1q 抗原加入到 96 孔黑色聚苯乙烯微孔板 (Greiner, 655209) 中。使用 Fortebio Octet Red96e 进行检测, 根据样品位置布板, 选择传感器位置。仪器设置参数如下: 运行步骤: 基线、加样 $\sim$ 3 nm、基线、缔合 (Kon) 和解离 (Kdis); 各个步骤运行时间取决于样品结合和解离速度, 转速为 1000 rpm, 温度为 30°C。实验完成后, 使用 ForteBio Octet 分析软件分析 KD 值, 导出坐标轴数据使用 Graphpad Prism 8 软件作图。

结果如表 5 和图 2k 所示, 只有 Fcmut-01 可与 C1q 结合, 亲合力为 2.02E-08, Fcmut-2~Fcmut-8 都不与 C1q 结合。说明本研究的 Fc 突变体可以减弱或阻止 Fc 与 C1q 的结合, 因而可以降低或消除抗体的 CDC 效应子功能。与相应的野生型对照相比, Fcmut-10~Fcmut-16、Fcmut-18~Fcmut-24 同样不与 C1q 结合。此外, 与 Fcmut-25 相比, Fcmut-26~Fcmut-32 同样不与 C1q 结合。

表 5. Fc 突变体与 C1q 的亲和力

样品	抗原	响应(nm)	KD (M)	Kon (1/Ms)	Kdis (1/s)
Fcmut-01	C1q	0.1582	2.02E-08	3.67E+06	7.41E-02
Fcmut-02		0.0007	不结合		
Fcmut-03		0.0016	不结合		
Fcmut-04		-0.0027	不结合		
Fcmut-05		-0.0033	不结合		
Fcmut-06		-0.0035	不结合		
Fcmut-07		-0.0134	不结合		
Fcmut-08		0.0004	不结合		

实验例 5. 生物膜薄层干涉技术测定本发明的抗体与抗原的亲和力

除以下内容, 采用与实施例 4 所述的方法相同的 BLI 法进行亲和力的检测。

实验开始前半个小时, 根据样品数量, 取合适数量的 AHC (Foretbio, 18-5060) 传感器浸泡于 SD 缓冲液 (1x PBS, 0.1% BSA, 0.05% Tween-20) 中。将抗体和 Claudin18.2 (cp0007, Genscript) 分别稀释至 100 nM。

取 200 μ l 的 SD 缓冲液、200 μ l 的抗体、200 μ l 的 Claudin18.2 抗原分别加入到 96 孔黑色聚苯乙烯微孔板 (Greiner, 655209) 中。使用 Fortebio Octet Red96e 进行检测, 根据样品位置布板, 选择传感器位置。仪器设置参数如下: 运行步骤: 基线、加样、基线、缔合 (Kon) 和解离 (Kdis); 各个步骤运行时间取决于样品结合和解离速度, 转速为 1000 rpm, 温度为 30°C。实验完成后, 使用 ForteBio Octet 分析软件分析 KD 值。

结果见表 6, Fcmut-02 ~ 08 和抗原的 KD 值与 Fcmut-01 和抗原的 KD 值处于相同的数量级, 因此说明本发明公开的在 Fc 区的具体突变不会影响相应抗体与其抗原的亲和力, 进而表明包含本发明 Fc 突变体的抗体将保留其自有的抗原亲和力。

表 6. 抗体与抗原的亲和力

样品	抗原	响应(nm)	KD (M)	Kon (1/Ms)	Kdis (1/s)
Fcmut-01	Claudin18.2	0.1493	3.32E-09	6.02E+04	2.00E-04
Fcmut-02		0.138	2.73E-09	7.32E+04	2.00E-04
Fcmut-03		0.1496	2.90E-09	6.90E+04	2.00E-04

Fcmut-04		0.1462	2.83E-09	7.07E+04	2.00E-04
Fcmut-05		0.153	3.17E-09	6.32E+04	2.00E-04
Fcmut-06		0.1444	2.44E-09	8.19E+04	2.00E-04
Fcmut-07		0.1538	2.47E-09	8.09E+04	2.00E-04
Fcmut-08		0.1517	2.41E-09	8.29E+04	2.00E-04

实施例 6. 抗体介导的 ADCC 效应

Fc γ R 介导的主要效应子功能之一为抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用 (ADCC)，其由 NK 细胞和巨噬细胞上的 Fc γ RIIIA (CD16A) 介导。在前面实施例研究了本申请获得的携带 Fc 突变的抗体与 Fc 受体的亲和力之后，本实施例继续探讨所述抗体突变体的 ADCC 效应子功能。

本实施例使用 Promega 公司的 Jurkat-ADCCNF-AT luciferase 效应细胞株 (以下简称 ADCC 效应细胞)，通过检测 NF-AT 信号的激活情况，从而检测抗体的 ADCC 活性。具体实验过程如下：

1) 细胞准备

对表面过表达人 claudin18.2 的细胞 DANG-18.2 (CLS Cell Lines Service) 和 ADCC 效应细胞进行细胞计数：离心消除细胞 DANG-18.2 和 ADCC 效应细胞的上清，并用 PBS 溶液洗涤细胞两次，然后用检测培养基 (含 5% 低 IgG 血清的 1640 培养基 (Gibco)) 重悬细胞，将 ADCC 效应细胞的浓度调整为 6×10^6 个/mL，将 DANG-18.2 细胞的浓度调整为 1×10^6 个/mL。

2) 铺板：将靶细胞 DANG-18.2 铺 96 孔板，每孔 25 μ L。

3) 加入系列稀释的本发明的抗体：每个携带 Fc 区突变的抗体样品及对照样品的起始浓度如表 7 所列，然后进行三倍稀释，共获得 10 个稀释梯度，分别依次加入孔板中，每孔 25 μ L。

表 7. 抗体的起始浓度

蛋白名称	Fcmut-01	Fcmut-02	Fcmut-03	Fcmut-04	Fcmut-05	Fcmut-06	Fcmut-07	Fcmut-08
起始孔蛋白浓度 (μ g/mL)	30	300	300	300	300	300	300	300

4) 将 ADCC 效应细胞加入各个孔板中，每孔 25 μ L。

5) 37°C 培养箱中孵育 12 小时。

6) 取出 96 孔板，室温放置 10 分钟，每孔加入解冻的 Luciferase 测试试剂 (Bio-GloTM Luciferase assay reagent) 75 μ L。用酶标仪检测，用 GraphPad

软件拟合浓度依赖的曲线。

检测结果如图 4 所示，对照抗体 Fcmut-01 具有野生型 IgG1 单克隆抗体的 Fc 区，其通过结合靶细胞（DANG-18.2）上的抗原，可以有效激活 ADCC 效应细胞的 NF-AT 信号，从而启动 ADCC 的下游信号通路，表明该抗体具有优良的 ADCC 杀伤能力。然而，本申请获得的携带 Fc 区突变的其他抗体则表现出非常弱或几近于无的 ADCC 效应，具体而言：突变体 Fcmut-05(携带 L234A & L235A 突变)在 10 倍大于对照 Fcmut-01 的浓度下展示出非常弱的 ADCC 活性，而其他的突变体即便在 10 倍大于对照 Fcmut-01 的高浓度下也没有 ADCC 活性，表明本申请获得的携带 Fc 区突变的抗体分子的 ADCC 效应功能实质上被消除，该结果也与实施例 3 中各个抗体分子与 CD16A 的亲合力数据一致。

根据现有技术可知，通过对 Fc 区进行 LALA 突变，可以显著降低抗体的 ADCC 效应，本实施例的结果表明相比较于 LALA 突变，本申请获得的 Fc 突变体对 ADCC 效应的降低效果更大。

本申请通过对抗体 Fc 区第 329 位、330 位、234 位或 235 位的一个或者多个氨基酸进行突变修饰（例如，缺失、取代）获得的抗体突变体基本上消除了 ADCC 效应子功能，由此表明，上述氨基酸位置对于抗体的 ADCC/ADCP 效应子功能至关重要。当目标抗体在实际需求中需要避免 ADCC/ADCP 效应子功能时，本领域技术人员将可以根据本申请公开的内容选择对 Fc 区第 329 位、330 位、234 位或 235 位的一个或者多个氨基酸进行相应修饰，从而产生实际的技术效果。具体而言，可以考虑缺失抗体 Fc 区的第 329 位氨基酸、缺失第 329-330 位氨基酸、缺失第 329 位氨基酸以及取代第 320 位氨基酸，以及将上述修饰与 LALA 修饰（L234A+L235A）组合应用，从而获得消除 ADCC/ADCP 效应子功能的抗体分子。

权利要求

1. 一种 Fc 突变体，其相对于人野生型 Fc 区包含一个或者多个氨基酸修饰，所述修饰选自依据 Kabat 中的 EU 索引编号的第 329 位、第 234 位、第 235 位或第 330 位氨基酸。

2. 权利要求 1 的 Fc 突变体，其包含如下修饰：

1) 依据 Kabat 中的 EU 索引编号的第 329 位氨基酸的缺失 ($\Delta 329$)；
或

2) 依据 Kabat 中的 EU 索引编号的第 329 位和第 330 位氨基酸的缺失 ($\Delta 329$ 和 $\Delta 330$)；或

4) 依据 Kabat 中的 EU 索引编号的如下修饰： $\Delta 329$ +A330G 或者 $\Delta 329$ +S330G；或

5) 依据 Kabat 中的 EU 索引编号的如下修饰：L234A+L235A+ $\Delta 329$ 、V234A+ $\Delta 329$ 或 F234A+L235A+ $\Delta 329$ ；或

6) 依据 Kabat 中的 EU 索引编号的如下修饰：L234A+L235A+ $\Delta 329$ + $\Delta 330$ 、V234A+ $\Delta 329$ + $\Delta 330$ 或 F234A+L235A+ $\Delta 329$ + $\Delta 330$ ；或

7) 依据 Kabat 中的 EU 索引编号的如下修饰：L234A+L235A+A330G+ $\Delta 329$ 、L234A+L235A+S330G+ $\Delta 329$ 、V234A+L235A+A330G+ $\Delta 329$ 、V234A+L235A+S330G+ $\Delta 329$ 、F234A+L235A+S330G+ $\Delta 329$ 或 F234A+L235A+A330G+ $\Delta 329$ 。

3. 权利要求 1 或 2 所述的 Fc 突变体，其为人 IgG 型 Fc 突变体，优选地其为 IgG1、IgG2、IgG4 型 Fc 突变体。

4. 权利要求 1-3 中任一项所述 Fc 突变体，其包含如下序列：

1) SEQ ID NO :2 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列，或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列，或者由该序列组成，或

2) SEQ ID NO :3 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列，或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、

甚至更高的同一性的氨基酸序列，或者由该序列组成，或

3) SEQ ID NO :4 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列，或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列，或者由该序列组成，或

4) SEQ ID NO :5 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列，或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列，或者由该序列组成，或

5) SEQ ID NO :6 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列，或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列，或者由该序列组成，或

6) SEQ ID NO :7 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列，或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列，或者由该序列组成，或

7) SEQ ID NO :8 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列，或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列，或者由该序列组成，或

8) SEQ ID NO :11 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列，或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列，或者由该序列组成，或

9) SEQ ID NO :12 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列，或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列，或者由该序列组成，或

10) SEQ ID NO :13 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列，或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列，或者由该序列组成，或

11) SEQ ID NO :14 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列，或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列，或者由该序列组成，或

12) SEQ ID NO :15 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列，或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列，或者由该序列组成，或

13) SEQ ID NO :16 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列, 或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列, 或者由该序列组成, 或

14) SEQ ID NO :17 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列, 或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列, 或者由该序列组成, 或

15) SEQ ID NO :19 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列, 或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列, 或者由该序列组成, 或

16) SEQ ID NO :20 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列, 或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列, 或者由该序列组成, 或

17) SEQ ID NO :21 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列, 或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列, 或者由该序列组成, 或

18) SEQ ID NO :22 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列, 或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列, 或者由该序列组成, 或

19) SEQ ID NO :23 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列, 或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列, 或者由该序列组成, 或

20) SEQ ID NO :24 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列, 或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列, 或者由该序列组成, 或

21) SEQ ID NO :25 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列, 或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列, 或者由该序列组成, 或

22) SEQ ID NO :27 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列, 或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列, 或者由该序列组成, 或

23) SEQ ID NO :28 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列, 或者与

该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列，或者由该序列组成，或

24) SEQ ID NO :29 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列，或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列，或者由该序列组成，或

25) SEQ ID NO :30 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列，或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列，或者由该序列组成，或

26) SEQ ID NO :31 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列，或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列，或者由该序列组成，或

27) SEQ ID NO :32 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列，或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列，或者由该序列组成，或

28) SEQ ID NO :33 中按照 EU 索引第 221-447 位氨基酸的序列，或者与该序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至更高的同一性的氨基酸序列，或者由该序列组成。

5. 一种多肽，其包含权利要求 1-4 中任一项所述的 Fc 突变体。

6. 权利要求 5 所述的多肽，其是抗体分子，优选地，所述抗体分子是 IgG 类抗体分子。

7. 权利要求 6 所述的包含 Fc 突变体的抗体分子，其包含如下的重链和轻链：

- 1) 包含 SEQ ID NO :2 所示的重链和 SEQ ID NO :9 所示的轻链；或
- 2) 包含 SEQ ID NO :3 所示的重链和 SEQ ID NO :9 所示的轻链；或
- 3) 包含 SEQ ID NO :4 所示的重链和 SEQ ID NO :9 所示的轻链；或
- 4) 包含 SEQ ID NO :5 所示的重链和 SEQ ID NO :9 所示的轻链；或
- 5) 包含 SEQ ID NO :6 所示的重链和 SEQ ID NO :9 所示的轻链；或
- 6) 包含 SEQ ID NO :7 所示的重链和 SEQ ID NO :9 所示的轻链；或

- 7) 包含 SEQ ID NO :8 所示的重链和 SEQ ID NO :9 所示的轻链；或
- 8) 包含 SEQ ID NO : 11 所示的重链和 SEQ ID NO :9 所示的轻链；或
- 9) 包含 SEQ ID NO : 12 所示的重链和 SEQ ID NO :9 所示的轻链；或
- 10) 包含 SEQ ID NO : 13 所示的重链和 SEQ ID NO :9 所示的轻链；或
- 11) 包含 SEQ ID NO : 14 所示的重链和 SEQ ID NO :9 所示的轻链；或
- 12) 包含 SEQ ID NO : 15 所示的重链和 SEQ ID NO :9 所示的轻链；或
- 13) 包含 SEQ ID NO : 16 所示的重链和 SEQ ID NO :9 所示的轻链；或
- 14) 包含 SEQ ID NO : 17 所示的重链和 SEQ ID NO :9 所示的轻链；或
- 15) 包含 SEQ ID NO : 19 所示的重链和 SEQ ID NO :9 所示的轻链；或
- 16) 包含 SEQ ID NO : 20 所示的重链和 SEQ ID NO :9 所示的轻链；或
- 17) 包含 SEQ ID NO : 21 所示的重链和 SEQ ID NO :9 所示的轻链；或
- 18) 包含 SEQ ID NO : 22 所示的重链和 SEQ ID NO :9 所示的轻链；或
- 19) 包含 SEQ ID NO : 23 所示的重链和 SEQ ID NO :9 所示的轻链；或
- 20) 包含 SEQ ID NO : 24 所示的重链和 SEQ ID NO :9 所示的轻链；或
- 21) 包含 SEQ ID NO : 25 所示的重链和 SEQ ID NO :9 所示的轻链；或
- 22) 包含 SEQ ID NO : 27 所示的重链和 SEQ ID NO :34 所示的轻链；或
- 23) 包含 SEQ ID NO : 28 所示的重链和 SEQ ID NO :34 所示的轻链；或
- 24) 包含 SEQ ID NO : 29 所示的重链和 SEQ ID NO :34 所示的轻链；或
- 25) 包含 SEQ ID NO : 30 所示的重链和 SEQ ID NO :34 所示的轻链；或
- 26) 包含 SEQ ID NO : 31 所示的重链和 SEQ ID NO :34 所示的轻链；或
- 27) 包含 SEQ ID NO : 32 所示的重链和 SEQ ID NO :34 所示的轻链；或
- 28) 包含 SEQ ID NO : 33 所示的重链和 SEQ ID NO :34 所示的轻链。

8. 一种药物组合物，其包含权利要求 1-4 任一项所述的 Fc 突变体，或者包含权利要求 5-7 中任一项所述的多肽，及可药用载体。

9. 权利要求 1-4 任一项所述的 Fc 突变体在减少或者消除 ADCC、ADCP 或 CDC 效应子功能中的用途。

10. 编码权利要求 1-4 任一项所述的 Fc 突变体、或编码权利要求 5-7 中任一项所述的多肽的核酸分子。

11. 一种载体，其包含权利要求 10 所述的核酸分子。
12. 一种宿主细胞，其包含权利要求 10 所述的核酸分子或 11 所述的载体。
13. 一种治疗受试者的肿瘤的方法，包括将有效量的权利要求 8 所述的药物组合物或权利要求 1-4 中任一项所述的 Fc 突变体，或者权利要求 5-7 中任一项所述的多肽施用给有需要的受试者。
14. 一种试剂盒，其包含权利要求 1-4 任一项所述的 Fc 突变体、权利要求 5-7 中任一项所述的多肽。
15. 一种制备如权利要求 1-4 中任一项所述的 Fc 突变体，或者制备如权利要求 5-7 中任一项所述的多肽的方法，包括在适当的条件下在如权利要求 12 所述的宿主细胞中表达如权利要求 10 所述的核酸分子或者表达如权利要求 11 所述的载体，任选地，所述方法还包括回收表达的 Fc 突变体或多肽。

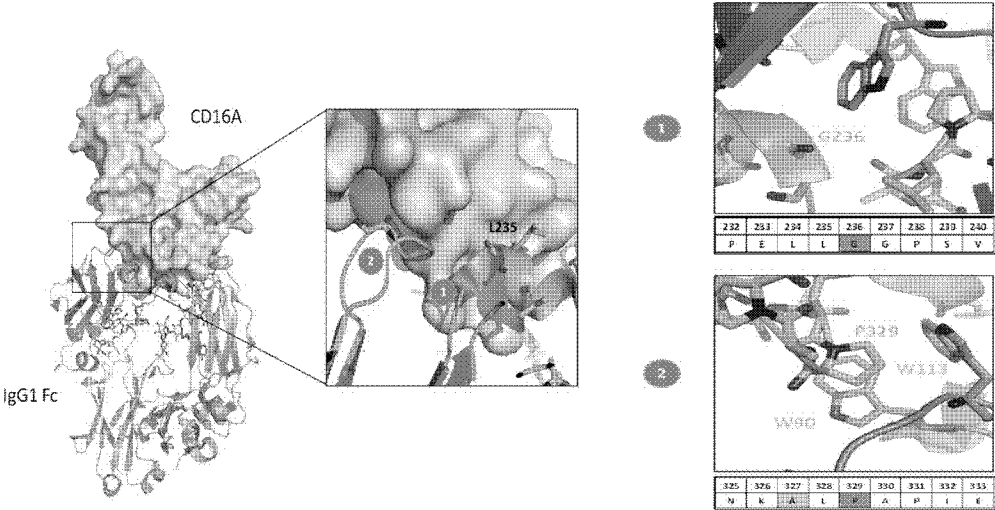


图 1

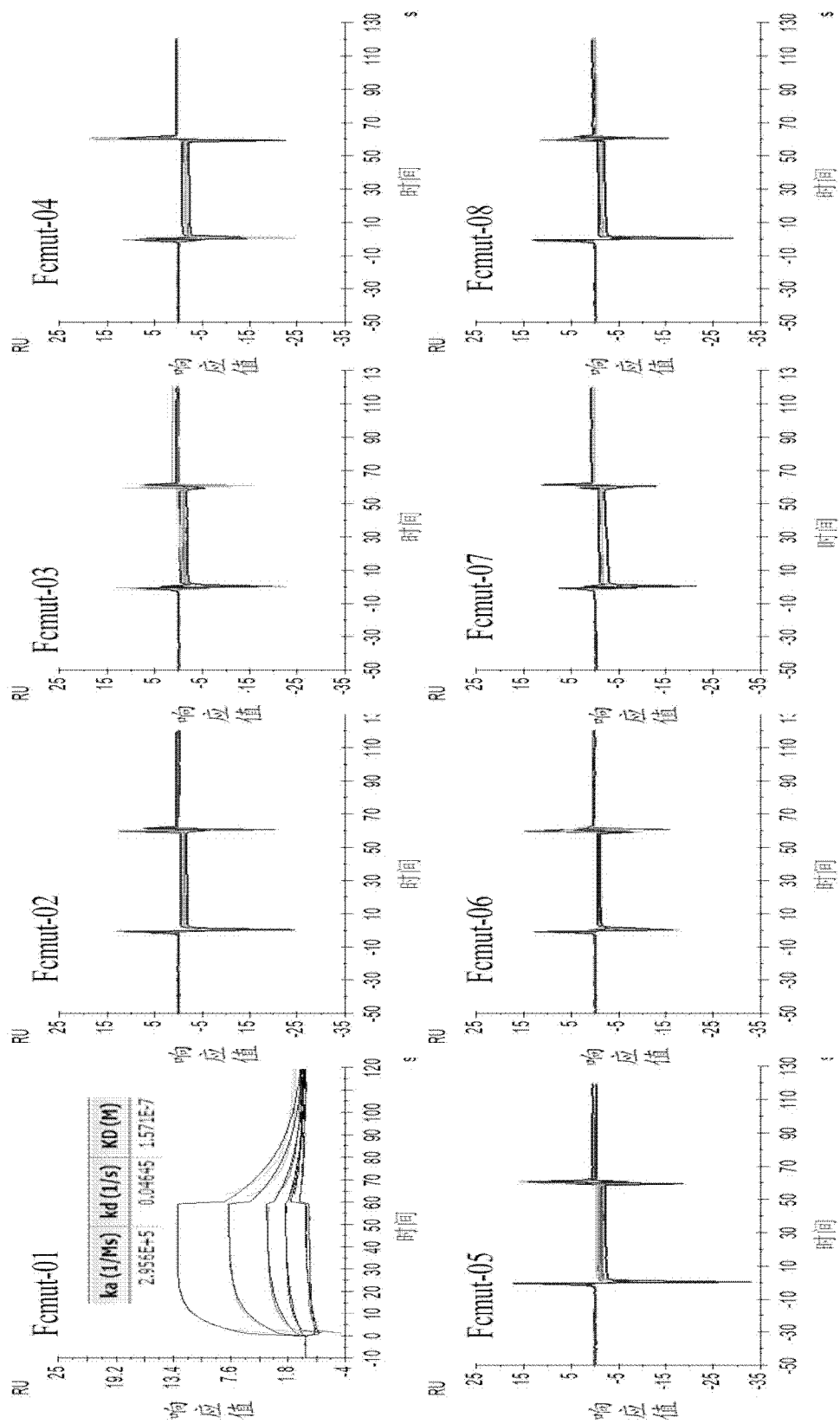


图 2a

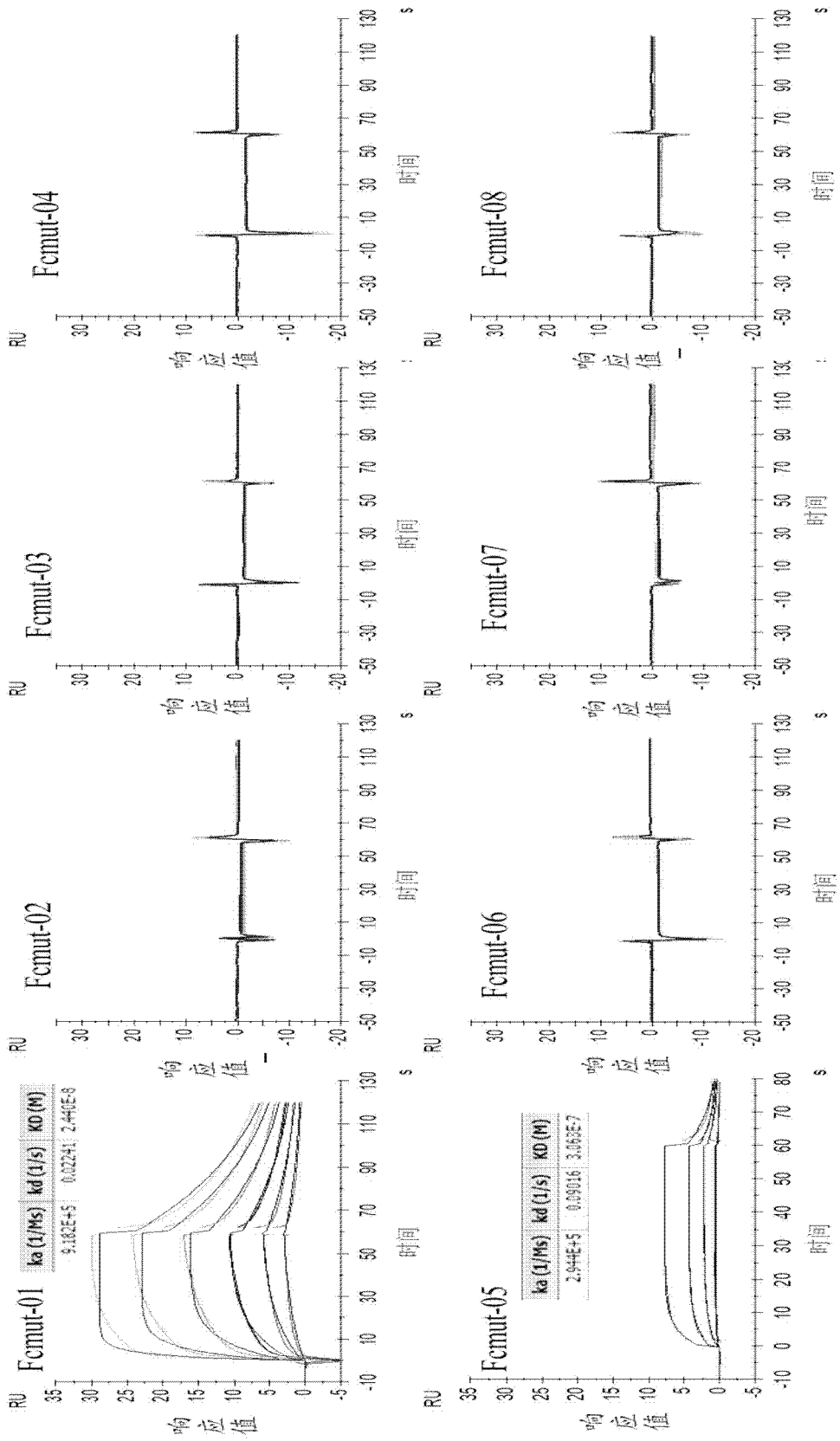


图 2b

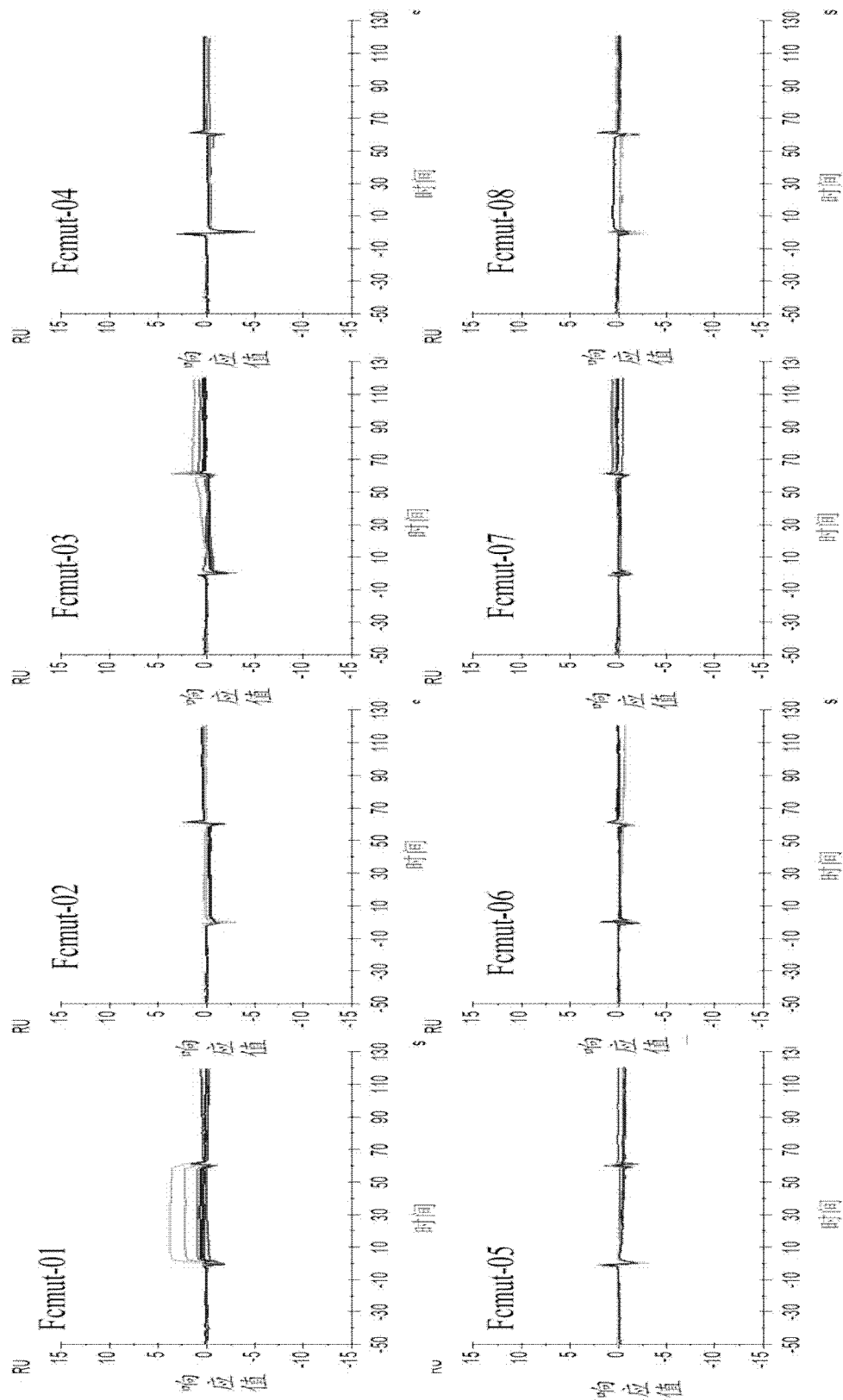


图 2c

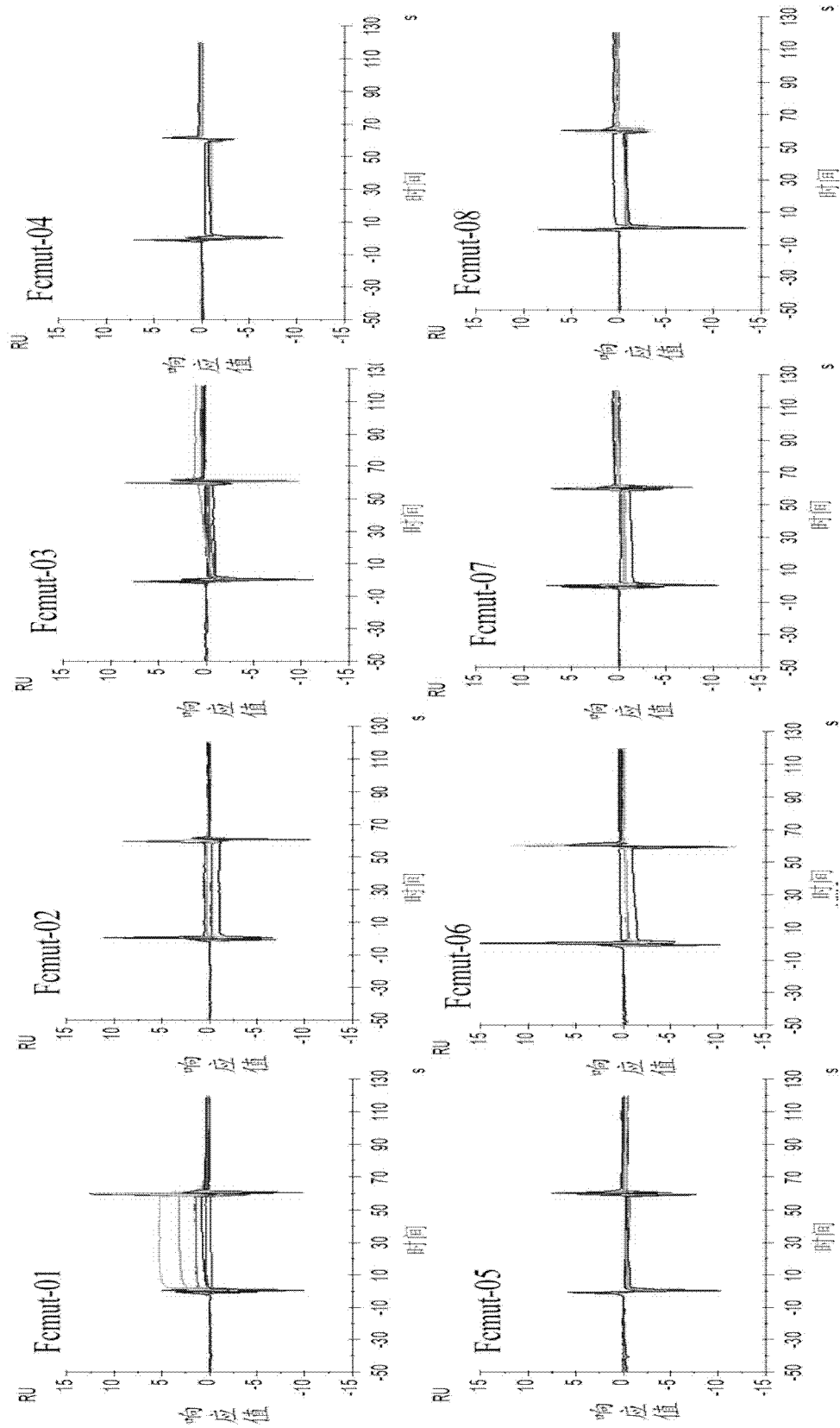


图 2d

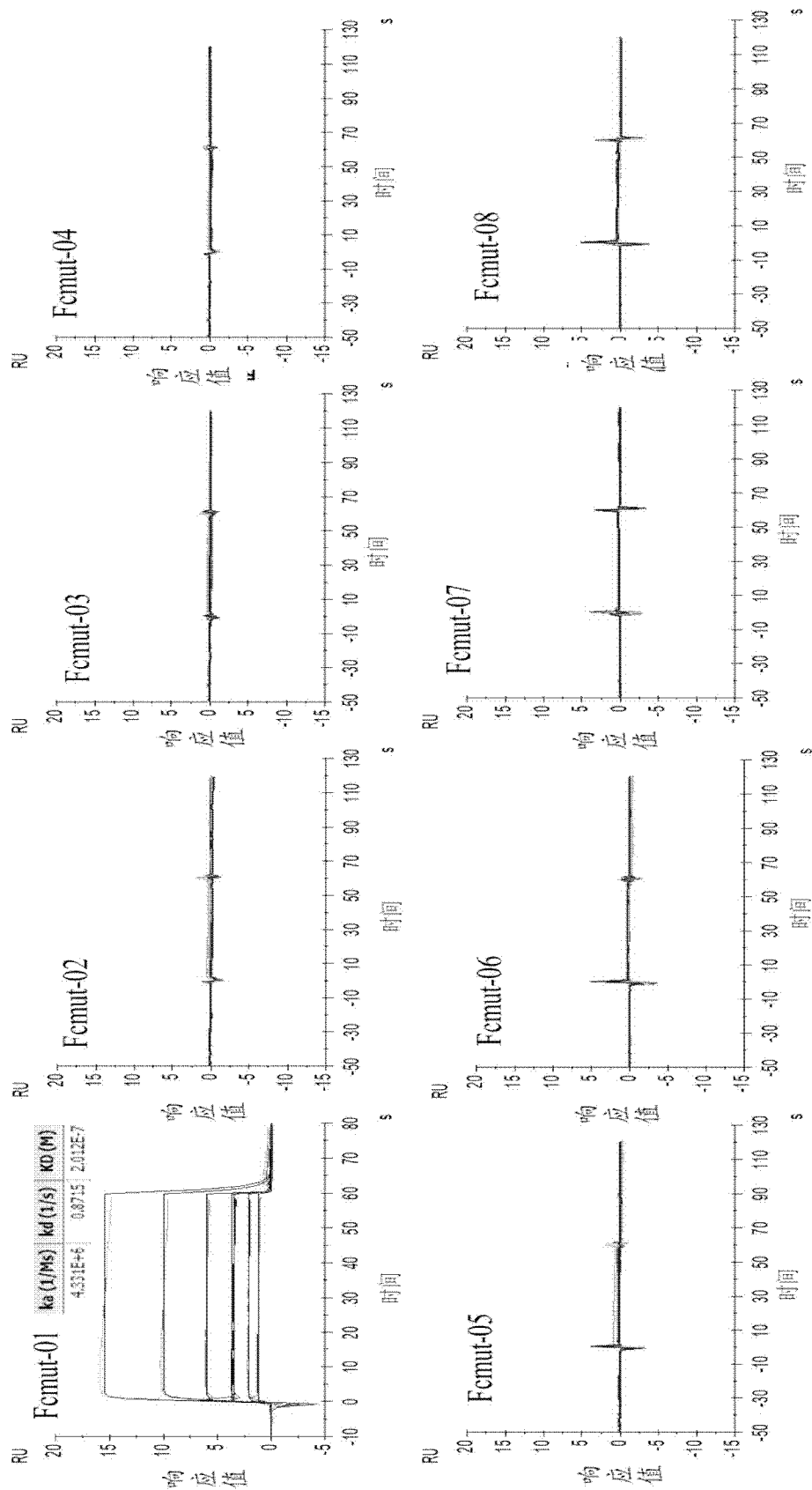


图 2e

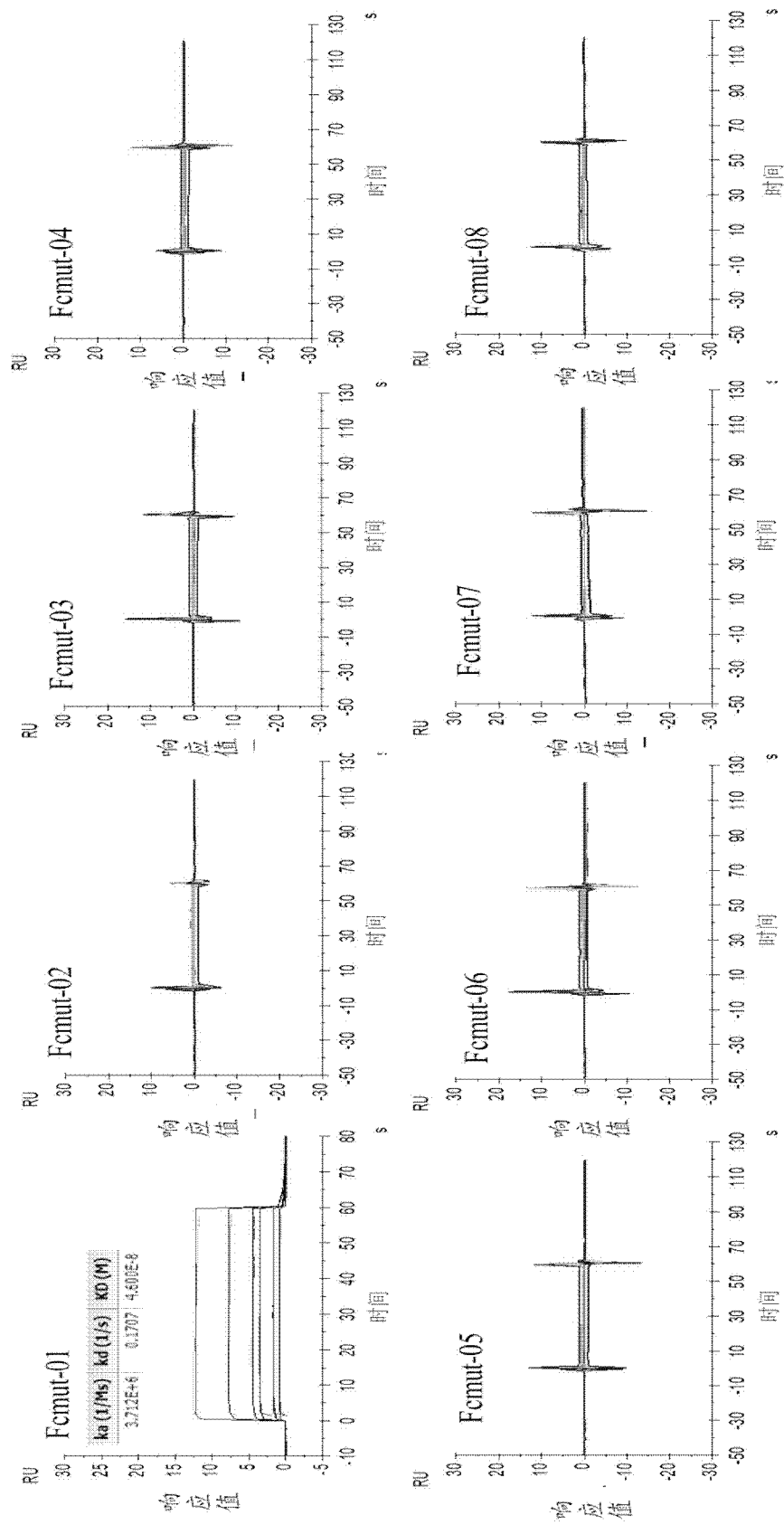


图 2f

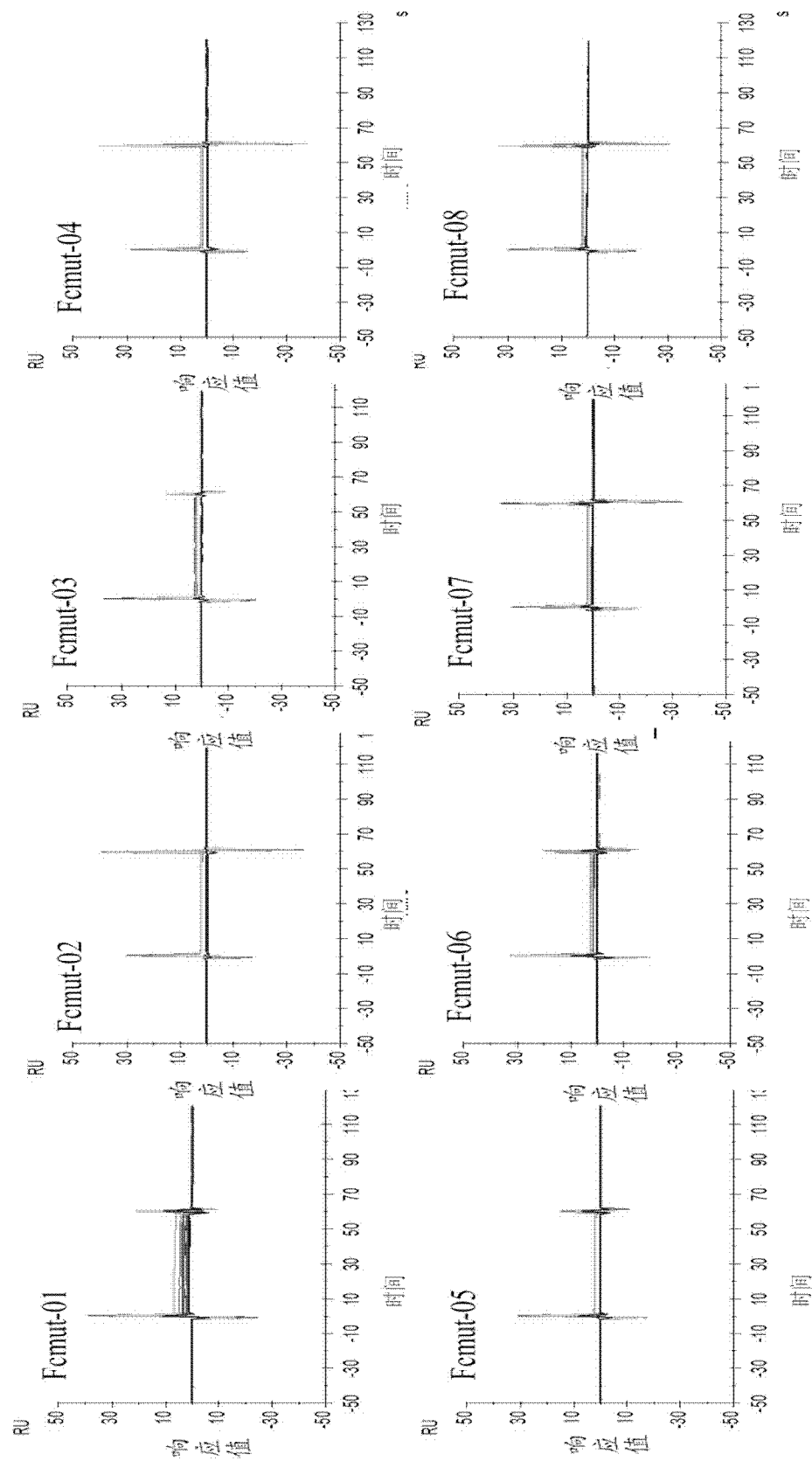


图 2g

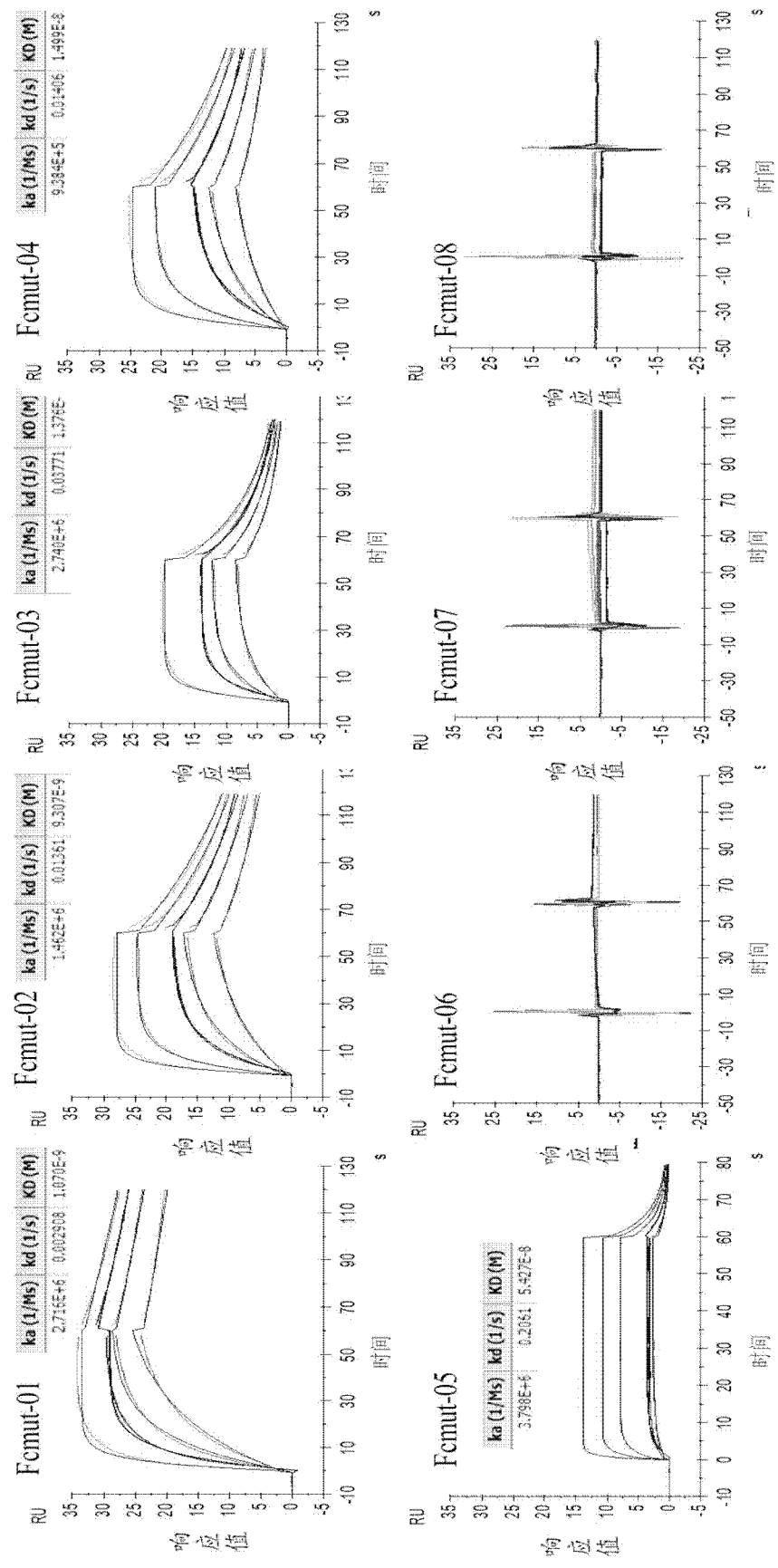


图 2h

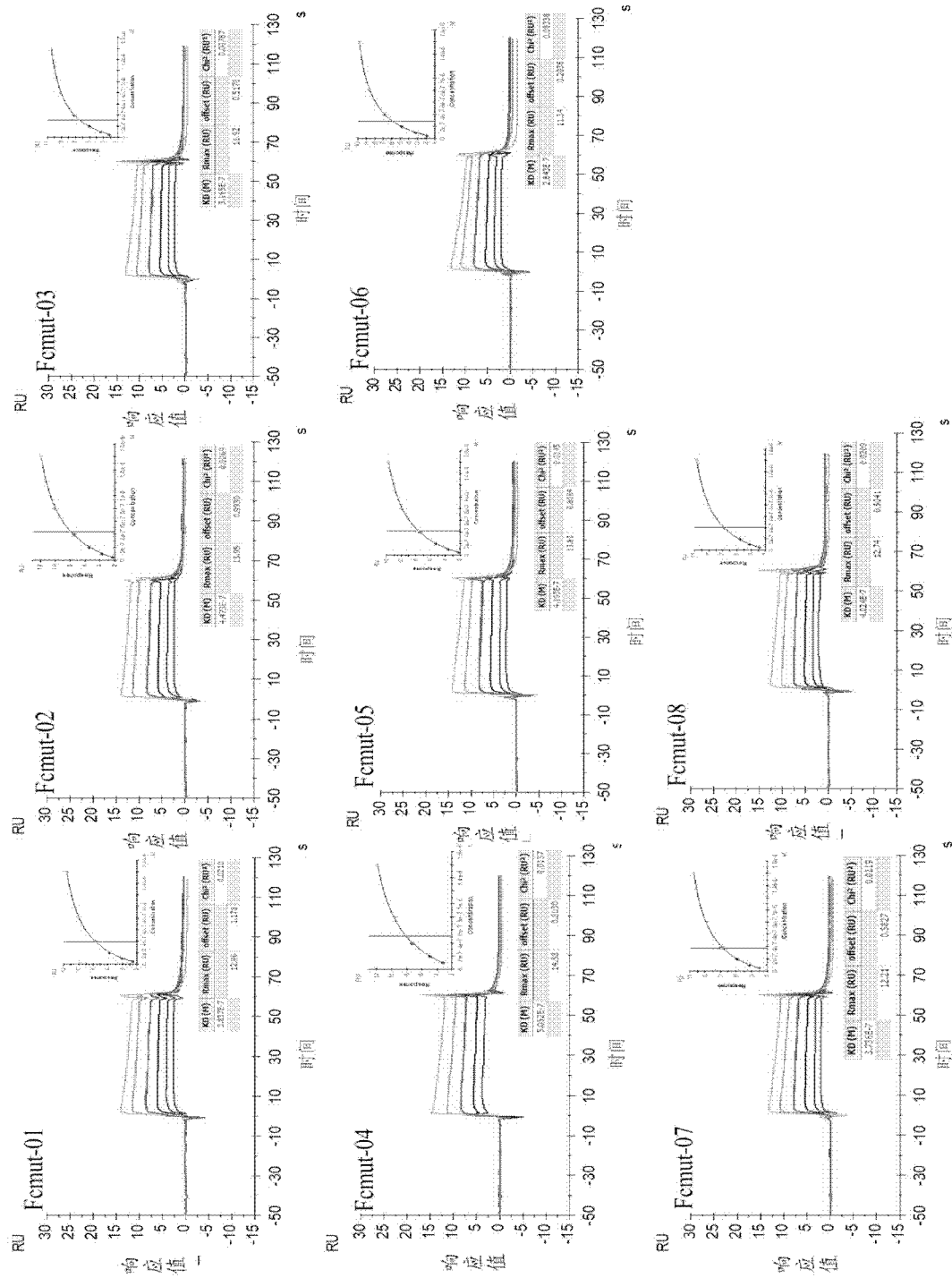


图 2i

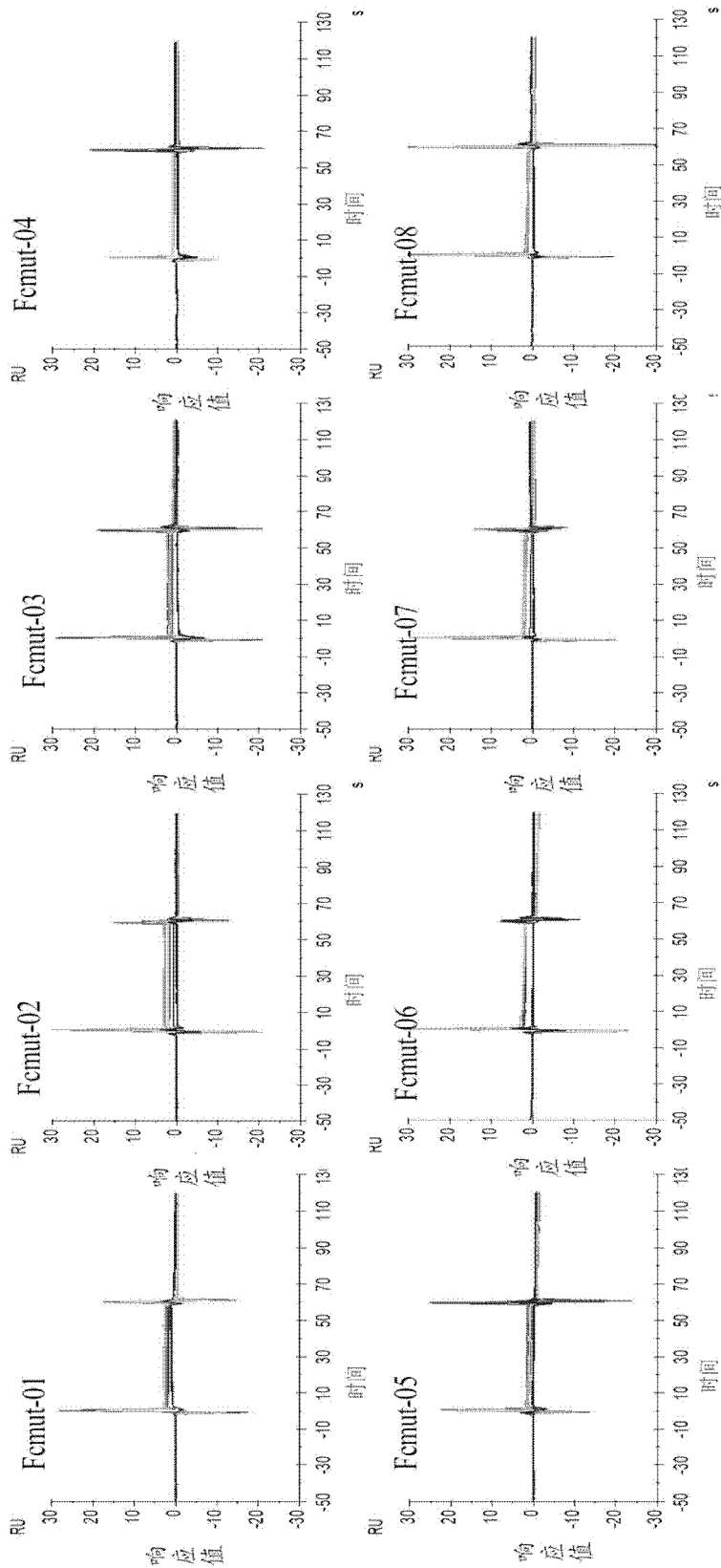


图 2j

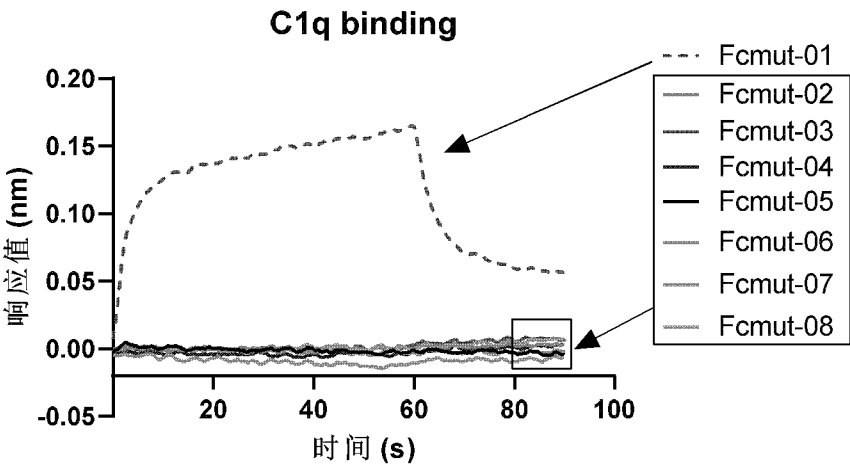
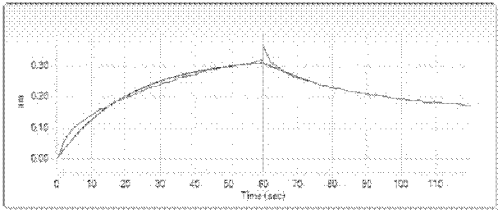
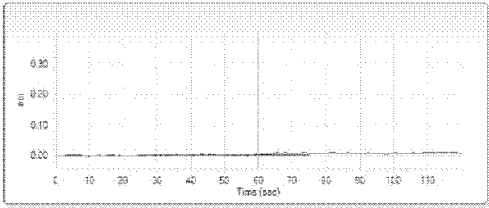


图 2k

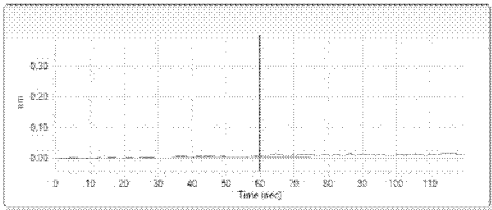
Fc-25



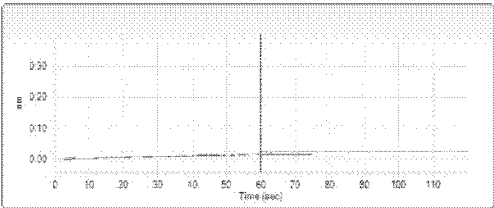
Fc-26



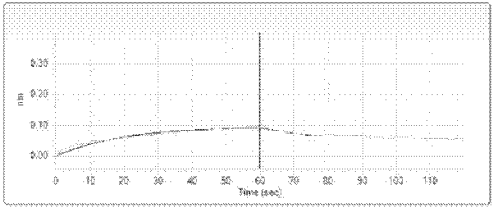
Fc-27



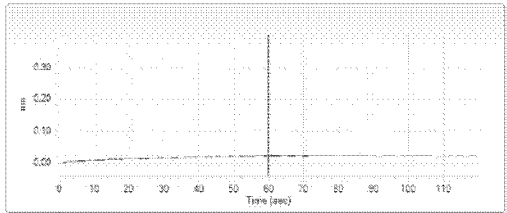
Fc-28



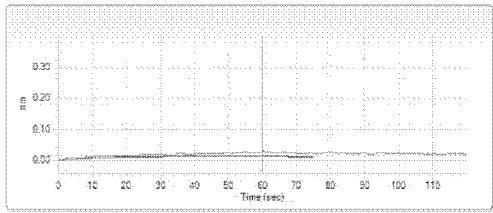
Fc-29



Fc-30



Fc-31



Fc-32

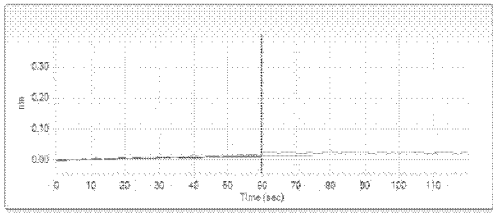
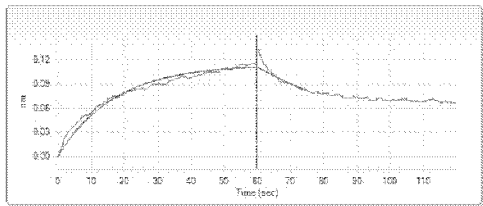
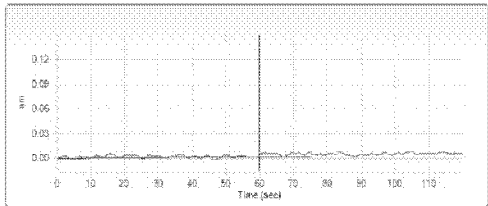


图 3a

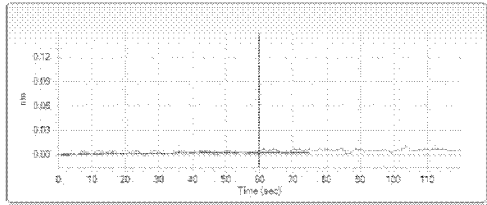
Fc-25



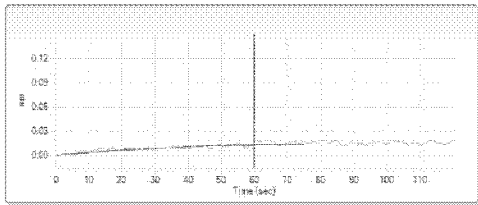
Fc-26



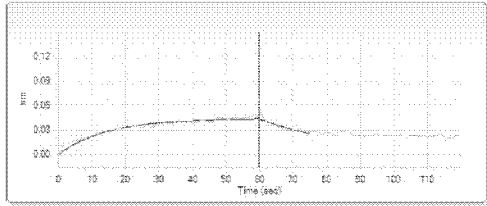
Fc-27



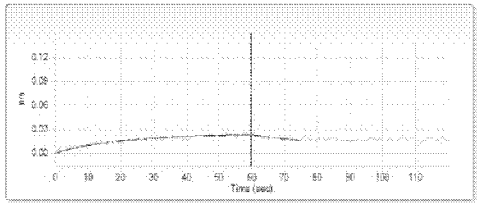
Fc-28



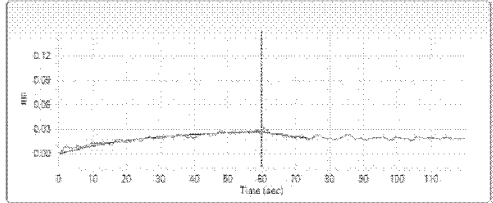
Fc-29



Fc-30



Fc-31



Fc-32

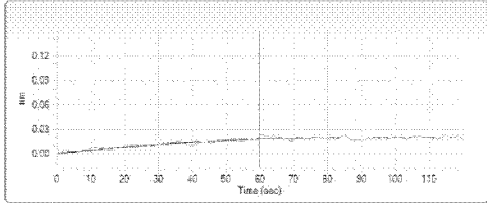
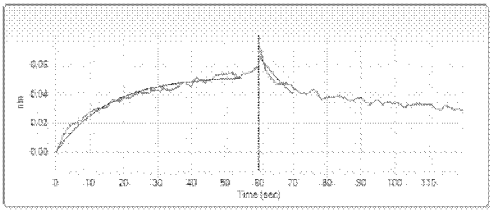
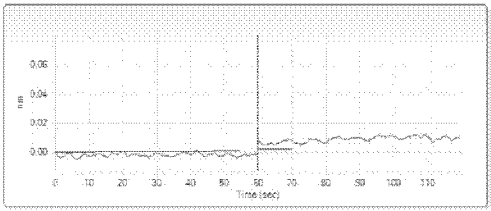


图 3b

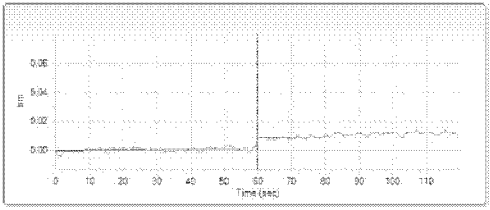
Fc-25



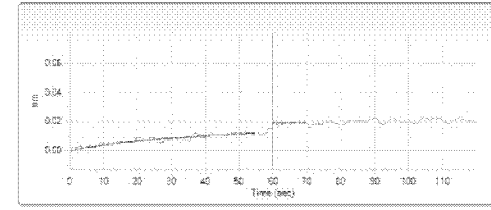
Fc-26



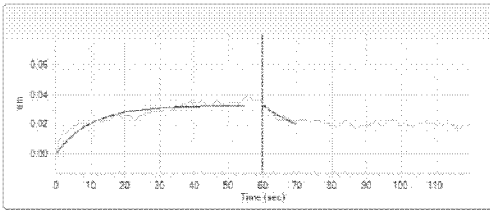
Fc-27



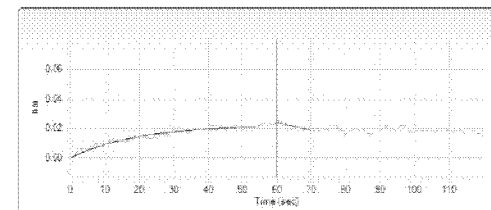
Fc-28



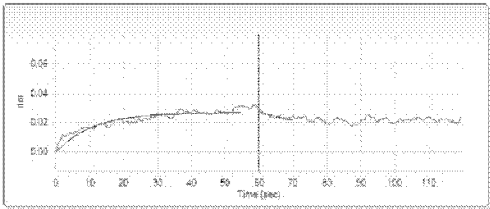
Fc-29



Fc-30



Fc-31



Fc-32

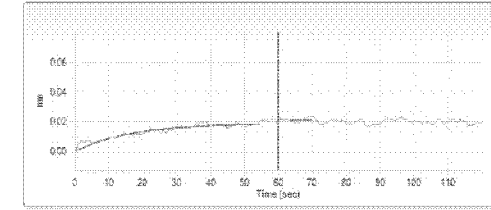
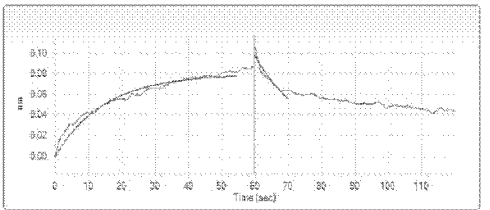
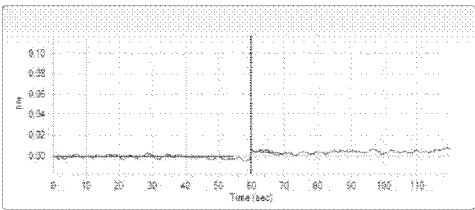


图 3c

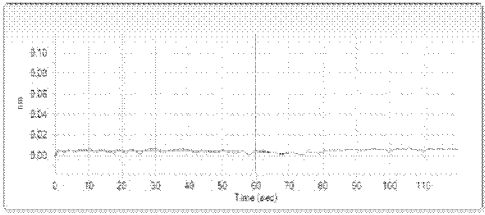
Fc-25



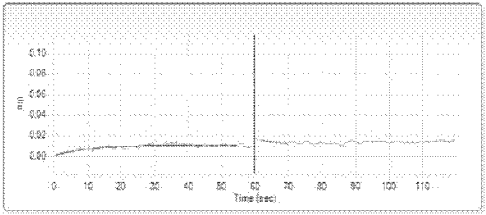
Fc-26



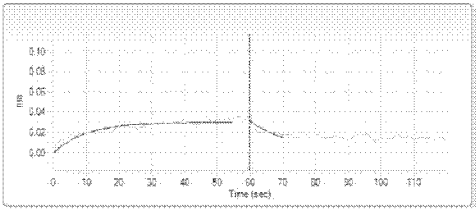
Fc-27



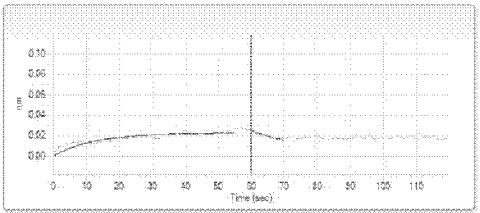
Fc-28



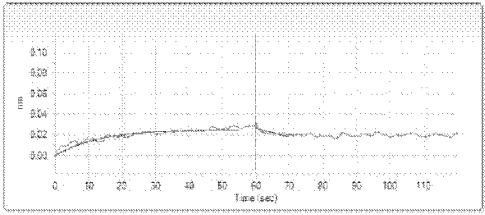
Fc-29



Fc-30



Fc-31



Fc-32

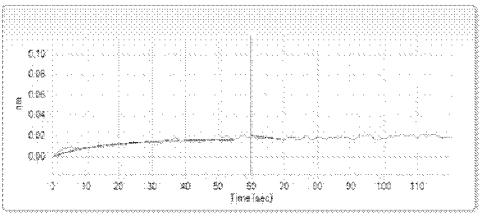
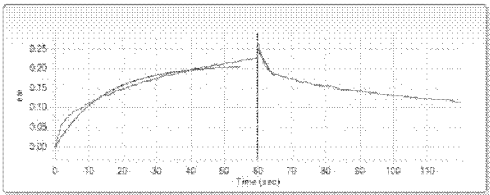
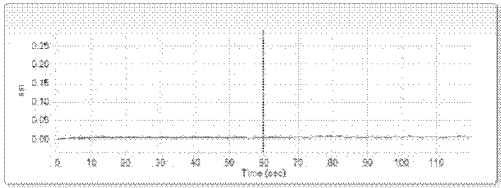


图 3d

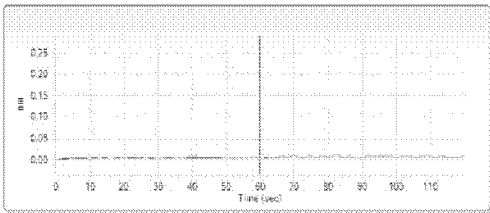
Fc-25



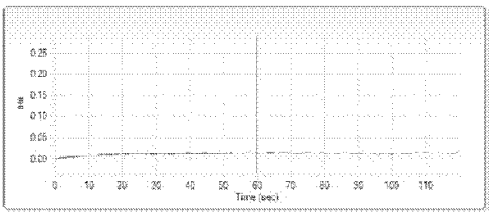
Fc-26



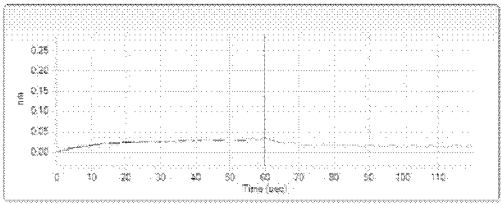
Fc-27



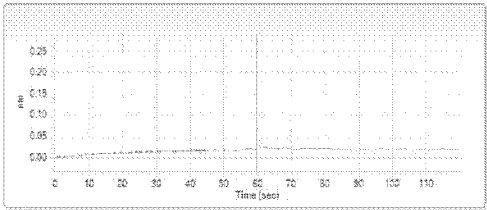
Fc-28



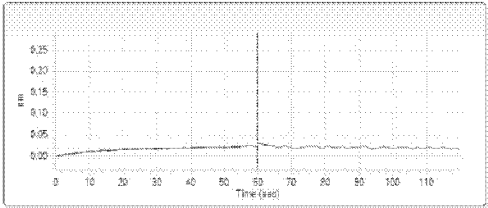
Fc-29



Fc-30



Fc-31



Fc-32

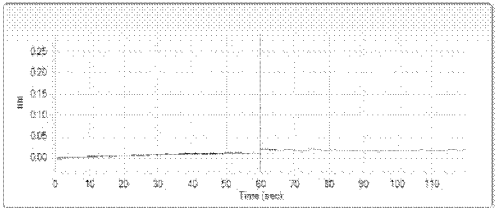
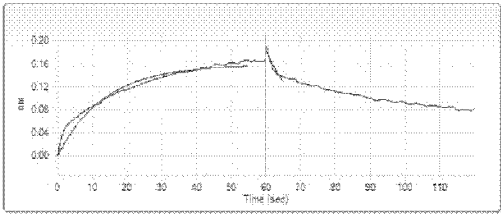
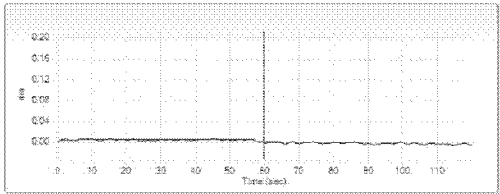


图 3e

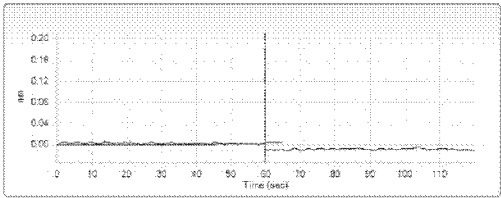
Fc-25



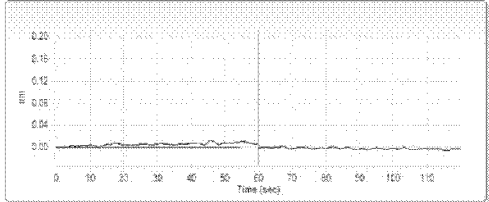
Fc-26



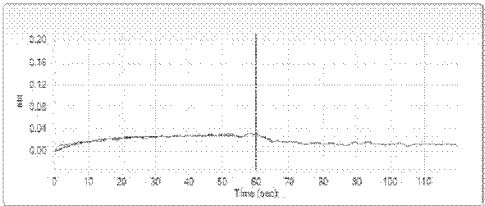
Fc-27



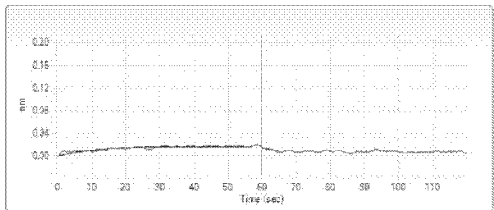
Fc-28



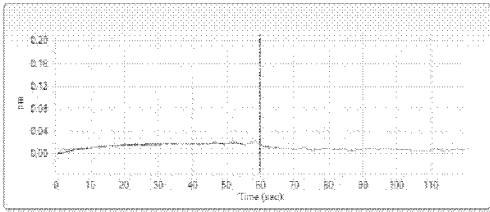
Fc-29



Fc-30



Fc-31



Fc-32

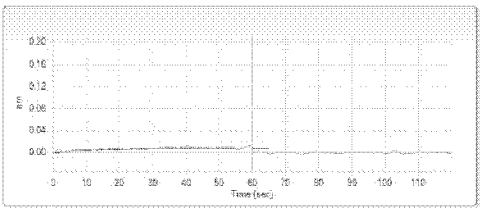
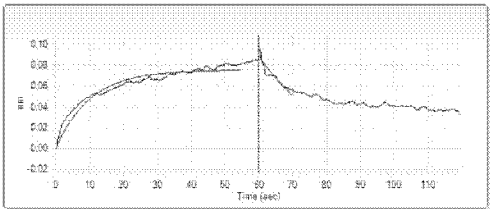
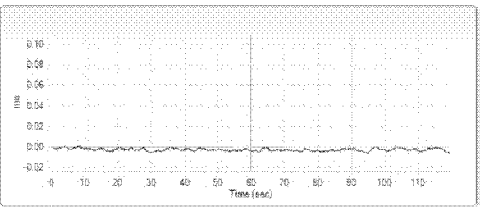


图 3f

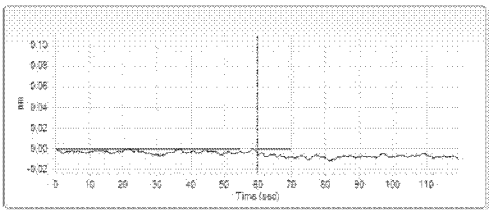
Fc-25



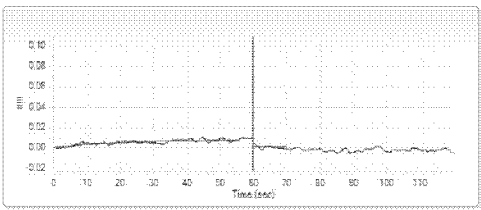
Fc-26



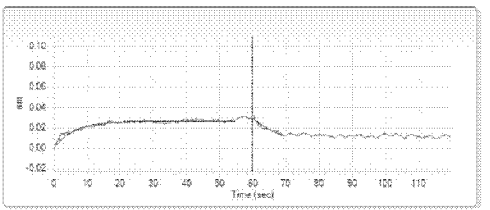
Fc-27



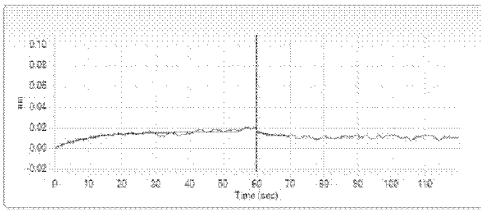
Fc-28



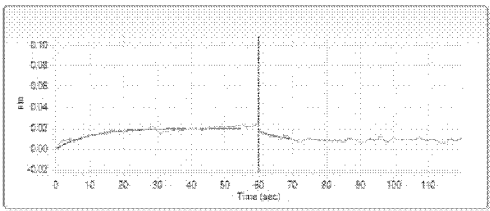
Fc-29



Fc-30



Fc-31



Fc-32

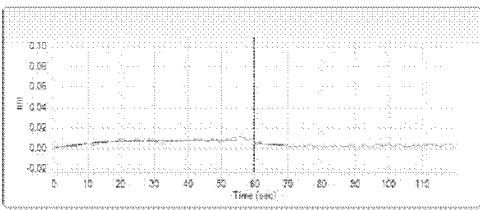
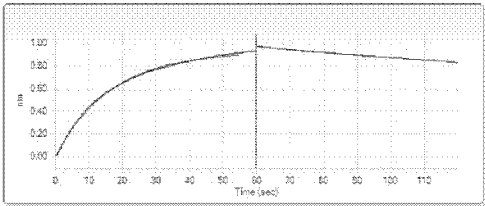
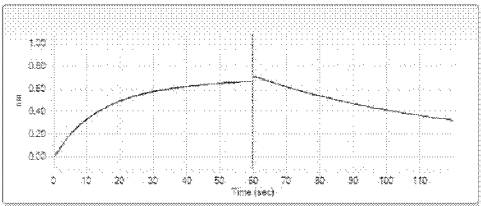


图 3g

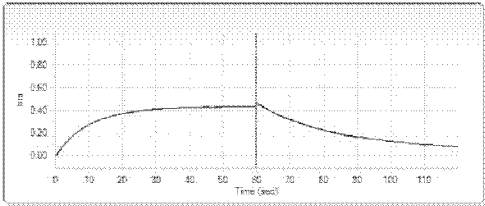
Fc-25



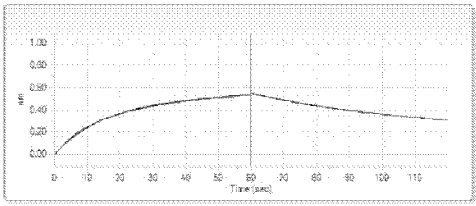
Fc-26



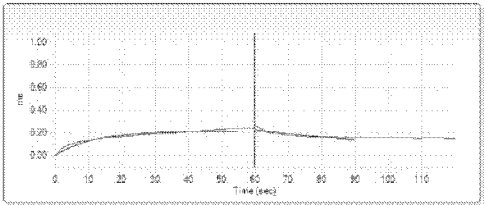
Fc-27



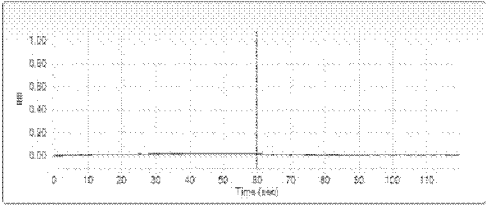
Fc-28



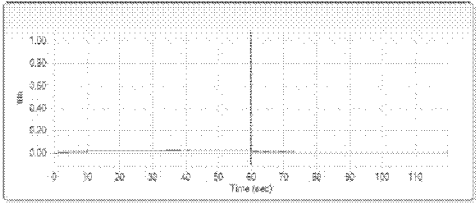
Fc-29



Fc-30



Fc-31



Fc-32

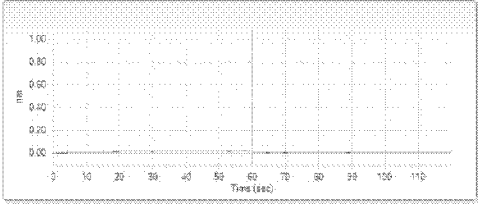
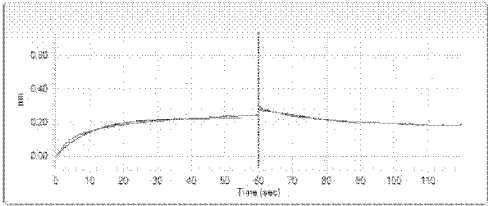
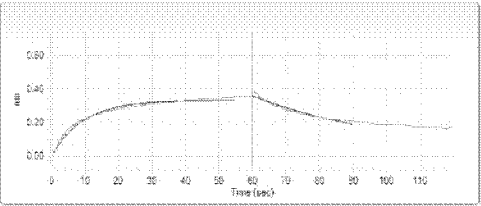


图 3h

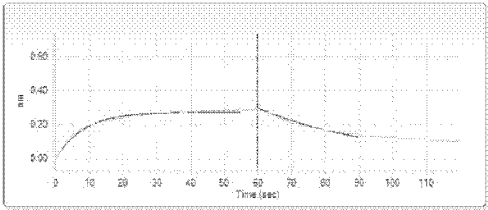
Fc-25



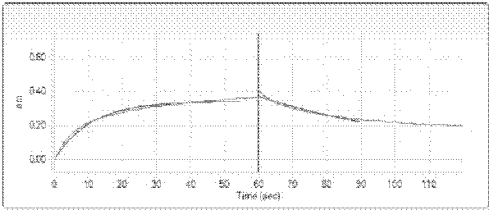
Fc-26



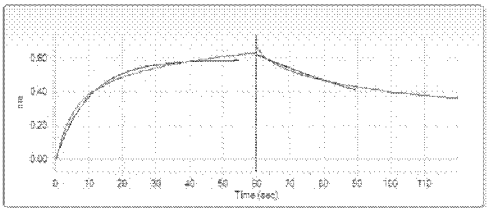
Fc-27



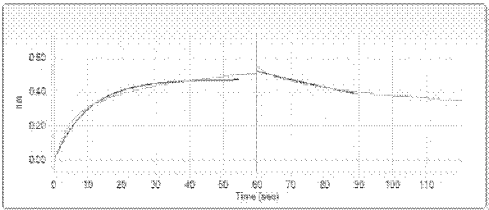
Fc-28



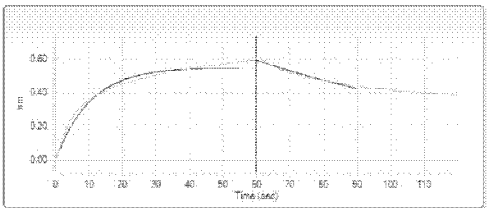
Fc-29



Fc-30



Fc-31



Fc-32

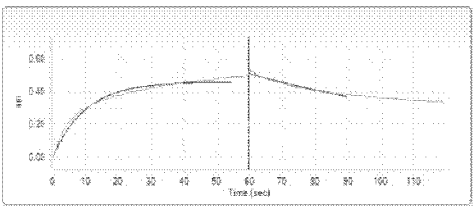


图 3i

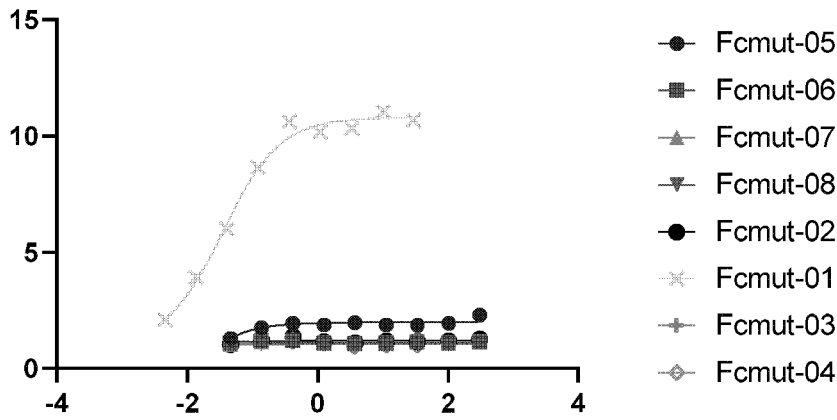


图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/091187

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/00(2006.01)i; C12N 9/16(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; C12N; A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, ELSEVIER, ISI Web of Knowledge, PubMed, 中国专利生物序列检索系统, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System, NCBI, EMBL, STN: Fc, ADCC, ADCP, CDC, 第329位, 第234位, 第235位, 第330位, 缺失, 取代, Δ329, L234A, F234A, V234A, L235A, Δ330, A330G, S330G, SEQ ID NOs: 2-33

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 108713027 A (JANSSEN BIOTECHNOLOGY INC.) 26 October 2018 (2018-10-26) claims 1 and 27-57, and description, paragraphs 0437-0457	1-15
Y	CN 108713027 A (JANSSEN BIOTECHNOLOGY INC.) 26 October 2018 (2018-10-26) claims 1 and 27-57, and description, paragraphs 0437-0457	2-15
X	CN 101987870 A (XENCOR INC.) 23 March 2011 (2011-03-23) description, paragraphs 0023 and 0032-0036	1-15
Y	CN 101987870 A (XENCOR INC.) 23 March 2011 (2011-03-23) description, paragraphs 0023 and 0032-0036	2-15
X	CN 109963871 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 02 July 2019 (2019-07-02) claims 95-107, and p. 106, the last paragraph, SEQ ID NO: 244	1-15
Y	CN 109963871 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 02 July 2019 (2019-07-02) claims 95-107, and p. 106, the last paragraph, SEQ ID NO: 244	2-15
X	CN 104395339 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 04 March 2015 (2015-03-04) claims 1-8, and descriptions 0085-0096	1-15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
 “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 “&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 July 2022

Date of mailing of the international search report

02 August 2022

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088, China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/091187**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 104395339 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 04 March 2015 (2015-03-04) claims 1-8, and descriptions 0085-0096	2-15
A	WO 2004092219 A2 (PROTEIN DESIGN LABS INC. et al.) 28 October 2004 (2004-10-28) entire document	1-15
A	WO 2020039321 A2 (PFIZER INC.) 27 February 2020 (2020-02-27) entire document	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/091187**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/091187**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **9,13**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 - [1] The technical solution of claim 9 relates to "a use of the Fc mutant according to any one of claims 1-4 in reducing or eliminating an ADCC, ADCP or CDC effector function". Claim 13 relates to "a method for treating a tumor in a subject", belonging to the subject matter as defined in PCT Rule 39(iv).
However, in the present search report, a search was conducted on the basis of a use of the Fc mutant or a polypeptide comprising the Fc mutant in the preparation of a drug for reducing or eliminating an ADCC, ADCP or CDC effector function or treating a tumor in a subject.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/091187

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	108713027	A	26 October 2018	KR	20180087430	A	01 August 2018
				EP	3390453	A2	24 October 2018
				US	2018355043	A1	13 December 2018
				BR	112018012344	A2	04 December 2018
				AU	2016371034	A1	31 May 2018
				WO	2017106684	A2	22 June 2017
				MA	44072	A	24 October 2018
				CA	3008819	A1	22 June 2017
				JP	2019502698	A	31 January 2019
CN	101987870	A	23 March 2011	EP	1919950	A1	14 May 2008
				JP	2008505174	A	21 February 2008
				EP	2940043	A1	04 November 2015
				AU	2005272993	A1	23 February 2006
				EP	2471813	A1	04 July 2012
				ES	2530340	T3	02 March 2015
				EP	3342782	A1	04 July 2018
				IL	179048	D0	08 March 2007
				BR	PI0510674	A	26 December 2007
				WO	2006019447	A1	23 February 2006
				CA	2565961	A1	23 February 2006
				CN	103351434	A	16 October 2013
				JP	2011188869	A	29 September 2011
				CN	103172731	A	26 June 2013
				KR	20070029190	A	13 March 2007
				CN	101014619	A	08 August 2007
				SI	2471813	T1	31 March 2015
CN	109963871	A	02 July 2019	PL	2471813	T3	30 September 2015
				DK	2471813	T3	02 March 2015
				US	2022064315	A1	03 March 2022
				EP	3494139	A1	12 June 2019
				WO	2018027204	A1	08 February 2018
				JP	2019530434	A	24 October 2019
				TW	201808991	A	16 March 2018
CN	104395339	A	04 March 2015	US	2018057598	A1	01 March 2018
				AR	109298	A1	14 November 2018
				CN	110256567	A	20 September 2019
				HK	1207864	A1	12 February 2016
				KR	20150023889	A	05 March 2015
				EP	2867253	A1	06 May 2015
				ES	2597228	T3	17 January 2017
				WO	2014001324	A1	03 January 2014
				RU	2015100230	A	10 August 2016
				US	2019002570	A1	03 January 2019
				BR	112014032193	A2	27 June 2017
				JP	2015527981	A	24 September 2015
				US	2015232561	A1	20 August 2015
				CA	2871880	A1	03 January 2014
				MX	2014014801	A	12 February 2015
WO	2004092219	A2	28 October 2004	DK	1615955	T3	10 December 2012
				SI	1615955	T1	31 January 2013

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/091187

Patent document cited in search report				Publication date (day/month/year)		Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)	
				PL	1615955	T3	29 March 2013		
				EP	1615955	A2	18 January 2006		
				MX	PA05010902	A	31 May 2006		
				KR	20060022231	A	09 March 2006		
				CA	2522331	A1	28 October 2004		
				BR	PI0409269	A	28 March 2006		
				AU	2004231078	A1	28 October 2004		
				CY	1113400	T1	22 June 2016		
				PT	1615955	E	10 December 2012		
				ES	2394088	T3	17 January 2013		
				US	2005032114	A1	10 February 2005		
WO	2020039321	A2	27 February 2020	JP	2021526847	A	11 October 2021		
				TW	202021619	A	16 June 2020		
				PH	12021550337	A1	04 October 2021		
				EP	3841121	A2	30 June 2021		
				AU	2019323790	A1	11 March 2021		
				CO	2021001893	A2	08 March 2021		
				CA	3109905	A1	27 February 2020		
				BR	112021003173	A2	11 May 2021		
				PE	20211412	A1	02 August 2021		
				US	2020055930	A1	20 February 2020		
				IL	280963	D0	29 April 2021		
				SG	11202101502Y	A	30 March 2021		
				KR	20210049840	A	06 May 2021		
				CN	112912395	A	04 June 2021		

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/091187

A. 主题的分类

C07K 16/00 (2006.01) i; C12N 9/16 (2006.01) i; A61K 39/00 (2006.01) i

按照国际专利分类 (IPC) 或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献 (标明分类系统和分类号)

C07K; C12N; A61K

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库 (数据库的名称, 和使用的检索词 (如使用))

CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, ELSEVIER, ISI Web of Knowledge, PubMed, 中国专利生物序列检索系统, NCBI, EMBL, STN: Fc, ADCC, ADCP, CDC, 第329位, 第234位, 第235位, 第330位, 缺失, 取代, Δ 329, L234A, F234A, V234A, L235A, Δ 330, A330G, S330G, SEQ ID NOs: 2-33

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 108713027 A (詹森生物科技有限公司) 2018年10月26日 (2018 - 10 - 26) 权利要求1, 27-57, 说明书第0437-0457段	1-15
Y	CN 108713027 A (詹森生物科技有限公司) 2018年10月26日 (2018 - 10 - 26) 权利要求1, 27-57, 说明书第0437-0457段	2-15
X	CN 101987870 A (赞科股份有限公司) 2011年3月23日 (2011 - 03 - 23) 说明书第0023, 0032-0036段	1-15
Y	CN 101987870 A (赞科股份有限公司) 2011年3月23日 (2011 - 03 - 23) 说明书第0023, 0032-0036段	2-15
X	CN 109963871 A (豪夫迈 罗氏有限公司) 2019年7月2日 (2019 - 07 - 02) 权95-107, 106页最后一段, SEQ ID NO: 244	1-15
Y	CN 109963871 A (豪夫迈 罗氏有限公司) 2019年7月2日 (2019 - 07 - 02) 权95-107, 106页最后一段, SEQ ID NO: 244	2-15
X	CN 104395339 A (弗 哈夫曼-拉罗切有限公司) 2015年3月4日 (2015 - 03 - 04) 权利要求1-8, 说明书第0085-0096	1-15

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2022年7月21日

国际检索报告邮寄日期

2022年8月2日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局 (ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

授权官员

张蕾

电话号码 86-(10)-53962037

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
Y	CN 104395339 A (弗 哈夫曼-拉罗切有限公司) 2015年3月4日 (2015 - 03 - 04) 权利要求1-8, 说明书第0085-0096	2-15
A	W0 2004092219 A2 (PROTEIN DESIGN LABS, INC. 等) 2004年10月28日 (2004 - 10 - 28) 全文	1-15
A	W0 2020039321 A2 (PFIZER INC.) 2020年2月27日 (2020 - 02 - 27) 全文	1-15

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

第II栏

某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第I页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 9, 13
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求9的技术方案涉及“权利要求1-4任一项所述的Fc突变体在减少或者消除ADCC、ADCP或CDC效应子功能中的用途”，权利要求13涉及“一种治疗受试者的肿瘤的方法”，属于PCT细则第39条(iv)规定的主题，但是本检索报告基于所述Fc突变体或包含所述Fc变体的多肽在制备减少或者消除ADCC、ADCP或CDC效应子功能或治疗受试者中的肿瘤的藥物中的用途进行检索。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/091187

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	108713027	A	2018年10月26日	KR	20180087430	A	2018年8月1日
				EP	3390453	A2	2018年10月24日
				US	2018355043	A1	2018年12月13日
				BR	112018012344	A2	2018年12月4日
				AU	2016371034	A1	2018年5月31日
				WO	2017106684	A2	2017年6月22日
				MA	44072	A	2018年10月24日
				CA	3008819	A1	2017年6月22日
				JP	2019502698	A	2019年1月31日
CN	101987870	A	2011年3月23日	EP	1919950	A1	2008年5月14日
				JP	2008505174	A	2008年2月21日
				EP	2940043	A1	2015年11月4日
				AU	2005272993	A1	2006年2月23日
				EP	2471813	A1	2012年7月4日
				ES	2530340	T3	2015年3月2日
				EP	3342782	A1	2018年7月4日
				IL	179048	D0	2007年3月8日
				BR	PI0510674	A	2007年12月26日
				WO	2006019447	A1	2006年2月23日
				CA	2565961	A1	2006年2月23日
				CN	103351434	A	2013年10月16日
				JP	2011188869	A	2011年9月29日
				CN	103172731	A	2013年6月26日
				KR	20070029190	A	2007年3月13日
				CN	101014619	A	2007年8月8日
				SI	2471813	T1	2015年3月31日
				PL	2471813	T3	2015年9月30日
				DK	2471813	T3	2015年3月2日
CN	109963871	A	2019年7月2日	US	2022064315	A1	2022年3月3日
				EP	3494139	A1	2019年6月12日
				WO	2018027204	A1	2018年2月8日
				JP	2019530434	A	2019年10月24日
				TW	201808991	A	2018年3月16日
				US	2018057598	A1	2018年3月1日
				AR	109298	A1	2018年11月14日
CN	104395339	A	2015年3月4日	CN	110256567	A	2019年9月20日
				HK	1207864	A1	2016年2月12日
				KR	20150023889	A	2015年3月5日
				EP	2867253	A1	2015年5月6日
				ES	2597228	T3	2017年1月17日
				WO	2014001324	A1	2014年1月3日
				RU	2015100230	A	2016年8月10日
				US	2019002570	A1	2019年1月3日
				BR	112014032193	A2	2017年6月27日
				JP	2015527981	A	2015年9月24日
				US	2015232561	A1	2015年8月20日
				CA	2871880	A1	2014年1月3日
				MX	2014014801	A	2015年2月12日
WO	2004092219	A2	2004年10月28日	DK	1615955	T3	2012年12月10日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/091187

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
				SI	1615955	T1	2013年1月31日
				PL	1615955	T3	2013年3月29日
				EP	1615955	A2	2006年1月18日
				MX	PA05010902	A	2006年5月31日
				KR	20060022231	A	2006年3月9日
				CA	2522331	A1	2004年10月28日
				BR	PI0409269	A	2006年3月28日
				AU	2004231078	A1	2004年10月28日
				CY	1113400	T1	2016年6月22日
				PT	1615955	E	2012年12月10日
				ES	2394088	T3	2013年1月17日
				US	2005032114	A1	2005年2月10日
WO	2020039321	A2	2020年2月27日	JP	2021526847	A	2021年10月11日
				TW	202021619	A	2020年6月16日
				PH	12021550337	A1	2021年10月4日
				EP	3841121	A2	2021年6月30日
				AU	2019323790	A1	2021年3月11日
				CO	2021001893	A2	2021年3月8日
				CA	3109905	A1	2020年2月27日
				BR	112021003173	A2	2021年5月11日
				PE	20211412	A1	2021年8月2日
				US	2020055930	A1	2020年2月20日
				IL	280963	D0	2021年4月29日
				SG	11202101502Y	A	2021年3月30日
				KR	20210049840	A	2021年5月6日
				CN	112912395	A	2021年6月4日