



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110785185 B

(45) 授权公告日 2024.05.24

(21) 申请号 201880037442.X
 (22) 申请日 2018.06.04
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 110785185 A
 (43) 申请公布日 2020.02.11
 (30) 优先权数据
 62/515316 2017.06.05 US
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2019.12.05
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/IB2018/053997 2018.06.04
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02018/224951 EN 2018.12.13
 (73) 专利权人 詹森生物科技公司
 地址 美国宾夕法尼亚州
 (72) 发明人 M.赵 A.兹沃拉克
 (74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
 72001
 专利代理师 李进 黄希贵
 (51) Int. Cl.
 A61K 39/395 (2006.01)
 C12N 15/09 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)
 C07K 16/12 (2006.01)
 C07K 16/46 (2006.01)
 (56) 对比文件
 CN 101189028 A, 2008.05.28
 CN 102471378 A, 2012.05.23
 CN 106068274 A, 2016.11.02
 US 2008112961 A1, 2008.05.15
 US 2010184959 A1, 2010.07.22
 US 2010331527 A1, 2010.12.30
 US 2016200807 A1, 2016.07.14
 US 2016215027 A1, 2016.07.28
 US 2016229908 A1, 2016.08.11
 US 2017029505 A1, 2017.02.02
 ZWOLAK, A ET AL..Rapid Purification of Human Bispecific Antibodies via Selective Modulation of Protein A Binding.SCIENTIFIC REPORTS.2017,第7卷(第7期),第1-11页.
 李锋等.双功能抗体药物研究进展.中国医药生物技术.2014,第9卷(第9期),第292页左栏第1段.

审查员 郭青

权利要求书4页 说明书68页
序列表60页 附图17页

(54) 发明名称
 具有非对称CH2-CH3区突变的工程化多特异性抗体和其他多聚体蛋白

(57) 摘要

本发明涉及具有非对称CH2-CH3区突变的工程化多特异性抗体和其他多聚体蛋白以及它们的制备和使用方法。

人 IgG1 CH2 VLTVLHQDWLN (SEQ ID NO: 104)
 小鼠 IgG2a CH2 ALPIQHQDWMS (SEQ ID NO: 105)

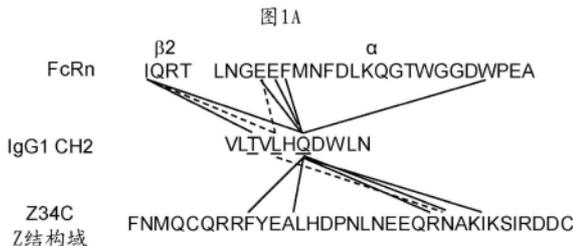


图1B

1. 一种分离的双特异性抗体,所述分离的双特异性抗体包含第一CH2-CH3区和第二CH2-CH3区,其中在所述第一CH2-CH3区引入突变Q311R或T307P/L309Q/Q311R并且在所述第二CH2-CH3区的相应位置为野生型氨基酸残基,其中残基根据EU索引进行编号,其中所述抗体为人IgG1同种型。

2. 根据权利要求1所述的分离的双特异性抗体,其中当与所述第二CH2-CH3区相比时,所述第一CH2-CH3区与蛋白A配体的结合降低。

3. 根据权利要求2所述的分离的双特异性抗体,其中所述蛋白A配体包括葡萄球菌蛋白A、Z结构域或Y结构域。

4. 根据权利要求3所述的分离的双特异性抗体,其中Z结构域包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的分离的双特异性抗体,还包含在所述第一CH2-CH3区和在所述第二CH2-CH3区中的非对称稳定突变,其中在所述第一CH2-CH3区和在所述第二CH2-CH3区中或者在所述第二CH2-CH3区和所述第一CH2-CH3区中的所述非对称稳定突变分别为F405L和K409R。

6. 根据权利要求1至4中任一项所述的分离的双特异性抗体,其中所述第一CH2-CH3区和所述第二CH2-CH3区选自以下氨基酸序列:

- a) 分别为SEQ ID NO:3和22;
- b) 分别为SEQ ID NO:5和22;
- c) 分别为SEQ ID NO:7和23;或
- d) 分别为SEQ ID NO:9和23。

7. 根据权利要求1至4中任一项所述的分离的双特异性抗体,包含第一轻链和第二轻链。

8. 根据权利要求7所述的分离的双特异性抗体,其中所述第一轻链和所述第二轻链具有相同的氨基酸序列。

9. 根据权利要求1至4中任一项所述的分离的双特异性抗体,其中所述分离的双特异性抗体结合两种抗原。

10. 根据权利要求9所述的分离的双特异性抗体,其中所述两种抗原为肿瘤抗原。

11. 根据权利要求9所述的分离的双特异性抗体,其中所述两种抗原为PD1、CD27、CD28、NKP46、ICOS、GITR、OX40、CTLA4、LAG3、TIM3、KIRa、CD73、CD39、IDO、BTLA、VISTA、TIGIT、CD96、CD30、HVEM、DNAM-1、LFA、EGFR、cMet、FGFR、ROR1、CD123、IL1RAP、FGFR、间皮素、CD3、CD32b、CD32a、CD16a、CD16b、NKG2D、NKP46、CD28、CD47、DLL、CD8、CD89、HLA或CD137中的任两种。

12. 一种药物组合物,包括根据权利要求1至11中任一项所述的分离的双特异性抗体。

13. 一种分离的多核苷酸,其编码权利要求1-11中任一项所述的分离的双特异性抗体。

14. 一种载体,包括权利要求13所述的分离的多核苷酸。

15. 根据权利要求14所述的载体,包含以下的分离的多核苷酸:

- i) 分别为SEQ ID NO:28和47;
- ii) 分别为SEQ ID NO:30和47;
- iii) 分别为SEQ ID NO:32和48;或

iv) 分别为SEQ ID NO:34和48。

16. 一种宿主细胞, 包含根据权利要求14或15所述的载体。

17. 根据权利要求16所述的宿主细胞, 其中所述宿主细胞为杂交瘤、骨髓瘤或CHO。

18. 根据权利要求16所述的宿主细胞, 其中所述宿主细胞为SP2/0、NS0、U266、CHO-K1SV、CHO-K1、DG44或Hek293。

19. 一种制备权利要求1所述的分离的双特异性抗体的方法, 所述方法包括:

a) 在表达所述双特异性抗体的条件下培养根据权利要求16所述的宿主细胞; 以及

b) 使用蛋白A配体亲和色谱纯化所述双特异性抗体。

20. 一种制备分离的双特异性抗体的方法, 所述分离的双特异性抗体包含第一重链或其片段和第二重链或其片段, 其中在所述第一重链或其片段引入突变Q311R或T307P/L309Q/Q311R并且在所述第二重链或其片段的相应位置为野生型氨基酸残基, 其中残基根据EU索引进行编号, 所述方法包括:

a) 提供包含所述第一重链或其片段和第一轻链的第一亲本抗体;

b) 提供包含所述第二重链或其片段和第二轻链的第二亲本抗体;

c) 使所述第一亲本抗体和所述第二亲本抗体在样品中接触;

d) 温育所述样品; 以及

e) 使用蛋白A配体亲和色谱纯化所述双特异性抗体, 其中所述分离的双特异性抗体为人IgG1同种型。

21. 根据权利要求20所述的方法, 其中所述分离的双特异性抗体还包含所述第一重链或其片段和所述第二重链或其片段中的非对称稳定突变, 其中所述第一重链或其片段和所述第二重链或其片段中, 或者所述第二重链或其片段和所述第一重链或其片段中的所述非对称稳定突变分别为F405L和K409R。

22. 根据权利要求20或21所述的方法, 其中所述第一轻链和所述第二轻链具有相同的氨基酸序列。

23. 根据权利要求20或21所述的方法, 其中所述第一亲本抗体和所述第二亲本抗体作为纯化抗体提供。

24. 根据权利要求20或21所述的方法, 其中在从表达所述第一亲本抗体和所述第二亲本抗体的细胞收集的细胞培养基中提供所述第一亲本抗体和所述第二亲本抗体。

25. 根据权利要求20所述的方法, 其中还原剂在步骤d) 期间添加。

26. 根据权利要求25所述的方法, 其中所述还原剂为2-巯基乙胺 (2-MEA)、二硫苏糖醇 (DTT)、二硫赤藓糖醇 (DTE)、谷胱甘肽、三 (2-羧乙基) 膦 (TCEP)、L-半胱氨酸和 β -巯基乙醇。

27. 根据权利要求26所述的方法, 其中2-MEA以10mM至100mM的浓度存在。

28. 根据权利要求27所述的方法, 其中2-MEA以25mM至75mM的浓度存在。

29. 根据权利要求20所述的方法, 其中步骤d) 在20°C至37°C的温度下进行90分钟至6小时。

30. 根据权利要求20或21所述的方法, 其中蛋白A配体亲和色谱采用pH梯度。

31. 根据权利要求30所述的方法, 其中所述pH梯度为pH 7.0至pH 3.0。

32. 根据权利要求30所述的方法, 其中所述pH梯度为pH 4.6至pH 3.4。

33. 根据权利要求30所述的方法, 其中所述双特异性抗体在pH 4.4至pH4.1之间洗脱。

34. 根据权利要求30所述的方法,其中蛋白A配体亲和色谱采用柠檬酸盐缓冲液。

35. 一种包含第一多肽和第二多肽的多聚体蛋白,其中所述第一多肽包含第一CH2-CH3区,并且所述第二多肽包含第二CH2-CH3区,其中在所述第一CH2-CH3区引入突变Q311R或T307P/L309Q/Q311R并且在所述第二CH2-CH3区的相应位置为野生型氨基酸残基,其中残基根据EU索引进行编号,其中所述多聚体蛋白为双特异性抗体,其中所述第一CH2-CH3区和所述第二CH2-CH3区为人IgG1同种型。

36. 根据权利要求35所述的多聚体蛋白,其中当与所述第二CH2-CH3区相比时,所述第一CH2-CH3区与蛋白A配体的结合降低。

37. 根据权利要求36所述的多聚体蛋白,其中所述蛋白A配体包括葡萄球菌蛋白A、Z结构域或Y结构域。

38. 根据权利要求37所述的多聚体蛋白,其中Z结构域包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

39. 根据权利要求35至38中任一项所述的多聚体蛋白,还包含在所述第一CH2-CH3区和在所述第二CH2-CH3区中的非对称稳定突变,其中在所述第一CH2-CH3区和在所述第二CH2-CH3区中或者在所述第二CH2-CH3区和所述第一CH2-CH3区中的所述非对称稳定突变分别为F405L和K409R。

40. 根据权利要求35至38中任一项所述的多聚体蛋白,其中所述第一CH2-CH3区和所述第二CH2-CH3区选自以下氨基酸序列:

- a) 分别为SEQ ID NO:3和22;
- b) 分别为SEQ ID NO:5和22;
- c) 分别为SEQ ID NO:7和23;或
- d) 分别为SEQ ID NO:9和23。

41. 根据权利要求35至38中任一项所述的多聚体蛋白,其中所述第一CH2-CH3区和/或所述第二CH2-CH3区与异源蛋白偶联。

42. 根据权利要求41所述的多聚体蛋白,其中所述异源蛋白是肽、受体的胞外结构域、配体的胞外结构域、分泌蛋白、scFv、Fab、重链可变区(VH)、轻链可变区(VL)、III型纤连蛋白结构域和/或fynomer。

43. 根据权利要求42所述的多聚体蛋白,其中所述异源蛋白偶联到所述第一CH2-CH3区和/或所述第二CH2-CH3区的N端或C端。

44. 根据权利要求43所述的多聚体蛋白,其中所述异源蛋白通过接头偶联到所述第一CH2-CH3区和/或所述第二CH2-CH3区的N端或C端。

45. 根据权利要求44所述的多聚体蛋白,其中所述接头包含SEQ ID NO:57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、92、93、94、95、96、97或98的氨基酸序列。

46. 根据权利要求35至38中任一项所述的多聚体蛋白,包含两个、三个或四个多肽链。

47. 一种药物组合物,包括根据权利要求35至46中任一项所述的多聚体蛋白。

48. 一种制备分离的多聚体蛋白的方法,所述分离的多聚体蛋白包含第一CH2-CH3区和第二CH2-CH3区,其中在所述第一CH2-CH3区引入突变Q311R或T307P/L309Q/Q311R并且在所述第二CH2-CH3区的相应位置为野生型氨基酸残基,其中残基根据EU索引进行编号,所述方法包括:

- a) 提供包含所述第一CH2-CH3区的第一亲本蛋白;

b) 提供包含所述第二CH2-CH3区的第二亲本蛋白；
c) 使所述第一亲本蛋白和所述第二亲本蛋白在样品中接触；
d) 温育所述样品；以及
e) 使用蛋白A配体亲和色谱纯化所述多聚体蛋白，其中所述多聚体蛋白为双特异性抗体，其中所述第一CH2-CH3区和所述第二CH2-CH3区为人IgG1同种型。

49. 根据权利要求48所述的方法，其中所述分离的多聚体蛋白还包含在所述第一CH2-CH3区和在所述第二CH2-CH3区中的非对称稳定突变，其中在所述第一CH2-CH3区和在所述第二CH2-CH3区中或者在所述第二CH2-CH3区和所述第一CH2-CH3区中的所述非对称稳定突变分别为F405L和K409R。

50. 根据权利要求48或49所述的方法，其中所述第一CH2-CH3区和所述第二CH2-CH3区选自以下氨基酸序列：

- a) 分别为SEQ ID NO:3和22；
- b) 分别为SEQ ID NO:5和22；
- c) 分别为SEQ ID NO:7和23；或
- d) 分别为SEQ ID NO:9和23。

51. 根据权利要求48或49所述的方法，其中所述第一CH2-CH3区和/或所述第二CH2-CH3区与异源蛋白偶联。

52. 根据权利要求51所述的方法，其中所述异源蛋白是肽、受体的胞外结构域、配体的胞外结构域、分泌蛋白、scFv、Fab、重链可变区(VH)、轻链可变区(VL)、III型纤连蛋白结构域和/或fynomer。

53. 根据权利要求51所述的方法，其中所述异源蛋白偶联到所述第一CH2-CH3区和/或所述第二CH2-CH3区的N端或C端。

54. 根据权利要求53所述的方法，其中所述异源蛋白通过接头偶联到所述第一CH2-CH3区和/或所述第二CH2-CH3区的N端或C端。

55. 根据权利要求54所述的方法，其中所述接头包含SEQ ID NO:57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、92、93、94、95、96、97或98的氨基酸序列。

56. 根据权利要求48或49所述的方法，其中所述第一亲本蛋白和所述第二亲本蛋白作为纯化蛋白提供。

57. 根据权利要求48或49所述的方法，其中在从表达所述第一亲本蛋白和所述第二亲本蛋白的细胞收集的细胞培养基中提供所述第一亲本蛋白和所述第二亲本蛋白。

58. 根据权利要求48所述的方法，其中还原剂在步骤d)期间添加。

59. 根据权利要求58所述的方法，其中所述还原剂为2-巯基乙胺(2-MEA)、二硫苏糖醇(DTT)、二硫赤藓糖醇(DTE)、谷胱甘肽、三(2-羧乙基)膦(TCEP)、L-半胱氨酸和 β -巯基乙醇。

60. 根据权利要求59所述的方法，其中2-MEA以10mM至100mM的浓度存在。

61. 根据权利要求59所述的方法，其中2-MEA以25mM至75mM的浓度存在。

62. 根据权利要求48所述的方法，其中步骤d)在25°C至37°C的温度下进行90分钟至6小时。

具有非对称CH2-CH3区突变的工程化多特异性抗体和其他多聚体蛋白

技术领域

[0001] 本发明涉及具有非对称CH2-CH3区突变的工程化多特异性抗体和其他多聚体蛋白以及它们的制备和使用方法。

[0002] 序列表

[0003] 本申请包含经由EFS-Web提交的序列表,其全部内容以引用方式并入本文。2018年5月29日创建的ASCII文本文件命名为JBI5124WOPCT_ST25.txt,并且大小为164千字节。

背景技术

[0004] 治疗性生物制剂项目正日益转向用于双靶向、细胞重定向和免疫检查点调节的双特异性抗体;实际上,许多双特异性治疗剂目前正处于临床试验中(Jachimowicz等人, BioDrugs, 2014年,第4卷,第331-343页)。双特异性抗体的开发受到上游和下游两种工艺的限制,存在以下困难:不能够以可重现且规模化的方式生成高滴度纯产物,并且难以将双特异性分子与过量的亲本分子或中间体分子分离。已经开发出用于特异性配对IgG重链或半分子的方法,这些方法包括knob-in-hole、受控的Fab臂交换、CrossMAb、以及共同的轻链和正交的Fab界面。基于Fv的分子(即,BiTE、双价抗体)和基于非IgG的支架(即,DARPin、Adnectin、fynomer和centyrin)的生产越来越倾向于开发这些分子作为治疗剂。

[0005] 仅Fv或另选的基于支架的分子的缺点是它们的血清寿命通常较短,这是由尿排泄或由于它们不能被FcRn回收而导致的溶酶体降解引起的。因此,包含完整Fc结构域的基于IgG的多特异性分子基于其较长的血清半衰期、促进效应子功能的能力和凋亡通路的诱导而具有吸引力。

[0006] 由于去除残余的亲本和其他中间体mAb和Ab片段分子需要多个步骤,因此纯化双特异性抗体可能有一定挑战性。此类分子可具有与源自的双特异性抗体相似的生物物理特性,因此不容易通过色谱方法分离。纯化困难可导致双特异性分子的收率或纯度降低。

[0007] 因此,仍然需要另选的双特异性和多特异性形式以及用于纯化双特异性和多特异性分子(诸如抗体)的方法。

发明内容

[0008] 本发明提供了一种分离的多特异性抗体,该分离的多特异性抗体包含第一CH2-CH3区和第二CH2-CH3区,该第一CH2-CH3区包含突变Q311R、Q311K、T307P/L309Q、T307P/V309Q、T307P/L309Q/Q311R或T307P/V309Q/Q311R并且该第二CH2-CH3区在位置307、309和311处包含野生型氨基酸残基,其中残基根据EU索引进行编号。

[0009] 本发明还提供了一种分离的多特异性抗体,该分离的多特异性抗体包含第一CH2-CH3区和第二CH2-CH3区,该第一CH2-CH3区包含突变Q311R并且该第二CH2-CH3区在位置311处包含野生型氨基酸残基,其中残基根据EU索引进行编号。

[0010] 本发明还提供了一种分离的多特异性抗体,该分离的多特异性抗体包含第一CH2-

CH3区和第二CH2-CH3区,该第一CH2-CH3区包含突变Q311K并且该第二CH2-CH3区在位置311处包含野生型氨基酸残基,其中残基根据EU索引进行编号。

[0011] 本发明还提供了一种分离的多特异性抗体,该分离的多特异性抗体包含第一CH2-CH3区和第二CH2-CH3区,该第一CH2-CH3区包含突变T307P/L309Q并且该第二CH2-CH3区在位置307和309处包含野生型氨基酸残基,其中残基根据EU索引进行编号。

[0012] 本发明还提供了一种分离的多特异性抗体,该分离的多特异性抗体包含第一CH2-CH3区和第二CH2-CH3区,该第一CH2-CH3区包含突变T307P/V309Q并且该第二CH2-CH3区在位置307和309处包含野生型氨基酸残基,其中残基根据EU索引进行编号。

[0013] 本发明还提供了一种分离的多特异性抗体,该分离的多特异性抗体包含第一CH2-CH3区和第二CH2-CH3区,该第一CH2-CH3区包含突变T307P/L309Q/Q311R并且该第二CH2-CH3区在位置307、309和311处包含野生型氨基酸残基,其中残基根据EU索引进行编号。

[0014] 本发明还提供了一种分离的多特异性抗体,该分离的多特异性抗体包含第一CH2-CH3区和第二CH2-CH3区,该第一CH2-CH3区包含突变T307P/V309Q/Q311R并且该第二CH2-CH3区在位置307、309和311处包含野生型氨基酸残基,其中残基根据EU索引进行编号。

[0015] 本发明还提供了一种分离的多核苷酸,该分离的多核苷酸包含:

[0016] 编码第一CH2-CH3区的多核苷酸,该第一CH2-CH3区包含突变Q311R、Q311K、T307P/L309Q、T307P/V309Q、T307P/L309Q/Q311R或T307P/V309Q/Q311R;

[0017] 编码第一CH2-CH3区和第二CH2-CH3区的多核苷酸,该第一CH2-CH3区包含突变Q311R、Q311K、T307P/L309Q、T307P/V309Q、T307P/L309Q/Q311R或T307P/V309Q/Q311R并且该第二CH2-CH3区在位置307、309和311处包含野生型氨基酸残基;或

[0018] SEQ ID NO:27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、87、88或91的多核苷酸序列。

[0019] 本发明还提供了一种载体,该载体包含:

[0020] 编码第一CH2-CH3区的分离的多核苷酸,该第一CH2-CH3区包含突变Q311R、Q311K、T307P/L309Q、T307P/V309Q、T307P/L309Q/Q311R或T307P/V309Q/Q311R;

[0021] 包含SEQ ID NO:27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、87、88或91的多核苷酸序列的分离的多核苷酸;

[0022] 包含编码第一CH2-CH3区和第二CH2-CH3区的多核苷酸的分离的多核苷酸,该第一CH2-CH3区包含突变Q311R、Q311K、T307P/L309Q、T307P/V309Q、T307P/L309Q/Q311R或T307P/V309Q/Q311R并且该第二CH2-CH3区在位置307、309和311处包含野生型氨基酸残基;或

[0023] 包含

[0024] 分别为SEQ ID NO:27和47;

[0025] 分别为SEQ ID NO:28和47;

[0026] 分别为SEQ ID NO:29和47;

[0027] 分别为SEQ ID NO:30和47;

[0028] 分别为SEQ ID NO:31和48;

[0029] 分别为SEQ ID NO:32和48;

[0030] 分别为SEQ ID NO:33和48;

- [0031] 分别为SEQ ID NO:34和48;
- [0032] 分别为SEQ ID NO:35和49;
- [0033] 分别为SEQ ID NO:36和49;
- [0034] 分别为SEQ ID NO:37和49;
- [0035] 分别为SEQ ID NO:38和49;
- [0036] 分别为SEQ ID NO:39和50;
- [0037] 分别为SEQ ID NO:40和50;
- [0038] 分别为SEQ ID NO:41和50;
- [0039] 分别为SEQ ID NO:42和50;
- [0040] 分别为SEQ ID NO:43和51;
- [0041] 分别为SEQ ID NO:44和51;
- [0042] 分别为SEQ ID NO:45和51;
- [0043] 分别为SEQ ID NO:46和51;
- [0044] 分别为SEQ ID NO:87和89;
- [0045] 分别为SEQ ID NO:87和90;
- [0046] 分别为SEQ ID NO:88和89;
- [0047] 分别为SEQ ID NO:88和90;
- [0048] 分别为SEQ ID NO:92和89;或
- [0049] 分别为SEQ ID NO:92和90的分离的多核苷酸。
- [0050] 本发明还提供一种包含本发明的载体的宿主细胞。
- [0051] 本发明还提供了一种制备本发明的分离的多特异性抗体的方法,该方法包括:
- [0052] 在表达多特异性抗体的条件下培养本发明的宿主细胞;以及
- [0053] 使用蛋白A配体亲和色谱纯化多特异性抗体。
- [0054] 本发明还提供了一种制备分离的多特异性抗体的方法,该分离的多特异性抗体包含第一重链和第二重链,该第一重链包含突变Q311R、Q311K、T307P/L309Q、T307P/V309Q、T307P/L309Q/Q311R或T307P/V309Q/Q311R并且该第二重链在位置307、309和311处包含野生型氨基酸残基,该方法包括:
- [0055] 提供包含第一重链和第一轻链的第一亲本抗体,该第一重链包含突变Q311R、Q311K、T307P/L309Q、T307P/V309Q、T307P/L309Q/Q311R或T307P/V309Q/Q311R;
- [0056] 提供包含第二重链和第二轻链的第二亲本抗体,该第二重链在位置307、309和311处包含野生型氨基酸残基;
- [0057] 使第一亲本抗体和第二亲本抗体在样品中接触;
- [0058] 温育该样品;以及
- [0059] 使用蛋白A配体亲和色谱纯化多特异性抗体。
- [0060] 本发明还提供了一种分离的抗体,该分离的抗体包含具有相同氨基酸序列的两条重链或其片段以及两条轻链或其片段,其中该两条重链包含突变Q311R、Q311K、T307P/L309Q、T307P/V309Q、T307P/L309Q/Q311R或T307P/V309Q/Q311R,其中残基根据EU索引进行编号。
- [0061] 本发明还提供了一种多核苷酸,该多核苷酸

[0062] 编码包含SEQ ID NO:2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、52、53或56的CH2-CH3区的抗体重链;或

[0063] 包含SEQ ID NO:27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、87、88或91的多核苷酸序列。

[0064] 本发明还提供了一种包含第一多肽和第二多肽的多聚体蛋白,其中该第一多肽包含第一CH2-CH3区,该第一CH2-CH3区包含突变Q311R、Q311K、T307P/L309Q、T307P/V309Q、T307P/L309Q/Q311R或T307P/V309Q/Q311R,并且该第二多肽包含第二CH2-CH3区,该第二CH2-CH3区在位置307、309和311处包含野生型氨基酸残基,其中残基根据EU索引进行编号。

[0065] 本发明还提供了一种包含本发明的多聚体蛋白的药物组合物。

[0066] 本发明还提供了一种制备分离的多聚体蛋白的方法,该分离的多聚体蛋白包含第一CH2-CH3区和第二CH2-CH3区,该第一CH2-CH3区包含突变Q311R、Q311K、T307P/L309Q、T307P/V309Q、T307P/L309Q/Q311R或T307P/V309Q/Q311R并且该第二CH2-CH3区在位置307、309和311处包含野生型氨基酸残基,该方法包括:

[0067] 提供包含第一CH2-CH3区的第一亲本蛋白,该第一CH2-CH3区包含突变Q311R、Q311K、T307P/L309Q、T307P/V309Q、T307P/L309Q/Q311R或T307P/V309Q/Q311R;

[0068] 提供包含第二CH2-CH3区的第二亲本蛋白,该第二CH2-CH3区在位置307、309和311处包含野生型氨基酸残基;

[0069] 使第一亲本蛋白和第二亲本蛋白在样品中接触;

[0070] 温育该样品;以及

[0071] 使用蛋白A配体亲和色谱纯化多特异性蛋白。

附图说明

[0072] 图1A示出了从氨基酸残基305至315的人IgG1结构域和小鼠IgG2a CH2结构域之间的比对;残基根据EU索引进行编号。

[0073] 图1B示出了IgG1 CH2残基T307、L309和Q311(图中带下划线的残基)与FcRn或Z结构域(Z34C肽)的相互作用。每个残基与FcRn中的残基并与Z结构域发生侧链相互作用。T307与FcRn的 β 2微球蛋白结构域上的I1相互作用。L309和Q311R负责与FcRn和Z结构域两者(虚线和实线分别为L309和Q311)相互作用。IQRT:SEQ ID NO:102(FcRn的 β 2链的一部分);LNGEEFMDFDLKQGTWGGDWPEA:SEQ ID NO:103(FcRn的 α 链的一部分);VLTVLHQDWLN:SEQ ID NO:104(IgG1 CH2结构域的一部分);FNMQCRRRFYEALHDPNLNEEQRNAKIKSIRDDC:SEQ ID NO:99。

[0074] 图2A示出了使用AlphaScreen测定法,所指示的具有mAb RSV-L的单特异性抗体对FcRn的竞争结合的剂量响应曲线。这些曲线图显示了对比竞争者的浓度绘制的最大信号百分比。

[0075] 图2B示出了使用AlphaScreen测定法,所指示的具有mAb RSV-L的单特异性或双特异性抗体对FcRn的竞争结合的剂量响应曲线。这些曲线图显示了对比竞争者的浓度绘制的最大信号百分比。

[0076] 图3A示出了使用AlphaScreen测定法,所指示的具有mAb RSV-L的单特异性或双特异性抗体对Fc γ RI的竞争结合的剂量响应曲线。这些曲线图显示了对比竞争者的浓度绘制

的最大信号百分比。

[0077] 图3B示出了使用AlphaScreen测定法,所指示的具有mAb RSV-L的单特异性或双特异性抗体对Fc γ RIIa的竞争结合的剂量响应曲线。这些曲线图显示了对比竞争者的浓度绘制的最大信号百分比。

[0078] 图3C示出了使用AlphaScreen测定法,所指示的具有mAb RSV-L的单特异性或双特异性抗体对Fc γ RIIb的竞争结合的剂量响应曲线。这些曲线图显示了对比竞争者的浓度绘制的最大信号百分比。

[0079] 图3D示出了使用AlphaScreen测定法,所指示的具有mAb RSV-L的单特异性或双特异性抗体对Fc γ RIIIa的竞争结合的剂量响应曲线。这些曲线图显示了对比竞争者的浓度绘制的最大信号百分比。

[0080] 图4A示出了疏水作用色谱(HIC)色谱图,表明双特异性抗体可在所开发的条件下与亲本单特异性mAb分离。

[0081] 图4B示出了使用Fab臂交换生成的等摩尔量的抗体RSV-L[TLQ]和gp120-R和bsRSV-L[TLQ]的混合物的样品的HIC色谱图。

[0082] 图4C示出了使用Fab臂交换由蛋白A树脂生成的抗体RSV-L[TLQ]、gp120-R和bsRSV-L[TLQ]的混合物的样品的洗脱曲线。

[0083] 图4D示出了蛋白A洗脱峰的HIC色谱图。

[0084] 图5A示出了上清液中Fab臂交换后的bsRSV-L[TLQ]的样品的洗脱曲线。

[0085] 图5B示出了来自上清液中Fab臂交换后的bsRSV-L[TLQ]的样品的蛋白A亲和柱pH 4.7洗脱液的HIC分析。

[0086] 图5C示出了来自上清液中Fab臂交换后的bsRSV-L[TLQ]的样品的蛋白A亲和柱pH 4.2洗脱液的HIC分析。

[0087] 图5D示出了来自上清液中Fab臂交换后的bsRSV-L[TLQ]的样品的蛋白A亲和柱pH 3.4洗脱液的HIC分析。

[0088] 图6A示出了上清液中Fab臂交换后的bsRSV-L[Q311R]的样品的蛋白A色谱图,该图显示出在pH 4.6、4.2和3.4时洗脱的三个不同峰。

[0089] 图6B示出了来自上清液中Fab臂交换后的bsRSV-L[Q311R]的样品的蛋白A亲和柱pH 4.6洗脱液的HIC分析。

[0090] 图6C示出了来自上清液中Fab臂交换后的bsRSV-L[Q311R]的样品的蛋白A亲和柱pH 4.2洗脱液的HIC分析。

[0091] 图6D示出了来自上清液中Fab臂交换后的bsRSV-L[Q311R]的样品的蛋白A亲和柱pH 3.4洗脱液的HIC分析。

[0092] 图7A示出了使用共同的轻链技术生成的bsTNF-[TLQ]的样品的蛋白A色谱图。

[0093] 图7B示出了使用共同的轻链技术生成的bsTNF-[TLQ]的样品的蛋白A亲和柱pH 4.7洗脱液的HIC分析。

[0094] 图7C示出了使用共同的轻链技术生成的bsTNF-[TLQ]的样品的蛋白A亲和柱pH 4.2洗脱液的HIC分析。

[0095] 图7D示出了使用共同的轻链技术生成的bsTNF-[TLQ]的样品的蛋白A亲和柱pH 3.4洗脱液的HIC分析。

[0096] 图8示出了Tg32半合子小鼠中的所指示抗体的药代动力学分析。这些曲线图显示了对比时间绘制的归一化为线性相位的初始时间点的每个mAb的浓度。各点表示每组四只动物的平均值±标准误差。

具体实施方式

[0097] 本说明书中所引用的所有出版物,包括但不限于专利和专利申请均以引用方式并入本文,如同在本文中完整给出。

[0098] 应当了解,本文所用的术语只是为了描述具体实施方案的目的,并非旨在进行限制。除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语的含义与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同。

[0099] 虽然与本文所述的那些方法和材料相似或等效的任意方法和材料都可以用于检验本发明的实践中,然而本文中描述示例性材料和方法。在描述和要求保护本发明时,将使用以下术语。

[0100] 定义

[0101] 如本说明书和所附权利要求中所用,除非内容另有明确说明,否则单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数指代。因此,例如,对“一个细胞”的提及包括两个或更多个细胞的组合等等。

[0102] “多聚体蛋白”是指由组合形成单一蛋白的两条或更多条独立的多肽链构成的蛋白。多肽链可例如经由二硫键非共价或共价连接。

[0103] “结合”是指两种蛋白的特异性结合,诸如抗体结合到抗原或者多特异性蛋白结合到其配体。“特异性结合”是指两种蛋白以通常约 1×10^{-8} M或更小(例如约 1×10^{-9} M或更小、约 1×10^{-10} M或更小、约 1×10^{-11} M或更小、或者约 1×10^{-12} M或更小)的平衡解离常数(K_D)优先结合,通常该 K_D 小于其结合至非特异性抗原(例如BSA、酪蛋白)的 K_D 的至少百分之一。

[0104] “结合降低”是指在与没有突变的亲本分子的结合相比时,本发明的在CH2-CH3区中具有至少一个突变的抗体或多特异性蛋白与蛋白A配体的结合显著降低。

[0105] “调节结合”是指本发明的在CH2-CH3区中具有至少一个突变的抗体或多特异性蛋白与Fc γ R或FcRn的结合的显著差异。

[0106] “抗原”是指能够在受试者中产生免疫应答的分子,诸如蛋白或蛋白片段。

[0107] “非对称稳定突变”是指在第一CH2-CH3区中和在第二CH2-CH3区中的这样的突变:其处于第一CH2-CH3区中和第二CH2-CH3区中的不同位置处,并且相对于在第一CH2-CH3区和第二CH2-CH3区之间形成同源二聚体,有利于(例如使其稳定)在第一CH2-CH3区和第二CH2-CH3区之间形成异源二聚体。

[0108] “异源蛋白”是指天然不是内源性细胞中的包含CH2-CH3区的多肽的一部分的多肽或蛋白。

[0109] “III型纤连蛋白(FN3)结构域”(FN3结构域)指在蛋白质中频繁出现的结构域,该蛋白质包括纤连蛋白、腱生蛋白、细胞内细胞骨架蛋白、细胞因子受体和原核酶(Bork和Doolittle,Proc Nat Acad Sci USA,第89卷,第8990-8994页,1992年;Meinke等人,J Bacteriol,第175卷,第1910-1918页,1993年;Watanabe等人,J Biol Chem,第265卷,第15659-15665页,1990年)。示例性FN3结构域是存在于人腱生蛋白C中的15个不同的FN3结构

域、存在于人纤连蛋白(FN)中的15个不同的FN3结构域以及非天然合成的FN3结构域,如例如在美国专利8,278,419中所述。单个的FN3结构域用结构域编号和蛋白质名称来表示,例如腱生蛋白的第三FN3结构域(TN3)或纤连蛋白的第十FN3结构域(FN10)。FN3结构域可被工程化以便以高特异性和亲和力结合抗原。

[0110] “Fynomer”是指来源于人Fyn SH3结构域的抗原结合蛋白,其可被工程化以便以高特异性和亲和力结合抗原。

[0111] “抗体”广义上是指并包括免疫球蛋白分子,具体包括单克隆抗体(包括鼠科动物单克隆抗体、兔单克隆抗体、人单克隆抗体、人源化单克隆抗体和嵌合单克隆抗体),抗原结合片段,单特异性抗体,双特异性或多特异性抗体,二聚、四聚或多聚抗体,单链抗体、结构域抗体,以及包含具有所需特异性的抗原结合位点的免疫球蛋白分子的任何其他经修饰构型。“全长抗体”包含由二硫键互连的两条重链(HC)与两条轻链(LC)以及它们的多聚体(例如IgM)。每条重链均由重链可变区(VH)和重链恒定区(由结构域CH1、铰链、CH2和CH3构成)构成。每条轻链由轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)构成。VH和VL可进一步细分为称作互补决定区(CDR)的超变区,间插有框架区(FR)。各个VH和VL由三个CDR和四个FR片段构成,其从氨基端到羧基端按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。

[0112] “互补决定区(CDR)”是抗体中结合抗原的区域。VH中存在三个CDR(HCDR1、HCDR2、HCDR3)并且VL中存在三个CDR(LCDR1、LCDR2、LCDR3)。可使用各种描绘诸如Kabat(Wu和Kabat, *J Exp Med*, 第132卷, 第211-250页, 1970年; Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版公共卫生服务, 国立卫生研究院, 贝塞斯达, 马里兰州, 1991年)、Chothia(Chothia和Lesk, *J Mol Biol*, 第196卷, 第901-917页, 1987年)和IMGT(Lefranc等人, *Dev Comp Immunol*, 第27卷, 第55-77页, 2003年)来定义CDR。描述了各种描绘和可变区域编号之间的对应关系(参见例如Lefranc等人, *Dev Comp Immunol*, 第27卷, 第55-77页, 2003年; Honegger和Pluckthun, *J Mol Biol*, 第309卷, 第657-670页, 2001年; 国际免疫遗传学(IMGT)数据库; Web资源, http://www_imgt_org)。可用程序(诸如UCL Business PLC的abYsis)可用于描绘CDR。除非另有明确地说明, 本文所用的术语“CDR”、“HCDR1”、“HCDR2”、“HCDR3”、“LCDR1”、“LCDR2”和“LCDR3”包括由任何上述方法(Kabat、Chothia或IMGT)定义的CDR。

[0113] 免疫球蛋白可根据重链恒定区氨基酸序列被指定为五种主要种类IgA、IgD、IgE、IgG和IgM。IgA和IgG进一步亚分类为同种型IgA1、IgA2、IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。任何脊椎动物物种的抗体轻链可基于其恒定区的氨基酸序列被指定为两种完全不同的类型中的一种, 即kappa(κ)和lambda(λ)。

[0114] “抗原结合片段”是指免疫球蛋白分子的保留亲本全长抗体的抗原结合特性的部分。示例性的抗原结合片段为重链互补决定区(HCDR)1、2和/或3、轻链互补决定区(LCDR)1、2和/或3、VH、VL、VH与VL、Fab、F(ab')₂、Fd和Fv片段以及由一个VH域或一个VL域组成的域抗体(dAb)。VH和VL域可经由合成接头连接在一起以形成各种类型的单链抗体设计, 其中在VH域和VL域由单独链表达的情况下, VH/VL域在分子内或分子间配对, 以形成单价抗原结合位点, 诸如单链Fv(scFv)或双价抗体; 例如在国际专利公布W01998/44001、国际专利公布W01988/01649; 国际专利公布W01994/13804; 国际专利公布W01992/01047中所描述的。

[0115] “CH2-CH3区”是指人抗体恒定结构域的一部分并且包括氨基酸残基231-446(残基

根据EU索引进行编号)。CH2-CH3区可在位置447处缺失C-末端赖氨酸。

[0116] “单克隆抗体”是指在每条重链和每条轻链中具有单一氨基酸组成的抗体群,除了可能的熟知改变,诸如从抗体重链中除去C末端赖氨酸之外。单克隆抗体通常特异性结合一个抗原表位,而双特异性或多特异性单克隆抗体特异性结合两个或更多个不同的抗原表位。单克隆抗体可在抗体群内具有异质糖基化。单克隆抗体可以是单特异性的或多特异性的,或者是单价的、二价的或多价的。术语“单克隆抗体”中包括双特异性抗体。

[0117] “分离的”是指已经与分子产生于其中的系统(例如重组细胞)中的其它组分基本上分离和/或从其中纯化出来的分子(诸如合成多核苷酸或蛋白质,如抗体)的同质群体,以及已经受至少一个纯化或分离步骤的蛋白质。“分离的抗体”是指基本上不含其他细胞材料和/或化学物质的抗体,并且涵盖分离至更高纯度,诸如80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%纯度的抗体。

[0118] “人源化抗体”是指其中CDR序列来源于非人物种且框架来源于人免疫球蛋白序列的抗体。人源化抗体在框架中可包含置换,使得该框架可能不是表达的人免疫球蛋白或人免疫球蛋白种系基因序列的精确拷贝。

[0119] “人抗体”是指当施用于人受试者时被优化以具有最小限度的免疫应答的抗体。人抗体的可变区来源于人种系免疫球蛋白序列。如果抗体包含恒定区或恒定区的一部分,则该恒定区也来源于人种系免疫球蛋白序列。

[0120] 如果人抗体的可变区来源于使用人种系免疫球蛋白基因的系统,则人抗体包含“来源于”人种系免疫球蛋白序列的重链可变区或轻链可变区。此类示例性系统为在噬菌体或哺乳动物细胞上展示的人免疫球蛋白基因文库,以及转基因非人动物,诸如携带人免疫球蛋白基因座的小鼠或大鼠。在与人体中表达的免疫球蛋白相比时,“人抗体”通常包含由于例如引入体细胞突变、特意引入框架或CDR中的置换以及非人动物中克隆和V_DJ重组期间引入的氨基酸变化所引起的氨基酸差异。“人抗体”的氨基酸序列与由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸序列通常具有约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。在一些情况下,“人抗体”可包含由人框架序列分析得到的共有框架序列(例如如在Knappik等人,J Mol Biol,第296卷,第57-86页,2000年中所述);或结合到展示在噬菌体上的人免疫球蛋白基因文库中的合成HCDR3(例如如Shi等人,J Mol Biol,第397卷,第385-396页,2010年和国际专利公布W02009/085462中所述)。“人抗体”的定义中不包括CDR来源于非人物种的抗体。

[0121] “重组体”是指以重组手段制备、表达、创建或分离的抗体及其它蛋白质。

[0122] “多特异性”是指特异性结合两个或更多个不同抗原或同一抗原内的两个或更多个不同表位的蛋白,诸如抗体。多特异性蛋白可能对其他相关的抗原具有交叉反应性,例如,对来自其他物种(同源)(诸如人或猴,例如食蟹猕猴(*Macaca fascicularis*) (*cynomolgus, cyno*)、黑猩猩(*Pan troglodytes*) (*chimpanzee, chimp*)或狨猴(*Callithrix jacchus*) (*common marmoset, marmoset*))的相同抗原具有交叉反应性,或者可结合两个或更多个抗原之间所共享的表位。

[0123] “双特异性”是指特异性结合两个不同抗原或同一抗原内的两个不同表位的蛋白,诸如抗体。双特异性蛋白可能对其他相关的抗原具有交叉反应性,例如,对来自其他物种

(同源) (诸如人或猴, 例如食蟹猕猴 (*Macaca fascicularis*) (*cynomolgus, cyno*)、黑猩猩 (*Pan troglodytes*) (*chimpanzee, chimp*) 或狨猴 (*Callithrix jacchus*) (*common marmoset, marmoset*)) 的相同抗原具有交叉反应性, 或者可结合两个或更多个抗原之间所共享的表位。

[0124] “单特异性”是指特异性结合一个不同抗原或不同表位的蛋白, 诸如抗体。单特异性蛋白可能对其他相关的抗原具有交叉反应性, 例如, 对来自其他物种(同源) (诸如人或猴, 例如食蟹猕猴 (*Macaca fascicularis*) (*cynomolgus, cyno*)、黑猩猩 (*Pan troglodytes*) (*chimpanzee, chimp*) 或狨猴 (*Callithrix jacchus*) (*common marmoset, marmoset*)) 的相同抗原具有交叉反应性, 或者可结合两个或更多个抗原之间所共享的表位。

[0125] “载体”是指能够在生物系统内复制或可在这类系统之间移动的多核苷酸。载体多核苷酸通常含有元件诸如复制起点、聚腺苷酸化信号或选择标记物, 其功能是促进这些多核苷酸在生物系统, 例如细胞、病毒、动物、植物、以及重组生物系统中的复制或保持。

[0126] “蛋白A配体亲和色谱”是指利用蛋白A配体的IgG结合结构域对免疫球蛋白分子的Fc区的亲和力的亲和色谱方法。该Fc区包含人或动物免疫球蛋白恒定结构域CH2和CH3或基本上类似于这些的免疫球蛋白结构域。蛋白A配体涵盖来自金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的细胞壁的天然蛋白A、通过重组或合成方法产生的蛋白A、以及保留结合至Fc区的能力的变体。在实施过程中, 蛋白A配体色谱法涉及使用固定到固体载体上的蛋白A配体。参见Gagnon, “Protein A Affinity Chromatography, Purification Tools for Monoclonal Antibodies”, 第155-198页, Validated Biosystems公司, 1996年。固体载体是蛋白A配体所粘附到的非水性基质。此类熟知的载体包括琼脂糖、琼脂糖凝胶、玻璃、二氧化硅、聚苯乙烯、硝化纤维、木炭、砂、纤维素和任何其他合适的材料。可使用任何合适的熟知方法将第二蛋白附连到固体载体。具有和不具有固定的蛋白A配体的此类固体载体易于购自许多商业来源, 包括诸如Vector Laboratory (Burlingame, Calif.)、Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Calif.)、BioRad (Hercules, Calif.)、Amersham Biosciences (GE Healthcare的分部, Uppsala, Sweden)、Pall (Port Washington, N.Y.) 和EMD-Millipore (Billerica, Mass.)。固定到孔玻璃基质的蛋白A配体可作为PROSEP[®]-A (Millipore) 商购获得。固相也可为基于琼脂糖的基质。固定在琼脂糖基质上的蛋白A配体可作为MABSELECT[™] (Amersham Biosciences) 商购获得。

[0127] “表达载体”是指可用于在生物系统或再造生物系统中以指导由存在于表达载体中的多核苷酸序列所编码的多肽进行翻译的载体。

[0128] “多核苷酸”是指包含磷酸糖类主链共价连接的核苷酸链或其它等同共价化学物的合成分子。cDNA是合成多核苷酸的典型示例。

[0129] “多肽”或“蛋白质”是指包含由肽键连接以形成多肽的至少两个氨基酸残基的分子。少于50个氨基酸的小多肽可以称作“肽”。

[0130] “变体”是指因一处或多处修饰(例如, 一个或多个置换、插入或缺失) 而不同于参考多肽或参考多核苷酸的多肽或多核苷酸。

[0131] “价”是指在分子中存在对于抗原为特异性的结合位点的指定数目。因此, 术语“单价”、“二价”、“四价”和“六价”分别是指在分子中存在对于抗原为特异性的一个、两个、四个和六个结合位点。

[0132] “蛋白A配体”是指天然存在的或修饰的葡萄球菌蛋白A,并且包括工程化的蛋白A结构域。工程化的蛋白A可以是例如Z结构域、Z结构域的变体、Y结构域,或不含D结构域和E结构域的工程化的蛋白A。工程化的蛋白A结构域可能无法结合到免疫球蛋白的VH3结构域(或者如果结合的话,以非常低的亲和力结合),但仍可结合到IgG1、IgG2和IgG4的CH2-CH3区。

[0133] “Z结构域”是当与蛋白A的野生型B结构域相比时,具有突变A1V和G29A的金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)蛋白A的B结构域的合成工程化的变体;Z结构域包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。另外的Z结构域变体是具有SEQ ID NO:99、100和101的氨基酸序列的变体以及US2006/0194950中所述的那些。

[0134] SEQ ID NO:1

VDNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLLAEAKK
[0135] LNDAQAPK

[0136] SEQ ID NO:99

[0137] FNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNAKIKSIRDDC

[0138] SEQ ID NO:100

VDNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLLAEAKK
[0139] LNDAQAPK

[0140] SEQ ID NO:101

[0141] FNMQQQRRFYALHDPNLNEEQRNAKIKSIRDD

[0142] 除非另有明确说明,否则在整个说明书中,抗体恒定区中的氨基酸残基根据EU索引编号,如Kabat等人,“Sequences of Proteins of Immunological Interest”,第5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)中有所描述。各种恒定结构域编号系统之间的对应关系在国际免疫遗传学 (IMGT) 数据库中提供; Web资源, http://www_imgt_org。

[0143] 本文使用如表1中所示的常规单字母和三字母氨基酸代码。

[0144] 表1.

[0145]

| 氨基酸 | 三字母代码 | 单字母代码 |
|------|-------|-------|
| 丙氨酸 | Ala | A |
| 精氨酸 | Arg | R |
| 天冬酰胺 | Asn | N |
| 天冬氨酸 | Asp | D |
| 半胱氨酸 | Cys | C |
| 谷氨酸 | Gln | E |
| 谷氨酰胺 | Glu | Q |
| 甘氨酸 | Gly | G |
| 组氨酸 | His | H |
| 异亮氨酸 | Ile | I |
| 赖氨酸 | Lvs | K |

| | | |
|------|-----|---|
| 甲硫氨酸 | Met | M |
| 苯丙氨酸 | Phe | F |
| 脯氨酸 | Pro | P |
| 丝氨酸 | Ser | S |
| 苏氨酸 | Thr | T |
| 色氨酸 | Trp | W |
| 酪氨酸 | Tyr | Y |
| 缬氨酸 | Val | V |

[0146] 物质组合物:多特异性抗体

[0147] 本发明提供了包含在CH2-CH3区中具有非对称突变的蛋白的多特异性抗体和其他多聚体CH2-CH3区(这有利于使用蛋白A配体色谱法纯化它们)、编码它们的多核苷酸、载体和宿主细胞,以及它们的制备和使用方法。

[0148] 全长双特异性治疗性抗体的制备和纯化需要将双特异性抗体与过量的亲本和/或中间体分子有效分离。本文已鉴定Fc突变,其降低突变的重链与蛋白A配体的结合。因此,可基于来自蛋白A配体亲和柱的差异洗脱曲线从亲本抗体纯化以非对称方式(例如,仅在一条重链中)具有这些Fc突变的双特异性抗体。

[0149] 已经开发出用于特异性配对IgG重链或半分子的各种方法,这些方法包括knob-in-hole(参见例如,美国专利7,695,936)、CrossMAb(Schaefer等人,Proc Natl Acad Sci U S A,第108卷,第11187-11192页,2011年)、受控的Fab臂交换(Labrijn等人,Proc Natl Acad Sci U S A,第110卷,第5145-5150页,2013年)、共同的轻链(参见例如,美国专利7,951,917)和正交的Fab界面(Lewis等人,Nat Biotechnol,第32卷,第191-198页,2014年)。本文所述的组合物和方法提供了用于生成和纯化双特异性抗体的进一步改进的方法。

[0150] FcRn负责将母体IgG转移到胎儿并保护血清IgG不受溶酶体降解的影响。这些方法均取决于FcRn在回收核内体中在酸性pH(<6.5)下以约600nM的 K_D 结合到IgG并且在中性pH下解离,从而将IgG释放回到血清中的能力(Roopenian和Akilesh,Nat Rev Immunol,第7卷,第715-725页,2007年)。IgG在CH2-CH3界面处结合FcRn,使得单个Fc包含两个相同的FcRn结合位点。结构和生物化学研究表明,单个Fc结合两个FcRn异源二聚体,但是内吞运输可涉及FcRn自身在膜表面上的多聚化。若干研究已表明,调节Fc和FcRn之间的相互作用会极大影响血清寿命(Dall'Acqua等人,J Immunol,第169卷,第5171-5180页,2002年;Hinton等人,J Biol Chem,第279卷第8期,第6213-6216页,2004年;Hinton等人,J Immunol,第176卷,第346-356页,2006年;Vaccaro等人,Nat Biotechnol,第23卷,第1283-1288页,2005年;Yeung等人,J Immunol,第182卷,第7663-7671页,2009年;Stapleton等人,Nat Commun,第2卷,第599页,2011年),从而得出结论,FcRn主要负责确定成人中IgG的血清寿命。

[0151] 调节Ab的蛋白A配体结合特性的尝试通常与显著缩短血清半衰期有关,因为蛋白A和新生儿Fc受体(FcRn)均在Fc上共享结合位点。本文引入的突变不会降低Fc与FcRn的结合,因此不会降低工程化抗体的血清半衰期。引入的突变中的一者Q311R导致与FcRn的结合稍微增强,并且延长了抗体的血清半衰期。

[0152] 虽然示例描述了来自亲本抗体的多特异性全长抗体的成功工程化和纯化,但本文所述的技术也适用于任何包含两个CH2-CH3区的多聚体蛋白。

[0153] 本发明提供了一种分离的多特异性抗体,该分离的多特异性抗体包含第一CH2-CH3区和第二CH2-CH3区,该第一CH2-CH3区包含突变Q311R、Q311K、T307P/L309Q、T307P/V309Q、T307P/L309Q/Q311R或T307P/V309Q/Q311R并且该第二CH2-CH3区在位置307、309和311处包含野生型氨基酸残基,其中残基根据EU索引进行编号。

[0154] 可使用蛋白A配体亲和色谱法从亲本抗体有效纯化具有非对称Q311R、Q311K、T307P/L309Q、T307P/V309Q、T307P/L309Q/Q311R或T307P/V309Q/Q311R突变的分离的多特异性抗体。引入的Q311K、T307P/L309Q和T307P/L309Q/Q311R突变不会降低工程化抗体与FcRn或Fc γ R的结合,因此不期望改变抗体半衰期或效应子功能。引入的Q311R突变增强了与FcRn的结合并延长了抗体的血清半衰期。

[0155] 本发明还提供了一种分离的多特异性抗体,该分离的多特异性抗体包含第一CH2-CH3区和第二CH2-CH3区,该第一CH2-CH3区包含突变Q311R并且该第二CH2-CH3区在位置311处包含野生型氨基酸残基,其中残基根据EU索引进行编号。

[0156] 本发明还提供了一种分离的多特异性抗体,该分离的多特异性抗体包含第一CH2-CH3区和第二CH2-CH3区,该第一CH2-CH3区包含突变Q311K并且该第二CH2-CH3区在位置311处包含野生型氨基酸残基,其中残基根据EU索引进行编号。

[0157] 本发明还提供了一种分离的多特异性抗体,该分离的多特异性抗体包含第一CH2-CH3区和第二CH2-CH3区,该第一CH2-CH3区包含突变T307P/L309Q并且该第二CH2-CH3区在位置307和309处包含野生型氨基酸残基,其中残基根据EU索引进行编号。

[0158] 本发明还提供了一种分离的多特异性抗体,该分离的多特异性抗体包含第一CH2-CH3区和第二CH2-CH3区,该第一CH2-CH3区包含突变T307P/V309Q并且该第二CH2-CH3区在位置307和309处包含野生型氨基酸残基,其中残基根据EU索引进行编号。

[0159] 本发明还提供了一种分离的多特异性抗体,该分离的多特异性抗体包含第一CH2-CH3区和第二CH2-CH3区,该第一CH2-CH3区包含突变T307P/L309Q/Q311R并且该第二CH2-CH3区在位置307、309和311处包含野生型氨基酸残基,其中残基根据EU索引进行编号。

[0160] 本发明还提供了一种分离的多特异性抗体,该分离的多特异性抗体包含第一CH2-CH3区和第二CH2-CH3区,该第一CH2-CH3区包含突变T307P/V309Q/Q311R并且该第二CH2-CH3区在位置307、309和311处包含野生型氨基酸残基,其中残基根据EU索引进行编号。

[0161] 在一些实施方案中,当与第二CH2-CH3区相比时,第一CH2-CH3区与蛋白质A配体的结合降低。

[0162] 与蛋白A配体的结合可使用任何合适的方法进行实验测定。此类方法可利用ProteOn XPR36、Biacore 3000或KinExA仪器。如果在不同的条件(例如,同渗容摩、pH)下测量,所测量的亲和力可变化。因此,亲和力和其他结合参数(例如, K_D 、 k_{on} 、 k_{off})的测量通常用标准化条件和标准化缓冲液(诸如本文所述的缓冲液)进行。另选地,可使用蛋白A配体色谱法使用pH梯度直接评估与蛋白A配体的结合。与蛋白A配体的结合降低的分子在较高pH下洗脱。示例性蛋白A配体色谱法可使用mAbSelect Sure柱(GE Healthcare),并且使用包含50mM柠檬酸盐的缓冲液在约pH 4.7、pH 4.2或pH 3.4的pH下在3个步骤中洗脱样品。

[0163] 在一些实施方案中,蛋白A配体包含葡萄球菌蛋白A。

[0164] 在一些实施方案中,蛋白A配体包含Z结构域。

[0165] 在一些实施方案中,Z结构域包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

- [0166] 在一些实施方案中,蛋白A配体包含Y结构域。
- [0167] 在一些实施方案中,蛋白A配体包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列。
- [0168] 在一些实施方案中,蛋白A配体包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列。
- [0169] 在一些实施方案中,蛋白A配体包含SEQ ID NO:101的氨基酸序列。
- [0170] 葡萄球菌蛋白A (spA) 包含5个同源螺旋状IgG结合结构域,表示为E、D、A、B和C (Uhlen、Guss等人,1984年)。这些结构域中的每一者均足以结合到Fc区,然而spA也结合到人VH3家族成员的VH区 (Romagnani等人,J Immunol,第129卷,第596-602页,1982年;Sasso等人,J Immunol,第147卷,第1877-1883页,1991年)。引入到spA B结构域或C结构域中的增强稳定性的突变分别得到耐受高pH处理并且仅结合Fc的合成的Z结构域和Y结构域。已将串联或四聚Z结构域、四聚Y结构域或天然spA结合到商业亲和树脂,诸如MabSelect SuRe (GE)、TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F和MabSelect Xtra。
- [0171] 在一些实施方案中,多特异性抗体是IgG1同种型。
- [0172] 在一些实施方案中,多特异性抗体是IgG2同种型。
- [0173] 在一些实施方案中,多特异性抗体是IgG4同种型。
- [0174] 虽然示例提供了关于成功生成和纯化IgG1多特异性抗体的实验数据,但预期所识别的突变也将在IgG2和IgG4同种型上起作用,因为残基307和311在所有三种同种型中是保守的,并且位置309在IgG1和IgG4之间是保守的,在IgG2中具有保守的Leu至Val置换。
- [0175] 在一些实施方案中,多特异性抗体与Fc γ R的结合与没有突变的亲本抗体与Fc γ R的结合相当。
- [0176] 在一些实施方案中,Fc γ R为Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb和/或Fc γ RIIIa。
- [0177] 在一些实施方案中,Fc γ R为Fc γ RI。
- [0178] 在一些实施方案中,Fc γ R为Fc γ RIIa。
- [0179] 在一些实施方案中,Fc γ R为Fc γ RIIb。
- [0180] 在一些实施方案中,Fc γ R为Fc γ RIIIa。
- [0181] 与Fc γ R的结合相当的示例性多特异性抗体是具有Q311R或T307P/L309Q/Q311R突变的多特异性抗体。
- [0182] 在一些实施方案中,多特异性抗体与FcRn的结合与没有突变的亲本抗体与FcRn的结合相当。
- [0183] 与FcRn的结合相当的示例性多特异性抗体是具有Q311K或T307P/L309Q/Q311R突变的多特异性抗体。
- [0184] 在一些实施方案中,当与没有突变的亲本抗体与FcRn的结合相比时,多特异性抗体与FcRn的结合有所增强。
- [0185] 与FcRn的结合增强的示例性多特异性抗体是具有Q311R突变的抗体。
- [0186] 本发明还提供了一种分离的多特异性抗体,该分离的多特异性抗体包含第一CH2-CH3区和第二CH2-CH3区,该第一CH2-CH3区包含突变Q311R、Q311K、T307P/L309Q、T307P/V309Q、T307P/L309Q/Q311R或T307P/V309Q/Q311R并且该第二CH2-CH3区在位置307、309和311处包含野生型氨基酸残基,其中残基根据EU索引进行编号,其中该多特异性抗体在第一CH2-CH3区中和在第二CH2-CH3区中还包含非对称稳定突变。
- [0187] 在一些实施方案中,在第一CH2-CH3区和在第二CH2-CH3区中或者在第二CH2-CH3

区和第一CH2-CH3区中的非对称稳定突变

[0188] 分别为F405L和K409R;

[0189] 分别为野生型和F405L/R409K;

[0190] 分别为T366W和T366S/L368A/Y407V;

[0191] 分别为T366Y/F405A和T394W/Y407T;

[0192] 分别为T366W/F405W和T394S/Y407A;

[0193] 分别为F405W/Y407A和T366W/T394S;

[0194] 分别为L351Y/F405A/Y407V和T394W;

[0195] 分别为T366I/K392M/T394W和F405A/Y407V;

[0196] 分别为T366L/K392M/T394W和F405A/Y407V;

[0197] 分别为L351Y/Y407A和T366A/K409F;

[0198] 分别为L351Y/Y407A和T366V/K409F;

[0199] 分别为Y407A和T366A/K409F;

[0200] 分别为D399K/E356K和K409D/K392D;或

[0201] 分别为D399K/E356K/E357K和K409D/K392D/K370。

[0202] 在一些实施方案中,在第一CH2-CH3区和在第二CH2-CH3区中或者在第二CH2-CH3区和第一CH2-CH3区中的非对称稳定突变分别为F405L和K409R。

[0203] 在一些实施方案中,在第一CH2-CH3区和在第二CH2-CH3区中或者在第二CH2-CH3区和第一CH2-CH3区中的非对称稳定突变分别为野生型和F405L/R409K。

[0204] 在一些实施方案中,在第一CH2-CH3区和在第二CH2-CH3区中或者在第二CH2-CH3区和第一CH2-CH3区中的非对称稳定突变分别为T366W和T366S/L368A/Y407V。

[0205] 在一些实施方案中,在第一CH2-CH3区和在第二CH2-CH3区中或者在第二CH2-CH3区和第一CH2-CH3区中的非对称稳定突变分别为T366Y/F405A和T394W/Y407T。

[0206] 在一些实施方案中,在第一CH2-CH3区和在第二CH2-CH3区中或者在第二CH2-CH3区和第一CH2-CH3区中的非对称稳定突变分别为T366W/F405W和T394S/Y407A。

[0207] 在一些实施方案中,在第一CH2-CH3区和在第二CH2-CH3区中或者在第二CH2-CH3区和第一CH2-CH3区中的非对称稳定突变分别为F405W/Y407A和T366W/T394S。

[0208] 在一些实施方案中,在第一CH2-CH3区和在第二CH2-CH3区中或者在第二CH2-CH3区和第一CH2-CH3区中的非对称稳定突变分别为L351Y/F405A/Y407V和T394W。

[0209] 在一些实施方案中,在第一CH2-CH3区和在第二CH2-CH3区中或者在第二CH2-CH3区和第一CH2-CH3区中的非对称稳定突变分别为T366I/K392M/T394W和F405A/Y407V。

[0210] 在一些实施方案中,在第一CH2-CH3区和在第二CH2-CH3区中或者在第二CH2-CH3区和第一CH2-CH3区中的非对称稳定突变分别为T366L/K392M[/T394W和F405A/Y407V。

[0211] 在一些实施方案中,在第一CH2-CH3区和在第二CH2-CH3区中或者在第二CH2-CH3区和第一CH2-CH3区中的非对称稳定突变分别为L351Y/Y407A和T366A/K409F。

[0212] 在一些实施方案中,在第一CH2-CH3区和在第二CH2-CH3区中或者在第二CH2-CH3区和第一CH2-CH3区中的非对称稳定突变分别为L351Y/Y407A和T366V/K409F。

[0213] 在一些实施方案中,在第一CH2-CH3区和在第二CH2-CH3区中或者在第二CH2-CH3区和第一CH2-CH3区中的非对称稳定突变分别为Y407A和T366A/K409F。

[0214] 在一些实施方案中,在第一CH2-CH3区和在第二CH2-CH3区中或者在第二CH2-CH3区和第一CH2-CH3区中的非对称稳定突变分别为D399K/E356K和K409D/K392D。

[0215] 在一些实施方案中,在第一CH2-CH3区和在第二CH2-CH3区中或者在第二CH2-CH3区和第一CH2-CH3区中的非对称稳定突变分别为D399K/E356K/E357K和K409D/K392D/K370。

[0216] 可将非对称稳定突变引入双特异性或多特异性抗体中,以有利于将它们与过量的亲本或中间分子分离的下游工艺。

[0217] 示例性的非对称稳定突变是促进两个亲本抗体之间的Fab臂交换(例如,半分子交换、重链-轻链对上的交换)的那些。在这种技术中,将有利于体外在无细胞环境中形成两个亲本抗体半分子的异源二聚体或使用共表达形成两个亲本抗体半分子的异源二聚体的突变引入每个亲本抗体中的重链CH3界面。例如,第一亲本抗体中的突变F405L和第二亲本抗体中的突变K409R可用于促进IgG1的Fab臂交换。对于IgG4抗体,可使用野生型第一亲本抗体和第二亲本抗体中的F405L/R409K突变。

[0218] 另外的非对称稳定突变是knob-in-hole突变(Genentech)或引入静电匹配残基的突变(Chugai、Amgen、NovoNordisk、Oncomed)。示例性knob-in-hole突变(表达为在第一亲本抗体中的突变位置/在第二亲本抗体中的突变位置)为T366Y/F405A、T366W/F405W、F405W/Y407A、T394W/Y407T、T394S/Y407A、T366W/T394S、F405W/T394S和T366W/T366S_L368A_Y407V。引入静电匹配残基的示例性突变为描述于下列专利中的那些:美国专利公布US2010/0015133;美国专利公布US2009/0182127;美国专利公布US2010/028637或美国专利公布号US2011/0123532中所述。另外的非对称稳定突变为L351Y_F405A_Y407V/T394W、T366I_K392M_T394W/F405A_Y407V、T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V、L351Y_Y407A/T366A_K409F、L351Y_Y407A/T366V_K409F、Y407A/T366A_K409F或T350V_L351Y_F405A_Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W,如美国专利公布US2012/0149876或美国专利公布号US2013/0195849中所述。

[0219] 通常使用标准方法以DNA水平到分子水平(诸如抗体的恒定域)上进行突变。

[0220] 在一些实施方案中,多特异性抗体在第一CH2-CH3区中包含Q311R/F405L突变并在第二CH2-CH3区中包含K409R突变。

[0221] 在一些实施方案中,多特异性抗体在第一CH2-CH3区中包含Q311K/F405L突变并在第二CH2-CH3区中包含K409R突变。

[0222] 在一些实施方案中,多特异性抗体在第一CH2-CH3区中包含T307P/L309Q/F405L突变并在第二CH2-CH3区中包含K409R突变。

[0223] 在一些实施方案中,多特异性抗体在第一CH2-CH3区中包含T307P/L309Q/Q311R/F405L突变并在第二CH2-CH3区中包含K409R突变。

[0224] 在一些实施方案中,多特异性抗体在第一CH2-CH3区中包含Q311R/K409R突变并在第二CH2-CH3区中包含F405L突变。

[0225] 在一些实施方案中,多特异性抗体在第一CH2-CH3区中包含Q311K/K409R突变并在第二CH2-CH3区中包含F405L突变。

[0226] 在一些实施方案中,多特异性抗体在第一CH2-CH3区中包含T307P/L309Q/K409R突变并在第二CH2-CH3区中包含F405L突变。

[0227] 在一些实施方案中,多特异性抗体在第一CH2-CH3区中包含T307P/L309Q/Q311R/

K409R突变并在第二CH2-CH3区中包含F405L突变。

[0228] 在一些实施方案中,多特异性抗体在第一CH2-CH3区中包含Q311R突变并在第二CH2-CH3区中包含F405L/R409K突变。

[0229] 在一些实施方案中,多特异性抗体在第一CH2-CH3区中包含Q311K突变并在第二CH2-CH3区中包含F405L/R409K突变。

[0230] 在一些实施方案中,多特异性抗体在第一CH2-CH3区中包含T307P/V309Q突变并在第二CH2-CH3区中包含F405L/R409K突变。

[0231] 在一些实施方案中,多特异性抗体在第一CH2-CH3区中包含T307P/V309Q/Q311R突变并在第二CH2-CH3区中包含F405L/R409K突变。

[0232] 在一些实施方案中,多特异性抗体在第一CH2-CH3区中包含Q311R/T366W突变并在第二CH2-CH3区中包含T366S/L368A/Y407V突变。

[0233] 在一些实施方案中,多特异性抗体在第一CH2-CH3区中包含Q311K/T366W突变并在第二CH2-CH3区中包含T366S/L368A/Y407V突变。

[0234] 在一些实施方案中,多特异性抗体在第一CH2-CH3区中包含T307P/L309Q/T366W突变并在第二CH2-CH3区中包含T366S/L368A/Y407V突变。

[0235] 在一些实施方案中,多特异性抗体在第一CH2-CH3区中包含T307P/L309Q/Q311R/T366W突变并在第二CH2-CH3区中包含T366S/L368A/Y407V突变。

[0236] 在一些实施方案中,多特异性抗体在第一CH2-CH3区中包含Q311R/T366S/L368A/Y407V突变并在第二CH2-CH3区中包含T366W突变。

[0237] 在一些实施方案中,多特异性抗体在第一CH2-CH3区中包含Q311K/T366S/L368A/Y407V突变并在第二CH2-CH3区中包含T366W突变。

[0238] 在一些实施方案中,多特异性抗体在第一CH2-CH3区中包含T307P/L309Q/T366S/L368A/Y407V突变并在第二CH2-CH3区中包含T366W突变。

[0239] 在一些实施方案中,多特异性抗体在第一CH2-CH3区中包含T307P/L309Q/Q311R/T366S/L368A/Y407V突变并在第二CH2-CH3区中包含T366W突变。

[0240] 本发明的多特异性抗体中的示例性CH2-CH3区的氨基酸序列在表2和表3中示出。

[0241] 在一些实施方案中,第一CH2-CH3区和第二CH2-CH3区分别包含SEQ ID NO:2和22的氨基酸序列。

[0242] 在一些实施方案中,第一CH2-CH3区和第二CH2-CH3区分别包含SEQ ID NO:3和22的氨基酸序列。

[0243] 在一些实施方案中,第一CH2-CH3区和第二CH2-CH3区分别包含SEQ ID NO:4和22的氨基酸序列。

[0244] 在一些实施方案中,第一CH2-CH3区和第二CH2-CH3区分别包含SEQ ID NO:5和22的氨基酸序列。

[0245] 在一些实施方案中,第一CH2-CH3区和第二CH2-CH3区分别包含SEQ ID NO:6和23的氨基酸序列。

[0246] 在一些实施方案中,第一CH2-CH3区和第二CH2-CH3区分别包含SEQ ID NO:7和23的氨基酸序列。

[0247] 在一些实施方案中,第一CH2-CH3区和第二CH2-CH3区分别包含SEQ ID NO:8和23

的氨基酸序列。

[0248] 在一些实施方案中,第一CH₂-CH₃区和第二CH₂-CH₃区分别包含SEQ ID NO:9和23的氨基酸序列。

[0249] 在一些实施方案中,第一CH₂-CH₃区和第二CH₂-CH₃区分别包含SEQ ID NO:10和24的氨基酸序列。

[0250] 在一些实施方案中,第一CH₂-CH₃区和第二CH₂-CH₃区分别包含SEQ ID NO:11和24的氨基酸序列。

[0251] 在一些实施方案中,第一CH₂-CH₃区和第二CH₂-CH₃区分别包含SEQ ID NO:12和24的氨基酸序列。

[0252] 在一些实施方案中,第一CH₂-CH₃区和第二CH₂-CH₃区分别包含SEQ ID NO:13和24的氨基酸序列。

[0253] 在一些实施方案中,第一CH₂-CH₃区和第二CH₂-CH₃区分别包含SEQ ID NO:14和25的氨基酸序列。

[0254] 在一些实施方案中,第一CH₂-CH₃区和第二CH₂-CH₃区分别包含SEQ ID NO:15和25的氨基酸序列。

[0255] 在一些实施方案中,第一CH₂-CH₃区和第二CH₂-CH₃区分别包含SEQ ID NO:16和25的氨基酸序列。

[0256] 在一些实施方案中,第一CH₂-CH₃区和第二CH₂-CH₃区分别包含SEQ ID NO:17和25的氨基酸序列。

[0257] 在一些实施方案中,第一CH₂-CH₃区和第二CH₂-CH₃区分别包含SEQ ID NO:18和26的氨基酸序列。

[0258] 在一些实施方案中,第一CH₂-CH₃区和第二CH₂-CH₃区分别包含SEQ ID NO:19和26的氨基酸序列。

[0259] 在一些实施方案中,第一CH₂-CH₃区和第二CH₂-CH₃区分别包含SEQ ID NO:20和26的氨基酸序列。

[0260] 在一些实施方案中,第一CH₂-CH₃区和第二CH₂-CH₃区分别包含SEQ ID NO:21和26的氨基酸序列。

[0261] 在一些实施方案中,第一CH₂-CH₃区和第二CH₂-CH₃区分别包含SEQ ID NO:52和54的氨基酸序列。

[0262] 在一些实施方案中,第一CH₂-CH₃区和第二CH₂-CH₃区分别包含SEQ ID NO:52和55的氨基酸序列。

[0263] 在一些实施方案中,第一CH₂-CH₃区和第二CH₂-CH₃区分别包含SEQ ID NO:53和54的氨基酸序列。

[0264] 在一些实施方案中,第一CH₂-CH₃区和第二CH₂-CH₃区分别包含SEQ ID NO:53和55的氨基酸序列。

[0265] 在一些实施方案中,第一CH₂-CH₃区和第二CH₂-CH₃区分别包含SEQ ID NO:56和54的氨基酸序列。

[0266] 在一些实施方案中,第一CH₂-CH₃区和第二CH₂-CH₃区分别包含SEQ ID NO:56和55的氨基酸序列。

[0267] 本发明的多特异性抗体还可包含共同的轻链以进一步有利于将它们与过量的亲本或中间体分子分离的下游工艺。

[0268] 在一些实施方案中,多特异性抗体包含第一轻链和第二轻链。

[0269] 在一些实施方案中,第一轻链和第二轻链具有相同的氨基酸序列。

[0270] 在一些实施方案中,多特异性抗体是双特异性抗体。

[0271] 表2.

| | CH2-CH3 结构域 | 蛋白质 SEQ ID NO: | cDNA SEQ ID NO: |
|--------|---|----------------|-----------------|
| | IgG1 CH2-CH3 Q311K | 2 | 27 |
| | IgG1 CH2-CH3 Q311R | 3 | 28 |
| [0272] | IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q | 4 | 29 |
| | IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/Q311R | 5 | 30 |
| | IgG1 CH2-CH3 Q311K/F405L | 6 | 31 |
| | IgG1 CH2-CH3 Q311R/F405L | 7 | 32 |
| | IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/F405L | 8 | 33 |
| | IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/Q311R/F405L | 9 | 34 |
| | IgG1 CH2-CH3 Q311K/K409R | 10 | 35 |
| | IgG1 CH2-CH3 Q311R/K409R | 11 | 36 |
| | IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/K409R | 12 | 37 |
| | IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/Q311R/K409R | 13 | 38 |
| | IgG1 CH2-CH3 Q311K/ T366W | 14 | 39 |
| | IgG1 CH2-CH3 Q311R/T366W | 15 | 40 |
| | IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/ T366W | 16 | 41 |
| | IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/Q311R/ T366W | 17 | 42 |
| | IgG1 CH2-CH3 Q311K/T366S/L368A/Y407V | 18 | 43 |
| | IgG1 CH2-CH3 Q311R/T366S/L368A/Y407V | 19 | 44 |
| [0273] | IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/ T366S/L368A/Y407V | 20 | 45 |
| | IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/Q311R/ T366S/L368A/Y407V | 21 | 46 |
| | 野生型 IgG1 CH2-CH3 | 22 | 47 |
| | IgG1 CH2-CH3 K409R | 23 | 48 |
| | IgG1 CH2-CH3 F405L | 24 | 49 |
| | IgG1 CH2-CH3 T366S/L368A/Y407V | 25 | 50 |
| | IgG1 CH2-CH3 T366W | 26 | 51 |
| | IgG2 CH2-CH3 Q311R | 52 | 87 |
| | IgG2 CH2-CH3 T307P/V309Q/Q311R | 53 | 88 |
| | 野生型 IgG2 CH2-CH3 | 54 | 89 |
| | IgG2 CH2-CH3 F405L/K409R | 55 | 90 |
| | IgG4 CH2-CH3 T307P/V309Q | 56 | 91 |

[0274] 表3.

[0275]

| CH2-CH3 结构域 | 蛋白质 SEQ ID NO: | 蛋白质氨基酸序列 |
|--------------------|----------------|--|
| IgG1 CH2-CH3 Q311K | 2 | PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHKDWLNGKEYKC KVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK |
| IgG1 CH2-CH3 Q311R | 3 | PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHRDWLNGKEYKC KVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK |
| IgG1 CH2-CH3 | 4 | PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV |

[0276]

| | | |
|---|----|--|
| T307P/L309Q | | VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLPVQHQRDNLNGKEYKC KVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP PGK |
| IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/Q31 1R | 5 | PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLPVQHQRDNLNGKEYKC KVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP PGK |
| IgG1 CH2-CH3 Q311K/F405L | 6 | PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHKDNLNGKEYKC KVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDS DGSFLLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK |
| IgG1 CH2-CH3 Q311R/F405L | 7 | PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHRDNLNGKEYKC KVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDS DGSFLLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK |
| IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/F405 L | 8 | PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLPVQHQRDNLNGKEYKC KVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDS DGSFLLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK |
| IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/Q31 1R/F405L | 9 | PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLPVQHQRDNLNGKEYKC KVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDS DGSFLLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK |
| IgG1 CH2-CH3 Q311K/K409R | 10 | PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR |

[0277]

| | | |
|---|----|--|
| | | EEQYNSTYRVVSVLTVLHKDWLNGKEYKC KVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK |
| IgG1 CH2-CH3 Q311R/K409R | 11 | PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHRDWLNGKEYKC KVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK |
| IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/K40 9R | 12 | PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLPVQH QDWLNGKEYKC KVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK |
| IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/Q31 1R/K409R | 13 | PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLPVQH R DWLNGKEYKC KVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK |
| IgG1 CH2-CH3 Q311K/ T366W | 14 | PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHKDWLNGKEYKC KVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK |
| IgG1 CH2-CH3 Q311R/T366W | 15 | PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHRDWLNGKEYKC KVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK |
| IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/ T366W | 16 | PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLPVQH QDWLNGKEYKC |

[0278]

| | | |
|---|----|--|
| | | KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK |
| IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/Q31 1R/ T366W | 17 | PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLPVQHRDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK |
| IgG1 CH2-CH3 Q311K/T366S/L36 8A/Y407V | 18 | PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHKDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK |
| IgG1 CH2-CH3 Q311R/T366S/L36 8A/Y407V | 19 | PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHRDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK |
| IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/ T366S/L368A/Y40 7V | 20 | PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLPVQHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK |
| IgG1 CH2-CH3 IgG1 T307P/L309Q/Q31 1R/ T366S/L368A/Y40 7V | 21 | PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLPVQHRDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK |

[0279]

| | | |
|---------------------------------------|----|---|
| IgG1 CH2-CH3 野生型 | 22 | PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK |
| IgG1 CH2-CH3 K409R | 23 | PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK |
| IgG1 CH2-CH3 F405L | 24 | PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK |
| IgG1 CH2-CH3 T366S/L368A/Y40 7V | 25 | PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK |
| IgG1 CH2-CH3 T366W | 26 | PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK |
| IgG2 CH2-CH3 Q311R | 52 | PPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDEPQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVSVLTVVHRDWLNGKEYKCK VSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESN GQPENNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK |

| | | |
|---------------------------------------|----|--|
| IgG2 CH2-CH3 T307P/V309Q/Q31 1R | 53 | PPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVVS VLPVQHRDWLNGKEYKCKV SNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNG QPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K |
| 野生型 IgG2 CH2- CH3 | 54 | PPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVVS VLT VVHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESN GQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK |
| IgG2 CH2-CH3 F405L/K409R | 55 | PPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVVS VLT VVHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESN GQPENNYKTPPMLDSDGSFLLYSRLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK |
| IgG4 CH2-CH3 T307P/V309Q | 56 | PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVS VLT VLHQDWLNGKEYKC KVSNGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDK SRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS LGK |

[0280]

[0281] 突变可转移到IgG2和IgG4同种型,因为位置307、309和311在该同种型中是保守的,不同的是IgG2在位置309处具有缬氨酸。位置366、368和407在抗体同种型中也是保守的。F405L是保守的,然而IgG4在位置409处具有R。为了促进人IgG4抗体的Fab臂交换,一个亲本抗体将被工程化以具有F405L/R409K突变,并且另一个亲本抗体为野生型。

[0282] 在一些实施方案中,多特异性抗体结合至少两个抗原。

[0283] 在一些实施方案中,抗原为ABCF1、ACVR1、ACVR1B、ACVR2、ACVR2B、ACVRL1、ADORA2A、聚集蛋白聚糖、AGR2、AICDA、AIF1、AIG1、AKAP1、AKAP2、白蛋白、AMH、AMHR2、ANGPT1、ANGPT2、ANGPTL3、ANGPTL4、ANPEP、APC、APOC1、APOE、AR、AZGP1(锌- α -糖蛋白)、B7.1、B7.2、BAD、BAFF、BAG1、BAI1、BCL2、BCL6、BDNF、BLNK、BLR1(MDR15)、B1yS、BMP1、BMP2、BMP3B(GDF10)、BMP4、BMP6、BMP8、BMPR1A、BMPR1B、BMPR2、BPAG1(plectin)、BRCA1、BTLA、C19orf10(IL27w)、C3、C4A、C5、C5R1、CANT1、CASP1、CASP4、CAV1、CCBP2(D6/JAB61)、CCL1(1-

309)、CCL11(嗜酸细胞活化趋化因子)、CCL13(MCP-4)、CCL15(MIP-1d)、CCL16(HCC-4)、CCL17(TARC)、CCL18(PARC)、CCL19(MIP-3b)、CCL2(MCP-1)、MCAF、CCL20(MIP-3a)、CCL21(MIP-2)、SLC、exodus-2、CCL22(MDC/STC-1)、CCL23(MPIF-1)、CCL24(MPIF-2/嗜酸粒细胞趋化因子-2)、CCL25(TECK)、CCL26(嗜酸粒细胞趋化因子-3)、CCL27(CTACK/ILC)、CCL28、CCL3(MIP-1a)、CCL4(MIP-1b)、CCL5(RANTES)、CCL7(MCP-3)、CCL8(mcp-2)、CCNA1、CCNA2、CCND1、CCNE1、CCNE2、CCR1(CKR1/HM145)、CCR2(mcp-1RB/RA)、CCR3(CKR3/CMKBR3)、CCR4、CCR5(CMKBR5/ChemR13)、CCR6(CMKBR6/CKR-L3/STRL22/DRY6)、CCR7(CKR7/EBI1)、CCR8(CMKBR8/TER1/CKR-L1)、CCR9(GPR-9-6)、CCRL1(VSHK1)、CCRL2(L-CCR)、CD123、CD137、CD164、CD16a、CD16b、CD19、CD1C、CD20、CD200、CD-22、CD24、CD28、CD3、CD30、CD32a、CD32b、CD37、CD38、CD39、CD3E、CD3G、CD3Z、CD4、CD40、CD40L、CD44、CD45RB、CD47、CD52、CD69、CD72、CD73、CD74、CD79A、CD79B、CD8、CD80、CD81、CD83、CD86、CD89、CD96、CDH1(E-钙黏蛋白)、CDH10、CDH12、CDH13、CDH18、CDH19、CDH20、CDH5、CDH7、CDH8、CDH9、CDK2、CDK3、CDK4、CDK5、CDK6、CDK7、CDK9、CDKN1A(p21Wap1/Cip1)、CDKN1B(p27Kip1)、CDKN1C、CDKN2A(p16INK4a)、CDKN2B、CDKN2C、CDKN3、CEBPB、CER1、CHGA、CHGB、几丁质酶、CHST10、CKLFSF2、CKLFSF3、CKLFSF4、CKLFSF5、CKLFSF6、CKLFSF7、CKLFSF8、CLDN3、CLDN7(紧密连接蛋白7)、CLN3、CLU(丛生蛋白)、CMKLR1、CMKOR1(RDC1)、CNR1、COL18A1、COL1A1、COL4A3、COL6A1、CR2、CRP、CSF1(M-CSF)、CSF2(GM-CSF)、CSF3(GCSF)、CTLA4、CTNNB1(β -连环蛋白)、CTSB(组织蛋白酶B)、CX3CL1(SCYD1)、CX3CR1(V28)、CXCL1(GRO1)、CXCL10(IP-10)、CXCL11(I-TAC/IP-9)、CXCL12(SDF1)、CXCL13、CXCL14、CXCL16、CXCL2(GRO2)、CXCL3(GRO3)、CXCL5(ENA-78/LIX)、CXCL6(GCP-2)、CXCL9(MIG)、CXCR3(GPR9/CKR-L2)、CXCR4、CXCR6(TYMSTR/STRL33/Bonzo)、CYB5、CYC1、CYSLTR1、DAB2IP、DES、DKFZp451J0118、DNAM-1、DNCL1、DPP4、E2F1、ECGF1、EDG1、EFNA1、EFNA3、EFNB2、EGF、EGFR、ELAC2、ENG、ENO1、ENO2、ENO3、EPHB4、EPO、ERBB2(Her-2)、EREG、ERK8、ESR1、ESR2、F3(TF)、FADD、FasL、FASN、FCER1A、FCER2、FCGR3A、FGF、FGF1(aFGF)、FGF10、FGF11、FGF12、FGF12B、FGF13、FGF14、FGF16、FGF17、FGF18、FGF19、FGF2(bFGF)、FGF20、FGF21、FGF22、FGF23、FGF3(int-2)、FGF4(HST)、FGF5、FGF6(HST-2)、FGF7(KGF)、FGF8、FGF9、FGFR、FGFR3、FIGF(VEGFD)、FIL1(EPSILON)、FIL1(ZETA)、FLJ12584、FLJ25530、FLRT1(纤连蛋白)、FLT1、FOS、FOSL1(FRA-1)、FY(DARC)、GABRP(GABAa)、GAGEB1、GAGEC1、GALNAC4S-6ST、GATA3、GDF5、GFI1、GGT1、GITR、GITRL、GM-CSF、GNAS1、GNRH1、GPR2(CCR10)、GPR31、GPR44、GPR81(FKSG80)、GRCC10(C10)、GRP、GSN(凝溶胶蛋白)、GSTP1、HAVCR2、HDAC4、HDAC5、HDAC7A、HDAC9、HGF、HIF1A、HIP1、组胺和组胺受体、HLA、HLA-A、HLA-DRA、HM74、HMOX1、HUMCYT2A、HVEM、ICEBERG、ICOS、ICOSL、IDO、ID2、IFN-a、IFNA1、IFNA2、IFNA4、IFNA5、IFNA6、IFNA7、IFNB1、IFN γ 、IFNW1、IGBP1、IGF1、IGF1R、IGF2、IGFBP2、IGFBP3、IGFBP6、IL-1、IL10、IL10RA、IL10RB、IL11、IL11RA、IL-12、IL12A、IL12B、IL12RB1、IL12RB2、IL13、IL13RA1、IL13RA2、IL14、IL15、IL15RA、IL16、IL17、IL17B、IL17C、IL17R、IL18、IL18BP、IL18R1、IL18RAP、IL19、IL1A、IL1B、IL1F10、IL1F5、IL1F6、IL1F7、IL1F8、IL1F9、IL1HY1、IL1R1、IL1R2、IL1RAP、IL1RAPL1、IL1RAPL2、IL1RL1、IL1RL2、IL1RN、IL2、IL20、IL20RA、IL21R、IL22、IL22R、IL22RA2、IL23、IL24、IL25、IL26、IL27、IL28A、IL28B、IL29、IL2RA、IL2RB、IL2RG、IL3、IL30、IL3RA、IL4、IL4R、IL5、IL5RA、IL6、IL6R、IL6ST(糖蛋白130)、IL7、IL7R、IL8、IL8RA、IL8RB、IL8RB、IL9、IL9R、ILK、INHA、INHBA、INSL3、INSL4、胰岛素、胰岛素

受体、IRAK1、IRAK2、ITGA1、ITGA2、ITGA3、ITGA6 (α 6整合素)、ITGAV、ITGB3、ITGB4 (β 4整合素)、JAG1、JAK1、JAK3、JUN、K6HF、KAI1、KDR、KITLG、KIR、KLF5 (GC Box BP)、KLF6、KLK10、KLK12、KLK13、KLK14、KLK15、KLK3、KLK4、KLK5、KLK6、KLK9、KRT1、KRT19 (角蛋白19)、KRT2A、KRTHB6 (毛发特异性II型角蛋白)、LAG-3、LAMA5、LDL、LEP (瘦蛋白)、LFA、Lingo-p75、Lingo-Troy、LPS、LTA (TNF-b)、LTB、LTB4R (GPR16)、LTB4R2、LTBR、M[ACMARCKS、MAG或Omgp、MAP2K7 (c-Jun)、MDK、间皮素、MIB1、中期因子、MIF、MIP-2、MKI67 (Ki-67)、MMP2、MMP9、MS4A1、MSMB、MT3 (金属硫粘连蛋白-III)、MTSS1、MUC1 (粘蛋白)、MYC、MYD88、NCK2、神经黏蛋白、NFKB1、NFKB2、NGFB (NGF)、NGFR、NgR-Lingo、NgR-Nogo66 (勿动蛋白)、NgR-p75、NgR-Troy、NKG2D、NKp46、NME1 (NM23A)、NOX5、NPPB、NR0B1、NR0B2、NR1D1、NR1D2、NR1H2、NR1H3、NR1H4、NRII2、NRII3、NR2C1、NR2C2、NR2E1、NR2E3、NR2F1、NR2F2、NR2F6、NR3C1、NR3C2、NR4A1、NR4A2、NR4A3、NR5A1、NR5A2、NR6A1、NRP1、NRP2、NT5E、NTN4、ODZ1、OPRD1、OX-40、OX-40L、P2RX7、PAP、PART1、PATE、PAWR、PCA3、PCNA、PD-1、PDGFA、PDGFB、PECAM1、PF4 (CXCL4)、PGF、PGR、磷酸酶蛋白聚糖、PIAS2、PIK3CG、PLAU (uPA)、PLG、PLXDC1、PPBP (CXCL7)、PPID、PR1、PRKCQ、PRKD1、PRL、PROC、PROK2、PSAP、PSCA、PTAFR、PTEN、PTGS2 (COX-2)、PTN、RAC2 (p21Rac2)、RARB、RGS1、RGS13、RGS3、RNF110 (ZNF144)、ROBO2、ROR1、SI00A2、SCGB1D2 (亲脂性蛋白B)、SCGB2A1 (乳腺珠蛋白2)、SCGB2A2 (乳腺珠蛋白1)、SCYE1 (内皮单核细胞活化细胞因子)、SDF2、SERPINA1、SERPINA3、SERPINB5 (乳腺丝抑蛋白)、SERPINE1 (PAI-1)、SERPINF1、SHBG、SLA2、SLC2A2、SLC33A1、SLC43A1、SLIT2、SPP1、SPRR1B (Spr1)、ST6GAL1、STAB1、STAT6、STEAP、STEAP2、TB4R2、TBX21、TCP10、TDGF1、TEK、TF (转铁蛋白受体)、TGFA、TGFB1、TGFB111、TGFB2、TGFB3、TGFB1、TGFB1、TGFB2、TGFB3、TH1L、THBS1 (血小板反应蛋白1)、THBS2、THBS4、THPO、TIE (Tie-1)、TIGIT、TIM-3、TIMP3、组织因子、TLR10、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR, 8、TLR9、TNF、TNF-a、TNFAIP2 (B94)、TNFAIP3、TNFRSF11A、TNFRSF1A、TNFRSF1B、TNFRSF21、TNFRSF5、TNFRSF6 (Fas)、TNFRSF7、TNFRSF8、TNFRSF9、TNFSF10 (TRAIL)、TNFSF11 (TRANCE)、TNFSF12 (APO3L)、TNFSF13 (April)、TNFSF13B、TNFSF14 (HVEM-L)、TNFSF15 (VEGI)、TNFSF18、TNFSF4 (OX40配体)、TNFSF5 (CD40配体)、TNFSF6 (FasL)、TNFSF7 (CD27配体)、TNFSF8 (CD30配体)、TNFSF9 (4-1BB配体)、TOLLIP、Toll样受体、TOP2A (拓扑异构酶Iia)、TP53、TPM1、TPM2、TRADD、TRAF1、TRAF2、TRAF3、TRAF4、TRAF5、TRAF6、TREM1、TREM2、TRPC6、TSLP、TWEAK、VEGF、VEGFB、VEGFC、多功能蛋白聚糖、VHL C5、VISTA、VLA-4、XCL1 (淋巴细胞趋化因子)、XCL2 (SCM-1b)、XCR1 (GPR5/CCXCR1)、YY1、以及ZFPM2。

[0284] 在一些实施方案中,多特异性抗体结合CD3。

[0285] 在一些实施方案中,多特异性抗体结合CD3和肿瘤抗原。

[0286] 在一些实施方案中,多特异性抗体结合两个抗原,其中这两个抗原为下列中任两者:PD1、CD27、CD28、NKP46、ICOS、GITR、OX40、CTLA4、LAG3、TIM3、KIRa、CD73、CD39、IDO、BTLA、VISTA、TIGIT、CD96、CD30、HVEM、DNAM-1、LFA、肿瘤抗原、EGFR、cMet、FGFR、ROR1、CD123、IL1RAP、FGFR、间皮素、CD3、T细胞受体、CD32b、CD32a、CD16a、CD16b、NKG2D、NKP46、CD28、CD47、DLL、CD8、CD89、HLA、B细胞受体或CD137。

[0287] 工程化本发明的多特异性抗体

[0288] 可使本发明的多特异性抗体发生另外的Fc突变,以调节效应子功能和药代动力学特性。在传统免疫功能中,抗体-抗原复合物与免疫系统的细胞的相互作用产生多种反应,

范围从效应子功能例如抗体依赖的细胞毒性和噬菌作用,到免疫调节信号例如调节淋巴细胞增殖与抗体分泌。所有这些相互作用是通过抗体的Fc区或者免疫复合物与特异细胞表面受体结合而引起的。由抗体和免疫复合物触发的细胞应答的多样性是如下Fc受体的结构异质性造成的:Fc γ RI (CD64)、Fc γ RIIA (CD32A)和Fc γ RIII (CD16)是活化Fc γ 受体(即免疫系统增强),而Fc γ RIIB (CD32B)是抑制Fc γ 受体(即免疫系统抑制)。结合FcRn受体调节了抗体半衰期。

[0289] 在一些实施方案中,本发明的多特异性抗体还包含调节抗体与Fc γ R的结合的至少一个突变。

[0290] 在一些实施方案中,本发明的多特异性抗体还包含调节抗体与FcRn的结合的至少一个突变。

[0291] 延长多特异性抗体的半衰期的示例性突变为突变M428L/N434S、M252Y/S254T/T256E、T250Q/M428L、N434A和T307A/E380A/N434A。缩短多特异性抗体的半衰期的示例性突变为突变H435A、P257I/N434H、D376V/N434H、M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F、T308P/N434A和H435R。

[0292] 在一些实施方案中,本发明的多特异性抗体包含至少一个突变,该突变降低抗体与活化Fc γ 受体(Fc γ R)的结合并且/或者降低Fc效应子功能,诸如C1q结合、补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)或吞噬作用(ADCP)。

[0293] 降低本发明的多特异性抗体与活化Fc γ R的结合并且/或者最大程度减小抗体效应子功能的示例性突变为IgG1上的L234A/L235A、IgG2上的V234A、/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S、IgG4上的F234A/L235A、IgG4上的S228P/F234A/L235A、所有Ig同种型上的N297A、IgG2上的V234A/G237A、IgG1上的K214T/E233P/L234V/L235A/G236-缺失/A327G/P331A/D365E/L358M、IgG2上的H268Q/V309L/A330S/P331S、IgG1上的S267E/L328F、IgG1上的L234F/L235E/D265A、IgG1上的L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S、IgG4上的S228P/F234A/L235A/G237A/P238S、以及IgG4上的S228P/F234A/L235A/G236-缺失/G237A/P238S。

[0294] 增加本发明的多特异性抗体与活化Fc γ 的结合并且/或者增强抗体效应子功能的示例性突变为S239D/I332E、S298A/E333A/K334A、F243L/R292P/Y300L、F243L/R292P/Y300L/P396L、F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L和G236A/S239D/I332E、K326A/E333A、K326W/E333A、H268F/S324T、S267E/H268F、S267E/S324T和S267E/H268F/S324T。

[0295] 熟知的S228P可在IgG4抗体中发生,以增强IgG4稳定性。

[0296] “抗体依赖性细胞的细胞毒性”、“抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”或“ADCC”是诱导细胞死亡的机制,该机制依赖于抗体包被靶细胞与具有裂解活性的效应细胞(诸如自然杀伤细胞、单核细胞、巨噬细胞和中性粒细胞)经由效应细胞上表达的Fc γ 受体(Fc γ R)发生的相互作用。例如,NK细胞表达Fc γ RIIIa,而单核细胞表达Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIIIa。效应细胞通过分泌膜孔形成蛋白和蛋白酶而具有的活性会导致抗体包被靶细胞发生死亡。为评估本发明抗体的ADCC活性,可将抗体与免疫效应细胞联合加入到表达期望抗原的细胞中,该免疫效应细胞可被抗原抗体复合物激活,从而使靶细胞发生细胞裂解。根据从裂解的细胞中释放的标记物(例如放射性底物、荧光染料或天然胞内蛋白)来检测细胞裂解。用于此类测定法的示例性效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和NK细胞。示例性靶细

胞包括内源性或重组表达期望抗原的细胞。在示例性测定中,可以按1个靶细胞与50个效应细胞的比率使用靶细胞。将靶细胞用BATDA (PerkinElmer) 在37°C预标记20分钟,洗涤两次并重悬浮于DMEM、10%热灭活的FBS、2mM L-谷氨酰胺(均来自Invitrogen)中。合并靶细胞(1×10^4 个细胞)和效应细胞(0.5×10^6 个细胞),并且将100 μ L细胞加入96孔U形底部板的孔中。在具有或不具有测试抗体情况下添加另外100 μ l。将板以200g离心3分钟,在37°C温育2小时,随后再次以200g离心3分钟。从每个孔中取出总共20 μ l的上清液,然后加入200 μ l基于DELPHIA Europium的试剂(PerkinElmer)并测定细胞溶解。使数据针对使用0.67% Triton X-100 (Sigma Aldrich) 的最大细胞毒性和通过在不存在任何抗体的情况下来自靶细胞的BATDA自发释放测定的最小对照标准化。

[0297] “抗体依赖性细胞吞噬作用”(“ADCP”)是指通过吞噬细胞(诸如巨噬细胞或树突状细胞)的内化作用消除抗体包被的靶细胞的机制。ADCP可通过如下方式评估:使用单核细胞来源的巨噬细胞作为效应细胞,并使用表达期望抗原的Daudi细胞(ATCC[®]CCL-21[™])或者B细胞白血病或淋巴瘤或肿瘤细胞作为被工程化为表达GFP或其他标记分子的靶细胞。效应细胞:靶细胞比例可为例如4:1。可在含或不含本发明抗体的情况下,将效应细胞与靶细胞一起温育4小时。在温育后,可使用细胞消化液(accutase)分离细胞。可使用偶联至荧光标记的抗-CD11b抗体和抗-CD14抗体鉴定巨噬细胞,并且可使用标准方法基于CD11⁺CD14⁺巨噬细胞中的GFP荧光%确定吞噬百分比。

[0298] “补体依赖性细胞毒性”(CDC)是指诱导细胞死亡的机制,其中靶结合抗体的Fc效应域结合并激活补体成分C1q,C1q继而激活补体级联,从而导致靶细胞死亡。补体的激活也可导致补体成分沉积在靶细胞表面上,这些补体成分通过结合白细胞上的补体受体(例如,CR3)来促进ADCC。可例如通过如下方式测量CDC:将Daudi细胞以 1×10^5 个细胞/孔(50 μ L/孔)接种到RPMI-B(补充有1%BSA的RPMI)中,将50 μ L测试抗体以介于0-100 μ g/mL之间的最终浓度加入到孔中,将反应在室温下温育15分钟,将11 μ L的混合人血清加入到孔中,然后将反应在37°C下温育45分钟。可使用标准方法在FACS测定法中检测碘化丙啶染色细胞%作为裂解细胞百分比(%)。

[0299] 还可使本发明的多特异性抗体发生增强该抗体与Fc γ RIIb的结合的另外的突变。示例性的此类突变是突变S267E、S267D、S267E/I332E、S267E/L328F、G236D/S267E和E233D/G237D/H268D/P271G/A330R/P238D。

[0300] 一般来讲,可将增强与活化Fc γ R的结合并降低与抑制Fc γ RIIb的结合的突变工程化到抗体中,以用于增强受试者的免疫应答,诸如用于治疗癌症和感染。可将降低与活化Fc γ R的结合或增强与抑制Fc γ RIIb的结合的突变工程化到抗体中,以用于抑制受试者的免疫应答,诸如用于治疗炎性疾病或自身免疫疾病。也可将增强与抑制Fc γ RIIb的结合的突变引入到与TNFR超家族成员结合的拮抗性抗体中以增强其拮抗活性。

[0301] 本发明的多特异性抗体诱导ADCC的能力可通过工程化其低聚糖组分来增强。人IgG1在Asn297处被熟知的双分枝G0、G0F、G1、G1F、G2或G2F形式的大多数聚糖N-糖基化。未工程化的CHO细胞所产生的抗体通常具有约至少85%的聚糖岩藻糖含量。从连接到Fc区的双分枝复合物型低聚糖去除核心岩藻糖,可经由改善的Fc γ RIIIa结合来增强抗体的ADCC,而不会改变抗原结合或CDC活性。此类mAb可使用不同方法来实现,据报道这些方法导致携带双分枝复合物型Fc低聚糖的相对高去岩藻糖基化抗体的成功表达,诸如控制培养物渗透

度、施加变体CHO细胞系Lec13作为宿主细胞系、施加变体CHO细胞系EB66作为宿主细胞系、施加小鼠杂交瘤细胞系YB2/0作为宿主细胞系、引入特异性地针对 α 1,6-岩藻糖基转移酶(FUT8)基因的小干扰RNA、或者 β -1,4-N-乙酰葡萄糖胺基转移酶III和高尔基体 α -甘露糖苷酶II或强效 α -甘露糖苷酶I抑制剂kifunensine的共表达。

[0302] 在一些实施方案中,本发明的多特异性抗体具有岩藻糖含量为约0%至约15%(例如15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或0%)的双分枝聚糖结构。

[0303] 在一些实施方案中,本发明的多特异性抗体具有岩藻糖含量为约50%、40%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或0%的双分枝聚糖结构。

[0304] “岩藻糖含量”意指Asn297处糖链内的岩藻糖单糖的量。岩藻糖的相对量为含岩藻糖的结构相对于所有糖结构的百分比。这些可通过多种方法进行表征和定量,例如:1)使用经N-糖苷酶F处理的样本(例如,复合结构、混合结构及低聚甘露糖结构和高聚甘露糖结构)的MALDI-TOF;2)通过酶促释放Asn297聚糖,随后衍生化并通过具有荧光检测的HPLC(UPLC)和/或HPLC-MS(UPLC-MS)进行检测/定量;3)在用或不用Endo S或其它酶处理Asn297聚糖的情况下,对天然或还原后的mAb进行完整蛋白分析,所述其它酶在第一GlcNAc单糖和第二GlcNAc单糖之间进行裂解,留下连接至第一GlcNAc的岩藻糖;4)通过酶消化(例如,胰蛋白酶或肽链内切酶Lys-C)将mAb消化为成分肽,随后通过HPLC-MS(UPLC-MS)进行分离、检测和定量;或5)用PNGase F在Asn 297处进行特异性酶促去糖基化,从而将mAb低聚糖与mAb蛋白分离。可通过各种互补技术对释放的低聚糖进行荧光团标记、分离并鉴定,这些技术允许:采用基质辅助激光解吸电离(MALDI)质谱法,通过比较实验质量与理论质量来对聚糖结构进行精细表征;通过离子交换HPLC(GlycoSep C)确定唾液酸化程度;通过正相HPLC(GlycoSep N),根据亲水性标准分离和定量低聚糖形式;以及通过高效毛细管电泳激光诱导荧光(HPCE-LIF)分离和定量低聚糖。

[0305] “低岩藻糖”或“低岩藻糖含量”是指抗体的岩藻糖含量为约0%至15%。

[0306] “正常岩藻糖”或“正常岩藻糖含量”是指抗体的岩藻糖含量大约高于50%,通常大约高于60%、70%、80%或高于85%。

[0307] 本发明的多特异性抗体可通过诸如糖基化、异构化、去糖基化或非天然存在的共价修饰(例如添加聚乙二醇部分(聚乙二醇化)和脂质化)等过程进行翻译后修饰。此类修饰可在体内或体外进行。例如,本文所述的本发明的抗体可缀合至聚乙二醇(聚乙二醇化的)以改善其药代动力学特性。缀合可通过本领域技术人员已知的技术来实施。已经证实治疗性抗体与PEG的共轭增强药效学而不干扰功能。

[0308] 可经修饰以改善稳定性、选择性、交叉反应性、亲和力、免疫原性或其他所需生物学或生物物理学特性的本发明的多特异性抗体在本发明的范围之内。抗体的稳定性受许多因素影响,包括(1)影响其内在稳定性的单独域的核心堆叠,(2)对HC和LC配对具有影响的蛋白质/蛋白质界面相互作用,(3)极性和带电残基的包埋,(4)极性和带电残基的H键网络;以及(5)其他分子内力和分子间力中的表面电荷和极性残基分布(Worn和Pluckthun,2001年)潜在的结构不稳定残基可根据该抗体的晶体结构或在某些情况下通过分子建模来鉴定,并且所述残基对于抗体稳定性的影响可通过生成并评估在所鉴定残基中携带突变的变

体来测试。一种增加抗体稳定性的方法是升高由差示扫描量热法 (DSC) 测量的热转变中间点 (T_m)。一般来讲,蛋白质的 T_m 与其稳定性相关联并且与其对溶液中的解折叠和变性以及依赖于该蛋白质解折叠倾向的降解过程的易感性成反向相关。制剂研究提示,Fab T_m 对相应 mAb 的长期物理稳定性有影响。

[0309] 可通过在血流中内源性循环羧肽酶从注射的抗体中移除C-末端赖氨酸(CTL)。在制备期间,可通过控制细胞外 Zn^{2+} 、EDTA或EDTA- Fe^{3+} 的浓度,将CTL移除控制到小于最大水平,如美国专利公开US20140273092中有所描述。抗体中的CTL含量可使用已知方法测定。

[0310] 在一些实施方案中,本发明的多特异性抗体具有约10%至约90%、约20%至约80%、约40%至约70%、约55%至约70%、或约60%的C-末端赖氨酸含量。

[0311] 在一些实施方案中,本发明的多特异性抗体具有约0%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%的C-末端赖氨酸含量。

[0312] 本发明还提供了一种分离的抗体,该分离的抗体包含具有相同氨基酸序列的两条重链以及两条轻链,其中两条相同的重链包含突变Q311R、Q311K、T307P/L309Q、T307P/V309Q、T307P/L309Q/Q311R或T307P/V309Q/Q311R,其中残基根据EU索引进行编号。

[0313] 本发明还提供了一种分离的抗体,该分离的抗体包含具有相同氨基酸序列的两条重链以及两条轻链,其中两条相同的重链包含突变Q311R,其中残基根据EU索引进行编号。

[0314] 本发明还提供了一种分离的抗体,该分离的抗体包含具有相同氨基酸序列的两条重链以及两条轻链,其中两条相同的重链包含突变Q311K,其中残基根据EU索引进行编号。

[0315] 本发明还提供了一种分离的抗体,该分离的抗体包含具有相同氨基酸序列的两条重链以及两条轻链,其中两条相同的重链包含突变T307P/L309Q,其中残基根据EU索引进行编号。

[0316] 本发明还提供了一种分离的抗体,该分离的抗体包含具有相同氨基酸序列的两条重链以及两条轻链,其中两条相同的重链包含突变T307P/V309Q,其中残基根据EU索引进行编号。

[0317] 本发明还提供了一种分离的抗体,该分离的抗体包含具有相同氨基酸序列的两条重链以及两条轻链,其中两条相同的重链包含突变T307P/L309Q/Q311R,其中残基根据EU索引进行编号。

[0318] 本发明还提供了一种分离的抗体,该分离的抗体包含具有相同氨基酸序列的两条重链以及两条轻链,其中两条相同的重链包含突变T307P/V309Q/Q311R,其中残基根据EU索引进行编号。

[0319] 该分离的抗体可用作生成本发明的多特异性抗体的亲本抗体。

[0320] 在一些实施方案中,该分离的抗体还包含突变F405L、K409R、F405L/R409K、T366W或T366S/L368A/Y407V。

[0321] 在一些实施方案中,该分离的抗体为IgG1、IgG2或IgG4同种型。

[0322] 生成本发明抗体的方法

[0323] 在与亲本多特异性抗体相比时氨基酸序列有改变的本发明的工程化多特异性抗体可使用标准克隆和表达技术生成。例如,可进行定点诱变或PCR介导的诱变以引入突变,并可使用公知的方法和实施例中本文所述的方法评估对抗体结合或其它感兴趣的特性的影响。

[0324] 抗体同种异型

[0325] 治疗性抗体的免疫原性与增大的输液反应风险和减小的治疗反应持续时间相关联 (Baert 等人, (2003) N Engl J Med 348:602-08)。治疗性抗体在宿主中诱导免疫应答的程度可部分通过抗体的同种异型来测定 (Stickler 等人, (2011) Genes and Immunity 12: 213-21)。抗体同种异型与抗体的恒定区序列中特定位置的氨基酸序列变异相关。

[0326] 表4示出选择的IgG1、IgG2和IgG4同种异型。

[0327] 在一些实施方案中,本发明的多特异性抗体为G2m(n)、G2m(n-)、G2m(n)/(n-)、nG4m(a)、G1m(17)或G1m(17,1)同种异型。

[0328] 表4.

| 同种异型 | 不同位置处的氨基酸残基 (残基编号: EU 索引) | | | | | | | |
|-------------|---------------------------|-----|------|-----|------|-----|-----|-----|
| | IgG2 | | IgG4 | | IgG1 | | | |
| | 189 | 282 | 309 | 422 | 214 | 356 | 358 | 431 |
| G2m(n) | T | M | | | | | | |
| G2m(n-) | P | V | | | | | | |
| G2m(n)/(n-) | T | V | | | | | | |
| nG4m(a) | | | L | R | | | | |
| G1m(17) | | | | | K | E | M | A |
| G1m(17,1) | | | | | K | D | L | A |

[0329] 表4.

[0330] 本发明的多特异性抗体的生成和分离

[0331] 本发明的多特异性抗体可使用标准分子生物学技术生成并促进亲本抗体的Fab臂交换。本发明的多特异性抗体可使用蛋白A配体亲和色谱法来纯化。

[0332] 本发明还提供了一种制备分离的多特异性抗体的方法,该分离的多特异性抗体包含第一重链或其片段以及第二重链或其片段,该第一重链或其片段包含突变Q311R、Q311K、T307P/L309Q、T307P/V309Q、T307P/L309Q/Q311R或T307P/V309Q/Q311R并且该第二重链或其片段在位置307、309和311处包含野生型氨基酸残基,该方法包括:

[0333] 提供包含第一重链或其片段和第一轻链的第一亲本抗体,该第一重链或其片段包含突变Q311R、Q311K、T307P/L309Q、T307P/V309Q、T307P/L309Q/Q311R或T307P/V309Q/Q311R;

[0334] 提供包含第二重链或其片段和第二轻链的第二亲本抗体,该第二重链或其片段在位置307、309和311处包含野生型氨基酸残基;

[0335] 使第一亲本抗体和第二亲本抗体在样品中接触;

[0336] 温育该样品;以及

[0337] 使用蛋白A配体亲和色谱纯化多特异性抗体。

[0338] 本发明还提供了一种制备分离的多特异性抗体的方法,该分离的多特异性抗体包含第一重链或其片段以及第二重链或其片段,该第一重链或其片段包含突变T307P/L309Q并且该第二重链或其片段在位置307和309处包含野生型氨基酸残基,该方法包括:

[0339] 提供包含第一重链或其片段和第一轻链的第一亲本抗体,该第一重链或其片段包含突变T307P/L309Q;

[0340] 提供包含第二重链或其片段和第二轻链的第二亲本抗体,该第二重链或其片段在位置307和309处包含野生型氨基酸残基;

- [0341] 使第一亲本抗体和第二亲本抗体在样品中接触；
- [0342] 温育该样品；以及
- [0343] 使用蛋白A配体亲和色谱纯化多特异性抗体。
- [0344] 本发明还提供了一种制备分离的多特异性抗体的方法，该分离的多特异性抗体包含第一重链或其片段以及第二重链或其片段，该第一重链或其片段包含突变T307P/V309Q并且该第二重链或其片段在位置307和309处包含野生型氨基酸残基，该方法包括：
- [0345] 提供包含第一重链或其片段和第一轻链的第一亲本抗体，该第一重链或其片段包含突变T307P/V309Q；
- [0346] 提供包含第二重链或其片段和第二轻链的第二亲本抗体，该第二重链或其片段在位置307和309处包含野生型氨基酸残基；
- [0347] 使第一亲本抗体和第二亲本抗体在样品中接触；
- [0348] 温育该样品；以及
- [0349] 使用蛋白A配体亲和色谱纯化多特异性抗体。
- [0350] 本发明还提供了一种制备分离的多特异性抗体的方法，该分离的多特异性抗体包含第一重链或其片段以及第二重链或其片段，该第一重链或其片段包含突变T307P/L309Q/Q311R并且该第二重链或其片段在位置307、309和311处包含野生型氨基酸残基，该方法包括：
- [0351] 提供包含第一重链或其片段和第一轻链的第一亲本抗体，该第一重链或其片段包含突变T307P/L309Q/Q311R；
- [0352] 提供包含第二重链或其片段和第二轻链的第二亲本抗体，该第二重链或其片段在位置307、309和311处包含野生型氨基酸残基；
- [0353] 使第一亲本抗体和第二亲本抗体在样品中接触；
- [0354] 温育该样品；以及
- [0355] 使用蛋白A配体亲和色谱纯化多特异性抗体。
- [0356] 本发明还提供了一种制备分离的多特异性抗体的方法，该分离的多特异性抗体包含第一重链或其片段以及第二重链或其片段，该第一重链或其片段包含突变T307P/V309Q/Q311R并且该第二重链或其片段在位置307、309和311处包含野生型氨基酸残基，该方法包括：
- [0357] 提供包含第一重链或其片段和第一轻链的第一亲本抗体，该第一重链或其片段包含突变T307P/V309Q/Q311R；
- [0358] 提供包含第二重链或其片段和第二轻链的第二亲本抗体，该第二重链或其片段在位置307、309和311处包含野生型氨基酸残基；
- [0359] 使第一亲本抗体和第二亲本抗体在样品中接触；
- [0360] 温育该样品；以及
- [0361] 使用蛋白A配体亲和色谱纯化多特异性抗体。
- [0362] 多特异性抗体的VH区和VL区可来源于对期望抗原具有特异性的抗体的现有VH/VL区，或来源于从头生成的亲本抗体的VH/VL结构域。
- [0363] 可使用各种技术从头生成亲本抗体。例如，可使用Kohler和Milstein, Nature, 第256卷, 第495页, 1975年所述的杂交瘤方法来生成亲本抗体。在杂交瘤方法中, 用抗原来免

疫小鼠或其他宿主动物(诸如仓鼠、大鼠或猴),之后使用标准方法将来自免疫动物的脾细胞与骨髓瘤细胞融合以形成杂交瘤细胞(Goding,“Monoclonal Antibodies:Principles and Practice”,第59-103页(Academic Press,1986年))。筛选出由单个永生化杂交瘤细胞产生的菌落,用以制备具有所需特性(诸如结合特异性、交叉反应性或缺乏结合特异性、缺乏交叉反应性,以及抗原的亲合力)的抗体。

[0364] 可使用基因组中携带人免疫球蛋白(Ig)基因座的转基因小鼠来生成抗期望抗原的亲本抗体,这在例如国际专利公布W090/04036;美国专利6150584;国际专利公布W099/45962;国际专利公布W002/066630;国际专利公布W002/43478;Lonberg等人,Nature,第368卷,第856-859页,1994年;Green等人,Nature Genet,第7卷,第13-21页,1994年;Green&Jakobovits,Exp.Med.第188卷,第483-495页,1998年;Lonberg和Huszar,Int Rev Immunol,第13卷,第65-93页,1995年;Bruggemann等人,Eur J Immunol,第21卷,第1323-1326页,1991年;Fishwild等人,Nat Biotechnol,第14卷,第845-851页,1996年;Mendez等人,NatGenet,第15卷,第146-156页,1997年;Green,J Immunol Methods,第231卷,第11-23页,1999年;Yang等人,Cancer Res,第59卷,第1236-1243页,1999年;Bruggemann和Taussig,Curr Opin Biotechnol.,第8卷,第455-458页,1997年;国际专利公布W002/043478中有所描述。可破坏此类鼠中的内源性免疫球蛋白基因座或使该基因座缺失,并且可使用转染色体或微小基因,通过同源或非同源重组将至少一种完整或部分的人免疫球蛋白基因座插入小鼠基因组中。可邀请诸如Regeneron(http://_www_regeneron_com)、Harbour Antibodies(http://_www_harbourantibodies_com)、Open Monoclonal Technology,Inc.(OMT)(http://_www_omtinc_net)、KyMab(http://_www_kymab_com)、Trianni(http://_www.trianni_com)和Ablexis(http://_www_ablexis_com)等公司使用上述技术以提供抗所选抗原的人抗体。

[0365] 亲本抗体也可选自噬菌体展示文库,其中噬菌体被工程化以表达人免疫球蛋白或其部分,诸如Fab、单链抗体(scFv)或者未配对或对抗体可变区。可例如用噬菌体pIX外壳蛋白从将抗体重链和轻链可变区表达为融合蛋白的噬菌体展示文库中分离出亲本抗体,如Shi等人,J Mol Biol,第397卷,第385-396页,2010年和国际专利公布W009/085462中所述。可从文库中筛选结合到期望抗原的噬菌体,并可进一步表征所获得的阳性克隆,从克隆裂解物中分离Fab,并将其表达为全长IgG。用于分离人抗体的此类噬菌体展示方法描述于例如:美国专利5,223,409;5,403,484;5,571,698;5,427,908;5,580,717;5,969,108;6,172,197;5,885,793;6,521,404;6,544,731;6,555,313;6,582,915和6,593,081。

[0366] 可使用标准克隆方法将分离的VH/VL区克隆为任何Ig同种型或抗体恒定结构域的一部分,诸如CH2-CH3区。可使用标准方法将Fc突变引入亲本抗体中。

[0367] 在一些实施方案中,第一亲本抗体和第二亲本抗体作为纯化抗体提供。

[0368] 在一些实施方案中,在从表达第一亲本抗体和第二亲本抗体的细胞收集的细胞培养基中提供第一亲本抗体和第二亲本抗体。

[0369] 在一些实施方案中,第一亲本抗体和第二亲本抗体在细胞中共表达。

[0370] 本文已证明,当亲本抗体在粗制提取物中作为未纯化抗体提供时,生成本发明的多特异性抗体。能够从粗制提取物中纯化多特异性抗体降低了下游加工的成本,因为仅需要一个纯化步骤。

- [0371] 一旦亲本抗体接触在一起,就进行温育步骤。
- [0372] 在一些实施方案中,温育在约20°C至约37°C的温度下进行。
- [0373] 在一些实施方案中,温育在约25°C至约37°C的温度下进行。
- [0374] 在一些实施方案中,温育在约25°C至约37°C的温度下进行约九十分钟至约六小时。
- [0375] 在一些实施方案中,在温育步骤期间加入还原剂。
- [0376] 在一些实施方案中,还原剂为2-巯基乙胺(2-MEA)。
- [0377] 在一些实施方案中,还原剂为二硫苏糖醇(DTT)。
- [0378] 在一些实施方案中,还原剂为二硫赤藓糖醇(DTE)。
- [0379] 在一些实施方案中,还原剂为谷胱甘肽。
- [0380] 在一些实施方案中,还原剂为三(2-羧乙基)膦(TCEP)。
- [0381] 在一些实施方案中,还原剂为L-半胱氨酸。
- [0382] 在一些实施方案中,还原剂为 β -巯基乙醇。
- [0383] 在一些实施方案中,还原剂以约10mM至约100mM的浓度存在。
- [0384] 在一些实施方案中,2-MEA以约10mM至约100mM的浓度存在。
- [0385] 在一些实施方案中,2-MEA以约25mM至约75mM的浓度存在。
- [0386] 例如,可使用如下条件:在至少25mM 2-MEA的存在下或至少0.5mM二硫苏糖醇的存在下,在5-8的pH例如pH7.0或pH7.4,至少20°C的温度下,温育至少90分钟。
- [0387] 在一些实施方案中,蛋白A配体色谱法采用pH梯度。
- [0388] 在一些实施方案中,pH梯度为约pH 7.0至约pH 3.0。
- [0389] 在一些实施方案中,pH梯度为约pH 4.6至约pH 3.4。
- [0390] 在一些实施方案中,多聚体抗体在约pH 4.4至约pH 4.1之间洗脱。
- [0391] 在一些实施方案中,pH梯度为pH 4.6、pH 4.1和pH 3.4的步骤梯度。
- [0392] 在一些实施方案中,蛋白A配体色谱法采用柠檬酸盐缓冲液。
- [0393] 在一些实施方案中,蛋白A配体色谱法采用50mM柠檬酸盐缓冲液。
- [0394] 在一些实施方案中,蛋白A配体色谱法采用乙酸盐缓冲液。
- [0395] 在一些实施方案中,蛋白A配体色谱法采用40mM乙酸盐缓冲液。
- [0396] 蛋白A色谱法可使用mAbSelect Sure柱(GE Healthcare)或以批处理模式进行。根据制造商的柱说明书,将培养上层清液在不进行附加加工的情况下直接装载到柱上。使用包含50mM柠檬酸盐的缓冲液在pH 4.7、pH 4.2或pH 3.4的pH步骤梯度下洗脱抗体。收集洗脱级分,并且在分析前将其浓缩至>1mg/mL。可使用疏水作用色谱(HIC)评估分离的多聚体抗体的纯度。
- [0397] 物质组合物:本发明的多聚体蛋白
- [0398] 本文所识别的突变可用于将任何多聚体蛋白与其亲本蛋白分离,只要该多聚体蛋白具有至少两条多肽链,每条多肽链均具有CH2-CH3区,该CH2-CH3区具有非对称的Q311R、Q311K、T307P/L309Q、T307P/V309Q、T307P/L309Q/Q311R或T307P/V309Q/Q311R突变。
- [0399] 本发明还提供了一种包含第一多肽和第二多肽的多聚体蛋白,其中该第一多肽包含第一CH2-CH3区,该第一CH2-CH3区包含突变Q311R、Q311K、T307P/L309Q、T307P/V309Q、T307P/L309Q/Q311R或T307P/V309Q/Q311R,并且该第二多肽包含第二CH2-CH3区,该第二

CH2-CH3区在位置307、309和311处包含野生型氨基酸残基,其中残基根据EU索引进行编号。

[0400] 本发明还提供了一种包含第一多肽和第二多肽的多聚体蛋白,其中该第一多肽包含第一CH2-CH3区,该第一CH2-CH3区包含突变Q311R,并且该第二多肽包含第二CH2-CH3区,该第二CH2-CH3区在位置311处包含野生型氨基酸残基,其中残基根据EU索引进行编号。

[0401] 本发明还提供了一种包含第一多肽和第二多肽的多聚体蛋白,其中该第一多肽包含第一CH2-CH3区,该第一CH2-CH3区包含突变Q311K,并且该第二多肽包含第二CH2-CH3区,该第二CH2-CH3区在位置311处包含野生型氨基酸残基,其中残基根据EU索引进行编号。

[0402] 本发明还提供了一种包含第一多肽和第二多肽的多聚体蛋白,其中该第一多肽包含第一CH2-CH3区,该第一CH2-CH3区包含突变T307P/L309Q,并且该第二多肽包含第二CH2-CH3区,该第二CH2-CH3区在位置307和309处包含野生型氨基酸残基,其中残基根据EU索引进行编号。

[0403] 本发明还提供了一种包含第一多肽和第二多肽的多聚体蛋白,其中该第一多肽包含第一CH2-CH3区,该第一CH2-CH3区包含突变T307P/V309Q,并且该第二多肽包含第二CH2-CH3区,该第二CH2-CH3区在位置307和309处包含野生型氨基酸残基,其中残基根据EU索引进行编号。

[0404] 本发明还提供了一种包含第一多肽和第二多肽的多聚体蛋白,其中该第一多肽包含第一CH2-CH3区,该第一CH2-CH3区包含突变T307P/L309Q/Q311R,并且该第二多肽包含第二CH2-CH3区,该第二CH2-CH3区在位置307、309和311处包含野生型氨基酸残基,其中残基根据EU索引进行编号。

[0405] 本发明还提供了一种包含第一多肽和第二多肽的多聚体蛋白,其中该第一多肽包含第一CH2-CH3区,该第一CH2-CH3区包含突变T307P/V309Q/Q311R,并且该第二多肽包含第二CH2-CH3区,该第二CH2-CH3区在位置307、309和311处包含野生型氨基酸残基,其中残基根据EU索引进行编号。

[0406] 在一些实施方案中,第一CH2-CH3区和第二CH2-CH3区为IgG1同种型。

[0407] 在一些实施方案中,第一CH2-CH3区和第二CH2-CH3区为IgG2同种型。

[0408] 在一些实施方案中,第一CH2-CH3区和第二CH2-CH3区为IgG4同种型。

[0409] 在一些实施方案中,当与第二CH2-CH3区相比时,第一CH2-CH3区与蛋白质A配体的结合降低。

[0410] 在一些实施方案中,蛋白A配体包含葡萄球菌蛋白A。

[0411] 在一些实施方案中,蛋白A配体包含Z结构域。

[0412] 在一些实施方案中,蛋白A配体包含Y结构域。

[0413] 在一些实施方案中,Z结构域包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

[0414] 在一些实施方案中,蛋白A配体包含SEQ ID NO:99、100或101的氨基酸序列。

[0415] 在一些实施方案中,多聚体蛋白还包含在第一CH2-CH3区和在第二CH2-CH3区中的非对称稳定突变。

[0416] 在一些实施方案中,在第一CH2-CH3区和在第二CH2-CH3区中或者在第二CH2-CH3区和第一CH2-CH3区中的非对称稳定突变

[0417] 分别为F405L和K409R;

[0418] 分别为野生型和F405L/R409K;

- [0419] 分别为T366W和T366S/L368A/Y407V;
- [0420] 分别为T366Y/F405A和T394W/Y407T;
- [0421] 分别为T366W/F405W和T394S/Y407A;
- [0422] 分别为F405W/Y407A和T366W/T394S;
- [0423] 分别为L351Y/F405A/Y407V和T394W;
- [0424] 分别为T366I/K392M/T394W和F405A/Y407V;
- [0425] 分别为T366L/K392M/T394W和F405A/Y407V;
- [0426] 分别为L351Y/Y407A和T366A/K409F;
- [0427] 分别为L351Y/Y407A和T366V/K409F;
- [0428] 分别为Y407A和T366A/K409F;
- [0429] 分别为D399K/E356K和K409D/K392D;或
- [0430] 分别为D399K/E356K/E357K和K409D/K392D/K370。
- [0431] 在一些实施方案中,第一CH2-CH3区和第二CH2-CH3区包含以下氨基酸序列:
- [0432] 分别为SEQ ID NO:2和22;
- [0433] 分别为SEQ ID NO:3和22;
- [0434] 分别为SEQ ID NO:4和22;
- [0435] 分别为SEQ ID NO:5和22;
- [0436] 分别为SEQ ID NO:6和23;
- [0437] 分别为SEQ ID NO:7和23;
- [0438] 分别为SEQ ID NO:8和23;
- [0439] 分别为SEQ ID NO:9和23;
- [0440] 分别为SEQ ID NO:10和24;
- [0441] 分别为SEQ ID NO:11和24;
- [0442] 分别为SEQ ID NO:12和24;
- [0443] 分别为SEQ ID NO:13和24;
- [0444] 分别为SEQ ID NO:14和25;
- [0445] 分别为SEQ ID NO:15和25;
- [0446] 分别为SEQ ID NO:16和25;
- [0447] 分别为SEQ ID NO:17和25;
- [0448] 分别为SEQ ID NO:18和26;
- [0449] 分别为SEQ ID NO:19和26;
- [0450] 分别为SEQ ID NO:20和26;
- [0451] 分别为SEQ ID NO:21和26;
- [0452] 分别为SEQ ID NO:52和54;
- [0453] 分别为SEQ ID NO:52和55;
- [0454] 分别为SEQ ID NO:53和54;
- [0455] 分别为SEQ ID NO:53和55;
- [0456] 分别为SEQ ID NO:56和54;或
- [0457] 分别为SEQ ID NO:56和55。

- [0458] 在一些实施方案中,第一CH2-CH3区和/或第二CH2-CH3区与异源蛋白偶联。
- [0459] 在一些实施方案中,异源蛋白为肽。
- [0460] 在一些实施方案中,异源蛋白为受体的胞外结构域。
- [0461] 在一些实施方案中,异源蛋白为配体的胞外结构域。
- [0462] 在一些实施方案中,异源蛋白为分泌蛋白。
- [0463] 在一些实施方案中,异源蛋白为scFv。
- [0464] 在一些实施方案中,异源蛋白为重链可变区(VH)。
- [0465] 在一些实施方案中,异源蛋白为轻链可变区(VL)。
- [0466] 在一些实施方案中,异源蛋白为III型纤连蛋白结构域。
- [0467] 在一些实施方案中,异源蛋白为fynomer。
- [0468] 在一些实施方案中,异源蛋白任选地通过接头偶联到第一CH2-CH3区和/或第二CH2-CH3区的N端。
- [0469] 在一些实施方案中,异源蛋白任选地通过接头偶联到第一CH2-CH3区和/或第二CH2-CH3区的C端。
- [0470] 在一些实施方案中,接头包含SEQ ID NO:57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、92、93、94、95、96、97或98的氨基酸序列。
- [0471] 在一些实施方案中,多聚体蛋白为抗体。
- [0472] 在一些实施方案中,抗体为多特异性的。
- [0473] 在一些实施方案中,抗体为双特异性的。
- [0474] 在一些实施方案中,抗体为单特异性的。
- [0475] 在一些实施方案中,多聚体蛋白包含两条多肽链。
- [0476] 在一些实施方案中,多聚体蛋白包含三条多肽链。
- [0477] 在一些实施方案中,多聚体蛋白包含四条多肽链。
- [0478] 本发明所涵盖的示例性多聚体蛋白形式示于表5中。在这些形式中,肽(P)可以是受体的胞外结构域、配体的胞外结构域、分泌蛋白、scFv、Fab、重链可变区(VH)、轻链可变区(VL)、III型纤连蛋白结构域或fynomer。在这些格式中,接头(L)可任选地不存在。示例性接头示于表6中。表中的星号(*)指示两个CH2-CH3结构域携带如本文已描述的非对称突变。
- [0479] 本发明的多聚体蛋白可使用标准方法进行进一步修饰,如本文针对多特异性抗体所述。本发明的多聚体蛋白可使用标准克隆方法制备。
- [0480] 表5.

| | | |
|--------|-------|---|
| | 形式 | 多肽链 |
| | 形式 1 | (P-L) _n -CH2-CH3 (P-L) _n -CH2-CH3* |
| | 形式 2 | CH2-CH3-(L-P) _n CH2-CH3*-(L-P) _n |
| | 形式 3 | (P-L) _n -CH2-CH3-(L-P) _n (P-L) _n -CH2-CH3*-(L-P) _n |
| | 形式 4 | VH1-CH1-铰链-CH2-CH3 VH2-CH1-铰链-CH2-CH3* VL1 VL2 |
| | 形式 5 | VH1-L-VH2-L-CH2-CH3 VH1-L-VH2-L-CH2-CH3* VL1 VL2 |
| [0481] | 形式 6 | VH1-CH1-铰链-CH2-CH3 VH2-CH1-铰链-CH2-CH3* VL1 |
| | 形式 7 | VH1-L-VH2-L-CH2-CH3 VH1-L-VH2-L-CH2-CH3* VL1 |
| | 形式 8 | VH1-L-VL2-L-CH2-CH3 VL1-L-VH2-L-CH2-CH3* |
| | 形式 9 | VH1-L-VL2-L-CH2-CH3 VL1-L-VH2 L-CH2-CH3* |
| | 形式 10 | (P-L) _n -VH1-CH1-铰链-CH2-CH3-(L-P) _n (P-L) _n -VH2-CH1-铰链-CH2-CH3*-(L-P) _n VL1 VL2 |
| | | n=1-5 |

[0482] 表6.

| 接头名称 | 接头氨基酸序列 | SEQ ID NO: |
|-------------------------|--|------------|
| 1FU1 | ASLDTTAENQAKNEHLQKENERLLRDWND VQGRFEKGS | 57 |
| 1DC1(13AA) ₂ | ASEKNKRSTPYIERAEKNKRSTPYIERAGS | 58 |
| 1DC1(13AA) ₃ | ASEKNKRSTPYIERAEKNKRSTPYIERAEKN KRSTPYIERAGS | 59 |
| AS(AP) ₁₀ GS | ASAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPGS | 60 |
| AS(AP) ₂₀ GS | ASAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAP APAPAPAPAPGS | 61 |

[0483]

- [0495] 在一些实施方案中,载体包含SEQ ID NO:29和47的多核苷酸。
- [0496] 在一些实施方案中,载体包含SEQ ID NO:30和47的多核苷酸。
- [0497] 在一些实施方案中,载体包含SEQ ID NO:31和48的多核苷酸。
- [0498] 在一些实施方案中,载体包含SEQ ID NO:32和48的多核苷酸。
- [0499] 在一些实施方案中,载体包含SEQ ID NO:33和48的多核苷酸。
- [0500] 在一些实施方案中,载体包含SEQ ID NO:34和48的多核苷酸。
- [0501] 在一些实施方案中,载体包含SEQ ID NO:35和49的多核苷酸。
- [0502] 在一些实施方案中,载体包含SEQ ID NO:36和49的多核苷酸。
- [0503] 在一些实施方案中,载体包含SEQ ID NO:37和49的多核苷酸。
- [0504] 在一些实施方案中,载体包含SEQ ID NO:38和49的多核苷酸。
- [0505] 在一些实施方案中,载体包含SEQ ID NO:39和50的多核苷酸。
- [0506] 在一些实施方案中,载体包含SEQ ID NO:40和50的多核苷酸。
- [0507] 在一些实施方案中,载体包含SEQ ID NO:41和50的多核苷酸。
- [0508] 在一些实施方案中,载体包含SEQ ID NO:42和50的多核苷酸。
- [0509] 在一些实施方案中,载体包含SEQ ID NO:43和51的多核苷酸。
- [0510] 在一些实施方案中,载体包含SEQ ID NO:44和51的多核苷酸。
- [0511] 在一些实施方案中,载体包含SEQ ID NO:45和51的多核苷酸。
- [0512] 在一些实施方案中,载体包含SEQ ID NO:46和51的多核苷酸。
- [0513] 在一些实施方案中,载体包含SEQ ID NO:87和89的多核苷酸。
- [0514] 在一些实施方案中,载体包含SEQ ID NO:87和90的多核苷酸。
- [0515] 在一些实施方案中,载体包含SEQ ID NO:88和89的多核苷酸。
- [0516] 在一些实施方案中,载体包含SEQ ID NO:88和90的多核苷酸。
- [0517] 在一些实施方案中,载体包含SEQ ID NO:92和89的多核苷酸。
- [0518] 在一些实施方案中,载体包含SEQ ID NO:92和90的多核苷酸。
- [0519] 表7示出了示例性CH2-CH3区的cDNA序列。
- [0520] 表7:

[0521]

| CH2-CH3 结构域 | cDNA SEQ ID NO: | cDNA 多核苷酸序列 |
|--------------------------|-----------------------|--|
| IgG1 CH2-CH3 Q311K | 27 | CCTGAACTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACAAGG ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA CAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC CCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCG TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACA AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG GTAAA |
| IgG1 CH2-CH3 Q311R | 28 | CCTGAACTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCGGG ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA CAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC CCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCG TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACA AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG GTAAA |
| IgG1 | 29 | CCTGAACTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC |

[0522]

| | | |
|---|-----------|---|
| <p>CH2-CH3 T307P/L3 09Q</p> | | <p>AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCCCCGTCCAGCACCAGG ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA CAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC CCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCG TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACA AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG GTAAA</p> |
| <p>IgG1 CH2-CH3 T307P/L3 09Q/Q311 R</p> | <p>30</p> | <p>CCTGAACTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCCCCGTCCAGCACCGGG ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA CAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC CCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCG TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACA AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG GTAAA</p> |
| <p>IgG1 CH2-CH3 Q311K/F4 05L</p> | <p>31</p> | <p>CCTGAACTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACAAGG ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA CAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC CCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCG TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACA AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTG CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG</p> |

[0523]

| | | |
|--|----|---|
| | | GTAAA |
| IgG1 CH2-CH3 Q311R/F4 05L | 32 | CCTGAACTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCGGG ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA CAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC CCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCG TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACA AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCCTG CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG GTAAA |
| IgG1 CH2-CH3 T307P/L3 09Q/F405 L | 33 | CCTGAACTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCCCCGTCCAGCACCAGG ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA CAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC CCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCG TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACA AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCCTG CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG GTAAA |
| IgG1 CH2-CH3 T307P/L3 09Q/Q311 R/F405L | 34 | CCTGAACTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCCCCGTCCAGCACCGGG ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA CAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC CCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCG TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACA AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCCTG CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC |

[0524]

| | | |
|--|----|--|
| | | AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG GTAAA |
| IgG1 CH2-CH3 Q311K/K 409R | 35 | CCTGAACTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACAAGG ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA CAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC CCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCG TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACA AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCCGGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG GTAAA |
| IgG1 CH2-CH3 Q311R/K 409R | 36 | CCTGAACTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCGGG ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA CAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC CCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCG TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACA AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCCGGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG GTAAA |
| IgG1 CH2-CH3 T307P/L3 09Q/K409 R | 37 | CCTGAACTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCCCCGTCCAGCACCAGG ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA CAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC CCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCG TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACA |

[0525]

| | | |
|--|----|---|
| | | AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCCGGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG GTAAA |
| IgG1 CH2-CH3 T307P/L3 09Q/Q311 R/K409R | 38 | CCTGAACTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCCCCGTCCAGCACCGGG ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA CAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC CCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCG TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACA AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCCGGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG GTAAA |
| IgG1 CH2-CH3 Q311K/ T366W | 39 | CCTGAACTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACAAGG ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA CAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC CCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCG TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACA AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG GTAAA |
| IgG1 CH2-CH3 Q311R/T3 66W | 40 | CCTGAACTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCGGG ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA CAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC CCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT |

[0526]

| | | |
|---|----|--|
| | | GTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCG TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACA AGACCACGCCTCCCCTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG GTAAA |
| IgG1 CH2-CH3 T307P/L3 09Q/ T366W | 41 | CCTGAACTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCCCCGTCCAGCACCAGG ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA CAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC CCCCATCCCAGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCG TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACA AGACCACGCCTCCCCTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG GTAAA |
| IgG1 CH2-CH3 T307P/L3 09Q/Q311 R/ T366W | 42 | CCTGAACTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCCCCGTCCAGCACCAGG ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA CAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC CCCCATCCCAGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCG TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACA AGACCACGCCTCCCCTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG GTAAA |
| IgG1 CH2-CH3 Q311K/T3 66S/L368 A/Y407V | 43 | CCTGAACTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCCTCTGCACAAGG ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA CAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA |

[0527]

| | | |
|--|----|---|
| | | GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC CCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GAGCTGCGCCGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACACTAC AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT CCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT GCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCG GGTAAA |
| IgG1 CH2-CH3 Q311R/T3 66S/L368 A/Y407V | 44 | CCTGAACTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCGGG ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA CAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC CCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GAGCTGCGCCGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACACTAC AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT CCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT GCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCG GGTAAA |
| IgG1 CH2-CH3 T307P/L3 09Q/ T366S/L3 68A/Y407 V | 45 | CCTGAACTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCCCCGTCCAGCACCAGG ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA CAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC CCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GAGCTGCGCCGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACACTAC AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT CCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT GCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCG GGTAAA |
| IgG1 CH2-CH3 T307P/L3 09Q/Q311 R/ T366S/L3 | 46 | CCTGAACTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCCCCGTCCAGCACCGGG |

[0528]

| | | |
|--------------------------|----|---|
| 68A/Y407 V | | ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA CAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC CCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GAGCTGCGCCGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTAC AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT CCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT GCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCG GGTAAA |
| IgG1 CH2-CH3 野生型 | 47 | CCTGAACTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAG GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAGG ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA CAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC CCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCG TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACA AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG GTAAA |
| IgG1 CH2-CH3 K409R | 48 | CCTGAACTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAG GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAGG ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA CAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC CCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCG TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACA AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCCGGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG GTAAA |
| IgG1 CH2-CH3 F405L | 49 | CCTGAACTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAG GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA |

[0529]

| | | |
|--|----|--|
| | | TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGG ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA CAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC CCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCG TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACA AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTG CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG GTAAA |
| IgG1 CH2-CH3 T366S/L3 68A/Y407 V | 50 | CCTGAACTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGG ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA CAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC CCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GAGCTGCGCCGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTAC AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT CCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT GCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCG GGTAAA |
| IgG1 CH2-CH3 T366W | 51 | CCTGAACTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGG ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA CAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC CCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCG TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACA AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG GTAAA |
| IgG2 CH2-CH3 | 87 | CCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCC ACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC |

[0530]

| | | |
|--|----|---|
| Q311R | | <p>ACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGG TCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA TGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCAC GTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTGCACCGGGACT GGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA AGGCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACC AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCC CATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGAC CTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGA CCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTC TACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA AA</p> |
| IgG2 CH2-CH3 T307P/V3 09Q/Q311 R | 88 | <p>CCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAA ACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC ACGTGCCTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGG TCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA TGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCAC GTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCCCCGTTTACGACCGGGACT GGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA AGGCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACC AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCC CATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGAC CTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGA CCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTC TACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA AA</p> |
| 野生型 IgG2 CH2-CH3 | 89 | <p>CCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAA ACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC ACGTGCCTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGG TCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA TGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCAC GTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTGCACCGGACT GGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA AGGCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACC AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCC CATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGAC CTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGA CCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTC TACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC</p> |

| | | | |
|--------|------------------------------------|--|--|
| | | AACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA AA | |
| [0531] | IgG2 CH2-CH3 F405L/K4 09R | 90 | CCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAA ACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC ACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGG TCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA TGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCAC GTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTGCACCAGGACT GGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA AGGCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACC AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCC CATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGAC CTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGA CCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTGCTC TACAGCCGGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA AA |
| | IgG2 CH2-CH3 T307P/V3 09Q | 91 | CCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAA ACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC ACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGG TCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA TGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCAC GTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCCCCGTTTACGACCAGGACT GGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA AGGCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACC AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCC CATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGAC CTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGA CCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTC TACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA AA |

[0532] 合适的表达载体通常可以在宿主生物体中作为游离基因或宿主染色体DNA的一部分进行复制。通常,表达载体包含选择标记,诸如氨苄青霉素抗性、潮霉素抗性、四环素抗性、卡那霉素抗性,以便对那些转化了所需DNA序列的细胞进行检测。

[0533] 合适的启动子和增强子元件是本领域已知的。对于真核细胞中的表达,示例性启动子包括轻链和/或重链免疫球蛋白基因启动子和增强子元件、细胞巨化病毒极早期启动子、单纯疱疹病毒胸苷激酶启动子、早期和晚期SV40启动子、存在于逆转录酶病毒长末端重复序列中的启动子、小鼠金属硫蛋白-I启动子、以及各种本领域已知的组织特异性启动子。选择适当的载体和启动子在本领域普通技术人员的水平范围内。

[0534] 已知大量合适的载体和启动子;许多可商购获得以生成重组构建体。示例性载体为用于细菌表达的载体,诸如pBs、phagescript、PsiX174、pBluescript SK、pBs KS、pNH8a、pNH16a、pNH18a、pNH46a (Stratagene, La Jolla, Calif., USA); pTrc99A、pKK223-3、pKK233-

3、pDR540和pRIT5 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) 和真核载体诸如pWLneo、pSV2cat、pOG44、PXR1、pSG (Stratagene) pSVK3、pBPV、pMSG和pSVL (Pharmacia)。

[0535] 本发明还提供一种宿主细胞,其包含本发明的一个或多个载体。“宿主细胞”是指已引入载体的细胞。应该理解,术语宿主细胞不仅旨在指特定的主体细胞,还指此类细胞的子代,并且也指特定主体细胞所产生的稳定细胞系。因为由于突变或者由于环境影响,在后代中可发生某些修饰,因此这种子代可与母体细胞不同,但仍包括在本文所用的术语“宿主细胞”的范围内。此类宿主细胞可以是真核细胞、原核细胞、植物细胞或古菌细胞。原核宿主细胞的示例是大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、杆菌属 (*bacilli*) 诸如枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和其它肠杆菌科 (*enterobacteriaceae*) 诸如沙门氏菌 (*Salmonella*)、沙雷氏菌 (*Serratia*) 以及各种假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 物种。其他微生物诸如酵母也可用于表达。酵母属 (*Saccharomyces*) (例如,酿酒酵母 (*S. cerevisiae*)) 和毕赤酵母是合适的酵母宿主细胞的示例。示例性真核细胞可以是哺乳动物、昆虫、禽类或其它动物来源。哺乳动物真核细胞包括无限增殖化细胞系,诸如杂交瘤或骨髓瘤细胞系,诸如SP2/0 (美国典型培养物保藏中心 (ATCC), Manassas, VA, CRL-1581)、NS0 (欧洲细胞培养物保藏中心 (ECACC), Salisbury, Wiltshire, UK, ECACC No. 85110503)、FO (ATCC CRL-1646) 和Ag653 (ATCC CRL-1580) 鼠细胞系。一种示例性人骨髓瘤细胞系是U266 (ATCC CRL-TIB-196)。其它可用的细胞系包括衍生自中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞的那些细胞系,诸如CHO-K1SV (Lonza Biologics, Walkersville, MD)、CHO-K1 (ATCC CRL-61) 或DG44。

[0536] 本发明还提供了一种制备本发明的分离的多特异性抗体的方法,该方法包括在表达多特异性抗体的条件下培养本发明的宿主细胞,并且使用蛋白A亲和色谱纯化多特异性抗体。

[0537] 药物组合物、施用及治疗方法

[0538] 本发明还提供了包含本发明的多特异性抗体或多聚体蛋白以及药学上可接受的载体的药物组合物。对于治疗性用途,可将本发明的多特异性抗体或多聚体蛋白制备为药物组合物,该药物组合物含有有效量的本发明的多特异性抗体或多聚体蛋白作为药学上可接受的载体中的活性成分。“载体”是指用以施用活性化合物的稀释剂、辅助剂、赋形剂或媒介物。此类媒介物可以是液体,诸如水和油,包括来源于石油、动物、植物的油或合成的那些油,诸如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。例如,可使用0.4% 盐水和0.3% 甘氨酸。这些溶液是无菌的,并且通常不含颗粒物。它们可通过熟知的常规灭菌技术(例如过滤)进行灭菌。该组合物可根据需要含有药学上可接受的辅助物质以接近生理条件,诸如pH调节剂和缓冲剂、稳定剂、增稠剂、润滑剂和着色剂等。此类药物制剂中本发明的多特异性抗体或多聚体蛋白的浓度可广泛改变,即从小于约0.5重量%,通常至少约1重量%至多达15重量%或20重量%,并且将根据所选择的具体施用模式,主要基于所需剂量、流体体积、粘度等进行选择。包含其它人蛋白(例如,人血清白蛋白)在内的合适的媒介物和制剂在例如Remington: The Science and Practice of Pharmacy,第21版,Troy, D.B. 编辑, Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2006,第5部分, Pharmaceutical Manufacturing,第691-1092页(特别参见第958-989页)中有所描述。

[0539] 本发明的多特异性抗体或多聚体蛋白的治疗用途的施用方式可以是将药剂递送至宿主的任何合适的途径,诸如非肠道施用,例如,真皮内、肌内、腹膜内、静脉内或皮下、肺

部;经粘膜施用(口服、鼻内、阴道内、直肠);使用在片剂、胶囊、溶液、粉末、凝胶、颗粒中的制剂;以及包含在注射器、植入装置、渗透泵、盒、微型泵中;或技术人员所理解的本领域熟知的其它方式。可通过例如以下方式实现位点特异性施用:胃肠外、支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑室内、结肠内、颈管内、胃内、肝内、心脏内、骨内、骨盆内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、脊柱内、滑膜内、胸内、子宫内、血管内、膀胱内、病灶内、阴道、直肠、口腔、舌下、鼻内或经皮递送。

[0540] 可将药物组合物作为包含容器的试剂盒供应,该容器包含本文所述的药物组合物。药物组合物可例如以用于单剂量或多剂量的可注射溶液的形式提供,或作为将在注射之前进行重构的无菌粉末提供。另选地,这种试剂盒可包括用于施用药物组合物的干粉分散器、液体气溶胶发生器或喷雾器。这种试剂盒还可包含关于药物组合物的指征和用法的书面信息。

[0541] 多特异性抗体和其他多聚体蛋白可根据个体的特异性用于治疗人受试者中的任何病症。

[0542] 虽然已经概括地描述了本发明,但是本发明的实施方案还将在以下实施例中进一步公开,以下实施例不应理解为限制权利要求的范围。

[0543] 实施例1.设计可能降低Fc与蛋白A的结合的Fc突变

[0544] FcRn和蛋白A的Z结构域在CH2结构域和CH3结构域之间的界面处与Fc结合,从而接触Fc上的许多相同残基。虽然小鼠IgG2a/b和人IgG1都与FcRn结合,但由于小鼠IgG2a/b与Z结构域的结合比人IgG1与Z结构域的结合弱,因此在人IgG1 CH2结构域的Z结构域结合界面中识别了在小鼠IgG2a CH2结构域中不保守的位置。图1A示出了在残基305和315之间人IgG1结构域和小鼠IgG2a CH2结构域的比对。因为在位置305、307、309、314和315处的残基在人序列和小鼠序列之间不同,所以假设将反向突变T307P和/或L309Q引入人IgG1中可导致工程化的IgG1变体与蛋白A的结合降低,但不影响FcRn相互作用。人IgG1中的缬氨酸305位于CH2结构域中的 β -股中,并且不与蛋白A或FcRn相互作用。虽然亮氨酸314和天冬酰胺315在人IgG和小鼠IgG之间不同,但它们的差异是保守的(例如,人IgG中的L314改变为另一个疏水残基:小鼠IgG中的L/M314,并且N315改变为另一个极性残基:小鼠IgG中的S315)。因此,推断,在位置307和309处的改变会对人IgG1与蛋白A和人IgG1与FcRn的相互作用具有最显著的影响。

[0545] 对Z结构域(Z34C肽,来源于Z结构域的经二硫键键合的两个螺旋束,PDB ID 1L6X)和Fc的复合物的晶体结构的分析显示,IgG1 Fc残基Q311主要通过疏水相互作用(图1B)与Z结构域上的F9、L13、R23、N24和I27相互作用(残基根据SEQ ID NO:99进行编号)。相反,IgG1 Fc残基Q311与FcRn的大部分酸性表面相互作用,该表面包含FcRn的 α -亚基(PDB ID 4N0U)的E115和E116(对应于SEQ ID NO:103的残基E4和E5)。假设使Fc残基Q311突变可有差别地影响所得的一种或多种变体与Z结构域和与FcRn的结合。图1B示出了Fc残基在截断距离5Å处与FcRn或Z结构域接触。

[0546] 实施例2.生成在研究中使用的单特异性抗体和双特异性抗体

[0547] 使用标准分子生物学技术将突变T307A、Q311A、Q311K、Q311E、T307P/L309Q或T307P/L309Q/Q311R工程化到各种单特异性抗体的两条重链中。

[0548] 使用共同轻链技术或者通过使用Duobody[®]技术或Knob-in-Hole技术促进Fab臂

交换,来生成双特异性mAb。在共同轻链技术中,使用已知共享轻链的抗TNF α 和抗 α V β 5抗体。在knob-in-hole技术中,将knob (T366W突变) 或hole (T366S、L368A、Y407V突变) 引入亲本单特异性抗体中。在Duobody[®]技术中,将F405L或K409R[®]突变引入亲本单特异性抗体中。

[0549] 所生成的双特异性抗体在仅一条重链中携带一种或多种突变(例如非对称突变),该突变可能破坏或降低蛋白A结合(T307A、Q311A、Q311K、Q311E、T307P/L309Q和T307P/L309Q/Q311R)。

[0550] 根据制造商规程,使用为3:1的轻链:重链质粒的摩尔比,在Expi293F细胞(Invitrogen)中表达Ab。使用为3:0.5:0.5的轻链:重链1:重链2质粒的摩尔比进行共转染。在5天表达期后通过过滤收获培养上层清液中。使用针对已知浓度的同种型对照标准物的表面双层干涉测量法来估计滴度。根据制造商规程,使用MabSelect SuRe树脂(GE Healthcare)通过蛋白A亲和色谱来纯化亲本Ab。根据制造商规程,通过蛋白G亲和色谱(GE Healthcare)来纯化蛋白G的结合有改变的变体。

[0551] 表8示出所生成的单特异性抗体。

[0552] 表9示出所生成的双特异性(bs)抗体。

[0553] 表8.

| mAb 名称 | 特异性 | 一种或多种 Fc 突变 | HC SEQ | LC SEQ ID |
|-----------------|--------------------------|-------------------------|--------|-----------|
| | | | ID NO: | NO: |
| gp120-R | gp120 | K409R | 68 | 69 |
| RSV-L | RSV | F405L | 70 | 71 |
| RSV-L[Q311A] | RSV | Q311A/F405L | 72 | 71 |
| RSV-L[Q311K] | RSV | Q311K/F405L | 73 | 71 |
| RSV-L[Q311R] | RSV | Q311R/F405L | 74 | 71 |
| RSV-L[Q311H] | RSV | Q311H/F405L | 75 | 71 |
| RSV-L[TL] | RSV | T307P/L309Q/F405L | 76 | 71 |
| RSV-L[TLQ] | RSV | T307P/L309Q/Q311R/F405L | 77 | 71 |
| RSV-[I253D] | RSV | I253D | 78 | 71 |
| aVb5 | α V β 5 整合素 | 野生型 | 79 | 80 |
| TNF | TNF- α | 野生型 | 81 | 80 |
| TNF-[Q311R] | TNF- α | Q311R | 82 | 80 |
| TNF-[TLQ] | TNF- α | T307P/L309Q/Q311R | 83 | 80 |
| TNF-knob[Q311R] | TNF- α | Q311R/T366W | 84 | 80 |
| TNF-knob[TLQ] | TNF- α | T307P/L309Q/Q311R/T366W | 85 | 80 |
| aVb5-hole | α V β 5 整合素 | T366S/L368A/Y407V | 86 | 80 |

[0556] 表9.

| 抗体名称 | 臂1 | 臂2 |
|----------------|---------|--------------|
| bs RSV-L | gp120-R | RSV-L |
| bsRSV-L[Q311A] | gp120-R | RSV-L[Q311A] |
| bsRSV-L[Q311K] | gp120-R | RSV-L[Q311K] |

| | | |
|-------------------|-----------|-----------------|
| bsRSV-L[Q311R] | gp120-R | RSV-L[Q311R] |
| bsRSV-L[TL] | gp120-R | RSV-L[TL] |
| bsRSV-L[TLQ] | gp120-R | RSV-L[TLQ] |
| bsTNF | aVb5 | TNF |
| bsTNF-[Q311R] | aVb5 | TNF-[Q311R] |
| bsTNF-[TLQ] | aVb5 | TNF-[TLQ] |
| bsTNF-knob[Q311R] | aVb5-hole | TNF-knob[Q311R] |
| bsTNF-knob[TLQ] | aVb5-hole | TNF-knob[TLQ] |

[0558] 所生成抗体的重链和轻链的氨基酸序列:

[0559] SEQ ID NO:68 gp120-R HC

[0560] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFSNFVIHWVRQAPGQRFWWM
 GWINPYNGNKEFSAKFQDRVTFTADTSANTAYMELRSLRSADTAVYYC
 ARVGPYSWDDSPQDNYYMDVWGKGTIVIVSSASTKGPSVFPLAPSSKST
 SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
 VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
 [0561] HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
 SNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEA
 LHNHYTQKSLSLSPGK

[0562] SEQ ID NO:69 gp120-R LC

EIVLTQSPGTLSPGERATFSCRSSHSIRSRRVAWYQHKGQAPRLVIHG
 VSNRASGISDRFSGSGSGTDFTLTITRVEPEDFALYYCQVYGASSYTFGQG
 [0563] TKLERKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD
 NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQG
 LSSPVTKSFNRGEC

[0564] SEQ ID NO:70 RSV-L HC

[0565] QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLA
 HIYWDDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDTATYYCAR
 LYGFTYGFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
 KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
 TYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
 KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
 EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 PPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
 SPGK

[0566] SEQ ID NO:71 RSV LC

[0567] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVDYNGISYMHWYQQKPGQPPK
 LLIYAASNPESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQIIEDPW
 TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ

[0568] WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVYACEV
 THQGLSSPVTKSFNRGEC

[0569] SEQ ID NO:72 RSV-L[Q311A]HC

[0570] QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLA
 HIYWDDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDTATYYCAR
 LYGFTYGFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
 KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
 TYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
 KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNSTYRVVSVLTVLHADWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
 EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 PPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
 SPGK

[0571] SEQ ID NO:73 RSV-L[Q311K]HC

- QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLA
HIYWDDDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDTATYYCAR
LYGFTYGFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
[0572] KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHKDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK
- [0573] SEQ ID NO:74 RSV-L[Q311R]HC(Q311R/F405L)
- [0574] QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLA
HIYWDDDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDTATYYCAR
LYGFTYGFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
[0575] YNSTYRVVSVLTVLHRDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK
- [0576] SEQ ID NO:75 RSV-L[Q311H]HC(Q311H/F405L)
- [0577] QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLA
HIYWDDDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDTATYYCAR
LYGFTYGFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHHDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK
- [0578] SEQ ID NO:76 RSV-L[TL]HC(T307P/L309Q/F405L)

[0579] QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLA
 HIYWDDDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDTATYYCAR
 LYGFTYGFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
 KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
 TYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
 KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNSTYRVVSVLPVQHQQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
 EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 PPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
 SPGK

[0581] SEQ ID NO:77 RSV-L[TLQ]HC(T307P/L309Q/Q311R/F405L)
 QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLA
 HIYWDDDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDTATYYCAR
 LYGFTYGFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
 KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
 TYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
 [0582] KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNSTYRVVSVLPVQHRDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
 EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 PPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
 SPGK

[0583] SEQ ID NO:78 RSV-L[I253D]HC(I253D/F405L)
 QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLA
 HIYWDDDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDTATYYCAR
 LYGFTYGFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
 KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
 TYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
 [0584] KDTLMDSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
 EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 PPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
 SPGK

[0585] SEQ ID NO:79 aVb5 HC
 QVQLVESGGGVVQPGRSRRLSCAASGFTFSRYTMHWVRQAPGKGLEWV
 [0586] AVISFDGSNKYYVGSVKGRFTISRDNSENTLYLQVNILRAEDTAVYYCAR
 EARGSYAFDIWGQGMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV

- KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
[0587] YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK
- [0588] SEQ ID NO:80TNF和抗aVb5 LC
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDA
SNRATGIPARFSGSGGTDFLTLSISLEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPG
- [0589] TKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD
NALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC
- [0590] SEQ ID NO:81 TNF HC
EVQLVESGGGVVQPGGSLSLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGNGLEWV
AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNSENTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARDRGIAAGGNYYYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS
GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
[0591] VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK
- [0592] SEQ ID NO:82 TNF-[Q311R]HC
EVQLVESGGGVVQPGGSLSLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGNGLEWV
- [0593] AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNSENTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARDRGIAAGGNYYYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS
GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
- [0594] HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHRDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK
- [0595] SEQ ID NO:83 TNF-[TLQ]HC(T307P/L309Q/Q311R) :

[0596] EVQLVESGGGVVQPGGSLSLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGNGLEWV
AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNSENTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARDRGIAAGGNYYYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS
GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLPLVQHRLDLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK

[0597] SEQ ID NO:84 TNF-knob [Q311R] HC (Q311R/T366W)
EVQLVESGGGVVQPGGSLSLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGNGLEWV
AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNSENTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARDRGIAAGGNYYYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS
GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
[0598] GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHRDLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK

[0599] SEQ ID NO:85 TNF-knob [TLQ] HC (T307P/L309Q/Q311R/T366W)
EVQLVESGGGVVQPGGSLSLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGNGLEWV
AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNSENTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARDRGIAAGGNYYYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS
GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
[0600] GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLPLVQHRLDLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK

[0601] SEQ ID NO:86 aVb5-hole HC (T366S/L368A/Y407V)

QVQLVESGGGVVQPGRSRRLSCAASGFTFSRYTMHWVRQAPGKGLEWV
 AVISFDGSNKYYVGSVKGRFTISRDNSENTLYLQVNILRAEDTAVYYCAR
 EARGSYAFDIWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
 KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
 TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKP
 [0602] KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
 EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
 LSPGK

[0603] 实施例3. T307、L309和/或Q311突变对与Z结构域知FcRn结合的影响

[0604] 单特异性IgG1变体与Z结构域的结合

[0605] 研究中使用如表8中示出的携带Fc突变的单特异性抗RSV抗体。

[0606] RSV-L在pH 4.09下从蛋白A树脂洗脱出。虽然T307A突变对蛋白A结合没有影响(数据未示出),但T307P/L309Q突变(mAb RSV-L[TL])导致与蛋白A的结合适度降低,从而致使该mAb在pH 4.48下洗脱出。可通过对称的Q311K或Q311R突变而不是通过Q311A突变实现对蛋白A结合的附加弱化影响。引入三重突变T307P/L309Q/Q311R(mAb RSV-L[TLQ])进一步破坏了与蛋白A的相互作用,如升高的洗脱pH 4.70所证实的。表10示出了所生成的IgG1变体的洗脱pH值。

[0607] 这些结果表明,Q311K、Q311R、T307P/L309Q和T307P/L309Q/Q311R对称突变各自降低了变体IgG1与蛋白A的结合,从而可能允许基于差异蛋白A洗脱纯化和分离由亲本变体IgG1生成的携带不对称突变的双特异性抗体。

[0608] 表10. 所生成的IgG1变体的洗脱pH值

| mAb | 洗脱pH | FcRn IC ₅₀ (nM) |
|--------------|------|----------------------------|
| RSV-L | 4.09 | 79.3 |
| RSV-L[Q311A] | 4.07 | 41.1 |
| RSV-L[Q311K] | 4.72 | 45.6 |
| RSV-L[Q311R] | 4.67 | 18.2 |
| RSV-L[Q311H] | NA | 59.1 |
| RSV-L[TL] | 4.48 | NA |
| RSV-L[TLQ] | 4.70 | 79.6 |

[0610] IgG1变体与FcRn的结合

[0611] 在位置311处引入的单个位置突变体(Q311R、Q311A、Q311K和Q311H)都不破坏单特异性抗体与FcRn的相互作用。Q311R突变导致结合FcRn的能力适度增强,这表明该突变可提供延长的血清半衰期。当与RSV-L相比时,RSV-L[TLQ]以相似的亲和力结合FcRn。当与野生型IgG1相比时,具有非对称F405L Q311R突变(bsRSV-L[Q311R])或F405L/T307P/L309Q/Q311R突变(bsRSV-L[TLQ])的双特异性IgG1抗体也以相同的亲和力结合FcRn。图2A示出了具有Q311R、Q311A、Q311K或Q311H突变的IgG1变体与FcRn的竞争结合的剂量响应曲线。图2B

示出了具有对称(例如,单特异性mAb RSV-L、RSV-L[Q311R]、RSV-L[TLQ])或非对称(例如,双特异性mAb bsRSV-L[Q311R]、bsRSV-L[TLQ])Q311R或T307P/L309Q/Q311R突变的IgG1变体与FcRn的竞争结合的剂量响应曲线。已知I253D突变破坏FcRn相互作用并且用作阴性对照。

[0612] Q311R、Q311A、Q311K或Q311H处的突变不削弱FcRn相互作用。Q311R的突变增强FcRn相互作用。在一条或两条重链中结合T307P/L309Q/Q311R突变不削弱FcRn相互作用。这些结果表明,可通过差异蛋白A纯化,从亲本单特异性抗体分离并纯化携带非对称Q311R或T307P/L309Q/Q311R突变的双特异性抗体。此外,当与野生型IgG1相比时,这些抗体可具有更长的血清半衰期。

[0613] 方法

[0614] 将T307A、Q311A、Q311K、Q311R、Q311H、T307P/L309Q和T307P/L309Q/Q311R突变更工程化到单特异性亲本抗RSV或抗gp120抗体中。将亲本抗体进一步工程化以具有F405L突变(抗RSV mAb)或K409R突变(抗gp120 mAb),以便使用Fab臂交换生成双特异性抗RSV/gp120抗体。评估突变可调节与Z结构域和与FcRn结合的程度。

[0615] 用于实验中的Z结构域具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

[0616] 蛋白A结合

[0617] 对于在两个臂上都携带突变的每个亲本mAb,将1mg装载到1mL mAbSelect sure柱(GE Healthcare)上并使用从1X PBS pH 7.2到50mM柠檬酸盐pH 3.5的30mL梯度以1mL/min洗脱。监测280nm处的吸光度和pH。使用峰值最大值处的pH值来确定用于制备性实验的洗脱pH。

[0618] FcRn结合

[0619] 使用alpha-screen测定法在体外评估FcRn结合。在这些测定法中,生物素酰化的IgG与涂覆链霉亲和素的供体珠结合,并且多聚组氨酸标记的FcRn与涂覆Ni的受体珠结合。两种蛋白之间的结合产生荧光信号。使用未标记的野生型或突变型IgG来竞争该结合,导致信号的剂量依赖性降低。根据制造商规程,使用SureLINK Chromophoric Biotin生物素标记试剂盒(KPL Inc.)对mAb进行生物素酰化。多聚组氨酸标记的FcRn购自SinoBiological。在补充有0.05%(质量/体积)牛血清白蛋白(BSA)和0.01%(重量/体积)Tween-20的调节至pH 6.0的1X PBS中进行测定。1 μ g/mL的生物素酰化野生型IgG1与链霉亲和素偶联的供体珠结合,并且0.2 μ g/mL多聚组氨酸标记的FcRn与镍偶联的受体珠结合。制备0.4mg/mL的竞争者Ab,并且对每个点连续稀释3倍。使用EnVision读板机(Perkin Elmer)记录介于520-620nm之间的荧光。使用Prism 6.01软件(GraphPad Software, Inc.)分析数据,并使用4参数竞争模型进行拟合,如前文所述(Vafa等人, Methods, 第65卷, 第114-126页, 2014年)。

[0620] 实施例4. T307P、L309Q和Q311R突变对Fc γ 受体(Fc γ R)结合或抗体稳定性无影响

[0621] 据报道,CH2-CH3界面中的突变会改变Fc的结构,导致Fc的动力学增强,热稳定性降低,并且与Fc γ 受体的相互作用发生改变(Majumdar等人, MAbs, 第7卷, 第84-95页, 2015年)。为了解决Q311R或T307P/L309Q/Q311R突变是否对Fc结构有相似的影响,评估了携带这些突变的抗体结合Fc γ 受体的能力及其热稳定性。

[0622] 单特异性或双特异性抗体中的对称或非对称Q311R或T307P/L309Q/Q311R突变分别对变体IgG1在体外与Fc γ 受体相互作用的能力没有影响。由于Fc γ 受体结合到C_H2-铰接

界面而不是 C_H2-C_H3 界面,这一结果在某种程度上是可以预料的。结果还表明,引入的突变不会干扰Fc的总体结构。图3A、图3B、图3C和图3D分别显示了所选抗体与Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb和Fc γ RIIIa竞争结合的剂量响应曲线。这些曲线图显示了对比竞争者的浓度绘制的最大信号百分比。

[0623] 工程化IgG的 T_m 值的比较表明,Q311R或T307P/L309Q/Q311R突变不会干扰mAb的热稳定性。表11示出了所测试的抗体的差示扫描量热法(T_m 和焓值)的参数。总之,这些结果表明,Q311R和T307P/L309Q/Q311R突变的作用局限于蛋白A和FcRn相互作用。

[0624] 表11.

| mAb | C_H2 和 Fab T_m ($^{\circ}C$) | C_H2 和 Fab T_m (cal/mol) | C_H3 T_m ($^{\circ}C$) | C_H3 ΔH (cal/mol) |
|--------------|------------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| RSV-L | 70.97 \pm 0.01 | 6.78 \pm 0.02 $\times 10^5$ | 81.75 \pm 0.03 | 1.45 \pm 0.02 $\times 10^5$ |
| RSV-L[Q311R] | 72.10 \pm 0.02 | 6.45 \pm 0.13 $\times 10^5$ | 81.66 \pm 0.03 | 1.65 \pm 0.02 $\times 10^5$ |
| RSV-L[TLQ] | 71.55 \pm 0.01 | 6.81 \pm 0.03 $\times 10^5$ | 81.55 \pm 0.04 | 1.61 \pm 0.03 $\times 10^5$ |

[0626] 方法

[0627] 使用实施例2中所述的方案并稍作修改,使用 α -筛选测定法评估IgG1变体与Fc γ R的结合。含有C端His标签的Fc γ R的可溶性胞外结构域购自R&D systems。在补充有0.05% (质量/体积)牛血清白蛋白(BSA)和0.01% (重量/体积)Tween-20的pH 7.2的1X PBS中进行测定。1 μ g/mL的生物素酰化野生型IgG1与链霉亲和素偶联的供体珠结合,并且His标记的Fc γ R与镍偶联的受体珠结合。对于Fc γ RI,使用结合了比野生型IgG1弱的受体的生物素化IgG1-L234A/L235A突变体来增加信号窗口。所用Fc γ R的浓度为200ng/mL (Fc γ RI和Fc γ RIIIa)、10ng/mL (Fc γ RIIa)或14ng/mL (Fc γ RIIb)。制备0.4mg/mL的竞争者Ab,并且对每个点连续稀释3倍。

[0628] 差示扫描量热法(DSC)用于确定抗体解折叠的 T_m 和焓。将样品在1X PBS pH 7.2中稀释至1mg/mL。在温度以1 $^{\circ}C$ /分钟的速率从25 $^{\circ}C$ 升至95 $^{\circ}C$ 之前,样品平衡至25 $^{\circ}C$ 达15分钟。使用Origin软件分析数据。

[0629] 实施例5.在通过从蛋白A树脂洗脱而进行纯化抗体的体外Fab臂交换后,从亲本单特异性mAb分离双特异性抗体

[0630] 将非对称Q311R或T307P/L309Q/Q311R突变引入双特异性抗体有助于将其从亲本单特异性mAb纯化。

[0631] 将在体外Fab臂交换后生成的亲本抗体RSV-L[TLQ]和gp120-R与双特异性bsRSV-L[TLQ]的1:1:1混合物通过差异蛋白A亲和色谱纯化,将洗脱峰合并并通过HIC分析。

[0632] 图4A示出,亲本和双特异性mAb都可使用HIC色谱在所开发的条件下分离。图4B示出了注入蛋白A柱中的抗体的等摩尔混合物的HIC色谱图。图4C示出了来自蛋白A树脂的抗体混合物的洗脱曲线,其在pH 4.7、pH 4.2和pH 3.4处产生了三个明显的洗脱峰,这与两种亲本抗体和双特异性抗体的存在一致。图4D示出了蛋白A洗脱峰的HIC分析。通过HIC对洗脱峰的分析表明,高pH洗脱液(pH 4.8)主要含有亲本RSV-L[TLQ]mAb,而pH 3.4洗脱液主要含

有gp120-R亲本mAb。中间的pH洗脱液 (pH 4.2) 包含纯度约94%的双特异性bsRSV-L[TLQ] mAb。表12示出了来自差异蛋白A纯化的bsRSV-L[TLQ]的洗脱纯度。

[0633] 表12.

| 洗脱 pH | % RSV-L[TLQ] | % bsRSV-L[TLQ] | % gp120-R |
|-----------|--------------|----------------|-----------|
| 4.6 | > 99 | N.D.* | 未测定 |
| 4.2 | 未测定 | 94 | 6 |
| 3.4 | 未测定 | 3 | 97 |
| *N.D.=未检出 | | | |

[0635] 方法

[0636] 研究中使用了亲本抗体RSV-L[TLQ]和gp120-R和双特异性bsRSV-L[TLQ]mAb。

[0637] 使用蛋白G亲和色谱纯化RSV-L[TLQ],并透析到1X PBS中。gp120-R通过蛋白A亲和色谱纯化,并透析到1X PBS中。然后使两个亲本mAb以1mg/mL经受Fab臂交换。简而言之,将5mg的每种亲本抗体在含有1X PBS、75mM 2-巯基乙胺的缓冲液中混合,并在31°C下温育5小时,然后针对1X PBS进行充分透析。然后将含95%以上BsAb的所得材料与两种纯化的亲本mAb以1:1:1的摩尔比混合,并将混合物用于差异蛋白A纯化实验中。

[0638] 使用1mL mAbSelect Sure柱(GE Healthcare)进行差异蛋白A纯化。在使用包含50mM柠檬酸盐的缓冲液(pH 4.7、pH 4.2或pH 3.4)的3个步骤中洗脱混合物。收集洗脱级分,并且在分析前将其浓缩至>1mg/mL。

[0639] 来自差异蛋白A纯化的洗脱峰的分析使用丁基NPR柱(Tosoh Bioscience)通过疏水作用色谱(HIC)进行分析。将大约30μg的每种样品注入到该柱上,并使用0至100%梯度的缓冲液洗脱,该缓冲液包含100mM磷酸钠pH 6.0、1.5M(NH₄)₂SO₄或100mM磷酸钠pH 6.0。

[0640] 实施例6.在通过从蛋白A树脂洗脱而在粗制上清液中进行体外Fab臂交换后,从亲本单特异性mAb分离双特异性抗体

[0641] 将非对称Q3 11R或T307P/L309Q/Q311R引入由上清液中交叉材料生成的双特异性抗体有助于从亲本抗体中纯化生成的双特异性抗体。

[0642] 用于生成双特异性抗体的DuoBody[®]技术要求亲本mAb在Fab臂交换之前进行单独纯化。然而,cFAE反应通常具有残留量的二价亲本mAb,这可能导致需要额外的下游抛光步骤。因此,使用pH梯度的差异蛋白A色谱可简化双特异性抗体的纯化。减少纯化步骤数量的另一种方法是使用培养上清液执行Fab臂交换规程。在该方法中,精确测定亲本mAb滴度,使得亲本mAb以1:1摩尔比混合。通过与培养上清液进行受控的Fab臂交换,可降低生成双特异性抗体的成本,因为减少了一个蛋白A纯化步骤,而且因不必进行两次亲本抗体的纯化和表征而节省了时间。

[0643] 在包含等量亲本抗体RSV-L[TLQ]和gp120-R的细胞培养上清液中使用Fab臂交换生成bsRSV-L[TLQ]和bsFSV-L[Q311R],并将所得样品经蛋白A亲和柱处理。

[0644] 图5A示出了上清液中Fab臂交换后的bsRSV-L[TLQ]的样品的蛋白A色谱图,该图示出在pH 4.7、4.2和3.4时洗脱的三个不同峰。

[0645] 图5B示出了来自上清液中Fab臂交换后的bsRSV-L[TLQ]的样品的蛋白A亲和柱pH 4.7洗脱液的HIC分析。

[0646] 图5C示出了来自上清液中Fab臂交换后的bsRSV-L[TLQ]的样品的蛋白A亲和柱pH 4.2洗脱液的HIC分析。

[0647] 图5D示出了来自上清液中Fab臂交换后的bsRSV-L[TLQ]的样品的蛋白A亲和柱pH 3.4洗脱液的HIC分析。

[0648] 图6A示出了上清液中Fab臂交换后的bsRSV-L[Q311R]的样品的蛋白A色谱图,该图示出在pH 4.7、4.2和3.4时洗脱的三个不同峰。

[0649] 图6B示出了来自上清液中Fab臂交换后的bsRSV-L[Q311R]的样品的蛋白A亲和柱pH 4.7洗脱液的HIC分析。

[0650] 图6C示出了来自上清液中Fab臂交换后的bsRSV-L[Q311R]的样品的蛋白A亲和柱pH 4.2洗脱液的HIC分析。

[0651] 图6D示出了来自上清液中Fab臂交换后的bsRSV-L[Q311R]的样品的蛋白A亲和柱pH 3.4洗脱液的HIC分析。

[0652] 对于产生bsRSV-L[TLQ]的上清液中Fab臂交换,剩余的亲本RSV-L[TLQ]通过在pH 4.7下洗脱除去(图5B),剩余的亲本gp120-R通过在pH 3.4下洗脱除去(图5D)。仅bsRSV-L[TLQ]在pH 4.2下洗脱(图5C)。一些bsRSV-L[TLQ]在pH 3.4(图5D)和pH 4.7(图5B)下洗脱,导致纯化的bsRSV-L[TLQ]的最终收率降低。表13示出了来自上清液中Fab臂交换生成的bsRSV-L[TLQ]的差异蛋白A纯化的洗脱液的纯度。分离出bsRSV-L[TLQ],纯度超过95%。

[0653] 表13.

| 洗脱 pH | % RSV-L[TLQ] | % bsRSV-L[TLQ] | % gp120-R |
|-----------|--------------|----------------|-----------|
| 4.7 | 21.4 | 78.6 | 未测定 |
| 4.2 | 未测定 | > 99 | 未测定 |
| 3.4 | 未测定 | 21.2 | 78.8 |
| *N.D.=未检出 | | | |

[0655] 对于产生bsRSV-L[Q311R]的上清液中Fab臂交换,剩余的亲本RSV-L[Q311R]通过在pH 4.6下洗脱除去(图6B),剩余的亲本gp120-R通过在pH 3.4下洗脱除去(图6D)。由于单突变结合蛋白A比三突变体T307P/L309Q/Q311R更强,因此有效洗脱亲本RSV-L[Q311R]所需的酸性pH略高。仅BsAb在pH 4.2下洗脱(图6C)。一些bsRSV-L[Q311R]在pH 3.4(图6D)和pH 4.6(图6B)下洗脱,导致纯化的BsAb的最终收率降低。

[0656] 表14示出了来自上清液中Fab臂交换生成的bsRSV-L[Q311R]的差异蛋白A纯化的洗脱液的纯度。纯化bsRSV-L[Q311R],纯度超过95%。

[0657] 表14.

| 洗脱 pH | % RSV-L[Q311R] | % bsRSV-L[Q311R] | % gp120-R |
|-----------|----------------|------------------|-----------|
| 4.6 | 14.5 | 85.5 | 未测定 |
| 4.2 | 未测定 | > 99 | 未测定 |
| 3.4 | 未测定 | 17.1 | 82.9 |
| *N.D.=未检出 | | | |

[0659] 总之,该实验证明Q311R和T307P/L309Q/Q311R突变可用于有效分离上清液中Fab臂交换生成的双特异性抗体。

[0660] 方法

[0661] 在Expi293细胞中表达亲本mAb RSV-L[Q311R]或RSV-L[TLQ]和gp120-R,并确定抗体滴度(Octet,ForteBio)。为了产生双特异性抗体bsRSV-L[Q311R]和bsRSV-L[TLQ],将含有等毫克量的RSV-L[Q311R]和gp120-R或RSV-L[TLQ]和gp120-R的培养上清液合并,并通过加入2-巯基乙胺至最终浓度为75mM以0.2mg/mL的最终蛋白质浓度进行Fab臂交换反应,然后在31°C下温育5小时并在1X DPBS pH 7.4中进行充分透析(Labrijn Aran F,Meesters Joyce I等人,2014年)。透析后,将蛋白施加至1mL的mAbSelect Sure柱(GE),并使用pH步骤梯度洗脱。

[0662] 纯化前,将含有等量的1mg纯化亲本mAb和双特异性抗体的对照混合物在1mL mAbSelect Sure柱(GE)上分离,以确定最佳洗脱条件。含有RSV-L[Q311R]、gp120-R和bsRSV-L[Q311R]的纯化蛋白混合物显示亲本mAb与BsAb的最佳分离,方法是用50mM柠檬酸盐pH 4.6洗脱30柱体积(CV),然后用50mM柠檬酸盐pH 4.2洗脱30CV,然后用50mM柠檬酸盐pH 3.4洗脱20CV。含有RSV-L[TLQ]、gp120-R和bsRSV-L[TLQ]的纯化蛋白混合物显示亲本mAb与双特异性mAb的最佳分离,方法是用50mM柠檬酸盐pH 4.7洗脱30CV,然后用50mM柠檬酸盐pH 4.2洗脱30CV,然后用50mM柠檬酸盐pH 3.4洗脱20CV。

[0663] 因此,在后续实验中,将上清液中交叉亲本mAb产生的bsRSV-L[Q311R]用50mM柠檬酸盐pH 4.6洗脱30CV,然后用50mM柠檬酸盐pH 4.2洗脱30CV,然后用50mM柠檬酸盐pH 3.4洗脱20CV。在后续实验中,将上清液中交叉亲本mAb产生的bsRSV-L[TLQ]用50mM柠檬酸盐pH 4.7洗脱30CV,然后用50mM柠檬酸盐pH 4.2洗脱30CV,然后用50mM柠檬酸盐pH 3.4洗脱20CV。在后续实验中使用了每个双特异性抗体对的最佳洗脱条件。

[0664] 使用疏水作用色谱评估分离效率。将来自每个pH步骤的洗脱级分合并,用Tris pH 7.5中和,并浓缩以供分析。样品以相同的蛋白质浓度制备,以1:2的比例稀释到结合缓冲液(0.1M NaHPO₄ pH 6.5,1.5M(NH₄)₂SO₄)中,施加至在0.1M NaHPO₄ pH 6.5,1.5M(NH₄)₂SO₄中平衡的4.6mm×10cm TSKgel丁基NPR柱(Tosoh Bioscience,LLC)中,并在25分钟内使用梯度以0.5mL/min洗脱至0.1M NaHPO₄ pH 6.5。

[0665] 实施例7.从共转染材料开始体外Fab臂交换后,从亲本单特异性mAb分离双特异性抗体

[0666] 评估了利用Q311R或T307P/L309Q/Q311R来纯化利用共同的轻链技术而非Fab臂交换生成的双特异性抗体的适用性。

[0667] 使用前面实施例中所述的3个pH步骤洗脱方法,将生成的双特异性抗体bsTNF-[TLQ]和bsTNF-[Q311R]分离至95%以上的纯度。bsTNF-[TLQ]和bsTNF-[Q311R]在pH 4.2下洗脱。此外,亲本TNF-[TLQ]和TNF-[Q311R]在pH 4.7下有效洗脱,而在其他洗脱液中未检测到mAb。从pH 4.2洗脱中分离出的bsTNF-[TLQ]和bsTNF-[Q311R]的纯度很高,但是与使用Fab臂交换生成的双特异性抗体相比,双特异性抗体的收率稍低,这是因为当共转染时两种亲本mAb的表达水平显著不同(TNF-[TLQ]亲本约为300mg/L,而aVb5约为35mg/L)。尽管亲本mAb的表达水平相差约10倍,但引入T307P/L309Q/Q311R突变仍有助于分离纯度在95%以上的bsTNF-[TLQ],该抗体仅占初始样品中总抗体群的10%。表15示出了使用共同的轻链技术生成的bsTNF-[TLQ]的差异蛋白A纯化的洗脱液的纯度。表16示出了使用共同的轻链技术生成的i bsTNF-[Q311R]的差异蛋白A纯化的洗脱液的纯度。

[0668] 图7A示出了使用共同的轻链技术生成的bsTNF-[TLQ]的样品的蛋白A色谱图,该图示出在pH 4.7、4.2和3.4时洗脱的三个不同峰。

[0669] 图7B示出了使用共同的轻链技术生成的bsTNF-[TLQ]的样品的蛋白A亲和柱pH 4.7洗脱液的HIC分析。

[0670] 图7C示出了使用共同的轻链技术生成的bsTNF-[TLQ]的样品的蛋白A亲和柱pH 4.2洗脱液的HIC分析。

[0671] 图7D示出了使用共同的轻链技术生成的bsTNF-[TLQ]的样品的蛋白A亲和柱pH 3.4洗脱液的HIC分析。

[0672] 从使用共同的轻链技术生成的bsTNF-[Q311R]样品中获得了相似的色谱图。

[0673] 表15.

| 洗脱 pH | % TNF-[TLQ] | % bsTNF-[TLQ] | % aVb5 |
|-----------|-------------|---------------|--------|
| 4.7 | 2.9 | 89.6 | 7.4 |
| 4.2 | 1.3 | 96.8 | 1.9 |
| 3.4 | 未测定 | 47.6 | 52.4 |
| *N.D.=未检出 | | | |

[0675] 表16.

| 洗脱 pH | % TNF-[Q311R] | % bsTNF-[Q311R] | % aVb5 |
|-----------|---------------|-----------------|------------|
| 4.6 | 100 (73.3) | 未测定 | 未测定 |
| 4.2 | 1.9 (0.3) | 97.0 (15.8) | 1.1 (0.18) |
| 3.4 | 未测定 | 51.4 (5.3) | 48.6 (5.1) |
| *N.D.=未检出 | | | |

[0678] 方法

[0679] 在实验中使用了亲本抗体TNF-[Q311R]、TNF-[TLQ]和aVb5(参见表8)。亲本抗TNF和抗 $\alpha\beta V$ 抗体共用一条共同的轻链,因此在实验中使用mAb可以最大程度地减少轻链错配可能生成的mAb种类。

[0680] 根据制造商规程,使用为0.5:0.5:3.0的TNF-[Q311R]或TNF-[TLQ]重链:aVb5重链:轻链的质粒的摩尔比,在Expi293细胞中进行TNF-[Q311R]和aVb5或TNF-[TLQ]和aVb5的共转染。为了确定近似的相对表达水平,还使用为1.0:3.0的重链质粒:轻链质粒的摩尔比进行了亲本mAb的单独转染,并使用Octet测定了滴度。将大约50mL的每种上清液施加到1mL mAbSelect Sure色谱柱上,并使用50mM柠檬酸盐、pH 4.7(或4.6)、4.2和3.4的3步pH步骤梯度洗脱。收集级分、浓缩并缓冲交换到1X PBS中,然后进行HIC分析。

[0681] 实施例8.Q311R或T307P/L309Q/Q311R突变对抗体血清半衰期无影响

[0682] 使用Tg32半合子小鼠研究所选抗体的PK特性。在这些实验中,RSV-L具有约7天的半衰期。携带Q311R或T307P/L309Q/Q311R突变的同源二聚体亲本Ab(抗体RSV-L[Q311R]和RSV-L[TLQ])均具有至少与野生型mAb一样长的半衰期(分别约为7天和9天)。当被非对称地引入双特异性抗体中时,这些突变对血清半衰期也几乎没有影响。bsRSV-L[Q311R]和bsRSV-L[TLQ]的血清半衰期分别为 $11/1 \pm 3.6$ 天和 4.8 ± 2.0 天。RSV-L血清半衰期为 7.0 ± 3.9 天,RSV-L[TLQ]半衰期为 9.0 ± 4.0 天,RSV-L[Q311R]血清半衰期为 6.7 ± 3.4 天。I253D突

变型Ab不结合FcRn,并在实验中用作对照。

[0683] 图8示出了所选变体的药代动力学分析的结果。这些结果与体外FcRn结合分析一致(实施例3)。实验结果表明,将Q311R或T307P/L309Q/Q311R突变非对称地引入到使用一系列技术生成的双特异性抗体中,导致抗体保持其正常血清半衰期,并允许双特异性抗体的差异蛋白A亲和纯化而不污染亲本单特异性抗体。

[0684] 方法

[0685] Tg32半合子小鼠(Jackson Laboratories stock.#014565)用于抗体药代动力学(PK)研究。这些小鼠是FcRn的人 α -微球蛋白亚基的转基因动物,因此有助于预测人的血清半衰期。(Petkova等人,Int Immunol,第18卷,第1759-1769页,2006年)。向小鼠经由尾部静脉以2mg/kg的剂量静脉注射测试Ab,每组4只动物。在1小时、1天、3天、7天、14天和21天获取时间点。在指定时间点从CO₂麻醉的小鼠获得连续眶后放血,并通过心脏穿刺终端取血(terminal bleeds)。在室温下30分钟之后,将血样以3,000×g离心15分钟并收集血清用于分析。

[0686] 为了检测小鼠血清中的测试Ab,使用电化学发光免疫测定法。将链霉亲和素胶体金多阵列96孔板(Meso Scale Discovery)用3 μ g/mL的Fc片段特异性的Biotin-F(ab')₂片段g抗h IgG以50 μ L/孔在起始块(Thermo)中包被过夜(Jackson Immunoresearch cat.#109-066-008);然后用含有Tween 20的Tris缓冲盐溶液(TBST)洗涤。在起始块中将血清样品在5%CD-1小鼠血清中稀释(1:20,然后连续2倍稀释),在板上温育2小时并洗涤。加入在1%BSA-TBST中的Ru⁺⁺标记的抗-h IgG F(ab')₂(由Jackson 109-006-097制备),并在板上温育1.5小时并洗涤。添加具有表面活性剂的200微升/孔的读取缓冲液,并在MSD Sector Imager6000板读取器中读取板。使用Prism6.01软件中的4参数非线性回归程序,由标准曲线确定IgG2b Ab的血清浓度。

[0687] 使用Prism 6.01版软件,利用通过自然对数浓度对时间的非线性回归拟合的1-期指数衰减模型来测定PK研究的消除期(β 期)的最终半衰期($t_{1/2}$)计算。最小二乘非线性衰减模型通过拟合浓度的倒数进行加权。消除期(β 期)的半衰期计算使用式 $t_{1/2} = \ln 2 / \beta$ 来确定,其中 β 是通过第一剂量后起始的最小二乘回归分析拟合的线的负斜率。通过对测试组内各动物所计算的 $t_{1/2}$ 值取平均值来确定Ab的最终半衰期值。

<110> Chiu, Mark
 Zwolak, Adam
 <120> 具有非对称 CH2-CH3 区突变的工程化多特异性抗体和其他多聚体蛋白
 <130> JBI5124WOPCT
 <140> 待转让
 <141> 2018-06-04
 <150> 62/515316
 <151> 2017-06-05
 <160> 105
 <170> PatentIn 版本 3.5
 <210> 1
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Z 结构域
 <400> 1
 Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile
 1 5 10 15
 Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
 20 25 30
 Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45
 [0001] Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55
 <210> 2
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> IgG1 HC2-HC3 Q311K
 <400> 2
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 1 5 10 15
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 20 25 30
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 50 55 60
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Lys
 65 70 75 80
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 85 90 95
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 100 105 110
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 115 120 125

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 130 135 140
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 145 150 155 160
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 165 170 175
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 180 185 190
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 195 200 205
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215
 <210> 3
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> IgG1 HC2-HC3 Q311R
 <400> 3
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 1 5 10 15
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 20 25 30
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45
 [0002] Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 50 55 60
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Arg
 65 70 75 80
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 85 90 95
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 100 105 110
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 115 120 125
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 130 135 140
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 145 150 155 160
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 165 170 175
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 180 185 190
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 195 200 205
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215
 <210> 4
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> IIgG1 HC2-HC3 T307P/L309Q
 <400> 4
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 1 5 10 15
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 20 25 30
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 50 55 60
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Val Gln His Gln
 65 70 75 80
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 85 90 95
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 100 105 110
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 115 120 125
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 130 135 140
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 145 150 155 160
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 165 170 175
 [0003] Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 180 185 190
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 195 200 205
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215
 <210> 5
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> IgG1 HC2-HC3 T307P/L309Q/Q311R
 <400> 5
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 1 5 10 15
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 20 25 30
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 50 55 60
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Val Gln His Arg
 65 70 75 80
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 85 90 95
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro

100 105 110
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 115 120 125
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 130 135 140
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 145 150 155 160
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 165 170 175
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 180 185 190
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 195 200 205
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215
 <210> 6
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> IgG1 HC2-HC3 Q311K/F405L
 <400> 6
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 1 5 10 15
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 20 25 30
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 50 55 60
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Lys
 65 70 75 80
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 85 90 95
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 100 105 110
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 115 120 125
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 130 135 140
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 145 150 155 160
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Leu Tyr
 165 170 175
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 180 185 190
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 195 200 205
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215
 <210> 7

[0004]

<211> 216
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> IgG1 HC2-HC3 Q311R/F405L
 <400> 7
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 1 5 10 15
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 20 25 30
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 50 55 60
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Arg
 65 70 75 80
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 85 90 95
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 100 105 110
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 115 120 125
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 130 135 140
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 [0005] 145 150 155 160
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Leu Tyr
 165 170 175
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 180 185 190
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 195 200 205
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215
 <210> 8
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> IgG1 HC2-HC3 T307P/L309Q/F405L
 <400> 8
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 1 5 10 15
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 20 25 30
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 50 55 60
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Val Gln His Gln
 65 70 75 80

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 85 90 95
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 100 105 110
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 115 120 125
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 130 135 140
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 145 150 155 160
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Leu Tyr
 165 170 175
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 180 185 190
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 195 200 205
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215
 <210> 9
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> IgG1 HC2-HC3 T307P/L309Q/Q311R/F405L
 <400> 9
 [0006] Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 1 5 10 15
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 20 25 30
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 50 55 60
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Val Gln His Arg
 65 70 75 80
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 85 90 95
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 100 105 110
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 115 120 125
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 130 135 140
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 145 150 155 160
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Leu Tyr
 165 170 175
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 180 185 190
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 195 200 205

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215
 <210> 10
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> IgG1 HC2-HC3 Q311K/K409R
 <400> 10
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 1 5 10 15
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 20 25 30
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 50 55 60
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Lys
 65 70 75 80
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 85 90 95
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 100 105 110
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 115 120 125
 [0007] Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 130 135 140
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 145 150 155 160
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 165 170 175
 Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 180 185 190
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 195 200 205
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215
 <210> 11
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> IgG1 HC2-HC3 Q311R/K409R
 <400> 11
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 1 5 10 15
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 20 25 30
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

180 185 190
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 195 200 205
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215
 <210> 13
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> IgG1 HC2-HC3 T307P/L309Q/Q311R/K409R
 <400> 13
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 1 5 10 15
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 20 25 30
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 50 55 60
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Val Gln His Arg
 65 70 75 80
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 85 90 95
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 100 105 110
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 115 120 125
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 130 135 140
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 145 150 155 160
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 165 170 175
 Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 180 185 190
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 195 200 205
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215
 <210> 14
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> IgG1 HC2-HC3 Q311K/ T366W
 <400> 14
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 1 5 10 15
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 20 25 30

[0009]

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 50 55 60
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Lys
 65 70 75 80
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 85 90 95
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 100 105 110
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 115 120 125
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 130 135 140
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 145 150 155 160
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 165 170 175
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 180 185 190
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 195 200 205
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

[0010]

<210> 15
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> IgG1 HC2-HC3 Q311R/T366W
 <400> 15
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 1 5 10 15
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 20 25 30
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 50 55 60
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Arg
 65 70 75 80
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 85 90 95
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 100 105 110
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 115 120 125
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 130 135 140
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 145 150 155 160

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 165 170 175
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 180 185 190
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 195 200 205
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215
 <210> 16
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> IgG1 HC2-HC3 T307P/L309Q/ T366W
 <400> 16
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 1 5 10 15
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 20 25 30
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 50 55 60
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Val Gln His Gln
 65 70 75 80
 [0011] Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 85 90 95
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 100 105 110
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 115 120 125
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 130 135 140
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 145 150 155 160
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 165 170 175
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 180 185 190
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 195 200 205
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215
 <210> 17
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> IgG1 HC2-HC3 T307P/L309Q/Q311R/ T366W
 <400> 17
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

```

1           5           10           15
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
           20           25           30
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
           35           40           45
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
           50           55           60
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Val Gln His Arg
65           70           75           80
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
           85           90           95
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
           100          105          110
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
           115          120          125
Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
           130          135          140
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
145          150          155          160
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
           165          170          175
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
           180          185          190
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
           195          200          205
[0012] Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
           210          215
<210> 18
<211> 216
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> IgG1 HC2-HC3 Q311K/T366S/L368A/Y407V
<400> 18
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
1           5           10           15
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
           20           25           30
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
           35           40           45
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
           50           55           60
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Lys
65           70           75           80
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
           85           90           95
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
           100          105          110
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
           115          120          125
Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

```

130 135 140
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 145 150 155 160
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val
 165 170 175
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 180 185 190
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 195 200 205
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215
 <210> 19
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> IgG1 HC2-HC3 Q311R/T366S/L368A/Y407V
 <400> 19
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 1 5 10 15
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 20 25 30
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 50 55 60
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Arg
 65 70 75 80
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 85 90 95
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 100 105 110
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 115 120 125
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 130 135 140
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 145 150 155 160
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val
 165 170 175
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 180 185 190
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 195 200 205
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215
 <210> 20
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>

[0013]

<223> IgG1 HC2-HC3 T307P/L309Q/ T366S/L368A/Y407V
 <400> 20
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 1 5 10 15
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 20 25 30
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 50 55 60
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Val Gln His Gln
 65 70 75 80
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 85 90 95
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 100 105 110
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 115 120 125
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 130 135 140
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 145 150 155 160
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val
 165 170 175
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 180 185 190
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 195 200 205
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215
 <210> 21
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> IgG1 HC2-HC3 T307P/L309Q/Q311R/ T366S/L368A/Y407V
 <400> 21
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 1 5 10 15
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 20 25 30
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 50 55 60
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Val Gln His Arg
 65 70 75 80
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 85 90 95
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 100 105 110

[0014]

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 115 120 125
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 130 135 140
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 145 150 155 160
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val
 165 170 175
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 180 185 190
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 195 200 205
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215
 <210> 22
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 22
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 1 5 10 15
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 20 25 30
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45
 [0015] Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 50 55 60
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 65 70 75 80
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 85 90 95
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 100 105 110
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 115 120 125
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 130 135 140
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 145 150 155 160
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 165 170 175
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 180 185 190
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 195 200 205
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215
 <210> 23
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> IgG1 CH2-CH3 K409R
 <400> 23
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 1 5 10 15
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 20 25 30
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 50 55 60
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 65 70 75 80
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 85 90 95
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 100 105 110
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 115 120 125
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 130 135 140
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 145 150 155 160
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 165 170 175
 [0016] Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 180 185 190
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 195 200 205
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215
 <210> 24
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> IgG1 CH2-CH3 F405L
 <400> 24
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 1 5 10 15
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 20 25 30
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 50 55 60
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 65 70 75 80
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 85 90 95
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro

```

          100              105              110
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
          115              120              125
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
          130              135              140
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
145              150              155              160
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Leu Tyr
          165              170              175
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
          180              185              190
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
          195              200              205
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
          210              215
<210> 25
<211> 216
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> IgG1 CH2-CH3 T366S/L368A/Y407V
<400> 25
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
1          5          10          15
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
          20          25          30
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
          35          40          45
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
50          55          60
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
65          70          75          80
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
          85          90          95
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
          100          105          110
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
          115          120          125
Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
          130          135          140
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
145          150          155          160
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val
          165          170          175
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
          180          185          190
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
          195          200          205
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
          210          215
<210> 26

```

[0017]

<211> 216
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> IgG1 CH2-CH3 T366W
 <400> 26
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 1 5 10 15
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 20 25 30
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 50 55 60
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 65 70 75 80
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 85 90 95
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 100 105 110
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 115 120 125
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 130 135 140
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 145 150 155 160
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 165 170 175
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 180 185 190
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 195 200 205
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

[0018]

<210> 27
 <211> 648
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> IgG1 CH2-CH3 Q311K
 <400> 27
 cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc 60
 atgatctccc ggaccctcga ggtcatatgc gtgggtgggtg acgtgagcca cgaagaccct 120
 gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg 180
 cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcacaag 240
 gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc 300
 atcgagaaaa ccatttccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 360
 cccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgctt ggtcaaagge 420
 ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 480
 aagaccacgc ctcccgtgct ggactcgcac ggctccttct tcctctacag caagctcacc 540
 gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gtcctctgat gcatgagget 600

| | | |
|--------|---|-----|
| | ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaa | 648 |
| | <210> 28 | |
| | <211> 648 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 人工序列 | |
| | <220> | |
| | <223> IgG1 CH2-CH3 Q311R | |
| | <400> 28 | |
| | cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc | 60 |
| | atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtgggtgtgg acgtgagcca cgaagaccct | 120 |
| | gaggtaagtc tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcca gacaaagccg | 180 |
| | cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcttccccgt cctgaccgg | 240 |
| | gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagcccc | 300 |
| | atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg | 360 |
| | ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgct ggtcaaagc | 420 |
| | ttctatccca ggcacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac | 480 |
| | aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctcctct tctctacag caagctcacc | 540 |
| | gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct | 600 |
| | ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaa | 648 |
| | <210> 29 | |
| | <211> 648 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 人工序列 | |
| | <220> | |
| | <223> IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q | |
| [0019] | <400> 29 | |
| | cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc | 60 |
| | atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtgggtgtgg acgtgagcca cgaagaccct | 120 |
| | gaggtaagtc tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcca gacaaagccg | 180 |
| | cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcttccccgt ccagcaccag | 240 |
| | gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagcccc | 300 |
| | atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg | 360 |
| | ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgct ggtcaaagc | 420 |
| | ttctatccca ggcacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac | 480 |
| | aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctcctct tctctacag caagctcacc | 540 |
| | gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct | 600 |
| | ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaa | 648 |
| | <210> 30 | |
| | <211> 648 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 人工序列 | |
| | <220> | |
| | <223> IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/Q311R | |
| | <400> 30 | |
| | cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc | 60 |
| | atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtgggtgtgg acgtgagcca cgaagaccct | 120 |
| | gaggtaagtc tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcca gacaaagccg | 180 |
| | cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcttccccgt ccagcaccgg | 240 |
| | gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagcccc | 300 |
| | atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg | 360 |
| | ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgct ggtcaaagc | 420 |

| | | |
|--------|---|-----|
| | ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac | 480 |
| | aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tctctacag caagctcacc | 540 |
| | gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct | 600 |
| | ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaa | 648 |
| | <210> 31 | |
| | <211> 648 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 人工序列 | |
| | <220> | |
| | <223> IgG1 CH2-CH3 Q311K/F405L | |
| | <400> 31 | |
| | cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc | 60 |
| | atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct | 120 |
| | gaggtaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcca gacaaagccg | 180 |
| | cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tctcaccgt cctgcacaag | 240 |
| | gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagcct cccagcccc | 300 |
| | atcgagaaaa ccattctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg | 360 |
| | ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgct ggtcaaagc | 420 |
| | ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac | 480 |
| | aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttcc tctctacag caagctcacc | 540 |
| | gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct | 600 |
| | ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaa | 648 |
| | <210> 32 | |
| | <211> 648 | |
| | <212> DNA | |
| [0020] | <213> 人工序列 | |
| | <220> | |
| | <223> IgG1 CH2-CH3 Q311R/F405L | |
| | <400> 32 | |
| | cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc | 60 |
| | atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct | 120 |
| | gaggtaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcca gacaaagccg | 180 |
| | cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tctcaccgt cctgcaccgg | 240 |
| | gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagcct cccagcccc | 300 |
| | atcgagaaaa ccattctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg | 360 |
| | ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgct ggtcaaagc | 420 |
| | ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac | 480 |
| | aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttcc tctctacag caagctcacc | 540 |
| | gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct | 600 |
| | ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaa | 648 |
| | <210> 33 | |
| | <211> 648 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 人工序列 | |
| | <220> | |
| | <223> IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/F405L | |
| | <400> 33 | |
| | cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc | 60 |
| | atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct | 120 |
| | gaggtaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcca gacaaagccg | 180 |
| | cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tctccccgt ccagcaccag | 240 |

| | | |
|--------|---|-----|
| | gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagcct cccagcccc | 300 |
| | atcgagaaaa ccattctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg | 360 |
| | ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaagc | 420 |
| | ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac | 480 |
| | aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttc tgctctacag caagctcacc | 540 |
| | gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgagget | 600 |
| | ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaa | 648 |
| | <210> 34 | |
| | <211> 648 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 人工序列 | |
| | <220> | |
| | <223> IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/Q311R/F405L | |
| | <400> 34 | |
| | cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc | 60 |
| | atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtgggtgtgg acgtgagcca cgaagacct | 120 |
| | gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcca gacaaagccg | 180 |
| | cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctccccgt ccagcaccgg | 240 |
| | gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagcct cccagcccc | 300 |
| | atcgagaaaa ccattctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg | 360 |
| | ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaagc | 420 |
| | ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac | 480 |
| | aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttc tgctctacag caagctcacc | 540 |
| | gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgagget | 600 |
| | ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaa | 648 |
| [0021] | <210> 35 | |
| | <211> 648 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 人工序列 | |
| | <220> | |
| | <223> IgG1 CH2-CH3 Q311K/K409R | |
| | <400> 35 | |
| | cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc | 60 |
| | atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtgggtgtgg acgtgagcca cgaagacct | 120 |
| | gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcca gacaaagccg | 180 |
| | cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctaccctg cctgcacaag | 240 |
| | gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagcct cccagcccc | 300 |
| | atcgagaaaa ccattctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg | 360 |
| | ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaagc | 420 |
| | ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac | 480 |
| | aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttc tcctctacag ccggtcacc | 540 |
| | gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgagget | 600 |
| | ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaa | 648 |
| | <210> 36 | |
| | <211> 648 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 人工序列 | |
| | <220> | |
| | <223> IgG1 CH2-CH3 Q311R/K409R | |
| | <400> 36 | |
| | cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc | 60 |

| | | | | | | |
|-------------------|--------------------------------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| atgatctccc | ggaccctga | ggtcacatgc | gtggtggtgg | acgtgagcca | cgaagaccct | 120 |
| gaggtcaagt | tcaactggta | cgtggacggc | gtggaggtgc | ataatgcca | gacaaagccg | 180 |
| cgggaggagc | agtacaacag | cacgtaccgt | gtggtcagcg | tcctcaccgt | cctgcaccgg | 240 |
| gactggctga | atggcaagga | gtacaagtgc | aaggtctcca | acaagccct | cccagccccc | 300 |
| atcgagaaaa | ccatctccaa | agccaaaggg | cagccccgag | aaccacaggt | gtacaccctg | 360 |
| ccccatccc | gggatgagct | gaccaagaac | caggtcagcc | tgacctgcct | ggtcaaagge | 420 |
| ttctatccca | gcgacatcgc | cgtggagtgg | gagagcaatg | ggcagccgga | gaacaactac | 480 |
| aagaccacgc | ctcccgtgct | ggactccgac | ggctccttct | tcctctacag | ccggtcacc | 540 |
| gtggacaaga | gcaggtggca | gcaggggaac | gtcttctcat | gctccgtgat | gcatgagget | 600 |
| ctgcacaacc | actacacgca | gaagagcctc | tcctgtctc | cgggtaaa | | 648 |
| <210> | 37 | | | | | |
| <211> | 648 | | | | | |
| <212> | DNA | | | | | |
| <213> | 人工序列 | | | | | |
| <220> | | | | | | |
| <223> | IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/K409R | | | | | |
| <400> | 37 | | | | | |
| cctgaactgc | tggggggacc | gtcagtcttc | ctcttcccc | caaaaccca | ggacaccctc | 60 |
| atgatctccc | ggaccctga | ggtcacatgc | gtggtggtgg | acgtgagcca | cgaagaccct | 120 |
| gaggtcaagt | tcaactggta | cgtggacggc | gtggaggtgc | ataatgcca | gacaaagccg | 180 |
| cgggaggagc | agtacaacag | cacgtaccgt | gtggtcagcg | tcctccccgt | ccagcaccag | 240 |
| gactggctga | atggcaagga | gtacaagtgc | aaggtctcca | acaagccct | cccagccccc | 300 |
| atcgagaaaa | ccatctccaa | agccaaaggg | cagccccgag | aaccacaggt | gtacaccctg | 360 |
| ccccatccc | gggatgagct | gaccaagaac | caggtcagcc | tgacctgcct | ggtcaaagge | 420 |
| ttctatccca | gcgacatcgc | cgtggagtgg | gagagcaatg | ggcagccgga | gaacaactac | 480 |
| [0022] aagaccacgc | ctcccgtgct | ggactccgac | ggctccttct | tcctctacag | ccggtcacc | 540 |
| gtggacaaga | gcaggtggca | gcaggggaac | gtcttctcat | gctccgtgat | gcatgagget | 600 |
| ctgcacaacc | actacacgca | gaagagcctc | tcctgtctc | cgggtaaa | | 648 |
| <210> | 38 | | | | | |
| <211> | 648 | | | | | |
| <212> | DNA | | | | | |
| <213> | 人工序列 | | | | | |
| <220> | | | | | | |
| <223> | IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/Q311R/K409R | | | | | |
| <400> | 38 | | | | | |
| cctgaactgc | tggggggacc | gtcagtcttc | ctcttcccc | caaaaccca | ggacaccctc | 60 |
| atgatctccc | ggaccctga | ggtcacatgc | gtggtggtgg | acgtgagcca | cgaagaccct | 120 |
| gaggtcaagt | tcaactggta | cgtggacggc | gtggaggtgc | ataatgcca | gacaaagccg | 180 |
| cgggaggagc | agtacaacag | cacgtaccgt | gtggtcagcg | tcctccccgt | ccagcaccgg | 240 |
| gactggctga | atggcaagga | gtacaagtgc | aaggtctcca | acaagccct | cccagccccc | 300 |
| atcgagaaaa | ccatctccaa | agccaaaggg | cagccccgag | aaccacaggt | gtacaccctg | 360 |
| ccccatccc | gggatgagct | gaccaagaac | caggtcagcc | tgacctgcct | ggtcaaagge | 420 |
| ttctatccca | gcgacatcgc | cgtggagtgg | gagagcaatg | ggcagccgga | gaacaactac | 480 |
| aagaccacgc | ctcccgtgct | ggactccgac | ggctccttct | tcctctacag | ccggtcacc | 540 |
| gtggacaaga | gcaggtggca | gcaggggaac | gtcttctcat | gctccgtgat | gcatgagget | 600 |
| ctgcacaacc | actacacgca | gaagagcctc | tcctgtctc | cgggtaaa | | 648 |
| <210> | 39 | | | | | |
| <211> | 648 | | | | | |
| <212> | DNA | | | | | |
| <213> | 人工序列 | | | | | |
| <220> | | | | | | |

| | | |
|--------|---|-----|
| | <223> IgG1 CH2-CH3 Q311K/ T366W | |
| | <400> 39 | |
| | cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc | 60 |
| | atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct | 120 |
| | gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcca gacaaagccg | 180 |
| | cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcacaag | 240 |
| | gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc | 300 |
| | atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg | 360 |
| | ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgtggtgcct ggtcaaagge | 420 |
| | ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac | 480 |
| | aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc | 540 |
| | gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgagget | 600 |
| | ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaa | 648 |
| | <210> 40 | |
| | <211> 648 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 人工序列 | |
| | <220> | |
| | <223> IgG1 CH2-CH3 Q311R/T366W | |
| | <400> 40 | |
| | cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc | 60 |
| | atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct | 120 |
| | gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcca gacaaagccg | 180 |
| | cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccgg | 240 |
| | gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc | 300 |
| [0023] | atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg | 360 |
| | ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgtggtgcct ggtcaaagge | 420 |
| | ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac | 480 |
| | aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc | 540 |
| | gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgagget | 600 |
| | ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaa | 648 |
| | <210> 41 | |
| | <211> 648 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 人工序列 | |
| | <220> | |
| | <223> IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/ T366W | |
| | <400> 41 | |
| | cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc | 60 |
| | atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct | 120 |
| | gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcca gacaaagccg | 180 |
| | cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctccccgt ccagcaccag | 240 |
| | gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc | 300 |
| | atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg | 360 |
| | ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgtggtgcct ggtcaaagge | 420 |
| | ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac | 480 |
| | aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc | 540 |
| | gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgagget | 600 |
| | ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaa | 648 |
| | <210> 42 | |
| | <211> 648 | |

<212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/Q311R/ T366W
 <400> 42
 cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc 60
 atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 120
 gaggtaactg tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg 180
 cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcttccccgt ccagcaccgg 240
 gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc 300
 atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 360
 cccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tggtggtgct ggtcaaaggc 420
 ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 480
 aagaccacgc ctcccgtget ggactccgac ggctccttct tctctacag caagctcacc 540
 gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 600
 ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaa 648

<210> 43
 <211> 648
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> IgG1 CH2-CH3 Q311K/T366S/L368A/Y407V
 <400> 43

[0024]

cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc 60
 atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 120
 gaggtaactg tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg 180
 cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcttaccctg cctgcacaag 240
 gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc 300
 atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 360
 cccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgagctgctc cgtcaaaggc 420
 ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 480
 aagaccacgc ctcccgtget ggactccgac ggctccttct tctcgtgag caagctcacc 540
 gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 600
 ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaa 648

<210> 44
 <211> 648
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> IgG1 CH2-CH3 Q311R/T366S/L368A/Y407V
 <400> 44

cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc 60
 atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 120
 gaggtaactg tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg 180
 cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcttaccctg cctgcaccgg 240
 gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc 300
 atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 360
 cccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgagctgctc cgtcaaaggc 420
 ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 480
 aagaccacgc ctcccgtget ggactccgac ggctccttct tctcgtgag caagctcacc 540
 gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 600

| | | |
|--------|---|-----|
| | ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaa | 648 |
| | <210> 45 | |
| | <211> 648 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 人工序列 | |
| | <220> | |
| | <223> IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/ T366S/L368A/Y407V | |
| | <400> 45 | |
| | cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc | 60 |
| | atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct | 120 |
| | gaggtaaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcca gacaaagccg | 180 |
| | cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcttccccgt ccagaccag | 240 |
| | gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagcccc | 300 |
| | atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg | 360 |
| | ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgagctgctc cgtcaaagc | 420 |
| | ttctatccca ggcacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac | 480 |
| | aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tctctgtgag caagctcacc | 540 |
| | gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggt | 600 |
| | ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaa | 648 |
| | <210> 46 | |
| | <211> 648 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 人工序列 | |
| | <220> | |
| | <223> IgG1 CH2-CH3 T307P/L309Q/Q311R/ T366S/L368A/Y407V | |
| [0025] | <400> 46 | |
| | cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc | 60 |
| | atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct | 120 |
| | gaggtaaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcca gacaaagccg | 180 |
| | cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcttccccgt ccagaccgg | 240 |
| | gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagcccc | 300 |
| | atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg | 360 |
| | ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgagctgctc cgtcaaagc | 420 |
| | ttctatccca ggcacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac | 480 |
| | aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tctctgtgag caagctcacc | 540 |
| | gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggt | 600 |
| | ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaa | 648 |
| | <210> 47 | |
| | <211> 648 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 智人(Homo sapiens) | |
| | <400> 47 | |
| | cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc | 60 |
| | atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct | 120 |
| | gaggtaaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcca gacaaagccg | 180 |
| | cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tctcaccgt cctgcaccag | 240 |
| | gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagcccc | 300 |
| | atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg | 360 |
| | ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgctt ggtcaaagc | 420 |
| | ttctatccca ggcacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac | 480 |
| | aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tctctacag caagctcacc | 540 |

| | | |
|--------|---|-----|
| | gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct | 600 |
| | ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaa | 648 |
| | <210> 48 | |
| | <211> 648 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 人工序列 | |
| | <220> | |
| | <223> IgG1 CH2-CH3 K409R | |
| | <400> 48 | |
| | cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc | 60 |
| | atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct | 120 |
| | gaggtaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcca gacaaagccg | 180 |
| | cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tctcaccgt cctgcaccag | 240 |
| | gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagcct cccagcccc | 300 |
| | atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg | 360 |
| | ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgct ggtcaaagc | 420 |
| | ttctatccca ggcacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac | 480 |
| | aagaccagc cteccgtgct ggactccgac ggctcctct tctctacag cggctcacc | 540 |
| | gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct | 600 |
| | ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaa | 648 |
| | <210> 49 | |
| | <211> 648 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 人工序列 | |
| | <220> | |
| [0026] | <223> IgG1 CH2-CH3 F405L | |
| | <400> 49 | |
| | cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc | 60 |
| | atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct | 120 |
| | gaggtaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcca gacaaagccg | 180 |
| | cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tctcaccgt cctgcaccag | 240 |
| | gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagcct cccagcccc | 300 |
| | atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg | 360 |
| | ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgct ggtcaaagc | 420 |
| | ttctatccca ggcacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac | 480 |
| | aagaccagc cteccgtgct ggactccgac ggctccttc tgctctacag caagctcacc | 540 |
| | gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct | 600 |
| | ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaa | 648 |
| | <210> 50 | |
| | <211> 648 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 人工序列 | |
| | <220> | |
| | <223> IgG1 CH2-CH3 T366S/L368A/Y407V | |
| | <400> 50 | |
| | cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc | 60 |
| | atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct | 120 |
| | gaggtaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcca gacaaagccg | 180 |
| | cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tctcaccgt cctgcaccag | 240 |
| | gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagcct cccagcccc | 300 |
| | atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg | 360 |

ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgagctgcgc cgtcaaaggc 420
 ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 480
 aagaccacgc cteccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctcgtgag caagctcacc 540
 gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 600
 ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaa 648

<210> 51
 <211> 648
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> IgG1 CH2-CH3 T366W
 <400> 51

cctgaactgc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacecaa ggacaccctc 60
 atgatctccc ggaccctga ggteacatgc gtgggtggg acgtgagcca cgaagaccct 120
 gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg 180
 cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcacctg cctgcaccag 240
 gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagcct cccagcccc 300
 atcgagaaaa ccattctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 360
 cccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgtggtgcct ggtcaaagge 420
 ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 480
 aagaccacgc cteccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc 540
 gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 600
 ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaa 648

<210> 52
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> IgG2 CH2-CH3 Q311R
 <400> 52

[0027]

Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 1 5 10 15
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 20 25 30
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 35 40 45
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 50 55 60
 Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Arg Asp
 65 70 75 80
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 85 90 95
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg
 100 105 110
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 115 120 125
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 130 135 140
 Ile Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 145 150 155 160
 Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser

165 170 175
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 180 185 190
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 195 200 205
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215
 <210> 53
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> IgG2 CH2-CH3 T307P/V309Q/Q311R
 <400> 53
 Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 1 5 10 15
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 20 25 30
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 35 40 45
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 50 55 60
 Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Pro Val Gln His Arg Asp
 65 70 75 80
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 85 90 95
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg
 100 105 110
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 115 120 125
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 130 135 140
 Ile Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 145 150 155 160
 Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 165 170 175
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 180 185 190
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 195 200 205
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215
 <210> 54
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 54
 Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 1 5 10 15
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 20 25 30

[0028]

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 35 40 45
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 50 55 60
 Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp
 65 70 75 80
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 85 90 95
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg
 100 105 110
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 115 120 125
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 130 135 140
 Ile Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 145 150 155 160
 Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 165 170 175
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 180 185 190
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 195 200 205
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

[0029]

<210> 55
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> IgG2 F405L/K409R
 <400> 55
 Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 1 5 10 15
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 20 25 30
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 35 40 45
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 50 55 60
 Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp
 65 70 75 80
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 85 90 95
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg
 100 105 110
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 115 120 125
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 130 135 140
 Ile Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 145 150 155 160

Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Leu Tyr Ser
 165 170 175
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 180 185 190
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 195 200 205
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215
 <210> 56
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> IgG4 CH2-CH3 T307P/V309Q
 <400> 56
 Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 1 5 10 15
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 20 25 30
 Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 50 55 60
 Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 65 70 75 80
 [0030] Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
 85 90 95
 Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 100 105 110
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
 115 120 125
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 130 135 140
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 145 150 155 160
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 165 170 175
 Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
 180 185 190
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 195 200 205
 Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 210 215
 <210> 57
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 1FU1 接头
 <400> 57
 Ala Ser Leu Asp Thr Thr Ala Glu Asn Gln Ala Lys Asn Glu His Leu

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|-------|-----|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 1 | | 5 | | | | | | 10 | | | | | 15 | | |
| | Gln | Lys | Glu | Asn | Glu | Arg | Leu | Leu | Arg | Asp | Trp | Asn | Asp | Val | Gln | Gly |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | |
| | Arg | Phe | Glu | Lys | Gly | Ser | | | | | | | | | | |
| | | | 35 | | | | | | | | | | | | | |
| | <210> | | 58 | | | | | | | | | | | | | |
| | <211> | | 30 | | | | | | | | | | | | | |
| | <212> | | PRT | | | | | | | | | | | | | |
| | <213> | | 人工序列 | | | | | | | | | | | | | |
| | <220> | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <223> | | IDC1(13AA)2 接头 | | | | | | | | | | | | | |
| | <400> | | 58 | | | | | | | | | | | | | |
| | Ala | Ser | Glu | Lys | Asn | Lys | Arg | Ser | Thr | Pro | Tyr | Ile | Glu | Arg | Ala | Glu |
| | 1 | | | 5 | | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| | Lys | Asn | Lys | Arg | Ser | Thr | Pro | Tyr | Ile | Glu | Arg | Ala | Gly | Ser | | |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | |
| | <210> | | 59 | | | | | | | | | | | | | |
| | <211> | | 43 | | | | | | | | | | | | | |
| | <212> | | PRT | | | | | | | | | | | | | |
| | <213> | | 人工序列 | | | | | | | | | | | | | |
| | <220> | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <223> | | IDC1(13AA)3 接头 | | | | | | | | | | | | | |
| | <400> | | 59 | | | | | | | | | | | | | |
| | Ala | Ser | Glu | Lys | Asn | Lys | Arg | Ser | Thr | Pro | Tyr | Ile | Glu | Arg | Ala | Glu |
| | 1 | | | 5 | | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| [0031] | Lys | Asn | Lys | Arg | Ser | Thr | Pro | Tyr | Ile | Glu | Arg | Ala | Glu | Lys | Asn | Lys |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | |
| | Arg | Ser | Thr | Pro | Tyr | Ile | Glu | Arg | Ala | Gly | Ser | | | | | |
| | | | 35 | | | | | 40 | | | | | | | | |
| | <210> | | 60 | | | | | | | | | | | | | |
| | <211> | | 24 | | | | | | | | | | | | | |
| | <212> | | PRT | | | | | | | | | | | | | |
| | <213> | | 人工序列 | | | | | | | | | | | | | |
| | <220> | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <223> | | AS(AP)10GS 接头 | | | | | | | | | | | | | |
| | <400> | | 60 | | | | | | | | | | | | | |
| | Ala | Ser | Ala | Pro | Ala | Pro | Ala | Pro | Ala | Pro | Ala | Pro | Ala | Pro | Ala | Pro |
| | 1 | | | 5 | | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| | Ala | Pro | Ala | Pro | Ala | Pro | Gly | Ser | | | | | | | | |
| | | | 20 | | | | | | | | | | | | | |
| | <210> | | 61 | | | | | | | | | | | | | |
| | <211> | | 44 | | | | | | | | | | | | | |
| | <212> | | PRT | | | | | | | | | | | | | |
| | <213> | | 人工序列 | | | | | | | | | | | | | |
| | <220> | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <223> | | AS(AP)20GS 接头 | | | | | | | | | | | | | |
| | <400> | | 61 | | | | | | | | | | | | | |
| | Ala | Ser | Ala | Pro | Ala | Pro | Ala | Pro | Ala | Pro | Ala | Pro | Ala | Pro | Ala | Pro |
| | 1 | | | 5 | | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| | Ala | Pro | Ala | Pro | Ala | Pro | Ala | Pro | Ala | Pro | Ala | Pro | Ala | Pro | Ala | Pro |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | |

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Gly Ser
 35 40
 <210> 62
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> (EAAAK)4 接头
 <400> 62
 Ala Ser Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala
 1 5 10 15
 Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala Gly Ser
 20 25
 <210> 63
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> (EAAAK)8 接头
 <400> 63
 Ala Ser Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala
 1 5 10 15
 Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala
 20 25 30
 Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala Gly Ser
 35 40 45
 [0032]
 <210> 64
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> GS(G4S)4 接头
 <400> 64
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 20
 <210> 65
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> GS(G4S)8 接头
 <400> 65
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 20 25 30
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 35 40
 <210> 66

<211> 62
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> GS12X(G4S)接头
 <400> 66
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 20 25 30
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 35 40 45
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 50 55 60

<210> 67
 <211> 82
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> GS16X(G4S)接头
 <400> 67
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 20 25 30
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 35 40 45
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 50 55 60
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 65 70 75 80
 Gly Ser

[0033]

<210> 68
 <211> 457
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> gp120-R HC (K409R)
 <400> 68
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Ser Asn Phe
 20 25 30
 Val Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Phe Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asn Lys Glu Phe Ser Ala Lys Phe
 50 55 60
 Gln Asp Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | | |
| | Ala | Arg | Val | Gly | Pro | Tyr | Ser | Trp | Asp | Asp | Ser | Pro | Gln | Asp | Asn | Tyr | |
| | | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | |
| | Tyr | Met | Asp | Val | Trp | Gly | Lys | Gly | Thr | Thr | Val | Ile | Val | Ser | Ser | Ala | |
| | | | | 115 | | | | 120 | | | | | | 125 | | | |
| | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu | Ala | Pro | Ser | Ser | Lys | Ser | |
| | | | | 130 | | | | 135 | | | | | | 140 | | | |
| | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | |
| | 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 | |
| | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | |
| | | | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | |
| | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | |
| | | | | 180 | | | | | | | 185 | | | | | 190 | |
| | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | |
| | | | | 195 | | | | 200 | | | | | | 205 | | | |
| | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Arg | |
| | 210 | | | | | | 215 | | | | | | | 220 | | | |
| | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | |
| | 225 | | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | 240 | |
| | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | |
| | | | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | |
| | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | |
| | | | | 260 | | | | | | | 265 | | | | | 270 | |
| | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | |
| | | | | 275 | | | | | | | | | | 280 | | 285 | |
| [0034] | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | |
| | 290 | | | | | | 295 | | | | | | | 300 | | | |
| | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | |
| | 305 | | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | 320 | |
| | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | |
| | | | | | | 325 | | | | | | 330 | | | | 335 | |
| | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | |
| | | | | 340 | | | | | | | 345 | | | | | 350 | |
| | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Arg | Glu | Glu | Met | |
| | | | | 355 | | | | | | | | | | 360 | | 365 | |
| | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Thr | Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | |
| | | | | 370 | | | | | | | | | | 375 | | 380 | |
| | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp | Glu | Ser | Asn | Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | |
| | 385 | | | | | | 390 | | | | | 395 | | | | 400 | |
| | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | Val | Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | |
| | | | | | | 405 | | | | | | 410 | | | | 415 | |
| | Tyr | Ser | Arg | Leu | Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Arg | Trp | Gln | Gln | Gly | Asn | Val | |
| | | | | 420 | | | | | | | | | | 425 | | 430 | |
| | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met | His | Glu | Ala | Leu | His | Asn | His | Tyr | Thr | Gln | |
| | | | | 435 | | | | | | | | | | 440 | | 445 | |
| | Lys | Ser | Leu | Ser | Leu | Ser | Pro | Gly | Lys | | | | | | | | |
| | | | | 450 | | | | | 455 | | | | | | | | |
| | <210> | | | | | | | | | | | | | | | 69 | |
| | <211> | | | | | | | | | | | | | | | | 215 |
| | <212> | | | | | | | | | | | | | | | | PRT |
| | <213> | | | | | | | | | | | | | | | | 人工序列 |

<220>
 <223> gp120-R LC
 <400> 69
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Phe Ser Cys Arg Ser Ser His Ser Ile Arg Ser Arg
 20 25 30
 Arg Val Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Val
 35 40 45
 Ile His Gly Val Ser Asn Arg Ala Ser Gly Ile Ser Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Arg Val Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Val Tyr Gly Ala Ser Ser
 85 90 95
 Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Arg Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140
 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160
 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175
 [0035] Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 70
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 抗 RSV-L HC (F405L)
 <400> 70
 Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Leu Tyr Gly Phe Thr Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln

<400> 71
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asn
 20 25 30
 Gly Ile Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Pro Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Ile
 85 90 95
 Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190
 [0037] His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 72
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> RSV-L[Q311A] HC (Q311A/ F405L)
 <400> 72
 Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Leu Tyr Gly Phe Thr Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450
 <210> 74
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> RSV-L[Q311K] HC (Q311R/ F405L)
 <400> 74
 Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 [0040] Cys Ala Arg Leu Tyr Gly Phe Thr Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450
 <210> 75
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 [0041] <223> RSV-L[Q311K] HC (Q311H/ F405L)
 <400> 75
 Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Leu Tyr Gly Phe Thr Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His His Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450
 <210> 76
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> RSV-L[TL] HC (T307P/L309Q/ F405L)
 <400> 76
 Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Leu Tyr Gly Phe Thr Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 [0043] 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Pro Val Gln His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450
 <210> 77
 <211> 450
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> RSV-L[TLQ] HC (T307P/L309Q/Q311R/F405L)

<400> 77

Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Leu Tyr Gly Phe Thr Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 [0044] 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Pro Val Gln His Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450
 <210> 78
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> RSV-L[I253D] HC (I253D/F405L)
 <400> 78
 Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Leu Tyr Gly Phe Thr Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Asp
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

[0045]

260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
450

[0046]

<210> 79

<211> 449

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> aVb5 HC

<400> 79

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Arg Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Phe Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Val Gly Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Glu Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Val Asn Ile Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Ala Arg Gly Ser Tyr Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 [0047] Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys

<210> 80

<211> 215

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗 TNF 和抗 aVb5 LC

<400> 80

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
 85 90 95
 Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140
 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160
 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 81
 <211> 456
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> TNF HC
 <400> 81
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Asn Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Phe Met Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Lys Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Glu Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Arg Gly Ile Ala Ala Gly Gly Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
 100 105 110
 Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 115 120 125
 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 130 135 140
 Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 145 150 155 160
 Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val

[0048]

165 170 175
 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 180 185 190
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 195 200 205
 Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
 210 215 220
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 225 230 235 240
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 245 250 255
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 260 265 270
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 275 280 285
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 305 310 315 320
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 325 330 335
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 340 345 350
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 355 360 365
 [0049] Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 370 375 380
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 385 390 395 400
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 405 410 415
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 420 425 430
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 435 440 445
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455
 <210> 82
 <211> 456
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> TNF-[Q311R] HC
 <400> 82
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Asn Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Phe Met Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Lys Tyr Ala Asp Ser Val

<210> 83
 <211> 456
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> TNF-[TLQ] HC (T307P/L309Q/Q311R)
 <400> 83
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Asn Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Phe Met Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Lys Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Glu Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Arg Gly Ile Ala Ala Gly Gly Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
 100 105 110
 Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 115 120 125
 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 130 135 140
 [0051] Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 145 150 155 160
 Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 165 170 175
 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 180 185 190
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 195 200 205
 Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
 210 215 220
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 225 230 235 240
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 245 250 255
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 260 265 270
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 275 280 285
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Val Gln His Arg
 305 310 315 320
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 325 330 335
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 340 345 350

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 355 360 365
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 370 375 380
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 385 390 395 400
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 405 410 415
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 420 425 430
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 435 440 445
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455
 <210> 84
 <211> 456
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> TNF-knob[Q311R] HC (Q311R/T366W)
 <400> 84
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 [0052] Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Asn Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Phe Met Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Lys Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Glu Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Arg Gly Ile Ala Ala Gly Gly Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
 100 105 110
 Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 115 120 125
 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 130 135 140
 Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 145 150 155 160
 Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 165 170 175
 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 180 185 190
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 195 200 205
 Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
 210 215 220
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 225 230 235 240

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 245 250 255
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 260 265 270
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 275 280 285
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Arg
 305 310 315 320
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 325 330 335
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 340 345 350
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 355 360 365
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 370 375 380
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 385 390 395 400
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 405 410 415
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 420 425 430
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 435 440 445
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455
 <210> 85
 <211> 456
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> TNF-knob[TLQ] HC (T307P/L309Q/Q311R/T366W)
 <400> 85
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Asn Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Phe Met Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Lys Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Glu Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Arg Gly Ile Ala Ala Gly Gly Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
 100 105 110
 Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 115 120 125

[0053]

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 130 135 140
 Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 145 150 155 160
 Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 165 170 175
 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 180 185 190
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 195 200 205
 Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
 210 215 220
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 225 230 235 240
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 245 250 255
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 260 265 270
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 275 280 285
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Val Gln His Arg
 305 310 315 320
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 [0054] 325 330 335
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 340 345 350
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 355 360 365
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 370 375 380
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 385 390 395 400
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 405 410 415
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 420 425 430
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 435 440 445
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455
 <210> 86
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> aVb5-hole HC (T366S/L368A/Y407V)
 <400> 86
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Arg Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Phe Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Val Gly Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Glu Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Val Asn Ile Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Ala Arg Gly Ser Tyr Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 [0055] 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser
 355 360 365
 Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

| | 420 | 425 | 430 | |
|-------|--|-----|-----|-----|
| | Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly | | | |
| | 435 | 440 | 445 | |
| Lys | | | | |
| <210> | 87 | | | |
| <211> | 645 | | | |
| <212> | DNA | | | |
| <213> | 人工序列 | | | |
| <220> | | | | |
| <223> | IgG2 CH2-CH3 Q311R | | | |
| <400> | 87 | | | |
| | ccacctgtgg caggaccgtc agtcttcttc ttccccccaa aaccceaagga caccctcatg | | | 60 |
| | atctcccgga cccctgaggt cacgtgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccccag | | | 120 |
| | gtccagtcca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccacgg | | | 180 |
| | gaggagcagt tcaacagcac gttccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgttgt gcaccgggac | | | 240 |
| | tggtgaacg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aaggcctccc agccccatc | | | 300 |
| | gagaaaacca tctccaaaac caaagggcag ccccagagaac cacaggtgta caccctgccc | | | 360 |
| | ccatcccggg aggagatgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc | | | 420 |
| | taccccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag | | | 480 |
| | accacacctc ccatgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctacagcaa gtcaccctg | | | 540 |
| | gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg | | | 600 |
| | cacaaccact acacgcagaa gaccctctcc ctgtctccgg gtaaa | | | 645 |
| <210> | 88 | | | |
| <211> | 645 | | | |
| <212> | DNA | | | |
| <213> | 人工序列 | | | |
| <220> | | | | |
| <223> | IgG2 CH2-CH3 T307P/V309Q/Q311R | | | |
| <400> | 88 | | | |
| | ccacctgtgg caggaccgtc agtcttcttc ttccccccaa aaccceaagga caccctcatg | | | 60 |
| | atctcccgga cccctgaggt cacgtgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccccag | | | 120 |
| | gtccagtcca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccacgg | | | 180 |
| | gaggagcagt tcaacagcac gttccgtgtg gtcagcgtcc tcccgttca gcaccgggac | | | 240 |
| | tggtgaacg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aaggcctccc agccccatc | | | 300 |
| | gagaaaacca tctccaaaac caaagggcag ccccagagaac cacaggtgta caccctgccc | | | 360 |
| | ccatcccggg aggagatgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc | | | 420 |
| | taccccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag | | | 480 |
| | accacacctc ccatgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctacagcaa gtcaccctg | | | 540 |
| | gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg | | | 600 |
| | cacaaccact acacgcagaa gaccctctcc ctgtctccgg gtaaa | | | 645 |
| <210> | 89 | | | |
| <211> | 645 | | | |
| <212> | DNA | | | |
| <213> | 智人(Homo sapiens) | | | |
| <400> | 89 | | | |
| | ccacctgtgg caggaccgtc agtcttcttc ttccccccaa aaccceaagga caccctcatg | | | 60 |
| | atctcccgga cccctgaggt cacgtgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccccag | | | 120 |
| | gtccagtcca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccacgg | | | 180 |
| | gaggagcagt tcaacagcac gttccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgttgt gcaccaggac | | | 240 |
| | tggtgaacg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aaggcctccc agccccatc | | | 300 |

[0056]

<212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 93
 Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu
 1 5
 <210> 94
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 94
 Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr
 1 5 10
 <210> 95
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 95
 Glu Ser Lys Tyr Gly
 1 5
 <210> 96
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> IgG1 工程化铰链
 [0058] <400> 96
 Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr
 1 5 10
 <210> 97
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 97
 Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser
 1 5 10 15
 Pro Ser
 <210> 98
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 98
 Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu
 1 5 10 15
 Arg Glu Thr Lys Thr Pro
 20
 <210> 99
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>

<223> 工程化 Z 结构域
 <400> 99
 Phe Asn Met Gln Cys Gln Arg Arg Phe Tyr Glu Ala Leu His Asp Pro
 1 5 10 15
 Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Lys Ile Lys Ser Ile Arg Asp
 20 25 30
 Asp Cys

<210> 100
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 工程化 Z 结构域
 <400> 100
 Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile
 1 5 10 15
 Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
 20 25 30
 Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45
 Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

[0059]

<210> 101
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 工程化 Z 结构域
 <400> 101
 Phe Asn Met Gln Gln Gln Arg Arg Phe Tyr Glu Ala Leu His Asp Pro
 1 5 10 15
 Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Lys Ile Lys Ser Ile Arg Asp
 20 25 30
 Asp

<210> 102
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 102
 Ile Gln Arg Thr
 1
 <210> 103
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 103
 Leu Asn Gly Glu Glu Phe Met Asp Phe Asp Leu Lys Gln Gly Thr Trp
 1 5 10 15
 Gly Gly Asp Trp Pro Glu Ala

人 IgG1 CH2 VLTVLHQDWLN (SEQ ID NO: 104)
 小鼠 IgG2a CH2 ALPIQHQDWMS (SEQ ID NO: 105)

图1A

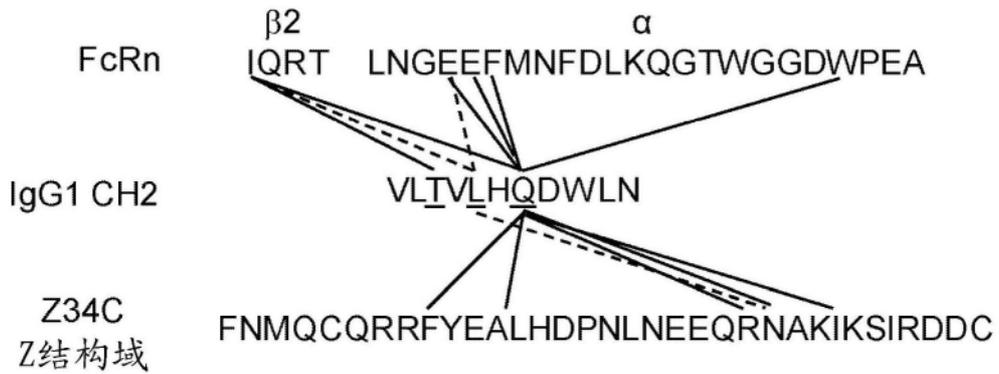


图1B

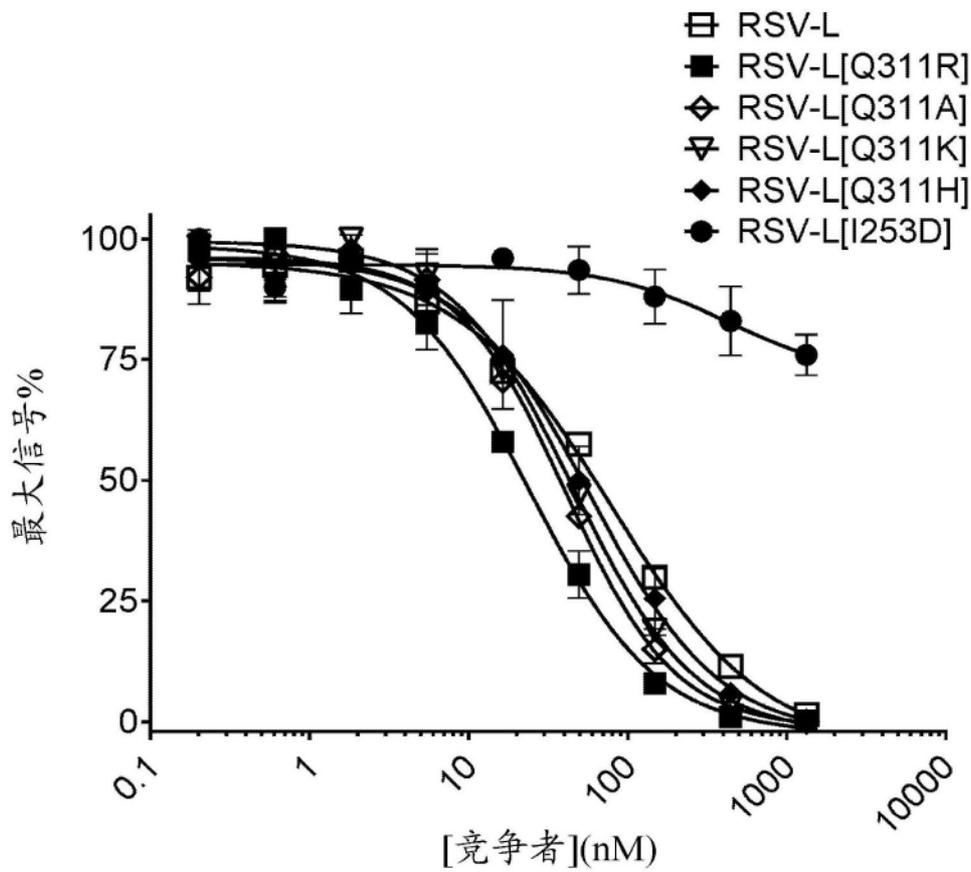


图2A

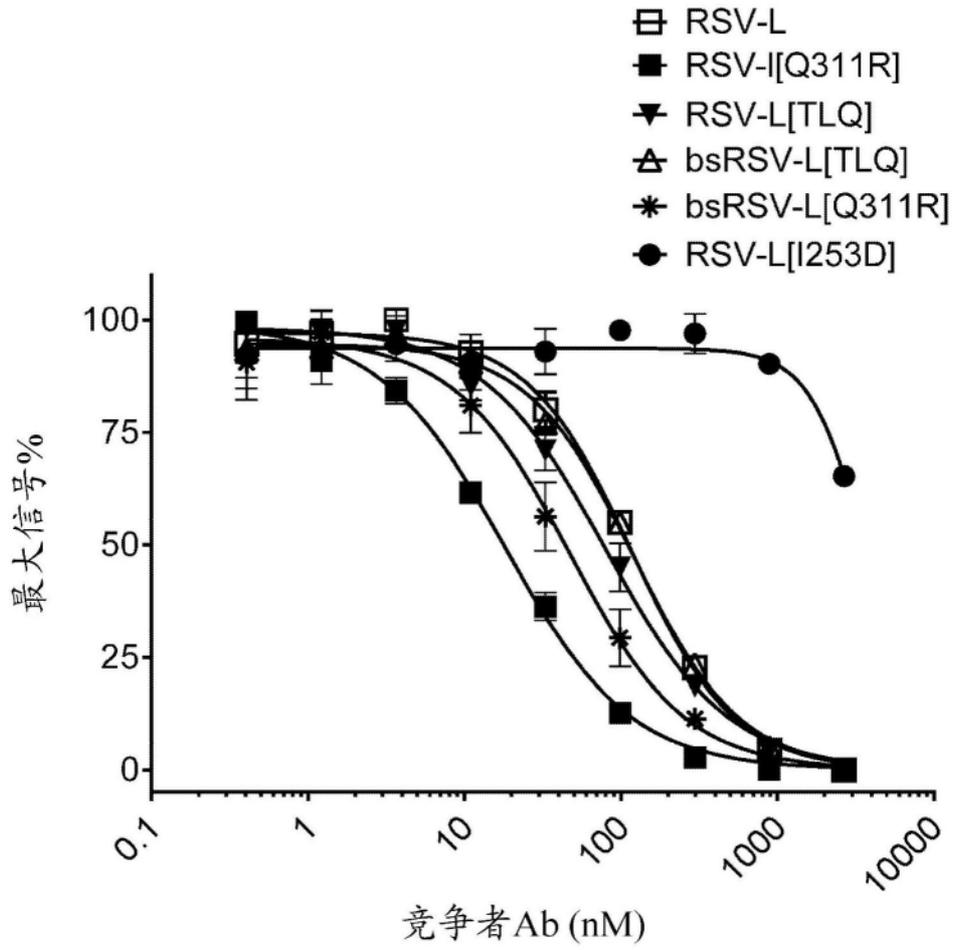


图2B

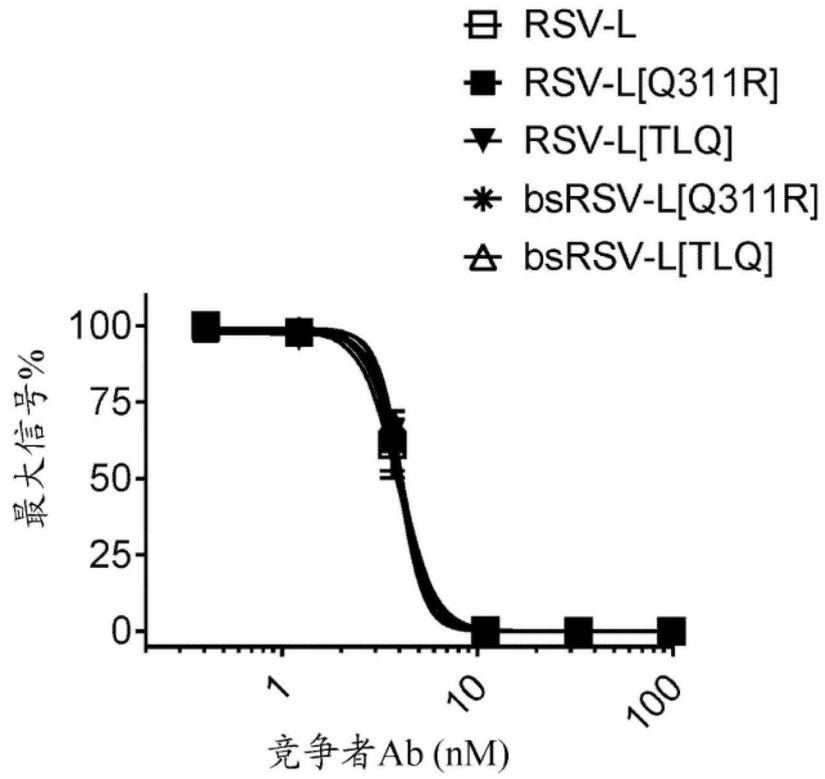


图3A

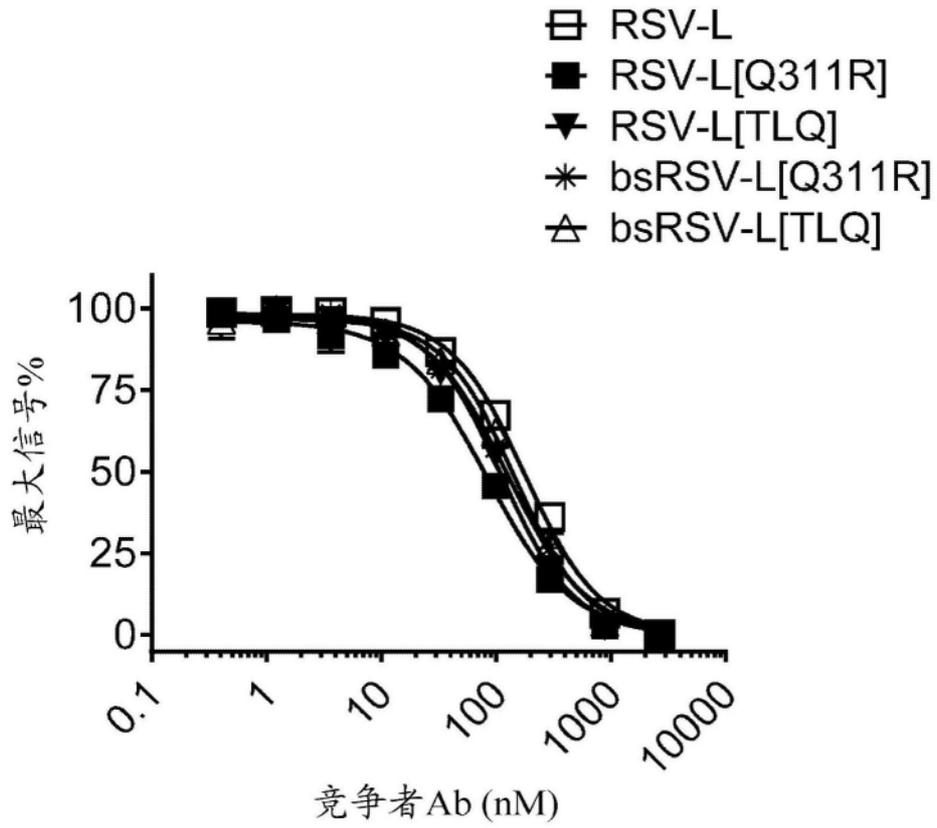


图3B

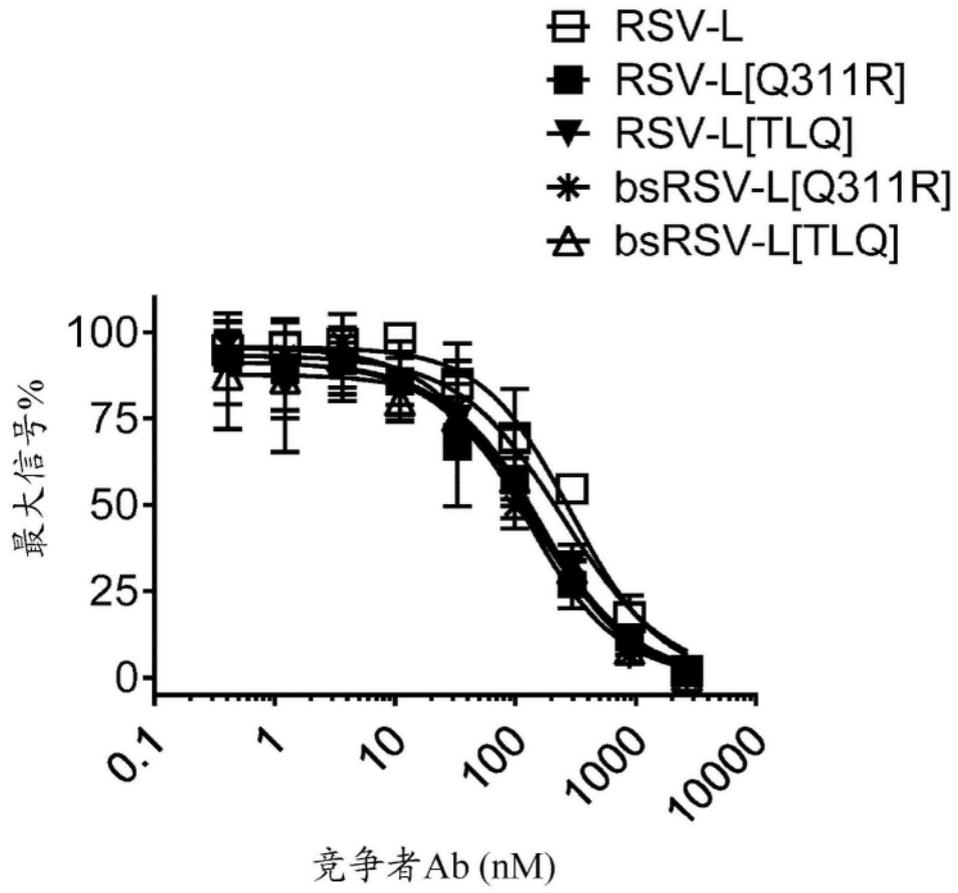


图3C

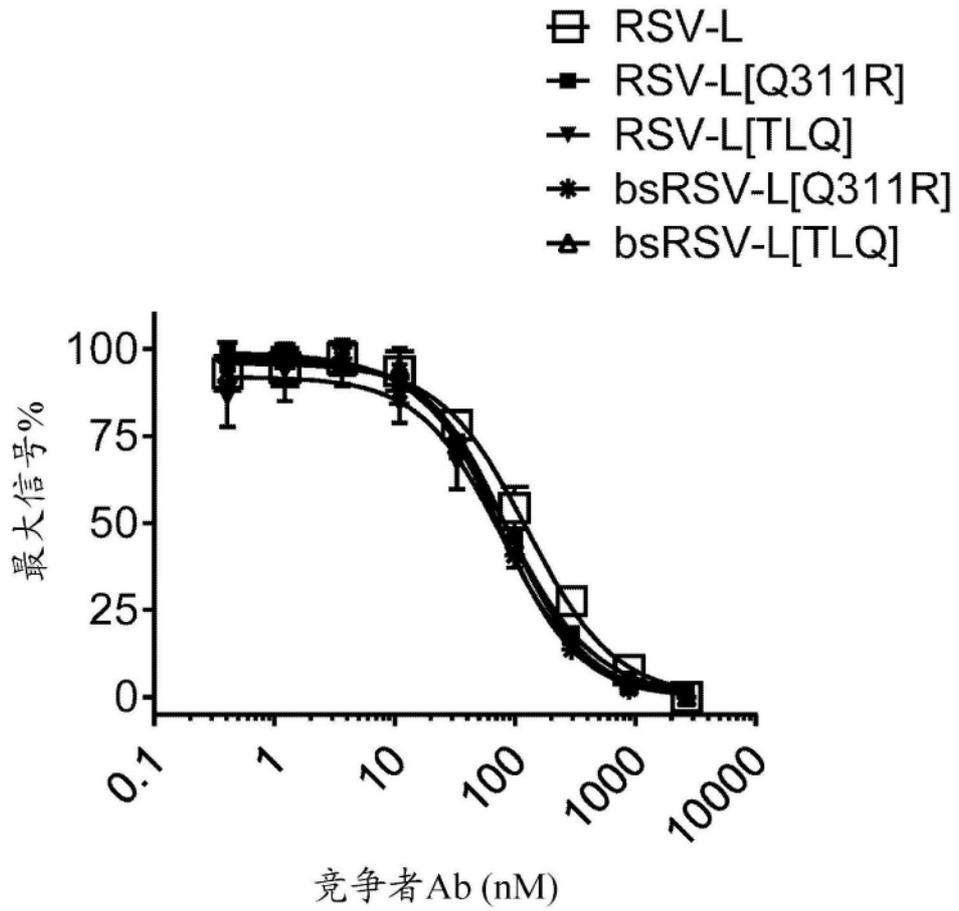


图3D

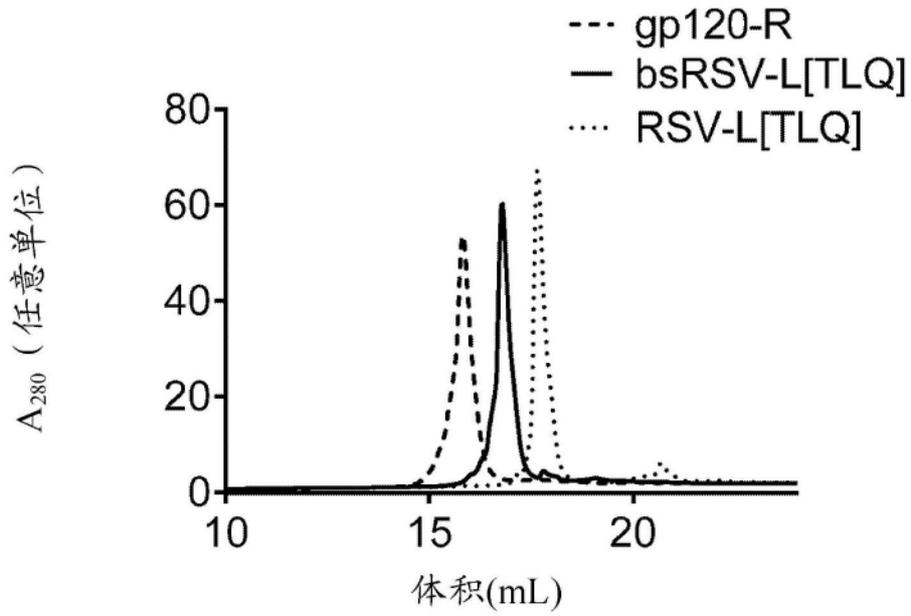


图4A

— Ab混合物: FPLC输入

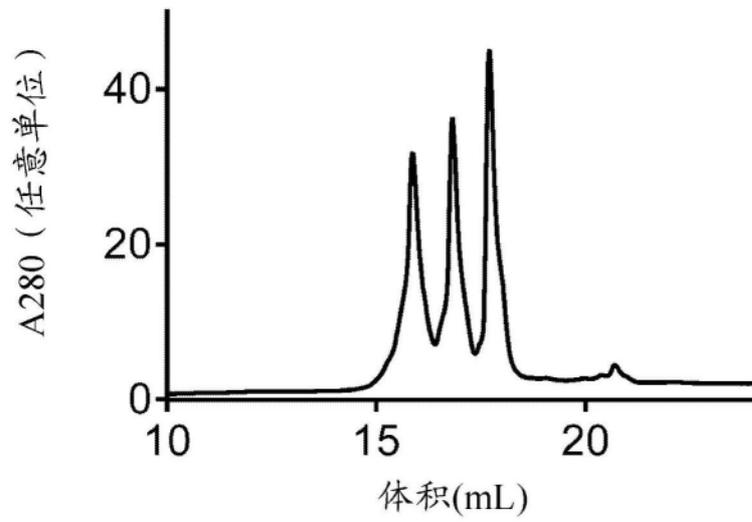


图4B

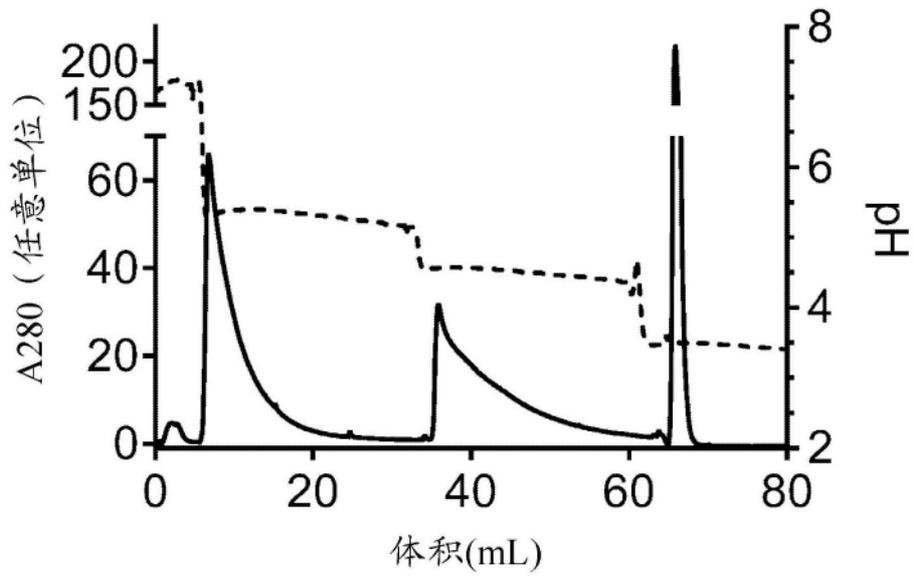


图4C

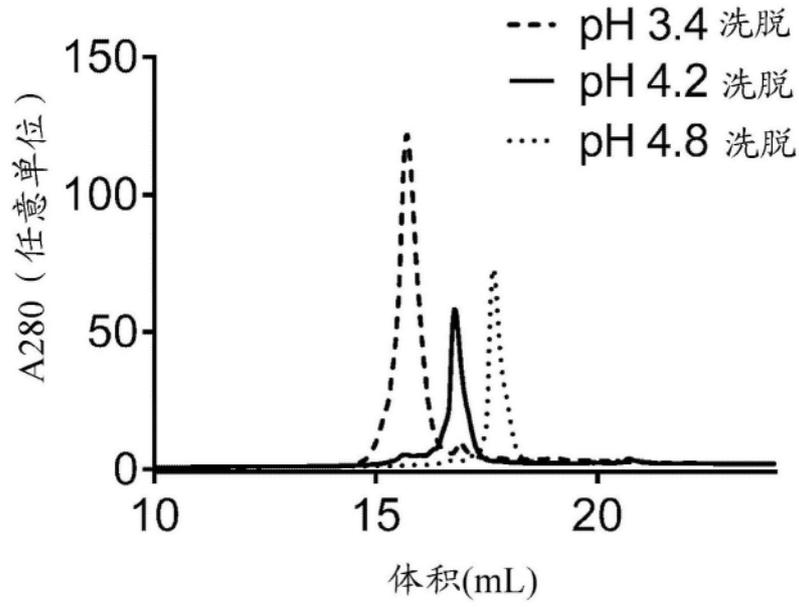


图4D

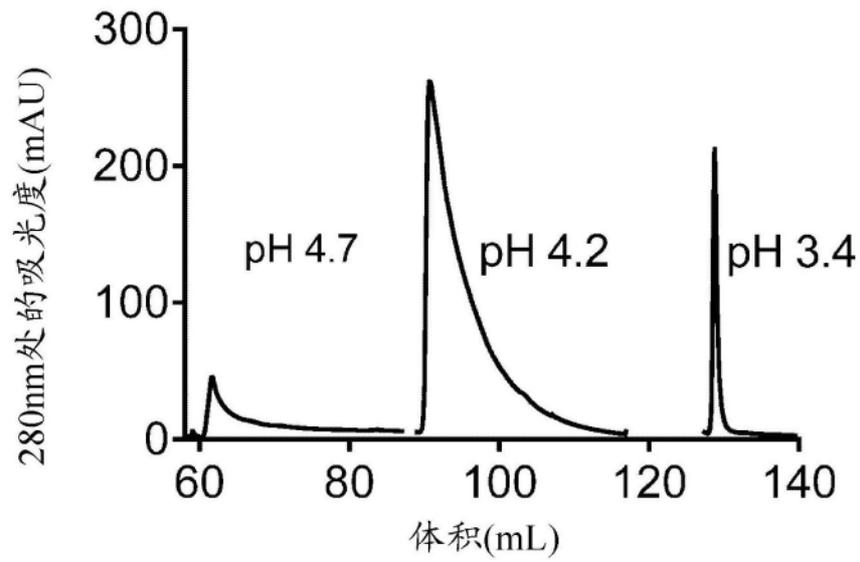


图5A

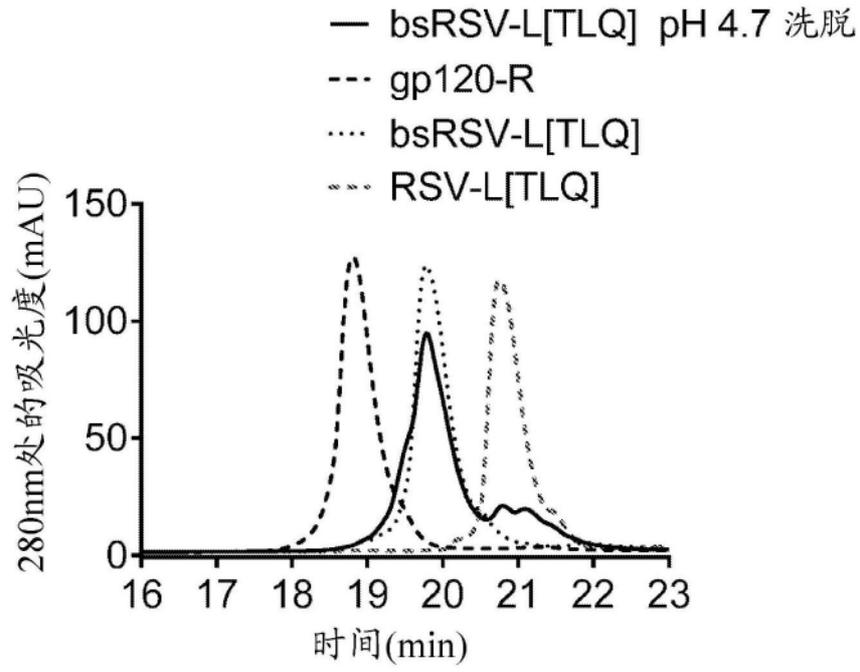


图5B

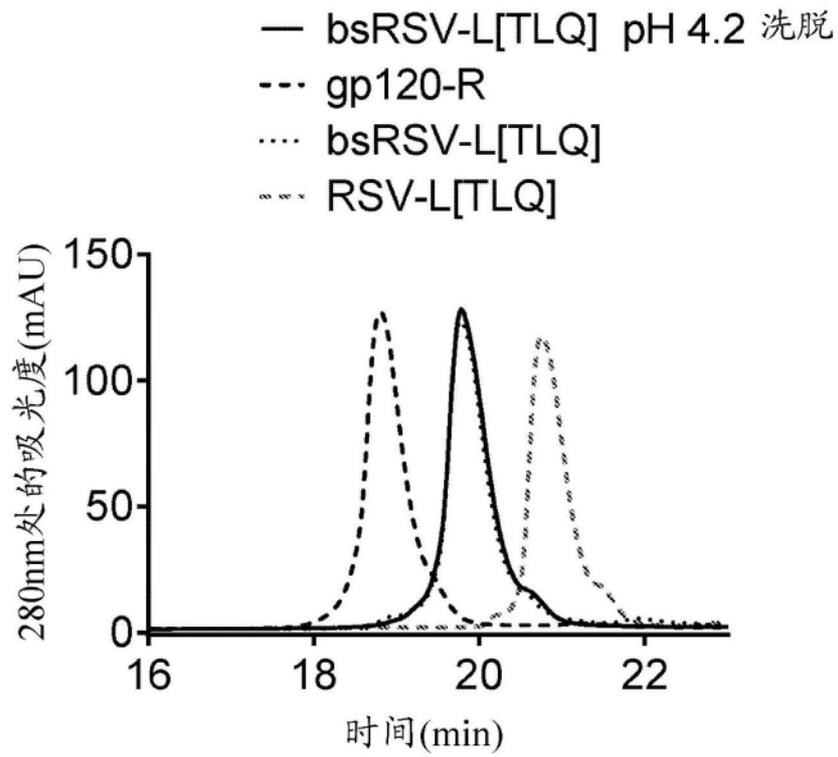


图5C

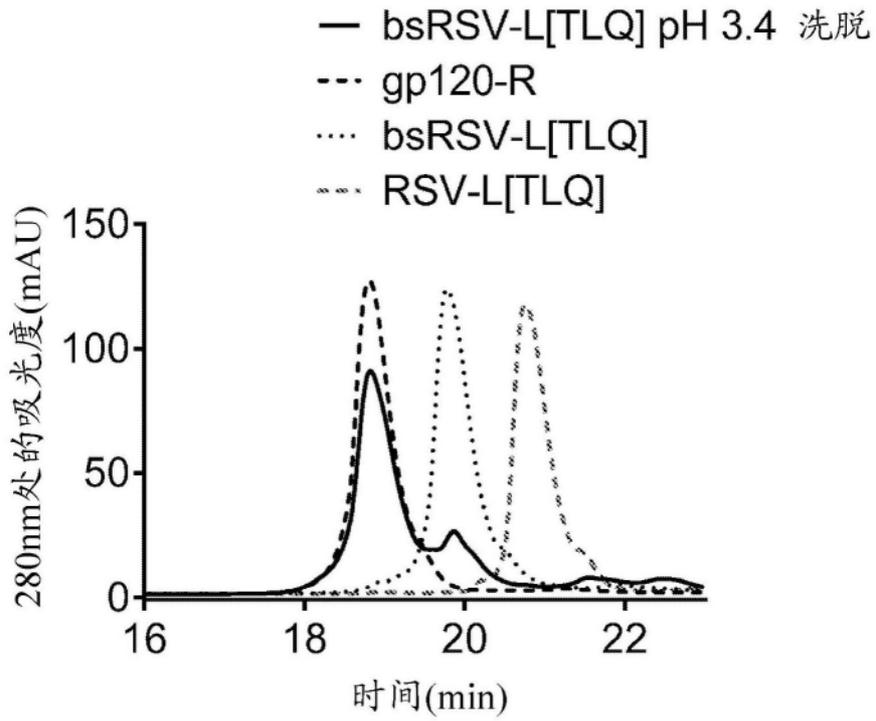


图5D

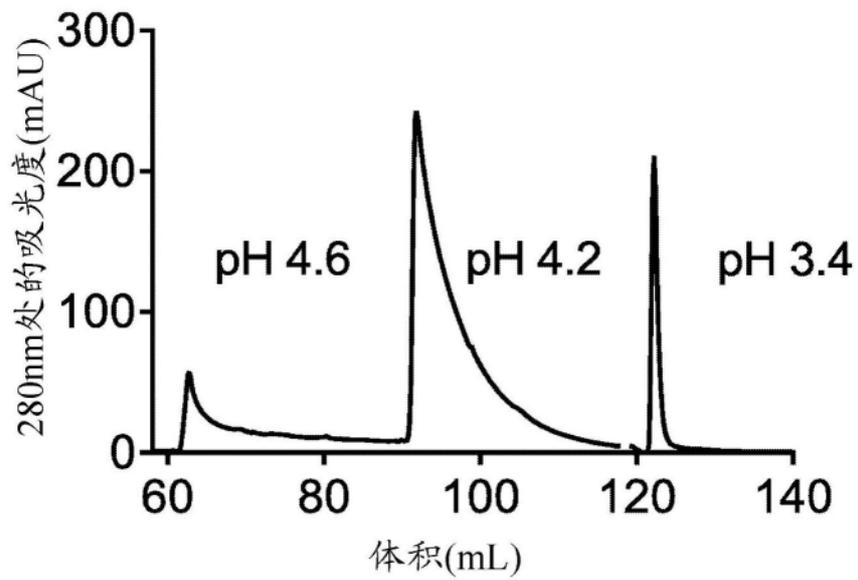


图6A

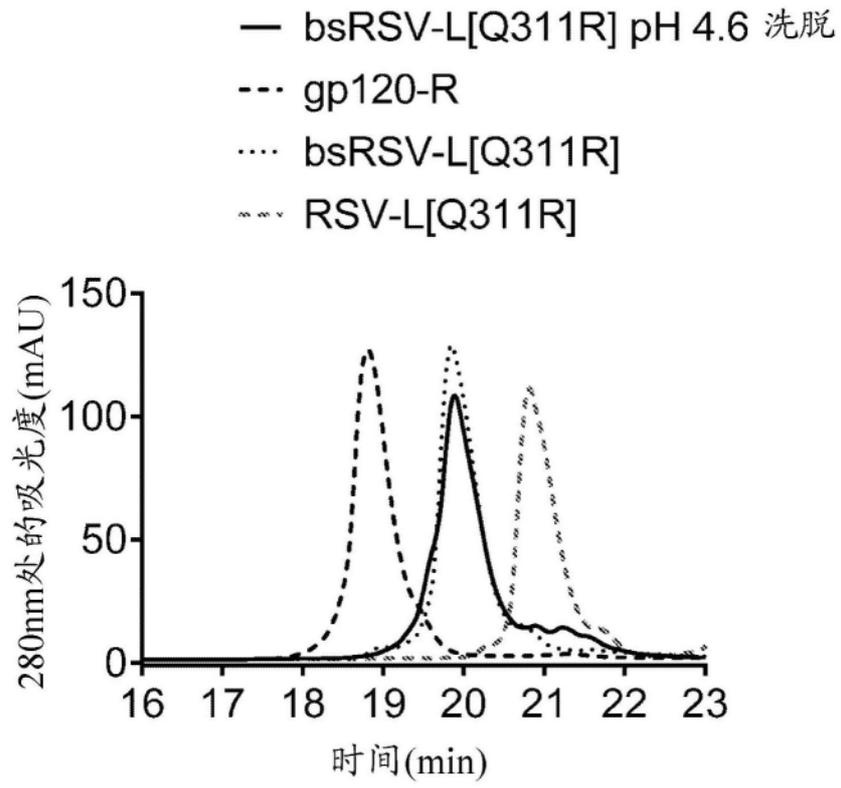


图6B

- bsRSV-L[Q311R] pH 4.2 洗脱
- gp120-R
- bsRSV-L[Q311R]
- ~ ~ ~ RSV-L[Q311R]

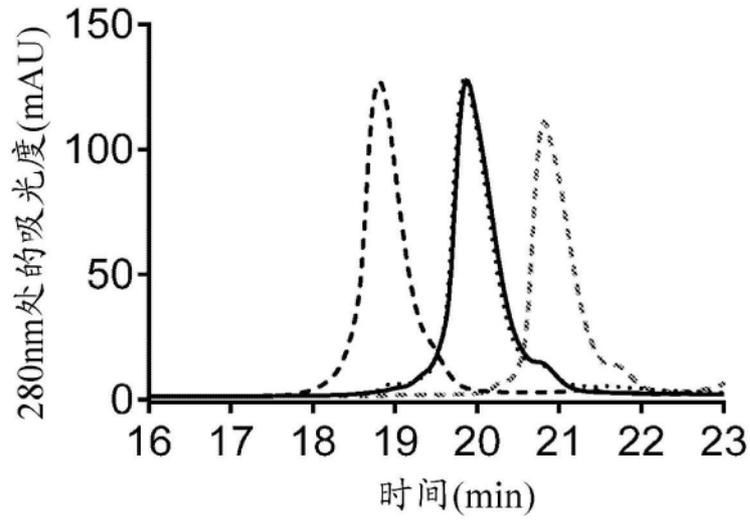


图6C

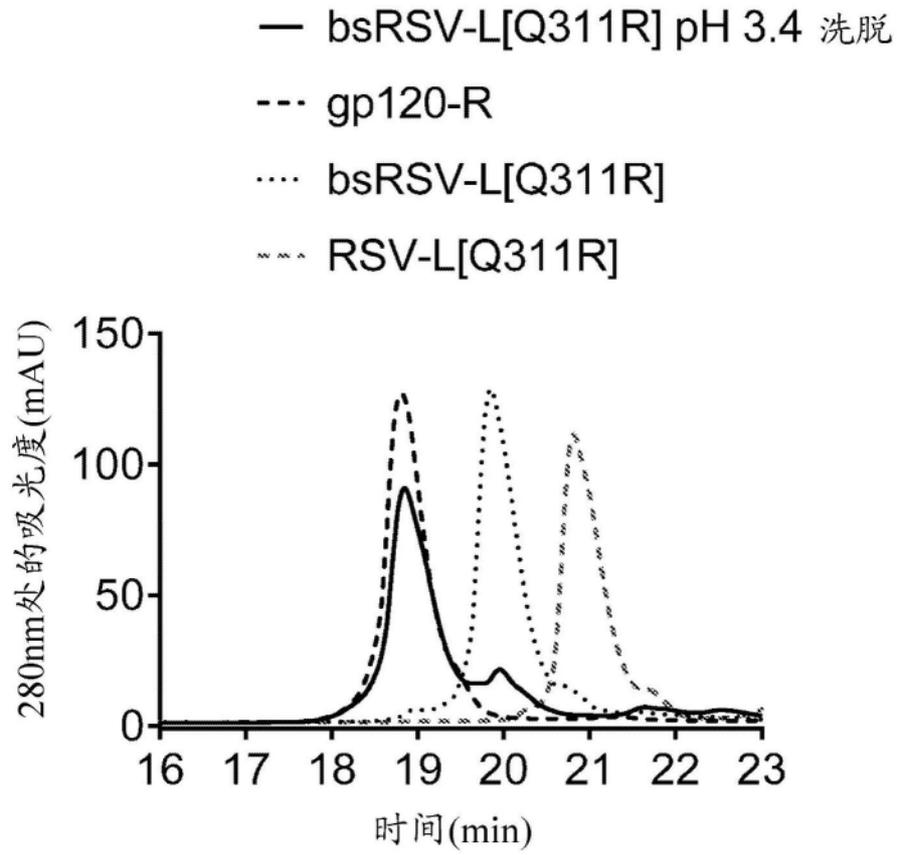


图6D

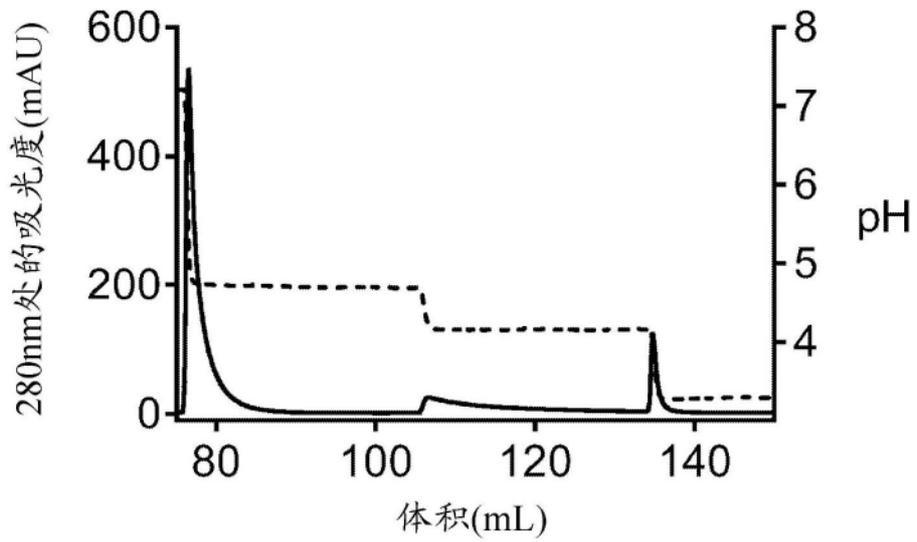


图7A

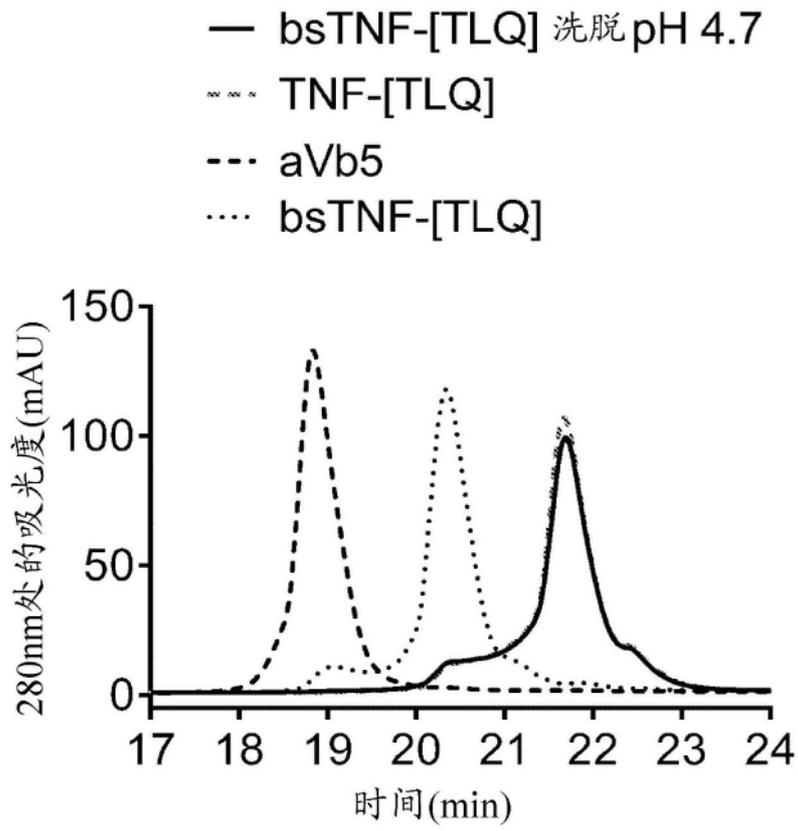


图7B

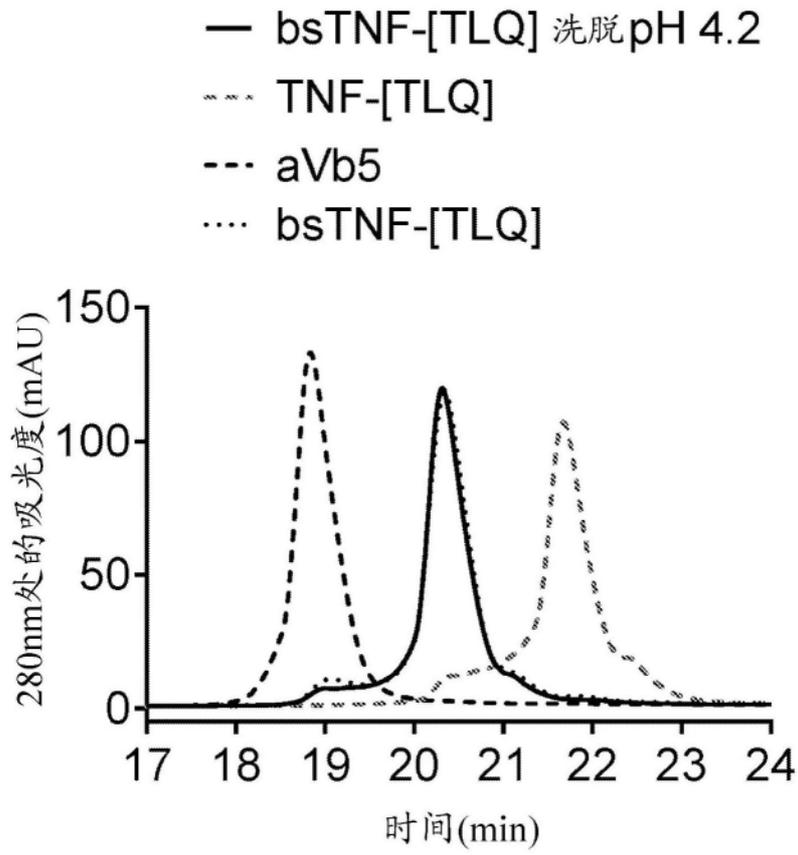


图7C

- bsTNF-[TLQ] 洗脱 pH 3.4
- TNF-[TLQ]
- aVb5
- bsTNF-[TLQ]

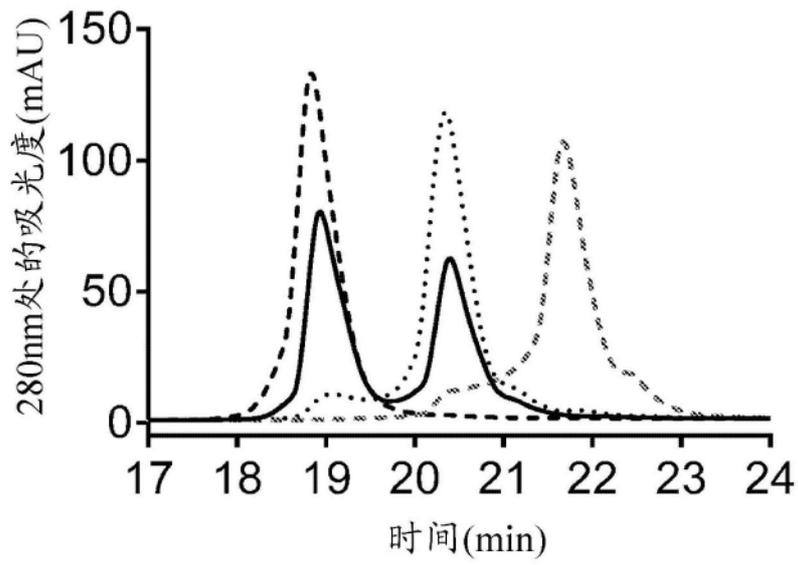


图7D

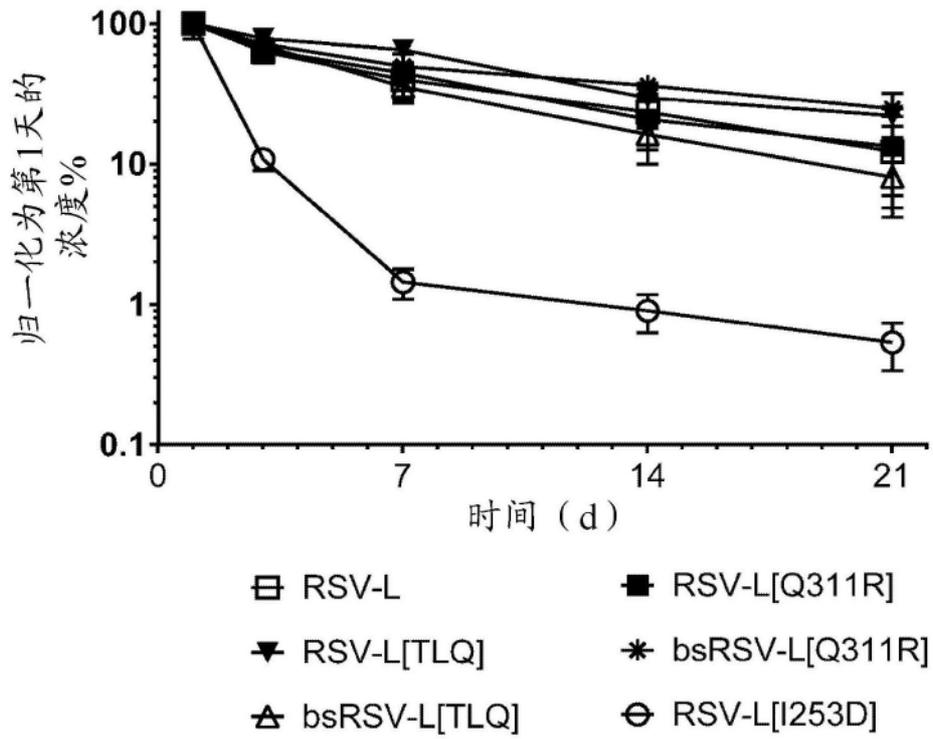


图8