

## Fc $\gamma$ RIIB 亲和力增强的抗体 Fc 区

### 技术领域

本发明涉及生物制药领域,特别是涉及一系列人 IgG2 抗体的 Fc 区的变体,  
5 这些变体具有增强的 Fc $\gamma$ RIIB 亲和力,包含这些 Fc 区变体的激动型抗体可望具有更好的激动活性。

### 背景技术

生物大分子药物的发展为多种疾病的治疗提供了新的方法和可能,尤其是  
10 基于抗体和重链恒定区(包含 Fc 区)的分子靶向治疗,包括抗体和重链恒定区融合蛋白,三十多年来在生物制药领域已经取得了巨大成功并持续成为该领域的重点。

从作用方式上,生物大分子主要可以分为三类:清除靶标(分子和细胞)的效应分子、阻断靶标参与的信号通路的阻断型分子、和激活靶标下游信号通路的激动型分子。肿瘤免疫治疗近年取得了重要突破。这得益于通过阻断免疫抑制节点,提高免疫细胞活性杀灭肿瘤的抗体的使用。但是目前仍有大量癌症患者对已有治疗手段没有应答。因此,一方面需要对目前已有的肿瘤免疫治疗手段进行优化;另一方面亟需研发新的肿瘤免疫治疗药物。需要特别指出的是有一类被称为“激动型抗体”的肿瘤免疫治疗手段,能够通过结合免疫细胞表面  
15 传递免疫激活信号的靶标分子并激活其控制的重要免疫激活信号通路,进而增强抗肿瘤免疫应答间接杀死肿瘤细胞。然而,虽然激动型肿瘤免疫治疗抗体已经在动物模型中证明了其巨大潜力,并且已经成为一个被广泛接受并看好的肿瘤免疫治疗理念,但是这类抗体的研发至今尚未成功,是肿瘤免疫治疗领域当前的一个主要挑战。此外,激动型抗体激活也是干预和调控其它生物学过程的关键信号通路的有利手段,在疾病防控和治疗领域有着广泛的应用前景。例如  
20 激活免疫抑制信号通路,可能有利于减轻炎症和自身免疫症状。

抗体主要通过其恒定区与 Fc $\gamma$ R 相互作用,并且不同的抗体与 Fc $\gamma$ R 的结合能力也有所不同,这种差异也影响着抗体在体内的功能。抗体 Fc 改造是优化治疗抗体的重要手段和趋势,其中改变抗体 Fc 区与关键蛋白如 Fc $\gamma$ R 的相互作用的能力是一种优化抗体的活性非常有效的方法。  
30

## 发明内容

针对上述问题，本发明基于 IgG，通过对 Fc 区进行突变改造，获得了可以增强 Fc $\gamma$ RIIB 亲和力的氨基酸突变及组合；包含这些氨基酸突变的 Fc 可以用于优化抗体的活性，特别是提高激动型抗体的激动活性。

5

在本发明的第一方面，提供了一种突变型 Fc 多肽片段，所述的突变型 Fc 多肽片段具有以下特征：

(i) 所述的突变型 Fc 多肽片段相对于突变前相应的野生型 Fc 片段具有突变；并且

10 (ii) 与野生型 Fc 区相比，所述突变型 Fc 区与 Fc $\gamma$ RIIB 的亲和力提高；并且，所述的野生型 Fc 为野生型 IgG2 的 Fc。

在另一优选例中，所述的突变型 Fc 多肽片段相对于突变前相应的野生型 Fc 片段具有选自下组的位点的突变：L328、H268、S267、P271、G327，或其组合；

15 其中，所有氨基酸的编号以 IgG Eu 编号为依据。

在另一优选例中，所述的亲和力可以体现为筛选的富集程度或者结合分析信号。

在另一优选例中，所述野生型 Fc 片段是以 IgG Eu 编号为依据的 IgG2 的氨基酸序列中的第 233 位至第 332 位，并且所述野生型 Fc 片段的氨基酸序列如 SEQ ID  
20 NO: 20 所示。

在另一优选例中，与野生型 Fc 片段相比，所述突变型 Fc 多肽片段具有增强的 Fc $\gamma$ RIIB 亲和力。

在另一优选例中，突变型 Fc 多肽片段对 Fc $\gamma$ RIIB 的亲和力较野生型 Fc 片段对 Fc $\gamma$ RIIB 的亲和力提升 1 倍以上；优选地，提升 2、3、4、5、10、20、50  
25 或 100 倍以上。

在另一优选例中，所述突变型 Fc 多肽片段对激活型 Fc $\gamma$ R 的亲和力较 Fc $\gamma$ RIIB 的亲和力低。

在另一优选例中，与野生型 Fc 片段相比，所述突变型 Fc 多肽片段与 Fc $\gamma$ RIIB 的亲和力提高，并且与激活型 Fc $\gamma$ R 的亲和力降低(I/A 比值高于野生型 Fc 片段)。

30 在另一优选例中，所述的突变型 Fc 多肽片段分别与 Fc $\gamma$ RIIB 和 Fc  $\gamma$  RIIA<sup>131R</sup> 的亲和力的比值(RIIB/RIIAR)高于野生型 IgG2。

在另一优选例中，所述的激活型 Fc $\gamma$ R 包括：Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RIIA<sup>131H</sup>、Fc $\gamma$ RIIA<sup>131R</sup>、Fc $\gamma$ RIIIA<sup>158F</sup> 和 Fc $\gamma$ RIIIA<sup>158V</sup>。

在另一优选例中，突变 L328 包括 L328W、L328E、L328Y、L328F、L328M、L328A、L328G、L328N、L328P、L328R、L328V；优选地为 L328W 或 L328E。

- 5 在另一优选例中，突变 H268 包括 H268D、H268S、H268E、H268K、H268N；优选地为 H268D、H268S 或 H268E。

在另一优选例中，突变 S267 包括 S267E、S267V、S267D、S267M、S267Q、S267A、S267G、S267R、S267N、S267W；优选地为 S267E、S267V、S267D、S267M；更优选地为 S267E。

- 10 在另一优选例中，突变 P271 包括 P271C、P271G、P271V、P271A、P271W、P271Y、P271Q、P271T、P271I、P271L、P271S；优选地为 P271C、P271G、P271V、P271A、P271W、P271Y、P271Q、P271T；更优选地为 P271C、P271G。

在另一优选例中，突变 G327 包括 G327A、G327L、G327S；优选地为 G327A。

- 15 在另一优选例中，所述的突变型 Fc 多肽片段相对于野生型 Fc 片段具有选自下组的位点的突变：L328W、L328E、H268D、H268S、H268E、S267E、A330S、P233G、P271G、P271C、P271V、P271A、P271W、P271Y、G327A，或其组合；其中，所有氨基酸的编号以 IgG Eu 编号为依据。

- 在另一优选例中，所述的突变型 Fc 多肽片段相对于野生型 Fc 片段具有 L328 和 H268 两个位点中至少一个位点的突变，并且所述突变型 Fc 多肽片段中具体的突变选自下组之一：L328W、L328E、H268D、H268S、H268E、H268D/S298L/L328W、S267V/S298L/L328W、V234M/S267E/S298L/L328W、A235W/V266L/S298L/L328W、V234Q/A235G/P238L/S239V/H268D/G327A/L328E/A330S/I332T、S239V/V266L/S298L/L328W、V266L/L328W、V266L/S267D/H268D/E269D/P271Q、S267E/H268S/E269D、P233F/V266L/S298L/L328W、V266L/S298L/L328W、V234Q/A235G/P238L/S239V/G327A/L328E/A330S/I332T、V266L/S267E/H268S/E269V、V266L/S267E/H268S/E269V/P271C、V266L/S267E/H268S/E269A/P271C、S267V/S298G/L328W、V266L/S267M/H268E/P271Q、V266L/S267E/H268S/E269G/P271T、V234Q/V266L/S267D/H268D/E269D/P271Q、V234Q/A235G/P238L/S239V/S267E/H268S/E269D、V266L/S267E/H268S/P271V、V234Q/A235G/P238L/S239V/S267E/S298L/G327A/L328E/A330S/I332T、V234Q/V266L/S267E/H268S/E269V、L328E/I332T；其中，所有氨基酸的编号以 IgG Eu 编号为依据。
- 20
- 25
- 30

在另一优选例中，所述的突变型 Fc 多肽片段相对于野生型 Fc 片段具有 S267 位点的突变，并且所述突变型 Fc 多肽片段中具体的突变选自下组之一：S267E/A330S、S267E/S298G、P233G/S267E、V234M/S267E/S298G/I332L、P233G/S267E/S298G、V266L/S267E/E269K/P271G、P238Q/S267E、S267A/P271C、S267A/P271G、S267E/D270H、S267E/P271C、S267E/P271V、S267E/P271W、S267E/P271Y、S267E/S298R、S267M/P271C、S267M/P271G、S267V/S298L、S267E/P329R；其中，所有氨基酸的编号以 IgG Eu 编号为依据。

在另一优选例中，所述的突变型 Fc 多肽片段相对于野生型 Fc 片段具有 S267 位点的突变，并且所述突变型 Fc 多肽片段中具体的突变选自下组之一：S267E/A330S、S267E/S298G、P233G/S267E、V234M/S267E/S298G/I332L、P233G/S267E/S298G、V266L/S267E/E269K/P271G、S267E/P271C；其中，所有氨基酸的编号以 IgG Eu 编号为依据。

在另一优选例中，所述的突变型 Fc 多肽片段相对于野生型 Fc 片段具有 P271 位点的突变，并且所述突变型 Fc 多肽片段中具体的突变选自下组之一：V266L/S267E/E269K/P271G、V266A/P271C、V266A/P271G、S267A/P271C、S267A/P271G、S267E/P271C、S267E/P271V、S267E/P271W、S267E/P271Y、S267M/P271C、S267M/P271G、V266G/P271C、P271A/S298R、P271G/G236V、P271G/P329S、P271G/P331C、P271G/P331T、P271G/S298D、P271G/S298E、P271G/S298G、P271G/S298K、P271G/S298L、P271G/S298N、P271G/S298R、P271G/T299A、P271G/T299M、P271G/T299S、P271G/T299W、P271G/I332L；其中，所有氨基酸的编号以 IgG Eu 编号为依据。

在另一优选例中，所述的突变型 Fc 多肽片段相对于野生型 Fc 片段具有 G327 位点的突变，并且所述突变型 Fc 多肽片段中具体的突变选自下组之一：G327A/A330R、G327A/A330V、G327A/I332A、G327A/I332C、G327A/I332E。

在另一优选例中，所述的突变型 Fc 多肽片段相对于野生型 Fc 片段的具体的突变选自下组之一：H268D/S298L/L328W、S267V/S298L/L328W、V234M/S267E/S298L/L328W、A235W/V266L/S298L/L328W、V234Q/A235G/P238L/S239V/H268D/G327A/L328E/A330S/I332T；其中，所有氨基酸的编号以 IgG Eu 编号为依据。

在本发明的第二方面，提供了一种突变型免疫球蛋白 Fc 区，所述突变型免疫球蛋白 Fc 区包含如本发明第一方面所述的突变型 Fc 多肽片段。

在另一优选例中，所述的免疫球蛋白是人 IgG2。

在另一优选例中，与野生型 IgG2 Fc 区相比，所述突变型免疫球蛋白 Fc 区具有增强的 Fc $\gamma$ RIIB 亲和力。

在另一优选例中，所述突变型免疫球蛋白 Fc 区对 Fc $\gamma$ RIIB 的亲和力较野生型 IgG2 Fc 区对 Fc $\gamma$ RIIB 的亲和力提升 1 倍以上；优选地，提升 2、3、4、5、10、20、50 或 100 倍以上。

在另一优选例中，所述的亲和力可以体现为筛选的富集程度或者结合分析信号。

在另一优选例中，所述突变型免疫球蛋白 Fc 区对激活型 Fc $\gamma$ R 的亲和力较 Fc $\gamma$ RIIB 的亲和力低。

在另一优选例中，与野生型 IgG2 Fc 区相比，所述突变型免疫球蛋白 Fc 区与 Fc $\gamma$ RIIB 的亲和力提高，并且与激活型 Fc $\gamma$ R 的亲和力降低(I/A 比值高于野生型 IgG2 Fc 区)。

在另一优选例中，所述的突变型免疫球蛋白 Fc 区分别与 Fc $\gamma$ RIIB 和 Fc $\gamma$ RIIA<sup>131R</sup> 的亲力的比值(RIIB/RIIAR)高于野生型 IgG2。

在本发明的第三方面，提供了一种抗体，所述抗体中包含如本发明第一方面所述的突变型 Fc 多肽片段或如本发明第二方面所述的突变型免疫球蛋白 Fc 区。

在另一优选例中，所述的抗体是基于人 IgG2 骨架的抗体。

在另一优选例中，所述抗体是激动型抗体。

在另一优选例中，所述抗体特异性地靶向肿瘤坏死因子受体超家族。

在另一优选例中，所述抗体能够特异性地结合选自下组的靶点：CD40、DR5、OX40、CD137、CD27、CD30、GITR、HVEM、TACI、DR4、FAS，或其组合。

在另一优选例中，所述抗体能够特异性地结合 OX40。

在另一优选例中，所述抗体所靶向的抗原为免疫受体分子，或其组合。

在另一优选例中，所述抗体所靶向的抗原为免疫抑制性受体分子，并且所述免疫抑制性受体分子选自于 PD-1、CTLA-4、VISTA、TIM-3、BTLA、LAG-3，或其组合。

在另一优选例中，所述抗体是人抗体、人源化抗体，或嵌合抗体。

在另一优选例中，所述抗体是单克隆抗体或多克隆抗体，优选为单克隆抗体。

在本发明的第四方面，提供了一种融合蛋白，所述融合蛋白包含如本发明第一方面所述的突变型 Fc 多肽片段、如本发明第二方面所述的突变型免疫球蛋白 Fc 区，或如本发明第三方面所述的抗体。

5 在另一优选例中，所述融合蛋白中还包括其它具有受体激动功能的蛋白序列或其片段。

在另一优选例中，所述其它具有受体激动功能的蛋白为 TNF 基因家族中细胞因子。

在另一优选例中，所述其它具有受体激动功能的蛋白包括免疫受体的配体分子。

10 在另一优选例中，所述其它具有受体激动功能的蛋白包括免疫受体的配体分子，所述免疫受体的配体分子选自于 CD80、CD86、ICOSL、OX40L、CD137L、CD40L、CD30L、CD27L、CD244、CD150、CD48、CD84、CD319、Ly118 或者 CD229 中的任意一种，或其组合。

15 在另一优选例中，所述其它具有受体激动功能的蛋白包括免疫受体的配体分子，所述免疫受体的配体分子选自下组：PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、CD47、VISTA、HVEM、GAL9，或其组合。

在另一优选例中，所述融合蛋白还可包括协助表达和/或纯化的标签序列；优选地，所述的标签序列包括 6His 标签、HA 标签和/或 FLAG 标签。

20 在本发明的第五方面，提供了一种分离的多核苷酸，所述多核苷酸编码如本发明第一方面所述的突变型 Fc 多肽片段、如本发明第二方面所述的突变型免疫球蛋白 Fc 区、如本发明第三方面所述的抗体，或如本发明第四方面所述的重组蛋白。

25 在本发明的第六方面，提供了一种载体，所述载体含有如本发明第五方面所述的分离的多核苷酸。

在另一优选例中，所述的载体选自下组：DNA、RNA、病毒载体、质粒、转座子、其它基因转移系统、或其组合。

在另一优选例中，所述载体包括病毒载体，如慢病毒、腺病毒、AAV 病毒、逆转录病毒、或其组合。

30

在本发明的第七方面，提供了一种宿主细胞，所述宿主细胞含有如本发明第

六方面所述的载体，或其基因组中整合有如本发明第五方面所述的多核苷酸；

或者，所述宿主细胞表达如本发明第一方面所述的突变型 Fc 多肽片段、如本发明第二方面所述的突变型免疫球蛋白 Fc 区、如本发明第三方面所述的抗体，或如本发明第四方面所述的重组蛋白。

5           在另一优选例中，所述的宿主细胞包括原核细胞或真核细胞。

在另一优选例中，所述的宿主细胞选自下组：大肠杆菌、酵母细胞、昆虫细胞、鸟类细胞、哺乳动物细胞。

在本发明的第八方面，提供了一种药物组合物，所述的药物组合物包括：

10           (a) 如本发明第一方面所述的突变型 Fc 多肽片段、如本发明第二方面所述的突变型免疫球蛋白 Fc 区、如本发明第三方面所述的抗体，或如本发明第四方面所述的重组蛋白；和

(b) 药学上可接受的载体。

15           在另一优选例中，所述药物组合物中还可包括治疗肿瘤的其它药物，如细胞毒性药物。

在另一优选例中，所述药物组合物中还可包括其它具有受体激动功能的活性物质。

在另一优选例中，所述的药物组合物为注射剂型。

20           在本发明的第九方面，提供了一种产生如本发明第一方面所述的突变型 Fc 多肽片段、如本发明第二方面所述的突变型免疫球蛋白 Fc 区、如本发明第三方面所述的抗体，或如本发明第四方面所述的重组蛋白的方法，包括步骤：

25           (i) 在合适的条件下，培养如本发明第七方面所述的宿主细胞，从而获得含所述突变型 Fc 多肽片段、所述突变型免疫球蛋白 Fc 区、所述抗体，或所述重组蛋白的培养物；和

(ii) 对步骤(i)中得到的培养物进行纯化和/或分离，获得所述的所述突变型 Fc 多肽片段、突变型免疫球蛋白 Fc 区、抗体，或重组蛋白。

在另一优选例中，所述纯化可以通过蛋白 A 亲和柱纯化分离获得目标抗体。

在另一优选例中，所述纯化可以通过蛋白 G 亲和柱纯化分离获得目标抗体。

30           在另一优选例中，所述经过纯化分离后的目标抗体纯度大于 95%，大于 96%、大于 97%、大于 98%、大于 99%，优选为 100%。

在本发明的第十方面，提供了如本发明第一方面所述的突变型 Fc 多肽片段、如本发明第二方面所述的突变型免疫球蛋白 Fc 区、如本发明第三方面所述的抗体，或如本发明第四方面所述的重组蛋白、如本发明第五方面所述的多核苷酸、如本发  
5 明第六方面所述的载体和/或如本发明第七方面所述的宿主细胞的用途，用于制备一用于肿瘤免疫治疗、减轻炎症和/或减轻自身免疫症状的药物组合物。

在本发明的第十一方面，提供了一种治疗疾病的方法，包括步骤：给有所需要的对象施用如本发明第一方面所述的突变型 Fc 多肽片段、如本发明第二方面所  
10 述的突变型免疫球蛋白 Fc 区、如本发明第三方面所述的抗体，或如本发明第四方面所述的重组蛋白、如本发明第五方面所述的多核苷酸、如本发明第六方面所述的载体、如本发明第七方面所述的宿主细胞，和/或如本发明第八方面所述的药物组合物。

在另一优选例中，所述的对象包括哺乳动物，优选地是人。

15 在另一优选例中，所述的疾病选自下组：肿瘤、炎性疾病、自身免疫性疾病，或其组合。

在另一优选例中，所述的癌症包括但不限于乳腺癌、前列腺癌、肺癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、黑素瘤、结肠癌、胃癌、肝癌、食道癌、肾癌、咽喉癌、甲状腺癌、胰腺癌、睾丸癌、脑癌、骨癌和血癌(如白血病、慢性淋巴细胞性白血病)  
20 等。

在另一优选例中，所述的癌症包括但不限于基底细胞癌、胆道癌、膀胱癌、骨癌、脑和中枢神经系统(CNS)癌、宫颈癌、绒毛膜癌、结肠直肠癌、结缔组织癌、消化系统癌、子宫内膜癌、食道癌、眼癌、头颈癌、胃癌、上皮内肿瘤、肾癌、喉癌、肝癌、肺癌(小细胞、大细胞)、淋巴瘤(包括霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤)；  
25 黑素瘤；神经母细胞瘤；口腔癌(例如唇、舌头、口和咽)；卵巢癌；胰腺癌；视网膜母细胞瘤；横纹肌肉瘤；直肠癌；呼吸系统癌；肉瘤；皮肤癌；胃癌；睾丸癌；甲状腺癌；子宫癌；泌尿系统癌；以及其它癌和肉瘤。

在另一优选例中，所述方法可用于刺激免疫反应以通过抑制或延缓肿瘤的生长或减少肿瘤的大小来治疗肿瘤。

30

在本发明的另一方面，还提供了一种筛选增强蛋白-分子结合能力的氨基

酸突变的方法，包括以下步骤：

- 1) 提供亲本蛋白序列，通过 PCR 在亲本蛋白序列中引入氨基酸突变；
  - 2) 将亲本蛋白以及突变后的蛋白构建入表达载体，形成突变文库；
  - 3) 将表达载体转染进入哺乳动物细胞，并将亲本蛋白以及突变后的蛋白
- 5 表达于细胞表面；
- 4) 将带标记的相互作用分子和上述哺乳动物细胞孵育，通过流式细胞分选或者磁珠分选出被标记的哺乳动物细胞；
  - 5) 提取被标记的哺乳动物细胞的 DNA，进行测序，分析比较分选前后序列比例的变化情况；
- 10 其中分选后的比例显著高于分选前的比例的氨基酸突变为能够增强所述蛋白和相互作用分子之间结合能力的氨基酸突变。

该筛选方法可高效地筛选各种氨基酸突变，具有非常好的便捷性和有效性，可用于筛选增强各种蛋白-蛋白相互作用或者蛋白-其它分子相互作用的氨基酸突变。

15

本发明的有益效果是：本发明提供的改造的 Fc 区或 Fc 片段具有增强的 Fc $\gamma$ RIIB 亲和力，部分在具有增强的 Fc $\gamma$ RIIB 亲和力的同时还具有降低的激活型 Fc $\gamma$ Rs 亲和力。这些蛋白可以用于设计、改造或优化抗体或者融合蛋白的激动活性。特别是可以用于设计基于人 IgG2 骨架的抗体或者融合蛋白的激动活

20 性。由此，可提供激动活性显著增强的蛋白分子，用于肿瘤、炎症疾病、自身免疫性疾病或其组合的治疗，具备显著的应用前景。

## 附图说明

图 1 显示了哺乳动物表面展示抗体质粒构建图谱。

- 25 图 2 显示了突变筛选流程示意图。具体包括先构建突变文库，然后通过逆转录病毒转入细胞，Fc 突变文库表达于细胞表面，细胞分选与 Fc $\gamma$ RIIB 高亲和力的细胞，提取 DNA，高通量测序 (NSG)，然后分析各种突变在分选前后的富集情况，选出与野生型相比富集倍数相对高的突变类型。

图 3 显示了人 IgG2 Fc 上 CH2 编码氨基酸对应的 Eu 编号。

- 30 图 4 显示了流式细胞分选仪分选可以逐步富集与 Fc $\gamma$ RIIB 结合能力高的细胞。图中分别为野生型人 IgG2 细胞和人 IgG2 文库 LibraryMix 细胞经过一轮

和两轮 Fc $\gamma$ RIIB 分选以后的细胞流式分析结果。

图 5 显示了经过文库筛选的细胞与 Fc $\gamma$ RIIB 的结合能力明显提高。图中分别为野生型人 IgG2 细胞和经过两轮 Fc $\gamma$ RIIB 分选以后的细胞流式分析结果。

图 6 显示了两种类型组合突变文库示意图。类型一，四个区域之间单点组合突变，即 P233-V240、V266-P271、S298-T299 以及 G327-I332 四个区域每个区域有 0-1 个突变，共 0-4 个位点的组合突变；类型二，一个区域内的多个氨基酸组合突变，即 P233-V240、V266-P271、S298-T299 或 G327-I332 四个区域，每个区域内部氨基酸的组合突变(分别为 0-7、0-6、0-2 和 0-6 个组合突变)。

图 7 显示了野生型 IgG2 和经过流式细胞分选后的文库 IgG2\_C01、文库 IgG2\_C02 的流式分析结果，显示在文库 IgG2\_C01 和文库 IgG2\_C02 中，与 Fc $\gamma$ RIIB 结合的细胞比例有所提高。

图 8 显示了文库 Cmix 和文库 C2 细胞在流式细胞分选前 (“\_befor”) 和分选后 (“\_1<sup>st</sup>” 和 “\_2<sup>nd</sup>”) 与 Fc $\gamma$ RIIB 的结合能力，结果显示分选后文库中细胞与 Fc $\gamma$ RIIB 结合的比例逐步提高 (2<sup>nd</sup> > 1<sup>st</sup> > befor)。

图 9 显示了不同 IgG2 抗体 Fc 突变体与 Fc $\gamma$ RI 的结合能力(表达为 ELISA 信号：在 650nm 的吸光值(A650))。

图 10 显示了不同 IgG2 抗体 Fc 突变体与 Fc $\gamma$ RIIA<sup>131H</sup> 的结合能力(表达为 ELISA 信号：在 650nm 的吸光值(A650))。

图 11 显示了不同 IgG2 抗体 Fc 突变体与 Fc $\gamma$ RIIA<sup>131R</sup> 的结合能力(表达为 ELISA 信号：在 650nm 的吸光值(A650))。

图 12 显示了不同 IgG2 抗体 Fc 突变体与 Fc $\gamma$ RIIB 的结合能力(表达为 ELISA 信号：在 650nm 的吸光值(A650))。

图 13 显示了不同 IgG2 抗体 Fc 突变体与 Fc $\gamma$ RIIIA<sup>158F</sup> 的结合能力(表达为 ELISA 信号：在 650nm 的吸光值(A650))。

图 14 显示了不同 IgG2 抗体 Fc 突变体与 Fc $\gamma$ RIIIA<sup>158V</sup> 的结合能力(表达为 ELISA 信号：在 650nm 的吸光值(A650))。

图 15 显示了 ELISA 分析 IgG1 V11(hIgG1V11)上对应到 IgG2 上突变体与 Fc $\gamma$ RIIA<sup>131H</sup> 以及与 Fc $\gamma$ RIIB 的结合能力(表达为 ELISA 信号：在 650nm 的吸光值(A650))。

图 16 显示了不同抗体 Fc 突变体抗人 OX40 抗体免疫激活活性分析结果，表达为 CD4 阳性细胞 CFSE 的平均荧光强度柱状图(CFSE 信号越低，活性越高)。

图 17 显示了不同抗体 Fc 突变体抗人 OX40 抗体免疫激活活性分析结果，表达为 CD4 阳性细胞 CFSE 的荧光强度直方图(CFSE 信号越低，活性越高)。

### 具体实施方式

- 5 除非另有说明，否则本文中所使用的科学与技术术语应具有那些本领域普通技术人员通常理解的含义。此外，除非本文中另有要求，否则单数术语应包括复数，且复数术语应包括单数。通常，本文中所描述的细胞及组织培养、分子生物学、免疫学及蛋白质与核酸化学所涉及的命名法与其技术均是本领域已知且常用的。
- 10 本发明的方法与技术通常依据本领域已知的传统方法进行，且说明于本说明书所摘录和讨论的多种一般性及较专业性参考书中，除非另有说明。参见例如：Sambrook 等人的 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*，第 2 版(Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989)) 及 Ausubel 等人的 *Current Protocols in Molecular Biology* (Greene Publishing Associates(1992))，及 Harlow 与 Lane 的 *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1990))，其内容已以引用的方式并入本文中。酶反应与纯化技术是根据制造商的说明书进行，通常可依本领域已知的方法或依本文说明的方法进行。与本文中描述的分析化学、合成有机化学、及医学与医药化学相关的命名法，及实验方法与技
- 15 术是本领域已知且常用的。化学合成法、化学分析法、医药制法、调配法与药物递送法，及患者的治疗法均采用标准技术。
- 20

除非另有说明，否则下列术语具有如下定义。

- “抗体”(Ab)应包括，但不仅限于，糖蛋白免疫球蛋白，其特异性结合抗原并且至少包括通过二硫键相互连接的两个重(H)链和两个轻(L)链，或其抗原
- 25 结合部分。每个 H 链包含重链可变区(本文缩写为 VH)和重链恒定区。抗体“重链恒定区”，又称 CDs，包含 CH1、CH2 和 CH3 三个结构域以及位于 CH1 结构域与 CH2 结构域之间的铰链区。每条轻链包含轻链可变区(本文缩写为 VL)和轻链恒定区。轻链恒定区由一个结构域 CL 组成。VH 和 VL 区可以进一步细分为高变性的区域，称为互补决定区(CDR)，它们之间散在着较为保守的称作框架区(FR)
- 30 的区域。每个 VH 和 VL 由三个 CDR 和四个 FR 组成，从氨基端向羧基端按以下顺序排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区包

含与抗原相互作用的结合结构域。

“Fc 区”（可结晶片段区域）或“Fc 结构域”或“Fc”是指抗体重链的 C-末端区域，其介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合，包括与位于免疫系统的各种细胞（例如，效应细胞）上的 Fc 受体的结合，或者与经典补体系统的第一组分（C1q）的结合。因此，Fc 区是构成抗体重链恒定区中除第一恒定区免疫球蛋白结构域（CH1 结构域）之外的部分的多肽。在 IgG，IgA 和 IgD 抗体同种型中，Fc 区由来自抗体两条重链的第二（CH2 结构域）和第三（CH3 结构域）恒定结构域的两个相同的蛋白片段构成；IgM 和 IgE 的 Fc 区在每个多肽链中包含三个重链恒定结构域（CH2-CH3-CH4 结构域）。对于 IgG，Fc 区包含免疫球蛋白结构域 CH2 和 CH3 以及 CH1 和 CH2 之间的铰链区。虽然免疫球蛋白重链的 Fc 区的边界可以变化，但是人 IgG 重链 Fc 区在本发明中被定义为从重链位置 P231 的氨基酸残基到羧基端的序列段，其中该编号是根据 EU 编号，如在 Kabat 中一样。人 IgG Fc 区的 CH2 结构域从大约氨基酸 231 延伸至大约氨基酸 340，而 CH3 结构域位于 Fc 区的 CH2 结构域的 C 末端侧，即，它从 IgG 的大约氨基酸 341 延伸至大约氨基酸 447。

“Fc 多肽片段”指包含在 Fc 区内的片段，本发明所指的 Fc 多肽片段是指 Fc 区中从氨基酸 233 延伸至氨基酸 332 的片段，或者包含该片段的其它 Fc 区内的片段，例如 Fc CH2 结构域或者 Fc 区。

如本文所使用的，“Fc 区”或者“Fc 多肽片段”可以是天然 Fc 或改造后的 Fc。此外，“Fc 区”或者“Fc 多肽片段”还可以指处于分离状态的这个区域，或者处于包含 Fc 的蛋白多肽中的这个区域，这样的多肽又称“Fc 融合蛋白”（例如，抗体或免疫粘附素）。

“Fc 受体”或“FcR”是结合免疫球蛋白 Fc 区的受体。结合 IgG 抗体的 FcR 包括 FcγR 家族的受体，包括这些受体的等位基因变体和可变剪接形式。人 Fcγ 受体家族包括几个成员：FcγRI（CD64）、FcγRIIA（CD32a）、FcγRIIB（CD32b）、FcγRIIIA（CD16a）、FcγRIIIB（CD16b）。其中，FcγRIIB 是唯一的抑制性 Fcγ 受体，其它均为激活型 Fcγ 受体。大多数天然效应器细胞类型共表达一种或多种激活型 FcγR 和抑制型 FcγRIIB，而自然杀伤（NK）细胞选择性地表达一种激活型 Fcγ 受体（在小鼠中是 FcγRIII，在人中是 FcγRIIIA），但在小鼠和人类中不表达抑制型 FcγRIIB。这些 Fcγ 受体的分子结构不同，也因此对各 IgG 抗体亚类具有不同的亲和力。在这些 Fcγ 受体中 FcγRI 是高亲和力受体，而

Fc $\gamma$ RIIA、Fc $\gamma$ RIIB 和 Fc $\gamma$ RIIIA 是低亲和力受体。基因多态性也存在于这些不同的 Fc $\gamma$  受体中并影响它们的结合亲和力。最常见的基因多态性是 Fc $\gamma$ RIIA 的 R131/H131 和 Fc $\gamma$ RIIIA 的 V158/F158 等多态形式。这些多态形式中有的被发现与多种疾病有相关性，一些特定治疗抗体的效果也依赖于病人是否带有特定的 Fc $\gamma$  受体基因多态形式。

本发明所述“序列”应当理解为包括与本发明序列实质相同的序列，所述“实质相同的序列”一词指当经过最适比对后，如：采用 GAP 或 BESTFIT 程序，使用默认缺口值测定两种肽序列之间具有至少 70、75 或 80% 序列同一性，优选为至少 90 或 95% 序列同一性，更优选为至少 97、98 或 99% 序列同一性。优选的，不相同的残基位置的差异最好为保守性氨基酸取代。“保守性氨基酸取代”指其中氨基酸残基被另一种具有化学性质（例如：电荷或亲水性）类似的侧链 R 基的氨基酸残基取代。通常，保守性氨基酸取代实质上不会改变蛋白质的功能性质。若其中两种或多种氨基酸序列的差异在于保守性取代时，可使序列同一性百分比或相似度上调，以校正取代作用的保守性质。参见例如：Pearson, Methods Mol. Biol. 243: 307-31 (1994)。具有相似化学性质的侧链的氨基酸基团实例包括：1) 脂肪族侧链：甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、与异亮氨酸；2) 脂肪族-羟基侧链：丝氨酸与苏氨酸；3) 含酰胺侧链：天冬酰胺与谷氨酰胺；4) 芳香族侧链：苯丙氨酸、酪氨酸、与色氨酸；5) 碱性侧链：赖氨酸、精氨酸、与组氨酸；6) 酸性侧链：天冬氨酸与谷氨酸；及 7) 含硫侧链：半胱氨酸与甲硫氨酸。优选保守性氨基酸取基组为：缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、谷氨酸-天冬氨酸、及天冬酰胺-谷氨酰胺。正如上面所指出的，根据本发明的 Fc 区、抗体、Fc 片段或者融合蛋白除了具备本发明所提供的氨基酸突变之外，也可以进一步包含本发明所未揭示的其它可能的修饰，只要满足上面所述的实质相同的序列要求。

本发明抗体及其片段或者结构域的氨基酸的序号是以 IgG Eu 编号为依据的。本发明中涉及的部分突变体对应的突变类型及其命名见表 1。

抗体通常以高亲和力特异性结合其关联抗原（同样地，本发明的蛋白也可以特异性结合其表位识别分子），这表现为  $10^{-5}$ - $10^{-11}$  M 或更小的解离常数 (KD)。任何大于大约  $10^{-4}$  M<sup>-1</sup> 的 KD 通常被认为指示非特异性结合。如本文所使用的，与抗原“特异性结合”的抗体是指以高亲和力与抗原和基本上相同的抗原结合的抗体，这意味着 KD 为  $10^{-7}$  M 或更小，优选地  $10^{-8}$  M 或更小，甚至更优选

地  $5 \times 10^{-9}$  M 或更小, 最优选地  $10^{-8}$ – $10^{-10}$  M 或更小, 但是不会以高亲和力与无关抗原结合。如果抗原与给定抗原显示高度的序列同一性, 例如, 如果它与给定抗原的序列显示至少 80%, 至少 90%, 优选至少 95%, 更优选至少 97%, 或甚至更优选至少 99% 的序列同一性, 则该抗原与给定抗原是“基本上相同的”。

5 免疫球蛋白可能来自任何通常已知的同种型。IgG 同种型在某些物种中可以被分细为亚类: 人类中的 IgG1, IgG2, IgG3 和 IgG4, 小鼠中的 IgG1, IgG2a, IgG2b 和 IgG3。“同种型”是指由重链恒定区基因编码的抗体类别(例如 IgM 或 IgG1)。“抗体”包括例如天然存在的和非天然存在的抗体; 单克隆和多克隆抗体; 嵌合和人源化抗体; 人或非人抗体; 全合成抗体; 和单链  
10 抗体。

本发明所述的“天然 IgG”是指那些可以在自然界中天然存在的 IgG, 这些 IgG 的序列不是经过人工修饰的。需要说明的是, 由于基因多态性的原因, 即便是天然 IgG 也可以存在不同的突变体, 不论是否突变, 只要是自然状态下非经人工修饰的 IgG 都被称之为天然 IgG。

15 “激动型抗体”是与受体结合并激活受体的抗体, 激动型抗体的功能实例是与肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族中受体结合并诱导表达 TNF 受体的细胞凋亡。测定细胞凋亡诱导作用的试验描述在 W098/51793 和 W099/37684 中, 该两篇文献特别在此引入作为参考。本发明具体的实施例中抗 CD40 的激动型抗体能够通过结合免疫细胞表面传递免疫激活信号的靶标分子并激活其控制的重  
20 要免疫激活信号通路, 进而增强抗肿瘤免疫应答间接杀死肿瘤细胞。一些已经进入临床研究阶段的激动型抗体的实例可以参考专利 PCT/CN2017/087620。

“激动活性”是指通过使抗体与抗原分子结合, 激发该抗原分子产生信号, 诱导某些特异性生理活性变化的活性。抗原分子包括受体分子和其它具有信号或生理功能的分子。上述特异性生理活性包括, 例如: 增殖活性、生存活  
25 性、分化活性、转录活性、膜转运活性、亲和力、蛋白分解活性、磷酸化/脱磷酸化活性、氧化还原活性、转移活性、核酸分解活性、脱水活性、细胞死亡诱导活性及凋亡诱导活性等, 但不限于这些。

“亲本”指在蛋白质改造过程中, 改造的对象。所述亲本可以是天然发生的多肽, 或者是天然发生的多肽的变体或改造型式。在一些实施例中, 本发明  
30 所述亲本 Fc 区为天然 IgG 的 Fc 区。

“变体”指在蛋白质改造过程中, 亲本经过修饰后所获得的蛋白。具体的

可以是通过亲本氨基酸的突变、缺失和/或添加而衍生出来的，且保留亲本中固有的一些或所有功能的蛋白质，本文变体的序列优选与亲本的序列拥有至少约 80% 的同源性，最优选至少约 90% 的同源性，更优选至少约 95% 的同源性。相应的是，本文所用“Fc 变体”指由于至少一个氨基酸修饰而不同于亲本 Fc 5 序列的 Fc 序列。Fc 变体可以仅包含 Fc 区，或者可以在抗体、Fc 融合物、分离的 Fc、Fc 区、或基本上由 Fc 编码的其它多肽的背景中存在。Fc 变体可以指 Fc 多肽本身、包含 Fc 变体多肽的组合物、或者编码它的氨基酸序列。

本文的“肿瘤坏死因子受体超家族”或“TNF 受体超家族”，是指可与 TNF 家族的细胞因子结合的受体多肽。一般而言，这些受体是在其胞外区具有一个或多个半胱氨酸丰富的重复序列的 I 型跨膜受体。TNF 基因家族中细胞因子的实例包括：肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、肿瘤坏死因子- $\beta$  (TNF- $\beta$  或淋巴毒素)、CD30 配体、CD27 配体、CD40 配体、OX-40 配体、4-1BB 配体、Apo-1 配体(也称作 Fas 配体或 CD95 配体)、Apo-2 配体(也称作 TRAIL)、Apo-3 配体(也称作 TWEAK)、osteoprotegerin(OPG)，APRIL、RANK 配体(也称作 TRANCE)，和 15 TALL-1(也称作 BlyS、BAFF 或 THANK)。TNF 受体超家族中受体的实例包括：1 型肿瘤坏死因子受体(TNFR1)、2 型肿瘤坏死因子受体(TNFR2)、p75 神经生长因子受体(NGFR)、B 细胞表面抗原 CD40、T 细胞抗原 OX-40、Apo-1 受体(也称作 Fas 或 CD95)、Apo-3 受体(也称作 DR3、sw1-1、TRAMP 和 LARD)、称作“跨膜激活剂和 CAML-相互作用子(interactor)”或“TACI”的受体、BCMA 蛋白、20 DR4、DR5(或者，也称作 Apo-2；TRAIL-R2，TR6，Tango-63，hAPO8，TRICK2 或 KILLER)、DR6、DcR1(也称作 TRID、LIT 或 TRAIL-R3)、DcR2(也称作 TRAIL-R4 或 TRUNDD)、OPG、DcR3(也称作 TR6 或 M68)、CAR1、HVEM(也称作 ATAR 或 TR2)、GITR、ZTNFR-5、NTR-1、TNFL1、CD30、淋巴毒素  $\beta$  受体(LTBr)、4-1BB 受体和 TR9(EP988, 371 A1)。

25 本发明所述的“对抑制型 Fc $\gamma$  受体以及激活型 Fc $\gamma$  受体的亲和力比值”或者“I/A 比值”等于抗体重链恒定区与抑制型 Fc $\gamma$  受体(例如：人 Fc $\gamma$ RIIB)的亲和力值除以抗体重链恒定区与同种属的激活型 Fc $\gamma$  受体(例如：包括人 Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RIIA、Fc $\gamma$ RIIIA、Fc $\gamma$ RIIIB)的最高亲和力值。

所述的“亲和力”是指两个分子之间的结合能力的大小，通常地可以用 KD 30 来衡量，在本发明中也可以用富集倍数(如表 7)或者结合分析信号来衡量(如图 12)。“KD”指两个分子(例如：特定抗体和抗原或者配体和受体)相互作用的

平衡解离常数。“富集倍数”指采用本发明所提供的流式细胞分选方法或者磁珠分选方法进行分选后，表达包含特定 Fc 突变的抗体的细胞在分选后的百分比/分选前的百分比(由二代测序分析，如表 7 所示)。“结合分析信号”采用本发明所提供的 ELISA 分析中的吸光值(如图 12)。

5 “人”抗体是指这样的抗体，其可变区具有来自人种系免疫球蛋白序列的框架区和 CDR 区。而且，如果抗体含有恒定区，则恒定区也来自人种系免疫球蛋白序列。本发明的人抗体可以包括不是由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如，通过体外随机或定点突变或者通过体内体细胞突变引入的突变)。然而，如本文所使用的，术语“人抗体”，不意图包括来自其它哺乳动物物种(如小鼠)的种系的 CDR 序列被嫁接到人框架序列上的抗体。术语“人”  
10 抗体和“完全人”抗体被同义使用。

本发明“抗体”包括例如天然存在的和非天然存在的抗体；单克隆和多克隆抗体；嵌合和人源化抗体；人或非人抗体；全合成抗体。

“人源化”抗体是指其中非人抗体 CDR 结构域以外的一些、大部分或全部的氨基酸被来自人免疫球蛋白的相应氨基酸所替换的抗体。在人源化形式抗体的一个实施方案中，CDR 结构域以外的一些、大部分或全部氨基酸被来自人免疫球蛋白的氨基酸代替，而一个或多个 CDR 区域内的一些、大部分或全部氨基酸都不变。允许对氨基酸进行小的添加、删除、插入、取代或修饰，只要它们不会消除抗体结合特定抗原的能力即可。“人源化”抗体保留与原始抗体相似的  
15 的抗原特异性。

“嵌合抗体”是指可变区来自一个物种而恒定区来自另一个物种的抗体，例如可变区来自小鼠抗体而恒定区来自人抗体的抗体。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，例如 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明，否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。  
25

30 表 1 本发明中涉及的部分突变体对应的突变类型及其命名

|    |         |    |         |
|----|---------|----|---------|
| 命名 | IgG2 突变 | 命名 | IgG2 突变 |
|----|---------|----|---------|

|        |                                                       |        |                                                             |
|--------|-------------------------------------------------------|--------|-------------------------------------------------------------|
| Mut_1  | L328W                                                 | Mut_16 | S267E/S298G                                                 |
| Mut_2  | H268D/S298L/L328W                                     | Mut_17 | V266L/S267E/H268S/E269V                                     |
| Mut_3  | S267V/S298L/L328W                                     | Mut_18 | P233G/S267E                                                 |
| Mut_4  | V234M/S267E/S298L/L328W                               | Mut_19 | V266L/S267E/H268S/E269V/P271C                               |
| Mut_5  | A235W/V266L/S298L/L328W                               | Mut_20 | V266L/S267E/H268S/E269A/P271C                               |
| Mut_6  | V234Q/A235G/P238L/S239V/H268D/G327A/L328E/A330S/I332T | Mut_21 | S267V/S298G/L328W                                           |
| Mut_7  | S239V/V266L/S298L/L328W                               | Mut_22 | V266L/S267M/H268E/P271Q                                     |
| Mut_8  | V266L/L328W                                           | Mut_23 | V266L/S267E/E269K/P271G                                     |
| Mut_9  | V266L/S267D/H268D/E269D/P271Q                         | Mut_24 | V266L/S267E/H268S/E269G/P271T                               |
| Mut_10 | S267E/H268S/E269D                                     | Mut_25 | V234Q/V266L/S267D/H268D/E269D/P271Q                         |
| Mut_11 | S267E/A330S                                           | Mut_26 | V234Q/A235G/P238L/S239V/S267E/H268S/E269D                   |
| Mut_12 | P233F/V266L/S298L/L328W                               | Mut_27 | V266L/S267E/H268S/P271V                                     |
| Mut_13 | V266L/S298L/L328W                                     | Mut_28 | P233G/S267E/S298G                                           |
| Mut_14 | V234M/S267E/S298G/I332L                               | Mut_29 | V234Q/A235G/P238L/S239V/S267E/S298L/G327A/L328E/A330S/I332T |
| Mut_15 | V234Q/A235G/P238L/S239V/G327A/L328E/A330S/I332T       | Mut_30 | V234Q/V266L/S267E/H268S/E269V                               |

# 材料与方法

## 哺乳动物表面展示载体构建

将人 IgG2 抗鼠 CD40 抗体轻链和重链全长序列通过多片段一步法快速克隆试剂盒(上海翊圣生物科技有限公司, 中国)构建至逆转录病毒载体 MIGRI (Addgene、Pear 等, Blood. 1998 Nov 15. 92(10):3780-92.) 上, 所用引物见表 2, 构建图谱如图 1 所示, 限制性内切酶 BglIII 单酶切后插入完整抗体的轻链 DNA 和重链 DNA, 中间以一段自剪切 Linker P2A 相连, 其中重链 DNA 的末端包含一段跨膜结构域 DNA(各片段的 DNA 序列如表 3), 该质粒在表达抗体人 IgG2 的同时也会表达 GFP 蛋白, 表面展示抗体及其相关 Fc 区的氨基酸序列如表 4。测序确认构建成功。

表 2. 哺乳动物表面展示抗体质粒构建所用引物

|              |                     |                                          |
|--------------|---------------------|------------------------------------------|
| SEQ ID NO: 1 | 5MIGR1-Bg<br>111-LC | CTAGGCGCCGGAATTAGATCTACCATGGAGACAGACAGAC |
| SEQ ID NO: 2 | 3' LC-P2            | GTTTGTGCGCCGGATCCACACTCTCCCCTGTTGAA      |
| SEQ ID NO: 3 | 5' LC-P2            | TTCAACAGGGGAGAGTGTGGATCCGGCGCAACAAAC     |
| SEQ ID NO: 4 | 3' P2-HC            | GCTGAGCCTGATGTCCATGGGTCCAGGATTCTCTTC     |
| SEQ ID NO: 5 | 5' P2-HC            | GAAGAGAATCCTGGACCCATGGACATCAGGCTCAGC     |
| SEQ ID NO: 6 | 3' HC-TM            | GGATGGAGGAGGCTCGAGTTTACCCGGAGACAGGGA     |
| SEQ ID NO: 7 | 5' HC-TM            | TCCCTGTCTCCGGGTAAACTCGAGCCTCCTCCATCC     |

|              |                     |                                       |
|--------------|---------------------|---------------------------------------|
| SEQ ID NO: 8 | 3MIGR1-Bg<br>III-TM | TTCGTAACTCGAGAGATCTTCACGCTAGAGAATGAGG |
|--------------|---------------------|---------------------------------------|

表 3. 表面展示抗体各片段的 DNA 序列

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 抗体轻链 DNA 序列 (SEQ ID NO: 9):<br>ATGGAGACAGACAGACTCCTGCTATGGGTGCTGCTGCTCTGGGTGCCAGGCTCCACTGGTGACAC<br>TGTACTGACCCAGTCTCCTGCTTTGGCTGTGTCTCCAGGAGAGAGGGTTACCATCTCCTGTAGGG<br>CCAGTGACAGTGTCACTACACTTATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCAACCCAACTC<br>CTCATCTATCTAGCATCACACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGG<br>GACAGACTTCACCCTCACCATTGATCCTGTGGAGGCTGATGACACTGCAACCTATTACTGTCAGC<br>AGAGTTGGAATGATCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAATTGAAACGAACTGTGGCT<br>GCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAATGCCTCTGTTGT<br>GTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCC<br>AATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC<br>AGCACCTGACGCTGAGCAAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCA<br>TCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 自剪切 Linker P2A DNA 序列 (SEQ ID NO: 10):<br>GGATCCGGCGCAACAACTTCTCTCTGCTGAAACAAGCCGGAGATGTCGAAGAGAATCCTGGACC<br>C                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 抗体重链 DNA 序列 (SEQ ID NO: 11):<br>ATGGACATCAGGCTCAGCTTGGTTTTCTTGTCTTTTCATAAAAGGTGTCCAGTGTGAGGTGCA<br>GCTGGTGGAGTCTGATGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAAGGTCCCTAAAACCTCCCCTGTGCAGCCT<br>CAGGATTCACTTTCAGTGACTATTACATGGCCTGGGTCCGCCAGGCTCCAACGAAGGGGCTGGAG<br>TGGGTGCAAGCATTAGTTATGATGGTAGTAGCACTTACTATCGAGACTCCGTGAAGGGCCGATT<br>CACTATCTCCAGAGATAATGCAAAAAGCACCTATACCTGCAAATGGACAGTCTGAGGTCTGAGG<br>ACACGGCCACTTATTACTGCGGAAGACACAGTAGCTACTTTGATTACTGGGGCCAAGGAGTCATG<br>GTCACAGTCTCGAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAG<br>CACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGG<br>TGTCGTGGAATCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCAGCTGTCTTACAGTCTCA<br>GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACAC<br>CTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTG<br>TCGAGTGCCACCGTGCCAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAA<br>CCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCA<br>CGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA<br>AGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTTGTGCACCAG<br>GACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCATCGA<br>GAAAACCATCTCCAAAACCAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCC<br>GGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGAC<br>ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACACCTCCCATGCT<br>GGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG<br>GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| TCCCTGTCTCCGGGTAAA                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 跨膜结构域 DNA 序列 (SEQ ID NO: 12):<br>CTCGAGCCTCCTCCATCCACTGTCTCCAACATGGCGACCGTTGCTGTTCTGGTTGTCCTTGGAGC<br>TGCAATAGTCACTGGAGCTGTGGTGGCTTTTGTGATGAAGATGAGAAGGAGAAACACAGGTGGAA<br>AAGGAGGGGACTATGCTCTGGCTCCAGGCTCCCAGACCTCTGATCTGTCTCTCCAGATTGTAAA<br>GTGATGGTTCATGACCCTCATTCTCTAGCGTGA |

表 4. 表面展示抗体及其相关 Fc 区的氨基酸序列

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 人 IgG2 抗鼠 CD40 表面展示抗体氨基酸序列 (SEQ ID NO: 13):<br>METDRLLLWVLLLWVPGSTGDTVLTQSPALAVSPGERVTISCRASDSVSTLMHWYQQKPGQPKL<br>LIYLASHLESGVPARFSGSGSGTDFTLTIDPVEADDTATYYCQQSWNDPWTFGGGKLELKRVA<br>APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL<br>STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMDIRL<br>SLVFLVLFIKGVQCEVQLVESDGGVLVQPGRSLKLPAAASGFTFSDYYMAWVRQAPTGLEWVASI<br>SYDGSSTYYRDSVKGRFTISRDNASTLYLQMSDLSRSEDATYYCGRHSSYFDYWGQGVMTVSS<br>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL<br>SSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL<br>MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNG<br>KEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW<br>ESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG<br>KLEPPSTVSNMATVAVLVVLGAAIVTGAVVAFVMKMRRTGKGKGDYALAPGSQTSDSLSPDC<br>KVMVHDPHSLA |
| 人 IgG2 抗鼠 CD40 表面展示抗体 Fc 区氨基酸序列 (SEQ ID NO: 14):<br>APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF<br>NSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN<br>QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSC<br>VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 人 IgG2 抗鼠 CD40 表面展示抗体 Fc CH2 结构域氨基酸序列 (SEQ ID NO: 15):<br>APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF<br>NSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| IgG2 抗体 Fc 部分 Eu 编号第 233 位至第 332 位对应氨基酸序列 (SEQ ID NO: 20):<br>PVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE<br>EQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPI                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |

Fc 突变文库构建

- 5 点突变文库为通过简并引物引入突变，设计多条简并引物。例如，P233 位点突变所用简并引物为 CCACCGTGCCAGCACCANNSTGGCAGGACCGTCAGTC (SEQ ID NO: 21)。分别将突变文库片段和所需连接载体通过 PCR 获得，一步法快速克隆试剂盒 (上

海翊圣生物科技有限公司, 中国)连接转化进入 DH5  $\alpha$ , 获得突变文库。每个文库挑取 20 个菌落测序确认是否在目的位置引入突变。

组合突变文库的方法类似, 引物为根据点突变文库已经筛选获得的具有富集的突变类型所设计, 中间简并引物处改为编码特定氨基酸的密码子或者编码几个氨基酸的简并密码子组成的引物序列, 例如: L328W(TGCAAGGTCTCCAACAAAGGCTGGCCAGCCCCATCGAGAAAAC, SEQ ID NO: 22)、Combine2\_1(ACGTGCGTGGTGGTGGACKNGWBGVASRWSSACCHGGAGGTCCAGTTCAACTGG, SEQ ID NO: 23)。

上述引物序列中除正常碱基外的符合为简并碱基: R 代表 A/G、Y 代表 C/T、M 代表 A/C、K 代表 G/T、S 代表 G/C、W 代表 A/T、H 代表 A/T/C、B 代表 G/T/C、V 代表 G/A/C、D 代表 G/A/T、N 代表 A/T/C/G。

### 稳转细胞系构建

将上述文库质粒和辅助质粒 Phoenix-Eco(摩尔比 2:1)与转染试剂 PEI(质量比 1:5)混合加入到提前铺板的 Phoenix 细胞(密度 80%)中, 6 小时换成新鲜培养基, 48 小时后收集含有逆转录病毒的上清。用 50%上述逆转录病毒上清加 50%新鲜培养基感染提前铺板密度 80%的 3T3 细胞, 24 小时后换液, 48 小时后即可获得表达抗体的稳转细胞系。

### 流式细胞仪分析表达抗体的稳转细胞系

胰酶消化收集 3T3 细胞, 制备单细胞悬浮液, 将约  $1-5 \times 10^6$  个细胞重悬在含有 PE-F(ab')<sub>2</sub> Fragment Goat Anti-Human IgG (1:500, Jackson ImmunoResearch Laboratories)或者 Biotin-Fc $\gamma$ RIIB(1  $\mu$ g/ml, 义翘神州)和 Streptavidin-APC(1:500, BD Biosciences)的 50  $\mu$ l FACS 缓冲液(含有 0.5% FBS 和 2mM EDTA 的 1xPBS)中, 冰上孵育 15 分钟, 然后 FACS 缓冲液洗涤细胞两次, 重悬于 200  $\mu$ l FACS 缓冲液中, 并通过流式细胞仪分析。

### 流式细胞分选与 Fc $\gamma$ RIIB 高亲和力的细胞

按照上述流式细胞仪分析染色方法等比例放大染色体系, 最终细胞重悬至约  $1-5 \times 10^7$  个细胞/ml, 上机, 选取 IgG 表达(PE 荧光信号强), 同时 Fc $\gamma$ RIIB 高亲和力(APC 荧光信号强)的细胞, 比例控制在小于 1%的 IgG 阳性细胞量。

**磁珠分选与 FcγRIIB 亲和力高但与激活型 FcγR 的亲和力弱的细胞(I/A 比值高)**

胰酶消化收集 3T3 细胞，制备单细胞悬浮液，将约  $1 \times 10^7$  个细胞重悬在含有 Biotin-FcγRIIB( $1 \mu\text{g/ml}$ , 义翘神州)和激活型 FcγR(包括 FcγRI、FcγRIIA<sup>131H</sup>、FcγRIIA<sup>131R</sup>、FcγRIIIA<sup>158V</sup>、FcγRIIIA<sup>158F</sup>, 均  $1 \mu\text{g/ml}$ , 上海近岸科技有限公司)的  $50 \mu\text{l}$  MACS 缓冲液(含有 0.5%BSA, 2mM EDTA 的  $1 \times \text{PBS}$ )中, 在冰上孵育 15 分钟, 然后 MACS 缓冲液洗涤细胞两次, 重悬于  $100 \mu\text{l}$  MACS 缓冲液中, 加入  $25 \mu\text{l}$  抗 Biotin 微珠, 在冰上孵育 15 分钟, MACS 缓冲液洗涤细胞一次, 重悬至  $500 \mu\text{l}$ , 加入到以放入磁场的 LS 柱中, 收集流出液,  $3\text{ml}$  MACS 缓冲液洗涤并收集, 最后 LS 柱移出磁场,  $5\text{ml}$  MACS 缓冲液快速将分选柱上滞留的细胞洗脱下来, 收集阳性细胞, 这些细胞即 I/A 比值高的细胞。

**高通量测序分析**

取目的细胞群约  $0.1-5 \times 10^6$  个细胞, 裂解, 提取基因组 DNA, PCR, 自建库进行高通量测序(PE150 或 PE250), 每个样品获得约 6-30 万条序列, 提取突变区域的核苷酸序列, 将其批量翻译成对应的氨基酸序列(<http://www.cbs.dtu.dk/services/VirtualRibosome/>, Rasmus Wernersson. Nucl. Acids Res. 2006 34: W385-W388), 计算每个样品中各突变序列所占比例: 突变序列所占比例=突变序列条数/总序列条数。

**抗体表达纯化**

将二代测序中的有利 Fc 突变体或新的组合突变体构建到抗人 OX40 抗体的重链中, 和对应的抗体轻链一起瞬转进入 HEK293S 细胞表达蛋白, Protein G 纯化获得不同的 Fc 突变抗体, SDS-PAGE 检测抗体结构均完整的。抗人 OX40 抗体 DNA 序列和蛋白序列见表 5 和表 6。

表 5. 野生型 IgG2 抗人 OX40 抗体 DNA 序列

|                                                                    |
|--------------------------------------------------------------------|
| 抗体轻链DNA序列(SEQ ID NO:16):                                           |
| ATGGAACCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGAGAAAT   |
| TGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCA  |
| GGGCCAGTCAGAGTGTTAGCGGCGACTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAACTTGGCCAGGCTCCC   |
| AGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCATCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCA GTGGCAGTGG |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| GTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAAAGTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACT<br>GTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGAACT<br>GTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTC<br>TGTGTGTGCCTGCTGAATAAATTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACG<br>CCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGC<br>CTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGT<br>CACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTGA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 野生型IgG2抗体重链DNA序列(SEQ ID NO:17):<br>ATGAAACACCTGTGGTTCTTCTCCTCCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCTGTCTCAGGTGCA<br>GCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGGGACCCTGTCACTCACCTGCGCTGTCT<br>CTGGTGGCTCCATCAGCAGTAGTATCTGGTGGAGCTGGGTCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTG<br>GAATGGATTGGGAAAATCCATCATAGTGGGAACACCAACTGCAATCCGTCCCTCAAGAGTCGAGT<br>CACCATATCAATAGACAAGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAACTGACCTCTGTGACCGCCGCGG<br>ACACGGCCGTATATTATTGTGCGAGAGCGGAACTGGAACACGCTTGACTACTGGGGCCAGGGA<br>ACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTC<br>CAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGG<br>TGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCAGCTGTCTTACAG<br>TCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGAC<br>CTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAAT<br>GTTGTGTCGAGTGCCACCGTGCCAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCC<br>CAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGT<br>GAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA<br>AGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCTTACCCTGTG<br>CACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCC<br>CATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCC<br>CATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCC<br>AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACACCTCC<br>CATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC<br>AGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAG<br>AGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGA |

表 6. 野生型 IgG2 抗人 OX40 抗体蛋白序列

|                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 抗体轻链蛋白序列(SEQ ID NO: 18):<br>METPAQLLFLLLLWLPDITGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSGDYLAWYQQKLQAP<br>RLLIYGASIRATGIPDRFSGSGSDFTLTISKLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGTKVEIKRT<br>VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS<br>LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 野生型IgG2抗体重链蛋白序列(SEQ ID NO:19):<br>MKHLWFFLLLVAAPRWLSQVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGGSISSSIWWSVRQPPGKGL<br>EWIGEIHHSNTNCNPSTKSRVTISIDKSKNQFSLKLTSTVTAADTAVYYCARAGTGTTLDYWGQG<br>TLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ                                     |

SSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFP  
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVV  
HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP  
SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQK  
SLSLSPGK

### 酶联免疫吸附实验 (ELISA) 分析突变抗体与Fc $\gamma$ R的结合特性

- 取2  $\mu$ g/mL, 100  $\mu$ L的抗体或其突变体加入酶联板中包被过夜, 弃上清, 用含1% BSA的PBS封闭2小时, PBST(含0.05%吐温20的PBS)洗涤, 然后加入适当浓度的Biotin标签的Fc $\gamma$  R胞外结构域蛋白(北京义翘神州生物技术有限公司)室温孵育1小时后弃掉上清, PBST洗涤。加入Streptavidin-HRP(BD生物科技)室温孵育1小时检测Biotin蛋白, 去除上清, 加入显色液显色20-40分钟后测定650 nm的吸光值(A650)。

### 10 不同抗体Fc突变抗人OX40抗体体外免疫激活活性分析(促进T细胞增殖)

- 分离人源化 FC $\gamma$  R/OX40 小鼠脾脏, 制备裂解红细胞的单细胞悬液, 进行CFSE 标记, 用含有 5  $\mu$ M CFSE 的 PBS 重悬细胞浓度为  $5 \times 10^6$ /mL, 37 $^{\circ}$ C放置 15 分钟, 含有 5% FBS 的 PBS 600g, 5min, 洗 2 次, 然后用原代细胞培养基(RPMI + 10% FBS + 1% Pen/Strep +1% HEPES +1% Sodium Pyruvate + 0.1% 2ME (final 50  $\mu$ M) + 1% L-glutamine + 1% Non-essential Aa)重悬细胞浓度为  $3 \times 10^6$ /ml, 每孔加入 100  $\mu$ L 细胞液, 即每孔含有  $3 \times 10^5$  个细胞。用含有 0.2  $\mu$ g/ml 抗 CD3 的原代细胞培养基稀释抗体浓度分别为 2、0.2、0.02  $\mu$ g/ml。转移上述 100  $\mu$ L 配置好的抗体混合物到已经含有 CFSE 标记的人源化 FC $\gamma$  R/OX40 脾脏细胞孔中。其中有两组对照分别为 CD3 only 组加 CFSE 标记的细胞和抗鼠 CD3, 但不加其它抗体; CD3+CD28 组加 CFSE 标记的细胞和抗鼠 CD3, 并加入浓度为 2  $\mu$ g/ml 的抗鼠 CD28 抗体(Clone37.51(RUO), BD 制药)(抗鼠 CD3 和 CD28 终浓度分别为 0.1  $\mu$ g/ml 和 1  $\mu$ g/ml)。在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 恒温细胞培养箱中孵育 3 天。培养结束后, 收集细胞用流式检测 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>细胞数量和扩增情况。流式细胞术检测 T 细胞的增殖: 将上述培养后的细胞转移至 96 孔 U 底板中, 用 PBS 洗 2 遍, 500g 离心 5 分钟, 甩去上清, 将细胞重悬在含有 PE anti-mouse CD4(Clone: GK1.5, 1:500, BD) 和 APC anti-mouse CD8a(Clone: 53-6.7, 1:500, BioLegend) 的 50  $\mu$ L FACS 缓冲液(含有 0.5% FBS, 2mM EDTA 的 PBS)中, 冰上避光孵育 15 分

钟, 然后 PBS 缓冲液洗涤细胞两次, 重悬于含有 DAPI (0.5  $\mu$ g/ml, Invitrogen) 和 CountBright Absolute Counting Beads (Life Technologies, 2  $\mu$ l/sample) 的 200  $\mu$ l FACS 缓冲液中, 并通过流式细胞仪分析。

5 本发明主要提供了一些增强人 IgG2 与 Fc $\gamma$ RIIB 相互作用的抗体 Fc 突变体序列。同时本发明也提供了筛选获得这些突变体的方法, 如图 2 所示, 根据上述方法可以筛选特定亲和性质的 Fc 突变体。

不仅如此, 现有技术的人员根据本发明提供的上述筛选方法, 可以筛选出增强各种蛋白-蛋白相互作用或者蛋白-其它分子相互作用的氨基酸突变; 一般  
10 的筛选方法包括:

- 1) 提供亲本蛋白序列, 通过 PCR 在亲本蛋白序列中引入氨基酸突变。
- 2) 将亲本蛋白以及突变后的蛋白构建入表达载体, 形成突变文库。
- 3) 将表达载体转染进入哺乳动物细胞, 并将亲本蛋白以及突变后的蛋白表达于细胞表面。
- 15 4) 将带标记的相互作用蛋白和上述哺乳动物细胞孵育, 通过流式细胞分选或者磁珠分选出被标记的哺乳动物细胞。
- 5) 提取被标记的哺乳动物细胞的 DNA, 进行测序, 分析比较分选前后序列比例的变化情况; 其中分选后的比例显著高于分选前的比例的氨基酸突变为能够增强所述蛋白和相互作用蛋白之间结合能力的氨基酸突变。

20

#### **实施例 1: 人抗体 IgG2\_Fc 点突变文库构建。**

本发明选取了人 IgG2\_Fc\_CH2 上一些位点, 包括 P233-S239、V266-P271、S298-T299 以及 G327-I332 (Eu 编号, 见图 3 和表 4), 将这些位点上的氨基酸进行单点随机突变, 每个位点上包括野生型共计有 20 种氨基酸类型 (A、R、D、C、Q、E、  
25 H、I、G、N、L、K、M、F、P、S、T、W、Y、V)。制备分别对应上述人 IgG2\_Fc 四个区域的单点随机突变的质粒文库 (Library1、Library2、Library3、Library4), 以及这四个文库的混合文库 (LibraryMix)。

#### **实施例 2: 流式细胞分析分选前后的细胞富集情况。**

30 上述质粒文库构建成功后, 制备逆转录病毒感染 3T3 细胞, 获得表达这些文库的稳转细胞系。本发明利用流式细胞仪分选技术分选表达人 IgG2 (由抗人

IgG F(ab')<sub>2</sub>检测)并结合人 FcγRIIB 的细胞。如图 4 所示, 流式细胞分选可以逐步富集与 FcγRIIB 结合能力高的细胞。人 IgG2 文库 LibraryMix 经流式细胞分选仪分选不同轮次所得到的细胞分别进行分析, 流式细胞仪可以检测到的与 FcγRIIB 结合的细胞比例在每一轮分选以后均有提高, 第一轮为 0.90%、第二轮为 22.2%, 相比较于野生型人 IgG2 的 0.34%, 分别提高到了 2.65 倍和 65.29 倍。

如图 5 所示, 经过两轮分选以后, 流式细胞仪上可以检测出 Library1、Library2、Library3、Library4 和 LibraryMix 中与 FcγRIIB 的结合的细胞比例均有所提高: 分别达到 1.85%、16.3%、0.57%、2.19%和 22.2%, 相比较于野生型人 IgG2 的 0.34%比例提高到了 5.44 倍、47.94 倍、1.69 倍、6.44 倍和 65.29 倍。

### 实施例 3: 流式细胞分选后二代测序分析与 Fc γ RIIB 结合能力提高的 IgG2 Fc 突变类型。

本发明选取分选前后序列占比增加为野生型人 IgG2 两倍以上突变(富集倍数/野生型富集倍数 > 2), 也就是人 IgG2 上对其与 FcγRIIB 结合能力提高有利(相对于野生型其富集倍数至少提高 1 倍)的突变类型, 见表 7。比如, L328W 分选前的占比为 0.39%, 分选后的占比为 12.84%, 富集倍数为 33.20, 是野生型的富集倍数(1.49)的 22.21 倍。

表 7. 人 IgG2 上对其与 FcγRIIB 结合能力提高有利的突变体

| 序号       | 突变    | 分选前   |       | 分选后  |      | 富集倍数          | 提高倍数         |
|----------|-------|-------|-------|------|------|---------------|--------------|
|          |       | 数目    | 百分比   | 数目   | 百分比  | 分选后百分比/分选前百分比 | 富集倍数/野生型富集倍数 |
| Library2 |       |       |       |      |      |               |              |
| #1       | 野生型   | 12137 | 11.34 | 7266 | 6.51 | 0.57          | 1.00         |
| 1        | S267Q | 410   | 0.38  | 3693 | 3.31 | 8.64          | 15.05        |
| 2        | S267A | 744   | 0.70  | 2457 | 2.20 | 3.17          | 5.52         |
| 3        | S267D | 513   | 0.48  | 1128 | 1.01 | 2.11          | 3.67         |
| 4        | S267M | 794   | 0.74  | 1223 | 1.10 | 1.48          | 2.57         |
| 5        | S267G | 10    | 0.00  | 27   | 0.01 | 1.79          | 3.50         |
| 6        | H268E | 319   | 0.30  | 561  | 0.50 | 1.69          | 2.94         |
| 7        | H268D | 221   | 0.21  | 355  | 0.32 | 1.54          | 2.68         |
| 8        | H268K | 421   | 0.39  | 581  | 0.52 | 1.32          | 2.31         |

|            |             |       |       |        |       |         |         |
|------------|-------------|-------|-------|--------|-------|---------|---------|
| 9          | P271C       | 893   | 0.83  | 15969  | 14.30 | 17.14   | 29.87   |
| 10         | V266A/P271C | 5     | 0.00  | 220    | 0.20  | 42.18   | 73.50   |
| 11         | V266A/P271G | 3     | 0.00  | 27     | 0.02  | 8.63    | 15.03   |
| 12         | S267A/P271C | 3     | 0.00  | 117    | 0.10  | 37.39   | 65.14   |
| 13         | S267A/P271G | 2     | 0.00  | 11     | 0.01  | 5.27    | 9.19    |
| 14         | S267E/D270H | 2     | 0.00  | 89     | 0.08  | 42.66   | 74.33   |
| 15         | S267E/P271C | 2     | 0.00  | 2089   | 1.87  | 1001.34 | 1744.71 |
| 16         | S267E/P271V | 2     | 0.00  | 46     | 0.04  | 22.05   | 38.42   |
| 17         | S267E/P271W | 2     | 0.00  | 50     | 0.04  | 23.97   | 41.76   |
| 18         | S267E/P271Y | 4     | 0.00  | 80     | 0.07  | 19.17   | 33.41   |
| 19         | S267M/P271C | 2     | 0.00  | 67     | 0.06  | 32.12   | 55.96   |
| 20         | S267M/P271G | 2     | 0.00  | 9      | 0.01  | 4.31    | 7.52    |
| 21         | V266G/P271C | 3     | 0.00  | 12     | 0.01  | 3.83    | 6.68    |
| Library4   |             |       |       |        |       |         |         |
| #2         | 野生型         | 14727 | 16.91 | 17343  | 25.27 | 1.49    | 1.00    |
| 22         | G327A       | 713   | 0.82  | 2838   | 4.13  | 5.05    | 3.38    |
| 23         | L328F       | 3     | 0.00  | 1332   | 1.94  | 563.47  | 377.03  |
| 24         | L328W       | 337   | 0.39  | 8815   | 12.84 | 33.20   | 22.21   |
| 25         | L328Y       | 50    | 0.06  | 133    | 0.19  | 3.38    | 2.26    |
| 26         | G327A/A330R | 2     | 0.00  | 155    | 0.23  | 98.35   | 65.81   |
| 27         | G327A/A330V | 2     | 0.00  | 11     | 0.02  | 6.98    | 4.67    |
| 28         | G327A/I332A | 2     | 0.00  | 46     | 0.07  | 29.19   | 19.53   |
| 29         | G327A/I332C | 1     | 0.00  | 9      | 0.01  | 11.42   | 7.64    |
| 30         | G327A/I332E | 1     | 0.00  | 99     | 0.14  | 125.64  | 84.07   |
| 31         | L328E/I332T | 10    | 0.01  | 434    | 0.63  | 55.08   | 36.85   |
| LibraryMix |             |       |       |        |       |         |         |
| #3         | 野生型         | 91423 | 29.03 | 119849 | 21.72 | 0.75    | 1.00    |
| 32         | S267E       | 259   | 0.08  | 98580  | 17.86 | 217.23  | 290.34  |
| 33         | S267R       | 6     | 0.00  | 16     | 0.00  | 1.52    | 2.03    |
| 34         | P271G       | 1132  | 0.36  | 136659 | 24.77 | 68.90   | 92.09   |
| 35         | P271Q       | 218   | 0.07  | 631    | 0.11  | 1.65    | 2.21    |
| 36         | S298L       | 2696  | 0.86  | 10298  | 1.87  | 2.18    | 2.91    |
| 37         | L328M       | 14    | 0.00  | 611    | 0.11  | 24.91   | 33.29   |
| 38         | S267V/S298L | 9     | 0.00  | 33     | 0.01  | 2.09    | 2.80    |
| 39         | S267E/S298R | 7     | 0.00  | 402    | 0.07  | 32.78   | 43.81   |
| 40         | P271A/S298R | 7     | 0.00  | 30     | 0.01  | 2.45    | 3.27    |
| 41         | P271G/G236V | 6     | 0.00  | 108    | 0.02  | 10.27   | 13.73   |
| 42         | P271G/P329S | 7     | 0.00  | 567    | 0.10  | 46.23   | 61.79   |
| 43         | P271G/P331C | 7     | 0.00  | 1717   | 0.31  | 139.99  | 187.11  |
| 44         | P271G/P331T | 12    | 0.00  | 680    | 0.12  | 32.34   | 43.23   |

|    |             |    |      |      |      |        |        |
|----|-------------|----|------|------|------|--------|--------|
| 45 | P271G/S298D | 8  | 0.00 | 95   | 0.02 | 6.78   | 9.06   |
| 46 | P271G/S298E | 10 | 0.00 | 5218 | 0.95 | 297.81 | 398.04 |
| 47 | P271G/S298G | 20 | 0.01 | 341  | 0.06 | 9.73   | 13.01  |
| 48 | P271G/S298K | 6  | 0.00 | 107  | 0.02 | 10.18  | 13.60  |
| 49 | P271G/S298L | 13 | 0.00 | 4286 | 0.78 | 188.17 | 251.50 |
| 50 | P271G/S298N | 8  | 0.00 | 252  | 0.05 | 17.98  | 24.03  |
| 51 | P271G/S298R | 18 | 0.01 | 504  | 0.09 | 15.98  | 21.36  |
| 52 | P271G/T299A | 23 | 0.01 | 253  | 0.05 | 6.28   | 8.39   |
| 53 | P271G/T299M | 10 | 0.00 | 83   | 0.02 | 4.74   | 6.33   |
| 54 | P271G/T299S | 6  | 0.00 | 126  | 0.02 | 11.99  | 16.02  |
| 55 | P271G/T299W | 6  | 0.00 | 97   | 0.02 | 9.23   | 12.33  |

#1-3: 该数据来自于 Library2 (#1)、Library4 (#2)、LibraryMix (#3) 的实验。

除了点突变之外, 本发明同时也筛选获得了一些双突变类型, 这些氨基酸突变在流式细胞分选前后比例增加至野生型人 IgG2 两倍以上。其中, 双突变组合 (V266A/P271C 或 G、S267A/P271C 或 G、S267E/D270H、S267E/P271C 或 V 或 W 或 Y、S267E/S298R、S267M/P271C 或 G、P271A/S298R、P271G/G236V、P271G/G329S、P271G/P331C 或 T、P271G/S298D 或 E 或 G 或 K 或 L 或 N 或 R、P271G/T299A 或 M 或 S 或 W、G327A/A330R 或 V、G327A/I332A 或 C 或 E、L328E/I332T 等) 的提高比例要高于其中任何一个点突变是提高比例, 说明该突变组合中两个氨基酸对 Fc $\gamma$ RIIB 的结合能力的提高均有贡献。而另外也出现突变组合如 S267V/S298L, 其组合突变提高的倍数约等于其中提高倍数较高的 S298L 突变, 说明该突变组合的提高只是这一个位点突变的贡献, 另一个点突变基本没有影响, 见表 8。由此, 本发明的 Fc 区、抗体、Fc 片段或者融合蛋白除了具备本发明所提供的氨基酸突变之外, 也可以进一步包含其它可能的组合或修饰。

15

表 8. 人 IgG2 上对其与 Fc $\gamma$ RIIB 结合能力提高有利的双突变类型

| 序号 | 突变          | 富集倍数          | 提高倍数 a       | 提高倍数 b |      | 提高倍数 2c |      |
|----|-------------|---------------|--------------|--------|------|---------|------|
|    |             | 分选后百分比/分选前百分比 | 富集倍数/野生型富集倍数 | 位点 1   | 位点 2 | 位点 1    | 位点 2 |
| 1  | V266A/P271C | 42.18         | 73.5         | 3.1    | 29.9 | 24.1    | 2.5  |
| 2  | V266A/P271G | 8.63          | 15.03        | 3.1    | 4.7  | 4.9     | 3.2  |
| 3  | S267A/P271C | 37.39         | 65.14        | 5.5    | 29.9 | 11.8    | 2.2  |
| 4  | S267A/P271G | 5.27          | 9.19         | 5.5    | 4.7  | 1.7     | 1.9  |
| 5  | S267E/D270H | 42.66         | 74.33        | 28.5   | 1.3  | 2.6     | 56.7 |

|    |             |         |         |      |      |       |         |
|----|-------------|---------|---------|------|------|-------|---------|
| 6  | S267E/P271C | 1001.34 | 1744.71 | 28.5 | 29.9 | 61.2  | 58.4    |
| 7  | S267E/P271V | 22.05   | 38.42   | 28.5 | 0.7  | 1.4   | 52.6    |
| 8  | S267E/P271W | 23.97   | 41.76   | 28.5 | 0.4  | 1.5   | 101.9   |
| 9  | S267E/P271Y | 19.17   | 33.41   | 28.5 | 1.0  | 1.2   | 33.4    |
| 10 | S267E/S298R | 32.78   | 43.81   | 28.5 | 0.8  | 1.5   | 56.2    |
| 12 | S267M/P271C | 32.12   | 55.96   | 2.6  | 29.9 | 21.8  | 1.9     |
| 13 | S267M/P271G | 4.31    | 7.52    | 2.6  | 4.7  | 2.9   | 1.6     |
| 14 | P271A/S298R | 2.45    | 3.27    | 0.1  | 0.8  | 54.5  | 4.2     |
| 15 | P271G/G236V | 10.27   | 13.73   | 4.7  | 0.5  | 2.9   | 30.5    |
| 16 | P271G/P329S | 46.23   | 61.79   | 4.7  | 1.2  | 13.1  | 52.8    |
| 17 | P271G/P331C | 139.99  | 187.11  | 4.7  | 0.2  | 39.6  | 779.6   |
| 18 | P271G/P331T | 32.34   | 43.23   | 4.7  | 0.1  | 9.1   | 480.3   |
| 19 | P271G/S298D | 6.78    | 9.06    | 4.7  | 1.6  | 1.9   | 5.5     |
| 20 | P271G/S298E | 297.81  | 398.04  | 4.7  | 7.1  | 84.2  | 56.0    |
| 21 | P271G/S298G | 9.73    | 13.01   | 4.7  | 1.2  | 2.8   | 10.7    |
| 22 | P271G/S298K | 10.18   | 13.6    | 4.7  | 4.4  | 2.9   | 3.1     |
| 23 | P271G/S298L | 188.17  | 251.5   | 4.7  | 2.9  | 53.2  | 86.4    |
| 24 | P271G/S298N | 17.98   | 24.03   | 4.7  | 2.3  | 5.1   | 10.5    |
| 25 | P271G/S298R | 15.98   | 21.36   | 4.7  | 0.8  | 4.5   | 27.4    |
| 26 | P271G/T299A | 6.28    | 8.39    | 4.7  | 0.4  | 1.8   | 20.5    |
| 27 | P271G/T299M | 4.74    | 6.33    | 4.7  | 1.0  | 1.3   | 6.1     |
| 28 | P271G/T299S | 11.99   | 16.02   | 4.7  | 0.6  | 3.4   | 25.0    |
| 29 | P271G/T299W | 9.23    | 12.33   | 4.7  | 0.5  | 2.6   | 23.3    |
| 30 | G327A/A330R | 98.35   | 65.81   | 3.4  | 0.0  | 19.5  | 21936.7 |
| 31 | G327A/A330V | 6.98    | 4.67    | 3.4  | 1.0  | 1.4   | 4.8     |
| 32 | G327A/I332A | 29.19   | 19.53   | 3.4  | 16.4 | 5.8   | 1.2     |
| 33 | G327A/I332C | 11.42   | 7.64    | 3.4  | 2.7  | 2.3   | 2.9     |
| 34 | G327A/I332E | 125.64  | 84.07   | 3.4  | 1.1  | 24.9  | 79.3    |
| 35 | L328E/I332T | 55.08   | 36.85   | 0.1  | 1.6  | 335.0 | 22.6    |

- a. 分选后突变体的富集倍数/野生型的富集倍数的比值
- b. 原点突变分选后突变体的富集倍数/野生型的富集倍数的比值
- c. 组合突变提高倍数/其中一个点突变提高倍数的比值

5      **实施例 4：磁珠分选后二代测序分析有利突变体类型。**

本发明利用磁珠分选技术对上述流式分选获得的 FcγRIIB 高亲和力细胞继续分选，使用 Biotin 标记的 FcγRIIB 和没有标记的激活型 FcγR 混合与细胞孵育，然后利用抗 Biotin-磁珠分选被标记的细胞，二代测序分析前后的富集比例，可以筛选到 I/A 比值较高的突变，见表 9。挑选突变的方法为：选取分选前后比例增加至  
10      野生型人 IgG2 两倍以上，同时在分选未结合磁珠部分(即过 LS 柱时流出液)中比例

减少的突变。

表 9. 人 IgG2 上对其与 Fc $\gamma$ RIIB 结合能力提高同时与激活型 Fc $\gamma$ Rs 的结合能力弱于 Fc $\gamma$ RIIB 的突变类型

| 序号         | 突变              | 分选前   |       | 未结合磁珠部分 |       | 分选后   |       | 分选前后变化            |                   | 富集倍数              | 提高倍数               |
|------------|-----------------|-------|-------|---------|-------|-------|-------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
|            |                 | 数目    | 百分比   | 数目      | 百分比   | 数目    | 百分比   | 分选后百分比/<br>未结合百分比 | 分选前百分比/<br>未结合百分比 | 分选后百分比/<br>分选前百分比 | 突变富集倍数/<br>野生型富集倍数 |
| Library2   |                 |       |       |         |       |       |       |                   |                   |                   |                    |
| #1         | 野生型             | 2838  | 3.60  | 5139    | 5.15  | 2509  | 2.98  | 0.58              | 0.70              | 0.83              | 1.00               |
| 1          | S267N           | 66    | 0.08  | NA      | NA    | 205   | 0.24  | —                 | —                 | 2.91              | 3.51               |
| 2          | S267W           | 89    | 0.11  | 4       | 0     | 177   | 0.21  | 52.49             | 28.16             | 1.86              | 2.25               |
| 3          | H268N           | 226   | 0.29  | 1       | 0     | 558   | 0.66  | 661.97            | 286.03            | 2.31              | 2.79               |
| 4          | P271A           | 61    | 0.08  | 3       | 0     | 180   | 0.21  | 71.18             | 25.73             | 2.77              | 3.33               |
| 5          | P271I           | 311   | 0.39  | NA      | NA    | 873   | 1.04  | —                 | —                 | 2.63              | 3.17               |
| 6          | P271L           | 51    | 0.06  | 2       | 0     | 241   | 0.29  | 142.95            | 32.27             | 4.43              | 5.34               |
| 7          | P271S           | 64    | 0.08  | 10      | 0.01  | 187   | 0.22  | 22.18             | 8.1               | 2.74              | 3.3                |
| 8          | P271V           | 246   | 0.31  | 1       | 0     | 923   | 1.1   | 1094.98           | 311.35            | 3.52              | 4.24               |
| Library4   |                 |       |       |         |       |       |       |                   |                   |                   |                    |
| #2         | 野生型             | 11937 | 14.33 | 16838   | 14.78 | 13554 | 12.62 | 0.85              | 0.97              | 0.88              | 1.00               |
| 9          | G327L           | 14    | 0.02  | 19      | 0.02  | 68    | 0.06  | 3.8               | 1.01              | 3.77              | 4.28               |
| 10         | G327S           | 83    | 0.1   | 11      | 0.01  | 738   | 0.69  | 71.16             | 10.32             | 6.9               | 7.84               |
| 11         | L328N           | 109   | 0.13  | 8       | 0.01  | 384   | 0.36  | 50.91             | 18.63             | 2.73              | 3.11               |
| LibraryMix |                 |       |       |         |       |       |       |                   |                   |                   |                    |
| #3         | 野生型             | 14919 | 19.10 | 20509   | 20.31 | 21855 | 21.53 | 1.06              | 0.94              | 1.13              | 1.00               |
| 12         | L328G           | 12    | 0.02  | NA      | NA    | 47    | 0.05  | —                 | —                 | 3.01              | 2.67               |
| 13         | L328R           | 18    | 0.02  | 4       | 0     | 124   | 0.12  | 30.84             | 5.82              | 5.3               | 4.69               |
| 14         | L328V           | 17    | 0.02  | 2       | 0     | 51    | 0.05  | 25.37             | 10.99             | 2.31              | 2.04               |
| 15         | P271G/<br>S298N | 8     | 0.01  | 2       | 0     | 24    | 0.02  | 11.94             | 5.17              | 2.31              | 2.04               |
| 16         | H268S           | 30    | 0.04  | NA      | NA    | 306   | 0.3   | —                 | —                 | 7.85              | 6.95               |
| #4         | 野生型             | 14919 | 19.10 | 20860   | 18.89 | 18101 | 17.95 | 0.95              | 1.01              | 0.94              | 1.00               |
| 17         | P238Q/<br>S267E | 40    | 0.05  | 48      | 0.04  | 191   | 0.19  | 4.36              | 1.18              | 3.7               | 3.93               |
| 18         | S267E/<br>P329R | 27    | 0.03  | 30      | 0.03  | 169   | 0.17  | 6.17              | 1.27              | 4.85              | 5.16               |
| 19         | P271G/          | 28    | 0.04  | 7       | 0.01  | 102   | 0.1   | 15.96             | 5.66              | 2.82              | 3                  |

|    |       |    |      |    |    |     |      |       |       |      |      |
|----|-------|----|------|----|----|-----|------|-------|-------|------|------|
|    | I332L |    |      |    |    |     |      |       |       |      |      |
| 20 | S267E | 13 | 0.02 | 1  | 0  | 48  | 0.05 | 52.56 | 18.38 | 2.86 | 3.04 |
| 21 | P271G | 11 | 0.01 | 3  | 0  | 52  | 0.05 | 18.98 | 5.18  | 3.66 | 3.89 |
| 22 | L328W | 18 | 0.02 | NA | NA | 99  | 0.1  | —     | —     | 4.26 | 4.53 |
| 23 | L328A | 28 | 0.04 | NA | NA | 116 | 0.12 | —     | —     | 3.21 | 3.41 |
| 24 | L328P | 29 | 0.04 | 3  | 0  | 81  | 0.08 | 29.57 | 13.67 | 2.16 | 2.3  |

NA 在该列样品中该行对应突变类型未检测出。

#1-#4: 该数据来自于 Library2(#1)、Library4(#2)、LibraryMix 的两次实验(#3、#4)。

5 G236D、S239D(根据 Seung Y. Chu 等人(Molecular Immunology 45 (2008) 3926 - 3933)报道)和 S298A 突变(根据专利 US20090042291A1 报道)可以提高人 IgG1 与 Fc $\gamma$ RIIB 的亲和力。但是,在本发明的二代测序分析结果显示,包含 G236D 或 S298A 突变的 IgG2 变体在分选后的占比没有增加,反而有一定降低(表 10);  
10 包含 S239D 突变的人 IgG2 变体在分选前的占比为 0.026%,而在分选后测序结果中未测出。这些结果说明 G236D、S239D 和 S298A 突变不提高人 IgG2 的 Fc $\gamma$ RIIB 结合能力,见表 10。

表 10. 不能根据已知突变对 IgG1 的 Fc $\gamma$ R 结合能力的影响直接预测其对 IgG2 的 Fc $\gamma$ R 结合能力的影响

| 序号 | 突变体   | 分选前  |      | 分选后  |      | 富集倍数              |
|----|-------|------|------|------|------|-------------------|
|    |       | 数目   | 百分比  | 数目   | 百分比  | 分选后百分比/<br>分选前百分比 |
| 1  | S298A | 4221 | 4.05 | 4205 | 3.72 | 0.92              |
| 2  | S239D | 29   | 0.03 | 0    | NA   | —                 |
| 3  | G236D | 511  | 0.46 | 427  | 0.39 | 0.84              |

15 NA 是指该行突变体类型在该列实验中未检测出,百分比和倍数无法计算。

### 实施例 5: 人 IgG2 Fc 多肽片段中可增强 Fc $\gamma$ RIIB 亲和力的氨基酸突变。

表 11 总结了根据本发明点突变文库筛选方法所筛选出来的可增强 Fc $\gamma$ RIIB 亲和力的氨基酸突变。与先前专利比较发现:本发明中 S267G、P271C 这些位  
20 点均为 IgG2 上新的可以提高 Fc $\gamma$ RIIB 结合能力的突变类型。H268S、L328A、G327A 这些位点均为 IgG2 上新的可以提高 Fc $\gamma$ RIIB 结合能力同时与其它激活型 Fc $\gamma$ Rs 的亲和力弱于 Fc $\gamma$ RIIB 的突变类型。

表 11. 人 IgG2 中可增强 Fc $\gamma$ RIIB 亲和力的氨基酸突变

| 突变位点(Eu 编号) | 亲本氨基酸 | 增强 Fc $\gamma$ RIIB 亲和力的氨基酸突变 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |
|-------------|-------|-------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|--|
| 267         | S     | E                             | Q | A | D | M | G | R | V | N | W |   |  |
| 268         | H     | E                             | D | K | N | S |   |   |   |   |   |   |  |
| 271         | P     | C                             | G | Q | V | W | Y | A | I | L | S |   |  |
| 327         | G     | A                             | L | S |   |   |   |   |   |   |   |   |  |
| 328         | L     | F                             | M | W | Y | E | A | G | N | P | R | V |  |

**实施例 6：人抗体 IgG2\_Fc 组合突变文库的构建**

5 根据前述点突变文库和高通量测序结果筛选出的能够提高 Fc $\gamma$ RIIB 亲和力的 Fc 突变类型(富集倍数相比较野生型提高 1 倍以上的突变)，设计两种类型的组合突变文库：类型一，四个区域之间单点组合突变，即 P233-V240、V266-P271、S298-T299 以及 G327-I332 四个区域每个区域有 0-1 个突变，共 0-4 个位点的组合突变；类型二，一个区域内的多个氨基酸组合突变，即

10 P233-V240、V266-P271、S298-T299 或 G327-I332 四个区域，每个区域内部氨基酸的组合突变(分别为 0-7、0-6、0-2 和 0-6 个组合突变)，如图 6 所示。质粒文库的大小最大至  $4.67 \times 10^5$ 。

**实施例7：组合突变文库流式细胞分选前后的细胞富集情况**

15 根据点突变筛选高通量测序结果，构建类型一和类型二组合突变文库(实施例 6)，获得表达组合突变的细胞文库，然后流式细胞分选 Fc $\gamma$ RIIB 高亲和力的细胞，连续分选两至三轮。如图 7 所示，经过两轮分选以后，流式细胞仪上可以检测出文库 IgG2\_C01、文库 IgG2\_C02 与 Fc $\gamma$ RIIB 结合的细胞比例均有所提高：分别达到 9.53%和 26.9%，相比较于野生型人 IgG2 的 0.23%比例提高到了 41.43 倍和 116.96 倍。其中 IgG2\_C01 为 P233-V240、V266-P271、S298-T299 以及 G327-I332 四个区域各有最多 1 个突变的组合突变(类型一)文库；IgG2\_C02 为 P233-V240、V266-P271、S298-T299 和 G327-I332 四个区域内连续的组合突变(类型二)文库合并共同转入 3T3 细胞制成的细胞文库。

25 如图 8 所示，经过两轮分选以后，流式细胞仪上可以检测出文库 Cmix 和文库 C2 细胞与 Fc $\gamma$ RIIB 的结合能力明显提高，每一轮分选之后其与 Fc $\gamma$ RIIB 结合的细胞比例均显著增多：Cmix 在第一轮分选和第二轮分选之后与 Fc $\gamma$ RIIB

结合的细胞比例分别达到 1.86%和 28.9%，相比较于分选前 0.00756%，分别提高到了 246.03 倍和 3822.75 倍；Cmix 分别达到 6.46%和 28.9%，相比较于分选前 0.00899%，分别提高到了 718.58 倍和 3214.68 倍。文库 Cmix 为四个区域各有最多 1 个突变的组合突变(类型一)文库；文库 C2 为 V266-P271 区域的组合突变(类型二)文库。

**实施例8：流式细胞分选后二代测序分析与Fc $\gamma$ RIIB结合能力提高的IgG2 Fc组合突变类型。**

为了筛选与 Fc $\gamma$ RIIB 结合能力提高的 IgG2 Fc 组合突变类型，将本发明中构建的组合突变文库进行流式分选，获得与 Fc $\gamma$ RIIB 的结合能力较高的细胞，然后使用二代测序分析分选前后各突变类型的富集倍数，结果见表 12。所选取的突变均有较高倍数的富集(最后一轮分选后/分选前)，或者在至少一轮分选中有明显富集(该轮分选后/该轮分选前)，或者仅在最后一轮分选后被测出。例如，V266L/S298L/L328W 的富集倍数为野生型的 21920.33 倍(在最后一轮分选后/分选前)；点突变 L328W 的富集倍数为野生型的 8.78 倍(在最后一轮分选后/分选前)；H268D/S298L/L328W 的富集倍数分别为 43.98(第二轮分选后/第二轮分选前)和 5.95(第三轮分选后/第三轮分选前)；V234M/S267E/S298L/L328W 的富集倍数为 5.13(第三轮分选后/第三轮分选前)；V234Q/A235G/P238L/S239V/G327A/L328E/A330S/I332T 仅在最后一轮分选后被测出。

表 12. 组合突变文库中筛选出人 IgG2 上对其与 Fc $\gamma$ RIIB 结合能力提高有利的突变体

| 序号 |             | 百分比    |        |       | 富集倍数                |                  |                  | 提高倍数   |
|----|-------------|--------|--------|-------|---------------------|------------------|------------------|--------|
|    |             | 第2次分选后 | 第1次分选后 | 分选前   | 第2次分选后百分比/第1次分选后百分比 | 第1次分选后百分比/分选前百分比 | 第2次分选后百分比/分选前百分比 |        |
| #1 | WT          | 54.22  | 61.56  | 63.83 | 0.88                | 0.96             | 0.85             | 1.00   |
| 1  | L328W       | 1.05   | 0.25   | 0.14  | 4.26                | 1.75             | 7.46             | 8.78   |
| 2  | S267E/A330S | 0.03   | 0.00   | NA    | 43.11               | -                | -                | -      |
| 3  | S267E/S298G | 0.25   | 0.01   | 0.00  | 19.16               | 9.16             | 175.56           | 206.66 |

|    |                                                 |        |        |        |       |                     |                     |                  |                  |                |
|----|-------------------------------------------------|--------|--------|--------|-------|---------------------|---------------------|------------------|------------------|----------------|
| 4  | P233G/S267E                                     |        | 0.05   | 0.01   | 0.00  |                     | 5.47                | 3.31             | 18.10            | 21.31          |
| 5  | P233G/S267E/S298G                               |        | 0.20   | 0.01   | 0.00  |                     | 38.49               | 7.13             | 274.31           | 322.90         |
| #2 | WT                                              |        | 47.81  | 58.39  | 56.60 |                     | 0.82                | 1.03             | 0.84             | 1.00           |
| 6  | V266L/S267E/H268S/P271V                         |        | 0.25   | NA     | NA    |                     | -                   | -                | -                | -              |
| 7  | V234Q/A235G/P238L/S239V/G327A/L328E/A330S/I332T |        | 0.15   | NA     | NA    |                     | -                   | -                | -                | -              |
| 8  | V234Q/A235G/P238L/S239V/S267E/H268S/E269D       |        | 0.07   | NA     | NA    |                     | -                   | -                | -                | -              |
| 9  | S267E/H268S/E269D                               |        | 5.78   | 0.07   | 0.00  |                     | 83.65               | 80.49            | 6733.01          | 7971.36        |
|    |                                                 |        |        |        |       |                     |                     |                  |                  |                |
|    |                                                 | 第3次分选后 | 第2次分选后 | 第1次分选后 | 分选前   | 第3次分选后百分比/第2次分选后百分比 | 第2次分选后百分比/第1次分选后百分比 | 第1次分选后百分比/分选前百分比 | 第3次分选后百分比/分选前百分比 | 突变富集倍数/野生型富集倍数 |
| #3 | WT                                              | 0.40   | 1.03   | 1.32   | 1.07  | 0.39                | 0.78                | 1.24             | 0.38             | 1.00           |
| 10 | H268D/S298L/L328W                               | 1.25   | 0.21   | 0.00   | NA    | 5.95                | 43.98               | -                | -                | -              |
| 11 | V266L/L328W                                     | 1.20   | 0.22   | 0.00   | 0.00  | 5.53                | 53.28               | 4.71             | 1386.84          | 3695.56        |
| 12 | V266L/S298L/L328W                               | 24.98  | 4.14   | 0.06   | 0.00  | 6.03                | 64.77               | 21.07            | 8226.06          | 21920.33       |
| 13 | S267V/S298L/L328W                               | 0.90   | 0.13   | 0.00   | 0.00  | 7.21                | 73.61               | 3.92             | 2081.88          | 5547.67        |
| 14 | S239V/V266L/S298L/L328W                         | 0.33   | 0.07   | 0.00   | NA    | 5.02                | 39.07               | -                | -                | -              |
| 15 | A235W/V266L/S298L/L328W                         | 0.22   | 0.05   | 0.00   | NA    | 4.67                | 70.06               | -                | -                | -              |
| 16 | P233F/V266L/S298L/L328W                         | 0.29   | 0.16   | 0.00   | NA    | 1.79                | 94.73               | -                | -                | -              |
| 17 | S267V/S298G/L328W                               | 0.19   | 0.03   | 0.00   | NA    | 5.76                | 47.36               | -                | -                | -              |
| 18 | V234M/S267E/S298L/L328W                         | 0.53   | 0.10   | NA     | NA    | 5.13                | -                   | -                | -                | -              |
| 19 | V234M/S267E/S298G/I332L                         | 0.30   | 0.46   | 0.01   | 0.00  | 0.66                | 64.37               | 16.47            | 695.04           | 1852.11        |
| #4 | WT                                              | 12.58  | 5.25   | 2.51   | 8.97  | 2.40                | 2.09                | 0.28             | 1.40             | 1.00           |
| 20 | V266L/S267E/H268S/E269A/P271C                   | 6.76   | 0.95   | 0.25   | 0.00  | 7.11                | 3.84                | 60.52            | 1651.90          | 1178.72        |
| 21 | V266L/S267E/H268S/E269V                         | 4.15   | 2.13   | 0.17   | 0.00  | 1.95                | 12.85               | 99.90            | 2501.18          | 1784.72        |
| 22 | V266L/S267E/H268S/E269V/P271C                   | 0.11   | 0.01   | 0.00   | NA    | 12.64               | 6.97                | -                | -                | -              |
| 23 | V266L/S267E/H268S/E269G/P271T                   | 1.23   | 0.24   | 0.03   | 0.00  | 5.20                | 9.34                | 32.69            | 1588.00          | 1133.12        |
| 24 | V266L/S267D/H268D/E269D/P271Q                   | 1.88   | 0.49   | 0.12   | 0.00  | 3.80                | 4.07                | 121.76           | 1882.93          | 1343.57        |
| 25 | V266L/S267E/E269K/P271G                         | 1.22   | 0.42   | 0.14   | 0.00  | 2.94                | 2.92                | 214.29           | 1838.25          | 1311.69        |
| 26 | V234Q/V266L/S267D/H268D/E269D/P271Q             | 0.04   | 0.00   | NA     | NA    | 15.39               | -                   | -                | -                | -              |
| 27 | V234Q/V266L/S267E/H268S/E269V                   | 0.09   | 0.01   | NA     | NA    | 11.37               | -                   | -                | -                | -              |
| 28 | V266L/S267M/H268E/P271Q                         | 13.35  | 17.07  | 2.59   | 0.01  | 0.78                | 6.60                | 229.11           | 1182.52          | 843.79         |

#1-4: 该数据来自于文库 IgG2\_C01(#1)、IgG2\_C02(#2)、Cmix(#3)、C2(#4)的实验。NA 在该列样品中该行对应突变类型未被测出。

### 实施例9: 酶联免疫吸附实验(ELISA)分析突变抗体与Fc $\gamma$ R的结合特性

5 在二代测序筛选到的有利 Fc 单点突变和突变组合的基础上, 构建新的 Fc 突变组合, 然后表达含有这些新的 Fc 突变组合的抗人 OX40 抗体, 并使用酶联

免疫吸附实验(ELISA)分析突变抗体与Fc $\gamma$ R的结合特性。如图9-14所示,不同的Fc突变体与Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RIIA<sup>131H</sup>、Fc $\gamma$ RIIA<sup>131R</sup>、Fc $\gamma$ RIIB、Fc $\gamma$ RIIIA<sup>158F</sup>和Fc $\gamma$ RIIIA<sup>158V</sup>的结合能力。设定IgG1的与各个Fc $\gamma$ R的结合能力为1,计算各突变体与这些Fc $\gamma$ R的相对结合能力(该变体与该Fc $\gamma$ R结合的ELISA吸光值除以IgG1与该Fc $\gamma$ R结合的ELISA吸光值),以及各突变体相对于野生型IgG2的Fc $\gamma$ RIIB结合能力的提高倍数(该变体与Fc $\gamma$ RIIB结合的ELISA吸光值除以野生型IgG2与Fc $\gamma$ RIIB结合的ELISA吸光值)。如表13所示,各突变体相对于野生型IgG2的Fc $\gamma$ RIIB结合能力的提高倍数为4.23至25.55倍。此外,计算各突变体的Fc $\gamma$ RIIB和Fc $\gamma$ RIIA<sup>131R</sup>结合能力比值(RIIB/RIIAR),结果(表13)显示这些突变体的RIIB/RIIAR比值均高于野生型IgG2(野生型IgG2:0.34;突变体:0.46-3.67)。

表 13. 不同 IgG2 抗体 Fc 突变体与 Fc $\gamma$ R 的结合情况。

|                   | 吸光值  |           |           |      |            |                | 相对结合能力    |                  |              |             |                                                   |               |                   |                    |
|-------------------|------|-----------|-----------|------|------------|----------------|-----------|------------------|--------------|-------------|---------------------------------------------------|---------------|-------------------|--------------------|
|                   | RI   | RII<br>AH | RII<br>AR | RIIB | RII<br>IAF | RII<br>IA<br>V | RI/<br>G1 | RII<br>AH/<br>G1 | RIIA<br>R/G1 | RIIB/<br>G1 | 相对于野<br>生型<br>IgG2<br>的<br>RIIB<br>结合<br>提高<br>倍数 | RIIIA<br>F/G1 | RIII<br>AV/<br>G1 | RIIB/<br>RIIA<br>R |
| IgG1              | 2.66 | 0.57      | 0.26      | 0.76 | 0.19       | 0.96           |           |                  |              |             |                                                   |               |                   |                    |
| IgG2              | 0.08 | 0.49      | 0.08      | 0.08 | 0.06       | 0.05           | 0.03      | 0.85             | 0.29         | 0.10        | 1.00                                              | 0.30          | 0.06              | 0.34               |
| IgG2<br>N297<br>A | 0.08 | 0.04      | 0.04      | 0.07 | 0.06       | 0.06           | 0.03      | 0.08             | 0.16         | 0.09        | 0.93                                              | 0.31          | 0.06              | 0.57               |
| Mut_1             | 0.17 | 0.35      | 0.22      | 0.64 | 0.07       | 0.09           | 0.06      | 0.62             | 0.83         | 0.85        | 8.51                                              | 0.38          | 0.09              | 1.02               |
| Mut_2             | 0.14 | 0.32      | 0.29      | 1.00 | 0.07       | 0.06           | 0.05      | 0.56             | 1.09         | 1.33        | 13.38                                             | 0.38          | 0.06              | 1.21               |
| Mut_3             | 0.18 | 0.34      | 0.23      | 0.94 | 0.08       | 0.07           | 0.07      | 0.60             | 0.87         | 1.25        | 12.57                                             | 0.40          | 0.08              | 1.44               |
| Mut_4             | 0.25 | 0.48      | 1.44      | 1.92 | 0.06       | 0.05           | 0.10      | 0.84             | 5.51         | 2.54        | 25.55                                             | 0.32          | 0.06              | 0.46               |
| Mut_5             | 0.38 | 0.46      | 0.46      | 1.18 | 0.06       | 0.06           | 0.14      | 0.81             | 1.77         | 1.56        | 15.69                                             | 0.31          | 0.07              | 0.88               |
| Mut_6             | 0.09 | 0.05      | 0.05      | 0.50 | 0.06       | 0.06           | 0.03      | 0.08             | 0.19         | 0.66        | 6.63                                              | 0.30          | 0.06              | 3.52               |
| Mut_7             | 0.13 | 0.38      | 0.23      | 0.58 | 0.07       | 0.06           | 0.05      | 0.67             | 0.87         | 0.76        | 7.70                                              | 0.38          | 0.07              | 0.88               |
| Mut_8             | 0.14 | 0.52      | 0.34      | 1.07 | 0.08       | 0.07           | 0.05      | 0.90             | 1.30         | 1.42        | 14.30                                             | 0.44          | 0.07              | 1.09               |
| Mut_9             | 0.12 | 0.20      | 0.74      | 1.20 | 0.07       | 0.07           | 0.05      | 0.34             | 2.83         | 1.59        | 15.99                                             | 0.38          | 0.08              | 0.56               |
| Mut_1<br>0        | 0.18 | 0.58      | 0.43      | 1.05 | 0.09       | 0.09           | 0.07      | 1.02             | 1.64         | 1.40        | 14.06                                             | 0.48          | 0.09              | 0.85               |
| Mut_1<br>1        | 0.13 | 0.55      | 0.36      | 1.01 | 0.08       | 0.08           | 0.05      | 0.96             | 1.36         | 1.33        | 13.40                                             | 0.41          | 0.08              | 0.98               |

|            |      |      |      |             |      |      |      |      |      |             |              |      |      |             |
|------------|------|------|------|-------------|------|------|------|------|------|-------------|--------------|------|------|-------------|
| Mut_1<br>2 | 0.21 | 0.39 | 0.33 | <b>0.94</b> | 0.06 | 0.06 | 0.08 | 0.68 | 1.26 | <b>1.25</b> | <b>12.57</b> | 0.32 | 0.06 | <b>0.99</b> |
| Mut_1<br>3 | 0.18 | 0.33 | 0.26 | <b>0.73</b> | 0.07 | 0.08 | 0.07 | 0.58 | 1.01 | <b>0.97</b> | <b>9.75</b>  | 0.37 | 0.09 | <b>0.96</b> |
| Mut_1<br>4 | 0.12 | 0.12 | 0.32 | <b>0.70</b> | 0.06 | 0.05 | 0.04 | 0.21 | 1.22 | <b>0.93</b> | <b>9.36</b>  | 0.31 | 0.06 | <b>0.76</b> |
| Mut_1<br>5 | 0.08 | 0.04 | 0.04 | <b>0.47</b> | 0.06 | 0.05 | 0.03 | 0.07 | 0.17 | <b>0.62</b> | <b>6.21</b>  | 0.31 | 0.06 | <b>3.67</b> |
| Mut_1<br>6 | 0.10 | 0.39 | 0.50 | <b>1.09</b> | 0.06 | 0.06 | 0.04 | 0.68 | 1.92 | <b>1.44</b> | <b>14.51</b> | 0.32 | 0.06 | <b>0.75</b> |
| Mut_1<br>7 | 0.14 | 0.54 | 0.50 | <b>1.19</b> | 0.09 | 0.06 | 0.05 | 0.95 | 1.90 | <b>1.58</b> | <b>15.93</b> | 0.49 | 0.06 | <b>0.83</b> |
| Mut_1<br>8 | 0.14 | 0.38 | 0.26 | <b>0.78</b> | 0.09 | 0.08 | 0.05 | 0.67 | 1.00 | <b>1.04</b> | <b>10.43</b> | 0.47 | 0.09 | <b>1.03</b> |
| Mut_1<br>9 | 0.11 | 0.33 | 0.28 | <b>0.82</b> | 0.07 | 0.07 | 0.04 | 0.58 | 1.08 | <b>1.09</b> | <b>10.96</b> | 0.38 | 0.07 | <b>1.00</b> |
| Mut_2<br>0 | 0.12 | 0.48 | 0.46 | <b>1.13</b> | 0.06 | 0.05 | 0.05 | 0.85 | 1.76 | <b>1.50</b> | <b>15.08</b> | 0.31 | 0.06 | <b>0.85</b> |
| Mut_2<br>1 | 0.16 | 0.09 | 0.11 | <b>0.32</b> | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 0.16 | 0.41 | <b>0.42</b> | <b>4.23</b>  | 0.31 | 0.06 | <b>1.03</b> |
| Mut_2<br>2 | 0.12 | 0.33 | 0.31 | <b>0.93</b> | 0.06 | 0.07 | 0.05 | 0.57 | 1.17 | <b>1.22</b> | <b>12.33</b> | 0.33 | 0.07 | <b>1.05</b> |
| Mut_2<br>3 | 0.11 | 0.43 | 0.38 | <b>0.97</b> | 0.07 | 0.06 | 0.04 | 0.75 | 1.44 | <b>1.29</b> | <b>12.96</b> | 0.35 | 0.06 | <b>0.90</b> |
| Mut_2<br>4 | 0.12 | 0.48 | 0.35 | <b>1.00</b> | 0.08 | 0.08 | 0.05 | 0.84 | 1.35 | <b>1.32</b> | <b>13.33</b> | 0.42 | 0.08 | <b>0.98</b> |
| Mut_2<br>5 | 0.12 | 0.06 | 0.30 | <b>0.86</b> | 0.07 | 0.05 | 0.05 | 0.10 | 1.13 | <b>1.14</b> | <b>11.49</b> | 0.36 | 0.06 | <b>1.01</b> |
| Mut_2<br>6 | 0.19 | 0.06 | 0.08 | <b>0.55</b> | 0.08 | 0.09 | 0.07 | 0.11 | 0.32 | <b>0.72</b> | <b>7.28</b>  | 0.41 | 0.09 | <b>2.24</b> |
| Mut_2<br>7 | 0.18 | 0.48 | 0.28 | <b>0.70</b> | 0.09 | 0.10 | 0.07 | 0.84 | 1.06 | <b>0.92</b> | <b>9.29</b>  | 0.49 | 0.11 | <b>0.87</b> |
| Mut_2<br>8 | 0.13 | 0.14 | 0.35 | <b>0.88</b> | 0.08 | 0.08 | 0.05 | 0.24 | 1.35 | <b>1.17</b> | <b>11.76</b> | 0.44 | 0.08 | <b>0.87</b> |
| Mut_3<br>0 | 0.12 | 0.18 | 0.26 | <b>0.80</b> | 0.06 | 0.06 | 0.05 | 0.32 | 1.01 | <b>1.06</b> | <b>10.65</b> | 0.33 | 0.07 | <b>1.05</b> |

注：表格中 RI、RIIAH、RIIAR、RIIB、RIIIAF、RIIIAV 分别代表  $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ 、 $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}^{131\text{H}}$ 、 $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}^{131\text{R}}$ 、 $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ 、 $\text{Fc}\gamma\text{RIIIA}^{158\text{F}}$ 、 $\text{Fc}\gamma\text{RIIIA}^{158\text{V}}$ 。

### 实施例10：有利突变支持更强的免疫激活活性

- 5 分析上述包含有利突变的抗人 OX40 抗体(实施例 9)在  $\text{Fc}\gamma\text{R/OX40}$  人源化小鼠脾脏细胞中的免疫激活活性，图 16、17 显示了抗体浓度为  $1\mu\text{g/ml}$  时， $\text{CD4}^+$  细胞的 CFSE 荧光强度 and 对应直方图，数值越低活性越强，所选抗体的活性均优于野生型 IgG2。将两次实验的不同抗体浓度的活性数值一起分析，设定只加入  $\alpha\text{CD3}$  抗体的活性为 0，加入  $\alpha\text{CD3}$  抗体和  $\alpha\text{CD28}$  抗体阳性对照活性为 1，
- 10 分别计算各突变抗体的相对活性，并计算平均值。表 14 显示，所选取的 30 个突变抗体的活性均优于野生型 IgG2，活性提高为野生型的 9.17 至 16.51 倍。

表 14 包含不同 Fc 突变的抗人 OX40 抗体的免疫激活活性分析

|              | 实验一        |                  |                   |            |                  |                   |                | 实验二           |              |            |              |                |                        |                                        |
|--------------|------------|------------------|-------------------|------------|------------------|-------------------|----------------|---------------|--------------|------------|--------------|----------------|------------------------|----------------------------------------|
|              | CFSE 荧光强度  |                  |                   | 相对活性       |                  |                   | 平均<br>相对<br>活性 | CFSE 荧光<br>强度 |              | 相对活性       |              | 平均<br>相对<br>活性 | 两次实<br>验平均<br>相对活<br>性 | 两次实验<br>平均相对<br>野生型<br>IgG2 活性<br>提高倍数 |
|              | 1μg<br>/ml | 0.1μ<br>g/m<br>l | 0.01<br>μg/<br>ml | 1μg<br>/ml | 0.1μ<br>g/m<br>l | 0.01<br>μg/<br>ml |                | 1μg/<br>ml    | 0.1μ<br>g/ml | 1μg/<br>ml | 0.1μ<br>g/ml |                |                        |                                        |
| CD3+C<br>D28 | 509        | 473              | 491               | 0.97       | 1.03             | 1.00              | 1.00           | 965           | 965          | 1.00       | 1.00         | 1.00           | 1.00                   |                                        |
| Mut_1        | 799        | 786              | 894               | 0.44       | 0.47             | 0.27              | 0.39           | 1552          | 2062         | 0.69       | 0.42         | 0.56           | 0.46                   | 10.48                                  |
| Mut_2        | 677        | 654              | 685               | 0.66       | 0.71             | 0.65              | 0.67           | 1149          | 1548         | 0.90       | 0.69         | 0.80           | 0.72                   | 16.51                                  |
| Mut_3        | 686        | 568              | 761               | 0.65       | 0.86             | 0.51              | 0.67           | 1365          | 1769         | 0.79       | 0.58         | 0.68           | 0.68                   | 15.47                                  |
| Mut_4        | 769        | 616              | 695               | 0.50       | 0.77             | 0.63              | 0.63           | 1439          | 1702         | 0.75       | 0.61         | 0.68           | 0.65                   | 14.91                                  |
| Mut_5        | 791        | 695              | 859               | 0.46       | 0.63             | 0.33              | 0.47           | 1309          | 1660         | 0.82       | 0.63         | 0.73           | 0.58                   | 13.14                                  |
| Mut_6        | 706        | 689              | 766               | 0.61       | 0.64             | 0.50              | 0.59           | 1698          | 1986         | 0.61       | 0.46         | 0.54           | 0.57                   | 12.94                                  |
| Mut_7        | 741        | 755              | 850               | 0.55       | 0.52             | 0.35              | 0.47           | 1347          | 1819         | 0.80       | 0.55         | 0.67           | 0.55                   | 12.66                                  |
| Mut_8        | 799        | 719              | 844               | 0.44       | 0.59             | 0.36              | 0.46           | 1436          | 1813         | 0.75       | 0.55         | 0.65           | 0.54                   | 12.32                                  |
| Mut_9        | 744        | 742              | 849               | 0.54       | 0.55             | 0.35              | 0.48           | 1454          | 1909         | 0.74       | 0.50         | 0.62           | 0.54                   | 12.27                                  |
| Mut_10       | 765        | 743              | 788               | 0.50       | 0.54             | 0.46              | 0.50           | 1465          | 2048         | 0.74       | 0.43         | 0.58           | 0.54                   | 12.23                                  |
| Mut_11       | 783        | 831              | 782               | 0.47       | 0.39             | 0.47              | 0.44           | 1359          | 1868         | 0.79       | 0.52         | 0.66           | 0.53                   | 12.10                                  |
| Mut_12       | 762        | 689              | 906               | 0.51       | 0.64             | 0.25              | 0.47           | 1319          | 2085         | 0.81       | 0.41         | 0.61           | 0.52                   | 11.99                                  |
| Mut_13       | 802        | 728              | 899               | 0.44       | 0.57             | 0.26              | 0.42           | 1446          | 1865         | 0.75       | 0.53         | 0.64           | 0.51                   | 11.62                                  |
| Mut_14       | 793        | 775              | 839               | 0.45       | 0.49             | 0.37              | 0.44           | 1581          | 1899         | 0.68       | 0.51         | 0.59           | 0.50                   | 11.40                                  |
| Mut_15       | 691        | 707              | 837               | 0.64       | 0.61             | 0.37              | 0.54           | 1826          | 2253         | 0.55       | 0.32         | 0.43           | 0.50                   | 11.37                                  |
| Mut_16       | 783        | 770              | 853               | 0.47       | 0.50             | 0.35              | 0.44           | 1487          | 2158         | 0.72       | 0.37         | 0.55           | 0.48                   | 11.01                                  |
| Mut_17       | 775        | 788              | 841               | 0.49       | 0.46             | 0.37              | 0.44           | 1557          | 2120         | 0.69       | 0.39         | 0.54           | 0.48                   | 10.95                                  |
| Mut_18       | 776        | 828              | 838               | 0.48       | 0.39             | 0.37              | 0.42           | 1535          | 2135         | 0.70       | 0.38         | 0.54           | 0.47                   | 10.65                                  |
| Mut_19       | 824        | 735              | 880               | 0.40       | 0.56             | 0.30              | 0.42           | 1672          | 2089         | 0.63       | 0.41         | 0.52           | 0.46                   | 10.46                                  |
| Mut_20       | 774        | 844              | 828               | 0.49       | 0.36             | 0.39              | 0.41           | 1610          | 2161         | 0.66       | 0.37         | 0.51           | 0.45                   | 10.37                                  |
| Mut_21       | 782        | 711              | 920               | 0.47       | 0.60             | 0.22              | 0.43           | 1814          | 2194         | 0.55       | 0.35         | 0.45           | 0.44                   | 10.08                                  |
| Mut_22       | NA         | NA               | NA                | -          | -                | -                 | -              | 1791          | 2290         | 0.56       | 0.30         | 0.43           | 0.43                   | 9.90                                   |
| Mut_23       | 843        | 777              | 898               | 0.36       | 0.48             | 0.26              | 0.37           | 1600          | 2161         | 0.67       | 0.37         | 0.52           | 0.43                   | 9.80                                   |
| Mut_24       | 816        | 812              | 912               | 0.41       | 0.42             | 0.24              | 0.36           | 1654          | 2052         | 0.64       | 0.43         | 0.53           | 0.43                   | 9.75                                   |
| Mut_25       | 779        | 778              | 895               | 0.48       | 0.48             | 0.27              | 0.41           | 1827          | 2209         | 0.55       | 0.34         | 0.45           | 0.42                   | 9.69                                   |
| Mut_26       | 753        | 806              | 938               | 0.53       | 0.43             | 0.19              | 0.38           | 1591          | 2368         | 0.67       | 0.26         | 0.47           | 0.42                   | 9.50                                   |
| Mut_27       | 834        | 807              | 849               | 0.38       | 0.43             | 0.35              | 0.39           | 1827          | 2214         | 0.55       | 0.34         | 0.44           | 0.41                   | 9.36                                   |
| Mut_28       | 862        | 882              | 829               | 0.33       | 0.29             | 0.39              | 0.34           | 1566          | 2230         | 0.68       | 0.33         | 0.51           | 0.41                   | 9.26                                   |
| Mut_29       | NA         | NA               | NA                | -          | -                | -                 | -              | 1581          | 2611         | 0.68       | 0.13         | 0.40           | 0.40                   | 9.23                                   |
| Mut_30       | NA         | NA               | NA                | -          | -                | -                 | -              | 1925          | 2277         | 0.49       | 0.31         | 0.40           | 0.40                   | 9.17                                   |

|              |          |          |          |           |           |      |           |      |      |      |           |      |      |      |
|--------------|----------|----------|----------|-----------|-----------|------|-----------|------|------|------|-----------|------|------|------|
| WTIgG<br>2   | 106<br>0 | 101<br>6 | 100<br>2 | -0.0<br>3 | 0.05      | 0.08 | 0.03      | 2610 | 2885 | 0.13 | -0.0<br>1 | 0.06 | 0.04 | 1.00 |
| Ctrl<br>hIgG | 107<br>1 | 108<br>3 | 101<br>8 | -0.0<br>5 | -0.0<br>7 | 0.05 | -0.0<br>2 | 2587 | 2730 | 0.15 | 0.07      | 0.11 | 0.03 | 0.65 |
| CD3<br>only  | 105<br>1 | 103<br>7 | 104<br>4 | -0.0<br>1 | 0.01      | 0.00 | 0.00      | 2863 | 2863 | 0.00 | 0.00      | 0.00 | 0.00 | 0.00 |

NA 此行突变抗体未进行该列实验。

# **实施例11：不能根据已知突变对IgG1的FcγR结合能力的影响直接预测其对IgG2的FcγR结合能力的影响**

5 G236D、S239D(根据 Seung Y. Chu 等人(Molecular Immunology 45 (2008) 3926 - 3933)报道)和 S298A 突变(根据专利 US20090042291A1 报道)可以提高人 IgG1 与 FcγRIIB 的亲合力。但是,在本发明的二代测序分析结果显示,包含 G236D 或 S298A 突变的 IgG2 变体在分选后的占比没有增加,反而有一定降低(表 10); 包含 S239D 突变的人 IgG2 变体在分选前的占比为 0.026%,而在分选后测序结  
10 果中未测出。这些结果说明 G236D、S239D 和 S298A 突变不提高人 IgG2 的 FcγRIIB 结合能力,见表 10。

此外,我们还通过在 IgG2 中引入能够显著提高 IgG1 的 FcγRIIB 结合能力的 V11 突变位点(G237D/P238D/H268D/P271G/A330R) (F.Mimoto 等人, Protein Engineering, Design & Selection vol. 26 no. 10 pp. 589 - 598, 2013),  
15 获得了 IgG2\_M2(H268D/P271G)、IgG2\_M3(H268D/P271G/A330R)、IgG2\_M4 (G236D/P238D/H268D/P271G)和 IgG2\_M5 (G236D/P238D/H268D/P271G/A330R), 其中 M5 在 IgG2 中的突变对应 IgG1 V11 的突变。图 15 ELISA 结果显示,这些 突变体并没有使得 IgG2 获得和 IgG1 V11 一样的 Fc γ RIIB 结合能力。

因此,不能根据已知突变对 IgG1 的 Fc γ R 结合能力的影响直接预测其对  
20 IgG2 的 Fc γ R 结合能力的影响。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献 被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后, 本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申  
25 请所附权利要求书所限定的范围。