



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102549016 B

(45) 授权公告日 2015. 05. 06

(21) 申请号 201080038758. 4

(22) 申请日 2010. 06. 29

(30) 优先权数据

61/221, 999 2009. 06. 30 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 02. 29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2010/040304 2010. 06. 29

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/008517 EN 2011. 01. 20

(73) 专利权人 研究发展基金会

地址 美国内华达州

(72) 发明人 G·乔吉欧 S·雷迪 S·T·郑

(74) 专利代理机构 北京派特恩知识产权代理有

限公司 11270

代理人 武晨燕 迟姗

(51) Int. Cl.

C07K 16/28(2006. 01)

C12N 15/13(2006. 01)

C12N 15/63(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1705491 A, 2005. 12. 07,

CN 101098890 A, 2008. 01. 02,

WO 2008137475 A2, 2008. 11. 13,

审查员 马静

权利要求书2页 说明书57页

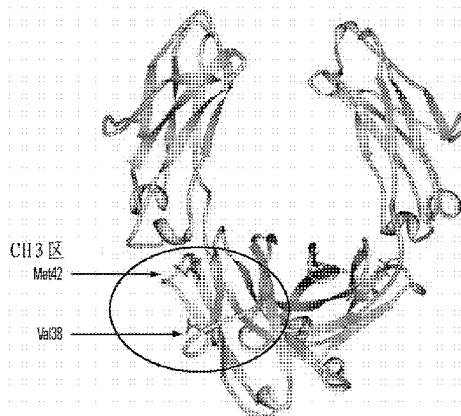
序列表37页 附图27页

(54) 发明名称

免疫球蛋白 FC 多肽

(57) 摘要

本发明涉及具有非糖基化抗体 Fc 结构域的多肽的方法和组合物。在某些实施方案中,与天然 Fc 结构域相比,具有非糖基化 Fc 结构域的多肽包含一个或更多个替换。此外,一些实施方案涉及结合一些 Fc 受体但不结合其它受体的 Fc 结构域。例如,提供具有非糖基化 Fc 结构域的多肽,所述非糖基化 Fc 结构域以糖基化 Fc 结构域结合水平 2 倍之内的水平选择性结合 Fc γ RI,但是对其它 Fc 受体的结合显著降低。此外,本发明提供使用具有修饰的非糖基化 Fc 结构域和第二非 Fc 结合结构域的多肽促进抗体依赖性细胞介导毒性 (ADCC) 的方法和组合物,所述的第二非 Fc 结合结构域可以是抗体的抗原结合区或者非抗原结合区。一些实施方案涉及具有此类多肽的抗体,其可以具有相同或者不同的非 Fc 结合结构域。



1. 包含能够结合人 FcR 多肽的非糖基化人 IgG1 Fc 结构域的抗体或者抗体片段, 其中该 Fc 结构域包含氨基酸 382 和氨基酸 428 位的氨基酸替换 E382V 和 M428I 与选自以下的一组额外替换 :a) K338R 和 G341V ;b) H224Y、E269K、N325S 和 G341V ;c) G341V 和 K392E ;d) K338R、G341V、S424L 和 N434D ;e) F241L 和 G341V ;f) G341V ;g) N276D 和 G341V ;h) G341V 和 V369A ;i) N286D、G341V 和 N434S ;j) N325S 和 G341V ;k) Y300C 和 G341V ;l) G341V 和 V348M ;m) L328W、A330V、P331A、I332Y 和 Q295R ;n) L328W、A330E、P331E、I332Y 和 V279M ;o) L328W、A330E、P331E 和 I332Y ;p) L328W、A330E、P331V、I332Y 和 S426T ;q) L328W、A330E、P331V 和 I332Y ;r) L328W、A330I、P331E 和 I332Y ;s) L328W、A330E 和 I332Y ;t) L328W、P331S 和 I332Y ;和 y) L328W、A330V、P331S、I332Y、H224R 和 L251F。

2. 权利要求 1 的抗体或者抗体片段, 其中 Fc 结构域能够结合人 Fc γ RI 多肽。

3. 权利要求 1 的抗体或者抗体片段, 还包含可缀合的连接体, 其中所述一组额外替换是 f) G341V。

4. 权利要求 1 的抗体或者抗体片段, 还包含非 FcR 结合结构域, 其中所述一组额外替换是 f) G341V。

5. 权利要求 4 的抗体或者抗体片段, 其中所述非 FcR 结合结构域是抗体的抗原结合位点。

6. 权利要求 4 的抗体或者抗体片段, 其中所述非 FcR 结合结构域不是抗体的抗原结合位点。

7. 权利要求 6 的抗体或者抗体片段, 其中所述非 FcR 结合结构域结合细胞表面蛋白。

8. 权利要求 7 的抗体或者抗体片段, 其中所述细胞表面蛋白是受体。

9. 权利要求 8 的抗体或者抗体片段, 其中所述受体是酪氨酸激酶。

10. 权利要求 9 的抗体或者抗体片段, 其中所述非 FcR 结合结构域结合多个酪氨酸激酶受体。

11. 编码权利要求 1-10 中任一项的任一抗体或者抗体片段的核酸。

12. 包含权利要求 11 的核酸的宿主细胞。

13. 用于制备非糖基化抗体的体外方法, 包括 :

a) 获得能够表达非糖基化抗体的宿主细胞, 所述非糖基化抗体包含能结合 FcR 多肽的人 IgG1 Fc 结构域, 其中所述 Fc 结构域包含氨基酸 382 和 428 位的氨基酸替换 E382V 和 M428I 与选自以下的一组额外替换 :a) K338R 和 G341V ;b) H224Y、E269K、N325S 和 G341V ;c) G341V 和 K392E ;d) K338R、G341V、S424L 和 N434D ;e) F241L 和 G341V ;f) G341V ;g) N276D 和 G341V ;h) G341V 和 V369A ;i) N286D、G341V 和 N434S ;j) N325S 和 G341V ;k) Y300C 和 G341V ;l) G341V 和 V348M ;m) L328W、A330V、P331A、I332Y 和 Q295R ;n) L328W、A330E、P331E、I332Y 和 V279M ;o) L328W、A330E、P331E 和 I332Y ;p) L328W、A330E、P331V、I332Y 和 S426T ;q) L328W、A330E、P331V 和 I332Y ;r) L328W、A330I、P331E 和 I332Y ;s) L328W、A330E 和 I332Y ;t) L328W、P331S 和 I332Y ;和 y) L328W、A330V、P331S、I332Y、H224R 和 L251F ;

b) 在促进非糖基化抗体表达的情况下培养宿主细胞 ;和,

c) 从所述宿主细胞纯化表达的抗体。

14. 权利要求 13 的方法, 其中 Fc 结构域能够结合人 Fc γ RI 多肽。

15. 一种抗体在制备用于在受试者中诱导免疫反应的药物中的用途, 其中所述抗体未

被糖基化并且包含根据权利要求 1-10 任一项所定义的 Fc 结构域。

免疫球蛋白 Fc 多肽

[0001] 发明背景

[0002] 本申请要求于 2009 年 6 月 30 日提出的美国申请号 61/221,999 的优先权,其全部公开明确地以其全文而无任何放弃的通过参考并入本文。

技术领域

[0003] 本发明一般涉及蛋白质工程领域。更加具体而言,其涉及用于筛选在细菌中表达的组合物抗体 Fc 文库的改良方法和组合物。

背景技术

[0004] 当前的重组治疗抗体销售超过 100 亿美元 / 年并且预计每年增长 20.9%,到 2010 年计划增长至 250 亿美元 / 年。单克隆抗体 (mAbs) 包括当前临床上的大多数重组蛋白,其中位于世界各地的公司资助超过 150 个正在研究的产品 (Pavlou 和 Belsey, 2005)。至于治疗焦点,mAb 市场主要集中于肿瘤学和关节炎、免疫和炎症性病症并且这些治疗领域内的产品将持续成为在整个预测阶段内的关键生长驱动力。总的来说,遗传工程化 mAbs 一般比小分子药物具有更高的 FDA 批准成功可能性。至少 50 个生物工程公司和所有的主要制药公司实施活性抗体开发项目。

[0005] 用于 mAbs 分离和生产的最初方法由 Milstein 和 Kohler 于 1975 年首次报导 (Kohler and Milstein, 1975), 并且它包括小鼠淋巴细胞和骨髓瘤细胞的融合,得到小鼠杂交瘤。治疗性的鼠 mAbs 在二十世纪八十年代早期进入临床研究;然而,但是缺乏有效性和因为患者产生人抗小鼠抗体 (HAMA) 而快速清除的问题变得明显。这些问题以及与技术相关的时间和成本消耗变成了发展 mAb 生产技术的驱动力。聚合酶链式反应 (PCR) 促进了直接从免疫动物淋巴细胞克隆单克隆抗体基因和片段抗体组合文库在细菌中的表达 (Orlandi 等, 1989)。后来的文库完全通过体外克隆技术使用具有重排互补决定区 3 (CDR3) 的天然基因产生 (Griffiths 和 Duncan, 1998; Hoogenboom 等, 1998)。结果,具有目的特异性的抗体片段的分离不再依赖于相应抗原的免疫原性。此外,合成的组合文库中的抗原特异性范围比从免疫小鼠产生的一组杂交瘤的抗原特异性范围大。这些优点促进了开发针对许多种独特抗原,包括小分子化合物 (半抗原) (Hoogenboom 和 Winter, 1992)、分子复合物 (Chames 等, 2000)、不稳定的化合物 (Kjaer 等, 1998) 和细胞表面蛋白质 (Desai 等, 1998) 的抗体片段。

[0006] 在微生物细胞中,通过流式细胞术开展展示筛选。具体而言,锚定周质表达 (Anchored 周质 ic Expression, APEX) 基于将抗体片段锚定在大肠杆菌内膜的周质面,然后破坏外膜,与荧光标记的靶孵育并分选原生质球 (美国专利 7,094,571)。APEX 用于抗体片段的亲和性成熟 (Harvey 等, 2004; Harvey 等, 2006)。在一个研究中,在仅两轮的筛选后得到了超过 200 倍的亲和性改善。

[0007] 抗体治疗潜能背后的一个重要机制是抗体募集免疫细胞至靶抗原 (或细胞) 的能力。因此,抗体的 Fc 区对于募集免疫细胞和抗体依赖的细胞毒性 (ADCC) 是至关重要的。

具体而言,由抗体引起的 ADCC 反应的性质依赖于 Fc 区与位于许多细胞类型表面上的受体 (FcR) 之间的相互作用。人包括 5 种不同种类的 Fc 受体。在另外的单元型中,属于特定种类的不同 FcR 的遗传变体是已知的。抗体与 FcR 的结合决定着募集其它免疫细胞和所募集细胞类型的能力。因此,工程改造可募集仅某些种类细胞的抗体的能力对于治疗是极其重要的。

[0008] 然而,据发明人所知,先前已经使用哺乳动物表达的 IgG 分子开展了改造 Fc 结构域的尝试。哺乳动物抗体是糖基化的。碳水化合物链连接至 Fc 区并且改变蛋白质的构象并且使得抗体能够结合至 FcR。与此相比,由细菌产生的非糖基化的抗体不能够结合至 FcR 并且因此不能够引起 ADCC。希望的是,改造能够引起 ADCC 的非糖基化抗体并且,因此从源于细菌表达的低生产成本受益。

[0009] 第二并且最重要的是,具有工程改造 Fc 区的哺乳动物抗体表现出对特定的目的 FcR 的结合增加,而且它们仍能够以正常亲和性结合其它 FcR。因此,虽然此类抗体对于由免疫系统天然产生的分子具有更大的选择性,但是它们仍然可以介导不希望的免疫反应。

[0010] 虽然如此,目前可以利用的所有高通量抗体筛选技术均依赖于抗体片段的微生物表达。已经描述了在文库构建和筛选中使用抗体片段而不是完整或者全长 IgG 相对于在微生物中表达长得多的 IgG 具有局限性。之前从来没有使用微生物如细菌或酵母表达或者筛选 IgG 文库。结果,对结合蛋白质的抗原的分离唯一使用更小的且容易产生的抗体片段开展。一旦分离后,然后此类抗体片段必须融合至表达全长免疫球蛋白的载体,反过来载体优先在哺乳动物细胞诸如 CHO 细胞中表达。

[0011] 大肠杆菌的细胞质少,这不适合具有二硫键的蛋白质的折叠,具有二硫键的蛋白质以未折叠的或者不正确折叠的状态积累 (Baneyx 和 Mujacic, 2004)。与细胞质相比,大肠杆菌的周质维持在氧化状态,这使得可以形成蛋白质二硫键。值得注意的是,已经成功地采用周质表达用于表达抗体片段,诸如 Fv、scFv、Fab 或者 F(ab')₂ (Kipriyanov 和 Little, 1999)。这些片段可以相对快速地大量产生,并且保留了抗原结合活性。然而,由于抗体片段缺乏 Fc 结构域,它们不能够结合 FcRn 受体并被快速清除;因此,它们仅偶尔适宜用作治疗蛋白质 (Knight 等, 1995)。直到最近,全长抗体仅可以在大肠杆菌中表达成为不溶解的聚集物,然后体外重折叠 (Boss 等, 1984; Cabilly 等, 1984)。显然,这种方法不适合抗体文库的高通量筛选,因为使用当前的技术不能够将数百万或者数千万的抗体逐一重折叠。进一步的问题是,由于大肠杆菌表达的抗体没有被糖基化,所以它们不能够结合补体因子 1q (C1q) 或者 Fc 和许多其它 Fc 受体。然而,非糖基化的 Fc 结构域可以有效地结合新生儿 Fc 受体 (FcRn)。因此,细菌表达的非糖基化抗体的确表现出与人细胞中产生的完全糖基化的 IgG 相似的血清持久性和药代动力学。虽然如此,由于非糖基化的抗体不能够引起补体活化并且不能够介导免疫细胞诸如巨噬细胞的募集,因此它们先前不能有效地用于许多治疗应用。

[0012] 此外,一些研究已经报导, Fc 结构域与一些 Fc 受体的结合可以具有激活效应,而其它一些则具有抑制效应 (Boruchov 等, 2005; Kalergis 等, 2002)。不同的 Fc γ R 效应器功能包括抗体依赖的细胞介导的细胞毒性 (ADCC)、细胞因子释放、吞噬作用和成熟作用。经工程改造具有选择性效应器功能的 Fc 结构域可以提供生理益处。

发明内容

[0013] 本公开提供涉及结合 Fc 受体的非糖基化抗体 Fc 结构域的化合物和方法。

[0014] 在一些实施方案中,涉及包含具有来自抗体的非糖基化 Fc 结构域(“抗体 Fc 结构域”)的多肽的组合物。在另外的实施方案中,非糖基化 Fc 结构域是野生型 Fc 结构域的变体,以致于变异使得 Fc 结构域可以特异性结合至一种或者更多种 Fc 受体。在一些实施方案中,具有非糖基化 Fc 结构域变体的多肽能够仅结合具有糖基化形式野生型 Fc 结构域(“糖基化野生型 Fc 结构域”)可以结合的 Fc 受体的亚组。在特定的实施方案中,具有非糖基化 Fc 结构域变体的多肽可特异性地结合 Fc γ RI;在一些情况中,其亲和性或者结合能力在具有糖基化野生型 Fc 结构域多肽的 2 倍之内。在其它的实施方案中,另外地或者备选地,具有非糖基化 Fc 结构域变体的多肽与具有糖基化野生型 Fc 结构域的多肽相比具有显著降低的亲和性或者结合能力(50 倍或者更大的降低)。在某些实施方案中,具有非糖基化 Fc 结构域变体的多肽具有显著降低的结合 Fc γ RIIB 的亲和性或者能力。可预期与具有糖基化野生型 Fc 结构域的多肽相比,多肽具有相当的(2 倍之内)对 Fc γ RI 的亲和性或者结合能力,以及显著降低的对 Fc γ RIIB 的亲和性或者结合能力。

[0015] 如本文所使用,术语“亲和性”指两种试剂可逆性结合的平衡常数并且表示为 Kd。结合结构域与其靶的亲和性可以,例如,从大约 100 纳摩尔(nM)至大约 0.1nM,从大约 100nM 至大约 1 皮摩尔(pM),或者从大约 100nM 至大约 1 飞摩尔(fM);备选地,亲和性可以在 100nM 和 1nM 之间或者在 0.1nM 和 10nM 之间。此外,考虑了当两种试剂之间的亲和性在上面讨论的亲和性范围之内时试剂特异性结合。

[0016] 抗体 Fc 结构域可以是 IgA、IgM、IgE、IgD 或者 IgG 抗体或其变体的 Fc 结构域。在某些实施方案中,结构域是 IgG 抗体 Fc 结构域,诸如 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 或 IgG4 抗体 Fc 结构域。此外,抗体 Fc 结构域可以限定为人 Fc 结构域,在这种情况下,Fc 结构域特异性结合一种或者更多种人 Fc 受体。在某些方面中,Fc 结构域可以是 IgG1 Fc 结构域,诸如抗 HER2 抗体的 Fc 结构域,更加具体而言是曲妥珠单抗的 Fc 结构域。在一些实施方案中考虑了整个多肽是非糖基化的,或者在其它实施方案中考虑了仅多肽的一部分是非糖基化的,如 Fc 结构域。还考虑了,多肽除了包含 Fc 结构域之外,还可包含一个或者更多个来自抗体的区域。多肽可包含来自抗体的抗原结合结构域。此外,多个多肽可以形成抗体或者抗体样蛋白质。

[0017] 在一些实施方案中,涉及包含能够结合人 FcR 多肽的非糖基化抗体 Fc 结构域的多肽,其中 Fc 结构域包含特定的氨基酸替换。在一些实施方案中,涉及多个氨基酸替换。在另外的实施方案中,涉及相对于野生型 Fc 结构域有直至 8 个氨基酸替换。在人 Fc 结构域中的替换中,实施方案包括具有这样的人 Fc 结构域的多肽,所述人 Fc 结构域在氨基酸 382 和 428 位具有氨基酸替换并且在下列任意氨基酸中具有至少一个额外替换:224、241、251、266、269、276、279、286、295、297、300、315、325、328、330、331、332、338、340、341、348、369、378、382、392、424、426、428 和 / 或 434。在一些情况中,特别考虑了,that the 人 Fc 结构域的氨基酸 329 是野生型序列,即脯氨酸。在一些实施方案中,多肽在氨基酸 382 具有人 Fc 结构域替换,即缬氨酸(V)替换谷氨酸(E)(E382V)。在本文中采用对于氨基酸的常规单字母缩写。在另外的实施方案中,多肽具有在氨基酸 428 位的人 Fc 结构域替换,其为异亮氨酸(M428I)。在一些情况中,多肽在人 Fc 结构域的氨基酸 382 和氨基酸 428 位均具有替换,

在氨基酸 382 位为缬氨酸 (E382V), 在氨基酸 428 位为异亮氨酸 (M428I)。在一些实施方案中, 多肽在人 Fc 结构域的氨基酸 328 位具有替换, 其为色氨酸 (L328W)。在另外的实施方案中, 多肽在人 Fc 结构域的氨基酸 332 位具有替换, 其为酪氨酸 (I332Y)。其它多肽包括至少在人 Fc 结构域的氨基酸 328 和 332 位具有替换的那些多肽。氨基酸 328 位的替换可以是色氨酸 (L328W) 并且氨基酸 332 位的替换可以是酪氨酸 (I332Y)。在另外的实施方案中, 多肽在人 Fc 结构域的氨基酸 341 位具有替换, 在更多实施方案中其为缬氨酸 (G341V)。更多实施方案涉及在人 Fc 结构域 382 和 428 位具有替换并且在结构域上的下列位置具有至少一个额外替换的多肽: H224R/Y、F241L、K251F、V266M、E269K、N276D、V279M、N286D、Q295R、N297D、Y300C、N315D、N325S、L328W、A330V/E/I、P331A/S/E、I332Y、K338I/R、K340N/Q、G341V、V348M、V369A、A378D、K392E、S424L、S426I 或 N434S/D。在一些实施方案中考虑了多个额外替换。

[0018] 在一些实施方案中, 多肽具有在氨基酸 382 和 428 位具有替换并且还在 CH2 上部区域具有至少一个额外替换的非糖基化人 Fc 结构域。一些实施方案涉及在 CH2 上部区域的下列部分中的氨基酸上具有至少一个额外的人 Fc 结构域替换的多肽: 234L-239S; 264V-268H; 297N-299T; 或者 328L-332I。

[0019] 在更多的实施方案中, 多肽不具有额外的人 Fc 结构域替换 G341V 和 / 或 K338R。然而, 在其它情况中, Fc 结构域可以具有 G341V 替换和选自下列组的至少一个其它替换: H224Y、F241L、E269K、N276D、N286D、Y300C、N325S、K338R、V348M、V369A、K392E、S424L 和 N434D/S。在一些实施方案中, Fc 结构域具有选自该组的多个其它替换。多肽可具有包括 K338R 替换的 Fc 结构域替换。

[0020] 在一些实施方案中涉及具有这样的人 Fc 结构域的多肽, 所述人 Fc 结构域具有选自下列的一组替换: a) K338R 和 G341V; b) N297D、N315D 和 K340N; c) K340N; d) K338I 和 K340N; e) K340Q 和 A378D; f) N325S 和 K340N; g) H224Y、E269K、N325S 和 G341V; h) G341V 和 K392E; i) K338R、G341V、S424L 和 N434D; j) F241L 和 G341V; k) G341V; l) N276D 和 G341V; m) G341V 和 V369A; n) N286D、G341V 和 N434S; o) N325S 和 G341V; p) Y300C 和 G341V; q) G341V 和 V348M; r) E382V 和 M428I; s) V266M; t) A330V、P331A 和 Q295R; u) A330E、P331E 和 V279M; v) A330E 和 P331E; w) A330E、P331V 和 S426T; x) A330E 和 P331V; y) A330I 和 P331E; z) A330E; aa) P331S; 和 bb) A330V、P331S、H224R 和 L251F。在一些实施方案中考虑了可包括非人 Fc 结构域的额外的多肽, 在这种情况下, 可以在相应氨基酸位进行所述替换。

[0021] 实施方案涉及具有能够特异性结合一种或更多种人 FcR 多肽的非糖基化 Fc 结构域的多肽。在一些实施方案中, 非糖基化 Fc 结构域已经进行如此的突变, 以致于其可以结合 Fc γ RIa、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIIc、Fc γ RIIIa、Fc γ RIIIb 或 Fc α RI 中的一种或更多种。考虑了与这些特定人 FcR 多肽中的一种或者更多种的结合为对于糖基化 Fc 区所观察到结合的 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或者 100% (或者可从它们推导出的任何范围) 之内, 或者相对于野生型糖基化 Fc 结构域, 结合改变 (增加或者降低) 至少或至多 50%、60%、70%、80%、90% 或 100% (或者可从它们推导出的任何范围)。备选地, 在具有突变的非糖基化 Fc 结构域的多肽与具有糖基化的和野生型 Fc 结构域的多肽之间的相对结合能力可以表示为 X- 倍数的差异 (增加或者降低)。例如, 可以是至少或至多至少 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍或者 10 倍的差异, 或者可从它们推导

出的任何范围。

[0022] 在一些实施方案中,具有突变的非糖基化 Fc 结构域的多肽能够特异性结合 Fc γ RI 多肽。在一些情况中,其以具有糖基化和野生型 Fc 结构域的多肽结合水平的 2 倍之内的水平结合。在其它的实施方案中,结合水平在糖基化和野生型 Fc 结构域的至少 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍或者 10 倍之内。例如,在本文所述的实施方案中,对于 Fc 受体与或者具有非糖基化 Fc 结构域变体的多肽或者具有糖基化和野生型 Fc 结构域的多肽的 K_D 数值在至少 2 倍或者 3 倍之内。在一些实施方案中,与具有非糖基化野生型抗体 Fc 结构域的多肽相比,多肽在 pH 依赖的 FcRn 结合方面具有至少 2 倍的降低。

[0023] 在一些实施方案中,本文所述的多肽可包括连接体。在更多的实施方案中,连接体是可缀合的连接体。在一些实施方案中,多肽包含来自抗体的 Fc 结构域。其可包含来自抗体的其他区域,如另一结合结构域。在某些实施方案中,另外的结合结构域不是 FcR 结合结构域。在一些实施方案中,其还包含来自抗体的抗原结合位点或者结构域。这将包括来自抗体的所有或者部分可变区。在其它的实施方案中,多肽包含来自抗体的 Fc 结构域但是不包含为非 FcR 结合结构域的另一结合结构域。在一些实施方案中,非 Fc 结合区不是抗体的抗原结合位点,但特异性结合细胞表面蛋白。在一些情况中,非 Fc 结合区识别的细胞表面蛋白是受体。在一些实施方案中,细胞表面受体是酪氨酸激酶。在另外的实施方案中,多肽具有能够结合多种酪氨酸激酶受体的非 Fc 结合区。在一些实施方案中,此种非 Fc 结合区能够结合 VEGF 受体、PDGF 受体、EGFR 受体、ErbB-2 受体、EGF 受体、HGF 受体和其它 Src 样酪氨酸激酶受体或其组合中的一种或多种。还特别考虑了,多肽具有识别这些受体酪氨酸激酶中一种或者更多种的抗原结合区。

[0024] 其他多肽包括具有能够结合 FcR γ I 多肽的非糖基化 Fc 结构域和第二结合结构域的那些多肽,其中第二结合结构域能够特异性结合细胞表面分子。在一些实施方案中,第二结合结构域是抗体的抗原结合结构域(“抗体抗原结合结构域”)。在一些情况中,第二结合结构域不是抗体抗原结合结构域。在一些实施方案中,第二结合结构域能够特异性结合其为蛋白质类分子的细胞表面分子。第二结合结构域可以是细胞表面受体的配体或者可以是细胞表面配体的受体。

[0025] 实施方案还考虑了编码本文所述任意多肽的核酸。核酸可以是分离的和/或重组的。其可以是分离的和/或重组的核酸片段。在一些实施方案中,核酸是 DNA,而在其他实施方案中核酸是 RNA。在某些实施方案中,核酸是 DNA 片段。在其它的实施方案中,核酸是能够表达这样的任意多肽的表达载体,所述的任意多肽具有特异性结合人 FcR 多肽的带有一个或更多个替换的 Fc 结合结构域。核酸可编码一种或更多种上述多肽,所述多肽取决于多肽如何产生而可以是糖基化的或者不是糖基化的。

[0026] 在一些实施方案中,涉及编码具有能够特异性结合人 FcR 多肽的 Fc 结构域的多肽的核酸。核酸可置于可表达多肽,特别是非糖基化形式多肽的宿主细胞中。宿主细胞可以是原核细胞,诸如细菌细胞。备选地,宿主细胞可以是真核细胞,诸如哺乳动物细胞。在一些实施方案中,宿主细胞包含第一表达载体,虽然它还可以包含第二表达载体。由于一些抗体由多个多肽组成,所以考虑了表达这些多肽的宿主细胞。例如,在一些实施方案中,考虑了包括第二表达载体的宿主细胞,所述第二表达载体编码包含免疫球蛋白轻链的多肽。

[0027] 在一些实施方案中,涉及宿主细胞群体,其中群体包含表达不同 Fc 结构域的多肽

的多种宿主细胞。考虑了任何两个不同 Fc 结构域的氨基酸序列之间的同一性差异小于 20%、15%、10%、5% 或更小。

[0028] 在一些实施方案中,涉及产生本文所述多肽(具有非糖基化 Fc 区的多肽)的方法以及使用它们的方法。就本文所述的任何多肽而言可使用任何这些方法。

[0029] 在一些实施方案中,涉及用于制备非糖基化多肽的方法,包括:a) 得到能够表达非糖基化抗体的宿主细胞,所述非糖基化抗体包含能够结合 FcR 多肽的 Fc 结构域,其中 Fc 结构域包含氨基酸 382 和 428 位的氨基酸替换并且在下列任意氨基酸中具有至少一个额外替换:224、241、251、266、269、276、279、286、295、297、300、315、325、328、330、331、332、338、340、341、348、369、378、382、392、424、426、428 和 / 或 434;b) 在促进非糖基化抗体表达的情况下培养宿主细胞;和,c) 从宿主细胞纯化表达的抗体。在一些实施方案中,宿主细胞是原核细胞,诸如细菌细胞。在其它的实施方案中,宿主细胞是真核细胞并且多肽包含 N297D 替换。在更多的实施方案中,方法包括从上清液收集表达的抗体,这可以在纯化之前进行。

[0030] 在一些实施方案中,方法包括从上清液纯化抗体。这可包括将上清液经过滤、HPLC、阴离子或阳离子交换、高效液相色谱(HPLC)、亲和层析或其组合纯化抗体。在一些实施方案中,方法包括使用能结合 IgG Fc 区的葡萄球菌蛋白 A 的亲和层析。其他纯化方法是本领域普通技术人员众所周知的。

[0031] 其他实施方案涉及用于诱导受试者内免疫反应的方法。可以在此种方法中使用具有能够结合 FcR 多肽的非糖基化 Fc 结构域的多肽。在某些实施方案中,向受试者开处或者施用非糖基化的并且具有能结合 Fc γ RI 多肽的 Fc 结构域的抗体。备选地,方法可包括用此种抗体治疗受试者。可以使用本文所述的任何多肽。某些实施方案涉及具有非糖基化人 Fc 结构域的多肽,所述非糖基化人 Fc 结构域包含在氨基酸 382 和 428 位的氨基酸替换并且在下列任意氨基酸中具有至少一个额外替换:224、241、251、266、269、276、279、286、295、297、300、315、325、328、330、331、332、338、340、341、348、369、378、382、392、424、426、428 和 / 或 434。

[0032] 在一些实施方案中,非糖基化多肽或者抗体能够特异性结合活化 FcR 多肽,活化 FcR 多肽指活化一种或者更多种免疫细胞的 FcR 多肽。活化多肽包括 Fc γ RI、IIa、IIIa、IIb 和 IIIc。Fc γ RIIb 是抑制性 FcR 多肽。在更多的实施方案中,非糖基化多肽或者抗体不再与糖基化的、野生型 Fc 结构域可比的水平结合抑制性 FcR 多肽。在特定的实施方案中,非糖基化多肽或者抗体特异性结合 Fc γ RI 多肽。在更多的实施方案中,非糖基化多肽或者抗体具有降低的结合 Fc γ RIIb 多肽的能力,其中其亲和性比糖基化的、野生型形式的多肽或抗体小至少 50 倍。在某些实施方案中,非糖基化抗体是非糖基化形式的治疗抗体,所述治疗抗体指用于治疗或者处置疾病或病症的抗体。本文所述的任何抗体或者多肽,包括上面所述的那些,可以用于实施用于诱导免疫反应的方法。治疗抗体的实例是曲妥单抗。

[0033] 在一些实施方案中,涉及诱导针对表达所靶向细胞表面多肽的靶细胞的树突细胞(DC)介导的细胞杀伤的方法,包括:a) 使靶细胞与包含 i) 能够至少特异性结合树突细胞活化 FcR 的突变的和非糖基化 Fc 结构域和 ii) 结合所靶向细胞表面多肽的第二结合结构域的多肽接触;和 b) 在促进杀死靶细胞的情况下将靶细胞与树突细胞接触。在一些实施方案中,活化 FcR 是 Fc γ RI 多肽。在另外的实施方案中,具有非糖基化 Fc 结构域的多肽以与具

有糖基化野生型 Fc 结构域的多肽相比降低的水平特异性结合 Fc γ RIIB 多肽。在一些实施方案中,多肽具有这样的 Fc 结构域,所述 Fc 结构域包含在下列氨基酸位的至少一个氨基酸替换:224、241、251、266、269、276、279、286、295、297、300、315、325、328、330、331、332、340、348、369、378、382、392、424、426、428 和 / 或 434。另外的多肽在上面以及本申请通篇讨论。在一些实施方案中,靶细胞是癌细胞。因此,考虑了在抗体治疗中使用非糖基化的和突变的 Fc 结构域代替糖基化的和野生型 Fc 结构域治疗癌症的方法。涉及使用糖基化和野生型 Fc 结构域的抗体对其他疾病或者病症的治疗,可以类似地使用本文所述的非糖基化的和 Fc 变体多肽实施。

[0034] 其它实施方案涉及用于筛选具有结合一种或者更多种特异性 FcR 多肽的 Fc 结构域的非糖基化多肽的方法,包括:a) 得到一群革兰氏阴性细菌细胞,该群细胞在它们的周质中表达包含 Fc 结构域的非糖基化多肽,其中群体表达多种不同的 Fc 结构域;b) 使细菌细胞与第一 FcR 多肽在使得 FcR 多肽与非糖基化 Fc 结构域之间接触的条件下接触,其中 FcR 多肽是 Fc γ RIa、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIIC、Fc γ RIIIa、Fc γ RIIIb 或者 Fc α RI ;和,c) 基于非糖基化 Fc 结构域与第一 FcR 多肽的结合选择至少一种细菌细胞。方法还包括从选择的细菌细胞鉴定或分离非糖基化多肽。同样,方法可包括确定所选择细菌细胞中的非糖基化多肽是否能结合其它 FcR 多肽。在一些实施方案中,确定所选择细菌细胞中的非糖基化多肽是否能结合其他 FcR 多肽包括以第二 FcR 多肽重复步骤 a)-c),以确定非糖基化多肽是否还结合第二 FcR 多肽。考虑了步骤 a)-c) 可以两种以上不同 FcR 多肽重复。在一些实施方案中,非糖基化多肽结合多种 FcR 多肽。

[0035] 在一些实施方案中,方法包括其为大肠杆菌细胞的细菌细胞。在另外的实施方案中,Fc 结构域是 IgG、IgA 或 IgE Fc 结构域。在更多的实施方案中,革兰氏阴性细菌细胞群体包含编码多种非糖基化 Fc 结构域的多种核酸。在一些情况中,多种核酸还编码与多种非糖基化 Fc 结构域融合的膜分泌信号。膜分泌信号可以是 PeIB 或者 DsbA。另外,非糖基化 Fc 结构域可以包括铰链区、CH2 区和 CH3 区。在某些实施方案中,非糖基化多肽包含真核 FcR 结构域。在一些实施方案中,涉及具有特异性结合表 1 中一种多肽的 Fc 结构域的多肽。在某些实施方案中,Fc 结构域结合人 Fc γ RIa、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIIC、Fc γ RIIIa、Fc γ RIIIb、Fc α RI 或者 Clq。在其它的实施方案中,相对于糖基化的和野生型形式的 Fc 结构域,其具有降低的对 Fc γ RIIb 的结合亲和性。特定的方法公开于 WO 2008/137475 中,其通过参考并入本文。

[0036] 其它实施方案涉及用于优化 Fc 结合一种或更多种具有 Fc 结构域的非糖基化多肽的特异性 FcR 多肽的方法,包括:a) 得到一群革兰氏阴性细菌细胞,该群细胞在它们的周质中表达包含 Fc 结构域的非糖基化多肽,其中群体表达表达不同突变的 Fc 结构域的不同多肽;b) 使细菌细胞与第一 FcR 多肽在使得 FcR 多肽与非糖基化 Fc 结构域之间接触的条件下接触,其中 FcR 多肽是 Fc γ RIa、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIIC、Fc γ RIIIa、Fc γ RIIIb 或者 Fc α RI ;和,c) 基于非糖基化 Fc 结构域与第一 FcR 多肽的结合选择至少一种细菌细胞。上面讨论的任何实施方案可以用于实施这些方法。

[0037] 就本文所述的任何其它方法或者组合物而言,可以用于本发明方法和 / 或组合物背景下讨论的任何其它实施方案。因此,关于一种方法或者组合物的实施方案也可以应用于本发明的其它方法和组合物中。

[0038] 如本文所使用,关于核酸的术语“编码”或者“编码的”用于使本领域技术人员容易理解,然而这些术语可以分别与“包含”或者“包含的”互换使用。

[0039] 如本说明书中所使用,“a”或者“an”意思是指一或者一以上。如权利要求书中所使用,当与词语“包含的”结合使用时,词语“a”或“an”意思是指一或一以上。

[0040] 在权利要求书中术语“或者”的使用用于指“和/或”,除非明确表明是指仅备选方案,或者备选方案是相互排斥的,虽然本公开支持“或者”指仅备选方案和“和/或”的定义。如本文所使用,“另一”意思是指至少第二或者更多。

[0041] 在本申请通篇中,术语“大约”用于数值包括用于确定数值的仪器、方法的内在误差变化,或者研究受试者当中存在的变化。

[0042] 根据下面的详细描述本发明的其它目标、特征和优势将变得显而易见。然而,应当理解,详细的描述和特定的实施例虽然表明了本发明的优选实施方案,但是仅以例证方式给出,因为根据该详细描述对于本领域技术人员而言处于本发明精神和范围内的多种改变和修改将是显而易见的。

附图说明

[0043] 下列附图构成了本说明书的一部分并且之所以包括下列附图是为了进一步证明本发明的某些方面。参照这些附图中的一个或者更多个并结合本文给出的特定实施方案的详细描述可以更好地理解本发明。

[0044] 图 1 以糖基化 IgG1Fc 的 3D 结构表示的分离的非糖基化 Fc5 的突变点 (382E 和 428M) (PBD 码 :1FC1)。

[0045] 图 2 在糖基化 IgG 晶体结构上表示的 CH3 结构域中的两个 β 片层,包括 β -片层 C 中的 382E 和 β -片层 C 中的 428M。(PBD 码 :1FC1)。

[0046] 图 3 用于工程改造非糖基化 Fc5 结构域的易错 PCR 文库。

[0047] 图 4 来自不同轮分选的以 Fc γ RIa-FITC 标记的原生质球的荧光直方图。

[0048] 图 5 表现出对 Fc γ RIa 比对 Fc5 具有更高亲和性的分离的 Fc 突变体克隆的 DNA 序列。对于以 Fc γ RIa 标记的各个克隆的平均荧光数值在括号中显示。

[0049] 图 6 在糖基化 IgG1Fc 的 3D 结构上表示的分离的非糖基化 Fc601-619 的突变点 (PBD 码 :1FC1)。

[0050] 图 7 对于以 30nM Fc γ RIa-FITC 标记的野生型 Fc、Fc5 和 Fc601 的原生质球的荧光直方图。M:平均荧光强度。

[0051] 图 8 在糖基化 IgG1Fc 的 3D 结构上表示的分离的非糖基化 Fc 601 的突变点 (K338R、G341V、E382V、M428I) (PBD 码 :1FC1)。

[0052] 图 9 质粒 pSTJ4- 赫赛汀 IgG1 图谱。

[0053] 图 10 通过对于结合 Fc γ RIa 的 BIAcore 分析所确定的非糖基化曲妥珠单抗、曲妥珠单抗 -Fc5、曲妥珠单抗 -Fc601 和糖基化曲妥珠单抗的动力学速率和平衡解离常数。

[0054] 图 11 对于曲妥珠单抗抗体与 Fc γ RIIa-GST 结合的 ELISA 测定。

[0055] 图 12 对于曲妥珠单抗抗体与 Fc γ RIIb-GST 结合的 ELISA 测定。

[0056] 图 13 对于曲妥珠单抗抗体与 Fc γ RIIIa 结合的 ELISA 测定。

[0057] 图 14 对于在 pH 7.4 和 6.0 下与 FcRn 进行 pH 依赖性结合的 ELISA 测定。板以非

糖基化曲妥珠单抗、曲妥珠单抗 -Fc5、曲妥珠单抗 -Fc601 或者商业化的糖基化曲妥珠单抗包被并且使用抗 GST-HRP 抗体确定 FcRn 的结合。

[0058] 图 15 对 Fc γ RIa 比对 Fc5 具有更高亲和性和 pH 依赖性 FcRn 结合的文库。

[0059] 图 16 用于构建 CH2 上部区域随机化的 4 个亚文库的基因装配 PCR。

[0060] 图 17 表现出对 Fc γ RIa 比对 Fc5 具有更高亲和性的分离的 Fc 突变体克隆的 DNA 序列。对于以 Fc γ RIa 标记的各个克隆的平均荧光数值在括号中显示。

[0061] 图 18Fc701-709 中突变总结。

[0062] 图 19 以 1nM Fc γ RIa-FITC 标记的野生型 Fc、Fc5、Fc701 和 Fc702 的原生质球细胞的荧光直方图。M:平均荧光强度。

[0063] 图 20 以 1nM Fc γ RIa-FITC 标记的野生型 Fc、Fc5、Fc601 和 Fc701 原生质球细胞的荧光直方图。M:平均荧光强度。

[0064] 图 21 在糖基化 IgG1Fc 的 3D 结构上表示的分离的非糖基化 Fc5 的突变点 (382E 和 428M) (PBD 码:1FC1)。

[0065] 图 22 通过对于结合 Fc γ RI 的 BIACore 分析所确定的非糖基化曲妥珠单抗、曲妥珠单抗 -Fc5、曲妥珠单抗 -Fc601、曲妥珠单抗 -Fc701 和糖基化曲妥珠单抗的动力学速率和平衡解离常数。

[0066] 图 23 对于在 pH 7.4 和 6.0 下进行 pH 依赖性结合 FcRn 的 ELISA 测定。板以非糖基化曲妥珠单抗、曲妥珠单抗 -Fc5、曲妥珠单抗 -Fc601、曲妥珠单抗 -Fc701 或者商业化的糖基化曲妥珠单抗包被并且使用抗 GST-HRP 抗体确定 FcRn 的结合。

[0067] 图 24 共价锚定的全长 IgG 展示系统。

[0068] 图 25 在双质粒共价锚定的全长 IgG 展示系统和双顺反子系统之间的 FACS 信号的比较。或者使用双质粒的锚定全长 IgG 展示系统或者使用双顺反子全长 IgG 展示系统表达曲妥珠单抗全长 IgG。M:平均荧光强度。原生质球与 30nM Fc γ RI-FITC 探针孵育以便检测。

[0069] 图 26 在双质粒共价锚定全长 IgG 展示系统和双顺反子系统之间 FACS 信号比较。或者使用双质粒锚定全长 IgG 展示系统或者双顺反子全长 IgG 展示系统表达曲妥珠单抗全长 IgG。M:平均荧光强度。原生质球与 30nM Fc γ RIIa-GST 孵育并以多克隆抗 GST-FITC(1 : 200) 探针标记以便检测。

[0070] 图 27 使用双质粒的共价锚定全长 IgG 展示系统和双顺反子系统的曲妥珠单抗全长 IgG 的 FACS 分析。表达曲妥珠单抗全长 IgG 的原生质球与 30nM Fc γ RI-FITC 探针孵育以便检测。M:平均荧光强度。

[0071] 图 28 使用双质粒的共价锚定全长 IgG 展示系统和双顺反子系统的曲妥珠单抗全长 IgG 的 FACS 分析。表达曲妥珠单抗全长 IgG 的原生质球与 30nM Fc γ RIIa-GST 孵育并且用多克隆抗 GST-FITC(1 : 200) 探针孵育以便检测。M:平均荧光强度。

[0072] 图 29 文库 CH2 上部区域随机化的文库。

[0073] 图 30 使用 PBMC 作为效应器细胞和使用 SkBr3 作为靶细胞的 ADCC 测定。*, P < 0.05。

[0074] 图 31 使用 mDCs 作为效应器细胞和使用 SkBr3 作为靶细胞的 ADCC 测定。*, P < 0.05 ;**, P < 0.01。

具体实施方式

[0075] 发明人先前克服了当前免疫治疗技术在提供能够结合 Fc 受体多肽的非糖基化抗体 Fc 结构域中的数个主要问题。已经开发出具有工程化特征的另外的 Fc 结构域。虽然提供了关于 Fc 文库和筛选方法的信息,但是在下面描述更多的实施方案和优势。

[0076] I. 周质表达

[0077] 在一些实施方案中,包含抗体 Fc 结构域的多肽可以在革兰氏阴性细菌周质空间中表达。此外,在一些方面中,抗体 Fc 结构域可以锚定在内膜的周质面上。例如,Fc 结构域可以与跨膜或者膜结合多肽直接融合,或者可以与跨膜或者膜结合多肽相互作用(例如通过蛋白质-蛋白质相互作用)。此种技术可以称作“锚定周质表达”或者“APEX”。

[0078] 周质区室包含于革兰氏阴性细胞的内膜与外膜之间(见例如 Oliver,1996)。作为亚细胞区室,周质区室的大小、形状和内容物伴随着细胞的生长和分裂而变化。在肽聚糖杂聚物框架内是密集环境的周质蛋白质和较少的水,赋予区室凝胶样的稠度(Hobot 等,1984;van Wielink 和 Duine,1990)。取决于距外膜的距离、其形成支撑细胞形状的胞壁质球囊的闭合以及渗透性溶解的抵抗,肽聚糖以不同程度聚合。

[0079] 外膜(见 Nikaido,1996)由磷脂类、孔蛋白和伸向外界基质的脂多糖(LPS)构成。外膜完整性的分子基础在于 LPS 结合二价阳离子(Mg^{2+} 和 Ca^{2+})的能力和通过静电彼此连接在膜上形成高序准晶体的有序“瓦屋顶”的能力(Labischinski 等,1985)。膜形成非常严格的通透性屏障、允许小于约 650Da 的分子经过孔蛋白通过(Burman 等,1972;Decad 和 Nikaido,1976)。大的充满水的孔蛋白通道主要负责允许单糖和二糖、离子和氨基酸自由通过进入周质区室(Nikaido 和 Nakae,1979;Nikaido 和 Vaara,1985)。因为分子进入周质具有如此严格的生理调节,乍一看大配体(即大约 650Da 的排斥界限)可以在筛选方法中采用是不可思议的。然而,发明人已经证明,大于 2000Da 大小的配体可以扩散进入周质中,而不破坏周质膜。如下文所述,可以对细菌细胞进行一种或者更多种处理,由此使外膜渗透性更大来辅助此种扩散。

[0080] 用于在周质空间中表达多肽并且特别是抗体的方法在本领域中是已知的,例如见美国专利 7,094,571 和美国专利公布 20030180937 和 20030219870,每一文献通过参考并入本文。在一些情况中,本发明的革兰氏阴性细菌细胞可以限定为大肠杆菌细胞。此外,在一些方面中,革兰氏阴性细菌细胞可以限定为遗传工程改造的细菌细胞,诸如大肠杆菌 Jude-1 株。

[0081] II. 外膜的透化

[0082] 在一些实施方案中,涉及破坏、透化或者去除细菌外膜的方法是本领域众所周知的,例如,见美国专利 7,094,571。例如,在细菌细胞与 FcR 多肽接触之前,用高渗条件、物理应力、溶菌酶、EDTA、消化酶、破坏外膜的化学试剂、通过以噬菌体感染细菌或者上述方法的组合处理细菌细胞的外膜。因此,在一些情况中,外膜可以通过溶菌酶和 EDTA 处理来破坏。此外,在某些实施方案中,细菌外膜可以完全去除。

[0083] 在一个实施方案中,采用用于增加外膜对一种或者更多种标记配体通透性的方法。这使得可以筛选标记配体的进入,否则标记的配体不能够跨过外膜。然而,某些种类的分子,例如大于 650Da 排斥界限的疏水性抗生素类本身可扩散通过细菌外膜,而不依赖于膜孔蛋白(Farmer 等,1999)。这样做实际上是该过程可将膜透化(Jouenne 和 Junter,

1990)。此种机制已经被用于以多粘菌素 B 九肽体内选择性标记细胞质膜蛋白的周质环 (Wada 等, 1999)。同样, 某些长链磷酸盐聚合物 (100Pi) 似乎完全绕过外膜的正常分子筛活性 (Rao 和 Torriani, 1988)。

[0084] 已经鉴定出导致配体透过进入周质而不损失活力或者所表达蛋白质不从细胞释放的条件, 但是本发明将在无需保持外膜的情况下开展。如本文中所述, Fc 结构域表达或锚定在周质空间内的候选结合蛋白, 消除了对维持外膜 (作为防止结合蛋白从细胞外漏的屏障) 以检测标记配体的需要。结果, 表达锚定至细胞质膜外面 (周质面) 的结合蛋白的细胞可以简单地通过具有部分透化膜或者几乎完全去除外膜的细胞与荧光标记的配体溶液孵育而进行荧光标记。

[0085] 不同菌株细菌宿主的外膜通透性在很大程度上变化。先前已经证明, 缺乏组蛋白样蛋白质会因为 OmpF 过表达而引起通透性增加, 结果导致对于 OmpF 翻译的负向调节 mRNA 的数量降低 (Painbeni 等, 1997)。同样, DNA 复制和染色体分离依赖于复制体与内膜的直接接触, 内膜本身与外膜在很多点接触。对于文库筛选应用的优选宿主是大肠杆菌 ABLEC 株, 另外其具有降低质粒拷贝数的突变。

[0086] 诸如高渗胁迫的处理可以显著改善标记。已知许多试剂, 包括钙离子 (Bukau 等, 1985) 和甚至 Tris 缓冲液 (Irvin 等, 1981) 改变外膜通透性。此外, 噬菌体感染刺激标记过程。丝状噬菌体内膜蛋白 pIII 和大多聚体外膜蛋白 pIV 均可改变膜通透性 (Boeke 等, 1982), 其中已知 pIV 中的突变体改善在正常情况下所排斥的麦芽糊精的进入 (Marciano 等, 1999)。使用包括菌株、盐和噬菌体的正确组合的本发明技术, 可以达到高程度的通透性 (Daugherty 等, 1999)。然后, 可以容易地将包含结合至荧光标记配体的锚定或周质相关多肽的细胞从表达结合蛋白的细胞分离, 而无需使用流式细胞术或者其它相关技术对于标记配体的亲和性。然而, 在一些情况中, 希望使用破坏性更小的技术以维持细胞的活力。在这方面, EDTA 和溶菌酶处理也是有用的。

[0087] III. 抗体结合性多肽

[0088] 在某些方面, 涉及用于鉴定对抗体结合性多肽诸如 Fc 受体具有特异亲和性的抗体 Fc 结构域的方法。在一些实施方案中, Fc 结构域经工程改造以结合一种或者更多种特异性 Fc 受体。另外地或者备选地, Fc 结构域可以工程改造以致于其特异性地结合一种或者更多种特异性 Fc 受体。

[0089] 在某些实施方案中, 涉及包含已经相对于天然或者野生型蛋白质进行修饰的蛋白质类分子的组合物。

[0090] 在一些实施方案中, 蛋白质类化合物已经缺失了氨基酸残基; 在其它的实施方案中, 蛋白质类化合物的氨基酸残基已经被替代, 而在又一实施方案中, 在蛋白质类化合物中进行了氨基酸残基的缺失和替代两者。此外, 蛋白质类化合物可包括包含一种以上多肽实体的氨基酸分子。如本文所使用, “蛋白质类分子”、“蛋白质类组合物”、“蛋白质类化合物”、“蛋白质类链”或者“蛋白质类材料”通常指, 但不限于, 大于约 200 个氨基酸的蛋白质或者从基因翻译的全长内源序列; 100 个氨基酸或者更大的多肽; 和/或 3 至 100 个氨基酸的肽。上面描述的所有的“蛋白质类”术语在本文中可以互换使用; 然而, 特别考虑了, 实施方案可以局限于特定类型的蛋白质类化合物, 诸如多肽。此外, 这些术语同样可以应用于融合蛋白质或者蛋白质缀合物。蛋白质可以包括一种以上的多肽。例如, IgG 抗体具有两个重链多

肽和两个轻链多肽,通过二硫键将它们彼此连接起来。

[0091] 如本文所使用,“不同的 Fc 结构域”可以定义为与另一 Fc 有少至 1 个氨基酸差异的结构域。用于产生不同抗体 Fc 结构域文库或者编码抗体的核酸的方法在本领域中众所周知并且在本文中举例说明。例如,在一些情况中,如在本文中所例证,Fc 结构域可以通过易错 PCR 扩增。此外,在某些情况下,多种抗体 Fc 结构域可以包含已经随机化的一串(1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 个或更多个)氨基酸。在某些情况下,可将 Fc 结构域经工程改造进行特定突变。例如,在一些方面中,正常情况下在抗体 Fc 结构域中被糖基化的残基可以突变。此外,在某些方面,正常情况下糖基化的残基(或者邻近残基)可以用作插入 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 个或更多个氨基酸的位点。氨基酸插入可以在对应于 IgG1Fc (SEQ ID NO: 2) 氨基酸 384 的残基或者附近进行。在又一种情况中,根据本发明的革兰氏阴性细菌群体可以定义为包含至少约 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 或者更多不同抗体 Fc 结构域。在一些特定情况中,革兰氏阴性细菌细胞群体可以通过包括下列步骤的方法产生:(a) 制备编码多种不同抗体 Fc 结构域的多种核酸;和 (b) 以所述核酸转化革兰氏阴性细菌群体,其中革兰氏阴性细菌包含表达在周质中的多种抗体 Fc 结构域。

[0092] 许多种抗体结合结构域(例如 FcR 多肽)是本领域已知的并且可以在本发明方法和组合物中使用。例如,在一些方面中,FcR 可以对 Ig 的特定类型或者亚型具有特异性,诸如 IgA、IgM、IgE 或者 IgG(例如 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 或者 IgG4)。因此,在一些实施方案中,抗体结合结构域可以限定为 IgG 结合结构域。FcR 多肽可包含真核的、原核的或者合成的 FcR 结构域。例如,抗体 Fc- 结合结构域可以限定为哺乳动物的、细菌的或者合成的结合结构域。用于在本发明中使用的一些 Fc- 结合结构域包括但不限于来自表 1 多肽之一的结合结构域。例如,Fc 结合多肽可以由 FCGR2A、FCGR2B、FCGR2C、FCGR3A、FCGR3B、FCGR1A、Fcgr1、FCGR2、FCGR2、Fcgr2、Fcgr2、FCGR3、FCGR3、Fcgr3、FCGR3、Fcgr3、FCGRT、mrp4、spa 或者 spg 基因编码。优选地,用于根据本发明使用的 FcR 多肽可以是来自人 Fc γ RIa、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIIc、Fc γ RIIIa、Fc γ RIIIb、Fc α RI 或 C1q 的 Fc 结合区。

[0093] 在本发明的又一实施方案中,Fc 多肽可以锚定至革兰氏阴性细菌的内膜。用于将多肽锚定至革兰氏阴性细菌内膜的方法和组合物已经在先前描述(美国专利 7,094,571 和美国专利公布 20050260736)。因此,在一些方面中,Fc 结构域可以融合至与细菌内膜结合或者整合入细菌内膜的多肽。此种融合蛋白质可以包括与 Fc 结构域的 N 末端或者 C 末端融合,并且在一些情况中可以在膜锚定多肽与 Fc 结构域之间包括额外的连接体氨基酸。在某些特定的情况中,膜锚定多肽可以是又大肠杆菌 NlpA 基因编码的前 6 个氨基酸,来自大肠杆菌内膜蛋白的一个或者更多个跨膜 α -螺旋,丝状噬菌体的基因 III 蛋白质或其片段,或者内膜脂蛋白或其片段。因此,作为实例,膜锚定多肽可以是内膜脂蛋白或其片段,诸如来自 AraH、MglC、MalF、MalG、MalC、MalD、RbsC、RbsC、ArtM、ArtQ、GlnP、ProW、HisM、HisQ、LivH、LivM、LivA、LivE、DppB、DppC、OppB、AmiC、AmiD、BtuC、ThuD、FecC、FecD、FecR、FepD、NikB、NikC、CysT、CysW、UgpA、UgpE、PstA、PstC、PotB、PotC、PotH、Pod、ModB、NosY、PhnM、LacY、SecY、TolC、Dsb、B、DsbD、TouB、TatC、CheY、TraB、ExbD、ExbB 或者 Aas。

[0094] 技术人员将理解,基于它们与 FcR 相互作用(结合)而选择细胞的方法在本领域中众所周知。例如,FcR 可以固定在柱或者珠上(例如磁珠)并且通过重复洗涤珠(例如磁分离)或者柱分离与 FcR 结合的细菌细胞。此外,在一些方面中,靶配体可以用例如荧光

体、放射性同位素或者酶标记。因此,在一些情况中,细菌细胞可以通过检测所结合 FcR 上的标记来选择。例如,荧光团可以用于使用荧光激活细胞分选 (FACS) 来选择细胞。此外,在一些方面中,细菌细胞可以基于两种或者更多种 FcR 多肽的结合或者不结合来选择。例如,可以选择表现出结合两种 FcR 多肽的抗体的细菌,其中使用每一 FcR 进行连续地选择细菌。相反,在某些方面,可以选择表现出结合一种 FcR(诸如包含第一标记的 FcR) 但不结合第二 FcR(例如包含第二标记) 的抗体 Fc 结构域的细菌。前述方法可以用于,例如,鉴定结合特异性 FcR 但不结合第二特异性 FcR 的抗体 Fc 结构域。

[0095] 在某些实施方案中,至少一种蛋白质类分子的大小可以包括,但不限于,大约或者至少 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、275、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000 个或者更多个氨基分子残基,和可从其推导出的任何范围。化合物可包括来自 SEQ ID NO :2(人 IgG Fc 多肽) 或者来自 SEQ ID NO 4-31 的上述数量的连续氨基酸,并且它们可以进一步地与 SEQ ID NO :2 或者 SEQ ID NO :4-31 中的任何序列具有百分比同一性或者同源性(下面讨论)。考虑了,对于 SEQ ID NO :2 的实施方案可以使用本文所述的任何其它氨基酸序列,并且根据情况反之亦然。

[0096] 如本文所使用,“氨基分子”指任何氨基酸、氨基酸衍生物或者本领域普通技术人员已知的氨基酸模拟物。在某些实施方案中,蛋白质类分子的残基是连续的,没有任何非氨基分子打断氨基分子残基序列。在其它的实施方案中,序列可以包含一个或者一个以上非氨基分子部分。在特定的实施方案中,蛋白质类分子的残基序列可以被一个或者更多个非氨基分子部分打断。

[0097] A. 修饰的蛋白质和多肽

[0098] 实施方案涉及修饰的蛋白质和多肽,特别是表现出与非修饰形式具有可比性的至少一种功能活性的修饰蛋白质或多肽,然而,修饰的蛋白质或者多肽拥有超过非修饰形式的额外的优势,诸如引起 ADCC,更容易或者更廉价生产,较少地引起副作用,和/或具有更佳或者更长的有效性或生物利用率。因此,当本申请提到“修饰蛋白质”或者“修饰多肽”的功能或者活性时,本领域普通技术人员将理解这包括例如这样的蛋白质或多肽,1) 表现出与未修饰蛋白质或者多肽具有至少一种相同的活性或者具有至少一种相同的特异性,但是具有不同水平的另一活性或者特异性;和 2) 拥有优于未修饰蛋白质或者多肽的额外的优势。活性的测定可以使用本领域技术人员熟悉的,特别是关于蛋白质活性的测定法实现,并且可以包括例如为了比较的目的使用天然和/或重组形式的修饰的或者未修饰的蛋白质或者多肽。特别考虑了,关于“修饰蛋白质”的实施方案可以使用“修饰多肽”实施,并且反之亦然。除了本文讨论的修饰的蛋白质和多肽之外,实施方案可以包括 WO 2008/137475 中描述的结构域、多肽和蛋白质,该文献明确地通过参考并入本文。

[0099] 修饰的蛋白质可以具有氨基酸缺失和/或替换;因此,具有缺失的蛋白质、具有替换的蛋白质,和具有缺失和替换的蛋白质是修饰的蛋白质。在一些实施方案中,这些修饰的蛋白质还可以包括氨基酸插入或者添加,诸如在融合蛋白中或者具有连体体的蛋白质中。“修饰的缺失的蛋白质”缺乏一个或者更多个天然蛋白质残基,但是具有天然蛋白质的特异性和/或活性。“修饰的缺失的蛋白质”还可以具有降低的免疫原性或者抗原性。修饰的缺

失的蛋白质的实例是这样的一种蛋白质,即其缺失至少一个抗原区的氨基酸残基,抗原区即决定在特定生物体,诸如修饰蛋白质可能会施用的生物体类型中抗原性的蛋白质区域。

[0100] 替换或替代变体有代表性地包括在蛋白质内的一个或多个位点一种氨基酸与另一种氨基酸的交换,并且可以经设计以调节多肽的一种或更多种特性,特别是其效应器功能和/或生物利用率。替换可以是保守的或者不是保守的,保守的即一个氨基酸用另一相似形状和电荷的氨基酸替换。保守替换是本领域众所周知的并且包括例如如下变化:丙氨酸至丝氨酸;精氨酸至赖氨酸;天冬酰胺至谷氨酰胺或组氨酸;天冬氨酸至谷氨酸;半胱氨酸至丝氨酸;谷氨酰胺至天冬酰胺;谷氨酸至天冬氨酸;甘氨酸至脯氨酸;组氨酸至天冬酰胺或谷氨酰胺;异亮氨酸至亮氨酸或缬氨酸;亮氨酸至缬氨酸或异亮氨酸;赖氨酸至精氨酸;甲硫氨酸至亮氨酸或异亮氨酸;苯基丙氨酸至酪氨酸,亮氨酸或甲硫氨酸;丝氨酸至苏氨酸;苏氨酸至丝氨酸;色氨酸至酪氨酸;酪氨酸至色氨酸或苯丙氨酸;以及缬氨酸至异亮氨酸或亮氨酸。

[0101] 除了缺失或替换外,修饰的蛋白质可以具有残基插入,其有代表性地包括在多肽中加入至少一个残基。这可以包括插入靶向肽或多肽或者只是信号残基。末端添加,称作融合蛋白在下面讨论。

[0102] 术语“生物功能等效”在本领域中很容易理解并且在本文中进一步详细定义。因此,包括了具有约70%和约80%之间,或者约81%和约90%之间,或者甚至约91%和约99%之间的与天然多肽氨基酸同一或者功能等效氨基酸的序列,前提是维持了蛋白质的生物学活性。修饰的蛋白质可以与其天然相似物在生物功能上等效。

[0103] 还应当理解,氨基酸和核酸序列可以包括额外的残基,诸如额外的N-末端或者C-末端氨基酸或者5'或者3'序列,并且在本质上仍然如在本文所公开的序列之一所述,只要序列满足了上述标准即可,包括就蛋白质表达而言维持了蛋白质的生物学活性。末端序列的添加特别应用于核酸序列,核酸序列例如可以包括编码区5'或3'部分的不同的非编码侧翼或者可以包括不同的内部序列,即已知基因内存在的内含子。

[0104] 下面是基于改变蛋白质氨基酸以产生等效或者甚至改善的、第二代分子的讨论。例如,某些氨基酸可以替换蛋白质结构中的其它氨基酸,而具有或不具有相当大的与结构例如作用物分子结合位点的相互作用结合能力的损失。由于限定蛋白质生物学功能活性的是该蛋白质的相互作用能力和性质,所以可以在蛋白质序列中并且在其DNA编码序列中进行某些氨基酸替换,尽管如此仍产生具有相似特性的蛋白质。因此发明人考虑了,可以对基因的DNA序列进行多种改变而不会造成它们的生物学有效性或者活性相当大的损失,如下面所讨论。如果满足下列“同源性标准”之一,则蛋白质类分子与第二蛋白质类分子具有“同源性”或者认为是“同源的”:1) 蛋白质类分子与第二蛋白质类分子在同一位置具有至少30%的序列同一性;2) 在第二蛋白质类分子内的相同位置上具有一些序列同一性,并且如本文所述,对于第二蛋白质类分子,在非相同的残基上,至少30%的残基为保守性的差异;或者3) 至少30%的蛋白质类分子与第二蛋白质类分子具有序列同一性,但是在相同残基之间可能具有非相同的残基缺口。如本文所使用,术语“同源的”可以同样地应用于蛋白质类分子的区域,而不是整个分子。如果术语“同源性”或者“同源的”通过数量限定,例如“50%同源性”或者“50%同源的”,则对于1)、2)和3)的同源性标准调整为从“至少30%”至“至少50%”。因此考虑了,在两个蛋白质类分子或者蛋白质类分子的部分之间存在至少

30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更高的同源性。

[0105] 备选地,修饰的多肽可以表征为与未修饰多肽或者与本文公开的任何多肽,包括 SEQ ID NO :2 或者 SEQ ID NO :4-31 中的任何序列具有一定的同一性百分数。两个蛋白质类分子或者蛋白质类分子的部分之间的同一性百分数可以是至多或者至少 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% (或者可从它们推导出的任何范围)。考虑了,上面讨论的同一性百分数与多肽特定区域与多肽未修饰区域的比较有关。例如,多肽可包含修饰的或者突变的 Fc 结构域,其可以基于修饰的或者突变的 Fc 结构域与来自同一物种的非修饰的或者突变的 Fc 结构域的氨基酸序列同一性进行表征。表征为例如与未修饰 Fc 结构域具有 90% 同一性的修饰的或者突变的人 Fc 结构域意思是指,在该结构域中有 90% 的氨基酸与未修饰人 Fc 结构域 (SEQ ID NO :2) 的氨基酸相同。

[0106] 在产生此类改变中,可以考虑氨基酸的亲疏水性指数。在本领域中普遍理解亲疏水性氨基酸指数对赋予蛋白质的相互作用的生物学功能上的重要性 (Kyte 和 Doolittle, 1982)。一般认为,氨基酸的相对亲疏水性特征有利于所得到蛋白质的二级结构,其反过来限定了蛋白质与其他分子例如酶、作用物、受体、DNA、抗体、抗原等等的相互作用。

[0107] 本领域中还理解,可以基于亲水性有效地产生相似氨基酸的替换。美国专利 4, 554, 101, 通过参考并入本文,描述了如通过邻近氨基酸的亲水性所决定的蛋白质的最大局部平均亲水性与蛋白质的生物学特性相关。如在美国专利 4, 554, 101 中所详细描述,对氨基酸残基指定下列亲水性值:精氨酸 (+3.0);赖氨酸 (+3.0);天冬氨酸 (+3.0±1);谷氨酸 (+3.0±1);丝氨酸 (+0.3);天冬酰胺 (+0.2);谷氨酰胺 (+0.2);甘氨酸 (0);苏氨酸 (-0.4);脯氨酸 (-0.5±1);丙氨酸 (-0.5);组氨酸 (-0.5);半胱氨酸 (-1.0);甲硫氨酸 (-1.3);缬氨酸 (-1.5);亮氨酸 (-1.8);异亮氨酸 (-1.8);酪氨酸 (-2.3);苯基丙氨酸 (-2.5);色氨酸 (-3.4)。

[0108] 应当理解,氨基酸可以替换具有相似亲水性值的另一氨基酸,而仍然产生生物学上等效的和免疫学上等效的蛋白质。在此类改变中,优选其亲水性值在 ±2 之内的氨基酸替换,特别优选亲水性值在 ±1 之内的那些氨基酸替换,并且更加特别优选其亲水性值在 ±0.5 之内的那些氨基酸替换。

[0109] 如上面所大概描述,氨基酸替换通常基于氨基酸侧链取代物的相对相似性,例如,它们的疏水性、亲水性、电荷、大小等等。考虑具有多种前述特征的示例性替换是本领域技术人员众所周知的并且包括:精氨酸和赖氨酸;谷氨酸和天冬氨酸;丝氨酸和苏氨酸;谷氨酰胺和天冬酰胺;以及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸。

[0110] 结合 Fc 结构域的多种 Fc 受体是本领域众所周知的并且一些受体实例列于下表 1 中。

[0111] 表 1 :选择的 FcR 多肽

[0112]

蛋白质名称	基因名称	描述	生物	长度(aa)	参考文献
Fc- γ RII-a (CD32)	FCGR2A	低亲和性免疫球蛋白 γ Fc 区受体 II-a 前体	人 (人类)	317	(Stuart 等 , 1987)
Fc- γ RII-a	FCGR2A	低亲和性免疫球蛋白 γ Fc 区受体 II-a 前体	<i>Pan troglodytes</i> (黑猩猩)	316	
Fc- γ RII-b	FCGR2B	低亲和性免疫球蛋白 γ Fc 区受体 II-b 前体	人 (人类)	310	(Stuart 等 , 1989)

[0113]

蛋白质名称	基因名称	描述	生物	长度(aa)	参考文献
Fc- γ RII-c	FCGR2C	低亲和性免疫球蛋白 γ Fc 区受体 II-c 前体	人 (人类)	323	(Stuart 等, 1989)
Fc- γ RIIIa	FCGR3A	低亲和性免疫球蛋白 γ Fc 区受体 III-A 前体	人 (人类)	254	(Ravetch 和 Perussia, 1989)
Fc- γ RIIIb	FCGR3B	低亲和性免疫球蛋白 γ Fc 区受体 III-B 前体	人 (人类)	233	(Ravetch 和 Perussia, 1989)
Fc- γ RI (CD64)	FCGR1A	高亲和性免疫球蛋白 γ Fc 受体 I 前体	人 (人类)	374	(Allen 和 Seed, 1988)
Fc- γ RI	Fcgr1	高亲和性免疫球蛋白 γ Fc 受体 I 前体	小家鼠 (<i>Mus musculus</i>) (小鼠)	404	(Sears 等, 1990)
Fc- γ RII	FCGR2	低亲和性免疫球蛋白 γ Fc 区受体 II 前体	普通牛 (<i>Bos taurus</i>) (牛)	296	(Zhang 等, 1994)
Fc- γ RII	FCGR2	低亲和性免疫球蛋白 γ Fc 区受体 II 前体	豚鼠 (<i>Cavia porcellus</i>) (荷兰猪)	341	(Tominaga 等, 1990)
Fc- γ RII	Fcgr2	低亲和性免疫球蛋白 γ Fc 区受体 II 前体	小家鼠 (小鼠)	330	(Ravetch 等, 1986)
Fc- γ RII	Fcgr2	低亲和性免疫球蛋白 γ Fc 区受体 II 前体	褐家鼠 (<i>Rattus norvegicus</i>) (大鼠)	285	(Bocek 和 Pecht, 1993)
Fc- γ RIII	FCGR3	低亲和性免疫球蛋白 γ Fc 区受体 III 前体	普通牛 (牛)	250	(Collins 等, 1997)
Fc- γ RIII	FCGR3	低亲和性免疫球蛋白 γ Fc 区受体 III 前体	食蟹猴 (<i>Macaca fascicularis</i>) (吃螃蟹的短尾猴) (短尾猴子)	254	
Fc- γ RIII	Fcgr3	低亲和性免疫球蛋白 γ Fc 区受体 III 前体	小家鼠 (小鼠)	261	(Ravetch 等, 1986)
Fc- γ RIII	FCGR3	低亲和性免疫球蛋白 γ Fc 区受体 III 前体	猪 (<i>Sus scrofa</i>) (猪)	257	(Halloran 等, 1994)
Fc- γ RIII	Fcgr3	低亲和性免疫球蛋白 γ Fc 区受体 III 前体	褐家鼠 (大鼠)	267	(Zeger 等, 1990)
FcRn	FCGRT	IgG 受体转运蛋白 FcRn 大亚基 p51 前体	人 (人类)	365	
FcRn	FCGRT	IgG 受体转运蛋白 FcRn 大亚基 p51 前体	食蟹猴 (吃螃蟹的短尾猴) (短尾猴子)	365	

[0114]

蛋白质名称	基因名称	描述	生物	长度(aa)	参考文献
FcRn	Fcgrt	IgG受体转运蛋白 FcRn 大亚基 p51 前体	小家鼠 (小鼠)	365	(Ahouse 等, 1993)
FcRn	Fcgrt	IgG受体转运蛋白 FcRn 大亚基 p51 前体	褐家鼠(大鼠)	366	(Simister 和 Mostov, 1989)
MRP 蛋白	mrp4	纤维蛋白原- 和 Ig-结合蛋白前体	化脓性链球菌 (<i>Streptococcus pyogenes</i>)	388	(Stenberg 等, 1992)
蛋白 B		cAMP 因子	无乳链球菌 (<i>Streptococcus agalactiae</i>)	226	(Ruhlmann 等, 1988)
蛋白 A	spa	免疫球蛋白 G-结 合蛋白 A 前体	金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)(菌株 NCTC 8325)	516	(Uhlen 等, 1984)
蛋白 A	spa	免疫球蛋白 G-结 合蛋白 A 前体	金黄色葡萄球菌	508	(Shuttleworth 等, 1987)
蛋白 A	spa	免疫球蛋白 G-结 合蛋白 A 前体	金黄色葡萄球菌 (菌株 Mu50 / ATCC 700699)	450	(Kuroda 等, 2001)
蛋白 A	spa	免疫球蛋白 G-结 合蛋白 A 前体	金黄色葡萄球菌 (菌株 N315)	450	(Kuroda 等, 2001)
蛋白 G	spg	免疫球蛋白 G-结 合蛋白 G 前体	链球菌属某种 (<i>Streptococcus sp.</i>)G 群	448	(Fahnestock 等, 1986)
蛋白 G	spg	免疫球蛋白 G-结 合蛋白 G 前体	链球菌属某种 G 群	593	(Olsson 等, 1987)
蛋白 H		免疫球蛋白 G-结 合蛋白 H 前体	化脓性链球菌 血清型 M1	376	(Gomi 等, 1990)
蛋白 sbi	sbi	免疫球蛋白 G-结 合蛋白 sbi 前体	金黄色葡萄球菌 (菌株 NCTC 8325-4)	436	(Zhang 等, 1998)
变应原 Asp fl 1		变应原 Asp fl 1 引 起人变态反应。结 合至 IgE 和 IgG	黄曲霉 (<i>Aspergillus flavus</i>)	32	
变应原 Asp fl 2		变应原 Asp fl 2 引 起人变态反应。结 合至 IgE 和 IgG	黄曲霉	20	
变应原 Asp fl 3		变应原 Asp fl 3 引 起人变态反应。结 合至 IgE 和 IgG	黄曲霉	32	
Fc-ε RI		在肥大细胞、嗜酸 细胞 和嗜碱粒细 胞上显示的 IgE 受体	人 (人类)		
Fc-α RI (CD86)		在巨噬细胞上显 示的 IgA (IgA1, IgA2)受体	人 (人类)		

[0115]

蛋白质名称	基因名称	描述	生物	长度(aa)	参考文献
C1q	C1QA NP_057075.1, C1QB NP_000482.3, C1QC NP_758957.1	C1q 是结合至由 6 个 A 链、6 个 B 链和 6 个 C 链组成的抗体 Fc 的多聚体复合体	人 (人类)		

[0116] 如上所述,多肽可以包含能够结合 FcR 多肽的非糖基化抗体 Fc 结构域。在一些方面中,非糖基化 Fc 结构域可以进一步限定为在生理条件下对 FcR 多肽具有特异性亲和性。例如, Fc 结构域在生理条件下具有约 10^{-6}M 至约 10^{-9}M 的平衡解离常数。此外,在一些方面中,非糖基化 Fc 结构域可以限定为相对于野生型序列,诸如人野生型序列包含一个或者更多个氨基酸取代或者插入。

[0117] 制备此种多肽的方法包括在 WO 2008/137475 中讨论的那些,该文献通过参考并入本文。人们可以备选地通过遗传工程技术直接制备此类多肽,例如,通过向已知的 Fc 背景中引入所选择的氨基酸替换或者插入,其中插入或者替换为非糖基化 Fc 区提供了改善的 FcR 结合能力。发明人已经鉴定出为实现此种改善的 FcR 结合特别优选的替换是在 Fc 结构域位置 331、382 和 / 或 428 上的那些替换(例如,见 Nagaoka 和 Akaike 2003;诸如美国专利公布 US20060173170 中所示的人 IgG Fc 结构域序列的 P331、E382 和 / 或 M428,通过参考并入本文),并且更加优选的是定义为 P331L、E382V、M428I 或 M428L 的一个或者更多个替换。

[0118] 除了在下表 5 和 6 中描述的替换之外,多肽可以具有包括 Fc 结构域 426、229、322、350、361、372、442、402、224、430、238、436、310、313、384、372、380 或者 331 中,诸如人 IgG Fc 结构域 S426、C229、K322、T350、N361、F372、S442、G402、H224、E430、P238、Y436、H310、W313、N384、F372、E380 或者 P331 中的一个或更多个替代,其中特别优选的实例是 a) E382 和 M428 ;b) N361、E382 和 M428 ;c) N361、F372、E382 和 M428 ;d) H310、K322、T350、E382、S426 和 S442 ;e) C229R、E382 和 M428 ;f) W313 和 M428 ;g) E382、N384 和 M428 ;h) E380、E382 和 N384 ;i) N361、E382 和 M428 ;j) E382、M428 和 Y436 ;k) P238、E382、S426、M428 和 E430 ;l) E380、E382、N384、S426、M428 和 E430 ;m) E382、S426、M428 和 E430 ;n) H224、E382、S426、M428 和 E430 ;o) P331 ;p) S239、I253、Q347、E382 ;q) E382、G402 和 M428 ;以及 r) E382、P331 和 M428。特别的替换包括 a) E382V 和 M428I ;b) E382V ;c) N361D、E382V 和 M428I ;d) N361D、F372L、E382V 和 M428I ;e) H310Y、K322R、T350A、E382V、S426T 和 S442P ;f) C229R、E382V 和 M428I ;g) W313R 和 M428I ;h) E382T、N384D 和 M428I ;i) E380R、E382M 和 N384E ;j) N361S、E382V 和 M428I ;k) E382V、M428I 和 Y436A ;l) P238S、E382V、S426V、M428L 和 E430H ;m) E380D、E382V、N384R、S426V、M428L 和 E430D ;n) E382V、S426I、M428L 和 E430S ;o) H224R、E382V、S426T、M428S 和 E430P ;p) P331L ;q) S239L、I253T、Q347L、E382V ;r) E382V、G402D 和 M428I ;以及 s) E382V、P331L 和 M428I。

[0119] 当向 Fc 结构域中插入额外的氨基酸时,Fc 结构域中存在多个插入点,提供了改善的 FcR 结合能力。考虑了 5 至 15 个氨基酸的插入。在一些实施方案中,插入了 10 个氨基酸,例如在 Fc 结构域诸如人 IgG Fc 结构域的氨基酸 N297 和 S298 之间。在该位置的特定的插入(以及替换)包括 a) RTETPVYVMV(SEQ ID NO :79) ;b) WQVFNKYTKP(SEQ ID NO :80) ;c) LGDGSPCKAN(SEQ ID NO :81) ;d) EVPLVWMWVS(SEQ ID NO :82) 以及 F241L 和 K326E ;和 e)

EQWGSQFGCG (SEQ ID NO :83) 以及 V282A。

[0120] Fc 结构域可以是在对应于 IgG Fc 结构域 E382 的氨基酸残基上包含氨基酸替换的人 IgG Fc。此外,非糖基化 Fc 结构域可以在邻近对应于 IgG Fc 结构域 E382 的氨基酸残基处包含氨基酸序列插入(例如大约 1 至 5 个氨基酸)。因此,在一些特定方面中,Fc 结构域可包含在 E382 位的疏水氨基酸替换,例如 E 至 V 的替换。此外,在一些方面中,本发明的 Fc 结构域可以在对应于人 IgG Fc 的 M428(例如 M428 至 I)、S426、C229、H310、K322、T350、N361、F372 或者 S442 的残基包含氨基酸替换。在某些特定的实施方案中,非糖基化 Fc 结构域可包含对应于在 WO 2008/137475 中所述的 Fc11 中发现的那些氨基酸替换,其通过参考并入本文。因此,在极其特别的情况中,非糖基化 Fc 结构域可包含氨基酸序列 SEQ ID NO : 2(Fc5)。

[0121] 在一些实施方案中,非糖基化 Fc 结构域包含对 FcR 诸如人 Fc γ RIa、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIIc、Fc γ RIIIa、Fc γ RIIIb、Fc α RI 或 C1q 的特异性结合亲和性。因此,在一些方面中,本发明的非糖基化 Fc 结构域定义为对 Fc γ RIa 具有特异性亲和性的 Fc 结构域。此外,此种 Fc 结构域可以定义为对于 Fc γ RIa 结合在生理条件下具有大约 10^{-6} M 至大约 10^{-9} M 的平衡解离常数。

[0122] B. 修饰的抗体和具有异源区的蛋白质类化合物

[0123] 实施方案涉及可包括来自一种以上天然存在或者天然多肽或蛋白质的氨基酸序列的蛋白质类化合物。上面讨论的实施方案考虑在该部分中应用,并且反之亦然。例如,修饰的抗体是包含具有抗原结合结构域的修饰 Fc 结构域的修饰抗体。此外,抗体可具有两个不同的抗原结合区,诸如在两个重链的每一个上的不同区域。备选地或者另外地,在一些实施方案中,涉及包含多个异源性肽和 / 或多肽的多肽(“异源性”意思是指它们不是衍生自同一多肽)。例如,蛋白质类化合物或者分子可包括不形成抗体的、具有蛋白质结合区的修饰的 Fc 结构域。在一些实施方案中,涉及包含结合细胞表面受体的、带有蛋白质结合区的修饰 Fc 结构域的多肽。包含多个功能结构域的这些蛋白质类分子可以是两个或者更多个结构域彼此化学缀合,或者其可以由一个核酸分子编码的两个或更多个多肽的融合蛋白。考虑了蛋白质或多肽可包括两个或者更多个异源多肽的全部或部分。

[0124] 因此,多个多肽的蛋白质类化合物可以由全部或部分的第一多肽和全部或部分的第二多肽、第三多肽、第四多肽、第五多肽、第六多肽、第七多肽、第八多肽、第九多肽、第十多肽或者更多个多肽组成。

[0125] 具有抗原结合结构域的多肽或蛋白质(包括抗体)或者抗体区域和非糖基化 Fc 结构域可以针对任何抗原或表位使用,所述抗原或表位包括但不限于属于下列靶标的蛋白质、亚基、结构域、模体和 / 或表位:17-1A、4-1BB、4Dc、6-酮-PGF1 α 、8-异-PGF2 α 、8-氧代-dG、A1 腺苷受体、A33、ACE、ACE-2、激活蛋白、激活蛋白 A、激活蛋白 AB、激活蛋白 B、激活蛋白 C、激活蛋白 RIA、激活蛋白 RIA ALK-2、激活蛋白 RIB ALK-4、激活蛋白 RIIA、激活蛋白 RIIB、ADAM、ADAM10、ADAM12、ADAM15、ADAM17/TACE、ADAM8、ADAM9、ADAMTS、ADAMTS4、ADAMTS5、地址素、aFGF、ALCAM、ALK、ALK-1、ALK-7、 α -1-抗胰蛋白酶、 α -V/ β -1 拮抗剂、ANG、Ang、APAF-1、APE、APJ、APP、APRIL、AR、ARC、ART、Artemin、anti-Id、ASPARTIC、心房利尿钠因子、av/b3 整联蛋白、Ax1、b2M、B7-1、B7-2、B7-H、B-淋巴细胞刺激因子(B1yS)、BACE、BACE-1、Bad、BAFF、BAFF-R、Bag-1、BAK、Bax、BCA-1、BCAM、Bcl、BCMA、BDNF、b-ECGF、bFGF、

BID、Bik、BIM、BLC、BL-CAM、BLK、BMP、BMP-2BMP-2a、BMP-3 成骨素、BMP-4BMP-2b、BMP-5、BMP-6Vgr-1、BMP-7 (OP-1)、BMP-8 (BMP-8a、OP-2)、BMPR、BMPR-IA (ALK-3)、BMPR-IB (ALK-6)、BRK-2、RPK-1、BMPR-II (BRK-3)、BMPs、b-NGF、BOK、铃蟾肽、骨衍生的神经营养因子、BPDE、BPDE-DNA、BTC、补体因子 3 (C3)、C3a、C4、C5、C5a、C10、CA125、CAD-8、降钙素、cAMP、癌胚抗原 (CEA)、癌相关抗原、组织蛋白酶 A、组织蛋白酶 B、组织蛋白酶 C/DPPI、组织蛋白酶 D、组织蛋白酶 E、组织蛋白酶 H、组织蛋白酶 L、组织蛋白酶 O、组织蛋白酶 S、组织蛋白酶 V、组织蛋白酶 X/ZIP、CBL、CCI、CCK2、CCL、CCL1、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL2、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27、CCL28、CCL3、CCL4、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9/10、CCR、CCR1、CCR10、CCR10、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CD1、CD2、CD3、CD3E、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8、CD10、CD11a、CD11b、CD11c、CD13、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD27L、CD28、CD29、CD30、CD30L、CD32、CD33 (p67 蛋白)、CD34、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD49a、CD52、CD54、CD55、CD56、CD61、CD64、CD66e、CD74、CD80 (B7-1)、CD89、CD95、CD123、CD137、CD138、CD140a、CD146、CD147、CD148、CD152、CD164、CEACAM5、CFTR、cGMP、CINC、肉毒梭菌毒素、产气荚膜梭菌毒素、CKb8-1、CLC、CMV、CMV UL、CNTF、CNTN-1、COX、C-Ret、CRG-2、CT-1、CTACK、CTGF、CTLA-4、CX3CL1、CX3CR1、CXCL、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、CXCR、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、细胞角蛋白肿瘤相关抗原、DAN、DCC、DcR3、DC-SIGN、衰变加速因子、des (1-3)-IGF-I (脑 IGF-1)、Dhh、地高辛、DNAM-1、DNA 酶、Dpp、DPPIV/CD26、Dtk、ECAD、EDA、EDA-A1、EDA-A2、EDAR、EGF、EGFR (ErbB-1)、EMA、EMMPRIN、ENA、内皮缩血管肽受体、脑啡肽酶、eNOS、Eot、嗜酸性粒细胞趋化因子 1、EpCAM、肝配蛋白 B2/EphB4、EPO、ERCC、E-选择素、ET-1、因子 IIa、因子 VII、因子 VIIIc、因子 IX、成纤维细胞活化蛋白 (FAP)、Fas、FcR1、FEN-1、铁蛋白、FGF、FGF-19、FGF-2、FGF3、FGF-8、FGFR、FGFR-3、血纤蛋白、FL、FLIP、Flt-3、Flt-4、促卵泡激素、Fractalkine、FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、FZD10、G250、Gas 6、GCP-2、GCSF、GD2、GD3、GDF、GDF-1、GDF-3 (Vgr-2)、GDF-5 (BMP-14、CDMP-1)、GDF-6 (BMP-13、CDMP-2)、GDF-7 (BMP-12、CDMP-3)、GDF-8 (Myostatin)、GDF-9、GDF-15 (MIC-1)、GDNF、GDNF、GFAP、GFRa-1、GFR- α 1、GFR- α 2、GFR- α 3、GITR、胰高血糖素、Glut 4、糖蛋白 IIb/IIIa (GP IIb/IIIa)、GM-CSF、gp130、gp72、GRO、生长激素释放因子、Hapten (NP-cap or NIP-cap)、HB-EGF、HCC、HCMVgB 包膜糖蛋白、HCMV gH 包膜糖蛋白、HCMV UL、造血生长因子 (HGF)、Hep B gp120、类肝素酶、Her2、Her2/neu (ErbB-2)、Her3 (ErbB-3)、Her4 (ErbB-4)、单纯疱疹病毒 (HSV) gB 糖蛋白、HSV gD 糖蛋白、HGFA、高分子量黑素瘤相关抗原 (HMW-MM)、HIV gp120、HIV IIIB gp120 V3 环、HLA、HLA-DR、HM1.24、HMFG PEM、HRG、Hrk、人心脏肌球蛋白、人巨细胞病毒 (HCMV)、人生长激素 (HGH)、HVEM、I-309、IAP、ICAM、ICAM-1、ICAM-3、ICE、ICOS、IFNg、Ig、IgA 受体、IgE、IGF、IGF 结合蛋白、IGF-1R、IGFBP、IGF-I、IGF-II、IL、IL-1、IL-1R、IL-2、IL-2R、IL-4、IL-4R、IL-5、IL-5R、IL-6、IL-6R、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-18R、IL-23、干扰素 (INF)- α 、INF- β 、INF- γ 、抑制素、iNOS、胰岛素 A-链、胰岛素 B-链、胰岛素样生长因子 1、整联蛋白 α 2、整联蛋白 α 3、整联蛋白 α 4、整联蛋白 α 4/ β 1、整联蛋白 α 4/ β 7、整联蛋白 α 5 (α V)、整联蛋白 α 5/ β 1、整联蛋白 α 5/ β 3、整联蛋

白 α 6、整联蛋白 β 1、整联蛋白 β 2、干扰素 γ 、IP-10、I-TAC、JE、激肽释放酶 2、激肽释放酶 5、激肽释放酶 6、激肽释放酶 11、激肽释放酶 12、激肽释放酶 14、激肽释放酶 15、激肽释放酶 L1、激肽释放酶 L2、激肽释放酶 L3、激肽释放酶 L4、KC、KDR、角质形成细胞生长因子 (KGF)、层粘连蛋白 5、LAMP、LAP、LAP (TGF-1)、Latent TGF-1、Latent TGF-1 bp1、LBP、LDGF、LECT2、Lefty、Lewis-Y 抗原、Lewis-Y 相关抗原、LFA-1、LFA-3、Lfo、LIF、LIGHT、脂蛋白、LIX、LKN、Lptn、L- 选择素、LT-a、LT-b、LTB4、LTBP-1、肺表面活性物质、黄体生成素、淋巴毒素 β 受体、Mac-1、MAdCAM、MAG、MAP2、MARC、MCAM、MCAM、MCK-2、MCP、M-CSF、MDC、Mer、METALLOPROTEASES、MGDF 受体、MGMT、MHC (HLA-DR)、MIF、MIG、MIP、MIP-1- α 、MK、MMAC1、MMP、MMP-1、MMP-10、MMP-11、MMP-12、MMP-13、MMP-14、MMP-15、MMP-2、MMP-24、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9、MPIF、Mpo、MSK、MSP、黏蛋白 (Muc1)、MUC18、苗勒抑制物质、Mug、MuSK、NAIP、NAP、NCAD、N- 钙黏着蛋白、NCA 90、NCAM、NCAM、中性溶酶、神经营养蛋白 -3、-4 或 -6、Neurturin、神经生长因子 (NGF)、NGFR、NGF- β 、nNOS、NO、NOS、Npn、NRG-3、NT、NTN、OB、OGG1、OPG、OPN、OSM、OX40L、OX40R、p150、p95、PADPr、甲状旁腺激素、PARC、PARP、PBR、PBSF、PCAD、P- 钙黏着蛋白、PCNA、PDGF、PDGF、PDK-1、PECAM、PEM、PF4、PGE、PGF、PGI2、PGJ2、PIN、PLA2、胎盘 1 碱性磷酸酶 (PLAP)、PIGF、PLP、PP14、胰岛素原、Prorelaxin、蛋白质 C、PS、PSA、PSCA、前列腺特异膜抗原 (PSMA)、PTEN、PTHrp、Ptk、PTN、R51、RANK、RANKL、RANTES、RANTES、松弛素 A- 链、松弛素 B- 链、肾素、呼吸道合胞病毒 (RSV)F、RSV Fgp、Ret、风湿样因子、RLIP76、RPA2、RSK、S100、SCF/KL、SDF-1、丝氨酸、血清白蛋白、sFRP-3、Shh、SIGIRR、SK-1、SLAM、SLPI、SMAC、SMDF、SMOH、SOD、SPARC、Stat、STEAP、STEAP-II、TACE、TACI、TAG-72 (中瘤相关糖蛋白 -72)、TARC、TCA-3、T- 细胞受体 (例如 T- 细胞受体 α / β)、TdT、TECK、TEM1、TEM5、TEM7、TEM8、TERT、睾丸 PLAP 样碱性磷酸酶、TfR、TGF、TGF- α 、TGF- β 、TGF- β Pan 特异性的、TGF- β RI (ALK-5)、TGF- β RII、TGF- β RIIb、TGF- β RIII、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4、TGF- β 5、凝血酶、胸腺 Ck-1、甲状腺刺激激素、Tie、TIMP、TIQ、组织因子、TMEFF2、Tmpo、TMPRSS2、TNF、TNF- α 、TNF- α β 、TNF- β 2、TNFc、TNF-RI、TNF-RII、TNFRSF10A (TRAIL R1 Apo-2、DR4)、TNFRSF10B (TRAIL R2 DR5、KILLER、TRICK-2A、TRICK-B)、TNFRSF10C (TRAIL R3 DcR1、LIT、TRID)、TNFRSF10D (TRAIL R4 DcR2、TRUND)、TNFRSF11A (RANK ODF R、TRANCE R)、TNFRSF11B (OPG OCIF、TR1)、TNFRSF12 (TWEAK R FN14)、TNFRSF13B (TACI)、TNFRSF13C (BAFF R)、TNFRSF14 (HVEM ATAR、HveA、LIGHT R、TR2)、TNFRSF16 (NGFR p75NTR)、TNFRSF17 (BCMA)、TNFRSF18 (GITR AITR)、TNFRSF19 (TROY TAJ、TRADE)、TNFRSF19L (RELT)、TNFRSF1A (TNF RI CD120a、p55-60)、TNFRSF1B (TNF RII CD120b、p75-80)、TNFRSF26 (TNFRH3)、TNFRSF3 (LTbR TNF RIII、TNFC R)、TNFRSF4 (OX40 ACT35、TXGP1 R)、TNFRSF5 (CD40 p50)、TNFRSF6 (Fas Apo-1、APT1、CD95)、TNFRSF6B (DcR3 M68、TR6)、TNFRSF7 (CD27)、TNFRSF8 (CD30)、TNFRSF9 (4-1BB CD137、ILA)、TNFRSF21 (DR6)、TNFRSF22 (DcTRAIL R2 TNFRH2)、TNFRST23 (DcTRAIL R1 TNFRH1)、TNFRSF25 (DR3Apo-3、LARD、TR-3、TRAMP、WSL-1)、TNFSF10 (TRAIL Apo-2 配体、TL2)、TNFSF11 (TRANCE/RANK 配体 ODF、OPG 配体)、TNFSF12 (TWEAK Apo-3 配体、DR3 配体)、TNFSF13 (APRIL TALL2)、TNFSF13B (BAFF BLYS、TALL1、THANK、TNFSF20)、TNFSF14 (LIGHT HVEM 配体、LTg)、TNFSF15 (TL1A/VEGI)、TNFSF18 (GITR 配体 AITR 配体、TL6)、TNFSF1A (TNF-aConectin、DIF、TNFSF2)、TNFSF1B (TNF-b LTa、TNFSF1)、TNFSF3 (LTb TNFC、p33)、TNFSF4 (OX40 配体 gp34、

TXGP1)、TNFSF5(CD40 配体 CD154、gp39、HIGM1、IMD3、TRAP)、TNFSF6(Fas 配体 Apo-1 配体、APT1 配体)、TNFSF7(CD27 配体 CD70)、TNFSF8(CD30 配体 CD153)、TNFSF9(4-1BB 配体 CD137 配体)、TP-1、t-PA、Tpo、TRAIL、TRAIL R、TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRANCE、转移受体、TRF、Trk、TROP-2、TSG、TSLP、肿瘤相关抗原 CA 125、表达肿瘤相关抗原的 Lewis Y 相关碳水化合物、TWEAK、TXB2、Ung、uPAR、uPAR-1、Uro 激酶、VCAM、VCAM-1、VECAD、VE-钙黏着蛋白、VE-钙黏着蛋白-2、VEGFR-1(flt-1)、VEGF、VEGFR、VEGFR-3(fit-4)、VEG1、VIM、病毒抗原、VLA、VLA-1、VLA-4、VNR 整联蛋白、von Willebrands 因子、WIF-1、WNT1、WNT2、WNT2B/13、WNT3、WNT3A、WNT4、WNT5A、WNT5B、WNT6、WNT7A、WNT7B、WNT8A、WNT8B、WNT9A、WNT9A、WNT9B、WNT10A、WNT10B、WNT11、WNT16、XCL1、XCL2、XCR1、XCR1、XEDAR、XIAP、XPD、和激素和生长因子的受体。在一些实施方案中,多肽或者蛋白质具有对一种或者更多种细胞表面肿瘤抗原特异性的抗原结合结构域。可以使用方法和组合物靶向肿瘤细胞以便引发 ADCC。

[0126] Fc 结构域可以结合 FcR,然而,考虑了 ADCC 不但可以通过包含 Fc 结构域多肽上的抗原结合结构域控制,而且还可以通过其它一些蛋白质结构域控制。因此,实施方案涉及 Fc 结构域和异源的非抗原结合结构域。在某些实施方案中,非抗原结合结构域结合至细胞表面。因此,这些试剂需要与能够结合至特异靶细胞的试剂 / 蛋白质进行化学缀合或者融合。实施方案还包括将全部或部分的非糖基化 Fc 结构域与全部或部分的表 2 中所列任何蛋白质邻接。考虑了实施方案包括,但不限于,在表 2 和本说明书中提供的实例。

[0127] 表 2

[0128]

蛋白质属	亚属	种	亚种
1) 抗体	多克隆的		
	单克隆的	非重组的	
		重组的	
			嵌合
			单链
			双抗体
			多亚基
2) 对于细胞表面受体的配体			IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19
	细胞因子/生长因子		
		对于受体酪氨酸激酶的细胞因子/生长因子	
			GM-CSF, G-CSF, M-CSF, EGF, VEGF, FGF, PDGF, HGF, GDNF, Trk, AXL, LTK, TIE, ROR, DDR, KLG, RYK, MuSK 配体
3) 对于细胞表面分子的非抗体结合蛋白			
	细胞表面蛋白的粘合剂		
		分化群 (CD)分子	

[0129] 可以使用受体的配体去靶向在其表面上表达配体的受体的细胞。配体还包括例如 CD95 配体、TRAIL、TNF (诸如 TNF- α 或者 TNF- β)、生长因子,包括上面讨论的那些,诸如 VEGF 和细胞因子,诸如干扰素或者白细胞介素及其变体。

[0130] 还考虑了具有多个结构域的实施方式,诸如包含 VEGF 受体 1 (Flt-1) 的第二细胞外结构域与 VEGF 受体 2 (KDR/Flk-1) 的第三个结构域和 IgG Fc 区的 VEGF Trap 融合蛋白。

[0131] 1. 融合物和缀合蛋白

[0132] 特定类型的插入变体是融合蛋白质。该分子通常具有在 N 末端或者 C 末端连接至全部或部分的第二多肽的全部或者相当大部分的天然分子。

[0133] 实施方式还涉及连接至至少一种试剂以形成修饰的蛋白质或者多肽的缀合多肽,诸如翻译的蛋白质、多肽和肽。为了提高分子作为诊断或者治疗剂的有效性,其常规的连接至或者共价结合至或者复合至少一种所希望的分子或者部分。此种分子或者部分可以是,但不限于,至少一种效应器或者报告子分子。效应器分子包含具有所希望活性,例如细胞毒性活性的分子。连接至抗体的效应器分子的非限定性实例包括毒素、抗肿瘤剂、治疗酶、放射性标记的核苷酸、抗病毒剂、螯合剂、细胞因子、生长因子、和寡核苷酸或多核苷酸。与之

相比,报告子分子定义为可以使用测定法检测的任何部分。缀合至抗体的报告子分子的非限定性实例包括酶、放射性标记、半抗原、荧光标记、荧光分子、化学发光分子、生色团、发光分子、光亲和性分子、色粒或配体,诸如生物素。

[0134] 具有足够选择性、特异性或者亲和性的任何抗体可以用作抗体缀合物的基础。此类特性可以使用本领域技术人员已知的常规免疫学筛选方法学进行评价。抗体分子中结合生物学活性分子的位点除了标准的抗原结合位点之外,还包括位于可变结构域内的可结合病原体、B 细胞超抗原、T 细胞共受体 CD4 和 HIV-1 包膜的位点 (Sasso 等,1989 ;Shorki 等,1991 ;Silvermann 等,1995 ;Cleary 等,1994 ;Lenert 等,1990 ;Berberian 等,1993 ;Kreier 等,1991)。此外,可变结构域参与抗体自身结合 (Kang 等,1988),并且包含被抗抗体识别的表位 (独特型) (Kohler 等,1989)。

[0135] 抗体缀合物的某些实例是其中抗体连接至可检测标记的那些缀合物。“可检测标记”是由于它们的特异性功能特性、和 / 或化学特性而可以被检测的化合物和 / 或元素,对它们的使用使得可以检测与它们连接的抗体,和 / 或如果需要可以进一步定量。另一个此类实例是包含连接至细胞毒性剂或者抗细胞剂的抗体的缀合物的形成,并且可以称作“免疫毒素”。

[0136] 氨基酸,例如可选择性切割的连接体、合成的连接体或者其它氨基酸序列可以用于分离蛋白质类部分。

[0137] C. 蛋白质纯化

[0138] 虽然一些实施方案涉及重组蛋白,但是实施方案可以涉及用于纯化蛋白质,包括修饰蛋白质和重组蛋白的方法和过程。通常,这些技术在一个水平上包括将细胞环境粗分级分离成多肽和非多肽部分。将多肽与其他蛋白质分离之后,可以使用色谱和电泳技术将目的多肽进一步纯化以达到部分或者完全的纯化 (或者纯化至同质性)。特别适宜于制备的分析方法是离子交换层析、排阻层析;聚丙烯酰胺凝胶电泳;等电聚焦。纯化肽的特别有效的方法是快速蛋白质液相层析或者甚至 HPLC。此外,开展此类技术的条件会影响所纯化分子的特性,诸如功能活性。

[0139] 某些方面涉及所编码蛋白质或肽的纯化,并且在特定的实施方案中,涉及所编码蛋白质或肽的基本纯化。术语“纯化的蛋白质或肽”如本文所使用,旨在指可从其它成分分离的成分,其中蛋白质或肽被纯化至相对于其天然可得到的状态的任何程度。因此,纯化的蛋白质或肽还指与其天然所存在环境分离的蛋白质或肽。“基本上纯化的”蛋白质或肽。

[0140] 通常,“纯化的”指已经进行分级分离以去除多种其他成分的蛋白质或肽,并且蛋白质或肽成分基本上保留了其所表达的生物学活性。当使用术语“基本上纯化的”,该术语将指其中蛋白质或肽形成组合物主要成分的组合物,例如构成组合物中蛋白质的约 50%、约 60%、约 70%、约 80%、约 90%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99%、约 99.2%、约 99.4%、约 99.6%、约 99.8%、约 99.9% 或更高。

[0141] 依据本公开,定量蛋白质或肽纯化程度的多种方法是本领域技术人员已知的。这些方法包括例如检测活性级分的特异性活性,或者通过 SDA/PAGE 分子评价级分内多肽的量。评价级分纯度的优选方法是计算级分的特异性活性,将其与最初提取物的特异性活性比较,并且因此计算纯化程度,在本文中评价为“纯化倍数”。当然,用于表示活性数量的实际单位将依赖于所选择的纯化后的特定测定技术以及所表达的蛋白质或肽是否表现出可

检测的活性。

[0142] 适用于蛋白质纯化的多种技术将是本领域技术人员众所周知的。这些技术包括例如适用硫酸铵、PEG、抗体等的沉淀或者通过加热变性,然后离心;层析步骤,诸如离子交换、凝胶过滤、反相、羟磷灰石和亲和层析;等电聚焦;凝胶电泳;以及此类技术和其他技术的组合。如本领域通常已知,据信开展多种纯化步骤的顺序可以改变,或者某些步骤可以省略,并且仍然为制备基本上纯化的蛋白质或肽的适宜方法。

[0143] 一般不需要蛋白质或肽总是以最纯化状态提供。实际上,在某些实施方案中考虑了纯化程度差的产品将具有实用性。可以通过使用较少的纯化步骤组合,或者通过使用同一大体纯化方案的不同形式实现部分纯化。例如,将会理解使用 HPLC 仪器开展的阳离子交换柱层析通常比使用低压力层析系统产生更大“倍数”的纯化。表现出较低程度相对纯化的方法将在蛋白质产物的总回收率或者保留所表达蛋白质的活性方面具有优势。

[0144] 已知随着 SDS/PAGE 条件的不同多肽的迁移会改变,有事明显改变 (Capaldi 等, 1977)。因此将会理解在不同的电泳条件下,纯化的或者部分纯化的表达产物的表观分子量将不同。

[0145] 还考虑与方法和组合物相组合使用肽标签。标签利用了两个多肽之间的相互作用。参与相互作用的一个多肽的一部分可以用作标签。例如,谷胱甘肽 S 转移酶 (GST) 结合区可以用作标签,以致于可以使用谷胱甘肽珠富级包含 GST 标签的化合物。可以使用被抗体或者 T 细胞受体识别的氨基酸区的表位标签。标签可以由有效连接至编码修饰蛋白质的核酸片段的核酸片段编码,以致于由核酸分子编码融合蛋白。其它适宜的融合蛋白是使用 β -半乳糖苷酶、遍在蛋白、六聚组氨酸 (6×His) 等的那些。

[0146] IV. 抗体 Fc 文库

[0147] 将与实施方案联合使用用于产生多种多样抗体 Fc 结构域和 / 或包含此类结构域的抗体的技术实例,将采用与美国专利 5,824,520 中所述的用于表达免疫球蛋白重链文库的那些技术相似的技术。先前采用的 Fc 文库在 WO 2008/137475 中讨论,其明确地通过参考并入本文。

[0148] V. 筛选抗体 Fc 结构域

[0149] 实施方案涉及用于鉴定能够结合特定 FcR 的分子的方法。它们在本文中以及在 PCT 申请 WO 2008/137475 中描述,其全文明确地通过参考并入本文。筛选的结合多肽将包含多种候选 Fc 结构域的大文库,或者备选地,可以包含经肉眼针对认为使 Fc 结构域更有可能结合靶配体的结构属性选择的特定种类的 Fc 结构域 (例如工程改造的点突变年或者氨基酸插入)。在一个实施方案中,候选结合蛋白是完整的抗体,或者包含 Fc 结构域的其片段或部分。

[0150] 为了鉴定能够结合靶配体的候选 Fc 结构域,可以开展如下步骤:提供表达不同抗体 Fc 结构域的一群革兰氏阴性细菌细胞;将细菌或者噬菌体与能够接触抗体的至少第一标记的或者固定化的靶配体 (FcR 多肽) 混合,和鉴定表达能够结合靶配体的分子的至少第一细菌。

[0151] 在上述方法的一些方面中,抗体 Fc 结构域与标记的 FcR 多肽之间的结合将阻止抗体 Fc 结构域扩散出细菌细胞。在该种方式,标记配体的分子可保留在包含透化外膜的细菌周质中。备选地,可以去除周质,由于显示 Fc 结构域与内膜结合,由此 Fc 结构域将导致结

合的候选分子滞留。然后,标记可用于分离表达能够结合 FcR 多肽的结合多肽的细胞,并且以这种方式,分离编码 Fc 结构域多肽的基因。然后使用体内或间接体内表达方法大量产生能结合靶配体的分子,然后用于任何希望的应用,例如,用于诊断或者治疗应用。此外,应当理解,所鉴定的分离的抗体 Fc 结构域可以用于构建包含抗原结合结构域的抗体片段或者全长抗体。

[0152] 在更多的实施方案中,用于产生本发明细菌的方法可包括至少两轮选择(步骤 c),其中将在第一轮选择中得到的细菌细胞的亚群进行基于候选抗体 Fc 结构域与 FcR 结合的至少第二轮选择。此外,在一些方面中,在第一轮选择中得到的细菌细胞亚群可以在第二轮选择之前在许可条件下生长(以扩大细胞总数)。因此,在一些方面中,方法可包括 2、3、4、5、6、7、8、9、10 或者更多轮选择。此外,在一些方面中,从每一轮选择得到的细菌细胞亚群将在随后一轮选择之前在许可条件下生长。在一轮或者更多轮选择之后分离的细胞可进行额外几轮的诱变。在一些情况中,可在去除未与抗体结合的 FcR 多肽之后开展选择。此外,在一些情况中,可以通过调节包含展示抗体的细菌的溶液的 pH、盐浓度或者温度修改选择的严格性。因此,在一些方面中,优选本发明细菌细胞在诸如约 25°C 的亚生理温度下生长。

[0153] 在仍进一步的方面中,产生根据本发明的细菌细胞的方法可以进一步地定义为产生编码结合至少第一 FcR 的 Fc 结构域的核酸序列的方法。因此,通过本文方法产生的细菌细胞可以用于克隆编码对 FcR 多肽具有特异亲和性的 Fc 结构域的核酸序列。通过例如 PCR 从细胞分离和扩增此类核酸的方法是本领域众所周知的并且在下面进一步描述。因此,通过上述方法产生的核酸序列作为本发明的一部分。此外,此种序列可以在细胞中表达以产生对 FcR 具有特异性亲和性的 Fc 结构域。因此,在一些方面中,本发明提供用于产生对 FcR 具有特异亲和性的 Fc 结构域的方法。此外,本发明包括通过本发明方法产生的抗体 Fc 结构域。然而,应当理解,通过此种筛选产生的抗体 Fc 结构域可以与对特定靶配体具有亲和性的抗体可变区组合,并且这些抗体也作为本发明的一部分。

[0154] A. Fc 结构域编码序列的克隆

[0155] 抗体 Fc 或其他结合蛋白的结合亲和性可以通过例如 Munson 和 Pollard(1980) 的 Scatchard 分析确定。备选地,结合亲和性可以通过表面等离子共振或者用于确定蛋白质:蛋白质相互作用动力学和平衡常数的其他任何已知方法确定。在鉴定出产生具有所希望特异性、亲和性和 / 或活性分子的细菌细胞之后,可以克隆相应的编码序列。以这种方式,可以使用常规方法(例如通过使用能够特异性结合编码抗体或者结合蛋白的基因的寡核苷酸探针)分离编码分子的 DNA 并测序。

[0156] 一旦分离抗体 Fc 结构域 DNA 之后,可将其置入表达载体中,然后将表达载体转染进入宿主细胞中,诸如细菌中。还可以通过例如加入人重链和轻链可变结构域的序列,或者通过将免疫球蛋白编码序列与非免疫球蛋白多肽编码序列的全部或部分共价连接,将 DNA 进行修饰。以这种方式,制备具有所希望结合特异性的“嵌合”或者“杂合”结合蛋白。例如,所鉴定的抗体 Fc 结构域可与治疗多肽或者毒素融合,并用于靶向表达特定 FcR 的细胞(体外或体内)。

[0157] 还可以使用合成蛋白质化学中的已知方法,包括涉及交联剂的那些方法,体外制备嵌合或者杂合 Fc 结构域。例如,可以使用二硫化物交换反应或者通过形成硫醚键构建靶向毒素。用于此目的的适宜试剂包括亚氨基硫醇盐和甲基 -4- 巯基丁酰亚氨酸酯。

[0158] 本领域的技术人员应当理解,可以从有活力的细胞或者无活力的细胞克隆核酸。在无活力细胞情况下,例如,希望使用例如 PCR 扩增克隆的 DNA。这还可以使用进一步生长或者不生长的活细胞开展。

[0159] B. 标记配体

[0160] 在一个实施方案中,分离对标记的 FcR 多肽具有亲和性的 Fc 结构域。根据本发明通过将革兰氏阴性细菌的周质膜透化处理和 / 或去除,可以筛选有可能任何大小的标记配体。在不去除周质膜的情况下,有代表性的优选的是标记的配体大小小于 50,000Da 以便允许配体有效扩散跨过细菌周质膜。

[0161] 如上面所标明,有代表性地是希望提供已经以一种或者更多种可检测试剂标记的 FcR 多肽。这可以通过例如将配体与至少一种可检测试剂连接形成缀合物实现。例如,常规情况是连接或者共价结合或者复合至少一种可检测分子或部分。“标记”或者“可检测标记”是由于它们的特异性功能特性、和 / 或化学特性而可以被检测的化合物和 / 或元素,对它们的使用使得可以检测与它们连接的配体,和 / 或如果需要可以进一步定量。可以使用的标记实例包括,但不限于酶、放射性标记、半抗原、荧光标记、荧光分子、化学发光分子、生色团、发光分子、光亲和性分子、色粒或配体,诸如生物素。

[0162] 在本发明的一个实施方案中,使用视觉上可检测的标志物,以致于可针对标记开展对细胞的自动筛选。具体而言,荧光标记是有益的,因为它们使得可以使用流式细胞术分离表达所希望结合蛋白或抗体的细胞。可使用合适仪器通过显色检测的试剂实例是本领域已知的,它们连接至希望配体的方法也如此(见例如美国专利 5,021,236 ;4,938,948 ;和 4,472,509,每一美国专利通过参考并入本文)。此类试剂可以包括顺磁离子;放射性同位素;荧光染料;NMR-可检测物质和用于 X-射线成像的物质。

[0163] 另一种类型的 FcR 缀合物是其中配体连接至当与生色底物接触时产生有颜色的产物的第二结合分子和 / 或酶(酶标签)。此类酶的实例包括尿素酶、碱性磷酸酶、(辣根)过氧化氢酶或葡萄糖氧化酶。在此类情况中,希望所选择的细胞仍然是有活力的。优选的第二结合配体是生物素和 / 或抗生物素蛋白和链亲和素化合物。此类标记的用途是本领域技术人员众所周知的并且描述于例如美国专利 3,817,837 ;3,850,752 ;3,939,350 ;3,996,345 ;4,277,437 ;4,275,149 和 4,366,241 中;每一美国专利通过参考并入本文。

[0164] 还可以使用包含叠氮基的分子通过由低强度紫外光产生的活性氮宾中间体而与蛋白质形成共价键(Potter 和 Haley,1983)。具体而言,嘌呤核苷酸的 2- 和 8- 叠氮基类似物已经用作位点定向光探针以鉴定粗细胞提取物中的结合核苷酸的蛋白质(Owens 和 Haley,1987 ;Atherton 等,1985)。2- 和 8- 叠氮基核苷酸还可以用作将纯化蛋白质的核苷酸结合结构域作图(Khatoon 等,1989 ;King 等,1989 ;以及 Dholakia 等,1989) 并且可以用作配体结合试剂。

[0165] 标记可以通过本领域技术人员众所周知的任何技术开展。例如,可以通过将配体与所希望的标记和化学氧化剂诸如次氯酸钠或者酶促氧化剂诸如乳过氧化物酶接触来标记 FcR 多肽。类似地,可以使用配体交换方法。备选地,可使用直接标记技术,例如通过将标记、还原剂诸如 SNCl_2 、缓冲溶液诸如邻苯二甲酸钠 - 钾溶液和配体孵育。还可以使用配体上的中间功能基,例如,在二乙三胺五乙酸(DTPA) 或者乙二胺四乙酸(EDTA) 存在下将标记连接至配体。

[0166] 用于将配体与其缀合物部分连接或者结合的其他方法在本领域中也是已知的。一些连接方法包括使用有机螯合剂,诸如二乙三胺五乙酸(DTPA);二乙二胺四乙酸(ethylenetriaminetetraacetic acid);N-氯对甲苯磺酰胺;和/或四氯-3 α -6 α -二苯基甘脲-3连接至配体(美国专利4,472,509和4,938,948,每一美国专利通过参考并入本文)。FcR多肽还可以在偶联剂诸如戊二醛或高碘酸盐存在下与酶反应。可以在这些偶联剂存在下或者通过与异硫氰酸酯反应制备具有荧光素标志物的缀合物。在美国专利4,938,948中,使用单克隆抗体实现乳腺肿瘤成像,并且使用交联剂诸如对羟基苯甲亚胺酸甲酯或者N-琥珀酰亚胺基-3-(4-羟基苯基)丙酸酯将可检测成像部分结合至抗体。在仍进一步的方面中,FcR多肽可以融合至报告蛋白质,诸如上面所述的酶或者荧光蛋白。

[0167] 以适宜的荧光配体特异性标记周质表达蛋白质的能力除了用于文库筛选之外,还有其他应用。用荧光配体进行特异性标记和流式细胞术可用于监测蛋白质生产过程中Fc结构域的产生。

[0168] 一旦分离出Fc结构域,希望将Fc结构域与至少一种试剂连接以形成缀合物增强该分子的效用。例如,为了提高Fc结构域或者抗体分子作为诊断或者治疗剂的有效性,常规情况下连接至或者共价结合至或者复合至至少一种所希望的分子或部分。此种分子或部分可以是,但不限于,至少一种效应器分子或者报告子分子。效应器分子包括具有所希望活性,例如细胞毒性活性的分子。可以与抗体连接的效应器分子的非限定性实例包括毒素、抗肿瘤试剂、治疗酶、放射性标记的核苷酸、抗病毒试剂、螯合剂、细胞因子、省长因子和寡核苷酸或多核苷酸。与之相比,报告子分子定义为可以使用测定法检测的任何部分。标记此种分子的技术是本领域技术人员已知的并且已经在上文描述。

[0169] 然后,标记的结合蛋白,诸如已经根据本发明制备的Fc结构域还可以用于例如用于结合、纯化、去除、定量和/或通常检测生物学成分,诸如一种或多种蛋白质、一种或多种多肽或者一种或多种肽的免疫检测方法中。一些免疫监测方法包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、免疫放射测定、荧光免疫测定、化学发光测定、生物发光测定和Western印迹,仅举此几种。多种有用的免疫检测方法的步骤已经在科学文献中描述,诸如例如Doolittle和Ben-Zeev,1999;Gulbis和Galand,1993;以及De Jager R等,1993,每一文献通过参考并入本文。此类技术包括结合测定,诸如本领域中已知的多种类型的酶联免疫吸附测定(ELISA)和/或放射免疫测定(RIA)。

[0170] 可以与制备的新鲜冷冻的和/或福尔马林固定的、石蜡包埋的组织块相联合使用Fc结构域分子,包括抗体,用于免疫组织化学(IHC)研究。从这些特定样本制备组织块的方法已经成功地用于先前对多种预后因子的IHC研究中,和/或是本领域技术人员众所周知的(Abbondanzo等,1990)。

[0171] VI. 使用流式细胞术的自动化筛选

[0172] 在本发明的一个实施方案中,荧光激活细胞分选(FACS)筛选技术或者其它自动化流式细胞计数技术可用于有效分离包含结合Fc结构域的标记配体的细菌细胞。开展流式细胞术的仪器是本领域技术人员已知的并且对公众而言是商业上可以得到的。此类仪器的实例包括来自Becton Dickinson(Foster City,加利福尼亚)的FACS Star Plus、FACScan和FACSort仪器、来自Coulter Epics Division(Hialeah, Fla.)的Epics C和来自Cytomation(Colorado Springs, Co)的MOFLO™。

[0173] 流式细胞术技术通常涉及分离液体样品中的细胞或者其它颗粒物。有代表性地,流式细胞术的目的是分析所分离颗粒的一种或者更多种特性,例如,标记配体或者其它分子的存在。流式细胞术的基础步骤包括指导流动样品经过仪器,以致于液体流经过传感区。颗粒将每次有一个经过传感器并且基于大小、折射、光散射、不透明性、粗糙度、形状荧光等分类。

[0174] 快速定量分析证明在生物医学研究和医学中是有用的。仪器允许以每秒数千个细胞的速度对细胞特性进行量化多参数分析。这些仪器提供了将细胞类型进行区分的能力。数据常常显示为所测量变量的一维(直方图)或者二维(轮廓图,散布图)频率分布。多参数数据文件的分区涉及连续使用交互的一维或二维图形学程序。

[0175] 用于快速细胞检测的多参数流式细胞计数数据的定量分析包括两个阶段:细胞种类表征和样品处理。通常,细胞种类表征过程将细胞特征划分为目的细胞与非目的细胞。因此,在样品加工中,每一细胞根据其所处区域而归类为两个类别之一。细胞种类分析是极其重要的,因为只有得到适当的细胞特性才能预期高的检测性能。

[0176] 流式细胞术不但能够分析细胞,而且还能分选细胞。在美国专利 3,826,364 中,公开了物理性分离颗粒,例如功能差异的细胞类型的仪器。在该仪器中,激光提供光照,通过适宜的镜头或者镜头系统将激光聚焦在颗粒流上,以致于从其中的颗粒产生高度集中的散射。此外,高强度源照明定向在颗粒流上,以将流中的颗粒激发出荧光。流中的某些颗粒可以选择性地带上电荷,然后通过将它们偏离进入指定容器而分离。该种分离的典型形式是通过荧光标记的抗体,其用于标记一种或者更多种细胞类型以便分离。

[0177] 流式细胞术方法的其它实例将包括,但不限于,美国专利号 4,284,412; 4,989,977; 4,498,766; 5,478,722; 4,857,451; 4,774,189; 4,767,206; 4,714,682; 5,160,974; 和 4,661,913 中描述的那些,每一公开明确地通过参考并入本文。

[0178] 对于本发明,流式细胞术的重要方面是连续开展多轮筛选。细胞可以从起始一轮分选分离,并且立即再次进入流式细胞仪中,并再次筛选以增加筛选的严格性。本领域技术人员已知的另一优势是使用流式细胞术可以回收非活力细胞。由于流式细胞术基本上是颗粒分选技术,细胞生长或者增殖的能力不是必需的。从此类非活力细胞回收核酸的技术在本领域中众所周知并且可以包括,例如,使用模板依赖性扩增技术,包括 PCR。

[0179] VII. 使用流式细胞术的自动筛选

[0180] 在本发明的某些实施方案中,基于核酸的表达系统可以用于表达重组蛋白。例如,本发明的一个实施方案涉及以抗体 Fc 结构域,或优选多个不同 Fc 结构域的编码序列转化革兰氏阴性细菌。

[0181] VIII. 基于核酸的表达系统

[0182] 在本发明的某些实施方案中,基于核酸的表达系统可以用于表达重组蛋白。例如,本发明的一个实施方案涉及以抗体 Fc 结构域,或优选多个不同 Fc 结构域的编码序列转化革兰氏阴性细菌。

[0183] A. 核酸递送方法

[0184] 本发明的某些方面可包括将核酸递送至靶细胞(例如革兰氏阴性细菌)。例如,细菌宿主细胞可以用编码能够潜在结合 FcR 的候选 Fc 结构域的核酸转化。在本发明的特定实施方案中,希望靶向表达至细菌的周质。真核宿主细胞的转化同样可以用于鉴定为能够

结合靶配体的多种候选分子的表达。

[0185] 用于递送核酸以转化细胞的适宜方法认为可以包括实际上可将核酸（例如 DNA）引入到此种细胞内或者甚至其细胞器内的任何方法。此类方法包括，但不限于，DNA 直接递送例如通过注射（美国专利 5,994,624,5,981,274,5,945,100,5,780,448,5,736,524,5,702,932,5,656,610,5,589,466 和 5,580,859,每一美国专利通过参考并入本文），包括微注射（Harland 和 Weintraub,1985；美国专利 5,789,215,通过参考并入本文）；通过电穿孔（美国专利 5,384,253,通过参考并入本文）；通过磷酸钙沉淀（Graham 和 Van Der Eb,1973；Chen 和 Okayama,1987；Rippe 等,1990）；通过使用 DEAE-葡聚糖然后通过聚乙二醇（Gopal,1985）；通过直接的声波加载（Fechheimer 等,1987）；通过脂质体介导的转染（Nicolau 和 Sene,1982；Fraley 等,1979；Nicolau 等,1987；Wong 等,1980；Kaneda 等,1989；Kato 等,1991）；通过微粒轰击（PCT 申请号 WO 94/09699 和 95/06128；美国专利 5,610,042；5,322,783；5,563,055；5,550,318；5,538,877 和 5,538,880,并且每一参考文献通过参考并入本文）；或者通过使用碳化硅纤维搅拌（Kaeppler 等,1990；美国专利 5,302,523 和 5,464,765,每一文献通过参考并入本文）；通过脱水 / 抑制介导 DNA 摄入（Potrykus 等,1985）。通过这些技术的应用，细胞可以稳定或者瞬时转化。

[0186] B. 载体

[0187] 载体可以在本发明中用于例如以编码候选 Fc 结构域的核酸序列转化革兰氏阴性细菌，人们希望筛选所述候选 Fc 结构域结合靶 FcR 的能力。在本发明的一个实施方案中，编码靶多肽的核酸序列的整个异质的“文库”可以引入到一群细菌中，由此可以筛选整个文库。术语“载体”用于向其中已插入核酸序列的运载核酸分子，用于引入到其可以复制的细胞中。核酸序列可以是“外源的”或者“异源的”，这意味着对于载体将引入其中的细胞而言是外来的，或者序列与细胞中的序列同源但是在宿主细胞核酸中的位置不是序列通常所存在的位置。载体包括质粒、粘粒和病毒（例如噬菌体）。本领域技术人员可通过标准重组技术构建载体，其描述于 Maniatis 等,1988 和 Ausubel 等,1994 中，该两篇文献通过参考并入本文。

[0188] 术语“表达载体”指包含编码能够被转录的至少部分基因产物的核酸序列的载体。在一些情况中，RNA 分子翻译成蛋白质、多肽或肽。表达载体可包含多种“控制序列”，控制序列指对于有效连接的编码序列在特定宿主生物体内的转录和可能的翻译所必需的核酸序列。除了控制转录和翻译的控制序列之外，载体和表达载体可包含还起着其它功能并在下面描述的核酸序列。

[0189] 1. 启动子和增强子

[0190] “启动子”是控制转录起始和转录速率的核酸序列区域的控制序列。其可包含遗传元件，在所述遗传元件处调节蛋白和分子可结合诸如 RNA 聚合物和其它转录因子。短语“有效放置的”、“有效连接的”“处于控制下”和“处于转录控制下”意思是指启动子相对于核酸序列处于正确的功能位置和 / 或方向以控制该序列的转录起始和 / 或表达。启动子可以与或不与“增强子”联合使用，增强子指参与核酸序列转录活化的顺式作用调节序列。

[0191] 启动子可以是与基因或者序列天然相关的启动子，其可以通过分离位于编码片段和 / 或外显子上游的 5' 非编码序列得到。此种启动子被称为“内源的”。类似地，增强子可以是与核酸序列天然相关的、位于该序列下游或上游的增强子。备选地，通过将编码核酸片

段置于重组或者异源启动子控制下获得某些优势,所述重组或异源启动子指正常情况下与天然环境中的核酸序列不相关的启动子。重组或异源增强子同样指正常情况下与天然环境中的核酸序列不相关的增强子。此类启动子或增强子可包括其它基因的启动子或增强子,和从任何其它原核细胞分离的启动子或增强子,和非“天然存在的”启动子或增强子,即包含不同转录调节区的不同元件和/或改变表达的突变。除了通过合成产生启动子和增强子的核酸序列之外,可以使用重组克隆和/或核酸扩增技术,包括 pCR™ 与本公开的组合物相结合产生序列(见美国专利 4,683,202,美国专利 5,928,906,每一美国专利通过参考并入本文)。

[0192] 自然地,重要的是采用有效指导 DNA 片段在选择用于表达的细胞类型中表达的启动子和/或增强子。可以在本发明中使用的此种启动子的一个实例是大肠杆菌阿拉伯糖或 T7 启动子。分子生物学领域技术人员普遍熟悉用于蛋白质表达的启动子、增强子和细胞类型组合的使用,例如,见 Sambrook 等.(1989),通过参考并入本文。采用的启动子可以是组成型的、组织特异的、可诱导的和/或在适宜条件下可用于指导所引入 DNA 片段高水平表达,这在重组蛋白和/或肽的大规模生产中具有优势。启动子可以是异源的或者内源的。

[0193] 2. 起始信号和内部核糖体结合位点

[0194] 对于编码序列的有效翻译还需要特异的起始信号。这些信号包括 ATG 起始信号或毗邻序列。可能需要提供外源翻译控制信号,包括 ATG 起始密码子。本领域普通技术人员能够容易地确定并提供必需的信号。众所周知,起始密码子必需与所希望编码序列的读码框为“框内的”以保证整个插入序列的翻译。外源翻译控制信号和起始密码子可以是天然的或者合成的。表达的有效性可以通过包含适当的转录增强元件增强。

[0195] 3. 多克隆位点

[0196] 载体可以包括多克隆位点(MCS),其是包含多个限制酶位点的核酸区,任何限制酶位点可以与标准重组技术相结合使用以消化载体(见 Carbonelli 等,1999,Levenson 等,1998,以及 Cocea,1997,通过参考并入本文)。“限制酶消化”指用仅在核酸分子内特定位置起作用的酶催化断裂核酸分子。这些限制酶当中许多是商业上可以得到的。本领域技术人员了解此类酶的使用。经常地,使用在 MCS 内切割的限制酶将载体线性化或者片段化以便使外源序列能够与载体连接。“连接”指在两个核酸片段之间形成磷酸二酯键的过程,其可以彼此连续或不连续。涉及限制酶和连接反应的技术是重组技术领域技术人员众所周知的。

[0197] 4. 终止信号

[0198] 根据本发明制备的载体或者构建体通常将包含至少一个终止信号。“终止信号”或者“终止子”由参与 RNA 转录物被 RNA 聚合酶特异性终止的 DNA 序列构成。因此,在某些实施方案中,考虑了停止 RNA 转录物产生的终止信号。终止子在体内是必需的以达到所希望的信使水平。

[0199] 考虑在本发明中使用的终止子包括本文所述的或者本领域普通技术人员已知的任何已知终止子,包括但不限于,例如, rhp 依赖性或者 rho 不依赖性终止子。在某些实施方案中,终止信号可能是缺乏可转录或者可翻译序列,例如由于序列截断。

[0200] 5. 复制起点

[0201] 为了在宿主细胞中扩增载体,载体可包含一个或更多个复制位点起点(常常称作

“ori”)，它是起始复制的特定核酸序列。

[0202] 6. 选择标记和筛选标记

[0203] 在本发明的某些实施方案中，可以通过在表达载体中包含标记来体外或体内鉴定包含本发明核酸构建体的细胞。此类标记将赋予细胞可辨别的改变，这使得可以容易地鉴定包含表达载体的细胞。通常，选择标记是赋予可以用于选择的特性的标记。阳性选择标记是其中标记的存在可以用于选择的标记，而阴性选择标记是其中标记的存在阻止选择的标记。阳性选择标记的实例是药物抗性标记。

[0204] 通常包含药物选择标记有助于克隆和鉴定转化体，例如，赋予抵抗新霉素、嘌呤霉素、潮霉素、DHFR、GPT、博莱霉素和组氨酸的基因是有用的选择标记。除了赋予允许基于条件的实现而辨别转化体的表型的标记之外，还考虑了标记，包括筛选标记的其它表型，例如其基础是比色分析的 GFP。备选地，可利用筛选酶，诸如氯霉素乙酰转移酶 (CAT)。本领域技术人员还已知可能与 FACS 分析相联合如何利用免疫学标记。认为所使用的标记不重要，只要其能够与编码基因产物的核酸同时表达即可。选择标记和筛选标记的更多的实例是本领域技术人员众所周知的。

[0205] C. 宿主细胞

[0206] 在表达异源核酸序列的情况中，“宿主细胞”指原核细胞，并且其包括能够复制载体和 / 或表达由载体编码的异源基因的任何可转化生物体。宿主细胞可以并且已经用作载体的接受者。宿主细胞可以被“转染”或者“转化”，转染或转化指通过该过程异源核酸被转移或者引入到宿主细胞内的过程。转化的细胞包括最初的受试者细胞及其后代。

[0207] 在本发明的特定实施方案中，宿主细胞是革兰氏阴性细菌细胞。这些细菌适宜在本发明中使用，因为它们在内膜和外膜之间具有周质空间，和特别是在周质和细胞质之间的上述内膜，其也被称作细胞质膜。照此，具有此种周质空间的任何其它细胞可以在本发明中使用。可以在本发明中使用的革兰氏阴性细菌的实例包括，但不限于，大肠杆菌、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、霍乱弧菌 (*Vibrio cholera*)、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、弗氏志贺菌 (*Shigella flexneri*)、流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenza*)、百日咳杆菌 (*Bordetella pertussi*)、梨火疫菌 (*Erwinia amylovora*)、根瘤菌属某种 (*Rhizobium sp.*)。革兰氏阴性细菌细胞还进一步定义为已经用融合多肽的编码序列转化的细菌细胞，所述融合多肽包含能够结合所选择配体的候选结合多肽。多肽锚定在细胞质膜的外侧面，面向周质空间，并且可包含抗体编码序列或者另一序列。表达多肽的一个方法是向多肽连接一个能引起此种指导表达的前导序列。

[0208] 众多的原核细胞系和培养物可用作宿主细胞，并且它们可以通过美国典型培养物保藏中心 (the American Type Culture Collection, ATCC) 得到，美国典型培养物保藏中心是起着活的培养物和遗传物质档案馆作用的机构 (www.atcc.org)。合适的宿主可以基于载体主链和所希望的结果由本领域技术人员确定。质粒或者粘粒，例如，可以进入到用于许多种载体复制的原核生物宿主细胞中。用作用于载体复制和 / 或表达的宿主细胞的细菌细胞包括 DH5 α 、JM109 和 KC8，以及许多商业上可以利用的细菌宿主，诸如 SURE[®] 感受态细胞和 Solopack[™] Gold 细胞 (Stratagene[®], La Jolla)。备选地，细菌细胞诸如大肠杆菌 LE392 可以用作噬菌体的宿主细胞。

[0209] 来自多种细胞类型和生物体的许多宿主细胞是可以得到的并且是本领域技术人

员已知的。类似地,病毒载体可以与原核宿主细胞,特别是允许载体复制或表达的原核宿主细胞结合使用。一些载体会采用允许其在原核细胞和真核细胞两者中复制和/或表达的控制序列。本领域技术人员将理解培养所有上述宿主细胞以维持它们并且允许载体复制的条件。还理解和已知的是允许大规模生产载体以及生产由载体编码的核酸以及它们的关联多肽、蛋白质或肽的技术和条件。

[0210] D. 表达系统

[0211] 存在众多的包含至少部分或者全部上述组成成分的表达系统。此类系统可以用于,例如,生产根据本发明鉴定的能够结合特定配体的多肽产物。基于原核生物的系统可以在本发明中使用以产生核酸序列,或者它们的关联多肽、蛋白质和肽。许多此类系统是商业性可得的且是处处可得的。表达系统的其它实例包括包含强的原核生物启动子诸如 T7、Tac、Trc、BAD、lambda pL、四环素或 Lac 启动子的载体、pET 表达系统和大肠杆菌表达系统。

[0212] E. 候选结合蛋白质和抗体

[0213] 在某些实施方案中,抗体 Fc 结构域在细胞质中或者在宿主细菌细胞的周质空间中表达。通过此类 Fc 结构域的异质群体表达,可以鉴定对靶配体 (FcR) 具有高亲和性的那些多肽。然后,所鉴定的 Fc 结构域可以用于多种诊断或者治疗应用中,如本文所述。

[0214] 如本文所使用,术语“Fc 结构域”旨在概括性地指任何免疫球蛋白的 Fc 区,诸如 IgG、IgM、IgA、IgD 或者 IgE Fc。制备和使用多种基于抗体的构建体和片段的技术在本领域中众所周知。制备和表征抗体的方法在本领域中也是众所周知的(见例如 *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; 通过参考并入本文)。

[0215] 一旦鉴定出对靶配体具有亲和性的抗体,可以根据需要使用过滤、离心和多种层析方法,诸如 HPLC 或亲和层析纯化 Fc 结构域。备选地, Fc 结构域或者多肽和肽更加普遍地使用自动肽合成仪合成。

[0216] IX. 实施例

[0217] 包括下列实施例以例证本发明的优选实施方案。本领域技术人员应当意识到,在下面实施例中公开的技术代表着本发明人公开的在实施本发明中良好工作的技术,并且因此可以认为构成了优选的实施方式。然而,根据本公开,本领域技术人员将意识到,可以在不脱离本发明精神和范围的情况下对所公开的特定实施方案进行诸多修改而仍得到相同或者类似的结果。

[0218] 实施例 1:用于工程改造 Fc5 的组合文库构建

[0219] 在本研究中使用的所有质粒和引物描述于表 3 和表 4 中。为了筛选表现出对 Fc γ RI 的结合亲和性比先前分离的 Fc 片段 (Fc5, 包含氨基酸替换 E328V/M428I) (图 1 和 2) 更高的 IgG1Fc 片段,通过易错 PCR 对 Fc5 基因进行随机诱变。使用模板 pPe1BFLAG-Fc5 和由 Integrated DNA Technologies (Coralville, IA) 合成的两条引物 (STJ#196 和 STJ#197) 开展标准的易错 PCR 方法 (Fromant 等, 1995)。将扩增的 PCR 片段连接入 SfiI 消化的 pPe1BFLAG 中。所得到的质粒转化进入大肠杆菌 Jude-1 (F' [Tn10(Tet^r) proAB⁺lacI^q Δ (lacZ)M15]mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC)80dlacZ Δ M15 Δ lacX74 deoR recA1 ara D139 Δ (ara leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG) 中 (Kawarasaki 等, 2003)。基于随机选择的 20 个文库克隆的序列,文库为 7×10^8 个个体转化体,其中每一基因的错误率为 0.264% (图 3)。

[0220] 实施例 2:原生质球和对 Fc5 亲和性成熟的高通量流式细胞术筛选

[0221] 将在含 2% (wt/vol) 葡萄糖并添加氯霉素 (50 μ g/ml) 的 Terrific 肉汤 (Becton Dickinson Diagnostic Systems Difco™, Sparks, MD) 中于 37°C 下以 250 转 / 分摇动过夜培养的文库细胞, 在包含 0.5M 海藻糖 (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ) 和氯霉素 (40 μ g/ml) 的新鲜 TB 培养基中以 1 : 50 稀释。在于 37°C 下以 250 转 / 分摇动 3 小时然后在 25°C 下冷却 20 分钟后, 使用 1mM 异丙基 -1- 硫代 - β -D- 吡喃型半乳糖苷 (IPTG) 诱导 Fc 片段表达。在于 25°C 下培养 5 小时后, 通过离心收获 4.5ml 的培养肉汤并且在 1ml 冷的 10mM Tris-HCl (pH 8.0) 中洗涤两次。在重悬于 1ml 冷的 STE 溶液 (0.5M 蔗糖, 10mM Tris-HCl, 10mM EDTA, pH8.0) 中后, 将细胞于 37°C 下摇动混合培养 30 分钟, 以 12,000 \times g 离心 1 分钟得到沉淀并且在 1ml 冷的溶液 A (0.5M 蔗糖, 20mM MgCl₂, 10mM MOPS, pH 6.8) 中洗涤沉淀。洗涤后的细胞在含 1mg/ml 鸡卵溶菌酶的 1ml 溶液 A 中于 37°C 培养 15 分钟。在以 12,000 \times g 离心 1 分钟后, 将所得到的原生质球沉淀重悬于 1ml 的冷 PBS 中。

[0222] 对于文库筛选, 使用 FITC 蛋白质标记试剂盒 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 以 FITC 标记重组糖基化 Fc γ RIa/CD64 细胞外结构域 (R&D Systems, Minneapolis, MN)。在标记反应之后, FITC 标记 Fc γ RI 对人 IgG Fc 的亲和性通过 ELISA 证实, 与 BSA 包被孔相比, 在 Fc 糖基化的人 IgG-Fc 包被孔中表现出高的荧光。原生质球以 30nM Fc γ RI-FITC 标记。在后续轮次的分选中, 使用降低浓度的 Fc γ RIa-FITC (对于第 2、3、4 轮分选分别为 10、3 和 1nM) 标记原生质球。通过配备有用于激发的 488nm 氩激光器的 MoFlo (Dako Cytomation, Fort Collins, CO) 分选超过 4 \times 10⁸ 个原生质球。在每一轮中, 由于 Fc γ RIa-FITC 结合而显示出最高荧光的顶端 3% 的群体, 通过最初分选之后即刻进行的分选和再分选而分离。

[0223] 通过使用 2 种特异性引物 (STJ#16 和 STJ#220) 的 PCR 扩增得到原生质球中的 Fc 基因, 使用 SfiI 限制酶位点连接入 pPe1BFLAG-Fc 中, 并且转化入电感受态大肠杆菌 Jude-1 细胞。在包含氯霉素的培养基中选择所得到的转化体然后生长, 如上制备原生质球用于下一轮的分选。随着分选轮次的进行高荧光克隆被富集 (图 4)。在第 5 轮分选之后, 分离了显示出比 Fc5 荧光更高的 19 个克隆 (图 5)。除了多余的突变之外, 所有的突变均位于三个不同的区域内, 包括与 Fc γ RIa 直接接触的上位 CH2 部分, 位于 CH2 和 CH3 结构域界面的连接体区, 和可有助于 Fc 片段构象改变以便结合 Fc γ RIa 的 CH3 区 (图 6)。最高荧光克隆是 Fc601, 它在 Fc5 (E382V/M428I) 中具有 2 个额外的突变 (K338R, G341V) (图 7 和 8)。

[0224] 实施例 3:表现出对 Fc γ RIa 结合的亲和性比 Fc5 更高的所选择克隆的序列

[0225] Fc5 (核酸序列 #2 和蛋白质序列 #2) 在野生型 IgG1-Fc 序列 (核酸序列 #1 和蛋白质序列 #1) 中具有 2 个突变 (E382V 和 M428I)。表现出对 Fc γ RIa 的亲和性比 Fc5 更高的工程改造的 Fc 突变体在 Fc5 的序列中具有替换突变。分离的 Fc 突变体 Fc601-Fc619 (蛋白质序列 #3 ~ #21) 载 Fc5 的序列中具有替换突变。分离的突变体总结于表 5 中。

[0226] 实施例 4:全长 IgG1-Fc601 的产生和纯化

[0227] 曲妥珠单抗 (赫赛汀™) 已经在临床上用于治疗过表达 HER2/neu (Erb2) 的乳腺转移癌 (Sergina 和 Moasser, 2007)。对于转移癌的清除, 曲妥珠单抗抗体识别 HER2/neu (Erb2) 并且与免疫细胞的表面 Fc γ R 相互作用产生抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC), 这对于治疗作用是基本的效应作用机制 (Lazar 等, 2006; Sergina 和 Moasser, 2007)。经工程改造对 Fc γ R 具有高亲和性的 Fc 片段基因整合入全长曲妥珠单抗抗体中。

为了构建 pSTJ4- 赫赛汀 IgG1, 通过使用全基因合成方法使用寡核苷酸引物重叠延伸 PCR 合成了大肠杆菌密码子优化 (Hoover 和 Lubkowski, 2002) 的人源化 4D5 (抗 p185HER2 抗体) V_L 和 V_H 结构域, 所述寡核苷酸引物分别为用于 V_L 的 12 种寡核苷酸引物, 包括 2 种外引物 (STJ#302 和 STJ#313) 和 10 种内引物 (STJ#303-312), 对于 V_H 的 14 种引物, 包括 2 种外引物 (STJ#314 和 STJ#327) 和 12 种内引物 (STJ#315-326)。对于 V_L 使用 NcoI/NotI 限制性内切核酸酶位点并且对于 V_H 使用 NheI/HindIII 限制性内切核酸酶位点将扩增的 V_L 和 V_H 连接入 pMAZ360-M18.1-Hum-IgG1 中产生 pSTJ4- 赫赛汀 IgG1。对于 pSTJ4- 赫赛汀 -Fc2a-IgG1 和 pSTJ4- 赫赛汀 -Fc5-IgG1, 使用引物 (STJ#290 和 STJ#291) 和模板 pPe1BFLAG-Fc5 或 pPe1BFLAG-Fc601 扩增 Fc5 和 Fc2a 突变体基因, 连接入使用 SalI/EcoRV 消化的 pSTJ4- 赫赛汀 IgG1 中。对于在大肠杆菌双顺反子质粒中制备型生产非糖基化曲妥珠单抗和曲妥珠单抗 -Fc5 和曲妥珠单抗 -Fc601, 构建了 pSTJ4- 赫赛汀 -IgG1、pSTJ4- 赫赛汀 -Fc5-IgG1 和 pSTJ4- 赫赛汀 -Fc601-IgG1。这些质粒处于具有与重链和轻链两者融合的 Pe1B 前导肽的双顺反子操纵子中 lac 启动子控制下 (图 9)。

[0228] 在将质粒转化进入大肠杆菌 BL21 (DE3) (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ) 中之后, 细胞在 LB 复合培养基中生长过夜, 然后在 R/2 培养基 (Jeong 和 Lee, 2003) 中培养过夜两次以便适应, R/2 培养基组成如下: 2g $(NH_4)_2HPO_4$ 、6.75g KH_2PO_4 、0.93g 柠檬酸 H_2O 、0.34g $MgSO_4$ 、20g 葡萄糖、0.05g 氨苄青霉素和 5ml 溶解在 2N HCl 中的痕量金属溶解 (每升 10g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、2.25g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 、1g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 、0.35g $MnSO_4 \cdot H_2O$ 、0.23g $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ 、1.5g $CaCl_2$ 和 0.1g $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$)。携带 pSTJ4- 赫赛汀 -IgG1、pSTJ4- 赫赛汀 -IgG1-Fc5 或者 pSTJ4- 赫赛汀 -IgG1-Fc601 的大肠杆菌 BL21 (DE3) 在含 120ml R/2 培养基的 500ml 带挡板烧瓶中于 30°C 下以 250 转 / 分培养 8 小时, 然后接种在含 1.2L R/2 培养基的 3.3L BioFlo 310 发酵罐中 (New Brunswick Scientific Co., Edison, NJ)。使用恒 pH 葡萄糖流加策略于 30°C 开展补料分批发酵。当需要时, 通过从 100 转 / 分至 1000 转 / 分的渐增搅拌速度, 从 1 至 3SLPM (每分钟标准流体) 的空气流速和从 0 至 1.5SLPM 的纯氧流速的自动级联控制, 将溶解氧 (DO) 浓度维持在 40% 的空气饱和度。最初 pH 调整至 6.8, 并且当降低至小于 6.75 时通过加入 30% (v/v) 氢氧化铵控制, 并且当增加至大于 6.9 时通过提供补料溶液 (700g/L 葡萄糖和 10g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 在诱导前) 和 (500g/L 葡萄糖、10g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 100g/L 酵母提取物; 在诱导后) 控制。当 OD₆₀₀ 达到 100 时, 培养温度降低至 25°C 并且 30 分钟后, 使用 1mM 异丙基 -1- 硫代 - β -D- 吡喃型半乳糖苷 (IPTG) 诱导蛋白质表达。在 7 小时后当 OD₆₀₀ 为 ~ 130-140 时收获培养肉汤。非糖基化四聚体 IgG 的产率为大约 40mg/L。

[0229] 通过 11,000×g 离心 30 分钟收获细胞并且悬浮于 1.2L 包含 100mM Tris、10mM EDTA (pH 7.4) 并添加有 4mg 溶菌酶 (每 g 干细胞重量) 和 1mM PMSF 的溶液中。通过将悬浮溶液于 30°C 下以 250 转 / 分摇动培养 16 小时释放周质蛋白。在 14,000×g 离心 30 分钟后, 上清液与聚乙烯亚胺 (MP Biomedical, Solon, OH) 混合至终浓度 0.2% (w/v), 再次以 14,000×g 离心 30 分钟, 并且经 0.2 μ m 滤膜过滤。澄清的滤液与在 20mM 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0) 中预平衡的固定化蛋白 A 琼脂糖树脂混合并于 4°C 下孵育 16 小时。在用 200ml 20mM 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0) 和 200ml 40mM 柠檬酸钠 (pH 5.0) 洗涤后, 使用 15ml 0.1M 甘氨酸 (pH 3.0) 将野生型非糖基化曲妥珠单抗、非糖基化曲妥珠单抗 -Fc5 和非糖基化曲妥

珠单抗 -Fc601 从树脂上洗脱,并且立即用 1M Tris(pH 8.0) 溶液中中和。洗脱的样品通过经 10kDa MW 截止膜的超滤浓缩并且将截留物应用至经 PBS(pH 7.4) 冲洗的 Superdex 200 凝胶过滤柱上。

[0230] 实施例 5:非糖基化曲妥珠单抗 -Fc601 对 Fc 受体的亲和性

[0231] 通过将糖基化曲妥珠单抗(临床级, Fox Chase Cancer Center Pharmacy)、非糖基化曲妥珠单抗和非糖基化曲妥珠单抗 -Fc5、非糖基化曲妥珠单抗 -Fc601 逐一固定在 CM-5 传感器芯片上,测量完全装配的非糖基化曲妥珠单抗抗体对 Fc γ RIa 的亲和性。将 HBS-EP(10mM HEPES pH 7.4, 150mM NaCl, 3.4mMEDTA, 和 0.005% P20 表面活性剂) 缓冲液中的可溶性单体 Fc γ RIa 以 30 μ l/ 分的流速注射 60 秒,解离时间 300 秒。通过单次注射 100mM 柠檬酸, pH 3.0 进行配体再生。可溶性单体 Fc γ RIa 与糖基化曲妥珠单抗、非糖基化曲妥珠单抗、曲妥珠单抗 -Fc5 和曲妥珠单抗 -Fc601 的亲和性如下得到,即通过一式两份以 0、25、50、100、200nM 的浓度以 30 μ l/ 分的流速向固定化的糖基化曲妥珠单抗、曲妥珠单抗、曲妥珠单抗 -Fc5 和曲妥珠单抗 Fc601 注射可溶性 Fc γ RIa 60 秒。通过一式两份以 0、200、300、400、500 和 600nM 的浓度以 30 μ l/ 分的流速向固定化的非糖基化曲妥珠单抗注射 Fc γ RIa 60 秒得到 Fc γ RIa 对野生型非糖基化曲妥珠单抗的亲和性。零浓度时的结合曲线作为空白被扣除。通过将平衡反应与通过 BIA 评定 3.0 软件提供的稳态亲和性模型拟合确定平衡解离常数 (KD)。如图 10 中所示,曲妥珠单抗 -Fc601 以与商业级别的来自 CHO 细胞的糖基化曲妥珠单抗相似的亲和性结合 Fc γ RIa, 并且与野生型非糖基化曲妥珠单抗相比亲和性增加超过 130 倍。

[0232] 通过 ELISA 分析纯化 IgG 对于 Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIa 细胞外结构域的亲和性。50 μ l 的 4 μ g/ml 非糖基化曲妥珠单抗、曲妥珠单抗 -Fc5 或者从大肠杆菌纯化的曲妥珠单抗 -Fc601、糖基化的 IgG 曲妥珠单抗在 0.05M Na₂CO₃(pH9.6) 缓冲液中稀释并且用于于 4°C 下包被 96 孔聚苯乙烯 ELISA 孔 (Corning, Corning, NY) 16 小时。在以 1 \times PBS(pH 7.4), 0.5% BSA 室温封闭 2 小时后,将板用包含 0.05% Tween20 的 PBS 洗涤 4 次,并且用系列稀释的 Fc γ RIIa、C 末端融合至 GST 的 Fc γ RIIb(Berntzen 等, 2005)、Fc γ RIIIa(R&D Systems, Minneapolis, MN) 室温孵育 1 小时。在用相同的缓冲液洗涤 4 次后,对于 Fc γ RIIa 和 Fc γ RIIb 加入 1 : 5,000 稀释的抗 GST 抗体 HRP 缀合物 (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ) 或者对于 Fc γ RIIIa 加入 1 : 10,000 稀释的抗聚组氨酸抗体 HRP 缀合物 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 并且如先前所述将板洗涤并显色 (Mazor 等, 2007)。为了确定在 pH 7.4 下 IgG 与 FcRn 的结合,将如先前所述与包含 1 : 5,000 稀释的抗 GST-HRP 的 PBS(pH 7.4) 室温预孵育 1 小时的 2 μ g/ml FcRn (Andersen 等, 2006) 加入至用曲妥珠单抗包被的板中。为了评价在 pH 6.0 下的结合,如上开展 ELISA,例外的是将 20mM MES 加入至洗涤缓冲液和样品稀释缓冲液中并将 pH 调整至 6.0。如所预期,非糖基化曲妥珠单抗表现出对 Fc γ RIIa 或 Fc γ RIIb(对于 GST 融合的 Fc γ RIIa 和 Fc γ RIIb 分别为 EC₅₀ \geq 1000 倍和高于 100 倍,图 3C 和 3D)(图 11 和图 12)、Fc γ RIIIa(图 13) 具有低亲和性。曲妥珠单抗 -Fc601 抗体表现出对 Fc γ RIIb 的亲和性稍微更高。新生儿 FcRn 受体与 CH2 结构域和 CH3 结构域界面的结合负责 IgG 在胞浆中的内体再循环 (Ghetie 和 Ward, 2000)。曲妥珠单抗 -Fc5 的确显示出其对新生儿 FcRn 的 pH 依赖性结合(在 pH 6.0 下以高亲和性结合并且在 pH 7.4 下以低亲和性结合)。然而,曲妥珠单抗 -Fc601 表现出在 pH

6.0 下对 FcRn 的结合亲和性低得多 (图 14)。

[0233] 实施例 6 :对 Fc γ RIa 比对 Fc5 亲和性更高并且 pH 依赖性 FcRn 结合的文库的构建

[0234] 在微酸性 pH 条件下人 FcRn 对人 IgG 具有高亲和性并且在中性或者碱性 pH 下具有低亲和性 (Ober 等, 2004a ;Ober 等, 2004b ;Raghavan 和 Bjorkman, 1996 ;Rodewald, 1976)。FcRn 结合位点位于 CH2 和 CH3 结构域界面处, 与葡萄球菌蛋白 A (SpA) 结合位点相似 (Kim 等, 1994 ;Shields 等, 2001)。Fc601 显示与 Fc5 相比具有改善的 Fc γ RIa 结合亲和性。然而, Fc601 在 IgG1 低位 CH2 区内的两个额外突变 (K338R, G341V) 破坏了 pH 依赖的 FcRn 结合, 这对于通过允许所胞饮的 IgG 在酸化内体中产生强的 IgG-FcRn 复合体以便跨过血管内皮细胞膜再循环进入血液, 而不是在溶酶体内降解, 来调节血清 IgG 浓度是至关重要的 (Ghetie 和 Ward, 2000)。

[0235] 为了分离显示对 Fc γ RIa 的亲和性比 Fc5 更高并且保留了 pH 依赖性 FcRn 结合的工程改造 Fc 片段, 构建了在 CH2 上部区域包含随机氨基酸的新组合文库。文库由 4 个亚文库组成。CH2 上部区域的 4 个部分 (234L-239S, 264V-268H, 297N-299T, 328L-332I) (Kabat 等, 1991) 使用 NNS 简并密码子被随机氨基酸替换 (图 15 和 16)。对于第一亚文库, 使用引物 (STJ#465 和 STJ#220) 和模板 pPe1BFLAG-Fc5 扩增 DNA 片段。使用引物 STJ#473 将 PCR 扩增片段的 N 末端序列延伸产生在 34L-239S 区有 5 个氨基酸被随机氨基酸替换的亚文库。使用通过引物 (STJ#467 和 STJ#220) 扩增的 DNA 片段和通过引物 (STJ#473 和 STJ#468) 扩增的 DNA 片段的基因装配 PCR 产物产生对于 264V-268H 为随机化的 5 个氨基酸残基的第二亚文库。使用相同的 PCR 模板质粒 pPe1BFLAG-Fc5 并且使用引物对 (STJ#473/STJ#470 和 STJ#469/STJ#220) 产生 297N-299T 随机化的第三个亚文库并且使用引物对 (STJ#473/STJ#470 和 STJ#469/STJ#220) 产生第四个亚文库 (328L-332I)。基于可能突变的数量, 来自 5 个氨基酸残基随机化的 3 个亚文库 (234L-239S ;264V-268H ;328L-332I) 的相同量的 DNA 与 203/205 倍数量的来自 3 个氨基酸残基随机化的第 3 个亚文库 (297N-299T) 的 DNA 混合。将 3 个亚文库的每一个亚克隆入 SfiI 消化的 pPe1BFLAG 中。所得到的质粒转化进入大肠杆菌 Jude-1 (F' [Tn10(Tet^r)proAB⁺lacI^q Δ (lacZ)M15]mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC)80dlacZ Δ M15 Δ lacX74 deoR recA1 araD139 Δ (araleu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG) 中 (Kawarasaki 等, 2003)。

[0236] 实施例 7 :表现出对 Fc γ RIa 的亲和性比 Fc5 更高和 pH 依赖性 FcRn 结合的 Fc 突变体的筛选

[0237] 通过实施例 2 中所述的方法将由 4 个亚文库组成的文库细胞转变成原生质球。通过装备氩激光器的 MoFlo 流式细胞仪 (Dako Cytomation, Fort Collins, CO) 分选超过 4×10^8 个原生质球。在室温标记 10nM (对于第 2 轮为 3nM, 对于第 3 轮为 1nM, 对于第 4 轮为 0.3nM) Fc γ RIa-FITC 1 小时之后, 通过选择性门控分选由于 Fc γ RIa-FITC 结合而显示最高荧光强度的群体顶部 3% 的原生质球。在最初分选之后, 将收集的原生质球立即进行再分选。通过 PCR 使用两种特异性引物 (STJ#16 和 STJ#220) 扩增 Fc 编码基因并且连接进入 SfiI 消化的 pPe1BFLAG 质粒中。将连接混合物转化进入大肠杆菌 Jude-1 中。在包含氯霉素的培养基上选择的转化体如上培养、制备原生质球并分选。在第 4 轮分选之后, 分离 8 个表现出比 Fc5 荧光更高的各个克隆 (图 17)。所有克隆具有在 L328W 和 I332Y 突变中的共

有序列突变。同样,氨基酸残基 329P 高度保守,表明了特定的氨基酸残基在 Fc γ RIa 结合中的关键性作用(图 18)。最高荧光克隆是 Fc701,其在 328L-332I 区具有 L328W、A330V、P331A、I332Y 突变并且具有另一额外的 Q295R 突变(图 19-21)。

[0238] 实施例 8:从上位 CH2 随机化文库筛选的表现出对 Fc γ RIa 具有高亲和性结合之所选择克隆的序列

[0239] 表现出对 Fc γ RIa 的亲合性比 Fc5 更高的工程改造的 Fc 突变体在 Fc5 序列中具有替换突变。分离的 Fc 突变体 Fc701-Fc708(蛋白质序列 #22 ~ #29) 在 Fc5 序列中具有突变。表现出对 Fc γ RI 的亲合性比 Fc5 更高的分离的突变体总结于表 6 中。

[0240] 实施例 9:全长曲妥珠单抗 -Fc701 IgG1 的表征

[0241] 使用补料分批发酵产生全长曲妥珠单抗 -Fc701IgG1,并且使用蛋白质 A 亲和层析纯化,接着通过凝胶过滤层析纯化,如实施例 4 中所述。为了得到全长曲妥珠单抗 -Fc701 对 Fc γ RIa 结合的动力学速率常数,使用胺偶联方法将纯化的曲妥珠单抗 -Fc701 固定化在 CM5 传感器芯片上。使用在实施例 5 中描述的条件分析曲妥珠单抗 -Fc701 与 Fc γ RIa 之间的相互作用。曲妥珠单抗 -Fc701 以与曲妥珠单抗 Fc601 相似的亲和性结合 Fc γ RIa(图 22)。使用 ELISA 在 pH 6.0 和 pH7.4 下分析 pH 依赖性 FcRn 结合,如实施例 5 中所述。如所预期,所有的曲妥珠单抗抗体,包括曲妥珠单抗 -Fc701,显示出在中性 pH 7.4 时对 FcRn 没有显著的结合亲和性。另一方面,曲妥珠单抗 Fc701 表现出在 pH 6.0 下对 FcRn 的结合亲和性比野生型非糖基化或者糖基化曲妥珠单抗抗体更高(图 23)。

[0242]

表 3. 本研究中使用的质粒。

质粒	相关特征	参考文献或来源
pMoPac1	Cm ^r , lac 启动子, tetA 基因, C 末端聚组氨酸 标签和 c-myc 标签	(Hayhurst 等, 2003)
pMoPac12	Ap ^r , lac 启动子, tetA 基因, <i>skp</i> 基因, C 末端聚组氨酸 标签和 c-myc 标签	(Hayhurst 等, 2003)
pMoPac1-FLAG-M18	NlpA 融合的 M18 scFv 基因, pMoPac1 中 C 末端 FLAG 标签	(Jung 等, 2007)
pPelBFLAG	Cm ^r , lac 启动子, tetA 基因, <i>skp</i> 基因, C 末端 FLAG 标签	本研究
pPelBFLAG-Fc	pPelBFLAG 中 <i>IgG1-Fc</i> 基因	本研究
pPelBFLAG-Fc5	pPelBFLAG 中 <i>IgG1-Fc5</i> 基因	本研究
pPelBFLAG-Fc601	pPelBFLAG 中 <i>IgG1-Fc601</i> 基因	本研究
pPelBFLAG-Fc701	pPelBFLAG 中 <i>IgG1-Fc601</i> 基因	本研究
pMAZ360-M18.1-Hum-IgG	pMAZ360 中 M18.1 人源化 <i>IgG1</i> 基因	(Mazor 等)
pSTJ4-赫赛汀 IgG1	pMAZ360-M18.1-Hum-IgG1 中赫赛汀 <i>IgG1</i> 基因	本研究
pSTJ4-赫赛汀-Fc5-IgG1	pMAZ360-M18.1-Hum-IgG1 中赫赛汀 <i>IgG1-Fc5</i> 基因	本研究
pSTJ4-赫赛汀-Fc601-IgG1	pMAZ360-M18.1-Hum-IgG1 中赫赛汀 <i>IgG1-601</i> 基因	本研究
pSTJ4-赫赛汀-Fc701-IgG1	pMAZ360-M18.1-Hum-IgG1 中赫赛汀 <i>IgG1-701</i> 基因	本研究

[0243] 表 4. 本研究中使用的引物

[0244]

Fc 突变体	突变
Fc601	K338R, G341V, E382V, M428I
Fc602	N297D, N315D, K340N, E382V, M428I
Fc603	K340N, E382V, M428I
Fc604	K338I, K340N, E382V, M428I
Fc605	K340Q, A378D, E382V, M428I
Fc606	N325S, K340N, E382V, M428I
Fc607	H224Y, E269K, N325S, G341V, E382V, M428I
Fc608	G341V, E382V, K392E, M428I
Fc609	K338R, G341V, E382V, S424L, M428I, N434D
[0246] Fc610	F241L, G341V, E382V, M428I
Fc611	G341V, E382V, M428I
Fc612	N276D, G341V, E382V, M428I
Fc613	G341V, V369A, E382V, M428I
Fc614	N286D, G341V, E382V, M428I, N434S
Fc615	N325S, G341V, E382V, M428I
Fc616	Y300C, G341V, E382V, M428I
Fc617	G341V, V348M, E382V, M428I
Fc618	E382V, M428I, N434S
Fc619	V266M, E382V, M428I

[0247] 表 6. 从 CH2 上部区域随机化文库分离的赋予对 Fc γ RI 的亲合性比 Fc5 更高的突变

Fc 突变体	突变(除了 E382V 和 M428I 之外)
[0248] Fc701	L328W, A330V, P331A, I332Y, Q295R

	Fc702	L328W, A330E, P331E, I332Y, V279M
	Fc703	L328W, A330E, P331E, I332Y
	Fc704	L328W, A330E, P331V, I332Y, S426T
	Fc705	L328W, A330E, P331V, I332Y
[0249]	Fc706	L328W, A330I, P331E, I332Y
	Fc707	L328W, A330E, I332Y
	Fc708	L328W, P331S, I332Y
	Fc709	L328W, A330V, P331S, I332Y, H224R, L251F

[0250] 实施例 10 :用于共价锚定全长 IgG 展示系统的质粒的详细构建

[0251] 将 PCR 扩增并且 SfiI 消化的编码人 IgG1-Fc 片段、人 IgG1 重链铰链区、CH2 区和 CH3 区的 Fc 基因 (GeneBank 登录号 AF237583) 亚克隆进入 SfiI 消化的 pPe1BFLAG 产生 pPe1BFLAG-Fc。通过将 XbaI-HindIII 消化的来自 pMoPac1-FLAG-M18 的 N1pA 融合的 M18scFv 基因连接进入用相同的内切核酸酶消化的 pBAD30-KmR 中得到 pBADN1pAHis-M18。通过引物 (STJ#475 和 STJ#476) 和模板 pSTJ4- 赫赛汀 IgG1 扩增的曲妥珠单抗 VL-Ck 用 SfiI 消化并连接进入用 SfiI 消化的 pBADN1pAHis-M18 中产生 pBADN1pA-VL-Ck-His。使用引物 (STJ#16 和 STJ#340) 和模板 (pSTJ4- 赫赛汀 IgG1) 扩增 Pe1B 前导肽融合的曲妥珠单抗 VL-Ck, 通过 XbaI/HindIII 内切核酸酶消化并连接进入用相同的内切核酸酶消化的 pBAD-N1pA-VL-Ck-His 中, 产生 pBADPe1B-VL-Ck。将通过引物 (STJ#70 和 STJ#332) 和模板 (pBADPe1B-VL-Ck) 扩增的 PCR 片段用 XbaI 消化并连接进入使用相同的内切核酸酶消化的 pBADN1pA-VL-Ck-His 构建 pBADPe1B-VL-Ck-N1pA-VL-Ck-His。分别对于 pPe1B- 赫赛汀 (H)-FLAG、pPe1B- 赫赛汀 (H)-Fc5-FLAG 和 pPe1B- 赫赛汀 (H)-Fc2a-FLAG 使用引物 (STJ#474 和 STJ#67) 和模板 pSTJ4- 赫赛汀 IgG1 扩增曲妥珠单抗重链。Fc2a 是通过 CH2 上部区域内两个突变 (S298G/T299A) 对于 Fc γ R2 结合进行优化的非糖基化抗体变体; 已经报导包含 IgG 的 Fc2a 表现出与那些糖基化抗体可比的 Fc γ R2a 结合和效应器功能 (Sazinsky 等, 2008)。对于正确装配的、同二聚体野生型 Fc 和 Fc2a 在大肠杆菌周质空间内的表达, 构建质粒 pDsbA-Fc-FLAG 和 pDsbA-Fc2a-FLAG 用于通过 DsbA 信号肽将 Fc 输出。PCR 扩增的片段用 SfiI 消化, 连接进入用相同的内切核酸酶消化的 pPe1BFLAG 中, 以产生 pPe1B- 赫赛汀 (H)-FLAG、pPe1B- 赫赛汀 (H)-Fc5-FLAG 和 pPe1B- 赫赛汀 (H)-Fc2a-FLAG。

[0252] 表 7 和 8 总结在实施例 10-14 中所使用的质粒和引物。

[0253] 实施例 11 :对于共价锚定全长 IgG 展示系统的原生质球制备和 FACS 分析以便工程改造 IgG 重链

[0254] 为了使用细菌全长 IgG 展示系统用于文库筛选, 应该考虑 4 个因素。首先, IgG 重链和轻链必须良好表达。第二, 重链和轻链应该在大肠杆菌中良好组装。第三, 结合配体能够接近细菌细胞内的全长 IgG。最后, 第四, 在文库筛选过程中所展示全长 IgG 的锚定应该

是强壮的。

[0255] 两个质粒共表达质粒用于稳定共价锚定全长 IgG(图 24)。pBADPe1B-VL-Ck-NlpA-VL-Ck-His 质粒使得能够表达 NlpA 前导肽融合的 IgG 轻链 (VL-Ck) 和 Pe1B 前导肽融合的 IgG 轻链 (VL-Ck)。因此,一部分轻链锚定在内膜的周质侧,在内膜上轻链与重链结合产生四聚体全长 IgG。pPe1B-赫赛汀(H)-FLAG 是处于 lac 启动子控制下的编码 IgG 重链的高拷贝数质粒。质粒 pBADPe1B-VL-Ck-NlpA-VL-Ck-His 与 pPe1B-赫赛汀(H)-FLAG、pPe1B-赫赛汀(H)-Fc5-FLAG 或 pPe1B-赫赛汀(H)-Fc2a-FLAG(分别对于野生型曲妥珠单抗、曲妥珠单抗-Fc5 或曲妥珠单抗-Fc2a)一起转化进入大肠杆菌 Jude-1($F' [Tn10(Tet^r)proAB^+lacI^q \Delta (lacZ)M15]mcrA \Delta (mrr-hsdRMS-mcrBC)80dla cZ \Delta M15 \Delta lacX74deoR recA1 araD139 \Delta (ara leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG)$) (Kawarasaki 等,2003) 中。转化的大肠杆菌细胞在含 2% (wt/vol) 葡萄糖并添加氯霉素 (50 μ g/ml) 和卡那霉素 (50g/ml) 的 Terrific 肉汤 (Becton Dickinson Diagnostic Systems Difco™, Sparks, MD) 中于 37°C 以 250 转/分摇动培养过夜。

[0256] 过夜培养的细胞在 125ml 锥形瓶中的含氯霉素 (50 μ g/ml) 和卡那霉素 (50g/ml) 的新鲜 7ml TB 培养基中以 1 : 100 稀释。在以 250 转/分摇动下于 37°C 培养 2 小时并且在 25°C 下冷却 20 分钟之后,使用 1mM 异丙基 β -D-吡喃型半乳糖苷 (IPTG) 诱导蛋白质表达。IPTG 诱导 20 小时后,通过离心收获 6ml 的培养肉汤并且在 1ml 冷的 10mM Tris-HCl (pH 8.0) 中洗涤两次。在重悬于 1ml 冷的 STE 溶液 (0.5M 蔗糖,10mM Tris-HCl, 10mM EDTA, pH 8.0) 后,于 37°C 下旋转混合培养细胞 30 分钟,通过 12,000 \times g 离心 1 分钟将细胞沉淀并且在 1ml 冷的溶液 A (0.5M 蔗糖,20mM MgCl₂,10mM MOPS, pH 6.8) 中洗涤。洗涤的细胞与含 1mg/ml 鸡卵溶菌酶的 1ml 溶液 A 于 37°C 孵育 15 分钟。在以 12,000 \times g 离心 1 分钟后,所得到的原生质球沉淀重悬于 1ml 冷 PBS 中。300 μ l 原生质球进一步在 700 μ l PBS 中稀释并用 30nM Fc γ RI-FITC 标记以分析 Fc γ RIa 的结合。为了用 FACS 分析 Fc γ RIIa 结合,原生质球与 90nM C 末端融合至 GST 的 Fc γ RIIa (Berntzen 等,2005) 孵育,在 1ml PBS 中洗涤,并用在 1ml PBS 中 1 : 200 稀释的多克隆山羊抗 GST-FITC (Abcam, Cambridge, MA) 标记。在于黑暗条件下于 25°C 强力摇动孵育 1 小时后,通过 12,000 \times g 离心 1 分钟将混合物沉淀并重悬于 1ml PBS 中。荧光标记的原生质球在 2.5ml PBS 中稀释并且在 BDFACSCalibur (BD Bioscience, San Jose, CA) 上分析。

[0257] 实施例 12 :FACS 分析

[0258] 对于使用 FACS 分选方法基于门孔选择性荧光和散布区的亲和性成熟,需要得到与阴性对照相比具有低变异系数 ($CV = [标准差 / 平均值] \times 100$) 的可区别的高或低荧光信号。对于双质粒共价锚定全长 IgG 展示系统的荧光与对于双顺反子质粒 pSTJ4-赫赛汀 IgG、pSTJ4-赫赛汀-IgG1-Fc5 或 pSTJ4-赫赛汀-IgG1-Fc2a 的荧光进行比较。

[0259] 比较了表达内膜锚定(通过 NlpA-VL-Ck 多肽)野生型全长 IgG 曲妥珠单抗的原生质球与从双顺反子载体系统 (Mazor 等,2007) 表达可溶性 IgG 的原生质球的荧光谱。当用 Fc γ RIa-FITC 标记时,双质粒锚定全长 IgG 展示系统清楚地显示出极大改善信号强度和 CV 值。使用在 TB 中于 12°C 或 25°C 下培养的细胞测试对于锚定全长 IgG 展示系统的荧光信号。从于 25°C 下培养的、使用双质粒共价锚定全长 IgG 展示系统展示曲妥珠单抗-Fc5 的细胞产生的原生质球表现出,当用 Fc γ RI-FITC 标记时,与表达野生型曲妥珠单抗的原生

质球相比,具有高得多的荧光和改善的 CV(图 25)。同样,在 FACS 分析以测定原生质球对 Fc γ RIIa-GST 的亲中性中(图 26),在 TB 中于 25°C 培养的双质粒共价锚定全长 IgG 展示系统显示出令人惊讶地改善的信号强度和 CV,这提供了用于全长 IgG 有效地亲和性成熟的选择性展示系统(图 27 和图 28)。

[0260] 实施例 13:用于 IgG Fc 工程改造的易错 PCR 文库的构建

[0261] 通过标准的易错 PCR(Fromant 等,1995)使用野生型 Fc 作为模板并使用两种引物(STJ#196 和 STJ#197)构建锚定 IgG 内 CH2-CH3 区的易错 PCR 文库。对于易错 PCR 文库,将扩增的 PCR 片段使用 SfiI 限制性位点接入 pPe1BFLAG 中。使用引物(STJ#479 和 STJ#67)扩增文库 Fc 片段。对于具有随机化 Fc 区的曲妥珠单抗重链(VH-CH1-铰链-CH2-CH3)文库,使用引物(STJ#474 和 STJ#480)从模板 pSTJ4-赫赛汀 IgG 扩增 VH-CH1 片段。使用引物(STJ#474 和 STJ#67)从铰链-CH2-CH3 区和 VH-CH1 区 2 个片段进行基因装配 PCR,产生随机化 Fc 区的曲妥珠单抗重链(VH-CH1-铰链-CH2-CH3)文库。将基因装配 PCR 片段使用 SfiI 限制位点接入 pPe1BFLAG 中。将所得到的质粒转化进入大肠杆菌 Jude-1(F' [Tn10(Tet^r)proAB⁺lacI^q Δ (lacZ)M15]mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC)80d1 acZ Δ M15 Δ lacX74 deoR recA1 araD139 Δ (ara leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG)(Kawarasaki 等,2003)中。文库由 9.2×10^8 个个体转化体组成,基于对随机选择的 20 个文库克隆的测序每一基因的错误率为 0.49%。

[0262] 实施例 14:用于 IgG Fc 工程改造的 CH2 上部区域随机化文库的构建

[0263] 这些文库由 4 个亚文库组成。CH2 上部区域的 4 个部分(234L-239S、264V-268H、297N-299T、328L-332I)(Kabat 等,1991)使用 NNS 简并密码子被随机氨基酸替换(图 29)。对于第一亚文库,使用引物(STJ#465 和 STJ#220)和模板 pPe1BFLAG-Fc 扩增 DNA 片段。使用引物 STJ#473 将 5' 序列延伸产生在 34L-239S 区有 5 个氨基酸被随机氨基酸替换的亚文库。使用通过引物(STJ#467 和 STJ#220)扩增的 DNA 片段和通过引物(STJ#473 和 STJ#468)扩增的 DNA 片段的基因装配 PCR 产物产生对于 264V-268H 为随机化的 5 个氨基酸残基的第二亚文库。使用相同的 PCR 模板质粒 pPe1BFLAG-Fc5 并且使用引物对(STJ#473/STJ#470 和 STJ#469/STJ#220)产生 297N-299T 随机化的第三个亚文库并且使用引物对(STJ#473/STJ#470 和 STJ#469/STJ#220)产生第四个亚文库(328L-332I)。基于可能突变的数量,来自 5 个氨基酸残基随机化的 3 个亚文库(234L-239S;264V-268H;328L-332I)的相同量的 DNA 与 203/205 倍数量的来自 3 个氨基酸残基随机化的第 3 个亚文库(297N-299T)的 DNA 混合。将 3 个亚文库的每一个亚克隆入 SfiI 消化的 pPe1BFLAG 中。对于 CH2 上部区域随机化的曲妥珠单抗重链(VH-CH1-铰链-CH2-CH3)文库,使用引物(STJ#474 和 STJ#480)从模板 pSTJ4-赫赛汀 IgG 扩增 VH1-CH1 片段。使用引物(STJ#474 和 STJ#67)从铰链-CH2-CH3 区和 VH1-CH1 区 2 个片段进行基因装配 PCR,产生随机化 CH2 上部区域的曲妥珠单抗重链(VH-CH1-铰链-CH2-CH3)文库。将基因装配 PCR 片段使用 SfiI 限制位点接入 pPe1BFLAG 中。将所得到的质粒转化进入大肠杆菌 Jude-1 中。基于随机选择的 20 个文库克隆的序列,构建的文库大小超过 3×10^8 个转化体。

[0264] 表 7. 本研究中使用的质粒

质粒	相关特征	参考文献或者来源
pMoPac1	Cm ^r , <i>lac</i> 启动子, <i>tetA</i> 基因, C 末端聚组氨酸标签和 c-myc 标签	(Hayhurst 等, 2003)
pMoPac12	Ap ^r , <i>lac</i> 启动子, <i>tetA</i> 基因, <i>skp</i> 基因, C 末端聚组氨酸标签和 c-myc 标签	(Hayhurst 等, 2003)
pMoPac1-FLAG-M18	NlpA 融合的 <i>M18 scFv</i> 基因, pMoPac1 中 C 末端 FLAG 标签	(Jung 等, 2007)
[0265] pPelBFLAG-M18	Cm ^r , <i>lac</i> 启动子, <i>tetA</i> 基因, <i>skp</i> 基因, C 末端 FLAG 标签	本研究
pPelBFLAG-Fc	pPelBFLAG 中 <i>IgG1-Fc</i> 基因	本研究
pPelBFLAG-Fc5	pPelBFLAG 中 <i>IgG1-Fc5</i> 基因	本研究
pPelBFLAG-Fc2a	pPelBFLAG 中 <i>IgG1-Fc2a</i> 基因	本研究
pMAZ360-M18.1-Hum-IgG	pMAZ360 中 <i>M18.1</i> 人源化 <i>IgG1</i> 基因	(Mazor 等)
pSTJ4-赫赛汀 IgG1	pMAZ360-M18.1-Hum-IgG1 中曲妥珠单抗 <i>IgG1</i> 基因	本研究
pSTJ4-赫赛汀 IgG1-Fc5	pMAZ360-M18.1-Hum-IgG1 中曲妥珠单抗 <i>IgG1-Fc5</i> 基因	本研究
pSTJ4-赫赛汀 IgG1-Fc2a	pMAZ360-M18.1-Hum-IgG1 中曲妥珠单抗 <i>IgG1-Fc2a</i> 基因	本研究

	pPelB- 赫赛汀 (H)-FLAG	pPelBFLAG 中 <i>IgG1</i> 重链基因	本研究
	pPelB- 赫赛汀 (H)-Fc5-FLAG	pPelBFLAG 中 <i>IgG1-Fc5</i> 重链基因	本研究
	pPelB- 赫赛汀 (H)-Fc2a-FLAG	pPelBFLAG 中 <i>IgG1-Fc2a</i> 重链基因	本研究
	pMAZ360-M18.1-Hum-IgG	pMAZ360 中 <i>M18.1</i> 人源化 <i>IgG1</i> 基因	(Mazor 等)
	pSTJ4-赫赛汀 IgG1	pMAZ360-M18.1-Hum-IgG1 中曲妥珠单抗 <i>IgG1</i> 基因	本研究
	pSTJ4- 赫赛汀 IgG1-Fc5	pMAZ360-M18.1-Hum-IgG1 中曲妥珠单抗 <i>IgG1-Fc5</i> 基因	本研究
	pSTJ4- 赫赛汀 IgG1-Fc2a	pMAZ360-M18.1-Hum-IgG1 中曲妥珠单抗 <i>IgG1-Fc2a</i> 基因	本研究
	pDsbA	pTrc99A 中的 <i>DsbA</i> 信号序列基因	本研究
[0266]	pDsbA-Fc-FLAG	pTrc99A 中的 <i>DsbA</i> 融合的 <i>IgG1-Fc</i> 基因, C 末端 FLAG 标签	本研究
	pDsbA-Fc5-FLAG	pTrc99A 中的 <i>DsbA</i> 融合的 <i>IgG1-Fc5</i> 基因, C 末端 FLAG 标签	本研究
	pDsbA-Fc2a-FLAG	pTrc99A 中的 <i>DsbA</i> 融合的 <i>IgG1-Fc2a</i> 基因, C 末端 FLAG 标签	本研究
	pBAD30	Apr, BAD 启动子	(Guzman 等, 1995)
	pBAD30-KmR	Km ^r , BAD 启动子	(Jung 等, 2007)
	pBADNlpAHis-M18	pBAD30 中的 NlpA 融合的 <i>M18 scFv</i> , C 末端聚组氨酸标签	本研究
	pBAD-PelB-VL-Ck-His	pBAD30-KmR 中的 PelB 融合的曲妥珠单抗 VL-Ck 结构域, C 末端聚组氨酸标签和 c-myc 标签	本研究
	pBAD-PelB-VL-Ck-NlpA-VL-Ck-His	pBAD30-KmR 中的 PelB 融合的曲妥珠单抗 VL-Ck 结构域和 NlpA 融合的曲妥珠单抗 VL-Ck-His	本研究

[0267] 表 8. 本研究中使用的引物

引物 名称	引物核苷酸序列 (5'→3')
STJ#16	GTGAGCGGATAACAATTC
STJ#67	AATTCGGCCCCGAGGCCCTTACCCGGGGACAGGGAGAGGCTCTTCTGCGTG
STJ#70	CTACCTGACGCTTTTTATCGC
STJ#144	TTTAGGGGTCGACGACAAAACACACATGCCACCGTG
STJ#145	TTTAAGGGAAGCTTCTATTAGGCGCGCCCTTGTTCATCG
STJ#147	GGCAAATCTGTTTTATCAGACCGCTTCTG
STJ#196	CGCAGCGAGGCCAGCCGGCCATGGCG
[0268] STJ#197	CGCAATTCGAATTCGGCCCCGAGGCC
STJ#220	CAATTTGTGTCAGCCGCTGAGCAGAAG
STJ#290	TTTAGGGGTCGACAAGAAAGTTGAGCCAAATCTTGTGACAAAACACACATGCCACCG
STJ#291	GGCCACCGGATATCTTATTATTACCCGGGGACAGGGAGAGG
STJ#302	GCGGAATCCCATGGCGGATATCAAATGACCC
STJ#303	CAGACGCGCTTAAAGAAGACGGGCTTGGGTCATTGAATATCCGCCATG
STJ#304	CGTCTTCTTAAAGCGCTGTGCGGTGATCGCGTGACCATCACGTGTCGT
STJ#305	AGGCCACCGCCGTATTAACATCTTGGCTCGCACGACACGTGATGGTCACG
STJ#306	GTTAATACGGCGGTGGCCTGGTATCAACAAAAACGGGTAAAGCCCCGAA
STJ#307	GAGTACAGAAAGCTGGCGCTGTAGATTAACAGCTTCGGGGCTTACCCGG
STJ#308	CAGCGCCAGCTTCTGTACTCTGGCGTCCCGAGCCGCTTTTCTGGCAGCC

STJ#309	TGCTAATGGTCAGCGTGAAGTCCGTACCGCTGCGGCTGCCAGAAAAGCGG
STJ#310	ACTTCACGCTGACCATTAGCAGCCTGCAGCCGGAGGATTCGCCACCTAT
STJ#311	GGCGGGGTGGTGTAGTGCTGCTGACAATAATAGGTGGCGAAATCCTCCG
STJ#312	ACTACACCACCCCGCAACCTTTGGCCAGGGTACGAAAAGTGGAGATTA
STJ#313	GACAGATGGTGCAGCCGCGCTGCGTTTAATCTCCACTTTCGTACCCTGG
STJ#314	ATTGTTATTGCTAGCGGCTCAGCCGGCAATGGCG
STJ#315	ACCAGACCACCGCCAGATTCCACTAATTGAACCTCCGCCATTGCCGGCTG
STJ#316	TCTGGCGGTGGTCTGGTGCAGCCAGGCGGTAGCTTACGTCTGAGCTGTGC
STJ#317	AGGTATCTTTGATGTTGAAGCCAGACGCTGCACAGCTCAGACGTAAGCTA
STJ#318	TCTGGCTTCAACATCAAAGATACCTACATTCATTGGGTTCCGCAAGCCCC
STJ#319	ATAGATACGGGCCACCCACTCCAGGCCTTACCTGGGGCTTGGCGAACCC
STJ#320	GAGTGGGTGGCCCGTATCTATCCAACCAATGGCTACACGCGTTATGCAGA
STJ#321	GCGCTAATGGTGAAGCGGCCTTTCACAGAGTCTGCATAACGCGTGTAGCC
STJ#322	CCGCTTACCATTAGCGCCGACACCTCTAAGAACACCCGATATTTACAGA
STJ#323	GTCTCTGCGCGTAAAGAGTTCATCTGTAATATGCGGTGTTCTTAGAGG
STJ#324	AACTCTTACGCGCAGAGGACACGCGGTGTAAGTACTGCTCTCGTTGGGG
STJ#325	AGTAGTCCATCGCGTAGAAACCGTACCCGCCCAACGAGAGCAGTAGTAC
STJ#326	GGTTTCTACGCGATGGACTACTGGGGTCAGGGTACGCTGGTACGGTACG
[0269] STJ#327	GCCCTTGAAGCTTGCAGAGCTGACCGTGACCAGCGT
STJ#332	GGGAATTCTAGACTATTAGCACTCTCCCTGTTGAAGCTCTTTG
STJ#340	TTTAAGGGAAGCTTCTATTAGCACTCTCCCTGTTGAAGCTCTTTG
STJ#422	CTAGGGAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACGCGCGTACCCTGTGGTACGCGTCTC
STJ#465	CCCACCGTGCCAGCACCTGAANNNSNSNSGGANNNSNSGTCTTCTCTTCCCCCAAACCC
STJ#466	GGTTTTGGGGGGAAGAGGAAGACSNNSNNTCCSNNSNSNNTTCAAGTGCTGGGCACGGTGGG
STJ#467	CCTGAGGTCACATGCGTGGTNSNSNSNSNSNSNSGAAGACCCTGAGGTCAAGTCAACTGG
STJ#468	CCAGTTGAACCTGACCTCAGGGTCTTCSNNSNSNSNSNSNACCACGCATGTGACCTCAGG
STJ#469	GCCGCGGGAGGAGCAGTACNNSNSNSNSTACCGTGTGGTACGCGTCCCT
STJ#470	GAGGACGCTGACCACACGGTASNSNSNSNGTACTGCTCCTCCCGCGG
STJ#471	CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCNNSNSNSNSNSNSGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGG
STJ#472	CCCTTTGGCTTTGGAGATGGTTTTCTCSNNSNSNSNSNSNNGGCTTTGTTGGAGACCTTGC
STJ#473	CGCAGCGAGGCCAGCCGGCCATGGCGGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGGCCAGCACCTG
STJ#474	CGCAGCGAGGCCAGCCGGCCATGGCGGAGTTCAATTAGTGAATCTG
STJ#475	CGCAGCGAGGCCAGCCGGCCATGGCGGATATTCAAATGACCCAAAGCCCG
STJ#476	CGCAATTCGGCCCCGAGGCCCGCACTCTCCCTGTTGAAGCTCTTTG
STJ#479	GACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCC
STJ#480	GGCACGGTGGGCATGTGTGAGTTTTGTC

[0270] 实施例 15 :用于抗体依赖性细胞毒性测定的人单核细胞衍生的树突细胞 (mDC) 的分离和分化

[0271] 血沉棕黄层 (Gulf Coast Blood Center, Galveston, TX) 以 1 : 1 的体积加入至 histopaque 溶液 (Sigma) 中, 避免内容物混合。血液 -histopaque 溶液于 23°C 在无离心制动情况下以 1600 转 / 分离心 30 分钟。按照梯度离心分离外周血单核细胞层, 并且用洗涤缓冲液 (PBS, 2.5% 胎牛血清 (FBS), 1mM 乙二胺四乙酸 (EDTA)) 通过离心洗涤 2 次。然后将细胞重悬于 Iscove 改良的 Dulbecco 培养基 (IMDM, Cambrex) 中, 并加入至 24 孔板中并于 37°C 下培养 2 小时以允许单核细胞粘附至板上。有代表性地, 来自 50ml 体积血液的 PBMC 重悬于 24ml IMDM 中, 并以 1ml / 孔铺板。然后将培养基和未粘附细胞吸出并将粘附细胞用洗涤缓冲液洗涤 5 次。然后将细胞以 1ml / 孔重悬于包含 IMDM (Cambrex)、10% FBS 和 200ng/ml 白细胞介素 -4 (IL-4, R&D systems) 和 200ng/ml 粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF, R&D systems) 重组细胞因子的生长培养基中。另外的 IL-4 和 GM-CSF 在第 2 和 5 天以每种 200ng/ml 加入, 不更换培养基。使用抗 DC 特异性表面标志物 CD11c 的荧光抗体

(eBioscience) 进行染色并通过流式细胞仪测量 DC 分化。

[0272] 实施例 16 : 抗体依赖性细胞的细胞毒性 (ADCC) 测定

[0273] 表达高水平 Her2 的乳腺癌细胞系 SkBr3 用作 ADCC 测定的靶。细胞用同位素 $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ (Perkin Elmer Life Sciences) 以 $100\text{uCi}/10^6$ 个细胞于 37°C 下标记 1 小时。然后将细胞用 PBS 洗涤两次并且重悬于含 glutamax 的 Roswell Park Memorial Institute 培养基 -1640 (RPMI) 中, 并以 10^4 个细胞 / 孔加入到 96 孔板中。非糖基化野生型曲妥珠单抗、曲妥珠单抗 -Fc5 和曲妥珠单抗 -Fc601 (如实施例 4 中所述制备) 和糖基化曲妥珠单抗 (Clinical grade, Genentech) 以及相关对照加入至一式三份孔内的靶细胞中并于 37°C 孵育 1 小时。然后将板以 2000 转 / 分离心 1 分钟并用 PBS 洗涤。将效应器细胞, 或者完全分化的 mDC (第 7 天) 或者新鲜分离的 PBMC, 重悬于 RPMI, 2% 低 IgG FBS (Invitrogen), $250\text{ng}/10^6$ 细胞的脂多糖 (LPS) 中, 并以不同的比率加入到孔中。靶细胞和 mDC 在 37°C 下孵育 24 小时。然后在液体闪烁计数器中对于铬 51 测量细胞培养基中的同位素水平。靶细胞与 SDS 的孵育用作最大裂解的阳性对照并且无效应器细胞的孵育用作背景裂解。当 mDC 用作效应器细胞时, 非糖基化曲妥珠单抗 -Fc5 和曲妥珠单抗 -601 显示非常高水平的 ADCC 并且糖基化的曲妥珠单抗诱导非常低的 ADCC (图 31)。推测这是因为 Fc-601 和 Fc-5 仅结合 $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ 并且不结合也在单核细胞衍生的 DC 表面上表达的抑制剂受体 $\text{Fc}\gamma\text{RIIb}$ 。在另一方面, 赫赛汀表现出结合所有的 $\text{Fc}\gamma\text{R}$ 受体, 包括 $\text{Fc}\gamma\text{RIIb}$, 并且与后者受体的结合可能抑制靶细胞活化和杀伤。使用 PBMC 作为效应器细胞证明, 可以结合所有 Fc 受体并可以活化 NK 细胞的糖基化曲妥珠单抗具有高的 ADCC。与之相比, 非糖基化曲妥珠单抗 -Fc5 和曲妥珠单抗 -601 显示具有低的 ADCC (图 30)。

[0274] ***

[0275] 根据本公开, 本文公开和要求专利保护的所有方法可以在无需过度实验的情况下建立并实施。虽然本发明的组合物和方法已经以优选实施方案的方式描述, 但是本领域技术人员显而易见, 可以对本文所述方法、方法的步骤以及方法步骤的顺序进行修改而不脱离本发明概念、精神和范围。具体而言, 显而易见, 化学上和生理上均相关的某些试剂可以替代本文所述的试剂而达到相同或者相似的结果。对本领域技术人员而言显而易见的所有这些相似替代和修改认为处于由后附权利要求书所限定的本发明的精神、范围和概念内。

[0276] 参考文献

[0277] 下列参考文献以它们提供补充本文所述那些方法的示例性方法或其它细节的程度明确地通过参考并入本文。

[0278] 美国专利 3, 817, 837

[0279] 美国专利 3, 826, 364

[0280] 美国专利 3, 850, 752

[0281] 美国专利 3, 939, 350

[0282] 美国专利 3, 996, 345

[0283] 美国专利 4, 275, 149

[0284] 美国专利 4, 277, 437

[0285] 美国专利 4, 284, 412

[0286] 美国专利 4, 366, 241

- [0287] 美国专利 4, 472, 509
- [0288] 美国专利 4, 498, 766
- [0289] 美国专利 4, 661, 913
- [0290] 美国专利 4, 683, 195
- [0291] 美国专利 4, 683, 202
- [0292] 美国专利 4, 714, 682
- [0293] 美国专利 4, 767, 206
- [0294] 美国专利 4, 774, 189
- [0295] 美国专利 4, 800, 159
- [0296] 美国专利 4, 857, 451
- [0297] 美国专利 4, 883, 750
- [0298] 美国专利 4, 938, 948
- [0299] 美国专利 4, 988, 618
- [0300] 美国专利 4, 989, 977
- [0301] 美国专利 5, 021, 236
- [0302] 美国专利 5, 160, 974
- [0303] 美国专利 5, 302, 523
- [0304] 美国专利 5, 322, 783
- [0305] 美国专利 5, 384, 253
- [0306] 美国专利 5, 464, 765
- [0307] 美国专利 5, 478, 722
- [0308] 美国专利 5, 538, 877
- [0309] 美国专利 5, 538, 880
- [0310] 美国专利 5, 550, 318
- [0311] 美国专利 5, 563, 055
- [0312] 美国专利 5, 567, 326
- [0313] 美国专利 5, 580, 859
- [0314] 美国专利 5, 589, 466
- [0315] 美国专利 5, 610, 042
- [0316] 美国专利 5, 656, 610
- [0317] 美国专利 5, 702, 932
- [0318] 美国专利 5, 736, 524
- [0319] 美国专利 5, 779, 907
- [0320] 美国专利 5, 780, 448
- [0321] 美国专利 5, 789, 215
- [0322] 美国专利 5, 824, 520
- [0323] 美国专利 5, 843, 650
- [0324] 美国专利 5, 846, 709
- [0325] 美国专利 5, 846, 783

- [0326] 美国专利 5,849,497
- [0327] 美国专利 5,849,546
- [0328] 美国专利 5,849,547
- [0329] 美国专利 5,858,652
- [0330] 美国专利 5,866,366
- [0331] 美国专利 5,882,864
- [0332] 美国专利 5,912,148
- [0333] 美国专利 5,916,776
- [0334] 美国专利 5,916,779
- [0335] 美国专利 5,922,574
- [0336] 美国专利 5,928,905
- [0337] 美国专利 5,928,906
- [0338] 美国专利 5,932,451
- [0339] 美国专利 5,935,825
- [0340] 美国专利 5,939,291
- [0341] 美国专利 5,942,391
- [0342] 美国专利 5,945,100
- [0343] 美国专利 5,981,274
- [0344] 美国专利 5,994,624
- [0345] 美国专利 7,094,571
- [0346] 美国专利 7,094,571
- [0347] 美国专利公布 20030180937
- [0348] 美国专利公布 20030219870
- [0349] 美国专利公布 20050260736
- [0350] 美国专利公布 20060173170
- [0351] Abbondanzo 等, *Breast Cancer Res. Treat.*, 16 :182(151), 1990。
- [0352] Ahouse 等, *J. Immunol.*, 151 :6076-6088, 1993。
- [0353] Allen 和 Seed, *Nucleic Acids Res.*, 16 :11824, 1988。
- [0354] Andersen 等, *Eur. J. Immunol.*, 36 :3044-3051, 2006。
- [0355] Andersen 等, *Eur. J. Immunol.*, 36 :3044-3051, 2006。
- [0356] *Antibodies :A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988
- [0357] Atherton 等, *Biol. Reprod.*, 32(1) :155-171, 1985。
- [0358] Ausubel 等, In :*Current Protocols in Molecular Biology*, John, Wiley & Sons, Inc, NY, 1994。
- [0359] Baneyx 和 Mujacic, *Nat. Biotechnol.*, 22 :1399-1408, 2004。
- [0360] Bellus, *J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem.*, A31(1) :1355-1376, 1994。
- [0361] Berntzen 等, *J. Immunol. Methods*, 298 :93-104, 2005。
- [0362] Berntzen 等, *J. Immunol. Methods*, 298 :93-104, 2005。
- [0363] Berntzen 等, *J. Immunol. Methods*, 298 :93-104, 2005。

- [0364] Better 等, *Science*, 240 :1041-10433, 1988。
- [0365] Bocek 和 Pecht, *FEBS Lett.* , 331, 86-90, 1993。
- [0366] Boeke 等, *Mol. Gen. Genet.* , 186, 1982。
- [0367] Boss 等, *Nucleic Acids Res.* , 12 :3791-3806, 1984。
- [0368] Bowden 和 Georgiou, *J. Biol. Chem.* , 265 :16760-16766, 1990。
- [0369] Bukau 等, *J. Bacteriol.* , 163 :61, 1985。
- [0370] Burman 等, *J. Bacteriol.* , 112 :1364, 1972。
- [0371] Cabilly 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81 :3273-3277, 1984。
- [0372] Carbonelli 等, *FEMS Microbiol Lett.* , 177 :75-82. 1999
- [0373] Chames 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97 :7969-7974, 2000。
- [0374] Chen 和 Okayama, *Mol. Cell Biol.* , 7 (8) :2745-2752, 1987。
- [0375] Cocea, *Biotechniques*, 23 (5) :814-816, 1997。
- [0376] Collins 等, *Immunogenetics*, 45 :440-443, 1997。
- [0377] Daugherty 等, *Protein Eng.* , 12 :613621, 1999。
- [0378] De Jager 等, *Semin. Nucl. Med.* , 23 (2) :165-179, 1993。
- [0379] de Kruif 和 Logtenberg, *J. Biol. Chem.* , 271 :7630-7634, 1996。
- [0380] Decad 和 Nikaido, *J. Bacteriol.* , 128 :325, 1976。
- [0381] Desai 等, *Cancer Res.* , 58 :2417-2425, 1998。
- [0382] Dholakia 等, *J. Biol. Chem.* , 264 (34) :20638-20642, 1989。
- [0383] Doolittle 和 Ben-Zeev, *Methods Mol Biol*, 109 :215-237, 1999。
- [0384] Eigenbrot 等, *J. Molec. Biol.* , 229 :969-995, 1993。
- [0385] Elbein 等, *Glycobiology*, 13 :17R-27, 2003。
- [0386] 欧洲申请 320308
- [0387] 欧洲申请 329822
- [0388] Fahnestock 等, *J. Bacteriol.* , 167 :870-880, 1986。
- [0389] Farmer 等, *FEMS Microbiol. Lett.* , 176 :11, 1999。
- [0390] Fechheimer, 等, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 84 :8463-8467, 1987。
- [0391] Fraley 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76 :3348-3352, 1979。
- [0392] Francisco 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 :10444-10448, 1993。
- [0393] Frohman, In :*PCR Protocols :A Guide To Methods And Applications*, Academic Press, N. Y. , 1990。
- [0394] Fromant 等, *Analytical Biochem.* , 224 :347-353, 1995。
- [0395] Fromant 等, *Analytical Biochem.* , 224 :347-353, 1995。
- [0396] Fromant 等, *Analytical Biochemistry*, 224 :347-353, 1995。
- [0397] Garinot-Schneider 等, *J. Mol. Biol.* , 260 :731-742, 1996。
- [0398] GB 申请 2 202 328
- [0399] Georgiou 和 Segatori, *Current Opin. Biotech.* , 16 :538-545, 2005。
- [0400] Ghetie 和 Ward, *Annu. Rev. Immunol.* , 18 :739-766, 2000。
- [0401] Ghetie 和 Ward, *Annu. Rev. Immunol.* , 18 :739-766, 2000。

- [0402] Gomi 等, *J. Immunol.*, 144 :4046-4052, 1990。
- [0403] Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5 :1188-1190, 1985。
- [0404] Graham 和 Van Der Eb, *Virology*, 52 :456-467, 1973。
- [0405] Griffiths 和 Duncan, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 9 :102-108, 1998。
- [0406] Gulbis 和 Galand, *Hum. Pathol.*, 24(12) :1271-1285, 1993。
- [0407] Guzman 等, *J. Bacteriol.*, 177 :4121-30, 1995。
- [0408] Guzman 等, *J. Bacteriol.*, 177 :4121-4130, 1995。
- [0409] Halloran 等, *J. Immunol.*, 153 :2631-2641, 1994。
- [0410] Harland 和 Weintraub, *J. Cell Biol.*, 101(3) :1094-1099, 1985。
- [0411] Harvey 等, *J. Immunol. Methods*, 308 :43-52, 2006。
- [0412] Harvey 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 9193-9198, 2004。
- [0413] Hayhurst 等, *J. Immunol. Methods*, 276 :185-196, 2003。
- [0414] Hayhurst 等, *J. Immunol. Methods*, 276 :185-196, 2003。
- [0415] Hayhurst 等, *J. Immunol. Methods*, 276 :185-196, 2003。
- [0416] Hobot 等, *J. Bacteriol.*, 160 :143, 1984。
- [0417] Hoogenboom 和 Winter, *J. Mol. Biol.*, 227 :381-388, 1992。
- [0418] Hoogenboom 等, *Immunotechnology.*, 4 :1-20, 1998。
- [0419] Hoover 和 Lubkowski, *Nucl. Acids Res.*, 30 :e43, 2002。
- [0420] Hoover 和 Lubkowski, *Nucleic Acids Res.*, 30 :e43, 2002。
- [0421] Innis 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85(24) :9436-9440, 1988。
- [0422] Irvin 等, *J. Bacteriol.*, 145 :1397, 1981。
- [0423] Jefferis, *Biotechnol. Prog.*, 21 :11-16, 2005。
- [0424] Jeong 和 Lee, *Appl. Environ. Microbiol.*, 69 :1295-1298, 2003。
- [0425] Jeong 和 Lee, *Appl. Environ. Microbiol.*, 69 :1295-1298, 2003。
- [0426] Jouenne 和 Junter, *FEMS Microbiol. Lett.*, 56 :313, 1990。
- [0427] Jung 等, *Biotechnol Bioeng*, 98 :39-47, 2007
- [0428] Jung 等, *Biotechnol. Bioeng.*, 98 :39-47, 2007。
- [0429] Jung 等, *Biotechnol. Bioeng.*, 98 :39-47, 2007。
- [0430] Jung 等, *Protein Expr. Purif.*, 31 :240-246, 2003。
- [0431] Kabat 等, In :*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U. S. Dept. Health and Hum. Serv., Bethesda, Md., 1991。
- [0432] Kabat 等, In :*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U. S. Dept. of Health and Hum. Serv., Bethesda, 1991。
- [0433] Kaeppler 等, *Plant Cell Reports*, 9 :415-418, 1990。
- [0434] Kaneda 等, *Science*, 243 :375-378, 1989。
- [0435] Kato 等, *J. Biol. Chem.*, 266 :3361-3364, 1991。
- [0436] Kawarasaki 等, *Nucleic Acids Res.*, 31 :e126, 2003。
- [0437] Kawarasaki 等, *Nucleic Acids Res.*, 31 :e126, 2003。
- [0438] Khatoon 等, *Ann. Neurol*, 26(2) :210-215, 1989。

- [0439] Kim 等, *Eur. J. Immunol.*, 24 :2429-2434, 1994。
- [0440] King 等, *J. Biol. Chem.*, 264(17) :10210-10218, 1989。
- [0441] Kipriyanov 和 Little, *Mol. Biotechnol.*, 12 :173-201, 1999。
- [0442] Kjaer 等, *FEBS Lett.*, 431 :448-452, 1998。
- [0443] Knight 等, *Mol. Immunol.*, 32 :1271-1281, 1995。
- [0444] Kohler 和 Milstein, *Nature*, 256 :495-497, 1975。
- [0445] Kouzarides 和 Ziff, *Nature*, 336 :646-6451, 1988。
- [0446] Kuroda 等, *Lancet.*, 357 :1225-1240, 2001。
- [0447] Kwoh 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86 :1173, 1989。
- [0448] Labischinski 等, *J. Bacteriol.*, 162 :9, 1985。
- [0449] Landschulz 等, *Science*, 240 :1759-1764, 1988。
- [0450] Lazar 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103 :4005-4010, 2006。
- [0451] Lazar 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103 :4005-4010, 2006。
- [0452] Lei 等, *J. Bacteriol.*, 169 :4379-4383, 1987。
- [0453] Levenson 等, *Hum. Gene Ther.*, 9(8) :1233-1236, 1998。
- [0454] Li 等, *J. Mol. Biol.*, 337 :743-759, 2004。
- [0455] Maniatis, 等, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1988。
- [0456] Marciano 等, *Science*, 284 :1516, 1999。
- [0457] Masaki 等, *Nucleic Acids Res.*, 13 :1623-1635, 1985。
- [0458] Mazor 等, *Nat. Biotech.*, 25(5) :563-565, 2007。
- [0459] Mazor 等, *Nat. Biotech.*, 25 :563-5, 2007。
- [0460] Munson 和 Pollard, *Anal. Biochem.*, 107 :220, 1980。
- [0461] Nagaoka 和 Akaike, *Protein Engineering*, 16 :243-245, 2003。
- [0462] Nicolau 和 Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721 :185-190, 1982。
- [0463] Nicolau 等, *Methods Enzymol.*, 149 :157-176, 1987。
- [0464] Nikaido 和 Nakae, *Adv. Microb. Physiol.*, 20 :163, 1979。
- [0465] Nikaido 和 Vaara, *Microbiol. Rev.*, 49 :1, 1985。
- [0466] Nikaido, *J. Bacteriology*, 178(20) :5853-5859, 1996。
- [0467] O' Brien 等, *Protein Expr. Purif.*, 24 :43-50, 2002。
- [0468] Ober 等, *J. Immunol.*, 172 :2021-2029, 2004b。
- [0469] Ober 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101 :11076-11081, 2004a。
- [0470] Olsson 等, *Eur. J. Biochem.*, 168 :319-324, 1987。
- [0471] Orlandi 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86 :3833-3837, 1989。
- [0472] Osborn 等, *J. Biol. Chem.*, 247 :3973-3986, 1972。
- [0473] Owens 和 Haley, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 142(3) :964-971, 1987。
- [0474] Painbeni 等, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 94 :6712, 1997。
- [0475] Pavlou 和 Belsey, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 59 :389-396, 2005。
- [0476] PCT 申请 PCT/US87/00880

- [0477] PCT 申请 PCT/US89/01025
- [0478] PCT 申请 WO 88/10315
- [0479] PCT 申请 WO 89/06700
- [0480] PCT 申请 WO 90/07641
- [0481] PCT 申请 WO 93/06213
- [0482] PCT 申请 WO 94/09699
- [0483] PCT 申请 WO 95/06128
- [0484] Potrykus 等, *Mol. Gen. Genet.*, 199(2) :169-177, 1985。
- [0485] Potter 和 Haley, *Methods Enzymol*, 91 :613-633, 1983。
- [0486] Purvis 等, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71 :3761-3769, 2005。
- [0487] Raghavan 和 Bjorkman, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 12 :181-220, 1996。
- [0488] Rao 和 Torriani, *J. Bacteriol.*, 170, 5216, 1988。
- [0489] Ravetch 和 Perussia 等, *J. Exp. Med.*, 170 :481-497, 1989。
- [0490] Ravetch 等, *Science*, 234 :718-725, 1986。
- [0491] Rippe, 等, *Mol. Cell Biol.*, 10 :689-695, 1990。
- [0492] Rodewald, *J. Cell Biol.*, 71 :666-669, 1976。
- [0493] Ruhlmann 等, *FEBS Lett.*, 235 :262-266, 1988。
- [0494] Sambrook 等, In :*Molecular cloning :a laboratory manual*, 2nd Ed., ColdSpring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989。
- [0495] Sazinsky 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105 :20167-20172, 2008。
- [0496] Schierle 等, *J. Bacteriol.*, 185 :5706-5713, 2003。
- [0497] Sears 等, *J. Immunol.*, 144 :371-378, 1990。
- [0498] Sergina 和 Moasser, *Trends in Molec. Med.*, 13 :527-534, 2007。
- [0499] Sergina 和 Moasser, *Trends in Molec. Med.*, 13 :527-534, 2007。
- [0500] Shields 等, *J. Biol. Chem.*, 276 :6591-6604, 2001。
- [0501] Shuttleworth 等, *Gene*, 58(2-3) :283-295, 1987。
- [0502] Simister 和 Mostov, *Nature*, 337(6203) :184-187, 1989。
- [0503] Sondermann 等, *J. Mol. Biol.*, 309 :737-749, 2001。
- [0504] Stenberg 等, *Mol. Microbiol.*, 6 :1185-1194, 1992。
- [0505] Stengelin 等, *Embo J*, 7 :1053-1059, 1988。
- [0506] Stuart 等, *Embo J.*, 8 :3657-3666, 1989。
- [0507] Stuart 等, *J. Exp. Med.*, 166 :1668-1684, 1987。
- [0508] Tominaga 等, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 168 :683-689, 1990。
- [0509] Uhlen 等, *J. Biol. Chem.*, 259 :1695-702, 1984。
- [0510] Van Wielink 和 Duine, *Trends Biochem Sci.*, 15 :136, 1990。
- [0511] Wada 等, *J. Biol. Chem.*, 274 :17353-17357, 1999。
- [0512] Walker 等, *Nucleic Acids Res.*, 20(7) :1691-1696, 1992。
- [0513] Wong 等, *Gene*, 10 :87-94, 1980。
- [0514] Wright 和 Morrison, *Trends Biotech.*, 15 :26-32, 1997。

-
- [0515] Zeger 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87 :3425-3429, 1990。
[0516] Zhang 等, Immunogenetics, 39 :423-437, 1994。
[0517] Zhang 等, Microbiology, 144(Pt 4) :985-991, 1998。

[0001]

115284PCT-CN-ELLA序列表

序列表

<110> G·乔吉欧
S·T·郑
S·雷迪

<120> 免疫球蛋白FC多肽

<130> CLFR.P0330W0

<140> 未知

<141> 2010-06-29

<150> 61/221,999

<151> 2009-06-30

<160> 78

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 681

<212> DNA

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 1

```

gacaaaaactc acacatgccc accgtgcccga gcacctgaac tcttgggggg accgtcagtc      60
ttctcttctcc ccccaaaacc caaggacacc ctcctgatct cccggacccc tgaggteaca      120
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtea agttcaactg gtacgtggac      180
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac      240
cgtgtggtca gctctctcac cgtctctgac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag      300
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caagccaaa      360
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag      420
aaccaggtca gcctgacctg cctggcmeta ggcttctatc ccagegacat cgcctgtggg      480
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cacctcccgt gctggactcc      540
gacggctcct tcttctctc cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg      600
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc      660
ctctccctgt cccccggtaa a                                          681

```

<210> 2

<211> 227

<212> PRT

<213> 人

<400> 2

```

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

```

[0002]

115284PCT-CN-ELLA序列表

65	70	75	80
Arg Val Val Ser	Val Leu Thr Val Leu	His Gln Asp Trp Leu	Asn Gly
	85	90	95
Lys Glu Tyr	Lys Cys Lys Val Ser	Asn Lys Ala Leu Pro	Ala Pro Ile
	100	105	110
Glu Lys Thr	Ile Ser Lys Ala Lys Gly	Gln Pro Arg Glu	Pro Gln Val
	115	120	125
Tyr Thr Leu Pro	Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr	Lys Asn Gln Val Ser	
	130	135	140
Leu Thr Cys Leu	Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser	Asp Ile Ala Val Glu	
	145	150	155
Trp Glu Ser	Asn Gly Gln Pro Glu Asn	Asn Tyr Lys Thr Thr	Pro Pro
	165	170	175
Val Leu Asp	Ser Asp Gly Ser Phe Phe	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr	Val
	180	185	190
Asp Lys Ser	Arg Trp Gln Gln Gly Asn	Val Phe Ser Cys Ser Val	Met
	195	200	205
His Glu Ala Leu	His Asn His Tyr Thr Gln Lys	Ser Leu Ser Leu Ser	
	210	215	220

Pro Gly Lys
225

<210> 3
 <211> 681
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 3
 gacaaaaact acacatgccc accgtgccc geacctgaac tcttgggggg accgtcagtc 60
 ttctctttcc ccccaaaacc caaggacacc etcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120
 tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggta agttcaactg gtacgtggac 180
 ggctggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 240
 cgtgtggtea gtgtctcac egtectgca caggactggc tgaatggcaa ggagtacaaa 300
 tgcaaggtct ccaacaaagc cteccagcc cccatcgaga aaacctctc caaagccaaa 360
 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccct cccgggatga gctgaccaag 420
 aaccaggtca gectgacctg cctggtcaaa ggctttctate ccagegacat cgcctggag 480
 tgggtgagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cacctcccgt gctggactcc 540
 gacggetct tcttcteta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 600
 aacgtttct catgctccgt gatacatgag gctctgcaca accactacac gcagaagage 660
 ctctcctgt ccccggtaa a 681

<210> 4

[0003]

115284PCT-CN-ELLA序列表

<211> 227
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 4
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160
 Trp Val Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Ile
 195 200 205
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220
 Pro Gly Lys
 225
 <210> 5
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 5
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15

[0004]

115284PCT-CN-ELLA序列表

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

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

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Arg Ala Lys Val Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160

Trp Val Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Ile
 195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

Pro Gly Lys
 225

<210> 6
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 6

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

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

[0005]

115284PCT-CN-ELLA序列表

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asp Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asp Gly
 85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Asn Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160

Trp Val Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Ile
 195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

Pro Gly Lys
 225

<210> 7
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 7

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

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

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

[0006]

115284PCT-CN-ELLA序列表

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Asn Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160
 Trp Val Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Ile
 195 200 205
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220
 Pro Gly Lys
 225
 <210> 8
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 8
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110

[0007]

115284PCT-CN-ELLA序列表

Glu Lys Thr Ile Ser Ile Ala Asn Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Val Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Ile
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 9
<211> 227
<212> PRT
<213> 人

<400> 9

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

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

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Gln Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

[0008]

115284PCT-CN-ELLA序列表

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Asp Val Glu
145 150 155 160

Trp Val Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Ile
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 10
<211> 227
<212> PRT
<213> 人

<400> 10

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

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

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Ser Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Asn Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Val Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

[0009]

115284PCT-CN-ELLA序列表

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Ile
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 11
<211> 227
<212> PRT
<213> 人

<400> 11

Asp Lys Thr Tyr Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

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

Lys Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Ser Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Val Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Val Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Ile
195 200 205

[0010]

115284PCT-CN-ELLA序列表

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 12
<211> 227
<212> PRT
<213> 人

<400> 12

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

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

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Val Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Val Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Glu Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Ile
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

[0011]

115284PCT-CN-ELLA序列表

<210> 13
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 13
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110
 Glu Lys Thr Ile Ser Arg Ala Lys Val Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160
 Trp Val Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Leu Cys Ser Val Ile
 195 200 205
 His Glu Ala Leu His Asp His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220
 Pro Gly Lys
 225
 <210> 14
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 14

[0012]

115284PCT-CN-ELLA序列表

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Leu Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Val Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160
 Trp Val Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Ile
 195 200 205
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220
 Pro Gly Lys
 225
 <210> 15
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 15
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

[0013]

115284PCT-CN-ELLA序列表

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Val Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160
 Trp Val Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Ile
 195 200 205
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220
 Pro Gly Lys
 225
 <210> 16
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 16
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asp Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60

[0014]

115284PCT-CN-ELLA序列表

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Val Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160
 Trp Val Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Ile
 195 200 205
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220
 Pro Gly Lys
 225
 <210> 17
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 17
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95

[0015]

115284PCT-CN-ELLA序列表

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Val Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140

Leu Thr Cys Leu Ala Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160

Trp Val Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Ile
 195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

Pro Gly Lys
 225

<210> 18
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 18

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

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

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60

His Asp Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Val Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125

[0016]

115284PCT-CN-ELLA序列表

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160

Trp Val Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Ile
 195 200 205

His Glu Ala Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

Pro Gly Lys
 225

<210> 19
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 19

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

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

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Ser Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Val Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160

[0017]

115284PCT-CN-ELLA序列表

Trp Val Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Ile
 195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

Pro Gly Lys
 225

<210> 20
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 20

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

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

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Cys
 65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Val Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160

Trp Val Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190

[0018]

115284PCT-CN-ELLA序列表

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Ile
 195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

Pro Gly Lys
 225

<210> 21
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 21

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

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

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Val Gln Pro Arg Glu Pro Gln Met
 115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160

Trp Val Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Ile
 195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

[0019]

115284PCT-CN-ELLA序列表

Pro Gly Lys
225

<210> 22
<211> 227
<212> PRT
<213> 人

<400> 22

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

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

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Val Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Ile
 195 200 205

His Glu Ala Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 23
<211> 227
<212> PRT

[0020]

115284PCT-CN-ELLA序列表

<213> 人
 <400> 23
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Met Ser His
 35 40 45
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160
 Trp Val Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Ile
 195 200 205
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220
 Pro Gly Lys
 225
 <210> 24
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 24
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15

[0021]

115284PCT-CN-ELLA序列表

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Met Ser His
 35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Arg Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Trp Pro Val Ala Tyr
 100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160

Trp Val Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Ile
 195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

Pro Gly Lys
 225

<210> 25
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 25

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Met Ser His
 35 40 45

[0022]

115284PCT-CN-ELLA序列表

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Met Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Trp Pro Glu Glu Tyr
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Val Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Ile
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 26
<211> 227
<212> PRT
<213> 人

<400> 26

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Met Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

[0023]

115284PCT-CN-ELLA序列表

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Trp Pro Glu Glu Tyr
 100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160

Trp Val Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Ile
 195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

Pro Gly Lys
 225

<210> 27
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 27

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Met Ser His
 35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Trp Pro Glu Val Tyr
 100 105 110

[0024]

115284PCT-CN-ELLA序列表

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160

Trp Val Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Thr Val Ile
 195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

Pro Gly Lys
 225

<210> 28
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 28

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Met Ser His
 35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Trp Pro Glu Val Tyr
 100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140

[0025]

115284PCT-CN-ELLA序列表

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160

Trp Val Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Ile
 195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

Pro Gly Lys
 225

<210> 29
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 29

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Met Ser His
 35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Trp Pro Ile Glu Tyr
 100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160

Trp Val Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

[0026]

115284PCT-CN-ELLA序列表

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Ile
 195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

Pro Gly Lys
 225

<210> 30
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 30

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Met Ser His
 35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Trp Pro Glu Pro Tyr
 100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160

Trp Val Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Ile
 195 200 205

[0027]

115284PCT-CN-ELLA序列表

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

Pro Gly Lys
 225

<210> 31
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 31

Asp Lys Thr Arg Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Phe Met
 20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Met Ser His
 35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Trp Pro Val Ser Tyr
 100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160

Trp Val Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Ile
 195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

Pro Gly Lys
 225

[0028]

115284PCT-CN-ELLA序列表

<210> 32		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> 人		
<400> 32		
ttgtgagcgg ataacaattt c		21
<210> 33		
<211> 27		
<212> DNA		
<213> 人		
<400> 33		
cgcagcaggg cccagccggc catggcg		27
<210> 34		
<211> 29		
<212> DNA		
<213> 人		
<400> 34		
cgcaattcga attcgcccc cgaggcccc		29
<210> 35		
<211> 27		
<212> DNA		
<213> 人		
<400> 35		
caattttgtc agccgcctga gcagaag		27
<210> 36		
<211> 33		
<212> DNA		
<213> 人		
<400> 36		
gcggaattcc catggcggat attcaaatga ccc		33
<210> 37		
<211> 50		
<212> DNA		
<213> 人		
<400> 37		
cagacgcgct taaagaagac gggetttggg tcatttgaat atccgccatg		50
<210> 38		
<211> 50		
<212> DNA		
<213> 人		
<400> 38		
cgctctcttt aagcgcgtct gtcggtgatc gcgtgacat cactgtctgt		50
<210> 39		
<211> 50		
<212> DNA		
<213> 人		
<400> 39		
aggccaccgc cgtattaaca tcttgctcg cagcacagt gatggtcacg		50
<210> 40		
<211> 50		
<212> DNA		

[0029]

115284PCT-CN-ELLA序列表

<213> 人	
<400> 40	
gttaatacgg cggtagcctg gtagcaaaa aaaccggta aagccccgaa	50
<210> 41	
<211> 50	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 41	
gagtagcaga agctggcctg gtagattaac agcttgggg ctttaccgg	50
<210> 42	
<211> 50	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 42	
cagcggcagc ttctgtaet ctggcgtccc gaccgcctt tcggcagcc	50
<210> 43	
<211> 50	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 43	
tgctaattgt cagcgtgaag tccgtaccgc tggcgtgcc agaaaagcg	50
<210> 44	
<211> 50	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 44	
acttcacgct gaccattage agcctgcage eggaggattt egccacctat	50
<210> 45	
<211> 50	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 45	
tggcgggtg gtgtagtct gctgacaata ataggtggcg aaatcctccg	50
<210> 46	
<211> 50	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 46	
actacaccac cccgccaaac ttggccagg gtacgaaagt ggagattaaa	50
<210> 47	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 47	
gacagatggt gggcggcgg tgcgtttaat ctccacttcc gtaccctgg	49
<210> 48	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 48	

[0030]

		115284PCT-CN-ELLA序列表	
	attgttattg ctagecgetc agccggcaat ggcg		34
<210>	49		
<211>	50		
<212>	DNA		
<213>	人		
<400>	49		
	accagaccac cgccagatc cactaattga acctccgcca ttgccgctg		50
<210>	50		
<211>	50		
<212>	DNA		
<213>	人		
<400>	50		
	tctggcggtg gtctgggtgca gccagcggt agcttacgtc tgagctgtgc		50
<210>	51		
<211>	50		
<212>	DNA		
<213>	人		
<400>	51		
	agtatcttt gatgttgaag ccagacgctg cacagctcag acgtaagcta		50
<210>	52		
<211>	50		
<212>	DNA		
<213>	人		
<400>	52		
	tctggttca acatcaaaga tacctacatt cattgggttc gccaaagccc		50
<210>	53		
<211>	50		
<212>	DNA		
<213>	人		
<400>	53		
	atagatacgg gccacccact ccaggccttt acctgggget tgccgaacce		50
<210>	54		
<211>	50		
<212>	DNA		
<213>	人		
<400>	54		
	gagtgggtgg cccgatctta tccaaccaat ggctacacgc gttatgcaga		50
<210>	55		
<211>	50		
<212>	DNA		
<213>	人		
<400>	55		
	gcgctaattgg tgaagcgcc tttcacagag tctgcataac gcgtgtagcc		50
<210>	56		
<211>	50		
<212>	DNA		
<213>	人		
<400>	56		
	ccgcttacc attagcgcg acacctctaa gaacaccgca tatttacaga		50

[0031]

115284PCT-CN-ELLA序列表

<210> 57		
<211> 50		
<212> DNA		
<213> 人		
<400> 57		
gtcctctgcg cgtaaagagt tcactgttaa atatgcgggtg ttcttagagg		50
<210> 58		
<211> 50		
<212> DNA		
<213> 人		
<400> 58		
aactctttac ggcagagga cacggcgggtg tactactgct ctcgttgggg		50
<210> 59		
<211> 50		
<212> DNA		
<213> 人		
<400> 59		
agtagtccat cgcgtagaaa cegtcaccgc cccaacgaga gcagtagtac		50
<210> 60		
<211> 50		
<212> DNA		
<213> 人		
<400> 60		
ggtttctacg cgatggacta ctggggtcag ggtacgctgg tcacggtcag		50
<210> 61		
<211> 36		
<212> DNA		
<213> 人		
<400> 61		
gcccttgaag ctgacagagc tgaccgtgac cagcgt		36
<210> 62		
<211> 64		
<212> DNA		
<213> 人		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (23)..(24)		
<223> n是a、c、g或t		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (26)..(27)		
<223> n是a、c、g或t		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (29)..(30)		
<223> n是a、c、g或t		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (35)..(36)		
<223> n是a、c、g或t		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (38)..(39)		
<223> n是a、c、g或t		

[0032]

115284PCT-CN-ELLA序列表

<400> 62		
cccaccgtgc ccagcacctg aannsnnsmn sggannsnns gtcttcctct tcccccaaa		60
acc		64
<210> 63		
<211> 64		
<212> DNA		
<213> 人		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (26)..(27)		
<223> n是a、c、g或t		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (29)..(30)		
<223> n是a、c、g或t		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (35)..(36)		
<223> n是a、c、g或t		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (38)..(39)		
<223> n是a、c、g或t		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (41)..(42)		
<223> n是a、c、g或t		
<400> 63		
gggttttggg gggaagagga agacsnnsmn tccsnnsnns nnttcaggtg ctgggcacgg		60
tggg		64
<210> 64		
<211> 62		
<212> DNA		
<213> 人		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (21)..(22)		
<223> n是a、c、g或t		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (24)..(25)		
<223> n是a、c、g或t		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (27)..(28)		
<223> n是a、c、g或t		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (30)..(31)		
<223> n是a、c、g或t		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (33)..(34)		
<223> n是a、c、g或t		

[0033]

115284PCT-CN-ELLA序列表

<400> 61		
cctgaggtca catgcgtggt nnsnnsnnsn nsnmngaaga cctgaggtc aagttcaact		60
gg		62
<210> 65		
<211> 62		
<212> DNA		
<213> 人		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (29)..(30)		
<223> n是a、c、g或t		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (32)..(33)		
<223> n是a、c、g或t		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (35)..(36)		
<223> n是a、c、g或t		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (38)..(39)		
<223> n是a、c、g或t		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (41)..(42)		
<223> n是a、c、g或t		
<400> 65		
ccagttgaac ttgacctcag ggtcttcsmn smnsnsmns nmaccacgca tgtgacctca		60
gg		62
<210> 66		
<211> 49		
<212> DNA		
<213> 人		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (20)..(21)		
<223> n是a、c、g或t		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (23)..(24)		
<223> n是a、c、g或t		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (26)..(27)		
<223> n是a、c、g或t		
<400> 66		
gccgcgggag gagcagtaen nsnsmnsta ccgtgtggtc agcgtcctc		49
<210> 67		
<211> 49		
<212> DNA		
<213> 人		
<220>		

[0034]

115284PCT-CN-ELLA序列表

<221>	misc_feature	
<222>	(23)..(24)	
<223>	n是a、c、g或t	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(26)..(27)	
<223>	n是a、c、g或t	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(29)..(30)	
<223>	n是a、c、g或t	
<400>	67	
	gaggacgctg accacacggt asnnsnnsnn gtactgctcc tcccgcggc	49
<210>	68	
<211>	67	
<212>	DNA	
<213>	人	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(26)..(27)	
<223>	n是a、c、g或t	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(29)..(30)	
<223>	n是a、c、g或t	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(32)..(33)	
<223>	n是a、c、g或t	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(35)..(36)	
<223>	n是a、c、g或t	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(38)..(39)	
<223>	n是a、c、g或t	
<400>	68	
	caagtgaag gtctccaaca aagccnnsnn snnsnnsns gagaaaacca tctccaaagc	60
	caaaggg	67
<210>	69	
<211>	67	
<212>	DNA	
<213>	人	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(29)..(30)	
<223>	n是a、c、g或t	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(32)..(33)	
<223>	n是a、c、g或t	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(35)..(36)	
<223>	n是a、c、g或t	

[0035]

115284PCT-CN-ELLA序列表

<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(38)..(39)		
<223>	n是a、c、g或t		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(41)..(42)		
<223>	n是a、c、g或t		
<400>	69		
	ccctttgget ttggagatgg ttttctcsnn snnsnnsnns nnggetttgt tggagacctt	60	
	gcacttg	67	
<210>	70		
<211>	64		
<212>	DNA		
<213>	人		
<400>	70		
	cgcagcgagg cccagccggc catggcggac aaaactcaca catgcccacc gtgccagca	60	
	cctg	64	
<210>	71		
<211>	67		
<212>	DNA		
<213>	人		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(26)..(27)		
<223>	n是a、c、g或t		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(29)..(30)		
<223>	n是a、c、g或t		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(32)..(33)		
<223>	n是a、c、g或t		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(35)..(36)		
<223>	n是a、c、g或t		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(38)..(39)		
<223>	n是a、c、g或t		
<400>	71		
	caagtgcaag gtctccaaca aagccnnsnn snnsnnsnns gagaaaacca tctccaaagc	60	
	caaaggg	67	
<210>	72		
<211>	67		
<212>	DNA		
<213>	人		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(29)..(30)		
<223>	n是a、c、g或t		

[0036]

115284PCT-CN-ELLA序列表

<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(32)..(33)		
<223>	n是a、c、g或t		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(35)..(36)		
<223>	n是a、c、g或t		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(38)..(39)		
<223>	n是a、c、g或t		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(41)..(42)		
<223>	n是a、c、g或t		
<400>	72		
	cccttggct tggagatgg tttctcsnn snsnnsnns nnggcttgt tggagacctt	60	
	gcacttg	67	
<210>	73		
<211>	64		
<212>	DNA		
<213>	人		
<400>	73		
	cgcagcgagg cccagccggc catggcggac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagea	60	
	cctg	64	
<210>	74		
<211>	49		
<212>	DNA		
<213>	人		
<400>	74		
	cgcagcgagg cccagccggc catggcggag gttcaattag tggaatctg	49	
<210>	75		
<211>	51		
<212>	DNA		
<213>	人		
<400>	75		
	cgcagcgagg cccagccggc catggcggat attcaaatga cccaaagccc g	51	
<210>	76		
<211>	49		
<212>	DNA		
<213>	人		
<400>	76		
	cgcaattcgg cccccgagc cccgactct cccctgttga agctctttg	49	
<210>	77		
<211>	28		
<212>	DNA		
<213>	人		
<400>	77		
	gacaaaactc acacatgcc accgtgcc	28	
<210>	78		

[0037]

115284PCT-CN-ELLA序列表

<211> 28
<212> DNA
<213> 人

<400> 78
ggcacggtgg gcatgtgtga gttttgtc

28

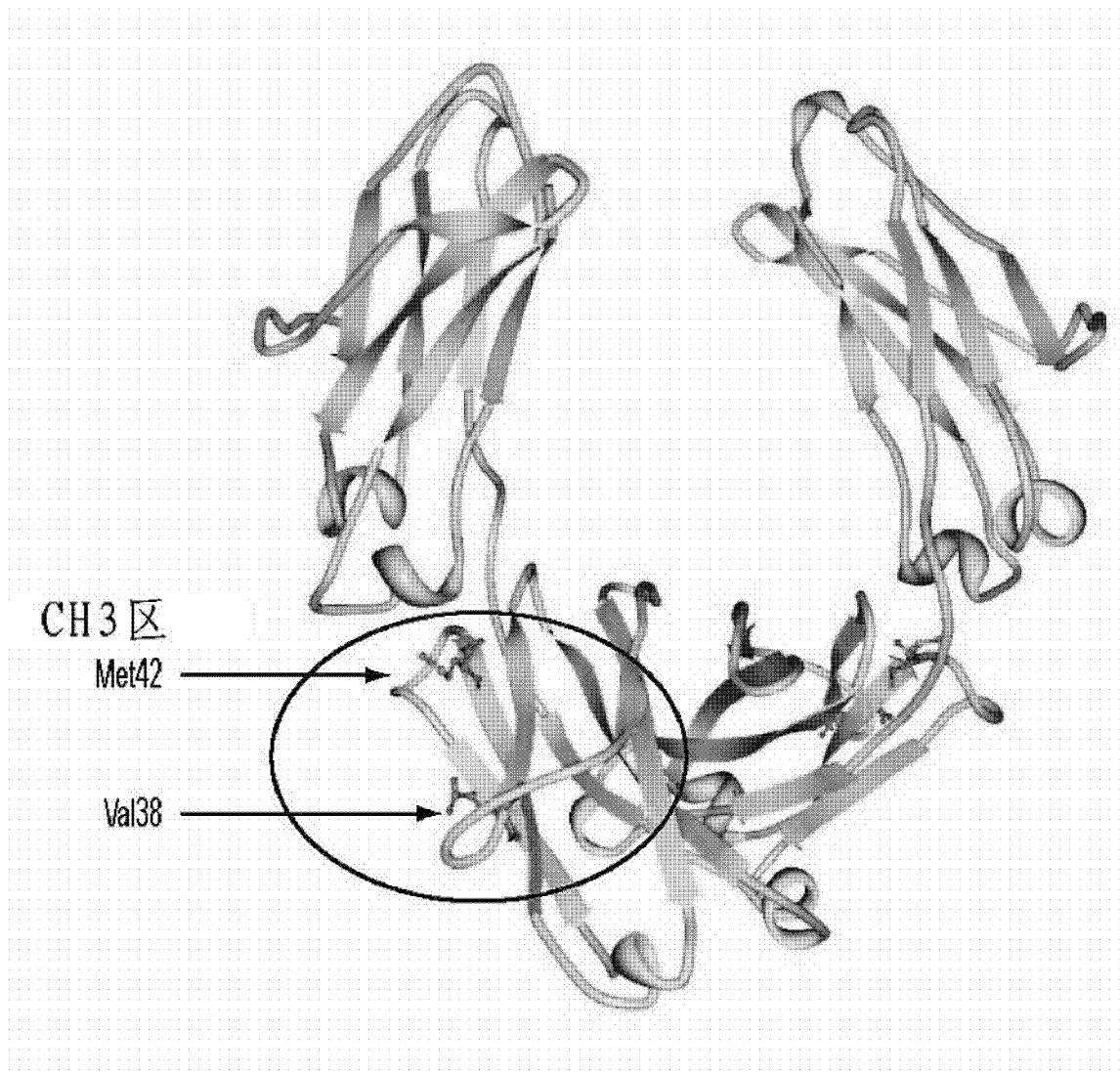


图 1

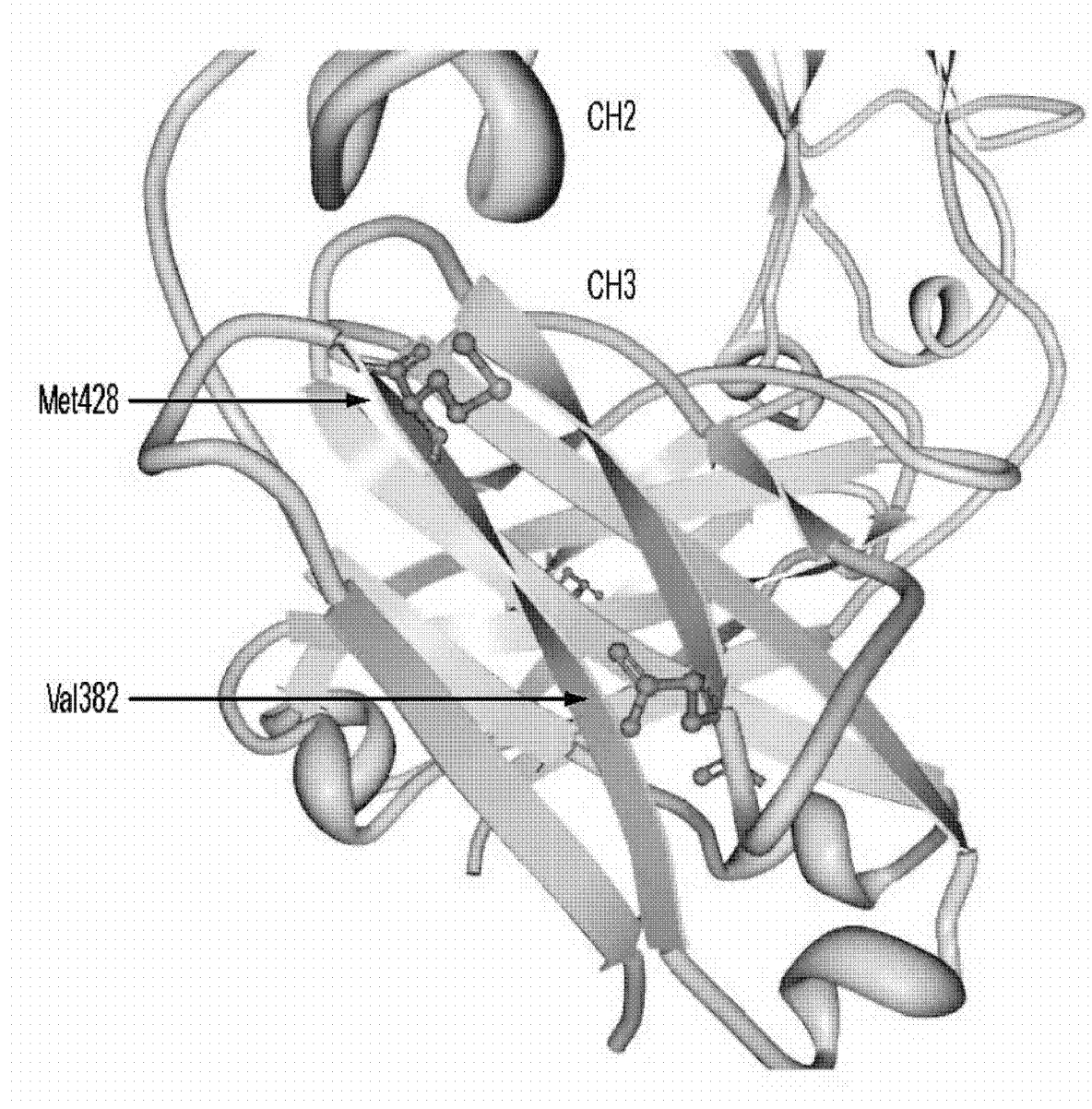


图 2

易错 PCR 文库 (Fc5 随机化)

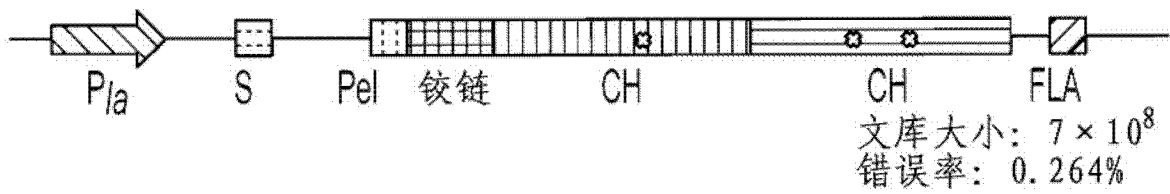


图 3

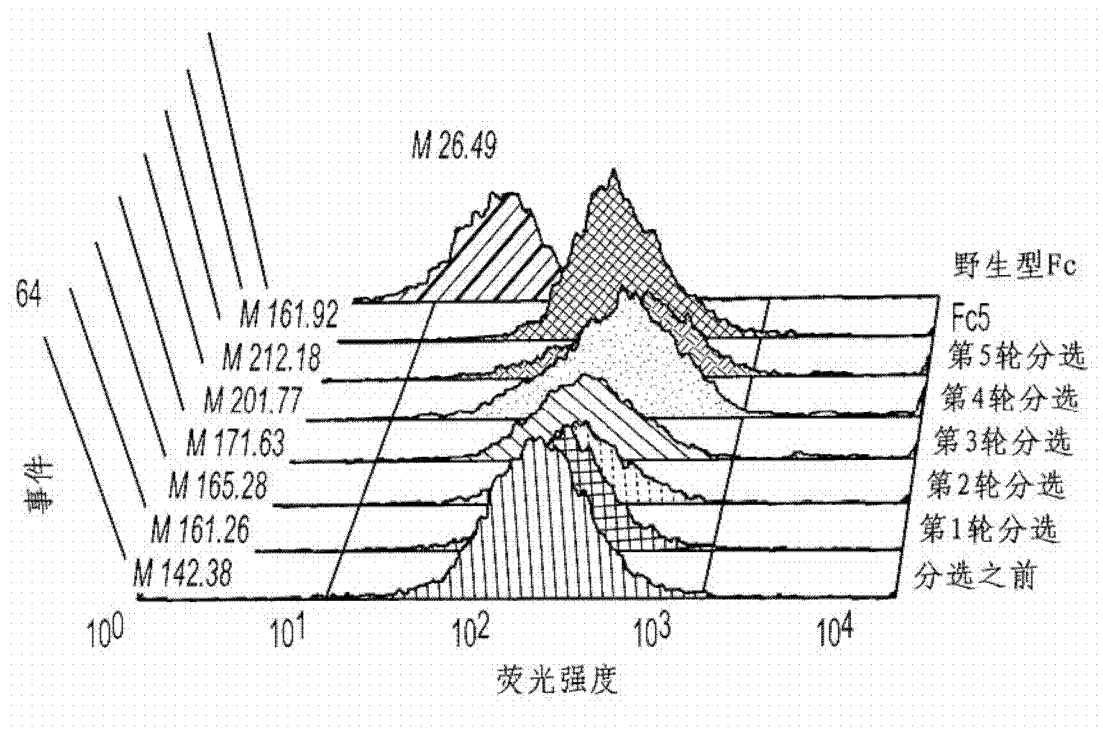


图 4

	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340
FcWT (26.12)	[DKTHTCPC]	[PAPELLGGPSVLFPPKPADTLMISRTPEVTCVVWDVSHEDPEKFWVVDGVEVHNAKTPREEQINSTRVVSVLTVLHODWLNKKEYKCVSNKALPAPLEKTSKAK										
Fc5 (161.20)	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]
Fc601 (401.57)	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]
Fc602 (268.03)	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]
Fc603 (223.76)	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]
Fc604 (203.60)	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]
Fc605 (265.60)	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]
Fc606 (356.32)	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]
Fc607 (350.94)	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]
Fc608 (347.13)	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]
Fc609 (338.85)	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]
Fc610 (325.74)	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]
Fc611 (315.97)	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]
Fc612 (310.79)	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]
Fc613 (299.59)	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]
Fc614 (269.14)	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]
Fc615 (241.44)	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]
Fc616 (210.56)	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]
Fc617 (206.22)	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]
Fc618 (222.06)	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]
Fc619 (181.17)	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]

CH2

铰链

至图 5B

图 5A

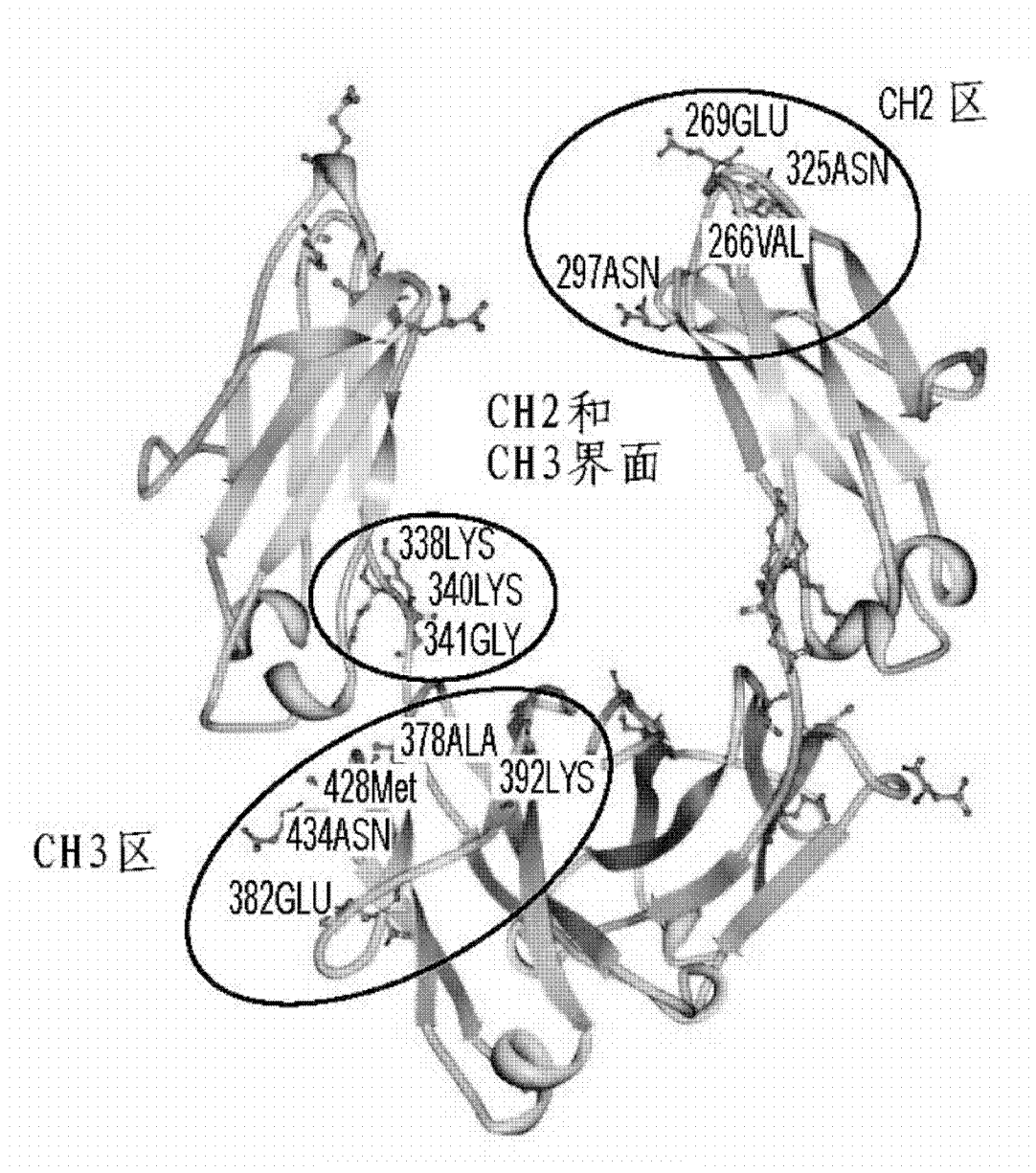


图 6

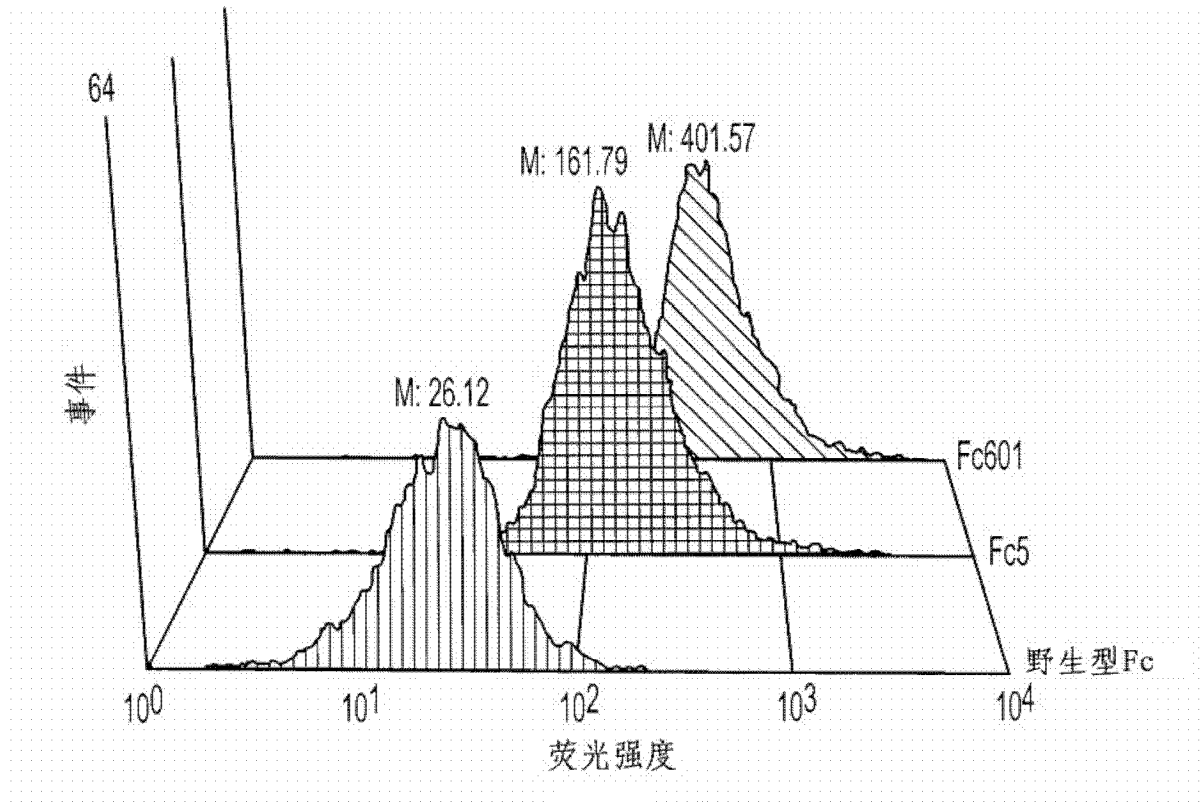


图 7

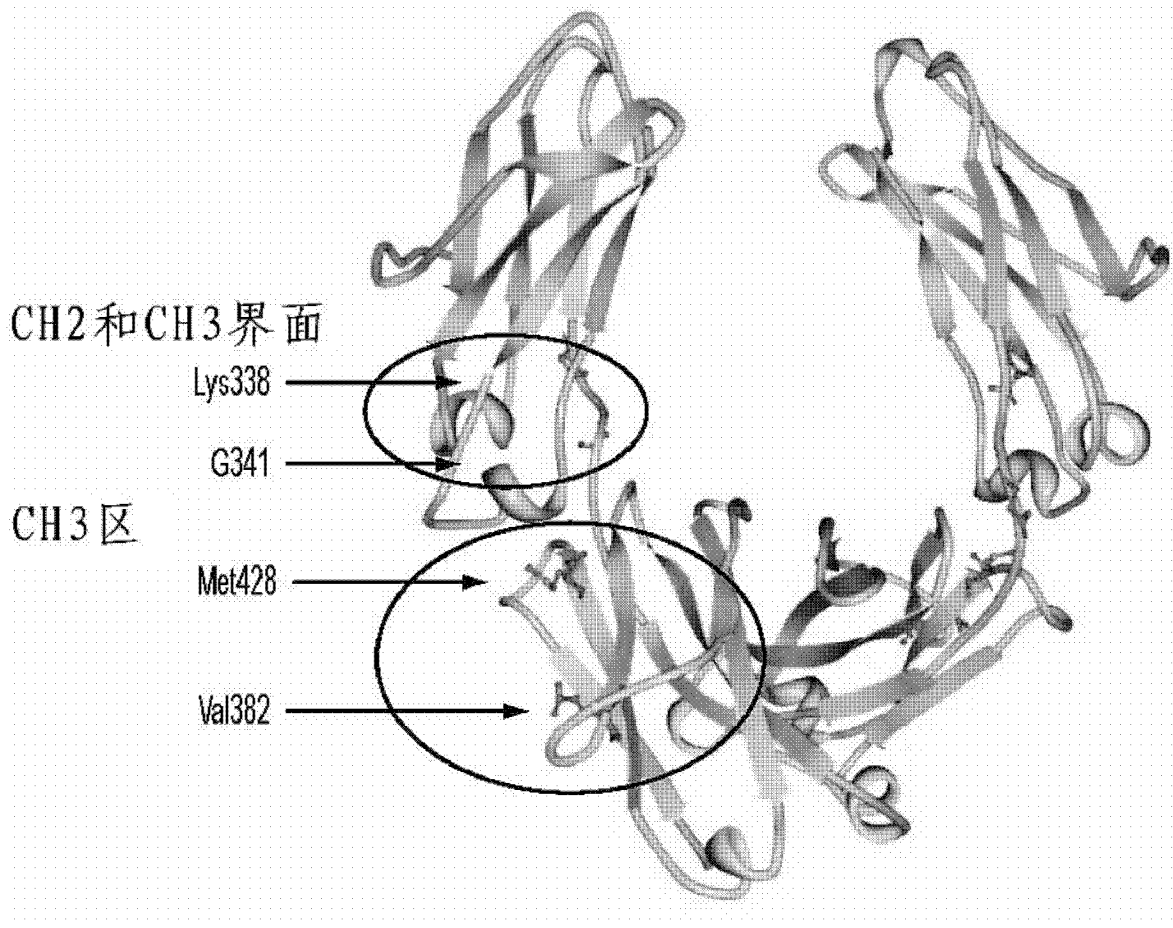


图 8

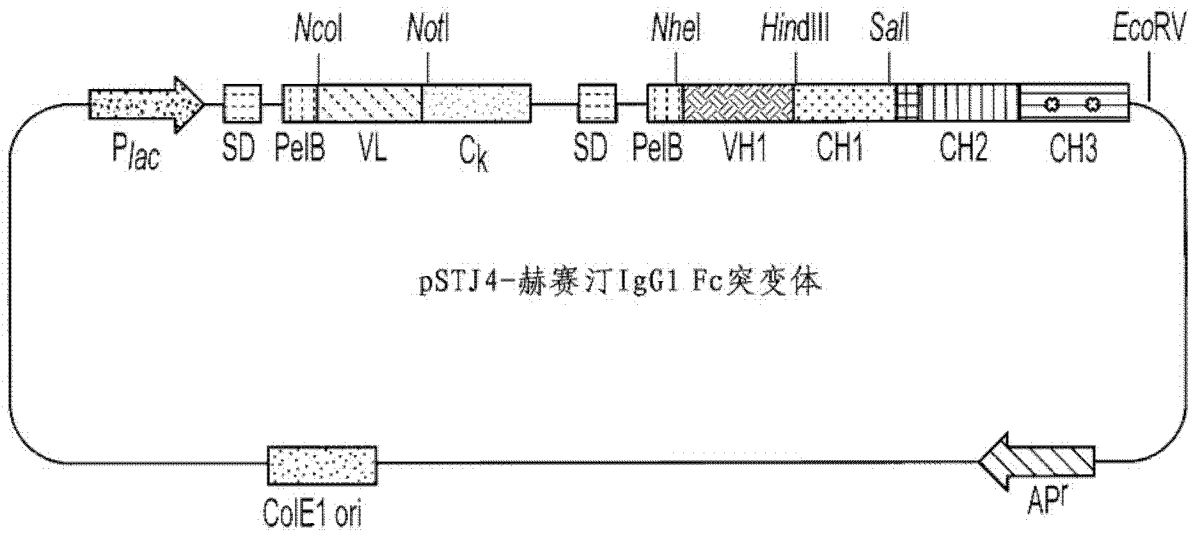


图 9

	$K_{ON} (M^{-1}秒^{-1})$	$K_{OFF} (秒^{-1})$	$K_D (nM)$	χ^2
无糖基化野生型曲妥珠单抗	1.31×10^5	5.02×10^{-2}	382	0.78
无糖基化曲妥珠单抗-Fc5	2.17×10^5	1.23×10^{-3}	5.69	0.78
无糖基化曲妥珠单抗-FC601	1.34×10^5	3.92×10^{-4}	2.92	1.42
糖基化赫赛汀	1.77×10^5	2.66×10^{-4}	1.5	2.74

图 10A

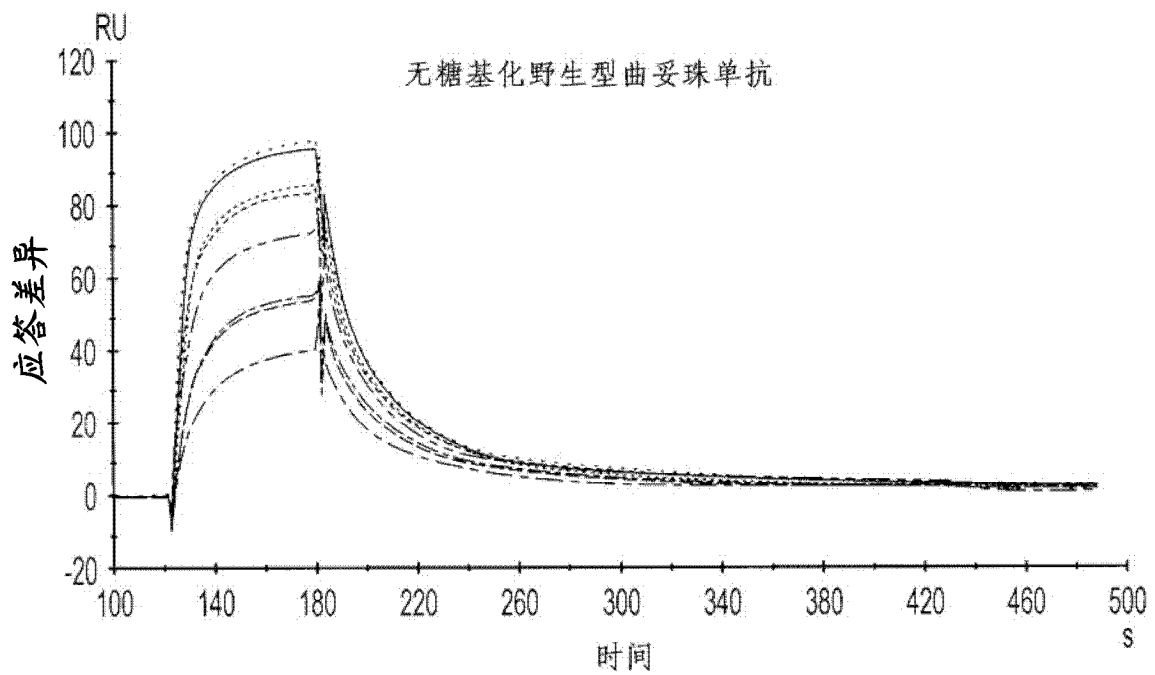


图 10B

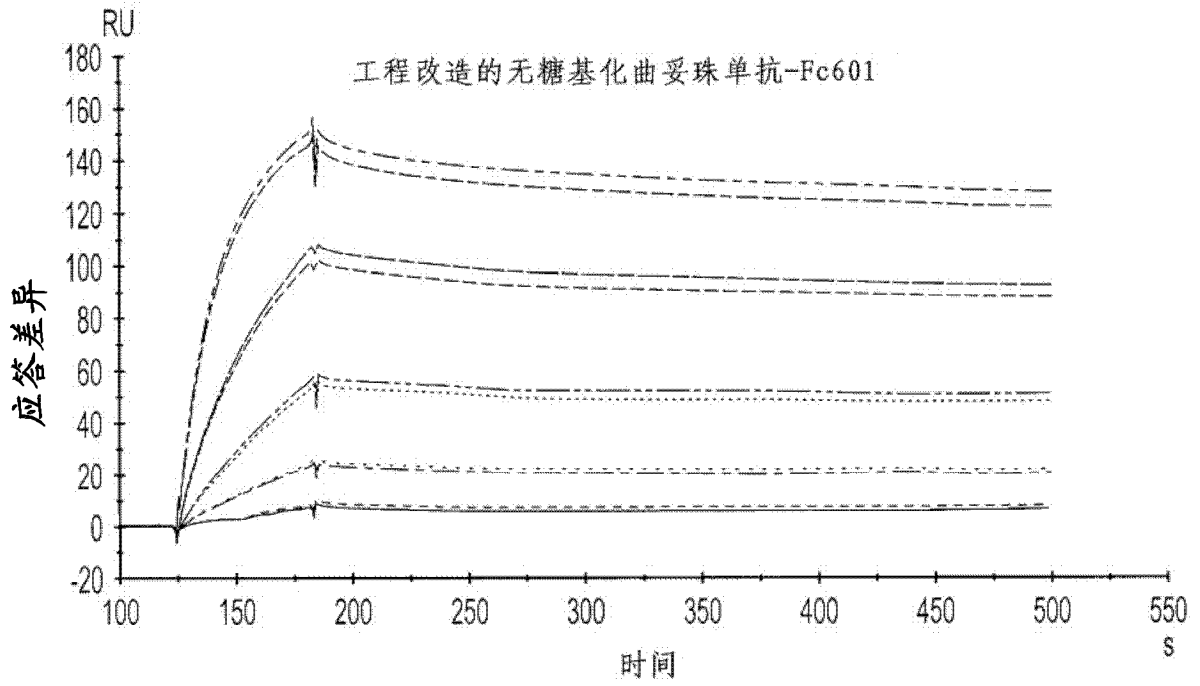


图 10C

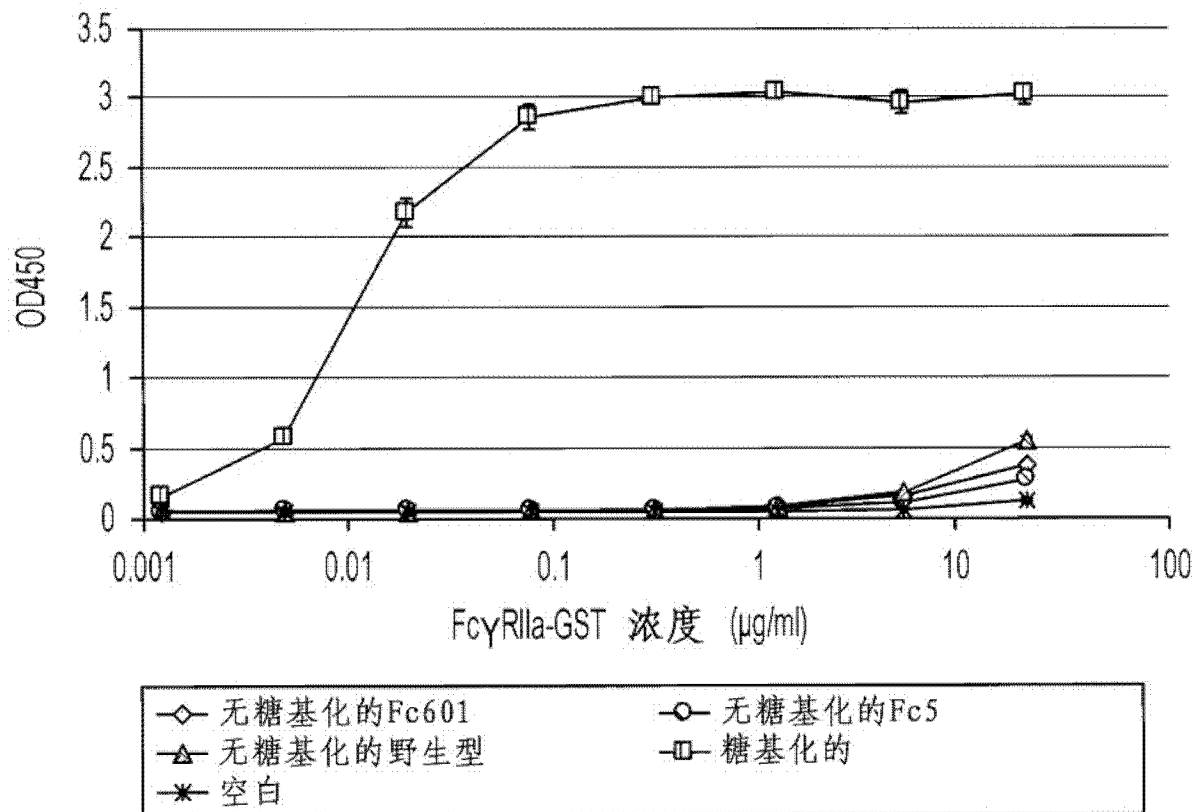


图 11

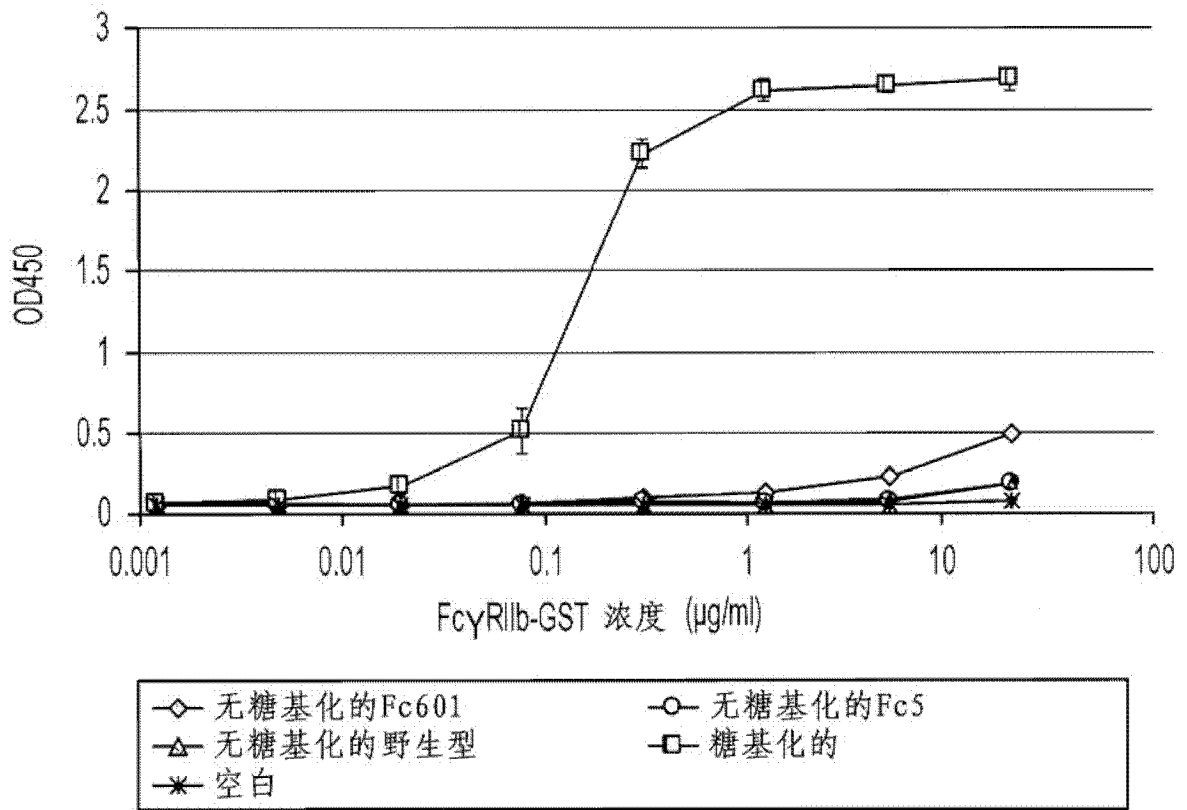


图 12

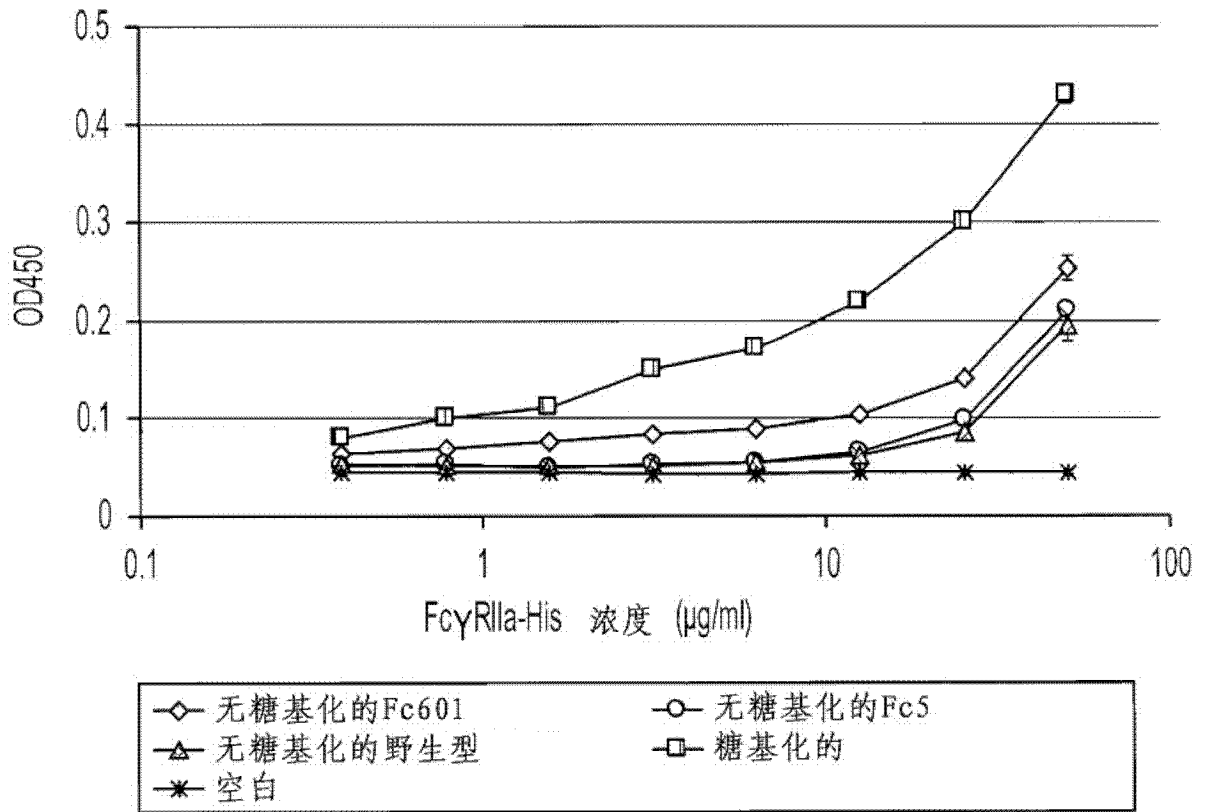


图 13

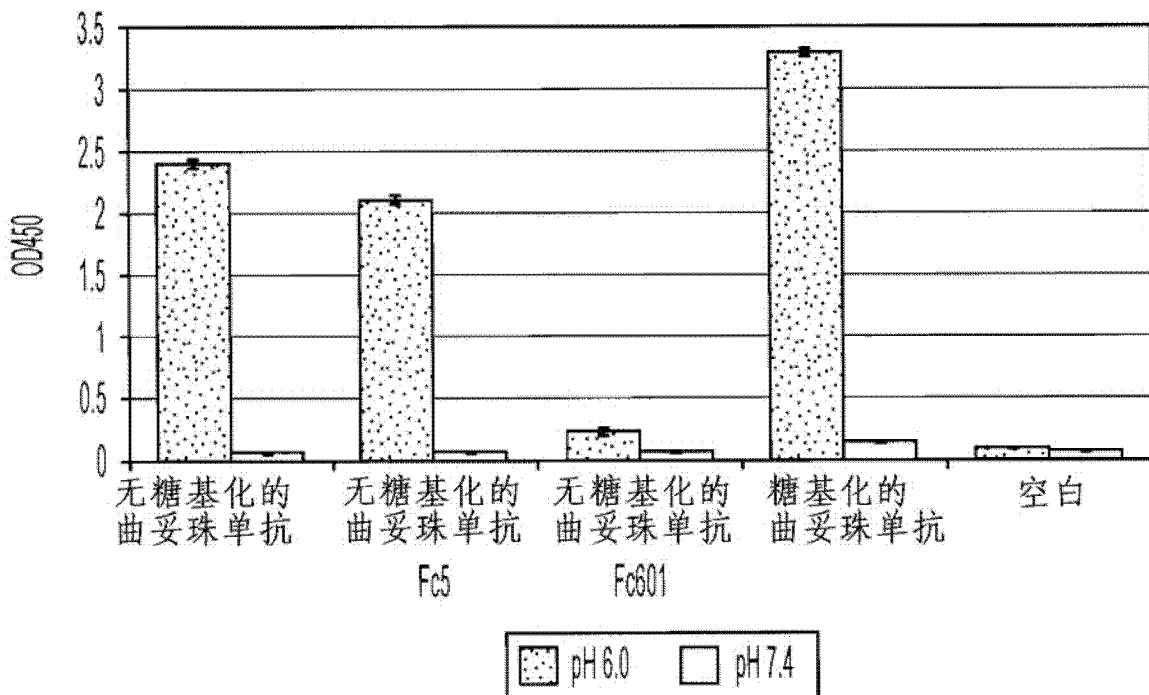


图 14

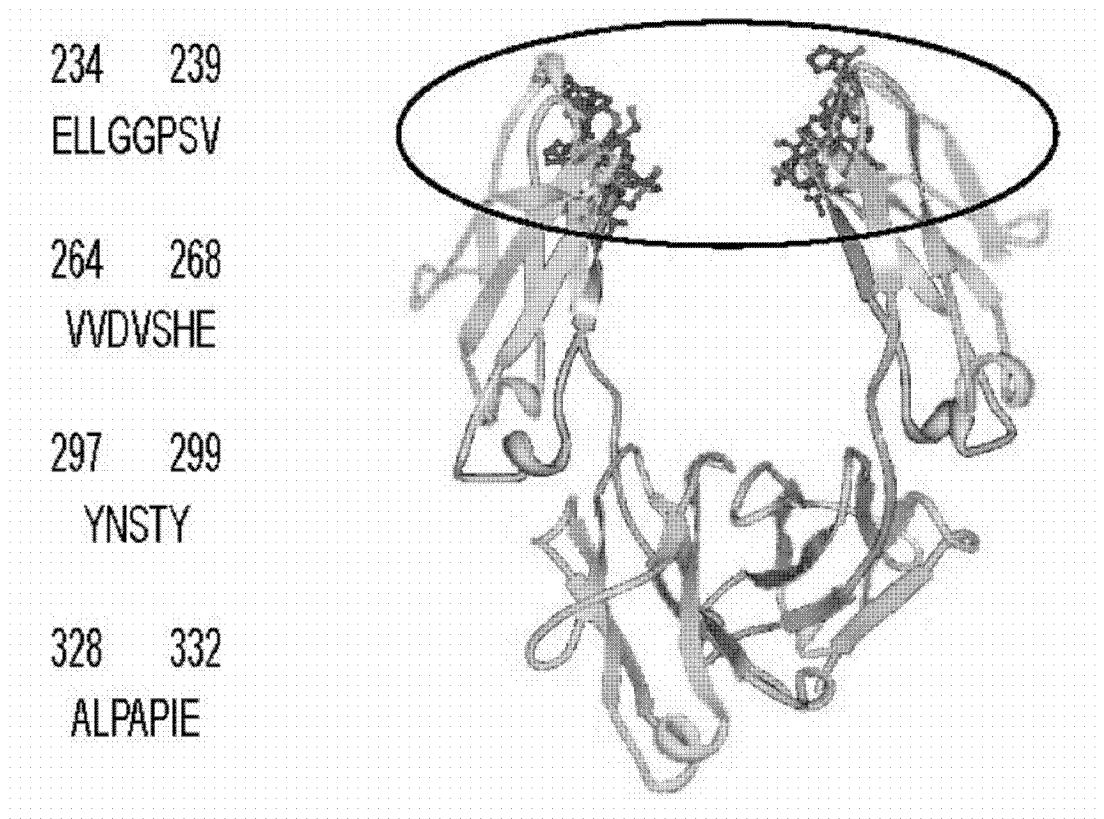


图 15

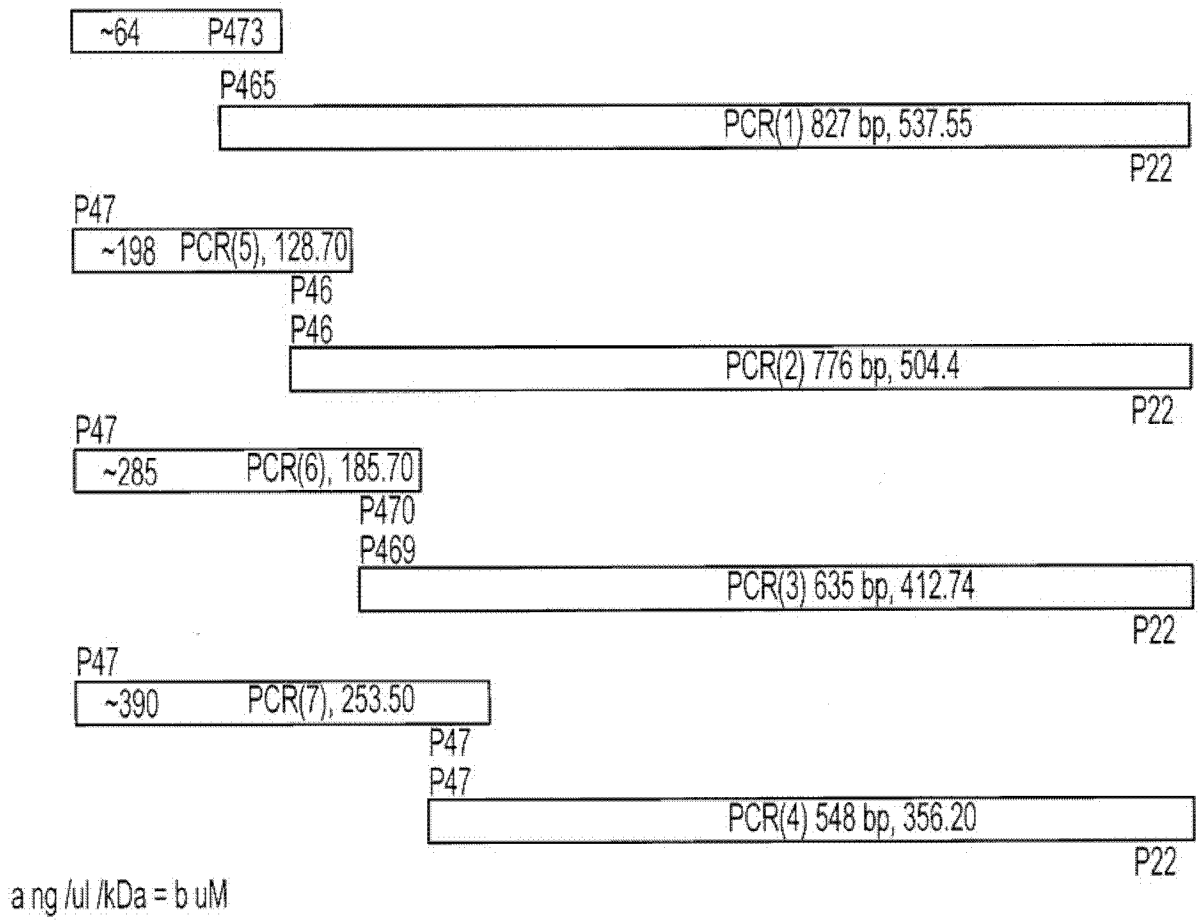


图 16

铰链

FcWT	(15.28)	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340
Fc5	(67.19)	[DKHTCPPC]	[PAPELLGGPSYFLFPPKPDILMSRPEVTCVVVDVSHEDPEVFNWVVDGVEVHNAKTPREEQVNSTYRVSVLTVLHODWLNKGEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK										
Fc601	(163.83)	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]
Fc701	(209.07)	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]
Fc702	(144.24)	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]
Fc703	(141.26)	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]
Fc704	(140.05)	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]
Fc705	(139.15)	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]
Fc706	(126.92)	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]
Fc707	(102.32)	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]
Fc708	(73.45)	[---R---	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]

图 17

FcWT	(15.28)	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440
Fc5	(67.19)	[GQPREPQVYTIPPSRDELTKNOVSLTCLVKGFPYSDIAVESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRHQQGNVFSQVMEALHNHYTQKSLSLSPGK									
Fc601	(163.83)	[V-----]	[V-----]	[V-----]	[V-----]	[V-----]	[V-----]	[V-----]	[V-----]	[V-----]	[V-----]
Fc701	(209.07)	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]
Fc702	(144.24)	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]
Fc703	(141.26)	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]
Fc704	(140.05)	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]
Fc705	(139.15)	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]
Fc706	(126.92)	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]
Fc707	(102.32)	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]
Fc708	(73.45)	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]	[-----]

1) FACS平均值在括号内示出

FcWT	32 LPAPI	33
Fc701	W-VAY	Q295R
Fc702	W-EEY	V279M
Fc703	W-EEY	
Fc704	W-EVY	S426T
Fc705	W-EVY	
Fc706	W-IEY	
Fc707	W-EPY	
Fc708	W-VSY	H224R, L251F

图 18

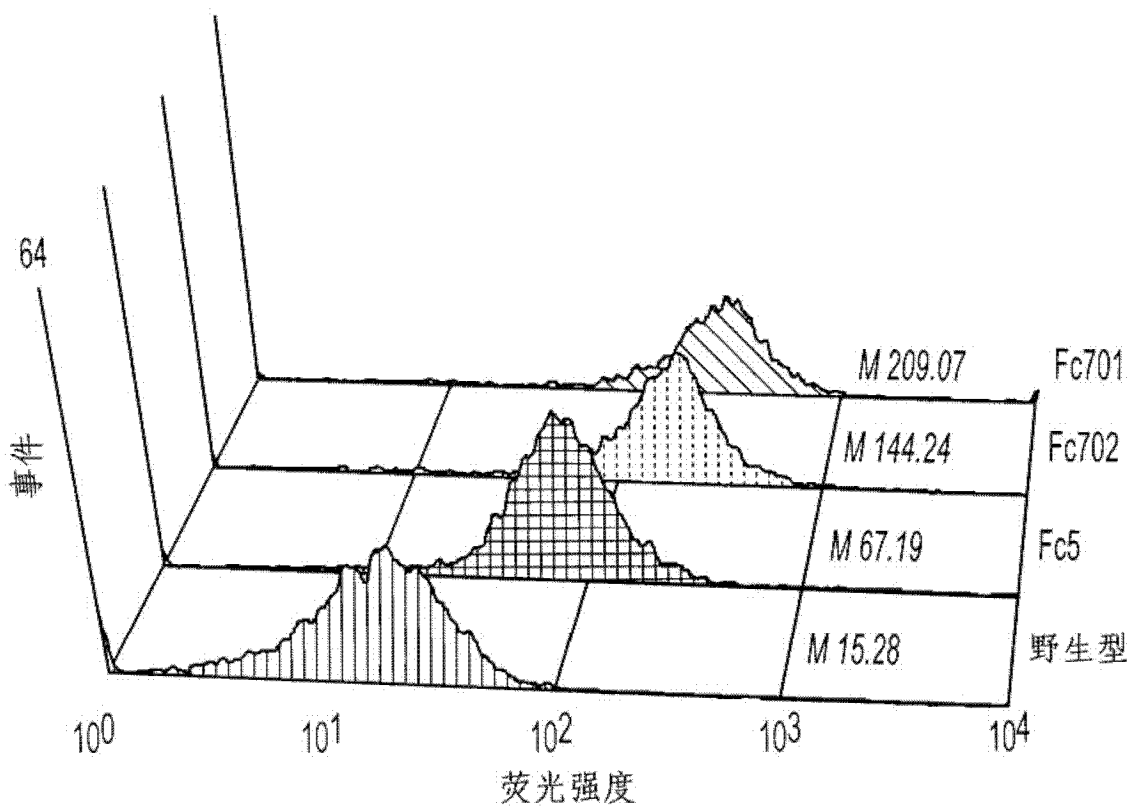


图 19

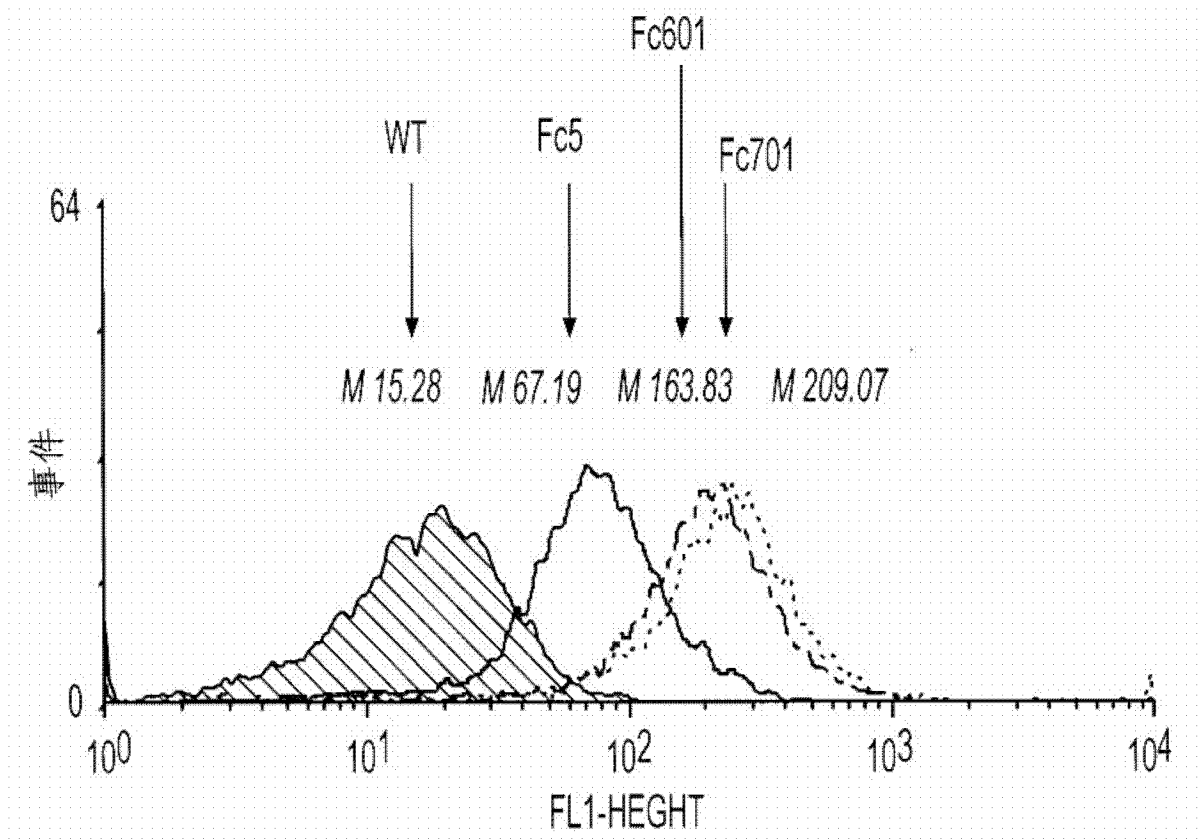


图 20

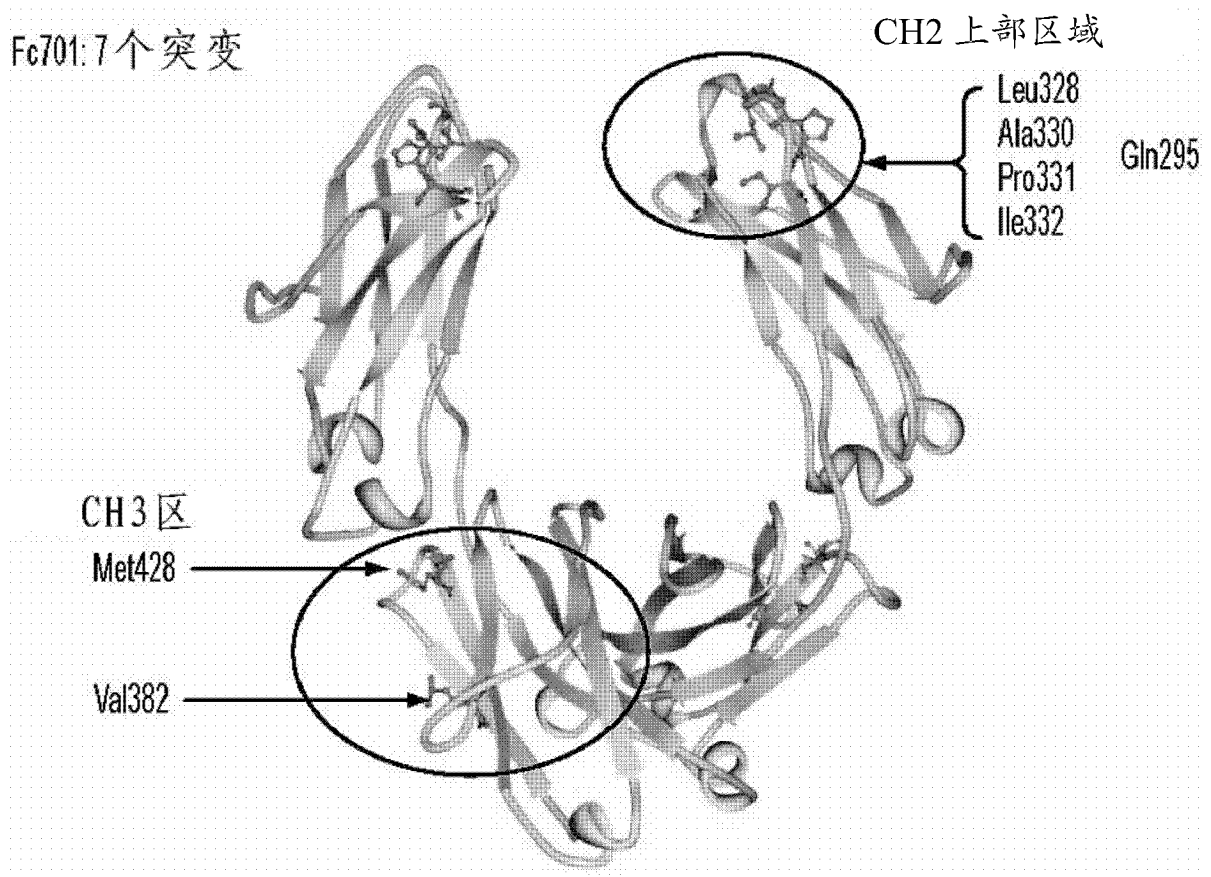


图 21

	K_{ON} ($M^{-1}秒^{-1}$)	K_{OFF} ($秒^{-1}$)	K_D (nM)	Chi ²
无糖基化野生型曲妥珠单抗	1.31×10^5	5.02×10^{-2}	382	0.78
无糖基化曲妥珠单抗-Fc5	2.17×10^5	1.23×10^{-3}	5.69	0.78
无糖基化曲妥珠单抗-Fc601	1.34×10^5	3.92×10^{-4}	2.92	1.42
无糖基化曲妥珠单抗-Fc701	2.96×10^5	9.25×10^{-4}	3.12	0.24
糖基化赫赛汀	1.77×10^5	2.66×10^{-4}	1.5	2.74

图 22A

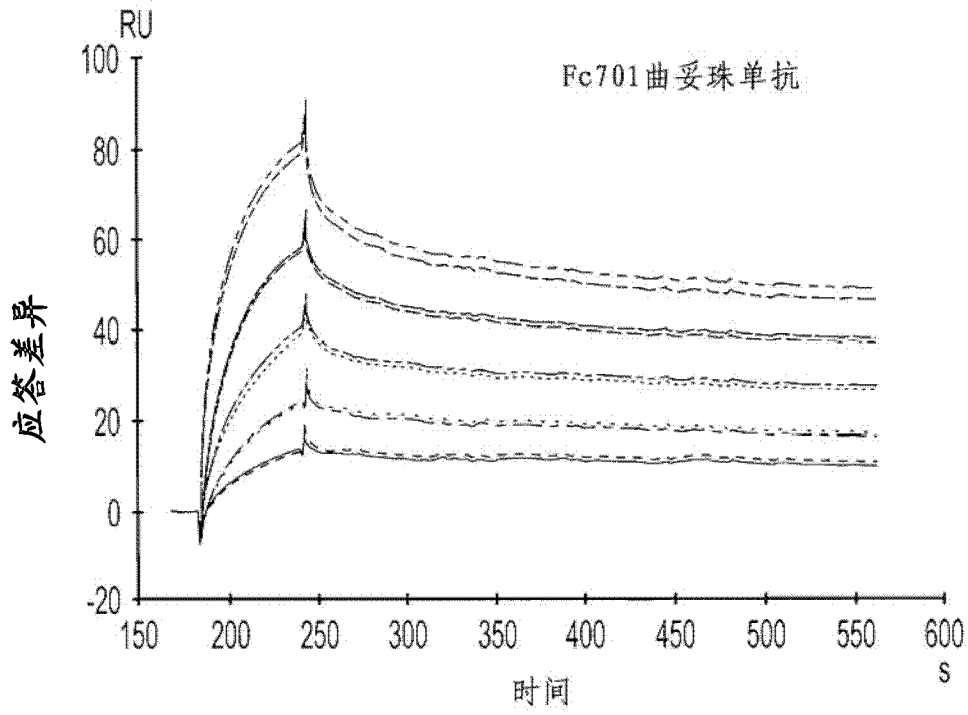


图 22B

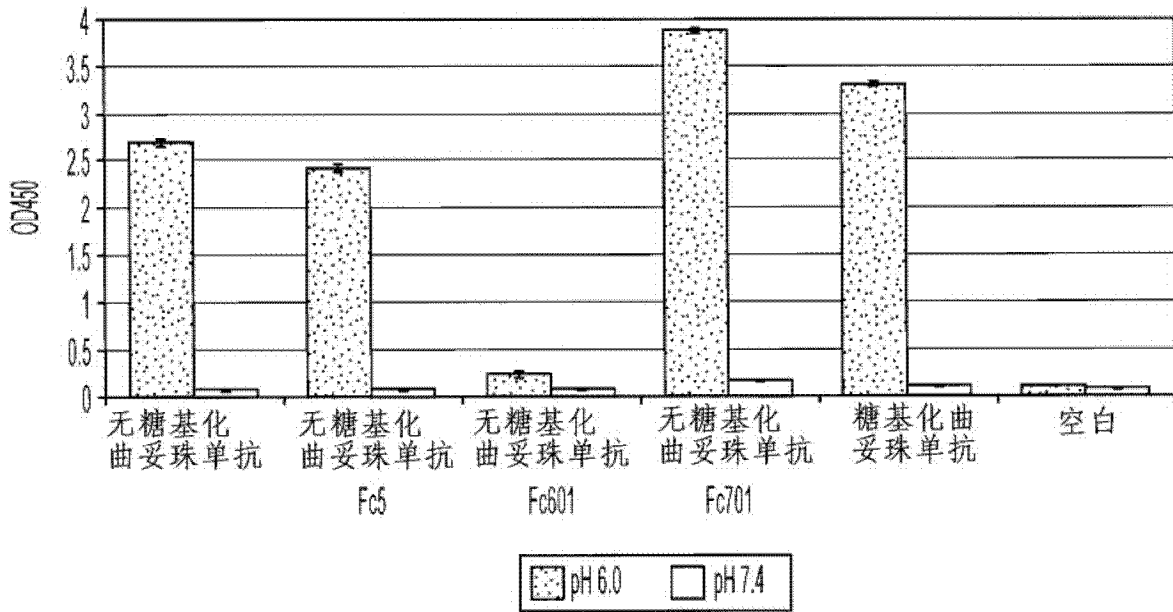


图 23

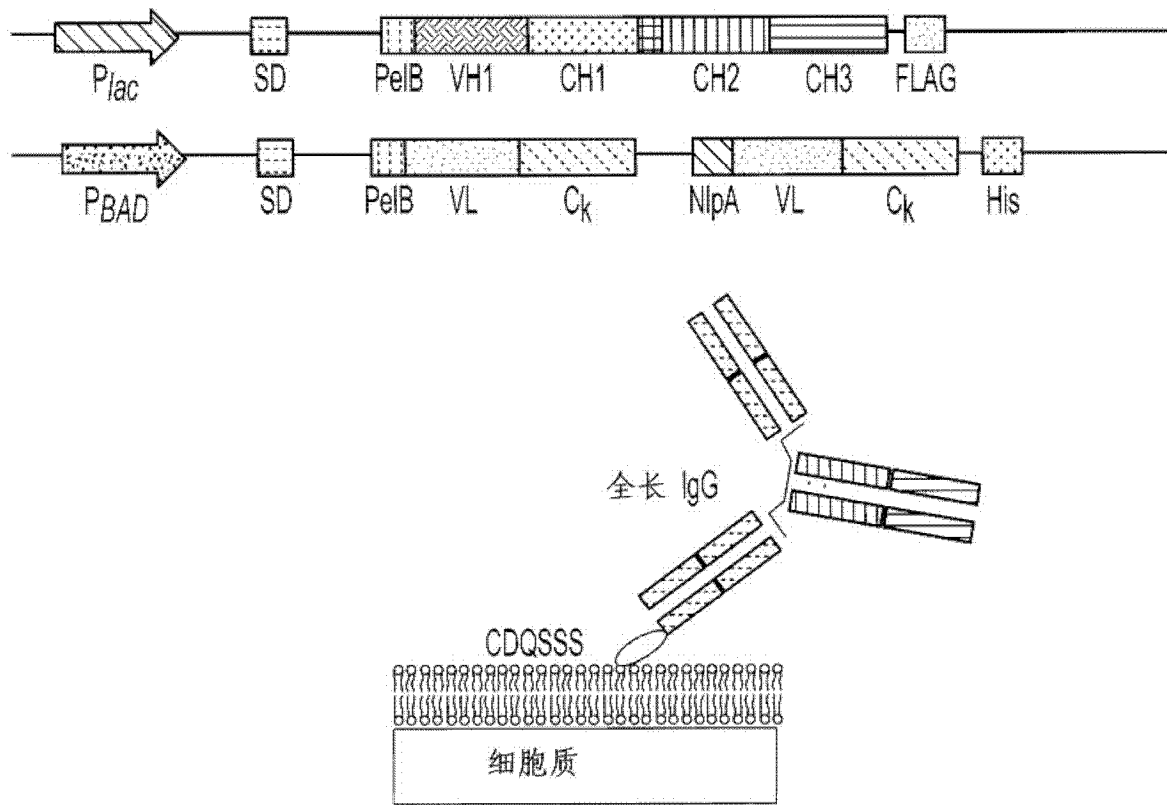


图 24

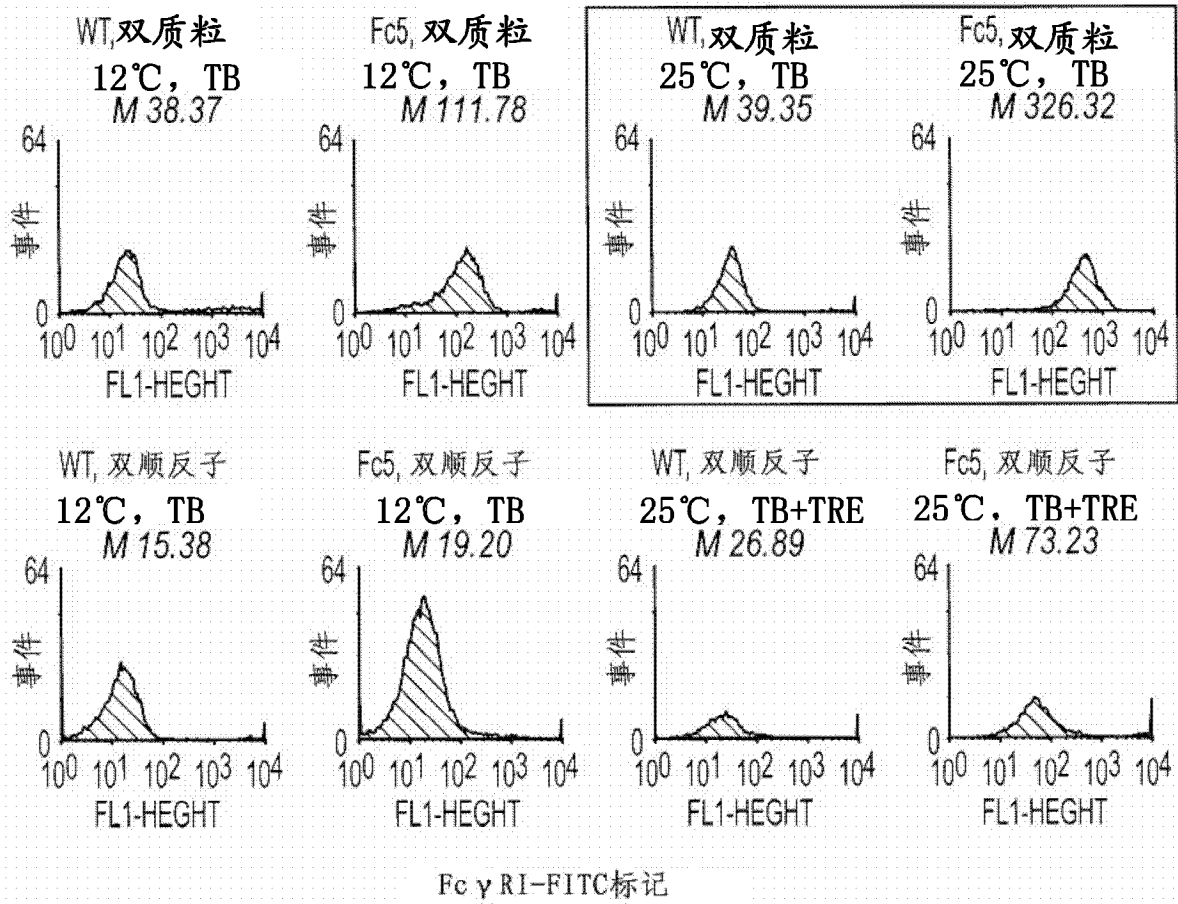


图 25

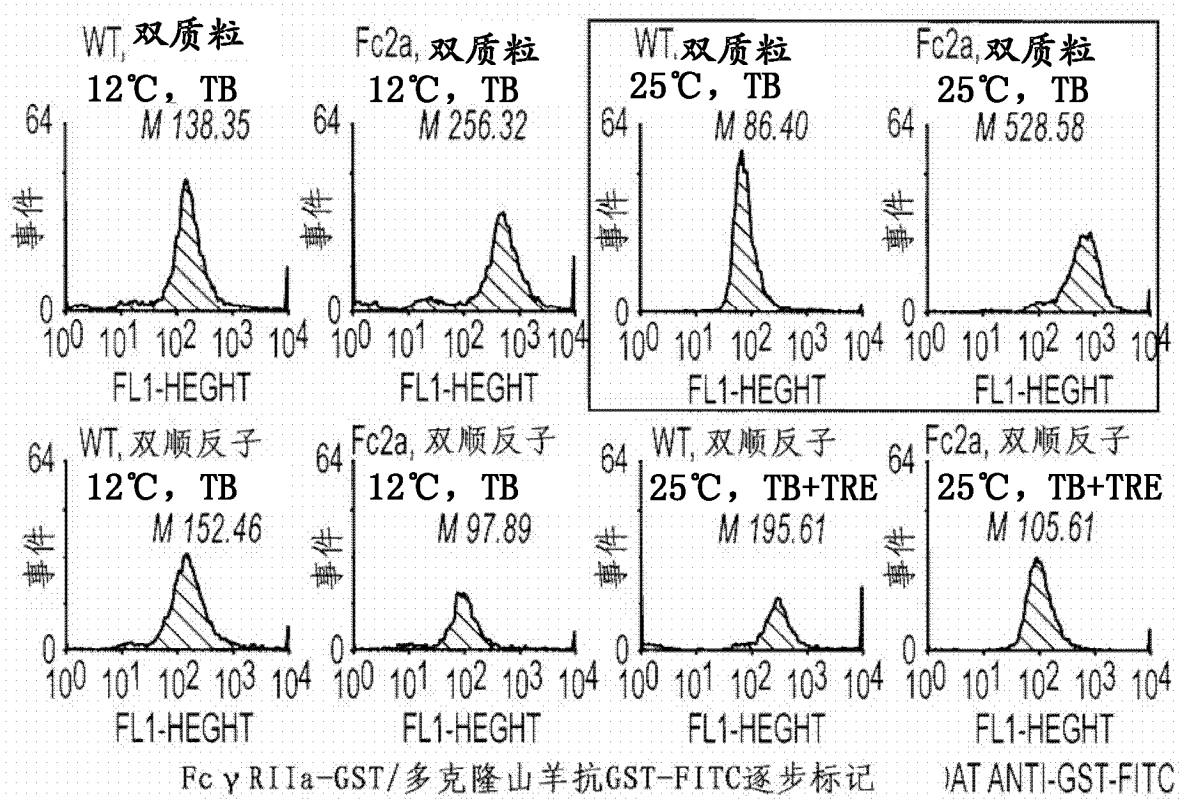


图 26

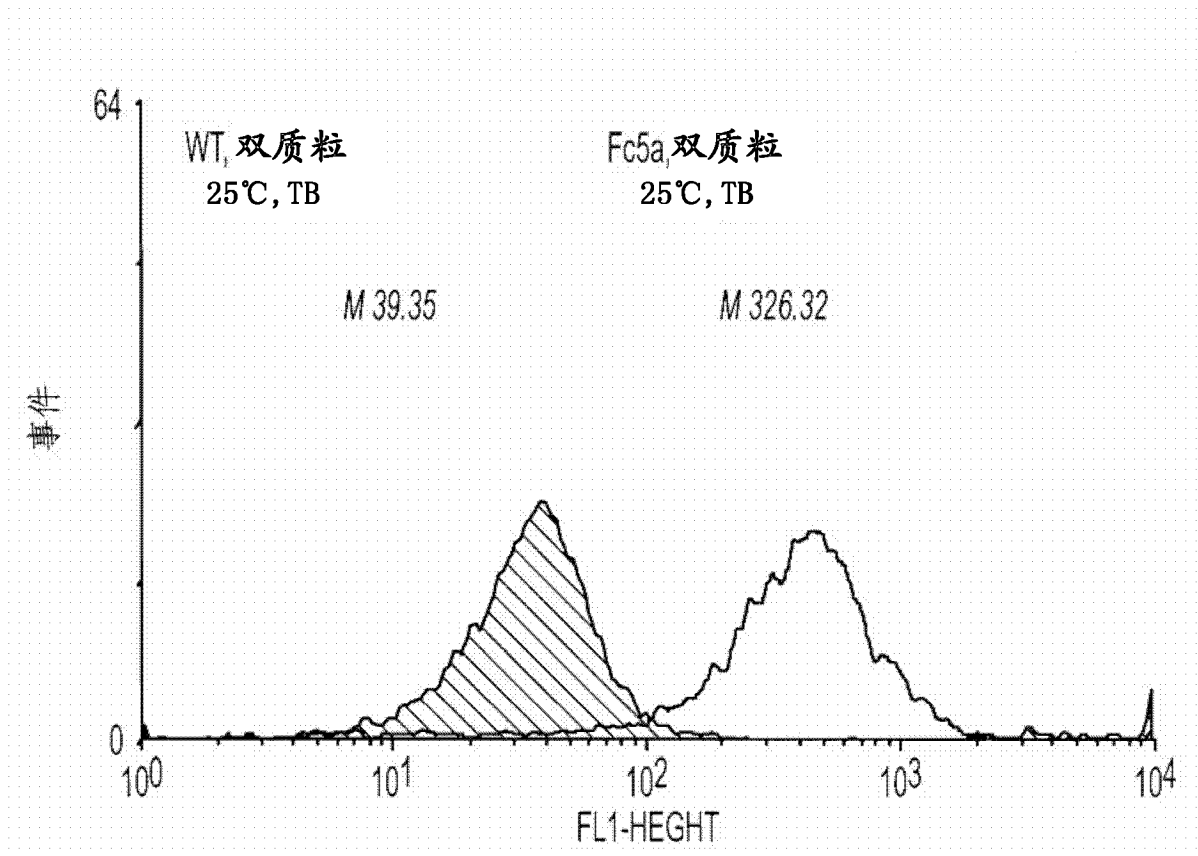


图 27

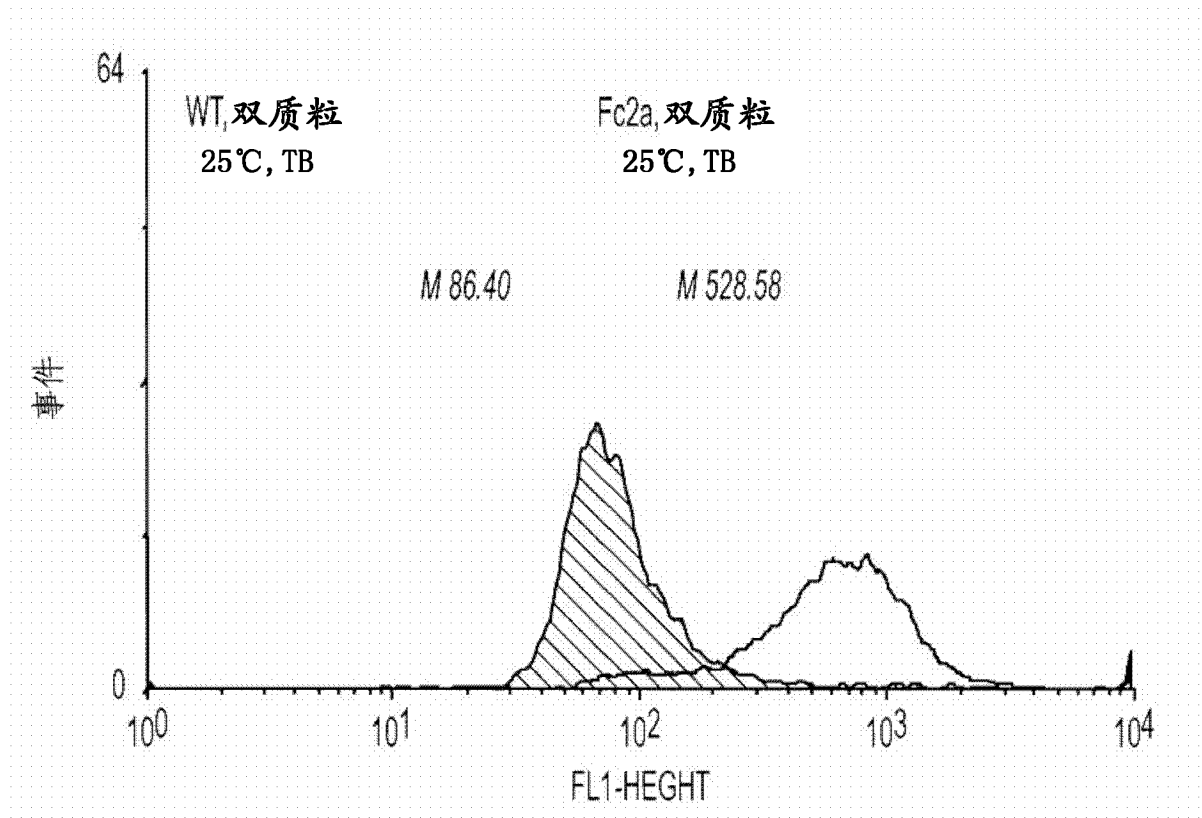


图 28

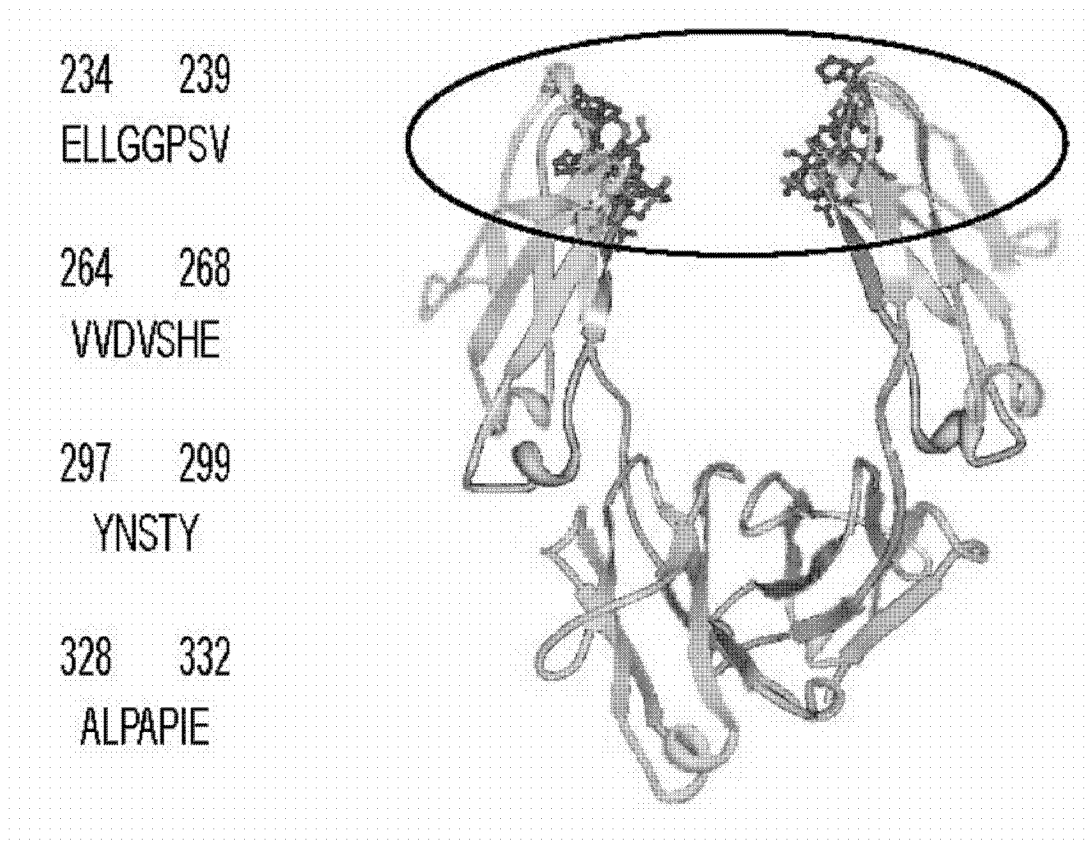


图 29

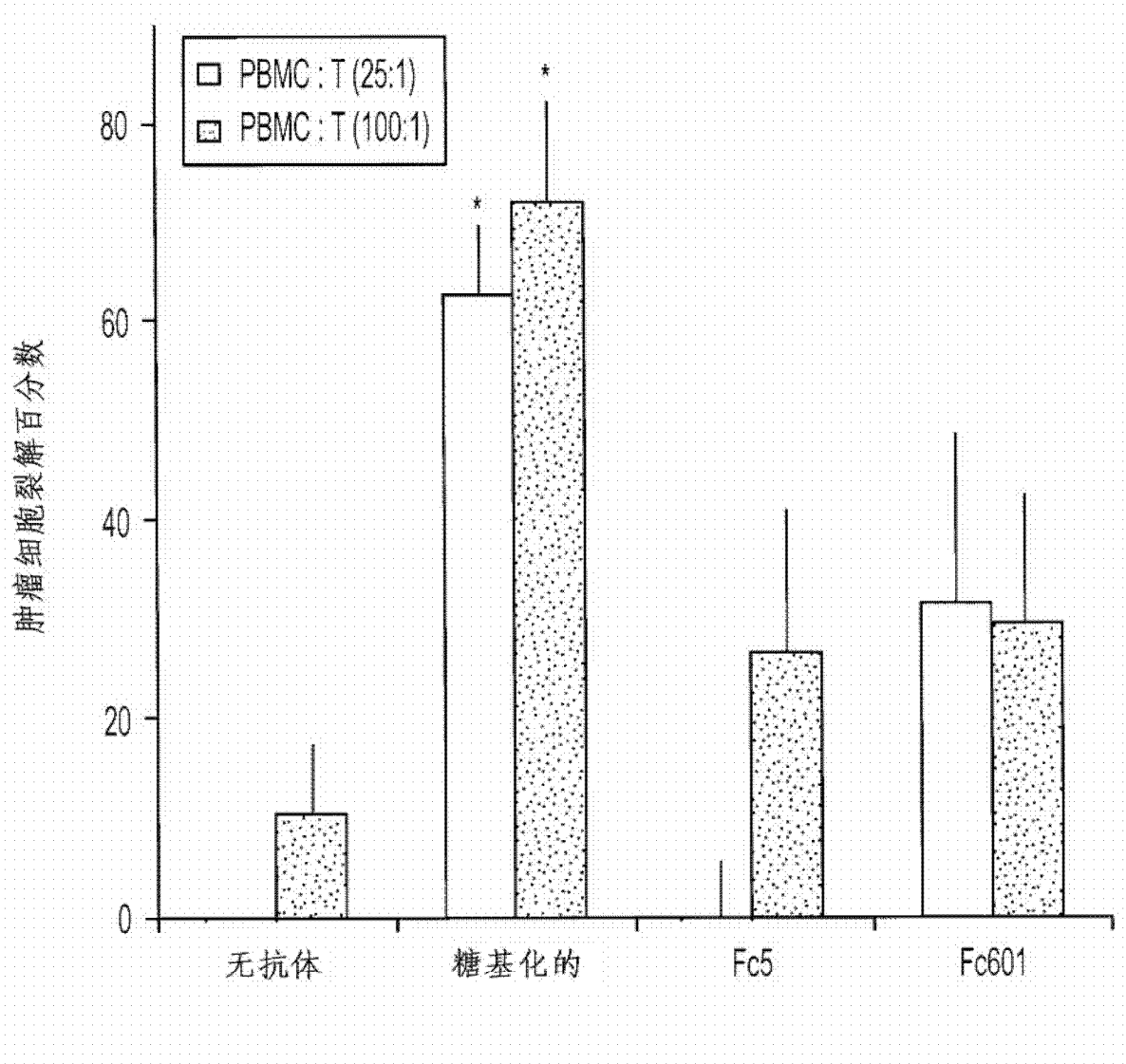


图 30

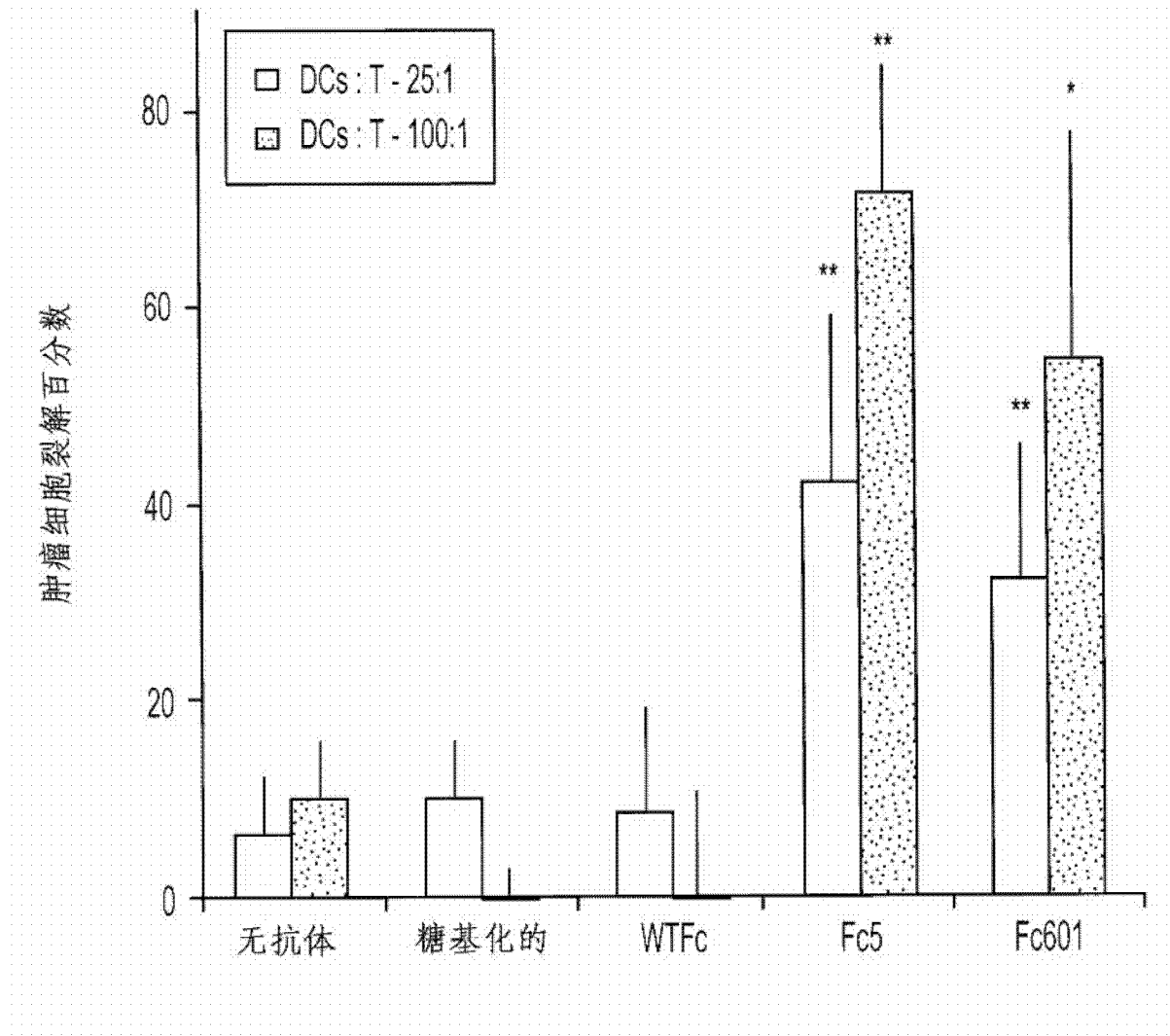


图 31

专利名称(译)	免疫球蛋白FC多肽		
公开(公告)号	CN102549016B	公开(公告)日	2015-05-06
申请号	CN201080038758.4	申请日	2010-06-29
[标]申请(专利权)人(译)	研究发展基金会		
申请(专利权)人(译)	研究发展基金会		
当前申请(专利权)人(译)	研究发展基金会		
[标]发明人	G乔吉欧 S雷迪 ST郑		
发明人	G·乔吉欧 S·雷迪 S·T·郑		
IPC分类号	C07K16/28 C12N15/13 C12N15/63 G01N33/53		
CPC分类号	A61P37/04 C07K16/00 C07K16/005 C07K16/32 C07K2317/24 C07K2317/41 C07K2317/72 C07K2317/732 C07K2317/75 C07K2317/76 G01N33/6857 G01N2500/10 G01N33/56911		
审查员(译)	马静		
优先权	61/221999 2009-06-30 US		
其他公开文献	CN102549016A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及具有非糖基化抗体Fc结构域的多肽的方法和组合物。在某些实施方案中，与天然Fc结构域相比，具有非糖基化Fc结构域的多肽包含一个或多个替换。此外，一些实施方案涉及结合一些Fc受体但不结合其它受体的Fc结构域。例如，提供具有非糖基化Fc结构域的多肽，所述非糖基化Fc结构域以糖基化Fc结构域结合水平2倍之内的水平选择性结合FcγRI，但是对其它Fc受体的结合显著降低。此外，本发明提供使用具有修饰的非糖基化Fc结构域和第二非Fc结合结构域的多肽促进抗体依赖性细胞介导毒性(ADCC)的方法和组合物，所述的第二非Fc结合结构域可以是抗体的抗原结合区或者非抗原结合区。一些实施方案涉及具有此类多肽的抗体，其可以具有相同或者不同的非Fc结合结构域。

