



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101479381 B

(45) 授权公告日 2015.04.29

(21) 申请号 200780019984.6

(22) 申请日 2007.03.30

(30) 优先权数据

097796/2006 2006.03.31 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2008.11.28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2007/057036 2007.03.30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02007/114319 JA 2007.10.11

(73) 专利权人 中外制药株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 井川智之 角田浩行 橘达彦

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 郭文洁 孙秀武

(51) Int. Cl.

C12N 15/09(2006.01)

C12N 1/19(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

(续)

(56) 对比文件

WO 9803546 A1, 1998.01.29, 摘要, 权利要求
1.

YAMASAKI Y. ET AL. Pharmacokinetic analysis of in vivo disposition of succinylated proteins targeted to liver nonparenchymal cells via scavenger receptors: importance of molecular size and negative charge density for in vivo recognition by receptors. 《J. PHARMACOL. EXP. THER.》. 2002, 第 301 卷 (第 2 期), 467-477.

LANCE W L ET AL. Crystal Structure at 2.8 Å^o of an FcRn/Heterodimeric Fc Complex: Mechanism of pH-Dependent Binding. 《MOLECULAR CELL》. 2001, 第 7 卷 867-877.

GHEITIE V ET AL. Multiple roles for the major histocompatibility complex class I-related receptor FcRn. 《ANNUAL REVIEW OF IMMUNOLOGY》. 2000, 739-766.

SHIELDS R L ET AL. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for FcγRI, FcγRII, FcγRIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the FcγRI. 《JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY》. 2001, 第 276 卷 (第 9 期), 6591-6604.

KHAWLI L. A. ET AL. Improved tumor localization and radioimaging with chemically modified monoclonal antibodies. 《CANCER BIOTHER. RADIOPHARM.》. 1996, 第 11 卷 (第 3 期), 203-215.

DEL RIO G. ET AL. An engineered penicillin acylase with altered surface charge is more stable in alkaline pH. 《ANN. N. Y. ACAD. SCI.》. 1996, 第 799 卷 61-64.

ONDA M. ET AL. Lowering the Isoelectric Point of the Fv Portion of Recombinant Immunotoxins Leads to Decreased Nonspecific Animal Toxicity Without Affecting Antitumor Activity. 《CANCER RES.》. 2001, 第 61 卷 (第 13 期), 5070-5077.

审查员 王慧

权利要求书1页 说明书27页

序列表13页 附图7页

(54) 发明名称

调控抗体血液动力学的方法

(57) 摘要

本发明发现,在含有 FcRn 结合区的多肽——IgG 抗体的可变区残基中,使暴露在表面的残基变异、控制表面电荷,则可以调控 IgG 抗体的血液

半衰期。通过本发明的方法,确认了血液半衰期得到调控的抗体可实际保有活性。本发明的方法与目标抗原的种类无关,广泛适用于 IgG 抗体等的可通过 FcRn 的补救途径回收的含有 FcRn 结合区的多肽。

[转续页]

[接上页]

(51) Int. Cl.

C12N 5/10(2006.01)

C12N 1/21(2006.01)

C12N 1/15(2006.01)

C07K 16/00(2006.01)

C12P 21/08(2006.01)

1. 一种血液药代动力学得到调控的 IgG 抗体的制备方法, 其中该方法包含以下步骤:
 - (a) 对编码抗体的核酸进行变异以改变至少一个选自下列氨基酸的氨基酸残基的电荷: 位于所述抗体重链可变区的 H10, H12, H23, H39, H43 和 H105;
 - (b) 培养宿主细胞, 以使该核酸表达; 以及
 - (c) 从宿主细胞培养物中回收所述抗体;其中所述变异的氨基酸残基选自以下 (a) 或 (b) 任一组中的氨基酸残基:
 - (a) 谷氨酸 (E) 和天冬氨酸 (D); 以及
 - (b) 赖氨酸 (K)、精氨酸 (R) 和组氨酸 (H)。
2. 权利要求 1 所述的方法, 其中, 上述血液药代动力学的调控是对血液半衰期、平均血液停留时间、血液清除中任一项参数的调控。
3. 权利要求 1-2 中任一项所述的方法, 其中, 步骤 (a) 中氨基酸残基电荷的改变通过氨基酸置换进行。

调控抗体血液动力学的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于调控抗体的血液动力学（血中動態）的抗体变异方法、含有在血液中动力学得到调控的抗体作为有效成分的药物组合物，及其制备方法等。

背景技术

[0002] 抗体在血液中的稳定性高，副作用也少，因此作为药物受到人们的关注。其中，IgG型的抗体药物有很多已经上市，目前也有很多抗体药物正在开发（非专利文献 1、非专利文献 2）。人们开发了使效应子功能等增强的技术作为第二代抗体药物。例如已知有通过 IgG 抗体 Fc 区的氨基酸置换使抗体依赖性细胞毒活性（ADCC）或补体依赖性细胞毒活性（CDC）增强的技术（非专利文献 3）。还有人报道了不仅使上述效应子功能增强，还使抗体的血液半衰期提高的 Fc 的氨基酸置换（非专利文献 4、非专利文献 5）。通过提高血液半衰期，有望降低给药量和延长给药间隔，可以提供低成本且便利性高的抗体药物。具体来说，通过在 Fc 区实施氨基酸置换，可以延长血液半衰期，所述的氨基酸置换可提高对于已知作为 IgG 的补救受体（Salvage receptor）的新生儿 Fc 受体的亲和性。另外，通过将 CH1、CH2、CH3 的恒定区进行改组（shuffling），可以提高血液半衰期（非专利文献 6）。但是，IgG 抗体恒定区的氨基酸序列在人中较为保守，从免疫原性的角度考虑，导入到恒定区的人工氨基酸置换较少为好。

[0003] 对于 IgG 抗体的可变区实施氨基酸置换的技术，有以下报道：以人源化（非专利文献 7），以及通过用于增强结合活性的互补决定区（CDR）的氨基酸置换形成亲和力成熟（非专利文献 8）；通过框架区（FR）的氨基酸置换来提高物理化学稳定性（非专利文献 9）。因此，与恒定区的氨基酸置换不同，可变区的氨基酸置换是用于增强抗体的功能或提高特性通常采用的方法。由于人源化抗体的 CDR 的氨基酸序列是人以外的动物种的氨基酸序列，因此无需关注免疫原性的风险问题。另外，在 FR 序列中，只要与 Kabat 数据库 (<http://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/kabat/>) 和 IMGT 数据库 (<http://imgt.cines.fr/>) 中公开的人抗体的 FR 序列相同，则可以认为免疫原性的风险小。但是，目前只有通过上述恒定区的 Fc 的氨基酸置换作为提高 IgG 抗体血液半衰期的方法，而对于通过免疫原性风险小的可变区氨基酸置换提高 IgG 抗体的血液半衰期的方法目前尚未有报道。其原因可能是：IgG 的血液半衰期与 IgG 的补救受体——新生儿 Fc 受体的结合以及其抗原依赖性的消除有很大的相关性（非专利文献 10），而可变区对于血液半衰期没有很大的影响。另外，通过使 IgG 琥珀酰化可以进行阴离子化，可以使 IgG 的等电点（pI）降低（非专利文献 11），或者通过多元胺修饰实现阳离子化，使 IgG 的 pI 升高（非专利文献 12），但在上述两种情况下血液半衰期没有提高，相反地缩短了，由此通过变异来改变 pI 无法提高血液半衰期。

[0004] 另一方面，相对于全长抗体 IgG，低分子量的低分子化抗体 Fab 或 scFv 的半衰期短，因此通过聚乙二醇等高分子进行修饰可以降低肾脏排泄，可以使血液半衰期提高（非专利文献 13）。有报道称：除高分子修饰之外，改变低分子化抗体的等电点（pI）也可使其血液动力学发生变化。例如非专利文献 14 中公开了，用有机酸修饰抗-Tac Fab 可使 pI 降

低, AUC(曲线下面积)提高。而非专利文献 15 和非专利文献 16 中公开了,用有机酸修饰抗-Tac dsFv 可使 pI 降低,同时 AUC 也降低。非专利文献 17 中公开了,通过氨基酸置换对抗 Tac-scFv 毒素的可变区施加变异使 pI 降低,半衰期 ($t_{1/2}$) 和 AUC 也降低。非专利文献 18 中公开了,在 scFv 的 C 末端附加了使 pI 降低的氨基酸,但是 AUC 几乎未发生变化。如上所述,在低分子化抗体中,通过修饰以及氨基酸置换使 pI 降低时,AUC 可能提高也可能降低,因此无法通过改变 pI 使血液半衰期按照目标进行调控。

[0005] 非专利文献 1: Monoclonal antibody successes in the clinic, Janice M Reichert, Clark J Rosensweig, Laura B Faden 和 Matthew C Dewitz, Nature Biotechnology 2005 ;23 :1073-1078

[0006] 非专利文献 2 : Pavlou AK, Belsey MJ., The therapeutic antibodies market to 2008., Eur J Pharm Biopharm. 2005 Apr ;59(3) :389-96.

[0007] 非专利文献 3 : Kim SJ, Park Y, Hong HJ., Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies., Mol Cells. 2005 Aug 31 ;20(1) :17-29. Review.

[0008] 非专利文献 4 : Hinton PR, Xiong JM, Johlf s MG, Tang MT, Keller S, Tsurushita N., An engineered human IgG1 antibody with longer serum half-life., J Immunol. 2006 Jan 1 ;176(1) :346-56.

[0009] 非专利文献 5 : Ghetie V, Popov S, Borvak J, Radu C, Matesoi D, Medesan C, Ober RJ, Ward ES., Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis., Nat Biotechnol. 1997 Jul ;15(7) :637-40.

[0010] 非专利文献 6 : Zuckier LS, Chang CJ, Scharff MD, Morrison SL., Chimeric human-mouse IgG antibodies with shuffled constant region exons demonstrate that multiple domains contribute to in vivo half-life., Cancer Res. 1998 Sep 1 ;58(17) :3905-8.

[0011] 非专利文献 7 : Tsurushita N, Hinton PR, Kumar S., Design of humanized antibodies : from anti-Tac to Zenapax., Methods. 2005 May ;36(1) :69-83.

[0012] 非专利文献 8 : Rajpal A, Beyaz N, Haber L, Cappuccilli G, Yee H, Bhatt RR, Takeuchi T, Lerner RA, Crea R., A general method for greatly improving the affinity of antibodies by using combinatorial libraries., Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Jun 14 ;102(24) :8466-71.

[0013] 非专利文献 9 : Ewert S, Honegger A, Pluckthun A., Stability improvement of antibodies for extracellular and intracellular applications : CDR grafting to stable frameworks and structure-based framework engineering., Methods. 2004 Oct ;34(2) :184-99. Review

[0014] 非专利文献 10 : Lobo ED, Hansen RJ, Balthasar JP., Antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics., J Pharm Sci. 2004 Nov ;93(11) :2645-68. Review.

[0015] 非专利文献 11 : Yamasaki Y, Sumimoto K, Nishikawa M, Yamashita F, Yamaoka K, Hashida M, Takakura Y., pharmacokinetic analysis of in vivo disposition of succinylated proteins targeted to liver nonparenchymal cells via scavenger

receptors: importance of molecular size and negative charge density for in vivo recognition by receptors., *Pharmacol Exp Ther.* 2002 May ;301(2) :467-77.

[0016] 非专利文献 12: Poduslo JF, Curran GL., Olyamine modification increases the permeability of proteins at the blood-nerve and blood-brain barriers., *Neurochem.* 1996 Apr ;66(4) :1599-609.

[0017] 非专利文献 13: Yang K, Basu A, Wang M, Chintala R, Hsieh MC, Liu S, Hua J, Zhang Z, Zhou J, Li M, Phyu H, Petti G, Mendez M, Janjua H, Peng P, Longley C, Borowski V, Mehlig M, Filpula D., Tailoring structure-function and pharmacokinetic properties of single-chain Fv proteins by site-specific PEGylation., *Protein Eng.* 2003 Oct ;16(10) :761-70.

[0018] 非专利文献 14: Kobayashi H, Le N, Kim IS, Kim MK, Pie JE, Drumm D, Paik DS, Waldmann TA, Paik CH, Carrasquillo JA., The pharmacokinetic characteristics of glycolated humanized anti-Tac Fabs are determined by their isoelectric points., *Cancer Res.* 1999 Jan 15 ;59(2) :422-30.

[0019] 非专利文献 15: Kim I, Kobayashi H, Yoo TM, Kim MK, Le N, Han ES, Wang QC, Pastan I, Carrasquillo JA, Paik CH., Lowering of pI by acylation improves the renal uptake of ^{99m}Tc-labeled anti-Tac dsFv: effect of different acylating reagents., *Nucl Med Biol.* 2002 Nov ;29(8) :795-801

[0020] 非专利文献 16: Kim IS, Yoo TM, Kobayashi H, Kim MK, Le N, Wang QC, Pastan I, Carrasquillo JA, Paik CH., Chemical modification to reduce renal uptake of disulfide-bonded variable region fragment of anti-Tac monoclonal antibody labeled with ^{99m}Tc., *Bioconjug Chem.* 1999 May-Jun ;10(3) :447-53.

[0021] 非专利文献 17: Onda M, Nagata S, Tsutsumi Y, Vincent JJ, Wang Q, Kreitman RJ, Lee B, Pastan I., Lowering the isoelectric point of the Fv portion of recombinant immunotoxins leads to decreased nonspecific animal toxicity without affecting antitumor activity., *Cancer Res.* 2001 Jul 1 ;61(13) :5070-7.

[0022] 非专利文献 18: Pavlinkova G, Beresford G, Booth BJ, Batra SK, Colcher D., Charge-modified single chain antibody constructs of monoclonal antibody CC49: generation, characterization, pharmacokinetics, and biodistribution analysis., *Nucl Med Biol.* 1999 Jan ;26(1) :27-34.

[0023] 非专利文献 19: Deen WM, Lazzara MJ, Myers BD., Structural determinants of glomerular permeability., *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001 Oct ;281(4) :F579-96.

[0024] 非专利文献 20: Schaeffer RC Jr, Gratrix ML, Mucha DR, Carbajal JM., The rat glomerular filtration barrier does not show negative charge selectivity., *Microcirculation.* 2002 Oct ;9(5) :329-42.

[0025] 非专利文献 21: Goode NP, Shires M, Davison AM., The glomerular basement membrane charge-selectivity barrier: an oversimplified concept?, *Nephrol Dial Transplant.* 1996 Sep ;11(9) :1714-6.

[0026] 非专利文献 22: Comper WD, Glasgow EF., Charge selectivity in kidney

ultrafiltration., Kidney Int. 1995 May ;47(5) :1242-51.

[0027] 非专利文献 23 :Ghetie V, Ward ES. FcRn :the MHC class I-related receptor that is more than an IgG transporter. Immunol Today. 1997 Dec ;18(12) :592-8.

[0028] 非专利文献 24 :He XY, Xu Z, Melrose J, Mallowney A, Vasquez M, Queen C, Vexler V, Klingbeil C, Co MS, Berg EL. Humanization and pharmacokinetics of a monoclonal antibody with specificity for both E- and P-selectin. J Immunol. 1998 Jan 15 ;160(2) :1029-35.

[0029] 非专利文献 25 :Gobburu JV, Tenhoor C, Rogge MC, Frazier DE Jr, Thomas D, Benjamin C, Hess DM, Jusko WJ. Pharmacokinetics/dynamics of 5c8, a monoclonal antibody to CD 154 (CD40 ligand) suppression of an immune response in monkeys. J Pharmacol Exp Ther. 1998 Aug ;286(2) :925-30.

[0030] 非专利文献 26 :Kashmiri SV, Shu L, Padlan EA, Milenic DE, Schlom J, Hand PH. , Generation, characterization, and in vivo studies of humanized anticarcinoma antibody CC49. , Hybridoma. 1995 Oct ;14(5) :461-73.

[0031] 非专利文献 27 :Graves SS, Goshorn SC, Stone DM, Axworthy DB, Reno JM, Bottino B, Searle S, Henry A, Pedersen J, Rees AR, Libby RT. , Molecular modeling and preclinical evaluation of the humanized N R-LU-13 antibody. , Clin Cancer Res. 1999 Apr ;5(4) :899-908.

[0032] 非专利文献 28 :Couto JR, Blank EW, Peterson JA, Ceriani RL. , Anti-BA46 monoclonal antibody Mc3 :humanization using a novel positional consensus and in vivo and in vitro characterization. , Cancer Res. 1995 Apr 15 ;55(8) :1717-22.

[0033] 非专利文献 29 :Adams CW, Allison DE, Flagella K, Presta L, Clarke J, Dybdal N, McKeever K, Sliwkowski MX. Humanization of a recombinant monoclonal antibody to produce a therapeutic HER dimerization inhibitor, pertuzumab. , Cancer Immunol Immunother. 2005 Sep 3 ; :1-11

[0034] 非专利文献 30 :Binz HK, Amstutz P, Pluckthun A. , Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains. , Nat Biotechnol. 2005 Oct ;23(10) :1257-68.

发明内容

[0035] 针对上述状况,本发明的目的在于提供通过下述变异来调控含有 FcRn 结合区的多肽的血液半衰期的方法,其中所述的变异是通过对暴露于 IgG 抗体等含有 FcRn 结合区的多肽表面的氨基酸残基进行置换;本发明还提供包含下述多肽的药物组合物,以及这些药物组合物的制备方法,所述的多肽是通过氨基酸置换使其血液半衰期得到调控的、含有 FcRn 结合区的多肽。

[0036] 本发明人对于通过氨基酸置换来调控含有 FcRn 结合区的多肽的血液半衰期的方法进行了深入的研究。结果,本发明人开发了在含有 FcRn 结合区的多肽——IgG 抗体的可变区残基中,对暴露在表面的残基进行变异、控制表面电荷,由此调控 IgG 抗体在血液中的半衰期的方法。具体来说,发现了不会对抗体的功能、结构产生影响、可控制表面电荷、调控

IgG 抗体的血液半衰期的、可变区的变异位置。并且根据本发明确认了血液半衰期得到调控的抗体实际上保持有活性。

[0037] 与目标抗原的种类无关、本发明的方法可广泛应用于 IgG 等含有 FcRn 结合区的多肽,所述的多肽通过 FcRn 补救途径再循环、其主代谢途径非肾脏排泄。

[0038] 本发明涉及通过下述变异来调控含有 FcRn 结合区的多肽的血液半衰期的方法,其中所述的变异是通过对暴露于含有 FcRn 结合区的多肽表面的氨基酸残基进行置换;本发明还涉及包含下述多肽的药物组合物以及该药物组合物的制备方法,所述的多肽是通过氨基酸置换使其血液半衰期得到调控的、含有 FcRn 结合区的多肽,更具体地说,提供以下内容:

[0039] 血液动力学得到控制的、含有 FcRn 结合区的多肽的制备方法,该方法包含以下步骤:

[0040] (a) 为了使可暴露于含有 FcRn 结合区的多肽表面的至少一个氨基酸残基的电荷发生改变,对编码含有该氨基酸残基的多肽的核酸进行变异;(b) 培养宿主细胞,以使该核酸表达;(c) 从宿主细胞培养物中回收含有 FcRn 结合区的多肽。

[0041] [1] 所述的方法,其中,上述可暴露在含有 FcRn 结合区的多肽表面的氨基酸残基位于含有 FcRn 结合区的多肽中 FcRn 结合区以外的区域。

[0042] [2] 所述的方法,其中,上述 FcRn 结合区包含 Fc 区或 Fc 样区。

[0043] [1] 所述的方法,其中,含有 FcRn 结合区的多肽是 IgG 抗体。

[0044] [4] 所述的方法,其中,步骤 (a) 中电荷得到改变的氨基酸残基是 IgG 抗体的重链可变区或轻链可变区的氨基酸残基。

[0045] [1] 所述的方法,其中,上述血液动力学的调控是对血液半衰期、平均血液停留时间、血液清除中任一项参数的调控。

[0046] [1] 所述的方法,其中,步骤 (a) 中氨基酸残基电荷的改变通过氨基酸置换进行。

[0047] 含有 FcRn 结合区的多肽,该多肽由 [1] 所述的方法制备。

[0048] 调控含有 FcRn 结合区的多肽的血液动力学的方法,该方法包括使可暴露于含有 FcRn 结合区的多肽表面的至少一个氨基酸残基的电荷发生改变。

[0049] [9] 所述的方法,其中,上述可暴露在含有 FcRn 结合区的多肽表面的氨基酸残基位于含有 FcRn 结合区的多肽中 FcRn 结合区以外的区域。

[0050] [10] 所述的方法,其中,上述 FcRn 结合区含有 Fc 区或 Fc 样区。

[0051] [9] 所述的方法,其中,含有 FcRn 结合区的多肽是 IgG 抗体。

[0052] [12] 所述的方法,其中,电荷发生改变的氨基酸残基是 IgG 抗体的重链可变区或轻链可变区的氨基酸残基。

[0053] [9] 所述的方法,其中,上述血液动力学的调控是对血液半衰期、平均血液停留时间、血液清除中任一项参数的调控。

[0054] [9] 所述的方法,其中,氨基酸残基电荷的改变通过氨基酸置换进行。

[0055] 通过 [9] 的方法使血液动力学得到调控的、含有 FcRn 结合区的多肽。

[0056] 人源化抗体,该人源化抗体含有来自人以外的动物的互补决定区 (CDR)、来自人的框架区 (FR) 和人恒定区,其中,在 CDR 或 FR 中,可暴露在抗体表面的至少一个氨基酸残基是与野生型 CDR 或 FR 的相应位置上的氨基酸残基相比具有不同电荷的氨基酸残基,与可变

区来自所述人以外的动物的抗体、且具有相同恒定区的嵌合抗体相比,该人源化抗体的血液动力学得到调控。

[0057] [17] 所述的人源化抗体,其中,上述人恒定区含有野生型人 Fc 区。

[0058] 组合物,其含有 [17] 或 [18] 中所述的人源化抗体和可药用载体。

[0059] 核酸,其编码构成 [17] 或 [18] 所述的人源化抗体的多肽。

[0060] 宿主细胞,该宿主细胞具有 [20] 所述的核酸。

[0061] [17] 或 [18] 所述的人源化抗体的制备方法,该方法包含培养 [21] 所述的宿主细胞的步骤;由细胞培养物回收多肽的步骤。

[0062] IgG 抗体,该抗体的重链可变区中选自 Kabat 编号的 10 号、12 号、23 号、39 号、43 号和 105 号的氨基酸残基的至少一个氨基酸残基电荷发生改变,与该氨基酸残基发生改变前相比,该抗体的血液动力学得到调控。

[0063] [23] 所述的 IgG 抗体,其中,上述变异的氨基酸残基选自以下 (a) 或 (b) 任一组中的氨基酸残基:

[0064] (a) 谷氨酸 (E)、天冬氨酸 (D);

[0065] (b) 赖氨酸 (K)、精氨酸 (R)、组氨酸 (H)。

[0066] 组合物,其含有 [23] 或 [24] 所述的 IgG 抗体和可药用载体。

[0067] 核酸,其编码构成 [23] 或 [24] 所述的 IgG 抗体的多肽。

[0068] 宿主细胞,该宿主细胞具有 [26] 所述的核酸。

[0069] [23] 或 [24] 所述的抗体的制备方法,该制备方法包含培养 [27] 所述的宿主细胞的步骤;由细胞培养物回收多肽的步骤。

[0070] 附图简述

[0071] 图 1 是表示对人源化双特异性抗体(人源化 A69(hA69a)/人源化 B26(hB26-F123e4)/人源化 BBA(hAL-F123j4))的凝固活性进行评价的结果的图。评价结果显示了与嵌合双特异性抗体具有同等以上的凝固活性。

[0072] 图 2 是表示使用人源化 A69-H 链可变区(hA69a)和人源化 BBA(hAL-F123j4)、以及人源化 hB26-H 链可变区(hB26-F123e4)和人源化 BBA(hAL-F123j4)实施抗体建模(モデリング)的结果的图。强调显示了可以使表面电荷变化的氨基酸的支链。编号采用 Kabat 数据库的序列编号(Kabat EA 等人,1991. Sequences of Proteins of Immunological Interest. NIH)。

[0073] 图 3 是表示 ATF、hA69-PF、BiAb、hB26-PF、hA69-N97R、hA69-p18、hB26-F123e4、hB26-p15 的等电聚焦电泳分析的结果的照片。

[0074] 图 4 是表示 ATF、hA69-PF、BiAb、hB26-PF、hA69-N97R、hA69-p18、hB26-F123e4、hB26-p15 的等电聚焦电泳中的 pI 标记的校正曲线、以及由校正曲线计算的各样品的 pI 的图。可观察到:可变区氨基酸的不同导致表面电荷变化,以及氨基酸变异导致表面电荷变化,由此 pI 变化。

[0075] 图 5 是表示使用未变异的、或可变区变异的人源化 A69 抗体(hA69a、hA69-N97R 和 hA69-N97R、hA69-p18、hA69-PF)分析与作为抗原的因子 IXa 的结合活性的结果的图。分析结果显示,等电点变化了的变异体与未经变异的抗体具有等同的结合活性。

[0076] 图 6 是表示使用未变异的、或可变区变异的人源化 B26 抗体(hB26-F123e4、

hB26-p15) 分析与作为抗原的因子 X 的结合活性的结果的图。分析结果显示,等电点变化了的经变异的抗体与未经变异的抗体具有等同的结合活性。

[0077] 图 7 是表示 ATF、hA69-PF、BiAb、hB26-PF 在小鼠血浆中的浓度变化的图。

[0078] 图 8 是表示作为 ATF、hA69-PF、BiAb、hB26-PF、hA69-N97R、hA69-p18、hB26-F123e4、hB26-p15 的药物动力学参数的、清除 (CL) 和半衰期 ($T_{1/2}$) 的相关性。

[0079] 实施发明的最佳方式

[0080] 本发明提供调控含有 FcRn 结合区的多肽的血液动力学的方法。作为本发明的方法的优选方案,提供了包含将可暴露于含有 FcRn 结合区的多肽表面的至少一个氨基酸残基的电荷进行改变的方法。即,通过改变氨基酸残基的电荷,使含有 FcRn 结合区的多肽的等电点 (pI) 变化,由此可以调控该蛋白质的血液动力学。

[0081] 如上所述, scFv 或 Fab 等低分子抗体不一定能通过 pI 的改变来调控其血液动力学。已知 scFv 或 Fab 等低分子抗体的主要代谢途径是肾脏排泄。但是,非专利文献 19-22 中所示的肾脏排泄中,蛋白质的电荷的阴性越强则肾脏过滤效果越受到抑制,另一方面,也有蛋白质的电荷没有影响的报道。实际上,如非专利文献 14-18 所示,有使低分子化抗体的 pI 降低则可以使血液半衰期延长的报告,也有使血液半衰期缩短的报告。蛋白质的电荷为阴性,则肾脏过滤后的蛋白质被近端肾小管重新吸收的情形受到抑制,通过 pI 无法自由地调控低分子化抗体的血液半衰期。

[0082] 另一方面, IgG 抗体的分子量非常大,因此主要代谢途径不是肾脏排泄。已知具有 Fc 的 IgG 抗体通过在血管等内皮细胞中表达的 FcRn 的补救途径再循环,由此具有较长的半衰期,这可能是由于 IgG 主要在内皮细胞中代谢 (非专利文献 23)。即,被内皮细胞非特异性摄入的 IgG 与 FcRn 结合, IgG 再循环,无法结合的分子被代谢。与 FcRn 的结合性降低的 IgG,其血液半衰期缩短,相反提高与 FcRn 的结合性则可以使血液半衰期延长 (非专利文献 23)。如上所述,目前的 IgG 的血液动力学的调控方法是通过使 Fc 变异改变其与 FcRn 的结合性来进行,但本发明的实施例 8 中,无关乎目标抗原的种类,具有相同 Fc 的 IgG 的血液半衰期与 pI 具有高相关系数的相关性,实际上,对于针对不同的抗原的两种抗体,通过改变其可变区的 pI,无需使 Fc 变异也可以调控血液半衰期。被内皮细胞非特异性摄入的速度可能与带有负电荷的细胞表面与 IgG 之间物理化学性的库仑相互作用有关,因此,通过降低 (提高) IgG 的 pI,库仑相互作用降低 (增大),被内皮细胞的非特异性摄入减少 (增多),结果,通过使内皮细胞中代谢减少 (增大),可以调控血液动力学。内皮细胞的细胞表面负电荷的库仑相互作用是物理化学性相互作用,因此可以认为该相互作用不依赖于目标抗原。因此,本发明中发现的血液动力学的调控方法可广泛应用于不依赖于目标抗原种类的、任意的 IgG 等含有 FcRn 结合区的多肽,此类多肽通过 FcRn 的补救途径再循环、主要代谢途径不是肾脏排泄。

[0083] 因此,本发明的含有 FcRn 结合区的多肽不限于 IgG 抗体,只要是可以与 Fc 受体 (FcRn) 结合 (具有结合活性或亲和性) 的蛋白质即可,本发明的含有 FcRn 结合区的多肽没有特别限定,优选可以是含有抗体的 Fc 区或 Fc 样区的蛋白质。本发明的含有 FcRn 结合区的多肽,例如 IgG 抗体。这些抗体 (蛋白质) 的变异体只要是可与 FcRn 结合的蛋白质即包含在本发明的含有 FcRn 结合区的多肽之中。本发明中,含有 FcRn 结合区的多肽的最优选例子为 IgG 抗体。

[0084] 使用 IgG 抗体作为本发明的含有 FcRn 结合区的多肽时,只要是 IgG 型的抗体分子即可,可以是任何亚型,也可以是双特异性 IgG 抗体。双特异性抗体是针对两种不同的表位具有特异性的抗体,除识别不同抗原的抗体之外,也包含识别同一抗原上的不同表位的抗体。另外,如上所述,当抗体分子如 scFv 或 Fab,是以肾脏排泄作为主要代谢途径的低分子化抗体时无法通过 pI 调控血液动力学,但本发明中,只要是不以肾脏排泄作为主要的代谢途径的 Fc 结合蛋白即可,可以采用任何抗体分子形式,例如,scFv-Fc、bAb-Fc、Fc 融合蛋白等。这些分子不以肾脏排泄作为主要的代谢途径,因此,采用本发明的方法来改变 pI,则可调控血液动力学。可适用于本发明的抗体分子可以是抗体样分子。抗体样分子是通过与靶分子结合而发挥功能的分子(非专利文献 30),例如有 DARPins、Affibody、Avimer 等。

[0085] 本发明中,“血液动力学得到调控”是指含有 FcRn 结合区的多肽在变异前和变异后的血液动力学进行比较,血液动力学朝目标方向变化。即,当目标是为了延长血液半衰期时,血液动力学的调控是指延长血液半衰期;当目的为缩短血液半衰期时,血液动力学的调控意味着使血液半衰期缩短。

[0086] 本发明中,含有 FcRn 结合区的多肽的血液动力学是否朝目标方向变化、即血液动力学是否按照目标调控,可通过例如使用小鼠、大鼠、兔、狗、猴等的动力实验来适当评价。本发明的“血液动力学的调控”更具体地说,包含对血液半衰期、平均血液停留时间、或血液清除等任何参数(ファーマコキネティクス演習による理解(南山堂))的调控。例如,使用体内动力分析软件 WinNonlin(Pharsight),按照所附说明书,通过 Noncompartmental 分析可适当评价。

[0087] 本发明中,“可暴露于表面的氨基酸”通常是指构成 FcRn 结合区的多肽的、位于多肽的表面的氨基酸。位于多肽的表面的氨基酸是其支链可与溶剂分子(通常为水分子)相接触的氨基酸,不一定是整个支链都与溶剂分子接触,支链的一部分与溶剂分子接触时,该氨基酸也是位于表面的氨基酸。本领域技术人员通过使用市售的软件进行的同源性建模等,可以制备多肽或抗体的同源模型,由此可以选择使适当的残基位于表面的氨基酸。

[0088] 本发明中,“可暴露于表面的氨基酸”没有特别限定,优选位于含有 FcRn 结合区的多肽中 FcRn 结合区以外。该 FcRn 结合区例如 Fc 区或 Fc 样区。

[0089] 本发明的含有 FcRn 结合区的多肽为 IgG 时,本发明中的改变电荷的氨基酸残基优选为 IgG 抗体的重链可变区或轻链可变区的氨基酸残基。该可变区具体有:互补决定区(CDR)、框架区(FR)等。

[0090] 本领域技术人员可以通过由同源性建模等制备的同源性模型来适当选择抗体可变区中的表面氨基酸,例如在 H 链 FR 区,可例举 H1, H3, H5, H8, H10, H12, H13, H15, H16, H19, H23, H25, H26, H39, H42, H43, H44, H46, H68, H71, H72, H73, H75, H76, H81, H82b, H83, H85, H86, H105, H108, H110, H112 为表面氨基酸,但本发明并不限于此。

[0091] H 链的 CDR 区同样可通过同源性模型选择表面氨基酸,例如 H97 几乎整个抗体暴露在表面。在 L 链的 FR 区例如 L1, L3, L7, L8, L9, L11, L12, L16, L17, L18, L20, L22, L38, L39, L41, L42, L43, L45, L46, L49, L57, L60, L63, L65, L66, L68, L69, L70, L74, L76, L77, L79, L80, L81, L85, L100, L103, L105, L106, L107, L108 作为表面氨基酸,但本发明并不限于此。L 链的 CDR 区同样可通过同源模型选择表面氨基酸。

[0092] 本发明的方法中,氨基酸残基的“变异”具体指将原有的氨基酸残基置换为其它的

氨基酸残基、使原有的氨基酸残基缺失、附加新的氨基酸残基等,优选指将原有的氨基酸残基置换为其它的氨基酸残基。即,本发明的“氨基酸残基电荷的改变”优选包括氨基酸置换。

[0093] 本发明中,含有 FeRn 结合区的多肽为 IgG 抗体时,为了实现上述“使氨基酸残基的电荷改变”的目的,例如使选自该 IgG 抗体的重链可变区中的 Kabat 编号中 10 号、12 号、23 号、39 号、43 号和 105 号氨基酸残基的至少一个氨基酸残基的电荷发生改变的方案。上述编号中所示的氨基酸残基中,该电荷被改变的氨基酸残基以外的氨基酸残基只要可实现目标血液动力学的调控即可,无需对其进行变异,也可以适当变异为具有与变异的氨基酸残基同种电荷,或者不具有电荷。

[0094] 氨基酸中已知有带有电荷的氨基酸。通常带有正电荷的氨基酸(正电荷氨基酸)有赖氨酸(K)、精氨酸(R)、组氨酸(H)。带有负电荷的氨基酸(负电荷氨基酸)已知有天冬氨酸(D)、谷氨酸(E)等。已知除此以外的氨基酸不带有电荷。

[0095] 上述“变异的氨基酸残基”优选从以下的(a)或(b)的任意一组所含的氨基酸残基中适当选择,没有特别限定。

[0096] (a) 谷氨酸(E)、天冬氨酸(D)

[0097] (b) 赖氨酸(K)、精氨酸(R)、组氨酸(H)

[0098] 原有的(变异前的)氨基酸残基已经具有电荷时,将其变异成不具有电荷的氨基酸残基,这也是本发明的优选方案之一。即,本发明的变异有:(1)由具有电荷的氨基酸置换为不具有电荷的氨基酸,(2)由具有电荷的氨基酸置换为具有与原有电荷相反的电荷的氨基酸,(3)由不具有电荷的氨基酸置换为具有电荷的氨基酸。

[0099] 本发明的方法中,优选使氨基酸残基变异,使含有 FeRn 结合区的多肽的等电点(pI)变化。通过变异导入多个氨基酸残基时,这些氨基酸残基中,可以含有少量的不带电荷的氨基酸残基。

[0100] 本发明的方法中,可进行变异的氨基酸残基的数目没有特别限定,例如,使抗体的可变区变异时,优选在不使所述抗体与抗原的结合活性降低、不提高其免疫原性、可实现调控血液动力学目标所需的、最低限度的氨基酸残基变异。

[0101] 为了不提高免疫原性,优选变异后的氨基酸序列为人序列,但本发明并不限于此。还可以向为了使等电点变化所导入的变异以外的位置引入突变,使变异后的 FR(FR1、FR2、FR3、FR4)均为人序列。如上所述,将各 FR 置换为人序列的方法在非专利文献(Ono K. 等人., Mol. Immunol. 1999 Apr ;36(6) :387-395)中有报道。为了使各 FR 的等电点变化,也可以将其变异为等电点不同的其它人 FR(例如将 FR3 与等电点低的其它的人 FR 交换)。上述人源化方法在非专利文献(Da11' AcquaWF., Methods. 2005 May ;36(1) :43-60)中有报道。

[0102] 在对少量的表面电荷进行变异未实现调控血液动力学的目标时,通过反复进行表面电荷的改变和血液动力学评价,可以获得所需要的血液动力学得到调控的、含有 FeRn 结合区的多肽。

[0103] 非专利文献 24 中,将抗 E,P-Selectin 抗体的嵌合抗体(IgG4)——嵌合 EP5C7. g4 和人源化抗体(IgG4)HuEP5C7. g4 在猕猴中的血液动力学进行比较,结果显示两者血液动力学同等。另外,非专利文献 25 中,将抗 CD154 抗体的嵌合型抗体——ch5d8 与人源化抗体 Hu5c8 在食蟹猴中血液动力学进行比较,结果显示两者血液动力学同等。非专利文献 26 中显示:嵌合抗体 cCC49 与人源化抗体 HuCC49 在小鼠中血液动力学同等。另外,在非专利文

献 27 和非专利文献 28 中,对于在小鼠中的评价,小鼠抗体与人源化抗体的血液动力学、分布显示为同等,小鼠 Fc 和人 Fc 均可与小鼠 FcRn 交叉反应,因此可以认为该嵌合抗体与该人源化抗体的血液动力学、分布同等。如这些例子所示,嵌合抗体与人源化抗体之间的血液动力学同等。即,按照非专利文献 7 等中公开的公知方法进行人源化时,与嵌合抗体比较,血液动力学同等,按照公知的方法是无法制备血液动力学得到调控的人源化抗体的。

[0104] 根据本发明的方法,在将嵌合抗体人源化时,通过使表面氨基酸变异,可以使抗体的 pI 变化,由此与嵌合抗体比较,可以制成血液动力学得到调控(即,血液半衰期延长,或血液动力学降低)的人源化抗体。用于调控血液动力学的表面氨基酸的变异可以与人源化同时进行,或者进一步使人源化抗体变异。

[0105] 非专利文献 29 中记载,使用相同人抗体的 FR 序列进行人源化得到的三种人源化抗体曲妥单抗、贝伐单抗、帕妥单抗(pertuzumab)的血液动力学大致相等。即,使用相同 FR 序列进行人源化时,血液动力学大致同等。为了调控血药浓度,除上述人源化步骤之外,根据本发明中发明的方法,通过对表面氨基酸施加变异,使抗体的 pI 变化,由此使血药浓度调控首次成为可能。

[0106] 对于由人抗体文库或生成抗体的小鼠等制备的人抗体的表面氨基酸进行变异,使抗体的 pI 改变,则与最初制备的人抗体相比,可以制备血液动力学得到调控的(即血液半衰期延长或血液动力学将低)的人抗体。

[0107] 如上所述,本发明中的“抗体”包含对上述使氨基酸残基的电荷改变的抗体进一步通过氨基酸的置换、缺失、附加和/或插入等使氨基酸序列发生变异的抗体。还包含对于通过氨基酸的置换、缺失、附加和/或插入,或者嵌合化或人源化等使氨基酸序列发生变异的抗体进一步使氨基酸残基的电荷改变的抗体。

[0108] 氨基酸的置换、缺失、附加和/或插入,以及人源化、嵌合化等氨基酸序列的变异可按照本领域所公知的方法进行。同样,以重组抗体的形式制备本发明的抗体时所利用的抗体的可变区和恒定区也可通过氨基酸的置换、缺失、附加和/或插入,或嵌合化或人源化等来使其氨基酸序列变异。

[0109] 本发明的抗体可以是小鼠抗体、人抗体、大鼠抗体、兔抗体、山羊抗体、骆驼抗体等来自任何动物的抗体。并且,可以是经变异的抗体,例如将嵌合抗体、氨基酸序列进行置换得到的人源化抗体等。还可以是结合有各种分子的抗体修饰物。

[0110] “嵌合抗体”是指将来自不同的动物的序列组合制备的抗体。例如,可以是含有小鼠抗体的重链、轻链的可变(V)区和人抗体的重链、轻链的恒定(C)区的抗体。嵌合抗体的制备是公知的,例如可以将编码抗体 V 区的 DNA 与编码人抗体 C 区的 DNA 连接,将其整合到表达载体中,导入宿主由此可获得嵌合抗体。

[0111] “人源化抗体”也称为重构人抗体,是将来自人以外的哺乳动物的抗体、例如小鼠抗体的互补决定区(CDR)置换到人抗体的 CDR 所得。鉴定 CDR 的方法是公知的(Kabat 等人., Sequence of Proteins of Immunological Interest(1987), National Institute of Health, Bethesda, Md.; Chothia 等人., Nature(1989)342:877)。另外,其常规的基因重组方法也是公知的(参照欧洲专利申请公开编号 EP125023 号公报、W096/02576 号公报)。因此,通过公知的方法,例如可以确定小鼠抗体的 CDR,获得编码该 CDR 与人抗体的框架区(FR)连接而得的抗体的 DNA,通过使用通常的表达载体所得的系统生产人源化抗体。上述

DNA 可以使用在 CDR 和 FR 两者的末端区具有重叠部分的多个寡核苷酸作为引物,通过 PCR 法合成(参照 W098/13388 号公报所述方法)。对经 CDR 连接的人抗体的 FR 进行选择,以使 CDR 形成良好的抗原结合部位。还可根据需要使抗体可变区中的 FR 的氨基酸变异,以使重构人抗体的 CDR 形成适当的抗原结合部位(Sato,K. 等人.,CancerRes. (1993) 53 :851-6)。FR 中可变异的氨基酸残基包含与抗原直接结合、或通过非共价键结合的部分(Amit 等人., Science(1986) 233 :747-53)、对于 CDR 的结构有影响或与之作用的部分(Chothia 等人., J.Mol.Biol. (1987) 196 :901-17) 以及与 VH-VL 相互作用相关的部分(EP239400 号专利公报)。

[0112] 本发明的抗体为嵌合抗体或人源化抗体时,这些抗体的 C 区优选使用来自人抗体的区。例如,H 链可以使用 C γ 1、C γ 2、C γ 3、C γ 4、L 链可以使用 C κ 、C λ 。为了改善抗体或其生产的稳定性,可以根据需要修饰人抗体 C 区。本发明中的嵌合抗体优选含有来自人以外的哺乳动物的抗体的可变区和来自人抗体的恒定区。人源化抗体优选含有来自人以外的哺乳动物的抗体的 CDR、以及来自人抗体的 FR 和 C 区。来自人抗体的恒定区是 IgG(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgM、IgA、IgD 和 IgE 等的同种型具有固有氨基酸序列。本发明的人源化抗体中使用的恒定区可以是属于任意同种型的抗体的恒定区。优选使用人 IgG 的恒定区,但并不限于此。另外,在人源化抗体中所利用的来自人抗体的 FR 也没有特别限定,可以是属于任意同种型的抗体。

[0113] 本发明的嵌合抗体和人源化抗体的可变区和恒定区在保证可显示原有抗体的结合特异性的条件下,可以通过缺失、置换、插入和 / 或附加等进行变异。

[0114] 利用来自人的序列得到的嵌合抗体和人源化抗体中,在人体内的免疫原性降低,因此可根据治疗目的等给予人。

[0115] 本发明的方法中,编码导入突变前的抗体(本说明书中可简称为“本发明的抗体”)的 H 链或 L 链的基因可使用已知的序列,还可以按照本领域公知的方法获得。例如可以从抗体文库中获得,还可以从生产单克隆抗体的杂交瘤中克隆编码抗体的基因来获得。

[0116] 关于抗体文库,已公知很多抗体文库,抗体文库的制备方法也是公知的,因此,本领域人员可以获得适当的抗体文库。例如对于抗体噬菌体文库可以参照 Clackson 等人., Nature 1991,352 :624-8;Marks 等人., J.Mol.Biol.1991,222 :581-97;Waterhouses 等人., Nucleic AcidsRes.1993,21 :2265-6;Griffiths 等人., EMBO J.1994,13 :3245-60;Vaughan 等人., Nature Biotechnology 1996,14 :309-14;以及日本特表平 10-504970 号公报等文献。其它还可以使用将真核细胞制成文库的方法(W095/15393 号说明书)或核糖体展示法等公知的方法。并且还已知由使用人抗体文库、通过淘选获得人抗体的技术。例如,可以将人抗体的可变区制成单链抗体(scFv),通过噬菌体展示法在噬菌体的表面表达,选择与抗原结合的噬菌体。对所选择的噬菌体的基因进行分析,则可以确定编码与抗原结合的人抗体的可变区的 DNA 序列。如果了解了与抗原结合的 scFv 的 DNA 序列,则可以以该序列为基础制备适当的表达载体,获得人抗体。这些方法是已知的,可以参考 W092/01047、W092/20791、W093/06213、W093/11236、W093/19172、W095/01438、W095/15388。

[0117] 由杂交瘤获得编码抗体的基因的方法基本上可以使用公知技术,可如下获得:使用所需抗原或表达所需抗原的细胞作为致敏抗原,将其按照常规的免疫方法进行免疫,将所得免疫细胞通过通常的细胞融合与公知的亲代细胞融合,通过通常的筛选法筛选单克隆

的抗体生成细胞（杂交瘤），使用反转录酶，从所得杂交瘤的 mRNA 中合成抗体的可变区（V 区）的 cDNA，将其与编码抗体恒定区（C 区）的 DNA 连接。

[0118] 更具体地说，用于获得编码上述 H 链和 L 链的抗体基因的致敏抗原包含具有免疫原性的完全抗原和譬如含有不显示免疫原性的半抗原等的不完全抗原，但并不限于此。例如可以使用目标蛋白质的全长蛋白或部分肽等。除此之外还已知由多糖类、核酸、脂质等构成的物质可以作为抗原，本发明的抗体的抗原没有特别限定。抗原的制备可按照本领域公知的方法进行，例如可按照使用杆状病毒的方法（例如 W098/46777 等）进行。杂交瘤的制备例如可按照 Milstein 等人（G. Kohler 和 C. Milstein, *Methods Enzymol.* 1981, 73 :3-46）的方法等进行。抗原的免疫原性低时，可以与白蛋白等具有免疫原性的巨大分子结合，进行免疫。还可根据需要使抗原与其它分子结合，制成可溶性抗原。使用受体等的跨膜分子作为抗原时，可以使用受体胞外区部分作为片段，或使用在细胞表面上表达跨膜分子的细胞作为免疫原。

[0119] 抗体生成细胞可使用上述的适当致敏抗原免疫动物获得。或者将可生成抗体的淋巴细胞进行体外免疫，制成抗体生成细胞。被免疫的动物可使用各种哺乳动物，通常使用啮齿目、兔目、灵长目动物。例如，小鼠、大鼠、仓鼠等啮齿目动物。兔等兔目动物。食蟹猴、猕猴、狒狒、黑猩猩等的灵长目动物。除此之外，还包括具有人抗体基因的所有组成成分的转基因动物，使用上述动物也可以获得人抗体（参照 W096/34096 ;Mendez 等人. , *Nat. Genet.* 1997, 15 :146-56）。例如在体外用所需抗原或表达所需抗原的细胞致敏人淋巴细胞，将致敏淋巴细胞与人骨髓瘤细胞，例如 U266 融合，以此作为使用上述转基因动物的替代方式，也可以获得与抗原具有结合活性的所需的人抗体（参照日本特公平 1-59878 号）。另外，具有人抗体基因的所有组成成分的转基因动物用所需抗原免疫，则可以获得所需的人抗体（参照 W093/1227、W092/03918、W094/02602、W096/34096 和 W096/33735）。

[0120] 动物的免疫例如可如下进行：用磷酸盐缓冲液（PBS）或生理盐水等将致敏抗原稀释并悬浮，根据需要混合佐剂进行乳化，然后注射到动物的腹腔内或皮下。然后优选每隔 4-21 天给予数次与氟氏不完全佐剂混合的致敏抗原。抗体生成的确认可通过常用的方法测定动物血清中的目标抗体效价来进行。

[0121] 杂交瘤可以用常用的融合剂（例如聚乙二醇），将从用所需抗原免疫了的动物或由淋巴细胞中得到的抗体生成细胞与骨髓瘤细胞融合制备（Goding, *Monoclonal Antibodies :Principles and Practice*, Academic Press, 1986, 59-103）。还可根据需要培养杂交瘤细胞，使其增殖，通过免疫沉淀、放射免疫分析（RIA）、酶联免疫吸附分析（ELISA）等公知的分析方法测定由该杂交瘤生成的抗体的结合特异性。然后根据需要测定了目标特异性、亲和性或活性的生成抗体的杂交瘤通过有限稀释法等方法进行亚克隆。

[0122] 接着，使用可与抗体特异性结合的探针（例如与编码抗体恒定区的序列互补的寡核苷酸等），从杂交瘤或抗体生成细胞（致敏淋巴细胞等）中克隆编码被选择的抗体的基因。还可以通过 RT-PCR 从 mRNA 中克隆。免疫球蛋白分为 IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM 五个不同的类。并且这些类又分为几种亚类（同种型）（例如 IgG-1、IgG-2、IgG-3 和 IgG-4；IgA-1 和 IgA-2 等）。本发明中，在抗体的制备中使用的 H 链和 L 链可以来自属于上述任意的类和亚类的抗体，没有特别限定，特别优选 IgG。

[0123] 这里，可以通过基因工程的方法将使编码 H 链和 L 链的基因变异。例如对于小鼠

抗体、大鼠抗体、兔抗体、仓鼠抗体、绵羊抗体、骆驼抗体等抗体,为了降低其与人的异种免疫原性等,可以适当制备人工变异的基因重组型抗体、例如嵌合抗体、人源化抗体等。嵌合抗体是含有人以外的哺乳动物例如小鼠抗体的 H 链、L 链的可变区和人抗体的 H 链、L 链的恒定区的抗体,可如下获得:将编码小鼠抗体可变区的 DNA 与编码人抗体恒定区的 DNA 连接,将其整合到表达载体中,导入宿主并生产。人源化抗体也称为重构人抗体,如下合成:设计成其末端部与下述 DNA 序列具有重叠部分的多个寡核苷酸,通过 PCR 法合成与小鼠之类的、人以外的哺乳动物的抗体的互补决定区(CDR)相连的 DNA 序列。将所得 DNA 与编码人抗体恒定区的 DNA 连接,接着整合到表达载体中,将其导入宿主并生成抗体(参照 EP239400, W096/02576)。选择经由 CDR 连接的人抗体的 FR,以使得互补决定区形成良好的抗原结合部位。还可以根据需要,置换抗体的可变区的框架区的氨基酸,使重构人抗体的互补决定区形成适当的抗原结合部位(K. Sato 等人., Cancer Res. 1993, 53:851-856)。

[0124] 除上述人源化之外,还可以为了改善与抗原的结合性等抗体的生物学特性对抗体实施变异。本发明的变异可通过位点定向诱变(例如参照 Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488)、PCR 突变、盒突变法等方法进行。通常,生物学特性得到改善的抗体突变体与原有的抗体的可变区的氨基酸序列具有 70%或以上、更优选 80%以上、进一步优选 90%以上(例如 95%以上、97%、98%、99%等)的氨基酸序列同源性和/或相似性。本说明书中,序列的同源性和/或相似性是通过序列比对以及根据需要导入缺口使序列同源性值获得最大化后,与原有的抗体残基相同(相同残基)或相似(通常根据氨基酸支链的特性被分类为同一组的氨基酸残基)的氨基酸残基的比例定义的。通常,天然的氨基酸残基根据其支链的性质被分类为(1)疏水性:丙氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸和亮氨酸;(2)中性亲水性:天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、苏氨酸和丝氨酸;(3)酸性:天冬氨酸和谷氨酸;(4)碱性:精氨酸、组氨酸和赖氨酸;(5)对链的取向有影响的残基:甘氨酸和脯氨酸;以及(6)芳族性:酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸。

[0125] 通常,存在于 H 链和 L 链可变区中的全部中,6 个互补决定区(超可变部;CDR)相互作用,形成抗体的抗原结合部位。已知与含有全部结合部位的情况相比,仅一个可变区的亲和性较低,但是其仍具有识别抗原并结合的能力。因此,对于本发明的编码 H 链和 L 链的抗体基因,只要该基因所编码的多肽可以保持与所需抗原的结合性即可,可以编码含有 H 链和 L 链各抗原结合部位的片段部分。

[0126] 重链可变区如上所述,通常由 3 个 CDR 区和 4 个 FR 区构成。本发明的优选方案中,进行“变异”的氨基酸残基可以在位于 CDR 区或 FR 区的氨基酸残基中适当选择。通常 CDR 区的氨基酸残基的变异可以使其与抗原的结合能力降低。因此,本发明中,进行“变异”的氨基酸残基虽然没有特别限定,但优选从位于 FR 区的氨基酸残基中适当选择。对于 CDR,如果确认即使进行了变异,其结合能力也不降低,则可以选择该位置。

[0127] 在人或小鼠等生物中,本领域技术人员可以利用公共数据库等适当获得可用作抗体的可变区的 FR 的序列。

[0128] 本发明进一步涉及通过本发明的方法使血液动力学得到调控的、含有 FcRn 结合区的多肽。

[0129] 本发明的优选方案中,提供通过本发明的方法使血液动力学得到调控的人源化抗体。该人源化抗体例如是该人源化抗体含有来自人以外的动物的互补决定区(CDR)、来自人

的框架区 (FR) 和人恒定区, 其中, 在 CDR 或 FR 中, 可暴露在抗体表面的至少一个氨基酸残基是与野生型 CDR 或 FR 的相应位置上的氨基酸残基相比具有不同电荷的氨基酸残基, 与可变区来自所述人以外的动物的抗体、且具有相同恒定区的嵌合抗体相比, 该人源化抗体的血液动力学得到调控。

[0130] 上述人恒定区优选指含有野生型人 Fc 区的区域, 可以是变异的 Fc。

[0131] 本发明还涉及含有 FcRn 结合区的多肽的制备方法, 其中, 所述的多肽血液动力学已通过本发明的方法得到调控。即, 本发明提供血液动力学得到调控的、含有 FcRn 结合区的多肽的制备方法。并且, 由本发明的方法制备的含有 FcRn 结合区的多肽也包含在本发明中。

[0132] 本发明的制备方法的优选方案是血液动力学得到调控的、含有 FcRn 结合区的多肽的制备方法, 该方法包含以下步骤: (a) 为了使可暴露于含有 FcRn 结合区的多肽表面的至少一个氨基酸残基的电荷发生改变, 对编码含有该氨基酸残基的多肽的核酸进行变异; (b) 培养宿主细胞, 以使该核酸表达; (c) 从宿主细胞培养物中回收含有 FcRn 结合区的多肽。

[0133] 本发明的上述方法中, “使核酸变异” 是指使核酸变异, 以使其对应于通过本发明的“变异”而导入的氨基酸残基。更具体地说, 对于编码原有的 (变异前) 氨基酸残基的核酸, 变异为编码通过变异导入的氨基酸残基的核酸。通常是指对于原有的核酸进行至少一个碱基的插入、缺失或置换等基因操作或突变处理, 形成编码目标氨基酸残基的密码子。即, 编码原有氨基酸残基的密码子置换为编码通过变异导入的氨基酸残基的密码子。上述核酸的变异可使用本领域公知的技术、例如位点定向诱变法、PCR 突变导入法等适当实施。

[0134] 本发明的核酸通常是担载 (插入) 于适当的载体上, 导入到宿主细胞中。该载体只要可稳定保有插入的核酸即可, 没有特别限定, 例如, 宿主如果使用大肠杆菌, 则克隆用的载体优选 pBluescript 载体 (Stratagene 制备) 等, 还可利用市场销售的各种载体。为了生产本发明的多肽而使用载体时, 优选使用表达载体。表达载体只要是在试管内、大肠杆菌内、培养细胞内、生物个体内表达多肽的载体即可, 没有特别限定, 例如, 如果在试管内表达则优选 pBEST 载体 (プロメガ制备), 如果在大肠杆菌中表达则优选 pEP 载体 (Invitrogen 制备), 如果在培养细胞中表达则优选 pME18S-SL3 载体 (GenBank 登录号 No. AB009864), 如果在生物个体中表达则优选 pME18S 载体 (Mol Cell Biol. 8:466-472(1988)) 等。本发明的 DNA 向载体中的插入可通过常规方法, 例如可通过使用限制酶切位点的连接酶反应进行 (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel 等人. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4-11.11)。

[0135] 上述宿主细胞没有特别限定, 可以根据目的使用各种宿主细胞。用于表达多肽的细胞, 例如有细菌细胞 (例如链球菌、葡萄球菌、大肠杆菌、链霉菌、枯草杆菌)、真菌细胞 (例如酵母、曲霉)、昆虫细胞 (例如黑腹果蝇 S2、夜蛾 SF9)、动物细胞 (例如 CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、HEK293、Bowes 黑素瘤细胞) 和植物细胞。将载体导入宿主细胞, 例如可通过磷酸钙沉淀法、电脉冲穿孔法 (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel 等人. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 9.1-9.9)、脂转染法、显微注射法等公知的方法进行。

[0136] 为了使在宿主细胞中表达的多肽在内质网的内腔中、周质中、或者细胞外的环境

中分泌,可以将适当的分泌信号整合到目标多肽中。这些信号对于目标多肽可以是内源性,也可以是外源的信号。

[0137] 上述制备方法中,对于多肽的回收,当本发明的多肽分泌到培养基中时则回收培养基。本发明的多肽在细胞内产生时,首先溶解该细胞,然后回收多肽。

[0138] 从重组细胞培养物中回收本发明的多肽并纯化时,可以采用包含磷酸铵或乙醇沉淀、酸提取、阴离子或阳离子交换层析、磷酸纤维素层析、疏水性相互作用层析、亲和层析、羟基磷灰石层析和凝集素层析等公知的方法。

[0139] 本发明还涉及含有通过本发明的方法使血液动力学得到调控的、含有 FcRn 结合区的多肽(例如 IgG 抗体)以及可药用载体的组合物(药物)。

[0140] 本发明中,药物组合物通常是指用于疾病的治疗或预防、或者检查、诊断的药物。

[0141] 本发明的药物组合物可以按照本领域所公知的方法制成制剂。例如,可以以与水或其它的药学可接受的液体形成的无菌性溶液或混悬剂的注射剂形式非口服使用。例如,可以与药理学可接受的载体或介质、具体来说灭菌水或生理盐水、植物油、乳化剂、悬浮剂、表面活性剂、稳定剂、香味剂、赋形剂、载体、防腐剂、粘结剂等适当组合,以公认的制药中所要求的单位用量形式混合,制成制剂。这些制剂中的有效分量设定为可获得所指示的范围的适当的容量。

[0142] 用于注射的灭菌组合物可使用注射用蒸馏水之类的载体,按照通常的制剂实施进行配制。

[0143] 注射用的水溶液例如有:含有生理盐水、葡萄糖或含有其它辅助试剂(例如 D-山梨醇、D-甘露糖、D-甘露糖醇、氯化钠)的等渗液。也可以结合使用适当的溶解助剂例如醇(乙醇等)、多元醇(丙二醇、聚乙二醇等)、非离子性表面活性剂(聚山梨醇 80(TM)、HCO-50 等)。

[0144] 油性液体有芝麻油、大豆油,溶解助剂可以结合使用苯甲酸苄酯和/或苄醇。还可以配合缓冲剂(例如磷酸盐缓冲液和乙酸钠缓冲液)、止痛剂(例如盐酸普鲁卡因)、稳定剂(例如苄醇和苯酚)、抗氧化剂。制备的注射液通常填充在适当的安瓿瓶中。

[0145] 本发明的药物组合物优选非口服给予。例如可以制成注射剂型、经鼻给予剂型、经肺给予剂型、透皮给予型的组合物。例如通过静脉内注射、肌肉注射、腹腔内注射、皮下注射等可以全身或局部给予。

[0146] 给予方法可根据患者的年龄、症状适当选择。含有抗体或编码抗体的多核苷酸的药物组合物的给予量例如可设定为每次按照 1 公斤体重为 0.0001mg-1000mg 的范围。或者例如每位患者可以是 0.001-1000000mg 的给予量,本发明并不限于这些数值。给予量和给予方法根据患者的体重、年龄、症状等变化,本领域技术人员可考虑这些条件适当设定给予量和给予方法。

[0147] 本发明还提供编码下述多肽的核酸,其中,所述多肽为通过本发明的方法使血液动力学得到调控的、含有 FcRn 结合区的多肽(例如人源化抗体等)。并且带有该核酸的载体也包含在本发明中。

[0148] 本发明进一步提供具有上述核酸的宿主细胞。该宿主细胞没有特别限定,例如有大肠杆菌或各种动物细胞等。宿主细胞例如可以以用于本发明的抗体或多肽的制备或表达的生产体系的形式使用。用于制备多肽的生产体系中有体外和体内的生产体系。体外的生

产体系有使用真核细胞的生产体系和使用原核细胞的生产体系。

[0149] 可作为宿主细胞使用的真核细胞例如有动物细胞、植物细胞、真菌细胞。动物细胞例如有哺乳类细胞,例如 CHO(J. Exp. Med. (1995) 108, 945)、COS、HEK293、3T3、骨髓瘤、BHK(幼仓鼠肾细胞)、HeLa、Vero 等,两栖类细胞例如非洲爪蟾卵细胞(Valle, 等人., Nature(1981) 291 :338-340)、以及昆虫细胞例如 Sf9、Sf21、Tn5。本发明的抗体的表达中,优选采用 CHO-DG44、CHO-DX11B、COS7 细胞、HEK293 细胞、BHK 细胞。动物细胞中,为了大量表达,特别优选 CHO 细胞。载体对宿主细胞的导入例如可通过磷酸钙法、DEAE 葡聚糖法、使用阳离子性脂质体 DOTAP(Boehringer Mannheim 制备)的方法、电穿孔法、脂转染等方法进行。

[0150] 植物细胞例如已知有来自烟草(*Nicotiana tabacum*)的细胞和浮萍(*Lemna minor*)作为蛋白质生产体系,通过将该细胞进行愈伤组织培养可以生产本发明的抗体。真菌细胞公知有使用酵母例如酵母属(*Saccharomyces*)的细胞(酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母(*Saccharomyces pombe*)等);和丝状菌例如曲霉属(*Aspergillus*)的细胞(黑曲霉(*Aspergillus niger*)等)的蛋白质表达体系,可用作本发明的抗体生成的宿主。

[0151] 使用原核细胞时,有使用细菌细胞的生产体系。细菌细胞除上述大肠杆菌之外,还已知使用枯草杆菌的生产体系,也可用于本发明的抗体生成。

[0152] 使用本发明的宿主细胞生产抗体时,可以对用含有编码本发明抗体的多核苷酸的表达载体转化的宿主细胞进行培养,使多核苷酸表达。培养可按照公知的方法进行。例如以动物细胞为宿主时,培养液例如可使用 DMEM、MEM、RPMI1640、IMDM。此时,可以结合使用 FBS、胎牛血清(FCS)等血清补液,通过无血清培养进行细胞培养。培养时的 pH 优选约 6-8。培养通常在约 30-40℃ 下进行约 15-200 小时,可以根据需要进行培养基的更换、通气、搅拌。

[0153] 体内生产多肽的体系,例如有使用动物的生产系统或使用植物的生产系统。向这些动物或植物中导入目标多核苷酸,在动物或植物的体内生成多肽并回收。本发明的“宿主”包含这些动物、植物。

[0154] 使用动物时,有使用哺乳类动物、昆虫的生产体系。哺乳类动物可以使用山羊、猪、绵羊、小鼠、牛等(Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications(1993))。使用哺乳类动物时,可以使用转基因动物。

[0155] 例如将编码本发明的抗体的多核苷酸和编码如山羊 β 酪蛋白等,生产乳汁中特有的多肽的基因以融合基因的形式制备。接着,将含有该融合基因的多核苷酸片段注入到山羊的胚胎中,将该胚胎移植到雌山羊体内。从接受了胚胎的山羊所生产的转基因山羊、或其子代所生产的乳汁中可以获得目标抗体。为了使含有由转基因山羊生产的抗体的乳汁量增加,可以对转基因山羊适当给予激素(Ebert 等人., Bio/Technology(1994) 12 : 699-702)。

[0156] 生产本发明的抗体的昆虫例如可以使用蚕。使用蚕时,使插入了编码目标抗体的多核苷酸的杆状病毒感染蚕,由此可从蚕的体液中获得目标抗体(Susumu 等人., Nature(1985) 315 :592-594)。

[0157] 将植物用于本发明的抗体生产时,例如可以使用烟草。使用烟草时,将编码目标

抗体的多核苷酸插入到植物表达用的载体例如 pMON530 中,将该载体导入到根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 等的细菌中。将该细菌感染烟草、例如烟草 (*Nicotiana tabacum*),可由该烟叶获得所需抗体 (Ma 等人., *Eur. J. Immunol.* (1994) 24 :131-8)。将同样的细菌感染浮萍,进行克隆后可由浮萍的细胞中获得所需抗体 (Cox K. M. 等人., *Nat. Biotechnol.* 2006 Dec ;24(12) :1591-1597)。

[0158] 上述得到的抗体可从宿主细胞内或细胞外(培养基、乳汁等)中分离,纯化为基本上纯的、均匀的抗体。抗体的分离、纯化可以使用通常在多肽的纯化中使用的分离、纯化方法,并没有特别的限定。例如可以将层析柱、过滤、超滤、盐析、溶剂沉淀、溶剂提取、蒸馏、免疫沉淀、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电聚焦电泳法、透析、重结晶等适当选择、组合,分离并纯化抗体。

[0159] 层析例如有:亲和层析、离子交换层析、疏水性层析、凝胶过滤、反相层析、吸附层析等 (*Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual*. Ed Daniel R. Marshak 等人., (1996) Cold Spring Harbor Laboratory Press)。这些层析可以使用液相层析例如 HPLC、FPLC 等液相层析进行。亲和层析中使用的柱有蛋白 A 柱、蛋白 G 柱。例如使用蛋白 A 的柱有:Hyper D、POROS、Sephacrose F.F. (Pharmacia) 等。

[0160] 还可以根据需要,在抗体的纯化前或纯化后使适当的蛋白质修饰酶作用,由此可以施加任意的修饰,或可部分地除去肽。蛋白质修饰酶例如可使用胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、赖氨酰肽链内切酶、蛋白激酶、葡糖苷酶等。

[0161] 如上所述,包含培养本发明的宿主细胞、由该培养物中回收下述多肽的步骤的多肽的制备方法也是本发明的优选方案之一,所述多肽的血液动力学得到调控、且含有 FcRn 结合区。

[0162] 本说明书中引用的所有现有技术文献均作为参照援引到本说明书中。

实施例

[0163] 以下通过实施例具体说明本发明,但本发明并不受这些实施例的限制。

[0164] [实施例 1] 双特异性抗体的人源化

[0165] 在日本特愿 2005-112514 中,对于缩短凝血时间最为有效的、含有抗 Factor IXa 抗体 A69-VH、抗 Factor X 抗体 B26-VH、杂合 L 链 (BBA) 的组合的双特异性抗体如下进行人源化。

[0166] 1-1 人抗体的同源性检索

[0167] 由一般公开的 Kabat 数据库 (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/kabat/>) 和 IMGT 数据库 (<http://imgt.cines.fr/>) 获得人抗体氨基酸序列数据,使用构建的数据库,对小鼠 A69-H 链可变区 (氨基酸序列:SEQ ID NO. 15)、小鼠 B26-H 链可变区 (氨基酸序列:SEQ ID NO. 16)、小鼠 BBA-L 链可变区 (氨基酸序列:SEQ ID NO. 17) 分别进行同源性检索。结果可以确认与以下所示人抗体序列具有高同源性,可用作人源化抗体的框架区 (以下称为 FR)。

[0168] (1) A69-H 链可变区:KABATID-000064 (Kabat 数据库)

[0169] (Kipps 等人., *J. Clin. Invest.* 1991 ;87 :2087-2096)

[0170] (2)B26-H 链可变区 :EMBL 登录号 AB063872 (IMGT 数据库)

[0171] (未公开数据)

[0172] (3)BBA-L 链可变区 :KABATID-024300 (Kabat 数据库)

[0173] (Welschof 等人., J. Immunol. Method. 1995 ;179 :203-214)

[0174] 将各小鼠抗体的互补决定区 (以下称为 CDR) 移植到 (1)-(3) 的人抗体的 FR, 制备人源化抗体。

[0175] 使用 NCBI 中一般公开的同源性检索网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), 检索与 (4)-(6) 的人抗体同源性高的人抗体分泌信号序列。使用检索得到的、以下所示的分泌信号序列。

[0176] (4)A69-H 链可变区 :Genbank 登录号 AF062257。

[0177] (5)B26-H 链可变区 :Genbank 登录号 AAC18248。

[0178] (6)BBA-L 链可变区 :Genbank 登录号 AAA59100。

[0179] 1-2 人源化抗体基因表达载体的构建

[0180] 相应于编码由分泌信号序列至抗体可变区的氨基酸序列的碱基序列中, 相互交叠地制备 12 条 50 个碱基左右的合成寡 DNA, 使其 3' 末端一侧有约 20 个碱基左右可退火。合成寡 DNA 设计成在 5' 末端一侧编码人序列, 在 3' 末端一侧编码小鼠序列, 或者全部碱基编码人序列。并且, 在抗体可变区基因的 5' 末端退火且具有 XhoI 切割序列的引物, 和在抗体可变区基因的 3' 末端退火且具有 SfiI 切割序列、并编码内含子序列的 5' 末端序列的引物。

[0181] 将各 1 μ L 制备成 2.5 μ M 的合成寡 DNA 混合, 加入 1 $\times$ TakaRa ExTaq 缓冲液、0.4mM dNTPs、0.5 单位 TaKaRa Ex Taq (均为宝酒造制备), 制备成 48 μ L 反应液。在 94 $^{\circ}$ C 下保温 5 分钟后, 将含有 94 $^{\circ}$ C 2 分钟、55 $^{\circ}$ C 2 分钟、72 $^{\circ}$ C 2 分钟的反应进行 2 个循环, 实施各合成寡 DNA 的装配和链延伸反应。接着, 添加 1 μ L 在抗体基因的 5' 末端和 3' 末端退火的引物 (各 10 μ M), 将含有 94 $^{\circ}$ C 30 秒、50 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 1 分钟的反应进行 35 个循环, 在 72 $^{\circ}$ C 反应 5 分钟, 扩增抗体可变区基因。PCR 后, 将全部反应液用于 1% 琼脂糖凝胶电泳。使用 QIA quick 凝胶纯化试剂盒 (QIAGEN), 按照所附说明书的方法纯化目标大小 (约 400bp) 的扩增片段, 用 30 μ L 灭菌水洗脱。使用 pGEM-T Easy 载体系统 (Promega), 按照所附说明书的方法对该片段进行克隆。各 DNA 片段的碱基序列是使用 BigDye 终止子循环测序试剂盒 (Applied Biosystems), 通过 DNA 测序仪 ABI PRISM 3730xL DNA 测序仪或 ABI PRISM 3700 DNA 测序仪 (Applied Biosystems), 按照所附说明书的方法确定。

[0182] 将确认插入了正确的人源化抗体可变区基因序列的 H 链可变区片段的质粒用 XhoI 和 SfiI 消化、将确认插入了正确的人源化抗体可变区基因序列的 L 链可变区片段的质粒用 EcoRI 消化, 然后将反应液用于 1% 琼脂糖凝胶电泳。使用 QIAquick 凝胶纯化试剂盒 (QIAGEN), 按照所附说明书的方法纯化目标大小 (约 400bp) 的 DNA 片段, 用 30 μ L 灭菌水洗脱。然后如下制备动物细胞用表达载体。为了使 H 链为异源重组的 IgG4 优先表达, 参考 IgG1 的 knobs-into-hole 技术 (MerchantAM 等人., Nature Biotechnology, 1998 年, Vol. 16, p. 677-681), 使用其 CH3 部分的氨基酸置换的 IgG4。并为了促进 H 链的二聚体形成, 向较链导入氨基酸置换 (-ppcpScp- $\rightarrow$ -ppcpPcp-)。在具有鸡 β 肌动蛋白启动子的 pCAGGS (Niwa 等人., Gene, 1991 年, Vol. 108, 193-199 页) 中整合了经 Y39C、T366W 置换的

恒定区基因,再向由此所得表达载体中插入人源化 A69H 链可变区抗体基因片段,制备人源化 A69H 链表达载体。另外,在 pCAGGS 中整合经 E356C、T366S、L368A、Y407V 置换的恒定区基因,再向由此所得表达载体中插入人源化 B26H 链可变区抗体基因片段,制备人源化 B26H 链表达载体。另外,在 pCAGGS 中插入了野生型抗体 L 链恒定区得到的质粒 (pCAG-g κ DNA) 用 EcoRI 消化,制备插入了人源化 BBA L 链可变区抗体基因片段的表达载体。连接反应使用 Rapid DNA 连接试剂盒 (Roche Diagnostics),转化大肠杆菌 DH5 α 株 (东洋纺绩制备)。

[0183] 1-3 人源化双特异性抗体的表达

[0184] 采用以下方法进行人源化双特异性抗体的表达。将来自人胎儿肾癌细胞的 HEK293H 株 (Invitrogen) 悬浮于含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基 (Invitrogen) 中,以 $5-6 \times 10^5$ 个 /mL 的细胞密度、以 10mL 接种于粘着细胞用培养皿 (直径 10cm, CORNING) 的各皿中,在 CO₂ 培养箱 (37°C、5% CO₂) 内培养一昼夜,然后吸除培养基,添加 6.9mL 含有 1% 胎牛血清 (Invitrogen) 的 CHO-S-SFM-II (Invitrogen) 培养基。将在 1-2 中制备的质粒 DNA 混合液 (合计 13.8 μ g) 与 20.7 μ L 1 μ g/mL 聚氮丙啶 (Polysciences Inc.) 和 690 μ L CHO-S-SFM-II 培养基混合,在室温下静置 10 分钟,将其加入到各培养皿的细胞中,在 CO₂ 培养箱 (37°C、5% CO₂) 内培养 4-5 小时。然后添加 6.9mL 含有 1% 胎牛血清 (Invitrogen) 的 CHO-S-SFM-II (Invitrogen) 培养基,在 CO₂ 培养箱内培养 3 天。回收培养上清,然后离心 (约 2000g, 5 分钟,室温) 除去细胞,进一步过 0.22 μ m 滤器 MILLEX^(R)-GV (Millipore) 进行灭菌,该样品在使用之前在 4°C 下保存。

[0185] 1-4 人源化双特异性抗体的纯化

[0186] 向按照实施例 1-2 所述方法得到的培养上清中添加 100 μ L 的 rProtein A SepharoseTM Fast Flow (Amersham Biosciences),在 4°C 下颠倒混合 4 小时以上。将该溶液转移至 0.22 μ m 的滤器杯 Ultrafree^(R)-MC (Millipore),用 500 μ L 含有 0.01% 吐温^(R)20 的 TBS 洗涤 3 次,将 100 μ L 含有 0.01% 吐温^(R)20 的 50mM 乙酸钠溶液悬浮于 rrProtein A SepharoseTM 树脂中,使 pH 为 3.3,静置 2 分钟,然后使抗体溶出。立即加入 6.7 μ L 的 1.5M Tris-HCl pH 7.8 进行中和。

[0187] 1-5 人源化双特异性抗体的浓度定量

[0188] 如下所示按照两种方法进行测定。

[0189] 用包被缓冲液将山羊抗人 IgG (Biosource International) 制备成 1 μ g/mL,固定于 Nunc-Immuno 板上 (Nunc)。用稀释缓冲液 (D.B.) 进行封闭,然后添加用 D.B. 适当稀释的培养上清样品。同样地添加由 2000ng/mL 以 3 倍系列、用 D.B. 稀释为 11 个梯度的人 IgG4 (人源化抗 TF 抗体,参照 WO 99/51743),作为计算抗体浓度的标准品。洗涤 3 次后,使其与山羊抗人 IgG、碱性磷酸酶反应 (Biosource International)。洗涤 5 次后,以 Sigma 104^(R) 磷酸酶底物 (Sigma-Aldrich) 作为底物进行显色,通过吸光度读数仪型号 3550 (Bio-Rad Laboratories)、以 665nm 作为参照波长测定 405nm 的吸光度。使用微量板 Manager III (Bio-Rad Laboratories) 软件,由标准品的校正曲线计算培养上清中人 IgG 的浓度。

[0190] 还使用 Biacore 1000 或 Biacore 11 (BIACORE),使用固定有蛋白 A 的传感芯片 CM5 (BIACORE) 进行定量。具体来说,按照生产商的说明书,将用 10mM 乙酸钠水溶液 (pH 4.0, BIACORE) 稀释为 50 μ g/mL 的蛋白 A (SIGMA) 溶液以 5 μ L/分钟在活化的传感芯片反应

30 分钟,然后实施封闭操作,制备固定有蛋白 A 的传感芯片。使用该传感芯片、用 Biacore 1000 (BIACORE),测定培养上清和纯化品的浓度。传感芯片的固定和浓度测定是使用 HBS-EP 缓冲液 (BIACORE)。浓度测定时的标准品使用由 4000ng/mL 按照 2 倍系列用 HBS-EP 缓冲液稀释为 6 个梯度的人源化 IgG4 抗体 (人源化抗组织因子抗体,参照 W099/51743)。

[0191] 1-6 人源化双特异性抗体的凝血活性评价

[0192] 为了明确双特异性抗体对血友病 A 血液的凝固能力是否有改变,研究该抗体对于使用缺少因子 VIII 血浆的活化部分促凝血酶原激酶时间 (APTT) 的影响。将 50 μ L 各种浓度的抗体溶液、50 μ L 缺少因子 VIII 血浆 (Biomerieux) 和 50 μ L APTT 试剂 (Dade Behring) 的混合液在 37℃ 下加温 3 分钟。凝固反应是通过将 50 μ L 20mM 的 CaCl_2 (DadeBehring) 加入到该混合液中引发。通过连接有 CR-A (Amelung) 的 KC10A (Amelung) 测定至凝固所需时间。

[0193] 以缺少因子 VIII 血浆的凝固时间为 0%,以正常血浆的凝固时间为 100%,制作校正曲线,使用该校正曲线,由添加了双特异性抗体时的凝固时间计算双特异性抗体的因子 VIII 样活性 (%)。

[0194] 1-7 保持凝血活性的人源化双特异性抗体的获得

[0195] 在上述凝血活性评价中,对于凝血能力低的人源化双特异性抗体,为了使其活性升高而使人源化抗体 FR 的氨基酸变异。具体来说,使用 QuikChange 位点定向诱变试剂盒 (Stratagene),按照所附说明书记载的方法向人源化抗体可变区导入突变。将确认插入了正确的人源化抗体可变区基因序列的 H 链可变区片段的质粒用 XhoI 和 SfiI 消化、将确认插入了正确的人源化抗体可变区基因序列的 L 链可变区片段的质粒用 EcoRI 消化,然后将反应液供给 1% 琼脂糖凝胶电泳。使用 QIAquick 凝胶纯化试剂盒 (QIAGEN),按照所附说明书记载的方法纯化目标大小 (约 400bp) 的 DNA 片段,用 30 μ L 灭菌水洗脱。然后按照实施例 1-2 所示方法制备动物细胞用表达质粒。按照实施例 1-3、1-4、1-5 所示方法制备人源化双特异性抗体,按照实施例 1-6 所示方法评价凝血活性。

[0196] 反复进行 FR 序列的氨基酸变异和凝血能力的评价,获得与嵌合双特异性抗体 (A69/B26/BBA) 具有同等活性的人源化双特异性抗体 (人源化 A69 (hA69a) / 人源化 B26 (hB26-F123e4) / 人源化 BBA (hAL-F123j4)) (图 1)。将各抗体可变区序列表示为以下的序列号 (SEQ ID NO)。

[0197] (1) 人源化 A69 抗体 VH (hA69a) SEQ ID NO. 1 (碱基序列)、SEQ ID NO. 2 (氨基酸序列)

[0198] (2) 人源化 B26 抗体 VH (hB26-F123e4) SEQ ID NO. 3 (碱基序列)、SEQ ID NO. 4 (氨基酸序列)

[0199] (3) 人源化 BBA 抗体 VL (hAL-F123j4) SEQ ID NO. 5 (碱基序列)、SEQ ID NO. 6 (氨基酸序列)

[0200] [实施例 2] 为了双特异性抗体的分离选择可变区氨基酸变异位置

[0201] 首先,为了确认暴露在人源化 A69 抗体和人源化 B26 抗体的可变区表面的氨基酸残基,使用 MOE 软件 (Chemical Computing Group Inc.),通过同源性建模制备人源化 A69 抗体和人源化 B26 抗体的抗体 Fv 区模型。模型如图 2 所示,通过该模型的详细分析,在 CDR 以外的 FR 序列中,在暴露于表面的氨基酸中, H10、H12、H23、H39、H43、H105 (Kabat 编号,

Kabat EA 等人. 1991. Sequences of Proteins of Immunological Interest. NIH) 是不会使活性降低、而可以使等电点变化的候选氨基酸。CDR 中, 暴露于表面的氨基酸选择 H97。

[0202] [实施例 3] 人源化 A69 抗体及其变异体和人源化 B26 抗体的可变区氨基酸的变异

[0203] 为了使入源化 A69 抗体和人源化 B26 抗体的等电点变化, 进行入源化 A69H 链可变区和人源化 B26H 链可变区的氨基酸变异。具体来说, 使用 QuikChange 位点定向诱变试剂盒 (Stratagene), 向按照所附说明书记载的方法制备的人源化 A69 抗体 H 链可变区 (hA69a, SEQ ID NO. 1) 和人源化 B26 抗体 H 链可变区 (hB26-F123e4, SEQ ID NO. 3) 中导入突变。将确认插入了正确的人源化抗体可变区基因序列的 H 链可变区片段的质粒用 XhoI 和 SfiI 消化, 然后将反应液用于 1% 琼脂糖凝胶电泳。使用 QIAquick 凝胶纯化试剂盒 (QIAGEN), 按照所附说明书记载的方法纯化目标大小 (约 400bp) 的 DNA 片段, 用 30 μ L 灭菌水洗脱。按照实施例 1-2 所示的方法, 将 DNA 片段插入到具有野生型恒定区的表达质粒中, 制备 H 链表达载体。各抗体的变异的氨基酸残基和序列号如表 1 所示。制备了 (hA69-N97R、hA69-p18)、人源化 B26 抗体 (hB26-F123e4) 及其变异体 (hB26-p15)。人源化 A69 抗体 (hA69a) 及其变异体 (hA69-N97R、hA69-p18) 是将 H 链表达载体 (可变区为 hA69-N97R、hA69-p18) 和 L 链表达载体 (可变区为 hAL-F123j4, SEQ ID NO. 6) 组合, 根据实施例 1-3 进行表达。人源化 B26 抗体 (hB26-F123e4) 及其变异体 (hB26-p15) 是将 H 链表达载体 (可变区为 hB26-F123e4、hB26-p15) L 链表达载体 (可变区为 B26-VL, 氨基酸序列为 W02005/035756, SEQ ID NO. 18) 组合, 根据实施例 1-3 进行表达。按照实施例 1-4 所示方法纯化培养上清中的抗体。

[0204] [表 1]

[0205]	名称	人源化 A69-H 链可变区	
		变异位置	氨基酸 SEQ ID NO.
	hA69a	—	2
	hA69-p18	Q43E, Q105E	7
	hA69-N97R	N97R	9
[0206]	名称	人源化 B26-H 链可变区	
		变异位置	氨基酸 SEQ ID NO.
	hB26-F123e4	—	4
	hB26-p15	Q39K, Q43K, Q105R	10

[0207] [实施例 4] 含有人源化 A69 抗体和人源化 B26 抗体的双特异性抗体表达细胞株的构建

[0208] 为了制备人源化双特异性抗体, 如下构建抗体表达细胞株。

[0209] 以人 IgG4 的野生型 H 链恒定区基因为模板, 使用设计为编码 H 链恒定区的 N 末端一侧的两个氨基酸 (Ala-Ser) 的碱基序列成为 NheI 识别序列 (GCTAGC) 的 5' 末端侧引物, 和设计成与 3' 末端一侧退火、且具有 NotI 识别位点的引物, PCR 扩增 H 链恒定区, 与将 pBluescriptKS+ 载体 (东洋纺) 用 NheI、NotI (均为宝酒造制备) 消化所得的载体连接, 制备 pBCH4 (包含 IgG4 恒定区基因)。使用与人源化 A69-H 链抗体 (hA69-PFL, SEQ ID NO. 11) 和人源化 B26-H 链抗体 (hB26-PF, SEQ ID NO. 12) 的 H 链可变区 5' 末端一侧碱基序列互补、具有 Kozak 序列 (CCACC) 和 EcoRI 识别序列的引物, 以及具有 NheI 识别序列的 3' 末端一侧碱基序列的引物进行 PCR, 将所得 PCR 产物用 EcoRI、NheI (均为宝酒造制备)

消化,插入到同样用 EcoRI、NheI 消化的 pBCH4 中,连接可变区和恒定区。将制备的人源化 A69-H 链抗体载体用 EcoRI、NotI (均为宝酒造制备) 消化,克隆到同样用 EcoRI、NotI 消化的动物细胞用表达载体 pCXND3 中。该载体 pCXND3 的构建流程如下所示。

[0210] 为了将 DHFR-ΔE-γVH-PM1-f (参照 W092/19759) 的抗体 H 链基因与载体分割,用限制酶 EcoRI、SmaI 进行消化,只回收载体一侧,然后克隆 EcoRI-NotI-BamHI 适体 (宝酒造制备)。将该载体命名为 pCHOI。将 pCHOI 的 DHFR 基因表达位点克隆到 pCXN (Niwa 等人, Gene 1991, 108:193-200) 的限制酶 HindIII 位点上,将所得载体命名为 pCXND3。将制备的人源化 B26-H 链抗体载体用 EcoRI、NotI (均为宝酒造制备) 消化,克隆到同样用 EcoRI、NotI 消化的动物细胞用表达载体 pCXZD1 中。pCXZD1 载体是将 pCXND3 载体的新霉素抗性基因置换为零霉素抗性基因得到的表达载体。按照实施例 1-2,将人源化 BBA-L 链抗体 (hAL-s8, SEQ ID NO. 8) 的 L 链可变区克隆到插入有 L 链恒定区的质粒 (pCAG-gκ DNA) 上,制备 L 链表达载体。将制备的三种表达载体通过限制酶制成直链连接,然后基因导入 CHO-DG44 细胞中,建立抗体表达细胞株。

[0211] 稳定表达细胞株的制备如下进行。通过使用 GenePulserXcellIII (Bio-Rad) 的电穿孔法导入基因。将各抗体表达载体与 0.75mL 悬浮于 PBS 中的 CHO 细胞 (1×10^7 细胞/mL) 混合,将混合物在冰上冷却 10 分钟,转移到样品杯中,然后以 1.5kV、25 μFD 的容量给予脉冲。在室温下恢复 10 分钟后,将电穿孔处理过的细胞悬浮于 40mL 以 1 倍浓度含有添加了 HT (Invitrogen) 的 CHO-S-SFMII 培养基 (Invitrogen) 中。用同样的培养基制备 10 倍稀释液,以 100 μL/孔分注到 96 孔培养板中。在 CO₂ 培养箱 (5% CO₂) 中培养 24 小时,然后添加 0.5mg/mL 遗传霉素 (Invitrogen)、0.6mg/mL 零霉素 (Invitrogen),培养 2 周。将显示抗药性的转化细胞的集落依次放大培养,使用建立的高生产细胞株进行大量的培养,得到培养上清。

[0212] [实施例 5] 人源化抗体同源二聚体和人源化双特异性抗体的分离纯化

[0213] 按照以下方法,从实施例 4 得到的培养上清中纯化双特异性抗体。将培养上清添加到用平衡缓冲液 (20mmol/L 磷酸钠缓冲液、150mmol/L NaCl, pH 7.0) 平衡的 rProtein A Sepharose Fast Flow 柱 (Amersham Biosciences, 50mm I.D. × 9.9cm H. = 194.3mL-树脂) 中,用洗涤缓冲液 1 (20mmol/L 磷酸钠缓冲液, 150mmol/L NaCl, pH 7.0)、洗涤缓冲液 2 (50mmol/L 乙酸钠缓冲液, pH 6.0) 洗涤,然后用 50mmol/L 乙酸洗脱。洗脱后立即加入 1.5mol/L 的 Tris-HCl、pH 7.8,调节至 pH 6.3。

[0214] 将所得纯化溶液添加到用 Solvent A (10mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 6.3) 平衡的 SP TOYOPERL 650M 柱 (東ソー、26mm I.D. × 22.3cm H. = 118.3mL-树脂) 中。在以下所示的溶液和梯度中通过抗体表面电荷差进行分离。

[0215] 溶剂 A: 20mmol/L 乙酸钠缓冲液, pH6.0

[0216] 溶剂 B: 20mmol/L 乙酸钠缓冲液, 1mol/L NaCl, pH6.0

[0217] 流速: 10mL/分钟 (113cm/小时) 只在洗脱时为 5.3mL/分钟 (60cm/小时)

[0218] 梯度: 0 → 15% B 台阶梯度 3 柱容积 (CV) 冲洗液体

[0219] 15 → 35% B 梯度 6CV

[0220] 35 → 50% B 梯度 10CV

[0221] 50 → 100% B 梯度 3CV

[0222] 100% B 台阶梯度 4CV 冲洗液体

[0223] 洗脱的结果显示,获得了检测出的三个峰,回收了两种同源二聚体 (hA69-PF、hB26-PF) 和一种杂合二聚体——双特异性抗体 BiAb。

[0224] [实施例 6] 制备抗体的等电聚焦电泳分析

[0225] ATF 是作为组织因子的单克隆抗体获得、具有人 IgG4 恒定区的人源化抗体。对于 ATF 的由来,在 W099/051743 中有详细记载, H 链可变区和 L 链可变区的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO. 13、SEQ IDNO. 14 所示。对于 ATF、以及实施例 5 中制备的 hA69-PF、BiAb、hB26-PF、实施例 3 中制备的 hA69-N97R、hA69-p18、hB26-e、hB26-p15,为了对由于可变区氨基酸序列不同而导致的表面电荷变化、以及氨基酸变异导致的表面电荷的变化进行评价,实施等电聚焦电泳分析。

[0226] ATF、hA69-PF、BiAb、hB26-PF、以及人源化 A69 抗体 hA69-N97R 及其变异体 hA69-p18、以及人源化 B26 抗体 hB26-F123e4 及其变异体 hB26-p15 的等电聚焦电泳如下进行。使用 Phastsystem Cassette (Amersham Bioscience 制备),用以下的溶胀液使 Phast-Gel Dry IEF (Amersham Bioscience 制备) 凝胶溶胀约 30 分钟。

[0227] MilliQ 水 1.5mL

[0228] Pharmalyte 5-8 用于 IEF (Amersham Bioscience 制备) 50 μ L

[0229] Pharmalyte 8-10.5 用于 IEF (Amersham Bioscience 制备) 50 μ L

[0230] 使用溶胀的凝胶,通过 Phastsystem (Amersham Bioscience 制备),按照以下程序进行电泳。样品是在步骤 2 添加到凝胶中。pI 标记使用 pI 校正曲线试剂盒 (Amersham Biosciences)。

[0231] 步骤 1:2000V 2.5mA 3.5W 15°C 75Vh

[0232] 步骤 2:200V 2.5mA 3.5W 15°C 15Vh

[0233] 步骤 3:2000V 2.5mA 3.5W 15°C 410Vh

[0234] 电泳后的凝胶用 20% TCA 固定,然后用银染试剂盒、蛋白质 (Amersham Biosciences),按照试剂盒所附的说明书进行银染。染色后,由 pI 标记的已知等电点计算样品的等电点。等电聚焦电泳的分析结果如图 3 所示。由 pI 标记制备的 pI 和移动率的校正曲线以及由此计算的等电点如图 4 所示。由于存在来自抗体的电荷异质性,因此各样品基于主条带的移动率来计算等电点。

[0235] 由此,根据可变区氨基酸序列不同导致的表面电荷的变化、以及氨基酸变异导致的表面电荷的变化,观察到 pI 的变化。hB26-PF 约为 9.2, BiAb 约为 8.7, hA69-PF 约为 8.0, ATF 约为 7.2, hA69-N97R 约为 8.9, hA69-p18 约为 8.5, hB26-F123e4 约为 8.7, hB26-p15 约为 9.0。hA69-N97R 和 hA69-p18、hA69-PF 同样是人源化抗体可变区变异,与 hA69-N97R 比较, hA69-PF 中获得了约 0.9pI 的变化,与 hB26-F123e4 比较, hB26-p15 带来了约 0.3pI 的变化。本研究中,由于可变区氨基酸序列的不同而使等电点发生变化,进一步通过选择的可变区的 H10、H12、H23、H39、H43、H97、H105 的表面氨基酸的电荷性改变,可以使等电点变化。

[0236] [实施例 7] 人源化 A69 抗体及其变异体以及人源化 B26 抗体及其变异体的结合活性评价

[0237] 为了评价人源化 A69 抗体及其变异体的功能,按照以下方法评价与作为抗原的因子 IXa 的结合活性。人源化 A69 抗体 (hA69a) 及其变异体 (hA69-N97R) 的评价如下进

行。将用包被缓冲液(100mM 碳酸氢钠, pH 9.6, 0.02%叠氮化钠)稀释为 1 μg/mL 的因子 Ixαβ (EnzymeResearch Laboratories) 以 100 μL/孔分注到 Nunc-Immuno 板(Nunc-Immuno™ 96MicroWell™ MaxiSorp™(Nalge Nunc Interantional)), 在 4℃ 下温育过夜。用含有吐温^(R)20 的 PBS(-) 洗涤 3 次, 然后用稀释缓冲液(50mM Tris-HCl, pH 8.1, 1%牛血清白蛋白, 1mM MgCl₂, 0.15M NaCl, 0.05%吐温^(R)20, 0.02%叠氮化钠)将板在室温下封闭 2 小时。除去缓冲液, 然后添加 100 μL/孔用稀释缓冲液稀释的纯化抗体, 在室温下温育 1 小时。将板洗涤 3 次, 然后添加 100 μL/孔用稀释缓冲液稀释为 1/4000 的碱性磷酸酶标记山羊抗小鼠 IgG(BIOSOURCE), 在室温下温育 1 小时。将板洗涤 5 次, 添加 100 μL/孔显色底物(Sigma), 在室温下温育 30 分钟。用微量板读板仪型号 3550(Bio-Rad Laboratories)测定 405nm(对照 655nm)的吸光度。

[0238] 实施例 8 中使用的变异抗体(hA69-N97R、hA69-p18、hA69-PF)如下进行评价。将用包被缓冲液(0.05M 碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液, pH9.6)稀释为 1 μg/mL 的因子 Ixα(Enzyme Research Laboratories)以 100 μL/孔分注到 Nunc-Immuno 板(Nunc-Immuno™ 96MicroWell™ MaxiSorp™(Nalge Nunc Interantional)), 在 4℃ 下温育过夜。用含有 0.05%吐温^(R)20 的 PBS(-)洗涤 3 次, 然后以 200 μL/孔将稀释缓冲液(Tris 盐缓冲液、吐温 20, pH 8.0(SIGMA), 1%牛血清白蛋白、0.02%叠氮化钠)添加到板中, 在室温下封闭 2 小时。除去缓冲液, 然后添加 100 μL/孔用稀释缓冲液稀释的纯化抗体, 在 4℃ 下温育过夜。将板洗涤 3 次, 然后添加 100 μL/孔用稀释缓冲液稀释为 1/500 的碱性磷酸酶标记小鼠抗人 IgG4(Southern Biotechnology), 在室温下温育 2 小时。将板洗涤 5 次, 添加 100 μL/孔 BluePhos Microwell 磷酸酶底物系统(Kirkegaard & Perry Laboratories)作为底物, 在室温下温育约 30 分钟。用微量板读板仪型 Vmax(Molecular Devices)于 650nm 测定。结果如图 5 所示, 由于改变表面电荷而使可变区变异的抗体与变异前的抗体显示同等的结合活性。

[0239] 为了评价人源化 B26 抗体(hB26-F123e4)及其变异体(hB26-p15)的功能, 按照以下方法评价与作为抗原的因子 X 的结合活性。将用包被缓冲液(100mM 碳酸氢钠, pH 9.6, 0.02%叠氮化钠)稀释为 1 μg/mL 的因子 X(Enzyme Research Laboratories)以 100 μL/孔分注到 Nunc-Immuno 板(Nunc-Immuno™ 96MicroWell™ MaxiSorp™(NalgeNunc Interantional)), 在 4℃ 下温育过夜。用含有吐温^(R)20 的 PBS(-)洗涤 3 次, 然后用稀释缓冲液(50mM Tris-HCl, pH 8.1, 1%牛血清白蛋白, 1mM MgCl₂, 0.15M NaCl, 0.05%吐温^(R)20, 0.02%叠氮化钠)将板在室温下封闭 2 小时。除去缓冲液, 然后添加 100 μL/孔用稀释缓冲液稀释的纯化抗体, 在室温下温育 1 小时。将板洗涤 3 次, 然后添加 100 μL/孔用稀释缓冲液稀释为 1/4000 的碱性磷酸酶标记山羊抗小鼠 IgG(BIOSOURCE), 在室温下温育 1 小时。将板洗涤 5 次, 添加 100 μL/孔显色底物(Sigma), 在室温下温育 30 分钟。用微量板读板仪型号 3550(Bio-Rad Laboratories)测定 405nm(对照 655nm)的吸光度。结果如图 6 所示, 由于改变表面电荷而使可变区变异的抗体与变异前的抗体显示同等的结合活性。

[0240] 以上显示, 本实施例的可变区的变异对于抗体与抗原的结合没有影响。

[0241] [实施例 8] 制备抗体的体内动力学评价

[0242] 8-1 使用小鼠的动力学实验

[0243] ATF 是作为人组织因子的单克隆抗体而获得、具有人 IgG4 的恒定区的人源化抗

体。关于 ATF 的由来在 W099/051743 中有详细记述,分别以 SEQ ID NO.13、SEQ ID NO.14 表示 H 链可变区和 L 链可变区的氨基酸序列。对于 ATF、以及实施例 5 中制备的 hA69-PF、BiAb、hB26-PF、实施例 3 中制备的 hA69-N97R、hA69-p18、hB26-e、hB26-p15,评价其在小鼠 (C57BL/6J, Charles River, Japan) 体内的动力学。将 ATF、hA69-PF、BiAb、hB26-PF 以 5mg/kg 静脉内单次给予小鼠 (C57BL/6J, Charles River, Japan),在给予前和给予后 15 分钟、2 小时、8 小时、1 天、2 天、4 天、7 天、11 天、14 天、21 天、28 天进行采血。采集的血液立即以 4℃、15,000rpm 离心 15 分钟,获得血浆。分离的血浆在实施测定之前一直保存在设定为 -20℃ 以下的冰箱中。同样,以 1mg/kg 将 hA69-N97R、hA69-p18、hB26-F123e4、hB26-p15 静脉内单次给予小鼠 (C57BL/6J, 日本チャールズリバー),在给予前和给予后 15 分钟、2 小时、8 小时、1 天、2 天、5 天、7 天、9 天、14 天、21 天、28 天进行采血。采集的血液立即以 4℃、15,000rpm 离心 15 分钟,获得血浆。分离的血浆在实施测定之前一直保存在设定为 -20℃ 以下的冰箱中。

[0244] 8-2 通过 ELISA 法测定血浆中浓度

[0245] 小鼠血浆中浓度测定通过 ELISA 法测定。血浆中的浓度是制备 6.4、3.2、1.6、0.8、0.4、0.2、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 的校正曲线试样。校正曲线试样和小鼠血浆测定试样分注到用抗人 IgG(γ 链特异性)F(ab')₂(Sigma 制备)固定的免疫板(Nunc-Immuno 板, MaxiSorp(Nalge nuncInternational 制备))中,在室温下静置 1 小时,然后依次与山羊抗人 IgG-BIOT(Southern Biotechnology Associates 制备)和链霉抗生物素-碱性磷酸酶偶联剂(Roche Diagnostics 制备)依次反应,使用 BluePhosMicrowell 磷酸酶底物系统(Kirkegaard & Perry Laboratories 制备)作为底物进行显色反应,通过微量板读板仪测定 650nm 的吸光度。小鼠血浆中浓度是使用分析软件 SOFTmax PRO(Molecular devices 制备),由校正曲线的吸光度计算。ATF、hA69-PF、BiAb、hB26-PF 的血浆中浓度的变化如图 7 所示。

[0246] 8-3 药物动力数据的计算方法

[0247] 通过药物动力分析软件 WinNonlin(Pharsight 制备),对所得血浆中浓度变化数据进行非模型依赖性分析,计算药物动力学的参数(清除率(CL)、半衰期(T_{1/2}))。T_{1/2}是由最终三点或 WinNonlin 自动设定的最终相血浆中浓度计算。所得药物动力学参数如表 2 所示。

[0248] [表 2]

		hA69-N97R	hA69-p18	hA69-PF	ATF
[0249]	pI	8.9	8.5	8.0	7.2
	CL mL/h/kg	0.412	0.300	0.204	0.136
	T _{1/2} 天	12.6	15.0	18.7	26.1
		hB26-F123e4	hB26-p15	hB26-PF	BiAb
[0250]	pI	8.7	9.0	9.2	8.7
	CL mL/h/kg	0.346	0.450	0.500	0.362
	T _{1/2} 天	13.4	11.9	10.8	13.6

[0251] 对于 pI,对各抗体的清除率(CL)、半衰期(T_{1/2})进行制图,如图 8 所示。发现:使用的各抗体中,不管是否具有相同恒定区序列,pI 与清除率(CL)和半衰期(T_{1/2})显示高的相关关系,pI 越低则清除率降低,具有较长的血液半衰期。如上所述,即使为同一恒定区

序列,根据 pI 值的不同也可以调控血液半衰期,即,使 pI 降低则可以使血液半衰期延长,使 pI 升高则可以使半衰期缩短。实际上,在本实施例中,可以使 hA69-N97R 可变区的表面氨基酸变异(变异的位置如表 3 所示)、使 pI 降低,由此可以延长血液半衰期;使 hB26-F123e4 可变区的表面氨基酸变异(变异位置如表 4 所示)、使 pI 升高,由此可以缩短血液半衰期。由此,通过使可变区的表面氨基酸(具体例子有 H10、H12、H23、H39、H43、H97、H105)进行电荷改变,可以调控 IgG 的血液动力学。

[0252] [表 3]

	名称	H1	H12	H23	H27	H43	H97	H103	L99
[0253]	hA69-N97R	Pyr(Q)	K	K	G	Q	R	Q	G
	hA69-p18	Pyr(Q)	K	K	G	E	N	E	G
	hA69-PF	E	V	T	Y	E	L	E	Q
			*	*		*	*	*	

[0254] [表 4]

	名称	H1	H9	H10	H28	H37	H39	H43	H103	L99
[0255]	hB26-F123e4	Pyr(Q)	P	D	M	A	Q	Q	Q	G
	hB26-p15	Pyr(Q)	P	D	M	A	K	K	R	G
	hB26-PF	E	A	Q	T	V	Q	K	R	Q
				*			*	*	*	

[0256] 上述表 3 和表 4 中,Pyr(Q) 是被焦谷氨酰化的 N 末端的谷氨酰胺残基,N 末端的氨基被保护,因此,在 Pyr(Q) 和 E 中电荷没有大的差异。另外,表 3 和表 4 中,通过氨基酸置换而使 pI 发生变化的位置用 * 表示。

[0257] 本发明发现,通过置换可变区的表面氨基酸、使 IgG 的 pI 降低,可以延长 IgG 的血液半衰期,相反,通过置换可变区的表面氨基酸、使 IgG 的 pI 升高,可以缩短 IgG 的血液半衰期。

[0258] 在使用小鼠的血液动力学研究中,非专利文献(Nat Biotechnol.1997;15:637-640)中公开:使存在于恒定区的 Fc 的氨基酸变异、提高与 FcRn 的亲合性,可以使血液半衰期($T_{1/2}$)延长约 1.5 倍;本发明中,hA69-PF 与 hA69-N97R 比较时,在相同的恒定区序列中,通过使可变区的表面氨基酸变异、使 pI 降低,可以使血液半衰期($T_{1/2}$)延长约 1.5 倍。并且,hA69-PF、ATF 与 hA69-N97R 比较,pI 最低的 ATF 的 $T_{1/2}$ 比 hA69-N97R 延长约 2.1 倍,由此,通过使存在于 hA69-N97R 的可变区的表面氨基酸进一步变异、使 pI 降低,可以进一步延长 hA69-N97R 的血液半衰期。将本实施例中使用的抗体进行比较,则 pI 最高的 hB26-PF 和最低的 ATF 的血液半衰期约有 2.4 倍的差异,通过可变区氨基酸变异来调控血液动力学,这与现有的调控技术比较,有望获得高的效果。另外,从免疫原性的角度考虑,向恒定区导入的人工氨基酸置换越少越好,通过使可变区的表面氨基酸变异来调控血液半衰期的本发明在药物的开发中 useful。

[0259] 产业实用性

[0260] 本发明的方法的优选方案中,氨基酸的置换在可变区进行,因此与使恒定区变异的以往的方法相比,免疫原性的风险小。另外,在使血液半衰期延长的调控中,比以往的使恒定区变异的方法显示更大的效果。另外,在可变区,无需使结构、功能(活性)发生改变,通过控制表面电荷即可以调控 IgG 抗体等含有 FcRn 结合区的多肽的血液半衰期。通过采用

本发明的方法,可以实际保有活性地获得血液半衰期得到控制的含有 FcRn 结合区的多肽。

序列表

<110>CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> 调节抗体在血液中的动力学的方法

<130>C1-A0605P

<150>JP 2006-097796

<151>2006-03-31

<160>18

<170>PatentIn version 3.3

<210>1

<211>354

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的核苷酸序列

<400>1

cagggtccagc ttgtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc agtgaaggtt	60
tcctgcaagg cctctggagg caccttcagt gactactata tgcactgggt gcgccaggcc	120
cccgacaag ggcttgagtg gatgggatac attaatccta gcagtggta tactaagtac	180
aatcggaagt tcagggacag agtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac	240
atggagctga gcagcctgag atctgaagac acggctgtgt attactgtgc gagaggggggt	300
aacggttact accttgacta ctggggccag ggcaccacgg tcaccgtctc ctca	354

<210>2

<211>118

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400>2

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 Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Arg Lys Phe
 50 55 60
 Arg Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys 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 Gly Asn Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210>3

<211>357

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的核苷酸序列

<400>3

```

caggtgcagc tgggtgcagtc tggacctgac gtgaagaagc cgggggcctc agtgaaggtc      60
tcctgcaagg cctctggcta catgttttcc gacaacaaca tggactgggc ggcacaggcc      120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggagat attaatacta aaagtgggtg ttctatctac      180
aaccagaagt tcaagggcag agtcatcatg accatagaca aatccacggg cacagcctac      240
atggaattga ggagcctgag atcagacgac acggccatat attactgtgc gaggaggagg      300
agctacggct actactttga ctactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctccctca      357
  
```

<210>4

<211>119

<212>PRT

<213> 人工的

$\langle 400 \rangle_4$ [illegible]

〈213〉 人工的

〈223〉 人工合成的核苷酸序列

 $\langle 400 \rangle_5$

gacatcgtga	tgaccagtc	tccatcctcc	ctgtctgcat	ctgtaggaga	cagagtcacc	60
atcacttgca	aggccagtc	gaatgtgggg	actgctgtag	cctggtatca	gcagaaacca	120
gggaaagccc	ctaagctcct	gatctattcg	gcatectacc	ggtacagtgg	ggtcccatca	180
aggttcagt	gcagtcgata	tgggacagat	ttcactctca	ccatctcaag	cttgaacct	240
gaagatttag	caacttacta	ctgtcagcaa	tatagcaact	atatcacgtt	cggcggaggg	300
accaaggtgg	agatcaaa					318

<210>6

<211>106

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400>6

```

Asp Ile Val 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 Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala
           20           25           30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
           35           40           45
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
           50           55           60
Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Ile Thr
           85           90           95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
           100          105

```

<210>7

<211>118

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400>7

```

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 Asp Tyr
           20           25           30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Met

```

35	40	45
Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Arg Lys Phe		
50	55	60
Arg Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys 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 Gly Asn Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Glu Gly Thr		
100	105	110
Thr Val Thr Val Ser Ser		
115		

<210>8

<211>106

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400>8

Asp Ile Val 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 Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala		
20	25	30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
35	40	45
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Ile Thr		
85	90	95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
100	105	

<210>9

<211>118

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400>9

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	Asp	Tyr
			20					25					30		
Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40						45		
Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Ser	Ser	Gly	Tyr	Thr	Lys	Tyr	Asn	Arg	Lys	Phe
	50					55					60				
Arg	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	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	Gly	Arg	Gly	Tyr	Tyr	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
			100					105					110		
Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
			115												

<210>10

<211>119

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400>10

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Pro	Asp	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Met	Phe	Ser	Asp	Asn
			20						25				30		

Asn	Met	Asp	Trp	Ala	Arg	Lys	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
35				40				45								
Gly	Asp	Ile	Asn	Thr	Lys	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	
50				55				60								
Lys	Gly	Arg	Val	Ile	Met	Thr	Ile	Asp	Lys	Ser	Thr	Gly	Thr	Ala	Tyr	
65				70				75				80				
Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	
				85				90				95				
Ala	Arg	Arg	Arg	Ser	Tyr	Gly	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Arg	Gly	
				100				105				110				
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
				115												

<210>11

<211>118

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400>11

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Val	Lys	Pro	Gly	Ser	
1				5				10				15				
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Thr	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr	
				20				25				30				
Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Glu	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
35				40				45								
Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Ser	Ser	Gly	Tyr	Thr	Lys	Tyr	Asn	Arg	Lys	Phe	
50				55				60								
Arg	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	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	Gly	Leu	Gly	Tyr	Tyr	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Glu	Gly	Thr	
				100				105				110				
Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
				115												

<210>12

<211>119

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400>12

```

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

```

<210>13

<211>463

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>13

```

Met Asp Trp Thr Trp Arg Phe Leu Phe Val Val Ala Ala Ala Thr Gly
1           5           10           15
Val Gln Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg
           20           25           30

```

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

340							345							350						
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro					
355							360							365						
Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu					
370							375							380						
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn					
385					390					395					400					
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser					
405					410					415										
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg					
420					425					430										
Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu					
435					440					445										
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys						
450					455					460										

 $\langle 210 \rangle_{14}$ $\langle 211 \rangle 236$

<212>PRT

〈213〉 智人

 $\langle 400 \rangle_{14}$

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

130	135	140	
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn			
145	150	155	160
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu			
	165	170	175
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp			
	180	185	190
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr			
	195	200	205
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser			
210	215	220	
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
225	230	235	

<210>15

<211>119

<212>PRT

<213>小鼠 (Mus musculus)

<400>15

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

<210>16

<211>120

<212>PRT

<213> 小鼠

<400>16

```

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

```

<210>17

<211>107

<212>PRT

<213> 智人

<400>17

```

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

```

65	70	75	80
Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Leu Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Ile Thr			
	85	90	95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg			
100	105		

<210>18

<211>108

<212>PRT

<213> 小鼠

<400>18

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

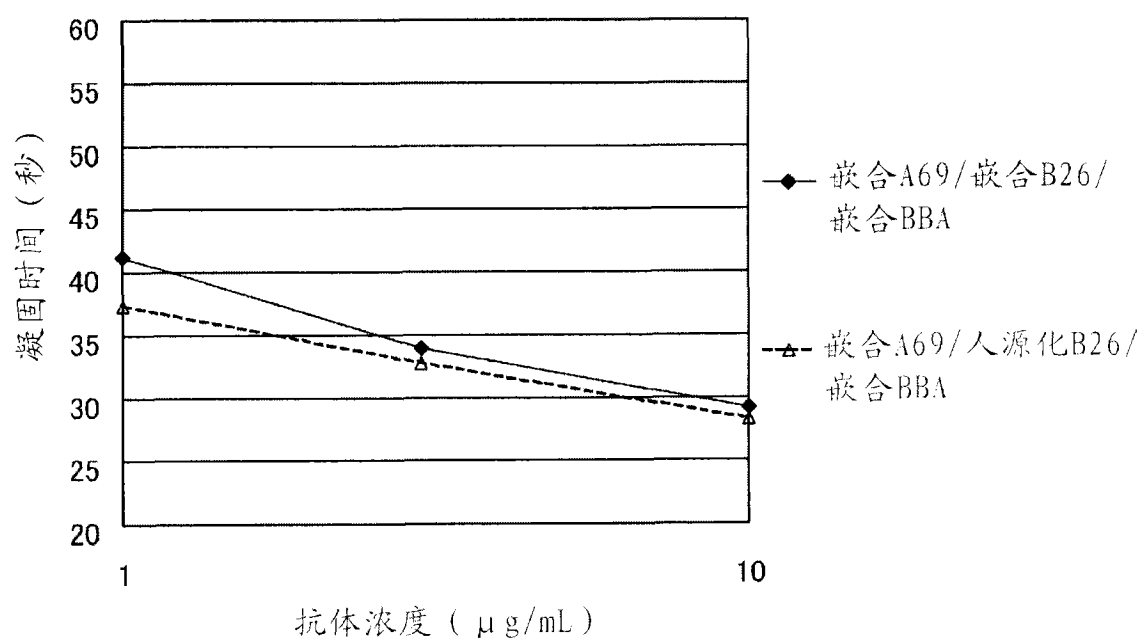


图 1

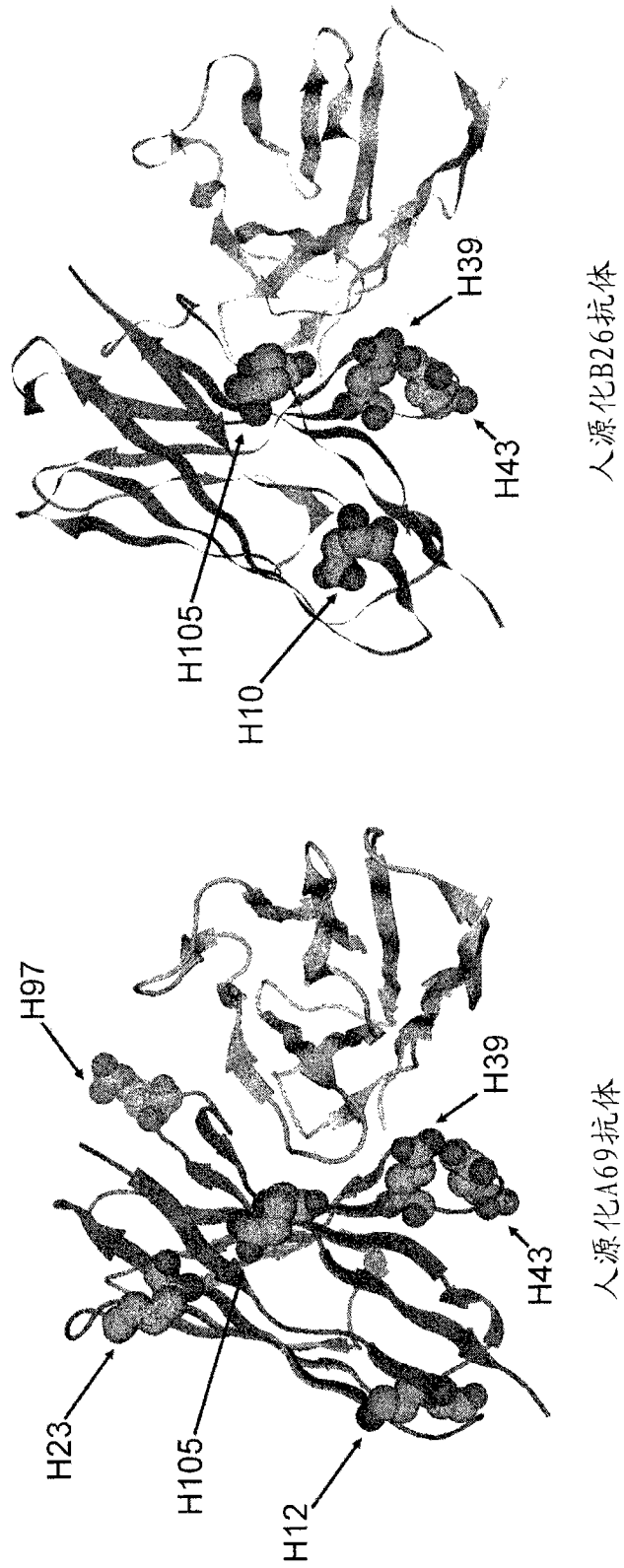


图 2

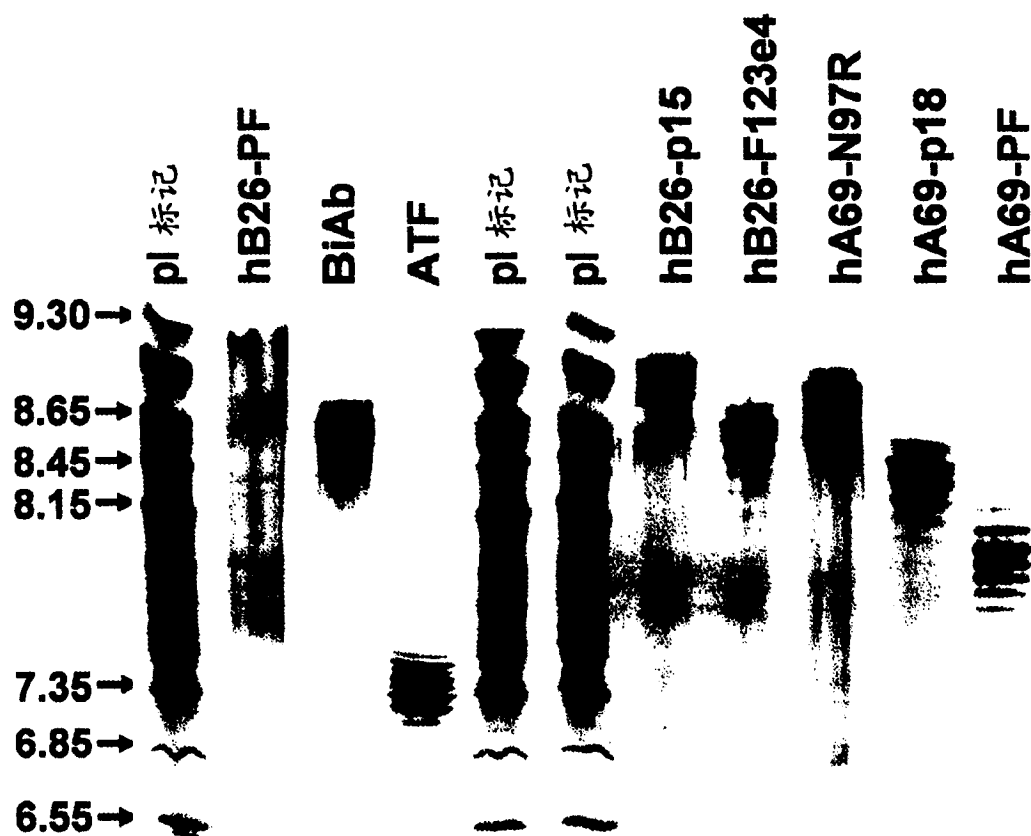
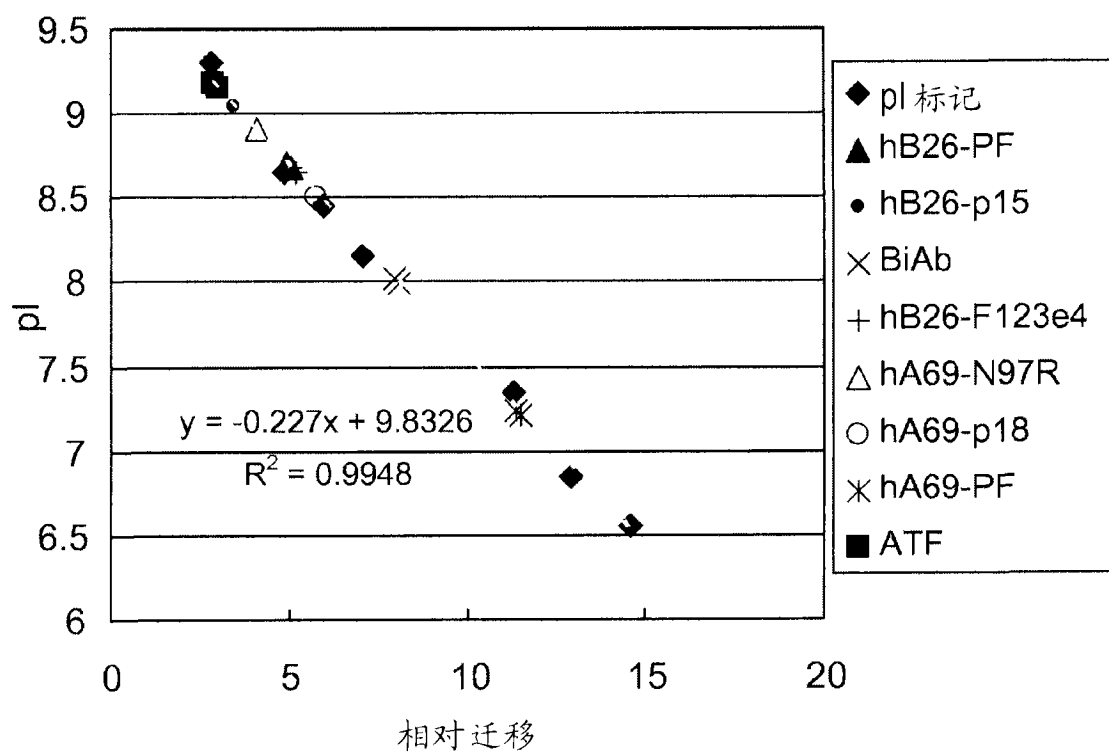


图 3



样品	pI
hB26-PF	9.2
hB26-p15	9.0
BiAb	8.7
hB26-F123e4	8.7
hA69-N97R	8.9
hA69-p18	8.5
hA69-PF	8.0
ATF	7.2

图 4

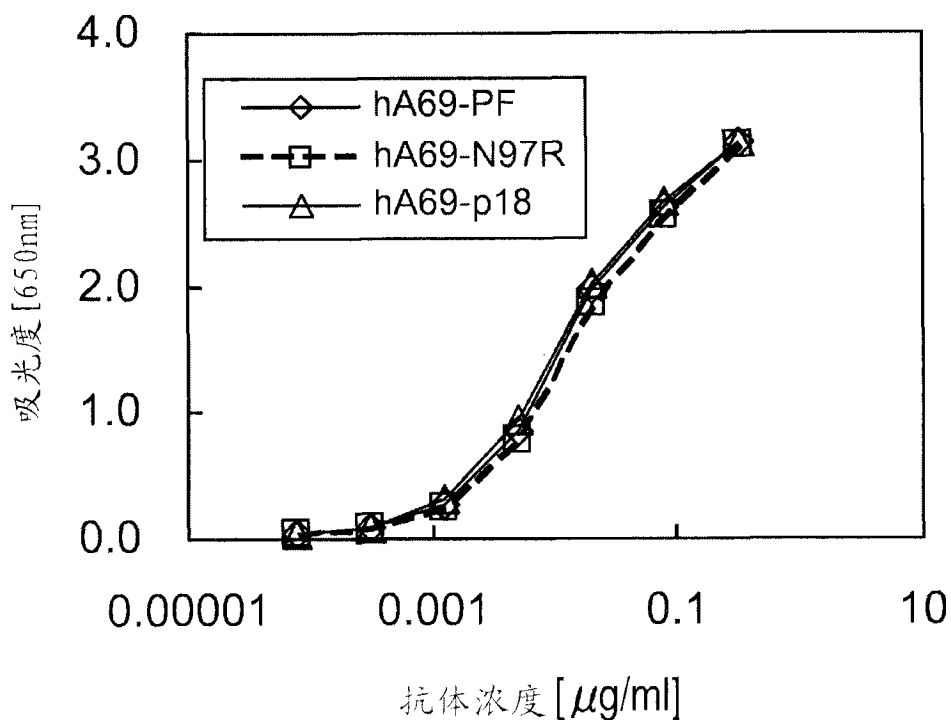
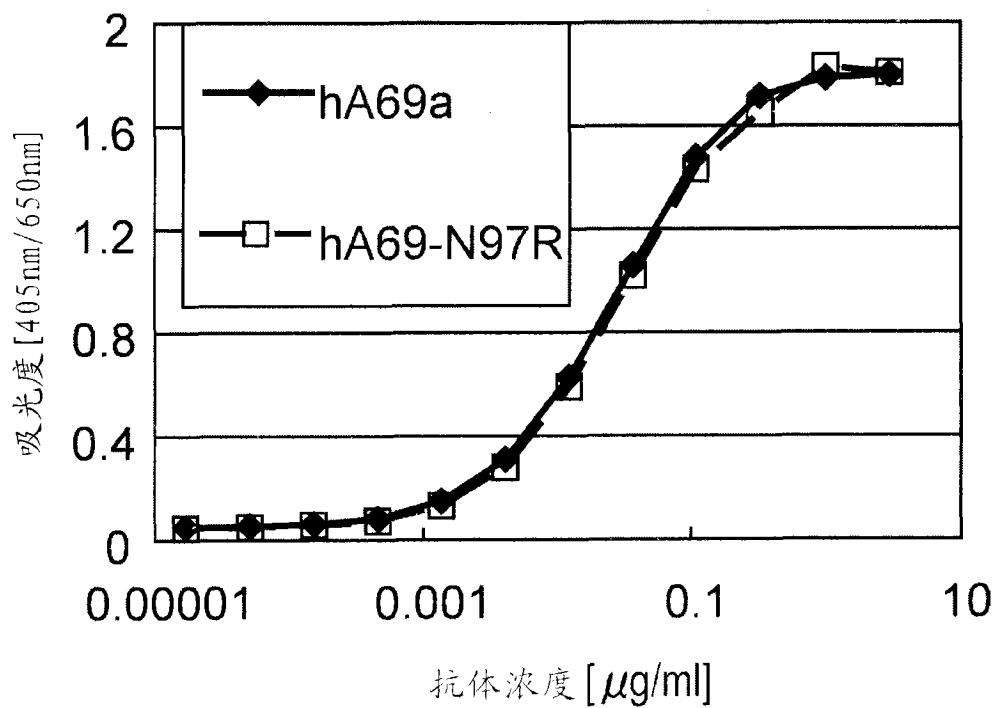


图 5

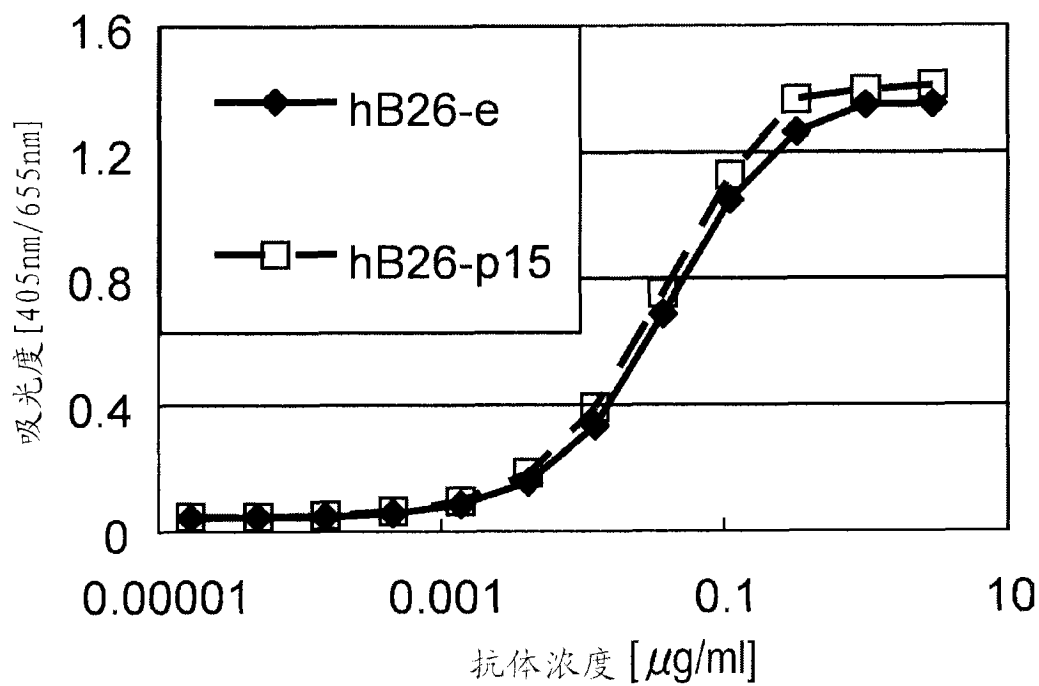


图 6

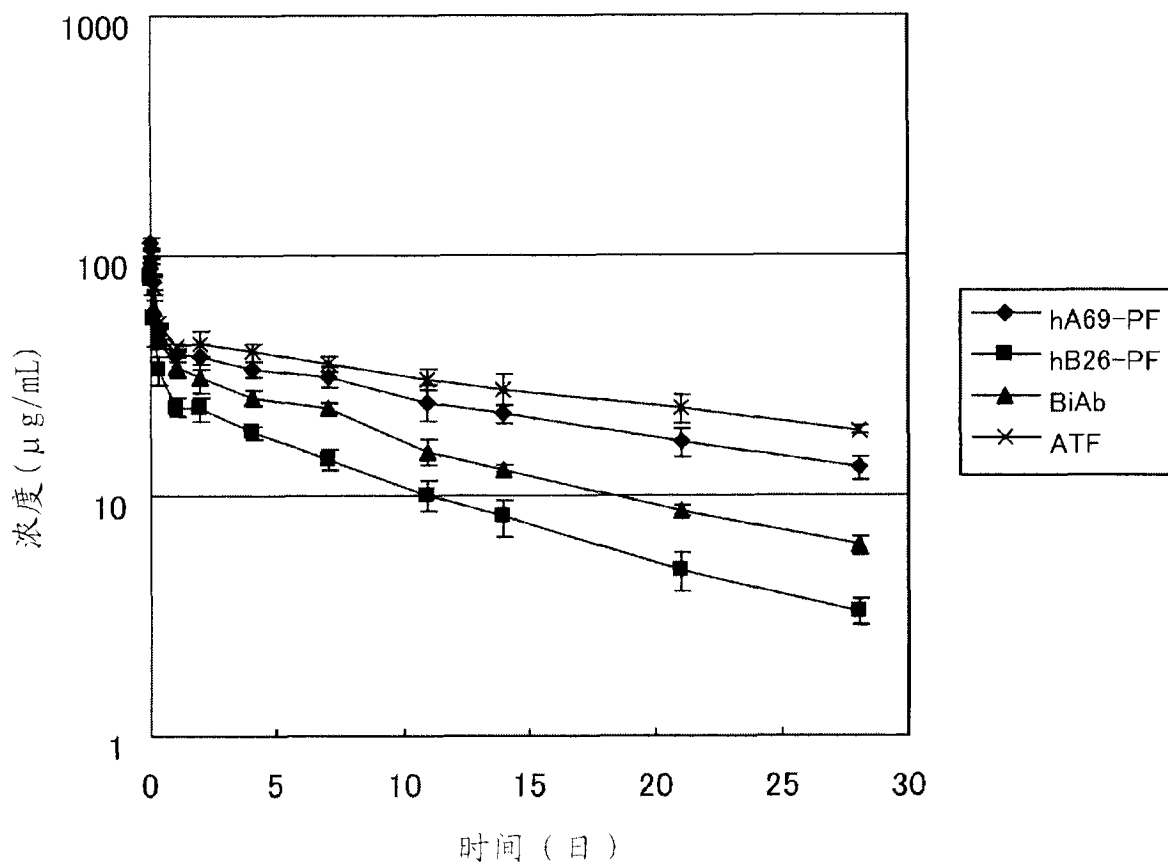


图 7

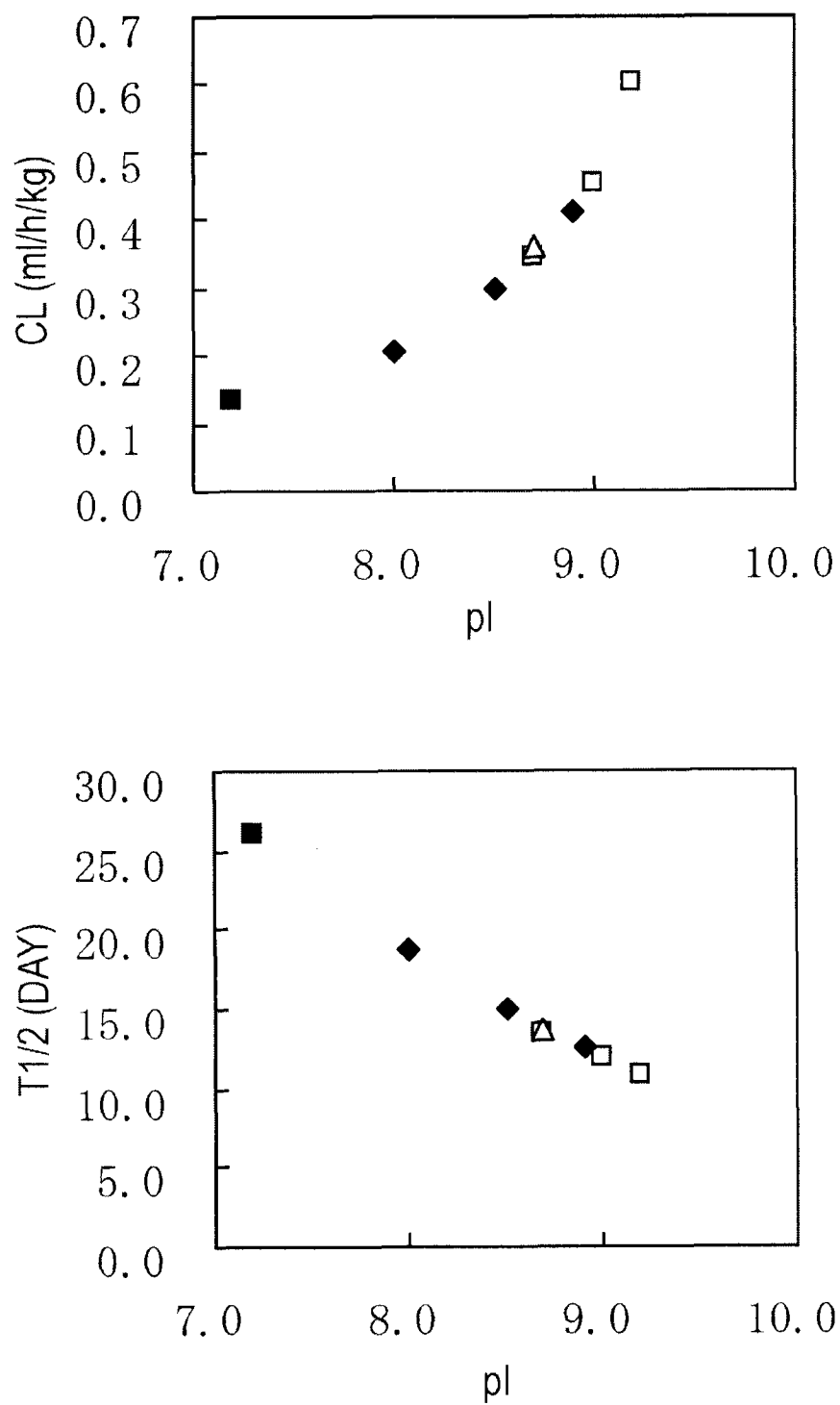


图 8