



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118019764 A

(43) 申请公布日 2024.05.10

(21) 申请号 202280062944.4

(22) 申请日 2022.09.07

(30) 优先权数据

10-2021-0124554 2021.09.17 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.03.18

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2022/013476 2022.09.07

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/043123 K0 2023.03.23

(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 曹美京 金修延

(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 王卫彬

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书24页

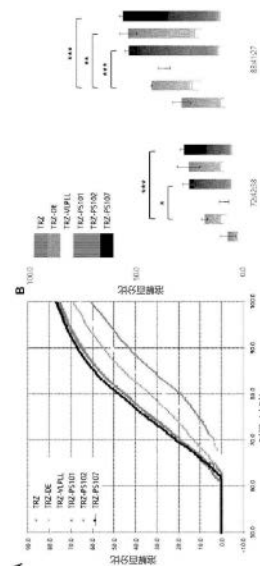
序列表（电子公布） 附图23页

(54) 发明名称

对Fc γ R IIIA的选择性结合力得到提高的糖基化FC变体

(57) 摘要

本发明涉及对Fc γ R IIIa的选择性结合力得到提高的糖基化Fc变体,与现有的被认证为抗体治疗剂的抗体相比,本发明的新型人类抗体Fc结构域变体减少与作为免疫抑制受体的Fc γ R IIb的结合力,提高与作为免疫激活受体的Fc γ R IIIa的结合力(增加A/I比例),具有显著提高的抗体依赖细胞介导的细胞毒作用(ADCC)诱导能力,具有能够使治疗用蛋白质药品的免疫作用机制最大化的效果,从而可以有效用作抗体药品。



1. 一种人类抗体Fc结构域变体,其特征在于,在野生型人类抗体Fc结构域中,选自由根据Kabat编号系统编号的224、243、247、292、300、303、305、330、332、339、356及387位置的氨基酸组成的组中的一个以上位置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所述的人类抗体Fc结构域变体,其特征在于,包含选自由H224R、F243L、P247I、R292P、Y300L、V303I、V305I、A330L、I332E、A339Q、D356G及P387Q组成的组中的一种以上的氨基酸取代。

3. 根据权利要求1所述的人类抗体Fc结构域变体,其特征在于,包含F243L、P247I、R292P、Y300L、V305I、A330L、I332E、A339Q及P387Q的氨基酸取代。

4. 根据权利要求1所述的人类抗体Fc结构域变体,其特征在于,包含H224R、F243L、P247I、R292P、Y300L、V303I、V305I、A330L、I332E、A339Q及P387Q的氨基酸取代。

5. 根据权利要求1所述的人类抗体Fc结构域变体,其特征在于,包含F243L、P247I、R292P、Y300L、V305I、A330L、I332E、A339Q、D356G及P387Q的氨基酸取代。

6. 根据权利要求1所述的人类抗体Fc结构域变体,其特征在于,与野生型Fc结构域相比,提高与Fc γ R IIIa的结合力。

7. 根据权利要求1所述的人类抗体Fc结构域变体,其特征在于,与野生型Fc结构域相比,减少与Fc γ R IIb的结合力。

8. 根据权利要求1所述的人类抗体Fc结构域变体,其特征在于,具有提高的抗体依赖细胞介导的细胞毒作用诱导能力。

9. 一种抗体或具有其免疫活性的片段,其特征在于,包含权利要求1所述的人类抗体Fc结构域变体。

10. 根据权利要求9所述的抗体或具有其免疫活性的片段,其特征在于,上述抗体为糖基化抗体。

11. 根据权利要求9所述的抗体或具有其免疫活性的片段,其特征在于,包含:

重链恒定区结构域2,包含序列6或序列7的氨基酸序列;以及

重链恒定区结构域3,包含序列18或序列19的氨基酸序列。

12. 一种核酸分子,其特征在于,编码权利要求1所述的人类抗体Fc结构域变体或权利要求9所述的抗体或具有其免疫活性的片段。

13. 一种载体,其特征在于,包含权利要求12所述的核酸分子。

14. 一种宿主细胞,其特征在于,包含权利要求13所述的载体。

15. 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所述的人类抗体Fc结构域变体或权利要求9所述的抗体或具有其免疫活性的片段作为有效成分。

16. 根据权利要求15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、肛周癌、子宫内膜癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金病、食管癌、淋巴结癌、膀胱癌、胆囊癌、内分泌腺癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉芽肿、尿道癌、阴茎癌、前列腺癌、慢性或剂型白血病、淋巴细胞淋巴瘤、肾或输尿管癌、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、脊髓肿瘤、脑干胶质瘤及脑垂体腺瘤组成的组中的任一种。

17. 一种人类抗体Fc结构域变体的制备方法,上述人类抗体Fc结构域变体对Fc γ R IIIa

的选择性结合力得到提高,其特征在于,包括:

步骤a),培养包含含有编码权利要求1所述的人类抗体Fc结构域变体的核酸分子的载体的宿主细胞;以及

步骤b),回收由宿主细胞表达的多肽。

18.一种糖基化抗体的制备方法,上述糖基化抗体对Fc γ RIIIa的选择性结合力得到提高,其特征在于,包括:

步骤a),培养包含含有编码权利要求9所述的抗体或具有其免疫活性的片段的核酸分子的载体的宿主细胞;以及

步骤b),纯化由宿主细胞表达的抗体。

19.一种包含权利要求1所述的人类抗体Fc结构域变体的抗体或具有其免疫活性的片段在制备抗体治疗剂中的用途。

20.一种包含权利要求1所述的人类抗体Fc结构域变体的抗体或具有其免疫活性的片段在预防或治疗癌症中的用途。

21.一种癌症治疗方法,其特征在于,包括以药学上有效的量向患有癌症的个体给药包含权利要求1所述的人类抗体Fc结构域变体的抗体或具有其免疫活性的片段的步骤。

对Fc γ RIII A的选择性结合力得到提高的糖基化FC变体

技术领域

[0001] 本发明涉及对Fc γ RIIIa的选择性结合力得到提高的糖基化Fc变体。

背景技术

[0002] 随着基因重组、细胞培养等生命工学技术在全世界的发展,有关蛋白质的结构和功能的研究也随之发展,这不仅提高对生命现象的理解,也在查明各种疾病的发病机理方面起到决定性作用,为疾病的诊断和治疗铺设有效的途径,从而大幅提高生活质量。尤其,随着1975年开发出通过融合B细胞(B Cell)与骨髓瘤细胞(Myeloma cell)来生产单克隆抗体的杂交瘤技术(Hybridoma technology) (Kohler and Milstein, Nature, 256:495-497, 1975),在癌症、自身免疫疾病、炎症、心血管疾病、感染等临床领域中,有关利用治疗用抗体的免疫治疗(Immunotherapy)的研究开发也随之活跃起来。

[0003] 抗体提供体液免疫系统与细胞免疫系统之间的桥梁,与抗体的Fab区识别抗原相反,Fc结构域部分与对于所有通过免疫活性细胞有差别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。抗体的Fc区上的Fc受体结合部位与细胞上的Fc受体(FcR)结合,从而通过Fc区与细胞结合,当抗体与细胞表面上的Fc受体结合时,触发包括抗体-包被粒子的吞噬及破坏、免疫复合物的去除、通过杀伤细胞的抗体-包被靶向细胞的溶解(抗体依赖细胞介导的细胞毒作用,antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity或ADCC)、炎症介质的释放、胎盘移动及免疫球蛋白生成的控制在内的重要且多样的多种生物学反应(Deo, Y.M. et al., Immunol. Today 18(3):127-135(1997))。如上所述,Fc结构域在免疫细胞的招募和抗体依赖细胞介导的细胞毒作用及抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP, antibody dependent cellular phagocytosis)中起到决定性作用,尤其,作为抗体的效应器功能(effector function)的抗体依赖细胞介导的细胞毒作用及抗体依赖性细胞吞噬作用功能依赖于与许多存在于细胞表面的Fc受体之间的相互作用。人的Fc受体分为5种,根据抗体与怎样的Fc受体结合来决定所招募的免疫细胞的种类。因此,可以说通过变形抗体来招募特定细胞的尝试在治疗领域中是非常重要的。

[0004] 与现有的低分子药物相比,治疗用抗体对靶标示出非常高的特异性,不仅生物体毒性低且副作用低,还具有约3周的优秀的血中半衰期,因此被认为是最为有效的癌症治疗方法之一。实际上,全世界的大型制药企业和研究所正加紧通过与包括癌症发病因子在内的癌细胞特异性结合来有效去除癌细胞的治疗用抗体的研究开发的步伐。治疗用抗体药品的开发主要在罗氏公司、安进公司、强生公司、雅培公司、BMS公司等制药企业中进行,尤其是罗氏公司依靠以抗癌治疗为目的赫赛汀(Herceptin)、阿瓦斯汀(Avastin)、利妥昔单抗(Rituxan)等三种代表性的治疗用抗体于2012年在世界市场实现约195亿美元的销售额等,创造了极大的利润,不仅如此,还引领着世界的抗体药品市场。开发出类克(Remicade)的强生公司也因销售的增加而在世界抗体市场中快速成长起来,已知雅培公司和BMS公司等制药企业也保有大多数已到开发最后阶段的治疗用抗体。由此带来的结果就是曾在世界制药市场占主导地位的低分子药品正快速被对疾病目标具有特异性且副作用低的包括治疗用

抗体在内的生物药品取代。

[0005] 现在,作为药品的抗体的作用有与抗原结合来抑制抗原的作用的直接的方式以及通过与抗原结合的抗体的Fc γ 部位和具有Fc γ 受体 (Fc gamma receptor, FCGR) 的效应细胞 (自然杀伤细胞、巨噬细胞等) 来间接去除抗原的方式。最近开发中的抗体治疗剂在通过与抗原的结合来抑制抗原作用的同时,通过效应细胞识别抗体的Fc γ 部位来攻击及去除的抗体依赖细胞介导的细胞毒作用机制进一步提高药剂的效果。据最近有关抗体依赖细胞介导的细胞毒作用的研究,查明Fc γ 与Fc γ 受体的结合力受Fc γ 部位受体的基因型的影响,据多数发表的研究,基于抗体的治疗剂的效率随作为患者的Fc γ 受体的FCGR2A蛋白 (Fc γ R IIIa) 的第131位氨基酸和FCGR3A蛋白的第158位氨基酸的氨基酸序列的多样性而不同。作为一例,据2008年穆索利诺 (Musolino) 的研究报告,在临床前研究中,作为乳腺癌治疗剂的曲妥珠单抗 (trastuzumab) 在FCGR2A131H/H或FCGR3A158V/V基因型中的抗体依赖性细胞毒性表现出显著差异并增加。然而,虽然通过哺乳动物抗体的Fc部位的变形来增加对特定Fc受体的结合力,但由于仍保持对其他Fc受体的结合力,因此仍具有保持所不希望的免疫反应的问题。人类的5种主要Fc γ R中的4种诱导免疫激活或炎症反应,而Fc γ R II b诱导免疫抑制或抗炎反应,但大部分自然生成的抗体或重组的糖基化抗体与激活及抑制的Fc受体都结合。通过抗体依赖细胞介导的细胞毒作用最大程度地诱导治疗用IgG抗体的癌细胞杀灭功效的免疫细胞为自然杀伤细胞 (NK细胞),与其他免疫细胞 (例如,单核细胞 (monocytes)、巨噬细胞 (macrophages)、树突状细胞 (dendritic cells) 等) 不同,NK细胞的表面表达Fc γ R IIIa而不表达Fc γ RI、Fc γ R II a、Fc γ R II b及Fc γ R III b,因此,为了使癌细胞杀灭作用机制最大化,需要通过IgG抗体的Fc部位的最优化来提高与NK细胞表面表达的Fc γ R IIIa的亲合力。并且,不仅是NK细胞,考虑到存在于血液中的多种免疫细胞的复合的免疫反应,由于抗体的Fc结构域的与激活Fc γ R结合的能力 (A) 比与抑制的Fc γ R II b结合的能力 (I) 的比例 (A/I ratio) 越高表现出越优秀的抗体依赖细胞介导的细胞毒作用诱导能力,因此,选择性地提高相对于作为抑制受体的Fc γ R II b的与激活受体的结合力尤为迫切 (Boruchov et al, J Clin Invest, 115 (10) : 2914-23, 2005)。但是,由于Fc γ R II b与激活的Fc γ R具有96%的同源性,通过向糖基化抗体导入基因突变来增加A/I比例 (ratio) 的努力很难有大的成果。

发明内容

[0006] 技术问题

[0007] 本发明的目的在于,提供新型人类抗体Fc结构域变体。

[0008] 并且,本发明的目的在于,提供对特定Fc γ 受体具有特异性的糖基化抗体或具有其免疫活性的片段。

[0009] 并且,本发明的目的在于,提供编码上述Fc结构域变体、上述抗体或具有其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核酸分子的宿主细胞。

[0010] 并且,本发明的目的在于,提供用于预防或治疗癌症的药物组合物。

[0011] 并且,本发明的目的在于,提供人类抗体Fc结构域变体的制备方法。

[0012] 并且,本发明的目的在于,提供对Fc γ R IIIa的选择性结合力得到提高的糖基化抗体的制备方法。

[0013] 并且,本发明的目的在于,提供抗体或具有其免疫活性的片段在制备抗体治疗剂

中的用途。

[0014] 并且,本发明的目的在于,提供抗体或具有其免疫活性的片段在预防或治疗癌症中的用途。

[0015] 同时,本发明的目的在于,提供癌症治疗方法,包括以药学上有效的量向患有癌症的个体给药抗体或具有其免疫活性的片段的步骤。

[0016] 技术方案

[0017] 为了解决上述问题,本发明提供增大与特定Fc γ 受体的选择性结合力的新型人类抗体Fc结构域变体。

[0018] 并且,本发明提供包含上述新型人类抗体Fc结构域变体的糖基化抗体或具有其免疫活性的片段。

[0019] 并且,本发明提供编码上述Fc结构域变体、上述抗体或具有其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核酸分子的宿主细胞。

[0020] 并且,本发明提供包含上述Fc结构域变体、上述抗体或具有其免疫活性的片段作为有效成分的用于预防或治疗癌症的药物组合物。

[0021] 并且,本发明提供人类抗体Fc结构域变体的制备方法。

[0022] 并且,本发明提供对Fc γ R III a的选择性结合力得到提高的糖基化抗体的制备方法。

[0023] 并且,本发明提供本发明的抗体或具有其免疫活性的片段在制备抗体治疗剂中的用途。

[0024] 并且,本发明提供本发明的抗体或具有其免疫活性的片段在预防或治疗癌症中的用途。

[0025] 同时,本发明提供癌症治疗方法,包括以药学上有效的量向患有癌症的个体给药本发明抗体或具有其免疫活性的片段的步骤。

[0026] 发明的效果

[0027] 与现有的得到认可的抗体治疗剂相比,本发明的新型人类抗体Fc结构域变体减少与作为免疫抑制受体的Fc γ R II b的结合力,提高与作为免疫激活受体的Fc γ R III a的结合力(增加A/I比例),具有显著提升的抗体依赖细胞介导的细胞毒作用诱导能力,具有能够使治疗用蛋白药品的免疫作用机制最大化的效果,从而可以有效用作抗体药品。

附图说明

[0028] 图1为将由公知的突变单纯组合来构成的4种曲妥珠单抗Fc变体(XMa、XMt、MM及XMM)(A部分)及Fc γ R II b-GST蛋白(B部分)高纯度纯化后通过十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)来确认的图。

[0029] 图2为示出分析纯化的曲妥珠单抗Fc变体(曲妥珠单抗-XMa、XMt、MM及XMM)与Fc γ R II b的结合力的酶联免疫吸附测定(ELISA)结果的图。

[0030] 图3为示出有关糖基化Fc的哺乳动物细胞展示技术的简图的图。

[0031] 图4为通过十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳来确认纯化为高纯度的四聚体Fc γ R III a-158V-链霉亲和素、四聚体Fc γ R III a-158F-链霉亲和素、四聚体Fc γ R II b-链霉亲和素、Fc γ R III a-158V-GST及Fc γ R III a-158F-GST的图。

[0032] 图5为分析荧光标记的四聚体Fc γ RIIIa-Alexa488、四聚体Fc γ RIIIa-Alexa647及Protein A-FITC与CHO细胞表达野生型Fc或Fc-T299L的结合活性的图。

[0033] 图6为示出用于糖基化Fc工程的改组(shuffle)文库的简图的图。

[0034] 图7为示出利用CHO细胞展示的糖基化Fc工程示意图及获得筛选结果的糖基化Fc变体的突变的基因标志(gene logo)的图。

[0035] 图8为利用在作为模型抗体的曲妥珠单抗重链基因克隆糖基化Fc变体后转染表达载体并培养的Expi293F细胞培养液来分析Fc γ RIIIa结合力的酶联免疫吸附测定结果及发掘的Fc变体的突变序列的图。

[0036] 图9为纯化包含示出高的Fc γ RIIIa结合力的糖基化Fc变体的曲妥珠单抗Fc变体(PS101、PS102、PS105、PS106、PS107、PS205、PS207、PS301、PS303及PS305)后通过十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳来确认的图。

[0037] 图10及图11为通过酶联免疫吸附测定分析筛选的糖基化曲妥珠单抗Fc变体(PS101、PS102、PS105、PS106、PS107、PS205、PS207、PS301、PS303及PS305)与Fc γ RIIIa-158V、Fc γ RIIIa-158F及Fc γ RIIb的结合力的图。

[0038] 图12为比较分析本发明的曲妥珠单抗Fc变体(PS101、PS102、PS105、PS106、PS107、PS205、PS207、PS301、PS303及PS305)与分别导入现有的被美国食品药品监督管理局(USA FDA)认证为B细胞淋巴瘤及乳腺癌治疗剂的作为糖基化抗体的他法西他单抗(tafasitamab)及马吉妥昔单抗(margetuximab)的Fc的曲妥珠单抗Fc变体DE及VLPLL对Fc γ RIIIa-158V、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIa-158F或Fc γ RIIb的结合倾向性的图。

[0039] 图13为示出分析野生型曲妥珠单抗(TRZ)、阳性对照组曲妥珠单抗Fc变体(TRZ-DE及TRZ-VLPLL)及曲妥珠单抗Fc变体(TRZ-PS101、TRZ-PS102及TRZ-PS107)与HER2的结合的结果的图。

[0040] TRZ:曲妥珠单抗

[0041] 图14为示出分析野生型曲妥珠单抗(TRZ)、阳性对照组曲妥珠单抗Fc变体(TRZ-DE及TRZ-VLPLL)及曲妥珠单抗Fc变体(TRZ-PS101、TRZ-PS102及TRZ-PS107)对CHO细胞表面表达的(膜锚定(membrane anchored))Fc γ RIIIa(CHO-Fc γ RIIIa-158V及CHO-Fc γ RIIIa-158F)的结合力的结果的图。

[0042] 图15为示出当E:T(效应细胞:靶向细胞(Effector cell:target cell))的比例为2:1时,分析野生型曲妥珠单抗(TRZ)、阳性对照组曲妥珠单抗Fc变体(TRZ-DE及TRZ-VLPLL)及曲妥珠单抗Fc变体(TRZ-PS101、TRZ-PS102及TRZ-PS107)的抗体依赖细胞介导的细胞毒作用的结果的图。A部分:实时细胞毒性百分比(%of cytotoxicity)分析曲线图,B部分:基于实时分析曲线图的细胞毒性终点百分比(endpoint %of cytotoxicity)分析曲线图。

[0043] 图16为示出当E:T的比例为5:1时,分析野生型曲妥珠单抗(TRZ)、阳性对照组曲妥珠单抗Fc变体(TRZ-DE及TRZ-VLPLL)及曲妥珠单抗Fc变体(TRZ-PS101、TRZ-PS102及TRZ-PS107)的抗体依赖细胞介导的细胞毒作用的结果的图。A部分:实时细胞毒性百分比分析曲线图,B部分:基于实时分析曲线图的细胞毒性终点百分比分析曲线图。

[0044] 图17为以热图示出野生型Fc和本发明的Fc变体(PS101、PS102及PS107)的基于IEDB的in silico免疫原性分析结果的图。

[0045] 图18为示出制备小鼠Fc γ RIV-GST及食蟹猕猴Fc γ RIII-GST后通过十二烷基磺酸钠

钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析的结果的图。

[0046] 图19为示出分析野生型曲妥珠单抗 (TRZ)、阳性对照组曲妥珠单抗Fc变体 (TRZ-DE及TRZ-VLPLL) 及曲妥珠单抗Fc变体 (TRZ-PS101、TRZ-PS102及TRZ-PS107) 对小鼠Fc γ RIV及食蟹猕猴Fc γ RIII的结合力的结果的图。

[0047] 图20为示出表达并纯化野生型西妥昔单抗 (CTX-WT)、阳性对照组西妥昔单抗Fc变体 (CTX-DE及CTX-VLPLL)、西妥昔单抗Fc变体 (CTX-PS101、CTX-PS102及CTX-PS107) 以及野生型利妥昔单抗 (RTX-WT)、阳性对照组利妥昔单抗Fc变体 (RTX-DE及RTX-VLPLL) 及利妥昔单抗Fc变体 (RTX-PS101、RTX-PS102及RTX-PS107) 后通过十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析的结果的图。

[0048] 图21为示出分析野生型西妥昔单抗 (CTX)、阳性对照组西妥昔单抗Fc变体 (CTX-DE及CTX-VLPLL) 及西妥昔单抗Fc变体 (CTX-PS101、CTX-PS102及CTX-PS107) 对人类Fc γ RIIIa-158V、人类Fc γ RIIIa-158F及人类Fc γ RIIb的结合力的结果的图。

[0049] 图22为示出分析野生型西妥昔单抗 (CTX)、阳性对照组西妥昔单抗Fc变体 (CTX-DE及CTX-VLPLL) 及西妥昔单抗Fc变体 (CTX-PS101、CTX-PS102及CTX-PS107) 对小鼠Fc γ RIV及食蟹猕猴Fc γ RIII的结合力的结果的图。

[0050] 图23为示出分析野生型利妥昔单抗 (RTX)、阳性对照组利妥昔单抗Fc变体 (RTX-DE及RTX-VLPLL) 及利妥昔单抗Fc变体 (RTX-PS101、RTX-PS102及RTX-PS107) 对人类Fc γ RIIIa-158V、人类Fc γ RIIIa-158F及人类Fc γ RIIb的结合力的结果的图。

[0051] 图24为示出分析野生型利妥昔单抗 (RTX)、阳性对照组利妥昔单抗Fc变体 (RTX-DE及RTX-VLPLL) 及利妥昔单抗Fc变体 (RTX-PS101、RTX-PS102及RTX-PS107) 对小鼠Fc γ RIV及食蟹猕猴Fc γ RIII的结合力的结果的图。

具体实施方式

[0052] 以下,参照附图通过本发明的实例详细说明本发明。但是,下述实例仅为本发明的例示,当判断对本发明所属技术领域的普通技术人员来说主旨鲜明的技术或结构的具体说明有可能不必要地混淆本发明的要旨时,可以省略其详细说明,但本发明不以此为限定。本发明可以在随附的发明要求保护范围的记载以及由此解释的同等范畴内具有多种变形及应用。

[0053] 并且,本说明书中使用的术语 (terminology) 为用来适当表达本发明的优选实施例的术语,可以根据使用人员、运用人员的意图或本发明所属技术领域的惯例等的不同而不同。因此,这些术语应基于本说明书全文的内容来下定义。在说明书全文中,当提及某部分“包含”某结构要素时,若无特别反对的记载,则表示还可以包含其他结构要素,而不是排除其他结构要素。

[0054] 若无其他定义,则本发明中使用的所有技术术语以本发明所属技术领域的普通技术人员通常理解的含义来使用。并且,本说明书中虽记载优选的方法或试样,但与之相似或同等的也包括在本发明的范畴内。本说明书中以参考文献来记载的所有刊物的内容都并入在本发明中。

[0055] 在本说明书全文中,对于天然存在的氨基酸,使用通常的单个字母或三字母的缩写,不仅如此,对于 α -氨基异丁酸 (Aib)、N-甲基甘氨酸 (Sar, N-methylglycine) 等其他氨基

酸,也使用通常可接受的三字母缩写。并且,本发明中以缩写来提及的氨基酸根据如下IUPAC-IUB命名法来记载。

[0056] 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,甲硫氨酸: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及缬氨酸:V。

[0057] 在一实施方式中,本发明涉及一种人类抗体Fc结构域变体,在野生型(Wild type)人类抗体Fc结构域中,选自由根据Kabat编号系统(Kabat numbering system)编号的222、224、239、243、247、252、292、300、303、305、330、332、339、356、361、387、396、405、及415位置的氨基酸组成的组中的一个以上位置的氨基酸被与野生型氨基酸不同的序列取代。

[0058] 在一实例中,本发明的人类抗体Fc结构域变体的选自由224、243、247、292、300、303、305、330、332、339、356及387位置的氨基酸组成的组中的一个以上位置的氨基酸被与野生型的氨基酸不同的序列取代。

[0059] 在一实例中,本发明的人类抗体Fc结构域变体可以包含选自由K222N、H224R、S239D、F243L、P247I、M252V、R292P、Y300L、V303I、V305I、A330L、I332E、A339Q、D356G、N361D、P387Q、P396L、F405L及S415G组成的组中的一种以上的氨基酸取代。

[0060] 在一实例中,上述人类抗体Fc结构域变体可以包含选自由H224R、F243L、P247I、R292P、Y300L、V303I、V305I、A330L、I332E、A339Q、D356G及P387Q组成的组中的一种以上的氨基酸取代。

[0061] 在一实例中,本发明的Fc结构域变体可以包含选自由序列22至序列35的氨基酸序列组成的组中的任一种。

[0062] 63在一实例中,上述人类抗体Fc结构域变体可以为包含F243L、P247I、R292P、Y300L、V305I、A330L、I332E、A339Q及P387Q的氨基酸取代的PS101。

[0063] 在一实例中,上述人类抗体Fc结构域变体可以为包含H224R、F243L、P247I、R292P、Y300L、V303I、V305I、A330L、I332E、A339Q及P387Q的氨基酸取代的PS102。

[0064] 在一实例中,上述人类抗体Fc结构域变体可以为包含F243L、P247I、R292P、Y300L、V305I、A330L、I332E、A339Q、D356G及P387Q的氨基酸取代的PS107。

[0065] 在一实例中,上述人类抗体Fc结构域变体可以为包含F243L、P247I、M252V、R292P、Y300L、V305I、A330L、I332E、A339Q、D356G及P387Q的氨基酸取代的PS106。

[0066] 在一实例中,上述人类抗体Fc结构域变体可以为包含F243L、P247I、R292P、Y300L、A330L、I332E及P396L的氨基酸取代的PS205。

[0067] 在一实例中,上述人类抗体Fc结构域变体可以为包含K222N、F243L、P247I、R292P、Y300L、V305I、A330L及I332E的氨基酸取代的PS301。

[0068] 在一实例中,上述人类抗体Fc结构域变体可以为包含S239D、P247I、Y300L、V305I、A330L、I332E、A339Q、N361D及P387Q的氨基酸取代的PS303。

[0069] 在一实例中,上述人类抗体Fc结构域变体可以为S239D、R292P、Y300L、A330L、A339Q、P387Q及F405L的氨基酸取代的PS305。

[0070] 在一实例中,上述人类抗体Fc结构域变体可以为包含R292P、Y300L、V305I、A330L、I332E、A339Q及P387Q的氨基酸取代的PS105。

[0071] 在一实例中,上述人类抗体Fc结构域变体可以为包含F243L、P247I、R292P、A330L、

I332E、A339Q、P396L、S415G的氨基酸取代的PS207。

[0072] 在一实例中,与野生型Fc结构域相比,本发明的Fc结构域变体可以提高Fc γ RIIIa的结合力,减少与Fc γ RIIb的结合力。

[0073] 在一实例中,本发明的Fc结构域变体可以与人类Fc γ 受体、小鼠Fc γ 受体或猴Fc γ 受体特异性结合,人类Fc γ 受体可以为Fc γ RIIIa-158V或Fc γ RIIIa-158F,小鼠Fc γ 受体可以为Fc γ IV,猴Fc γ 受体可以为食蟹猕猴Fc γ RIII。

[0074] 在一实例中,本发明的Fc结构域变体可以具有得到提升的抗体依赖细胞介导的细胞毒作用诱导能力。

[0075] 在一实例中,人类抗体(免疫球蛋白)可以为IgA、IgM、IgE、IgD或IgG或它们的变形,可以为IgG1、IgG2、IgG3或IgG4,优选地,为抗-HER2(人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2))抗体、抗-EGFR(表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor))抗体或抗-CD20抗体,更优选地,为曲妥珠单抗、西妥昔单抗或利妥昔单抗。抗体的木瓜蛋白酶分解形成2个Fab结构域和1个Fc结构域,在人类IgG分子中,Fc区通过使用木瓜蛋白酶分解Cys 226的N-末端来生成(Deisenhofer, Biochemistry 20: 2361-2370, 1981)。

[0076] 在一实例中,曲妥珠单抗可以包含:包含序列51的氨基酸序列轻链、包含序列52的氨基酸序列的重链。包含本发明的Fc变体的曲妥珠单抗TRZ-PS101、TRZ-PS102或TRZ-PS107可以包含含有序列53、序列54或序列55的氨基酸序列的重链。

[0077] 在一实例中,西妥昔单抗可以包含:包含序列56的氨基酸序列轻链、包含序列57的氨基酸序列的重链。包含本发明的Fc变体的西妥昔单抗CTX-PS101、CTX-PS102或CTX-PS107可以包含含有序列58、序列59或序列60的氨基酸序列的重链。

[0078] 在一实例中,利妥昔单抗可以包含:包含序列61的氨基酸序列的轻链、包含序列62的氨基酸序列的重链。包含本发明的Fc变体的利妥昔单抗RTX-PS101、RTX-PS102或RTX-PS107可以包含含有序列63、序列64或序列65的氨基酸序列的重链。

[0079] 在一实例中,野生型人类抗体Fc结构域可以包含序列21的氨基酸序列,可以由序列36的核酸分子编码。

[0080] 在本发明中,本发明的在人类抗体Fc区中包含氨基酸变异的变体根据构成母抗体Fc区的氨基酸变形来定义,通常的抗体编号根据通过Kabat的EU检索(Kabat et al., Sequence of proteins of immunological interest, 5th Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, 1991)。

[0081] 本发明中使用的术语“Fc结构域变体”可以与“Fc变体”混用。

[0082] 本发明中使用的术语“野生型(wild-type)多肽”是指以后将变形来生产衍生物的非变形的多肽。野生型多肽可以为在自然中发现的多肽或在自然中发现的多肽的衍生物或工程化的多肽。野生型多肽可以表示多肽本身、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,本发明中使用的术语“野生型抗体”是指通过使氨基酸残基变形来生成衍生物的非变形的抗体多肽。与上述术语互换地,还可以使用表示通过导入氨基酸变形来生成衍生物的非变形的抗体多肽的“母(parent)抗体”。

[0083] 本发明中使用的术语“氨基酸变形/变异”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。本发明中使用的术语“氨基酸取代”或“取代”是指野生型人类抗

体Fc结构域的多肽序列的特定位置的氨基酸被其他氨基酸替换。例如,包含T299A取代的Fc变体是指作为野生型抗体的Fc结构域的氨基酸序列中第299位氨基酸残基的苏氨酸被丙氨酸替换。

[0084] 本说明书中使用的术语“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变形。

[0085] 与野生型抗体Fc结构域(区域或片段)相比,本发明的Fc变体包含一个以上的氨基酸变形,因此,在氨基酸序列上存在差异。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在实质上相同。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变体的氨基酸序列具有80%以上的同源性,优选地,具有约90%以上的同源性,最优选地,具有约95%以上的同源性。氨基酸变形可以使用分子生物学方法以遗传的方式进行,或者利用酶或化学方法来进行。

[0086] 本发明的Fc变体可以通过本发明所属技术领域中公知的任意方法来制备。在一实施例中,本发明的人类抗体的Fc变体在编码包含特定氨基酸变形的多肽序列后,在希望的情况下,克隆到宿主细胞内,在表达及检验的核酸形成中使用。用于此的多种方法记载在文献(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。

[0087] 编码本发明的Fc变体的核酸可以插入用于蛋白质表达的表达载体中。表达载体包含通常的调节或控制(regulatory)序列、筛选标记物、任意的融合伴侣和/或以可操作的方式与附加要素连接的蛋白质,即,处于功能性关系的蛋白质。在适当状态下,可以通过由核酸转化的宿主细胞,优选地,可以通过以培养含有编码本发明的Fc变体的核酸的表达载体来诱导蛋白质表达的方法来生产本发明的Fc变体。可以使用包括哺乳动物细胞、细菌、昆虫细胞以及酵母在内的多种适当的宿主细胞,但限于于此。将外源性核酸导入宿主细胞的方法在本发明所属技术领域中公知的,根据所适用的宿主细胞的不同而不同。优选地,使用因生产成本低廉而利用价值高的大肠杆菌作为宿主细胞来生产本发明的Fc变体。

[0088] 因此,本发明的范围包括Fc变体的制备方法,包括:在适合蛋白质表达的条件下培养导入有编码Fc变体的宿主细胞的步骤;以及纯化或分离宿主细胞中表达的Fc变体的步骤。

[0089] 在一实施方式中,本发明涉及包含本发明的Fc结构域变体的抗体或具有其免疫活性的片段。

[0090] 在一实例中,上述抗体可以为糖基化抗体。

[0091] 在一实例中,本发明的抗体可以包含:包含选自由序列1至序列13的氨基酸序列组成的组中的任一种的重链恒定区结构域2(C_H2);以及包含选自由序列14至序列20的氨基酸序列组成的组中的任一种的重链恒定区结构域3(C_H3)。更优选地,包含:包含序列6或序列7的氨基酸序列的重链恒定区结构域2;以及包含序列18或序列19的氨基酸序列的重链恒定区结构域3。

[0092] 在一实例中,具有免疫活性的片段可以为选自由Fab、Fd、Fab'、dAb、F(ab')、F(ab')₂、scFv(单链可变区片段(single chain fragment variable))、Fv、单链抗体、Fv二聚体、互补决定区片段、人源化抗体、嵌合抗体及双特异抗体(diabody)组成的组中的任一

种。

[0093] 在一实例中,包含本发明的Fc结构域变体的抗体或具有其免疫活性的片段可以增加效应器作用,与野生型Fc结构域相比,提高与Fc γ R IIIa的结合力,减少与Fc γ R II b的结合力,具有高的Fc γ R IIIa结合选择性,具有A/I比例高的特性,从而可以增加抗体介导的细胞毒性作用(抗体依赖细胞介导的细胞毒作用)。

[0094] 在本发明中,A/I比例表示抗体的Fc结构域与激活Fc γ R结合的能力(A)比与抑制Fc γ R II b结合的能力(I)的比例(A/I ratio),A/I比例越高就表现出越优秀的抗体依赖细胞介导的细胞毒作用诱导能力,因此,重点在于,选择性地提高相对于作为抑制受体的结合力的激活受体的结合力。

[0095] 通常,由哺乳动物表达并被糖基化(glycosylated)的糖基化抗体通过Fc部位被修饰的糖链时蛋白质的结构稳定化,从而可以使抗体与Fc受体结合,但由于对所有Fc γ R都具有结合力,因此,具有在激活免疫反应的同时还表现出抑制的问题,相反,细菌中生产的非糖基化(aglycosylated)抗体没有在Fc部位结合的糖链,因此,具有因无法与Fc受体结合而不表现出抗体依赖细胞介导的细胞毒作用功能的问题,但本发明的抗体为“非糖基化”抗体或具有其免疫活性的片段,因此具有可以通过选择性地提高对Fc γ R的结合力来调节免疫反应的效果。

[0096] 抗体可以通过本发明所属技术领域中公知的多种方法来分离或纯化。标准的纯化方法包括色谱法技术、电泳、满意沉淀、透析、过滤、浓缩及色谱聚焦(chromatofocusing)技术。如本发明所属技术领域中公知的,例如,细菌蛋白A、G及L等多种天然蛋白与抗体接合,上述蛋白可以在纯化中使用。可以通过各种特定融合伴侣来纯化。

[0097] 上述抗体不仅包括完整的(whole)抗体形态,还包括抗体分子的功能性片段。完整的抗体为具有2个全长的轻链(light chain)及2个全长的重链(heavy chain)的结构,各个轻链通过二硫键(disulfide bond)与重链连接。抗体分子的功能性片段是指保有抗原结合功能的片段,抗体片段的例包括:(i)由轻链的可变区(VL)及重链的可变区(VH)与轻链的恒定区(CL)及重链的第一个恒定区(CH1)形成的Fab片段;(ii)由VH及CH1结构域形成的Fd片段;(iii)由单链抗体的VL及VH结构域形成的Fv片段;(iv)由VH结构域形成的dAb片段(Ward ES et al.,Nature 341:544-546(1989));(v)分离的CDR区;(vi)包含2个连接的Fab片段的作为二价片段的F(ab')₂片段;(vii)通过以VH结构域及VL结构域形成抗原结合部位的方式结合的肽接头来结合的单链Fv分子(scFv);(viii)双特异单链Fv二聚体(PCT/US92/09965);以及(ix)通过基因融合制备的作为多价或多特异片段的双特异抗体(diabody)(W094/13804)。

[0098] 本发明的抗体或具有其免疫活性的片段可以选自由动物源性抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人类抗体以及具有它们的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来生产。

[0099] 上述抗体或具有其免疫活性的片段可以为从生物体中分离的(不存在于生物体中)或非自然生产(non-naturally occurring)的,例如,可以为通过合成或重组来生产的。

[0100] 在本发明中,“抗体”是指在免疫系统中通过抗原的刺激来产生的物质,其种类不受特别限制,可以通过自然或非自然(例如,合成或重组)的方式来获得。不仅在生物体外,抗体在生物体内也非常稳定且半衰期长,因此有利于大量表达及生产。并且,抗体在本质上

具有二聚体(dimer)结构,因此亲和力(avidity)非常高。完整的抗体为仅具有两个全长(full length)轻链及两个全长重链的结构,各个轻链通过二硫键与重链连接。抗体的恒定区分为重链恒定区和轻链恒定区,重链恒定区具有伽马(γ)、缪(μ)、阿尔法(α)、德尔塔(δ)及伊普西龙(ϵ)型,亚型有伽马1(γ 1)、伽马2(γ 2)、伽马3(γ 3)、伽马4(γ 4)、阿尔法1(α 1)及阿尔法2(α 2)。轻链的恒定区具有卡帕(κ)及兰布达(λ)型。

[0101] 本发明中的术语“重链”解释为为了赋予对抗原的特异性而包含含有具有充分的可变区序列的氨基酸序列的可变区结构域 V_H 及包含三个恒定区结构域 C_H1 、 C_H2 、 C_H3 以及铰链(hinge)的全长的重链及其片段的含义。并且,术语“轻链”解释为为了赋予对抗原的特异性而包含含有具有充分的可变区序列的氨基酸序列的可变区结构域 V_L 及包含恒定区结构域 C_L 的全长的轻链及其片段的含义。

[0102] 本发明中的术语“Fc结构域”、“Fc片段”或“Fc区”与Fab结构域/片段一同形成抗体,Fab结构域/片段由轻链的可变区(V_L)及重链的可变区(V_H)与轻链的恒定区(C_L)及重链的第一个恒定区(C_H1)形成,Fc结构域/片段由重链的第二个恒定区(C_H2)及第三个恒定区(C_H3)形成。

[0103] 在一实施方式中,本发明涉及编码本发明的Fc结构域变体、包含其的抗体或具有其免疫活性的片段的核酸分子。

[0104] 在一实例中,编码本发明的Fc变体的核酸分子可以包含选自核酸序列37至序列50的碱基序列组成的组中的任一种。

[0105] 在一实施方式中,本发明涉及包含上述核酸分子的载体、包含上述载体的宿主细胞。

[0106] 本发明的核酸分子可以为单离的或重组的,不仅包括单链及双链形态的脱氧核糖核酸(DNA)及核糖核酸(RNA),还包括与之对应的互补性序列。在天然生成原则下单离的核酸的情况下,单离的核酸为从存在于核酸单离的个体的基因组的周围遗传序列中分离的核酸。在从模板通过酶或化学方法合成的核酸的情况下,例如,在聚合酶链式反应(PCR)产物、互补脱氧核糖核酸(cDNA)分子或寡核苷酸的情况下,可以理解为通过上述过程生成的核酸单离的核酸分子。单离的核酸分子表现为单独的片段形态或作为更大的核酸构建物的成分的核酸分子。核酸与其他核酸序列以功能性关系排列时,以可操作的方式连接。例如,前序列或分泌前导序列(leader)的脱氧核糖核酸在表达为分泌多肽之前的形态的前体蛋白(preprotein)时,与多肽的脱氧核糖核酸以可操作的方式连接,启动子或增强子再给多肽序列的转录带来影响时,与编码序列以可操作的方式连接,或者,核糖体结合部位以促进翻译的方式配置时,与编码序列以可操作的方式连接。通常,以可操作的方式连接是指所要连接的脱氧核糖核酸序列相邻来设置,在分泌前导的情况下,是指存在于同一阅读框内。但是,增强子不需要相邻来设置。连接在方便的限制酶部位通过结扎来实现。若没有这样的部位,则根据通常的方法来使用合成寡核苷酸接头或连接头。

[0107] 考虑到由于密码子的退化(degeneracy)或者上述所要表达它的生物中偏好的密码子,编码本发明的Fc结构域变体、包含其的抗体或具有其免疫活性的片段的单离的核酸分子可以在不变化从编码区域表达的Fc结构域变体、包含其的抗体或具有其免疫活性的片段的氨基酸序列的范围内在编码区域进行多种变形,在除编码区域以外的部分中,也可以在不给基因的表达带来影响的范围内进行多种变形或修饰,本发明所属技术领域的普通技

术人员可以理解的是,这样的变形基因也包括在本发明的范围内。即,在编码具有同等活性的蛋白质的情况下,本发明的核酸分子可以通过一个以上核酸碱基的取代、缺失、插入或它们的组合来变异,这些也都包括在本发明的范围内。这样的核酸分子的序列可以为单链或双链,可以为脱氧核糖核酸分子或核糖核酸(信使核糖核酸(mRNA))分子。

[0108] 为了蛋白质表达,本发明的编码本发明的Fc结构域变体、包含其的抗体或具有其免疫活性的片段的单离的核酸分子可以插入表达载体中。表达载体包含通常的调节或控制(regulatory)序列、筛选标记物、任意的融合伴侣和/或以可操作的方式与酶连接的蛋白质,即,处于功能性关系的蛋白质。适当状态下,可以通过由核酸转化的宿主细胞,优选地,可以通过以培养含有编码本发明的Fc结构域变体、包含其的抗体或具有其免疫活性的片段的单离的核酸分子的表达载体来诱导蛋白质表达的方法来生产本发明的Fc结构域变体、包含其的抗体或具有其免疫活性的片段。可以使用包括哺乳动物细胞、细菌、昆虫细胞以及酵母在内的多种适当的宿主细胞,但不限于于此。将外源性核酸导入宿主细胞的方法在本发明所属技术领域是公知的,根据所使用的宿主细胞的不同而不同。优选地,使用因生产成本低廉而利用价值高的大肠杆菌作为宿主细胞来生产。

[0109] 本发明的载体包括质粒载体、粘粒载体、噬菌体载体及病毒载体等,但不限于于此。适当的载体除启动子、操纵子、启动密码子、终止密码子、加尾信号及增强子等表达调节要素以外,还包含用于膜靶向化或分泌的信号序列或前导序列,可以根据目标多种多样地调节。载体的启动子可以为结构性或诱导性。在宿主为埃希氏菌属(*Escherichia* sp.)菌的情况下,上述信号序列可以利用PhoA信号序列、OmpA信号序列等,在宿主为芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)菌的情况下,可以利用 α -淀粉酶信号序列、枯草杆菌蛋白酶信号序列等,在宿主为酵母菌(yeast)的情况下,可以利用MF α 信号序列、SUC2信号序列等,在宿主为动物细胞的情况下,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,但不限于于此。并且,载体还可以包含用于选择含有载体的宿主细胞的选择标记物,在可复制的表达载体的情况下,包含复制起点。

[0110] 本发明中的术语“载体”是指为导入能够复制核酸序列的细胞而能够插入核酸序列的载体。核酸序列可以为外源性(exogenous)或异种(heterologous)。载体可以为质粒、粘粒及病毒(例如噬菌体),但不限于于此。本发明所属技术领域的普通技术人员可以通过标准的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; 及 Ausubel et al., In: *Current Protocols in Molecular Biology*, John, Wiley & Sons, Inc, NY, 1994等)。

[0111] 在一实例中,在制备上述载体时,可以根据所要生产上述Fc结构域变体、包含其的抗体或具有其免疫活性的片段的宿主细胞的种类适当选择启动子(promoter)、终止子(terminator)、增强子(enhancer)等表达调节序列以及用于靶向化或分泌的序列等,根据目标多种多样地组合。

[0112] 在本发明中,术语“表达载体”是指包含编码所要转录的基因产物中的至少一部分的核酸序列的载体。在部分情况下,之后核糖核酸分子翻译为蛋白质、多肽或肽。表达载体可以包含多种调节序列。与调节转录及翻译的序列一同,载体及表达载体还可以同时包含提供其他功能的核酸序列。

[0113] 在本发明中,术语“宿主细胞”包括真核生物及原核生物,是指可以复制上述载体

或可以表达通过载体编码的基因的任意的可转化的生物。宿主细胞可以通过上述载体来转染(transfected)或转化(transformed),这是指外源性的核酸分子传递或导入到宿主细胞内的过程。

[0114] 在一实例中,上述宿主细胞可以为细菌或动物细胞,动物细胞株可以为CHO细胞、HEK细胞或NS0细胞,细菌可以为大肠杆菌。

[0115] 在一实施方式中,本发明涉及包含本发明的Fc结构域变体的抗体治疗剂。

[0116] 在一实例中,本发明的Fc结构域变体或包含其的蛋白结合物可以结合以治疗或预防人类的疾病为目的来使用的细胞因子、白细胞介素、白细胞介素结合蛋白、酶、抗体、生长因子、转录调节因子、血液因子、疫苗、结构蛋白、配体蛋白或受体、细胞表面抗原、受体拮抗物质等多种生理活性多肽、它们的衍生物以及类似物来使用。

[0117] 在一实例中,本发明的Fc结构域变体或包含其的蛋白结合物可以结合抗体药物,癌症治疗用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)、派姆单抗(Pembrolizumab)、纳武单抗(Nivolumab)、阿替利珠单抗(Atezolizumab)或阿维鲁单抗(Avelumab)。

[0118] 抗体治疗剂中以靶向抗原来招募免疫细胞并传递的机制为最重要的机制之一,抗体的Fc结构域在免疫细胞的招募和抗体依赖细胞介导的细胞毒作用中起到决定性作用,因此,本发明的对Fc γ 受体的选择性结合力得到增加的Fc变体有利于用作治疗用抗体。尤其,抗体的抗体依赖细胞介导的细胞毒作用功能依赖于存在于许多细胞的表面的Fc γ 受体(Fc γ R)之间的相互作用,根据抗体与人类的5种Fc受体中的哪种Fc受体结合来确定招募的免疫细胞的种类,因此,通过变形抗体来招募特定抗体的尝试在医疗领域中是非常重要的。

[0119] 在一实施方式中,本发明涉及用于预防或治疗癌症的药物组合物,包含本发明的Fc结构域变体、包含其的抗体或具有其免疫活性的片段作为有效成分。

[0120] 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、肛周癌、子宫内膜癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金病(Hodgkin's disease)、食管癌、淋巴结癌、膀胱癌、胆囊癌、内分泌腺癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉芽肿、尿道癌、阴茎癌、前列腺癌、慢性或剂型白血病、淋巴细胞淋巴瘤、肾或输尿管癌、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、脊髓肿瘤、脑干胶质瘤及脑垂体腺瘤组成的组中的任一种。

[0121] 在一实例中,包含本发明的Fc结构域变体的抗体或具有其免疫活性的片段通过具有高的Fc γ RIIIa结合选择性来具有高的A/I比例,可以通过自然杀伤细胞(NK细胞)增加效应器作用来增加抗体依赖细胞介导的细胞毒作用。拥有最为强力的癌细胞杀灭功效的自然杀伤细胞(NK细胞)与其他免疫细胞(例如,单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞)不同,表面表达Fc γ RIIIa而不表达Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb及Fc γ RIIIb,因此,包含本发明的具有Fc γ RIIIa结合选择性的Fc结构域变体的抗体或具有其免疫活性的片段可以通过NK细胞来使癌细胞杀灭作用最大化。

[0122] 在一实例中,本发明的组合物还可以包含免疫原性细胞杀灭诱导剂,免疫原性细胞杀灭诱导剂可以为选自由环蒽类抗癌剂、紫杉烷类抗癌剂、抗表皮生长因子受体(EGFR)

抗体、BK通道激动剂、硼替佐(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,环蒽类抗癌剂可以为柔红霉素(daunorubicin)、多柔比星(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、伊达比星(idarubicin)、匹杉琼(pixantrone)、萨巴比星(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)。

[0123] 本发明的用于预防或治疗癌症的药物组合物可以与化学抗癌药物(抗癌剂)等一同给药,通过癌细胞的杀灭效果来进一步增加现有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给药。上述抗癌剂的例包括:脱氧核糖核酸烷化剂(DNA alkylating agents),例如,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)、罗莫司丁(lomustine:CCNU)、链脲佐菌素(streptozotocin)、白消安(busulfan)、噻替哌(thiotepa)、顺铂(cisplatin)及卡铂(carboplatin);抗癌抗生素(anti-cancer antibiotics),例如,放线菌素D(dactinomycin:actinomycin D)、普卡霉素(plicamycin)及丝裂霉素C(mitomycin C);以及植物生物碱(plant alkaloids),例如长春新碱(vincristine)、长春碱(vinblastine)、依托泊苷(etoposide)、替尼泊甙(teniposide)、托泊替康(topotecan)及伊立替康(iridotecan)等。但不限于此。

[0124] 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迟癌症的发生、扩散及复发的所有行为。

[0125] 本发明中使用的术语“治疗”是指通过给药本发明的组合物来杀灭癌细胞或者使癌症的症状好转或痊愈的所有行为。本发明所属技术领域的普通技术人员可以参照韩国医学协会等颁布的资料来获知本申请的组合物有效的疾病的准确的标准并判断改善、提高及治疗的程度。

[0126] 本发明中与有效成分结合来使用的术语“药学上有效的量”是指在对象疾病的预防或治疗中有效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上有效的量可以根据例如给药方法、目标部位、患者的状态等诸多因素的不同而不同。因此,在向人体使用时应综合考虑安全性及有效性来确定适当的量。也可以从通过动物实验确定的有效量来推断在人体使用的量。决定有效量时需要考虑的诸多事项在例如Hardman and Limbird, eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed. (2001), Pergamon Press; 及 E.W. Martin ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed. (1990), Mack Publishing Co. 中记载。

[0127] 本发明的药物组合物以药学上有效的量来给药。本发明中使用的术语“药学上有效的量”是指以能够适用于医学治疗的合理的收益/风险比例治疗疾病的充分且不因副作用的量,有效剂量水平可以根据包括个体的健康状态、感染症的种类、疾病严重程度、药物的活性、对药物的敏感性、给药方法、给药时间、给药途径及代谢比例、治疗期间、配合或同时使用的药物在内的因素以及其他医学领域中广为人知的因素来确定。本发明的组合物能够以单独的治疗剂来给药或者与其他治疗剂联合来给药,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。重点在于,在考虑上述所有因素后能够以无副作用的最少的

量获得最大效果的方式来给药,这可以通过本发明所属技术领域的普通技术人员轻松确定。

[0128] 本发明的药物组合物还可以包含药剂学上可接受的添加剂,在此情况下,药剂学上可接受的载体可以使用淀粉、明胶化淀粉、微晶纤维素、乳糖、聚维酮、胶体二氧化硅、磷酸钙、乳糖、甘露醇、糖稀、阿拉伯胶、预糊化淀粉、玉米淀粉、粉末纤维素、羟丙基纤维素、欧巴代、羟基乙酸淀粉钠、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、山梨糖醇及滑石粉等。优选地,相对于上述组合物,可以包含0.1重量份至90重量份的本发明的药学上可接受的添加剂,但不限于于此。

[0129] 本发明的药物组合物可以包含生物制剂中通常使用的载体、稀释剂、赋形剂或它们两种以上的组合。本发明中使用的术语“药学上可接受的”是指示出在暴露于上述组合物的细胞或人体中没有毒性的特性。上述载体只要是适合输送组合物的就不受特别限制,例如,可以使用Merck Index, 13th ed., Merck & Co. Inc. 中记载的化合物、生理盐水、灭菌水、林格氏液、缓冲生理盐水、葡萄糖溶液、麦芽糖糊精、甘油、乙醇及混合一种以上上述成分来使用,还可以根据需要加入抗氧化剂、缓冲液、杀菌剂等其他通常的添加剂。并且,还可以加入稀释剂、分散剂、表面活性剂、结合剂及润滑剂来配制为水溶液、悬混液、乳浊液等注射用剂型以及丸药、胶囊、颗粒或片剂。进而,可以通过本发明所属技术领域中的适当的方法获或Remington's Pharmaceutical Science (Mack Publishing Company, Easton PA, 18th, 1990) 中公开的方法根据各疾病或根据成分来优选地配制。

[0130] 本发明的组合物可以根据所目标的方法来胃肠外给药(例如,静脉内、皮下、腹腔内或病灶)或口服给药,给药量的范围可以根据患者的体重、年龄、性别、健康状态、饮食、给药时间、给药方法、代谢率及疾病的严重程度等的不同而多种多样。本发明的组合物的每日给药量为0.0001~10mg/ml,优选地,为0.0001~5mg/ml,更为优选地,以一天一次至分为数次来给药。

[0131] 本发明的组合物的用于口服给药的液体制剂有悬混剂、内溶液剂、乳剂、糖浆剂等,除通常使用的作为单纯稀释剂的水、液体石蜡以外,还可以包含多种赋形剂,例如,湿润剂、甜味剂、芳香剂、保存剂等。用于胃肠外给药的制剂包括灭菌的水溶液、非水性溶剂、悬混剂、油剂、冷冻干燥制剂、栓剂等。

[0132] 本发明包括将上述Fc结构域变体通过非肽聚合物以共价键与生理活性多肽连接来制备持续性药物制剂的方法。

[0133] 本发明的制备方法可以包括:通过末端具有效应基团的非肽性聚合物以共价键连接生理活性多肽与Fc结构域变体的步骤;以及分离生理活性多肽、非肽性聚合物及Fc结构域变体以共价键连接的结合物的步骤。

[0134] 在一实施方式中,本发明涉及人类抗体Fc结构域变体的制备方法,包括:步骤a),培养包含含有编码本发明的Fc结构域变体的核酸分子的载体的宿主细胞;以及步骤b),回收由宿主细胞表达的多肽。

[0135] 在一实施方式中,本发明涉及对Fc γ RIIIa的选择性结合力得到提高的糖基化抗体的制备方法,包括:步骤a),培养包含含有编码本发明的抗体或具有其免疫活性的片段的核酸分子的载体的宿主细胞;以及步骤b),纯化由宿主细胞表达的抗体。

[0136] 在一实例中,抗体的纯化可以包括过滤、高效液相色谱法(HPLC)、阴离子交换或阳

离子交换、亲和层析法或它们的组合,优选地,可以利用使用蛋白A(Protein A)的亲和层析法。

[0137] 在一实施方式中,本发明涉及本发明的抗体或具有其免疫活性的片段在制备抗体治疗剂中的用途。

[0138] 在一实施方式中,本发明涉及本发明的抗体或具有其免疫活性的片段的在预防或治疗癌症中的用途。

[0139] 在一实施方式中,本发明涉及癌症的治疗方法,包括以药学上有效的量向患有癌症的个体给药本发明的抗体或具有其免疫活性的片段的步骤。

[0140] 本发明的实施方式

[0141] 通过下述实施例更为详细地说明本发明。但下述实施例仅用于使本发明的内容具体化,本发明不受它们的限制。

[0142] 实施例1.制备及分析由Fc突变的单纯组合构成的曲妥珠单抗Fc变体

[0143] 1-1.制备单纯组合曲妥珠单抗Fc变体

[0144] 为了确认现有公知的曲妥珠单抗Fc变体的单纯组合的效果,制备由DEL变体(S239D/I332E/A330L:与野生型Fc相比,A/I比例(ratio)提高9倍)、LPLIL变体(F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L:对Fc γ RIIIa-158V的结合力提高10倍)及IQ变体(P247I/A339Q:抗体依赖细胞介导的细胞毒作用诱导能力提高6倍)的单纯组合构成的Fc变体(XMa:S239D/F243L/R292P/Y300L/V305I/A330L/I332E/P396L,XMt:S239D/P247I/A330L/I332E/A339Q,MM:F243L/P247I/R292P/Y300L/V305I/A339Q/P396L及XMM:S239D/F243L/P247I/R292P/Y300L/V305I/A330L/I332E/A339Q/P396L)(表1)。将上述Fc变体克隆到作为模型抗体的曲妥珠单抗的重链基因,使用聚乙烯亚胺(PEI,polyethylenimine)(Polyscience公司,23966)与轻链基因一同共(co-)转染(transfection)到Expi293F细胞来临时表达。将共转染的Expi293F细胞在37℃、125rpm及8%的CO₂的条件下培养7天后,回收培养液并使用磷酸盐缓冲溶液(PBS)平衡后,通过蛋白A亲和层析法来纯化曲妥珠单抗Fc变体(图1的A部分)。

[0145] 1-2.生产Fc γ RIIb-GST

[0146] 为了确认单纯组合曲妥珠单抗Fc变体对作为通过下调(down-regulation)免疫反应来弱化抗体依赖细胞介导的细胞毒作用活性的Fc受体的Fc γ RIIb的结合力,生产Fc γ RIIb-GST。具体地,利用聚乙烯亚胺将克隆有Fc γ RIIb的C-融合有GST的基因的动物细胞表达用载体的质粒转染到Expi293F细胞后,在37℃、125rpm及8%的CO₂的条件下临时表达7天。然后,回收细胞培养液后,使用磷酸盐缓冲溶液平衡后,通过抗GST(anti-GST)亲和力层析来确保高纯度的Fc γ RIIb-GST(图1的B部分)。

[0147] 1-3.分析单纯组合曲妥珠单抗Fc变体的Fc γ RIIb结合力

[0148] 为了确认上述实施例1-1中纯化来准备的曲妥珠单抗Fc变体(XMa、XMt、MM及XMM)对Fc γ RIIb的结合力,进行酶联免疫吸附测定分析。具体地,将50 μ l的以4 μ g/ml的浓度稀释在0.05M的碳酸钠(Na₂CO₃)(pH9.6)的Fc γ RIIb-GST在平底聚苯乙烯高结合(flat bottom polystyrene high bind)96孔酶标板(Costar公司,3590)中以4℃的温度固定16小时后,使用100 μ l的4%的脱脂牛奶(GenomicBase公司,SKI400)在常温下封闭(blocking)2小时。然后,将使用180 μ l的0.05%的PBST洗涤4次并使用1%的脱脂牛奶稀释来准备的上述实施例1-1的糖基化曲妥珠单抗Fc变体向各孔分注50 μ l后在常温下反应1小时。洗涤后,处理50 μ l

的辣根过氧化物酶-蛋白L (HRP-Protein L) (GenScript公司, M00098) 并在常温下进行过抗体反应1小时后洗涤。然后, 加入50 μ l的1-Step Ultra TMB-ELISA底物溶液 (substrate solution) (赛默飞世尔公司 (Thermo Fisher Scientific), 34028) 来显色后, 处理50 μ l的2M的硫酸 (H_2SO_4) 来终止反应后利用Epoch酶标仪 (microplate spectrophotometer) (BioTek公司) 分析吸光度。结果, 确认到与分别以B细胞淋巴瘤及Her2阳性乳腺癌治疗剂得到美国食品药品监督管理局认证的抗体依赖细胞介导的细胞毒作用得到提高的糖基化Fc变体 (作为B细胞淋巴瘤治疗剂 (Monjuvi, 他法西单抗) 于2020年7月31日得到美国食品药品监督管理局认证的DE (S239E/I332E) 及作为Her2阳性乳腺癌治疗剂 (Margenza, 马吉妥昔单抗) 于2020年12月16日得到美国食品药品监督管理局认证的VLPLL (L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L)) 相比, 由公知的突变的单纯组合构成的曲妥珠单抗Fc变体表现出具有显著高的Fc γ R II b结合力 (图2), 确认到可以给抗体依赖细胞介导的细胞毒作用活性诱导带来负面影响。

[0149] 实施例2. 构建用于筛选糖基化Fc变体的哺乳动物细胞展示系统

[0150] 为了找到能够使抗体依赖细胞介导的细胞毒作用诱导能力最大化的Fc突变的最佳的组合并发现新的糖基化Fc变体, 制作Fc文库。具体地, 为了在哺乳动物细胞表面展示并稳定筛选糖基化Fc, 利用了稳定细胞系 (stable cell line) 制备中使用的FLP-FRT基因重组 (gene recombination) 系统, 为了在细胞膜展示, 在Fc的C-末端融合血小板源性生长因子受体 (PDGFR, Platelet-derived growth factor receptor) 跨膜 (transmembrane) 结构域。Fc-PDGFR基因通过克隆到插入有FRT位点 (site) 的pcDNA5/FRT质粒 (英杰公司 (Invitrogen), V601020) 来准备。通过与表达作为使相关质粒引起基因重组的酶的FLP的pOG44质粒 (英杰公司, V600520) 一同共转染到插入有FRT位点的CHO细胞 (英杰公司, R75807) 诱导基因重组, 来在CHO细胞的染色特脱氧核糖核酸 (chromosomal DNA) 整合有 (Integration) Fc-PDGFR脱氧核糖核酸, 从而制备糖基化Fc稳定表达CHO细胞株 (图3)。在此情况下, 为了只筛选转染后引起基因整合的CHO细胞, 一同整合潮霉素 (hygromycin) -B拮抗基因, 通过处理500 μ g/ml的潮霉素-B (英杰公司, 10687010) 来筛选稳定表达糖基化Fc的CHO细胞株, 从而构建用于筛选糖基化Fc变体的哺乳动物细胞展示系统。

[0151] 实施例3. 制备用于分析结合力的Fc γ Rs

[0152] 3-1. 表达及纯化

[0153] 通过荧光激活细胞分选 (FACS) 来筛选确立的糖基化Fc的CHO细胞展示系统及Fc文库稳定表达细胞株, 为了分析发掘的Fc变体对Fc γ Rs的结合力, 制备及生产Fc γ R III a及Fc γ R II b。在Fc γ Rs中, 已知Fc γ R III a及Fc γ R II b为与Fc的结合力低的低亲和性受体 (low affinity receptor), 因此, 在各受体的C-末端融合链霉亲和素 (streptavidin) 来提高与Fc的可见结合亲和度以制备能够进行有效的荧光激活细胞分选的四聚体 (tetrameric) Fc γ R III a-158V-链霉亲和素-His、四聚体Fc γ R III a-158F-链霉亲和素-His及四聚体Fc γ R II b-链霉亲和素-His。并且, 为了通过酶联免疫吸附测定分析所要发掘的糖基化Fc变体的Fc γ Rs结合力, 制备Fc γ R III a-158V-GST及Fc γ R III a-158F-GST。将各蛋白质克隆到动物细胞表达用载体来准备后, 利用聚乙烯亚胺转染到Expi293F细胞后, 在37 $^{\circ}$ C、125rpm及8%的CO₂的条件下培养7天。培养后, 回收上清液并使用磷酸盐缓冲溶液平衡, 使用Ni-NTA (Anti-His) 或anti-GST亲和层析来纯化。结果, 纯化了高纯度的四聚体Fc γ R III a-158V-链霉亲和

素、四聚体Fc γ RIIIa-158F-链霉亲和素、四聚体Fc γ RIIb-链霉亲和素、Fc γ RIIIa-158V-GST及Fc γ RIIIa-158F-GST(图4)。

[0154] 3-2. 检验功能

[0155] 在上述实施例3-1中制备及生产的蛋白质中,使用Alexa488(英杰公司,A10235)及Alexa647(英杰公司,A20173)的荧光染料(dye)标记为了荧光激活细胞分选而准备的四聚体Fc γ RIIIa-链霉亲和素,以能够进行通过与无荧光四聚体Fc γ RIIb-链霉亲和素的竞争性结合来筛选(sorting)Fc变体的方式来准备,为了确认展示的Fc变体的表达与否及标签,在与Fc γ Rs的结合部位不重叠的蛋白A(艾美科健公司(Amicogen),1070020)偶联(conjugation)FITC(英杰公司,F6434)来准备。荧光染料(alexa488、Alexa647及FITC)的偶联根据各生产公司提供的说明书来进行。诱导荧光标记的四聚体Fc γ RIIIa-链霉亲和素-Alexa488、四聚体Fc γ RIIIa-链霉亲和素-Alexa647及Protein A-FITC与展示在各CHO细胞的消除野生型Fc及Fc γ Rs结合力的Fc变体(Fc-T299L)的结合后确认活性。

[0156] 结果,通过Protein A-FITC结合的荧光信号确认到Protein A-FITC具有正常的活性,确认到CHO细胞中展示的野生型Fc及Fc-T299L稳定地表达来表现出相似的表达水平(图5)。并且,四聚体Fc γ RIIIa-链霉亲和素-Alexa488及四聚体Fc γ RIIIa-链霉亲和素-Alexa647也与野生型Fc正常结合,不与作为消除Fc γ Rs结合力的Fc变体的Fc-T299L结合(图5),Alexa488/647荧光标记Fc γ RIIIa也具有优秀的活性,成功检验CHO细胞中展示的Fc都稳定表达并发挥各自的功能。

[0157] 实施例4. 构建利用哺乳动物细胞展示的对Fc γ RIIIa的选择性结合力得到提高的糖基化Fc变体文库

[0158] 通过确立的CHO细胞Fc展示系统工程化糖基化Fc,为了筛选Fc γ RIIIa结合力得到提高的糖基化Fc变体而制作文库。利用文库改组(shuffling)DEL变体、LPLIL变体及IQ变体的突变来探索能够使Fc γ RIIIa结合最大化的最佳的突变结合(图6)。文库基因通过与上述实施例2中确立的Fc稳定表达哺乳动物细胞株制备方法相同的方法与FLP表达质粒共转染后,经过利用潮霉素-B培养基的筛选过程来制备糖基化Fc变体文库稳定表达CHO细胞株。

[0159] 实施例5. 利用哺乳动物细胞展示筛选Fc γ RIIIa选择性结合力得到提高的Fc变体

[0160] 利用上述实施例2中确立的CHO细胞Fc展示系统及上述实施例4中确立的Fc文库稳定表达CHO细胞株,为了筛选Fc γ RIIIa结合力得到提高的糖基化Fc,在文库稳定表达CHO细胞株中诱导Fc γ RIIIa-Alexa647、Protein A-FITC或Fc γ RIIIa-Alexa647与无荧光Fc γ RIIb、Protein A-FITC的结合后,同时监测通过Protein A-FITC的表达水平和Fc γ RIIIa结合来进行1R的荧光激活细胞分选。以此来筛选预计示出优秀的Fc γ RIIIa结合力及选择性的细胞集团(population),通过基因组脱氧核糖核酸(genomic DNA)预备(preparation)回收糖基化Fc变体表达CHO细胞后,通过确认碱基序列来最终筛选工程化的(engineered)糖基化Fc变体(图7)。

[0161] 实施例6. 分析曲妥珠单抗Fc变体的Fc γ RIIIa结合力

[0162] 为了表达及纯化糖基化Fc变体,克隆到作为模型抗体曲妥珠单抗重链基因来制备表达载体。具体地,首先在3ml的Freestyle293表达培养液(Gibco公司,12338-018)中以1:1的比例混合变体的重链基因与轻链基因后,以4:1的比例混合聚乙烯亚胺(Polyscience公司,23966)与变体基因并在常温下培养20分钟后,以 2×10^6 cells/ml的密度混合到30ml的

传代培养的Expi293F细胞中在振荡(shaking)CO₂培养器中以37℃、125rpm及8%的CO₂的条件培养7天后,通过离心分离来只取上清液。使用25×的磷酸盐缓冲溶液平衡上清液后,使用0.2μm的注射器过滤器过滤。向在4℃的温度下过夜包被Her2蛋白的细胞外结构域(extracellular domain)的高结合(high binding)96孔培养板(Costar公司,3590)中放入50μl的上述过滤的曲妥珠单抗Fc变体表达培养液并固定1小时。然后,使用100μl的4%的脱脂牛奶(GenomicBase公司,SKI400)在常温下封闭2小时。使用180μl的0.05%的PBST洗涤4次后,向各孔的1%的脱脂牛奶中分别放入50μl的20μg/ml及0.02μg/ml的Fc γ RIIIa-GST后在常温下反应1小时。洗涤后,分别处理50μl的山羊抗GST-HRP (GE Healthcare公司, RPN1236V)并在常温下进行抗体反应1小时后洗涤。加入50μl的1-Step Ultra TMB-ELISA底物溶液(赛默飞世尔公司,34028)来显色后,放入50μl的2M的硫酸来终止反应后利用Epoch酶标仪(BioTek公司)分析吸光度。结果,确认到本发明中开发的新型Fc变体中的PS301、PS303、PS305、PS205、PS207、PS101、PS102、PS105、PS106及PS107(表1)具有与作为认证为Her2阳性乳腺癌治疗剂的现有公知的马吉妥昔单抗的VLPLL变体具有相似或显著高的Fc γ RIIIa结合力(图8)。

[0163] 表1。

[0164]	#	突变	序列编号
	PS301	K222N/F243L/P247I/R292P/Y300L/V305I/A330L/I332E	22及37
	PS303	S239D/P247I/Y300L/V305I/A330L/I332E/A339Q/N361D/P387Q	23及38
	PS305	S239D/R292P/Y300L/A330L/A339Q/P387Q/F405L	24及39
[0165]	PS205	F243L/P247I/R292P/Y300L/A330L/I332E/P396L	25及40
	PS207	F243L/P247I/R292P/A330L/I332E/A339Q/P396L/S415G	26及41
	PS101	F243L/P247I/R292P/Y300L/V305I/A330L/I332E/A339Q/P387Q	27及42
	PS102	H224R/F243L/P247I/R292P/Y300L/V303I/V305I/A330L/I332E/A339Q/P387Q	28及43
	PS105	R292P/Y300L/V305I/A330L/I332E/A339Q/P387Q	29及44
	PS106	F243L/P247I/M252V/R292P/Y300L/V305I/A330L/I332E/A339Q/D356G/P387Q	30及45
	PS107	F243L/P247I/R292P/Y300L/V305I/A330L/I332E/A339Q/D356G/P387Q	31及46
	XMa	S239D/F243L/R292P/Y300L/V305I/A330L/I332E/P396L	32及47
	XMt	S239D/P247I/A330L/I332E/A339Q	33及48
	MM	F243L/P247I/R292P/Y300L/V305I/A339Q/P396L	34及49
	XMM	S239D/F243L/P247I/R292P/Y300L/V305I/A330L/I332E/A339Q/P396L	35及50

[0166] 实施例7.纯化Fc γ RIIIa结合力得到提高的糖基化曲妥珠单抗Fc变体

[0167] 为了纯化上述实施例6中通过培养液酶联免疫吸附测定确认具有高的Fc γ RIIIa结合力的曲妥珠单抗Fc变体,向变体中加入蛋白A树脂树脂(resin)并在4℃的温度下搅拌16小时后,通过降速(spin down)来回收树脂后,使用2ml的磷酸盐缓冲溶液洗涤并300μl的

100mM的甘氨酸(pH 2.7)缓冲液洗脱(elution)后,使用100 μ l的1M的Tris-HCl(pH 8.0)中和。为了更换缓冲液,使用Amicon Ultra-4离心过滤装置(centrifugal filter units)30K(默克密理博公司(Merck Millipore),UFC503096)。结果,确认到纯化了高纯度的糖基化抗体曲妥珠单抗Fc变体(图9)。

[0168] 实施例8.通过酶联免疫吸附测定分析糖基化曲妥珠单抗Fc变体的Fc γ RIIIa及Fc γ RIIb结合力

[0169] 为了确认上述实施例7中表达及纯化的糖基化曲妥珠单抗Fc变体对Fc γ RIIIa及Fc γ RIIb的结合力,进行酶联免疫吸附测定。具体地,将各50 μ l的以4 μ g/ml的浓度稀释在0.05M的碳酸钠(pH9.6)的Fc γ Rs-GST(Fc γ RIIIa-158V-GST、Fc γ RIIIa-158F-GST及Fc γ RIIb-GST)分注到平底聚苯乙烯高结合96孔酶标板(Costar公司,3590)中,以4 $^{\circ}$ C的温度固定16小时后,使用100 μ l的4%的脱脂牛奶(GenomicBase公司,SKI400)在常温下封闭2小时。然后,将使用180 μ l的0.05%的PBST洗涤4次并使用1%的脱脂牛奶连续稀释的各糖基化曲妥珠单抗Fc变体向各孔分注50 μ l后在常温下反应1小时。将其洗涤后,处理50 μ l的辣根过氧化物酶-蛋白L(GenScript公司,M00098)并在常温下进行过抗体反应1小时后洗涤。然后,加入50 μ l的1-Step Ultra TMB-ELISA底物溶液(赛默飞世尔公司,34028)来显色后,加入50 μ l的2M的硫酸(H₂SO₄)来终止反应后利用Epoch酶标仪(BioTek公司)分析吸光度。

[0170] 结果,与分别以作为B细胞淋巴瘤及Her2阳性乳腺癌治疗剂得到美国食品药品监督管理局认证的糖基化Fc变体(DE及VLPLL)及由现有公知的突变的单纯组合构成的Fc变体(XMa、XMt、MM及XMM)相比,本发明的糖基化曲妥珠单抗Fc变体示出具有显著高的Fc γ RIIIa/Fc γ RIIb选择性结合力(图10及图11)。尤其,包含从不是公知的功能得到提高的Fc变体突变的单纯组合的糖基化抗体Fc变体的巨大文库探索中筛选的追加并删除一部分突变来最优化的突变的Fc变体在Fc γ RIIIa/Fc γ RIIb选择性结合力诱导中表现出非常有效(图12),根据他阿门的结合特性分为如下述表2所示的3组。

[0171] 表2

Fc变体 (PS)	与DE相比	与VLPLL相比
	Fc γ RIIIa结合力提高	Fc γ RIIIa结合力提高
101、102、107	Fc γ RIIb结合力减少	Fc γ RIIb结合力减少
106、205、301、303、305	Fc γ RIIIa结合力提高	Fc γ RIIIa结合力提高
	Fc γ RIIb结合力减少	Fc γ RIIb结合力相似
105、207	Fc γ RIIIa结合力相似	Fc γ RIIIa结合力提高
	Fc γ RIIb结合力减少	Fc γ RIIb结合力减少

[0173] 实施例9.测定糖基化曲妥珠单抗Fc变体的Fc γ RIIIa及Fc γ RIIb结合常数

[0174] 利用Octet R8(赛多利斯公司(Sartorius))设备测定上述实施例7中表达及纯化的糖基化曲妥珠单抗Fc变体中的PS101、PS102及PS107变体的定量结合常数。具体地,使用磷酸盐缓冲溶液在经过10分钟的水化(hydration)的Ni-NTA生物传感器(biosensor)中校准基线(baseline)60秒钟后,分别固定(immobilization)5 μ g/ml的Fc γ RIIIa-158V-链霉亲和素-His、Fc γ RIIIa-158F-streapavidin-His及Fc γ RIIb-streapavidin-His。固定后,再

次使用磷酸盐缓冲液校准基线一次,然后,接着将使用磷酸盐缓冲溶液连续稀释的曲妥珠单抗Fc变体结合 (association) 90秒钟。然后,使用磷酸盐缓冲溶液分解 (dissociation) 150秒钟来获得全部动力学传感图 (full kinetics sensorgram),利用Octet BLIDiscovery 12.2软件 (software) 获得包括定量结合常数在内的动力学系数 (kinetics parameters)。

[0175] 表3

	FcγRIIIa-158V				FcγRIIIa-158F				FcγRIIb				A/I 比例	
	K _D (nM)	k _{on} (10 ⁴ /Ms)	k _{dis} (10 ⁻³ /s)	倍数	K _D (nM)	k _{on} (10 ⁴ /Ms)	k _{dis} (10 ⁻³ /s)	倍数	K _D (nM)	k _{on} (10 ⁴ /Ms)	k _{dis} (10 ⁻³ /s)	倍数	158V	158F
曲妥珠单抗	425±132	1.34±0.102	5.56±1.34	1.00	489±10.2	0.900±0.319	4.40±0.0640	1.00	657±10.5	2.38±0.0265	1.56±0.00750	1.00	1.55	1.34
曲妥珠单抗-VLPL	87.4±15.0	1.97±0.0260	1.73±0.317	4.86	77.8±3.47	1.85±0.0235	1.44±0.0825	6.29	943±27.3	1.61±0.01000	1.52±0.0345	0.70	10.8	12.1
曲妥珠单抗-DE	59.4±0.02	3.20±0.161	1.90±0.0945	7.15	78.8±7.83	1.88±0.0690	1.47±0.0925	6.21	74.8±0.405	4.3±0.00500	1.07±0.00550	8.78	1.26	0.95
曲妥珠单抗-PS101	47.5±8.95	3.57±0.579	1.64±0.0445	8.95	42.8±0.770	2.88±0.0405	1.23±0.00500	11.4	859±9.90	1.64±0.00150	1.41±0.0175	0.77	18.1	20.1
曲妥珠单抗-PS102	34.3±10.3	6.16±0.645	2.05±0.415	12.4	54.2±6.3	3.56±0.129	1.92±0.155	9.03	1140±56.0	1.38±0.0355	1.57±0.0370	0.57	33.3	21.1
曲妥珠单抗-PS107	18.4±2.26	3.74±1.60	0.654±0.210	23.1	32.6±2.98	3.04±0.139	0.987±0.0455	15.0	867±3.95	1.78±0.000500	1.54±0.00650	0.76	47.1	26.6

[0177] 结果,确认到与野生型曲妥珠单抗相比,发掘的3种曲妥珠单抗Fc变体(曲妥珠单抗-PS101、曲妥珠单抗-PS102及曲妥珠单抗-PS107)示出对Fc γ RIIIa-158V最大提高23倍的结合力以及对Fc γ RIIIa-158F最大提高15倍的结合力,对Fc γ RIIb示出降低1.8倍的结合力(曲妥珠单抗-PS101对Fc γ RIIIa-158V:8.95倍,对Fc γ RIIIa-158F:11.4倍,对Fc γ RIIb:0.77倍;曲妥珠单抗-PS102对Fc γ RIIIa-158V:12.4倍,对Fc γ RIIIa-158F:9.03倍,对Fc γ RIIb:0.57倍;曲妥珠单抗-PS107对Fc γ RIIIa-158V:23.1倍,对Fc γ RIIIa-158F:15.0倍,对Fc γ RIIb:0.76倍)(表3)。

[0178] 实施例10.分析糖基化曲妥珠单抗Fc变体与HER2表达靶向细胞的结合

[0179] 将本发明的Fc变体导入模型抗体(曲妥珠单抗)后,利用作为曲妥珠单抗的抗原的HER2表达癌细胞株SKBR-3来分析是否保持抗原结合力。具体地,向4×10⁶的SKBR-3一同放入10nM的本发明的曲妥珠单抗Fc变体(TRZ-PS101、TRZ-PS102及TRZ-PS107)与Protein A-FITC,在冰(ice)中培养30分钟后使用磷酸盐缓冲溶液洗涤2次来准备根据各Fc变体的试样。使用BD FACSLytic流式细胞仪来分析准备好的试样并根据FITC荧光强度确认结合程度及结合与否。

[0180] 结果,确认到未导入Fc变异的野生型曲妥珠单抗与导入本发明的Fc变体的曲妥珠单抗Fc变体的抗原结合力都相同(图13)。通过此可知即使导入本发明的Fc变体也不给抗原结合带来影响。

[0181] 实施例11.分析糖基化曲妥珠单抗Fc变体与细胞膜表达Fc γ RIIIa的结合力

[0182] 为了模拟(mimic)NK细胞表面表达的Fc γ RIIIa与糖基化曲妥珠单抗Fc变体的结

合,在CHO细胞表面表达纯(naïve)Fc γ RIIIa后分析与本发明的曲妥珠单抗Fc变体的结合力。具体地,利用FLP-FRT基因重组系统分别将人类Fc γ RIIIa-158V及人类Fc γ RIIIa-158F的基因克隆到插入有FRT位点的pcDNA5/FRT质粒(英杰公司,V601020)来准备。通过与表达作为使相关质粒引起基因重组的酶的FLP的pOG44质粒(英杰公司,V600520)一同共转染(co-transfection)到插入有FRT位点的CHO细胞(英杰公司,R75807)诱导基因重组来在CHO细胞的染色体脱氧核糖核酸整合有人类Fc γ RIIIa脱氧核糖核酸,从而分别制备稳定表达人类Fc γ RIIIa-158V及人类Fc γ RIIIa-158F的CHO细胞株。在此情况下,为了在转染后仅筛选引起基因整合(gene integration)的CHO细胞,一同整合潮霉素-B拮抗基因,通过处理500 μ g/ml的潮霉素-B(英杰公司,10687010)来筛选稳定表达人类Fc γ RIIIa的CHO细胞株(CHO-Fc γ RIIIa-158V及CHO-Fc γ RIIIa-158F)。分别向制备的CHO-Fc γ RIIIa-158V及CHO-Fc γ RIIIa-158F一同放入2.5nM的糖基化曲妥珠单抗Fc变体(TRZ-PS101、TRZ-PS102及TRZ-PS107)与HER2-Alexa488荧光探针来诱导结合后,利用BD FACSLyric流式细胞仪分析荧光。

[0183] 结果,与可溶的(soluble)Fc γ RIIIa的结合力分析结果相似地,本发明的糖基化曲妥珠单抗Fc变体(TRZ-PS101、TRZ-PS102及TRZ-PS107)示出具有比作为阳性对照组的曲妥珠单抗-DE、曲妥珠单抗-VLPLL显著高的结合力(图14)。

[0184] 实施例12. 实时分析糖基化曲妥珠单抗Fc变体的抗体依赖细胞介导的细胞毒作用功效

[0185] 为了实时确认本发明的糖基化曲妥珠单抗Fc变体的抗体依赖细胞介导的细胞毒作用功效,利用xCELLigence-RTCA-SP(安捷伦公司(Agilent))设备实时监测细胞毒性(cell cytotoxicity)。具体地,以 1×10^4 cell/well的密度在96孔电子微孔板(E-plate 96)中包被SKBR-3后,在5%CO₂的培养期中培养24小时。24小时后,分别放入20pM的糖基化曲妥珠单抗Fc变体(TRZ-PS101、TRZ-PS102及TRZ-PS107)和人类PBMC并培养来诱导靶向细胞的凋亡。在此情况下,以E:T(效应细胞:靶向细胞)的比例为2:1及5:1来分析,完全裂解(full lysis)通过处理2%的Triton X-100、1%的十二烷基磺酸钠(SDS)、100mM的氯化钠(NaCl)及1mM的二乙胺四乙酸(EDTA)缓冲液来计算细胞溶解(cytolysis)的百分比(%)。

[0186] 确认各曲妥珠单抗Fc变体的实施细胞凋亡曲线图的结果,在E:T比例为2:1(图15)及5:1(图16)的情况下,与作为对照组的野生型曲妥珠单抗及作为阳性对照组的曲妥珠单抗-DE及曲妥珠单抗-VLPLL相比,作为本发明的曲妥珠单抗Fc变体的曲妥珠单抗-PS101、曲妥珠单抗-PS102及曲妥珠单抗-PS107(TRZ-PS101、TRZ-PS102及TRZ-PS107)都示出显著高的靶向细胞杀灭效果。在基于实时曲线图(图15的A部分及16的A部分)的端点分析中,也确认到本发明的曲妥珠单抗-PS101、曲妥珠单抗-PS102及曲妥珠单抗-PS107具有显著优秀的细胞毒性百分比(% of cytotoxicity)(图15的B部分及16的B部分)。

[0187] 实施例13. 糖基化曲妥珠单抗Fc变体的免疫原性预测分析

[0188] 为了分析本发明的糖基化曲妥珠单抗Fc变体通过与MHC2类分子(class II)结合的免疫原性,基于IEDB来确认本发明的Fc变体随碱基序列的免疫原性可能性。具体地,按照百分位数顺序(percentil rank)分析Fc肽(PS101、PS102及PS107)对人类种最多表达的27种类型的人类白细胞抗原(HLA)(HLA-DRB1*01:01、HLA-DRB1*03:01、HLA-DRB1*04:01、HLA-DRB1*04:05、HLA-DRB1*07:01、HLA-DRB1*08:02、HLA-DRB1*09:01、HLA-DRB1*11:01、HLA-DRB1*12:01、HLA-DRB1*13:02、HLA-DRB1*15:01、HLA-DRB3*01:01、HLA-DRB3*02:02、HLA-

DRB4*01:01、HLA-DRB5*01:01、HLA-DQA1*05:01/DQB1*02:01、HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01、HLA-DQA1*03:01/DQB1*03:02、HLA-DQA1*04:01/DQB1*04:02、HLA-DQA1*01:01/DQB1*05:01、HLA-DQA1*01:02/DQB1*06:02、HLA-DPA1*02:01/DPB1*01:01、HLA-DPA1*01:03/DPB1*02:01、HLA-DPA1*01:03/DPB1*04:01、HLA-DPA1*03:01/DPB1*04:02、HLA-DPA1*02:01/DPB1*05:01及HLA-DPA1*02:01/DPB1*14:01)的结合力,在此情况下,将Fc分为15-mer的肽形态来分析。基于以数据库为基础的预测顺序(rank),高亲和性(highaffinity)表示为红色(red),中间亲和性(intermediated affinity)表示为橙色(orange)及低亲和性(low affinity)表示为黄色(yellow)来以热图示出。

[0189] in silico分析结果示出,人类IgG1 Fc与本发明的Fc变体的免疫原性预测结果没有大的差异(图17)。

[0190] 实施例14.分析糖基化曲妥珠单抗Fc变体与动物Fc受体的结合力

[0191] 14-1.生产小鼠Fc γ RIV及猴Fc γ RIII

[0192] 为了检验在小鼠及猴动物模型中的功效,将与人类的Fc γ RIIIa对应的动物的Fc受体克隆为GST融合形态来制备载体(小鼠Fc γ RIV-GST及食蟹猕猴Fc γ RIII-GST)。具体地,首先在30ml的Freestyle293表达培养液(Gibco公司,12338-018)中以1:1的比例混合变体的重链基因与轻链基因后,以4:1的比例混合聚乙烯亚胺(Polyscience公司,23966)与变体基因并在常温下培养20分钟后,以 2×10^6 cells/ml的密度混合到30ml的传代培养的Expi293F细胞中在振荡CO₂培养器中以37℃、125rpm及8%的CO₂的条件培养7天后,通过离心分离来只取上清液。使用25×的磷酸盐缓冲溶液平衡上清液后,使用0.2 μ m的注射器过滤器过滤,放入谷胱甘肽树脂(glutathione resin)(GenScript公司,L00206)后在4℃的温度下搅拌16小时。将搅拌结束的试样降到5ml的一次性(disposable)聚丙烯柱(polypropylene column)(赛默飞世尔公司,29922)来回收树脂后,使用10CV的磷酸盐缓冲溶液洗涤。使用4ml的50mM的Tris-HCl及10mM的还原的谷胱甘肽(reduced glutathione)(pH 8.0)缓冲液洗脱后,为了更换缓冲液,使用Amicon Ultra-4离心过滤装置30K(默克密理博公司,UFC503096)。

[0193] 结果,获得高纯度的小鼠Fc γ RIV-GST及食蟹猕猴Fc γ RIII-GST(图18)。

[0194] 14-2.分析糖基化曲妥珠单抗Fc变体与小鼠Fc γ RIV及猴Fc γ RIII的结合力

[0195] 为了确认与人类Fc γ RIIIa相对应的动物Fc受体(小鼠Fc γ RIV及猴Fc γ RIII)与本发明的曲妥珠单抗Fc变体(TRZ-PS101、TRZ-PS102及TRZ-PS107)的结合力,进行酶联免疫吸附测定分析。具体地,将上述实施例14-1中制备的小鼠Fc γ RIV-GST和食蟹猕猴Fc γ RIII-GST以4 μ g/ml的浓度稀释在0.05M的碳酸钠(pH9.6)中,将各50 μ l分别在平底聚苯乙烯高结合96孔酶标板(Costar公司,3590)中以4℃的温度固定16小时后,使用100 μ l的4%的脱脂牛奶(GenomicBase公司,SKI400)在常温下封闭2小时。然后,将使用180 μ l的0.05%的PBST洗涤4次后使用1%的脱脂牛奶稀释的本发明的糖基化曲妥珠单抗Fc变体向各孔分注50 μ l后在常温下反应1小时。洗涤后,利用50 μ l的辣根过氧化物酶-蛋白L(GenScript公司,M00098)在常温下进行过抗体反应1小时后洗涤。然后,加入50 μ l的1-Step Ultra TMB-ELISA底物溶液(赛默飞世尔公司,34028)来显色后,放入50 μ l的2M的硫酸来终止反应后利用Epoch酶标仪(BioTek公司)分析吸光度。

[0196] 结果示出,本发明的曲妥珠单抗Fc变体(TRZ-PS101、TRZ-PS102及TRZ-PS107)对于

小鼠及食蟹猕猴的Fc受体也对人类受体相似地具有比阳性对照组糖基化Fc变体(DE及VLPLL)显著高的结合力(图19)。

[0197] 实施例15.制备西妥昔单抗或利妥昔单抗Fc变体

[0198] 将本发明的糖基化Fc变体(PS101、PS102及PS107)分别克隆到作为其他模型抗体的西妥昔单抗及利妥昔单抗的重链基因来制备表达载体。具体地,首先在10ml的Freestyle293表达培养液(Gibco公司,12338-018)中以1:1的比例混合变体的重链基因与轻链基因后,以4:1的比例混合聚乙烯亚胺(Polyscience公司,23966)与变体基因并在常温下培养20分钟后,以 2×10^6 cells/ml的密度混合到30ml的传代培养的Expi293F细胞中在振荡(shaking)CO₂培养器中以37℃、125rpm及8%的CO₂的条件培养7天后,通过离心分离来只取上清液。使用25×的磷酸盐缓冲溶液平衡上清液后,使用0.2μm的注射器过滤器过滤,放入蛋白A树脂后在4℃的温度下搅拌16小时。将搅拌结束的试样降到5ml的一次性聚丙烯柱(赛默飞世尔公司,29922)来回收树脂后,使用5ml的磷酸盐缓冲溶液洗涤。使用3ml的100mM的甘氨酸(pH 2.7)缓冲液洗脱后,使用1ml的1M的Tris-HCl(pH 8.0)中和。为了更换缓冲液,使用Amicon Ultra-4离心过滤装置30K(默克密理博公司,UFC503096)。

[0199] 结果,确认到纯化了高纯度的糖基化抗体西妥昔单抗Fc变体及利妥昔单抗Fc变体(图20)。

[0200] 实施例16.分析糖基化西妥昔单抗Fc变体对Fc γ 受体的结合力

[0201] 16-1.分析对人类Fc γ RIIIa及Fc γ RIIb的结合力

[0202] 为了确认上述实施例15中制备的糖基化西妥昔单抗Fc变体(CTX-PS101、CTX-PS102及CTX-PS107)对Fc γ RIIIa及Fc γ RIIb的结合力,进行酶联免疫吸附测定分析。具体地,分别将50μl的以4μg/ml的浓度稀释在0.05M的碳酸钠(pH9.6)的Fc γ Rs-GST(Fc γ RIIIa-158V-GST、Fc γ RIIIa-158F-GST及Fc γ RIIb-GST)在平底聚苯乙烯高结合96孔酶标板(Costar公司,3590)中以4℃的温度固定16小时后,使用100μl的4%的脱脂牛奶(GenomicBase公司,SKI400)在常温下封闭2小时。然后,将使用180μl的0.05%的PBST洗涤4次后使用1%的脱脂牛奶连续稀释的糖基化西妥昔单抗Fc变体(CTX-PS101、CTX-PS102及CTX-PS107)向各孔分注50μl后在常温下反应1小时。洗涤后,利用50μl的辣根过氧化物酶-蛋白L(GenScript公司,M00098)在常温下进行过抗体反应1小时后洗涤。加入50μl的1-Step Ultra TMB-ELISA底物溶液(赛默飞世尔公司,34028)来显色后,放入50μl的2M的硫酸来终止反应后利用Epoch酶标仪(BioTek公司)分析吸光度。

[0203] 结果示出,本发明中制备的糖基化西妥昔单抗Fc变体具有比阳性对照组糖基化Fc变体(DE及VLPLL)显著高的Fc γ RIIIa/Fc γ RIIb选择性结合力(图21)。尤其,确认到当向互不相同的模型治疗用抗体导入Fc变体时可以保持显著优秀的Fc γ RIIIa/Fc γ RIIb选择性结合特性。

[0204] 16-2.分析对小鼠Fc γ RIV及猴Fc γ RIII的结合力

[0205] 为了确认与人类Fc γ RIIIa相对应的动物Fc受体与西妥昔单抗Fc变体的结合力,进行酶联免疫吸附测定分析。具体地,将小鼠Fc γ RIV-GST及食蟹猕猴Fc γ RIII-GST以4μg/ml的浓度稀释在0.05M的碳酸钠(pH9.6)中,将各50μl在平底聚苯乙烯高结合96孔酶标板(Costar公司,3590)中以4℃的温度固定16小时后,使用100μl的4%的脱脂牛奶(GenomicBase公司,SKI400)在常温下封闭2小时。然后,将使用180μl的0.05%的PBST洗涤4

次后使用1%的脱脂牛奶连续稀释的西妥昔单抗Fc变体(CTX-PS101、CTX-PS102及CTX-PS107)向各孔分注50 μ l后在常温下反应1小时。洗涤后,利用50 μ l的辣根过氧化物酶-蛋白L(GenScript公司,M00098)在常温下进行过抗体反应1小时后洗涤。加入50 μ l的1-Step Ultra TMB-ELISA底物溶液(赛默飞世尔公司,34028)来显色后,放入50 μ l的2M的硫酸来终止反应后利用Epoch酶标仪(BioTek公司)分析吸光度。

[0206] 结果示出,与对人类受体一样,本发明中制备的糖基化西妥昔单抗Fc变体对小鼠及食蟹猕猴的Fc受体也具有比阳性对照组糖基化Fc变体(DE及VLPLL)显著高的结合力(图22)。

[0207] 实施例17.分析糖基化利妥昔单抗Fc变体对Fc γ 受体的结合力

[0208] 17-1.分析对人类Fc γ R IIIa及Fc γ R II b的结合力

[0209] 为了确认上述实施例15中制备的糖基化利妥昔单抗Fc变体(RTX-PS101、RTX-PS102及RTX-PS107)对Fc γ R IIIa及Fc γ R II b的结合力,进行酶联免疫吸附测定分析。具体地,将Fc γ Rs-GST(Fc γ R IIIa-158V-GST、Fc γ R IIIa-158F-GST及Fc γ R II b-GST)以4 μ g/ml的浓度稀释在0.05M的碳酸钠(pH9.6)中,将各50 μ l在平底聚苯乙烯高结合96孔酶标板(Costar公司,3590)中以4 $^{\circ}$ C的温度固定16小时后,使用100 μ l的4%的脱脂牛奶(GenomicBase公司,SKI400)在常温下封闭2小时。然后,将使用180 μ l的0.05%的PBST洗涤4次后使用1%的脱脂牛奶连续稀释的糖基化利妥昔单抗Fc变体(RTX-PS101、RTX-PS102及RTX-PS107)向各孔分注50 μ l后在常温下反应1小时。洗涤后,利用50 μ l的辣根过氧化物酶-蛋白L(GenScript公司,M00098)在常温下进行过抗体反应1小时后洗涤。加入50 μ l的1-Step Ultra TMB-ELISA底物溶液(赛默飞世尔公司,34028)来显色后,放入50 μ l的2M的硫酸来终止反应后利用Epoch酶标仪(BioTek公司)分析吸光度。

[0210] 结果示出,本发明中制备的糖基化利妥昔单抗Fc变体具有比阳性对照组糖基化Fc变体(DE及VLPLL)显著高的Fc γ R IIIa/Fc γ R II b选择性结合力(图23)。尤其,确认到在向互不相同的模型治疗用抗体导入Fc变体时可以保持显著优秀的Fc γ R IIIa/Fc γ R II b选择性结合特性。

[0211] 17-2.分析对小鼠Fc γ R IV及猴Fc γ R III的结合力

[0212] 为了确认与人类Fc γ R IIIa相对应的动物Fc受体与利妥昔单抗Fc变体的结合力,进行酶联免疫吸附测定分析。具体地,将小鼠Fc γ R IV-GST及食蟹猕猴Fc γ R III-GST以4 μ g/ml的浓度稀释在0.05M的碳酸钠(pH9.6)中,将各50 μ l在平底聚苯乙烯高结合96孔酶标板(Costar公司,3590)中以4 $^{\circ}$ C的温度固定16小时后,使用100 μ l的4%的脱脂牛奶(GenomicBase公司,SKI400)在常温下封闭2小时。然后,将使用180 μ l的0.05%的PBST洗涤4次后使用1%的脱脂牛奶连续稀释的糖基化利妥昔单抗Fc变体(RTX-PS101、RTX-PS102及RTX-PS107)向各孔分注50 μ l后在常温下反应1小时。洗涤后,利用50 μ l的辣根过氧化物酶-蛋白L(GenScript公司,M00098)在常温下进行过抗体反应1小时后洗涤。加入50 μ l的1-Step Ultra TMB-ELISA底物溶液(赛默飞世尔公司,34028)来显色后,放入50 μ l的2M的硫酸来终止反应后利用Epoch酶标仪(BioTek公司)分析吸光度。

[0213] 结果示出,与对人类受体一样,发掘的糖基化利妥昔单抗Fc变体与对小鼠及食蟹猕猴的Fc受体也具有比阳性对照组糖基化Fc变体(DE及VLPLL)显著高的结合力(图24)。

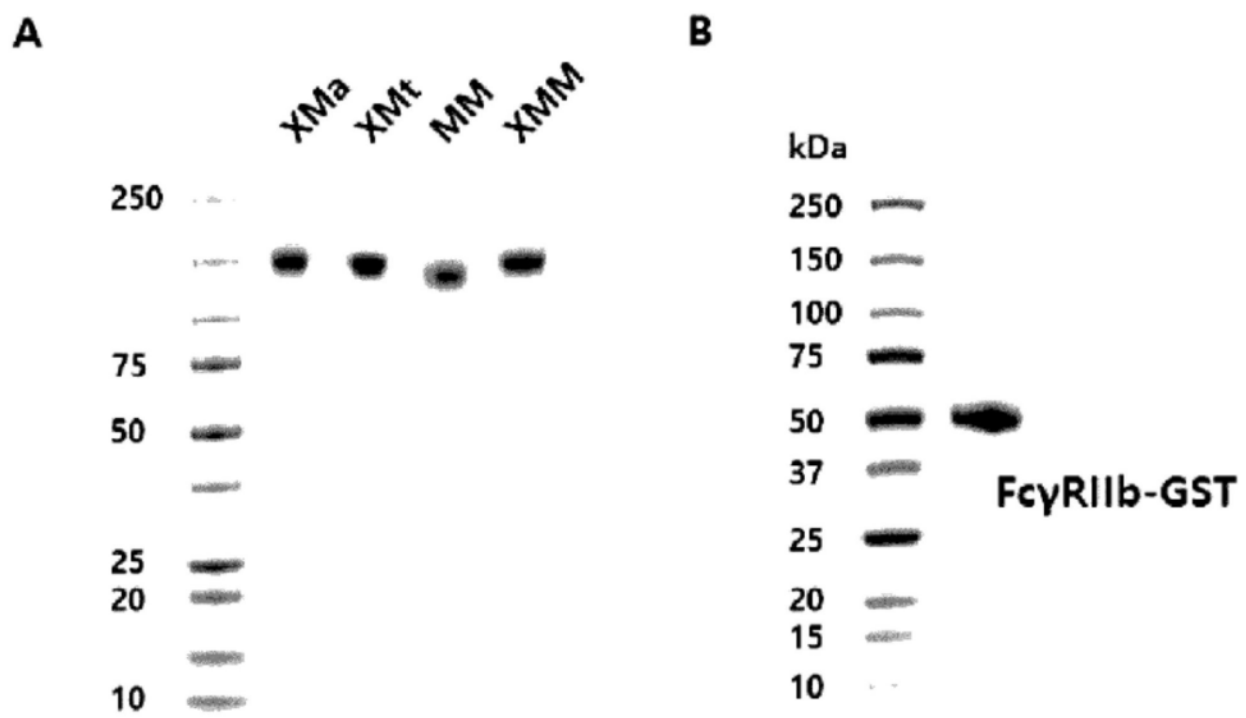


图1

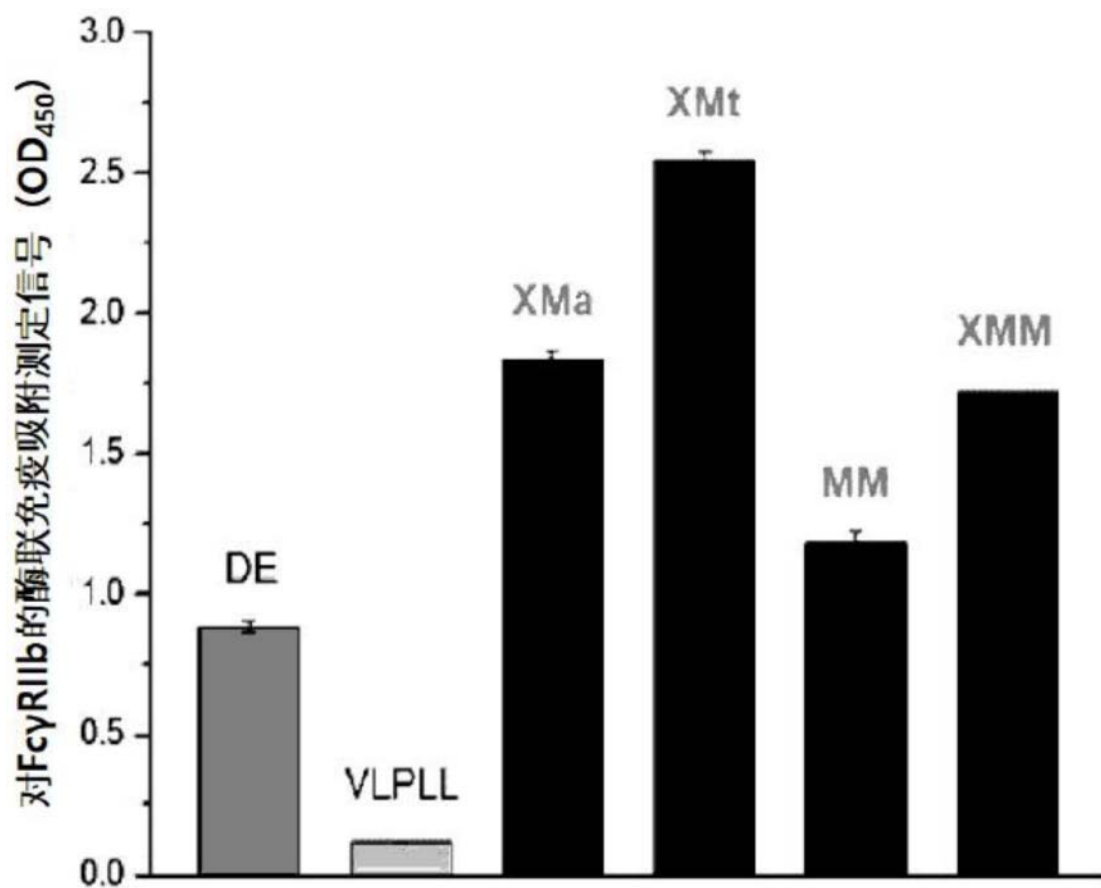


图2

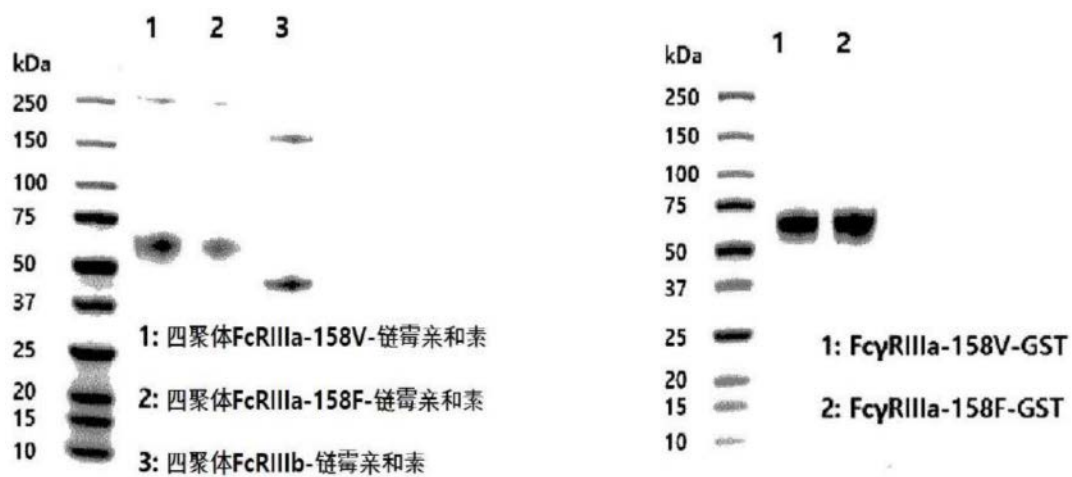


图4

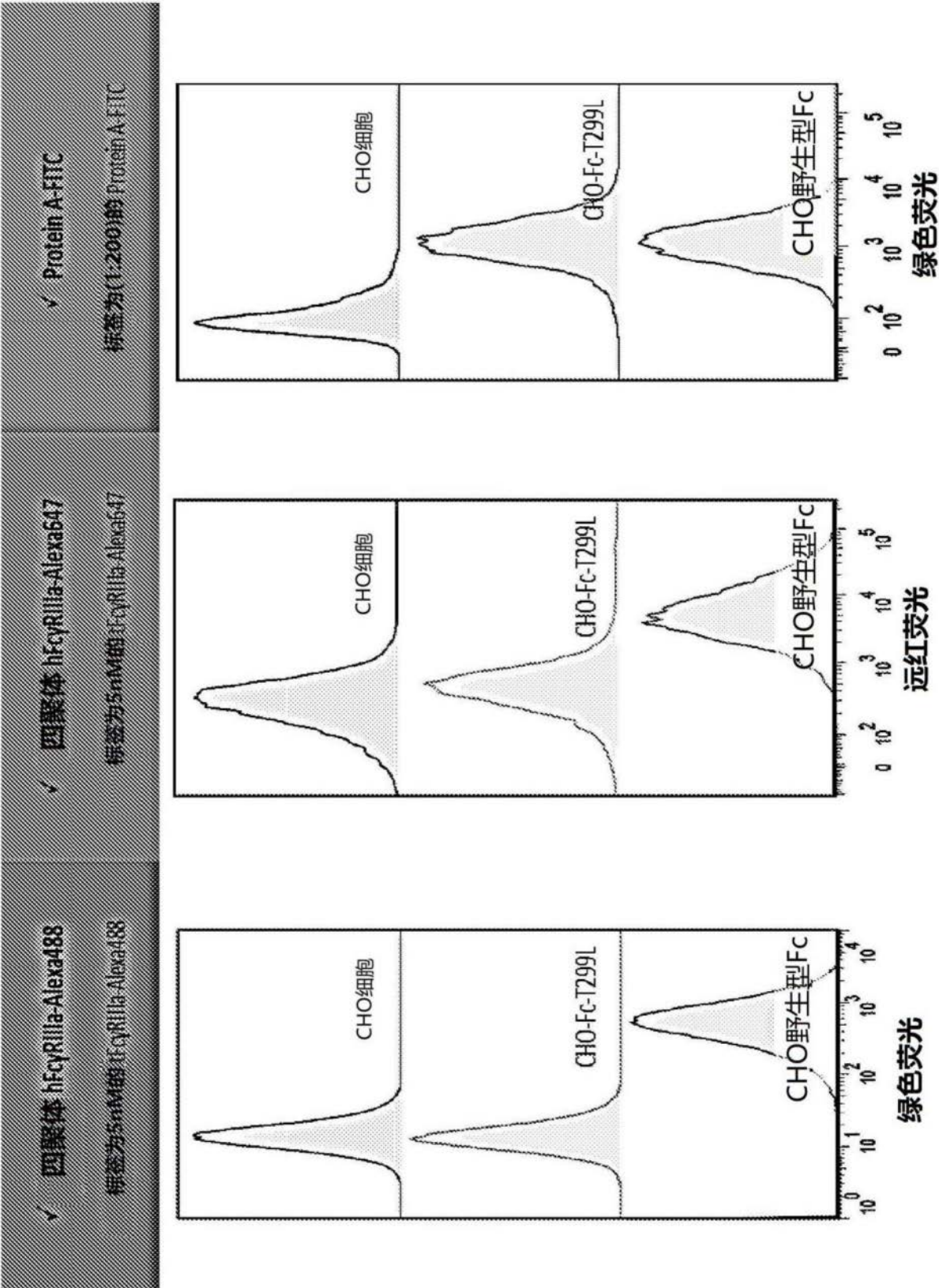


图5



图6

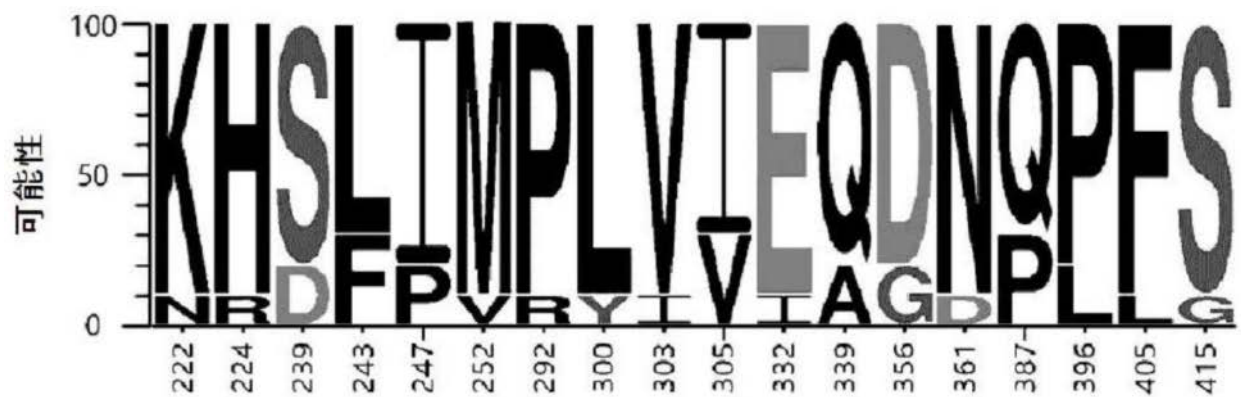


图7

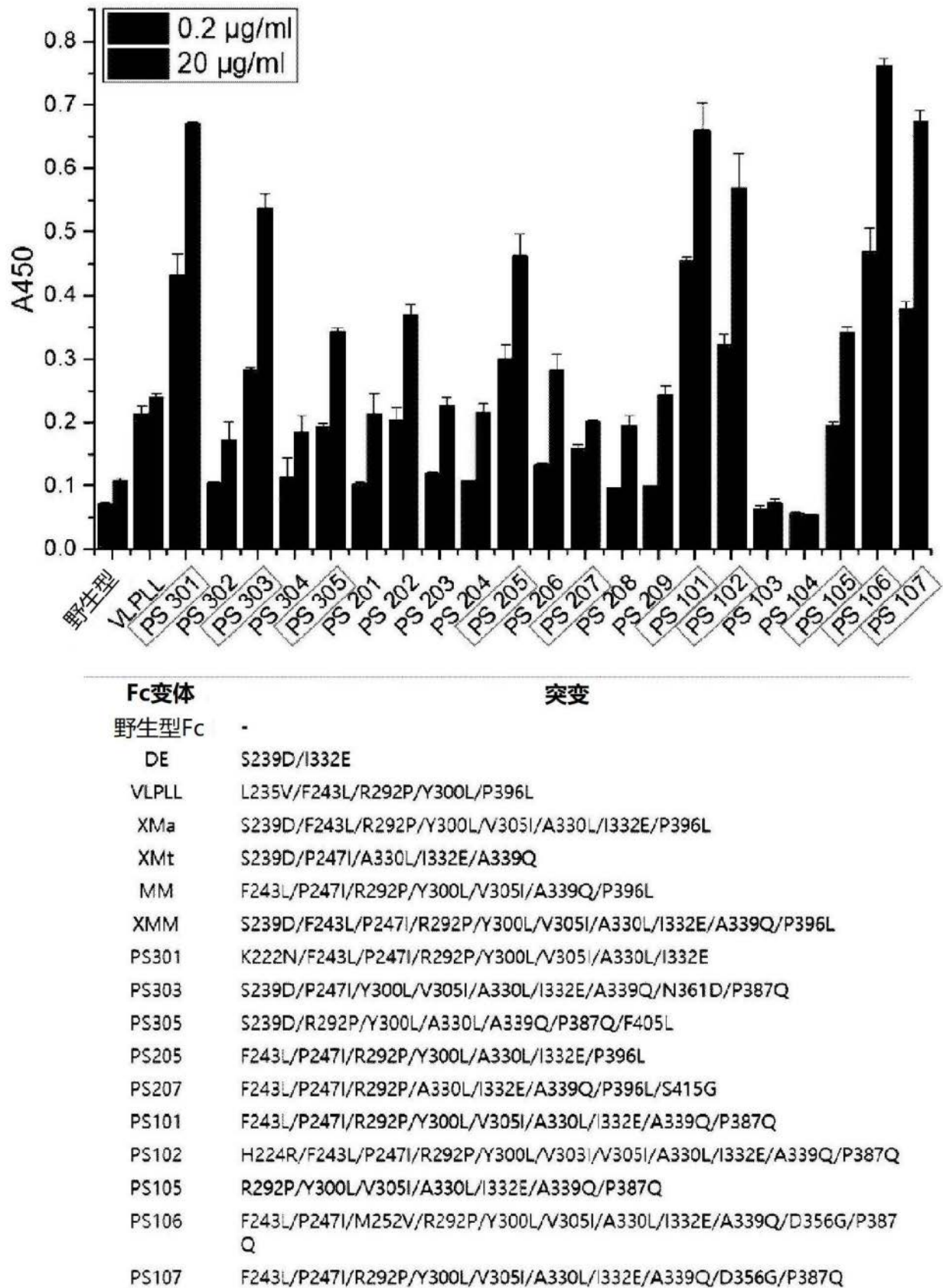


图8

曲妥珠单抗Fc变体

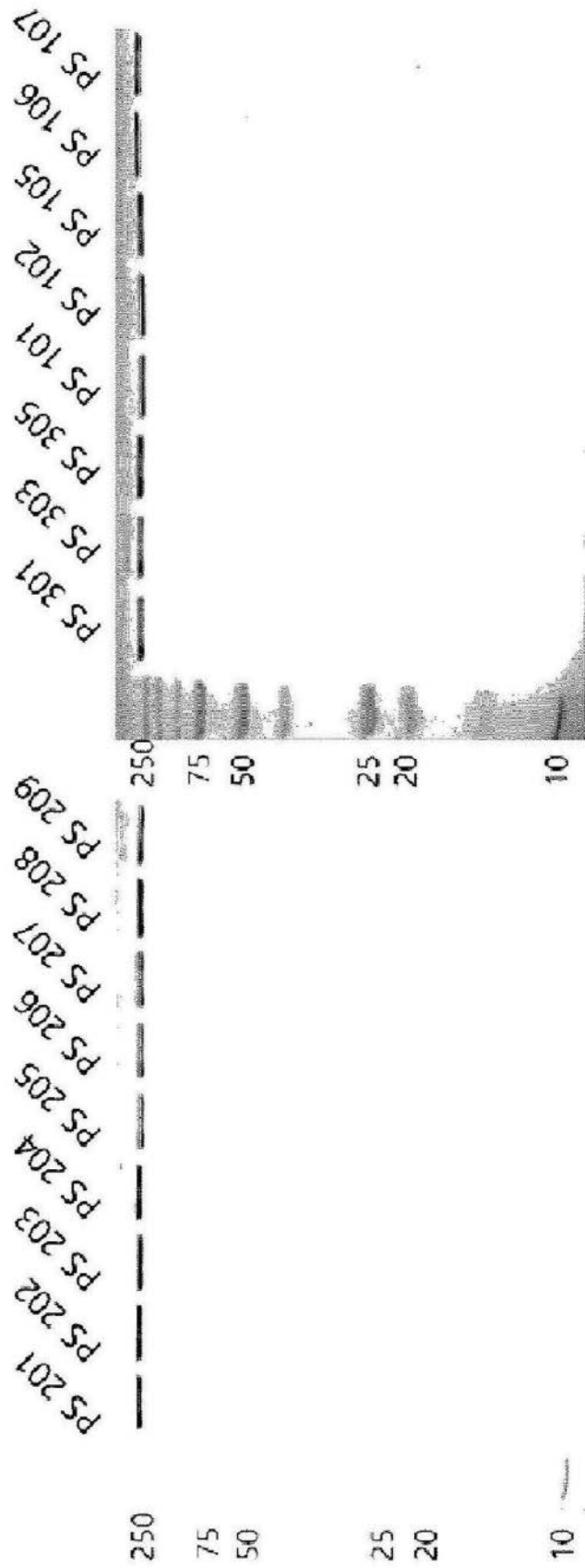


图9

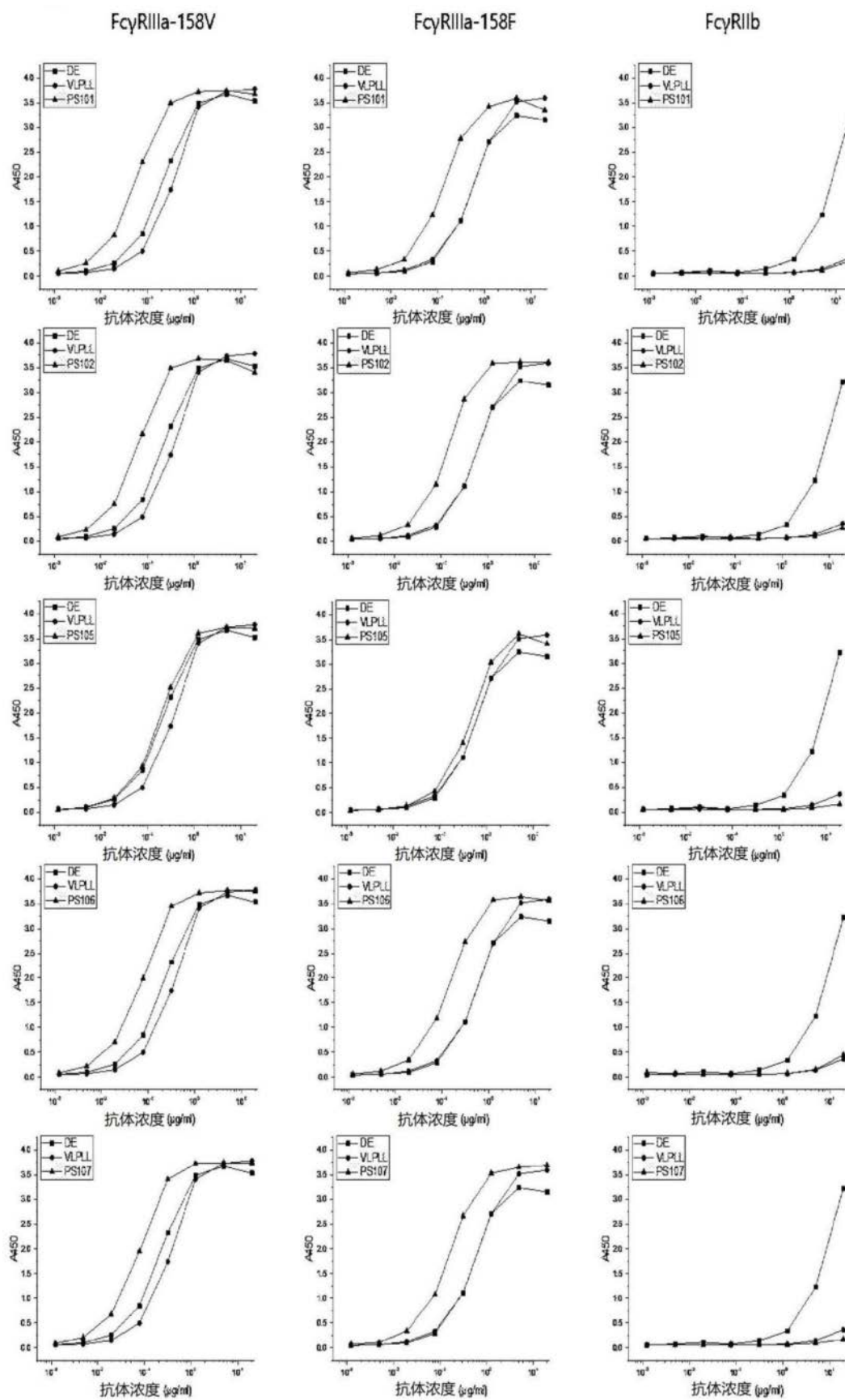


图10

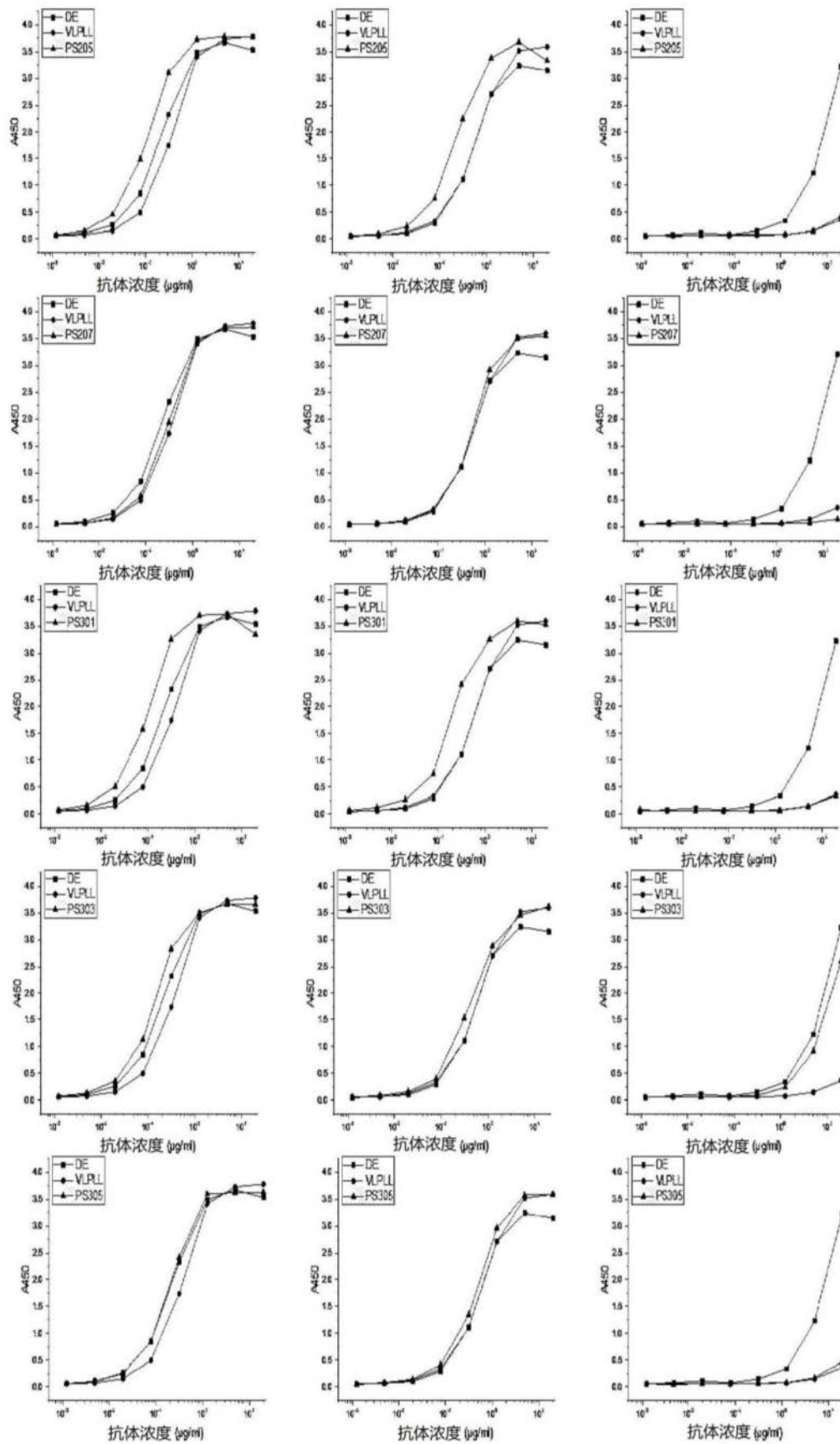


图11

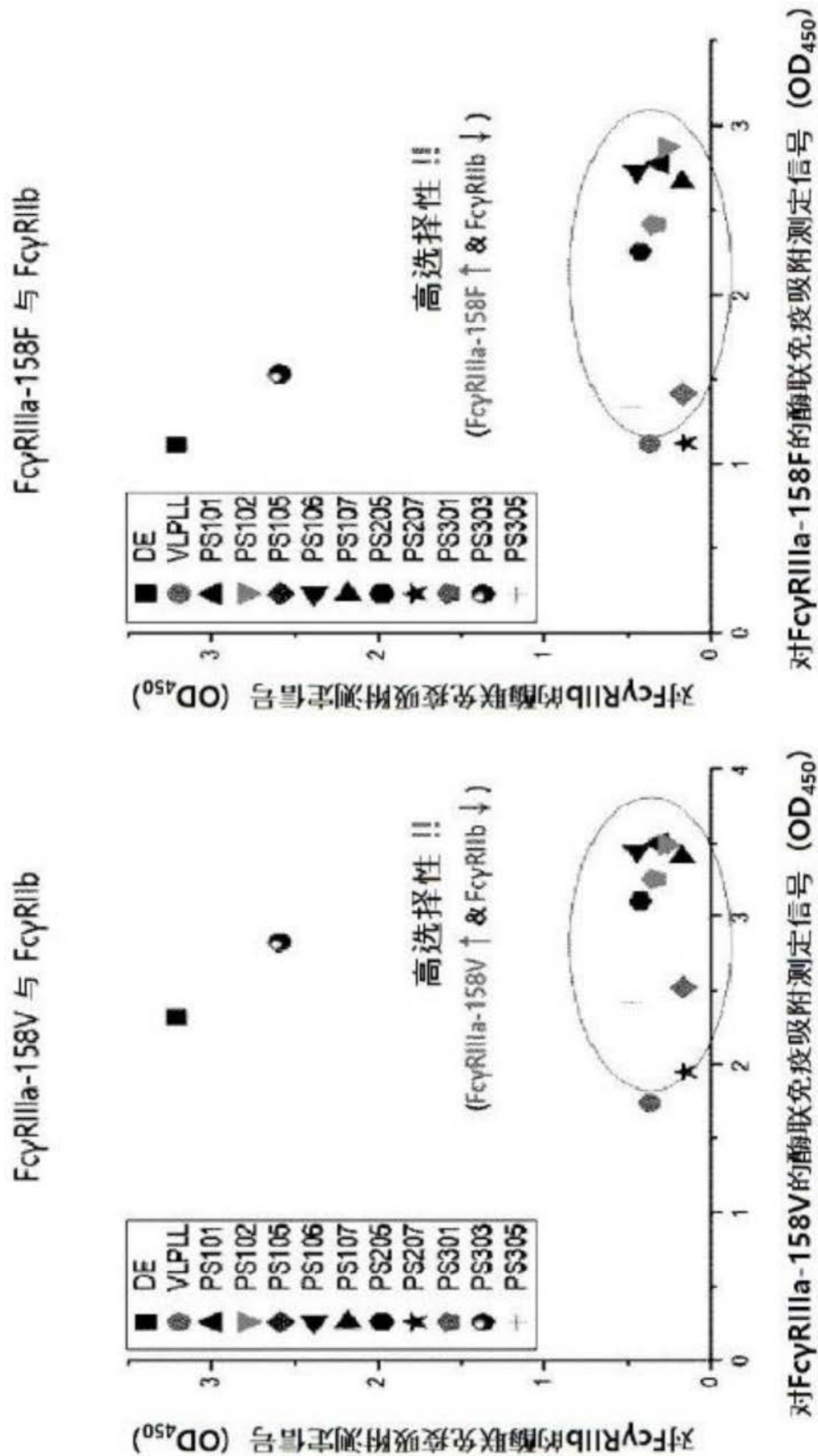


图12

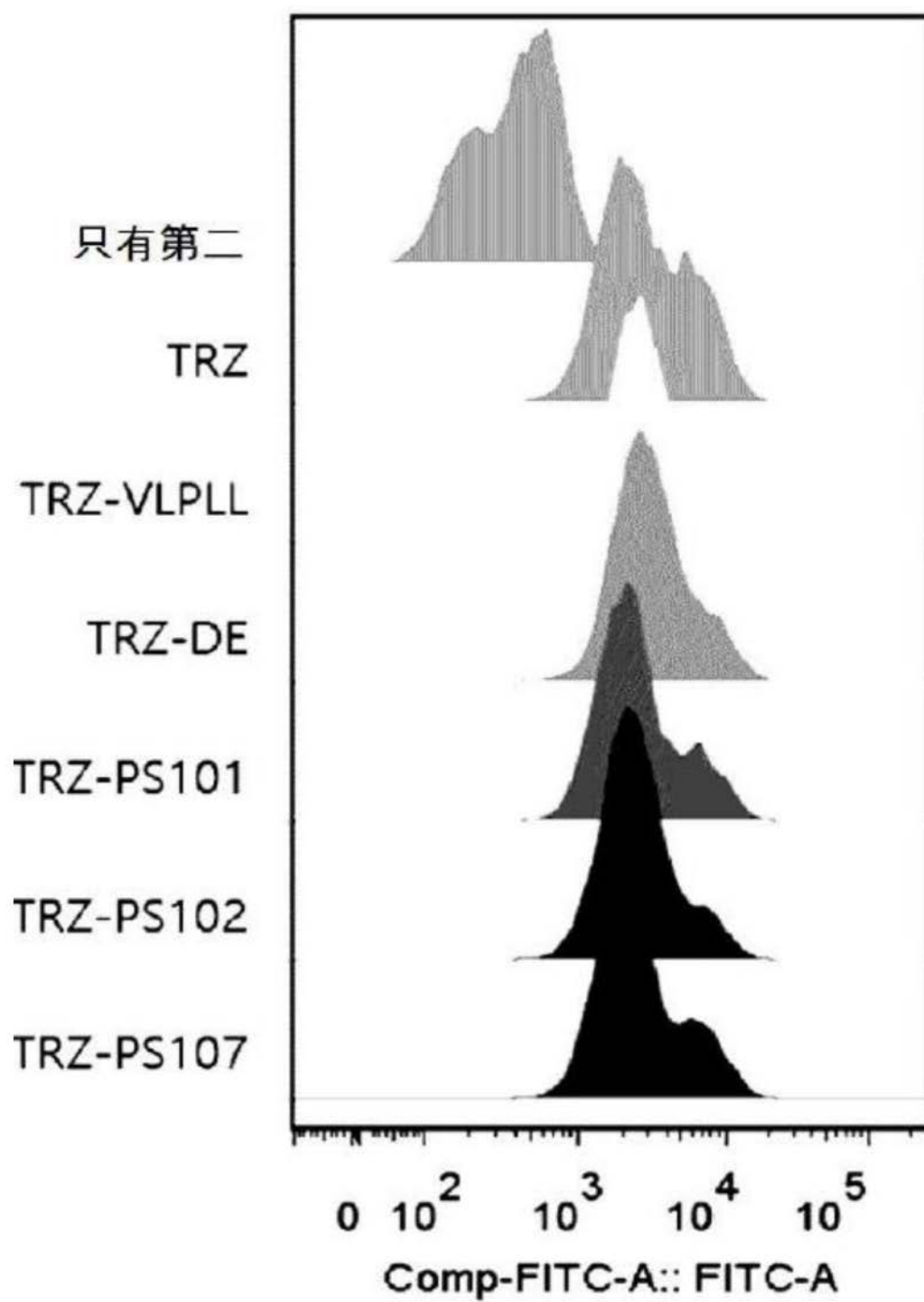


图13

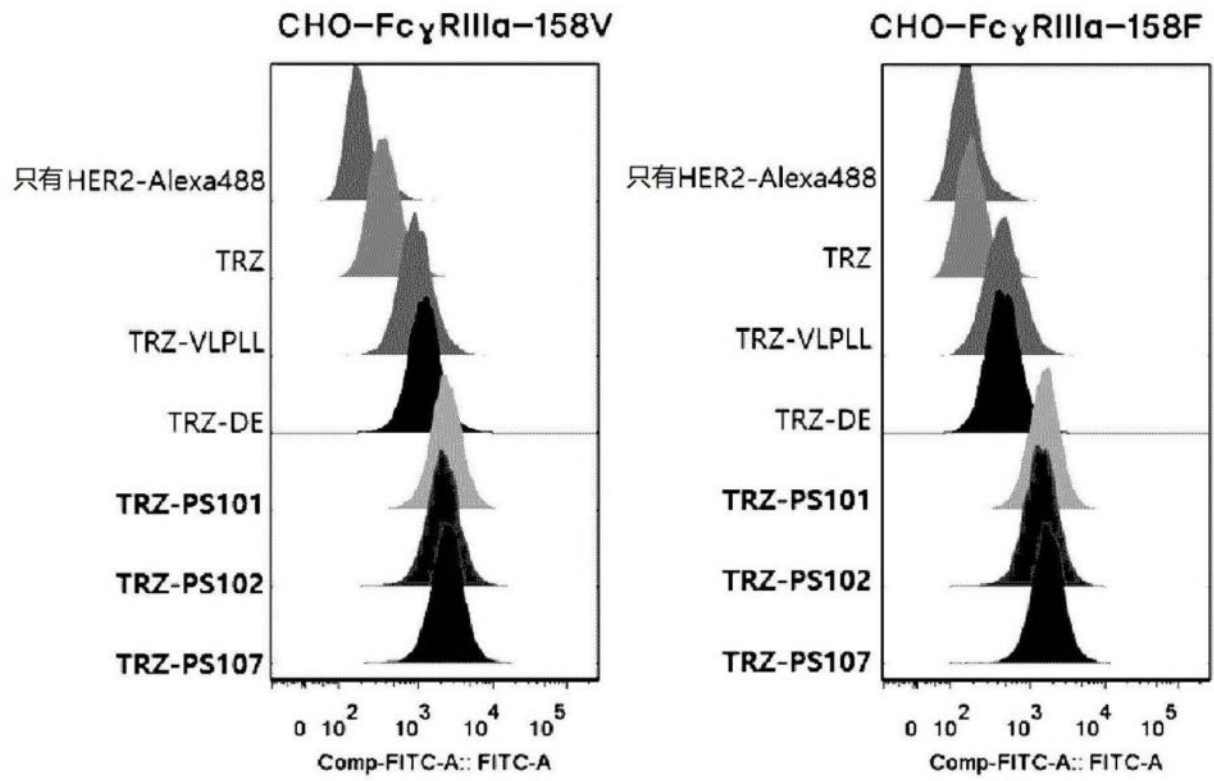


图14

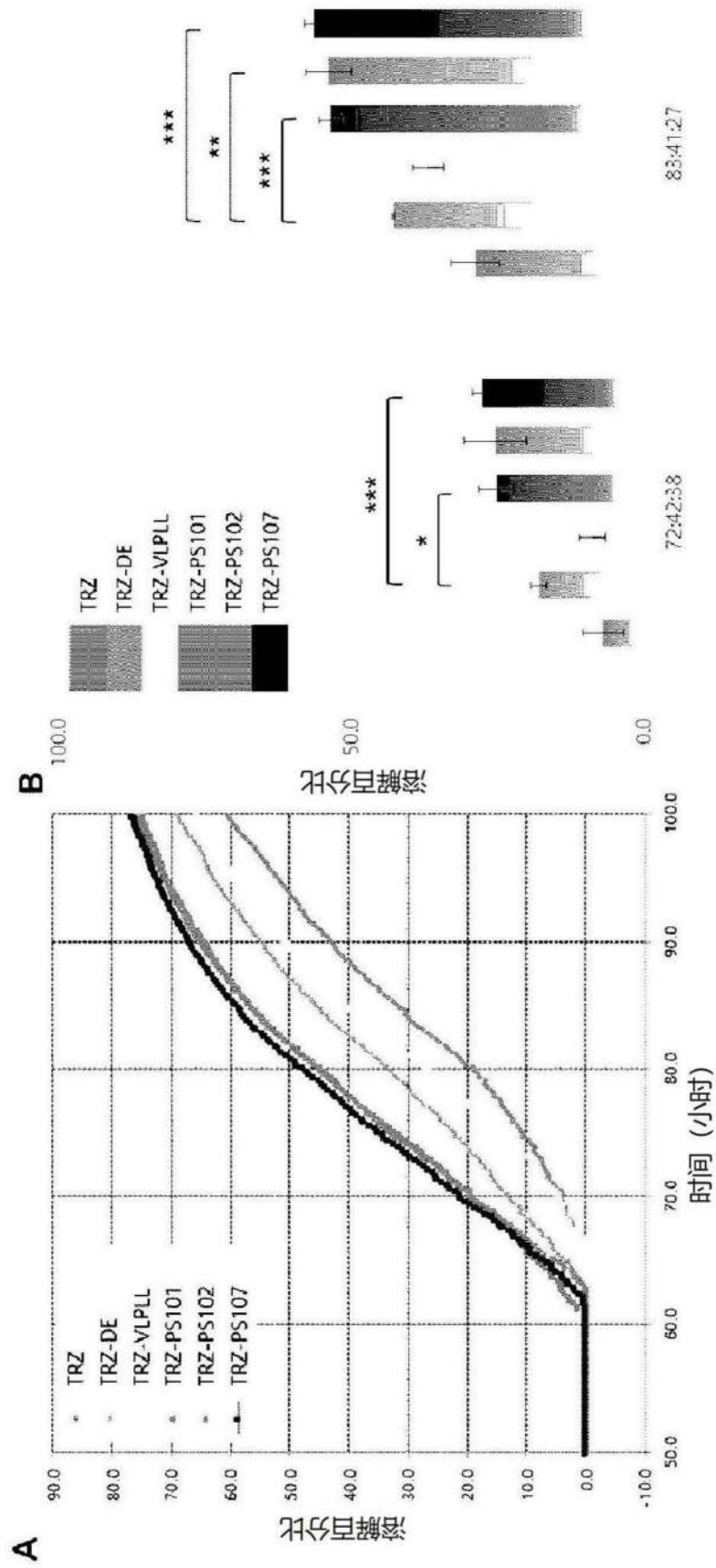


图15

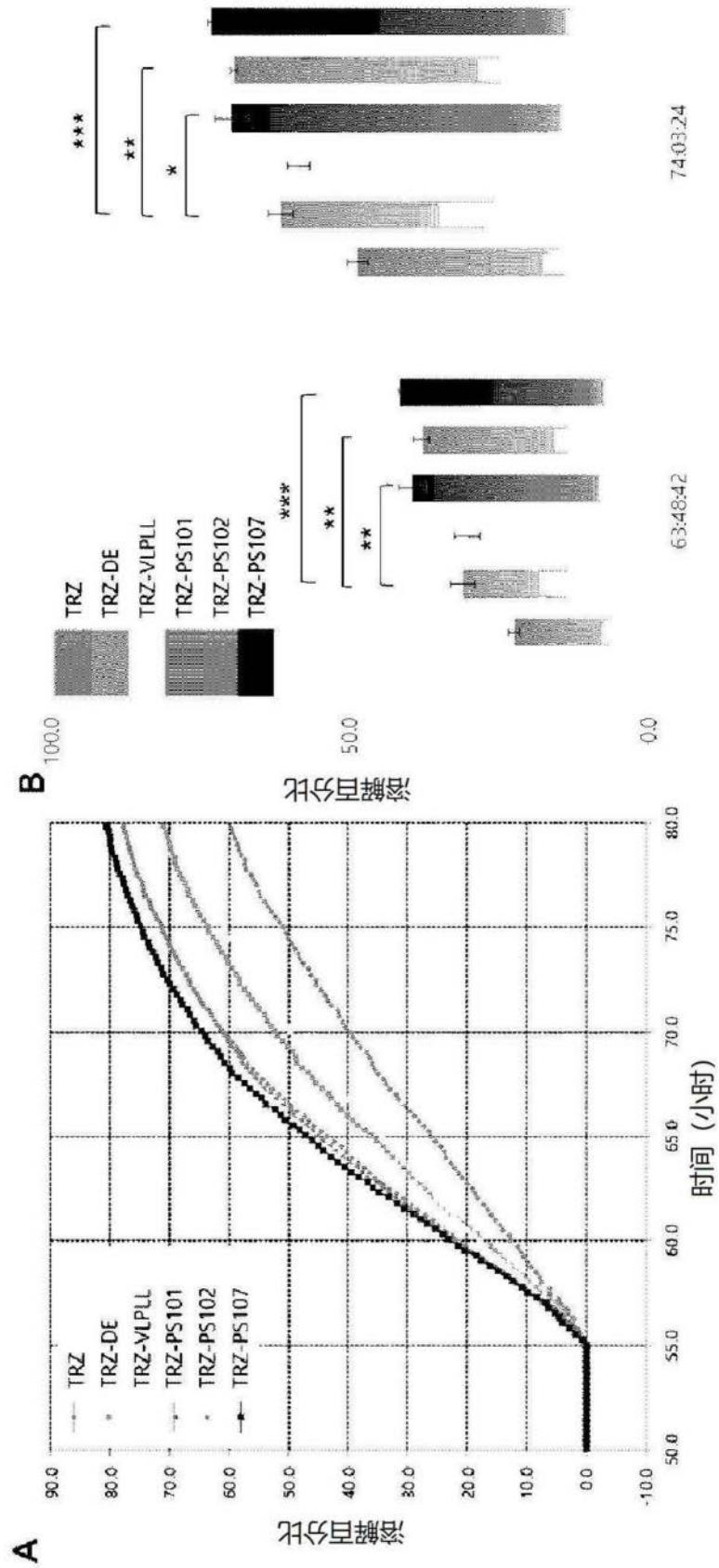


图16

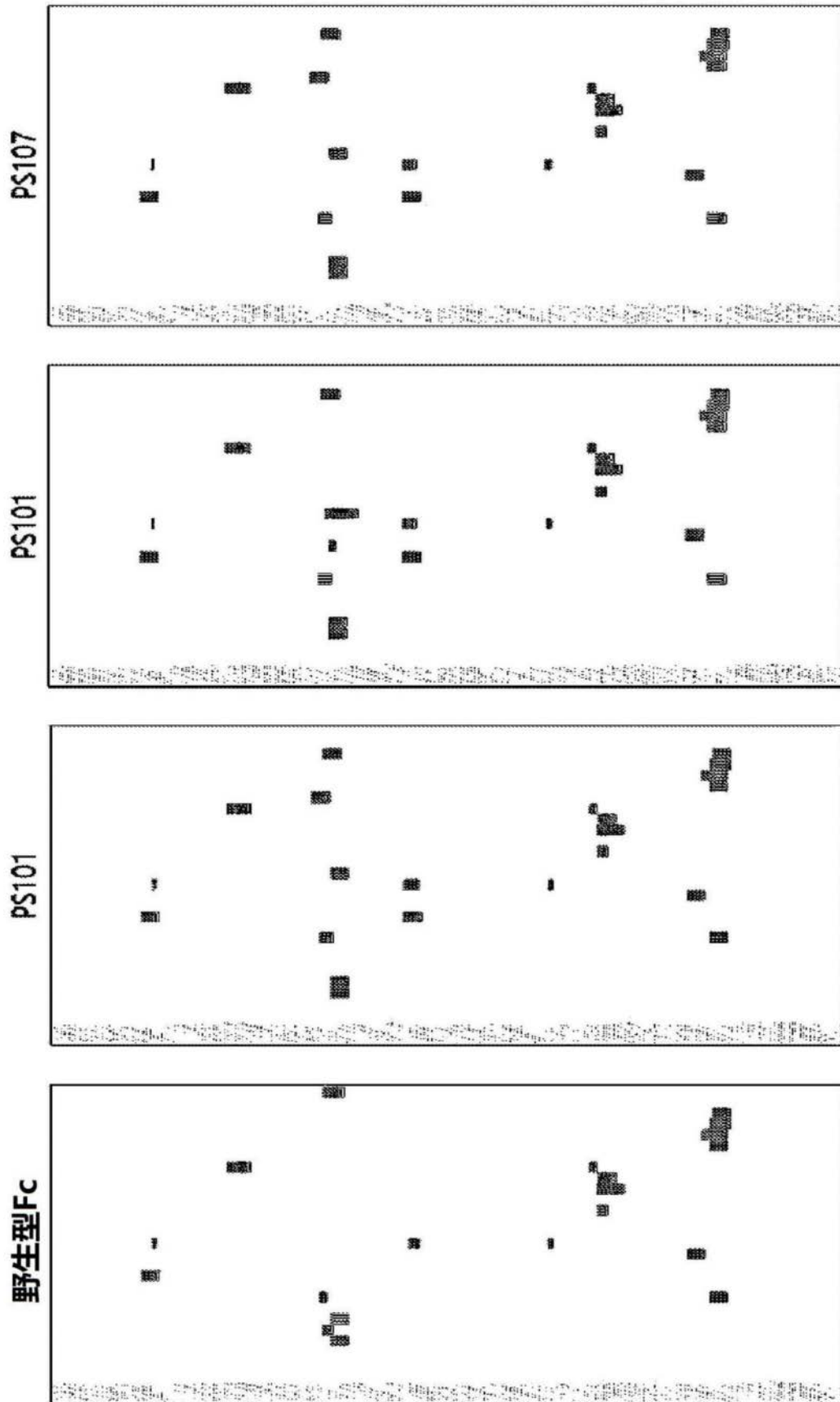


图17

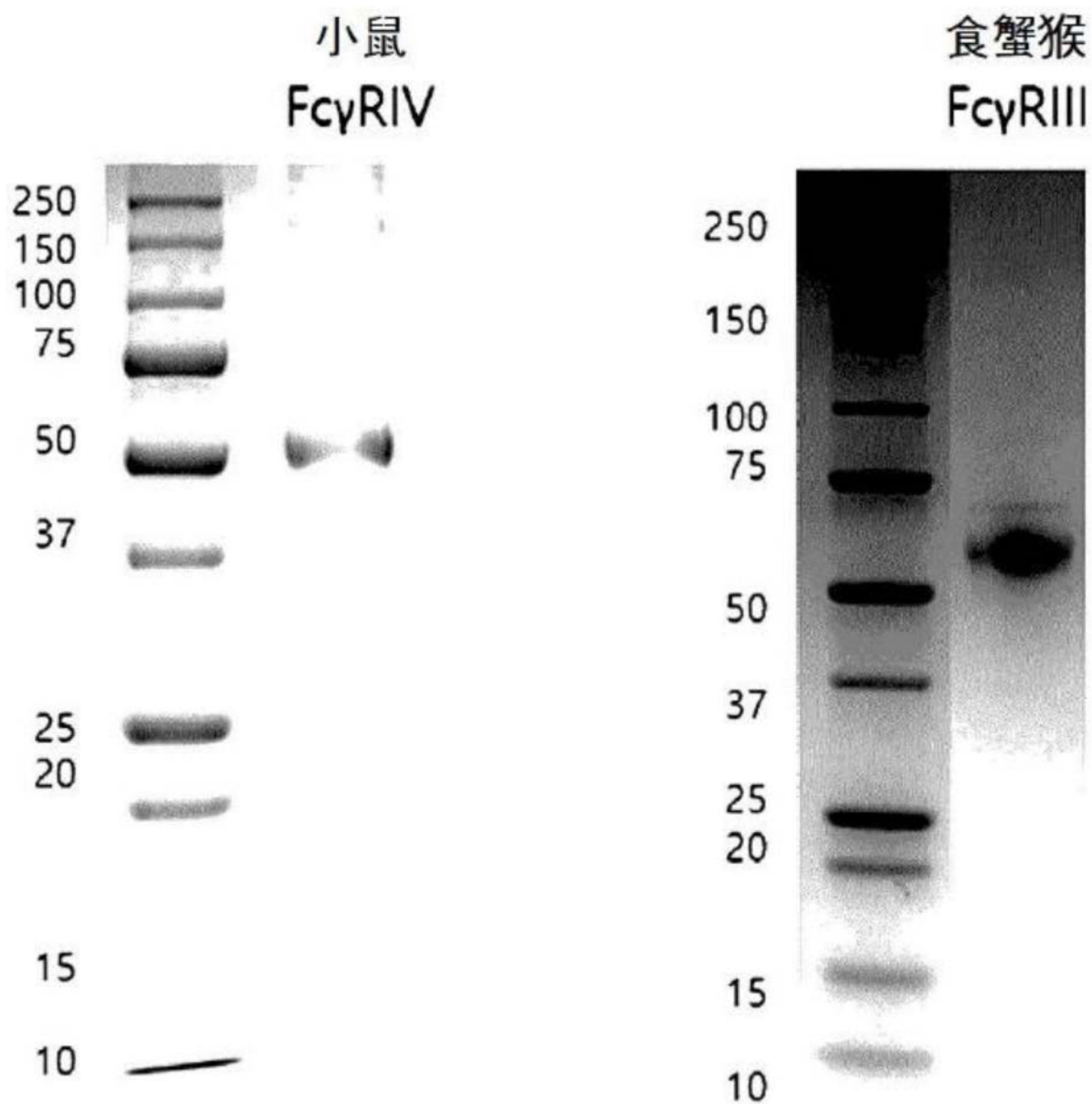
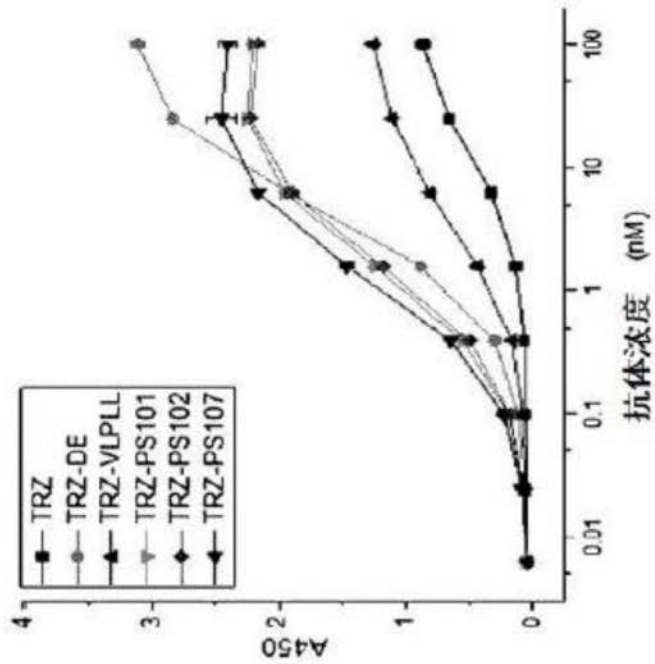


图18

食蟹猴FcγRIII



小鼠FcγRIV

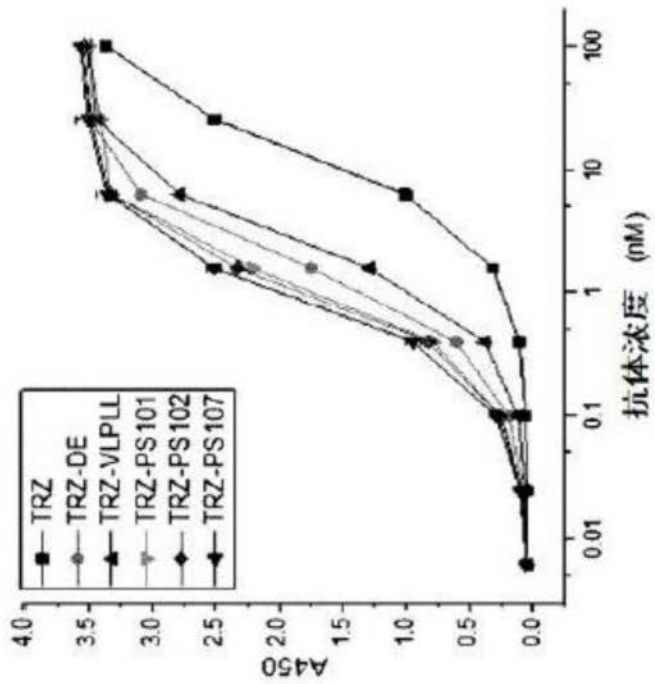


图19

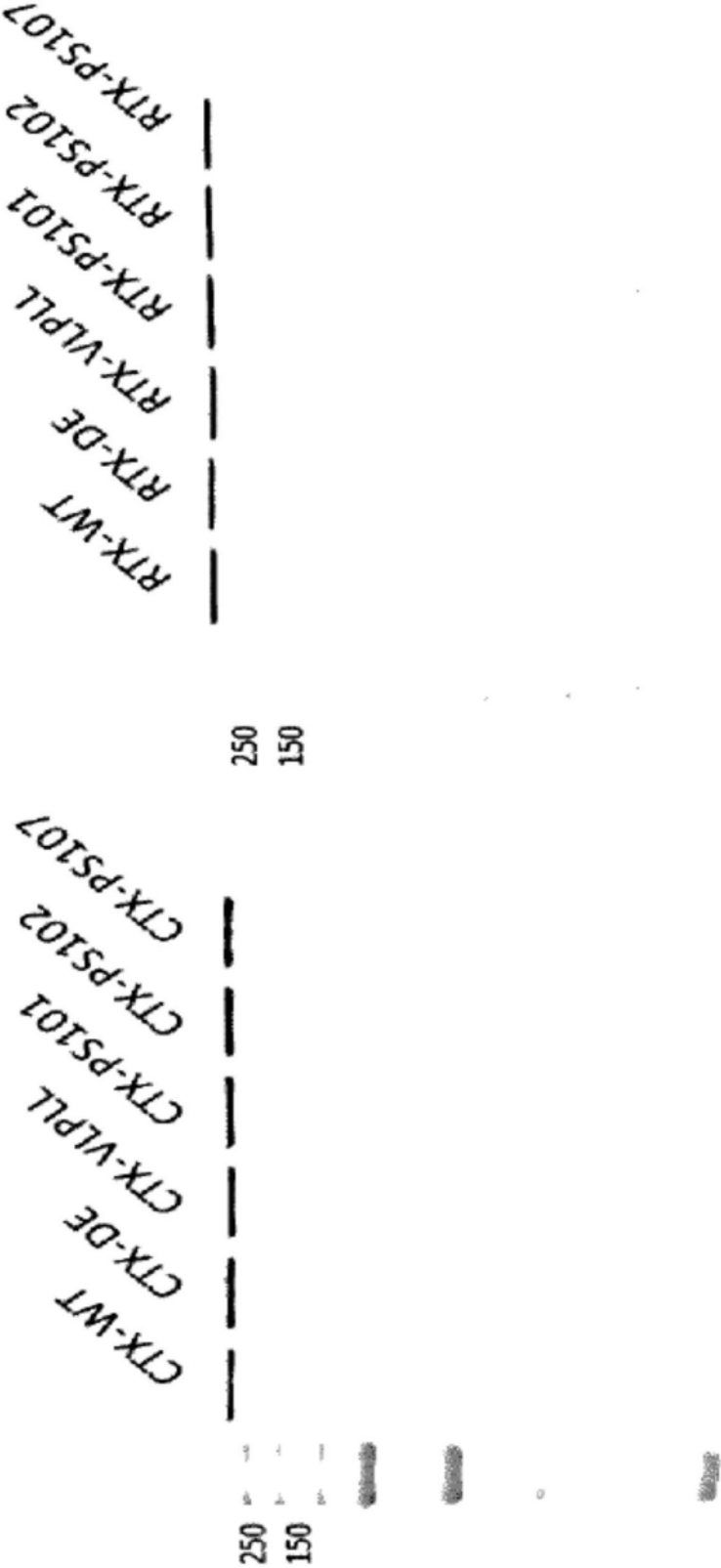


图20

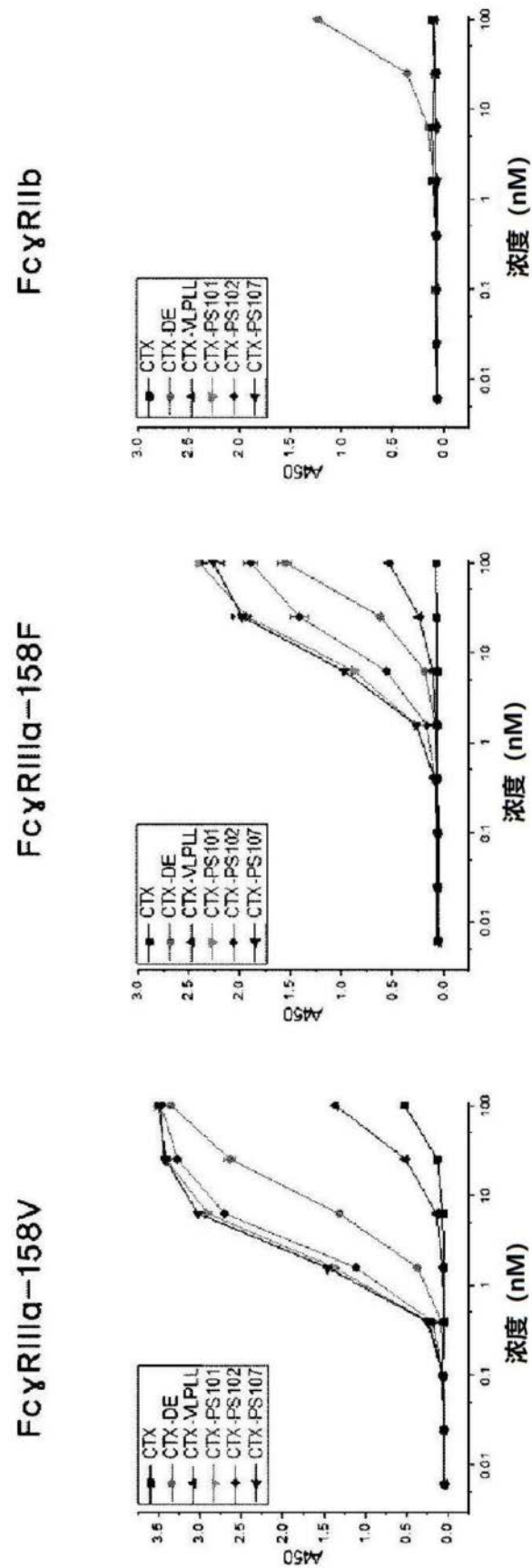
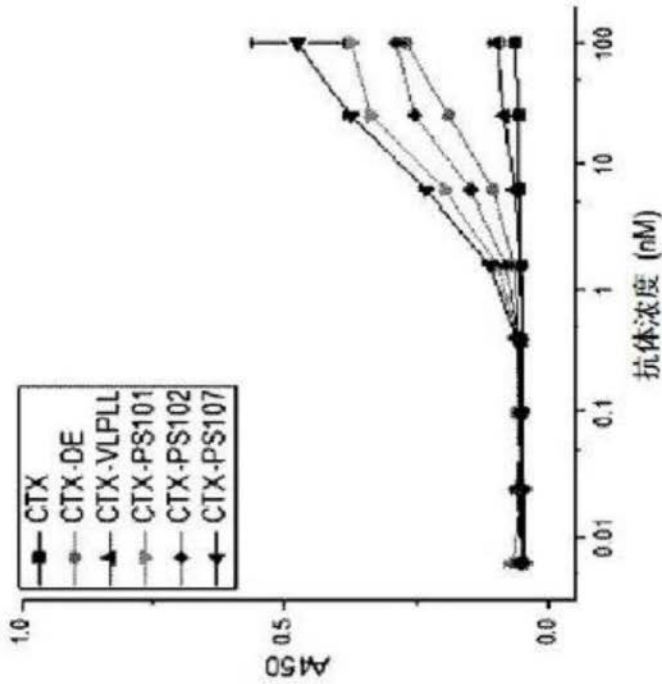


图21

食蟹猴FcγRⅢ



小鼠FcγRⅣ

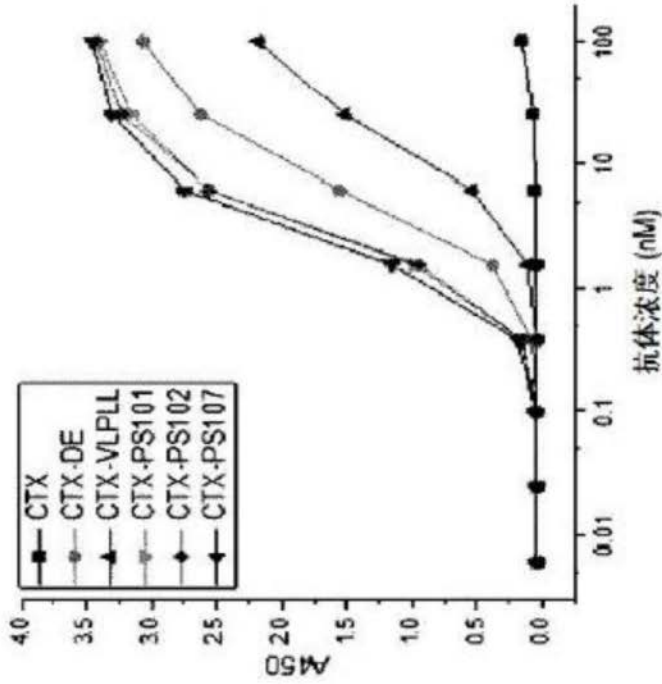


图22

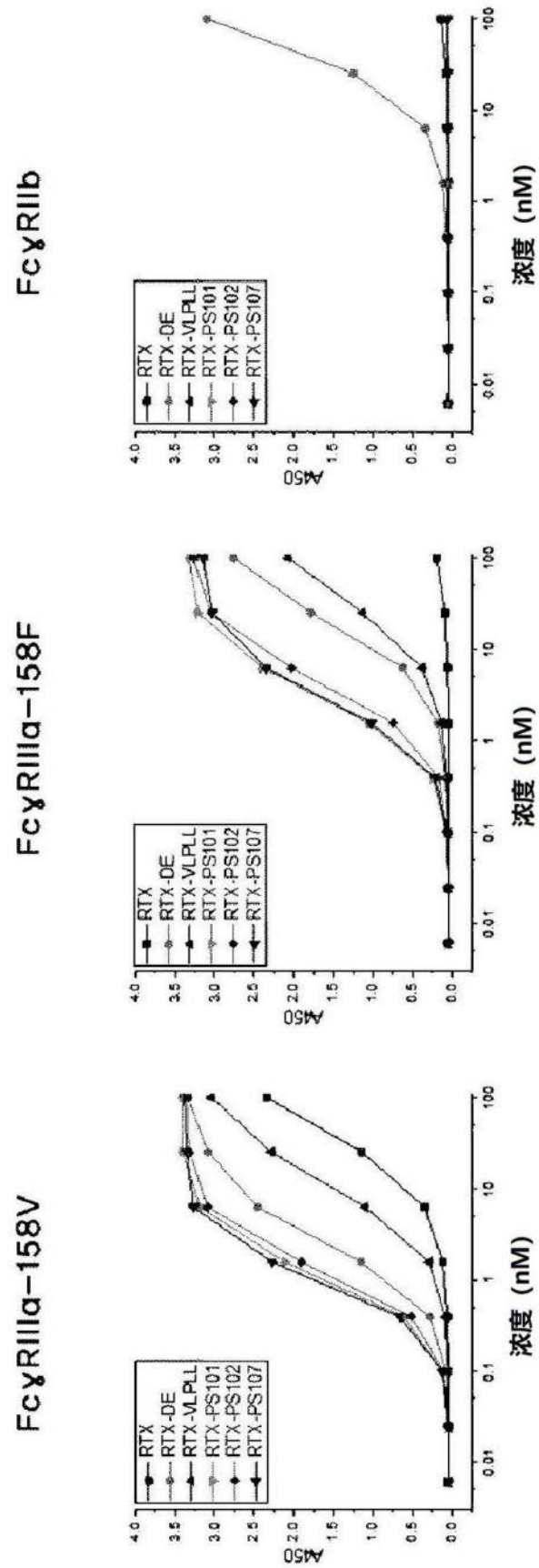
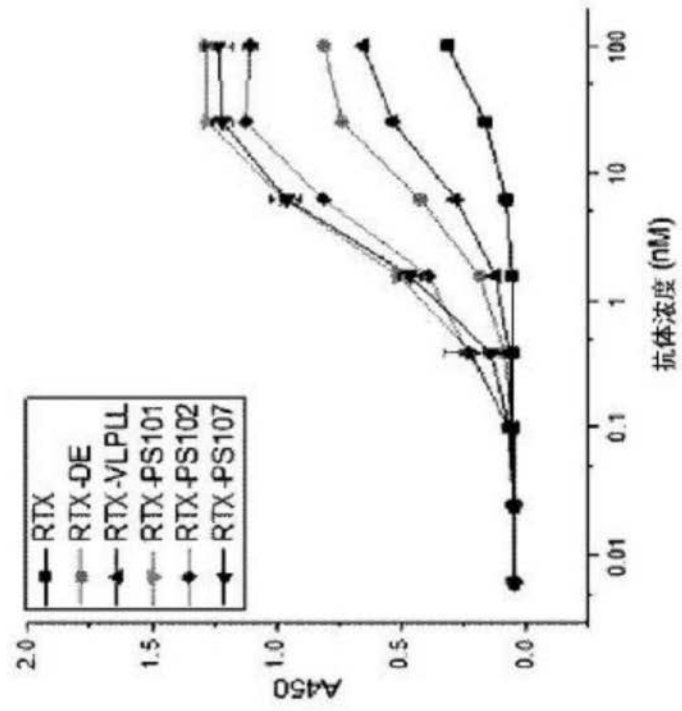


图23

食蟹猴FcγRⅢ



小鼠FcγRIV

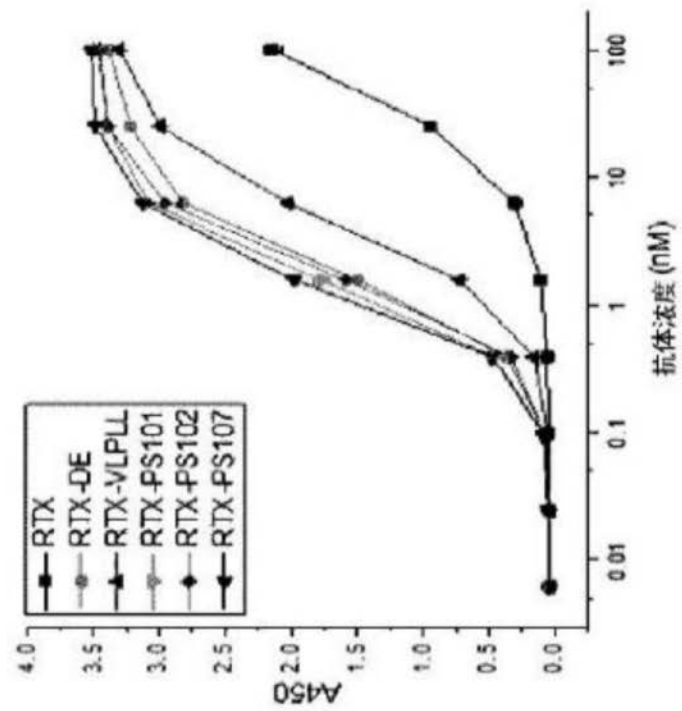


图24