



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117500829 A

(43) 申请公布日 2024. 02. 02

(21) 申请号 202280042689.7

(22) 申请日 2022.06.15

(30) 优先权数据

21180204.6 2021.06.18 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.12.14

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2022/066289 2022.06.15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/263501 EN 2022.12.22

(71) 申请人 豪夫迈·罗氏有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 G·乔治斯 J·菲舍尔

L·卡普日克 V·伦扎

J·赛多-安德森

C·贝尔蒂内蒂-拉帕茨基

M·格茨 S·冯 S·W·颜

W·S·A·何 R·A·林

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

专利代理师 陈迎春 黄革生

(51) Int.Cl.

C07K 16/24 (2006.01)

权利要求书5页 说明书115页

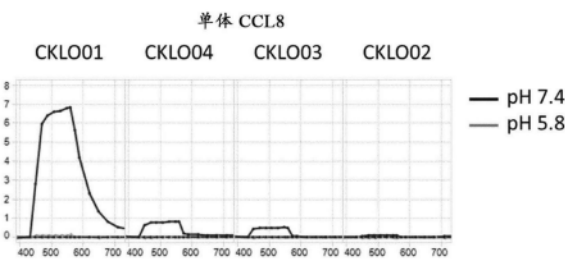
序列表141页 附图45页

(54) 发明名称

双特异性抗CCL2抗体

(57) 摘要

本发明涉及与人CCL2上的两个不同表位结合的双特异性抗CCL2抗体、其药物组合物、它们的制造以及作为用于治疗癌症、炎症性疾病、自身免疫性疾病和眼科疾病的药物的用途。



1. 一种双特异性抗体,其包含与人CCL2上的第一表位(特异性)结合的第一抗原结合位点和与人CCL2上的第二不同的表位(特异性)结合的第二不同的抗原结合位点,

其中所述双特异性抗体包含

a) 第一多肽链,其包含(从N末端至C末端方向)VH1-CH1-L1-铰链-CH2-CH3-L2-VL1-CL, 其中,

VH1为第一重链可变结构域并且VL1为第一可变轻链结构域(两者一起形成(缔合在一起以形成)所述第一抗原结合位点),

CH1为恒定重链结构域1,

L1为长度为5个至15个氨基酸(在一项权利要求中,长度为5个至10个氨基酸)的多肽接头,

铰链为重链铰链区,

CH2为恒定重链结构域2,

CH3为恒定重链结构域3,

L2为长度为5个至15个氨基酸(在一项权利要求中,长度为10个至15个氨基酸)的多肽接头,

CL为恒定轻链结构域,

以及

b) 第二多肽链,其包含(从N末端至C末端方向)VH2-CH1-L1-铰链-CH2-CH3-L2-VL2-CL, 其中,

VH2为第二重链可变结构域并且VL2为第二可变轻链结构域(两者一起形成(缔合在一起以形成)第二抗原结合位点),

CH1为恒定重链结构域1,

L1为长度为5个至15个氨基酸(在一项权利要求中,长度为5个至10个氨基酸)的多肽接头,

铰链为重链铰链区,

CH2为恒定重链结构域2,

CH3为恒定重链结构域3,

L2为长度为5个至15个氨基酸(在一项权利要求中,长度为10个至15个氨基酸)的多肽接头,

CL为恒定轻链结构域,

其中

A) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列;

并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且

ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列;

并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;

或者

B) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列;

并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且

ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列;

- 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列；
或者
C) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列；
并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列；并且
ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列；
并且VL2结构域包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列；
或者
D) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列；
并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列；并且
ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列；
并且VL2结构域包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列；
或者
E) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列；
并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列；并且
ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列；
并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列；
或者
F) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列；并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列；并且ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列；
并且VL2结构域包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列；
或者
G) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列；并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列；并且ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列；
并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列；
或者
H) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列；并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列；并且ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列；
并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列；
或者
I) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列；并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列；并且ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列；
并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列；
或者
J) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列；并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列；并且ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列；
并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列；
或者
K) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列；并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列；并且ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列；

并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列；
或者

L) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列；并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列；并且ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列；

并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列；
或者

M) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列；并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列；并且ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列；

并且VL2结构域包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列；
或者

N) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列；并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列；并且ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列；

并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列；
或者

O) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列；并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列；并且ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列；

并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列；
或者

P) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列；并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列；并且ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列；

并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列。

2. 根据权利要求1所述的双特异性抗体，其中

i) VH1结构域包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列；
并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列；并且
ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列；
并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列。

3. 根据权利要求1所述的双特异性抗体，其中

i) VH1结构域包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列；
并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列；并且
ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列；
并且VL2结构域包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的双特异性抗体，其中

L1为长度为9个至11个氨基酸的多肽接头，并且
L2为长度为9个至11个氨基酸的多肽接头。

5. 根据权利要求4所述的双特异性抗体，其中

L1和L2为选自以下项的组的多肽接头：GSGGSGGSGG (SEQ ID NO:183)、GSGGSGGGG (SEQ ID NO:184)、GSGGGGSGGG (SEQ ID NO:185)、GGSGGSGGGG (SEQ ID NO:186)、GGSGGGSGGG (SEQ ID NO:187)、GGSGGGSGG (SEQ ID NO:188)、GGSGGSGGG (SEQ ID NO:189)、GGGSGGGSGG (SEQ ID NO:190) 和GGGGSGGSGG (SEQ ID NO:191)。

6. 根据权利要求4所述的双特异性抗体, 其中
L1为包含GGSGGGGSGG (SEQ ID NO:188) 的氨基酸序列的多肽接头, 并且
L2为包含GGSGGGGSGG (SEQ ID NO:188) 的氨基酸序列的多肽接头。
7. 根据权利要求1至6中任一项所述的双特异性抗体, 其中所述恒定重链结构域CH1、铰链、CH2和CH3属于人IgG同种型, 优选地属于人IgG1同种型。
8. 根据前述权利要求中任一项所述的双特异性抗体, 其中所述双特异性抗体
i) 在体外阻断CCL2与其受体CCR2的结合 (报告基因测定, $IC_{50}=0.5nM$); 且/或
ii) 在体外抑制CCL2介导的骨髓细胞的趋化性 ($IC_{50}=1.5nM$); 且/或
iii) 对食蟹猴和人CCL2有交叉反应性。
9. 根据前述权利要求中任一项所述的双特异性抗体, 其中相比于与CCL2的结合, 所述双特异性抗体不对选自CCL8、CCL7和CCL13的组的其他CCL同源物有交叉反应性。
10. 根据前述权利要求中任一项所述的双特异性抗体, 其中所述双特异性抗体以pH依赖性方式与人CCL2结合, 并且其中相比于在酸性pH, 所述第一抗原结合位点和所述第二抗原结合位点两者在中性pH均以较高的亲和力与CCL2结合。
11. 根据前述权利要求中任一项所述的双特异性抗体, 其中相比于在pH5.8, 所述双特异性抗体在pH 7.4以10倍的亲和力与人CCL2结合。
12. 根据权利要求1至11中任一项所述的双特异性抗体, 其中所述恒定重链结构域CH1、铰链、CH2和CH3属于人IgG1同种型并且包含以下突变中的一者或多者 (Kabat EU编号)
i) Q311R和/或P343R; 和/或
ii) L234Y、L235W、G236N、P238D、T250V、V264I、H268D、Q295L、T307P、K326T和/或A330K; 和/或
iii) M428L、N434A和/或Y436T; 和/或
iv) Q438R和/或S440E。
13. 根据权利要求1至11中任一项所述的双特异性抗体, 其中所述恒定重链结构域CH1、铰链、CH2和CH3属于人IgG1同种型并且包含以下突变中的一者或多者 (Kabat EU编号)
i) Q311R和/或P343R; 和/或
ii) L235W、G236N、H268D、Q295L、K326T和/或A330K; 和/或
iii) N434A; 和/或
iv) Q438R和/或S440E。
14. 根据权利要求1至11中任一项所述的双特异性抗体, 其中所述恒定重链结构域CH1、铰链、CH2和CH3属于人IgG1同种型并且包含以下突变中的一者或多者 (Kabat EU编号)
i) Q311R和P343R; 和
ii) L234Y、P238D、T250V、V264I、T307V和A330K; 和
iii) M428L、N434A和Y436T; 和
iv) Q438R和S440E。
15. 根据权利要求12至14中任一项所述的双特异性抗体, 其中恒定重链结构域CH3包含以下突变 (Kabat EU编号)
K447G。
16. 一种核酸, 其编码根据前述权利要求中任一项所述的抗体。

17. 一种宿主细胞,其包含根据权利要求16所述的核酸。
18. 一种生产抗体的方法,所述方法包括培养根据权利要求17所述的宿主细胞以便生产所述抗体。
19. 根据权利要求18所述的方法,其进一步包括从所述宿主细胞回收所述抗体。
20. 一种药物制剂,其包含根据权利要求1至15中任一项所述的双特异性抗体以及药用载体。
21. 根据权利要求1至15中任一项所述的双特异性抗体,其用作药物。
22. 根据权利要求1至15中任一项所述的双特异性抗体,其用于治疗癌症、或者炎症性或自身免疫性疾病。
23. 根据权利要求1至15中任一项所述的双特异性抗体在制造药物中的用途。
24. 根据权利要求23所述的用途,其中所述药物用于癌症的治疗。
25. 根据权利要求24所述的用途,其中所述药物用于炎症性或自身免疫性疾病的治疗。
26. 一种治疗患有癌症的个体的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的根据权利要求1至15中任一项所述的双特异性抗体。
27. 一种治疗患有炎症性或自身免疫性疾病的个体的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的根据权利要求1至15中任一项所述的双特异性抗体。

双特异性抗CCL2抗体

[0001] 本发明涉及与人CCL2上的两个不同表位结合的双特异性抗CCL2抗体、其药物组合物、它们的制造以及作为用于治疗癌症、炎症性疾病、自身免疫性疾病和眼科疾病的药物的用途。

背景技术

[0002] CCL2/CCR2轴是未成熟骨髓细胞向肿瘤内募集的主要介质。CCL2被恶性细胞过度表达并与细胞外基质 (ECM) 结合形成趋化梯度。一旦到达肿瘤,髓系来源的抑制性细胞 (MDSC) 通过分泌/上调抗炎细胞因子/受体,进而抑制抗肿瘤T细胞反应的启动,从而促进原致癌基因环境。这样,MDSC可能会降低甚至削弱任何T细胞活化疗法的功效 (Meyer等人, 2014)。因此,特异性抑制这些未成熟骨髓细胞的募集将提高检查点抑制剂、T细胞双特异性抗体 (TCB) 或其他癌症免疫疗法 (CIT) 的功效。此外,CCL2还参与促进血管生成、转移和肿瘤生长,提示中和CCL2可能有助于多线抗肿瘤干预。

[0003] 靶向CCL2-而不是其受体-将特异性地抑制不期望的CCL2介导的效应,从而避免可能通过相同的受体 (CCR2) 但不同的配体 (例如CCL7、CCL8、CCL13) 信号传导的效应,后者参与其他免疫细胞群的募集,如Th1和NK细胞。

[0004] 临床上,CCL2已成为多项研究的优选抗体靶标,该多项研究旨在中和不同炎症性疾病引起的CCL2水平升高,所述炎症性疾病诸如类风湿关节炎 (Haringman等人,Arthritis Rheum. 2006年8月;54(8):2387-92)、特发性肺纤维化 (Raghu等人,Eur Respir J. 2015年12月;46(6):1740-50)、糖尿病肾病 (Menne等人,Nephrol Dial Transplant (2017) 32:307-315) 和癌症 (Sandhu等人,Cancer Chemother Pharmacol. 2013年4月;71(4):1041-50)。然而,其较高的合成速率和观察到的较高的体内抗体-抗原解离常数 (KD) 已被证明是阻碍常规抗体以临床可行剂量抑制游离CCL2的主要障碍 (Fetterly等人,J Clin Pharmacol. 2013年10月;53(10):1020-7)。

[0005] CCL2的中和作用似乎在CCL2血清水平升高的患者中更明显,这在乳腺癌 (BC)、卵巢癌 (OvCa)、结直肠癌 (CRC)、胰腺癌和前列腺癌等多种类型的癌症中都观察到。然而,即使是在这些适应症中没有出现这种血清学但肿瘤高度浸润髓系免疫细胞的患者,由于上述提及的CCL2在肿瘤中的许多作用,也可能从这种新型的治疗中获益。

[0006] Ikawa等人,Immunological Reviews 270(2016)132-151描述了扫集技术,其中所生成的抗体带有pH依赖性CDR (用于酸性内体中的抗体-抗原解离,从而导致抗原降解),和具有经优化的等电点 (pI) 和经增强的与Fc γ RIIb的结合 (有利于免疫复合物的细胞摄取) 的工程化Fc分子,以及与新生儿Fc受体的中等亲和力,以维持可接受的药代动力学特征。

发明内容

[0007] 本发明涉及与人CCL2上的两个不同表位结合的某些双特异性抗CCL2抗体、其药物组合物、它们的制造以及作为用于治疗癌症、炎症性疾病、自身免疫性疾病和眼科疾病的药物的用途。

[0008] 本发明提供了一种双特异性抗体,其包含与人CCL2上的第一表位(特异性)结合的第一抗原结合位点和与人CCL2上的第二不同的表位(特异性)结合的第二不同的抗原结合位点,

[0009] 其中双特异性抗体包含

[0010] a) 第一多肽链,其包含(从N末端至C末端方向)VH1-CH1-L1-铰链-CH2-CH3-L2-VL1-CL,其中,

[0011] VH1为第一重链可变结构域并且VL1为第一可变轻链结构域(两者一起形成(缔合在一起以形成)第一抗原结合位点),

[0012] CH1为恒定重链结构域1,

[0013] L1为长度为5个至15个氨基酸(在一个实施例中,长度为5个至10个氨基酸)的多肽接头,

[0014] 铰链为重链铰链区,

[0015] CH2为恒定重链结构域2,

[0016] CH3为恒定重链结构域3,

[0017] L2为长度为5个至15个氨基酸(在一个实施例中,长度为10个至15个氨基酸)的多肽接头,

[0018] CL为恒定轻链结构域,

[0019] 以及

[0020] b) 第二多肽链,其包含(从N末端至C末端方向)VH2-CH1-L1-铰链-CH2-CH3-L2-VL2-CL,其中,

[0021] VH2为第二重链可变结构域并且VL2为第二可变轻链结构域(两者一起形成(缔合在一起以形成)第二抗原结合位点),

[0022] CH1为恒定重链结构域1,

[0023] L1为长度为5个至15个氨基酸(在一个实施例中,长度为5个至10个氨基酸)的多肽接头,

[0024] 铰链为重链铰链区,

[0025] CH2为恒定重链结构域2,

[0026] CH3为恒定重链结构域3,

[0027] L2为长度为5个至15个氨基酸(在一个实施例中,长度为10个至15个氨基酸)的多肽接头,

[0028] CL为恒定轻链结构域,

[0029] 其中

[0030] A) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列;

[0031] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且

[0032] ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列;

[0033] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;

[0034] 或者

[0035] B) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列;

[0036] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且

- [0037] ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列;
[0038] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;
[0039] 或者
[0040] C) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列;
[0041] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且
[0042] ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列;
[0043] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列;
[0044] 或者
[0045] D) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列;
[0046] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且
[0047] ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列;
[0048] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列;
[0049] 或者
[0050] E) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列;
[0051] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且
[0052] ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列;
[0053] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;
[0054] 或者
[0055] F) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列;
[0056] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且
[0057] ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列;
[0058] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列;
[0059] 或者
[0060] G) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列;
[0061] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且
[0062] ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列;
[0063] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;
[0064] 或者
[0065] H) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列;
[0066] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且
[0067] ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列;
[0068] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;
[0069] 或者
[0070] I) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列;
[0071] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且
[0072] ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列;
[0073] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;
[0074] 或者
[0075] J) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列;

- [0076] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且
- [0077] ii)VH2结构域包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列;
- [0078] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;
- [0079] 或者
- [0080] K) i)VH1结构域包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列;
- [0081] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且
- [0082] ii)VH2结构域包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列;
- [0083] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;
- [0084] 或者
- [0085] L) i)VH1结构域包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列;
- [0086] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且
- [0087] ii)VH2结构域包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列;
- [0088] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;
- [0089] 或者
- [0090] M) i)VH1结构域包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列;
- [0091] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且
- [0092] ii)VH2结构域包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列;
- [0093] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列;
- [0094] 或者
- [0095] N) i)VH1结构域包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列;
- [0096] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且
- [0097] ii)VH2结构域包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列;
- [0098] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;
- [0099] 或者
- [0100] O) i)VH1结构域包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列;
- [0101] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且
- [0102] ii)VH2结构域包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列;
- [0103] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;
- [0104] 或者
- [0105] P) i)VH1结构域包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列;
- [0106] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且
- [0107] ii)VH2结构域包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列;
- [0108] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列。
- [0109] 本发明的一个实施例为上述双特异性抗体,其中
- [0110] i)VH1结构域包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列;
- [0111] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且
- [0112] ii)VH2结构域包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列;
- [0113] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列。
- [0114] 本发明的一个实施例为上述双特异性抗体,其中

- [0115] i) VH1结构域包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列;
- [0116] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且
- [0117] ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列;
- [0118] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列。
- [0119] 在本发明的一个实施例中,恒定重链结构域CH1、铰链、CH2和CH3属于人IgG同种型,优选地属于人IgG1同种型。
- [0120] 在本发明的一个实施例中,双特异性抗体
- [0121] i) 在体外阻断CCL2与其受体CCR2的结合(报告基因测定, $IC_{50}=0.5nM$);且/或
- [0122] ii) 在体外抑制CCL2介导的骨髓细胞的趋化性($IC_{50}=1.5nM$);且/或
- [0123] iii) 对食蟹猴和人CCL2有交叉反应性。
- [0124] 在本发明的一个实施例中,双特异性抗体
- [0125] 双特异性抗体不对其他CCL同源物有交叉反应性(相比于与CCL2的结合,其与其他CCL同源物(选自CCL8、CCL7和CCL13的组)的结合为100分之一
- [0126] 在本发明的一个实施例中,双特异性抗体
- [0127] 双特异性抗体以离子依赖性方式与人CCL2上的第一和第二表位结合。
- [0128] 在本发明的一个实施例中,双特异性抗体
- [0129] 双特异性抗体以pH依赖性方式与人CCL2结合,并且其中相比于在酸性pH,第一抗原结合位点和第二抗原结合位点两者均在中性pH以较高的亲和力与CCL2结合。
- [0130] 在本发明的一个实施例中,双特异性抗体
- [0131] 相比于在pH 5.8,双特异性抗体在pH 7.4以10倍的亲和力与人CCL2结合。
- [0132] 在本发明的一个实施例中,恒定重链结构域CH1、铰链、CH2和CH3属于人IgG1同种型并且包含以下突变中的一者或多者(Kabat EU编号)
- [0133] i) Q311R和/或P343R(适用于增加pI,以用于增强抗原的摄取);和/或
- [0134] ii) L235W、G236N、H268D、Q295L、K326T和/或A330K(适用于增加与人FcγRIIb的亲和力并且降低与其他人FcγR的亲和力);和/或
- [0135] iii) N434A(适用于增加与FcRn的亲和力,以用于更长的血浆半衰期);和/或
- [0136] iv) Q438R和/或S440E(适用于抑制类风湿因子结合)。
- [0137] 在本发明的一个实施例中,恒定重链结构域CH1、铰链、CH2和CH3属于人IgG1同种型并且包含以下突变中的一者或多者(Kabat EU编号)
- [0138] i) Q311R和P343R(适用于增加pI,以用于增强抗原的摄取);和
- [0139] ii) L234Y、P238D、T250V、V264I、T307V和A330K(适用于增加与人FcγRIIb的亲和力并且降低与其他人FcγR的亲和力);和
- [0140] iii) M428L、N434A和Y436T(适用于增加与FcRn的亲和力,以用于更
- [0141] 长的血浆半衰期);以及
- [0142] iv) Q438R和S440E(适用于抑制类风湿因子结合)。
- [0143] 本发明进一步提供了一种经分离的核酸,其编码如本文所述的根据本发明的双特异性抗体。
- [0144] 本发明进一步提供了一种包含此类核酸的宿主细胞。
- [0145] 本发明进一步提供了一种生产双特异性抗体的方法,该方法包括培养此类宿主细

胞以便生产双特异性抗体。

[0146] 本发明进一步提供了一种药物制剂,其包含如本文所述的根据本发明的双特异性抗体以及药用载体。

[0147] 本发明进一步提供了如本文所述的根据本发明的双特异性抗体,其用作药物。

[0148] 本发明进一步提供了如本文所述的根据本发明的双特异性抗体,其用于治疗癌症。

[0149] 本发明进一步提供了如本文所述的根据本发明的双特异性抗体,其用于治疗炎症性或自身免疫性疾病。

[0150] 本发明进一步提供了如本文所述的根据本发明的双特异性抗体在制造药物中的用途。

[0151] 在一个方面,本发明部分基于以下发现:如本文所述的双特异性抗体使用不同的抗CCL2抗原结合位点作为第一和第二抗原结合位点/部分。这些双特异性抗CCL2抗体以高特异性与CCL2的某些表位结合,并且有能力特异性抑制CCL2与其受体CCR2的结合。与单特异性抗体相比,它们示出了经改善的免疫复合物形成以及经改善的体内CCL2消除。本文所述的呈扭曲体(contorsbody)形式的特异性双特异性抗CCL2抗体还示出了有价值的特性,如低粘度(这允许例如适用于例如皮下施用的高浓度溶液)

附图说明

[0152] 图1:示出了单特异性抗CCL2抗体(CNT0888(=CNT0)、1A5、1G9和人源化11K2(=11k2)与重组CCL2和CCL2同源物的结合的表面等离子体共振(Biacore®)传感图。

[0153] 图2a:将预形成的免疫复合物静脉注入FcRn转基因小鼠后,hCCL2的血清浓度随时间推移的变化,该预形成的免疫复合物由以下项组成:a)实线:0.1mg/kg人CCL2(hCCL2)和20mg/kg单特异性抗CCL2抗体CNT0888-SG1(野生型IgG1)或b)虚线:0.1mg/kg人CCL2(hCCL2)和20mg/kg单特异性抗CCL2抗体CNT0888-SG105(Fc受体结合沉默IgG1)。

[0154] 图2b:将预形成的免疫复合物静脉注入FcRn转基因小鼠后,hCCL2的血清浓度随时间推移的变化,该预形成的免疫复合物由以下项组成:a)实线:0.1mg/kg人CCL2(hCCL2)和20mg/kg单特异性抗CCL2抗体11K2-SG1(野生型IgG1)或b)虚线:0.1mg/kg人CCL2(hCCL2)和20mg/kg单特异性抗CCL2抗体11K2-SG105(Fc受体结合沉默IgG1)。

[0155] 图2c:将预形成的免疫复合物静脉注入FcRn转基因小鼠后,hCCL2的血清浓度随时间推移的变化,该预形成的免疫复合物由以下项组成:a)实线:0.1mg/kg人CCL2(hCCL2)和20mg/kg单特异性抗CCL2抗体ABN912-SG1(野生型IgG1)或b)虚线:0.1mg/kg人CCL2(hCCL2)和20mg/kg单特异性抗CCL2抗体ABN912-SG105(Fc受体结合沉默IgG1)。

[0156] 图2d:将预形成的免疫复合物静脉注入FcRn转基因小鼠后,hCCL2的血清浓度随时间推移的变化,该预形成的免疫复合物由以下项组成:a)实线:0.1mg/kg人CCL2(hCCL2)和20mg/kg单特异性抗CCL2抗体1A4-SG1(野生型IgG1)或b)虚线:0.1mg/kg人CCL2(hCCL2)和20mg/kg单特异性抗CCL2抗体1A4-SG105(Fc受体结合沉默IgG1)。

[0157] 图2e:将预形成的免疫复合物静脉注入FcRn转基因小鼠后,hCCL2的血清浓度随时间推移的变化,该预形成的免疫复合物由以下项组成:a)实线:0.1mg/kg人CCL2(hCCL2)和20mg/kg单特异性抗CCL2抗体1A5-SG1(野生型IgG1)或b)虚线:0.1mg/kg人CCL2(hCCL2)和

20mg/kg单特异性抗CCL2抗体1A5-SG105 (Fc受体结合沉默IgG1)。

[0158] 图2f:将预形成的免疫复合物静脉注入FcRn转基因小鼠后,hCCL2的血清浓度随时间推移的变化,该预形成的免疫复合物由以下项组成:a)实线:0.1mg/kg人CCL2(hCCL2)和20mg/kg单特异性抗CCL2抗体1G9-SG1(野生型IgG1)或b)虚线:0.1mg/kg人CCL2(hCCL2)和20mg/kg单特异性抗CCL2抗体1G9-SG105(Fc受体结合沉默IgG1)。

[0159] 图2g:将预形成的免疫复合物静脉注入FcRn转基因小鼠后,hCCL2的血清浓度随时间推移的变化,该预形成的免疫复合物由以下项组成:a)实线:0.1mg/kg人CCL2(hCCL2)和20mg/kg单特异性抗CCL2抗体2F6-SG1(野生型IgG1)或b)虚线:0.1mg/kg人CCL2(hCCL2)和单特异性抗CCL2抗体20mg/kg 2F6-SG105(Fc受体结合沉默IgG1)。

[0160] 图3:示出了在小鼠中静脉注射以下项后,血清总小鼠CCL2浓度(图3a)和抗体-时间曲线(图3b)的时间过程:a)实线:20mg/kg单特异性抗CCL2抗体11K2-SG1(野生型IgG1)以及b)虚线:20mg/kg单特异性抗CCL2抗体11K2-SG105(Fc受体结合沉默IgG1)。

[0161] 图4a:将预形成的免疫复合物静脉注入Balb/c小鼠后,hCCL2的血清浓度随时间推移的变化,该预形成的免疫复合物由以下项组成:a)实线:0.1mg/kg人CCL2(hCCL2)和20mg/kg双特异性抗CCL2抗体11K2//1G9-WT IgG1(具有完整Fc受体结合的野生型IgG1)或b)虚线:0.1mg/kg人CCL2(hCCL2)和20mg/kg双特异性抗CCL2抗体11K2//1G9-PGLALA(Fc受体结合沉默IgG1)。

[0162] 图4b:将预形成的免疫复合物静脉注入Balb/c小鼠后,hCCL2的血清浓度随时间推移的变化,该预形成的免疫复合物由以下项组成:a)实线:0.1mg/kg人CCL2(hCCL2)和20mg/kg双特异性抗CCL2抗体CNT0888//11K2-WT IgG1(具有完整Fc受体结合的野生型IgG1)或b)虚线:0.1mg/kg人CCL2(hCCL2)和20mg/kg双特异性抗CCL2抗体CNT0888//11K2-PGLALA(Fc受体结合沉默IgG1)。

[0163] 图4c:将预形成的免疫复合物静脉注入Balb/c小鼠后,hCCL2的血清浓度随时间推移的变化,该预形成的免疫复合物由以下项组成:a)实线:0.1mg/kg人CCL2(hCCL2)和20mg/kg双特异性抗CCL2抗体CNT0888//1G9-WT IgG1(具有完整Fc受体结合的野生型IgG1)或b)虚线:0.1mg/kg人CCL2(hCCL2)和20mg/kg双特异性抗CCL2抗体11K2//1G9-PGLALA(Fc受体结合沉默IgG1)。

[0164] 图4d:将预形成的免疫复合物静脉注入Balb/c小鼠后,hCCL2的血清浓度随时间推移的变化,该预形成的免疫复合物由以下项组成:a)实线:0.1mg/kg人CCL2(hCCL2)和20mg/kg双特异性抗CCL2抗体CNT0888//1A5-WT IgG1(具有完整Fc受体结合的野生型IgG1)或b)虚线:0.1mg/kg人CCL2(hCCL2)和20mg/kg双特异性抗CCL2抗体CNT0888//1A5-PGLALA(Fc受体结合沉默IgG1)。

[0165] 图4e:将预形成的免疫复合物静脉注入Balb/c小鼠后,hCCL2的血清浓度随时间推移的变化,该预形成的免疫复合物由以下项组成:a)实线:0.1mg/kg人CCL2(hCCL2)和20mg/kg双特异性抗CCL2抗体1A5//1G9-WT IgG1(具有完整Fc受体结合的野生型IgG1)或b)虚线:0.1mg/kg人CCL2(hCCL2)和20mg/kg双特异性抗CCL2抗体1A5//1G9-PGLALA(Fc受体结合沉默IgG1)。

[0166] 图4f:将预形成的免疫复合物静脉注入Balb/c小鼠后,hCCL2的血清浓度随时间推移的变化,该预形成的免疫复合物由以下项组成:a)实线:0.1mg/kg人CCL2(hCCL2)和20mg/

kg双特异性抗CCL2抗体11K2//2F6-WT IgG1 (具有完整Fc受体结合的野生型IgG1) 或b) 虚线:0.1mg/kg人CCL2 (hCCL2) 和20mg/kg双特异性抗CCL2抗体11K2//2F6-PGLALA (Fc受体结合沉默IgG1)。

[0167] 图4g:将预形成的免疫复合物静脉注入Ba1b/c小鼠后,hCCL2的血清浓度随时间推移的变化,该预形成的免疫复合物由以下项组成:a) 实线:0.1mg/kg人CCL2 (hCCL2) 和20mg/kg双特异性抗CCL2抗体ABN912//11K2-WT IgG1 (具有完整Fc受体结合的野生型IgG1) 或b) 虚线:0.1mg/kg人CCL2 (hCCL2) 和20mg/kg双特异性抗CCL2抗体ABN912//11K2-PGLALA (Fc受体结合沉默IgG1)。

[0168] 图4h:将预形成的免疫复合物静脉注入Ba1b/c小鼠后,hCCL2的血清浓度随时间推移的变化,该预形成的免疫复合物由以下项组成:a) 实线:0.1mg/kg人CCL2 (hCCL2) 和20mg/kg双特异性抗CCL2抗体1A4//2F6-WT IgG1 (具有完整Fc受体结合的野生型IgG1) 或b) 虚线:0.1mg/kg人CCL2 (hCCL2) 和20mg/kg双特异性抗CCL2抗体1A4//2F6-PGLALA (Fc受体结合沉默IgG1)。

[0169] 图4i:将预形成的免疫复合物静脉注入Ba1b/c小鼠后,hCCL2的血清浓度随时间推移的变化,该预形成的免疫复合物由以下项组成:a) 实线:0.1mg/kg人CCL2 (hCCL2) 和20mg/kg双特异性抗CCL2抗体1A5//2F6-WT IgG1 (具有完整Fc受体结合的野生型IgG1) 或b) 虚线:0.1mg/kg人CCL2 (hCCL2) 和20mg/kg双特异性抗CCL2抗体1A5//2F6-PGLALA (Fc受体结合沉默IgG1)。

[0170] 图5a:示出了四种经修饰的11K2和四种CNT0888变体、以及由四种经修饰的11K2和四种CNT0888变体的各自组合抗原结合部分所产生的16种双特异性抗CCL2抗体CKL001至CKL016在pH 7.4 (黑线) 和pH 5.8 (灰线) 与单体CCL2的结合曲线的 **Biacore®** 传感图。

[0171] 图5b:示出了四种经修饰的11K2和四种CNT0888变体、以及由四种经修饰的11K2和四种CNT0888变体的各自组合抗原结合部分所产生的16种双特异性抗CCL2抗体CKL001至CKL016与单体CCL2的结合曲线的 **Biacore®** 传感图。在pH 7.4的解离阶段之后,立即将在pH 5.8的另外的解离阶段整合至 **BIACORE®** 测定中。

[0172] 图6:示出了双特异性抗CCL2抗体CKL001、CKL002、CKL003和CKL004在pH 7.4 (黑线) 和pH 5.8 (灰线) 与单体CCL8的结合曲线的 **Biacore®** 传感图。

[0173] 图7a:将预形成的免疫复合物注入SCID小鼠中后,hCCL2的血清浓度随时间推移的变化,该预形成的免疫复合物由hCCL2和双特异性抗CCL2抗体 (亲代CNT0//11K2和pH依赖性变体CKL001、CKL002、CKL003和CKL004) 组成。

[0174] 图7b:将预形成的免疫复合物注入SCID小鼠中后,hCCL2的血清浓度随时间推移的变化,该预形成的免疫复合物由hCCL2和CKL003 (具有IgG1野生型Fc) 或CKL003-SG1099 (具有经增强的pI Fc的CKL003) 组成。

[0175] 图8:趋化性测定:具有相同CDR和可变区VH/VL的双特异性抗CCL2抗体,即CKL02-IgG1野生型和CKL02-SG1095 (但Fc部分不同) 可以以相同的效能抑制THP-1细胞的迁移 ($IC_{50}=0.2\mu\text{g/ml}$;图8,左侧)。

[0176] 类似的,CCL2-0048 (CKL02的亲本未经修饰的双特异性抗体CNT0888/11k2k2 IgG1,其为非pH依赖性的) 也示出了 $0.2\mu\text{g/ml}$ 的 IC_{50} ,因为pH依赖性 (该现象在该测定中不会发生) 对于抗原扫集至关重要。

[0177] 相应的单特异性抗体CNT0888 IgG1和人源化11k2 IgG1展示出的IC₅₀值分别为0.3 μg/ml和0.7 μg/ml,而huIgG1同种型对照未示出抑制作用(图8,右侧)。

[0178] 图9:经基因修饰的小鼠模型中的体内抗肿瘤活性。用Mab CKL02-IgG1 (Fc野生型IgG1)和CKL02-SG1099(=CKL02 pI增强型)进行治疗的小鼠肿瘤模型。研究结束时的肿瘤体积(左)、肿瘤重量(中)和M-MDSC浸润(右)。(媒介物呈黑色,CKL02野生型IgG1呈灰色,并且CKL02 pI增强型Fc(CKL02-SG1099)呈白色条/虚线)

[0179] 图10:在用双特异性抗CCL2抗体(媒介物呈黑色,CKL02野生型IgG1呈灰色,并且pI增强型Fc(CKL02-SG1099)呈白色条/虚线)进行治疗的情况下,在体内抗肿瘤活性研究(参见图9中的功效)期间,血清总(左)和游离(右)CCL2水平。

[0180] 图11:食蟹猴中CCL2扫集效率的概念验证研究。食蟹猴血清中的总抗体浓度-时间曲线;左侧:呈现了在七天内四种抗体的平均浓度-时间曲线;第1组:单特异性CNT0888-SG1(=IgG1野生型)抗CCL2抗体,其作为最大总CCL2积累的对照(n=3只动物);第2组:双原位旁抗CCL2抗体CKL02-SG1(IgG1野生型),其具有pH依赖性靶标结合但无Fc修饰(n=3);第3组:双原位旁抗CCL2抗体CKL02-SG1100,其具有pH依赖性靶标结合和Fc-pI以及进一步的修饰(n=4);以及第4组:双原位旁抗CCL2抗体CKL02-SG1095,其具有pH依赖性靶标结合、Fc-pI和经增强的Fc γ RI Ib亲和力以及进一步的修饰(n=4);右侧:呈现了PK研究期间(70天)内个体4(第2组)的个体浓度-时间曲线。

[0181] 图12:食蟹猴中CCL2扫集效率的概念验证研究。食蟹猴血清中的总CCL2浓度-时间曲线;左侧:呈现了在七天内四种抗体的平均总CCL2浓度-时间曲线;右侧:呈现了PK研究期间(70天)内个体4(第2组)的个体总CCL2浓度-时间曲线。

[0182] 图13:食蟹猴血清中的游离CCL2浓度-时间曲线;左侧:呈现了在七天内四种抗体的平均游离CCL2浓度-时间曲线;右侧:呈现了PK研究期间(70天)内个体4(第2组)的个体游离CCL2浓度-时间曲线;对于低于检测限的样品,使用0.01ng/mL的值(定量下限)来计算平均谱。

[0183] 图14:食蟹猴中CCL2扫集效率的PK/PD研究。食蟹猴血清中的总CKL02-SG1095浓度-时间曲线(用不同浓度进行的CKL02-SG1095处理(第1组至第3组));左侧:呈现了在七天内三个剂量水平的平均浓度-时间曲线(n=4);右侧:呈现了研究期间(98天)内两只ADA阴性个体动物(25mg/kg剂量组)的个体浓度-时间曲线。

[0184] 图15:食蟹猴中CCL2扫集效率的PK/PD研究。在用不同浓度进行CKL02-SG1095处理(第1组至第3组)下的、以及与CNT0888-SG1处理(第4组)进行比较的食蟹猴血清中的总CCL2浓度-时间曲线;左侧:呈现了在七天内四个研究组的平均总CCL2浓度-时间曲线(误差条指示SD);右侧:呈现了PK研究期间(98天)内来自第3组(n=2,误差条指示范围)和第4组(n=3,误差条指示SD)的ADA阴性动物的个体总CCL2浓度-时间曲线。

[0185] 图16:食蟹猴中CCL2扫集效率的PK/PD研究。食蟹猴血清中的游离CCL2浓度-时间曲线;左侧:呈现了在七天内四个研究组的平均游离CCL2浓度-时间曲线(误差条指示SD)(用不同浓度进行CKL02-SG1095处理(第1组至第3组),以及与CNT0888-SG1处理(第4组)进行比较);右侧:呈现了PK研究期间(70天)内来自第3组(n=2,误差条指示范围)和第4组(n=3,误差条指示SD)的ADA阴性动物的平均游离CCL2浓度-时间曲线;对于低于检测限的样品,使用0.01ng/mL的值(定量下限)来计算平均谱。

[0186] 图17:本发明的双特异性抗CCL2抗体的示例性方案(呈所谓的扭曲体(CB)形式。

[0187] 图18:SEC复合物:CCL2复合物与双原位旁抗体P1AF8139(缩写为39)和P1AF8143(缩写为43)的SEC

[0188] 图19A至图19C:

[0189] Fc γ -IIa-经由Fc γ RIIa来细胞摄取CCL2。图19A:Y形双原位旁抗体与参考抗体P1AD8325,图19B:扭曲体P1AF8142和P1AF8143连同参考抗体P1AD8325,以及图19C:抗体P1AD8325、CNT0888-IgG1、CKL02(=CKL02-SG1(=IgG1 wt),并且不存在作为参考集的抗体。

[0190] 图20A至图20C:

[0191] Fc γ -IIb-经由Fc γ RIIb来细胞摄取CCL2。图20A:Y形双原位旁抗体与参考抗体P1AD8325,图20B:扭曲体P1AF8142和P1AF8143连同参考抗体P1AD8325,以及图20C:抗体P1AD8325、CNT0888-IgG1、CKL02(=CKL02-SG1(=IgG1 wt),并且不存在作为参考集的抗体。

具体实施方式

[0192] 本发明涉及与人CCL2上的两个不同表位结合的双特异性抗CCL2抗体、其药物组合物、它们的制造以及作为用于治疗癌症、炎症性疾病、自身免疫性疾病和眼科疾病的药物的用途。

[0193] 在本发明的一个方面,双特异性抗CCL2抗体包含与人CC2上的第一表位(特异性)结合的第一抗原结合位点和与不同的第二表位(特异性)结合的第二不同的抗原结合位点,其中双特异性抗CCL2抗体包含

[0194] a) 第一多肽链,其包含(从N末端至C末端方向)VH1-CH1-L1-铰链

[0195] -CH2-CH3-L2-VL1-CL,其中,

[0196] VH1为第一重链可变结构域并且VL1为第一可变轻链结构域(两者一起形成(缔合在一起以形成)所述第一抗原结合位点),

[0197] CH1为恒定重链结构域1,

[0198] L1为长度为5个至15个氨基酸(在一个实施例中,长度为5个至10个氨基酸)的多肽接头,

[0199] 铰链为重链铰链区,

[0200] CH2为恒定重链结构域2,

[0201] CH3为恒定重链结构域3,

[0202] L2为长度为5个至15个氨基酸(在一个实施例中,长度为10个至15个氨基酸)的多肽接头,

[0203] CL为恒定轻链结构域,

[0204] 以及

[0205] b) 第二多肽链,其包含(从N末端至C末端方向)VH2-CH1-L1-铰链-CH2-CH3-L2-VL2-CL,其中,

[0206] VH2为第二重链可变结构域并且VL2为第二可变轻链结构域(两者一起形成(缔合在一起以形成)第二抗原结合位点),

- [0207] CH1为恒定重链结构域1,
- [0208] L1为长度为5个至15个氨基酸(在一个实施例中,长度为5个至10个氨基酸)的多肽接头,
- [0209] 铰链为重链铰链区,
- [0210] CH2为恒定重链结构域2,
- [0211] CH3为恒定重链结构域3,
- [0212] L2为长度为5个至15个氨基酸(在一个实施例中,长度为10个至15个氨基酸)的多肽接头,
- [0213] CL为恒定轻链结构域。
- [0214] 如本文所用,术语“CCL2”、“人CCL2”,也称为“MCP-1”意指NCBI记录登录号NP_002973中引用的76个氨基酸序列并冠以各种各样的名称:CCL2、MCP-1(单核细胞趋化蛋白1)、SMC-CF(平滑肌细胞趋化因子)、LDCF(淋巴细胞来源的趋化因子)、GDCF(胶质瘤来源的单核细胞趋化因子)、TDCF(肿瘤来源的趋化因子)、HC11(人细胞因子11)、MCAF(单核细胞趋化活化因子)。基因符号是SCYA2,人类17号染色体上的JE基因,新命名为CCL2(Zlotnik, Yoshie 2000. *Immunity* 12:121-127)。JE是人MCP-1/CCL2的小鼠类似物。
- [0215] Handel及其他人(*Biochemistry*.1996;35:6569-6584)确定了CCL2二聚体的溶液结构。这些研究表明CCL2的二级结构由四个 β -折叠组成。此外,Zhang和Rollins描述了负责CCL2二聚化界面的残基(*Mol Cell Biol*.1995;15:4851-4855)。蛋白质复合物被两个单体拉长,这种拉长的使得它们形成一个大口袋。也已确定了单体和二聚体CCL2的结构处于两种晶型,即所谓的I和P形式(Lubkowski等人,*Nat Struct Biol*.1997;4:64-69)。Paolini等人, (*J Immunol*.1994年9月15日;153(6):2704-17)描述了MCP1/CCL2在生理相关浓度下以单体形式存在:通过分析新鲜.CCL2蛋白(购自Peprotech公司)(借助尺寸排除HPLC、沉降平衡超速离心和化学交联等方法),可以表明MCP-1单体和二聚体形式的质量分数取决于体外的浓度。最后,Seo和同事(*J Am Chem Soc*.2013年3月20日;135(11):4325-32)可以通过离子迁移质谱显示生理条件下注射的CCL2以单体和二聚体形式存在。
- [0216] 因此“野生型CCL-2”(wt CCL2)可以以单体形式存在,但在生理浓度下也可以形成二聚体。这种单体-二聚体平衡当然是不同的,并且在所有可能使用不同浓度的体外实验中必须仔细考虑。为了避免任何不确定性,我们生成了点突变的CCL2变体:CCL2的“P8A”变体在二聚化界面上发生突变,导致无法形成二聚体,从而形成定义的、纯的CCL2单体。相反,CCL2的“T10C”变体导致CCL2的固定二聚体(*J Am Chem Soc*.2013年3月20日;135(11):4325-32)。
- [0217] CCL2/CCR2轴是未成熟骨髓细胞向肿瘤内募集的主要介质。CCL2被恶性细胞过度表达并与细胞外基质(ECM)结合形成趋化梯度。一旦到达肿瘤,髓系来源的抑制性细胞(MDSC)通过分泌/上调抗炎细胞因子/受体,进而抑制抗肿瘤T细胞反应的启动,从而促进原致癌基因环境。这样,MDSC可能会降低甚至削弱任何T细胞活化疗法的功效(Meyer等人,2014)。因此,特异性抑制这些未成熟骨髓细胞的募集将提高检查点抑制剂、T细胞双特异性和癌症免疫疗法的功效。此外,CCL2还参与促进血管生成、转移和肿瘤生长,提示中和CCL2可能有助于多线抗肿瘤干预。
- [0218] 靶向CCL2-而不是其受体-将特异性地抑制不期望的CCL2介导的效应,从而避免可

能通过相同的受体 (CCR2) 但不同的配体 (例如 CCL7、CCL8、CCL13) 信号传导的效应, 后者参与与其他免疫细胞群的募集, 如 Th1 和 NK 细胞。

[0219] 临床上, CCL2 已成为多个研究的首选抗体靶标, 该多项研究旨在中和不同炎症性疾病引起的 CCL2 水平升高, 所述炎症性疾病诸如类风湿关节炎 (Haringman 等人, 2006)、特发性肺纤维化 (Raghu 等人, 2015)、糖尿病肾病 (Menne 等人, 2016) 和癌症 (Sandhu 等人, 2013)。然而, 其较高的合成速率和观察到的较高的体内抗体-抗原解离常数 (KD) 已被证明是阻碍常规抗体以临床可行剂量抑制游离 CCL2 的主要障碍 (Fetterly 等人, 2013)。

[0220] CCL2 的中和作用似乎在 CCL2 血清水平升高的患者中更明显, 这在乳腺癌 (BC)、卵巢癌 (OvCa)、结直肠癌 (CRC)、胰腺癌和前列腺癌等多种类型的癌症中都观察到。然而, 即使是在这些适应症中没有出现这种血清学但肿瘤高度浸润髓系免疫细胞的患者, 由于上述提及的 CCL2 在肿瘤中的许多作用, 也可能从这种新型的治疗中获益。

[0221] 如本文所用, “与人 CCL2 结合” “与人 CCL2 特异性结合” 和 “结合至人 CCL2” 的抗体或 “抗 CCL2 抗体” 是指与人 CCL2 抗原特异性结合的抗体, 其具有 K_D 值为 $5.0 \times 10^{-8} \text{ mol/l}$ 或更低的结合亲和力, 在一个实施例中 K_D 值为 $1.0 \times 10^{-9} \text{ mol/l}$ 或更低, 在一个实施例中 K_D 值为 $5.0 \times 10^{-8} \text{ mol/l}$ 至 $1.0 \times 10^{-13} \text{ mol/l}$ 。

[0222] 使用标准结合测定 (诸如表面等离子体共振技术 (BIAcore®, GE-Healthcare Uppsala, 瑞典)) 例如使用包含 CCL2 胞外域 (例如在其天然存在的 3 维结构中) 的结构来确定结合亲和力。在一个实施例中, 结合亲和力是通过标准的结合测定使用示例性的可溶性 CCL2 来确定的。

[0223] 抗体具体是指抗体对抗原的特定表位的选择性识别。例如, 天然抗体为单特异性的。

[0224] 如本文所用, 术语 “单特异性” 抗体表示具有一个或多个结合位点的抗体, 每个结合位点与相同抗原的相同表位结合。

[0225] 如本文所用, 术语 “结合 (人) CCL2 的双特异性抗体”、“结合 (人) CCL2 双原位旁抗体”、“双特异性抗 CCL2 抗体”、“双原位旁抗 CCL2 抗体” 是指能够特异性结合 (人) CCL2 上至少两个不同表位的抗体。通常, 这种双特异性抗体包含两个不同的抗原结合位点 (两个不同的互补位), 每个抗原结合位点针对 (人) CCL2 的不同表位具有特异性。在某些实施例中, 双特异性抗体能够结合 CCL2 上的两个不同且不重叠的表位, 这意味着这两个不同的抗原结合位点不会竞争与 CCL2 结合。

[0226] 出于本文目的的 “受体人框架” 是这样的框架, 其包含来源于如下所定义的人免疫球蛋白框架或人共有框架的轻链可变结构域 (VL) 框架或重链可变结构域 (VH) 框架的氨基酸序列。“来源于” 人免疫球蛋白框架或人共有框架的受体人框架可包含与所述人免疫球蛋白框架或人共有框架相同的氨基酸序列, 或者其可以包含氨基酸序列变化。在一些实施例中, 氨基酸变化的数量为 10 个或更少、9 个或更少、8 个或更少、7 个或更少、6 个或更少、5 个或更少、4 个或更少、3 个或更少, 或 2 个或更少。在一些实施例中, VL 受体人框架在序列上与 VL 人免疫球蛋白框架序列或人共有框架序列相同。

[0227] 本文的术语 “抗体” 以最广泛的含义使用, 并且包括各种抗体结构, 包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体 (例如, 双特异性抗体) 和抗体片段, 只要它们表现出所需的抗原结合活性即可。

[0228] “抗体片段”是指除了完整抗体以外的分子,该分子包含完整抗体的一部分,该部分结合完整抗体所结合的抗原。抗体片段的实例包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂;双体抗体;线性抗体;单链抗体分子(例如scFv);以及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0229] 如本文所用,术语“价”表示在抗体中存在指定数目的抗原结合位点。因此,术语“与抗原单价结合”表示在抗体中存在对抗原具有特异性的一个(并且不超过一个)抗原结合位点。

[0230] 术语“抗原结合位点”是指提供与抗原的相互作用的抗体的位点或区域,即一个或若干个氨基酸残基。例如,抗体的抗原结合位点包含来自互补决定区(complementarity determining region,CDR)的氨基酸残基。在一个实施例中,抗体的抗原结合位点包含来自VH和VL的氨基酸残基。天然免疫球蛋白分子通常具有两个抗原结合位点,Fab分子通常具有单个抗原结合位点。“抗原结合部分”是指包含与抗原决定簇特异性结合的抗原结合位点的多肽分子。抗原结合部分包括如本文进一步定义的抗体及其片段。特定的抗原结合部分包括抗体的抗原结合结构域,其包含抗体重链可变区和抗体轻链可变区。在某些实施例中,抗原结合部分可包含如本文进一步定义且在本领域中已知的抗体恒定区。可用的重链恒定区包括以下五种同种型中的任一种:α、δ、ε、γ或μ。可用的轻链恒定区包括以下两种同种型中的任一种:κ和λ。

[0231] 如本文所用,术语“抗原决定簇”或“抗原”是指多肽大分子上与抗原结合部分/位点结合形成抗原结合部分-抗原复合物的位点。有用的抗原决定簇可以在例如肿瘤细胞的表面上、病毒感染细胞的表面上、其他患病细胞的表面上、免疫细胞的表面上、血清中的游离物和/或细胞外基质(ECM)中找到。

[0232] 术语“嵌合”抗体是指这样的抗体,在所述抗体中重链和/或轻链的一部分来源于特定来源或物种,而重链和/或轻链的其余部分来源于不同的来源或物种。

[0233] 抗体的“类别”是指抗体的重链所具有的恒定结构域或恒定区的类型。存在五大类抗体:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且这些抗体中的一些可以进一步分为亚类(同种型),例如IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁和IgA₂。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定结构域分别称为α、δ、ε、γ和μ。优选地,本发明的双特异性抗体属于人IgG同种型,更优选地属于人IgG1同种型。如本文所用,术语IgG同种型和IgG1同种型是指人IgG同种型和人IgG1同种型。通常,基于IgG亚类之间的等位基因变异,不同的IgG同种型以略有不同的同种异型的形式存在(参见Vidarsson等人;Front Immunol 5(2014)Article 520,1-17)。药剂(例如,药物制剂)的“有效量”,是指用以在必要的剂量和时间段内有效实现所需的治疗或预防结果的量。

[0234] 本文的术语“Fc结构域”或“Fc区”用于定义免疫球蛋白重链的C末端区,该C末端区含有恒定区的至少一部分。该术语包括天然序列Fc区和变体Fc区。尽管IgG重链Fc区的边界可能略有不同,但是人IgG重链Fc区通常被定义为从Cys226或从Pro230延伸至该重链的羧基末端。然而,由宿主细胞产生的抗体可以经历对来自重链C末端的一个或多个(特别是一个或两个)氨基酸的翻译后裂解。因此,由宿主细胞通过表达编码全长重链的特定核酸分子产生的抗体可以包括全长重链,或者该抗体可以包括全长重链的切割变体(在本文中也称为“经切割的变体重链”)。这可能是重链的最后两个C末端氨基酸为甘氨酸(G446)和赖氨酸(K447,根据Kabat EU索引编号)的情况。因此,Fc区的C末端赖氨酸(Lys447)或C末端甘氨酸

(Gly446)和赖氨酸(K447)可以存在或可以不存在。如果没有另外指明,则包含Fc结构域(或如本文所定义的Fc结构域的亚基)的重链的氨基酸序列在本文中被表示为没有C末端甘氨酸-赖氨酸二肽。在本发明的一个实施例中,包括如本文所指定的Fc结构域的亚基的重链包含在根据本发明的抗体或双特异性抗体中,该重链包含另外的C末端甘氨酸-赖氨酸二肽(G446和K447,根据Kabat的EU索引编号)。在本发明的一个实施例中,包含如本文所指定的Fc结构域的亚基的重链包含在根据本发明的抗体或双特异性抗体中,该重链包含另外的C末端甘氨酸残基(G446,根据Kabat的EU索引编号)。本发明的组合物,诸如本文所述的药物组合物,包含本发明的抗体或双特异性抗体群体。该抗体或双特异性抗体群体可包含具有全长重链的分子和具有经切割的变体重链的分子。该抗体或双特异性抗体群体可以由具有全长重链的分子和具有经切割的变体重链的分子的混合物组成,其中至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%的该抗体或双特异性抗体具有经切割的变体重链。在本发明的一个实施例中,包含本发明的抗体或双特异性抗体群体的组合物包含抗体或双特异性抗体,该抗体或双特异性抗体包含重链,该重链包含如本文所指定的Fc结构域的亚基以及另外的C末端甘氨酸-赖氨酸二肽(G446和K447,根据Kabat的EU索引编号)。在本发明的一个实施例中,包含本发明的抗体或双特异性抗体群体的组合物包含抗体或双特异性抗体,该抗体或双特异性抗体包含重链,该重链包含如本文所指定的Fc结构域的亚基以及另外的C末端甘氨酸残基(G446,根据Kabat的EU索引编号)。在本发明的一个实施例中,此类组合物包含抗体或双特异性抗体群体,该抗体或双特异性抗体群体由以下分子构成:包含包括如本文所指定的Fc结构域的亚基的重链的分子;包含包括如本文所指定的Fc结构域的亚基以及另外的C末端甘氨酸残基(G446,根据Kabat的EU索引编号)的重链的分子;以及包含包括如本文所指定的Fc结构域的亚基以及另外的C末端甘氨酸-赖氨酸二肽(G446和K447,根据Kabat的EU索引编号)的重链的分子。在某些实施例中,根据Kabat的EU索引编号的447位处的赖氨酸已经被甘氨酸(K447G)突变替换,并且分子包含另外的C末端甘氨酸-甘氨酸二肽(G446和G447,根据Kabat的EU索引编号)。除非本文另有说明,否则Fc区或恒定区中氨基酸残基的编号是“根据EU编号系统”,也称为“根据Kabat的EU索引编号”或“Kabat EU编号”,如以下文献所述:Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991(另见上文)。如本文所用的Fc结构域的“亚基”是指形成二聚Fc结构域的一种多肽中的一种,即包含免疫球蛋白重链的C末端恒定区的多肽,该多肽能够稳定自缔合。例如,IgG Fc结构域的亚基包含IgG CH2和IgG CH3恒定结构域。

[0235] “框架”或“FR”是指除高变区(HVR)残基之外的可变结构域残基。可变结构域的FR通常由以下四个FR结构域组成:FR1、FR2、FR3和FR4。因此,CDR和FR序列通常在VH(或VL)中以如下序列出现:FR-H1(L1)-CDR-H1(L1)-FR-H2(L2)-CDR-H2(L2)-FR-H3(L3)-CDR-H3(L3)-FR-H4(L4)。

[0236] 术语“全长抗体”、“完整抗体”及“全抗体”在本文中可互换地用于指代具有基本上类似于天然抗体结构的结构或具有含有如本文所定义的Fc区的重链的抗体。

[0237] “人抗体”是这样的抗体,该抗体具有的氨基酸序列对应于由人或人细胞产生的抗体的氨基酸序列,或来源于利用人抗体全套库或其他人抗体编码序列的非人源的抗体的氨基酸序列。人抗体的该定义特别地排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

[0238] “人共有框架”是这样的框架,其表示在人免疫球蛋白VL或VH框架序列的选择中最常存在的氨基酸残基。一般而言,人免疫球蛋白VL或VH序列的选择来自于可变结构域序列的亚组。一般而言,序列的亚组是如Kabat,E.A.等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Bethesda MD(1991),NIH Publication 91-3242,第1-3卷中所述的亚组。在一个实施例中,对于VL,该亚组是如Kabat等人,出处同上中的亚组κI。在一个实施例中,对于VH,该亚组是如Kabat等人,出处同上中的亚组III。

[0239] “人源化”抗体是指这样的嵌合抗体,其包含来自非人CDR的氨基酸残基和来自人FR的氨基酸残基。在某些实施例中,人源化抗体将基本上包含所有的至少一个、通常两个可变结构域,其中所有或基本上所有CDR对应于非人抗体的CDR,并且所有或基本上所有的FR对应于人抗体的FR。人源化抗体任选地可以包含来源于人抗体的抗体恒定区的至少一部分。“人源化形式”的抗体,例如,非人抗体,是指已经进行过人源化的抗体。

[0240] 如本文所用,术语“互补决定区”或“CDR”是指以下项中的每一种:抗体可变结构域的在序列中高变和/或形成结构上限定的环(“高变环”)和/或含有抗原接触残基(“抗原接触点”)的区域。通常,抗体包含六个CDR;三个在VH中(CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3),并且三个在VL中的(CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3)。本文中的示例性CDR包括:

[0241] (a) 出现在以下氨基酸残基处的高可变环:26至32(CDR-L1)、50至52

[0242] (CDR-L2)、91至96(CDR-L3)、26至32(CDR-H1)、53至55(CDR-H2)

[0243] 和96至101(CDR-H3)(Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917(1987));(b) 出现在以下氨基酸残基处的CDR:24至34(CDR-L1)、50至56

[0244] (CDR-L2)、89至97(CDR-L3)、31至35b(CDR-H1)、50至65(CDR-H2)和95至102(CDR-H3)(Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991));

[0245] (c) 出现在以下氨基酸残基处的抗原接触点:27c至36(CDR-L1)、46至55(CDR-L2)、89至96(CDR-L3)、30至35b(CDR-H1)、47至58(CDR-H2)和93至101(CDR-H3)(MacCallum等人,J.Mol.Biol.262:732-745(1996));以及

[0246] (d) (a)、(b)和/或(c)的组合,包括CDR氨基酸残基24至34(CDR-L1)、50至56(CDR-L2)、89至97(vL3)、31至35(CDR-H1)、50至63(CDR-H2)和95-102(CDR-H3)。

[0247] 除非另外指明,否则可变结构域中的CDR残基和其他残基(例如,FR残基)在本文中根据以下文献编号:Kabat等人,Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991)。

[0248] “个体”或“受试者”是哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯养动物(例如牛、绵羊、猫、犬和马)、灵长类动物(例如人和非人灵长类动物,诸如猴)、兔以及啮齿类动物(例如小鼠和大鼠)。在某些实施例中,该个体或受试者为人。

[0249] “分离的”抗体为已从其自然环境的组分中分离的抗体。在一些实施例中,通过例如电泳(例如,SDS-PAGE、等电聚焦(isoelectric focusing,IEF)、毛细管电泳)或色谱(例如,离子交换或反相HPLC)确定,将抗体纯化至大于95%或99%的纯度。关于用于评估抗体纯度的方法的综述,参见例如,Flatman,S.等人,J.Chromatogr.B 848(2007)79-87。

[0250] “经分离的”核酸是指已自其自然环境的组分中分离的核酸分子。分离的核酸包括

这样的核酸分子,其包含在通常含有核酸分子的细胞中,但该核酸分子存在于染色体外或与其天然染色体位置不同的染色体位置处。

[0251] “编码单特异性或双特异性抗CCL2抗体的经分离的核酸”是指编码抗体重链和轻链(或其片段)的一个或多个核酸分子,包括在单一载体或单独的载体中的此类核酸分子,以及存在于宿主细胞中一个或多个位置的此类核酸分子。

[0252] 如本文所用的术语“单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体群体获得的抗体,即,除了可能的变异抗体(例如,含有天然存在的突变或在单克隆抗体制剂的生产过程中产生,此类变体通常以少量形式呈递)之外,包含该群体的各个抗体是相同的和/或结合相同的表位。与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相反,单克隆抗体制剂中的每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。因此,修饰语“单克隆”表示抗体的特征是从基本上同质的抗体群体获得的,并且不应解释为需要通过任何特定方法生产抗体。例如,待根据本发明使用的单克隆抗体可以通过多种技术制备,包括但不限于杂交瘤方法、重组DNA方法、噬菌体展示方法以及利用含有全部或部分人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法,在本文中描述了用于制备单克隆抗体的此类方法和其他示例性方法。

[0253] “天然抗体”是指具有不同结构的天然存在的免疫球蛋白分子。例如,天然IgG抗体是约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白,由经二硫键合的两条相同轻链和两条相同重链构成。从N末端至C末端,每条重链均具有可变区(VH),亦称为可变重链结构域或重链可变结构域,随后为三个恒定结构域(CH1、CH2和CH3)。类似地,自N末端至C末端,各轻链具有可变区(VL),也称为可变轻链结构域或轻链可变结构域,继之以恒定轻链(CL)结构域。抗体的轻链基于其恒定结构域的氨基酸序列,可以归属于两种类型中的一种,这两种类型称为卡帕(κ)和兰姆达(λ)。

[0254] 术语“包装插页”用于指治疗产品的商业包装中通常包括的说明书,其含有涉及此类治疗产品的使用的有关适应症、用法、剂量、施用、组合疗法、禁忌和/或警告的信息。

[0255] 相对于参考多肽序列的“氨基酸序列同一性百分比(%)”被定义为在比对候选序列与参考多肽序列并且引入空位(如果必要的话)以实现最大的序列同一性百分比之后,并且在不考虑将任何保守取代作为序列同一性的组成部分的情况下,候选序列中的氨基酸残基与参考多肽序列中的氨基酸残基相同的百分比。用于确定氨基酸序列同一性百分比的比对可以以本领域技术范围内的各种方式实现,例如使用可公开获得的计算机软件,诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可确定用于比对的适当参数,包括在所比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。然而,为了本文的目的,使用序列比较计算机程序ALIGN-2来生成氨基酸序列同一性%的值。ALIGN-2序列比较计算机程序由基因泰克公司(Genentech, Inc.)编写,并且源代码已经与用户文档一起提交到U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559,在那里以美国版权登记号TXU510087注册。ALIGN-2程序可从基因泰克公司, South San Francisco, California公开获得,或者可以从源代码编译。ALIGN-2程序应经编译以在UNIX操作系统上使用,该UNIX操作系统包括数字UNIX V4.0D。所有序列比较参数均由ALIGN-2程序设置并且不变。

[0256] 在采用ALIGN-2进行氨基酸序列比较的情况下,给定氨基酸序列A与给定氨基酸序列B的氨基酸序列同一性%(其可以替代性地表达为给定氨基酸序列A具有或包含与给定氨基酸序列B的某一氨基酸序列同一性%)计算如下:100乘以分数X/Y

[0257] 其中X是由序列比对程序ALIGN-2在该程序对A和B的比对中评分为相同匹配的氨基酸残基的数目,而其中Y是B中氨基酸残基的总数。应当理解,在氨基酸序列A的长度不等于氨基酸序列B的长度的情况下,A与B的氨基酸序列同一性%将不等于B与A的氨基酸序列同一性%。除非另外特别指明,否则本文所使用的所有氨基酸序列同一性%的值是如前一段中所述使用ALIGN-2计算机程序获得的。

[0258] 术语“药物制剂”是指处于允许包含在其中的活性成分的生物活性有效的形式,并且不含对于将被施用制剂的受试者具有不可接受的毒性的另外组分的制剂。

[0259] “药用载体”是指药物制剂中除活性成分外的对受试者无毒的成分。药用载体包括但不限于缓冲液、赋形剂、稳定剂,或防腐剂。

[0260] 如本文所用,“治疗(treatment)”(及其语法变型,诸如“治疗(treat)”或“治疗(treating)”)是指试图改变所治疗个体的自然进程的临床干预,并且可以是为了预防或在临床病理学的进程期间进行。治疗的期望效果包括但不限于预防疾病的发生或复发、减轻症状、削弱疾病的任何直接或间接病理学后果、预防转移、降低疾病进展的速率、改善或减轻疾病状态,以及缓解或改善预后。在一些实施例中,本发明的抗体用于延迟疾病的发展或减缓疾病的进展。

[0261] 术语“可变区”或“可变结构域”是指抗体重链或轻链的参与抗体与抗原结合的结构域。天然抗体的重链和轻链的可变结构域(分别为VH和VL)通常具有相似的结构,其中每个结构域包含四个保守框架区(FR)和三个高变区(CDR)。(参见例如,Kindt,T.J.等人,Kuby Immunology,第6版,W.H.Freeman and Co.,N.Y.(2007),第91页)。单一VH或VL结构域可以足赋予抗原结合特异性。此外,结合特定抗原的抗体可分别使用来自结合该抗原的抗体的VH或VL结构域来进行分离,以筛选互补VL或VH结构域的文库。参见例如,Portolano,S.等人,J.Immunol.150(1993)880-887;Clackson,T.等人,Nature 352(1991)624-628)。

[0262] 如本文所用的术语“载体”是指能够载运与其相连的另一核酸的核酸分子。该术语包括作为自我复制核酸结构的载体,以及并入其已被引入的宿主细胞的基因组中的载体。某些载体能够指导与其可操作地连接的核酸的表达。此类载体在本文中称为“表达载体”。

[0263] I.组合物和方法

[0264] 在一个方面,本发明部分基于以下发现:如本文所述的双特异性抗体使用不同的抗CCL2抗原结合位点作为第一和第二抗原结合位点/部分。这些双特异性抗CCL2抗体以高特异性与CCL2的某些表位结合,并且有能力特异性抑制CCL2与其受体CCR2的结合。与单特异性抗体相比,它们示出了经改善的免疫复合物形成以及经改善的体内CCL2消除。本文所述的呈扭曲体(contorsbody)形式的特异性双特异性抗CCL2抗体还示出了有价值的特性,如低粘度(这允许例如适用于例如皮下施用的高浓度溶液)

[0265] 双特异性抗CCL2抗体

[0266] 双特异性抗体

[0267] 如本文所述的双特异性抗体是对CCL2上的至少两个不同表位具有不同的结合特异性的单克隆抗体。

[0268] 制备多特异性抗体和双特异性抗体的技术包括但不限于对具有不同特异性的两个免疫球蛋白重链-轻链对的重组共表达(参见,Milstein和Cuello,Nature305:537(1983))和“杵臼”工程化(参见例如,美国专利号5,731,168,以及Atwell等人,

J.Mol.Biol.270:26(1997))。多特异性抗体也可以通过以下方法来制备:工程化静电转向效应,以用于制备抗体Fc-异源二聚体分子(参见例如,WO 2009/089004);交联两种或更多种抗体或片段(参见例如,美国专利号4,676,980以及Brennan等人,Science,229:81(1985));使用亮氨酸拉链以生产双特异性抗体(参见例如,Kostelny等人,J.Immunol.,148(5):1547-1553(1992)和WO 2011/034605);使用通用轻链技术,以用于规避轻链错配问题(参见例如,WO 98/50431);使用“双体抗体”技术,以用于制备双特异性抗体片段(参见例如,Hollinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:6444-6448(1993));以及使用单链Fv(sFv)二聚体(参见例如,Gruber等人,J.Immunol.,152:5368(1994));以及如例如Tutt等人,J.Immunol.147:60(1991)所述的方法制备三特异性抗体。

[0269] 本文还包括具有三个或更多个抗原结合位点的工程化抗体,包括例如“章鱼抗体”或者DVD-Ig(参见例如,WO 2001/77342和WO 2008/024715)。具有三个或更多个抗原结合位点的多特异性抗体的其他示例可以在WO 2010/115589、WO 2010/112193、WO 2010/136172、WO2010/145792和WO 2013/026831中找到。双特异性抗体或其抗原结合片段还包括“双重作用Fab”或“DAF”,其包含与CCL2以及另一种不同抗原结合或与CCL2的两个不同表位结合的抗原结合位点(参见例如,US2008/0069820和WO 2015/095539)。

[0270] 多特异性抗体也可以以不对称形式提供,其中在具有相同抗原特异性的一个或多个结合臂中有结构域互换,即通过交换VH/VL结构域(参见例如,WO 2009/080252和WO 2015/150447)、CH1/CL结构域(参见例如,WO 2009/080253)或完整的Fab臂(参见例如,WO 2009/080251、WO 2016/016299,还参见Schaefer等人,PNAS,108(2011)1187-1191,以及Klein等人,MAbs 8(2016)1010-20),也称为CrossMab。还可以通过将荷电或非荷电的氨基酸突变引入结构域界面以指导正确的Fab配对,以对不对称结合臂进行工程化。参见例如WO 2016/172485。

[0271] 多特异性抗体的各种其他分子形式是在本领域中已知的并且包括在本文中(参见例如Spiess等人,Mol Immunol 67(2015)95-106)。

[0272] 本发明的双特异性抗体形式:

[0273] 本发明的优选双特异性抗体属于以下形式:

[0274] 双特异性抗体包含

[0275] a) 第一多肽链,其包含(从N末端至C末端方向)VH1-CH1-L1-铰链-CH2-CH3-L2-VL1-CL,其中,

[0276] VH1为第一重链可变结构域并且VL1为第一可变轻链结构域(两者一起形成(缔合在一起以形成)第一抗原结合位点),

[0277] CH1为恒定重链结构域1,

[0278] L1为长度为5个至15个氨基酸(在一个实施例中,长度为5个至10个氨基酸)的多肽接头,

[0279] 铰链为重链铰链区,

[0280] CH2为恒定重链结构域2,

[0281] CH3为恒定重链结构域3,

[0282] L2为长度为5个至15个氨基酸(在一个实施例中,长度为10个至15个氨基酸)的多肽接头,

[0283] CL为恒定轻链结构域，

[0284] 以及

[0285] b) 第二多肽链，其包含(从N末端至C末端方向) VH2-CH1-L1-铰链-CH2-CH3-L2-VL2-CL，其中，

[0286] VH2为第二重链可变结构域并且VL2为第二可变轻链结构域(两者一起形成(缔合在一起以形成)第二抗原结合位点)，

[0287] CH1为恒定重链结构域1，

[0288] L1为长度为5个至15个氨基酸(在一个实施例中，长度为5个至10个氨基酸)的多肽接头，

[0289] 铰链为重链铰链区，

[0290] CH2为恒定重链结构域2，

[0291] CH3为恒定重链结构域3，

[0292] L2为长度为5个至15个氨基酸(在一个实施例中，长度为10个至15个氨基酸)的多肽接头，

[0293] CL为恒定轻链结构域。

[0294] 包含形式“扭曲体”(CB)的该基础抗体Fc结构域例如描述于Guy J.Georges等人，Computational and Structural Biotechnology Journal第18卷，2020，第1210-1220页。还参见图17中的方案，其中示出了具有不同区域和组分的双特异性扭曲体形式的实例。CH3结构域之间的实心圆为任选的异源二聚化，该异源二聚化促进CH3结构域的修饰/突变(例如，杵臼结构，在下文参考促进FC修饰的异源二聚化的章节中描述了更多细节)

[0295] 术语“多肽接头”表示天然和/或合成来源的接头。多肽接头由氨基酸的线性链组成，其中20种天然存在的氨基酸是通过肽键连接的单体结构嵌段。链的长度为1个至15个氨基酸残基。多肽接头可以含有重复的氨基酸序列或天然存在的多肽的序列。多肽接头具有功能以确保双特异性扭曲体的抗体结构域可通过允许结构域正确折叠并且被适宜地呈递而执行它们的生物活性。优选地，多肽接头是“合成的肽接头”，其被指定为富含甘氨酸残基和/或丝氨酸残基。这些残基排列在例如至多五个氨基酸的小重复单元中。

[0296] 接头L1和L2优选地为甘氨酸-丝氨酸接头；丝氨酸残基在链中帶有一些极性，用以向接头提供溶解度。如W02019233842所述，接头区段与融合蛋白片段之间的转变优选地不应涉及GS基序，因为存在翻译后修饰(即，O-糖化)的可能性。本申请中所述的扭曲体则由末端甘氨酸构成。已经测试了长度/组成的变异。可以考虑L1和L2的任意组合。重复甘氨酸限于最多4个连续甘氨酸。如果经由接头与另一个C末端区段融合的结构域的C端区段由例如一个或两个甘氨酸组成(例如，如果CH3结构域的C末端以甘氨酸结束或被修饰为以两个甘氨酸结束)，则必须考虑这一个或两个甘氨酸的最多4个连续甘氨酸的限制。在至多六个额外任意度的多体单元的氨基末端和/或羧基末端，可加入天然出现的氨基酸。长度为10个氨基酸的示例性接头例如选自以下项的组：GSGGSGGSGG (SEQ ID NO:183)、GSGGGSGGGG (SEQ ID NO:184)、GSGGGGSGGG (SEQ ID NO:185)、GSGGGSGGGG (SEQ ID NO:186)、GSGGGSGGGG (SEQ ID NO:187)、GSGGGGSGG (SEQ ID NO:188)、GGGSGGSGGG (SEQ ID NO:189)、GGGSGGSGG (SEQ ID NO:190)、GGGGSGGSGG (SEQ ID NO:191)，优选地GGSGGGGSGG (SEQ ID NO:188)。类似地，可以构建长度为5个至9个氨基酸或长度为11个至15个氨基酸的其他接头。

[0297] Fc结构域和修饰

[0298] 在特定实施例中,本发明的双特异性抗体包含由第一亚基和第二亚基构成的Fc结构域。应当理解,本文描述的与双特异性抗体相关的Fc结构域的特征可同样适用于包含在本发明抗体中的Fc结构域。

[0299] 双特异性抗体的Fc结构域由包含免疫球蛋白分子的重链结构域的一对多肽链组成。例如,免疫球蛋白G(IgG)分子的Fc结构域是二聚体,该二聚体的每个亚基包含CH2和CH3 IgG重链恒定结构域。Fc结构域的两个亚基能够彼此稳定缔合。在一个实施例中,本发明的双特异性抗体包含不超过一个Fc结构域。

[0300] 在一个实施例中,双特异性抗体的Fc结构域是IgG Fc结构域。在一个特定实施例中,Fc结构域是IgG₁ Fc结构域。在另一个实施例中,Fc结构域是IgG₄ Fc结构域。在一个更具体的实施例中,Fc结构域是IgG₄ Fc结构域,该结构域包含S228位处的氨基酸取代(Kabat EU编号),特别是氨基酸取代S228P。该氨基酸取代减少IgG₄抗体的体内Fab臂交换(参见Stubenrauch等人,Drug Metabolism and Disposition 38,84-91(2010))。在另一特定实施例中,Fc结构域是人Fc结构域。在一个甚至更特定的实施例中,Fc结构域是人IgG₁ Fc结构域。

[0301] IgG同种型的Fc结构域以基于例如它们与Fc γ 受体或与新生儿Fc受体(FcRn)的相互作用的各种特性为特征(参见例如参见,Vidarsson等人;Front Immunol 5(2014) Article 520,1-17)。

[0302] 促进异源二聚化的Fc结构域修饰

[0303] 根据本发明的双特异性抗体包含可以与Fc结构域的两个亚基中的一个或另一个融合的不同抗原结合部分,因此Fc结构域的两个亚基通常包含在两个不相同的多肽链中。这些多肽的重组共表达和随后的二聚化导致了两种多肽的几种可能的组合。为了在重组生产中改善双特异性抗体的产率和纯度,因此将有利的是在双特异性抗体的Fc结构域中引入促进所需多肽的缔合的修饰。

[0304] 因此,在特定实施例中,根据本发明的双特异性抗体的Fc结构域包含促进Fc结构域的第一亚基和第二亚基缔合的修饰。人IgG Fc结构域的两个亚基之间最广泛的蛋白质间相互作用位点在Fc结构域的CH3结构域中。因此,在一个实施例中,所述修饰位于Fc结构域的CH3结构域中。

[0305] 存在几种对Fc结构域的CH3结构域进行修饰以实施异二聚化的方法,这些方法例如在WO 96/27011、WO 98/050431、EP 1870459、WO 2007/110205、WO 2007/147901、WO 2009/089004、WO 2010/129304、WO 2011/90754、WO 2011/143545、WO 2012058768、WO 2013157954、WO 2013096291中详细描述。通常,在所有此类方法中,Fc结构域的第一亚基的CH3结构域和Fc结构域的第二亚基的CH3结构域都以互补的方式工程化,使得每个CH3结构域(或包含其的重链)可以不再与其自身同源二聚化,而是被迫与互补工程化的其他CH3结构域异源二聚化(使得第一和第二CH3结构域异源二聚化并且在两个第一或两个第二CH3结构域之间不形成同源二聚体)。这些用于实现改善的重链异源二聚化的不同方法被设想为与双特异性抗体中的重-轻链修饰(例如在一个结合臂中进行VH和VL交换/替换并且在CH1/CL界面中引入带有相反电荷的荷电氨基酸的取代)组合的不同替换方案,该不同替换方案减少重链/轻链错配和Bence Jones型副产物。

[0306] 在一个具体实施例中,所述促进Fc结构域的第一亚基和第二亚基缔合的修饰是所谓的“突出物入孔”修饰,所述修饰包含在Fc结构域的两个亚基中的一个亚基中进行“突出物”修饰并且在Fc结构域的两个亚基中的另一个亚基中进行“孔”修饰。

[0307] 杵臼结构技术描述于例如US 5,731,168;US 7,695,936;Ridgway等人,Prot Eng 9,617-621(1996)和Carter,J Immunol Meth 248,7-15(2001)中。通常,该方法涉及在第一多肽的界面处引入突起(“杵”)并在第二多肽的界面中引入相应的空腔(“臼”),使得该突起可以定位在该空腔中,以便促进异二聚体的形成并阻碍同二聚体的形成。突起是通过用较大侧链(例如酪氨酸或色氨酸)取代来自第一多肽的界面的小氨基酸侧链而构建的。具有与突起相同或相似大小的补偿空腔是通过用较小的氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)取代大氨基酸侧链而在第二多肽的界面中创建的。

[0308] 因此,在一个特定实施例中,在双特异性抗体的Fc结构域的第一亚基的CH3结构域中,氨基酸残基被具有较大侧链体积的氨基酸残基取代,从而在第一亚基的CH3结构域内产生突起,该突起可定位在第二亚基的CH3结构域内的空腔中,并且在Fc结构域的第二亚基的CH3结构域中,氨基酸残基被具有较小侧链体积的氨基酸残基取代,从而在第二亚基的CH3结构域内产生空腔,第一亚基的CH3结构域内的突起可定位在该空腔内。

[0309] 优选地,所述具有较大侧链体积的氨基酸残基选自精氨酸(R)、苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)和色氨酸(W)组成的组。

[0310] 优选地,所述具有较小侧链体积的氨基酸残基选自丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)和缬氨酸(V)组成的组。

[0311] 凸起和空腔可以通过改变编码多肽的核酸(例如通过位点特异性诱变或通过肽合成)来制备。

[0312] 在一个具体实施例中,在Fc结构域的第一亚基(“突出物”亚基)(的CH3结构域)中,366位的苏氨酸残基被色氨酸残基(T366W)替代,并且在Fc结构域的第二亚基(“孔”亚基)(的CH3结构域)中,407位的酪氨酸残基被缬氨酸残基(Y407V)替代。在一个实施例中,在Fc结构域的第二亚基中,另外地366位的苏氨酸残基被丝氨酸残基(T366S)替代,并且368位的亮氨酸残基被丙氨酸残基(L368A)替代(根据Kabat的EU索引编号)。

[0313] 在又一个实施例中,在Fc结构域的第一亚基中,另外地354位的丝氨酸残基被半胱氨酸残基(S354C)替代或356位的谷氨酸残基被半胱氨酸残基(E356C)替代(特别地354位的丝氨酸残基被半胱氨酸残基取代),并且在Fc结构域的第二亚基中,另外地349位的酪氨酸残基被半胱氨酸残基(Y349C)替代(根据Kabat的EU索引编号)。引入这两个半胱氨酸残基导致在Fc结构域的两个亚基之间形成二硫桥,从而进一步稳定所述二聚体(Carter,J Immunol Methods 248,7-15(2001))。

[0314] 在一个特定实施例中,Fc结构域的第一亚基包含氨基酸取代S354C和T366W,并且Fc结构域的第二亚基包含氨基酸取代Y349C、T366S、L368A和Y407V(根据Kabat EU索引编号)。

[0315] 在一个特定实施例中,与第二抗原结合的抗原结合部分与(任选地经由与CCL2结合的第一抗原结合部分和/或肽接头)Fc结构域的第一亚基(包含“杵”修饰)融合。不希望受理论束缚,结合第二抗原(例如活化性T细胞抗原)的抗原结合部分与Fc结构域的含杵亚基的融合将(进一步)最小化包含两个与活化性T细胞抗原结合的抗原结合部分的抗体的产生

(两个含杵多肽的空间冲突)。

[0316] 用于实施异源二聚化的其他CH3修饰技术被设想为根据本发明的替代方案,并且描述于例如WO 96/27011、WO 98/050431、EP 1870459、WO 2007/110205、WO 2007/147901、WO 2009/089004、WO 2010/129304、WO 2011/90754、WO 2011/143545、WO 2012/058768、WO 2013/157954、WO 2013/096291中。

[0317] 在一个实施例中,可替代地使用EP 1870459中描述的异源二聚化方法。该方法基于在Fc结构域的两个亚基之间的CH3/CH3结构域界面中的特定氨基酸位置处引入带有相反电荷的荷电氨基酸。本发明的双特异性抗体的一个优选实施例是氨基酸突变R409D;在(Fc结构域的)两个CH3结构域中的一者中的K370E,以及氨基酸突变D399K;在Fc结构域的CH3结构域中的另一者中的E357K(根据Kabat EU索引编号)。

[0318] 在另一个实施例中,本发明的双特异性抗体包含Fc结构域的第一亚基的CH3结构域中的氨基酸突变T366W和Fc结构域的第二亚基的CH3结构域中的氨基酸突变T366S、L368A、Y407V,以及另外地氨基酸突变R409D;在Fc结构域的第一亚基的CH3结构域中的K370E,以及氨基酸突变D399K;在Fc结构域的第二亚基的CH3结构域中的E357K(根据Kabat EU索引编号)。

[0319] 在另一个实施例中,本发明的双特异性抗体包含Fc结构域的第一亚基的CH3结构域中的氨基酸突变S354C、T366W和Fc结构域的第二亚基的CH3结构域中的氨基酸突变Y349C、T366S、L368A、Y407V,或者所述双特异性抗体包含Fc结构域的第一亚基的CH3结构域中的氨基酸突变Y349C、T366W和Fc结构域的第二亚基的CH3结构域中的氨基酸突变S354C、T366S、L368A、Y407V,以及另外地氨基酸突变R409D;在Fc结构域的第一亚基的CH3结构域中的K370E,以及氨基酸突变D399K;在Fc结构域的第二亚基的CH3结构域中的E357K(所有根据Kabat EU索引编号)。

[0320] 在一个实施例中,替代地使用WO 2013/157953中描述的异源二聚化方法。在一个实施例中,第一CH3结构域包含氨基酸突变T366K,并且第二CH3结构域包含氨基酸突变L351D(编号根据Kabat EU索引)。在另一实施例中,第一CH3结构域包含另外的氨基酸突变L351K。在另一实施例中,第二CH3结构域还包含选自由Y349E、Y349D和L368E(优选L368E)组成的组的氨基酸突变(编号根据Kabat EU索引)。

[0321] 在一个实施例中,替代地使用WO 2012/058768中描述的异源二聚化方法。在一个实施例中,第一CH3结构域包含氨基酸突变L351Y、Y407A,并且第二CH3结构域包含氨基酸突变T366A、K409F。在另一实施例中,第二CH3结构域包含在T411、D399、S400、F405、N390或K392位的进一步氨基酸突变,例如选自由以下项组成的组:a) T411N、T411R、T411Q、T411K、T411D、T411E或T411W, b) D399R、D399W、D399Y或D399K, c) S400E、S400D、S400R或S400K, d) F405I、F405M、F405T、F405S、F405V或F405W, e) N390R、N390K或N390D, f) K392V、K392M、K392R、K392L、K392F或K392E(编号根据Kabat EU索引)。在另一实施例中,第一CH3结构域包含氨基酸突变L351Y、Y407A,并且第二CH3结构域包含氨基酸突变T366V、K409F。在另一实施例中,第一CH3结构域包含氨基酸突变Y407A,并且第二CH3结构域包含氨基酸突变T366A、K409F。在另一实施例中,第二CH3结构域还包含氨基酸突变K392E、T411E、D399R和S400R(根据Kabat的EU索引编号)。

[0322] 在一个实施例中,替代地使用WO 2011/143545中描述的异源二聚化方法,例如在

选自由368和409组成的组的位置处进行氨基酸修饰(根据Kabat EU索引编号)。

[0323] 在一个实施例中,替代地使用W0 2011/090762中描述的异源二聚化方法,该异源二聚化方法也使用上述突出物入孔技术。在一个实施例中,第一CH3结构域包含氨基酸突变T366W,并且第二CH3结构域包含氨基酸突变Y407A。在一个实施例中,第一CH3结构域包含氨基酸突变T366Y,并且第二CH3结构域包含氨基酸突变Y407T(编号根据Kabat EU索引)。

[0324] 在一个实施例中,双特异性抗体或其Fc结构域属于IgG₂亚类,并且替代性地使用在W0 2010/129304中描述的异源二聚化方法。

[0325] 在一个替代实施例中,促进Fc结构域的第一亚基和第二亚基缔合的修饰包括介导静电转向效应的修饰,例如如在PCT公开W0 2009/089004中所述。通常,该方法涉及用带电电荷的氨基酸残基取代两个Fc结构域亚基的界面处的一个或多个氨基酸残基,使得同源二聚体形成变得在静电上不利,但异源二聚化在静电上有利。在一个此类实施例中,第一CH3结构域包含用带负电荷的氨基酸对K392或N392进行的氨基酸取代(例如谷氨酸(E)或天冬氨酸(D),优选K392D或N392D),并且第二CH3结构域包含用带正电荷的氨基酸对D399、E356、D356或E357进行的氨基酸取代(例如赖氨酸(K)或精氨酸(R),优选D399K、E356K、D356K或E357K,更优选D399K和E356K)。在另一实施例中,第一CH3结构域还包含用带负电荷的氨基酸对K409或R409进行的氨基酸取代(例如谷氨酸(E)或天冬氨酸(D),优选K409D或R409D)。在另一实施例中,第一CH3结构域进一步或替代地包含用带负电荷的氨基酸对K439和/或K370进行的氨基酸取代(例如谷氨酸(E)或天冬氨酸(D))(所有根据Kabat的EU索引编号)。

[0326] 在又一实施例中,替代地使用W0 2007/147901中描述的异源二聚化方法。在一个实施例中,第一CH3结构域包含氨基酸突变K253E、D282K和K322D,并且第二CH3结构域包含氨基酸突变D239K、E240K和K292D(根据Kabat的EU索引编号)。

[0327] 在又一实施例中,可替代地使用W0 2007/110205中描述的异源二聚化方法。

[0328] 在一个实施例中,Fc结构域的第一亚基包含氨基酸取代K392D和K409D,并且Fc结构域的第二亚基包含氨基酸取代D356K和D399K(根据Kabat EU索引编号)。

[0329] 如本文所用,对于双特异性抗CCL2抗体,术语“野生型(WT) IgG或IgG1”是指包含IgG或IgG1恒定重链的双特异性抗体,其可以包含上述促进异源二聚化的修饰/突变,但其不包含不包含如下所述的增加或减少Fc受体结合和/或效应子功能的进一步Fc结构域修饰/突变。

[0330] 增加或减少Fc受体结合和/或效应子功能的Fc结构域修饰/突变:

[0331] 经由扫集技术来修饰双特异性抗CCL2抗体

[0332] 双特异性抗CCL2抗体使用扫集技术来进行修饰,以使得双特异性抗体和CCL2抗体能够在较长时间内消除游离CC12,以在体内实现持续的生物效应,如抗癌功效。

[0333] 扫集概念的描述于例如如下文献:Ikawa等人,Immunological Reviews 270 (2016) 132-151、W02012/122011、W02016/098357和W02013/081143,其通过引用并入本文。

[0334] 本发明提供了用于通过将上述抗体的在酸性pH范围内的抗原结合活性(结合能力)减少至小于其在中性pH范围内的抗原结合活性来促进抗体介导的将抗原摄取至细胞中的方法;并且这促进将抗原摄取至细胞中。本发明还提供了用于促进抗体介导的将抗原摄取至细胞中的方法,该方法基于改变上述抗体的抗原结合结构域中的至少一个氨基酸,这促进将抗原摄取至细胞中。本发明还提供了用于促进抗体介导的将抗原摄取至细胞中的方

法,该方法基于用组氨酸取代至少一个氨基酸或将至少一个组氨酸插入上述抗体的抗原结合结构域中,这促进将抗原摄取至细胞中。

[0335] 在本文中,由抗体介导的“抗原摄取至细胞中”意指抗原通过胞吞作用来吸收至细胞中。同时,在本文中,“促进摄取至细胞中”意指增强与血浆中的抗原结合的抗体的细胞内摄取的速率,和/或减少经摄取的抗原再循环至血浆的量。这意味着,与增加抗体的在中性pH范围内的人FcRn结合活性之前,或者在增加人FcRn结合活性并将抗体的在酸性pH范围内的抗原结合活性(结合能力)减少至小于其在中性pH范围内的抗原结合活性之前的抗体相比,促进了摄取至细胞中的速率。优选地与完整人IgG相比,并且更优选地与完整人IgG相比,该速率得到改善。因此,在本发明中,可以基于抗原摄取至细胞中的速率的增加来评估是否由抗体促进抗原摄取至细胞中。抗原摄取至细胞中的速率可以例如通过以下方式进行计算:监测在将抗原和抗体添加至培养基中后,含有人FcRn表达细胞的培养基中抗原浓度随时间推移的减少;或监测随时间推移摄取至人FcRn表达细胞中抗原的量。使用本发明的方法以用于促进抗体介导的将抗原摄取至细胞中的速率,例如,从血浆中消除抗原的速率可以通过施用抗体来进行增强。因此,还可以例如通过测试施用抗体是否加速了从血浆中消除抗原的速率或者是否减少了血浆中总抗原浓度,评估是否促进了抗体介导的将抗原摄取至细胞中。

[0336] 在本文中,“血浆中总抗原浓度”意指抗体结合抗原和非结合抗原浓度(或者“血浆中游离抗原浓度”,其为抗体非结合抗原浓度)的总和。用以测量“血浆中总抗原浓度”或“血浆中游离抗原浓度”的各种方法为本领域中众所周知的,如下文所述。

[0337] 如本文所用,“完整人IgG”(或“野生型(WT)人IgG”)意指未经修饰的(除了关于上述异源二聚化的潜在修饰之外)人IgG并且不限于特定类别的IgG。这意味着,人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4可以用作“完整人IgG”,只要它可以在酸性pH范围内与人FcRn结合即可。优选地,“完整人IgG”可以为IgG1。

[0338] 本发明还提供了用于增加抗原的数量的方法,单一抗体可以与该抗原结合。更具体地,本发明提供了用于通过增加抗体的在中性pH范围内的人FcRn结合活性来增加抗原的数量的方法,具有在酸性pH范围内的人FcRn结合活性的单一抗体可以与该抗原结合。本发明还提供了用于通过改变抗体的人FcRn结合结构域中的至少一个氨基酸来增加抗原的数量的方法,具有在酸性pH范围内的人FcRn结合活性的单一抗体可以与该抗原结合。

[0339] 本发明提供了用于促进抗体介导的将抗原摄取至细胞中的方法。更具体地,本发明提供了用于促进由具有在酸性pH范围内的人FcRn结合活性的抗体来将抗原摄取至细胞中的方法,该方法基于增加抗体的在中性pH范围内的人FcRn结合活性。本发明还提供了用于由具有在酸性pH范围内的人FcRn结合活性的抗体来改善将抗原摄取至细胞中的方法,该方法基于改变抗体的人FcRn结合结构域中的至少一个氨基酸。

[0340] 本发明还提供了用于基于使用包含氨基酸序列的人FcRn结合结构域,促进由具有在酸性pH范围内的人FcRn结合活性的抗体来将抗原摄取至细胞中的方法,该氨基酸序列具有不同氨基酸的取代,该不同氨基酸的取代取代了选自以下位置的那些氨基酸的至少一个氨基酸:237、238、239、248、250、252、254、255、256、257、258、265、270、286、289、297、298、303、305、307、308、309、311、312、314、315、317、325、332、334、360、376、380、382、384、385、386、387、389、424、428、433、434和436(EU编号),该位置在人FcRn结合结构域的亲本IgG Fc

结构域中,其包含亲本IgG的Fc结构域。

[0341] 本发明还提供了用于通过将上述抗体的在酸性pH范围内的抗原结合活性(结合能力)减少至小于其在中性pH范围内的抗原结合活性来促进抗体介导的将抗原摄取至细胞中的方法;并且这促进将抗原摄取至细胞中。本发明还提供了用于促进抗体介导的将抗原摄取至细胞中的方法,该方法基于改变上述抗体的抗原结合结构域中的至少一个氨基酸,这促进将抗原摄取至细胞中。本发明还提供了用于促进抗体介导的将抗原摄取至细胞中的方法,该方法基于用组氨酸取代至少一个氨基酸或将至少一个组氨酸插入上述抗体的抗原结合结构域中,这促进将抗原摄取至细胞中。

[0342] 在本文中,由抗体介导的“抗原摄取至细胞中”意指抗原通过胞吞作用来吸收至细胞中。同时,在本文中,“促进摄取至细胞中”意指增强与血浆中的抗原结合的抗体的细胞内摄取的速率,和/或减少经摄取的抗原再循环至血浆的量。这意味着,与增加抗体的在中性pH范围内的人FcRn结合活性之前,或者在增加人FcRn结合活性并将抗体的在酸性pH范围内的抗原结合活性(结合能力)减少至小于其在中性pH范围内的抗原结合活性之前的抗体相比,促进了摄取至细胞中的速率。优选地与完整人IgG相比,并且更优选地与完整人IgG相比,该速率得到改善。因此,在本发明中,可以基于抗原摄取至细胞中的速率的增加来评估是否由抗体促进抗原摄取至细胞中。抗原摄取至细胞中的速率可以例如通过以下方式进行计算:监测在将抗原和抗体添加至培养基中后,含有人FcRn表达细胞的培养基中抗原浓度随时间推移的减少;或监测随时间推移摄取至人FcRn表达细胞中抗原的量。使用本发明的方法以用于促进抗体介导的将抗原摄取至细胞中的速率,例如,从血浆中消除抗原的速率可以通过施用抗体来进行增强。因此,还可以例如通过测试施用抗体是否加速了从血浆中消除抗原的速率或者是否减少了血浆中总抗原浓度,评估是否促进了抗体介导的将抗原摄取至细胞中。

[0343] 在本文中,“血浆中总抗原浓度”意指抗体结合抗原和非结合抗原浓度(或者“血浆中游离抗原浓度”,其为抗体非结合抗原浓度)的总和。用以测量“血浆中总抗原浓度”或“血浆中游离抗原浓度”的各种方法为本领域中众所周知的,如下文所述。

[0344] 如本文所用,“完整人IgG”(或“野生型IgG”)意指未经修饰的人IgG(除了关于上述异源二聚化的潜在修饰之外)并且不限于特定类别的IgG。这意味着,人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4可以用作“完整人IgG”,只要它可以在酸性pH范围内与人FcRn结合即可。优选地,“完整人IgG”可以为IgG1。

[0345] 如本文所用,“亲本IgG”意指未经修饰的IgG,其随后被修饰以生成变体,只要亲本IgG的经修饰的变体可以在酸性pH范围内与人FcRn结合即可(因此,亲本IgG不一定需要在酸性条件的与人FcRn结合的结合活性)。亲本IgG可以为天然存在的IgG,或者天然存在的IgG的变体或工程化版本。亲本IgG可以是指多肽本身、包含亲本IgG的组合物,或编码它的氨基酸序列。应当注意,“亲本IgG”包括已知的商业、重组产生的IgG,如下文所概述。“亲本IgG”的来源不受限制并且可以从非人动物或人类的任何生物体中获得。优选地,生物体选自小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、沙鼠、猫、兔、狗、山羊、绵羊、牛、马、骆驼和非人灵长类动物。在另一个实施例中,“亲本IgG”还可以从食蟹猴、狨猴、恒河猴、黑猩猩或人中获得。优选地,“亲本IgG”从人IgG1,但不限于特定类别的IgG中获得。这意味着人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4可以适当地用作“亲本IgG”。以类似的方式,来自前文任何生物体的任何类别或亚类的IgG可以

优选地用作“亲本IgG”。天然存在的IgG的变体或工程化版本的实例描述于以下文献中：Curr Opin Biotechnol.2009年12月;20(6):685-91、Curr Opin Immunol.2008年8月;20(4):460-70、Protein Eng Des Sel.2010年4月;23(4):195-202、WO 2009/086320、WO 2008/092117、WO 2007/041635和WO 2006/105338,但不限于此。

[0346] 本发明还提供了用于通过施用抗体来增强消除血浆抗原的能力的方法。在本发明中,“用于增强消除血浆抗原的能力的方法”与“用于加强抗体从血浆中消除抗原的能力的方法”同义。更具体地,本发明提供了用于通过增加抗体的在中性pH范围内的人FcRn结合活性,增强由具有在酸性pH值范围内的人FcRn结合活性的抗体来消除血浆抗原的能力的方法。本发明还提供了用于增强由具有在酸性pH范围内的人FcRn结合活性的抗体来消除血浆抗原的能力的方法,该方法基于改变抗体的人FcRn结合结构域中的至少一个氨基酸。

[0347] 本发明还提供了用于通过使用包含氨基酸序列的人FcRn结合结构域,增强由具有在酸性pH范围内的人FcRn结合活性的抗体来消除血浆抗原的能力的方法,该氨基酸序列具有选自以下位置的那些氨基酸的至少一个氨基酸的取代:237、238、239、248、250、252、254、255、256、257、258、265、270、286、289、297、298、303、305、307、308、309、311、312、314、315、317、325、332、334、360、376、380、382、384、385、386、387、389、424、428、433、434和436(EU编号),该位置在人FcRn结合结构域的亲本IgG Fc结构域中,其包含具有不同氨基酸的亲本IgG的Fc结构域。

[0348] 本发明还提供了用于通过减少抗体的在酸性pH范围内的抗原结合活性,增强由上述抗体来消除血浆抗原的能力的方法,与在中性pH范围内的抗原结合活性相比,上述抗体具有经改善的消除血浆抗原的能力。本发明还提供了用于通过改变抗体的抗原结合结构域中的至少一个氨基酸,增强由上述抗体来消除血浆抗原的能力的方法,上述抗体具有经改善的消除血浆抗原的能力。本发明还提供了用于通过施用抗体、通过用组氨酸取代至少一个氨基酸或将至少一个组氨酸插入上述抗体的抗原结合结构域,增强消除血浆抗原的能力的方法,上述抗体具有经改善的消除血浆抗原的能力。

[0349] 在本文中,“消除血浆抗原的能力”意指当体内施用或分泌抗体时,从血浆中消除抗原的能力。因此,本文中的“抗体消除血浆抗原的能力的增强”意指与增加抗体的在中性pH范围内的人FcRn结合活性之前、或在增加人FcRn结合活性并同时将其在酸性pH范围内的抗原结合活性减少至小于中性pH范围内的抗原结合活性之前相比,在施用抗体后从血浆中消除抗原的速率加快。抗体用以从血浆中消除抗原的活性的增加可以例如通过体内施用可溶性抗原和抗体,并且测量施用后血浆中可溶性抗原的浓度来进行评估。当通过增加抗体的在中性pH范围内的人FcRn结合活性、或通过增加其人FcRn结合活性并同时将其在酸性pH范围内的抗原结合活性减少至小于中性pH范围内的抗原结合活性,使施用可溶性抗原和抗体后血浆中可溶性抗原的浓度减少时,可以判断抗体消除血浆抗原的能力增强。可溶性抗原的形式可以为抗体结合抗原或抗体非结合抗原,其浓度可以分别确定为“血浆中抗体结合抗原浓度”和“血浆中抗体非结合抗原浓度”(后者与“血浆中游离抗原浓度”同义)。由于“血浆中总抗原浓度”意指抗体结合抗原和非结合抗原浓度(或者“血浆中游离抗原浓度”,其为抗体非结合抗原浓度)的总和,因此可溶性抗原的浓度可以确定为“血浆中总抗原浓度”。用于测量“血浆中总抗原浓度”或“血浆中游离抗原浓度”的各种方法为本领域中众所周知的,如下文所述。

[0350] 本发明还提供了用于改善抗体的药代动力学的方法。更具体地,本发明提供了用于通过增强抗体的在中性pH范围内的人FcRn结合活性,改善具有在酸性pH值范围内的人FcRn结合活性的抗体的药代动力学的方法。此外,本发明提供了用于通过改变抗体的人FcRn结合结构域中的至少一个氨基酸,改善具有在酸性pH值范围内的人FcRn结合活性的抗体的药代动力学的方法。

[0351] 本发明还提供了用于通过使用包含氨基酸序列的人FcRn结合结构域,改善具有在酸性pH范围内的人FcRn结合活性的抗体的药代动力学的方法,该氨基酸序列具有不同氨基酸的取代,该不同氨基酸的取代取代了选自以下位置的那些氨基酸的至少一个氨基酸:: 237、238、239、248、250、252、254、255、256、257、258、265、270、286、289、297、298、303、305、307、308、309、311、312、314、315、317、325、332、334、360、376、380、382、384、385、386、387、389、424、428、433、434和436 (EU编号),该位置在人FcRn结合结构域的亲本IgG Fc结构域中,其包含IgG的Fc结构域。

[0352] 未与抗体结合的游离抗原的血浆浓度或者游离抗原浓度与总浓度的比率可以通过本领域技术人员已知的方法来进行确定,例如,通过以下文献中描述的方法: PharmRes. 2006年1月; 23(1): 95-103。替代性地,当抗原在体内表现出特定功能时,可以通过测试抗原功能是否被无效化来评估抗原是否与将抗原功能无效化的抗体(拮抗分子)结合。可以通过测定反映抗原功能的体内标志物来评估抗原功能是否被无效化。可以通过测定反映抗原功能的体内标志物来评估抗原是否与活化抗原功能的抗体(激动分子)结合。

[0353] 游离抗原的血浆浓度和血浆中游离抗原的量与血浆中总抗原的量的比率的确定、体内标志物测定,以及此类测量不受特别限制;然而,优选地在施用抗体后经过一定时间段后执行测定。在本发明中,施用抗体后的时间段不受特别限制,本领域技术人员可以取决于所施用的抗体的特性等来确定适当的时间段。此类时间段包括例如施用抗体后一天、施用抗体后三天、施用抗体后七天、施用抗体后14天和施用抗体后28天。在本文中,“血浆抗原浓度”意指“血浆中总抗原浓度”,其为抗体结合抗原和非结合抗原浓度(或者“血浆中游离抗原浓度”,其为抗体非结合抗原浓度)的总和。

[0354] 与施用包含完整人IgG Fc结构域作为人FcRn结合结构域的参考抗体相比,或与当不施用本发明的抗原结合结构域分子时相比,可以通过施用本发明的抗体来将血浆中的总抗原浓度降低至二分之一、五分之一、十分之一、二十分之一、五十分之一、一百分之一、二百分之一、500分之一、1,000分之一或甚至更低。

[0355] 在另一方面,本发明提供了表现出pH依赖性结合特征的双特异性抗CCL2抗体。如本文所用,表述“pH依赖性结合”意指抗体表现出“与其在中性pH的结合相比,在酸性pH与CCL2的结合减少”(出于本公开的目的,两种表述均可以互换使用)。例如,“具有pH依赖性结合特征”的抗体包括相比于在酸性pH,在中性pH以较高的亲和力与CCL2结合的抗体。在某些实施例中,相比于在酸性pH,本发明的双特异性抗体在中性pH以至少2倍、3倍、5倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、55倍、60倍、65倍、70倍、75倍、80倍、85倍、90倍、95倍、100倍、200倍、400倍、1000倍、10000倍或更多倍数的亲和力与CCL2结合。在一些实施例中,相比于在pH 5.8,抗体在pH 7.4以较高的亲和力与CCL2结合。在进一步的实施例中,相比于在pH 5.8,抗体在pH 7.4以至少2倍、3倍、5倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、55倍、60倍、65倍、70倍、75倍、80倍、85倍、90倍、95倍、100倍、200倍、

400倍、1000倍、10000倍或更多倍数的亲和力与CCL2结合。

[0356] 当抗原为可溶性蛋白质时,抗体与抗原的结合可以导致血浆中抗原的半衰期延长(即,抗原从血浆中的清除率减少),因为抗体在血浆中可以具有比抗原本身更长的半衰期,并且可以用作用于抗原的载体。这是由于由FcRn穿过细胞中的内体途径来将抗原-抗体复合物再循环(Roopenian, Nat. Rev. Immunol. 7 (9): 715-725 (2007))。然而,具有pH依赖性结合特征的抗体在中性细胞外环境中与其抗原结合,同时在其进入细胞后将抗原释放至酸性内体区室中,预期在抗原中和和清除方面,该抗体相对于其以pH非依赖性方式结合的对应抗体具有更优异的特性(Ikawa等人, Nature Biotechnol. 28 (11): 1203-1207 (2010); Devanaboyina等人, mAbs 5 (6): 851-859 (2013); WO 2009/125825)。

[0357] 出于本公开的目的,抗体对CCL2的“亲和力”以抗体的KD来表达。抗体的KD是指抗体-抗原相互作用的平衡解离常数。抗体与其抗原结合的KD值越大,其对该特定抗原的结合亲和力越弱。因此,如本文所用,表述“相比于在酸性pH,在中性pH以较高的亲和力”(或等同表述“pH依赖性结合”)意指在酸性pH与CCL2结合的抗体的KD大于在中性pH与CCL2结合的抗体的KD。例如,在本发明的上下文中,如果在酸性pH与CCL2结合的抗体的KD为在中性pH与CCL2结合的抗体的KD的至少2倍,则认为相比于在酸性pH,抗体在中性pH以较高的亲和力与CCL2结合。因此,本发明包括相比于在中性pH与CCL2结合的抗体的KD,在酸性pH以至少2倍、3倍、5倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、55倍、60倍、65倍、70倍、75倍、80倍、85倍、90倍、95倍、100倍、200倍、400倍、1000倍、10000倍或更多倍数的KD与CCL2结合的抗体。在另一个实施例中,抗体的在中性pH的KD值可以为 10^{-7}M 、 10^{-8}M 、 10^{-9}M 、 10^{-10}M 、 10^{-11}M 、 10^{-12}M 或更小。在另一个实施例中,抗体的在酸性pH的KD值可以为 10^{-9}M 、 10^{-8}M 、 10^{-7}M 、 10^{-6}M 或更大。

[0358] 在进一步的实施例中,如果在pH 5.8与CCL2结合的抗体的KD为在pH 7.4与CCL2结合的抗体的KD的至少2倍,则认为相比于在酸性pH,抗体在中性pH以较高的亲和力与结合。在一些实施例中,相比于在pH 7.4与CCL2结合的抗体的KD,所提供的抗体在pH 5.8以至少3倍、5倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、55倍、60倍、65倍、70倍、75倍、80倍、85倍、90倍、95倍、100倍、200倍、400倍、1000倍、10000倍或更多倍数的KD与CCL2结合。在另一个实施例中,抗体的在pH 7.4的KD值可以为 10^{-7}M 、 10^{-8}M 、 10^{-9}M 、 10^{-10}M 、 10^{-11}M 、 10^{-12}M 或更小。在另一个实施例中,抗体的在pH 5.8的KD值可以为 10^{-9}M 、 10^{-8}M 、 10^{-7}M 、 10^{-6}M 或更大。

[0359] 抗体对特定抗原的结合特性也可以以抗体的kd来表达。抗体的kd是指抗体的相对于特定抗原的解离速率常数,并且以秒的倒数(即, sec^{-1})来表达。kd值的增加表示抗体与其抗原的结合较弱。因此,本发明包括相比于在中性pH,在酸性pH以较高的kd值与CCL2结合的抗体。本发明包括相比于在中性pH与CCL2结合的抗体的kd,在酸性pH以至少2倍、3倍、5倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、55倍、60倍、65倍、70倍、75倍、80倍、85倍、90倍、95倍、100倍、200倍、400倍、1000倍、10000倍或更多倍数的kd与CCL2结合的抗体。在另一个实施例中,抗体的在中性pH的kd值可以为 10^{-2} 1/s 、 10^{-3} 1/s 、 10^{-4} 1/s 、 10^{-5} 1/s 、 10^{-6} 1/s 或更小。在另一个实施例中,抗体的在酸性pH的kd值可以为 10^{-3} 1/s 、 10^{-2} 1/s 、 10^{-1} 1/s 或更大。本发明还包括相比于在pH 7.4,在pH 5.8以较高的kd值与CCL2结合的抗体。本发明包括相比于在pH 7.4与CCL2结合的抗体的kd,在pH 5.8以至少3倍、5

倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、55倍、60倍、65倍、70倍、75倍、80倍、85倍、90倍、95倍、100倍、200倍、400倍、1000倍、10000倍或更多倍数的kd与CCL2结合的抗体。在另一个实施例中,抗体的在pH 7.4的kd值可以为 10^{-2} 1/s、 10^{-3} 1/s、 10^{-4} 1/s、 10^{-5} 1/s、 10^{-6} 1/s或更小。在另一个实施例中,抗体的在pH 5.8的kd值可以为 10^{-3} 1/s、 10^{-2} 1/s、 10^{-1} 1/s或更大。

[0360] 在某些情况下,“与其在中性pH的结合相比,在酸性pH与CCL2的结合减少”以在酸性pH与CCL2结合的抗体的KD值与在中性pH与CCL2结合的抗体的KD值的比率来表达(反之亦然)。例如,出于本发明的目的,如果抗体表现出2或更大的酸性/中性KD比率,则抗体可以被视为表现出“与其在中性pH的结合相比,在酸性pH与CCL2的结合减少”。在某些实施例中,本发明的抗CCL2抗体的pH 5.8/pH 7.4KD比率为2或更大。在某些示例性实施例中,本发明的抗体的酸性/中性KD比率可以为2、3、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、200、400、1000、10000或更大。在另一个实施例中,抗体的在中性pH的KD值可以为 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、 10^{-12} M或更小。在另一个实施例中,抗体的在酸性pH的KD值可以为 10^{-9} M、 10^{-8} M、 10^{-7} M、 10^{-6} M或更大。在进一步的情况下,如果抗体表现出2或更大的pH 5.8/pH 7.4KD比率,则抗体可以被视为表现出“与其在中性pH的结合相比,在酸性pH与CCL2的结合减少”。在某些示例性实施例中,抗体的pH 5.8/pH 7.4KD比率可以为3、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、200、400、1000、10000或更大。在另一个实施例中,抗体的在pH 7.4的KD值可以为 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、 10^{-12} M或更小。在另一个实施例中,抗体的在pH 5.8的KD值可以为 10^{-9} M、 10^{-8} M、 10^{-7} M、 10^{-6} M或更大。

[0361] 在某些情况下,“与其在中性pH的结合相比,在酸性pH与CCL2的结合减少”以在酸性pH与CCL2结合的抗体的kd值与在中性pH与CCL2结合的抗体的kd值的比率来表达(反之亦然)。例如,出于本发明的目的,如果抗体表现出2或更大的酸性/中性kd比率,则抗体可以被视为表现出“与其在中性pH的结合相比,在酸性pH与CCL2的结合减少”。在某些示例性实施例中,本发明的抗体的pH 5.8/pH 7.4kd比率为2或更大。在某些示例性实施例中,本发明的抗体的酸性/中性kd比率可以为2、3、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、200、400、1000、10000或更大。在另一个实施例中,抗体的在中性pH的kd值可以为 10^{-2} 1/s、 10^{-3} 1/s、 10^{-4} 1/s、 10^{-5} 1/s、 10^{-6} 1/s或更小。在另一个实施例中,抗体的在酸性pH的kd值可以为 10^{-3} 1/s、 10^{-2} 1/s、 10^{-1} 1/s或更大。在某些示例性实施例中,本发明的抗体的pH 5.8/pH 7.4kd比率可以为2、3、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、200、400、1000、10000或更大。在另一个实施例中,抗体的在pH 7.4的kd值可以为 10^{-2} 1/s、 10^{-3} 1/s、 10^{-4} 1/s、 10^{-5} 1/s、 10^{-6} 1/s或更小。在另一个实施例中,抗体的在pH 5.8的kd值可以为 10^{-3} 1/s、 10^{-2} 1/s、 10^{-1} 1/s或更大。

[0362] 如本文所用,表述“酸性pH”意指4.0至6.5的pH。表述“酸性pH”包括以下项中的任一者的pH值:4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4和6.5。在特定方面,“酸性pH”为5.8。

[0363] 如本文所用,表述“中性pH”意指6.7至约10.0的pH。表述“中性pH”包括以下项中的任一者的pH值:6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9和10.0。在

特定方面,“中性pH”为7.4。

[0364] 如本文所表达的,KD值和kd值可以使用基于表面等离子体共振的生物传感器来进行确定,以表征抗体-抗原相互作用。KD值和kd值可以在25℃或37℃下进行确定。

[0365] 在进一步的方面,本发明提供了与CCL2形成免疫复合物(即,抗原-抗体复合物)的双特异性抗CCL2抗体。在某些实施例中,两个或更多个双特异性抗CCL2抗体与两个或更多个CCL2分子结合,以形成免疫复合物。这是可能的,因为CCL2作为含有两个CCL2分子的同源二聚体存在,而抗体具有两个抗原结合位点。

[0366] 一般来说,当两个或更多个抗体与两个或更多个抗原形成免疫复合物时,所得免疫复合物可以穿过复合物中抗体的Fc区、由于亲和力效应而与细胞表面存在的Fc受体强烈结合,并且然后可以被被高效地吸收至细胞中。因此,能够形成含有两个或更多个抗CCL2抗体和两个或更多个CCL2分子的免疫复合物的上述抗CCL2抗体可以经由与Fc受体的强结合(由于亲合力效应)而导致在活体中从血浆中迅速清除CCL2。

[0367] 此外,在抗原中和和清除方面,具有pH依赖性结合特征的抗体被认为相对于其以pH非依赖性方式结合的对应该抗体具有更优异的特性(Igawa等人,Nature Biotech.28(11):1203-1207(2010);Devanaboyina等人,mAbs 5(6):851-859(2013);WO 2009/125825)。因此,预期具有上述两种特性的抗体,即具有pH依赖性结合特征并且与两个或更多个抗原形成含有两个或更多个抗体的免疫复合物的抗体,具有甚至更优异的特性以用于高度加速从血浆中消除抗原(WO 2013/081143)。

[0368] 在一个方面,本发明提供了包含具有经增强的Fc γ RIIb结合活性的变体Fc区的多肽,该变体Fc区包含至少两个氨基酸改变,该至少两个氨基酸改变包括:(a) 236位处的一个氨基酸改变,以及(b) 选自由以下项组成的组的至少一个位置的至少一个氨基酸改变:231、232、233、234、235、237、238、239、264、266、267、268、271、295、298、325、326、327、328、330、331、332、334和396,根据EU编号。

[0369] 在一个方面,本发明提供了包含具有经增强的Fc γ RIIb结合活性的变体Fc区的多肽,该变体Fc区包含236位(根据EU编号)处的氨基酸改变。

[0370] 在一个方面,本发明提供了包含具有经增强的Fc γ RIIb结合活性的变体Fc区的多肽,该变体Fc区包含至少两个氨基酸改变,该至少两个氨基酸改变包括:(a) 236位处的一个氨基酸改变,以及(b) 选自由以下项组成的组的至少一个位置的至少一个氨基酸改变:231、232、235、239、268、295、298、326、330和396,根据EU编号。在进一步的实施例中,变体Fc区包含选自由以下项组成的组的至少一个位置的氨基酸改变:231、232、235、239、268、295、298、326、330和396,根据EU编号。在进一步的实施例中,变体Fc区包含选自由以下项组成的组的至少一个位置的氨基酸改变:268、295、326和330,根据EU编号。

[0371] 在另一方面,本发明提供了包含具有经增强的Fc γ RIIb结合活性的变体Fc区的多肽,该变体Fc区包含以下(1)至(37)中任一者的氨基酸改变:(1) 231、236、239、268和330位;(2) 231、236、239、268、295和330位;(3) 231、236、268和330位;(4) 231、236、268、295和330位;(5) 232、236、239、268、295和330位;(6) 232、236、268、295和330位;(7) 232、236、268和330位;(8) 235、236、268、295、326和330位;(9) 235、236、268、295和330位;(10) 235、236、268和330位;(11) 235、236、268、330和396位;(12) 235、236、268和396位;(13) 236、239、268、295、298和330位;(14) 236、239、268、295、326和330位;(15) 236、239、268、295和330位;(16)

236、239、268、298和330位；(17) 236、239、268、326和330位；(18) 236、239、268和330位；(19) 236、239、268、330和396位；(20) 236、239、268和396位；(21) 236和268位；(22) 236、268和295位；(23) 236、268、295、298和330位；(24) 236、268、295、326和330位；(25) 236、268、295、326、330和396位；(26) 236、268、295和330位；(27) 236、268、295、330和396位；(28) 236、268、298和330位；(29) 236、268、298和396位；(30) 236、268、326和330位；(31) 236、268、326、330和396位；(32) 236、268和330位；(33) 236、268、330和396位；(34) 236、268和396位；(35) 236和295位；(36) 236、330和396位；以及(37) 236和396位，根据EU编号。

[0372] 在进一步的实施例中，具有经增强的Fc γ RIIb结合活性的变体Fc区包含选自由以下项组成的组的至少一个氨基酸：(a) 231位处的Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、Tyr；(b) 232位处的Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、Tyr；(c) 233位处的Asp；(d) 234位处的Trp、Tyr；(e) 235位处的Trp；(f) 236位处的Ala、Asp、Glu、His、Ile、Leu、Met、Asn、Gln、Ser、Thr、Val；(g) 237位处的Asp、Tyr；(h) 238位处的Glu、Ile、Met、Gln、Tyr；(i) 239位处的Ile、Leu、Asn、Pro、Val；(j) 264位处的Ile；(k) 266位处的Phe；(l) 267位处的Ala、His、Leu；(m) 268位处的Asp、Glu；(n) 271位处的Asp、Glu、Gly；(o) 295位处的Leu；(p) 298位处的Leu；(q) 325位处的Glu、Phe、Ile、Leu；(r) 326位处的Thr；(s) 327位处的Ile、Asn；(t) 328位处的Thr；(u) 330位处的Lys、Arg；(v) 331位处的Glu；(w) 332位处的Asp；(x) 334位处的Asp、Ile、Met、Val、Tyr；以及(y) 396位处的Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、Tyr；根据EU编号。

[0373] 在进一步的实施例中，具有经增强的Fc γ RIIb结合活性的变体Fc区包含选自由以下项组成的组的至少一个氨基酸改变(例如，取代)：(a) 231位处的Gly、Thr；(b) 232位处的Asp；(c) 235位处的Trp；(d) 236位处的Asn、Thr；(e) 239位处的Val；(f) 268位处的Asp、Glu；(g) 295位处的Leu；(h) 298位处的Leu；(i) 326位处的Thr；(j) 330位处的Lys、Arg；以及(k) 396位处的Lys、Met；根据EU编号。在进一步的实施例中，具有经增强的Fc γ RIIb结合活性的变体Fc区包含以下项的氨基酸改变(例如，取代)：236位处的Asn、268位处的Glu、330位处的Lys以及396位处的Met；根据EU编号。在进一步的实施例中，具有经增强的Fc γ RIIb结合活性的变体Fc区包含以下项的氨基酸改变(例如，取代)：236位处的Asn、268位处的Asp以及330位处的Lys；根据EU编号。在进一步的实施例中，具有经增强的Fc γ RIIb结合活性的变体Fc区包含以下项的氨基酸改变(例如，取代)：236位处的Asn、268位处的Asp、295位处的Leu以及330位处的Lys；根据EU编号。在进一步的实施例中，具有经增强的Fc γ RIIb结合活性的变体Fc区包含以下项的氨基酸改变(例如，取代)：236位处的Thr、268位处的Asp以及330位处的Lys；根据EU编号。在进一步的实施例中，具有经增强的Fc γ RIIb结合活性的变体Fc区包含以下项的氨基酸改变(例如，取代)：236位处的Asn、268位处的Asp、295位处的Leu、326位处的Thr以及330位处的Lys；根据EU编号。在进一步的实施例中，具有经增强的Fc γ RIIb结合活性的变体Fc区包含以下项的氨基酸改变(例如，取代)：235位处的Trp、236位处的Asn、268位处的Asp、295位处的Leu、326位处的Thr以及330位处的Lys；根据EU编号。

[0374] 在另一方面，本发明提供了经分离的多肽，其包含具有增加的等电点(pI)的变体Fc区。在某些实施例中，本文所述的变体Fc区包含亲本Fc区中的至少两个氨基酸改变。在某些实施例中，与亲本Fc区的等电点(pI)相比，氨基酸改变中的每个氨基酸改变增加了变体

Fc区的等电点。它们基于以下发现：已经通过修饰至少两个氨基酸残基而增加了pI的抗体可以促进从血浆中抗原的消除，例如当在体内施用抗体时。

[0375] 在本发明中，pI可以为理论的或经实验确定的pI。pI的值可以例如通过本领域技术人员已知的等电聚焦来进行确定。理论pI的值可以例如使用基因和氨基酸序列分析软件(Genetyx等)来进行计算。

[0376] 在一个实施例中，与之前修改相比，pI值可以至少增加例如0.01、0.03、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5或更多，至少增加0.6、0.7、0.8、0.9或更多，至少增加1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5或更多，或至少增加1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、3.0或更多。

[0377] 在某些实施例中，经增加的pI的氨基酸可以暴露在变体Fc区的表面上。在本发明中，可以暴露在表面上的氨基酸通常是指位于构成变体Fc区的多肽的表面上的氨基酸残基。位于多肽的表面上的氨基酸残基是指其侧链可以与溶剂分子(其一般大多为水分子)接触的氨基酸残基。然而，侧链不一定必须完全与溶剂分子接触，并且当即使侧链的一部分与溶剂分子接触时，氨基酸也被定义为“位于表面上的氨基酸残基”。位于多肽的表面上的氨基酸残基还包括靠近表面进行定位的氨基酸残基，并且从而可以具有来自其侧链与溶剂分子接触(甚至部分接触)的另一个氨基酸残基的电荷影响。本领域技术人员可以例如使用可商购获得的软件来制备多肽的同源模型。替代性地，可以使用本领域技术人员已知的方法，例如X射线晶体学。例如，使用计算机程序例如InsightII程序(Accelrys)，用来自三维模型的坐标来确定可以暴露在表面上的氨基酸残基。可表面暴露的位点可以使用本技术领域已知的算法来进行确定(例如，Lee和Richards(J.Mol.Biol.55:379-400(1971))；Connolly(J.Appl.Cryst.16:548-558(1983))。可表面暴露的位点可以使用适用于蛋白质建模和三维结构信息的软件来进行确定。可用于此类目的的软件包括例如SYBYL Biopolymer Module软件(Tripos Associates)。当算法需要用户输入尺寸参数时，在计算中使用的探针的“尺寸”可以被设置为大约1.4埃或更小的半径。此外，已经由Pacios描述了用于使用个人计算机软件来确定可表面暴露的区域的方法(Comput.Chem.18(4):377-386(1994)；J.Mol.Model.1:46-53(1995))。基于如上所述的此类信息，可以选择位于构成变体Fc区的多肽的表面上的适当氨基酸残基。

[0378] 在某些实施例中，多肽包含变体Fc区和抗原结合结构域两者。在进一步的实施例中，抗原为可溶性抗原。在一个实施例中，抗原存在于受试者的生物流体(例如，血浆、间质液、淋巴液、腹水和胸腔积液)中。抗原还可以为膜抗原。

[0379] 在进一步的实施例中，抗原结合结构域的抗原结合活性根据离子浓度条件而变化。在一个实施例中，离子浓度不受特别限制，并且是指氢离子浓度(pH)或金属离子浓度。在本文中，金属离子是指以下项的离子：除氢以外的I族元素(诸如碱金属和铜族元素)，II族元素(诸如碱土金属和锌族元素)，除硼以外的III族元素，除碳和硅之外的IV族元素的离子，VIII族元素(诸如铁族和铂族元素)，属于V族、VI族和VII族的A副族的元素，以及金属元素(诸如锑、铋和钋)。在本发明中，金属离子包括例如钙离子，如W0 2012/073992和W0 2013/125667所述。在一个实施例中，“离子浓度条件”可以为聚焦于抗原结合结构域的生物行为在低离子浓度与高离子浓度之间的差异的条件。此外，“抗原结合结构域的抗原结合活性根据离子浓度条件而变化”意指抗原结合结构域的抗原结合活性在低离子浓度与高离子浓度之间变化(例如，抗原结合结构域在本文中称为“离子浓度依赖性抗原结合结构

域”)。高离子浓度条件下的抗原结合结构域的抗原结合活性可以比低离子浓度条件下的抗原结合结构域的抗原结合活性更高(更强)或更低(更弱)。在一个实施例中,离子浓度依赖性抗原结合结构域(例如,pH依赖性抗原结合结构域或钙离子浓度依赖性抗原结合结构域)可以通过例如描述于WO 2009/125825、WO 2012/073992和WO 2013/046722的已知方法来获得。

[0380] 在本发明中,高钙离子浓度条件下的抗原结合结构域的抗原结合活性可以比低钙离子浓度条件下的抗原结合结构域的抗原结合活性更高。高钙离子浓度不特别限于但可以为选自100 μ M与10mM之间、200 μ M与5mM之间、400 μ M与3mM之间、200 μ M与2mM之间、400 μ M与1mM之间或500 μ M与2.5mM之间的浓度,该浓度可优选地接近体内钙离子的血浆(血液)浓度。同时,低钙离子浓度不特别限于但可以为选自0.1 μ M与30 μ M之间、0.2 μ M与20 μ M之间、0.5 μ M与10 μ M之间、1 μ M与5 μ M之间或2 μ M与4 μ M之间的浓度,该浓度可优选地接近体内早期体内钙离子的浓度。

[0381] 在一个实施例中,低钙离子浓度条件下的抗原结合活性与高钙离子浓度条件下的抗原结合活性之间的比率不受限制,但低钙离子浓度条件下的解离常数(KD)与高钙离子浓度条件下的KD的比率,即,KD(低钙离子浓度条件)/KD(高钙离子浓度条件)为2或更多、10或更多,或者40或更多。该比率的上限可以为400、1000或10000,只要此类抗原结合结构域可以通过本领域技术人员已知的技术来产生即可。替代性地,例如,可以使用解离速率常数(kd)代替KD。在这种情况下,低钙离子浓度条件下的kd与高钙离子浓度条件下的kd的比率,即,kd(低钙离子浓度条件)/kd(高钙离子浓度条件)为2或更多、5或更多、10或更多,或者30或更多。该比率的上限可以为50、100或200,只要抗原结合结构域可以基于本领域技术人员的常见技术知识来产生即可。

[0382] 在本发明中,低氢离子浓度(中性pH)下的抗原结合结构域的抗原结合活性可以比高氢离子浓度(酸性pH)下的抗原结合结构域的抗原结合活性更高。酸性pH可以为例如选自pH 4.0至pH 6.5、选自pH 4.5至pH 6.5、选自pH5.0至pH 6.5或选自pH 5.5至pH 6.5的pH,该pH可优选地接近早期体内中的体内pH。酸性pH还可以为例如pH 5.8或pH 6.0。在特定实施例中,酸性pH为pH 5.8。同时,中性pH可以为例如选自pH 6.7至pH 10.0、选自pH6.7至pH 9.5、选自pH 7.0至pH 9.0或选自pH 7.0至pH 8.0的pH,该pH可优选地接近体内血浆(血液)中的体内pH。中性pH也可以为例如pH 7.4或pH 7.0。在特定实施例中,中性pH为pH 7.4。

[0383] 在一个实施例中,酸性pH条件下的抗原结合活性与中性pH条件下的抗原结合活性之间的比率不受限制,但酸性pH条件下的解离常数(KD)与中性pH条件下的KD的比率,即,KD(酸性pH条件)/KD(中性pH条件)为2或更多、10或更多,或者40或更多。该比率的上限可以为400、1000或10000,只要此类抗原结合结构域可以通过本领域技术人员已知的技术来产生即可。替代性地,例如,可以使用解离速率常数(kd)代替KD。在这种情况下,酸性pH条件下的kd与中性pH条件下的kd的比率,即,kd(酸性pH条件)/kd(中性pH条件)为2或更多、5或更多、10或更多,或者30或更多。该比率的上限可以为50、100或200,只要抗原结合结构域可以基于本领域技术人员的常见技术知识来产生即可。

[0384] 在一个实施例中,例如,至少一个氨基酸残基被侧链pKa为4.0至8.0的氨基酸残基取代,和/或至少一个侧链pKa为4.0至8.0的氨基酸被插入抗原结合结构域中,如WO 2009/125825所述。氨基酸可以在任何位点处被取代和/或插入,只要与在取代或插入之前相比,

抗原结合结构域的抗原结合活性在酸性pH条件下比在中性pH条件下变弱即可。当抗原结合结构域具有可变区或CDR时,该位点可以在可变区或CDR内。经取代或插入的氨基酸的数量可以由本领域技术人员来适当地确定;并且数量可以为一个或多个。侧链pKa为4.0至8.0的氨基酸可以用于根据氢离子浓度条件来改变抗原结合结构域的抗原结合活性。此类氨基酸包括例如天然氨基酸,诸如His (H) 和Glu (E);以及非天然氨基酸,诸如组氨酸类似物(US2009/0035836)、m-N02-Tyr (pKa 7.45)、3,5-Br2-Tyr (pKa 7.21) 和3,5-I2-Tyr (pKa 7.38) (Heyl等人,Bioorg.Med.Chem.11(17):3761-3768(2003))。还可以使用侧链pKa为6.0至7.0的氨基酸,其包括例如His (H)。

[0385] 在另一个实施例中,描述了针对具有经增加的pI的变体Fc区的可优选的抗原结合结构域,并且该抗原结合结构域可以通过W02016/125495和W02017/046994中所述的方法来获得。

[0386] 在某些实施例中,具有经增加的pI的变体Fc区包含选自以下项组成的组的至少两个位置的至少两个氨基酸改变:285、311、312、315、318、333、335、337、341、342、343、384、385、388、390、399、400、401、402、413、420、422和431,根据EU编号。

[0387] 在进一步的实施例中,具有经增加的pI的变体Fc区包含选自以下项组成的组的至少两个位置的至少两个氨基酸改变:311、341、343、384、399、400、401、402和413,根据EU编号。

[0388] 在另一方面,本发明提供了包含具有经增加的pI的变体Fc区的多肽,该变体Fc区包含以下(1)至(10)中任一者的氨基酸改变:(1)311和341位;(2)311和343位;(3)311、343和413位;(4)311、384和413位;(5)311和399位;(6)311和401位;(7)311和413位;(8)400和413位;(9)401和413位;以及(10)402和413位;根据EU编号。

[0389] 在一个方面,本发明提供了包含具有经增强的Fc γ RIIb结合活性和经增加的pI的变体Fc区的多肽,该变体Fc区包含至少三个氨基酸改变,该至少三个氨基酸改变包括:(a)选自以下项组成的组的至少一个位置的至少一个氨基酸改变:231、232、233、234、235、236、237、238、239、264、266、267、268、271、295、298、325、326、327、328、330、331、332、334和396,根据EU编号,以及(b)选自以下项组成的组的至少两个位置的至少两个氨基酸改变:285、311、312、315、318、333、335、337、341、342、343、384、385、388、390、399、400、401、402、413、420、422和431,根据EU编号。

[0390] 在一个方面,本发明提供了包含具有经增强的Fc γ RIIb结合活性和经增加的pI的变体Fc区的多肽,并且该变体Fc区包含至少三个氨基酸改变,该至少三个氨基酸改变包括:(a)选自以下项组成的组的至少一个位置的至少一个氨基酸改变:231、232、235、236、239、268、295、298、326、330和396,根据EU编号,以及(b)选自以下项组成的组的至少两个位置的至少两个氨基酸改变:311、341、343、384、399、400、401、402和413,根据EU编号。

[0391] 在另一方面,本发明提供了包含具有经增强的Fc γ RIIb结合活性和经增加的pI的变体Fc区的多肽,该变体Fc区包含以下(1)至(9)中任一者的氨基酸改变:(1)235、236、268、295、311、326、330和343位;(2)236、268、295、311、326、330和343位;(3)236、268、295、311、330和413位;(4)236、268、311、330、396和399位;(5)236、268、311、330和343位;(6)236、268、311、330、343和413位;(7)236、268、311、330、384和413位;(8)236、268、311、330和413位;以及(9)236、268、330、396、400和413位;根据EU编号。

[0392] 在一个方面,本发明提供了包含具有经增强的Fc γ RI Ib结合活性和经增加的pI的变体Fc区的多肽,该变体Fc区包含至少三个氨基酸改变,该至少三个氨基酸改变包括:(a)选自由以下项组成的组的至少一个位置的至少一个氨基酸改变:234、238、250、264、267、307和330,以及(b)选自由以下项组成的组的至少两个位置的至少两个氨基酸改变:285、311、312、315、318、333、335、337、341、342、343、384、385、388、390、399、400、401、402、413、420、422和431,根据EU编号。在进一步的实施例中,多肽包含选自由以下项组成的组的至少两个位置的至少两个氨基酸改变:311、341、343、384、399、400、401、402和413,根据EU编号。

[0393] 在另一方面,本发明提供了包含具有经增强的Fc γ RI Ib结合活性和经增加的pI的变体Fc区的多肽,该变体Fc区包含以下(1)至(16)中任一者的氨基酸改变:(1) 234、238、250、264、307、311、330和343位;(2) 234、238、250、264、307、311、330和413位;(3) 234、238、250、264、267、307、311、330和343位;(4) 234、238、250、264、267、307、311、330和413位;(5) 234、238、250、267、307、311、330和343位;(6) 234、238、250、267、307、311、330和413位;(7) 234、238、250、307、311、330和343位;(8) 234、238、250、307、311、330和413位;(9) 238、250、264、267、307、311、330和343位;(10) 238、250、264、267、307、311、330和413位;(11) 238、250、264、307、311、330和343位;(12) 238、250、264、307、311、330和413位;(13) 238、250、267、307、311、330和343位;(14) 238、250、267、307、311、330和413位;(15) 238、250、307、311、330和343位;以及(16) 238、250、307、311、330和413位;根据EU编号。

[0394] 此外,出于其他目的执行的氨基酸改变可以组合在本文所述的变体Fc区中。例如,可以添加改善FcRn结合活性的氨基酸取代(Hinton等人,J. Immunol. 176(1):346-356(2006); Dall'Acqua等人,J. Biol. Chem. 281(33):23514-23524(2006); Petkova等人,Intl. Immunol. 18(12):1759-1769(2006); Zalevsky等人,Nat. Biotechnol. 28(2):157-159(2010); WO 2006/019447; WO 2006/053301;和WO 2009/086320),以及用于改善抗体异质性或稳定性的氨基酸取代(WO 2009/041613)。替代性地,描述于WO 2011/122011、WO 2012/132067、WO 2013/046704或WO 2013/180201中的具有促进抗原清除的特性的多肽,描述于WO 2013/180200中的具有与靶组织特异性结合的特性的多肽,描述于WO 2009/125825、WO 2012/073992或WO 2013/047752中的具有用于与多个抗原分子重复结合的特性的多肽可以与本文所述的变体Fc区组合。替代性地,为了赋予与其他抗原的结合能力,EP1752471和EP1772465中公开的氨基酸改变可以组合在本文所述的变体Fc区的CH3中。替代性地,为了增加血浆保留,降低恒定区的pI的氨基酸改变(WO 2012/016227)可以组合在本文所述的变体Fc区中。替代性地,为了促进摄取至细胞中,增加恒定区的pI的氨基酸改变(WO 2014/145159)可以组合在本文所述的变体Fc区中。替代性地,为了促进从血浆中消除靶分子,增加恒定区的pI的氨基酸改变(WO2016/125495)可以组合在本文所述的变体Fc区中。在一个实施例中,此类改变可以包括例如选自由以下项组成的组的至少一个位置的取代:311、343、384、399、400和413,根据EU编号。在进一步的实施例中,此类取代可以为在每个位置处用Lys或Arg替换氨基酸。

[0395] 增强酸性pH下的人FcRn结合活性的氨基酸改变也可以组合在本文所述的变体Fc区中。具体地,此类改变可以包括例如,根据EU编号,在428位处用Leu取代Met以及在434位处用Ser取代Asn(Zalevsky等人,Nat. Biotechnol. 28:157-159(2010));在434位处用Ala取代Asn(Deng等人,Metab. Dispos. 38(4):600-605(2010));在252位处用Tyr取代Met,在254

位处用Thr取代Ser以及在256位处用Glu取代Thr (Dall'Acqua等人, J. Biol. Chem. 281: 23514-23524 (2006)); 在250位处用Gln取代Thr以及在428位处用Leu取代Met (Hinton等人, J. Immunol. 176 (1): 346-356 (2006)); 在434位处用His取代Asn (Zheng等人, Clin. Pharmacol. Ther. 89 (2): 283-290 (2011)), 以及描述于W0 2010/106180、W0 2010/045193、W0 2009/058492、W0 2008/022152、W0 2006/050166、W0 2006/053301、W0 2006/031370、W0 2005/123780、W0 2005/047327、W0 2005/037867、W0 2004/035752或W0 2002/060919中的改变。此类改变可以包括例如选自由以下项组成的组的至少一个改变: 在428位处用Leu取代Met, 在434位处用Ala取代Asn以及在436位处用Thr取代Tyr。这些改变可以进一步包括在438位处用Arg取代Gln和/或在440位处用Glu取代Ser (W02016/125495)。

[0396] 示例性双特异性抗CCL2抗体

[0397] 本发明的一个实施例为一种双特异性抗体, 其包含与人CCL2上的第一表位 (特异性) 结合的第一抗原结合位点和与人CCL2上的第二不同的表位 (特异性) 结合的第二不同的抗原结合位点,

[0398] 其中双特异性抗体包含

[0399] a) 第一多肽链, 其包含 (从N末端至C末端方向) VH1-CH1-L1-铰链-CH2-CH3-L2-VL1-CL, 其中,

[0400] VH1为第一重链可变结构域并且VL1为第一可变轻链结构域 (两者一起形成 (缔合在一起以形成) 第一抗原结合位点),

[0401] CH1为恒定重链结构域1,

[0402] L1为长度为5个至15个氨基酸 (在一个实施例中, 长度为5个至10个氨基酸) 的多肽接头,

[0403] 铰链为重链铰链区,

[0404] CH2为恒定重链结构域2,

[0405] CH3为恒定重链结构域3,

[0406] L2为长度为5个至15个氨基酸 (在一个实施例中, 长度为10个至15个氨基酸) 的多肽接头,

[0407] CL为恒定轻链结构域, 以及

[0408] b) 第二多肽链, 其包含 (从N末端至C末端方向) VH2-CH1-L1-铰链-CH2-CH3-L2-VL2-CL, 其中,

[0409] VH2为第二重链可变结构域并且VL2为第二可变轻链结构域 (两者一起形成 (缔合在一起以形成) 第二抗原结合位点),

[0410] CH1为恒定重链结构域1,

[0411] L1为长度为5个至15个氨基酸 (在一个实施例中, 长度为5个至10个氨基酸) 的多肽接头,

[0412] 铰链为重链铰链区,

[0413] CH2为恒定重链结构域2,

[0414] CH3为恒定重链结构域3,

[0415] L2为长度为5个至15个氨基酸 (在一个实施例中, 长度为10个至15个氨基酸) 的多肽接头,

- [0416] CL为恒定轻链结构域,其中
- [0417] A) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列;
- [0418] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且
- [0419] ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列;
- [0420] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;
- [0421] 或者
- [0422] B) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列;
- [0423] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且
- [0424] ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列;
- [0425] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;
- [0426] 或者
- [0427] C) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列;
- [0428] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且
- [0429] ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列;
- [0430] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列;
- [0431] 或者
- [0432] D) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列;
- [0433] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且
- [0434] ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列;
- [0435] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列;
- [0436] 或者
- [0437] E) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列;
- [0438] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且
- [0439] ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列;
- [0440] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;
- [0441] 或者
- [0442] F) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列;
- [0443] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且
- [0444] ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列;
- [0445] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列;
- [0446] 或者
- [0447] G) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列;
- [0448] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且
- [0449] ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列;
- [0450] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;
- [0451] 或者
- [0452] H) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列;
- [0453] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且
- [0454] ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列;

- [0455] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;
[0456] 或者
[0457] I) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列;
[0458] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且
[0459] ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列;
[0460] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;
[0461] 或者
[0462] J) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列;
[0463] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且
[0464] ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列;
[0465] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;
[0466] 或者
[0467] K) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列;
[0468] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且
[0469] ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列;
[0470] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;
[0471] 或者
[0472] L) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列;
[0473] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且
[0474] ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列;
[0475] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;
[0476] 或者
[0477] M) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列;
[0478] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且
[0479] ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列;
[0480] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列;
[0481] 或者
[0482] N) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列;
[0483] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且
[0484] ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列;
[0485] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;
[0486] 或者
[0487] O) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列;
[0488] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且
[0489] ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列;
[0490] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;
[0491] 或者
[0492] P) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列;
[0493] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且

- [0494] ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列;
- [0495] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列。
- [0496] 本发明的一个实施例为一种双特异性抗体,其包含与人CCL2上的第一表位(特异性)结合的第一抗原结合位点和与人CCL2上的第二不同的表位(特异性)结合的第二不同的抗原结合位点,
- [0497] 其中双特异性抗体包含
- [0498] a) 第一多肽链,其包含(从N末端至C末端方向) VH1-CH1-L1-铰链-CH2-CH3-L2-VL1-CL,其中,
- [0499] VH1为第一重链可变结构域并且VL1为第一可变轻链结构域(两者一起形成(缔合在一起以形成)第一抗原结合位点),
- [0500] CH1为恒定重链结构域1,
- [0501] L1为长度为5个至15个氨基酸(在一个实施例中,长度为5个至10个氨基酸)的多肽接头,
- [0502] 铰链为重链铰链区,
- [0503] CH2为恒定重链结构域2,
- [0504] CH3为恒定重链结构域3,
- [0505] L2为长度为5个至15个氨基酸(在一个实施例中,长度为10个至15个氨基酸)的多肽接头,
- [0506] CL为恒定轻链结构域,以及
- [0507] b) 第二多肽链,其包含(从N末端至C末端方向) VH2-CH1-L1-铰链-CH2-CH3-L2-VL2-CL,其中,
- [0508] VH2为第二重链可变结构域并且VL2为第二可变轻链结构域(两者一起形成(缔合在一起以形成)第二抗原结合位点),
- [0509] CH1为恒定重链结构域1,
- [0510] L1为长度为5个至15个氨基酸(在一个实施例中,长度为5个至10个氨基酸)的多肽接头,
- [0511] 铰链为重链铰链区,
- [0512] CH2为恒定重链结构域2,
- [0513] CH3为恒定重链结构域3,
- [0514] L2为长度为5个至15个氨基酸(在一个实施例中,长度为10个至15个氨基酸)的多肽接头,
- [0515] CL为恒定轻链结构域,其中
- [0516] i) 所述第一抗原结合位点,其包含:
- [0517] VH结构域,其包含(a) CDR-H1,其包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列SHYGXS,其中X为I, (b) CDR-H2,其包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列GX¹IX²IFX³TANYAQKFQG,其中X¹为V, X²为P并且X³为H,和(c) CDR-H3,其包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列YDAHYGELDF;以及
- [0518] VL结构域,其包含(d) CDR-L1,其包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列RASQHVSDAYLA; (e) CDR-L2,其包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列DASDRAE,和(f) CDR-L3,其包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列HQYIHLHSFT;以及

[0519] ii)所述第二抗原结合位点,其包含:

[0520] VH结构域,其包含(a)CDR-H1,其包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列HTYMH;(b)CDR-H2,其包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列RIDPXNHNTKFDPKFQG,其中X为D,和(c)CDR-H3,其包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列GVFGFFXH,其中X为E;

[0521] VL结构域,其包含(d)CDR-L1,其包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列KAX¹EDIYNRX²A,其中X¹为F并且X²为R,(e)CDR-L2,其包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列GATSLEH,和(f)CDR-L3,其包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列QQFXSAPYT,其中X为R。

[0522] 本发明的一个实施例为一种双特异性抗体,其包含与人CCL2上的第一表位(特异性)结合的第一抗原结合位点和与人CCL2上的第二不同的表位(特异性)结合的第二不同的抗原结合位点,

[0523] 其中双特异性抗体包含

[0524] a)第一多肽链,其包含(从N末端至C末端方向)VH1-CH1-L1-铰链-CH2-CH3-L2-VL1-CL,其中,

[0525] VH1为第一重链可变结构域并且VL1为第一可变轻链结构域(两者一起形成(缔合在一起以形成)第一抗原结合位点),

[0526] CH1为恒定重链结构域1,

[0527] L1为长度为5个至15个氨基酸(在一个实施例中,长度为5个至10个氨基酸)的多肽接头,

[0528] 铰链为重链铰链区,

[0529] CH2为恒定重链结构域2,

[0530] CH3为恒定重链结构域3,

[0531] L2为长度为5个至15个氨基酸(在一个实施例中,长度为10个至15个氨基酸)的多肽接头,

[0532] CL为恒定轻链结构域,

[0533] 以及

[0534] b)第二多肽链,其包含(从N末端至C末端方向)VH2-CH1-L1-铰链-CH2-CH3-L2-VL2-CL,其中,

[0535] VH2为第二重链可变结构域并且VL2为第二可变轻链结构域(两者一起形成(缔合在一起以形成)第二抗原结合位点),

[0536] CH1为恒定重链结构域1,

[0537] L1为长度为5个至15个氨基酸(在一个实施例中,长度为5个至10个氨基酸)的多肽接头,

[0538] 铰链为重链铰链区,

[0539] CH2为恒定重链结构域2,

[0540] CH3为恒定重链结构域3,

[0541] L2为长度为5个至15个氨基酸(在一个实施例中,长度为10个至15个氨基酸)的多肽接头,

[0542] CL为恒定轻链结构域,

[0543] 其中

- [0544] i) VH1结构域包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列;
- [0545] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且
- [0546] ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列;
- [0547] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列。
- [0548] 在一个实施例中,L1和L2为包含氨基酸甘氨酸和丝氨酸的多肽接头,其中重复甘氨酸限于最多4个连续甘氨酸并且没有丝氨酸直接连接至另一个丝氨酸。
- [0549] 在一个实施例中,L1为长度为9个至11个氨基酸的多肽接头,并且L2为长度为9个至11个氨基酸的多肽接头。
- [0550] 在一个实施例中,L1和L2为选自以下项的组的多肽接头:GSGGSGGSGG (SEQ ID NO:183)、GSGGSGGGG (SEQ ID NO:184)、GSGGSGGGG (SEQ ID NO:185)、GGSGGSGGGG (SEQ ID NO:186)、GGSGGSGGGG (SEQ ID NO:187)、GGSGGGSGG (SEQ ID NO:188)、GGGSGGSGGG (SEQ ID NO:189)、GGGSGGSGG (SEQ ID NO:190)和GGGGSGGSGG (SEQ ID NO:191)。
- [0551] 在一个实施例中,L1为包含GGSGGGSGG (SEQ ID NO:188)的氨基酸序列的多肽接头,并且L2为包含GGSGGGSGG (SEQ ID NO:188)的氨基酸序列的多肽接头。
- [0552] 在一个实施例中,恒定重链结构域CH1、铰链、CH2和CH3属于人IgG同种型,优选地属于人IgG1同种型。
- [0553] 在一个实施例中,本文所述的双特异性抗体不对其他人CCL同源物有交叉反应性,特别是相比于与CCL2的结合,其与其他CCL同源物(选自CCL8、CCL7和CCL13的组)的结合为100分之一
- [0554] 在一个实施例中,本文所述的双特异性抗体以离子依赖性方式与人CCL2上的第一和第二表位结合。
- [0555] 在一个实施例中,本文所述的双特异性抗体以pH依赖性方式与人CCL2结合,并且其中相比于在酸性pH,第一抗原结合位点和第二抗原结合位点两者均在中性pH以较高的亲和力与CCL2结合。
- [0556] 在一个实施例中,相比于在pH 5.8,本文所述的双特异性抗体在pH 7.4以10倍的亲和力与人CCL2结合
- [0557] 在一个实施例中,当以10ml/kg的单剂量将由20mg/kg每种双特异性抗体和0.1mg/kg人CCL2组成的预形成的免疫复合物施用至FcRn转基因小鼠中时,与施用包含含有突变L234A、L235A、P329G (Kabat EU编号)的人IgG1同种型的Fc γ 受体沉默的恒定重链结构域(或其Fc结构域)的双特异性抗体后的人CCL2的体内清除率(ml/天/kg)相比,施用包含人野生型IgG1同种型的恒定重链结构域(或其Fc结构域)的双特异性抗体后的人CCL2的体内清除率(ml/天/kg)为至少15倍,具体地至少20倍。
- [0558] 在一个实施例中,当以10ml/kg的单剂量将由20mg/kg每种双特异性抗体和0.1mg/kg人CCL2组成的预形成的免疫复合物施用至FcRn转基因小鼠中时,与施用包含含有突变L234A、L235A、P329G (Kabat EU编号)的人IgG1同种型的Fc γ 受体沉默的恒定重链结构域(或其Fc结构域)的双特异性抗体后的人CCL2的体内清除率(ml/天/kg)相比,施用包含人野生型IgG1同种型的恒定重链结构域(或其Fc结构域)的双特异性抗体后的人CCL2的体内清除率(ml/天/kg)为至少两倍(在一个实施例中为至少5倍,在一个实施例中为至少10倍,在一个实施例中为至少20倍)。

[0559] 在一个实施例中,恒定重链结构域CH1、铰链、CH2和CH3属于人IgG1同种型并且包含以下突变中的一者或多者(Kabat EU编号)

[0560] i) Q311R和/或P343R(适用于增加pI,以用于增强抗原的摄取);和/或

[0561] ii) L234Y、L235W、G236N、P238D、T250V、V264I、H268D、Q295L、T307P、K326T和/或A330K(适用于增加与人FcγRIIb的亲合力并且降低与其他人FcγR的亲合力);和/或

[0562] iii) M428L、N434A和/或Y436T(适用于增加与FcRn的亲合力,以用于更长的血浆半衰期);和/或

[0563] iv) Q438R和/或S440E(适用于抑制类风湿因子结合)。

[0564] 在一个实施例中,恒定重链结构域CH1、铰链、CH2和CH3属于人IgG1同种型并且包含以下突变中的一者或多者(Kabat EU编号)

[0565] i) Q311R和/或P343R(适用于增加pI,以用于增强抗原的摄取);和/或

[0566] ii) L235W、G236N、H268D、Q295L、K326T和/或A330K(适用于增加与人FcγRIIb的亲合力并且降低与其他人FcγR的亲合力);和/或

[0567] iii) N434A(适用于增加与FcRn的亲合力,以用于更长的血浆半衰期);和/或

[0568] iv) Q438R和/或S440E(适用于抑制类风湿因子结合)。

[0569] 在一个实施例中,恒定重链结构域CH1、铰链、CH2和CH3属于人IgG1同种型并且包含以下突变中的一者或多者(Kabat EU编号)

[0570] i) Q311R和P343R(适用于增加pI,以用于增强抗原的摄取);和

[0571] ii) L235W、G236N、H268D、Q295L、K326T和A330K(适用于增加与人FcγRIIb的亲合力并且降低与其他人FcγR的亲合力);和

[0572] iii) N434A(适用于增加与FcRn的亲合力,以用于更长的血浆半衰期);和

[0573] iv) Q438R和S440E(适用于抑制类风湿因子结合)。

[0574] 在一个实施例中,恒定重链结构域CH1、铰链、CH2和CH3属于人IgG1同种型并且包含以下突变中的一者或多者(Kabat EU编号)

[0575] i) Q311R和P343R(适用于增加pI,以用于增强抗原的摄取);和

[0576] ii) N434A(适用于增加与FcRn的亲合力,以用于更长的血浆半衰期);和

[0577] iii) Q438R和S440E(适用于抑制类风湿因子结合)。

[0578] 在一个实施例中,恒定重链结构域CH1、铰链、CH2和CH3属于人IgG1同种型并且包含以下突变中的一者或多者(Kabat EU编号)

[0579] Q311R和P343R(适用于增加pI,以用于增强抗原的摄取)。

[0580] 在一个实施例中,恒定重链结构域CH1、铰链、CH2和CH3属于人IgG1同种型并且包含以下突变中的一者或多者(Kabat EU编号)

[0581] i) Q311R和/或P343R(适用于增加pI,以用于增强抗原的摄取);和/或

[0582] ii) L234Y、P238D、T250V、V264I、T307P和/或A330K(适用于增加与人FcγRIIb的亲合力并且降低与其他人FcγR的亲合力);和/或

[0583] iii) M428L、N434A和/或Y436T(适用于增加与FcRn的亲合力,以用于更长的血浆半衰期);和/或

[0584] iv) Q438R和/或S440E(适用于抑制类风湿因子结合)。

[0585] 在一个实施例中,恒定重链结构域CH1、铰链、CH2和CH3属于人IgG1同种型并且包

含以下突变中的一者或多者 (Kabat EU编号)

[0586] i) Q311R和P343R (适用于增加pI,以用于增强抗原的摄取);和

[0587] ii) L234Y、P238D、T250V、V264I、T307P和A330K (适用于增加与人FcγRIIb的亲合力并且降低与其他人FcγR的亲合力);和

[0588] iii) M428L、N434A和Y436T (适用于增加与FcRn的亲合力,以用于更

[0589] 长的血浆半衰期);以及

[0590] iv) Q438R和S440E (适用于抑制类风湿因子结合)。

[0591] 在一个实施例中,恒定重链结构域CH1、铰链、CH2和CH3属于人IgG1同种型并且包含以下突变中的一者或多者 (Kabat EU编号)

[0592] i) Q311R和P343R (适用于增加pI,以用于增强抗原的摄取);和

[0593] ii) L234Y、P238D、T250V、V264I、T307P和A330K (适用于增加与人FcγRIIb的亲合力并且降低与其他人FcγR的亲合力);和

[0594] iii) N434A和 (适用于增加与FcRn的亲合力,以用于更长的血浆半衰期);以及

[0595] iv) Q438R和S440E (适用于抑制类风湿因子结合)

[0596] 在一个实施例中,此类双特异性抗体包含 (独立地或除了上述突变之外) 以下突变 (Kabat EU编号)

[0597] i) 重链恒定CH3结构域中的一者中的S354C和T366W

[0598] ii) 重链恒定CH3结构域中的另一者中的Y349C、T366S、L368A、Y407V。

[0599] 在一个实施例中,可以使用如上文在促进异源二聚化的Fc结构域修饰的章节中所述的促进突变的其他异源二聚化,代替上述示例性杆臼结构修饰。

[0600] 本发明的一个具体实施例为 (经分离的) 双特异性抗体,其包含a) 与人CCL2上的第一表位 (特异性) 结合的第一抗原结合位点和b) 与人CCL2上的第二 (不同的) 表位 (特异性) 结合的第二 (不同的) 抗原结合位点,其中双特异性抗体包含含有与SEQ ID NO:175的序列至少98%或99%相同的氨基酸序列的多肽,以及含有与SEQ ID NO:176的序列至少98%或99%相同的氨基酸序列的多肽。

[0601] 本发明的一个具体实施例为 (经分离的) 双特异性抗体,其包含a) 与人CCL2上的第一表位 (特异性) 结合的第一抗原结合位点和b) 与人CCL2上的第二 (不同的) 表位 (特异性) 结合的第二 (不同的) 抗原结合位点,其中双特异性抗体包含含有SEQ ID NO:175的序列的氨基酸序列的多肽,以及含有SEQ ID NO:176的氨基酸序列的多肽。

[0602] 本发明的一个具体实施例为 (经分离的) 双特异性抗体,其包含a) 与人CCL2上的第一表位 (特异性) 结合的第一抗原结合位点和b) 与人CCL2上的第二 (不同的) 表位 (特异性) 结合的第二 (不同的) 抗原结合位点,其中双特异性抗体包含含有与SEQ ID NO:177的序列至少98%或99%相同的氨基酸序列的多肽,以及含有与SEQ ID NO:178的序列至少98%或99%相同的氨基酸序列的多肽。

[0603] 本发明的一个具体实施例为 (经分离的) 双特异性抗体,其包含a) 与人CCL2上的第一表位 (特异性) 结合的第一抗原结合位点和b) 与人CCL2上的第二 (不同的) 表位 (特异性) 结合的第二 (不同的) 抗原结合位点,其中双特异性抗体包含含有SEQ ID NO:177的序列的氨基酸序列的多肽,以及含有SEQ ID NO:178的氨基酸序列的多肽。

[0604] 本发明的一个具体实施例为 (经分离的) 双特异性抗体,其包含a) 与人CCL2上的第

一表位(特异性)结合的第一抗原结合位点和b)与人CCL2上的第二(不同的)表位(特异性)结合的第二(不同的)抗原结合位点,其中双特异性抗体包含含有与SEQ ID NO:179的序列至少98%或99%相同的氨基酸序列的多肽,以及含有与SEQ ID NO:180的序列至少98%或99%相同的氨基酸序列的多肽。

[0605] 本发明的一个具体实施例为(经分离的)双特异性抗体,其包含a)与人CCL2上的第一表位(特异性)结合的第一抗原结合位点和b)与人CCL2上的第二(不同的)表位(特异性)结合的第二(不同的)抗原结合位点,其中双特异性抗体包含含有SEQ ID NO:179的序列的氨基酸序列的多肽,以及含有SEQ ID NO:180的氨基酸序列的多肽。

[0606] 本发明的一个具体实施例为(经分离的)双特异性抗体,其包含a)与人CCL2上的第一表位(特异性)结合的第一抗原结合位点和b)与人CCL2上的第二(不同的)表位(特异性)结合的第二(不同的)抗原结合位点,其中双特异性抗体包含含有与SEQ ID NO:181的序列至少98%或99%相同的氨基酸序列的多肽,以及含有与SEQ ID NO:182的序列至少98%或99%相同的氨基酸序列的多肽。

[0607] 本发明的一个具体实施例为(经分离的)双特异性抗体,其包含a)与人CCL2上的第一表位(特异性)结合的第一抗原结合位点和b)与人CCL2上的第二(不同的)表位(特异性)结合的第二(不同的)抗原结合位点,其中双特异性抗体包含含有SEQ ID NO:181的序列的氨基酸序列的多肽,以及含有SEQ ID NO:182的氨基酸序列的多肽。

[0608] 重组方法和组合物

[0609] 可以使用重组方法和组合物来产生抗体,例如,如在美国专利号4816567中所述。在一个实施例中,提供编码如本文所述的抗CCL2抗体(双特异性或单特异性)的经分离的核酸。此类核酸可以编码构成单特异性或双特异性抗体的一种或所有VL的氨基酸序列和/或构成单特异性或双特异性抗体的一种或所有VH的氨基酸序列(例如,抗体的轻链和/或重链)。在进一步的实施例中,提供了包含此类核酸的一种或多种载体(例如,表达载体)。在进一步的实施例中,提供包含此类核酸的宿主细胞。在一个此类实施例中,宿主细胞包含(例如,已经用以下各物转化):(1)包含核酸的载体,该核酸编码包含抗体的VL的氨基酸序列和包含抗体的VH的氨基酸序列;或(2)第一载体和第二载体,该第一载体包含核酸,该核酸编码包含抗体的VL的氨基酸序列,该第二载体包含核酸,该核酸编码包含抗体的VH的氨基酸序列。在一个实施例中,宿主细胞为真核细胞,例如,中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、HEK293细胞或淋巴细胞(例如,Y0、NS0、Sp20细胞)。在一个实施例中,提供了一种制备抗兔CCL2抗体的方法,其中该方法包括在适于表达抗体的条件下培养包含如上提供的编码抗体的核酸的宿主细胞,以及任选地从宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收该抗体。

[0610] 为了抗CCL2细胞的重组生产,可以使用常规程序来容易地对此类核酸进行分离和测序(例如,通过使用能够与编码抗体的重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)。

[0611] 用于克隆或表达编码抗体的载体的合适宿主细胞包括本文所述的原核或真核细胞。例如,可以在细菌中产生抗体,特别是当不需要糖基化和Fc效应子功能时。关于在细菌中表达抗体片段和多肽,参见例如US 5,648,237、US 5,789,199和US 5,840,523。(还参见Charlton,K.A.,在:Methods in Molecular Biology,第248卷,Lo,B.K.C.(编辑),Humana Press,Totowa,NJ(2003),第245-254页,描述抗体片段在大肠杆菌中的表达。)抗体可在表达后在可溶性级分中从细菌细胞糊中分离,并且可以进一步纯化。

[0612] 除了原核生物外,诸如丝状真菌或酵母等真核微生物也是用于编码抗体的载体的合适克隆或表达宿主,该真核微生物包括这样的真菌和酵母菌株:其糖基化途径已经“人源化”,从而使得产生具有部分或完全人糖基化模式的抗体。参见Gerngross, T.U., Nat.Biotech.22(2004)1409-1414;和Li, H.等人, Nat.Biotech.24(2006)210-215。

[0613] 用于表达糖基化抗体的合适宿主细胞也来源于多细胞生物(无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎动物细胞的实例包括植物细胞和昆虫细胞。已经鉴定出了许多可以与昆虫细胞一起使用的杆状病毒株,特别是用于转染草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞。

[0614] 植物细胞培养物也可用作宿主。参见例如,美国专利号5,959,177、6,040,498、6,420,548、7,125,978和6,417,429(描述了用于在转基因植物中产生抗体的PLANTIBODIES™技术)。

[0615] 脊椎动物细胞也可用作宿主。例如,适于在悬浮液中生长的哺乳动物细胞系可能是有用的。有用的哺乳动物宿主细胞系的其他实例为:由SV40转化的猴肾CV1系(COS-7);人胚肾系(如例如以下文献所述的293或293细胞:Graham, F.L.等人, J.Gen Virol.36(1977)59-74);幼仓鼠肾细胞(BHK);小鼠支持细胞(如例如以下文献所述的TM4细胞:Mather, J.P., Biol.Reprod.23(1980)243-252);猴肾细胞(CV1);非洲绿猴肾细胞(VERO-76);人宫颈癌细胞(HELA);犬肾细胞(MDCK;buffalo大鼠肝细胞(BRL 3A);人肺细胞(W138);人肝细胞(Hep G2);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562);如例如以下文献所述的TRI细胞:Mather, J.P.等人, Annals N.Y.Acad.Sci.383(1982)44-68;MRC 5细胞;以及FS4细胞。其他有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,包括DHFR⁻CHO细胞(Urlaub, G.等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77(1980)4216-4220);以及骨髓瘤细胞系,诸如Y0、NS0和Sp2/0。关于适用于抗体产生的某些哺乳动物宿主细胞系的综述,参见例如Yazaki, P.和Wu, A.M., Methods inMolecular Biology,第248卷,Lo, B.K.C.(编辑), Humana Press, Totowa, NJ (2004), 第255-268页。

[0616] 在另一方面,本发明部分基于以下发现:如本文所述的经修饰的单特异性抗体示出经改善的pH依赖性结合特性,并且因此尤其可用于生成本发明的双特异性抗体

[0617] 用于诊断和检测的方法和组合物

[0618] 在某些实施例中,本文提供的双特异性抗CCL2抗体中的任一种可用于检测生物样品中CCL2的存在。如本文所用的术语“检测”涵盖定量或定性检测。在某些实施例中,生物样品包含细胞或组织,诸如免疫细胞或T细胞浸润和或肿瘤细胞。

[0619] 在一个实施例中,提供了用于诊断或检测方法中的双特异性抗CCL2抗体。在进一步的方面,提供了检测生物样品中的CCL2的存在的方法。在某些实施例中,该方法包括在允许双特异性抗CCL2抗体与CCL2结合的条件下使生物样品与如本文所述的双特异性抗CCL2抗体接触,以及检测是否在双特异性抗CCL2抗体与CCL2之间形成了复合物。此类方法可以是体外或体内方法。在一个实施例中,双特异性抗CCL2抗体用于选择能够用双特异性抗CCL2抗体进行治疗的受试者,例如其中CCL2是用于选择患者的生物标志物。

[0620] 在某些实施例中,提供了经标记的双特异性抗CCL2抗体。标记包括但不限于直接检测的标记或部分(诸如荧光标记、发色标记、电子致密标记、化学发光标记,以及放射性标记),以及间接(例如通过酶促反应或分子相互作用)检测的部分(诸如酶或配体)。示例性标记包括但不限于放射性同位素³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³H和¹³¹I;荧光团,诸如稀土螯合物或荧光素

(fluorescein)及其衍生物、罗丹明及其衍生物、丹酰、伞形酮;萤光素酶(luciferase),例如萤火虫萤光素酶和细菌萤光素酶(美国专利号4,737,456);萤光素(luciferin);2,3-二氢二氮杂萘二酮(dihydrophthalazinedione);辣根过氧化物酶(HRP);碱性磷酸酶; β -半乳糖苷酶;葡糖淀粉酶;溶菌酶;糖氧化酶,例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶;杂环氧化酶,诸如尿酸氧化酶和黄嘌呤氧化酶;与采用过氧化氢来氧化染料前体的酶(诸如HRP、乳过氧化物酶,或微过氧化物酶)偶联;生物素/抗生物素蛋白;纺丝标记;噬菌体标记;稳定自由基等。

[0621] 药物制剂

[0622] 如本文所述的双特异性抗CCL2抗体的药物制剂通过将此类具有所需纯度的抗体与一种或多种任选的药用载体混合(Remington's Pharmaceutical Sciences第16版, Osol, A. (编辑) (1980)),制成冻干制剂或水溶液的形式。药用载体在所采用的剂量和浓度下通常对受体无毒,包括但不限于:缓冲剂,例如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(例如十八烷基二甲基苄基氯化铵;六甲基氯化铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚,丁醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷基酯,例如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,例如聚(乙烯吡咯烷酮);氨基酸,例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖,二糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖,诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐的抗衡离子,例如钠;金属络合物(例如锌蛋白络合物);及/或非离子表面活性剂,例如聚乙二醇(PEG)。本文的示例性药用载体进一步包括间质药物分散剂诸如可溶性中性活性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP),例如,人可溶性PH-20透明质酸酶糖蛋白,诸如rhuPH20 (HYLENEX[®], Baxter International, Inc.)。某些示例性sHASEGP和使用方法(包括rhuPH20)描述于美国专利公开号2005/0260186和2006/0104968中。在一个方面中,将sHASEGP与一种或多种另外的糖胺聚糖酶(诸如软骨素酶)组合。

[0623] 示例性的冻干抗体制剂描述于美国专利号6,267,958中。水性抗体制剂包括在美国专利号6,171,586和WO 2006/044908中描述的那些,后者中的制剂包含组氨酸-乙酸盐缓冲剂。

[0624] 本文的制剂还可含有多于一种对于所治疗的特定适应症是必需的活性成分,优选是具有不会彼此不利地影响的互补活性的活性成分。例如,可能期望进一步提供。此类活性成分适当地以对预期目的有效的量组合存在。

[0625] 活性成分可以包埋在例如通过凝聚技术或通过界面聚合而制备的微胶囊(例如,分别为羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)中;包埋在胶体药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米粒子和纳米胶囊)中;或包埋在粗乳液中。此类技术公开于Remington's Pharmaceutical Sciences第16版, Osol, A. (编辑) (1980)中。

[0626] 可以制备缓释制备物。持续释放制备物的合适实例包括含有抗体的固体疏水聚合物的半透性基质,该基质为成型制品的形式,例如,膜或微胶囊。

[0627] 用于体内施用的制剂通常是无菌的。例如,无菌可以通过无菌过滤膜过滤而容易地实现。

[0628] 治疗方法和组合物

[0629] 本文提供的双特异性抗CCL2抗体中的任一种可用于治疗方法中。

[0630] 在一个方面,提供了一种双特异性抗CCL2抗体,其用作药物。在进一步的方面,提供了用于治疗癌症的双特异性抗CCL2抗体。在某些实施例中,提供了用于治疗方法中的双特异性抗CCL2抗体。在某些实施例中,本发明提供了用于治疗患有癌症的个体的方法中的双特异性抗CCL2抗体,该方法包括向该个体施用有效量的双特异性抗CCL2抗体。

[0631] 在进一步的实施例中,本发明提供了双特异性抗CCL2抗体抑制肿瘤中的免疫抑制,并且然后使肿瘤对免疫刺激剂(如抗PD1、抗PDL-1拮抗剂等)敏感。

[0632] 因此,一方面为本文所述的双特异性抗CCL2抗体与癌症免疫疗法(如抗PD1、抗PDL-1拮抗剂等)的组合。

[0633] 如本文所用的术语“癌症”可以是例如肺癌、非小细胞肺(NSCL)癌、支气管肺泡细胞肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头或颈癌、皮肤或眼内黑素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛区癌、胃癌(stomach cancer)、胃癌(gastric cancer)、结肠癌、乳腺癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金病、食管癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、前列腺癌、膀胱癌、肾癌或输尿管癌、肾细胞癌、肾盂癌、间皮瘤、肝细胞癌、胆管癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、脊椎轴肿瘤、脑干胶质瘤、多形性成胶质细胞瘤、星形细胞瘤、神经鞘瘤、室管膜瘤、成髓细胞瘤、脑膜瘤、鳞状细胞癌、垂体腺瘤、淋巴瘤、淋巴细胞性白血病,包括以上癌症中的任一种的难治性型式,或一种或多种以上癌症的组合。

[0634] 根据上述实施中的任一者的“个体”优选地是人。在进一步的方面,本发明提供双特异性抗CCL2抗体在制造或制备药物中的用途。在一个实施例中,所述药物用于癌症的治疗。在进一步实施例中,该药物用于治疗癌症的方法中,该方法包括向患有癌症的个体施用有效量的药物。在进一步的实施例中,药物用于诱导细胞介导的癌细胞裂解。在进一步的实施例中,药物用于在患有癌症的个体中诱导细胞介导的癌细胞裂解的方法中,该方法包括向该个体施用有效量的药物以诱导癌细胞中的细胞凋亡/或抑制癌细胞增殖。根据任何上述实施例的“个体”可以为人。

[0635] 在进一步的方面,本发明提供了用于治疗癌症的方法。在一个实施例中,该方法包括向患有癌症的个体施用有效量的双特异性抗CCL2抗体。根据任何上述实施例的“个体”可以为人。

[0636] 在进一步的方面,本发明提供了用于在患有癌症的个体中诱导细胞介导的癌细胞裂解的方法。在一个实施例中,该方法包括向个体施用有效量的双特异性抗CCL2抗体,以在患有癌症的个体中诱导细胞介导的癌细胞裂解。在一个实施例中,个体是人。

[0637] 在本发明的另一个方面,提供了用于治疗炎症性疾病或自身免疫性疾病的双特异性抗CCL2抗体。在某些实施例中,本发明提供了用于治疗患有炎症性疾病或自身免疫性疾病的个体的方法中的双特异性抗CCL2抗体,该方法包括向该个体施用有效量的双特异性抗CCL2抗体。

[0638] 在一些实施例中,炎症性疾病或自身免疫性疾病为自身免疫性疾患、炎症性疾患、纤维化疾患、粒细胞(嗜中性粒细胞或嗜酸性粒细胞)疾患、单核细胞疾患或淋巴细胞疾患,或者与正常或异常组织固有细胞(诸如肥大细胞、巨噬细胞或淋巴细胞)或基质细胞(诸如

成纤维细胞、肌成纤维细胞、平滑肌细胞、上皮细胞或内皮细胞)的数量或分布增加相关联的疾患。在一些实施例中,疾患为肺部疾患。在一些实施例中,肺部疾患与以下项相关联:粒细胞(嗜酸性粒细胞和/或嗜中性粒细胞)肺部炎症、感染诱导的肺部病症(包括与病毒(例如流感、副流感、鼻病毒、人偏肺病毒和呼吸道合胞病毒)、细菌或真菌(例如曲霉属真菌)触发因素相关联的那些肺部病症。在一些实施例中,疾患为变应原诱导的肺部病症、有毒环境污染诱导的肺部病症(例如,石棉肺、硅肺或铍中毒)、胃内容物吸入诱导的肺部病症,或者与具有遗传易感性(例如,囊性纤维化)的免疫失调或炎症性病症相关联。在一些实施例中,疾患为身体创伤诱导的肺部病症(例如,呼吸机损伤)、肺气肿、香烟诱导的肺气肿、支气管炎、结节病、组织细胞增生症、淋巴管肌瘤病、急性肺损伤、急性呼吸窘迫综合征、慢性肺病、支气管肺发育不良、肺炎(例如社区获得性肺炎、院内肺炎、呼吸机相关性肺炎、病毒性肺炎、细菌性肺炎和重症肺炎)、气道恶化和急性呼吸窘迫综合征(ARDS))。在一些实施例中,炎症性肺部疾患为COPD。

[0639] 在一些实施例中,炎症性肺部疾患为哮喘。在一些实施例中,哮喘为持续性慢性严重哮喘,其具有可能危及生命的症状恶化(恶化或发作)的急性事件。在一些实施例中,哮喘是特应性(也称为过敏性)哮喘、非过敏性哮喘(例如,通常由呼吸道病毒(例如流感、副流感、鼻病毒、人偏肺病毒和呼吸道合胞病毒)感染或吸入性刺激物(室内或室外的空气污染物、烟雾、柴油颗粒、挥发性化学物质和气体,甚至干冷空气)而触发,

[0640] 在一些实施例中,哮喘为间歇性的或运动诱导的,由于急性或慢性初次或二手暴露于“烟雾”(通常为香烟、雪茄、烟斗)、吸入或“吸电子烟”(烟草、大麻或其他此类物质)而导致的哮喘,或通过最近摄入阿司匹林或相关NSAID而触发的哮喘。在一些实施例中,哮喘为轻度的、或皮质类固醇初治(corticosteroidnaïve)哮喘、新诊断且未治疗的哮喘,或先前不需要长期使用局部吸入性或全身吸入性类固醇以控制症状(咳嗽、喘息、呼吸短促/呼吸困难或胸痛)。在一些实施例中,哮喘为慢性的、皮质类固醇抵抗性哮喘、皮质类固醇难治性哮喘、用皮质类固醇或其他慢性哮喘控制药品而仍未控制的哮喘。在一些实施例中,自身免疫性疾患、炎症性疾患、纤维化疾患、嗜中性粒细胞疾患或嗜酸性粒细胞疾患为肺纤维化。在一些实施例中,肺部纤维化为特发性肺纤维化(IPF)。在一些实施例中,自身免疫性疾患、炎症性疾患、纤维化疾患、粒细胞(嗜中性粒细胞或嗜酸性粒细胞)疾患、单核细胞疾患或淋巴细胞疾患为食管炎、过敏性鼻炎、非过敏性鼻炎、鼻窦炎伴鼻息肉、鼻息肉病、支气管炎、慢性肺炎、过敏性支气管肺曲霉病、气道炎症、过敏性鼻炎、支气管扩张和/或慢性支气管炎。

[0641] 在一些实施例中,自身免疫性疾患、炎症性疾患、纤维化疾患、粒细胞(嗜中性粒细胞或嗜酸性粒细胞)疾患、单核细胞疾患或淋巴细胞疾患为关节炎。在一些实施例中,关节炎为类风湿关节炎。在一些实施例中,关节炎为骨关节炎、类风湿关节炎、幼年型关节炎、幼年型类风湿关节炎、早期关节炎、多关节类风湿关节炎、全身型类风湿关节炎、肠病性关节炎、反应性关节炎、银屑病关节炎和/或损伤导致的关节炎。

[0642] 在一些实施例中,自身免疫性疾患、炎症性疾患、纤维化疾患、粒细胞(嗜中性粒细胞或嗜酸性粒细胞)疾患、单核细胞疾患或淋巴细胞疾患为胃肠道炎症性疾患。在一些实施例中,胃肠道炎症性病症为IBD(炎症性肠病)、溃疡性结肠炎(UC)、克罗恩病(CD)、结肠炎(例如,由环境侵害引起的结肠炎(例如,由治疗方案引起或与该治疗方案相关联,诸如化学

疗法、放射疗法等)、感染性结肠炎、缺血性结肠炎、胶原性或淋巴细胞性结肠炎、坏死性小肠结肠炎、诸如慢性肉芽肿病或乳糜泻等情况下的结肠炎、食物过敏、胃炎、胃肠炎、感染性胃炎或小肠结肠炎(例如,幽门螺杆菌感染的慢性活动性胃炎),以及由感染原引起的其他形式的胃肠道炎症,或未确定型结肠炎。

[0643] 在一些实施例中,自身免疫性疾患、炎症性疾患、纤维化疾患、粒细胞(嗜中性粒细胞或嗜酸性粒细胞)疾患、单核细胞疾患或淋巴细胞疾患,或者与正常或异常组织固有细胞(诸如肥大细胞、巨噬细胞或淋巴细胞)或基质细胞(诸如成纤维细胞、肌成纤维细胞、平滑肌细胞、上皮细胞或内皮细胞)的数量或分布增加相关联的疾患为狼疮或系统性红斑狼疮(SLE),或狼疮的一种或多种器官特异性表现(例如,影响肾脏的狼疮性肾炎(LN),或影响血液和/或淋巴器官(淋巴结、脾脏、胸腺和相关联的淋巴管)和/或关节和/或其他器官但不一定是肾脏的肾外狼疮(ERL))。在一些实施例中,自身免疫性疾患、炎症性疾患或纤维化疾患涉及脓毒症和/或创伤、HIV感染或特发性(未知病因)诸如ANCA相关血管炎(AAV)、肉芽肿性多血管炎(以前称为韦格纳肉芽肿病)、白塞病、心血管疾病、嗜酸性粒细胞支气管炎、莱特尔综合征、SEA综合征(血清阴性、接骨点病变、关节病综合征)、强直性脊柱炎、皮肌炎、硬皮病(例如系统性硬皮病,也称为系统性硬化症)、血管炎(例如巨细胞动脉炎(GCA),也称为颞动脉炎、颅动脉炎或霍顿病)、肌炎、多发性肌炎、皮肌炎、结节性多动脉炎、动脉炎、风湿性多肌痛、结节病、原发性胆汁性硬化症、硬化性胆管炎、干燥综合征、银屑病、斑块型银屑病、滴状银屑病、反向型银屑病、脓疱型银屑病、红皮病型银屑病、皮炎、特应性皮炎、天疱疮(例如寻常型天疱疮)、动脉粥样硬化、狼疮、斯提耳病、重症肌无力、乳糜泻、复发缓解型(RRMS)亚型或原发进展型(PPMS)亚型或继发进展型(SPMS)亚型的多发性硬化症(MS)、格林-巴利病、I型糖尿病(T1DM)或胰岛素依赖型(IDDM)或青少年发病DM型、甲状腺炎(例如格雷夫斯病)、乳糜泻、查尔格-施特劳斯综合征、肌痛综合征、嗜酸性粒细胞增多综合征、水肿反应(包括阵发性血管性水肿)、蠕虫感染、盘尾丝虫皮炎、嗜酸性粒细胞食管炎、嗜酸性粒细胞肠炎、嗜酸性粒细胞结肠炎、阻塞性睡眠呼吸暂停、心内膜心肌纤维化、阿狄森病、雷诺病或现象、自身免疫性肝炎、移植物抗宿主病(GVHD)或器官移植排斥反应。

[0644] 在进一步的方面,本发明提供了包含本文提供的双特异性抗CCL2抗体中的任一种的药物制剂,其例如用于以上治疗方法中的任一者中。在一个实施例中,药物制剂包含本文提供的任何双特异性抗CCL2抗体以及药用载体。

[0645] 本发明的抗体(和任何另外的治疗剂)可以通过任何合适的方式施用,包括肠胃外、肺内和鼻内,并且如果需要的话用于局部治疗、病灶内施用。肠胃外输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。给药可以通过任何合适的途径进行,例如通过注射,诸如静脉内或皮下注射,部分取决于施用是短暂的还是长期的。本文考虑了各种投配时间安排,包括但不限于在各个时间点处的单次或多次施用、推注施用,以及脉冲输注。

[0646] 本发明的抗体将以符合良好医学实践的方式配制、给药和施用。在这种情况下需要考虑的因素包括所治疗的特定疾患、所治疗的特定哺乳动物、个体患者的临床病症、疾患的原因、药剂的递送部位、施用方法、施用的时间安排,以及执业医师已知的其他因素。该抗体不是必须的,而是任选地与一种或多种目前用于预防或治疗所讨论的疾患的制剂共同配制。此类其他药剂的有效量取决于所用制剂中存在的抗体的量、疾患或治疗的类型,以及上面讨论的其他因素。这些通常以与本文所述相同的剂量和施用途径使用,或以本文所述剂

量的约1%至99%使用,或以任何剂量且通过经验/临床上确定为合适的任何途径使用。

[0647] 为了预防或治疗疾病,本发明的抗体的适当剂量(当单独使用或与一种或多种其他另外治疗剂组合使用时)将取决于待治疗的疾病类型、抗体的类型、疾病的严重程度和病程、施用分子用于预防还是治疗目的、患者的病史和对抗体的应答以及主治医师的酌处权。抗体适当地一次或在一系列治疗中施用于患者。取决于疾病的类型和严重程度,约1 μ g/kg至15mg/kg(例如,0.5mg/kg至10mg/kg)的抗体可以是例如通过一次或多次单独施用或通过连续输注而向患者施用的初始候选剂量。取决于上述因素,一种典型的日剂量的范围可以为约1 μ g/kg至100mg/kg或更多。对于数天或更长时间的重复施用,取决于病症,治疗通常会持续直至发生所需的疾病症状抑制。抗体的一种示例性剂量的范围为约0.05mg/kg至约10mg/kg。因此,可以向患者施用约0.5mg/kg、2.0mg/kg、4.0mg/kg或10mg/kg(或它们的任何组合)的一种或多种剂量。此类剂量可以间歇施用,例如每周或每三周施用(例如,使得患者接受约两次至约二十次,或例如约六次剂量的抗体)。可施用初始较高负荷剂量,然后施用一种或多种较低剂量。示例性给药方案包括施用约4mg/kg初始负荷剂量的抗体,然后每周施用约2mg/kg维持剂量的抗体。然而,其他剂量方案可能有用。通过常规技术和测定可以容易地监测该疗法的进展。

[0648] II. 制品

[0649] 在本发明的另一方面中,提供了一种制品,其含有可用于治疗、预防和/或诊断上述疾患的物质。该制品包括容器和在该容器上或与该容器相关的标签或包装插页(package insert)。合适的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器、静脉注射(IV)溶液袋等。该容器可以由多种材料(诸如玻璃或塑料)形成。该容器容纳组合物,该组合物本身或与另一种组合物组合能够有效地治疗、预防和/或诊断病症,并且该容器可以具有无菌入口(例如,该容器可以是静脉内溶液袋或具有可由皮下注射针刺穿的塞子的小瓶)。组合物中的至少一种活性剂是本发明的抗体。标签或包装插页指示该组合物用于治疗所选择的病症。此外,该制品可包括(a)第一容器,其中该第一容器中含有包含本发明的抗体的组合物;以及(b)第二容器,该第二容器中含有包含另外的细胞毒性剂或其他治疗剂组合物。本发明该实施例中的制品可以进一步包含包装插页,该包装插页指示该组合物可用于治疗特定病症。替代性地或另外地,该制品还可包含第二(或第三)容器,该第二(或第三)容器包含药用缓冲液,诸如抑菌性注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液和葡萄糖溶液。所述制品还可包括从商业和用户角度所需的其他物质,包括其他缓冲剂、稀释剂、过滤器、针头和注射器。

[0650] 下面列出本发明的具体实施例:

[0651] 1. 一种双特异性抗体,其包含与人CCL2上的第一表位(特异性)结合的第一抗原结合位点和与人CCL2上的第二不同的表位(特异性)结合的第二不同的抗原结合位点,

[0652] 其中双特异性抗体包含

[0653] a) 第一多肽链,其包含(从N末端至C末端方向)VH1-CH1-L1-铰链-CH2-CH3-L2-VL1-CL,其中,

[0654] VH1为第一重链可变结构域并且VL1为第一可变轻链结构域(两者一起形成(缔合在一起以形成)第一抗原结合位点),

[0655] CH1为恒定重链结构域1,

[0656] L1为长度为5个至15个氨基酸(在一个实施例中,长度为5个至10个氨基酸)的多肽

接头,

[0657] 铰链为重链铰链区,

[0658] CH2为恒定重链结构域2,

[0659] CH3为恒定重链结构域3,

[0660] L2为长度为5个至15个氨基酸(在一个实施例中,长度为10个至15个氨基酸)的多肽接头,

[0661] CL为恒定轻链结构域,

[0662] 以及

[0663] b) 第二多肽链,其包含(从N末端至C末端方向) VH2-CH1-L1-铰链-CH2-CH3-L2-VL2-CL,其中,

[0664] VH2为第二重链可变结构域并且VL2为第二可变轻链结构域(两者一起形成(缔合在一起以形成)第二抗原结合位点),

[0665] CH1为恒定重链结构域1,

[0666] L1为长度为5个至15个氨基酸(在一个实施例中,长度为5个至10个氨基酸)的多肽接头,

[0667] 铰链为重链铰链区,

[0668] CH2为恒定重链结构域2,

[0669] CH3为恒定重链结构域3,

[0670] L2为长度为5个至15个氨基酸(在一个实施例中,长度为10个至15个氨基酸)的多肽接头,

[0671] CL为恒定轻链结构域,

[0672] 其中

[0673] A) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列;

[0674] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且

[0675] ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列;

[0676] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;

[0677] 或者

[0678] B) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列;

[0679] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且

[0680] ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列;

[0681] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;

[0682] 或者

[0683] C) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列;

[0684] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且

[0685] ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列;

[0686] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列;

[0687] 或者

[0688] D) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列;

[0689] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且

- [0690] ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列;
[0691] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列;
[0692] 或者
[0693] E) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列;
[0694] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且
[0695] ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列;
[0696] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;
[0697] 或者
[0698] F) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列;
[0699] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且
[0700] ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列;
[0701] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列;
[0702] 或者
[0703] G) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列;
[0704] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且
[0705] ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列;
[0706] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;
[0707] 或者
[0708] H) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列;
[0709] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且
[0710] ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列;
[0711] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;
[0712] 或者
[0713] I) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列;
[0714] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且
[0715] ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列;
[0716] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;
[0717] 或者
[0718] J) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列;
[0719] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且
[0720] ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列;
[0721] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;
[0722] 或者
[0723] K) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列;
[0724] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且
[0725] ii) VH2结构域包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列;
[0726] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;
[0727] 或者
[0728] L) i) VH1结构域包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列;

- [0729] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且
- [0730] ii)VH2结构域包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列;
- [0731] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;
- [0732] 或者
- [0733] M) i)VH1结构域包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列;
- [0734] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且
- [0735] ii)VH2结构域包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列;
- [0736] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列;
- [0737] 或者
- [0738] N) i)VH1结构域包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列;
- [0739] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且
- [0740] ii)VH2结构域包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列;
- [0741] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;
- [0742] 或者
- [0743] O) i)VH1结构域包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列;
- [0744] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且
- [0745] ii)VH2结构域包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列;
- [0746] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;
- [0747] 或者
- [0748] P) i)VH1结构域包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列;
- [0749] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且
- [0750] ii)VH2结构域包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列;
- [0751] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;
- [0752] 2.根据实施例1所述的双特异性抗体,其中
- [0753] i)VH1结构域包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列;
- [0754] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且
- [0755] ii)VH2结构域包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列;
- [0756] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列。
- [0757] 3.根据实施例1所述的双特异性抗体,其中
- [0758] i)VH1结构域包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列;
- [0759] 并且VL1结构域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列;并且
- [0760] ii)VH2结构域包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列;
- [0761] 并且VL2结构域包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列。
- [0762] 4.根据实施例1至3中任一项所述的双特异性抗体,其中
- [0763] L1为长度为9个至11个氨基酸的多肽接头,并且
- [0764] L2为长度为9个至11个氨基酸的多肽接头。
- [0765] 5.根据实施例4所述的双特异性抗体,其中
- [0766] L1和L2为选自以下项的组的多肽接头:GSGGSGGSGG(SEQ ID NO:183)、GSGGGSGGGG
(SEQ ID NO:184)、GSGGGGSGGG(SEQ ID NO:185)、GGSGGSGGGG(SEQ ID NO:186)、

GGSGGGSGGG (SEQ ID NO:187)、GGSGGGSGG (SEQ ID NO:188)、GGSGGGSGGG (SEQ ID NO:189)、GGSGGGSGG (SEQ ID NO:190)和GGGGSGGGSGG (SEQ ID NO:191)。

[0767] 6.根据实施例4所述的双特异性抗体,其中

[0768] L1为包含GGSGGGSGG (SEQ ID NO:188)的氨基酸序列的多肽接头,并且

[0769] L2为包含GGSGGGSGG (SEQ ID NO:188)的氨基酸序列的多肽接头。

[0770] 7.根据实施例1至6中任一项所述的双特异性抗体,其中恒定重链结构域CH1、铰链、CH2和CH3属于人IgG同种型,优选地属于人IgG1同种型。

[0771] 8.根据前述实施例中任一项所述的双特异性抗体,其中双特异性抗体

[0772] i)在体外阻断CCL2与其受体CCR2的结合(报告基因测定, $IC_{50}=0.5nM$);且/或

[0773] ii)在体外抑制CCL2介导的骨髓细胞的趋化性($IC_{50}=1.5nM$);且/或

[0774] iii)对食蟹猴和人CCL2有交叉反应性。

[0775] 9.根据前述实施例中任一项所述的双特异性抗体,其中双特异性抗体不对其他CCL同源物有交叉反应性(相比于与CCL2的结合,其与其他CCL同源物(选自CCL8、CCL7和CCL13的组)的结合为100分之一

[0776] 10.根据前述实施例中任一项所述的双特异性抗体,其中双特异性抗体以离子依赖性方式与人CCL2上的第一和第二表位结合。

[0777] 11.根据前述实施例中任一项所述的双特异性抗体,其中双特异性抗体以pH依赖性方式与人CCL2结合,并且其中相比于在酸性pH,第一抗原结合位点和第二抗原结合位点两者均在中性pH以较高的亲和力与CCL2结合。

[0778] 12.根据前述实施例中任一项所述的双特异性抗体,其中相比于在pH 5.8,双特异性抗体在pH 7.4以10倍的亲和力与人CCL2结合。

[0779] 13.根据权利要求1至12中任一项所述的双特异性抗体,其中所述恒定重链结构域CH1、铰链、CH2和CH3属于人IgG1同种型并且包含以下突变中的一者或多者(Kabat EU编号)

[0780] i)Q311R和/或P343R(适用于增加pI,以用于增强抗原的摄取);和/或

[0781] ii)L234Y、L235W、G236N、P238D、T250V、V264I、H268D、Q295L、T307P、K326T和/或A330K(适用于增加与人FcγRIIb的亲和力并且降低与其他人FcγR的亲和力);和/或

[0782] iii)M428L、N434A和/或Y436T(适用于增加与FcRn的亲和力,以用于更长的血浆半衰期);和/或

[0783] iv)Q438R和/或S440E(适用于抑制类风湿因子结合)。

[0784] 14.根据权利要求1至12中任一项所述的双特异性抗体,其中所述恒定重链结构域CH1、铰链、CH2和CH3属于人IgG1同种型并且包含以下突变中的一者或多者(Kabat EU编号)

[0785] i)Q311R和/或P343R(适用于增加pI,以用于增强抗原的摄取);和/或

[0786] ii)L235W、G236N、H268D、Q295L、K326T和/或A330K(适用于增加与人FcγRIIb的亲和力并且降低与其他人FcγR的亲和力);和/或

[0787] iii)N434A(适用于增加与FcRn的亲和力,以用于更长的血浆半衰期);和/或

[0788] iv)Q438R和/或S440E(适用于抑制类风湿因子结合)。

[0789] 15.根据权利要求1至12中任一项所述的双特异性抗体,其中所述恒定重链结构域CH1、铰链、CH2和CH3属于人IgG1同种型并且包含以下突变中的一者或多者(Kabat EU编号)

[0790] i)Q311R和P343R(适用于增加pI,以用于增强抗原的摄取);和

[0791] ii) L235W、G236N、H268D、Q295L、K326T和A330K (适用于增加与人FcγRIIb的亲合力并且降低与其他人FcγR的亲合力);和

[0792] iii) N434A (适用于增加与FcRn的亲合力,以用于更长的血浆半衰期);和

[0793] iv) Q438R和S440E (适用于抑制类风湿因子结合)。

[0794] 16. 根据权利要求1至12中任一项所述的双特异性抗体,其中所述恒定重链结构域CH1、铰链、CH2和CH3属于人IgG1同种型并且包含以下突变中的一者或多者 (Kabat EU编号)

[0795] i) Q311R和/或P343R (适用于增加pI,以用于增强抗原的摄取);和/或

[0796] ii) L234Y、P238D、T250V、V264I、T307V和/或A330K (适用于增加与人FcγRIIb的亲合力并且降低与其他人FcγR的亲合力);和/或

[0797] iii) M428L、N434A和/或Y436T (适用于增加与FcRn的亲合力,以用于更长的血浆半衰期);和/或

[0798] iv) Q438R和/或S440E (适用于抑制类风湿因子结合)。

[0799] 17. 根据权利要求1至12中任一项所述的双特异性抗体,其中所述恒定重链结构域CH1、铰链、CH2和CH3属于人IgG1同种型并且包含以下突变中的一者或多者 (Kabat EU编号)

[0800] i) Q311R和P343R (适用于增加pI,以用于增强抗原的摄取);和

[0801] ii) L234Y、P238D、T250V、V264I、T307V和A330K (适用于增加与人FcγRIIb的亲合力并且降低与其他人FcγR的亲合力);和

[0802] iii) M428L、N434A和Y436T (适用于增加与FcRn的亲合力,以用于更长的血浆半衰期);以及

[0803] iv) Q438R和S440E (适用于抑制类风湿因子结合)。

[0804] 18. 根据权利要求1至12中任一项所述的双特异性抗体,其中所述恒定重链结构域CH1、铰链、CH2和CH3属于人IgG1同种型并且包含以下突变中的一者或多者 (Kabat EU编号)

[0805] i) Q311R和P343R (适用于增加pI,以用于增强抗原的摄取);和

[0806] ii) L234Y、P238D、T250V、V264I、T307V和A330K (适用于增加与人FcγRIIb的亲合力并且降低与其他人FcγR的亲合力);和

[0807] iii) N434A (适用于增加与FcRn的亲合力,以用于更长的血浆半衰期);以及

[0808] iv) Q438R和S440E (适用于抑制类风湿因子结合)。

[0809] 19. 根据权利要求13至18中任一项所述的双特异性抗体,其中恒定重链结构域CH3包含以下突变 (Kabat EU编号)

[0810] i) 重链恒定结构域CH3中的一者中的S354C和T366W;和

[0811] ii) 重链恒定结构域CH3中的另一者中的Y349C、T366S、L368A、Y407V。

[0812] 20. 根据权利要求13至19中任一项所述的双特异性抗体,其中恒定重链结构域CH3包含以下突变 (Kabat EU编号)

[0813] K447G。

[0814] 21. 根据实施例1至2和4至7中任一项所述的双特异性抗体,其中双特异性抗体包含含有与SEQ ID NO:175的序列至少98%或99%相同的氨基酸序列的多肽,以及含有与SEQ ID NO:176的序列至少98%或99%相同的氨基酸序列的多肽。

[0815] 22. 根据实施例1至2和4至7中任一项所述的双特异性抗体,其中双特异性抗体包含含有SEQ ID NO:175的序列的氨基酸序列的多肽,以及含有SEQ ID NO:176的氨基酸序列

的多肽。

[0816] 23. 根据实施例1至7、实施例1至2和4至7中任一项所述的双特异性抗体,其中双特异性抗体包含含有与SEQ ID NO:177的序列至少98%或99%相同的氨基酸序列的多肽,以及含有与SEQ ID NO:178的序列至少98%或99%相同的氨基酸序列的多肽。

[0817] 24. 根据实施例1至2和4至7中任一项所述的双特异性抗体,其中双特异性抗体包含含有SEQ ID NO:177的序列的氨基酸序列的多肽,以及含有SEQ ID NO:178的氨基酸序列的多肽。

[0818] 25. 根据实施例1至2和4至7中任一项所述的双特异性抗体,其中双特异性抗体包含含有与SEQ ID NO:179的序列至少98%或99%相同的氨基酸序列的多肽,以及含有与SEQ ID NO:180的序列至少98%或99%相同的氨基酸序列的多肽。

[0819] 26. 根据实施例1至2和4至7中任一项所述的双特异性抗体,其中双特异性抗体包含含有SEQ ID NO:179的序列的氨基酸序列的多肽,以及含有SEQ ID NO:180的氨基酸序列的多肽。

[0820] 27. 根据实施例1至2和4至7中任一项所述的双特异性抗体,其中双特异性抗体包含含有与SEQ ID NO:179的序列至少98%或99%相同的氨基酸序列的多肽,以及含有与SEQ ID NO:180的序列至少98%或99%相同的氨基酸序列的多肽。

[0821] 28. 根据实施例1至2和4至7中任一项所述的双特异性抗体,其中双特异性抗体包含含有SEQ ID NO:181的序列的氨基酸序列的多肽,以及含有SEQ ID NO:182的氨基酸序列的多肽。

[0822] 29. 经分离的核酸,其编码根据前述实施例中任一项所述的抗体。

[0823] 30. 一种宿主细胞,其包含根据实施例29所述的核酸。

[0824] 31. 一种生产抗体的方法,该方法包括培养根据实施例30所述的宿主细胞以便生产抗体。

[0825] 32. 根据实施例32所述的方法,其进一步包括从宿主细胞回收抗体。

[0826] 33. 一种药物制剂,其包含根据实施例1至28中任一项所述的双特异性抗体以及药用载体。

[0827] 34. 根据实施例1至28中任一项所述的双特异性抗体,其用作药物。

[0828] 35. 根据实施例1至28中任一项所述的双特异性抗体,其用于治疗癌症。

[0829] 36. 根据实施例1至28中任一项所述的双特异性抗体,其用于治疗炎症性或自身免疫性疾病。

[0830] 37. 根据实施例1至28中任一项所述的双特异性抗体在制造药物中的用途。

[0831] 38. 根据实施例37所述的用途,其中所述药物用于癌症的治疗。

[0832] 39. 根据实施例37所述的用途,其中药物用于炎症性或自身免疫性疾病的治疗。

[0833] 40. 一种治疗患有癌症的个体的方法,该方法包括向个体施用有效量的根据实施例1至28中任一项所述的双特异性抗体。

[0834] 41. 一种治疗患有炎症性或自身免疫性疾病的个体的方法,该方法包括向个体施用有效量的根据实施例1至28中任一项所述的双特异性抗体。

[0835] 提供以下实例和附图以帮助理解本发明,本发明的真正范围在所附权利要求书中阐明。应当理解,在不脱离本发明的精神的情况下,可对所阐述的程序进行修改。

[0836] 氨基酸序列的描述

[0837] 与不同表位结合的抗CCL2抗原结合部分(可变区和高变区(CDR)):

[0838]

SEQ ID NO:	33	重链 CDR-H1	CNT O888	SYGIS
SEQ ID NO:	34	重链 CDR-H2	CNT O888	GIIPIFGTANYAQKFQG
SEQ ID NO:	35	重链 CDR-H3	CNT O888	YDGIYGELDF
SEQ ID NO:	36	轻链 CDR-L1	CNT O888	RASQSVSDAYLA
SEQ ID NO:	37	轻链 CDR-L2	CNT O888	DASSRAT
SEQ ID NO:	38	轻链 CDR-L3	CNT O888	HQYIQLHSFT
SEQ ID NO:	39	重链可 变结构 域 VH	CNT O888	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGT FSSYGISWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGT ANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSL RSEDTAVYYCARYDGIYGELDFWGQGT LVTSS
SEQ ID NO:	40	轻链可 变结构 域 VL	CNT O888	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVS DAYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATG VPAFRFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYY CHQYIQLHSFTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO:	41	重链 CDR-H1	人源 化 11K2 (= 11K2)	DTYMH
SEQ ID NO:	42	重链 CDR-H2	人源 化 11K2 (= 11K2)	RIDPANGNTKFDPKFQG
SEQ ID NO:	43	重链 CDR-H3	人源 化 11K2 (= 11K2)	GVFGFFDY

[0839]

SEQ ID NO:	44	轻链 CDR-L1	人源化 11K2 (= 11K2)	KATEDIYNRLA
SEQ ID NO:	45	轻链 CDR-L2	人源化 11K2 (= 11K2)	GATSLET
SEQ ID NO:	46	轻链 CDR-L3	人源化 11K2 (= 11K2)	QQFWSAPYT
SEQ ID NO:	47	重链可变结构域 VH	人源化 11K2 (= 11K2)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGLT ISDTYMHWRQAPGQGLEWMGRIDPAN GNTKFDPKFQGRVTITADTSTSTAYMELS SLRSEDVAVYYCARGVFGFFDYWGQGTT VTVSS
SEQ ID NO:	48	轻链可变结构域 VL	人源化 11K2 (= 11K2)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKATEDIY NRLAWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGV PSRFGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYC QQFWSAPYTFGGGTKVEIK

[0840] CDR修饰的抗CCL2抗原结合部分(可变区和高变区(CDR)):

[0841] 经修饰的CNT0888

[0842]

SEQ ID NO:	57	重链 CDR-H1	突变的变体 CNT0888	SHYGXS, 其中 X 为 I 或 T
SEQ ID NO:	58	重链 CDR-H2	突变的变体 CNT0888	$GX^1IX^2IFX^3TANYAQKFQG$ 其中 X^1 为 V、I 或 H, X^2 为 P 或 H, 并且 X^3 为 H 或 G
SEQ ID NO:	59	重链 CDR-H3	突变的变体	YDAHYGELDF

[0843]

			CNT0888	
SEQ ID NO:	60	轻链 CDR-L1	突变的变体 CNT0888	RASQHVSDAYLA
SEQ ID NO:	61	轻链 CDR-L2	突变的变体 CNT0888	DASDRAE
SEQ ID NO:	62	轻链 CDR-L3	突变的变体 CNT0888	HQYIHLHSFT
SEQ ID NO:	63	重链 FR-H1	突变的变体 CNT0888	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTF
SEQ ID NO:	64	重链 FR-H2	突变的变体 CNT0888	WVRQAPGQGLEWMG
SEQ ID NO:	65	重链 FR-H3	突变的变体 CNT0888	RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR
SEQ ID NO:	66	重链 FR-H4	突变的变体 CNT0888	WGQGTLVTVSS
SEQ ID NO:	67	轻链 FR-L1	突变的变体 CNT0888	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC
SEQ ID NO:	68	轻链 FR-L2	突变的变体 CNT0888	WYQQKPGQAPRLLIY
SEQ ID NO:	69	轻链 FR-L3	突变的变体 CNT0888	GVPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYC
SEQ ID NO:	70	轻链 FR-L4	突变的变体 CNT0888	GQGTKVEIK

[0844]

SEQ ID NO:	71	重链可变结构域 VH	突变的变体 CNT0888 H0695	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS GGTFSHYGISWVRQAPGQGLEWMG GVIPIFHTANYAQKFQGRVTITADES TSTAYMELSSLRSED TAVYYCARYD AHYGELDFWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO:	72	重链可变结构域 VH	突变的变体 CNT0888 H0625	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS GGTFSHYGISWVRQAPGQGLEWMG GIIHIFHTANYAQKFQGRVTITADEST STAYMELSSLRSED TAVYYCARYDA HYGELDFWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO:	73	重链可变结构域 VH	突变的变体 CNT0888 H0634	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS GGTFSHYGT SWVRQAPGQGLEWMG GIIHIFGTANYAQKFQGRVTITADEST STAYMELSSLRSED TAVYYCARYDA HYGELDFWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO:	74	重链可变结构域 VH	突变的变体 CNT0888 H0635	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS GGTFSHYGISWVRQAPGQGLEWMG GIIHIFGTANYAQKFQGRVTITADES TSTAYMELSSLRSED TAVYYCARYD AHYGELDFWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO:	75	轻链可变结构域 VL	突变的变体 CNT0888 L0616	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQ HVSDAYLAWYQQKPGQAPRLLIYD ASDRAEGVPARFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCHQYIHLHSFTFGQG TKVEIK

[0845] 经修饰的人源化11K2

[0846]

SEQ ID NO:	76	重链 CDR-H1	突变的变体人源化 11K2	HTYMH
SEQ ID NO:	77	重链 CDR-H2	突变的变体人源化 11K2	RIDPXNHNTKFDPKFQG, 其中 X 为 D 或 E
SEQ ID NO:	78	重链 CDR-H3	突变的变体人源化	GVFGFFXH, 其中 X 为 D 或 E

[0847]

			11K2	
SEQ ID NO:	79	轻链 CDR-L1	突变的变 体人源化 11K2	KAX ¹ EDIYNRX ² A, 其中 X ¹ 为 F 或 T 并且 X ² 为 R 或 L
SEQ ID NO:	80	轻链 CDR-L2	突变的变 体人源化 11K2	GATSLEH
SEQ ID NO:	81	轻链 CDR-L3	突变的变 体人源化 11K2	QQFXSAPYT, 其中 X 为 W 或 R
SEQ ID NO:	82	重链 FR-H1	突变的变 体人源化 11K2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGLTIS
SEQ ID NO:	83	重链 FR-H2	突变的变 体人源化 11K2	WVRQAPGQGLEWMG
SEQ ID NO:	84	重链 FR-H3	突变的变 体人源化 11K2	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCAR
SEQ ID NO:	85	重链 FR-H4	突变的变 体人源化 11K2	WGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:	86	轻链 FR-L1	突变的变 体 11K2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC
SEQ ID NO:	87	轻链 FR-L2	突变的变 体人源化 11K2	WYQQKPGKAPKLLIH
SEQ	88	轻链	突变的变	GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPED

[0848]

ID NO:		FR-L3	体人源化 11K2	FATYYC
SEQ ID NO:	89	轻链 FR-L4	突变的变 体人源化 11K2	FGGGTKVEIK
SEQ ID NO:	90	重链可 变结构 域 VH	突变的变 体人源化 11K2 H1503	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGLTISHTYMHWVRQAPGQGLEWM GRIDPDNHNTKFDPKFQGRVTITAD TSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCAR GVFGFFDHWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:	91	重链可 变结构 域 VH	突变的变 体人源化 11K2 H1510	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGLTISHTYMHWVRQAPGQGLEWM GRIDPDNHNTKFDPKFQGRVTITAD TSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCAR GVFGFFEHWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:	92	重链可 变结构 域 VH	突变的变 体人源化 11K2 H1514	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGLTISHTYMHWVRQAPGQGLEWM GRIDPENHNTKFDPKFQGRVTITAD TSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCAR GVFGFFEHWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:	93	轻链可 变结构 域 VL	突变的变 体人源化 11K2 L1338	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKAF EDIYNRRAWYQQKPGKAPKLLIHG ATSLEHGVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYCQQFWSAPYTFGGG TKVEIK
SEQ ID NO:	94	轻链可 变结构 域 VL	突变的变 体人源化 11K2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKAT EDIYNRLAWYQQKPGKAPKLLIHG ATSLEHGVPSRFSGSGSGTDYTLTIS
			L1201	SLQPEDFATYYCQQFRSAPYTFGGG TKVEIK

[0849]

- [0850] 示例性恒定轻链区：
- [0851] SEQ ID NO:95示例性人 κ 轻链恒定区
- [0852] SEQ ID NO:96示例性人 λ 轻链恒定区
- [0853] 示例性恒定重链区：
- [0854] SEQ ID NO:97来源于IgG1的示例性人重链恒定区
- [0855] SEQ ID NO:98来源于具有突变L234A、L235A和P329G的IgG1 (Fc γ 受体沉默) 的示例性人重链恒定区
- [0856] SEQ ID NO:99来源于IgG1 (SG1-IgG1同种异型) 的示例性人重链恒定区
- [0857] SEQ ID NO:100来源于具有突变的IgG1 (SG105-IgG1同种异型-Fc γ 受体沉默) 的示例性人重链恒定区
- [0858] SEQ ID NO:101SG1095-来源于包含以下突变 (Kabat EU编号) 的IgG1的示例性人重链恒定区：
- [0859] -L235W/G236N/H268D/Q295L/A330K/K326T (适用于增加与人Fc γ R2b的亲和力并且降低与其他人Fc γ R的亲和力)；
- [0860] -Q311R/P343R (适用于增加等电点 (pI), 以用于增强抗原的摄取；
- [0861] -N434A (适用于增加与FcRn的亲和力, 以用于抗体的更长的血浆半衰期；以及
- [0862] -Q438R/S440E (适用于抑制类风湿因子结合
- [0863] SEQ ID NO:102SG1099-来源于包含以下突变 (Kabat EU编号) 的IgG1的示例性人重链恒定区：
- [0864] Q311R/P343R (适用于增加pI, 以用于增强抗原的摄取)
- [0865] SEQ ID NO:103SG1100-来源于包含以下突变 (Kabat EU编号) 的IgG1的示例性人重链恒定区：
- [0866] -Q311R/P343R (适用于增加pI, 以用于增强抗原的摄取)；
- [0867] -N434A (适用于增加与FcRn的亲和力, 以用于抗体的更长的血浆半衰期)；以及
- [0868] -Q438R/S440E (适用于抑制类风湿因子结合)
- [0869] CNT0888//11K2-WT IgG1 (示例性双特异性CNT0888//11K2-WT IgG1 Crossmab)
- [0870] SEQ ID NO:104重链1-CNT0888//11K2-WT IgG1
- [0871] SEQ ID NO:105重链2-CNT0888//11K2-WT IgG1
- [0872] SEQ ID NO:106轻链1-CNT0888//11K2-WT IgG1
- [0873] SEQ ID NO:107轻链2-CNT0888//11K2-WT IgG1
- [0874] CKL02-IgG1 (示例性双特异性CKL02 IgG1 Crossmab)
- [0875] SEQ ID NO:108重链1-CKL02 IgG1
- [0876] SEQ ID NO:109重链2-CKL02 IgG1
- [0877] SEQ ID NO:110轻链1-CKL02 IgG1
- [0878] SEQ ID NO:111轻链2-CKL02 IgG1
- [0879] CKL02-SG1095 (=P1AD8325) (示例性双特异性CKL02 Crossmab, 其包含SG1095 Fc突变)
- [0880] SEQ ID NO:112重链1-CKL02-SG1095
- [0881] SEQ ID NO:113重链2-CKL02-SG1095

- [0882] SEQ ID NO:114轻链1-CKL02-SG1095
- [0883] SEQ ID NO:115轻链2-CKL02-SG1095
- [0884] CKL02-SG1099 (示例性双特异性CKL02 Crossmab,其包含SG1099 Fc突变)
- [0885] SEQ ID NO:116重链1-CKL02-SG1099
- [0886] SEQ ID NO:117重链2-CKL02-SG1099
- [0887] SEQ ID NO:118轻链1-CKL02-SG1099
- [0888] SEQ ID NO:119轻链2-CKL02-SG1099
- [0889] CKL02-SG1100 (示例性双特异性CKL02 Crossmab,其包含SG1100 Fc突变)
- [0890] SEQ ID NO:120重链1-CKL02-SG1100
- [0891] SEQ ID NO:121重链2-CKL02-SG1100
- [0892] SEQ ID NO:122轻链1-CKL02-SG1100
- [0893] SEQ ID NO:123轻链2-CKL02-SG1100
- [0894] CKL03-SG1095 (示例性双特异性CKL03 Crossmab,其包含SG1095 Fc突变)
- [0895] SEQ ID NO:124重链1-CKL03-SG1095
- [0896] SEQ ID NO:125重链2-CKL03-SG1095
- [0897] SEQ ID NO:126轻链1-CKL03-SG1095
- [0898] SEQ ID NO:127轻链2-CKL03-SG1095
- [0899] CKL03-SG1099 (示例性双特异性CKL03 Crossmab,其包含SG1099 Fc突变)
- [0900] SEQ ID NO:128重链1-CKL03-SG1099
- [0901] SEQ ID NO:129重链2-CKL03-SG1099
- [0902] SEQ ID NO:130轻链1-CKL03-SG1099
- [0903] SEQ ID NO:131轻链2-CKL03-SG1099
- [0904] CKL03-SG1100 (示例性双特异性CKL03 Crossmab,其包含SG1100 Fc突变)
- [0905] SEQ ID NO:132重链1-CKL03-SG1100
- [0906] SEQ ID NO:133重链2-CKL03-SG1100
- [0907] SEQ ID NO:134轻链1-CKL03-SG1100
- [0908] SEQ ID NO:135轻链2-CKL03-SG1100
- [0909] 其他抗CCL2抗原结合部分:
- [0910] SEQ ID NO:136重链可变结构域VH 2F2
- [0911] SEQ ID NO:137轻链可变结构域VL 2F2
- [0912] SEQ ID NO:138重链可变结构域VH鼠11K2(=11K2m)
- [0913] SEQ ID NO:139轻链可变结构域VL鼠11K2(=11K2m)
- [0914] SEQ ID NO:140重链可变结构域VH 1H11
- [0915] SEQ ID NO:141轻链可变结构域VL 1H11
- [0916] 示例性CCL2和同源物(不含信号肽):
- [0917] SEQ ID NO:142示例性人CCL2(MCP1)-野生型(wt)
- [0918] SEQ ID NO:143示例性人CCL2(MCP1)-P8A变体
- [0919] SEQ ID NO:144示例性人CCL2(MCP1)-T10C变体
- [0920] SEQ ID NO:145示例性人CCL8(MCP2)-野生型(wt)

- [0921] SEQ ID NO:146 示例性人CCL8 (MCP2) -P8A变体
- [0922] SEQ ID NO:147 示例性人CCL7 (MCP3) -野生型 (wt)
- [0923] SEQ ID NO:148 示例性人CCL13 (MCP4) -野生型 (wt)
- [0924] SEQ ID NO:149 示例性食蟹猴CCL2-野生型 (wt)
- [0925] SEQ ID NO:150 示例性小鼠CCL2-野生型 (wt)
- [0926] 其他示例性恒定重链区:
- [0927] SEQ ID NO:151GG01-来源于包含以下突变 (Kabat EU编号) 的IgG1的示例性人重链恒定区:
- [0928] -L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K (适用于增加与人FcγRIIb的亲和力并且降低与其他人FcγR的亲和力);
- [0929] -Q311R/P343R (适用于增加等电点 (pI), 以用于增强抗原的摄取);
- [0930] -N434A (适用于增加与FcRn的亲和力, 以用于抗体的更长的血浆半衰期); 以及
- [0931] -Q438R/S440E (适用于抑制类风湿因子结合)
- [0932] SEQ ID NO:152GG02-来源于包含以下突变 (Kabat EU编号) 的IgG1的示例性人重链恒定区:
- [0933] -L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K (适用于增加与人FcγRIIb的亲和力并且降低与其他人FcγR的亲和力);
- [0934] -Q311R/P343R (适用于增加等电点 (pI), 以用于增强抗原的摄取);
- [0935] -M428L/N434A/Y436T (适用于增加与FcRn的亲和力, 以用于抗体的更长的血浆半衰期); 以及
- [0936] -Q438R/S440E (适用于抑制类风湿因子结合)
- [0937] SEQ ID NO:153GG03-来源于包含以下突变 (Kabat EU编号) 的IgG1 (包含IgG1同种异型序列) 的示例性人重链恒定区:
- [0938] -L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K (适用于增加与人FcγRIIb的亲和力并且降低与其他人FcγR的亲和力);
- [0939] -Q311R/P343R (适用于增加等电点 (pI), 以用于增强抗原的摄取);
- [0940] -N434A (适用于增加与FcRn的亲和力, 以用于抗体的更长的血浆半衰期); 以及
- [0941] -Q438R/S440E (适用于抑制类风湿因子结合)
- [0942] SEQ ID NO:154GG04-来源于包含以下突变 (Kabat EU编号) 的IgG1 (包含IgG1同种异型序列) 的示例性人重链恒定区:
- [0943] -L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K (适用于增加与人FcγRIIb的亲和力并且降低与其他人FcγR的亲和力);
- [0944] -Q311R/P343R (适用于增加等电点 (pI), 以用于增强抗原的摄取);
- [0945] -M428L/N434A/Y436T (适用于增加与FcRn的亲和力, 以用于抗体的更长的血浆半衰期); 以及
- [0946] -Q438R/S440E (适用于抑制类风湿因子结合)
- [0947] CKL02-GG01 (=P1AF8137) (示例性双特异性CLOK2 Crossmab, 其包含GG01 Fc突变)
- [0948] SEQ ID NO:155重链1-CKL02-GG01

- [0949] SEQ ID NO:156重链2-CKL02-GG01
- [0950] SEQ ID NO:157轻链1-CKL02-GG01
- [0951] SEQ ID NO:158轻链2-CKL02-GG01
- [0952] CKL02-GG02(=P1AF8139)(示例性双特异性CLOK2 Crossmab,其包含GG02 Fc突变)
- [0953] SEQ ID NO:159重链1-CKL02 GG02
- [0954] SEQ ID NO:160重链2-CKL02 GG02
- [0955] SEQ ID NO:161轻链1-CKL02 GG02
- [0956] SEQ ID NO:162轻链2-CKL02 GG02
- [0957] CKL02-GG03(示例性双特异性CLOK2 Crossmab,其包含GG03 Fc突变)
- [0958] SEQ ID NO:163重链1-CKL02-GG03
- [0959] SEQ ID NO:164重链2-CKL02-GG03
- [0960] SEQ ID NO:165轻链1-CKL02-GG03
- [0961] SEQ ID NO:166轻链2-CKL02-GG03
- [0962] CKL02-GG04(示例性双特异性CKL02 Crossmab,其包含GG04 Fc突变)
- [0963] SEQ ID NO:167重链1-CKL02-GG04
- [0964] SEQ ID NO:168重链2-CKL02-GG04
- [0965] SEQ ID NO:169轻链1-CKL02-GG04
- [0966] SEQ ID NO:170轻链2-CKL02-GG04
- [0967] CKL02-GG03/GG04(=P1AF8140)(示例性双特异性CKL02 Crossmab,其包含杵链中的GG03 Fc突变并且包含臼链中的GG04 Fc突变)
- [0968] SEQ ID NO:171重链1-CKL02-GG03/GG04
- [0969] SEQ ID NO:172重链2-CKL02-GG03/GG04
- [0970] SEQ ID NO:173轻链1-CKL02-GG03/GG04
- [0971] SEQ ID NO:174轻链2-CKL02-GG03/GG04
- [0972] P1AF8142(CKL02-CB-SG1095) - (示例性双特异性CKL02扭曲体(CB),其仅包含含有SG1095 Fc突变的2条多肽链)
- [0973] SEQ ID NO:175多肽链1-CKL02-CB-SG1095
- [0974] SEQ ID NO:176多肽链2-CKL02-CB-SG1095
- [0975] P1AF8143(CKL02-CB-GG02) - (示例性双特异性CKL02扭曲体(CB),其仅包含含有GG02 Fc突变的2条多肽链)
- [0976] SEQ ID NO:177多肽链1-CKL02-CB-GG02
- [0977] SEQ ID NO:178多肽链2-CKL02-CB-GG02
- [0978] P1AG5853(CKL02-CB-GG02-K447G) - (示例性双特异性CKL02扭曲体(CB),其仅包含含有GG02 Fc突变和突变K447G的2条多肽链)
- [0979] SEQ ID NO:179多肽链1-CKL02-CB-GG02-KG
- [0980] SEQ ID NO:180多肽链2-CKL02-CB-GG02-KG
- [0981] P1AG8317(CKL02-CB-SG1095-K447G) - (示例性双特异性CKL02扭曲体(CB),其仅包含含有SG1095 Fc突变和突变K447G的2条多肽链)

- [0982] SEQ ID NO:181多肽链1-CKL02-CB-SG1095-KG
- [0983] SEQ ID NO:182多肽链2-CKL02-CB-SG1095-KG
- [0984] 长度为10个氨基酸的示例性甘氨酸-丝氨酸多肽接头:
- [0985] SEQ ID NO:183多肽接头GSGGSGGSGG
- [0986] SEQ ID NO:184多肽接头GSGGSGGGG
- [0987] SEQ ID NO:185多肽接头GSGGSGGGG
- [0988] SEQ ID NO:186多肽接头GGSGGSGGGG
- [0989] SEQ ID NO:187多肽接头GGSGGSGGGG
- [0990] SEQ ID NO:188多肽接头GGSGGGSGG
- [0991] SEQ ID NO:189多肽接头GGGSGGSGGG
- [0992] SEQ ID NO:190多肽接头GGGSGGGSGG
- [0993] SEQ ID NO:191多肽接头GGGGSGGSGG
- [0994] 对用于本文所述的抗CCL2双特异性抗体的单特异性未经修饰的抗CCL2抗体/抗原结合部分进行命名

[0995]

抗体/抗原结合位点	别名	VH/VL
1A4	CCL2-0008	SEQ ID NO:8/SEQ ID NO:9
1A5	CCL2-0009	SEQ ID NO:15/SEQ ID NO:16
1G9	CCL2-0010	SEQ ID NO:23/SEQ ID NO:24
2F6	CCL2-0014	SEQ ID NO:31/SEQ ID NO:32
CNT0888	CCL2-0004	SEQ ID NO:39/SEQ ID NO:40
人源化11K2(=11K2)	CCL2-0002	SEQ ID NO:47/SEQ ID NO:48
ABN912	CCL2-0003	SEQ ID NO:55/SEQ ID NO:56

- [0996] 将具有未经修饰的VH/VL的双特异性抗CCL2命名为Crossmab(参见W0 2016/016299),其具有IgG1或包含突变L234A、L235A和P329G的IgG1(PGLALA)

[0997]

双特异性抗CCL2抗体	别名
11K2//1G9-WT IgG1	CCL2-0049
11K2//1G9-PGLALA	CCL2-0043
CNT0888//11K2-WT IgG1	CCL2-0048
CNT0888//11K2-PGLALA	CCL2-0042
CNT0888//1G9-WT IgG1	CCL2-0051
CNT0888//1G9-PGLALA	CCL2-0045
CNT0888//1A5-WT IgG1	CCL2-0050
CNT0888//1A5-PGLALA	CCL2-0044
1A5//1G9-WT IgG1	CCL2-0052
1A5//1G9-PGLALA	CCL2-0046
11K2//2F6-WT IgG1	CCL2-0056
11K2//2F6-PGLALA	CCL2-0053
ABN912//11K2-WT IgG1	CCL2-0047
ABN912//11K2-PGLALA	CCL2-0041

1A4//2F6-WT IgG1	CCL2-0057
1A4//2F6-PGLALA	CCL2-0054
1A5//2F6-WT IgG1	CCL2-0058
1A5//2F6-PGLALA	CCL2-0055

[0998] 将具有经修饰的VH/VL的双特异性抗体命名为Crossmab(参见W0 2016/016299)。取决于所使用的重链恒定结构域(例如IgG1野生型、PGLALA、SG1095、SG1099、SG1100、GG01、GG02、GG03、GG04、GG02-KG),添加后缀IgG1野生型、PGLALA、SG1095、SG1099、1100、GG01、GG02、GG03、GG04、GG02-KG)

[0999]

双特异性 CCL2 抗体 (和亲代单特 异性)	可变区的名称 (VH/VL)	VH (SEQ ID NO)	VL (SEQ ID NO)	VH (SEQ ID NO)	VL (SEQ ID NO)
人源化 11K2 亲代	11K2 VH/11K2 VL	47	48	-	-
CNT0888 亲代	CNT0888 VH /CNT0888VL			39	40
CKLO01	11K2H1503/11K2L1338// CNT0888H0695/CNT0888 L0616	90	93	71	75
CKLO02	11K2H1510/11K2L1338// CNT0888H0695/CNT0888 L0616	91	93	71	75
CKLO03	11K2H1503/11K2L1201// CNT0888H0695/CNT0888 L0616	90	94	71	75
CKLO04	11K2H1503/11K2L1201// CNT0888H0625/CNT0888 L0616	90	94	72	75
CKLO05	11K2H1503/11K2L1338// CNT0888H0634/CNT0888 L0616	90	93	73	75
CKLO06	11K2H1503/11K2L1201// CNT0888H0634/CNT0888 L0616	90	94	73	75
CKLO07	11K2H1514/11K2L1338// CNT0888H0634/CNT0888 L0616	92	93	73	75
CKLO08	11K2H1510/11K2L1338// CNT0888H0634/CNT0888 L0616	91	93	73	75

[1000]

双特异性 CCL2 抗体 (和亲代单特 异性)	可变区的名称 (VH/VL)	VH (SEQ ID NO)	VL (SEQ ID NO)	VH (SEQ ID NO)	VL (SEQ ID NO)
CKLO09	11K2H1503/11K2L1338// CNT0888H0625/CNT0888 L0616	90	93	72	75
CKLO10	11K2H1514/11K2L1338// CNT0888H0625/CNT0888 L0616	92	93	72	75
CKLO11	11K2H1510/11K2L1338// CNT0888H0625/CNT0888 L0616	91	93	72	75
CKLO12	11K2H1503/11K2L1338// CNT0888H0635/CNT0888 L0616	90	93	74	75
CKLO13	11K2H1503/11K2L1201// CNT0888H0635/CNT0888 L0616	90	94	74	75
CKLO14	11K2H1514/11K2L1338// CNT0888H0635/CNT0888 L0616	92	93	74	75
CKLO15	11K2H1510/11K2L1338// CNT0888H0635/CNT0888 L0616	91	93	74	75
CKLO16	11K2H1514/11K2L1338// CNT0888H0695/CNT0888 L0616	92	93	71	75

[1001] 实例:

[1002] 实例A-1单特异性抗CCL2抗体

[1003] 单特异性抗CCL2抗体和CCL2抗原的生成

[1004] 重组DNA技术

[1005] 使用标准方法来操纵DNA,如在Sambrook,J.等人,Molecular cloning: Alaboratory manual;Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York,1989中所述。根据制造商的说明来使用分子生物学试剂。

[1006] 基因和寡核苷酸合成

[1007] 在Geneart GmbH(Regensburg,Germany)处通过化学合成来制备所需的基因区段。将合成的基因片段克隆到大肠杆菌质粒中进行繁殖/扩增。通过DNA测序来验证亚克隆基因片段的DNA序列。替代性地,通过对化学合成的寡核苷酸进行退火或经由PCR来组装短的合成DNA片段。各个寡核苷酸由metabion GmbH(Planegg-Martinsried,Germany)制备

[1008] 基础/标准哺乳动物表达质粒的描述

[1009] 为了表达所需基因/蛋白质(例如全长抗体重链、全长抗体轻链或CCL-2分子),使用包含以下功能元件的转录单位:

[1010] -来自人巨细胞病毒(P-CMV)的即刻早期增强子和启动子,包括内含子A,

[1011] -人重链免疫球蛋白5'-非翻译区(5'UTR),

[1012] -鼠免疫球蛋白重链信号序列,

[1013] -待表达的基因/蛋白质(例如,全长抗体重链或抗体轻链或CCL-2分子),以及

[1014] -牛生长激素多腺苷酸化序列(BGH pA)。

[1015] 除了包括所希望的待表达基因的表达式单元/盒外,基础/标准哺乳动物表达质粒还包含

[1016] 来自载体pUC18的复制起点,其允许在大肠杆菌中进行该质粒的复制,以及

[1017] β -内酰胺酶基因,其赋予大肠杆菌中的氨苄青霉素抗性。

[1018] 用于重组单克隆抗体和CCL-2分子的表达质粒的生成

[1019] 用于单克隆抗体和CCL-2抗原瞬时表达的表达式质粒除各个表达式盒外还包含来自载体pUC18的复制起点(其允许该质粒在大肠杆菌中复制)和在大肠杆菌中赋予对氨苄青霉素的耐药性的 β -内酰胺酶基因。

[1020] 各个免疫球蛋白HC或LC或CCL-2分子的转录单位包含了以下功能元件:

[1021] -来自人巨细胞病毒(P-CMV)的即刻早期增强子和启动子,包括内含子A,

[1022] -人重链免疫球蛋白5'-非翻译区(5'UTR),

[1023] -鼠免疫球蛋白重链信号序列,以及

[1024] -牛生长激素多腺苷酸化序列(BGH pA)。

[1025] 各个抗体1A4、1A5、1G9、2F6、CNT0888、鼠和人源化11K2、ABN912,基于它们的VH和VL而生成成为IgG1野生型并且生成成为具有 κ 轻链的IgG1PGLALA/效应子沉默Fc

[1026] 瞬时表达和纯化

[1027] 通过在F17培养基(Invitrogen Corp.)中培养的HEK293细胞(人胚胎肾细胞系293衍生)的瞬时转染来执行重组生产。为了生产单克隆抗体,将细胞与含有各个免疫球蛋白重链和轻链的质粒共转染。对于转染,使用“293-Fectin”转染试剂(Invitrogen)。按照制造商的说明进行转染。在转染后三至七(3-7)天收获细胞培养上清液。将上清液储存于降低的温度(例如-80°C)。

[1028] 关于在例如HEK293细胞中的人免疫球蛋白的重组表达的一般信息给出于: Meissner, P.等人, Biotechnol. Bioeng. 75(2001) 197-203。

[1029] 使用MabSelectSure-Sepharose™(GE Healthcare, Sweden)和Superdex200尺寸排阻(GE Healthcare, Sweden)色谱法,通过亲和色谱法从细胞培养上清液中纯化抗体。简而言之,将无菌过滤的细胞培养上清液捕获在用PBS缓冲液(10mM Na₂HPO₄、1mM KH₂PO₄、137mM NaCl和2.7mM KCl, pH 7.4)平衡的MabSelect SuRe树脂上,用平衡缓冲液洗涤并用pH 3.0的25mM柠檬酸钠洗脱。合并经洗脱的蛋白级分,用2M Tris(pH 9.0)中和,并使用用20mM组氨酸、140mM NaCl(pH 6.0)平衡的Superdex 200 26/60 GL(GE Healthcare, Sweden)柱通过尺寸排阻色谱法进一步纯化。尺寸排阻色谱级分通过CE-SDS(Caliper Life Science, USA)来进行分析,并且将含有抗体的级分合并并且储存在-80°C下。

[1030] 重组CCL2的生成

[1031] 野生型CCL2可以作为单体存在,但实际上在生理浓度下也可以形成二聚体。这种单体-二聚体平衡可能是不同的,并且在所有可能使用不同浓度的体外实验中必须仔细考虑。为了避免任何不确定性,我们生成了点突变的CCL2变体:CCL2的P8A变体在二聚化界面上发生突变,导致无法形成二聚体,从而形成定义的、纯的CCL2单体。相反,CCL2的T10C变体导致CCL2的固定二聚体(J Am Chem Soc.2013年3月20日;135(11):4325-32)。

[1032] 使用SP-Sepharose HP (GE Healthcare, Sweden) 和Superdex 200尺寸排阻 (GE Healthcare, Sweden) 色谱法,通过阳离子交换色谱法从细胞培养上清液中纯化各个可溶性CCL2蛋白(野生型、P8A或T10C变体)。简而言之,将无菌过滤的细胞培养上清液用10mM KH₂PO₄ (pH 5.0) 稀释,以调节电导率<4mS/cm。将经稀释的上清液加载至用10mM KH₂PO₄ (pH 5.0) 平衡的SP-Sepharose树脂上,用平衡缓冲液洗涤并使用梯度至10mM KH₂PO₄、1M NaCl (pH 5.0) 进行洗脱。合并经洗脱的蛋白级分,并使用用20mM组氨酸、140mM NaCl (pH 6.0) 平衡的Superdex 200 16/60GL (GE Healthcare, Sweden) 柱通过尺寸排阻色谱法进一步纯化。尺寸排阻色谱级分通过SDS-PAGE和分析型高性能尺寸排阻色谱法来进行分析。将含有CCL2的级分合并并且储存在-80℃下。

[1033] 功能性表征(结合)

[1034] T200仪器安装有Biacore S系列传感器芯片CM5。系统缓冲液为HBS-ET (10mM HEPES (pH 7.4), 150mM NaCl, 1mM EDTA, 0.05% (w/v) P20)。系统设置为37℃。对于每次测量,样品缓冲液为系统缓冲液,另外地补充有1mg/ml CMD (羧基甲基葡聚糖, Fluka)。

[1035] 建立了抗体捕获系统。如制造商所述,通过EDC/NHS偶联,将14000个GARFc γ (山羊抗兔Fc γ), 111-005-046, Jackson ImmunoResearch) 在25℃以25 μ g/ml固定在10mM乙酸钠缓冲液 (pH 5.0) 中。捕获系统通过用HBS缓冲液 (100mM HEPES pH 7.4、1.5M NaCl、0.05% (w/v) Tween 20) 注射15sec、用10mM甘氨酸缓冲液pH 2.0注射1min、然后用10mM甘氨酸缓冲液pH 2.25注射两次(每次持续1min),以20 μ l/min再生。在另一个实施例中,通过将12700RU多克隆兔抗小鼠 (RAMIgG, GE Healthcare) 抗体固定在如上所述的Biacore系列CM5传感器上,在生物传感器上捕获鼠单克隆抗体。通过注射10mM甘氨酸缓冲液 (pH 1.7) 3min,使传感器再生。

[1036] 抗体克隆上清液在系统缓冲液中按1:2稀释,并且以5 μ l/min捕获,持续1min。捕获抗体后,系统由2.5倍浓缩系统缓冲液以80 μ l/min来清洗30sec,然后进行2min基线稳定化。以30 μ l/min执行分析物动力学。使用wt人CCL2或单体CCL2 P8A变体CCL2作为溶液中的分析物。分析物以90nM最高浓度进行注射。分析物接触时间为3min,并且解离时间为10min。根据制造商GEHC的说明来使用Biaevaluation软件V.3.0。应用具有RMAX本地的1:1结合模型以明显估计动力学速率。

[1037] 抗体与野生型(wt)人CCL2和人CCL2 P8A变体(单体)的结合

[1038]

抗体	别名	KD [nM] wt 人 CCL2	T1/2 [min]	KD [nM] 单 体人 CCL2	T1/2 [min]
1A4	CCL2-0008	0.073	100	0.059	174
1A5	CCL2-0009	0.024	160	0.046	137
1G9	CCL2-0010	0.062	177	0.051	218
2F6	CCL2-0014	0.059	52	0.091	47
鼠 11K2	X-0048	0.35	19	0.011	518
人源化 11K2 (=11K2)	CCL2-0002	0.028	118	0.035	116
AB912	CCL2-0003	0.036	33	0.046	25
CNT0888	CCL2-0004	0.026	94	0.054	44

[1039] 从SPR分析中获得的pH依赖性CCL2结合动力学总结I

[1040] T200仪器安装有Biacore S系列传感器芯片CM5。系统缓冲液为HBS-ET (10mM HEPES (pH 7.4), 150mM NaCl, 1mM EDTA, 0.05% (w/v) P20)。在其他实施例中, 系统缓冲液的pH设置为pH 8.3、pH 7.9、pH 7.4、pH 7.1、pH 6.7、pH 6.3、pH 5.9、pH 5.5。系统设置为25℃。对于每次测量, 样品缓冲液为系统缓冲液, 另外地补充有1mg/ml CMD (羧基甲基葡聚糖, Fluka)。

[1041] 建立了抗体捕获系统。如制造商所述, 通过EDC/NHS偶联, 将13000个MAb<h-Fc-pan>M-R10Z8E9-IgG (Roche) 在25℃以18μg/ml固定在10mM乙酸钠缓冲液 (pH 5.0) 中。捕获系统通过用HBS缓冲液 (100mM HEPES pH 7.4、1.5M NaCl、0.05% (w/v) Tween 20) 以20μl/min注射、然后用10mM NaOH注射1min 15sec并且用10mM甘氨酸缓冲液 (pH 2.5) 注射两次 (每次持续1min) 来进行再生。经捕获的抗体以10μl/min注射30sec以80nM浓度稀释在各自的系统缓冲液中。捕获抗体后, 系统由2.5倍浓缩系统缓冲液以50μl/min来清洗30sec, 然后进行2min基线稳定化。浓度依赖性分析物系列以1:3稀释步骤进行注射, 从0nM (缓冲液对照) 0.4nM、1.1nM, 以3.3nM、30nM注射两次。分析物接触时间为3min, 并且解离时间为10min。以50μl/min执行分析物动力学。

[1042] 将人类抗体作为配体而捕获在传感器表面上:

[1043] • 作为阳性对照的人正常IgG (H-N-IgG, Id.: 11717570, Roche)、

[1044] • 抗人CCL2 mAb (人源化11k2: CCL2-0002)、

[1045] • 抗人CCL2 mAb (AB912, CCL2-0003), 以及

[1046] • 抗人CCL2 mAb (CNT0888, CCL2-0004);

[1047] • 作为阴性对照的系统缓冲液。

[1048] 根据制造商GEHC的说明来使用Biaevaluation软件V.3.0。应用具有 R_{MAX} 本地的1:1结合模型以确定动力学速率。

[1049]

	人源化 11K2 CCL2-0002		ABN912 CCL2-0003		CNT0888 CCL2-0004	
pH	KD [nM]	t ½-diss. [min]	KD [nM]	t ½-diss. [min]	KD [nM]	t ½-diss. [min]
8.3	0.003	1155	0.004	35	0.01	135
7.9	0.02	165	0.004	25	0.01	138
7.4	0.02	163	0.01	33	0.02	130
7.1	0.01	215	0.02	20	0.02	124
6.7	0.01	292	0.2	8	0.03	103
6.3	0.003	1155	1	3	0.02	128
5.9	0.01	287	13	1	0.04	61

[1050]

	人源化 11K2 CCL2-0002		ABN912 CCL2-0003		CNT0888 CCL2-0004	
5.5	0.01	118	2000	0.03	0.06	31

[1051] 交叉反应性CCL同源物

[1052] 由于CCL2 (MCP-1) 与CCL7 (MCP-3)、CCL8 (MCP-2)、CCL13 (MCP-4) 具有高度同源性, 并且这些CCL趋化因子能够与CCR2结合, 因此对抗CCL2抗体与这些同源物的结合进行了评估。结果在图1中示出。除了CNT0888之外, 它被描述为对CCL2具有选择性 (Mol Immunol. 2012年6月; 51 (2): 227-33), 经测试的其他抗体与CCL7或CCL8结合 (示出了与CCL7或CCL8的交叉反应性)。

[1053] Biacore测定方法: 抗CCL2抗体与CCL同源物 (例如CCL2 (MCP-1)、CCL8 (MCP-2)、CCL7 (MCP-3) 和CCL13 (MCP-4)) 的结合使用Biacore T200仪器 (GE Healthcare) 在25℃下进行评估。根据由制造商推荐的设置, 使用胺偶联试剂盒 (GE Healthcare) 将小鼠抗人IgG (Fc) (GE Healthcare) 固定在CM4传感器芯片的每个流动池上。将抗体和分析物稀释至ACES pH 7.4缓冲液 (20mM ACES、150mM NaCl、1mg/ml BSA、0.05% Tween 20、0.005% NaN₃) 中。将抗体捕获至抗Fc传感器表面上, 然后将重组人CCL同源物蛋白以5nM和20nM注射在流动池上方。野生型CCL2 (MCP-1)、CCL8 (MCP-2)、CCL7 (MCP-3) 和CCL13 (MCP-4) 可从R&D Systems商购获得, 而单体CCL2 (P8A变体) 为内部生成的抗原。每个周期用3M MgCl₂将传感器表面再

生。结合传感图使用Biacore T200评估软件2.0版(GE Healthcare)来进行处理。

[1054] 功能性表征(生物学)

[1055] CCR2信号传导I-钙通量测定

[1056] THP-1 (人急性单核细胞白血病细胞系;ATCC TIB-202) 细胞在RPMI 1640、10% FBS、1mM丙酮酸钠、10mM HEPES、50 μ M β -巯基乙醇(供应商Thermo Fisher Scientific)中进行培养。在测定当天,在25.8ml测定培养基(RPMI 1640w/o FBS)中将细胞密度调节至 8.33×10^5 个细胞/ml。**FLIPR®**Calcium Assay Kits(FLIPR Calcium 4测定试剂盒,目录号R8142,Molecular Devices)were used for detecting intracellular calcium changes in a homogeneous assay format.

[1057] 根据制造商Molecular Devices的说明,通过将两小瓶组分A与20ml组分B(HBSS缓冲液加20mM HEPES,pH 7.4)混合来制备染料上样溶液。添加516 μ l 1M Hepes(最终测定浓度:10mM),然后添加516 μ l 250mM丙磺舒(最终测定浓度:2.5mM)。对于储备溶液,将65.4mg丙磺舒(Sigma P8761)溶解在465 μ l 1N NaOH中,并且添加465 μ l 1x HBSS(Thermo Fisher Scientific)。将25.8ml上样缓冲液与25.8ml测定培养基混合,其中细胞足以用于例如四个微孔板(需要52.6ml体积; 10^6 个THP-1/ml)。将上样缓冲液中的120 μ l细胞悬浮液转移至黑色F型底96孔细胞培养板的每个孔。将板在室温下孵育3小时至4小时。

[1058] 同时,制备抗体和配体溶液。已经测试了每种抗体的从30 μ g/ml至0.025 μ g/ml的八个浓度(无系列稀释液,孔中的最终浓度)。每个浓度在两个板上进行测试。所有稀释液均在测定培养基中制备为10倍浓缩溶液。使用人CCL2/JE/MCP-1抗体(R&D Systems目录号MAB279)作为参考抗体。通过将50 μ g CCL2冻干物溶解在500 μ l RPMI 1640(100 μ g/ml)中并且将400 μ l转移至10ml测定培养基(4 μ g/ml储备溶液)中来制备配体CCL2(R&D Systems目录号279-MC-10)。使用离子霉素(Sigma目录号I-0634)作为刺激对照(1mg离子霉素溶解在1340 μ l DMSO(Sigma目录号D-8779)中,1mM)。将10 μ l 1mM储备溶液稀释在1990 μ l测定培养基中(5 μ M,最终测定浓度500nM)。将100 μ l移液至聚丙烯MTP的相应对照孔中。

[1059] 将抗体稀释液和CCL2在两个V形聚丙烯96孔板中预孵育。将50 μ l 4 μ g/ml储备溶液CCL2(最终400ng/ml CCL2)和50 μ l 10倍浓缩抗体稀释液移液至孔中。将板在室温下孵育30min至60min。

[1060] 孵育后,将细胞板和化合物板直接转移至**FlexStation®3**(Molecular Devices)读取位置,并且如系统手册所述执行钙测定(激发485nm,发射525nm)。以若干秒的间隔完成读出。

[1061] 结果:

[1062] 表1:40ng/ml PMA和4 μ M离子霉素用作阳性对照。该表包括n=2的EC₅₀平均值。

[1063]

抗 CCL2 抗体		CCR2 信号传导的抑制	
抗体	别名	EC50 [$\mu\text{g/ml}$]	EC50 [nM]
1A4	CCL2-0008	4.2	28.0
1A5	CCL2-0009	2.2	14.6
1G9	CCL2-0010	2.4	16
2F6	CCL2-0014	8.7	3.9
Mab279 (R&D)	商业参考	2.6	17.4
鼠 11K2 (11K2m)	X-0048	4.5	30.0
人源化 11K2 (11K2)	CCL2-0002	2.1	14.0
AB912	CCL2-0003	1.9	12.7
CNT0888	CCL2-0004	2.7	18

[1064] 抗CCL2抗体抑制在单核细胞上表达的CCL2诱导的CCR2受体内化的效能

[1065] 为了防止在骨髓细胞上的配体诱导的CCR2内化,我们设置了体外测定并且表征了抗CCL2抗体。使用商业试剂盒 (Stemcell, 目录号15068) 通过磁选来将单核细胞从健康供体的外周血中分离。为了阻断Fc γ R, 在FACS缓冲液 (PBS+0.2% BSA) 中将单核细胞与500 $\mu\text{g/ml}$ 的最终浓度下的正常人IgG (Privigen, CSL Behring) 在冰上预孵育50min。然后将细胞离心10min (300xg, 4 $^{\circ}\text{C}$), 用FACS缓冲液再洗涤一次并且储存在冰上。抗CCL2抗体稀释液 (每个50 μl) 在96个U型底孔 (BD) 中进行制备 (以并行方法在4 $^{\circ}\text{C}$ 和37 $^{\circ}\text{C}$ 下)。将单核细胞分裂, 重悬于培养基 (RPMI 1640; 10% FCS; 2mM L-谷氨酰胺) 中, 并分别在4 $^{\circ}\text{C}$ 和37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育, 直至进一步使用。在4 $^{\circ}\text{C}$ 和37 $^{\circ}\text{C}$ 两者下将重组CCL2 (50 μl ; 在100ng/ml的最终浓度下) 添加至所制备的抗体稀释液 (在不同浓度下) 中。将100 μl 单核细胞悬浮液 (2×10^5 个细胞/孔) 添加至总体积为200 μl 的CCL2/抗CCL2混合物中, 并且将细胞在4 $^{\circ}\text{C}$ 和37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育1h 30min, 然后在300xg、4 $^{\circ}\text{C}$ 下进行离心。从现在起, 所有步骤均用预冷却的缓冲液进行: 细胞用250 μl FACS缓冲液进行洗涤, 并且另外地, 针对CCR2受体将细胞染色 (根据标准FACS方案, 使用商业CCR2-APC缀合物或适当的同种型ctrl-APC: 等分试样用具有以下项的5 $\mu\text{l}/10^6$ 个细胞进行染色: CD192 (CCR2) APC (BioLegend, #357208, 克隆K036C2/mIgG2ak) 以及适当的同种型ctrl抗体: 20 $\mu\text{l}/10^6$ 个细胞mIgG2a k APC BD Biosciences, #400222, 克隆MOPC-173)。

[1066] 然后, 受体表达在FACS Canto II上进行分析, 并且将CCR2内化如下计算:

[1067] • 无内化: 在不存在配体 (新鲜CCL2) 孵育的情况下所分析的细胞。

[1068] • 100%内化: 先前与新鲜CCL2一起孵育的细胞上的经最大限度减少的CCR2表达水平

[1069]

抗 CCL2 抗体		CCR2 内化的抑制	
抗体	别名	EC50 [$\mu\text{g/ml}$]	EC50 [nM]
1A4	CCL2-0008	2.52	16.81
1A5	CCL2-0009	2.37	15.77
1G9	CCL2-0010	2.16	14.42
2F6	CCL2-0014	2.41	1.09
11K2 (鼠)	X-0048	1.98	13.19
AB912	CCL2-0003	1.99	13.25
CNT0888	CCL2-0004	2.00	13.36
Mab279 (R&D)	商业参考	1.98	13.22

[1070] 人THP-1细胞上的CCL2介导的趋化性的抑制

[1071] 如下测试了朝向CCL2梯度的CCR2⁺THP1细胞的迁移。单核细胞THP1细胞(ATCC® TIB-202™)在RPMI 1640培养基(PAN, 目录号P04-17500)中进行培养, 该培养基补充有FCS和L-谷氨酰胺。在用于迁移测定之前, 细胞通常传代两次至三次, 并且然后在FCS含量减少(1.5%而不是10% FCS)的培养基中饥饿过夜。对细胞进行计数并且与10 $\mu\text{g/ml}$ 正常人IgG(Invitrogen, 目录号12000; 用以阻断FcγR)在室温下一起孵育15分钟。

[1072] 同时, 将抗CCL2抗体(和/或对照)添加至HTS Transwell 96孔板系统(Corning, 目录号3386, 3 μm 孔径)的下室中, 该系统含有具有25ng/ml rhCCL-2的无血清培养基(R&D Systems, 目录号#279-MC)。然后将插入板插入下室板中, 并且将75 μl (1.5 $\times 10^5$ 个细胞) 上述细胞悬浮液(包含IgG块)在含有或不含5 $\mu\text{g/ml}$ 抗体/同种型的情况下添加至每种插入物中。将板覆盖, 并且在CO2孵育箱(5% CO2)中于37℃下孵育过夜。

[1073] 将插入板去除, 并且将Cell-titer-glo底物(Promega, 目录号G758)添至到下室板的每个孔中, 以测量经迁移的细胞的活力。在摇床上以300rpm(密封盖板)孵育1小时后, 将每孔200 μl 转移至Microfluor黑色96孔板(VWR, 目录号735-0527)并对发光进行测量(发光读取器, 例如Bio-Tek, Tecan)。将倍数变化计算为具有IgG对照抗体和抗CCL2抗体的经迁移的细胞数(Cell Titer Glo, RLU)之间的比率。在下表2中示出了每个条件5次至10次重复的结果:

[1074] 表2

[1075]

抗体	别名	THP1 趋化性 [与 IgG 对照相比的倍数变化]
1A4	CCL2-0008	4.5
1A5	CCL2-0009	3.6
1G9	CCL2-0010	0.9
2F6	CCL2-0014	6.7
Mab279 (R&D)	-	3.7
鼠 11K2 (11K2m)	X-0048	6.9
人源化 11K2 (11K2)	CCL2-0002	7.2
ABN912	CCL2-0003	6.5
CNT0888	CCL2-0004	4.9

[1076] 对在小鼠中用单特异性(单原位旁)抗CCL2抗体进行人CCL2免疫复合物扫集的评价

[1077] 为了评估单原位旁抗体与野生型人CCL2形成免疫复合物的能力,将由抗CCL2单原位旁抗体 (20mg/kg) 和野生型人CCL2 (0.1mg/kg) 组成的预形成的免疫复合物以10ml/kg的单剂量施用至人FcRn转基因小鼠的尾静脉中 (B6.Cg-Fcgrt^{tm1Dcr}Tg (FCGRT) 32Dcr/DcrJ, Jackson Laboratory)。施用后5分钟、7小时、1天、2天、3天和7天收集血液。血清通过立即将血液在4℃下以14,000rpm离心10分钟来进行制备。将血清储存在-80℃处或以下,直至进行测量。经测试的单原位旁抗体在下表3中列出。具有SG1 Fc的抗体具有与野生型类似的Fc γ 受体结合,而具有SG105 Fc的抗体为Fc γ 受体结合沉默。

[1078] 通过比较具有Fc γ 受体结合的抗CCL2抗体 (SG1, =具有完整Fc γ 受体结合的IgG1野生型;实线) 和具有Fc γ 受体结合沉默的抗CCL2抗体 (SG105, =不具有Fc γ 受体结合的IgG1;虚线), 评估每种抗CCL2单原位旁抗体的免疫复合物扫集对体内hCCL2清除率的影响, 如图2所示。各自的图2a至图2g示出了将由hCCL2和各自的抗CCL2抗体 (具有两个不同的Fc部分:SG1=具有完整Fc γ 受体结合的IgG1野生型,以及SG105=不具有Fc γ 受体结合的IgG1) 组成的预形成的免疫复合物注入FcRn转基因小鼠中后,hCCL2的血清浓度随时间推移的变化。使用Phoenix 64 (Pharsight/Certara),通过非房室分析来对抗体谱进行分析。AUCinf通过外推至无穷大的线性对数梯形法则来进行估计。清除率值定义为剂量/AUCinf。该清除率差异也表达为倍数变化,该倍数变化通过将具有Fc γ 受体结合的抗体 (SG1) 的hCCL2清除率除以具有Fc γ 受体结合沉默的抗体 (SG105) 的hCCL2清除率来进行计算(下表3)。下表3中的数据指示,对于所有经测试的单原位旁抗体,Fc γ 受体结合抗体 (SG1=具有完整Fc γ 受体结合的IgG1野生型) 对人CCL2的清除率与Fc γ 受体结合沉默抗体 (SG105,不具有Fc γ 受体结合) 对人CCL2的清除率类似。这表明由经测试的单原位旁抗体进行的免疫复合物介导的CCL2扫集并不高效。

[1079] 表3:施用抗CCL2单特异性抗体 (20mg/kg) 和野生型人CCL2 (0.1mg/kg) 的预形成的免疫复合物后,野生型CCL2的清除率值 (IgG1野生型 (SG1) 或IgG1 Fc受体沉默 (SG105))

[1080]		清除率 (ml/天/kg)	倍数变化 (野生型 IgG1 (SG1) 与 Fc 受体沉默 IgG1 (SG105))
	CNT0888-SG1	14.05	1.60
	CNT0888-SG105	8.80	
	11K2-SG1	80.60	1.69
	11K2-SG105	47.83	
[1081]	ABN912-SG1	67.06	0.99
	ABN912-SG105	67.84	
	1A4-SG1	38.93	1.66
	1A4-SG105	23.39	
	1A5-SG1	20.08	0.95
	1A5-SG105	21.14	
	1G9-SG1	14.02	0.87
	1G9-SG105	16.07	
	2F6-SG1	21.49	1.03
	2F6-SG105	20.94	

[1082] 通过电化学发光(ECL)来测量血清中的总人CCL2浓度

[1083] 通过ECL测量小鼠血清中的总人CCL2浓度。将3ug/mL抗CCL2抗体(F7(Biolegend)或克隆MAB679(R&D Systems))固定在MULTI-ARRAY 96孔板(Meso Scale Discovery)上过夜,然后在封闭缓冲液中于30℃下孵育2小时。抗CCL2 MAB679用作捕获抗体,其用于含有人源化11K2、1A4或1A5抗体的样品。抗CCL2克隆5D3-F7用于含有ABN912、CNT0888、1G9、2F6H抗体的样品。人CCL2校准曲线样品、质量控制样品和小鼠血清样品通过在稀释缓冲液中稀释并与过量药物在37℃下一起孵育30分钟来进行制备。之后,将样品添加至抗CCL2固定板上,并且允许其在30℃下结合1小时,然后洗涤。接下来,添加SULFO TAG NHS-酯(Meso Scale Discovery)标记的抗人Fc(克隆:JDC-10,SouthernBiotech)并且将板在30℃下孵育1小时,然后洗涤。立即将Read Buffer T(x4)(Meso Scale Discovery)添加至板,并且信号通过SECTOR Imager 2400(Meso Scale Discovery)来进行检测。使用分析软件SOFTmax PRO(Molecular Devices)基于校准曲线的响应计算人CCL2浓度。

[1084] 通过酶联免疫吸附测定(ELISA)来测量血清中的抗CCL2抗体浓度

[1085] 通过ELISA来测量小鼠血清中的抗CCL2抗体浓度。将抗人IgGκ链(Antibody Solutions)分配至Nunc MaxiSorp板(Thermofisher)上,并且允许其在4℃下静置过夜以制备抗人IgG固定板。校准曲线和样品用1%混合小鼠血清进行制备。然后,将样品分配至抗人IgG固定板上,并且允许其在30℃下静置1小时。随后,添加具有HRP缀合物的山羊抗人IgG(γ链特异性)(Southern Biotech)以在30℃下反应1小时。使用TMB底物(Life Technologies)作为底物来执行显色反应。用1N硫酸(Wako)停止反应后,450nm处的吸光度

由酶标仪来进行测量。使用分析软件SOFTmax PRO (Molecular Devices), 由校准曲线的吸光度来计算小鼠血浆中的浓度。

[1086] 对在小鼠中用单原位旁抗体进行内源性小鼠CCL2免疫复合物扫集的评估

[1087] 除了上述结果 (这表明由经测试的单原位旁抗体进行的免疫复合物介导的CCL2扫集并不高效) 之外, 还进行了进一步的评估。

[1088] 为了评估单原位旁抗体与内源性小鼠CCL2形成和清除免疫复合物的能力, 向小鼠施用小鼠交叉反应性11K2抗CCL2单原位旁抗体。将人源化11K2H2-SG1 (IgG1野生型=Fc γ 受体结合) 或人源化11K2-SG105 (Fc γ 受体结合沉默) 抗体以20mg/kg的单剂量以10ml/kg的单剂量静脉内施用于Ba1b/c小鼠的尾静脉中。施用前、施用后5分钟、7小时、1天、2天、3天和7天收集血液。血清通过立即将血液在4℃下以14,000rpm离心10分钟来进行制备。将血清储存在-80℃处或以下, 直至进行测量。

[1089] 图3示出了小鼠中的血清总小鼠CCL2浓度的时间过程以及人源化11K2-SG1和11K2-SG105的抗体-时间曲线。

[1090] 如图3所示, 11K2-SG105 (Fc γ 受体结合沉默Fc) 与11K2-SG1 (IgG1野生型=Fc γ 受体结合Fc) 之间的累积小鼠CCL2水平没有差异。这指示由经注射的抗体进行的内源性小鼠CCL2的Fc γ 受体介导的清除率没有或很少。由于经由Fc γ 受体的多聚体接合, 免疫复合物中的抗原比未复合的抗原被更迅速地清除, 因此这表明11K2抗体不能够与内源性小鼠CCL2形成免疫复合物。

[1091] 通过酶联免疫吸附测定 (ELISA) 来测量小鼠血清中的小鼠CCL2浓度

[1092] 小鼠血清中的小鼠CCL2浓度通过采用来自可商购获得的小鼠CCL2ELISA试剂盒 (R&D Systems) 中的试剂来进行测量。除校准曲线样品的制备外, 均按照制造商的方案。经纯化的重组小鼠CCL2代替制造商的蛋白质作为标准品。对于注射抗体之后采集的样品, 校准曲线样品和样品通过将2.5%小鼠血清注射抗体以40微克/ml的浓度掺入来进行制备, 并且在37℃下孵育30分钟。随后, 将样品分配至抗人CCL2固定板上, 并且在30℃下孵育2小时。通过添加小鼠MCP-1缀合物并在30℃下孵育2小时, 然后添加底物和停止溶液来进行检测。

[1093] 对于注射抗体之前采集的样品, 根据制造商的说明来使用小鼠MCP-1超敏试剂盒 (Meso Scale Discovery)。在添加至板之前, 未将抗体掺入样品中。

[1094] 通过酶联免疫吸附测定 (ELISA) 来测量血清中的抗CCL2抗体浓度

[1095] 通过ELISA来测量小鼠血清中的抗CCL2抗体浓度。将抗人IgG κ 链 (Antibody Solutions) 分配至Nunc MaxiSorp板 (Thermofisher) 上, 并且允许其在4℃下静置过夜以制备抗人IgG固定板。校准曲线和样品用1%混合小鼠血清进行制备。然后, 将样品分配至抗人IgG固定板上, 并且允许其在室温下静置1小时。随后, 添加小鼠抗人IgG HRP (克隆JDC-10, Southern Biotech), 以在室温下反应30分钟。使用ABTS底物 (KPL) 作为底物来执行显色反应, 并且405nm处的吸光度由酶标仪来进行测量。使用分析软件SOFTmax PRO (Molecular Devices), 由校准曲线的吸光度来计算小鼠血浆中的浓度

[1096] 对单特异性 (单原位旁) 抗CCL2抗体进行的不同小鼠PK研究的结论

[1097] 总结小鼠PK研究的结果, 经测试的单原位旁抗体均未示出从循环中高效清除CCL2。这些数据表明, 单原位旁抗体不能够与CCL2形成免疫复合物以高效地将其从循环中清除。

[1098] 相反,如下所述,具有两个不同的抗原结合部分/位点的双特异性抗CCL2抗体(双原位旁抗CCL2抗体)能够高效地与CCL2形成免疫复合物并且将其从循环中清除。

[1099] 实例B-1

[1100] 双特异性(双原位旁)抗CCL2抗体

[1101] 生成了若干双特异性抗CCL2抗体,其具有与人CCL2上的两个不同特异性表位结合的两个不同的抗原结合部分(互补位)

[1102] 介绍

[1103] 为了测试抗原的单一结合或交联是否对体内CCL2清除具有显著影响,我们使用双特异性CrossMab技术而生成了双特异性抗CCL2抗体,该抗体具有与CCL2上的2个不同表位结合的2个不同的抗原结合部分/位点(参见例如,WO 2009/080252、WO 2015/150447)、WO 2009/080253、WO 2009/080251、WO 2016/016299,Schaefer等人,PNAS,108(2011)1187-1191,以及Klein等人,MAbs 8(2016)1010-20)(双特异性(=双原位旁)CrossMab)。首先在体外对这些分子的生化特性和功能特性进行了表征,但它们也可以用于小鼠共注射研究中体内CCL2清除率评估的工具。为了评估基于Fc γ 受体(Fc γ R)结合介导的扫集的清除率可能性(例如在Ikawa等人,Immunological Reviews270(2016)132-151,WO2012/122011和WO2016/098357和WO2013/081143中),我们将所有Crossmab生成为野生型huIgG1,其与Fc γ R结合并具有经修饰的人IgG1恒定链,该恒定链具有经减少/消除的与Fc γ R效应子沉默分子的结合(例如具有突变L234A、L235A、P329G(Kabat EU编号)的IgG1)。

[1104] 合适的抗CCL2抗体对的识别-通过夹心ELISA来选择双原位旁抗体臂。

[1105] 执行夹心ELISA,以识别不会竞争与人CCL2结合的抗体对。384孔MAXISORP(NUNC)板用1 μ g/mL的7种所指示的捕获抗体(臂1)包被,并且用2% BSA封闭。将生物素化的(NHS-PEO₄-生物素,Pierce)WT人CCL2(20ng/mL)与过量的1 μ g/mL下的相同7种抗体(臂2)或封闭缓冲液在37摄氏度下一起孵育1小时。孵育后,将混合物添加至经封闭的ELISA板并在室温下孵育1小时。板结合的CCL2使用链霉亲和素HRP,然后使用TMB One Component底物(Lifetech)来进行检测。通过1N HCl酸(Wako)来停止信号发展。对于每个捕获抗体,不具有竞争抗体的孔的O.D.被设置为100%信号。将未添加CCL2的空白孔的O.D.设置为0%信号。选择在两个方向上对CCL2结合未示出强烈竞争的九个抗体对,作为用于生成双特异性Crossmab抗体的候选物。

		抗体臂 2						
		ABN912	CNT0888	11K2	1A4	1A5	1G9	2F6
[1106]	抗体臂 1	ABN912		选择		选择		
		CNT0888		选择			选择	
		11K2					选择	选择
		1A4						选择
		1A5					选择	选择
		1G9						
		2F6						

[1107] 双原位旁抗CCL2抗体和免疫复合物的生成和表征

[1108] 以双特异性CrossMab形式重组DNA技术生成双原位旁抗CCL2抗体

[1109] 使用标准方法来操纵DNA,如在Sambrook,J.等人,Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989中所述。根据制造商的说明来使用分子生物学试剂。

[1110] 基因和寡核苷酸合成

[1111] 在Genearth GmbH(Regensburg, Germany)处通过化学合成来制备所需的基因区段。将合成的基因片段克隆到大肠杆菌质粒中进行繁殖/扩增。通过DNA测序来验证亚克隆基因片段的DNA序列。替代性地,通过对化学合成的寡核苷酸进行退火或经由PCR来组装短的合成DNA片段。各个寡核苷酸由metabion GmbH(Planegg-Martinsried, Germany)制备

[1112] 基础/标准哺乳动物表达质粒的描述

[1113] 为了表达所需基因/蛋白质(例如,抗体重链或抗体轻链),使用包含以下功能元件的转录单位:

[1114] • 来自人类巨细胞病毒(P-CMV)的即刻早期增强子和启动子,包括内含子A,

[1115] • 人重链免疫球蛋白5'-非翻译区(5'UTR),

[1116] • 鼠免疫球蛋白重链信号序列,

[1117] • 待表达的基因/蛋白质(例如,全长抗体重链或MHC I类分子),以及

[1118] • 牛生长激素多腺苷酸化序列(BGH pA)。

[1119] • 除了包括所希望的待表达基因的表达式单元/盒外,基础/标准哺乳动物表达质粒还包含

[1120] • 来自载体pUC18的复制起点,其允许在大肠杆菌中进行该质粒的复制,以及

[1121] • β -内酰胺酶基因,其赋予大肠杆菌中的氨苄青霉素抗性。

[1122] 用于重组单克隆抗体的表达质粒的生成

[1123] 重组单克隆抗体基因编码各个免疫球蛋白重链和轻链。

[1124] 用于瞬时表达单克隆抗体分子的表达质粒除免疫球蛋白重链或轻链表达式单元外还包含来自载体pUC18的复制起点(其允许该质粒在大肠杆菌中复制)和在大肠杆菌中赋予对氨苄青霉素的耐药性的 β -内酰胺酶基因。

[1125] 各个抗体重链或轻链的转录单位包含了以下功能元件:

[1126] • 来自人类巨细胞病毒(P-CMV)的即刻早期增强子和启动子,包括内含子A,

[1127] • 人重链免疫球蛋白5'-非翻译区(5'UTR),

[1128] • 鼠免疫球蛋白重链信号序列,

[1129] • 各个抗体重链或轻链cDNA序列,以及

[1130] • 牛生长激素多腺苷酸化序列(BGH pA)。

[1131] 瞬时表达和分析表征

[1132] 通过在F17培养基(Invitrogen Corp.)中培养的HEK293细胞(人胚胎肾细胞系293衍生)的瞬时转染来执行重组生产。为了生产单克隆抗体,将细胞与含有各个免疫球蛋白重链和轻链的质粒共转染。对于转染,使用“293-Fectin”转染试剂(Invitrogen)。按照制造商的说明进行转染。在转染后三至七(3-7)天收获细胞培养上清液。将上清液储存于降低的温度(例如-80°C)。

[1133] 关于在例如HEK293细胞中的人免疫球蛋白的重组表达的一般信息给出于：Meissner, P. 等人, Biotechnol. Bioeng. 75 (2001) 197-203。为了生成以下双特异性抗体, 在CH3/CH3界面中将W0 2016/016299中描述的CrossMab技术(其中在一个抗体臂中交换了VH/VL, 并且已经通过电荷修饰对另一抗体臂的CH1/CL界面进行了修饰)与杵臼结构技术结合使用, 以促进异源二聚化。对于CNT0888//11K2-WT IgG1, 给出了其中应用了该技术的所有四个抗体链的示例性序列(参见SEQ ID NO:104至SEQ ID NO:107)

[1134] 具有野生型IgG1(WT IgG1)的所生成的双特异性(双原位旁)抗CCL2Crossmab抗体的列表(野生型IgG1意指不含影响Fc受体结合的修饰/突变, 然而异源二聚化技术(如杵臼结构)被包含在其中)

[1135]	<u>双特异性抗体</u> <u>IgG1</u>	<u>别名 1</u>	<u>别名 2</u>	<u>第一个抗原</u> <u>结合位点</u> VH/VL_交叉	<u>第二抗原</u> <u>结合位点</u> VH/VL 正 常结构(非 交叉)
	ABN912//11K2-WT IgG1	CCL2-0047	P1AA3447	人源化 11K2	ABN912
	CNT0888//11K2-WT IgG1	CCL2-0048	P1AA3429	人源化 11K2	CNT0888
	11K2//1G9-WT IgG1	CCL2-0049	P1AA3461	人源化 11K2	1G9
	11K2//2F6-WT IgG1	CCL2-0056	P1AA3392	人源化 11K2	2F6
	CNT0888//1A5-WT IgG1	CCL2-0050	P1AA3419	CNT0888	1A5
	CNT0888//1G9-WT IgG1	CCL2-0051	P1AA3439	CNT0888	1G9
	1A4//2F6-WT IgG1	CCL2-0057	P1AA3400	1A4	2F6
	1A5//2F6-WT IgG1	CCL2-0058	P1AA3427	1A5	2F6
	1A5//1G9-WT IgG1	CCL2-0052	P1AA3446	1A5	1G9

[1136] 具有IgG1的双特异性(双原位旁)抗CCL2 Crossmab抗体的列表, 该抗体包含Fc γ 受体沉默突变L234A、L235A、P329G(Kabat EU编号)(IgG1-PGLALA)

[1137]	<u>双特异性抗体</u> <u>IgG1 PGLALA</u>	<u>别名 1</u>	<u>别名 2</u>	<u>第一个抗原</u> <u>结合位点</u> VH/VL_交叉	<u>第二抗原</u> <u>结合位点</u> VH/VL 正 常结构(非 交叉)
	ABN912//11K2-PGLALA	CCL2-0041	P1AA3411	人源化 11K2	ABN912
	CNT0888//11K2-PGLALA	CCL2-0042	P1AA3452	人源化 11K2	CNT0888

[1138]	<u>双特异性抗体</u> <u>IgG1 PGLALA</u>	<u>别名 1</u>	<u>别名 2</u>	<u>第一个抗原</u> <u>结合位点</u> VH/VL_交叉	<u>第二抗原</u> <u>结合位点</u> VH/VL 正 常结构(非 交叉)
	11K2//1G9-PGLALA	CCL2-0043	P1AA3463	人源化 11K2	1G9
	11K2//2F6-PGLALA	CCL2-0053	P1AA3450	人源化 11K2	2F6
	CNT0888//1A5-PGLALA	CCL2-0044	P1AA3448	CNT0888	1A5
	CNT0888//1G9-PGLALA	CCL2-0045	P1AA3455	CNT0888	1G9
	1A4//2F6-PGLALA	CCL2-0054	P1AA3459	1A4	2F6
	1A5//2F6-PGLALA	CCL2-0055	P1AA3402	1A5	2F6
	1A5//1G9-PGLALA	CCL2-0046	P1AA3444	1A5	1G9

[1139] 双原位旁抗CCL2抗体的纯化

[1140] 含有细胞培养上清液的双原位旁抗CCL2抗体通过至多三个色谱步骤来进行过滤和纯化。取决于捕获步骤洗脱液的纯度,任选地在捕获与精制步骤之间实施了离子交换色谱步骤。

[1141] 使用MabSelectSure-Sepharose™ (GE Healthcare, Sweden)、POROS 50HS (ThermoFisher Scientific) 和Superdex 200尺寸排阻 (GE Healthcare, Sweden) 色谱法,通过亲和色谱法从细胞培养上清液中纯化双原位旁抗CCL2抗体。简而言之,将无菌过滤的细胞培养上清液捕获在用PBS缓冲液 (10mM Na₂HPO₄、1mM KH₂PO₄、137mM NaCl和2.7mM KCl, pH 7.4) 平衡的MabSelect SuRe树脂上,用平衡缓冲液洗涤并用pH 3.0的25mM柠檬酸钠洗脱。将洗脱的蛋白级分合并,并用2M Tris (pH 9.0) 中和。

[1142] 用POROS 50HS (ThermoFisher Scientific) 执行离子交换色谱法作为任选的第二纯化步骤,用20mM组氨酸 (pH 5.6) 进行平衡和洗涤,并且加载经稀释的捕获步骤洗脱液,用20mM组氨酸、0.5M NaCl在pH 5.6完成梯度色谱法,离子交换色谱级分通过CE-SDS LabChip GX II (PerkinElmer) 来进行分析,并且合并含有Crossmab的级分。

[1143] Superdex 200 (GE Healthcare) 上的尺寸排阻色谱法用作第二或第三纯化步骤。尺寸排阻层析在20mM组氨酸缓冲液、0.14M NaCl、pH 6.0中进行。尺寸排阻色谱级分通过CE-SDS LabChip GX II (PerkinElmer) 来进行分析,并且将含有Crossmab的级分合并并且储存在-80℃。

[1144] 在Superdex 200 (GE Healthcare) 上的POROS 50HS (ThermoFisher Scientific) 尺寸排阻色谱法被20mM组氨酸缓冲液、0.14M NaCl (pH 6.0) 中的HiPrep 26/10Desalting (GE Healthcare) 上的脱盐色谱法替换后,产品质量令人满意的情况下。

[1145] 使用基于氨基酸序列计算的摩尔消光系数,通过测量280nm处的光密度 (OD) 来确定抗体制剂的蛋白质浓度。

[1146] 使用具有Protein Express芯片和HT Protein Express Reagents试剂盒的LabChip GX II (PerkinElmer),通过CE-SDS来分析抗体的纯度和完整性。抗体制剂的聚集体含量使用Biosuite高分辨率SEC、250 Å、5μm分析尺寸排阻柱 (Waters GmbH),使用200mM

K₂HPO₄/KH₂PO₄、250mM KCl (pH 7.0) 作为运行缓冲液,通过高性能SEC来进行确定。如通过CE-SDS所分析,平均纯度在94%至100%之间,并且单体含量>95% (SEC)。

[1147] 双特异性(双原位旁)抗CCL2抗体的功能性表征

[1148] 亲和力和测量(结合)

[1149] 在pH 5.0,通过使用GE Healthcare提供的胺偶联试剂盒将大约1200个共振单位(RU)的捕获系统(20μg/ml山羊抗人IgG Fc;产品编码:109-005-098;Jackson Immuno Research)偶联在C1芯片(GE Healthcare BR-1005-35)上。样品和系统缓冲液是PBS-T(10mM磷酸盐缓冲盐水,其包括0.05% Tween20)pH 7.4。流动池设置为25℃,而样品块设置为12℃,并且用运行缓冲液灌注两次。通过以10μl/min的流速注射2μg/ml溶液持续60sec来捕获双特异性抗体。通过以30μl/min的流速注射以1:10稀释度从30nM开始的各种浓度的溶液中的人CCL2(wt)持续150sec来测量缔合。监测解离阶段长达1200sec,并通过从样品溶液切换到运行缓冲液来触发。通过用0.85% H₃PO₄溶液以10μl/min的流速洗涤60sec使表面再生。通过减去从山羊抗人IgG Fc表面获得的应答来校正大折射率偏差。还减去空白注射(=双重参照)。为了计算动力学参数,使用了Langmuir 1:1模型。

[1150]

单特异性和双特异性抗 CCL2 抗体	别名	t 1/2* (min)	配体水平 (RU)	Rmax (RU)
人源化 11K2 (=11K2)	CCL2-0002	无解离	293.5	39.3
ABN912	CCL2-0003	27	307.0	33.6
CNT0888	CCL2-0004	无解离	272.8	31.9
ABN912//11K2-PGLALA	CCL2-0041	无解离	212.2	21.1
CNT0888//11K2-PGLALA	CCL2-0042	无解离	211.8	22.0
11K2//1G9-PGLALA	CCL2-0043	无解离	204.9	21.2
CNT0888//1A5-PGLALA	CCL2-0044	无解离	207.3	20.0
CNT0888//1G9-PGLALA	CCL2-0045	无解离	213.0	19.0
1A5//1G9-PGLALA	CCL2-0046	无解离	203.1	20.0
ABN912//11K2-WT IgG1	CCL2-0047	无解离	209.3	20.2
CNT0888//11K2-WT IgG1	CCL2-0048	无解离	226.1	22.9
11K2//1G9-WT IgG1	CCL2-0049	无解离	206.1	21.1
CNT0888//1A5-WT IgG1	CCL2-0050	无解离	214.4	20.3
CNT0888//1G9-WT IgG1	CCL2-0051	无解离	215.8	20.7
1A5//1G9-WT IgG1	CCL2-0052	无解离	211.7	21.0
11K2//2F6-PGLALA	CCL2-0053	无解离	201.9	19.8
1A4//2F6-PGLALA	CCL2-0054	无解离	194.7	18.8
1A5//2F6-PGLALA	CCL2-0055	无解离	203.5	20.1
11K2//2F6-WT IgG1	CCL2-0056	无解离	205.3	20.2
1A4//2F6-WT IgG1	CCL2-0057	无解离	199.0	19.5
1A5//2F6-WT IgG1	CCL2-0058	无解离	202.8	19.8

[1151] 在野生型抗原的存在下的天然免疫复合物形成。

[1152] 使用透析或离心超滤装置,将所有蛋白质样品(双特异性抗CCL2 CrossMab抗体和抗原)重新缓冲在1x PBS(pH 7.4)中。

[1153] 制备了2.0mg/mL至0.1mg/mL的CrossMab样品的稀释系列。同样,制备浓度范围为0.012mg/mL至0.23mg/mL的抗原在PBS中的溶液。选择浓度以允许等体积的混合,以实现1:1的恒定摩尔比(抗体:CCL2复合物)。在本研究中使用了以下抗原:野生型CCL2。

[1154] 将等体积的预稀释CrossMab和CCL2制剂混合并且在37°C下孵育1小时,然后将样品施加在Superose6(GE Healthcare#2039)柱上,用PBS预平衡并且以0.5mL/min的流速洗脱。总共施加了100μg或250μL的最大可能体积,并且仅使用抗体和抗原作为对照。

[1155] SEC-MALLS数据用OptiLab rEX折射率检测器并且用miniDAWN Treos MALLS检测器(两者均来自Wyatt inc.)进行记录。SEC-MALLS信号使用Astra V5软件(Wyatt)来进行处理。

[1156]	双特异性抗 CCL2 抗体	别名	与 CCL2wt (低浓度) 的相互作用
	ABN912//11K2-WT IgG1	CCL2-0047	+
	CNT0888//11K2-WT IgG1	CCL2-0048	+++
	11K2//1G9-WT IgG1	CCL2-0049	++
	CNT0888//1A5-WT IgG1	CCL2-0050	+
	CNT0888//1G9-WT IgG1	CCL2-0051	+
	1A5//1G9-WT IgG1	CCL2-0052	++
	11K2//2F6-WT IgG1	CCL2-0056	++
	1A4//2F6-WT IgG1	CCL2-0057	+
	1A5//2F6-WT IgG1	CCL2-0058	+

[1157] 图例

[1158] +++大量的多聚物/低聚物

[1159] ++中等量的多聚物/低聚物

[1160] +较低量的多聚物/低聚物

[1161] 0仅二聚体或更少

[1162] 用以研究抗CCL2抗体的中和特征的CCR2报告基因测定

[1163] TangoTMCCR2-bla U2OS细胞购自Invitrogen,Germany,用以研究CCL2中和抗体构建体的影响。这些报告细胞含有连接至TEV蛋白酶位点的人类趋化因子(C-C基序)受体2(CCR2)和稳定整合至TangoTMGPCR-bla U2OS亲代细胞系中的Gal4-VP16转录因子。在UAS应答元件的控制下,该亲代细胞系稳定表达β-抑制蛋白/TEV蛋白酶融合蛋白和β-内酰胺酶(bla)报告基因。添加天然配体MCP1=CCL2产生了报告基因的活性的指示,这可以通过FRET使能底物的裂解来进行测量。

[1164] 原则上,测定和细胞处理程序是根据供应商手册的。简而言之,CCR2-U2OS细胞以2x10⁴个细胞/孔的密度(96er黑色透明底板,目录号655090,Greiner Bio-one)接种在50μl测定培养基(Freestyle 293表达培养基,目录号12338-018,Invitrogen)。并行地,以c=4x最终浓度制备不同测试抗体以及CCL2抗原溶液的系列稀释液。然后,制备CCL2抗原/抗体混

合物并在室温下将其预孵育两至三小时(hr)。将50 μ l所指示CCL2/抗体溶液转移至表达CCR2的U2OS细胞中,并且将其在37℃和5%CO₂下的加湿孵育箱中孵育18小时。仅使用测定培养基作为对照。

[1165] 次日,CCF4底物(目录号:K1089,Invitrogen)用 β -内酰胺酶上样溶液(目录号K1085,Invitrogen)进行制备并且将其以20 μ l/孔添加至细胞中。在室温下,将底物溶液在黑暗中孵育两小时。

[1166] 最后,荧光波长用Spectra Max(M4)酶标仪(Molecular devices)在以下波长(Ex/Em=409nm/460nm=蓝色*;Ex/Em=409nm/530nm=绿色**)以及减去测定介质对照后的蓝色/绿色荧光的比率下进行确定,该比率根据以下方程进行计算:比率=(样品-蓝色*-对照-蓝色*)/(样品-绿色**-对照-绿色**)。

[1167] pH工程化后,我们对最终LO候选物(CKL01-4)抑制CCL2诱导的CCR2信号传导的能力进行了表征。在这种情况下,中和特性仅通过新鲜CCL2蛋白的单体变体来进行了评估,以大约15ng/ml的最终浓度来使用该单体变体。

[1168]

双特异性抗体	别名	IC50 [ng/ml]		
		Exp 1	Exp 2	Exp3
ABN912//11K2-PGLALA	CCL2-0041		80.2	
CNT0888//11K2-PGLALA	CCL2-0042		84	
11K2//1G9-PGLALA	CCL2-0043		57	
CNT0888//1A5-PGLALA	CCL2-0044		77.7	88
CNT0888//1G9-PGLALA	CCL2-0045		86.4	81.3
1A5//1G9-PGLALA	CCL2-0046		75.8	
ABN912//11K2-WT IgG1	CCL2-0047	84.4		
CNT0888//11K2-WT IgG1	CCL2-0048	92.9		
11K2//1G9-WT IgG1	CCL2-0049	82.2		
CNT0888//1A5-WT IgG1	CCL2-0050	89.2		
CNT0888//1G9-WT IgG1	CCL2-0051		89.6	52.7 / 67.9
1A5//1G9-WT IgG1	CCL2-0052	86.2		
11K2//2F6-PGLALA	CCL2-0053		26.3	49.6 / 70

双特异性抗体	别名	IC50 [ng/ml]		
		Exp 1	Exp 2	Exp3
1A4//2F6-PGLALA	CCL2-0054		78.2	
1A5//2F6-PGLALA	CCL2-0055		48.7	
11K2//2F6-WT IgG1	CCL2-0056	93.9		
1A4//2F6-WT IgG1	CCL2-0057		58.2	
1A5//2F6-WT IgG1	CCL2-0058	93		
单特异性对照	CCL2-0002	76.1	79.1	56.9 / 58

[1169] 对在小鼠中用双原位旁抗体进行人CCL2免疫复合物扫集的评估

[1170] 为了评估双原位旁抗体与野生型人CCL2形成免疫复合物的能力,将由抗CCL2双原位旁抗体(20mg/kg)和野生型人CCL2(0.1mg/kg)组成的预形成的免疫复合物以10ml/kg的

单剂量施用至Balb/c小鼠的尾静脉中。施用后5分钟、7小时、1天、3天和7天收集血液。血清通过立即将血液在4℃下以14,000rpm离心10分钟来进行制备。将血清储存在-80℃处或以下,直至进行测量。经测试的双原位旁抗体在下表4中列出。具有WT IgG1 Fc的抗体具有与野生型类似的Fc γ 受体结合,而具有PGLALA Fc的抗体为Fc γ 受体结合沉默。结果在图4a至图4i中示出。

[1171] 通过比较具有Fc γ 受体结合的抗CCL2抗体(实线)和具有Fc γ 受体结合沉默的抗CCL2抗体(PGLALA,虚线),评估每种抗CCL2双原位旁抗体的免疫复合物扫集对体内hCCL2清除率的影响,如图4a至图4i所示。使用Phoenix 64 (Pharsight/Certara),通过非房室分析来对抗体谱进行分析。AUCinf通过外推至无穷大的线性对数梯形法则来进行估计。清除率值定义为剂量/AUCinf。该清除率差异也表达为倍数变化,该倍数变化通过将具有Fc γ 受体结合的抗体(SG1)的hCCL2清除率除以具有Fc γ 受体结合沉默的抗体(PGLALA)的hCCL2清除率来进行计算(下表4)。下表4中的数据指示,对于所有经测试的双原位旁抗体,Fc γ 受体(Fc γ R)结合抗体(WT IgG1)对人CCL2的清除率优于Fc γ 受体结合沉默抗体(PGLALA,其具有包含突变L234A、L235A、P329G突变(Kabat EU编号)的IgG1 Fc结构域)。这表明由经测试的双原位旁抗体实现的免疫复合物介导的CCL2扫集更为高效。此外,若干种双原位旁抗体的清除率值示出了较大的倍数变化,例如CNT0//人源化11K2(CNT0//11K2)。

[1172] 倍数变化通过将具有WT Fc γ R(Fc γ R)结合的抗体的hCCL2清除率除以具有PGLALA的抗体的hCCL2清除率来进行计算。如图4a至图4i和下表4所示,CNT0//11k2示出了具有IgG1野生型(WT)的抗体(该抗体具有Fc γ R结合)与Fc γ R结合沉默的抗体(PGLALA)之间的最大倍数变化21.5。这表明由CNT0//11k2-WT IgG1进行的免疫复合物介导的扫集为所有变体中最高效的。

[1173] 表4:施用抗CCL2双原位旁抗体(20mg/kg)和野生型人CCL2(0.1mg/kg)的预形成免疫复合物后,野生型CCL2的清除率值

[1174]	抗体	别名	清除率 (ml/天/kg)	倍数变化
	11K2//1G9-WT IgG1	CCL2-0049	101.761	6.1
	11K2//1G9-PGLALA	CCL2-0043	16.713	
	CNTO888//11K2-WT IgG1	CCL2-0048	244.705	21.5
	CNTO888//11K2-PGLALA	CCL2-0042	11.374	
	CNTO888//1G9-WT IgG1	CCL2-0051	31.085	7.8
	CNTO888//1G9-PGLALA	CCL2-0045	3.999	
	CNTO888//1A5-WT IgG1	CCL2-0050	7.098	3.8
	CNTO888//1A5-PGLALA	CCL2-0044	1.892	
	1A5//1G9-WT IgG1	CCL2-0052	194.481	11.4
	1A5//1G9-PGLALA	CCL2-0046	17.073	
	11K2//2F6-WT IgG1	CCL2-0056	14.442	4.9
	11K2//2F6-PGLALA	CCL2-0053	2.964	
	ABN912//11K2-WT IgG1	CCL2-0047	20.935	4.2
	ABN912//11K2-PGLALA	CCL2-0041	4.988	
	1A4//2F6-WT IgG1	CCL2-0057	19.606	3.3
	1A4//2F6-PGLALA	CCL2-0054	5.933	
	1A5//2F6-WT IgG1	CCL2-0058	10.254	2.7
	1A5//2F6-PGLALA	CCL2-0055	3.825	

[1175] 通过电化学发光(ECL)来测量血清中的总人CCL2浓度

[1176] 通过ECL测量小鼠血清中的总人CCL2浓度。将3ug/mL抗CCL2抗体2F2-SG1固定在MULTI-ARRAY 96孔板(Meso Scale Discovery)上过夜,然后在封闭缓冲液中于30℃下孵育2小时。将人CCL2校准曲线样品、质量控制样品和经稀释的小鼠血清样品与由9% SDS组成的变性缓冲液在37℃下一起孵育30分钟,或与由pH2.0-2.5甘氨酸HCl缓冲液组成的变性缓冲液在37℃下孵育10分钟。变性缓冲液的目的为将人CCL2从双原位旁抗体中解离。之后,将样品稀释10倍并且添加至抗CCL2固定板上,并且允许其在30℃下结合1小时,然后洗涤。接下来,添加SULFO TAG标记的MCP-1抗体,并且将板在30℃下孵育1小时,然后洗涤。立即将Read Buffer T(x4)(Meso Scale Discovery)添加至板,并且信号通过SECTOR Imager 2400(Meso Scale Discovery)来进行检测。使用分析软件SOFTmax PRO(Molecular Devices)基于校准曲线的响应计算人CCL2浓度。

[1177] 通过酶联免疫吸附测定(ELISA)来测量血清中的抗CCL2抗体浓度

[1178] 通过ELISA来测量小鼠血清中的抗CCL2抗体浓度。将抗人IgGκ链(Antibody Solutions)分配至Nunc MaxiSorp板(Thermofisher)上,并且允许其在4℃下静置过夜以制备抗人IgG固定板。校准曲线和样品用1%混合小鼠血清进行制备。然后,将样品分配至抗人IgG固定板上,并且允许其在30℃下静置1小时。随后,添加具有HRP缀合物的山羊抗人IgG(γ链特异性)(Southern Biotech)以在30℃下反应1小时。使用ABTS底物(KPL)作为底物来执行显色反应,并且450nm处的吸光度由酶标仪来进行测量。使用分析软件SOFTmax PRO(Molecular Devices),由校准曲线的吸光度来计算小鼠血浆中的浓度。

[1179] 研究内容

[1180] 总结小鼠PK研究数据,与相同剂量下的单原位旁抗体相比,由经测试的双原位旁抗体进行的人CCL2扫集更为高效。关于单原位旁抗体,具有WT FcγR结合的抗体与具有FcγR结合沉默的抗体之间的抗原清除率存在极小差异(表3)。相反,获得了具有WT FcγR结合的抗体与具有FcγR结合沉默的抗体之间的抗原清除率的较大差异(表4),这表明经测试的双原位旁抗体可以高效地扫集人CCL2。选择CNT0888//11K2的组合以用于进一步的抗体工程化,因为它展示了最大的清除率倍数可能性。

[1181] 实例B-2具有经修饰的可变结构域和CDR(离子依赖性/pH依赖性结合)的抗CCL2抗体

[1182] 导致离子依赖性/pH依赖性结合的修饰

[1183] 为了生成pH依赖性抗CCL2抗体,对mAb CNT0888和人源化11K2的所有CDR进行了组氨酸扫描诱变。根据制造商的说明,使用In-Fusion HD克隆试剂盒(Clontech Inc.或Takara Bio公司)将CDR中的每个氨基酸单独突变为组氨酸。通过测序而证实每个变体突变正确后,通过以下方法来瞬时表达并纯化变体:根据制造商的说明,使用Freestyle FS293-F细胞和293Fectin(Life technologies)来瞬时表达重组抗体。重组抗体用蛋白A(GE Healthcare)纯化,并且在D-PBS或His缓冲液(20mM组氨酸,150mM NaCl,pH6.0)中洗脱。对于难以用蛋白A进行纯化的抗体,例如可以使用kappaSelect或LambdaFABselect(GE Healthcare)或CaptureSelect IgG-CH1亲和矩阵(ThermoFisher Scientific)。如果必要的话,进一步进行尺寸排阻色谱法以去除高分子量和/或低分子量组分。与上述相比,所有组氨酸取代的变体均通过经修饰的BIACORE®测定来进行评估。简而言之,在pH 7.4的解离阶段之后,立即将在pH 5.8的另外的解离阶段整合至BIACORE®测定中。这是为了评估在pH 7.4形成的从复合物中进行抗体(Ab)与抗原(Ag)之间的pH依赖性解离,而不是在pH 5.8的相应的解离。pH 5.8缓冲液的解离速率通过使用Scrubber 2.0(BioLogic Software)曲线拟合软件处理和拟合数据来进行确定。

[1184] 选择并组合单个组氨酸取代,与pH 7.4解离阶段相比,该单个组氨酸取代导致在pH 5.8的结合响应减少。为了识别在pH 7.4改善亲和力的突变,使用在组氨酸取代步骤期间生成的至少一种变体,分别针对重链和轻链生成了超过500种变体。这些变体使得CDR中的每个氨基酸均被18个其他氨基酸取代,不包括原始氨基酸和半胱氨酸。使用BIACORE®4000仪器(GE Healthcare),在37°C、pH 7.4评估变体与人CCL2的结合能力。与之前一样,在pH 7.4的解离阶段之后,立即将在pH 5.8的另外的解离阶段整合至BIACORE®测定中。pH 5.8缓冲液的解离速率通过使用Scrubber 2.0(BioLogic Software)曲线拟合软件处理和拟合数据来进行确定。

[1185] 选择在pH 7.4改善了亲和力并且改善了pH依赖性的变体,并且将这些突变组合。这在下表中的四种11K2变体和四种CNT0888变体中进行举例说明。

[1186] 表:四种经修饰的11K2和四种CNT0888变体,其经过工程化以用于pH依赖性结合

[1187]

经修饰的11K2变体 (VH/VL)	经修饰的CNT0888变体 (VH/VL)
11K2H1503/11K2L1338	CNT0888H0625/CNT0888L0616
11K2H1510/11K2L1338	CNT0888H0634/CNT0888L0616
11K2H1503/11K2L1201	CNT0888H0635/CNT0888L0616

11K2H1514/11K2L1338	CNT0888H0695/CNT0888L0616
---------------------	---------------------------

[1188] 为了评估经修饰的11K2和CNT0888变体的组合效果,将每种11K2变体与四种经修饰的CNT0888变体组合,并且以CrossMab形式表达为双原位旁CCL2抗体。这在下表中进行举例说明,其中4x4组合导致16种双原位旁抗体(指定为CKL001至CKL016)的生成。

[1189] 表:四种经修饰的11K2和四种经修饰的CNT0888变体的组合,其用以生成16种双特异性(双原位旁)抗体。

[1190]	双特异性抗 CCL2 抗体	基于以下项的可变结构域
	CKLO01	11K2H1503/11K2L1338//CNT0888H0695/CNT0888L0616
	CKLO02	11K2H1510/11K2L1338//CNT0888H0695/CNT0888L0616
	CKLO03	11K2H1503/11K2L1201//CNT0888H0695/CNT0888L0616
	CKLO04	11K2H1503/11K2L1201//CNT0888H0625/CNT0888L0616
	CKLO05	11K2H1503/11K2L1338//CNT0888H0634/CNT0888L0616
	CKLO06	11K2H1503/11K2L1201//CNT0888H0634/CNT0888L0616
	CKLO07	11K2H1514/11K2L1338//CNT0888H0634/CNT0888L0616
	CKLO08	11K2H1510/11K2L1338//CNT0888H0634/CNT0888L0616
	CKLO09	11K2H1503/11K2L1338//CNT0888H0625/CNT0888L0616
	CKLO10	11K2H1514/11K2L1338//CNT0888H0625/CNT0888L0616
	CKLO11	11K2H1510/11K2L1338//CNT0888H0625/CNT0888L0616
	CKLO12	11K2H1503/11K2L1338//CNT0888H0635/CNT0888L0616
	CKLO13	11K2H1503/11K2L1201//CNT0888H0635/CNT0888L0616
	CKLO14	11K2H1514/11K2L1338//CNT0888H0635/CNT0888L0616
	CKLO15	11K2H1510/11K2L1338//CNT0888H0635/CNT0888L0616
	CKLO16	11K2H1514/11K2L1338//CNT0888H0695/CNT0888L0616

[1191] 为了生成双特异性抗体,在CH3/CH3界面中将W0 2016/016299中描述的CrossMab技术(其中在一个抗体臂中交换了VH/VL,并且已经通过电荷修饰对另一抗体臂的CH1/CL界面进行了修饰)与杵臼结构技术结合使用,以促进异源二聚化。对于CKLO2 IgG1,给出了其中应用了该技术的所有四个抗体链的示例性序列(参见SEQ ID NO:108至SEQ ID NO:111)。取决于所使用的重链恒定结构域(例如IgG1野生型(不含Fc受体结合沉默突变)、PGLALA、SG1095、SG1099、1100-对于SG1095、SG1099、1100,参见下面的描述或序列描述)添加后缀IgG1、PGLALA、SG1095、SG1099、1100

[1192] 具有经修饰的可变结构域和CDR(离子依赖性/pH依赖性结合)的双原位旁抗CCL2抗体的功能性表征

[1193] 亲和力测量(参见上述方法)

[1194] 对于所有16种生成为IgG1野生型的双特异性抗CCL2抗体,确定了它们的pH依赖性结合人CCL2。

[1195] 图5a示出了Biacore®传感图,该传感图示出了四种经修饰的11K2和四种CNT0888变体以及组合后的16种Crossmab在pH 7.4(黑线)和pH 5.8(灰线)与单体CCL2的结合曲线。

[1196] 图5b示出了Biacore®传感图,该传感图示出了四种经修饰的11K2和四种

CNT0888变体以及组合后的16种Crossmab与单体CCL2的结合曲线,其中在pH 7.4的解离阶段之后,立即将pH 5.8的另外的解离阶段整合至BIACORE®测定中。

[1197] 与CCL8的交叉反应性结合

[1198] 使用Biacore T200仪器 (GE Healthcare),在37℃评估重组单体人CCL2与重组单体人CCL8的pH依赖性结合。根据由制造商推荐的设置,使用胺偶联试剂盒 (GE Healthcare) 将抗人Fc (GE Healthcare) 固定在CM4传感器芯片的每个流动池上。将抗体和分析物稀释至ACES pH 7.4或pH 5.8缓冲液 (20mMACES、150mM NaCl、1mg/ml BSA、0.05% Tween 20、0.005% NaN₃) 中。将抗体捕获至抗Fc传感器表面上,然后将重组单体人CCL2以8nM浓度注射在流动池上方。监测分析物与抗体的缔合阶段持续120s,然后监测解离阶段持续180s。每个周期用3M MgCl₂将传感器表面再生。结合传感图由TIBCO Spofire通过对捕获水平的结合响应进行归一化来进行处理。

[1199] 通过经修饰的Biacore测定,检查在pH 7.4形成的抗体/抗原复合物的pH依赖性解离的评估。简而言之,在pH 7.4的解离阶段之后,立即将在pH 5.8的另外的解离阶段整合至Biacore测定中。结合传感图由TIBCO Spofire通过对捕获水平的结合响应进行归一化来进行处理。

[1200] 重组人CCL8 P8A单体的表达和纯化:野生型人CCL8的序列获自Genbank (NCBI:NP_005614.2)。为了制备单体CCL8,成熟CCL8蛋白的8位处的脯氨酸突变为丙氨酸。根据制造商的说明,对Expi 293细胞 (Lifetech) 进行转染。使用SP-Sepharose HP (GE Healthcare) 和 Superose 200尺寸排阻 (GE Healthcare) 色谱法,通过阳离子交换色谱法来从细胞培养上清液中使用相同的方法纯化CCL8野生型和P8A单体蛋白。简而言之,将细胞培养上清液用MilliQ水 (Millipore) 稀释至2.5分之一,加载至用PBS平衡的Hi-Trap SP-HP柱上,用平衡缓冲液洗涤并且使用0-2M NaCl梯度来进行洗脱。合并经洗脱的蛋白级分,并使用用20mM组氨酸、150mM NaCl (pH 6.0) 平衡的HiLoad 16/600Superose 200 (GE Healthcare) 柱通过尺寸排阻色谱法进一步纯化。级分通过尺寸排阻色谱法和SDS-PAGE来进行分析。将含有CCL8蛋白的级分合并、浓缩并且储存在-80℃下

[1201] 人CCL8与CCL2共享高度同源性,并且也能够与CCR2结合。由于11K2臂能够结合CCL8 (参见图1),因此有必要识别突变以减少该结合,以避免中和CCL8的可能的脱靶效应。此外,去除11K2臂上的CCL8结合对于与CCL2高效形成免疫复合物非常重要。由于CNT0臂不结合CCL8,因此CCL8与11K2臂的结合将干扰与CCL2形成免疫复合物,这可能减少从血浆中清除CCL2的清除率。

[1202] 为了识别会减少11K2与人CCL8的结合并向人CCL2赋予选择性的突变,一些CDR位置被取代,如例如CKL002的11K2 VH中的D101E或者CKL003的11K2 VL中的W92R,以去除与huCCL8的交叉反应性。如图6所示,双原位旁Crossmab中的CCL8结合可以通过将11K2工程化而显著减少。CKL001变体未经过优化以减少CCL8结合,而CKL004、CKL003和CKL002含有用以减少CCL8结合的突变。所有四种Crossmab均具有与CCL8的pH依赖性结合。

[1203] 在pH 7.4和pH 5.8的抗CCL2抗体与重组CCL2和CCL8的结合亲和力

[1204] 为了确定亲代CNT0888H/11K2H2、CKL01、CKL02和CKL03与人CCL2和CCL8的亲和力和pH依赖性结合,使用Biacore T200仪器 (GE Healthcare) 在37℃进行评估。根据由制造商推荐的设置,使用胺偶联试剂盒 (GE Healthcare) 将抗人Fc (GE Healthcare) 固定在CM4传

感器芯片的每个流动池上。将抗体和分析物稀释至ACES pH 7.4或pH 5.8缓冲液(20mM ACES、150mM NaCl、1mg/ml BSA、0.05% Tween 20、0.005% NaN₃)中。将抗体捕获至抗Fc传感器表面上,然后将由两倍系列稀释液所制备的重组人CCL2 P8A变体(单体)或CCL8 P8A变体(单体)以1.25nM至20nM注射在流动池上方。每个周期用3M MgCl₂将传感器表面再生。使用Biacore T200评估软件2.0版(GE Healthcare),通过处理数据并将其拟合至1:1结合模型来确定结合亲和力。在pH 7.4和pH 5.8的抗CCL2抗体与重组CCL2和CCL8的结合亲和力在下表5中示出。

[1205] 表5:在pH 7.4和pH 5.8的抗CCL2抗体与重组CCL2和CCL8的结合亲和力

[1206] 双特异性抗 CCL2 抗体	与人 CCL2 的 KD		与人 CCL8 的 KD	
	pH 7.4	pH 5.8	pH 7.4	pH 5.8
CNT0888/11k2	1.28E-11	2.35E-13	1.47E-09	1.75E-09
CKLO1	7.39E-12	9.32E-09	2.33E-08	n.d.
CKLO2	4.32E-12	n.d.	n.d.	n.d.
CKLO3	6.85E-12	2.17E-08	n.d.	n.d.

[1207] 注:n.d.由于结合响应低,因此无法确定KD。

[1208] 表5中的数据示出,对于CKLO2和CKLO3,在pH 7.4与CCL8的结合被消除,而对于CCL2,在pH 7.4保持强亲和力和pH依赖性结合。结果示出,在基于CNT0888和11K2的亲代双特异性抗体的可变区和CDR中引入的不同修饰成功生成了亲和力成熟的变体CKLO1、CKLO2、CKLO3,与在pH7.4的亲代Ab相比,该变体具有经增强的与CCL2的结合亲和力。同时,CKLO1、CKLO2、CKLO3示出了与CCL2的强烈pH依赖性结合。与在pH7.4的KD值相比,在pH 5.8观察到与CCL2的结合亲和力的KD为1000分之一以下

[1209] 野生型人CCL2的清除率

[1210] 为了评估pH依赖性双特异性抗体增强野生型人CCL2的清除率的能力,将由抗CCL2单原位旁抗体(20mg/kg)和野生型人CCL2(0.1mg/kg)组成的预形成的免疫复合物以10ml/kg的单剂量施用至SCID小鼠的尾静脉中。施用后5分钟、1小时、4小时、7小时、1天和7天收集血液。将血清储存在-80℃处或以下,直至进行测量。经测试的Crossmab抗体为亲代CNT0//11K2和四种pH工程化变体:CKLO01、CKLO02、CKLO03和CKLO04。所有抗体均具有IgG1野生型Fc部分(不含沉默/消除Fc(γ)受体结合的突变)。如上所述,完成小鼠血清中的总人CCL2和抗CCL2抗体浓度的测量(在表4后的“对小鼠中用双原位旁抗体进行人CCL2免疫复合物扫集的评估”下)。

[1211] 结果在图7a中示出:将预形成的免疫复合物注入SCID小鼠中后,hCCL2的血清浓度随时间推移的变化,该预形成的免疫复合物由hCCL2和双特异性抗CCL2抗体(亲代CNT0//11K2和pH依赖性变体CKLO01、CKLO02、CKLO03和CKLO04)组成。所有四种pH工程化变体均示出了人CCL2的迅速清除。对于CKLO02、CKLO03,人CCL2在第1天时低于检测限。对于亲代CNT0//11K2,最初直到第1天一直观察到人CCL2的迅速清除,但此后,人CCL2的清除较慢。

[1212] 实例B-3具有经修饰的可变结构域和CDR(离子依赖性/pH依赖性结合)和Fc介导的扫集的抗CCL2抗体

[1213] 经由扫集技术来修饰双特异性抗CCL2抗体

[1214] 双特异性抗CCL2抗体使用扫集技术来进行修饰,以使得双特异性抗体和CCL2抗体能够在较长时间段内消除游离CC12,以在体内实现持续的生物效应,如抗癌功效或抗炎功效。

[1215] 扫集概念的描述于例如如下文献:Ikawa等人,Immunological Reviews 270 (2016) 132-151、W02012/122011、W02016/098357和W02013/081143,其通过引用并入本文。

[1216] pI Fc介导的扫集

[1217] 在证明pH工程化双原位旁抗体可以加速体内CCL2清除后,我们接下来评估了具有pI增加型取代的抗体增强野生型人CCL2清除的能力。将由抗CCL2单原位旁抗体 (20mg/kg) 和野生型人CCL2 (0.1mg/kg) 组成的预形成的免疫复合物以10ml/kg的单剂量施用于SCID小鼠的尾静脉中。施用后5分钟、30分钟、1小时、2小时、4小时和7天收集血液。将血清储存在-80℃处或以下,直至进行测量。经测试的Crossmab抗体为具有IgG1的亲代CKL003,以及具有pI增强型Fc的CKL003,CKL003-SG1099。如上所述,完成小鼠血清中的总人CCL2和抗CCL2抗体浓度的测量(在表4后的“对在小鼠中用双原位旁抗体进行人CCL2免疫复合物扫集的评估”下)。

[1218] 结果在图7b中示出:将预形成的免疫复合物注入SCID小鼠中后,hCCL2的血清浓度随时间推移的变化,该预形成的免疫复合物由hCCL2和CKL003 (具有IgG1野生型Fc) 或CKL003-SG1099 (具有经增强的pI Fc的CKL003) 组成。与具有IgG1的CKL003相比,含有Fc取代Q311R/P343R (EU Kabat编号) 的CKL003-SG1099示出了更快的人CCL2清除率/减少。这证明具有pI增加型突变的pH依赖性双原位旁抗体可以加速CCL2的清除。

[1219] 用Fc γ RIIb增强型Fc变体和进一步的Fc修饰来生成双原位旁抗CCL2抗体

[1220] 在该实例中,说明了用以增强CCL2清除率的Fc工程化。

[1221] 在W0 2013/125667中已经证明,可溶性抗原的清除率可以通过施用包含对Fc γ RIIb展示出经增加的亲和力的Fc结构域的抗原结合分子(例如,抗体)来进行增强。此外,可以示出与人Fc γ RIIb经增强的结合的Fc变体已经在W0 2012/115241和W0 2014/030728中进行了说明。还说明,这些Fc变体可以示出与人Fc γ RIIb的经选择性增强的结合,以及与其他活性Fc γ 受体 (Fc γ R) 的经降低的结合。Fc γ RIIb结合的该选择性增强不仅有利于可溶性抗原的清除率,而且有利于降低不期望的效应子功能和免疫应答的风险。

[1222] 对于抗体药物的开发,应当在非人动物(药物在该非人动物中具有药理活性)中评估功效、药代动力学和安全性。如果它仅在人类中具有活性,则必须考虑替代性方法,例如使用替代抗体(Int. J. Tox. 28: 230-253 (2009))。然而,使用替代抗体来精确预测人类中Fc区与Fc γ R之间相互作用的影响并不容易,因为非人动物中Fc γ R的表达模式和/或功能并不总是与人类相同。抗体药物的Fc区与非人动物(尤其是具有与人接近的Fc γ R表达模式和功能的食蟹猴)具有交叉反应性将是优选的,以便可以将非人动物中获得的结果外推至人类。

[1223] 用在Fc部分的位置处的突变(EU Kabat编号),生成了双特异性抗CCL2抗体的以下IgG1恒定结构域/Fc变体(作为Crossmab)

[1224] SG1095-来源于包含以下突变(Kabat EU编号)的IgG1:

[1225] -L235W/G236N/H268D/Q295L/A330K/K326T(适用于增加与人Fc γ RIIb的亲合力并且降低与其他人Fc γ R的亲合力);

- [1226] -Q311R/P343R(适用于增加等电点 (pI),以用于增强抗原的摄取);
- [1227] -N434A(适用于增加与FcRn的亲合力,以用于抗体的更长的血浆半衰期);以及
- [1228] -Q438R/S440E(适用于抑制类风湿因子结合)
- [1229] SG1099-来源于包含以下突变(Kabat EU编号)的IgG1:
- [1230] Q311R/P343R(适用于增加pI,以用于增强抗原的摄取)
- [1231] SG1100-来源于包含以下突变(Kabat EU编号)的IgG1:
- [1232] -Q311R/P343R(适用于增加pI,以用于增强抗原的摄取);
- [1233] -N434A(适用于增加与FcRn的亲合力,以用于抗体的更长的血浆半衰期);以及
- [1234] -Q438R/S440E(适用于抑制类风湿因子结合)
- [1235] GG01-来源于包含以下突变(Kabat EU编号)的IgG1:
- [1236] -L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K(适用于增加与人FcγRIIb的亲合力并且降低与其他人FcγR的亲合力)
- [1237] -Q311R/P343R(适用于增加等电点 (pI),以用于增强抗原的摄取);
- [1238] -N434A(适用于增加与FcRn的亲合力,以用于抗体的更长的血浆半衰期);以及
- [1239] -Q438R/S440E(适用于抑制类风湿因子结合)
- [1240] GG02-来源于包含以下突变(Kabat EU编号)的IgG1:
- [1241] -L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K(适用于增加与人FcγRIIb的亲合力并且降低与其他人FcγR的亲合力)
- [1242] -Q311R/P343R(适用于增加等电点 (pI),以用于增强抗原的摄取);
- [1243] -M428L/N434A/Y436T(适用于增加与FcRn的亲合力,以用于抗体的更长的血浆半衰期);以及
- [1244] -Q438R/S440E(适用于抑制类风湿因子结合)
- [1245] GG03-来源于包含以下突变(Kabat EU编号)的IgG1(SG1-IgG1同种异型):
- [1246] -L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K(适用于增加与人FcγRIIb的亲合力并且降低与其他人FcγR的亲合力)
- [1247] -Q311R/P343R(适用于增加等电点 (pI),以用于增强抗原的摄取);
- [1248] -N434A(适用于增加与FcRn的亲合力,以用于抗体的更长的血浆半衰期);以及
- [1249] -Q438R/S440E(适用于抑制类风湿因子结合)
- [1250] GG04-来源于包含以下突变(Kabat EU编号)的IgG1(SG1-IgG1同种异型):
- [1251] -L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K(适用于增加与人FcγRIIb的亲合力并且降低与其他人FcγR的亲合力)
- [1252] -Q311R/P343R(适用于增加等电点 (pI),以用于增强抗原的摄取);
- [1253] -M428L/N434A/Y436T(适用于增加与FcRn的亲合力,以用于抗体的更长的血浆半衰期);以及
- [1254] -Q438R/S440E(适用于抑制类风湿因子结合)
- [1255] 具有经修饰的可变结构域和CDR(离子依赖性/pH依赖性结合)并且含有或不含Fc介导的扫集的双特异性抗CCL2抗体的功能性表征
- [1256] 呈Crossmab形式的CKL02的Fc变体SG1095、GG01、GG02、GG03/04的SPR结合
- [1257] 在Biacore 8K仪器处的SPR测定中,对在pH 7.4和5.8的单体人和食蟹猴CCL2与4

种不同的抗体P1AD8325 (CKL02-SG1095)、P1AF8137 (CKL02-GG01)、P1AF8139 (CKL02-GG02) 和P1AF8140 (CKL02-GG03/04) 的结合进行了研究。

[1258] 在该设置中,使用胺偶联方法将CaptureSelect™人Fab-κ (ThermoFisher Scientific) 固定在CM3传感器芯片上,捕获多样的抗体作为配体,并且在两个不同pH值用 0nM、10nM、100nM和1000nM单体人或食蟹猴CCL2作为分析物来执行测量。

[1259] CKL02-SG1095、CKL02-GG01、CKL02-GG02、CKL02-GG03/04示出了几乎相同的与单体人和食蟹猴CCL2的结合曲线,其在10nM、100nM和1000nM结合并且在pH 7.4同样快速地解离,而在pH 5.8未观察到稳定结合。结果如下表所示。

[1260] 表:CKL02-SG1095、CKL02-GG01、CKL02-GG02、CKL02-GG03/04与单体人和食蟹猴CCL2的结合示出了几乎相同的与单体人和食蟹猴CCL2的结合曲线

[1261]	抗体	抗原	Rmax (RU) @ pH 7.4	t 1/2 (s) @ pH 7.4	Rmax (RU) @ pH 5.8	t 1/2 (s) @ pH 5.8
	CKLO2-GG01	单体人 CCL2	15.9	6.18	29.8	3.29
	CKLO2-GG02	单体人 CCL2	16.8	4.04	28.8	3.29
	CKLO2-GG03/04	单体人 CCL2	17.6	5.90	29.6	3.24
	CKLO2-SG1095	单体人 CCL2	19.0	5.49	35.3	3.51
	CKLO2-GG01,	单体食蟹猴 CCL2	16.5	7.10	30.7	3.22
	CKLO2-GG02,	单体食蟹猴 CCL2	17.2	5.97	29.5	3.14
	CKLO2-GG03/04	单体食蟹猴 CCL2	17.9	6.48	30.4	3.12
	CKLO2-SG1095	单体食蟹猴 CCL2	19.5	6.07	36.0	3.41

[1262] 趋化性测定

[1263] 方法的描述

[1264] 将THP-1细胞培养3天,直至达到 8×10^5 个细胞/ml。将总细胞数为5000个细胞/孔接种在微孔板的上室中,并且使其在37℃下沉降。在存在或不存在抗CCL2抗体的情况下,将重组huCCL2以50ng/ml的最终浓度移液在底室中(当执行测定以测试替代抗体时,以100ng/ml使用重组muCCL2作为替代)。将上室和底室放在一起从而避免形成气泡,然后将板在37℃下孵育24h。根据制造商的建议,通过Cell Titer Glo方法来对经迁移的细胞进行定量,并且用Tecan Infinite 200酶标仪对发光进行测量。

[1265] 结果在图8中示出:趋化性测定:具有相同CDR和可变区VH/VL的双特异性抗CCL2抗体,即CKL02-IgG1野生型和CKL02-SG1095(但Fc部分不同)可以以相同的效能抑制THP-1细胞的迁移($IC_{50}=0.2\mu\text{g/ml}$;图8,左侧)。

[1266] 类似的,CCL2-0048 (CKL02的亲本VH/VL未经修饰的双特异性抗体CNT0888/11k2,其为非pH依赖性的)也示出了 $0.2\mu\text{g/ml}$ 的 IC_{50} ,因为pH依赖性(该现象在该测定中不会发生)对于抗原扫集至关重要。

[1267] 相应的单原位旁抗体CNT0888 IgG1和人源化11k2 IgG1展示出的 IC_{50} 值分别为 $0.3\mu\text{g/ml}$ 和 $0.7\mu\text{g/ml}$,而huIgG1同种型对照未示出抑制作用(图8,右侧)。

[1268] 在另外的类似实验中,确定了CKL02-GG01 ($0.2\mu\text{g/ml}$)、CKL02-GG02 ($0.2\mu\text{g/ml}$) 和

GG03/GG04(0.3 μ g/ml)的IC₅₀值。

[1269] 经基因修饰的小鼠模型中的体内生物活性

[1270] 材料和方法

[1271] B16-huCCL2/CCL2-null模型

[1272] 生成本模型的目的为在具有免疫能力的荷瘤小鼠中测试抗人CCL2抗体,而不受小鼠CCL2的干扰。为此,选择小鼠肿瘤细胞系B16-F10,因为它不分泌mCCL2,并且已知它在C57/B16品系小鼠中体内生长,而该品系小鼠为CCL2敲除小鼠的遗传背景。

[1273] 为了生成表达huCCL2的B16F10肿瘤细胞的稳定池,用编码huCCL2的质粒DNA和潮霉素-B选择盒来转染它们。因此,在生长培养基(DMEM+10% FCS+2mM L-谷氨酰胺)中将细胞以2.0E+05个细胞/孔接种至6孔板中。24h后,将由每孔1 μ g DNA和0pti-MEM培养基中的Lipofectamine2000构成的转染混合物添加至细胞中。随后,用含有潮霉素-B(0.5mg/ml)的培养基对细胞进行选择。培养20天后,使用BD FACS Aria III,基于FSC/SSC散射对活单细胞进行分选。十二天后,与野生型B16F10细胞相比,使用来自ebioscience的ELISA Ready-SET-Go(目录号88-7399-86)对来自单细胞克隆的细胞培养上清液进行人CCL2表达的筛选(数据未示出)。

[1274] 将所选择的B16-F10_HOMSA_CCL2肿瘤细胞克隆1A5、2A3和2B2在含有10% FCS和2mM L-谷氨酰胺(PAN Biotech GmbH,Germany)的DMEM中于37℃、5% CO₂下在水饱和气氛中常规培养。用每周两次的胰蛋白酶/EDTA 1x(PAN Biotech GmbH,Germany)分裂来执行培养传代。

[1275] 到达时周龄为7周至10周的雌性B6.129S4-Ccl2tm1Ro1/J小鼠(Jackson Laboratories)用B16-F10_HOMSA_CCL2肿瘤细胞克隆进行接种:当天(研究第0天),从培养瓶中收获肿瘤细胞并且将其转移至培养基中,洗涤一次并重悬于PBS中。细胞数使用细胞计数器和分析系统(Vi-CELL,Beckman Coulter)来进行确定。对于皮下注射,将细胞滴度调节为1 $\times$ 10⁶个细胞/ml,并且使用经冷却的

[1276] 1.0ml结核菌素注射器(Dispomed,Germany)和小针头(0.45x12mm)来将100 μ l皮下注射至小鼠右侧肋腹。在由异氟烷(CP Pharma,Germany)进行全身麻醉的情况下,在用于小动物的吸入装置中执行细胞接种。

[1277] 每天监测肿瘤生长,并且在研究第15天处死小鼠,此时对于B16-F10_HOMSA_CCL2肿瘤细胞克隆1A5和2A3,肿瘤达到约1000mm³(在这个时间点,由于生长速度较慢,因此2B2肿瘤为约600mm³)。在终点处,采集血液样品以用于CCL2测量,并且将肿瘤移植并通过流式细胞术来进行分析,如上所述。

[1278] 已发现小鼠免疫细胞会浸润所有肿瘤,从而证实了人类CCL2能够吸引小鼠CCR2+细胞的观念。B16-F10_HOMSA_CCL2肿瘤细胞克隆1A5展示出最高的CD45+总浸润以及最高的相对mMDSC(单核细胞骨髓来源的抑制细胞)组合物(图2)。尽管2A3细胞产生了与1A5细胞类似水平的血清总CCL2,而2B2克隆示出了显著较低的CCL2血清浓度,但克隆2A3和2B2在肿瘤中具有较低的免疫细胞频率(数据未示出)。

[1279] 如上所述,雌性B6.129S4-Ccl2tm1Ro1/J小鼠用B16-F10_HOMSA_CCL2肿瘤细胞克隆1A5进行接种。

[1280] 研究组的治疗在细胞接种后5天开始。第1组接受了人IgG媒介物对照治疗,而第2

组和第3组分别用Mab CKL02-IgG1 (Fc野生型IgG1) 和CKL02-SG1099 (基于具有突变Q311R/P343R (Kabat EU编号) 的IgG1的CKL02 pI增强型Fc) 进行了腹腔注射治疗,每天3.7mg/kg,持续9天。在研究第14天,处死小鼠并且将肿瘤移植。使用酶促消化和细胞滤网以从每个肿瘤团块中生成单细胞悬浮液,以通过流式细胞术进行非合并地分析。为了检测到感兴趣的免疫细胞群,使用了以下标志物和荧光染料:CD45-BUV395、CD11b-BUV737、F4/80-BV421、CD11c-BV605、Ly6C-AF488、Ly6G-PerCP-Cy5.5、CD206-BV711、CD4-BV510、CD8a-APC-H7、NK1.1-PE-Cy7、CD279-APC和CD274-PE。样品用BD LSR-Fortessa流式细胞仪来进行获取,并且使用BD Diva软件来进行分析。

[1281] 在研究第6天、第8天、第11天和第14天抽取血清样品,以测量总huCCL2和游离huCCL2。

[1282] 用以检测游离CCL2的方法在下面的“食蟹猴中CCL2扫集效率的概念验证研究”中详细描述。为了分析本研究中的游离人CCL2,重组食蟹猴CCL2被重组人CCL2替换,以制备校准品和QC。

[1283] 将总CCL2血清样品用未经验证但合格的特异性夹心ELISA进行分析。简而言之,将生物素化的抗CCL2捕获抗体 (CNT0888, CCL2-0004)、封闭缓冲液、预处理的测试样品和检测试剂 (地高辛化抗CCL2抗体 (M-1H11-IgG)) 逐步添加至384孔链霉亲和素包被的微孔板,并在每个步骤中在非强力摇床上孵育1小时。为了在预处理步骤中解离CCL2-药物复合物,将样品、校准品或QC在pH 5.5、37°C酸化10分钟。将酸化样品添加至SA-MTP。对于固定化免疫复合物的检测,添加多克隆抗地高辛-POD缀合物,并将板孵育60分钟。在每一步之后,将板洗涤三次,以去除未结合的物质。

[1284] 将ABTS添加至板上,并在室温下振荡孵育。在405/490nm波长处测量吸收。使用分析软件XLfit (IDBS) 基于校准曲线的响应计算人CCL2浓度。

[1285] 取决于经过统计学分析的数据集,相应地应用了t检验或具有Tukey检验的单因素方差分析以用于多重比较。

[1286] 结果

[1287] 研究结束时,接受CKL02-SG1099 (CKL02 pI增强型Fc) 的那些小鼠的肿瘤体积和肿瘤重量显著减少 (图9)。仔细观察肿瘤浸润,揭示出单核细胞骨髓来源的抑制细胞 (M-MDSC) 的肿瘤浸润降低,正如CCL2阻断后所预期的一样 (图9)。

[1288] 此外,血清分析证实了该疗法的功效:与IgG1野生型Fc CKL02分子相比,pI优化确实导致总CCL2的积累减少,而游离CCL2 (未与抗体结合) 被完全抑制在检测限下 (图10)。因此,本模型适于使用抗huCCL2双原位旁扫集抗体CKL02-SG1099 (CKL02 pI增强型Fc) 来研究CCL2阻断在肿瘤背景下的效果。在后续研究中研究了最佳剂量方案,其中CKL02-SG1099 (CKL02 pI增强型Fc) 每周以较低剂量给药一次或两次,并且在数周内监测游离CCL2抑制的延长。此外,在该模型中还探索了与T细胞活化疗法 (即,T细胞双特异性抗体、PD-L1阻断) 的组合。

[1289] 在另外的类似实验中,分析了其他变体,如CKL02-SG1095、CKL02-GG01、GG02和GG03/GG04。

[1290] 食蟹猴中CCL2扫集效率的概念验证 (POC) 研究

[1291] 方法。本研究的主要目的为评估食蟹猴中四种抗CCL2 (MCP-1) 抗体的CCL2抑制延

长和扫集效率。次要目的为评估这些抗体的药代动力学 (PK) 特性。所有抗体均以25mg/kg的单次IV输注方式在30分钟的时间段内向3岁至4岁雄性动物进行施用,并且在70天内血清中测量总CCL2和抗体浓度。经研究的抗CCL2抗体由以下项构成:对照抗体(第1组和第2组)以及经专门工程化以提供CCL2-药物复合物的经增强的消除的抗体(下文称为抗原扫集或简单扫集)。组1:CNT0888-SG1(=IgG1野生型)抗CCL2抗体(n=3种动物)作为最大CCL2积累的对照;第2组:双原位旁抗CCL2抗体CKL02-SG1(IgG1野生型),具有pH依赖性靶向结合但无Fc-修饰(n=3);第3组:双原位旁抗CCL2抗体CKL02-SG1100,具有pH依赖性靶向结合和Fc-pI以及进一步的修饰(n=4)以及第4组:双原位旁抗CCL2抗体CKL02-SG1095,具有pH依赖性靶向结合、Fc-pI和Fc γ RII以及进一步的修饰(n=4)。

[1292] 在本研究中,对抗体的总血清浓度、总量(游离和抗体结合的CCL2)和游离靶标进行了定量。此外,还评估了抗药物抗体(ADA)的存在。使用Phoenix64(Pharsight/Certara),通过非房室分析来对抗体、总CCL2谱和游离CCL2谱进行分析;数据使用GraphPad Prism v.6.07(GraphPad Software)来进行说明。

[1293] 对于抗体,血清样品使用通用夹心ELISA方法来进行分析。通过ELISA来测量猴血清中的总抗体浓度。将2 μ g/mL抗人 κ 链抗体固定在maxisorp 96孔板上过夜,然后在封闭缓冲液中于30℃下孵育2小时。将抗体校准曲线样品、质量控制样品和猴血清样品在板上于30℃下孵育1小时,然后洗涤。接下来,添加抗人IgG-HRP并且在30℃下孵育1小时,然后洗涤。将ABTS底物孵育10分钟、20分钟和30分钟,然后用酶标仪在405nm处进行检测。使用分析软件SOFTmax PRO(Molecular Devices)基于校准曲线的响应计算抗体浓度。

[1294] 将总CCL2血清样品用未经验证但合格的特异性夹心ECL方法测定进行分析。将3 μ g/mL抗CCL2抗体(r2F2-SG1)固定在MULTI-ARRAY 96孔板(Meso Scale Discovery)上过夜,然后在封闭缓冲液中于30℃下孵育2小时。将食蟹猴CCL2校准曲线样品、质量控制样品和经稀释的食蟹猴血清样品与pH 5.5酸性缓冲液在37℃一起孵育10分钟。之后,将样品在抗CCL2固定板上于30℃下孵育1小时,然后洗涤。接下来,添加SULFO TAG标记的MCP-1抗体,并且在30℃下孵育1小时,然后洗涤。立即将Read Buffer T(x4)(Meso Scale Discovery)添加至板,并且信号通过SECTOR Imager 2400(Meso Scale Discovery)来进行检测。使用分析软件SOFTmax PRO(Molecular Devices)基于校准曲线的响应计算食蟹猴CCL2浓度。

[1295] 将游离CCL2血清样品用未经验证但合格的GyrolabTM免疫测定在Gyrolab Xplore上进行分析。使用生物素化的抗CCL2抗体(M-2F6-IgG)作为捕获试剂,并选择Alexa647标记的抗CCL2抗体(M-1H11-IgG)进行检测。将两种试剂在PBS、0.1% Tween、1% BSA中稀释至1 μ g/mL,并转移至96孔PCR板(Fisher Scientific)。食蟹猴CCL2校准曲线样品、QC和未稀释血清样品也转移到96孔PCR板中。两块板均与Gyrolab Bioaffy 200nl盘(Gyros Protein Technologies AB)一起加载至仪器。选择三步测定方案(200-3W-001)。简而言之,该方案描述了在Gyrolab Bio Affy 200盘的指定链霉亲和素柱中依次添加捕获试剂、样品和检测试剂。每个试剂在向圆盘施用的短暂的旋转步骤后同时到达柱子。每一步后用PBS 0.05% Tween洗涤柱子,并且最后在仪器内记录激光诱导荧光值。使用XL Fit软件(IDBS)基于校准曲线的响应计算游离食蟹猴CCL2浓度。

[1296] ADA使用其他地方描述的方法来进行分析(Stubenrauch等人,2010)。总之,生物素化的mAb抗人Fc γ -pan R10Z8E9以0.5 μ g/mL的浓度与链霉亲和素包被的高结合板结合,并

且孵育1h。将样品和标准品用测定缓冲液稀释至5%食蟹猴血清,并在洗涤后添加至包被板的每个孔,并且振荡孵育1h。洗涤后,添加0.1 $\mu\text{g/mL}$ 下的地高辛化抗食蟹猴(cyno) IgG,并振荡孵育1h。洗涤后,添加25mU/mL下的多克隆抗地高辛-HRP缀合物,并振荡孵育1h。将ABTS添加至板上,并在室温下振荡孵育10分钟。由酶标仪在405/490nm波长处测量吸收。使用分析软件SOFTmax PRO(Molecular Devices)基于校准曲线的响应计算ADA浓度。

[1297] 结果。在动物不含ADA期间(即第14天之前)评估PK行为。在该时间段期间,所有抗CCL2抗体的血清浓度-时间曲线为类似的(参见图11左侧),并且对于第1组、第2组、第3组和第4组,部分平均AUC值($\text{AUC}_{0-7\text{d}}$)在不同组之间具有可比性,其分别为1490天 $\cdot\mu\text{g/mL}$ 、1810天 $\cdot\mu\text{g/mL}$ 、1210天 $\cdot\mu\text{g/mL}$ 和1320天 $\cdot\mu\text{g/mL}$ 。类似地,对于第1组、第2组、第4组和第4组,平均 C_{max} 值分别与620 $\mu\text{g/mL}$ 、764 $\mu\text{g/mL}$ 、616 $\mu\text{g/mL}$ 和664 $\mu\text{g/mL}$ 的值具有可比性。ADA发育的程度在动物和群体之间为高度可变的,并且导致超过第7天之后高度可变的PK曲线(数据未示出)。来自第2组的一只动物在整个70天的观察期内呈ADA阴性(参见图11右侧)。在该动物中,通过非房室分析估计抗CCL2抗体的清除率、分布体积和终末半衰期分别为7.34mL/(天 $\cdot\text{kg}$)、76.2mL/kg和10.9天。

[1298] 在开始抗体治疗之前,针对每只动物评估了血清中CCL2的基线水平。基础CCL2水平范围为0.126ng/mL至0.357ng/mL(几何平均值(%CV):0.199ng/mL(32.2%, $N=14$))。由于游离形式的CCL2比抗体结合形式的CCL2具有更高的消除率,因此预期在抗体治疗后总CCL2血清浓度会增加。这确实在所有组中均观察到(图12左侧),从而证明所有抗体均接合了靶标。在治疗下,对于第1组、第2组、第3组和第4组,总CCL2的 C_{max} 值分别增加至824ng/mL、575ng/mL、106ng/mL、32.7ng/mL。对于第1组、第2组、第3组和第4组, $\text{AUC}_{0-7\text{d}}$ 值分别为3060天 $\cdot\text{ng/mL}$ 、2970天 $\cdot\text{ng/mL}$ 、522天 $\cdot\text{ng/mL}$ 和181天 $\cdot\text{ng/mL}$ 。在动物呈ADA阴性期间,摩尔药物浓度仍然超过总CCL2浓度。与传统抗体(第1组)相比,两种扫集抗CCL2抗体(第3组和第4组)示出了总CCL2血清浓度大幅减少,基于血清 C_{max} 值,分别为大约8分之一和25分之一;并且基于总CCL2的 $\text{AUC}_{0-7\text{d}}$ 值,分别为大约6分之一至17分之一。第2组的ADA阴性动物展示出总CCL2浓度的持续靶标接合(通过平台而明显地表现出来)(图12右侧)。

[1299] 用所有抗体进行治疗均导致血清中的游离CCL2水平显著减少(图13左侧),但最初仅部分降低。在第1组中,所有个体在一天后再次具有了可定量水平的游离CCL2。在第2组中,所有个体在两天后再次具有了可定量水平的游离CCL2。在第3组和第4组中,每个组的两个个体示出了持续七天的对游离CCL2的抑制。在第3组中,两只具有中等ADA响应(保持足够的抗体浓度)的动物示出了持续21天的低于检测限的游离CCL2抑制。在ADA阳性动物中,抗体消除显著增加,并且由于靶标接合的损失,因此CCL2水平迅速回到它们的原始基线(此处未示出)。

[1300] 在另外的类似实验中,分析了其他变体,如CKL02-SG1099、CKL02-GG01、GG02和GG03/GG04。

[1301] 食蟹猴中CCL2扫集效率的PK/PD研究

[1302] 研究纲要和目的。PK/PD研究基于使用抗CCL2抗体CKL02-SG1095的POC研究结果来进行设计。由于POC研究已经证明了抗药物抗体(ADA)形成程度较高,因此将Gazyva®(obinituzumab)治疗包含在PK/PD研究中,旨在减少ADA响应。为了该目的,在整个研究过程中,通过静脉内输注四次施用30mg/kg剂量的Gazyva:在第-14天、第-7天、第8天和第36天。

在第1天以2.5mg/kg、10mg/kg和25mg/kg剂量水平向每个剂量组的四只动物(2/2雄性和雌性)施用CKL02-SG1095,其方式为进行30分钟内的IV输注(第1组至第3组)。为了进行比较,在第1天以25mg/kg的剂量施用常规抗CCL2抗体(CNT0888-IgG1),其方式为进行30分钟内的IV输注(第4组;与上述POC研究的第1组相同的对照)。评估总PK(CKL02-SG1095)、总CCL2浓度和游离CCL2浓度,直至第99天(即,给药后14周)。

[1303] PK/PD研究的目的是证明在非人灵长类动物中,与常规抗CCL2抗体(具有野生型IgG1 Fc部分的CNT0888)相比,CKL02-SG1095的游离CCL2抑制持续时间得到延长。

[1304] 方法。在本研究中,对总PK以及总CCL2和游离CCL2进行了定量。然而,由于血清样品中存在Gazyva,与POC研究相比,对总PK测定、总CCL2测定和ADA测定进行了一些修改,这些在本文中描述。对于CNT0888IgG1,未开发PK测定。

[1305] 通过ELISA来测量猴血清中的总抗体CKL02-SG1095浓度。对于ELISA,将生物素化的重组人CCL2(抗原)、预处理的测试样品、阳性对照标准品(校准品)或QC(质量控制)以及地高辛化抗人IgG(M-1.19.31-IgG)依次添加至384孔链霉亲和素包被的微孔板(SA-MTP)。为了解离CCL2-药物复合物,在pH 5.5对测试样品执行预处理20分钟。在添加至SA-MTP之前,酸化样品被中和。固定化免疫复合物用多克隆抗地高辛-POD缀合物进行检测。在每一步之后,将板洗涤三次,以去除未结合的物质。将ABTS作为底物添加至板,并且在室温下孵育。在405/490nm波长处测量吸收。使用分析软件XLFit(IDBS)基于校准曲线的响应计算抗体浓度。

[1306] 将总CCL2血清样品用未经验证但合格的特异性夹心ELISA进行分析。简而言之,将生物素化的抗CCL2捕获抗体*、预处理的测试样品和检测试剂(地高辛化抗CCL2抗体(1H11-IgG1))逐步添加至384孔链霉亲和素包被的微孔板,并且在非强力摇床上分别孵育1小时(对于捕获和样品步骤)和50分钟(对于检测试剂)。为了在预处理步骤中解离CCL2-药物复合物,将样品、校准品或QC在pH 5.5酸化20分钟。将酸化样品添加至SA-MTP。对于固定化免疫复合物的检测,添加多克隆抗地高辛-POD缀合物,并将板孵育50分钟。在每一步之后,将板洗涤三次,以去除未结合的物质。

[1307] 将ABTS添加至板上,并在室温下振荡孵育。在405/490nm波长处测量吸收。使用分析软件XLFit(IDBS)基于校准曲线的响应计算食蟹猴CCL2浓度。*用于第1组至第3组的分析的捕获抗体:抗CCL2 CNT0888 IgG1,用于第4组的分析的捕获抗体:抗CCL2 2F2 IgG1。

[1308] 在384孔板中用桥接夹心ELISA筛选ADA。将第1组、第2组和第3组动物的测试样品、质量控制样品和阳性对照与生物素化的捕获抗体CKL02-SG1095和地高辛化检测抗体CKL02-SG1095连同两种另外的抗CCL2抗体(2F6-IgG1和1H11-IgG1)在MTP摇床上于室温、500rpm下一起孵育过夜;添加这些抗体以中和CCL2。对于第4组的动物样品,分别使用生物素标记的CNT0888-SG1和地高辛化CNT0888-SG1。将所形成的免疫复合物转移至链霉亲和素(SA)包被的MTP,以经由生物素标记(Bi)捕获抗体来将免疫复合物固定化。抽吸上清液后,通过重复洗涤来去除未结合的物质。通过添加抗地高辛POD(p)缀合抗体和ABTS底物溶液来完成检测。以光度测定的方式确定反应的颜色强度(405nm至490nm参考波长处的吸收)。如果发现信号高于板特定的分割点,则样品被定义为ADA阳性。该切割点在测定鉴定期间被定义。

[1309] 结果。尽管进行了Gazyva®(obinituzumab)预处理,CKL02-SG1095治疗的12只动

物中的10只动物以及CNT0888治疗的4只动物中的1只动物仍出现了ADA,其对药物浓度和生物标志物浓度产生影响。然而,CKL02-SG1095的两只ADA阴性动物在25mg/kg剂量组中,从而允许与CNT0888组的ADA阴性动物进行直接比较。在动物不含ADA期间(即第10天之前)评估PK行为。CKL02-SG1095的三个不同剂量组的PK曲线在图14左侧中示出。对于剂量水平2.5mg/kg、10mg/kg和25mg/kg,部分平均AUC值(AUC_{0-7d})分别为229/191天· $\mu\text{g/mL}$ (男性/女性)、696/813天· $\mu\text{g/mL}$ 和1492/1346天· $\mu\text{g/mL}$ 。对于剂量水平2.5mg/kg、10mg/kg和25mg/kg, C_{max} 值分别为115/122 $\mu\text{g/mL}$ (男性/女性)、369/491 $\mu\text{g/mL}$ 和869/941 $\mu\text{g/mL}$ 。在最高剂量水平下,这些发现与POC研究一致。对于两只ADA阴性动物,通过非房室分析估计CKL02-SG1095的清除率、分布体积和终末半衰期分别为10.5mL/(天·kg)至17.4mL/(天·kg)、116mL/kg至118mL/kg和5.8天至11.6天(参见图14右侧)。

[1310] 至于上述POC研究,在用抗CCL2抗体进行处理后观察到总CCL2的积累(参见图15左侧)。在施用药物之前,五次评估CCL2的基线水平(包括Gazyva® (obinituzumab)治疗之前一次);平均CCL2基线值为0.742ng/mL,并且Gazyva® (obinituzumab)治疗不影响基础CCL2水平。总CCL2积累的程度(括号中的值指示相对于个体基线的中值倍数变化)为剂量和构建体依赖性的。对于CKL02-SG1095,对于2.5mg/kg、10mg/kg和25mg/kg剂量水平,总CCL2水平增加至22.4 (22) ng/mL、67.2 (105) ng/mL和54.9 (76) ng/mL(四只动物的中值)。对于CNT0888 IgG1,总CCL2水平增加至1490 (3160) ng/mL(4只动物的中值)。第3组和第4组的ADA阴性动物的比较示出,与CNT0888相比,对于CKL02-SG1095,积累水平相当低(图15右侧)。

[1311] 所有研究组的治疗均导致血清中的游离CCL2水平显著、瞬时减少(参见图16左侧;通常低于检测限(0.01ng/mL))。对于所有ADA阳性动物,在出现ADA后,游离CCL2水平迅速回到基线值(与药物暴露的损失和迅速靶标周转一致)。对于ADA阴性动物(第3组中的2/4)和(第4组中的3/4),可以在整个研究期间评估游离CCL2抑制的持续时间。对于常规抗体CNT0888(第4组),CCL2抑制的持续时间较短,大概是由于总靶标的广泛积累(图15)。虽然未对药物浓度进行定量(没有可用于CNT0888的具体测定),但POC研究表明CNT0888与CKL02-SG1095之间具有类似的PK特性。另一方面,对于第3组的两只ADA阴性动物,观察到持久的游离CCL2抑制。对于一只动物,游离CCL2水平保持低于检测限,持续29天(图16右侧)。

[1312] 在另外的类似实验中,分析了其他变体,如CKL02-SG1099、CKL02-GG01、GG02和GG03/GG04。

[1313] CCL2在不同肿瘤类型中的患病率研究

[1314] 对6种不同适应症的121份人类匹配肿瘤和血清样品执行以下CCL2及其受体CCR2的IHC患病率研究(包括使用CD163/CD68和CD14的巨噬细胞分析):

[1315] 胰腺癌(PaC)

[1316] 结直肠癌(CRC)

[1317] 乳腺癌(BC)

[1318] 前列腺癌(PrC)

[1319] 卵巢癌(OvC)

[1320] 胃癌(GC)

[1321] 解决了以下问题:

[1322] • 这些肿瘤是否(过度)表达CCL2?

- [1323] • 在这些肿瘤患者中血液CCL2水平是否升高?
- [1324] • 血液CCL2水平与肿瘤CCL2水平之间是否存在相关性?
- [1325] • 肿瘤CCL2免疫细胞与浸润性CCR2⁺免疫细胞之间是否存在相关性?
- [1326] • 肿瘤CCL2骨髓细胞与浸润性骨髓细胞之间是否存在相关性?

[1327] 材料和方法

[1328] 半定量地完成组织病理学评分。此外,将自动化多重图像分析用于CD163/CD68 IHC,并测试其CD14和CCR2,以用于免疫细胞定量并用于CCL2定量。

[1329] 对6种不同适应症的121份人类肿瘤的一组切除标本执行了免疫组织学研究:31份胰腺癌(PaC)、30份结直肠癌(CRC)、30份乳腺癌(BC)、29份前列腺癌(PrC)、20份卵巢癌(OvC)和10份胃癌(GC),其由Indivumed (Hamburg)和Asterand (Royston/Herts,UK)提供。将肿瘤固定在4%缓冲甲醛中,进行石蜡包埋,切割成2.5μm厚度,并且安装在Superfrost Plus载玻片上。按照标准染色方案(对于32'为CC1,在VBX中的浓度为1μg/mL,Optiview DAB检测系统),在Ventana BXT上使用针对CCL2的小鼠单克隆抗体(克隆2D8,Novusbio NBP2-22115)。按照标准染色方案(对于32'为CC1,在DS2中的浓度为0.8ug/ml,Omni-UltraMap HRP DAB检测系统)在Ventana Discovery XT上使用针对CCR2的兔单克隆抗体(E68,Abcam ab32144)。按照标准染色方案(对于64'为CC1,Omni-UltraMap HRP DAB检测系统检测系统),在Ventana Discovery Ultra上使用针对单核细胞标志物CD14的小鼠单克隆抗体(Cell Marque EPR3653,RTU)。按照标准染色方案(对于32'为CC1,CD163 RTU//CD68在DS2中的浓度为0.6μg/ml,用DAB和Red检测系统进行检测),在Ventana BXT上使用针对巨噬细胞和M2样TAM(肿瘤相关巨噬细胞)CD163/CD68(DAB CD163小鼠MRQ-26Cell Marque RTU//红色CD68小鼠PG-M1 Dako)的双重染色。所有图像均使用Ventana iScanHT®来进行扫描。对组织切片进行半定量分析。

[1330] 1. 结果

[1331] CCL2和CCR2患病率

[1332] 所有经分析的肿瘤适应症均示出了一些肿瘤,该肿瘤具有不同水平下的CCL2上调并且TAM上存在不同量的CCR2(下表6)。对于CCL2和CCR2两者,观察到在卵巢癌中的最高表达,其次为PDAC和GC

[1333] 肿瘤类型特异性特征

[1334] 具有CCL2-CCR2的高活性的肿瘤(其与高MDSC吸引和M2极化的肿瘤生长增强免疫状态相关联)代表了用于CCL2阻断治疗的优选肿瘤。CCR2 IHC示出了与MDSC和M2样巨噬细胞的良好相关性,这证实了其生物学作用,并且证明了与CCL2 IHC测量相比,它作为用于该途径的生物标志物具有更高的关联性。从本研究得出结论,可以总结出对于CCL2疗法的以下建议:

- [1335] • 由于CCL2和CCR2患病率最高以及M2极化,因此OvC可以被推荐用于CCL2靶向疗法;
- [1336] • 由于与其他经分析的肿瘤类型相比,其MDSC的量最高,并且因为CCR2和M2以相当高的水平和量存在,因此PDAC可以被推荐用于CCL2靶向疗法。CCL2在PDAC中也很高,并且与其他肿瘤类型相比,其示出了相比于在肿瘤细胞中,高得多的在免疫细胞中的存在量。PaC在CCL2/CCR2与MDSC吸引/M2极化之间示出了非常好的相关性。这些结果支持在经分析

的PDAC中,CCL2-CCR2的作用高度集中在免疫细胞吸引上。

[1337] • BC,尤其是TNBC,可以被推荐用于CCL2靶向疗法:BC示出了相当高的水平和量下的CCL2、CCR2、MDSC和M2。尤其是TNBC病例以M2和MDSC量高于非TNBC为特征,尽管与其他肿瘤适应症相比,非TNBC在肿瘤细胞中示出了最高的CCL2生产。

[1338] 以下肿瘤适应症似乎不太依赖于CCL2-CCR2轴,并且因此可能不太被推荐用于CCL2靶向疗法:

[1339] • CRC:与其他肿瘤类型相比,CCL2较低,尤其是当与PaC相比时。同样在此处,与其他肿瘤类型相比,测量到量最低的M2样巨噬细胞。CCR2和MDSC以不同的量存在。有趣的是,仅在该适应症中,可检测到CCL2与CCR2之间的正相关趋势。然而,总体研究结果表明在CRC中,CCL2-CCR2的作用集中在肿瘤细胞存活上,而不是集中在免疫细胞吸引上。

[1340] • 尽管对于CCL2为较高的,但观察到对于CCR2,GC为较低的,并且示出了最低量的MDSC。M2样巨噬细胞以不同的量存在。

[1341] 表6:在本研究中分析的不同肿瘤类型的肿瘤细胞(TC)和免疫细胞(IC)中的CCL2和CCR2阳性表达。

[1342]

肿瘤类型:	CCL2					CCR2		
	在肿瘤细胞中(TC) (手动评分)			在免疫细胞中(TC) (手动评分)		在免疫细胞中 (手动评分)		
	阳性 病例的 %	中等至 高阳性 病例的 %	平均评分	阳性 病例的 %	平均评分	阳性 病例的 %	中等至 高阳性 病例的 %	平均评分
OvC	100%	42%	1.3	100%	0.9	100%	63	1.7
PaC	90%	9%	0.8 (PDAC 0.8 和 PNET 0.9)	97%	2.0 (PDAC 2.2 和 PNET 0.6)	90%	55	1.5 (PDAC 1.7 和 PNET 0.3)
GC	91%	45%	1.3	91%	1.9	91%	18	0.8
BC	78%	46%	1.1 (TNBC 0.9, 非 TNBC 1.6)	61%	0.6 (TNBC 0.5, 非 TNBC 0.9)	96%	38	1.3 (TNBC 1.2, 非 TNBC 1.5)
CRC	76%	24%	0.8	72%	0.7	96%	39	1.2
PrC	72%	10%	0.7	79%	0.5	72%	10	0.6

[1343] • 在PrC中,CCR2以不同的水平存在。(未测量M2和MDSC)

[1344] 相关性分析

[1345] 研究结果可以总结如下:

[1346] • 在肿瘤CCL2与CCR2(IHC)之间,仅有的正相关性存在于CRC中。

[1347] • 血清CCL2(ELISA)与肿瘤中的任何测量参数(包括CCL2、CCR2、巨噬细胞和MDSC)均不相关。仅在PrC中发现与肿瘤CCL2呈正相关趋势,其中两种方法均示出非常低的值。

[1348] • CCR2表达与M2样巨噬细胞和CD14⁺细胞的存在呈正相关,并且与M1/M2比率呈负相关,并且证实了CCR2的生物学作用。CCR2的水平与M2极化的相关性比与MDSC吸引的相关性更佳。

[1349] • CCL2示出了与MDSC吸引和M2极化的正相关趋势。因此,单独的CCL2水平似乎并不是MDSC和M2样极化的存在的主要因素。

[1350] 实例C-1具有经修饰的可变结构域和CDR(离子依赖性/pH依赖性结合)和Fc介导的扫集的双特异性扭曲体

[1351] 用Fc γ RIIb增强型Fc变体和进一步的Fc修饰来生成呈扭曲体形式的双原位旁抗

CCL2抗体(双特异性抗CCL2扭曲体)

[1352] 用在呈扭曲体(CB)形式的Fc部分的位置处的突变(EU Kabat编号),生成了双特异性抗CCL2抗体的以下IgG1恒定结构域/Fc变体。包含形式“扭曲体”(CB)的该Fc结构域例如描述于Guy J.Georges等人,Computational and Structural Biotechnology Journal第18卷,2020,第1210-1220页。

[1353] 因此,使用所描述的方法,例如在实例B-1下,但使用序列SEQ ID NO:175至SEQ ID NO:182,生成了以下双特异性抗体(扭曲体):

[1354] P1AF8142(CKL02-CB-SG1095) - (示例性双特异性CKL02扭曲体(CB),其仅包含含有SG1095 Fc突变的2条多肽链)

[1355] SEQ ID NO:175 重链1-CKL02-CB-SG1095

[1356] SEQ ID NO:176 重链2-CKL02-CB-SG1095

[1357] P1AF8143(CKL02-CB-GG02) - (示例性双特异性CKL02扭曲体(CB),其仅包含含有GG02 Fc突变的2条多肽链)

[1358] SEQ ID NO:177 重链1-CKL02-CB-GG02

[1359] SEQ ID NO:178 重链2-CKL02-CB-GG02

[1360] P1AG5853(CKL02-CB-GG02-K447G) - (示例性双特异性CKL02扭曲体(CB),其仅包含含有GG02 Fc突变和突变K447G的2条多肽链)

[1361] SEQ ID NO:179 重链1-CKL02-CB-GG02-KG

[1362] SEQ ID NO:180 重链2-CKL02-CB-GG02-KG

[1363] P1AG8317(CKL02-CB-SG1095-K447G) - (示例性双特异性CKL02扭曲体(CB),其仅包含含有SG1095 Fc突变和突变K447G的2条多肽链)

[1364] SEQ ID NO:181 重链1-CKL02-CB-SG1095

[1365] SEQ ID NO:182 重链2-CKL02-CB-SG1095

[1366] 类似地,变体CKL01和CKL03至CKL016的扭曲体用野生型(wt)Fc(包含异源二聚化培育突变,如例如杵臼结构)或如本文所述的其他Fc变体而生成。

[1367] 双原位旁抗CCL2抗体的纯化

[1368] 含有细胞培养上清液的双原位旁抗CCL2抗体通过至多三个色谱步骤来进行过滤和纯化。取决于捕获步骤洗脱液的纯度,任选地在捕获与精制步骤之间实施了离子交换色谱步骤。

[1369] 使用CaptureSelect IgG-CH1亲和矩阵(Thermofisher Scientific)、POROS XS(Thermofisher Scientific)和Superdex 200尺寸排阻(GE Healthcare,Sweden)色谱法,通过亲和色谱法从细胞培养上清液中纯化双原位旁抗CCL2抗体。简而言之,将无菌过滤的细胞培养上清液捕获在用PBS缓冲液(10mM Na₂HPO₄、1mM KH₂PO₄、137mM NaCl和2.7mM KCl,pH 7.4)平衡的IgG-CH1树脂上,用平衡缓冲液洗涤并用pH 3.0的25mM柠檬酸钠洗脱。将洗脱的蛋白级分合并,并用2M Tris(pH 9.0)中和。

[1370] 用POROS XS(Thermofisher Scientific)执行离子交换色谱法作为任选的第二纯化步骤,用40mM乙酸钠(pH 5.5)进行平衡和洗涤,并且加载经稀释的捕获步骤洗脱液,用1M乙酸钠在pH 5.5完成梯度色谱法。离子交换色谱级分通过CE-SDS LabChip GX II(PerkinElmer)来进行分析,并且合并含有Crossmab的级分。

[1371] Superdex 200 (GE Healthcare) 上的尺寸排阻色谱法用作第二或第三纯化步骤。尺寸排阻层析在20mM组氨酸缓冲液、0.14M NaCl、pH 6.0中进行。尺寸排阻色谱级分通过CE-SDS LabChip GX II (PerkinElmer) 来进行分析,并且将含有Crossmab的级分合并并且储存在-80℃下。

[1372] 在Superdex 200 (GE Healthcare) 上的POROS XS (ThermoFisher Scientific) 尺寸排阻色谱法被20mM组氨酸缓冲液、0.14M NaCl (pH 6.0) 中的HiPrep26/10Desalting (GE Healthcare) 上的脱盐色谱法替换后,产品质量令人满意的情况下。

[1373] 使用基于氨基酸序列计算的摩尔消光系数,通过测量280nm处的光密度(OD) 来确定抗体制剂的蛋白质浓度。

[1374] 使用具有Protein Express芯片和HT Protein Express Reagents试剂盒的LabChip GX II (PerkinElmer),通过CE-SDS来分析抗体的纯度和完整性。抗体制剂的聚集体含量使用Biosuite高分辨率SEC、250 Å、5μm分析尺寸排阻柱 (Waters GmbH),使用200mM K₂HPO₄/KH₂PO₄、250mM KCl (pH 7.0) 作为运行缓冲液,通过高性能SEC来进行确定。如通过CE-SDS所分析,平均纯度在94%至100%之间,并且单体含量>95% (SEC)。

[1375] 具有经修饰的可变结构域和CDR (离子依赖性/pH依赖性结合) 以及经修饰的Fc结构域的双特异性抗CCL2扭曲体的功能性表征

[1376] 扭曲体P1AF8142 (CKL02-CB-SG1095)、P1AF8143 (CKL02-CB-GG02)、P1AG5853 (CKL02-CB-GG02-K447G) 的表面等离子体共振 (SPR) -CCL2结合 (与crossmab相比)

[1377] 通过表面等离子体共振 (SPR) 评估的与CCL2抗原的结合

[1378] 双特异性抗体的总体架构对Fab部分的结合没有显著影响。

[1379] 材料和方法 (Mat和Meth) -SPR

[1380] SPR测量在Biacore 8K仪器 (GE Healthcare/Cytiva) 处完成。在第一步骤中,制备CM3芯片 (S系列传感器芯片CM3, GE Healthcare/Cytiva),并且将抗κ抗体 (抗κselect, Thermo Fischer) 作为捕获分子进行固定化 (10μg/ml, 280s, 流速10μl/min, pH 4.5)。

[1381] 随后,抗体构建体以5nM的浓度和120s的缔合时间,以5μl/min与固定化抗κ抗体结合 (固定化缓冲液HBS-N: 0.01M HEPES、0.15M NaCl, pH 7.4; GE Healthcare/cytiva BR-1006-70)。在下一步骤中,CCL2抗原作为分析物以一定的浓度系列 (0-100nM) 以50μl/min的流速进行注射。缔合时间为120s,解离时间为600s。作为再生溶液,以30μl/min的流速注射10mM甘氨酸 (pH 1.5),持续60s。

[1382] 主要运行进行两次:一次运行用在pH 7.4的运行缓冲液PBS-P+ (0.02M磷酸盐缓冲液、2.7mM KCl、137mM NaCl、0.05% (v/v) 表面活性剂P20; GE Healthcare/Cytiva 28995084),并且第二次运行用在pH 5.8的PBS-P+。所有测量均在25℃下执行。

[1383] 为了进行评估,计算了 $t_{1/2}$ (=与抗体结合的抗原的解离半衰期) 和 R_{max} 。

[1384] 测量了不同构建体 (Crossmab和扭曲体) 与单体人CCL2和食蟹猴CCL2的结合。结果如下表所示。

[1385] 类似地,在另外的实验中,分析了P1AG5853和P1AG8317并且示出了结果。

[1386] 表:单体人CCL2和食蟹猴CCL2的结合

[1387]

抗体	抗原	Rmax (RU) @ pH 7.4	t 1/2 (s) @ pH 7.4	Rmax (RU) @ pH 5.8	t 1/2 (s) @ pH 5.8
P1AD8325	单体人 CCL2	6.0	106.8	9.1	4.6
CNTO888-IgG1	单体人 CCL2	4.4	2125.8	5.1	366.5
P1AF8137	单体人 CCL2	5.9	96.7	8.5	4.8
P1AF8139	单体人 CCL2	5.1	271.9	7.4	5.2
P1AF8140	单体人 CCL2	5.4	84.1	8.6	4.9
P1AF8142	单体人 CCL2	4.3	130.1	4.2	5.7
P1AF8143	单体人 CCL2	3.7	257.5	4.6	4.6
P1AD8325	单体食蟹猴 CCL2	5.5	289.6	6.9	2.8
CNTO888-IgG1	单体食蟹猴 CCL2	4.8	2627.9	5.7	421.8
P1AF8137	单体食蟹猴 CCL2	5.4	296.0	5.8	3.1
P1AF8139	单体食蟹猴 CCL2	4.9	345.1	7.2	2.6
P1AF8140	单体食蟹猴 CCL2	4.9	294.3	5.1	3.4
P1AF8142	单体食蟹猴 CCL2	3.9	284.1	1.9	0.0
P1AF8143	单体食蟹猴 CCL2	3.5	276.3	2.5	3.1

[1388] 对在pH 5.8的结合的评估会导致对于所有双特异性抗体结合的损失。

[1389] 通过表面等离子体共振 (SPR) 与FcRn的结合

[1390] 所有双特异性分子在低pH均示出了与FcRn受体的良好结合亲和力,并且在生理pH 7.4均示出了大大减少的结合亲和力。然后,所有双特异性抗体在内体中的酸性pH值结合FcRn,并且然后重新洗牌离开细胞。

[1391] SPR测量在Biacore 8K仪器 (GE Healthcare/Cytiva) 处完成。在第一步骤中,制备SA芯片 (GE Healthcare/Cytiva),并且生物素化的配体人单链FcRn(sc huFcRn)通过与链霉亲和素的非共价捕获结合来进行固定化 (90s,流速10 μ l/min,HBS-EP+缓冲液:0.01M HEPES、0.15M NaCl、0.003M EDTA、0.05% (v/v) 表面活性剂P20) 以达到500RU的sc huFcRn水平。随后,抗体构建体以50nM的浓度、90s的缔合时间和240s的解离时间以30 μ l/min的流速在1x PBS中在三种不同的pH值5、6和7.4与固定化sc huFcRn-Bi结合 (PBS-P+:0.02M磷酸盐缓冲液、2.7mM KCl、137mM NaCl、0.05% (v/v) 表面活性剂P20)。所有测量均在25℃下执行。

[1392] 位于缔合阶段结束处的报告点“结合”被读出。评估了芯片上每1RU sc huFcRn的经结合的抗体构建体的量[RU]。类似地,在另外的实验中,分析了P1AG5853和P1AG8317并且示出了结果。

[1393] 表SPR-FcRn结合

		每 1RU FcRn 表面的 Ab 结合量 (RU)		
抗体 (捕获水平: 500 RU)		@ pH 5	@ pH 6	@ pH 7.4
[1394]	P1AD8325	1.16	0.90	0.13
	P1AF8137	1.18	0.85	0.09
	P1AF8139	1.27	1.07	0.34
	P1AF8140	1.20	0.92	0.15
	P1AF8142	1.16	0.82	0.08
[1395]	P1AF8143	1.18	0.89	0.18
	CNT0888-IgG1	0.90	0.35	0.00
	CKLO2-SG1	1.02	0.56	0.00
	CKLO2-SG1100	1.18	0.97	0.15

[1396] 通过SPR与Fc γ 受体的结合

[1397] 所有双特异性抗体均进行工程化以增强与Fc γ RIIb的结合,该Fc γ RIIb为与所有其他Fc γ 受体相反的、生成抑制信号的受体。因此,双特异性抗体旨在被良好地摄取至细胞

中而不生成活化信号。

[1398] SPR测量在Biacore T200 (GE Healthcare/Cytiva) 处完成。使用EDC/NHS偶联化学(胺偶联试剂盒, GE Healthcare/Cytiva), 将蛋白L (Pierce#21189) 固定在CM5生物传感器芯片 (GE Healthcare/Cytiva) 上。为了该目的, 将其稀释在10mM乙酸钠缓冲液 (pH 4.0) 中, 并且以10 μ l/min的流速注射至两个流动池中, 持续600s。固定化和之后的捕获结合测定在25 $^{\circ}$ C的温度进行测量。使用PBS-P (0.02M磷酸盐缓冲液、2.7mM KCl、137mM NaCl pH 7.4、0.05% v/v表面活性剂P20) 作为运行和稀释缓冲液。

[1399] 在第一步骤中, 以10 μ l/min的流速注射抗体样品120s, 目标为实现1000RU捕获水平。在第二步骤中, 单体Fc γ 受体 (Fc γ RIIa、Fc γ RIIb或Fc γ RIIIa) 以5 μ g/ml的浓度以10 μ l/min的流速注射90s。

[1400] 位于缔合阶段结束处的报告点“结合”被读出。计算了每1RU抗体的Fc γ 受体结合量 (RU)。

[1401] 表SPR-Fc γ R

	抗体 (捕获水平: 1000 RU)	Fc γ 受体	每 1 RU Ab 的 hFc γ R 的结合量 (RU)
[1402]	P1AD8325	Fc γ RIIa	0.042
		Fc γ RIIb	0.049

[1403]

	FcγRIIIa	-0.001
P1AF8137	FcγRIIa	0.002
	FcγRIIb	0.051
	FcγRIIIa	0.000
P1AF8139	FcγRIIa	0.002
	FcγRIIb	0.056
	FcγRIIIa	0.000
P1AF8140	FcγRIIa	0.003
	FcγRIIb	0.059
	FcγRIIIa	0.000
P1AF8142	FcγRIIa	0.070
	FcγRIIb	0.074
	FcγRIIIa	0.002
P1AF8143	FcγRIIa	0.003
	FcγRIIb	0.033
	FcγRIIIa	0.001
CKLO2-SG1	FcγRIIa	0.028
	FcγRIIb	0.007
	FcγRIIIa	0.017
CKLO2-SG1100	FcγRIIa	0.038

[1404]		Fc γ RIIb	0.010
		Fc γ RIIIa	0.020
	CNT0888-IgG1	Fc γ RIIa	0.003
		Fc γ RIIb	0.000
		Fc γ RIIIa	0.001

[1405] <CCL2>抗体不识别活化受体(如Fc γ RIIa),但对Fc γ RIIb具有经增强的亲和力。此外,分子P1AF8137、P1AF8139、P1AF8140和P1AF8143示出了对Fc γ RIIb与Fc γ RIIa的选择性,而分子P1AD8325和P1AF8142未示出。两组分子属于两种不同类型的Fc部分的工程化。

[1406] 在Y形双特异性抗体与扭曲体之间,铰链区周围的几何形状可能为不同的。与Fc γ R的结合似乎并未受到该构象修饰的大幅影响。

[1407] 类似地,在另外的实验中,分析了P1AG5853和P1AG8317,并且对于不同的Fc γ R示出了结果。

[1408] 趋化性测定

[1409] 在如B-3下所述的其他另外地类似实验中,已经(或即将)确定P1AF8142 (CKL02-CB-SG1095)、P1AF8143 (CKL02-CB-GG02)、P1AG5853 (CKL02-CB-GG02-K447G)的IC₅₀值如下:

[1410] P1AF8142 (0.2 μ g/ml)、P1AF8143 (0.6 μ g/ml)、P1AG5853(待确定)。

[1411] 而且,如实例B-3所述,类似地确定经基因修饰的小鼠模型中的体内生物活性和/或食蟹猴中的CCL2扫集效率

[1412] 可集中性 (Concentrability) 和粘度

[1413] 在药物旨在进行皮下应用和/或需要高浓度以中和其靶标的情况下,分子的粘度和可集中性为重要因素。对于双特异性抗体,已经研究了高浓度。在浓度高于200mg/L时,蛋白质可以示出更高的形成聚集体并最终形成沉淀物的倾向。为了用作注射剂,粘度的测量结果为更相关的参数。绘制了粘度与浓度范围的关系图,以便导出最大浓度(<15cP) (对于该最大浓度,粘度仍为可接受的);下表示出了该值。与crossmab P1AD8325相比,扭曲体P1AF8142示出了最大浓度增加38%;两种化合物均具有相同的Fab和Fc部分,但扭曲体形式更紧凑并且对于相同粘度会产生更高的浓度。

[1414] 表15 cP的粘度下的最大浓度 (在20℃下)

[1415]

化合物	最大浓度 15 cP (20°C)
P1AD8325	81 mg/ml
P1AF8142	112 mg/ml
P1AF8139	115 mg/ml
P1AF8143	183 mg/ml

[1416] 与分子P1AF8139(相应的crossmab)相比,化合物P1AF8143示出了在15cP下的最大浓度增加约60%。因此,扭曲体架构显著增强了生物物理特性。

[1417] 材料和方法粘度测量

[1418] 在Amicon离心过滤装置(10K)中将样品进行缓冲液更换为20mM组氨酸缓冲液(pH 6.0),并且以14000x g浓缩。高度浓缩的储备溶液使用分析天平来进行稀释,以便通过UV测量来确定浓度(在NanoDrop 8000UV-Vis分光光度计上重复三次)。

[1419] 对于DLS测量(Wyatt DLS DynaPro读板仪),样品在体积为15μl的缓冲液中进行制备,该缓冲液含有最终浓度为0.02%的Tween20和最终浓度为0.03%的珠粒。1%珠粒储备溶液(纳米级微球颗粒标准品,Thermo Scientific,公称直径:300nm,平均直径(NIST可追溯):296±6nm,尺寸分布:5.3nm-标准差:1.8%CV,内容:使用水中的聚合物微球(1%固体,6.77*10⁸珠粒/μL)以用于稀释。

[1420] 样品通过反向移液来转移至光学384孔板(Greiner bio-one Microplate/Sensoplate,384孔,黑色,玻璃底,小体积,带盖,gen 2)中,并且用硅油(Alfa Aesar)覆盖。乳胶珠粒的表观直径由20℃下的动态光散射来进行确定。溶液的粘度可以计算为 $\eta = \eta_0 (r_h/r_{h,0})$ (η :粘度; η_0 :水的粘度; r_h :乳胶珠粒的表观流体动力学半径; $r_{h,0}$:在水中的乳胶珠粒的流体动力学半径)。

[1421] 为了允许比较相同浓度下的各种样品,使用指数拟合模型501用以下方程而在XLfit内拟合数据:

[1422] $\eta = C + (A * \exp(B * c))$

[1423] (η :粘度; c :浓度; A 、 B 、 C :指数拟合变量)。

[1424] 根据这些拟合结果,可以外推出对于15cP的粘度阈值,在20℃下的最大可行浓度。

[1425] 类似地,在另外的实验中,分析了P1AG5853和P1AG8317并且示出了结果。

[1426] CCL2复合物形成

[1427] 方法SEC

[1428] 复合物形成:

[1429] 对于复合物形成,向1x PBS(sigma-Aldrich 1166678900)掺入100μg/mL

P1AD8325、P1AF8139或P1AF8143连同各自的等摩尔浓度的wtCCL2。将溶液混合并且在环境温度下孵育过夜。

[1430] SEC-MALLS测量:

[1431] 对于SEC-MALLS测量,将1mg/ml浓度下的100 μ g样品应用于ThermoUltimate 3000仪器上的GE Superose6色谱柱(Increase 10/300GL),该仪器具有UV280检测器和Wyatt MALS检测器(RIOptilab rEX,LS miniDAWN Treos)。使用1x PBS (pH 7.4)作为洗脱液,流速为0.5mL/min。

[1432] 与Y形IgG样形式(如crossmab)相比,紧凑的扭曲体形式在由双原位旁分子所触发的多聚体组件的形成方面表现不同。图SEC复合物示出了在SEC-MALLs色谱实验中,不含和含有CCL2的双原位旁分子的行为。所有双原位旁分子的分子量具有可比性,其范围为145kDa至148kDa,但扭曲体的行为与Crossmab的行为不同,因为形式更紧凑。该紧凑性也不允许在与CCL2结合时存在长菊花链。实际上,与wtCCL2进行孵育后,扭曲体P1AF8143(在图18中缩写为43)大部分形成约85%四聚体,而相应的Crossmab P1AF8139(图18中缩写为39)在很大程度上形成更大的多聚体。

[1433] P1AF8139(缩写为39)的SEC-MALLS测量示出,大多数复合物(>80%)为至多10MDa的多聚体,而P1AF8143(缩写为43)在具有wtCCL2的复合物中大部分(>85%)形成大约600kDa的四聚体。

[1434] 类似地,在另外的实验中,分析了P1AG5853和P1AG8317并且示出了结果。

[1435] 经由细胞摄取来耗竭CCL2

[1436] 为了测量双特异性抗体经由与Fc γ RIIB受体的相互作用而渗透细胞的能力,CHO-K1细胞系已经用人Fc γ RIIB受体(克隆223)进行了转染。作为与活化Fc γ R的不需要的相互作用的对照,CHO-K1细胞系也已经用人Fc γ RIIa(克隆138)进行了转染。本文的双特异性抗体已经进行了工程化以增强与Fc γ RIIB的结合,同时保持与Fc γ RIIa的相互作用尽可能低。

[1437] 在体外,将不同浓度下的<CCL2>抗体混合以与CCL2形成复合物;将复合物添加至种子细胞。24小时后,分析上清液以检测剩余的CCL2(未被内化和降解的部分)。

[1438] 材料和方法CHO摄取测定

[1439] 细胞系和培养条件:

[1440] CHO细胞,CHO-K1-W-TDZ5_HOMSA_FCGR2B_克隆_223(Roche)或CHO-K1-W-TDZ5_HOMSA_FCGR2A_克隆_138_HR(Roche)为内部生产的。CHO细胞在RPMI160培养基ATCC改良中进行培养,该培养基包含200mM L-谷氨酰胺、4.5g/L葡萄糖、10mM HEPES、1mM丙酮酸钠,该培养基补充有10% FCS和400 μ g/ml遗传霉素(Thermo Fisher)。

[1441] 所有细胞均生长在组织培养皿(Greiner)中的单层中,并且在37 $^{\circ}$ C下于5%CO₂的加湿孵育箱中孵育。细胞用Accutase(Thermo Fisher)进行分离,并且在RPMI160培养基ATCC改良中进一步处理,该培养基包含200mM L-谷氨酰胺、4.5g/L葡萄糖、10mM HEPES、1mM丙酮酸钠,该培养基补充有10%FCS和50 μ g/mL庆大霉素(Thermo Fisher)。

[1442] 在细胞摄取研究中,于37 $^{\circ}$ C和5% CO₂下在96孔组织培养板中,将2ng/mL生物素化CCL2(Roche)与不同稀释度的<CCL2>Mab一起预孵育一小时,以形成CCL2/<CCL2>Mab免疫复合物。

[1443] 然后,将各自细胞系的每孔 2.5×10^4 个细胞添加至免疫复合物,并且将板在37℃和5% CO₂下孵育23小时至24小时。

[1444] 在下面的ELISA中,将细胞培养上清液(10μL)转移至96孔链霉亲和素包被板(Microcoat),该板含有在PBST(Thermo Fisher)中的测定稀释剂(90μL)1%BSA(Sigma Aldrich),其用160mM甘氨酸-HCl(Sigma Aldrich)调节至pH2.5,该板在环境温度孵育一小时,以分解免疫复合物并且捕获经变性的生物素化CCL2。

[1445] 经变性的生物素化CCL2通过在室温下与测定稀释剂中的0.3μg/mL DIG-抗CCL2检测抗体和40mU/ml POD标记的抗-DIG Fab(两者均来自Roche,Penzberg)连续孵育一小时来进行检测。在每个步骤之间,将孔用PBST洗涤3次。为了读出,使用了ABTS溶液(Roche,Penzberg)和ABTS停止溶液(KPL)。OD405/490在i3x(Molecular Devices)上进行定量。

[1446] 在测定中测试了从40μg/mL至0.512ng/mL的经纯化的<CCL2>Mab系列稀释液。使用以下4参数方程,经由非线性回归来拟合与<CCL2>Mab浓度呈函数关系的OD405/490信号,以确定有效浓度:

[1447] 其中:

$$y = D + \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B} \quad \begin{array}{ll} A & = \text{较高渐近线} \\ B & = \text{曲线坡度} \end{array}$$

[1449] C=EC₅₀值

[1450] D=较低渐近线

[1451] X=<CCL2>Mab浓度(单位为ng/ml)

[1452] Y=OD值

[1453] 结果在图19A-1和20A-C以及下表中示出。

[1454] 图19A至图19C和图20A至图20C Fc γ -IIa示出,对于大多数经测试的化合物,上清液中CCL2的浓度保持稳定。然而,关于化合物P1AF8142,观察到上清液中CCL2的浓度依赖性损失;与共享相同Fc序列的crossmab P1AD8325相比,观察到扭曲体P1AF8142的形式依赖性摄取。观察到两种化合物分别以相同水平与Fc γ RIIa和Fc γ RIIb结合,但与crossmab P1AD8325相比,扭曲体P1AF8142的结合水平显著更高。因此,扭曲体形式影响与Fc γ RIIa的结合,并且连同较小尺寸的形式一起,在扭曲体P1AF8142的情况下观察到经由Fc γ RIIa进行的一些摄取。

[1455] 表Fc γ -IIb:经由CHO细胞克隆223中的FcγRIIb来进行耗竭

[1456]

化合物	最大耗竭水平(%)	EC50[nM]	EC90[nM]
P1AF8143	82	0.14	0.4
P1AF8142	80	0.13	0.5
P1AD8325	85	0.50	13
P1AF8139	45	0.60	约30

[1457] 表Fc γ IIb示出了不同水平的CCL2耗竭/降解。呈扭曲体形式的两种双特异性抗体P1AF8142和P1AF8143为最高效的CCL2耗竭剂,其具有约0.13nM的EC50。两个相应的crossmab P1AD8325和P1AF8139的EC50为约0.55nM。在表γ-IIb中总结了EC90和最大耗竭水平。

[1458] 对于参考CKL02-SG1,还观察到上清液中CCL2浓度的非常轻微的降低(图20C γ IIb),因为该化合物如所有其他双特异性抗体P1AD8325、P1AF8139、P1AF8142、P1AF8143一样具有抗原结合位点,CKL02-SG1具有常规Fc,即wt IgG1,因此不具有用于更佳摄取的工程化Fc,但是,在被动摄取至细胞中的情况下,抗原CCL2在低pH被释放并且可以被分类出来以进行降解。类似地,在另外的实验中,分析了P1AG5853和P1AG8317并且示出了结果。

[1459] DC-T-细胞活化测定:DC:CD4再刺激测定

[1460] 材料

[1461] 来自健康供体的PBMC在抽血六小时内自全血制备。使细胞冷冻保存在气相氮中,直至用于测定中。通过用阳性对照(例如KLH)活化七天来分析每一PBMC制剂的质量及功能,以评估原初T细胞反应。

[1462] 匙孔藤血蓝蛋白(KLH)被用作技术对照,根据制造商的建议,在无菌条件下以一次性等分试样在-80℃下重建并且储存。此外,也包含贝伐珠单抗(Avastin®)作为阳性基准蛋白。对于DC刺激阶段和APC再刺激阶段,所有样品均以0.3 μ M的最终浓度进行测试。

[1463] 方法

[1464] 单核细胞通过磁珠选择来从冷冻PBMC样品中分离,并且使用GM-CSF和IL-4分化为未成熟的DC(iDC)。然后收获、洗涤iDC,并且将其在37℃下以300nM的最终浓度加载有每种单独的测试蛋白(mAb(数据未示出)或免疫复合物),持续4小时。如下新鲜制备免疫复合物:将600nM mAb与600nM CCL2在室温下一起孵育24小时,并且以300nM的最终浓度添加至iDC。然后添加含有TNF α 和IL-1 β 的DC成熟混合物,再持续40小时至42小时,以使DC活化/成熟(mDC)。通过流式细胞术评估关键DC表面标志物(CD11c、CD14、CD40、CD80、CD83、CD86、CD209和HLA-DR)在不成熟及成熟阶段中的表达,以确保DC在T细胞相互作用之前经活化。然后使1.0 $\times 10^5$ 个mDC与1.2 $\times 10^6$ 个自体CD4+T细胞(通过磁珠选择来进行分离)在潮湿气氛中在37℃、5% CO₂下共培养6天。在第6天,使用磁珠选择将自体单核细胞从PBMC中分离,并且加载有最初用于加载DC的所选择的蛋白质/肽。在潮湿气氛中在37℃、5% CO₂下孵育4小时后。将5 $\times 10^4$ 个单核细胞/孔连同相应的DC:T共培养物以一式四份(2.5 $\times 10^5$ 个CD4+T细胞/孔)添加至抗IFN- γ /抗IL-5预包被的FluoroSpot板(Mabtech)。在潮湿气氛中使FluoroSpot板在37℃、5% CO₂下孵育40小时至42小时。孵育后,使用内部程序使FluoroSpot板显色,并且在每一测试条件下对每一细胞因子评估每孔中的斑点形成细胞(SFC)。

[1465] 在不成熟及成熟阶段对单核细胞源性DC实施表面标志物QC检查,以确定测试产物对DC分化的任何可能的影响,并且允许在随后与CD4+T细胞共培养之前评估DC的质量。使用荧光标记抗体和Guava®easyCyte™8HT流式细胞仪,通过流式细胞术评估表面标志物。

[1466] 数据分析

[1467] 数据管理和统计分析已经以R编程语言来执行(<https://www.R-project.org/>, v.3.6.1)。将数据转换为log₂量表,并且应用广义线性模型(GLM)以定量SI(倍数变化和95% CI)。将调节应用于数据集(经调节的异方差性的指数类型、在SFU量表的低端处的高斯噪声注入、每个SI的线性回归和外推至空白值0),并且生成了QC绘图(DC分化标记、化合物的再现性和供体水平、供体的相对刺激)。

[1468] 为了帮助进行免疫原性风险评估,针对每个供体中的每个测试条件计算刺激指数

(SI) (SFU/孔与匹配空白之间的比率)。

[1469] 如果建立至少2倍SI变化且 $p < 0.05$ (来自GLM的未调节p值), 则计作阳性供体反应。在30位的健康供体队列内, 对治疗有积极供体反应的数量给出了相对于该治疗的反应率。

[1470] 表反应率概述 ($St > 2$, 其中 $p > 0.05$) - 基于SFU校正而观察到的百分比

[1471]	抗体	免疫复合物 (抗体 + CCL2) 的反应率 (单位为 %)
	P1AD8325	3.33
	P1AF8137-048	23.33
	P1AF8139	33.33
	P1AF8140	6.67
	P1AF8142	3.33
	P1AF8143	10

[1472] 当化合物作为免疫复合物进行应用时, 化合物P1AF8139 (其具有工程化Fc部分, 以增加经由Fc γ RI Ib进行的摄取) 示出响应者数量上升 (约33%), 而化合物P1AF8143 (Y形抗体P1AF8139的相应扭曲体) 的确示出10%参考水平下的响应者的百分比。

序列表

<110> 豪夫迈·罗氏有限公司

<120> 双特异性抗 CCL2 抗体

<130> P36927-W0 (WJ)

<150> EP21180204.6

<151> 2021-06-18

<160> 191

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重链 CDR-H1 1A4

<400> 1

Trp Ile Cys

1

<210> 2

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重链 CDR-H2 1A4

<400> 2

Cys Ile Gly Ala Gly Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala

1

5

10

15

Lys Gly

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重链 CDR-H3 1A4

<400> 3

Thr Gly Thr Glu Phe Thr Tyr Tyr Ser Leu

1

5

10

<210> 4

<211> 12

<212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> 轻链 CDR-L1 1A4
 <400> 4
 Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn Asn Met Ala
 1 5 10
 <210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> 轻链 CDR-L2 1A4
 <400> 5
 Thr Ala Ser Ser Leu Ala Ser
 1 5
 <210> 6
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> 轻链 CDR-L3 1A4
 <400> 6
 Ala Gly Tyr Lys Ser Tyr Ser Asn Asp Glu Tyr Gly
 1 5 10
 <210> 7
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> 重链可变结构域 VH 1A4
 <400> 7
 Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
 1 5 10 15
 Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Glu Leu Asp Phe Tyr Trp Ile Cys
 20 25 30
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Ala Cys Ile
 35 40 45
 Gly Ala Gly Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly

50	55	60
Arg Phe Thr Val Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Thr Leu Gln Met		
65	70	75
Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Thr		
	85	90
Gly Thr Glu Phe Thr Tyr Tyr Ser Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val		
	100	105
Thr Val Ser Ser		110

115

<210> 8

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 轻链可变结构域 VL 1A4

<400> 8

Ala Leu Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn
20 25 30

Asn Met Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Thr Ala Ser Ser Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser His Phe Arg
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu
65 70 75 80

Ser Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Tyr Lys Ser Tyr Ser
85 90 95

Asn Asp Glu Tyr Gly Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重链 CDR-H1 1A5

<400> 9

Thr Ser Tyr Trp Met Cys
1 5

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重链 CDR-H2 1A5

<400> 10

Cys Ile Ser Ser Ser Ile Gly Val Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Glu

1 5 10 15

Gly

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重链 CDR-H3 1A5

<400> 11

Thr Thr Asp Asp Asn Trp Asn Val Gly Phe Asn Leu

1 5 10

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 轻链 CDR-L1 1A5

<400> 12

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Asn Arg Tyr Leu Ser

1 5 10

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 轻链 CDR-L2 1A5

<400> 13

Gly Thr Ser Thr Leu Ala Ser

1 5

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 轻链 CDR-L3 1A5

<400> 14

Gln Gln Gly Ala Thr Ile Ser Tyr Leu Asp Asn Ala

1 5 10

<210> 15

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重链可变结构域 VH 1A5

<400> 15

Gln Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Glu Gly

1 5 10 15

Ser Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Thr Ser

20 25 30

Tyr Trp Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu

35 40 45

Ile Ala Cys Ile Ser Ser Ser Ile Gly Val Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp

50 55 60

Ala Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Thr

65 70 75 80

Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Val Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Thr Thr Asp Asp Asn Trp Asn Val Gly Phe Asn Leu Trp Gly

100 105 110

Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 16

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 轻链可变结构域 VL 1A5

<400> 16

Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Val Gly Val Gly

1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Asn Arg
 20 25 30
 Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Thr Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu
 65 70 75 80
 Ser Ala Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ala Thr Ile Ser
 85 90 95
 Tyr Leu Asp Asn Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
 100 105 110

<210> 17

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重链 CDR-H1 1G9

<400> 17

Leu Tyr Ser Tyr Met Cys

1 5

<210> 18

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重链 CDR-H2 1G9

<400> 18

Cys Val Asp Ala Gly Ala Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 19

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重链 CDR-H3 1G9

<400> 19

Gly Ile Leu Tyr Tyr Thr Trp Pro Tyr Pro Ala Gly Ala Ile Asp Ala

1	5	10	15
Phe Asp Ser			
<210>	20		
<211>	11		
<212>	PRT		
<213>	人工		
<220>			
<223>	轻链 CDR-L1	1G9	
<400>	20		
Gln Ala Ser Glu Ser Ile Ser Asn Tyr Leu Ser			
1	5	10	
<210>	21		
<211>	7		
<212>	PRT		
<213>	人工		
<220>			
<223>	轻链 CDR-L2	1G9	
<400>	21		
Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser			
1	5		
<210>	22		
<211>	12		
<212>	PRT		
<213>	人工		
<220>			
<223>	轻链 CDR-L3	1G9	
<400>	22		
Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Ser Asn Val Phe Asn Thr			
1	5	10	
<210>	23		
<211>	128		
<212>	PRT		
<213>	人工		
<220>			
<223>	重链可变结构域 VH	1G9	
<400>	23		
Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser			
1	5	10	15
Leu Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Gly Ile Asp Phe Ser Leu Tyr Ser			

129

<223> 重链 CDR-H1 2F6

<400> 25

Asn Asn Tyr Tyr Met Cys

1 5

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重链 CDR-H2 2F6

<400> 26

Cys Ile Ser Thr Asp Asp Ser Asn Thr His Tyr Ala Ser Trp Ala Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 27

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重链 CDR-H3 2F6

<400> 27

Asp Ala His Phe Thr Ser Tyr Gly Tyr Gly Phe Asp Leu

1 5 10

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 轻链 CDR-L1 2F6

<400> 28

Arg Ala Ser Glu Asp Ile Glu Asn Leu Val Ala

1 5 10

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 轻链 CDR-L2 2F6

<400> 29

Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser

1 5

<210> 30

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 轻链 CDR-L3 2F6

<400> 30

Gln Gly Asp Tyr Gly Ser Gly Trp Ile Met Tyr Ser

1 5 10

<210> 31

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重链可变结构域 VH 2F6

<400> 31

Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Glu Gly Ser

1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asn Asn Asn Tyr

20 25 30

Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Cys Ile Ser Thr Asp Asp Ser Asn Thr His Tyr Ala Ser Trp Ala

50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Ala Ser Ser Thr Ala Leu Thr Leu

65 70 75 80

Gln Val Ala Gly Leu Thr Val Ala Asp Met Ala Thr Tyr Phe Cys Ala

85 90 95

Arg Asp Ala His Phe Thr Ser Tyr Gly Tyr Gly Phe Asp Leu Trp Gly

100 105 110

Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 32

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 轻链可变结构域 VL 2F6

<400> 32

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Ser Ala Ala Val Gly

1 5 10 15

Gly Thr Val Ser Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Glu Asn Leu

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Gly Asp Leu Glu Ser

65 70 75 80

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Asp Tyr Gly Ser Gly Trp

85 90 95

Ile Met Tyr Ser Phe Gly Gly Gly Thr Asp Leu Val Val Lys

100 105 110

<210> 33

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重链 CDR-H1 CNT0888

<400> 33

Ser Tyr Gly Ile Ser

1 5

<210> 34

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重链 CDR-H2 CNT0888

<400> 34

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重链 CDR-H3 CNT0888

<400> 35

Tyr Asp Gly Ile Tyr Gly Glu Leu Asp Phe

1 5 10

<210> 36

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 轻链 CDR-L1 CNT0888

<400> 36

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asp Ala Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 37

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 轻链 CDR-L2 CNT0888

<400> 37

Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 轻链 CDR-L3 CNT0888

<400> 38

His Gln Tyr Ile Gln Leu His Ser Phe Thr

1 5 10

<210> 39

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重链可变结构域 VH CNT0888

<400> 39

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

<210> 40

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 轻链可变结构域 VL CNT0888

<400> 40

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 Asp Ala
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Ile Gln Leu His
 85 90 95
 Ser Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 41

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重链 CDR-H1 人源化 11K2 (= 11K2)

<400> 41

Asp Thr Tyr Met His

1 5

<210> 42

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重链 CDR-H2 人源化 11K2 (= 11K2)

<400> 42

Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Phe Asp Pro Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 43

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重链 CDR-H3 人源化 11K2 (= 11K2)

<400> 43

Gly Val Phe Gly Phe Phe Asp Tyr

1 5

<210> 44

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 轻链 CDR-L1 人源化 11K2 (= 11K2)

<400> 44

Lys Ala Thr Glu Asp Ile Tyr Asn Arg Leu Ala

1 5 10

<210> 45

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 轻链 CDR-L2 人源化 11K2 (= 11K2)

<400> 45

Gly Ala Thr Ser Leu Glu Thr

1 5

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 轻链 CDR-L3 人源化 11K2 (= 11K2)

<400> 46

Gln Gln Phe Trp Ser Ala Pro Tyr Thr

1 5

<210> 47

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重链可变结构域 VH 人源化 11K2 (= 11K2)

<400> 47

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Leu Thr Ile Ser Asp Thr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Phe Asp Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Val Phe Gly Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 48

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 轻链可变结构域 VL 人源化 11K2 (= 11K2)

<400> 48

```

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

```

<210> 49

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重链 CDR-H1 ABN912

<400> 49

```

His Tyr Trp Met Ser
1           5

```

<210> 50

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重链 CDR-H2 ABN912

<400> 50

```

Asn Ile Glu Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
1           5           10           15
Gly

```

<210> 51

<211> 13
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 重链 CDR-H3 ABN912
<400> 51
Asp Leu Glu Gly Leu His Gly Asp Gly Tyr Phe Asp Leu
1 5 10
<210> 52
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 轻链 CDR-L1 ABN912
<400> 52
Arg Ala Ser Gln Gly Val Ser Ser Ala Leu Ala
1 5 10
<210> 53
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 轻链 CDR-L2 ABN912
<400> 53
Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5
<210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 轻链 CDR-L3 ABN912
<400> 54
Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5
<210> 55
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工

<220>

<223> 重链可变结构域 VH ABN912

<400> 55

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

<210> 56

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 轻链可变结构域 VL ABN912

<400> 56

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ile Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Val Ser Ser Ala
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Pro Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100	105
<210> 57	
<211> 6	
<212> PRT	
<213> 人工	
<220>	
<223> 重链 CDR-H1 突变的变体 CNT0888	
<220>	
<221> MISC_FEATURE	
<222> (5) .. (5)	
<223> X 是 I 或 T	
<400> 57	
Ser His Tyr Gly Xaa Ser	
1 5	
<210> 58	
<211> 17	
<212> PRT	
<213> 人工	
<220>	
<223> 重链 CDR-H2 突变的变体 CNT0888	
<220>	
<221> MISC_FEATURE	
<222> (2) .. (2)	
<223> X 是 V 或 I 或 H	
<220>	
<221> MISC_FEATURE	
<222> (4) .. (4)	
<223> X 是 P 或 H	
<220>	
<221> MISC_FEATURE	
<222> (7) .. (7)	
<223> X 是 H 或 G	
<400> 58	
Gly Xaa Ile Xaa Ile Phe Xaa Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln	
1 5 10 15	
Gly	
<210> 59	
<211> 10	
<212> PRT	

<213> 人工

<220>

<223> 重链 CDR-H3 突变的变体 CNT0888

<400> 59

Tyr Asp Ala His Tyr Gly Glu Leu Asp Phe

1 5 10

<210> 60

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 轻链 CDR-L1 突变的变体 CNT0888

<400> 60

Arg Ala Ser Gln His Val Ser Asp Ala Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 61

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 轻链 CDR-L2 突变的变体 CNT0888

<400> 61

Asp Ala Ser Asp Arg Ala Glu

1 5

<210> 62

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 轻链 CDR-L3 突变的变体 CNT0888

<400> 62

His Gln Tyr Ile His Leu His Ser Phe Thr

1 5 10

<210> 63

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重链 FR-H1 突变的变体 CNT0888

<400> 63

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe
20 25

<210> 64

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重链 FR-H2 突变的变体 CNT0888

<400> 64

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 65

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重链 FR-H3 突变的变体 CNT0888

<400> 65

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15
Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 66

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重链 FR-H4 突变的变体 CNT0888

<400> 66

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 67

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 轻链 FR-L1 突变的变体 CNT0888

<400> 67

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

20

<210> 68

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 轻链 FR-L2 突变的变体 CNT0888

<400> 68

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 69

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 轻链 FR-L3 突变的变体 CNT0888

<400> 69

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 70

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 轻链 FR-L4 突变的变体 CNT0888

<400> 70

Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5

<210> 71

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重链可变结构域 VH 突变的变体 CNT0888 H0695

<400> 71

```

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

```

<210> 72

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重链可变结构域 VH 突变的变体 CNT0888 H0625

<400> 72

```

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

```

	100	105	110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
115			
<210> 73			
<211> 119			
<212> PRT			
<213> 人工			
<220>			
<223> 重链可变结构域 VH 突变的变体 CNT0888 H0634			
<400> 73			
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser			
1 5 10 15			
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser His Tyr			
20 25 30			
Gly Thr Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			
35 40 45			
Gly Gly Ile Ile His Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe			
50 55 60			
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr			
65 70 75 80			
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85 90 95			
Ala Arg Tyr Asp Ala His Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly			
100 105 110			
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
115			
<210> 74			
<211> 119			
<212> PRT			
<213> 人工			
<220>			
<223> 重链可变结构域 VH 突变的变体 CNT0888 H0635			
<400> 74			
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser			
1 5 10 15			
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser His Tyr			
20 25 30			
Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			
35 40 45			

Gly Gly His Ile His Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Tyr Asp Ala His Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 75

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 轻链可变结构域 VL 突变的变体 CNT0888 L0616

<400> 75

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 His Val Ser Asp Ala
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Asp Ala Ser Asp Arg Ala Glu Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Ile His Leu His
 85 90 95
 Ser Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 76

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重链 CDR-H1 突变的变体人源化 11K2

<400> 76

His Thr Tyr Met His

1 5
 <210> 77
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> 重链 CDR-H2 突变的变体人源化 11K2
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5) .. (5)
 <223> X 是 D 或 E
 <400> 77
 Arg Ile Asp Pro Xaa Asn His Asn Thr Lys Phe Asp Pro Lys Phe Gln
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 78
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> 重链 CDR-H3 突变的变体人源化 11K2
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7) .. (7)
 <223> X 是 D 或 E
 <400> 78
 Gly Val Phe Gly Phe Phe Xaa His
 1 5
 <210> 79
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> 轻链 CDR-L1 突变的变体人源化 11K2
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3) .. (3)
 <223> X 是 F 或 T
 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10) .. (10)

<223> X 是 R 或 L

<400> 79

Lys Ala Xaa Glu Asp Ile Tyr Asn Arg Xaa Ala

1 5 10

<210> 80

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 轻链 CDR-L2 突变的变体人源化 11K2

<400> 80

Gly Ala Thr Ser Leu Glu His

1 5

<210> 81

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 轻链 CDR-L3 突变的变体人源化 11K2

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4) .. (4)

<223> X 是 W 或 R

<400> 81

Gln Gln Phe Xaa Ser Ala Pro Tyr Thr

1 5

<210> 82

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重链 FR-H1 突变的变体人源化 11K2

<400> 82

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Leu Thr Ile Ser

20 25 30

<210> 83

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重链 FR-H2 突变的变体人源化 11K2

<400> 83

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly

1 5 10

<210> 84

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重链 FR-H3 突变的变体人源化 11K2

<400> 84

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu

1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 85

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重链 FR-H4 突变的变体人源化 11K2

<400> 85

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 86

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 轻链 FR-L1 突变的变体 11K2

<400> 86

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 87

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 轻链 FR-L2 突变的变体人源化 11K2

<400> 87

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile His

1 5 10 15

<210> 88

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 轻链 FR-L3 突变的变体人源化 11K2

<400> 88

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 89

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 轻链 FR-L4 突变的变体人源化 11K2

<400> 89

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 90

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重链可变结构域 VH 突变的变体人源化 11K2

H1503

<400> 90

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Leu Thr Ile Ser His Thr			
20	25	30	
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			
35	40	45	
Gly Arg Ile Asp Pro Asp Asn His Asn Thr Lys Phe Asp Pro Lys Phe			
50	55	60	
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Arg Gly Val Phe Gly Phe Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Thr			
100	105	110	
Val Thr Val Ser Ser			
115			
<210>	91		
<211>	117		
<212>	PRT		
<213>	人工		
<220>			
<223>	重链可变结构域 VH	突变的变体人源化 11K2	
	H1510		
<400>	91		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser			
1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Leu Thr Ile Ser His Thr			
20	25	30	
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			
35	40	45	
Gly Arg Ile Asp Pro Asp Asn His Asn Thr Lys Phe Asp Pro Lys Phe			
50	55	60	
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Arg Gly Val Phe Gly Phe Phe Glu His Trp Gly Gln Gly Thr Thr			
100	105	110	
Val Thr Val Ser Ser			
115			

<210> 92

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重链可变结构域 VH 突变的变体人源化 11K2
H1514

<400> 92

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

<210> 93

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 轻链可变结构域 VL 突变的变体人源化 11K2
L1338

<400> 93

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

50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Trp Ser Ala Pro Tyr		80
	85	90
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		95
	100	105
<210>	94	
<211>	107	
<212>	PRT	
<213>	人工	
<220>		
<223>	轻链可变结构域 VL	突变的变体人源化 11K2
	L1201	
<400>	94	
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Thr Glu Asp Ile Tyr Asn Arg		15
	20	25
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		30
	35	40
His Gly Ala Thr Ser Leu Glu His Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		45
	50	55
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		60
65	70	75
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Arg Ser Ala Pro Tyr		80
	85	90
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		95
	100	105
<210>	95	
<211>	107	
<212>	PRT	
<213>	智人 (homo sapiens)	
<400>	95	
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu		
1	5	10
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe		15
	20	25
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln		30

35	40	45
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser		
50	55	60
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu		
65	70	75
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser		
85	90	95
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
100	105	

<210> 96

<211> 105

<212> PRT

<213> 智人 (homo sapiens)

<400> 96

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu		
1	5	10
Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe		
20	25	30
Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val		
35	40	45
Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys		
50	55	60
Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser		
65	70	75
His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu		
85	90	95
Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser		
100	105	

<210> 97

<211> 328

<212> PRT

<213> 智人 (homo sapiens)

<400> 97

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys		
1	5	10
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr		
20	25	30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		
35	40	45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser		
50	55	60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr		
65	70	75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		
	85	90 95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys		
	100	105 110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
	115	120 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
	130	135 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
145	150	155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
	165	170 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
	180	185 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
	195	200 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
	210	215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu		
225	230	235 240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
	245	250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
	260	265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
	275	280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
	290	295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
305	310	315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
	325	

<210> 98
 <211> 328
 <212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 来源于具有突变 L234A、L235A 和 P329G 的 IgG1 (Fc γ 受体沉默) 的示例性人重链恒定区

<400> 98

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
			35					40					45		
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
			50				55					60			
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70				75					80	
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85					90						95	
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
			100					105					110		
Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
			115				120					125			
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
			130				135					140			
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145					150				155					160	
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
			165					170						175	
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
			180					185					190		
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
			195				200					205			
Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
			210				215					220			
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu
225					230				235					240	
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
			245					250					255		
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
			260					265					270		

Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
275				280				285							
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
290				295				300							
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
305				310				315				320			
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro								
				325											
<210> 99															
<211> 328															
<212> PRT															
<213> 智人 (homo sapiens)															
<400> 99															
Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5				10				15			
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
				20				25				30			
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
35				40				45							
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
50				55				60							
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65				70				75				80			
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
				85				90				95			
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
100				105				110							
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
115				120				125							
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
130				135				140							
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145				150				155				160			
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
				165				170				175			
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
180				185				190							
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
195				200				205							

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325

<210> 100

<211> 328

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 来源于具有突变的 IgG1 (SG105-IgG1 同种异型 - Fc γ 受体沉默) 的示例性人重链恒定区

<400> 100

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

115	120	125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
130	135	140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
145	150	155
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
165	170	175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
180	185	190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
195	200	205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
210	215	220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu		
225	230	235
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
245	250	255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
260	265	270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
275	280	285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
290	295	300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
305	310	315
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		320
325		
<210> 101		
<211> 328		
<212> PRT		
<213> 人工		
<220>		
<223> SG1095 - 来源于包含突变(Kabat EU 编号)		
L235W/G236N/H268D/Q295L/A330K/K326T、		
Q311R/P343R、N434A、Q438R/S440E 的 IgG1 的		
示例性人重链恒定区		
<400> 101		
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys		
1	5	10
		15

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

325

<210> 102

<211> 328

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> SG1099 - 来源于包含突变(Kabat EU 编号)

Q311R/P343R 的 IgG1 的示例性人重链恒定区

<400> 102

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5				10						15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
			35					40					45		
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
			50					55					60		
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65						70				75					80
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85							90					95
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
			100							105					110
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
			115					120							125
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
			130					135							140
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145						150				155					160
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
			165							170					175
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
			180							185					190
His	Arg	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
			195							200					205
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
			210					215							220
Gln	Arg	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu
225						230						235			240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325

<210> 103

<211> 328

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> SG1100 - 来源于包括突变 (Kabat EU 编号)
 Q311R/P343R、N434A、Q438R/S440E 的 IgG1 的
 示例性人重链恒定区

<400> 103

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

Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145					150					155					160
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
			165						170					175	
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
			180					185					190		
His	Arg	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
		195					200					205			
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
	210					215					220				
Gln	Arg	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu
225					230					235					240
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
			245						250					255	
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
			260					265					270		
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
		275					280					285			
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
	290					295					300				
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Ala	His	Tyr	Thr
305					310					315					320
Arg	Lys	Glu	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro								
			325												

<210> 104

<211> 437

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重链 1- CNT0888//11K2-WT IgG1

<400> 104

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

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

370	375	380
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser		
385	390	395
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser		400
	405	410
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser		415
	420	425
		430
Leu Ser Leu Ser Pro		
435		
<210> 105		
<211> 447		
<212> PRT		
<213> 人工		
<220>		
<223> 重链 2- CNT0888//11K2-WT IgG1		
<400> 105		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser		
1	5	10
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr		15
	20	25
Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		30
	35	40
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe		45
	50	55
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		60
65	70	75
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		80
	85	90
Ala Arg Tyr Asp Gly Ile Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly		95
	100	105
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe		110
	115	120
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu		125
	130	135
Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp		140
145	150	155
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu		160
	165	170
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser		175

	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 Glu 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 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 Cys Thr					
	340		345		350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu 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					
	435		440		445
<210>	106				
<211>	224				
<212>	PRT				
<213>	人工				
<220>					
<223>	轻链 1- CNT0888//11K2-WT IgG1				

<400> 106

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

<210> 107

<211> 216

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 轻链 2- CNT0888//11K2-WT IgG1

<400> 107

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 Asp Ala

				20					25					30			
Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu		
		35					40					45					
Ile	Tyr	Asp	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser		
	50					55					60						
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu		
65					70					75					80		
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	His	Gln	Tyr	Ile	Gln	Leu	His		
				85					90					95			
Ser	Phe	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val		
			100					105					110				
Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Arg	Lys	Leu	Lys		
		115					120					125					
Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg		
	130					135				140							
Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn		
145				150					155						160		
Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser		
				165				170					175				
Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys		
			180					185					190				
Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr		
		195					200					205					
Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys										
	210					215											
<210>	108																
<211>	437																
<212>	PRT																
<213>	人工																
<220>																	
<223>	重链	1-	CKL02	IgG1													
<400>	108																
Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly		
1			5					10						15			
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Phe	Glu	Asp	Ile	Tyr	Asn	Arg		
			20					25					30				
Arg	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile		
		35					40					45					
His	Gly	Ala	Thr	Ser	Leu	Glu	His	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly		

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

Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys
370							375					380			
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser
385					390					395					400
Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
				405					410					415	
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser
			420					425					430		
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro											
			435												
<210>	109														
<211>	447														
<212>	PRT														
<213>	人工														
<220>															
<223>	重链 2- CKL02 IgG1														
<400>	109														
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
1			5						10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	His	Tyr
			20					25					30		
Gly	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
	35					40						45			
Gly	Gly	Val	Ile	Pro	Ile	Phe	His	Thr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
	50					55				60					
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
65				70					75					80	
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85					90					95		
Ala	Arg	Tyr	Asp	Ala	His	Tyr	Gly	Glu	Leu	Asp	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		
Thr	Leu	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	Glu	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 Glu 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
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
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 Cys Thr		
340	345	350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu 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
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		
435	440	445
<210>	110	
<211>	224	
<212>	PRT	
<213>	人工	
<220>		

<223> 轻链 1- CKL02 IgG1

<400> 110

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

<210> 111

<211> 216

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 轻链 2- CKL02 IgG1

<400> 111

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 His Val Ser Asp Ala		
20	25	30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu		
35	40	45
Ile Tyr Asp Ala Ser Asp Arg Ala Glu Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser		
50	55	60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu		
65	70	75
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Ile His Leu His		
85	90	95
Ser Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val		
100	105	110
Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys		
115	120	125
Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg		
130	135	140
Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn		
145	150	155
Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser		
165	170	175
Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys		
180	185	190
Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr		
195	200	205
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210	215	
<210>	112	
<211>	437	
<212>	PRT	
<213>	人工	
<220>		
<223>	重链 1- CKL02 - SG1095	
<400>	112	
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Phe Glu Asp Ile Tyr Asn Arg		
20	25	30
Arg Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
35	40	45

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

355	360	365
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys		
370	375	380
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser		
385	390	395
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser		400
405	410	415
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala His Tyr Thr Arg Lys Glu		
420	425	430
Leu Ser Leu Ser Pro		
435		
<210> 113		
<211> 447		
<212> PRT		
<213> 人工		
<220>		
<223> 重链 2- CKL02 - SG1095		
<400> 113		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser		
1 5 10 15		
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser His Tyr		
20 25 30		
Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
35 40 45		
Gly Gly Val Ile Pro Ile Phe His Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe		
50 55 60		
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
65 70 75 80		
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85 90 95		
Ala Arg Tyr Asp Ala His Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly		
100 105 110		
Thr Leu 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 Glu 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 Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys					
	210		215		220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Trp Asn 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 Asp 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 Leu Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val					
	290		295		300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu					
305		310		315	320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Thr Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys					
	325		330		335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Arg Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr					
	340		345		350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu 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 Ala His Tyr Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro					
	435		440		445
<210>	114				
<211>	224				
<212>	PRT				
<213>	人工				

<220>

<223> 轻链 1- CKL02 - SG1095

<400> 114

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

<210> 115

<211> 216

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 轻链 2- CKL02 - SG1095

<400> 115

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 His Val Ser Asp Ala			
20	25	30	
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu			
35	40	45	
Ile Tyr Asp Ala Ser Asp Arg Ala Glu Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser			
50	55	60	
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu			
65	70	75	80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Ile His Leu His			
85	90	95	
Ser Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val			
100	105	110	
Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys			
115	120	125	
Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg			
130	135	140	
Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn			
145	150	155	160
Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser			
165	170	175	
Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys			
180	185	190	
Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr			
195	200	205	
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
210	215		
<210>	116		
<211>	437		
<212>	PRT		
<213>	人工		
<220>			
<223>	重链 1- CKL02 - SG1099		
<400>	116		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Phe Glu Asp Ile Tyr Asn Arg			
20	25	30	
Arg Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			

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

Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp
355				360				365							
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys
370				375				380							
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser
385				390				395				400			
Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
				405				410				415			
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser
				420				425				430			
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro											
435															
<210> 117															
<211> 447															
<212> PRT															
<213> 人工															
<220>															
<223> 重链 2- CKL02 - SG1099															
<400> 117															
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
1				5				10				15			
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	His	Tyr
				20				25				30			
Gly	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
35				40				45							
Gly	Gly	Val	Ile	Pro	Ile	Phe	His	Thr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
50				55				60							
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
65				70				75				80			
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85				90				95			
Ala	Arg	Tyr	Asp	Ala	His	Tyr	Gly	Glu	Leu	Asp	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly
				100				105				110			
Thr	Leu	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	Glu	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 Glu 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 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val		
290	295	300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Arg 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 Arg Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr		
	340	345 350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu 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		
	435	440 445
<210>	118	
<211>	224	
<212>	PRT	

<213> 人工

<220>

<223> 轻链 1- CKL02 - SG1099

<400> 118

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

<210> 119

<211> 216

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 轻链 2- CKL02 - SG1099

<400> 119

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	His	Val	Ser	Asp	Ala
		20						25					30		
Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
	35						40						45		
Ile	Tyr	Asp	Ala	Ser	Asp	Arg	Ala	Glu	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser
	50					55					60				
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu
65				70						75				80	
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	His	Gln	Tyr	Ile	His	Leu	His
			85						90					95	
Ser	Phe	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val
		100						105					110		
Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Arg	Lys	Leu	Lys
		115					120					125			
Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg
	130						135					140			
Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn
145				150						155				160	
Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser
			165						170					175	
Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys
		180						185					190		
Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr
	195						200						205		
Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys								
	210					215									

<210> 120

<211> 437

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重链 1- CKL02 - SG1100

<400> 120

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

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

340	345	350
Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp		
355	360	365
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys		
370	375	380
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser		
385	390	395
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser		400
405	410	415
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala His Tyr Thr Arg Lys Glu		
420	425	430
Leu Ser Leu Ser Pro		
435		
<210> 121		
<211> 447		
<212> PRT		
<213> 人工		
<220>		
<223> 重链 2- CKL02 - SG1100		
<400> 121		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser		
1	5	10
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser His Tyr		15
20	25	30
Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
35	40	45
Gly Gly Val Ile Pro Ile Phe His Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe		
50	55	60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Tyr Asp Ala His Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly		
100	105	110
Thr Leu 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 Glu 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 Glu 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 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val			
	290	295	300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Arg 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 Arg Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr			
	340	345	350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu 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 Ala His Tyr Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro			
	435	440	445
<210>	122		
<211>	224		

<212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> 轻链 1- CKL02 - SG1100
 <400> 122
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Leu Thr Ile Ser His Thr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Asp Asn His Asn Thr Lys Phe Asp Pro Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Val Phe Gly Phe Phe Glu His Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
 115 120 125
 Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
 130 135 140
 Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
 145 150 155 160
 Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
 165 170 175
 Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
 180 185 190
 Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
 195 200 205
 Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220
 <210> 123
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> 轻链 2- CKL02 - SG1100

<400> 123

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 His Val Ser Asp Ala
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Asp Ala Ser Asp Arg Ala Glu Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Ile His Leu His
 85 90 95
 Ser Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
 100 105 110
 Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys
 115 120 125
 Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 130 135 140
 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 145 150 155 160
 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 165 170 175
 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 180 185 190
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 195 200 205
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 124

<211> 437

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重链 1- CKL03 - SG1095

<400> 124

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Thr Glu Asp Ile Tyr Asn Arg

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

Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys
			340						345				350		
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp
		355						360					365		
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys
		370						375					380		
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser
385						390					395				400
Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
				405						410				415	
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Ala	His	Tyr	Thr	Arg	Lys	Glu
			420						425					430	
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro											
			435												
<210>	125														
<211>	447														
<212>	PRT														
<213>	人工														
<220>															
<223>	重链 2- CKL03 - SG1095														
<400>	125														
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
1			5						10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	His	Tyr
			20						25					30	
Gly	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
			35					40					45		
Gly	Gly	Val	Ile	Pro	Ile	Phe	His	Thr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
		50					55				60				
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
65						70				75					80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
						85				90				95	
Ala	Arg	Tyr	Asp	Ala	His	Tyr	Gly	Glu	Leu	Asp	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly
			100						105					110	
Thr	Leu	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 Glu 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 Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys			
	210	215	220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Trp Asn 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 Asp 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 Leu Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val			
	290	295	300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu			
305	310	315	320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Thr Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys			
	325	330	335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Arg Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr			
	340	345	350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu 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 Ala His Tyr Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro			
	435	440	445
<210>	126		

<211> 224
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> 轻链 1- CKL03 - SG1095
 <400> 126
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Leu Thr Ile Ser His Thr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Asp Asn His Asn Thr Lys Phe Asp Pro Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Val Phe Gly Phe Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
 115 120 125
 Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
 130 135 140
 Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
 145 150 155 160
 Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
 165 170 175
 Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
 180 185 190
 Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
 195 200 205
 Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220
 <210> 127
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>

<223> 轻链 2- CKL03 - SG1095

<400> 127

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	His	Val	Ser	Asp	Ala
			20					25					30		
Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
		35					40					45			
Ile	Tyr	Asp	Ala	Ser	Asp	Arg	Ala	Glu	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser
	50					55					60				
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu
65				70					75					80	
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	His	Gln	Tyr	Ile	His	Leu	His
			85					90					95		
Ser	Phe	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val
			100					105					110		
Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Arg	Lys	Leu	Lys
		115					120				125				
Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg
	130					135				140					
Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn
145				150					155					160	
Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser
			165					170					175		
Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys
			180					185					190		
Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr
		195					200						205		
Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys								
	210					215									

<210> 128

<211> 437

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重链 1- CKL03 - SG1099

<400> 128

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	

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

				325						330					335				
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys				
				340						345					350				
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp				
				355						360					365				
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys				
				370						375					380				
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser				
385						390					395				400				
Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser				
				405						410					415				
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser				
				420						425					430				
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro															
				435															
<210>	129																		
<211>	447																		
<212>	PRT																		
<213>	人工																		
<220>																			
<223>	重链 2- CKL03 - SG1099																		
<400>	129																		
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser				
1				5					10					15					
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	His	Tyr				
				20					25					30					
Gly	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met				
				35					40					45					
Gly	Gly	Val	Ile	Pro	Ile	Phe	His	Thr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe				
				50					55					60					
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr				
65					70					75					80				
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys				
				85						90					95				
Ala	Arg	Tyr	Asp	Ala	His	Tyr	Gly	Glu	Leu	Asp	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly				
				100						105					110				
Thr	Leu	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 Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp		
145	150	155
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 Glu 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
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 Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
305	310	315
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 Arg Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr		
340	345	350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu 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
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		
435	440	445

<210> 130
 <211> 224
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> 轻链 1- CKL03 - SG1099
 <400> 130
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Leu Thr Ile Ser His Thr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Asp Asn His Asn Thr Lys Phe Asp Pro Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Val Phe Gly Phe Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
 115 120 125
 Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
 130 135 140
 Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
 145 150 155 160
 Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
 165 170 175
 Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
 180 185 190
 Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
 195 200 205
 Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220
 <210> 131
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> 人工

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

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

Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Arg	Arg
					325					330				335	
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys
					340					345				350	
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp
					355					360				365	
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys
					370					375				380	
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser
385						390					395				400
Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
					405						410				415
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Ala	His	Tyr	Thr	Arg	Lys	Glu
					420						425				430
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro											
					435										
<210>	133														
<211>	447														
<212>	PRT														
<213>	人工														
<220>															
<223>	重链 2- CKL03 - SG1100														
<400>	133														
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	His	Tyr
				20					25					30	
Gly	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
				35					40					45	
Gly	Gly	Val	Ile	Pro	Ile	Phe	His	Thr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
				50					55					60	
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85					90					95
Ala	Arg	Tyr	Asp	Ala	His	Tyr	Gly	Glu	Leu	Asp	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly
				100						105				110	
Thr	Leu	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	Glu	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	Glu	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	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val
		290				295					300				
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Arg	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	Arg	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Cys	Thr
			340					345					350		
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	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	Ala	His	Tyr	Thr	Arg	Lys	Glu	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	

435	440	445
<210> 134		
<211> 224		
<212> PRT		
<213> 人工		
<220>		
<223> 轻链 1- CKL03- SG1100		
<400> 134		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser		
1 5 10 15		
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Leu Thr Ile Ser His Thr		
20 25 30		
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
35 40 45		
Gly Arg Ile Asp Pro Asp Asn His Asn Thr Lys Phe Asp Pro Lys Phe		
50 55 60		
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
65 70 75 80		
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85 90 95		
Ala Arg Gly Val Phe Gly Phe Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Thr		
100 105 110		
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe		
115 120 125		
Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys		
130 135 140		
Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val		
145 150 155 160		
Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln		
165 170 175		
Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser		
180 185 190		
Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His		
195 200 205		
Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210 215 220		
<210> 135		
<211> 216		
<212> PRT		

<213> 人工

<220>

<223> 轻链 2- CKL03 - SG1100

<400> 135

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	His	Val	Ser	Asp	Ala
			20					25					30		
Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
		35					40					45			
Ile	Tyr	Asp	Ala	Ser	Asp	Arg	Ala	Glu	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser
	50					55					60				
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu
65					70					75				80	
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	His	Gln	Tyr	Ile	His	Leu	His
				85					90					95	
Ser	Phe	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val
			100					105					110		
Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Arg	Lys	Leu	Lys
		115					120					125			
Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg
	130						135					140			
Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn
145					150					155				160	
Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser
				165					170				175		
Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys
			180					185					190		
Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr
		195					200						205		
Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys								
		210					215								

<210> 136

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重链可变结构域 VH 2F2

<400> 136

Gln	Glu	Gln	Leu	Glu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Phe	Ser	Phe	Ile	Asp	His
			20						25					30	
Tyr	Ala	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40						45		
Ala	Tyr	Ile	Gly	Gly	Ser	Gly	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asn	Arg	Ala	Lys
	50					55					60				
Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Thr	Ser	Ser	Thr	Thr	Val	Thr	Leu	Gln
65					70					75					80
Met	Thr	Ser	Leu	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg
				85					90					95	
Asn	Leu	Asp	Val	Ser	Ala	Ser	Leu	Trp	Gly	Pro	Gly	Thr	Leu	Val	Thr
			100						105					110	
Val	Ser	Ser													
			115												
<210>	137														
<211>	112														
<212>	PRT														
<213>	人工														
<220>															
<223>	轻链可变结构域 VL								2F2						
<400>	137														
Gln	Val	Leu	Thr	Gln	Thr	Pro	Ala	Ser	Val	Ser	Ala	Ala	Val	Gly	Gly
1				5					10					15	
Thr	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Gln	Ser	Ser	Gln	Ser	Val	Tyr	Asn	Asn	Asn
			20						25					30	
Leu	Leu	Ser	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu
		35					40						45		
Ile	Tyr	Glu	Ala	Ser	Lys	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Pro	Arg	Phe	Ser
	50					55					60				
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Gln	Ser	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Val	Gln
65					70					75					80
Cys	Asp	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Glu	Gly	Ala	Phe	Leu	Cys	Thr
				85					90					95	
Thr	Tyr	Asp	Cys	Phe	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Glu	Val	Val	Val	Lys
			100						105					110	
<210>	138														
<211>	117														

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 138

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

<210> 139

<211> 107

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 139

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

<210> 140

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重链可变结构域 VH 1H11

<400> 140

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

<210> 141

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 轻链可变结构域 VL 1H11

<400> 141

Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Val Gly Val Gly Gly
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Asn Arg Tyr
 20 25 30
 Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Thr Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu Cys
 65 70 75 80

Ala Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ala Thr Ile Ser Tyr
85 90 95

Leu Asp Asn Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

<210> 142

<211> 76

<212> PRT

<213> 智人 (homo sapiens)

<400> 142

Gln Pro Asp Ala Ile Asn Ala Pro Val Thr Cys Cys Tyr Asn Phe Thr
1 5 10 15

Asn Arg Lys Ile Ser Val Gln Arg Leu Ala Ser Tyr Arg Arg Ile Thr
20 25 30

Ser Ser Lys Cys Pro Lys Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Ile Val Ala
35 40 45

Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Gln Lys Trp Val Gln Asp Ser Met
50 55 60

Asp His Leu Asp Lys Gln Thr Gln Thr Pro Lys Thr
65 70 75

<210> 143

<211> 76

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 示例性人 CCL2 (MCP1) - P8A 变体

<400> 143

Gln Pro Asp Ala Ile Asn Ala Ala Val Thr Cys Cys Tyr Asn Phe Thr
1 5 10 15

Asn Arg Lys Ile Ser Val Gln Arg Leu Ala Ser Tyr Arg Arg Ile Thr
20 25 30

Ser Ser Lys Cys Pro Lys Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Ile Val Ala
35 40 45

Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Gln Lys Trp Val Gln Asp Ser Met
50 55 60

Asp His Leu Asp Lys Gln Thr Gln Thr Pro Lys Thr
65 70 75

<210> 144

<211> 76

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 示例性人 CCL2 (MCP1) - T10C 变体

<400> 144

Gln	Pro	Asp	Ala	Ile	Asn	Ala	Pro	Val	Cys	Cys	Cys	Tyr	Asn	Phe	Thr
1				5				10						15	
Asn	Arg	Lys	Ile	Ser	Val	Gln	Arg	Leu	Ala	Ser	Tyr	Arg	Arg	Ile	Thr
			20					25						30	
Ser	Ser	Lys	Cys	Pro	Lys	Glu	Ala	Val	Ile	Phe	Lys	Thr	Ile	Val	Ala
			35					40						45	
Lys	Glu	Ile	Cys	Ala	Asp	Pro	Lys	Gln	Lys	Trp	Val	Gln	Asp	Ser	Met
			50					55				60			
Asp	His	Leu	Asp	Lys	Gln	Thr	Gln	Thr	Pro	Lys	Thr				
65						70					75				

<210> 145

<211> 76

<212> PRT

<213> 智人 (homo sapiens)

<400> 145

Gln	Pro	Asp	Ser	Val	Ser	Ile	Pro	Ile	Thr	Cys	Cys	Phe	Asn	Val	Ile
1				5				10						15	
Asn	Arg	Lys	Ile	Pro	Ile	Gln	Arg	Leu	Glu	Ser	Tyr	Thr	Arg	Ile	Thr
			20					25						30	
Asn	Ile	Gln	Cys	Pro	Lys	Glu	Ala	Val	Ile	Phe	Lys	Thr	Lys	Arg	Gly
			35					40						45	
Lys	Glu	Val	Cys	Ala	Asp	Pro	Lys	Glu	Arg	Trp	Val	Arg	Asp	Ser	Met
			50					55				60			
Lys	His	Leu	Asp	Gln	Ile	Phe	Gln	Asn	Leu	Lys	Pro				
65						70					75				

<210> 146

<211> 76

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> SEQ ID NO: 146 示例性人 CCL8 (MCP2) - P8A 变体

<400> 146

Gln	Pro	Asp	Ser	Val	Ser	Ile	Ala	Ile	Thr	Cys	Cys	Phe	Asn	Val	Ile
1				5				10						15	
Asn	Arg	Lys	Ile	Pro	Ile	Gln	Arg	Leu	Glu	Ser	Tyr	Thr	Arg	Ile	Thr

	20		25		30
Asn Ile Gln Cys Pro Lys Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Lys Arg Gly					
35		40		45	
Lys Glu Val Cys Ala Asp Pro Lys Glu Arg Trp Val Arg Asp Ser Met					
50		55		60	
Lys His Leu Asp Gln Ile Phe Gln Asn Leu Lys Pro					
65		70		75	
<210>	147				
<211>	76				
<212>	PRT				
<213>	智人 (homo sapiens)				
<400>	147				
Gln Pro Val Gly Ile Asn Thr Ser Thr Thr Cys Cys Tyr Arg Phe Ile					
1	5		10		15
Asn Lys Lys Ile Pro Lys Gln Arg Leu Glu Ser Tyr Arg Arg Thr Thr					
20		25		30	
Ser Ser His Cys Pro Arg Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Lys Leu Asp					
35		40		45	
Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Thr Gln Lys Trp Val Gln Asp Phe Met					
50		55		60	
Lys His Leu Asp Lys Lys Thr Gln Thr Pro Lys Leu					
65		70		75	
<210>	148				
<211>	82				
<212>	PRT				
<213>	智人 (homo sapiens)				
<400>	148				
Phe Asn Pro Gln Gly Leu Ala Gln Pro Asp Ala Leu Asn Val Pro Ser					
1	5		10		15
Thr Cys Cys Phe Thr Phe Ser Ser Lys Lys Ile Ser Leu Gln Arg Leu					
20		25		30	
Lys Ser Tyr Val Ile Thr Thr Ser Arg Cys Pro Gln Lys Ala Val Ile					
35		40		45	
Phe Arg Thr Lys Leu Gly Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Glu Lys					
50		55		60	
Trp Val Gln Asn Tyr Met Lys His Leu Gly Arg Lys Ala His Thr Leu					
65		70		75	80
Lys Thr					
<210>	149				

<211> 76

<212> PRT

<213> 食蟹猴

<400> 149

Gln Pro Asp Ala Ile Asn Ala Pro Val Thr Cys Cys Tyr Asn Phe Thr
 1 5 10 15
 Asn Arg Lys Ile Ser Val Gln Arg Leu Ala Ser Tyr Arg Arg Ile Thr
 20 25 30
 Ser Ser Lys Cys Pro Lys Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Ile Val Ala
 35 40 45
 Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Gln Lys Trp Val Gln Asp Ser Met
 50 55 60
 Asp His Leu Asp Lys Gln Ile Gln Thr Pro Lys Pro
 65 70 75

<210> 150

<211> 125

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 150

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

<210> 151

<211> 328

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> GG01 - 来源于包含突变(Kabat EU 编号)

L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K、Q311R/P343R、
N434A、Q438R/S440E 的 IgG1 的示例性人重链恒定区

<400> 151

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5				10					15		
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
			35					40					45		
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
			50				55					60			
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70				75					80	
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85					90						95	
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
			100					105					110		
Pro	Ala	Pro	Glu	Tyr	Leu	Gly	Gly	Asp	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
			115					120				125			
Lys	Pro	Lys	Asp	Val	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
			130					135				140			
Val	Val	Ile	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145					150				155					160	
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
			165					170						175	
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Pro	Val	Leu
			180					185					190		
His	Arg	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
			195				200					205			
Lys	Ala	Leu	Pro	Lys	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
			210				215					220			
Gln	Arg	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu
225					230				235					240	
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
			245					250						255	
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
			260					265					270		

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro
 325

<210> 152

<211> 328

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> GG02 - 来源于包含突变 (Kabat EU 编号)
 L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K、
 Q311R/P343R/M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E 的
 IgG1 的示例性人重链恒定区

<400> 152

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

				165					170					175		
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Pro	Val	Leu	
			180						185					190		
His	Arg	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	
		195					200					205				
Lys	Ala	Leu	Pro	Lys	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	
	210					215					220					
Gln	Arg	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	
225					230					235					240	
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	
			245						250				255			
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	
		260						265				270				
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	
	275						280					285				
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	
	290					295					300					
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Leu	His	Glu	Ala	Leu	His	Ala	His	Thr	Thr	
305					310					315					320	
Arg	Lys	Glu	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro									
			325													
<210>	153															
<211>	328															
<212>	PRT															
<213>	人工															
<220>																
<223>	GG03 - 来源于包含突变(Kabat EU 编号) L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K、 Q311R/P343R、N434A、Q438R/S440E 的 IgG1 (包含 IgG1 同种异型序列)的示例性人重链恒定区															
<400>	153															
Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	
1			5				10				15					
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	
			20				25				30					
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	
		35					40				45					
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	
	50						55				60					

Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70					75					80
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85						90					95	
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
			100						105				110		
Pro	Ala	Pro	Glu	Tyr	Leu	Gly	Gly	Asp	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
			115					120				125			
Lys	Pro	Lys	Asp	Val	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
			130				135				140				
Val	Val	Ile	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145						150				155					160
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
						165				170				175	
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Pro	Val	Leu
			180					185					190		
His	Arg	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
			195					200				205			
Lys	Ala	Leu	Pro	Lys	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
			210				215				220				
Gln	Arg	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
225					230					235					240
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
					245				250					255	
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
			260					265					270		
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
			275					280				285			
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
			290				295				300				
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Ala	His	Tyr	Thr
305					310					315					320
Arg	Lys	Glu	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro								
					325										

<210> 154

<211> 328

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> GG04 - 来源于包含突变(Kabat EU 编号)
L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K/Q311R/P343R、
M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E 的 IgG1
(包含 IgG1 同种异型序列)的示例性人重链恒定区

<400> 154

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5				10					15		
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
			35					40					45		
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
			50					55					60		
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65						70					75				80
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
						85					90				95
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
						100					105				110
Pro	Ala	Pro	Glu	Tyr	Leu	Gly	Gly	Asp	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
						115					120				125
Lys	Pro	Lys	Asp	Val	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
						130					135				140
Val	Val	Ile	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145								150							160
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
								165							175
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Pro	Val	Leu
								180							185
His	Arg	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
								195							200
Lys	Ala	Leu	Pro	Lys	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
								210							215
Gln	Arg	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
225								230							235
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
								245							250
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
								260							265
															270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Ala His Thr Thr
 305 310 315 320
 Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro
 325

<210> 155

<211> 437

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重链 1- CKL02 - GG01

<400> 155

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Phe Glu Asp Ile Tyr Asn Arg
 20 25 30
 Arg Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 His Gly Ala Thr Ser Leu Glu His Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Trp Ser Ala Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr
 100 105 110
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 115 120 125
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 130 135 140
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 145 150 155 160
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 180 185 190

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu		
195	200	205
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro		
210	215	220
Glu Tyr Leu Gly Gly Asp Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys		
225	230	235
240		
Asp Val Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Ile		
245	250	255
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp		
260	265	270
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr		
275	280	285
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Val Leu His Arg Asp		
290	295	300
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu		
305	310	315
320		
Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Arg Arg		
325	330	335
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys		
340	345	350
Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp		
355	360	365
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys		
370	375	380
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser		
385	390	395
400		
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser		
405	410	415
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala His Tyr Thr Arg Lys Glu		
420	425	430
Leu Ser Leu Ser Pro		
435		
<210>	156	
<211>	447	
<212>	PRT	
<213>	人工	
<220>		
<223>	重链 2- CKL02 - GG01	
<400>	156	

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	His	Tyr
			20					25					30		
Gly	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Gly	Val	Ile	Pro	Ile	Phe	His	Thr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70				75					80	
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90				95		
Ala	Arg	Tyr	Asp	Ala	His	Tyr	Gly	Glu	Leu	Asp	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		
Thr	Leu	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	Glu	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	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys
	210					215				220					
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Tyr	Leu	Gly	Gly	Asp
225					230					235				240	
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Val	Leu	Met	Ile	Ser
			245						250				255		
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Ile	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	Pro	Val	Leu	His	Arg	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu

305	310	315	320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys			
	325	330	335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Arg Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr			
	340	345	350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu 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 Ala His Tyr Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro			
	435	440	445
<210> 157			
<211> 224			
<212> PRT			
<213> 人工			
<220>			
<223> 轻链 1- CKL02 GG01			
<400> 157			
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser			
1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Leu Thr Ile Ser His Thr			
	20	25	30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			
	35	40	45
Gly Arg Ile Asp Pro Asp Asn His Asn Thr Lys Phe Asp Pro Lys Phe			
	50	55	60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Arg Gly Val Phe Gly Phe Phe Glu His Trp Gly Gln Gly Thr Thr			
	100	105	110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe			

115	120	125
Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys		
130	135	140
Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val		
145	150	155
Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln		
165	170	175
Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser		
180	185	190
Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His		
195	200	205
Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210	215	220
<210> 158		
<211> 216		
<212> PRT		
<213> 人工		
<220>		
<223> 轻链 2- CKL02 GG01		
<400> 158		
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
1	5	10
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln His Val Ser Asp Ala		
20	25	30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu		
35	40	45
Ile Tyr Asp Ala Ser Asp Arg Ala Glu Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser		
50	55	60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu		
65	70	75
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Ile His Leu His		
85	90	95
Ser Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val		
100	105	110
Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys		
115	120	125
Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg		
130	135	140
Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn		

145	150	155	160
Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser			
	165	170	175
Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys			
	180	185	190
Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr			
	195	200	205
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
210	215		
<210> 159			
<211> 437			
<212> PRT			
<213> 人工			
<220>			
<223> 重链 1- CKL02 GG02			
<400> 159			
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Phe Glu Asp Ile Tyr Asn Arg			
	20	25	30
Arg Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
	35	40	45
His Gly Ala Thr Ser Leu Glu His Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
	50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Trp Ser Ala Pro Tyr			
	85	90	95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr			
	100	105	110
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser			
	115	120	125
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu			
	130	135	140
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His			
145	150	155	160
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser			
	165	170	175
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys			

	180		185		190
Asn Val	Asn His Lys Pro Ser	Asn Thr Lys Val Asp	Lys Lys Val Glu		
195		200		205	
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro					
210		215		220	
Glu Tyr Leu Gly Gly Asp Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys					
225		230		235	240
Asp Val Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Ile					
	245		250		255
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp					
260		265		270	
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr					
275		280		285	
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Val Leu His Arg Asp					
290		295		300	
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu					
305		310		315	320
Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Arg Arg					
	325		330		335
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys					
340		345		350	
Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp					
355		360		365	
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys					
370		375		380	
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser					
385		390		395	400
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser					
	405		410		415
Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Ala His Thr Thr Arg Lys Glu					
	420		425		430
Leu Ser Leu Ser Pro					
435					
<210>	160				
<211>	447				
<212>	PRT				
<213>	人工				
<220>					
<223>	重链 2- CKL02 GG02				

<400> 160
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser His Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Val Ile Pro Ile Phe His Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Tyr Asp Ala His Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu 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 Glu 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 Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Tyr Leu Gly Gly Asp
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Ile 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	Pro	Val	Leu	His	Arg	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu
305					310					315					320
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Lys	Pro	Ile	Glu	Lys
			325						330					335	
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Arg	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Cys	Thr
			340					345					350		
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	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	Leu	His	Glu
			420					425					430		
Ala	Leu	His	Ala	His	Thr	Thr	Arg	Lys	Glu	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	
		435					440					445			
<210>	161														
<211>	224														
<212>	PRT														
<213>	人工														
<220>															
<223>	轻链 1- CKL02 - GG02														
<400>	161														
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
1			5					10					15		
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Leu	Thr	Ile	Ser	His	Thr
		20					25					30			
Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
	35					40					45				
Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Asp	Asn	His	Asn	Thr	Lys	Phe	Asp	Pro	Lys	Phe
	50					55				60					
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
65			70					75						80	
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85					90					95		
Ala	Arg	Gly	Val	Phe	Gly	Phe	Phe	Glu	His	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr
		100						105					110		

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe		
115	120	125
Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys		
130	135	140
Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val		
145	150	155
160		
Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln		
165	170	175
Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser		
180	185	190
Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His		
195	200	205
Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210	215	220
<210>	162	
<211>	216	
<212>	PRT	
<213>	人工	
<220>		
<223>	轻链 2- CKL02 - GG02	
<400>	162	
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 His Val Ser Asp Ala		
20	25	30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu		
35	40	45
Ile Tyr Asp Ala Ser Asp Arg Ala Glu Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser		
50	55	60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu		
65	70	75
80		
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Ile His Leu His		
85	90	95
Ser Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val		
100	105	110
Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys		
115	120	125
Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg		
130	135	140

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 145 150 155 160
 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 165 170 175
 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 180 185 190
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 195 200 205
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 163

<211> 437

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重链 1- CKL02 - GG03

<400> 163

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Phe Glu Asp Ile Tyr Asn Arg
 20 25 30
 Arg Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 His Gly Ala Thr Ser Leu Glu His Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Trp Ser Ala Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr
 100 105 110
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 115 120 125
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 130 135 140
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 145 150 155 160
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys		
180	185	190
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu		
195	200	205
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro		
210	215	220
Glu Tyr Leu Gly Gly Asp Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys		
225	230	235
Asp Val Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Ile		
245	250	255
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp		
260	265	270
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr		
275	280	285
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Val Leu His Arg Asp		
290	295	300
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu		
305	310	315
Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Arg Arg		
325	330	335
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Glu Glu Met Thr Lys		
340	345	350
Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp		
355	360	365
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys		
370	375	380
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser		
385	390	395
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser		
405	410	415
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala His Tyr Thr Arg Lys Glu		
420	425	430
Leu Ser Leu Ser Pro		
435		
<210>	164	
<211>	447	
<212>	PRT	
<213>	人工	
<220>		

<223> 重链 2- CKL02 - GG03

<400> 164

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	His	Tyr
			20					25					30		
Gly	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
			35				40						45		
Gly	Gly	Val	Ile	Pro	Ile	Phe	His	Thr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
		50				55					60				
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70				75					80	
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Tyr	Asp	Ala	His	Tyr	Gly	Glu	Leu	Asp	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		
Thr	Leu	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	Glu	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	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys
		210				215					220				
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Tyr	Leu	Gly	Gly	Asp
225					230					235				240	
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Val	Leu	Met	Ile	Ser
				245					250					255	
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Ile	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 Pro	Val Leu His Arg Asp Trp	Leu Asn Gly Lys Glu
305	310	315
Tyr Lys Cys Lys Val	Ser Asn Lys Ala Leu Pro	Lys Pro Ile Glu Lys
325	330	335
Thr Ile Ser Lys Ala	Lys Gly Gln Arg Arg Glu Pro	Gln Val Cys 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
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 Ala His	Tyr Thr Arg Lys Glu Leu Ser	Leu Ser Pro
435	440	445
<210>	165	
<211>	224	
<212>	PRT	
<213>	人工	
<220>		
<223>	轻链 1- CKL02 - GG03	
<400>	165	
Gln Val Gln Leu Val	Gln Ser Gly Ala Glu Val	Lys Lys Pro Gly Ser
1	5	10
Ser Val Lys Val Ser	Cys Lys Ala Ser Gly Leu Thr	Ile Ser His Thr
20	25	30
Tyr Met His Trp Val	Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly	Leu Glu Trp Met
35	40	45
Gly Arg Ile Asp Pro	Asp Asn His Asn Thr Lys Phe	Asp Pro Lys Phe
50	55	60
Gln Gly Arg Val Thr	Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr	Ser Thr Ala Tyr
65	70	75
Met Glu Leu Ser Ser	Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala	Val Tyr Tyr Cys
85	90	95
Ala Arg Gly Val Phe	Gly Phe Phe Glu His Trp Gly	Gln Gly Thr Thr

100	105	110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser	Val Ala Ala Pro Ser	Val Phe Ile Phe
115	120	125
Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys	Ser Gly Thr Ala Ser	Val Val Cys
130	135	140
Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg	Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys	Val
145	150	155
Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn	Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu	Gln
165	170	175
Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser	Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu	Ser
180	185	190
Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys	Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr	His
195	200	205
Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr	Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu	Cys
210	215	220
<210>	166	
<211>	216	
<212>	PRT	
<213>	人工	
<220>		
<223>	轻链 2- CKL02 - GG03	
<400>	166	
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro	Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro	Gly
1	5	10
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg	Ala Ser Gln His Val Ser Asp	Ala
20	25	30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys	Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu	Leu
35	40	45
Ile Tyr Asp Ala Ser Asp Arg Ala	Glu Gly Val Pro Ala Arg Phe	Ser
50	55	60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe	Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu	Glu
65	70	75
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr	Cys His Gln Tyr Ile His Leu	His
85	90	95
Ser Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr	Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr	Val
100	105	110
Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe	Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu	Lys
115	120	125
Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys	Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro	Arg

130	135	140
Glu Ala Lys Val Gln Trp	Lys Val Asp Asn Ala Leu	Gln Ser Gly Asn
145	150	155
Ser Gln Glu Ser Val Thr	Glu Gln Asp Ser Lys Asp	Ser Thr Tyr Ser
165	170	175
Leu Ser Ser Thr Leu Thr	Leu Ser Lys Ala Asp Tyr	Glu Lys His Lys
180	185	190
Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr	His Gln Gly Leu Ser Ser	Pro Val Thr
195	200	205
Lys Ser Phe Asn Arg Gly	Glu Cys	
210	215	
<210> 167		
<211> 437		
<212> PRT		
<213> 人工		
<220>		
<223> 重链 1- CKL02 - GG04		
<400> 167		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Phe Glu Asp Ile Tyr Asn Arg		
20	25	30
Arg Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
35	40	45
His Gly Ala Thr Ser Leu Glu His Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Trp Ser Ala Pro Tyr		
85	90	95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr		
100	105	110
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser		
115	120	125
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu		
130	135	140
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His		
145	150	155
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser		

				165					170					175	
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys
				180					185					190	
Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu
				195					200					205	
Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
				210					215					220	
Glu	Tyr	Leu	Gly	Gly	Asp	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys
225									230					235	
Asp	Val	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Ile
				245					250					255	
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp
				260					265					270	
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr
				275					280					285	
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Pro	Val	Leu	His	Arg	Asp
				290					295					300	
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu
305									310					315	
Pro	Lys	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Arg	Arg
				325					330					335	
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys
				340					345					350	
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp
				355					360					365	
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys
				370					375					380	
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser
385									390					395	
Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
				405					410					415	
Cys	Ser	Val	Leu	His	Glu	Ala	Leu	His	Ala	His	Thr	Thr	Arg	Lys	Glu
				420					425					430	
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro											
				435											
<210>	168														
<211>	447														
<212>	PRT														
<213>	人工														

<220>

<223> 重链 2- CKL02 - GG04

<400> 168

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	His	Tyr
			20					25						30	
Gly	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
			35					40						45	
Gly	Gly	Val	Ile	Pro	Ile	Phe	His	Thr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
			50					55						60	
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
65							70				75				80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
							85				90				95
Ala	Arg	Tyr	Asp	Ala	His	Tyr	Gly	Glu	Leu	Asp	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly
							100				105				110
Thr	Leu	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	Glu	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	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys
							210				215				220
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Tyr	Leu	Gly	Gly	Asp
225							230				235				240
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Val	Leu	Met	Ile	Ser
							245				250				255
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Ile	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																			
Val Ser Val Leu Pro Val Leu His Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu																			
305																			
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys																			
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Arg Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr																			
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser																			
Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu																			
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu																			
385																			
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys																			
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu																			
Ala Leu His Ala His Thr Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro																			
<210> 169																			
<211> 224																			
<212> PRT																			
<213> 人工																			
<220>																			
<223> 轻链 1- CKL02 - GG04																			
<400> 169																			
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser																			
1																			
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Leu Thr Ile Ser His Thr																			
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met																			
Gly Arg Ile Asp Pro Asp Asn His Asn Thr Lys Phe Asp Pro Lys Phe																			
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr																			
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys																			

Ala Arg Gly Val Phe Gly Phe Phe Glu His Trp Gly Gln Gly Thr Thr		
100	105	110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe		
115	120	125
Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys		
130	135	140
Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val		
145	150	155
Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln		
165	170	175
Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser		
180	185	190
Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His		
195	200	205
Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210	215	220
<210>	170	
<211>	216	
<212>	PRT	
<213>	人工	
<220>		
<223>	轻链 2- CKL02 - GG04	
<400>	170	
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
1	5	10
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln His Val Ser Asp Ala		
20	25	30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu		
35	40	45
Ile Tyr Asp Ala Ser Asp Arg Ala Glu Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser		
50	55	60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu		
65	70	75
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Ile His Leu His		
85	90	95
Ser Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val		
100	105	110
Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys		
115	120	125

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 130 135 140
 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 145 150 155 160
 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 165 170 175
 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 180 185 190
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 195 200 205
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 171
 <211> 437
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> 重链 1- CKL02 - GG03/GG04
 <400> 171
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Phe Glu Asp Ile Tyr Asn Arg
 20 25 30
 Arg Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 His Gly Ala Thr Ser Leu Glu His Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Trp Ser Ala Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr
 100 105 110
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 115 120 125
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 130 135 140
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 145 150 155 160

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser		
	165	170 175
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys		
	180	185 190
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu		
	195	200 205
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro		
	210	215 220
Glu Tyr Leu Gly Gly Asp Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys		
225	230	235 240
Asp Val Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Ile		
	245	250 255
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp		
	260	265 270
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr		
	275	280 285
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Val Leu His Arg Asp		
	290	295 300
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu		
305	310	315 320
Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Arg Arg		
	325	330 335
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Glu Glu Met Thr Lys		
	340	345 350
Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp		
	355	360 365
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys		
	370	375 380
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser		
385	390	395 400
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser		
	405	410 415
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala His Tyr Thr Arg Lys Glu		
	420	425 430
Leu Ser Leu Ser Pro		
	435	
<210>	172	
<211>	447	
<212>	PRT	

<213> 人工

<220>

<223> 重链 2- CKL02 - GG03/GG04

<400> 172

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	His	Tyr
			20					25					30		
Gly	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
			35				40					45			
Gly	Gly	Val	Ile	Pro	Ile	Phe	His	Thr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
		50				55				60					
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70				75					80	
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90				95		
Ala	Arg	Tyr	Asp	Ala	His	Tyr	Gly	Glu	Leu	Asp	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		
Thr	Leu	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	Glu	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	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys
		210				215				220					
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Tyr	Leu	Gly	Gly	Asp
225					230					235				240	
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Val	Leu	Met	Ile	Ser
			245						250				255		
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Ile	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 Pro Val Leu His Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
305	310	315
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys		
325	330	335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Arg Arg Glu Pro Gln Val Cys 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
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 Leu His Glu		
420	425	430
Ala Leu His Ala His Thr Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro		
435	440	445
<210> 173		
<211> 224		
<212> PRT		
<213> 人工		
<220>		
<223> 轻链 1- CKL02 - GG03/GG04		
<400> 173		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser		
1	5	10
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Leu Thr Ile Ser His Thr		
20	25	30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
35	40	45
Gly Arg Ile Asp Pro Asp Asn His Asn Thr Lys Phe Asp Pro Lys Phe		
50	55	60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		

				85					90					95			
Ala	Arg	Gly	Val	Phe	Gly	Phe	Phe	Glu	His	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr		
				100					105					110			
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe		
				115					120					125			
Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys		
				130					135					140			
Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val		
145					150					155					160		
Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln		
				165						170				175			
Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser		
				180					185					190			
Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His		
				195					200					205			
Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys		
				210					215					220			
<210>	174																
<211>	216																
<212>	PRT																
<213>	人工																
<220>																	
<223>	轻链 2-	CKL02	-	GG03	/GG04												
<400>	174																
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	His	Val	Ser	Asp	Ala		
				20					25					30			
Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu		
				35					40					45			
Ile	Tyr	Asp	Ala	Ser	Asp	Arg	Ala	Glu	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser		
				50					55					60			
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu		
65					70				75					80			
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	His	Gln	Tyr	Ile	His	Leu	His		
				85					90					95			
Ser	Phe	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val		
				100					105					110			
Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Arg	Lys	Leu	Lys		

115	120	125
Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg		
130	135	140
Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn		
145	150	155
Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser		
165	170	175
Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys		
180	185	190
Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr		
195	200	205
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210	215	
<210> 175		
<211> 685		
<212> PRT		
<213> 人工		
<220>		
<223> 多肽链 1- CKL02 - CB- SG1095		
<400> 175		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser		
1	5	10
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser His Tyr		
20	25	30
Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
35	40	45
Gly Gly Val Ile Pro Ile Phe His Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe		
50	55	60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Tyr Asp Ala His Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly		
100	105	110
Thr Leu 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 Gly Gly			
	210	215	220
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro			
225	230	235	240
Cys Pro Ala Pro Glu Leu Trp Asn Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro			
	245	250	255
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr			
	260	265	270
Cys Val Val Val Asp Val Ser Asp Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn			
	275	280	285
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg			
	290	295	300
Glu Glu Leu Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val			
305	310	315	320
Leu His Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser			
	325	330	335
Asn Thr Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys			
	340	345	350
Gly Gln Arg Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp			
	355	360	365
Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe			
	370	375	380
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu			
385	390	395	400
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe			
	405	410	415
Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly			
	420	425	430
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala His Tyr			
	435	440	445
Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Ser Gly Gly			
450	455	460	

Gly Gly Ser Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu			
465	470	475	480
Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln			
	485	490	495
His Val Ser Asp Ala Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln			
	500	505	510
Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asp Arg Ala Glu Gly Val			
	515	520	525
Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr			
	530	535	540
Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln			
545	550	555	560
Tyr Ile His Leu His Ser Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu			
	565	570	575
Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser			
	580	585	590
Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn			
	595	600	605
Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala			
	610	615	620
Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys			
625	630	635	640
Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp			
	645	650	655
Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu			
	660	665	670
Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
	675	680	685
<210>	176		
<211>	681		
<212>	PRT		
<213>	人工		
<220>			
<223>	多肽链 2- CKL02 - CB- SG1095		
<400>	176		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser			
1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Leu Thr Ile Ser His Thr			
	20	25	30

Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
	35						40					45			
Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Asp	Asn	His	Asn	Thr	Lys	Phe	Asp	Pro	Lys	Phe
	50					55					60				
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Gly	Val	Phe	Gly	Phe	Phe	Glu	His	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr
			100					105					110		
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu
			115					120					125		
Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys
	130						135				140				
Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser
145					150					155					160
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser
					165				170					175	
Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser
			180					185					190		
Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn
			195					200					205		
Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Gly	Gly	Ser	Gly
	210						215				220				
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro
225					230					235					240
Ala	Pro	Glu	Leu	Trp	Asn	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	Asp	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr
			275					280				285			
Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu
	290						295				300				
Leu	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His
305					310					315					320
Arg	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Thr
					325					330				335	
Ala	Leu	Pro	Lys	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln

			340				345				350					
Arg	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	
			355				360				365					
Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	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	Lys	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	Ala	His	Tyr	Thr	Arg	
			435				440				445					
Lys	Glu	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	
450							455				460					
Ser	Gly	Gly	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	
465							470				475				480	
Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Phe	Glu	Asp	Ile	
			485				490				495					
Tyr	Asn	Arg	Arg	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	
			500				505				510					
Leu	Leu	Ile	His	Gly	Ala	Thr	Ser	Leu	Glu	His	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	
			515				520				525					
Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	
530							535				540					
Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Phe	Trp	Ser	
545							550				555				560	
Ala	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	
			565				570				575					
Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	
			580				585				590					
Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	
			595				600				605					
Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	
610							615				620					
Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	
625							630				635				640	
Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	
			645				650				655					

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 660 665 670
 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 675 680
 <210> 177
 <211> 685
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> 多肽链 1- CKL02 - CB- GG02
 <400> 177
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser His Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Val Ile Pro Ile Phe His Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Tyr Asp Ala His Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu 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 Gly Gly
 210 215 220

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro			
225	230	235	240
Cys Pro Ala Pro Glu Tyr Leu Gly Gly Asp Ser Val Phe Leu Phe Pro			
	245	250	255
Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr			
	260	265	270
Cys Val Val Ile Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn			
	275	280	285
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg			
	290	295	300
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Val			
305	310	315	320
Leu His Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser			
	325	330	335
Asn Lys Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys			
	340	345	350
Gly Gln Arg Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp			
	355	360	365
Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe			
	370	375	380
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu			
385	390	395	400
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe			
	405	410	415
Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly			
	420	425	430
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Ala His Thr			
	435	440	445
Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Ser Gly Gly			
	450	455	460
Gly Gly Ser Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu			
465	470	475	480
Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln			
	485	490	495
His Val Ser Asp Ala Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln			
	500	505	510
Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asp Arg Ala Glu Gly Val			
	515	520	525
Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr			

530	535	540
Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln		
545	550	555
Tyr Ile His Leu His Ser Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu		
565	570	575
Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser		
580	585	590
Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn		
595	600	605
Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala		
610	615	620
Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys		
625	630	635
Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp		
645	650	655
Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu		
660	665	670
Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
675	680	685
<210> 178		
<211> 681		
<212> PRT		
<213> 人工		
<220>		
<223> 多肽链 2- CKL02 - CB- GG02		
<400> 178		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser		
1	5	10
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Leu Thr Ile Ser His Thr		
20	25	30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
35	40	45
Gly Arg Ile Asp Pro Asp Asn His Asn Thr Lys Phe Asp Pro Lys Phe		
50	55	60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Gly Val Phe Gly Phe Phe Glu His Trp Gly Gln Gly Thr Thr		

	100		105		110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu					
115		120		125	
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys					
130		135		140	
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser					
145		150		155	160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser					
165		170		175	
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser					
180		185		190	
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn					
195		200		205	
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Ser Gly					
210		215		220	
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro					
225		230		235	240
Ala Pro Glu Tyr Leu Gly Gly Asp Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys					
245		250		255	
Pro Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val					
260		265		270	
Val Ile Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr					
275		280		285	
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 Pro Val Leu His					
305		310		315	320
Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys					
325		330		335	
Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln					
340		345		350	
Arg Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu					
355		360		365	
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp 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	

$\langle 210 \rangle$	179
$\langle 211 \rangle$	685
$\langle 212 \rangle$	PRT
$\langle 213 \rangle$	人工
$\langle 220 \rangle$	

<223> 多肽链 1- CKL02 - CB- GG02-KG

<400> 179

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	His	Tyr
			20					25					30		
Gly	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
			35				40					45			
Gly	Gly	Val	Ile	Pro	Ile	Phe	His	Thr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
		50				55					60				
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70				75					80	
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90				95		
Ala	Arg	Tyr	Asp	Ala	His	Tyr	Gly	Glu	Leu	Asp	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		
Thr	Leu	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	Gly	Gly
		210				215				220					
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro
225				230					235					240	
Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Tyr	Leu	Gly	Gly	Asp	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro
				245					250				255		
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Val	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr
			260				265					270			
Cys	Val	Val	Ile	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn
		275					280					285			
Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg

290	295	300
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Val		
305	310	315
Leu His Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser		320
	325	330
Asn Lys Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys		335
	340	345
Gly Gln Arg Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp		350
	355	360
Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe		365
370	375	380
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu		
385	390	395
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe		400
	405	410
Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly		415
	420	425
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Ala His Thr		430
435	440	445
Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
450	455	460
Gly Gly Ser Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu		
465	470	475
Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln		480
	485	490
His Val Ser Asp Ala Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln		495
	500	505
Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asp Arg Ala Glu Gly Val		510
	515	520
Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr		525
530	535	540
Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln		
545	550	555
Tyr Ile His Leu His Ser Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu		560
	565	570
Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser		575
	580	585
Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn		590
595	600	605

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Leu	Thr	Ile	Ser	His	Thr
			20					25					30		
Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Asp	Asn	His	Asn	Thr	Lys	Phe	Asp	Pro	Lys	Phe
	50					55				60					
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Gly	Val	Phe	Gly	Phe	Phe	Glu	His	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr
			100					105					110		
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu
		115					120					125			
Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys
	130					135				140					
Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser
145					150					155					160
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser
				165					170					175	

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser																	
180																	
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn																	
195																	
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Ser Gly																	
210																	
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro																	
225																	
Ala Pro Glu Tyr Leu Gly Gly Asp Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys																	
245																	
Pro Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val																	
260																	
Val Ile Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr																	
275																	
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu																	
290																	
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Val Leu His																	
305																	
Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys																	
325																	
Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln																	
340																	
Arg Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu																	
355																	
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro																	
370																	
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn																	
385																	
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu																	
405																	
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val																	
420																	
Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Ala His Thr Thr Arg																	
435																	
Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly																	
450																	
Ser Gly Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala																	
465																	
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Phe Glu Asp Ile																	

	485		490		495
Tyr Asn Arg Arg Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys					
	500		505		510
Leu Leu Ile His Gly Ala Thr Ser Leu Glu His Gly Val Pro Ser Arg					
	515		520		525
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser					
	530		535		540
Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Trp Ser					
545		550		555	560
Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr					
	565		570		575
Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu					
	580		585		590
Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro					
	595		600		605
Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly					
	610		615		620
Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr					
625		630		635	640
Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His					
	645		650		655
Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val					
	660		665		670
Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys					
	675		680		
<210>	181				
<211>	685				
<212>	PRT				
<213>	人工				
<220>					
<223>	多肽链 1- CKL02 - CB- SG1095-KG				
<400>	181				
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser					
1	5		10		15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser His Tyr					
	20		25		30
Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met					
	35		40		45
Gly Gly Val Ile Pro Ile Phe His Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe					

50	55	60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Tyr Asp Ala His Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly		
100	105	110
Thr Leu 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
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 Gly Gly		
210	215	220
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro		
225	230	235
Cys Pro Ala Pro Glu Leu Trp Asn Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro		
245	250	255
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr		
260	265	270
Cys Val Val Val Asp Val Ser Asp Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn		
275	280	285
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg		
290	295	300
Glu Glu Leu Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val		
305	310	315
Leu His Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser		
325	330	335
Asn Thr Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys		
340	345	350
Gly Gln Arg Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp		
355	360	365

Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	370	375	380
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	385	390	395
Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	405	410	415
Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	420	425	430
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Ala	His	Tyr	435	440	445
Thr	Arg	Lys	Glu	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	450	455	460
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	465	470	475
Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	485	490	495
His	Val	Ser	Asp	Ala	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	500	505	510
Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Asp	Ala	Ser	Asp	Arg	Ala	Glu	Gly	Val	515	520	525
Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	530	535	540
Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	His	Gln	545	550	555
Tyr	Ile	His	Leu	His	Ser	Phe	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	565	570	575
Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	580	585	590
Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	595	600	605
Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	610	615	620
Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	625	630	635
Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	645	650	655
Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	660	665	670
Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys						

675	680	685
<210> 182		
<211> 681		
<212> PRT		
<213> 人工		
<220>		
<223> 多肽链 2- CKL02 - CB- SG1095-KG		
<400> 182		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser		
1 5 10 15		
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Leu Thr Ile Ser His Thr		
20 25 30		
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
35 40 45		
Gly Arg Ile Asp Pro Asp Asn His Asn Thr Lys Phe Asp Pro Lys Phe		
50 55 60		
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
65 70 75 80		
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85 90 95		
Ala Arg Gly Val Phe Gly Phe Phe Glu His Trp Gly Gln Gly Thr Thr		
100 105 110		
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu		
115 120 125		
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys		
130 135 140		
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser		
145 150 155 160		
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser		
165 170 175		
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser		
180 185 190		
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn		
195 200 205		
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Ser Gly		
210 215 220		
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro		
225 230 235 240		
Ala Pro Glu Leu Trp Asn 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	Asp	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr
				275				280				285			
Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu
				290				295				300			
Leu	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His
305				310				315				320			
Arg	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Thr
				325				330				335			
Ala	Leu	Pro	Lys	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln
				340				345				350			
Arg	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu
				355				360				365			
Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	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	Lys	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	Ala	His	Tyr	Thr	Arg
				435				440				445			
Lys	Glu	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
				450				455				460			
Ser	Gly	Gly	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala
465				470				475				480			
Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Phe	Glu	Asp	Ile
				485				490				495			
Tyr	Asn	Arg	Arg	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys
				500				505				510			
Leu	Leu	Ile	His	Gly	Ala	Thr	Ser	Leu	Glu	His	Gly	Val	Pro	Ser	Arg
				515				520				525			
Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser
				530				535				540			
Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Phe	Trp	Ser
545				550				555				560			

Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
565 570 575
Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
580 585 590
Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
595 600 605
Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
610 615 620
Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
625 630 635 640
Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
645 650 655
Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
660 665 670
Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
675 680

<210> 183

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 多肽接头 GSGGSGGSGG

<400> 183

Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10

<210> 184

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 多肽接头 GSGGGSGGGG

<400> 184

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10

<210> 185

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 多肽接头 GSGGGGSGGG
<400> 185
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
1 5 10
<210> 186
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 多肽接头 GGSGGSGGGG
<400> 186
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10
<210> 187
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 多肽接头 GGSGGGSGGG
<400> 187
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
1 5 10
<210> 188
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 多肽接头 GGSGGGGSGG
<400> 188
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10
<210> 189
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 多肽接头 GGGSGGSGGG
<400> 189
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly

1	5	10
<210>	190	
<211>	10	
<212>	PRT	
<213>	人工	
<220>		
<223>	多肽接头	GGGSGGGSGG
<400>	190	
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
1	5	10
<210>	191	
<211>	10	
<212>	PRT	
<213>	人工	
<220>		
<223>	多肽接头	GGGGSGGSGG
<400>	191	
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly		
1	5	10

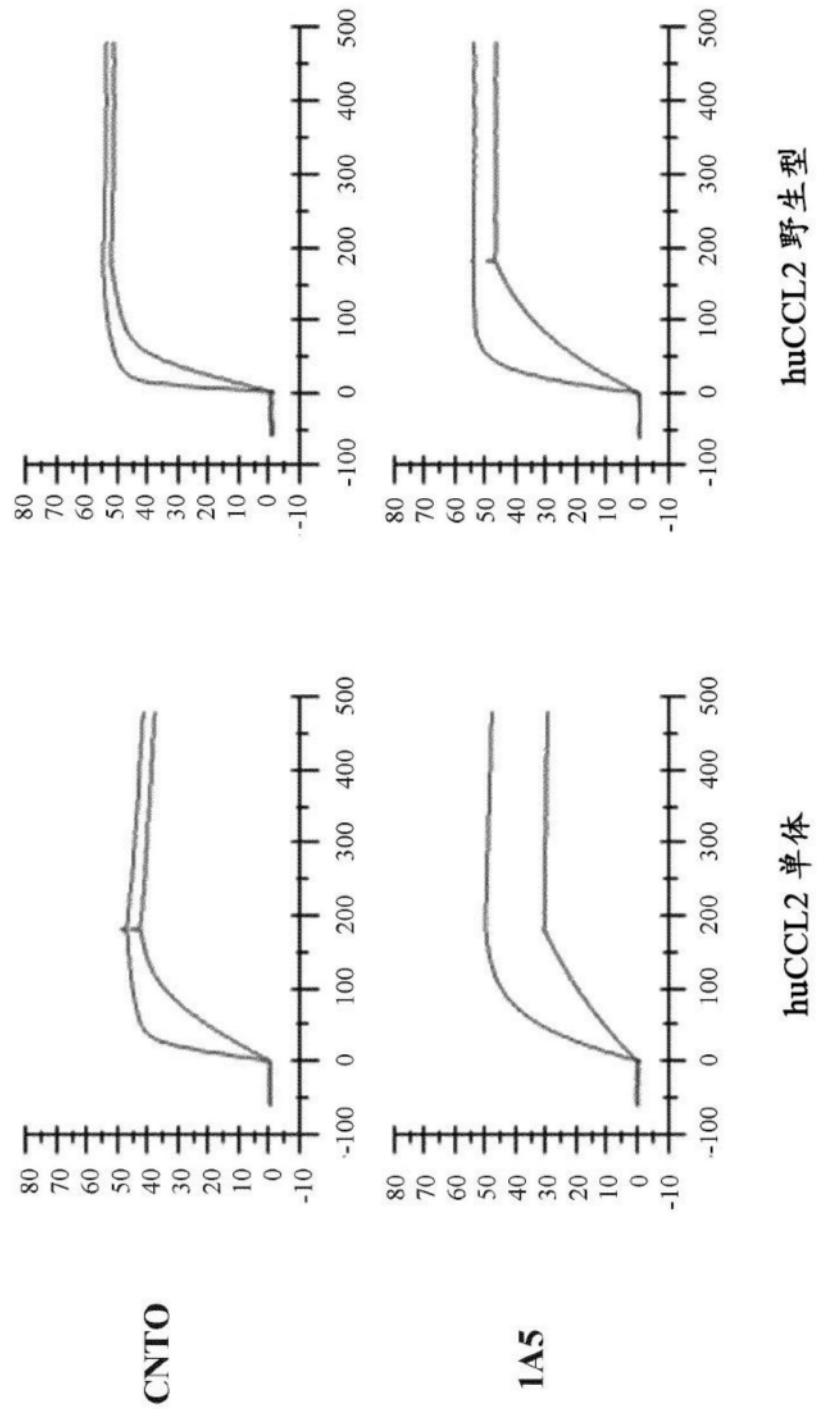


图1

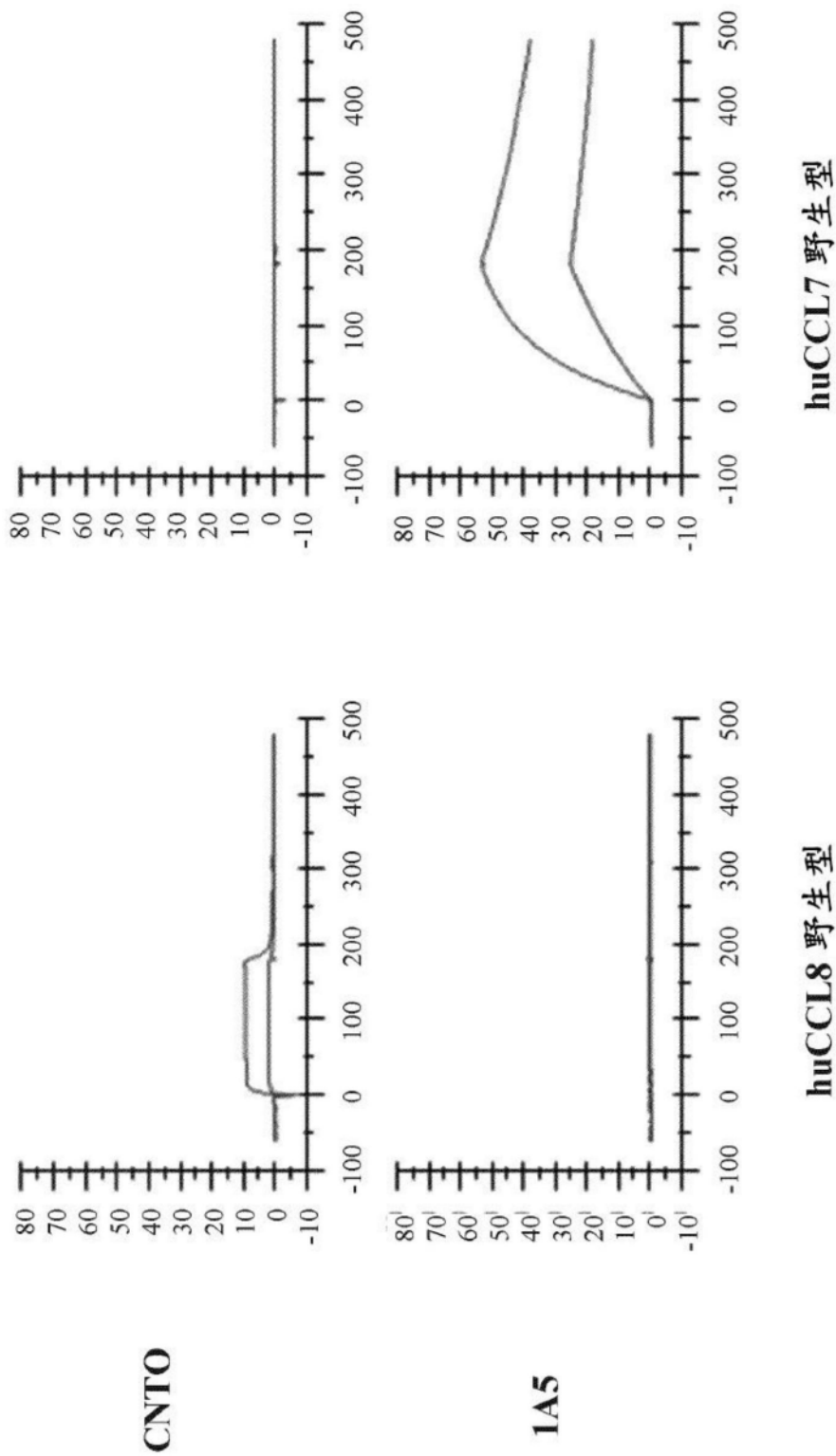


图1续

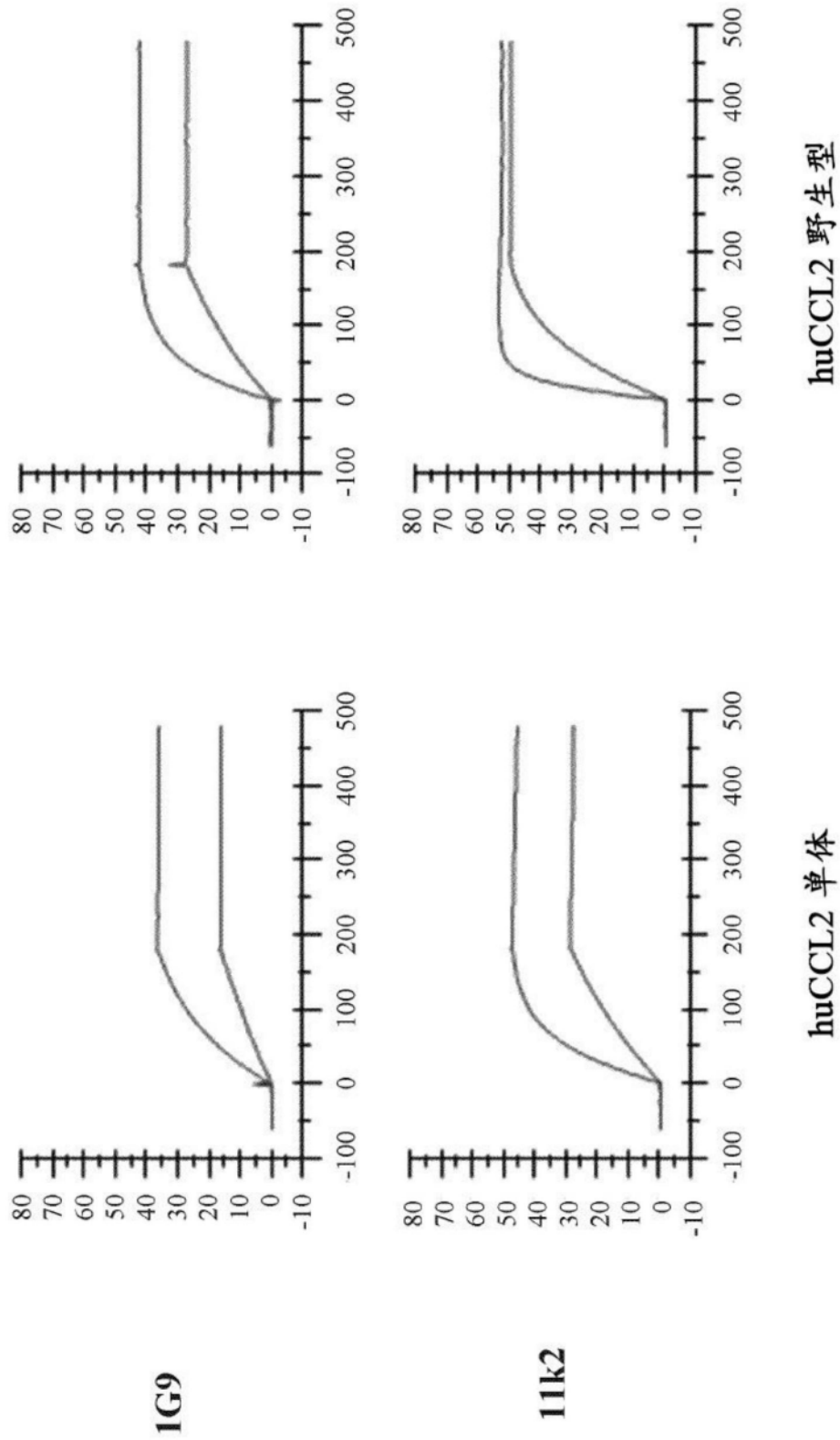


图1续

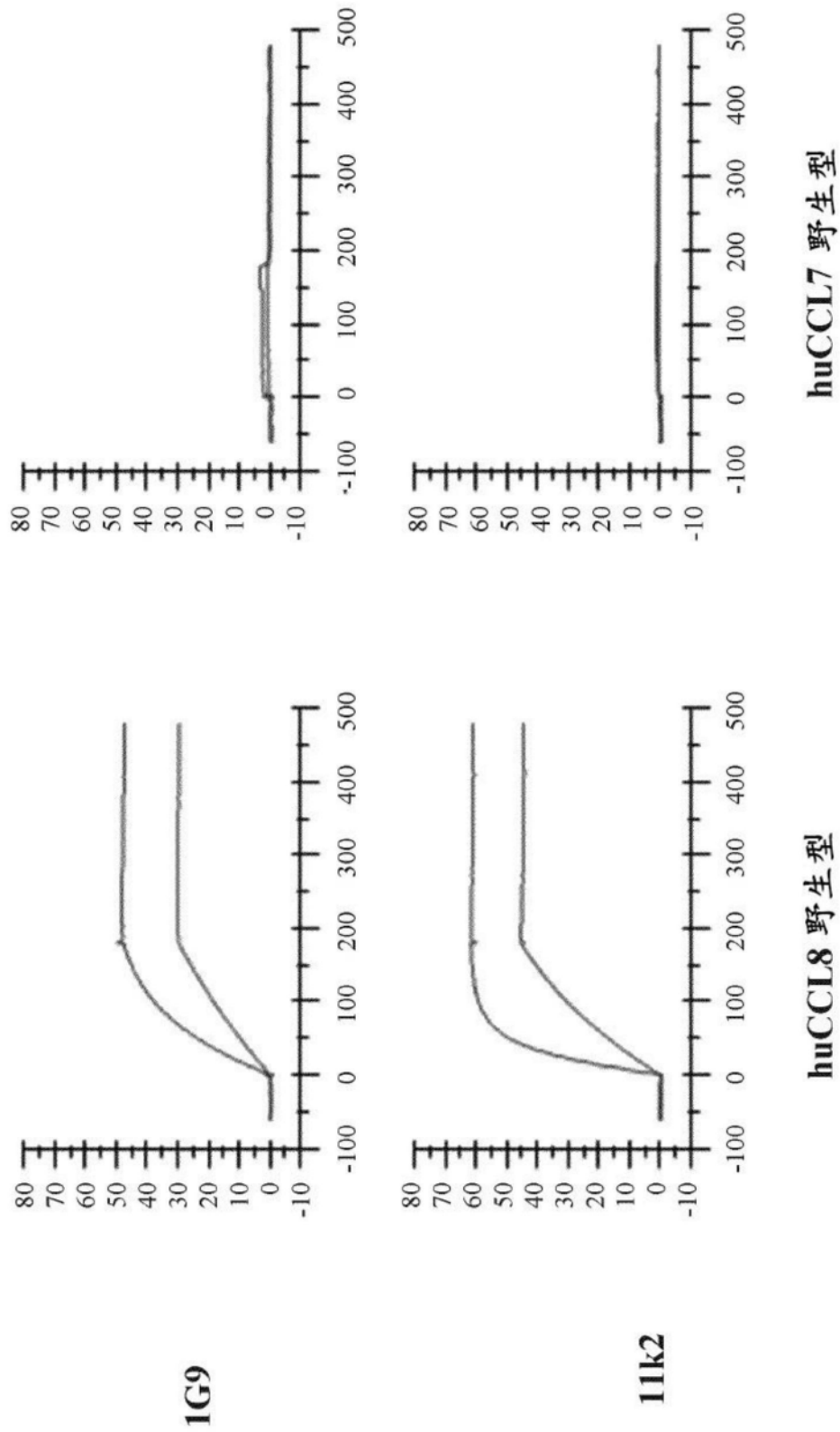


图1续

huCCL13 野生型

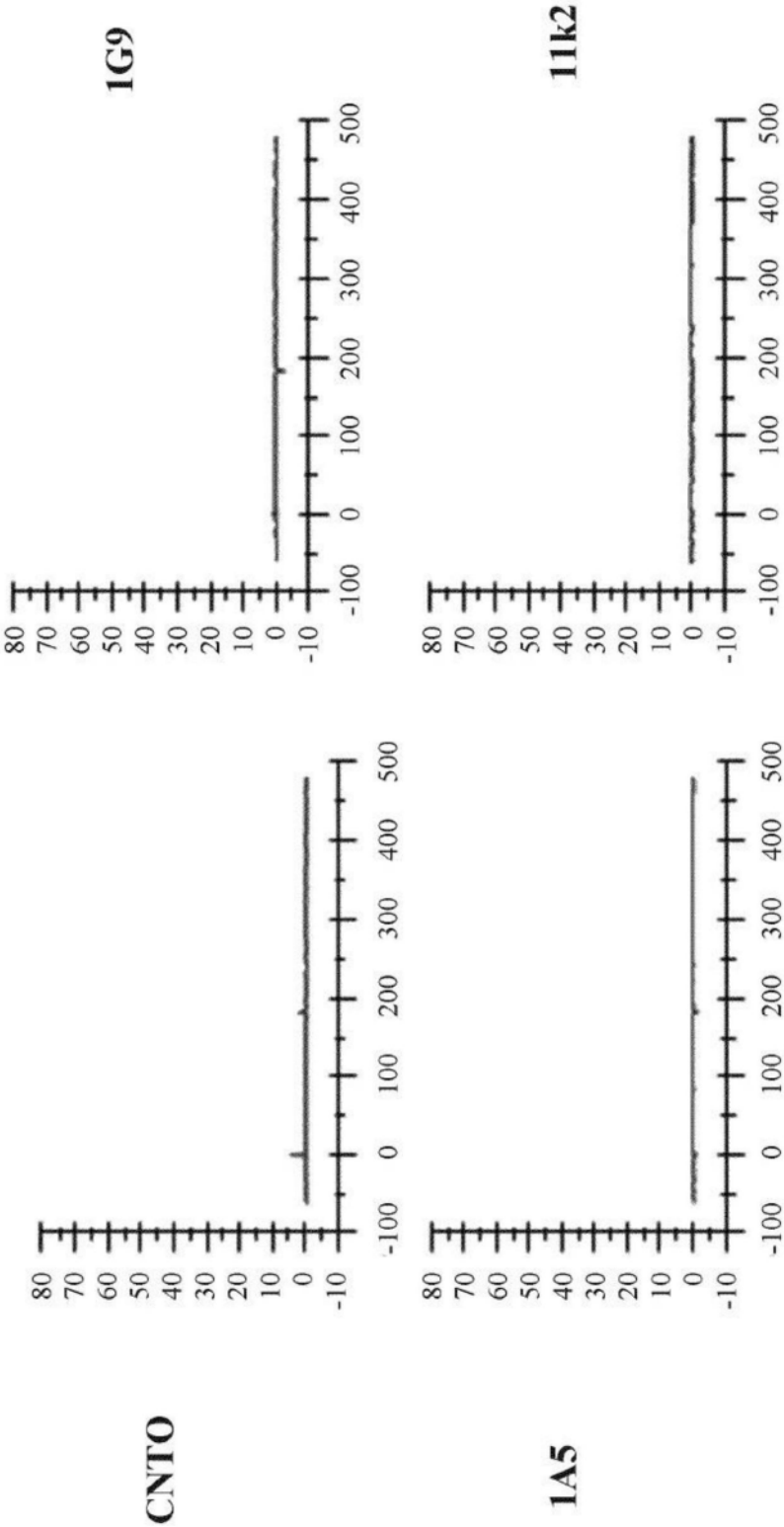


图1续

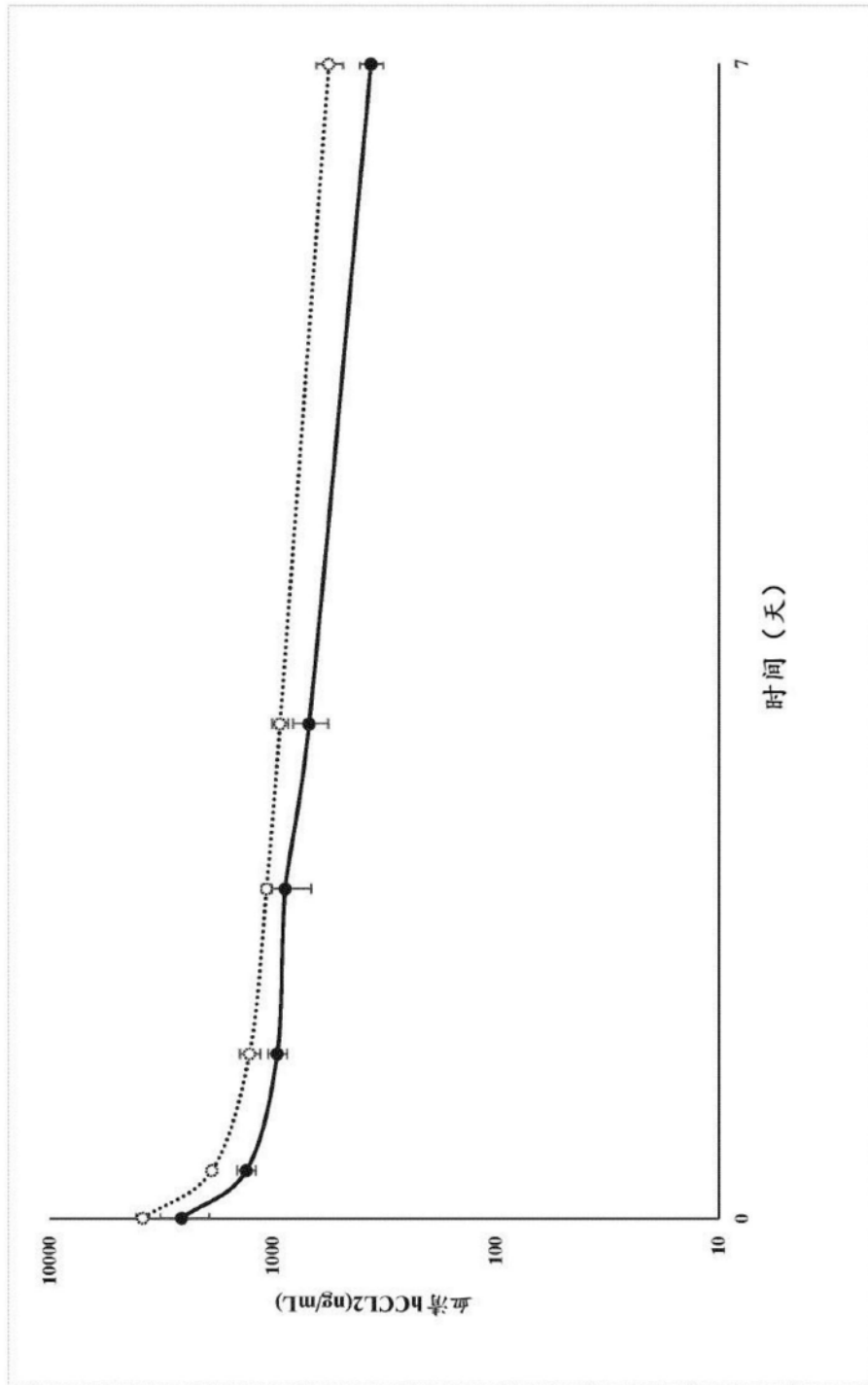


图2a

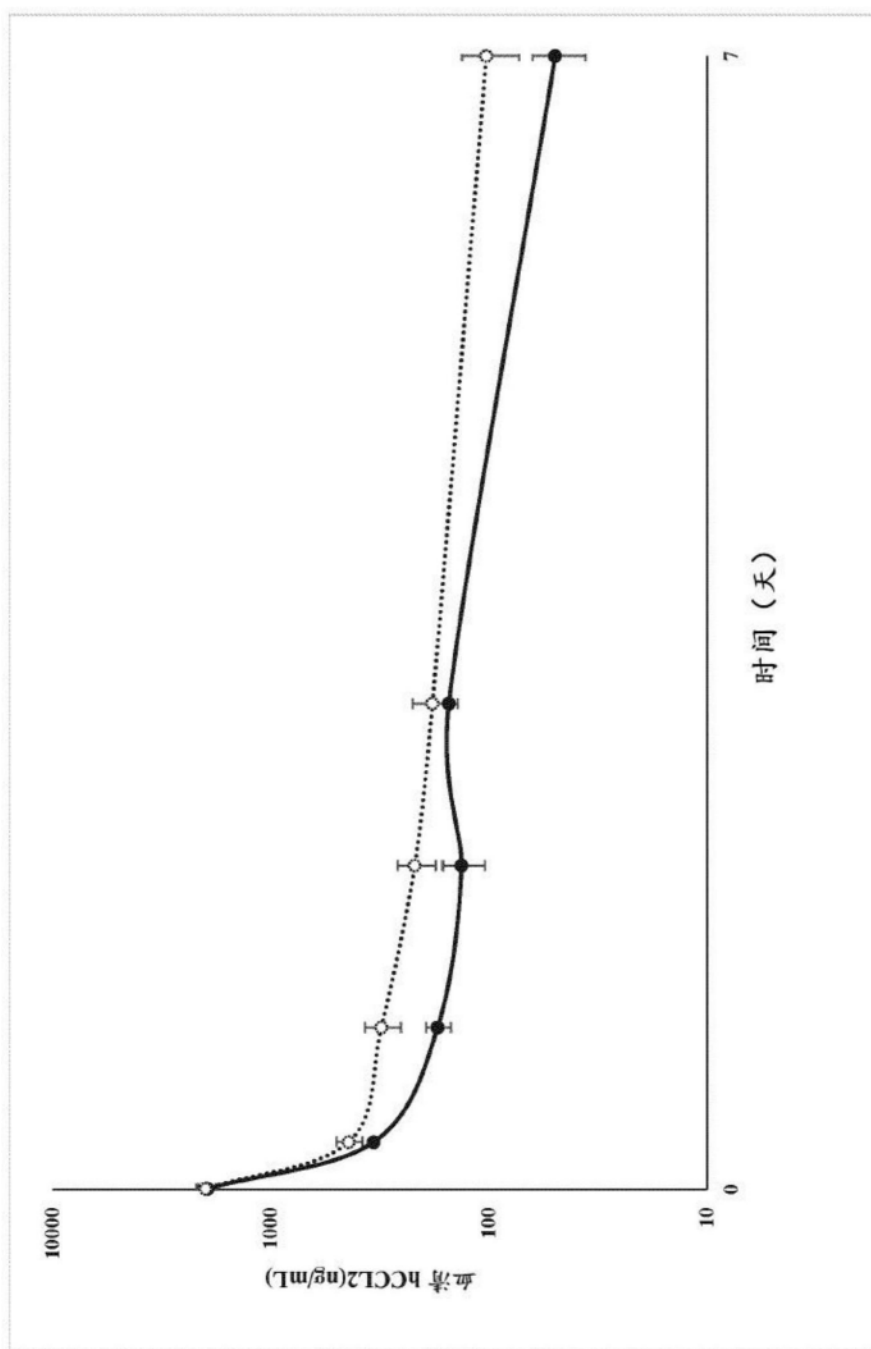


图2b

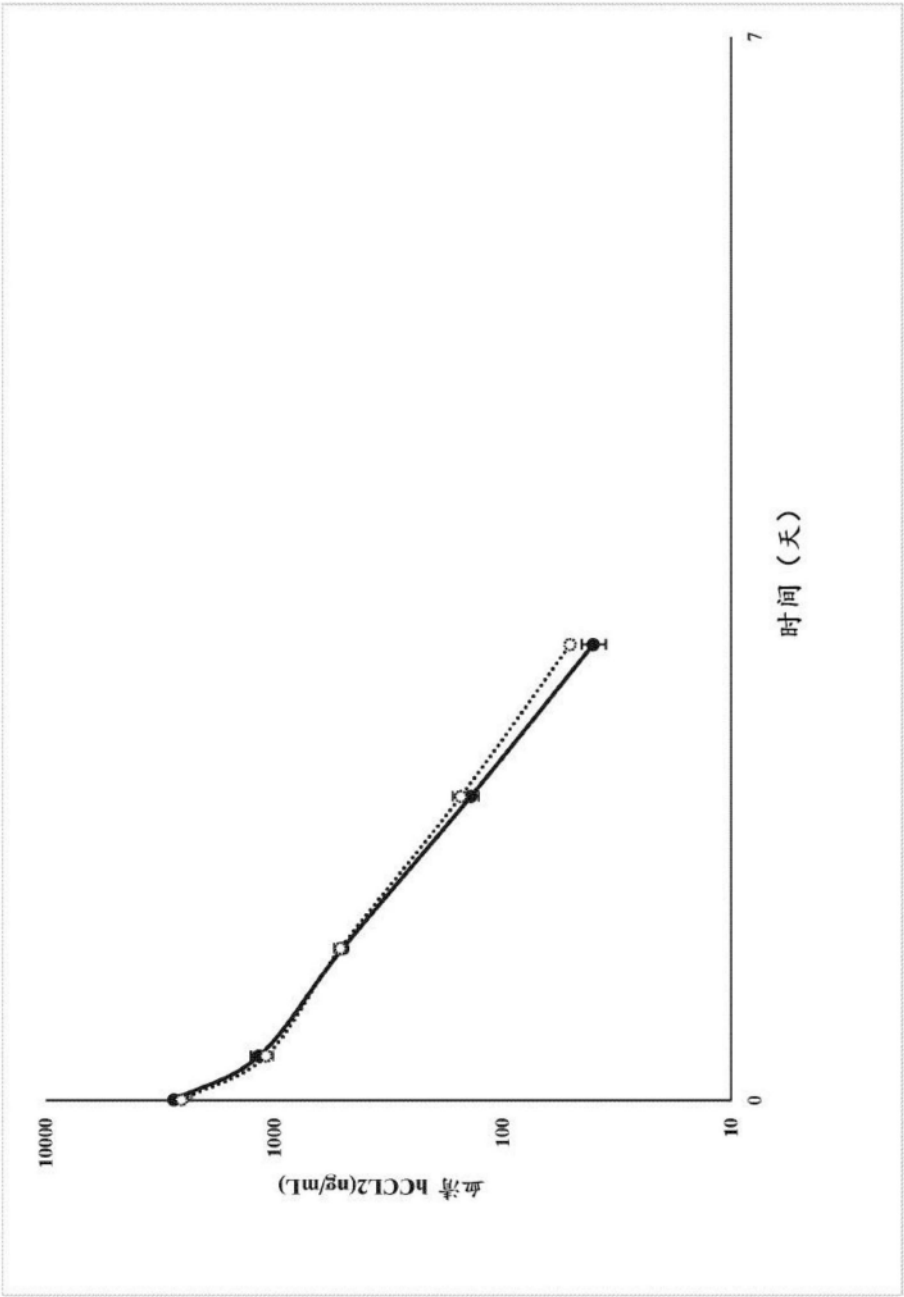


图2c

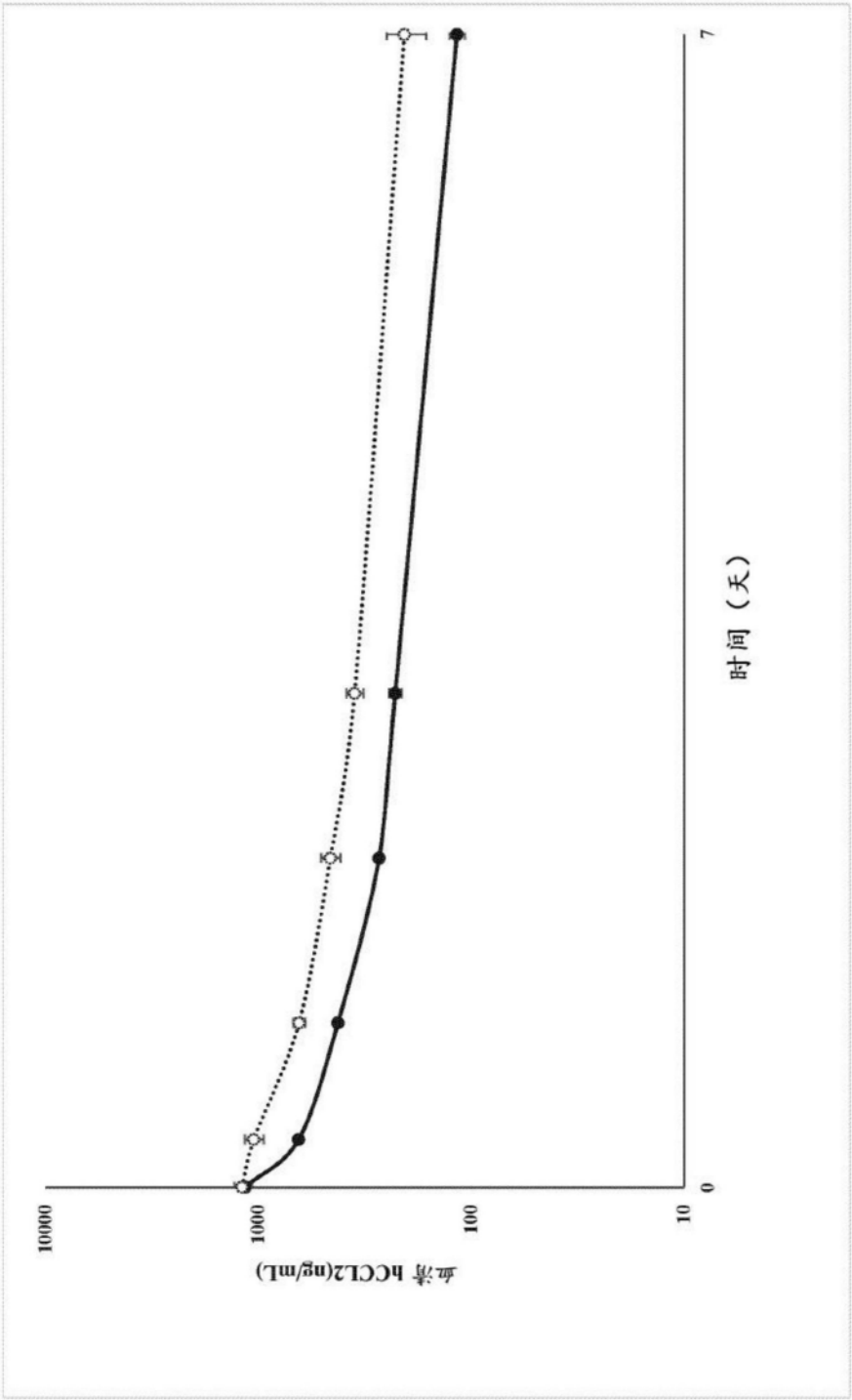


图2d

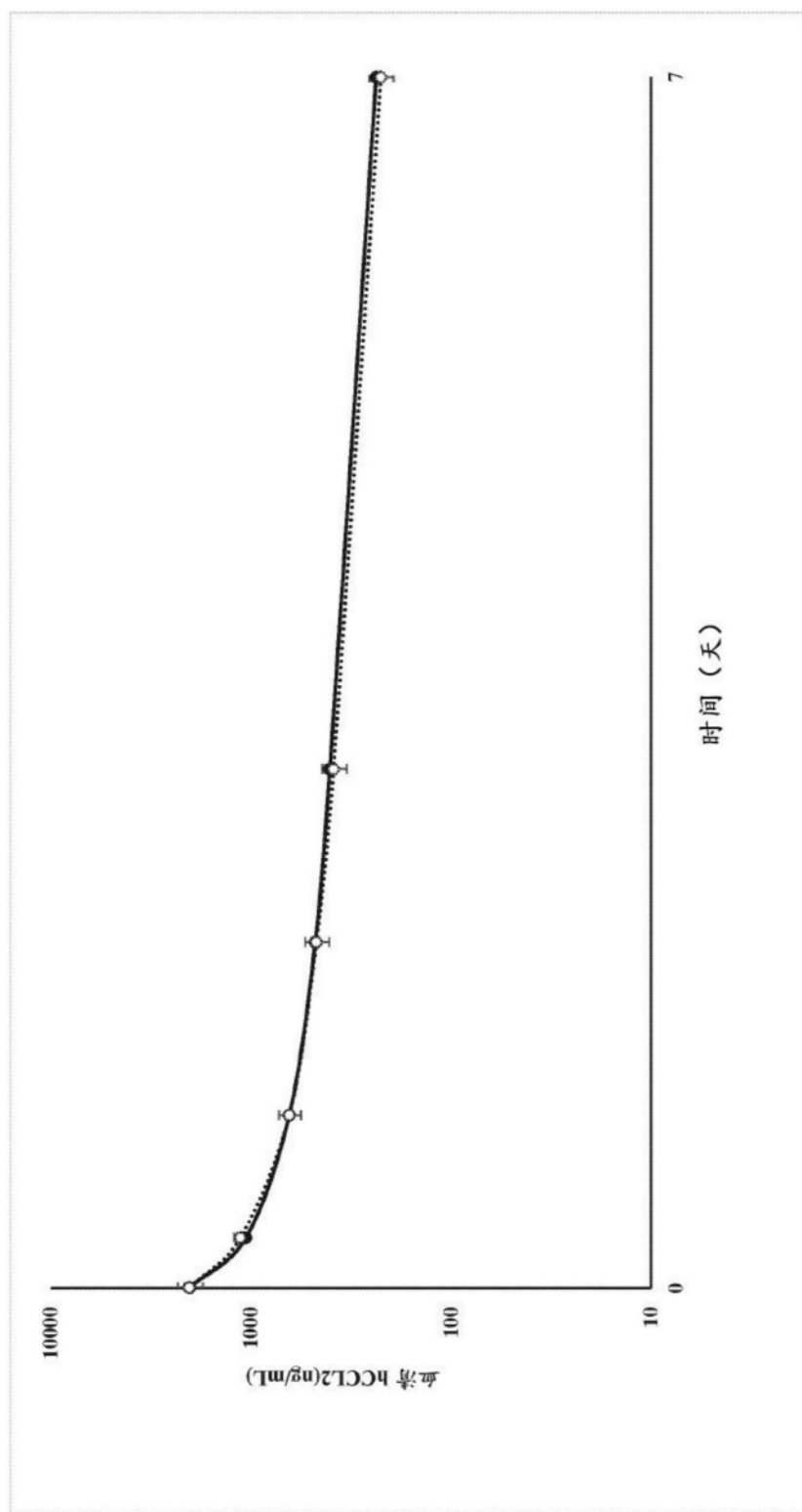


图2e

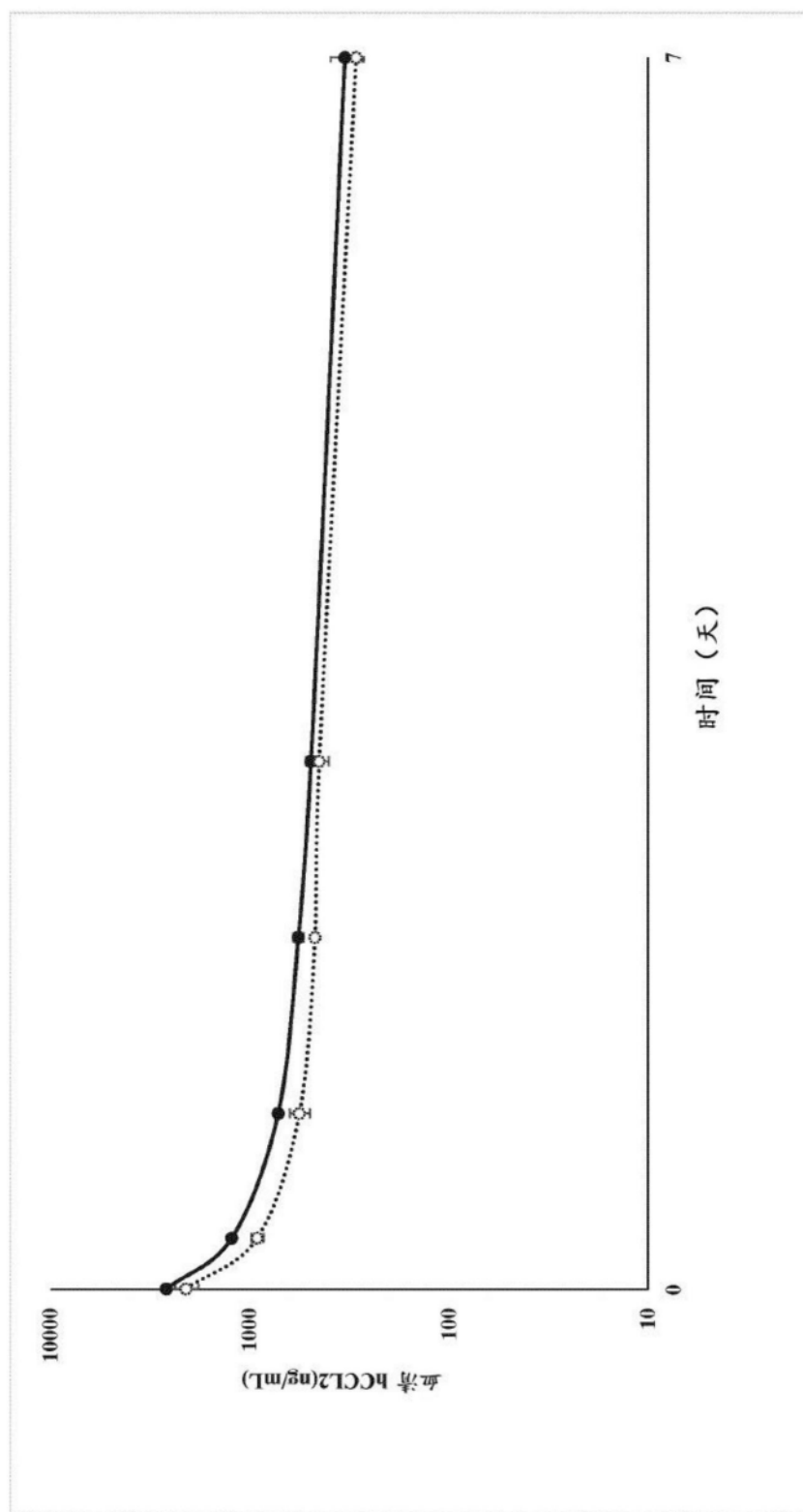


图2f

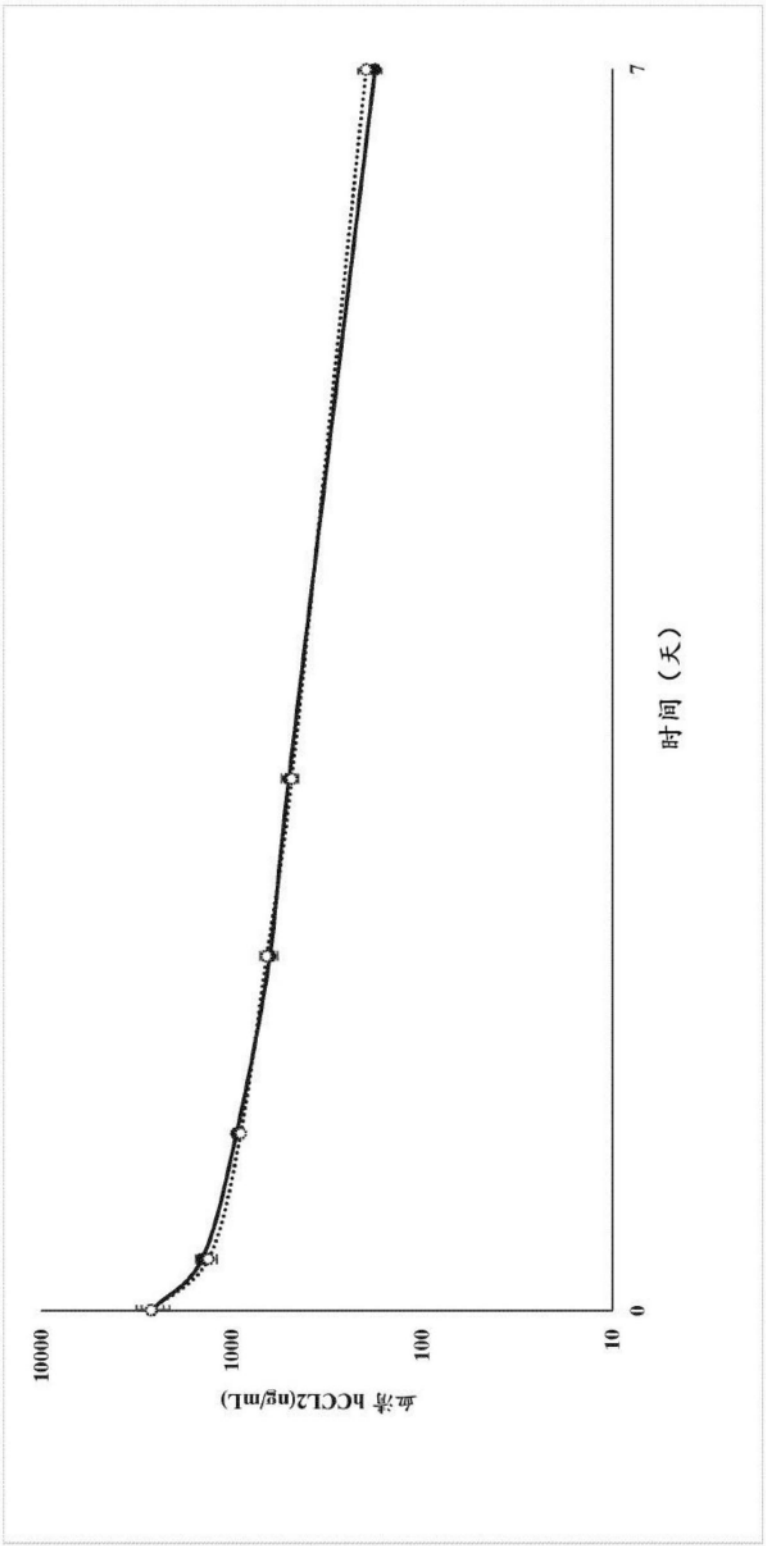


图2g

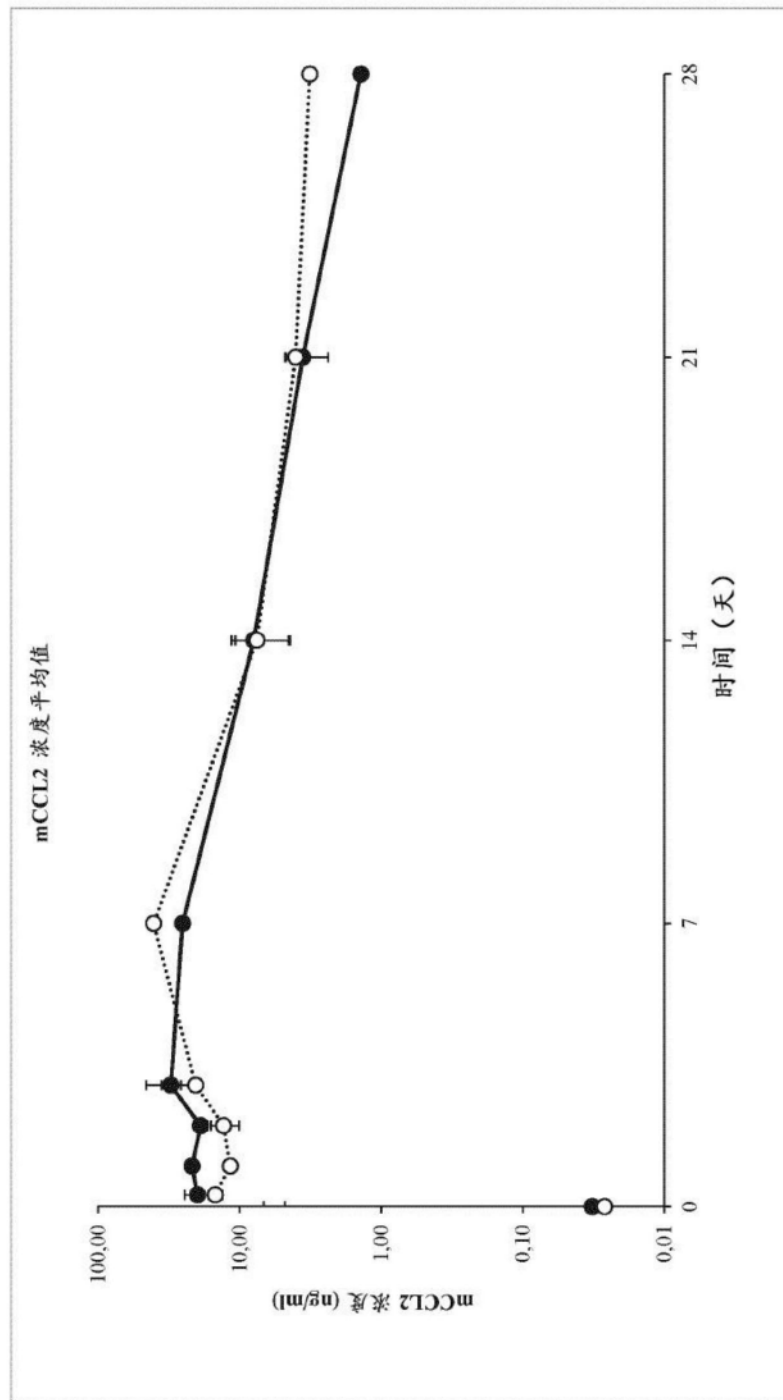


图3a

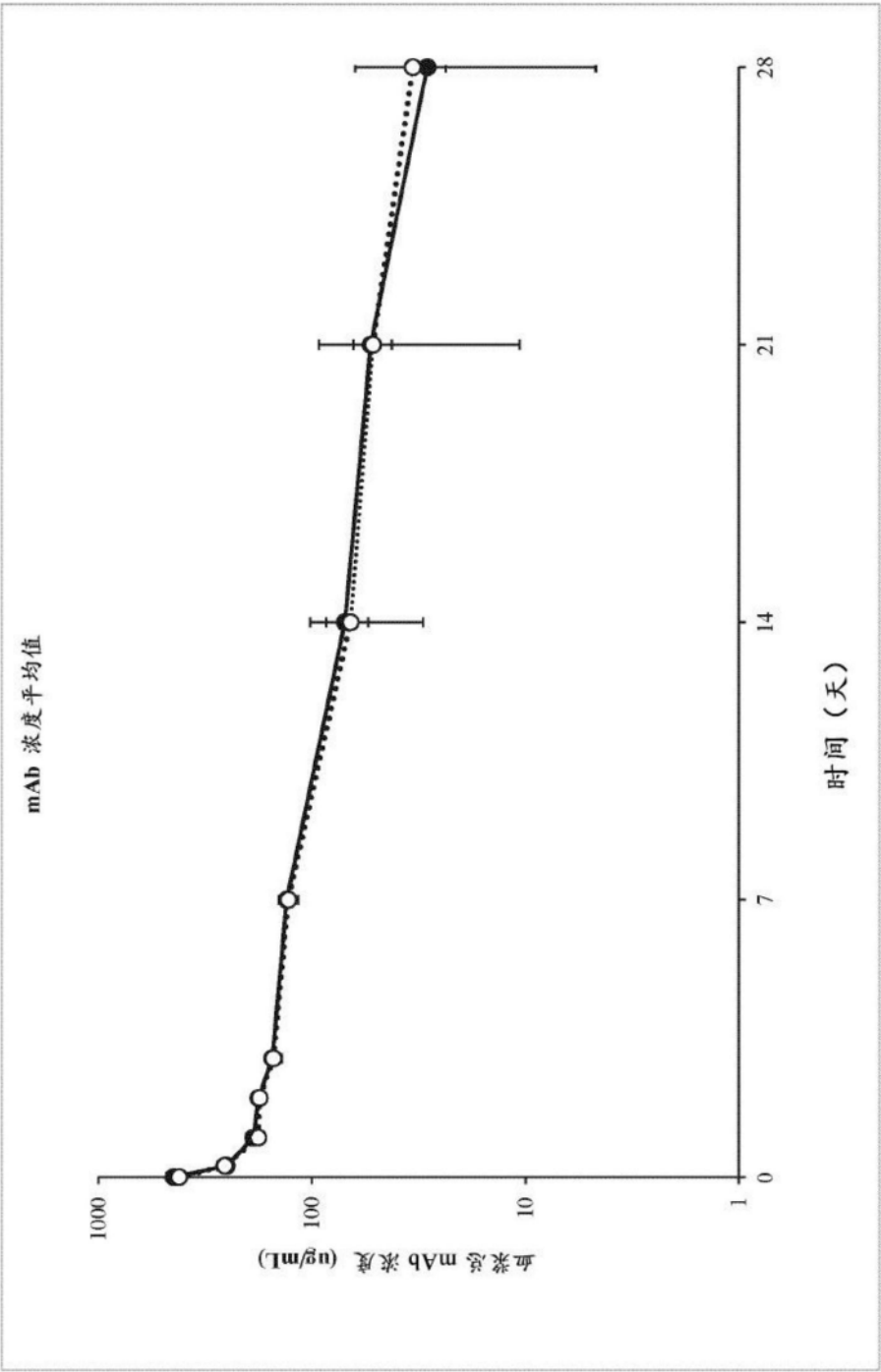


图3b

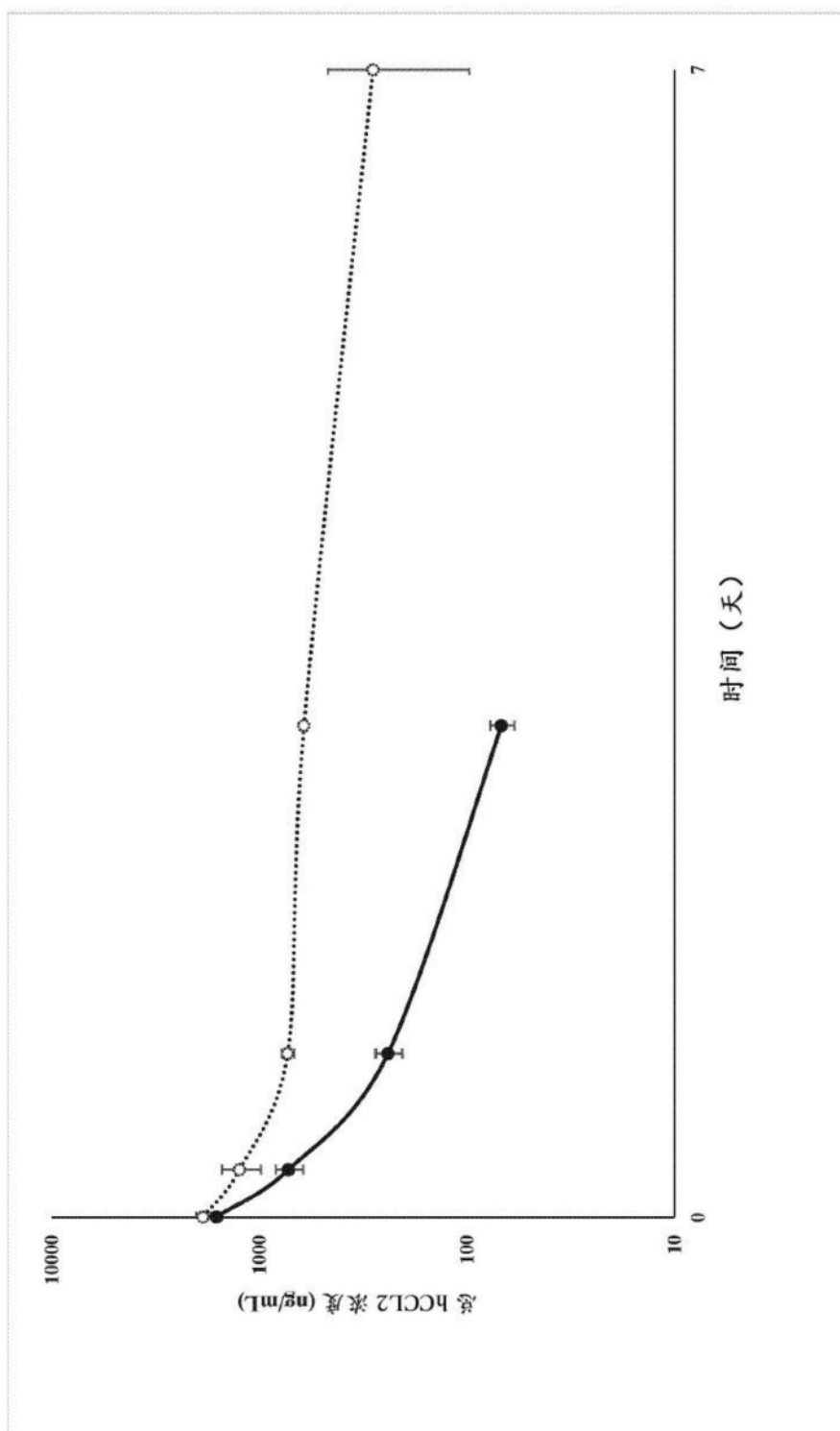


图4a

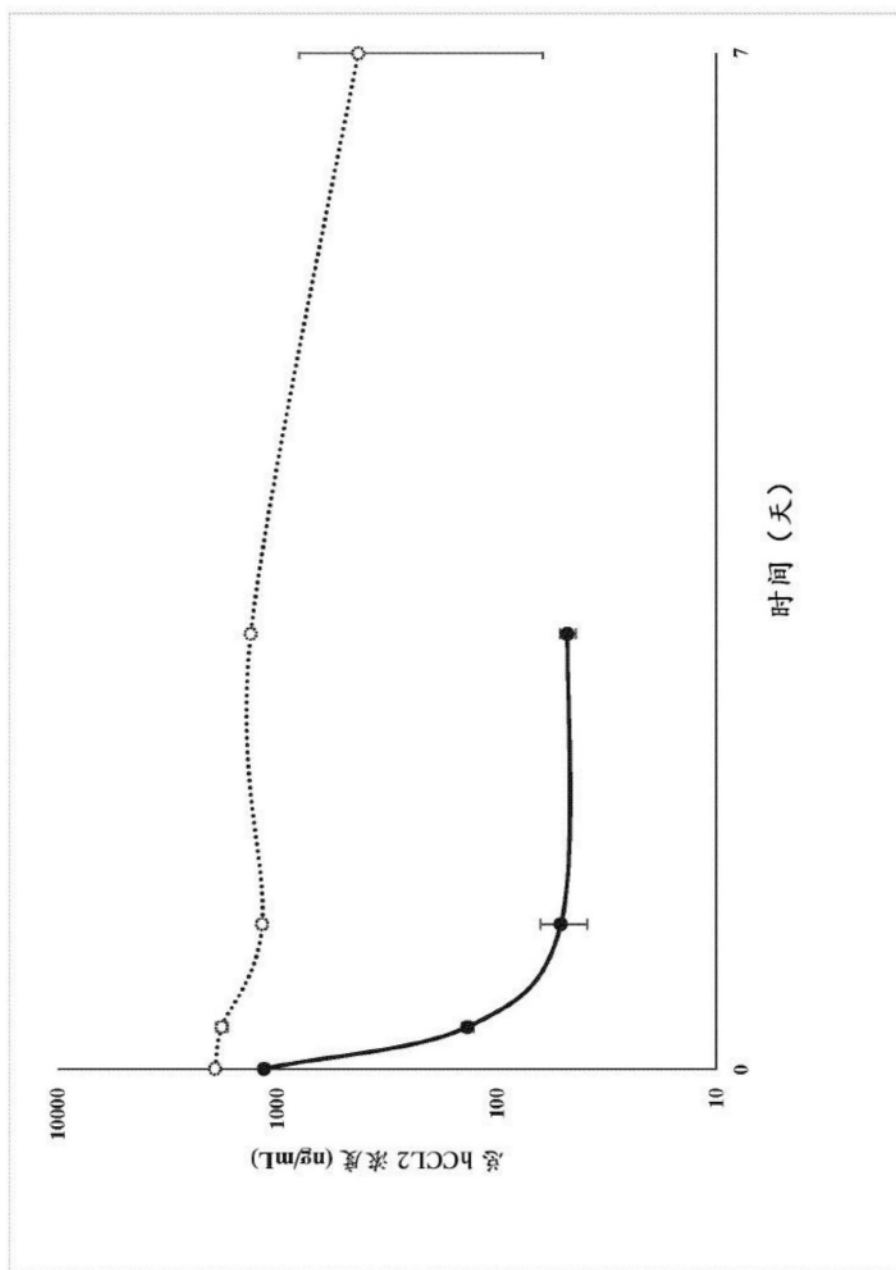


图4b

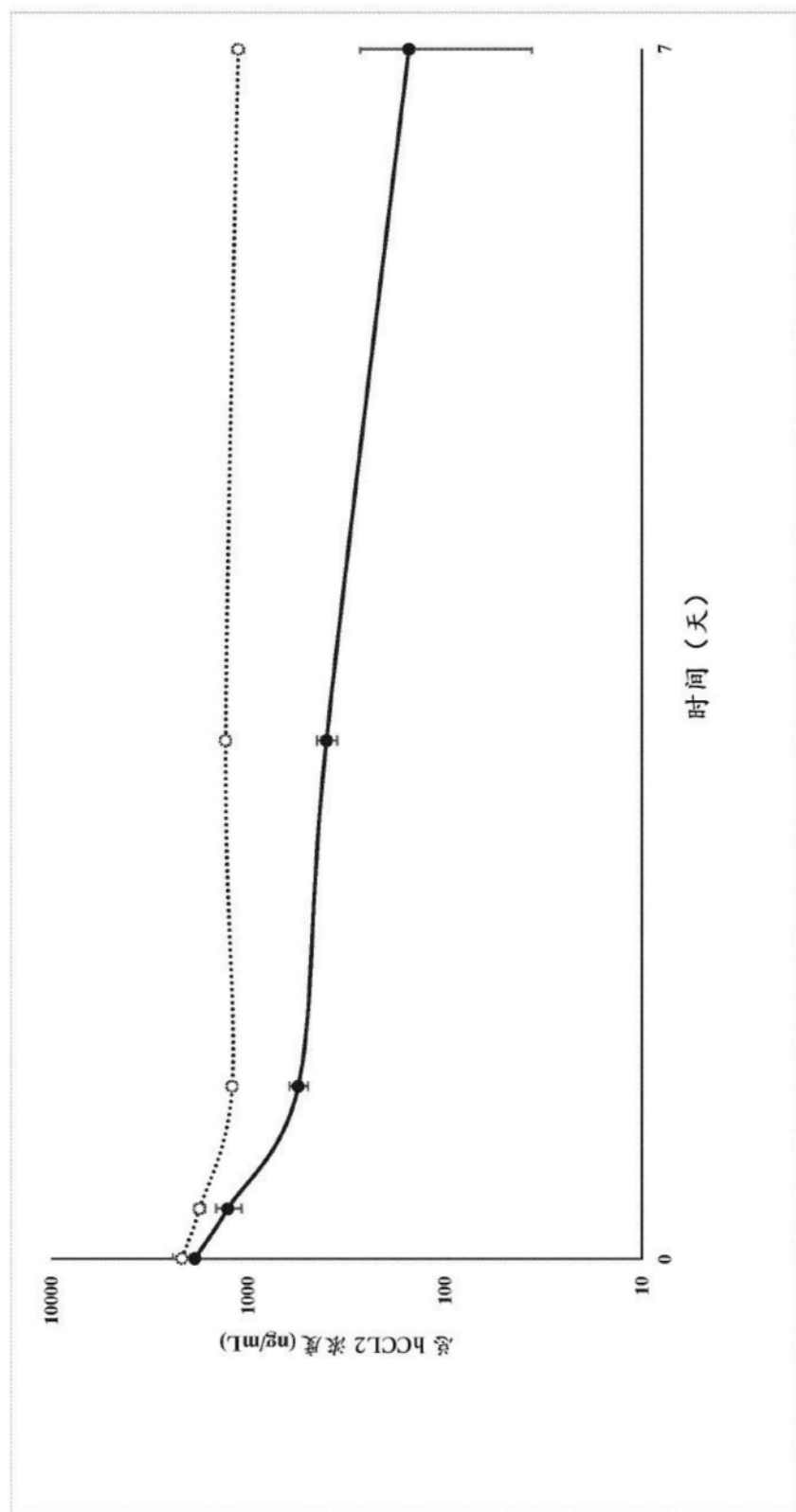


图4c

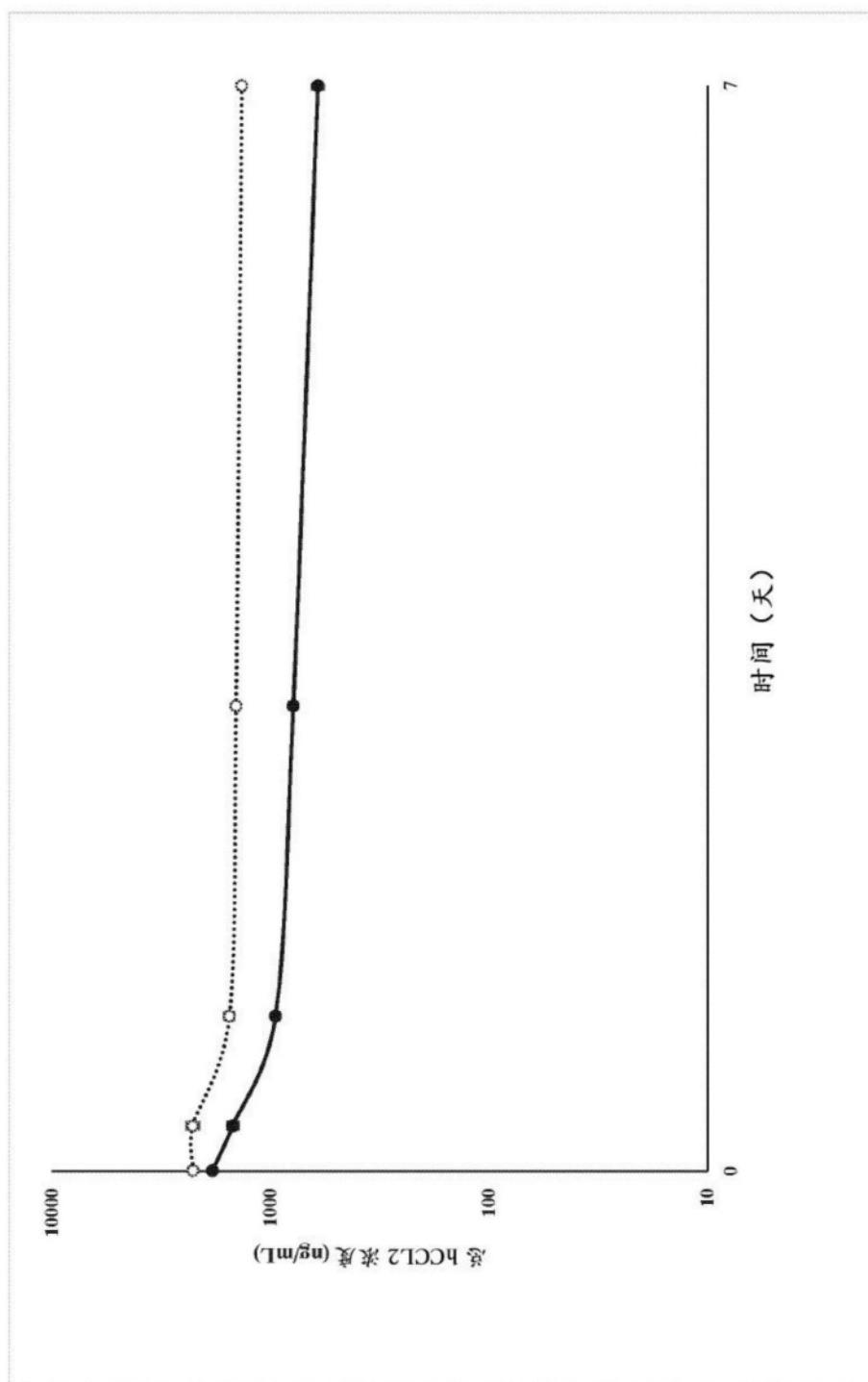


图4d

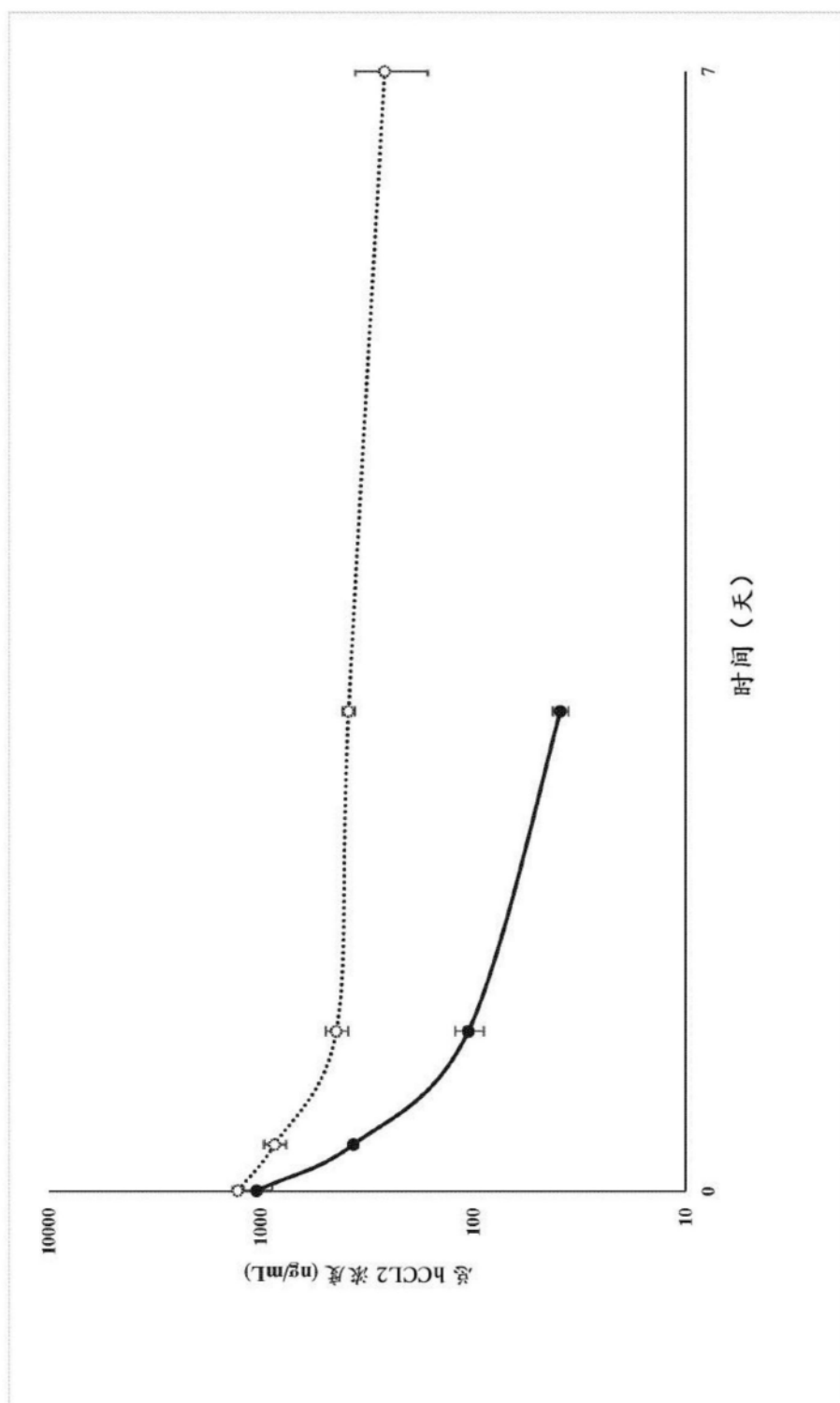


图4e

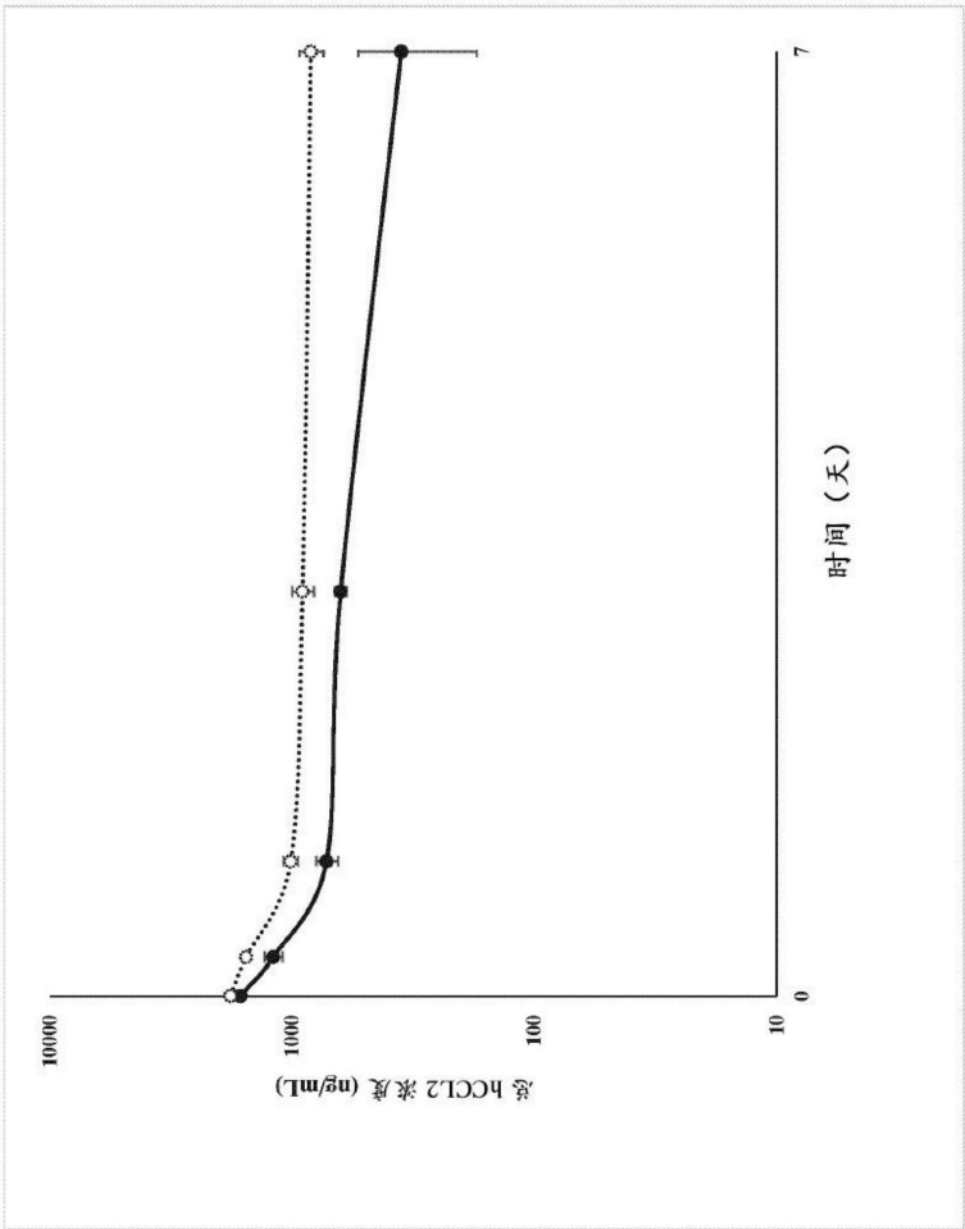


图4f

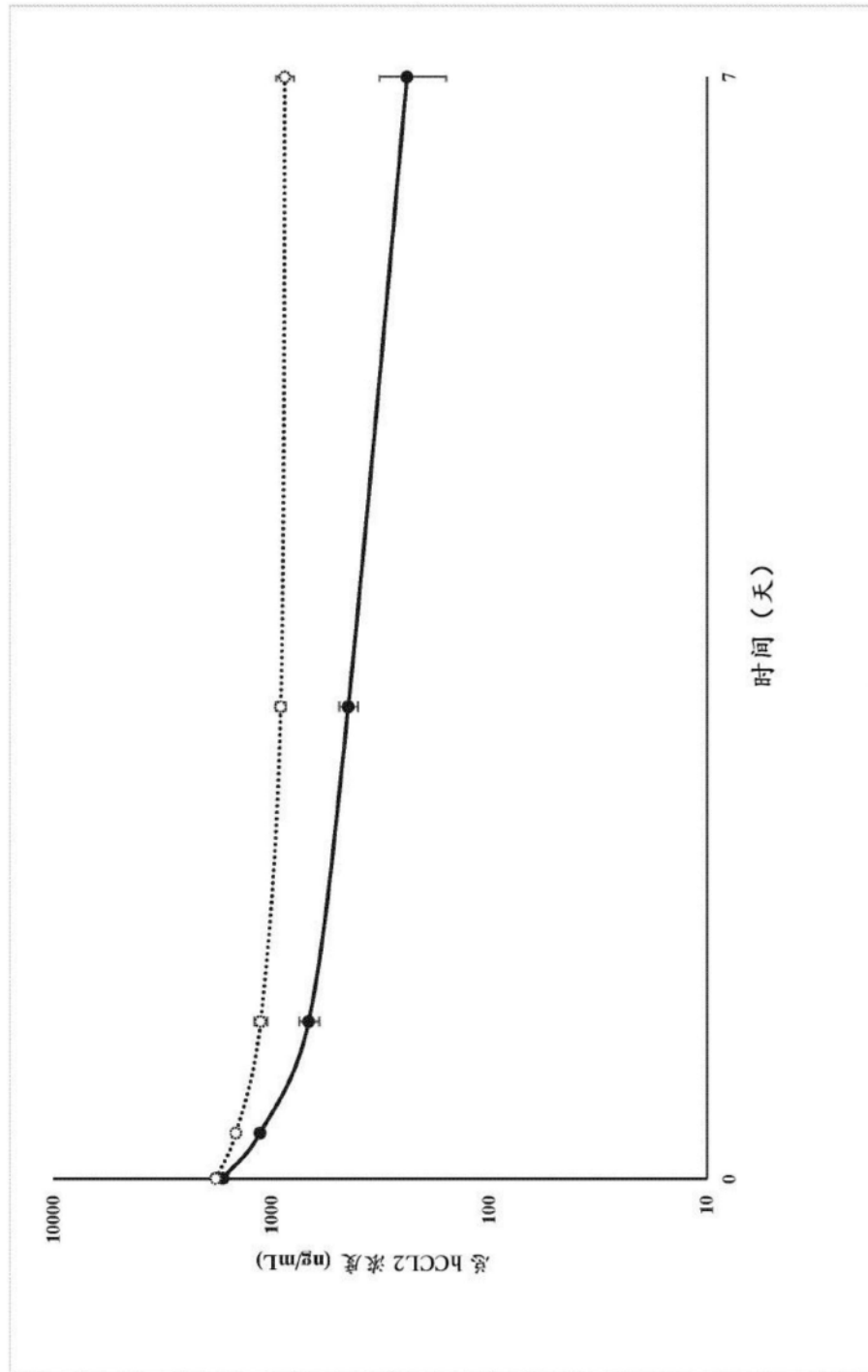


图4g

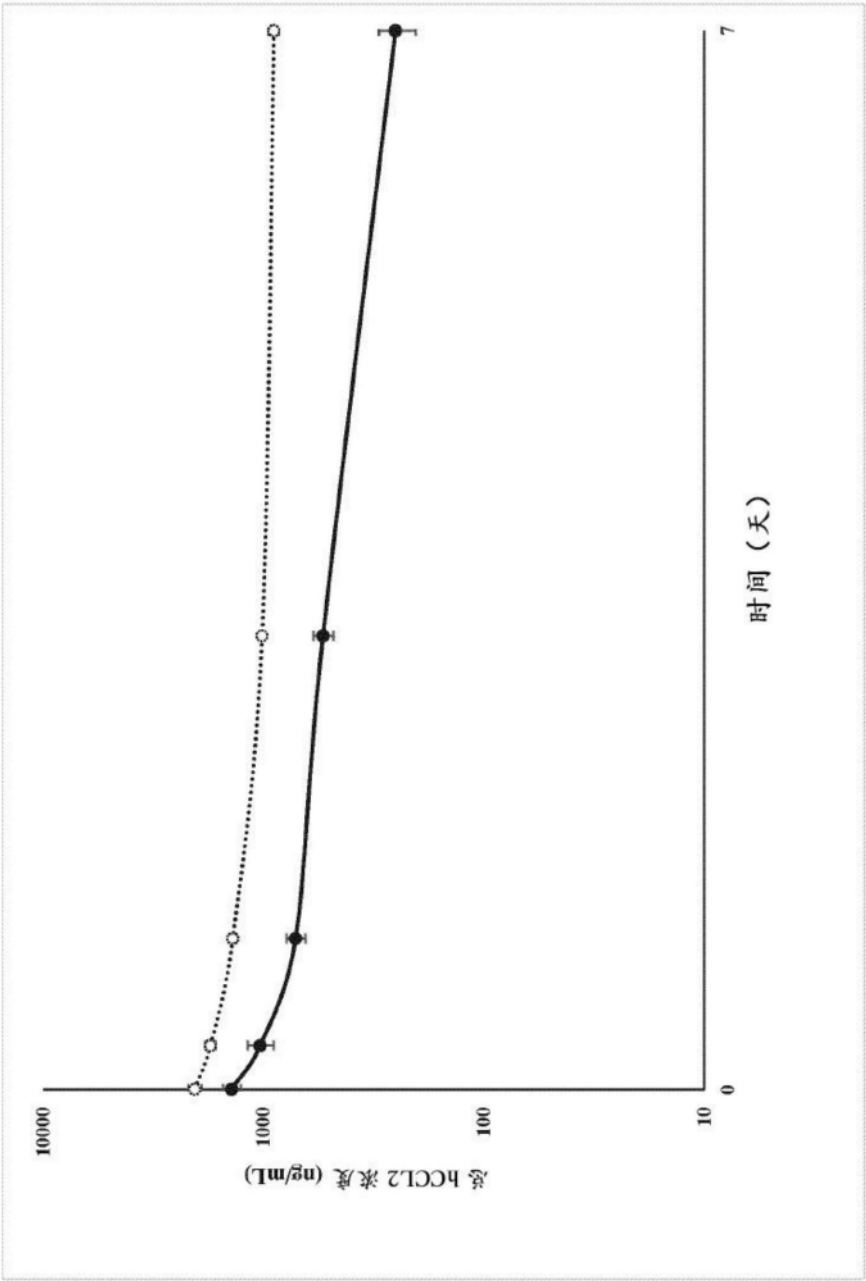


图4h

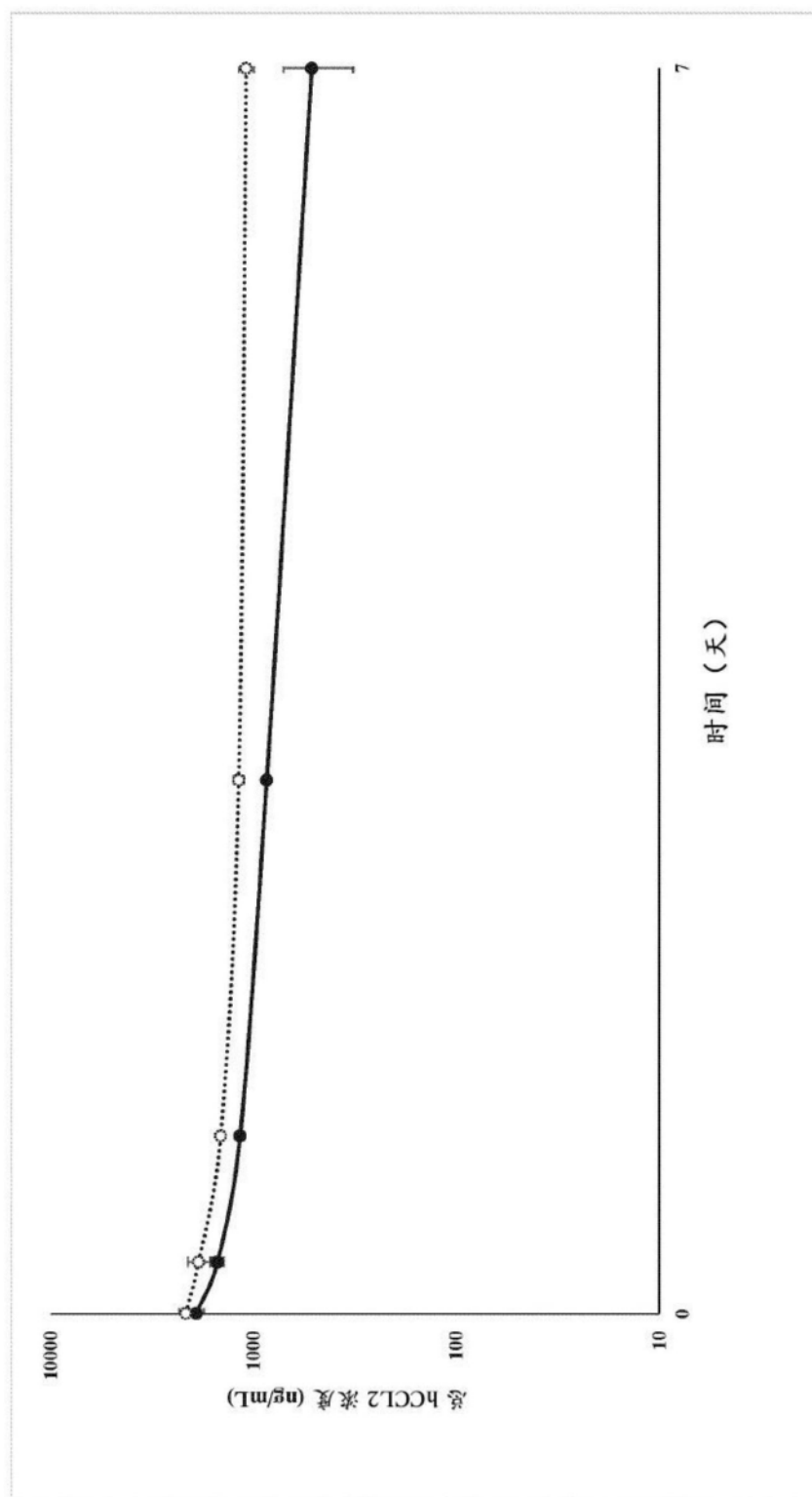


图4i

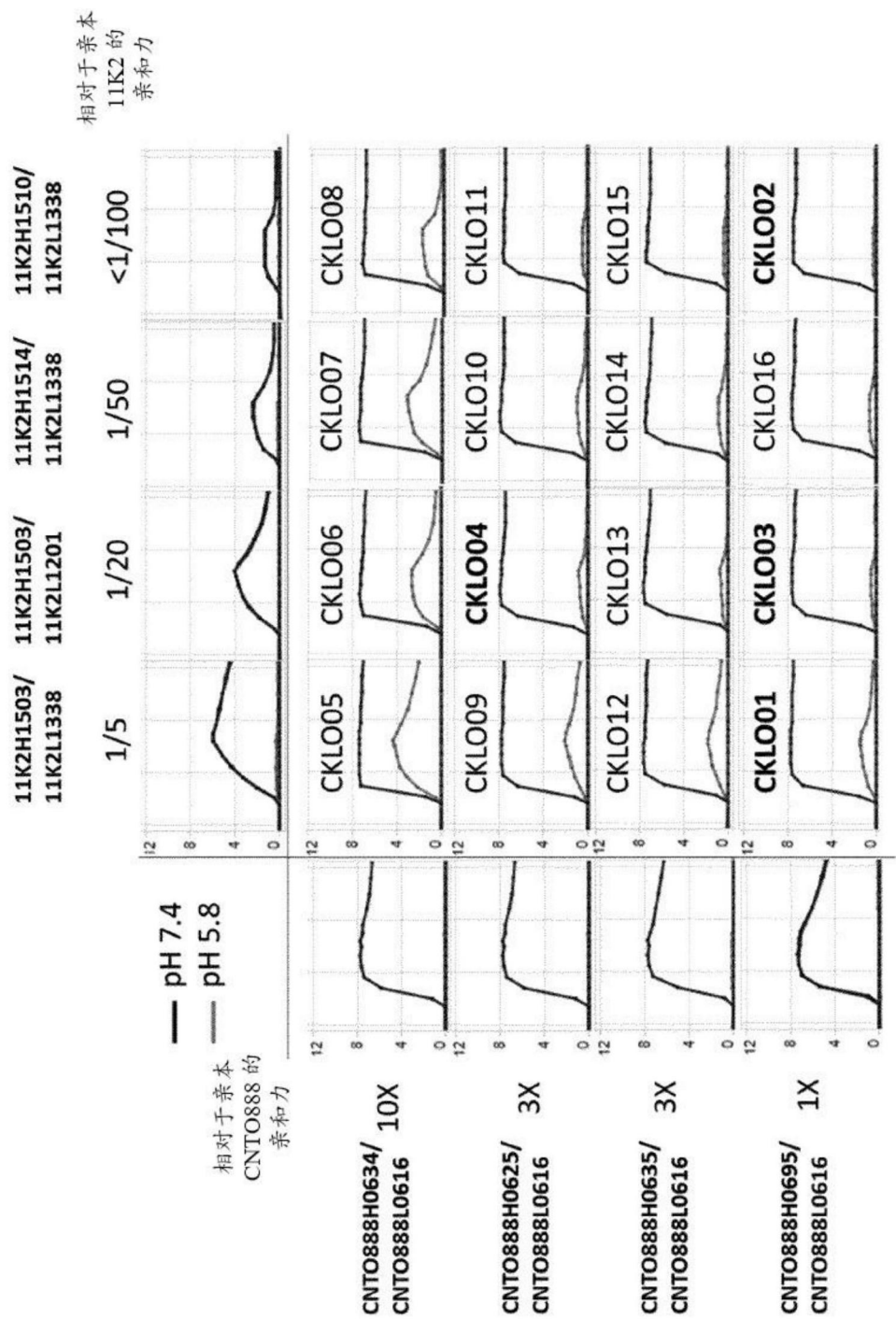


图5a

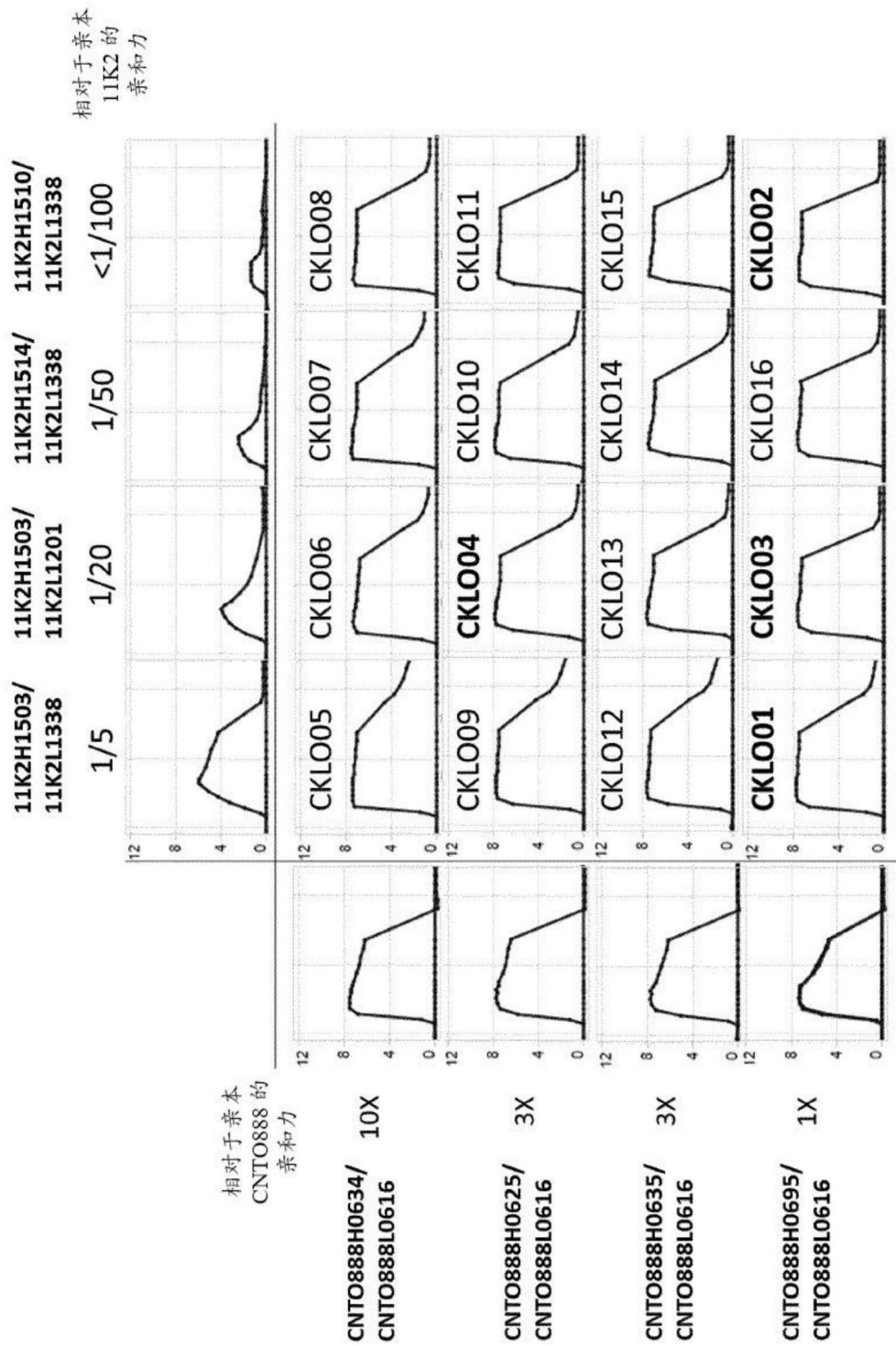


图5b

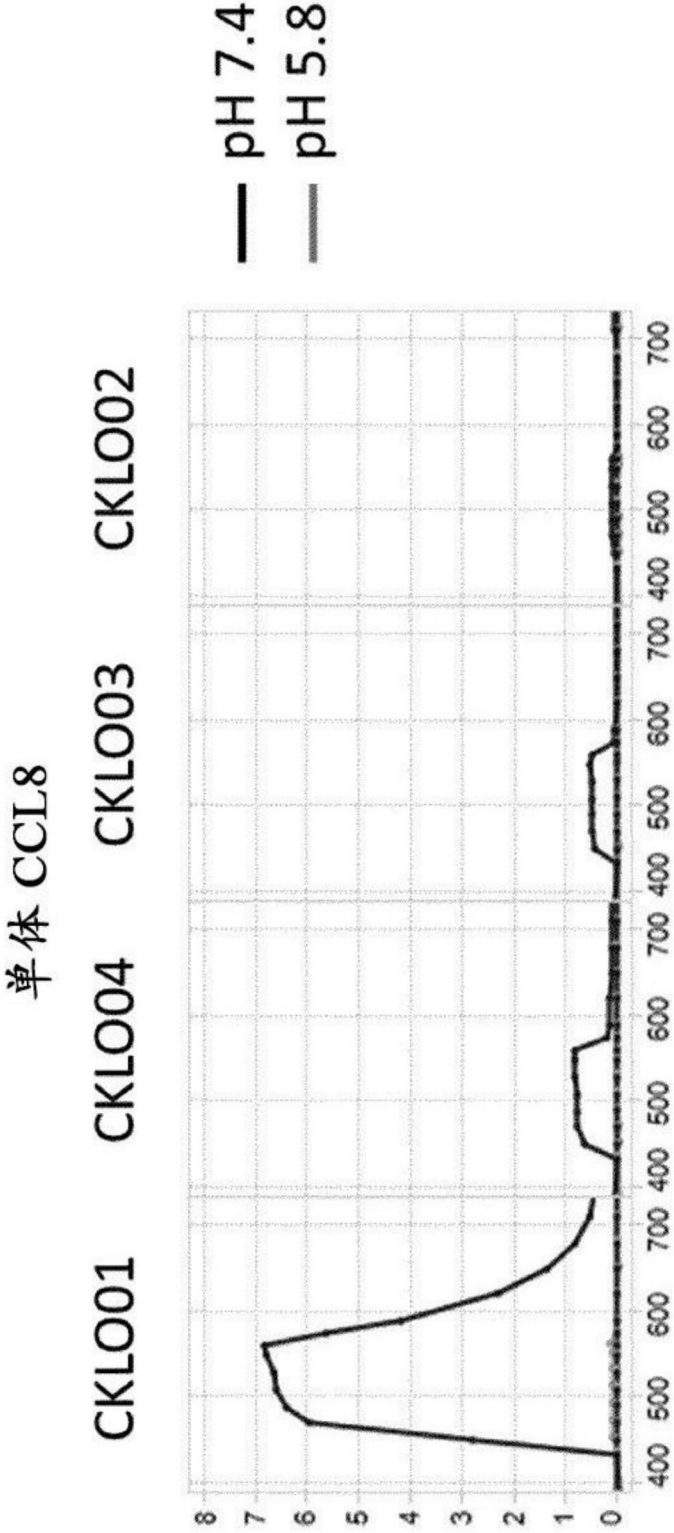


图6

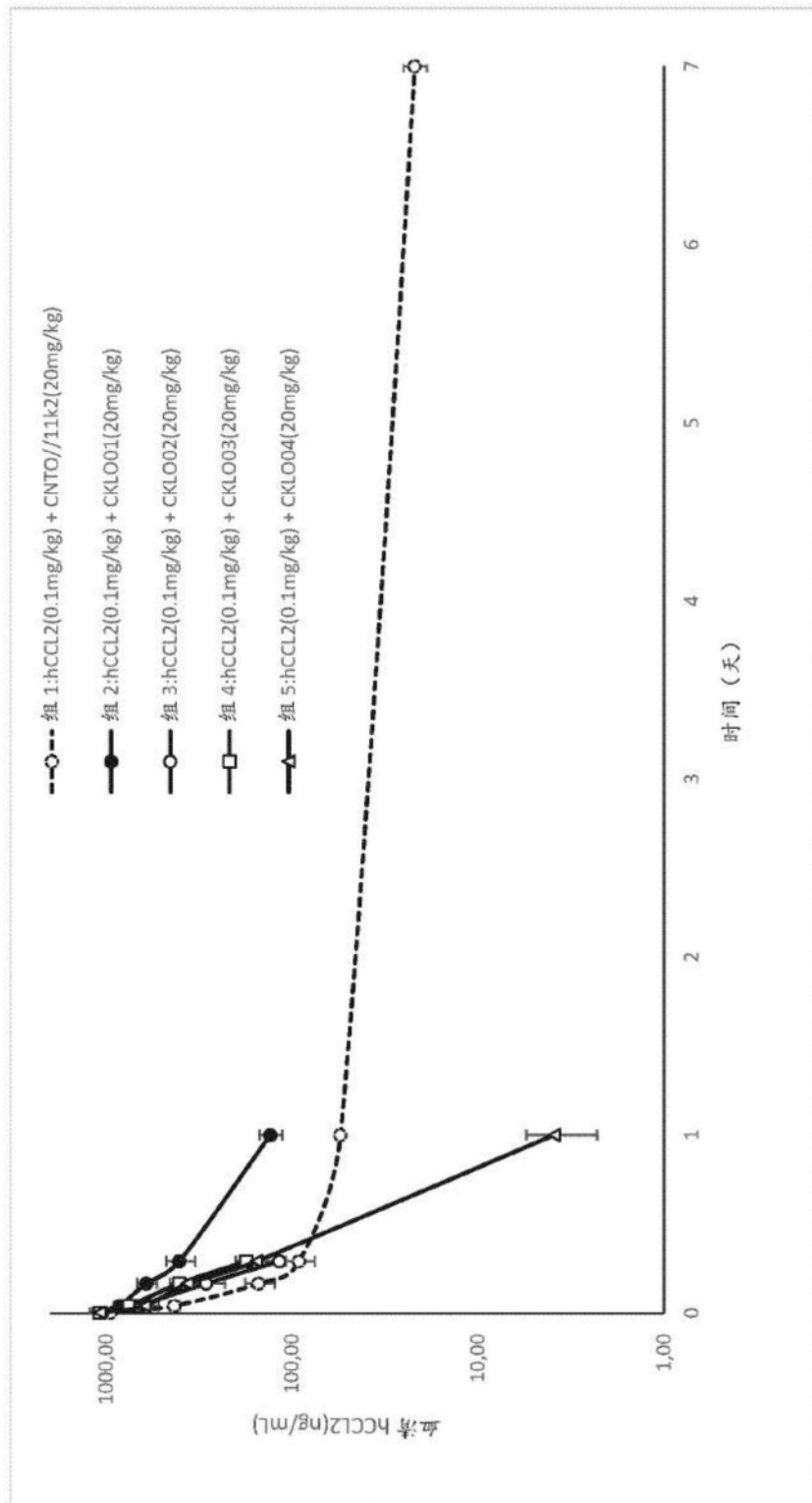


图7a

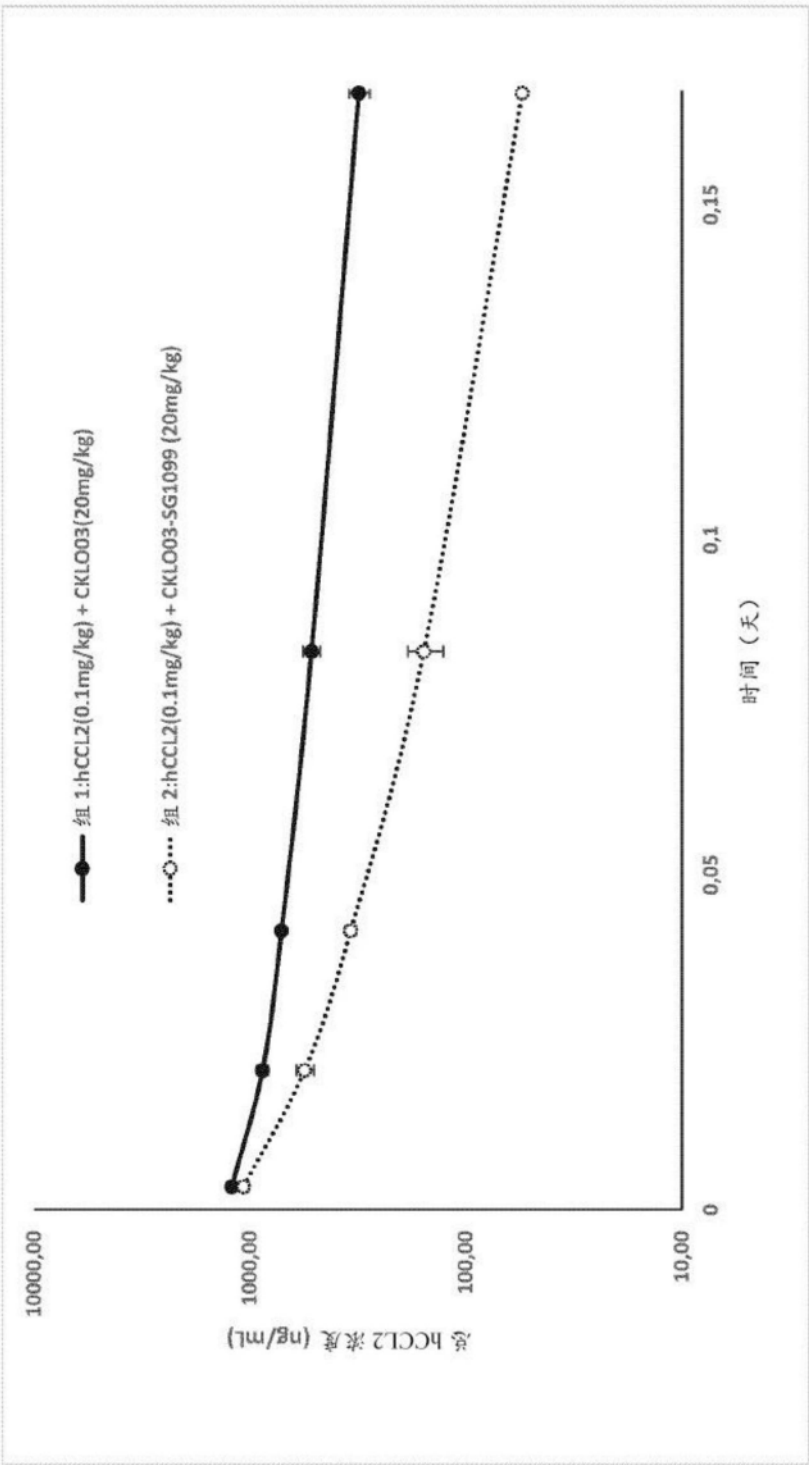


图7b

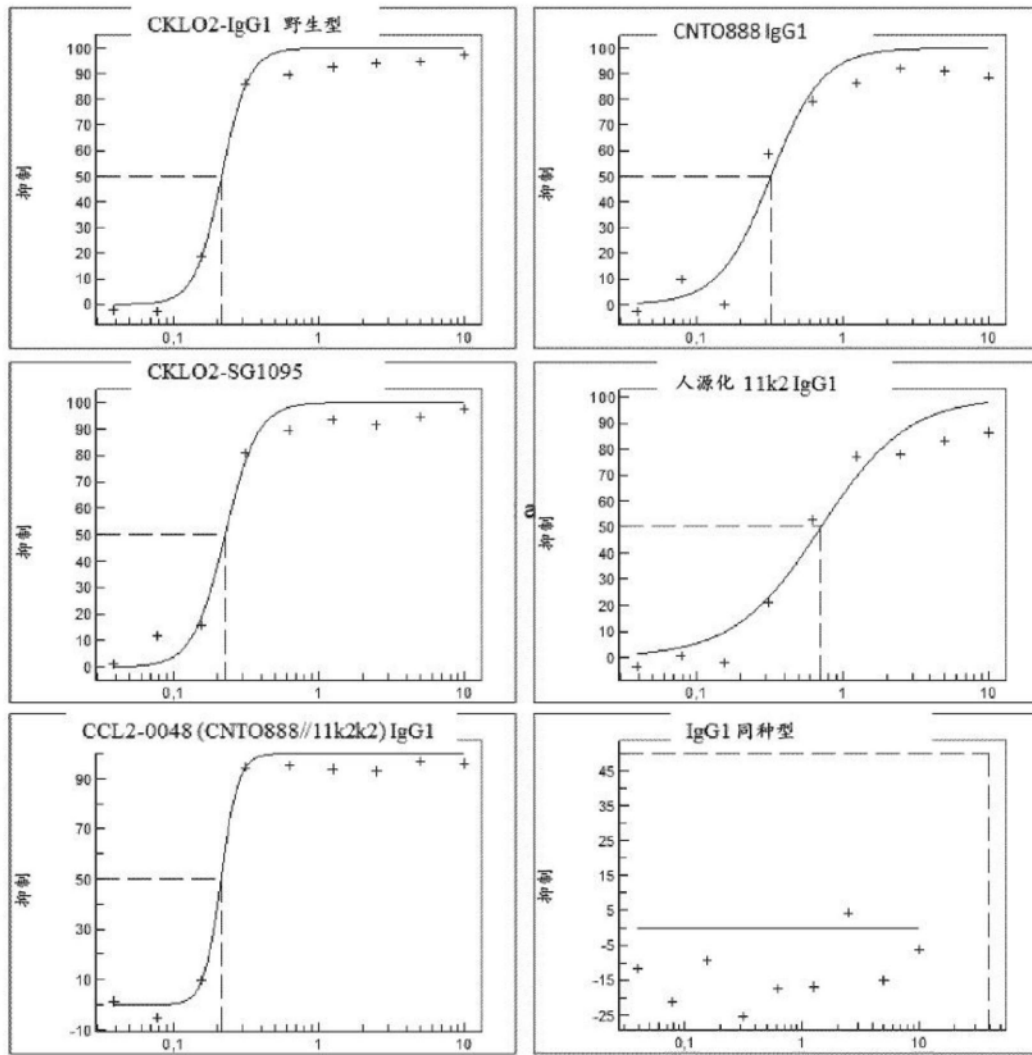


图8

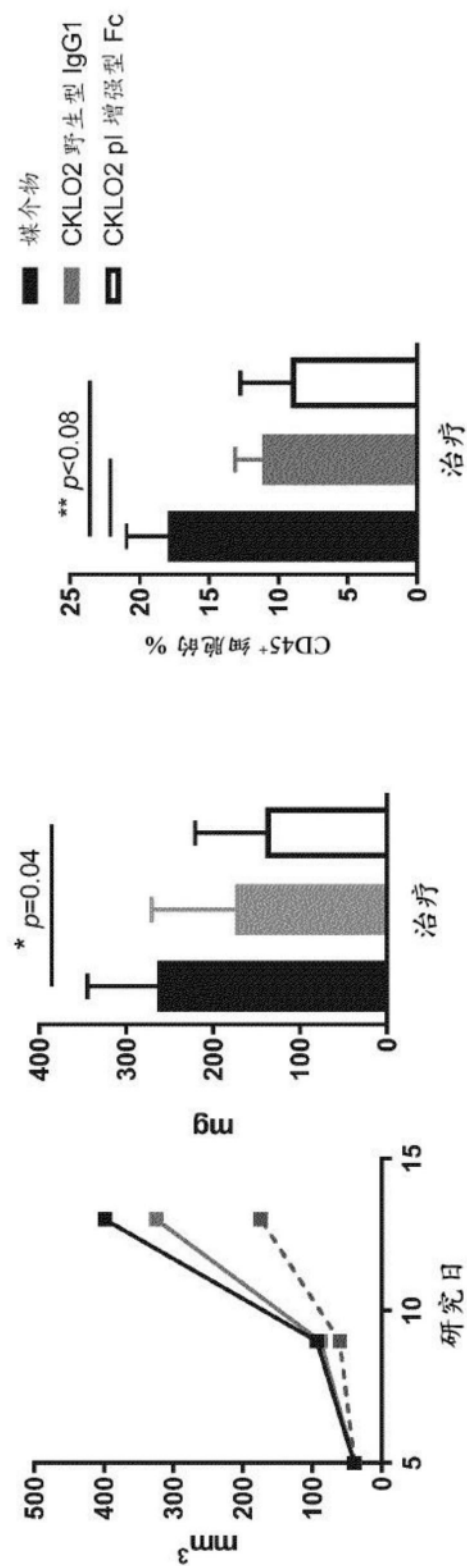


图9

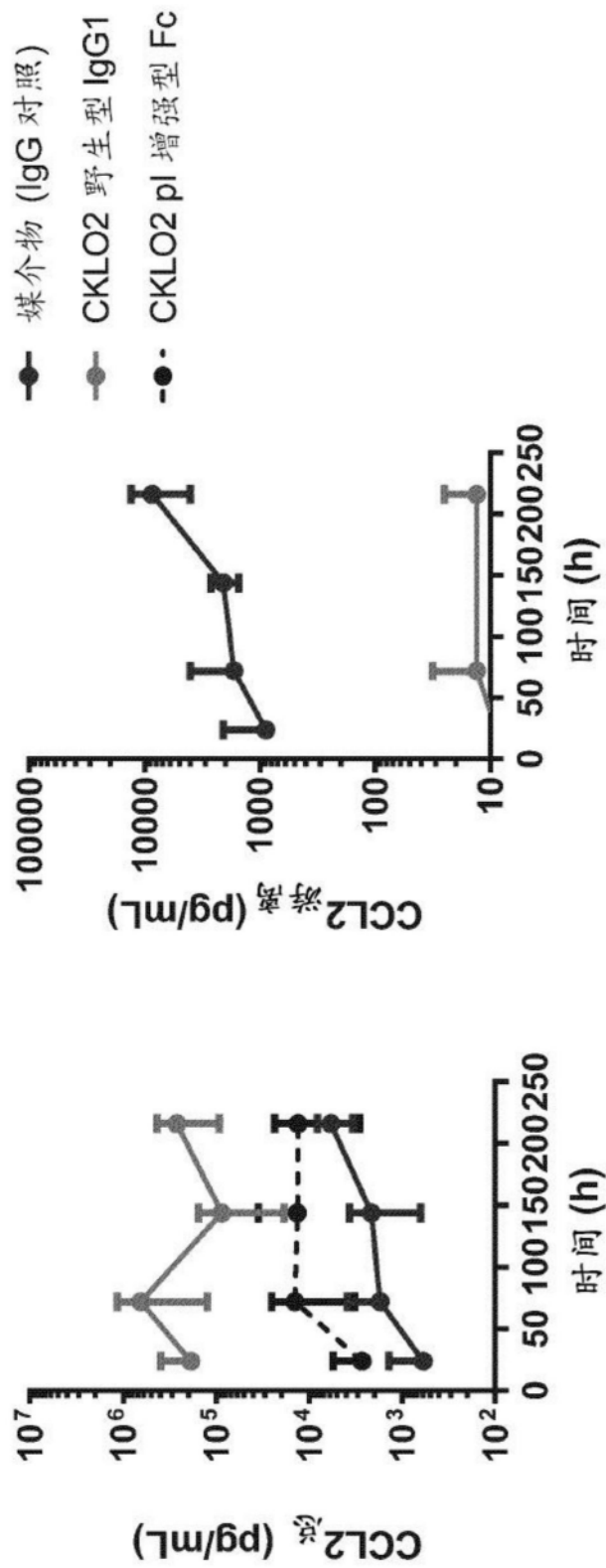


图10

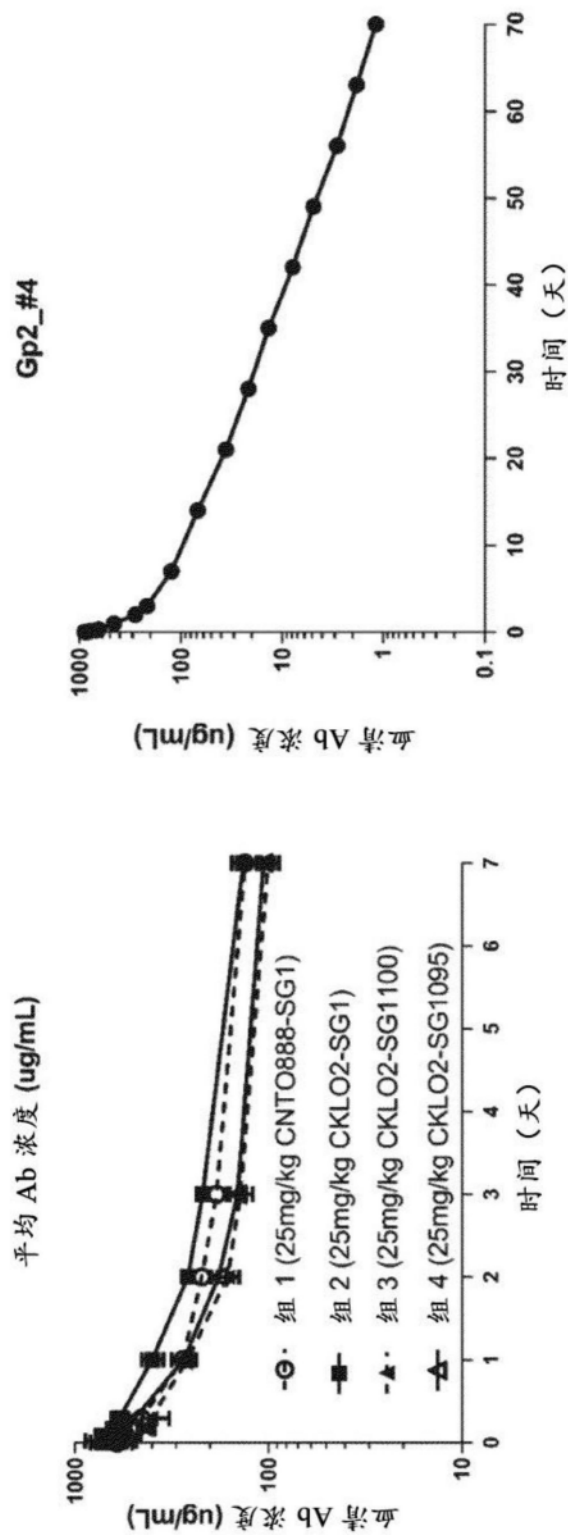


图11

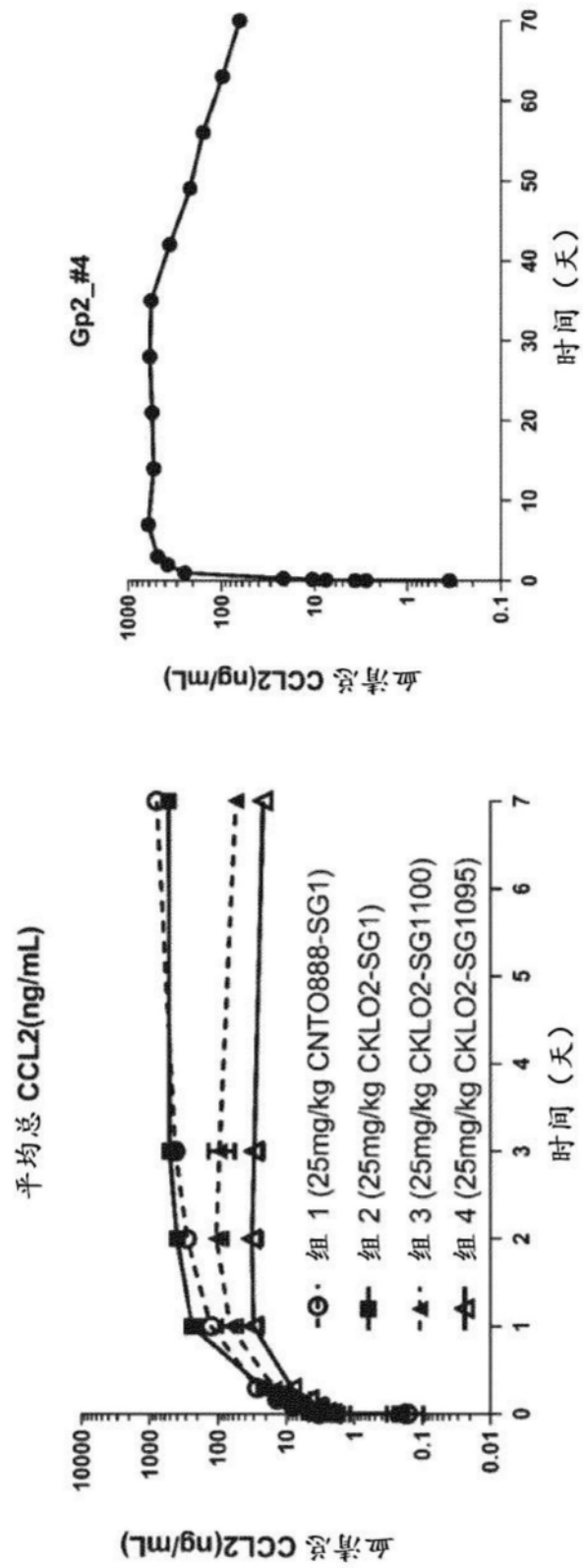


图12

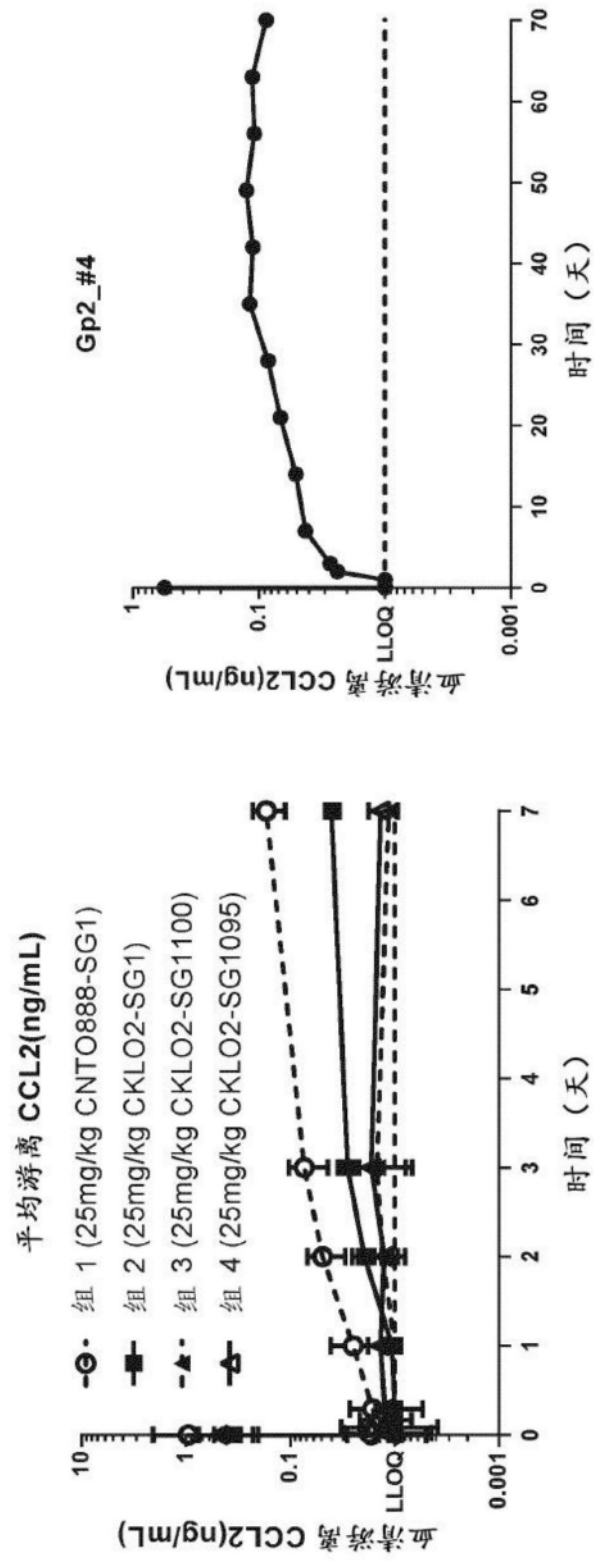


图13

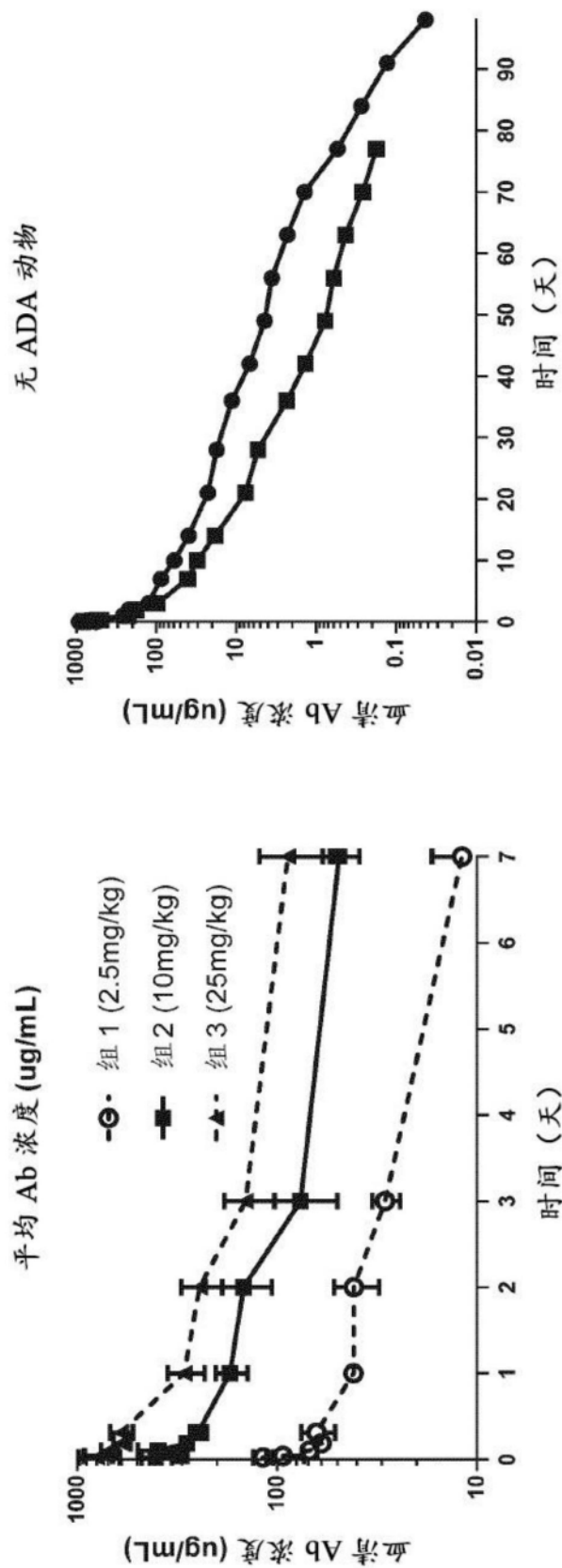


图14

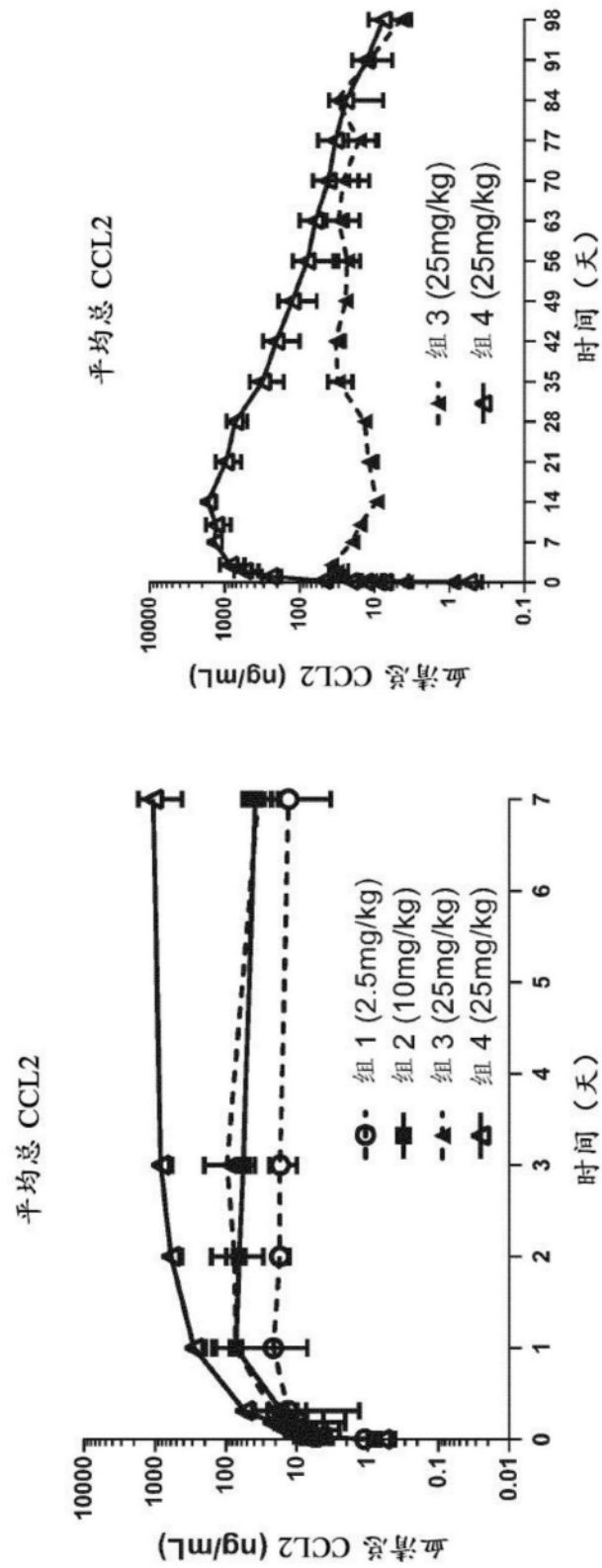


图15

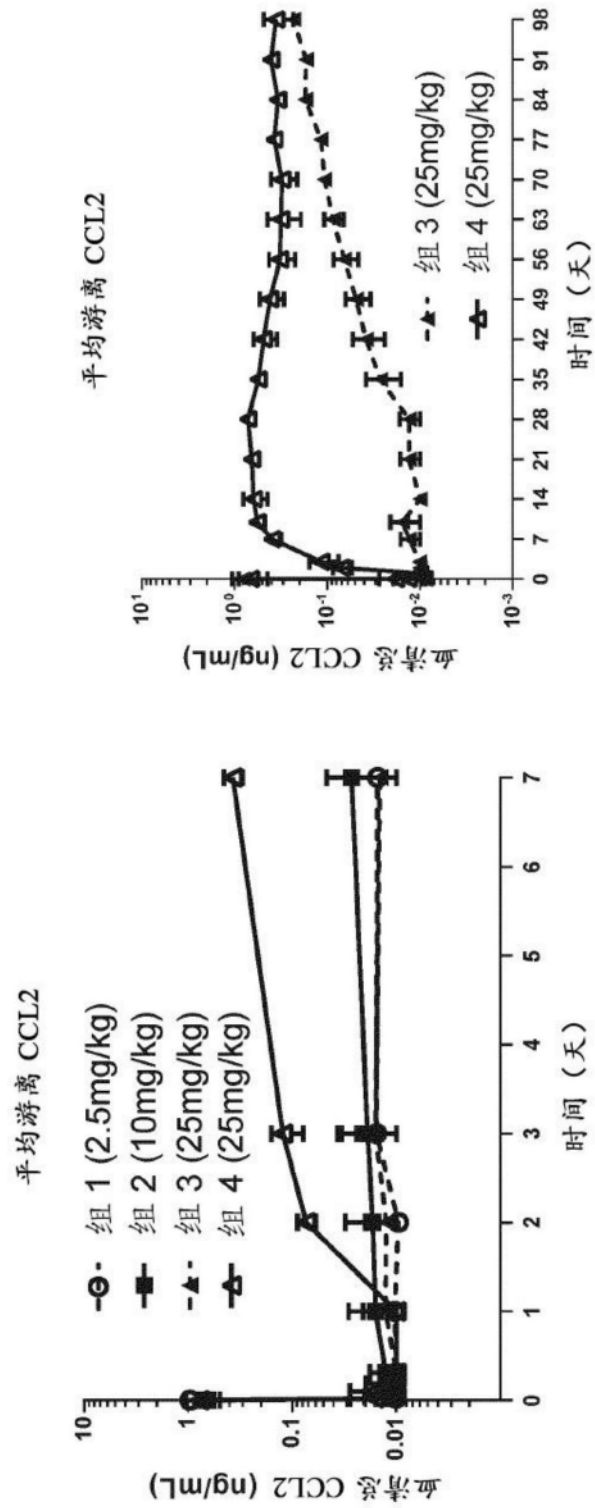


图16

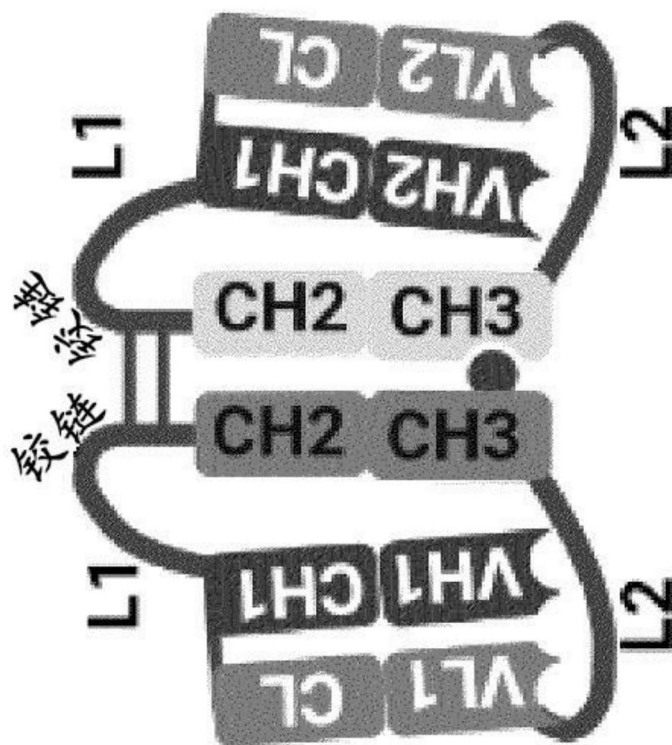


图17

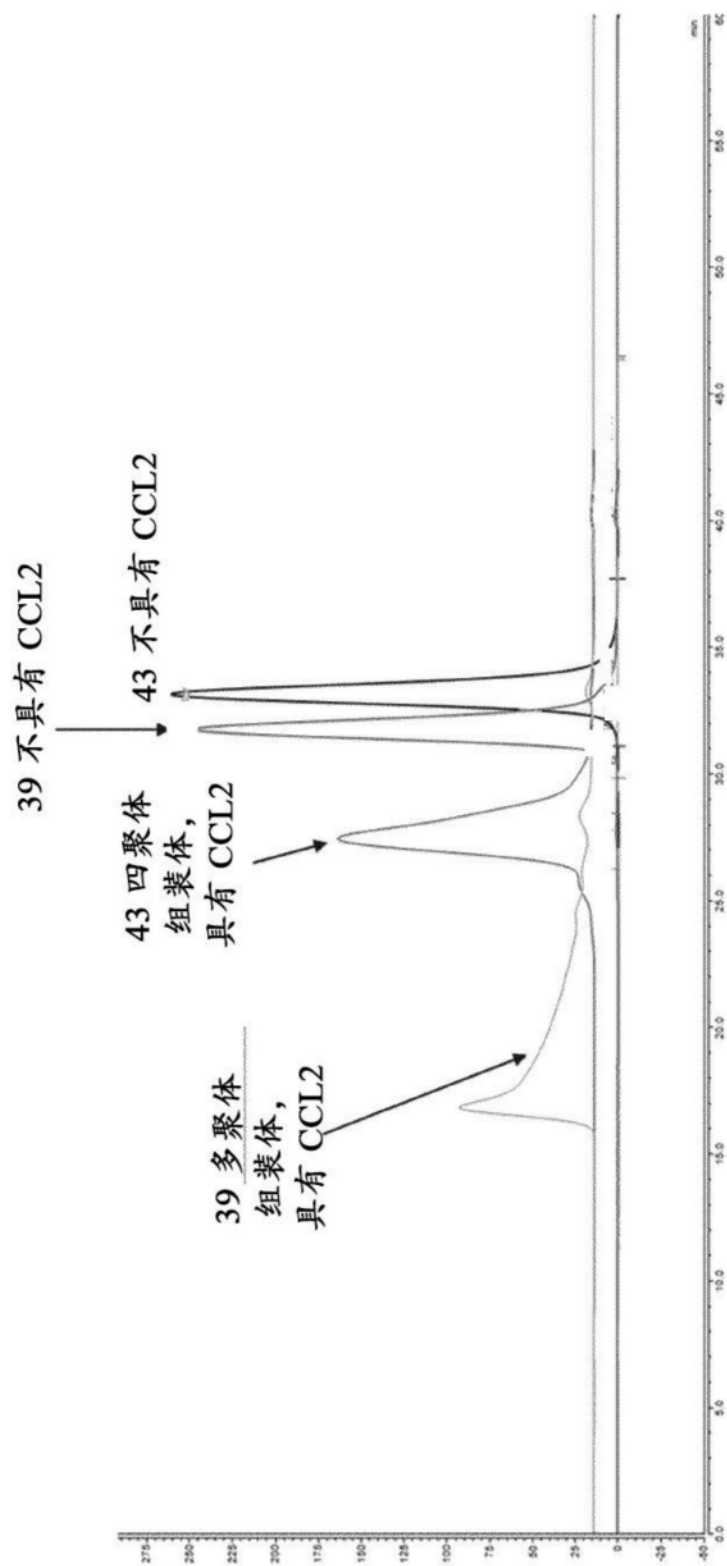


图18

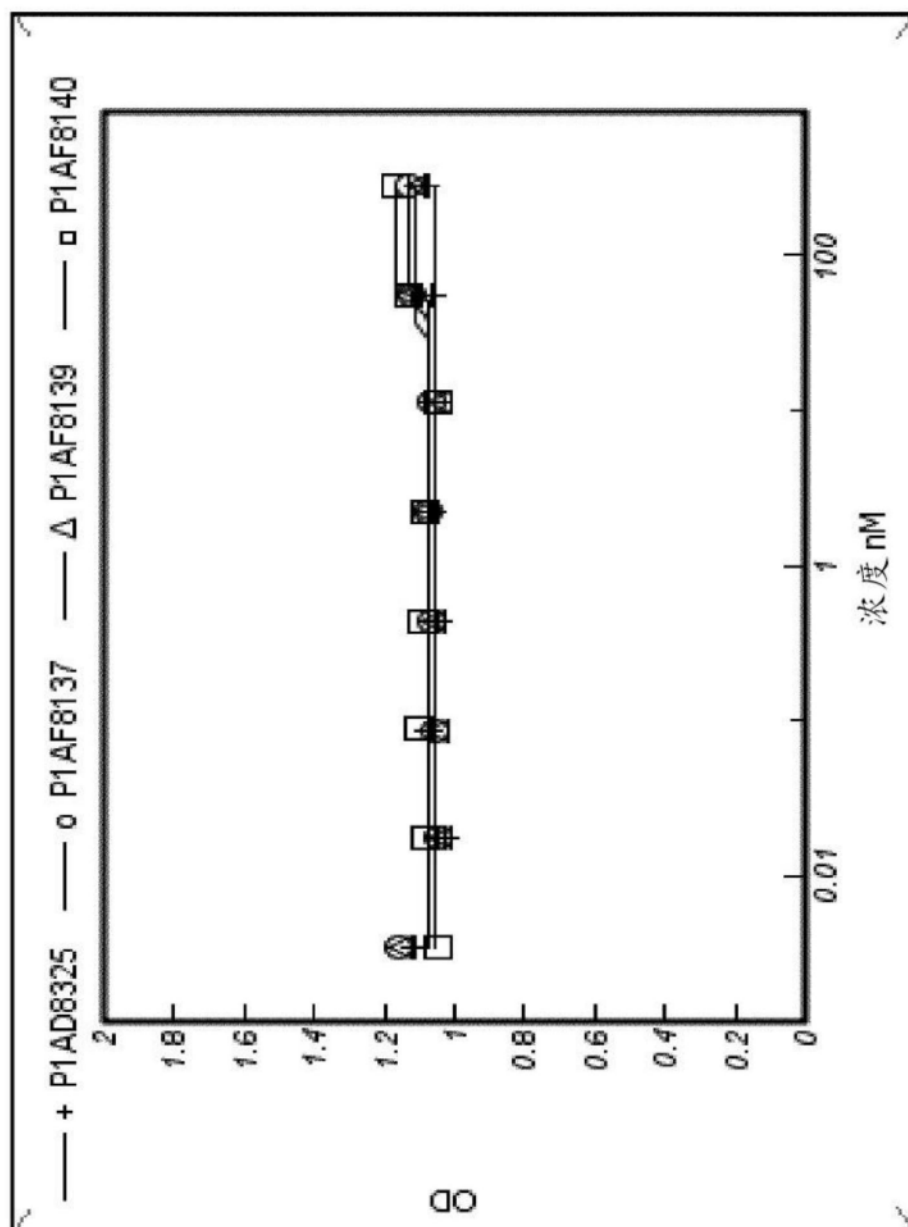


图19A

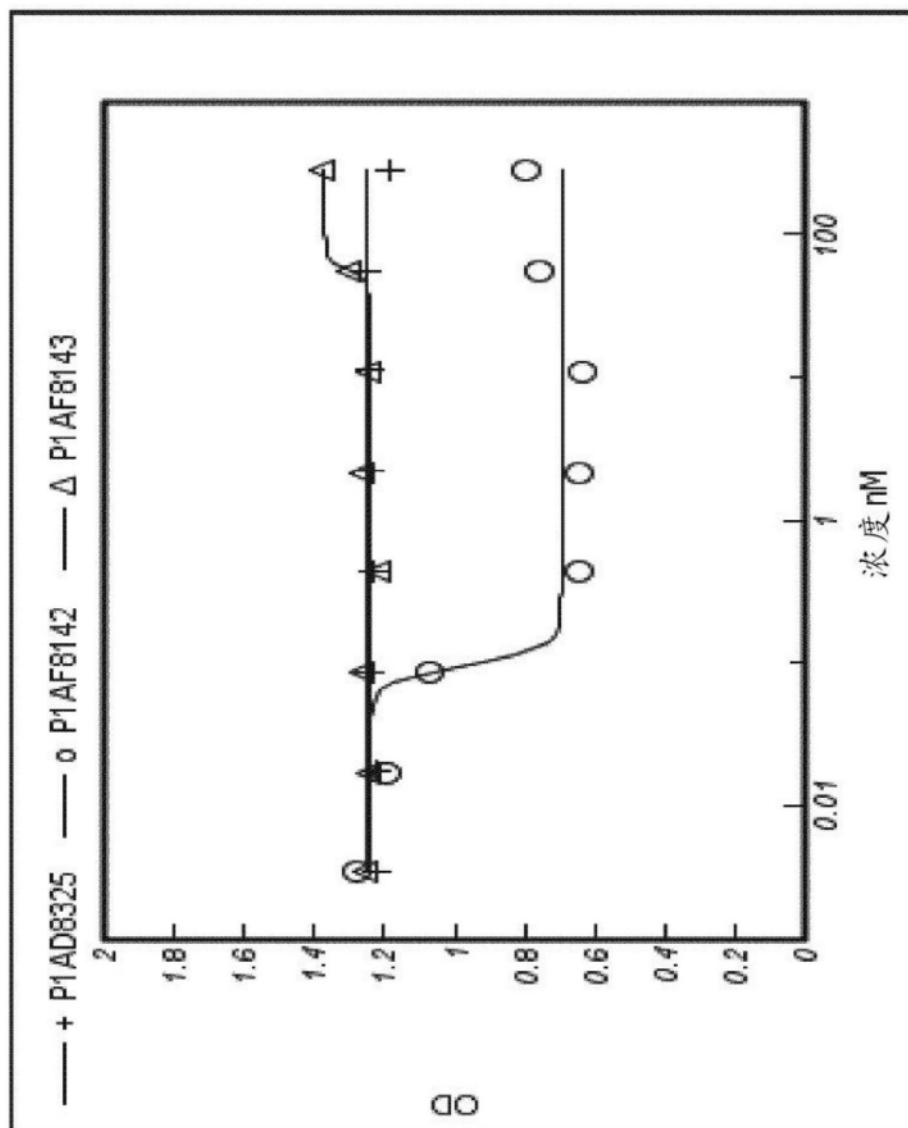


图19B

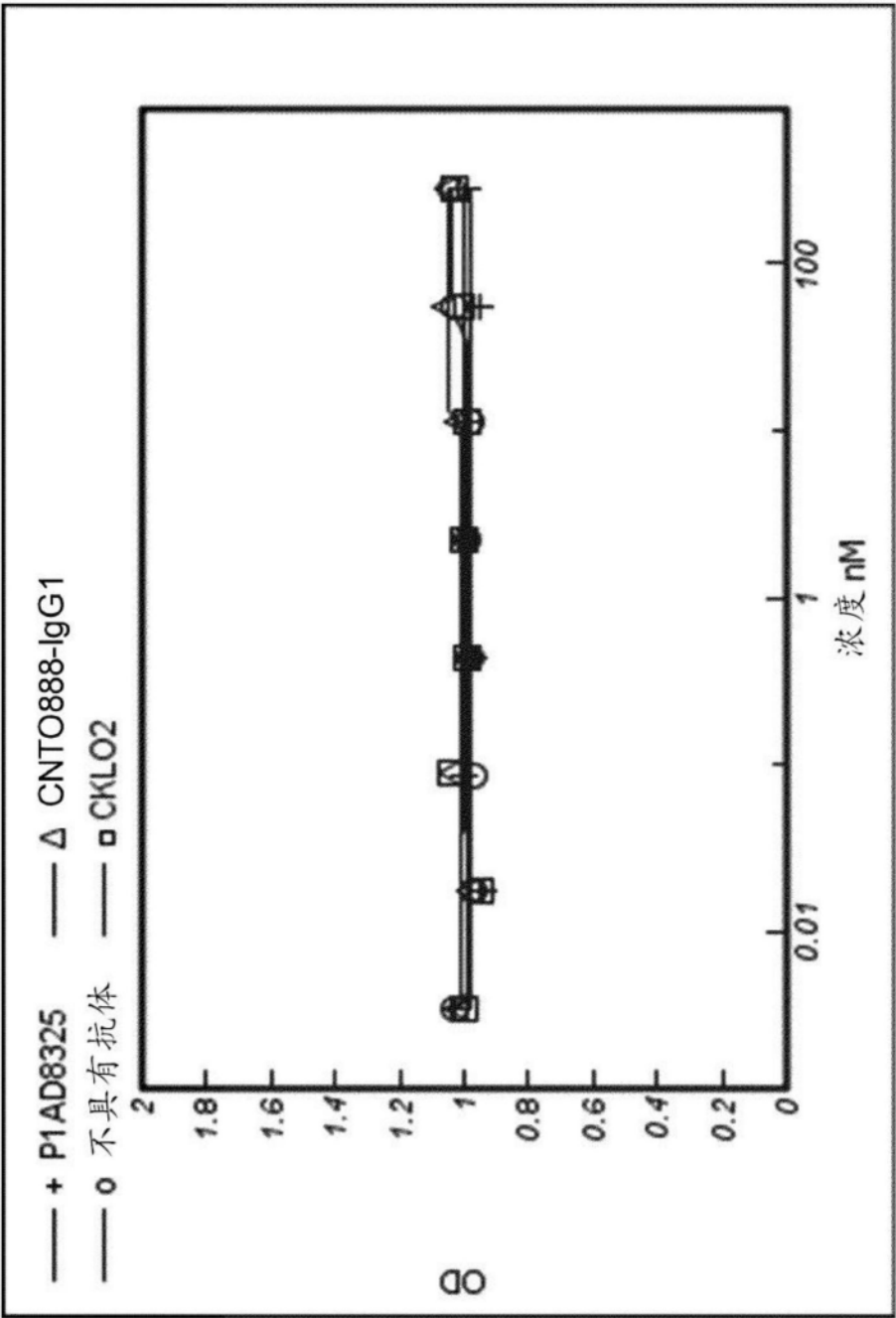


图19C

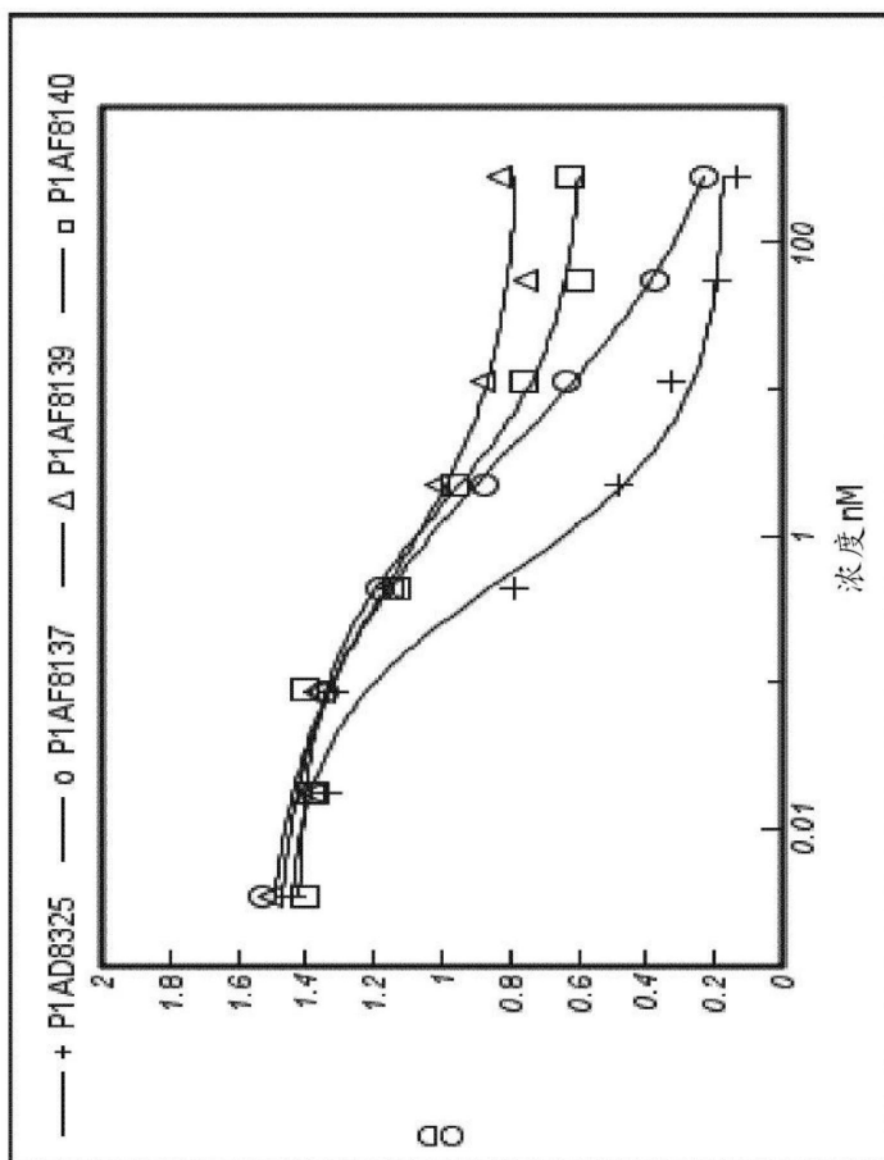


图20A

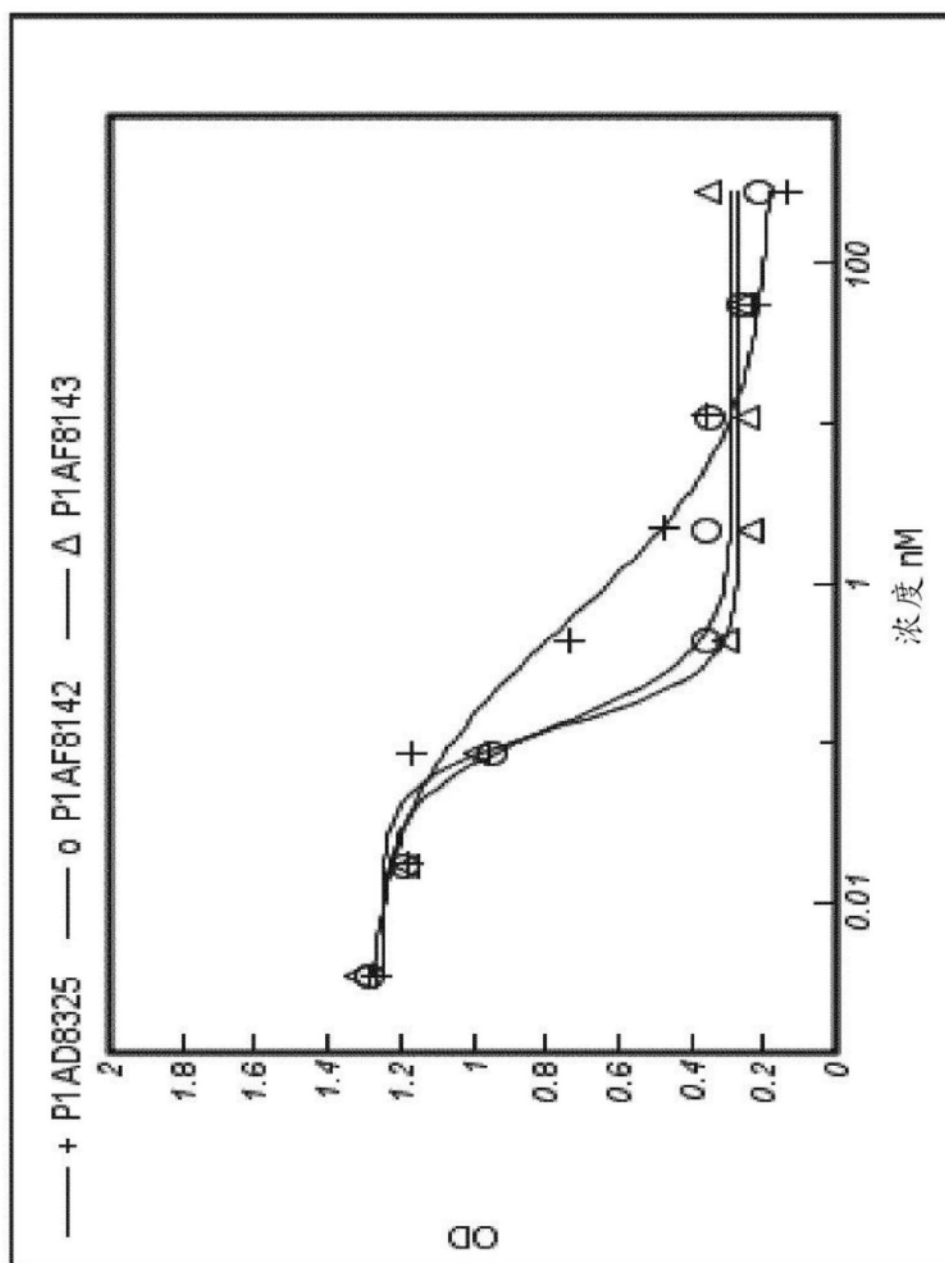


图20B

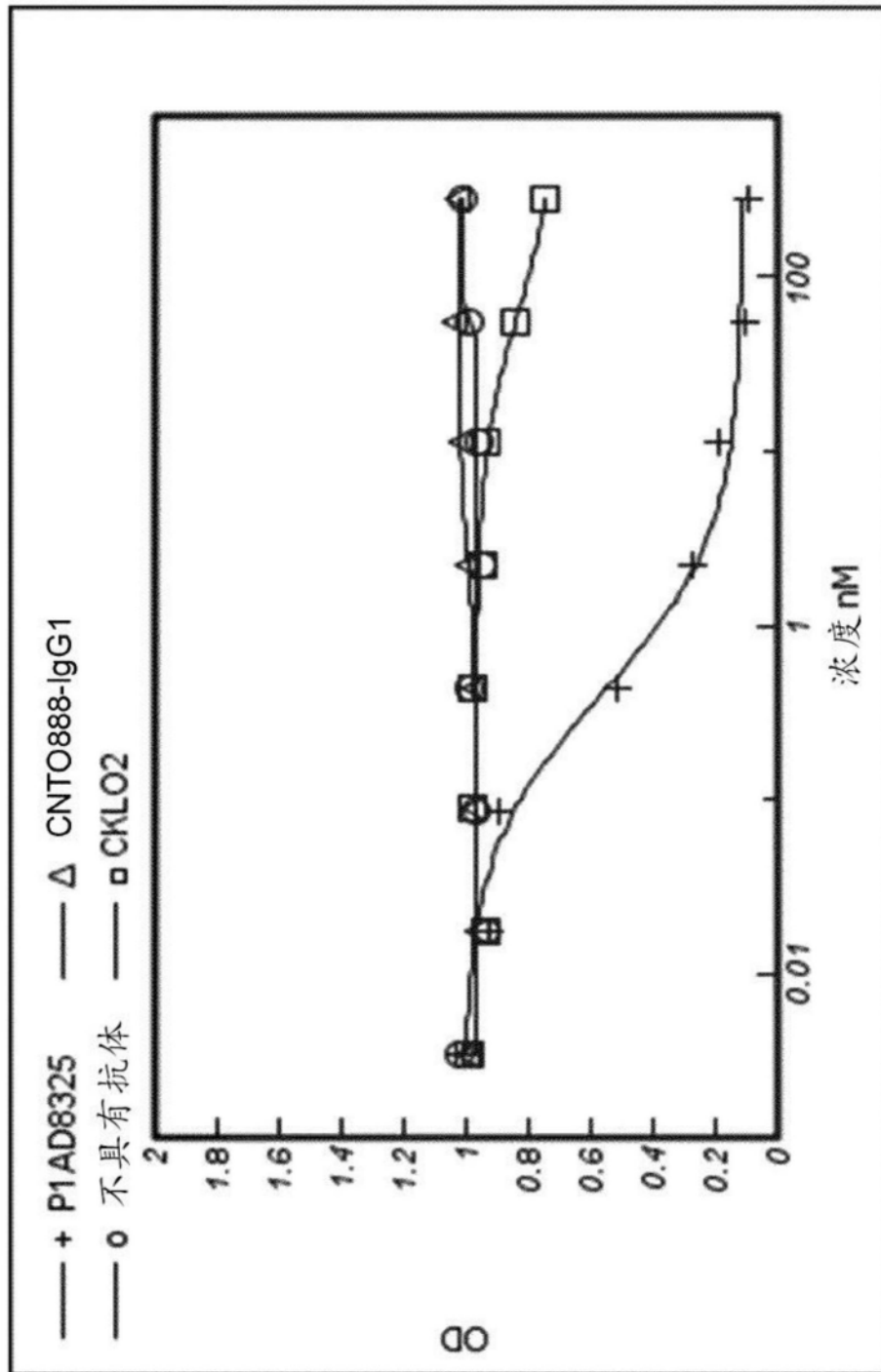


图20C