



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108290958 B

(45) 授权公告日 2021.12.28

(21) 申请号 201680069598.7
 (22) 申请日 2016.09.30
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 108290958 A
 (43) 申请公布日 2018.07.17
 (30) 优先权数据
 15188060.6 2015.10.02 EP
 16168918.7 2016.05.10 EP
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2018.05.29
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/EP2016/073410 2016.09.30
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02017/055539 EN 2017.04.06
 (73) 专利权人 豪夫迈·罗氏有限公司
 地址 瑞士巴塞尔
 (72) 发明人 S·伊姆霍夫-容 C·克莱因
 M·莫尔霍伊 J·T·雷古拉
 W·舍费尔

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
 11247
 代理人 陈迎春 黄革生

(51) Int.Cl.
 C07K 16/46 (2006.01)
 C07K 16/22 (2006.01)
 C07K 16/24 (2006.01)
 C07K 16/28 (2006.01)

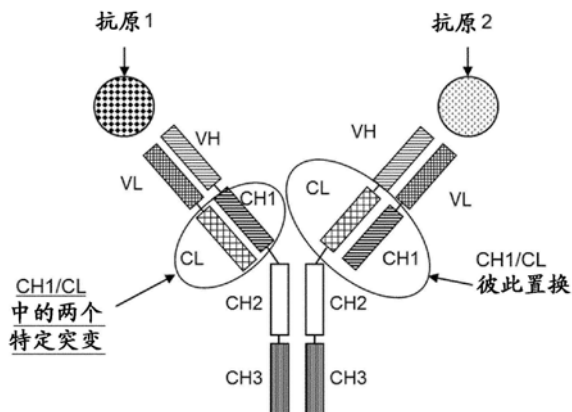
(56) 对比文件
 CN 1176659 A, 1998.03.18
 WO 2015101588 A1, 2015.07.09
 WO 2010040508 A1, 2010.04.15
 US 2014154254 A1, 2014.06.05
 US 2010286374 A1, 2010.11.11
 Wolfgang Schaefer等. Immunoglobulin domain crossover as a generic approach for the production of bispecific IgG antibodies.《PNAS》.2011,第108卷(第27期), 黄飞摘译.重链与轻链随机结合后抗D亲和力的调变.《国外医学输血及血液分册》.2003,第26卷(第2期),

审查员 程呈

权利要求书2页 说明书64页
 序列表25页 附图6页

(54) 发明名称
 多特异性抗体

(57) 摘要
 本发明涉及多特异性抗体、其制备方法、含有所述抗体的药物组合物及其用途。



1. 一种人IgG1或人IgG4亚类的多特异性抗体,其包含
 - a) 源自特异性结合第一抗原的第一抗体的第一轻链和第一重链;和
 - b) 源自特异性结合第二抗原的第二抗体的第二轻链和第二重链,其中在第二轻链中恒定结构域CL被第二重链的恒定结构域CH1置换;和在第二重链中恒定结构域CH1被第二轻链的恒定结构域CL置换;和
 - i) 其中在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123的氨基酸彼此独立地被选自K和R的氨基酸取代;其中在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147和213的氨基酸彼此独立地被选自E或D的氨基酸取代,并且其中
 - ii) 在第二重链恒定结构域CL中,位置124的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代;其中在一个重链CH3结构域中位置366处的氨基酸T被W替代和在位置354处的氨基酸S被C取代,并且在另一个重链CH3结构域中位置366处的氨基酸T被S替代,在位置368处的氨基酸L被A取代,在位置407处的氨基酸Y被V替代和在位置349处的氨基酸Y被C取代,其中CH1和CH3结构域的所有编号是根据Kabat的EU索引编号,并且CL结构域的所有编号是根据Kabat编号系统。
2. 根据权利要求1所述的多特异性抗体,其中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124的氨基酸被K取代。
3. 根据前述权利要求任一项所述的多特异性抗体,其中在第一重链的恒定结构域CH1中,位置213的氨基酸被E取代。
4. 根据权利要求3所述的多特异性抗体,其中在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147的氨基酸被E取代。
5. 根据权利要求1所述的多特异性抗体,其特异性结合人血管生成素-2和人VEGF,其中
 - a) 抗体包含SEQ ID NO:26的可变重链结构域(VH)和SEQ ID NO:27的可变轻链结构域(VL);和
 - b) 抗体包含SEQ ID NO:24的可变重链结构域(VH)和SEQ ID NO:25的可变轻链结构域(VL)。
6. 一种制备根据权利要求1至5中任一项所述的多特异性抗体的方法,其包括以下步骤:
 - 用包含核酸的载体转化宿主细胞,所述核酸编码
 - a) 如权利要求1至5之一中所限定的第一轻链,其源自特异性结合第一抗原的第一抗体;
 - b) 如权利要求1至5之一中所限定的第一重链,其源自特异性结合第一抗原的第一抗体;
 - c) 如权利要求1至5之一中所限定的第二轻链,其源自特异性结合第二抗原的第二抗体;和
 - d) 如权利要求1至5之一中所限定的第二重链,其源自特异性结合第二抗原的第二抗体,
 - 在允许合成所述多特异性抗体的条件下培养所述宿主细胞;和
 - 从所述宿主细胞培养物中回收所述多特异性抗体。
7. 一种宿主细胞,其包含

a) 包含核酸的载体,所述核酸编码如权利要求1-5之一所限定的源自特异性结合第一抗原的第一抗体的第一轻链;

b) 包含核酸的载体,所述核酸编码如权利要求1-5之一所限定的源自特异性结合第一抗原的第一抗体的第一重链;

c) 包含核酸的载体,所述核酸编码如权利要求1-5之一所限定的源自特异性结合第二抗原的第二抗体的第二轻链;和

d) 包含核酸的载体,所述核酸编码如权利要求1-5之一所限定的源自特异性结合第二抗原的第二抗体的第二重链。

8. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1至5中任一项所述的多特异性抗体与至少一种药学上可接受的载体的组合。

多特异性抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及新的多特异性抗体、其制备方法、含有所述抗体的药物组合物及其用途。

背景技术

[0002] 工程化蛋白质,如能够结合两种或更多种抗原的双特异性或多特异性抗体是本领域已知的。可以使用细胞融合、化学缀合或重组DNA技术产生此类多特异性结合蛋白。

[0003] 近来已经开发了各种各样的重组多特异性抗体形式,例如,通过融合例如IgG抗体形式与单链结构域的四价双特异性抗体(参见例如Coloma,M.J.等人Nature Biotech.15 (1997) 159-163;WO 2001/077342;和Morrison,S.L.,Nature Biotech.25 (2007) 1233-1234)。

[0004] 还开发了几种其他新形式,其中不再保留抗体核心结构(IgA、IgD、IgE、IgG或IgM);如能够结合两种或多种抗原的双、三或四抗体、小型抗体和几种单链形式(scFv、Bis-scFv)(Holliger,P.等人Nature Biotech.23 (2005) 1126-1136;Fischer,N.和Léger,O.,Pathobiology 74 (2007) 3-14;Shen,J.,等人J.Immunol.Methods 318 (2007) 65-74;Wu,C.等人,Nature Biotech.25 (2007) 1290-1297)。

[0005] 所有这些形式使用接头融合抗体核心(IgA、IgD、IgE、IgG或IgM)与其他结合蛋白(例如scFv)或融合例如两个Fab片段或scFv(Fischer,N.,和Léger,O.,Pathobiology 74 (2007) 3-14)。虽然显而易见接头在双特异性抗体的工程化中具有优势,但它们也可能在治疗情形中造成问题。事实上,这些外源肽可能会引发针对接头本身或蛋白质与接头之间连接点的免疫应答。此外,这些肽的柔韧性使得它们更易于蛋白水解切割,可能导致差的抗体稳定性、聚集和增加的免疫原性。另外,人们可能想要保留效应功能,如,例如,补体依赖性细胞毒性(CDC)或抗体依赖性细胞毒性(ADCC),其通过维持与天然存在的抗体的高度相似性通过Fc部分介导。

[0006] 因此,理想情况下,应该旨在开发与天然存在的抗体(如IgA、IgD、IgE、IgG或IgM)在一般结构上非常相似且与人序列偏离最小的双特异性抗体。

[0007] 在一种方法中,使用四价体瘤(quadroma)技术(参见Milstein,C.和Cuello,A.C.,Nature 305 (1983) 537-540)基于两种不同杂交瘤细胞系(其表达具有所需双特异性抗体特异性的鼠单克隆抗体)的体细胞融合产生了与天然抗体非常相似的双特异性抗体。由于在所得杂合杂交瘤(或四价体瘤)细胞系内随机配对两种不同的抗体重链和轻链,产生多达十种不同的抗体种类,其中仅一种是所需的功能性双特异性抗体。由于错配副产物的存在以及生产产率的显著降低,需要复杂的纯化程序(参见例如Morrison,S.L.,Nature Biotech.25 (2007) 1233-1234)。一般而言,如果使用重组表达技术,那么仍然存在错配副产物的相同问题。

[0008] 一种避免错配副产物问题的方法称为“杵入臼(knob-into-hole)技术”,其旨在通过将突变引入CH3结构域以修饰接触界面来强制配对两种不同的抗体重链。在一条链上,大

体积氨基酸被具有短侧链的氨基酸置换以产生“臼”。相反,具有大侧链的氨基酸被引入到另一个CH3结构域中,以产生“杵”。通过共表达这两条重链(和两条相同的轻链,其必须适用于两条重链),相对于同二聚体形成(“臼-臼”或“杵-杵”)观察到高产率的异二聚体形成(“杵-臼”(Ridgway, J.B. 等人, *Protein Eng.* 9 (1996) 617-621; 和 WO 96/027011)。通过使用噬菌体展示方法重塑两个CH3结构域的相互作用表面并引入二硫键桥以稳定异二聚体可进一步增加异二聚体的百分比 (Merchant, A.M. 等人, *Nature Biotech.* 16 (1998) 677-681; Atwell, S. 等人, *J. Mol. Biol.* 270 (1997) 26-35)。杵入臼技术的新方法在例如 EP 1 870 459 A1 中描述。虽然这种形式看起来非常有吸引力,但目前还没有数据描述向临床的进展。该策略的一个重要限制是两个亲本抗体的轻链必须相同以防止错配和形成无活性分子。因此,该技术不合作为从针对第一和第二抗原的两种抗体出发容易地开发针对三种或四种抗原的重组三或四特异性抗体的基础,因为这些抗体的重链和/或相同轻链必须首先被优化,然后必须加入针对第三和第四抗原的另外的抗原结合肽。

[0009] WO 2006/093794 涉及异二聚体蛋白质结合组合物。WO 99/37791 描述了多用途抗体衍生物。Morrison, S.L. 等人, *J. Immunol.* 160 (1998) 2802-2808 涉及可变区结构域交换对 IgG 功能性质的影响。

[0010] WO2013/02362 涉及异二聚体化的多肽。WO2013/12733 涉及包含异二聚体 Fc 区的多肽。WO2012/131555 涉及工程化的异二聚体免疫球蛋白。EP 2647707 涉及工程化的异二聚体免疫球蛋白。

[0011] WO 2009/080251、WO 2009/080252、WO 2009/080253、WO 2009/080254 和 Schaefer, W. 等人 PNAS, 108 (2011) 11187-11191 涉及具有结构域交叉的二价双特异性 IgG 抗体。

[0012] WO2015/101588A1 涉及血脑屏障穿梭组件。WO2015/101588A1 提及在 CH1/CL 界面中在具有突变的一个结合臂中具有 VH/VL 结构域交叉的二价双特异性抗体。WO2015/101588A1 没有提及所述突变的技术效果。

[0013] 在 WO 2009/080253 和 Schaefer, W. 等人 PNAS, 108 (2011) 11187-11191 中描述的在一个结合臂中具有 CL-CH1 置换的多特异性抗体 (CrossMAb^{CH1-CL}) 明显减少了由特异性结合第一抗原的第一抗体的轻链与特异性结合第二抗原的第二抗体的错误重链的错配引起的副产物形成(当与没有这种结构域交换的方法进行比较时)。然而,其制剂并不是完全没有副产物。副产物概况取决于在一个结合臂中具有 CL-CH1 置换的多特异性抗体的结构。另外,其热稳定性还可以得到改善。

[0014] 因此仍需要进一步减少不需要的副产物的方法,以提高纯度并改善多特异性抗体的热稳定性。

发明内容

[0015] 本发明涉及多特异性抗体,其包含源自特异性结合第一抗原的第一抗体的第一轻链和第一重链;以及源自特异性结合第二抗原的第二抗体的第二轻链和第二重链,其中在第二轻链中恒定结构域 CL 被第二重链的恒定结构域 CH1 置换;和在第二重链中恒定结构域 CH1 被第二轻链的恒定结构域 CL 置换;和其中在第一轻链的恒定结构域 CL 中,位置 124 (根据 Kabat 编号) 的氨基酸被选自 K、R 和 H 的氨基酸取代;和其中在第一重链的恒定结构域 CH1 中,

位置147 (根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸被选自E或D的氨基酸取代。

[0016] 本发明的一个实施方案涉及多特异性抗体,其中在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123 (根据Kabat编号)的氨基酸彼此独立地被选自K、R和H的氨基酸取代;和其中在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147和213 (根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸彼此独立地被选自E或D的氨基酸取代,和其中在第二重链的恒定结构域CL中,位置124 (根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代。

[0017] 本发明的另一方面是用于制备根据本发明的多特异性抗体的方法,其包括以下步骤:

[0018] -用包含核酸的载体转化宿主细胞,所述核酸编码

[0019] a) 如根据本发明的多特异性抗体所限定的源自特异性结合第一抗原的第一抗体的第一轻链;

[0020] b) 如根据本发明的多特异性抗体所限定的源自特异性结合第一抗原的第一抗体的第一重链;

[0021] c) 如根据本发明的多特异性抗体所限定的源自特异性结合第二抗原的第二抗体的第二轻链;和

[0022] d) 如根据本发明的多特异性抗体所限定的源自特异性结合第二抗原的第二抗体的第二重链,

[0023] -在允许合成所述多特异性抗体的条件下培养所述宿主细胞;和

[0024] -从所述宿主细胞培养物中回收所述多特异性抗体。

[0025] 本发明的另一方面是编码根据本发明的多特异性抗体的核酸。

[0026] 本发明的另一方面是包含根据本发明的核酸的载体,其中所述载体能够在宿主细胞中表达所述核酸。

[0027] 本发明的另一方面是包含根据本发明的载体的宿主细胞。

[0028] 本发明的另一方面是药物组合物,其包含根据本发明的多特异性抗体与至少一种药学上可接受的载体组合。

[0029] 本发明的另一方面是免疫缀合物,其包含偶联于细胞毒性剂的根据本发明的多特异性抗体。

[0030] 本发明的另一方面是根据本发明的多特异性抗体用于制备药物组合物的用途。

[0031] 本发明的另一方面是根据本发明的多特异性抗体用作药物。

[0032] 本发明的另一方面是包含根据本发明的多特异性抗体与至少一种药学上可接受的载体组合的药物组合物用作药物。

[0033] 本发明的另一方面是根据本发明的多特异性抗体用于制备药物的用途。

[0034] 本发明的另一方面是治疗患有疾病的患者的方法,其通过向需要这种治疗的患者施用根据本发明的多特异性抗体来实现。

[0035] 本发明的另一方面是产生多特异性抗体的方法,所述多特异性抗体包含源自特异性结合第一抗原的第一抗体的第一轻链和第一重链;和源自特异性结合第二抗原的第二抗体的第二轻链和第二重链,其中在第二轻链中恒定结构域CL被第二重链的恒定结构域CH1置换;和在第二重链中恒定结构域CH1被第二轻链的恒定结构域CL取代;

[0036] -所述方法包括从两种抗体中选择具有较高的聚集起始温度 (Tagg) 和/或热稳定

性的抗体作为第二抗体并引入结构域置换，

[0037] -所述方法还包括仅在具有较低聚集起始温度 (Tagg) 和/或热稳定性的第一抗体的重链的恒定结构域CH1和轻链的恒定结构域CL中引入以下氨基酸取代：

[0038] -在第一轻链的恒定结构域CL中，位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸彼此独立地被选自K、R和H的氨基酸取代；和其中在第一重链的恒定结构域CH1中，位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸彼此独立地被选自E或D的氨基酸取代，和其中在第二重链的恒定结构域CL中，位置124(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代。

[0039] 根据本发明，可以降低多特异性抗体产生期间不需要的副产物的形成并且可以增加热稳定性(例如聚集起始温度)，这是由于在CH1/CL结构域交叉多特异性抗体的非交叉结合臂中、在CH1和CL界面的特定位置上引入带相反电荷的氨基酸。由此，可以增加所需多特异性抗体的纯度和稳定性，特别是蛋白A和SEC纯化后的纯度。

附图说明

[0040] 图1:根据本发明的多特异性抗体的一些实例，其中一个抗体结合臂中具有CL-CH1结构域交换(CrossMab^{CH1-CL})和一个CH1/CL结构域界面中具有特定氨基酸取代：

[0041] 图1A:一个抗体结合臂中的CL-CH1结构域交换和另一个(“未交叉”)抗体结合臂的CH1/CL结构域界面中的特定突变。

[0042] 图1B:一个抗体结合臂中的CL-CH1结构域交换，其中在相同(“交叉”)抗体结合臂中具有一个特定突变，和另一个(“未交叉”)抗体结合臂的CH1/CL结构域界面中具有另外的特定突变。

[0043] 图1C:一个抗体结合臂中的CL-CH1结构域交换和另一个(“未交叉”)抗体结合臂的CH1/CL结构域界面中的特定突变，和两个抗体结合臂的VH/VL界面中另外的特定突变。

[0044] 图1D:在一个抗体结合臂的CL-CH1结构域交换，其中在相同(“交叉”)抗体结合臂中具有一个特定突变，和在另一个(“未交叉”)抗体结合臂的CH1/CL结构域界面中具有另外的特定突变，和两个抗体结合臂的VH/VL界面具有另外的特定突变。

[0045] 图1E:一个抗体结合臂的CL-CH1结构域交换和另一个(“未交叉”)抗体结合臂的CH1/CL结构域界面中的特定突变，和修饰CH3/CH3结构域界面以增强重链异二聚体化(如，例如杵入臼技术或可选的异二聚体化技术，如，例如带电荷的氨基酸被其各自的相反电荷取代)。

[0046] 图1F:一个抗体结合臂中的CL-CH1结构域交换和两个抗体结合臂的CH1/CL结构域界面中的特定突变(“未交叉”结合臂上的双重突变)，和修饰CH3/CH3结构域界面以增强重链异二聚体化(如，例如杵入臼技术或可选的异二聚体化技术，如，例如带电荷的氨基酸被其各自的相反电荷取代)。

[0047] 图1G:一个抗体结合臂中的CL-CH1结构域交换和另一个(“未交叉”)抗体结合臂的CH1/CL结构域界面中的特定突变，和两个抗体结合臂的VH/VL界面中另外的特定突变，和修饰CH3/CH3结构域界面以增强重链异二聚体化(如，例如杵入臼技术或可选的异二聚体化技术，如，例如带电荷的氨基酸被其各自的相反电荷取代)。

[0048] 图1H:一种抗体结合臂中的CL-CH1结构域交换和两个抗体结合臂的CH1/CL结构域界面中的特定突变(“未交叉”结合臂上的双重突变)和两个抗体结合臂的VH/VL界面中另外

的特定突变,和修饰CH3/CH3结构域界面以增强重链异二聚体化(如,例如杵入臼技术或可选的异二聚体化技术,如,例如带电荷的氨基酸被其各自的相反电荷取代)。

[0049] 图2:CH1和CL结构域中氨基酸取代的位置

[0050] 图2A:CH1结构域中的野生型(wt)氨基酸序列(显示四种IgG同种型),其中突出氨基酸位置147和213(根据Kabat编号)。

[0051] 图2B:K和 λ 同种型的CL结构域中的野生型(wt)氨基酸序列,其中带下划线和突出氨基酸位置123和124(根据Kabat EU索引编号)。

[0052] 发明详述

[0053] I) 定义

[0054] 术语“一(a)”、“一(an)”和“该”通常包括复数指示物,除非上下文另有明确指示。

[0055] 本文中术语“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。

[0056] “多特异性抗体”结合两个或更多个不同的表位(例如,两个、三个、四个或更多个不同的表位)。表位可以在相同或不同的抗原上。多特异性抗体的实例是结合两个不同表位的“双特异性抗体”。

[0057] 当抗体具有多于一种特异性时,识别的表位可以与单个抗原或与多于一种抗原相关联。

[0058] 如本文所用,术语“价”表示抗体分子中存在特定数目的结合位点。天然抗体例如具有两个结合位点并且是二价的。如此,术语“三价”表示抗体分子中存在三个结合位点。

[0059] “抗体特异性”是指由抗体选择性识别抗原的特定表位。天然抗体,例如,是单特异性的。如本文所用的术语“单特异性抗体”表示具有一个或多个结合位点的抗体,每个结合位点结合相同抗原的相同表位。

[0060] 表位是被抗体结合的抗原的区。术语“表位”包括能够特异性结合抗体的任何多肽决定簇。在某些实施方案中,表位决定簇包括分子(如氨基酸、聚糖侧链、磷酸基或磺酰基)的化学活性表面分组,并且在某些实施方案中,可以具有特定的三维结构特征和/或特定的电荷特征。在某些实施方案中,当抗体优先识别蛋白质和/或大分子的复杂混合物中的其靶抗原时,抗体被认为与抗原特异性结合。

[0061] 如本文所用,术语“结合”和“特异性结合”是指在体外测定法中,优选在具有纯化的野生型抗原的等离子体共振测定法(BIAcore,GE-Healthcare Uppsala,Sweden)中抗体与抗原表位的结合。

[0062] 抗体与抗原结合的亲和力由术语 k_a (从抗体/抗原复合物中抗体的结合速率常数)、 k_d (解离常数)和 K_D (k_d/k_a)定义。在一个实施方案中,结合或特异性结合意味着结合亲和力(K_D)为 10^{-8} mol/l或更低,在一个实施方案中为 10^{-8} M至 10^{-13} mol/l。因此,根据本发明的多特异性抗体特异性结合各抗原,其对抗原是特异的,结合亲和力(K_D)为 10^{-8} mol/l或更低,例如, 10^{-8} 至 10^{-13} mol/l的结合亲和力(K_D)。在一个实施方案中结合亲和力(K_D)为 10^{-9} 至 10^{-13} mol/l。

[0063] 可以通过BIAcore测定法(GE-Healthcare Uppsala,Sweden)研究抗体与Fc γ R III的结合。通过术语 k_a (从抗体/抗原复合物中抗体的结合速率常数)、 k_d (解离常数)和 K_D (k_d/k_a)

ka) 来定义结合亲和力。

[0064] 如本文所用的术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”是指单一氨基酸组合物的抗体分子的制剂。

[0065] 术语“嵌合”抗体是指这样的抗体,其中重链和/或轻链的一部分源自特定来源或物种,而重链和/或轻链的其余部分源自不同来源或物种。

[0066] 术语“人源化抗体”是指这样的抗体,其中框架或CDR已经被修饰以包含与亲本免疫球蛋白相比具有不同特异性的免疫球蛋白的CDR。在一个优选的实施方式中,将鼠CDR接枝到人抗体的框架区以制备“人源化抗体”。参见例如Riechmann,L.等人,Nature 332 (1988) 323-327;和Neuberger,M.S.等人,Nature 314 (1985) 268-270。本发明所涵盖的其他形式的人源化抗体是其中恒定区已被从原始抗体的恒定区另外修饰或改变以产生根据本发明的性质(特别是关于C1q结合和/或Fc受体(FcR)结合)的那些抗体。

[0067] 如本文所用,术语“人抗体”旨在包括具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。人抗体在现有技术中是众所周知的(van Dijk,M.A.,和van de Winkel,J.G.,Curr.Opin.Chem.Biol.5 (2001) 368-374)。也可以在转基因动物(例如小鼠)中产生人抗体,所述转基因动物在免疫接种时能够产生完整的人抗体谱系(repertoire)或人抗体的选择,而无内源性免疫球蛋白的产生。在这样的种系突变小鼠中转移人种系免疫球蛋白基因阵列将导致在抗原攻击时产生人抗体(参见,例如,Jakobovits,A.等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90 (1993) 2551-2555;Jakobovits,A.等人,Nature 362 (1993) 255-258;Bruggemann,M.等人,Year Immunol.7 (1993) 33-40)。还可以在噬菌体展示文库中产生人抗体(Hoogenboom,H.R.,和Winter,G.,J.Mol.Biol.227 (1992) 381-388;Marks,J.D.等人,J.Mol.Biol.222 (1991) 581-597)。Cole等人和Boerner等人的技术也可用于制备人单克隆抗体(Cole等人Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,p.77 (1985);和Boerner,P.等人,J.Immunol.147 (1991) 86-95)。如针对根据本发明的嵌合和人源化抗体已经提到的,本文所用的术语“人抗体”还包含这样的抗体,其例如通过“类别转换”即Fc部分的改变或突变(例如从IgG1到IgG4和/或IgG1/IgG4突变)在恒定区中被修饰以产生根据本发明的性质,特别是关于C1q结合和/或FcR结合。

[0068] 如本文所用,术语“重组人抗体”旨在包括通过重组方法制备、表达、产生或分离的所有人抗体,如从宿主细胞(如NS0或CHO细胞)或从人免疫球蛋白基因的转基因动物(例如小鼠)分离的抗体或用转染入宿主细胞的重组表达载体表达的抗体。这样的重组人抗体具有重排形式的可变区和恒定区。根据本发明的重组人抗体已经进行体内体细胞超突变。因此,重组抗体的VH和VL区的氨基酸序列是源自人种系VH和VL序列并且与其相关的序列,但是其可能并不天然存在于体内人抗体种系谱系中。

[0069] 如本文所用,术语“结合位点”或“抗原结合位点”表示配体(例如抗原或其抗原片段)实际结合的并且源自抗体的抗体分子区。抗原结合位点包括抗体重链可变结构域(VH)和/或抗体轻链可变结构域(VL)或VH/VL对。

[0070] 特异性结合所需抗原的抗原结合位点可以源自a)与抗原特异性结合的已知抗体或b)通过从头免疫接种方法获得的新抗体或抗体片段,特别是使用抗原蛋白或核酸或其片段或通过噬菌体展示。

[0071] 根据本发明的抗体的抗原结合位点可以含有六个互补决定区(CDR),其对抗原的

结合位点的亲和力具有不同程度的贡献。有三个重链可变结构域CDR (CDRH1、CDRH2和CDRH3) 和三个轻链可变结构域CDR (CDRL1、CDRL2和CDRL3)。通过与编译的氨基酸序列数据库进行比较确定CDR和框架区 (FR) 的范围,其中这些区根据序列间的变异性来限定。在本发明的范围内还包括由较少的CDR组成的功能性抗原结合位点(即,其中结合特异性由三、四或五个CDR确定)。例如,少于完整的一组6个CDR可能足以用于结合。在某些情况下,VH或VL域就足够了。

[0072] 来自任何脊椎动物物种的抗体(免疫球蛋白)的“轻链”可根据其恒定结构域的氨基酸序列归入两种不同类型之一,称为kappa (κ) 和lambda (λ)。野生型轻链通常含有两个免疫球蛋白结构域,通常为一个可变结构域 (VL) (其对结合抗原重要) 和恒定结构域 (CL)。

[0073] 存在定义抗体的类别或同种型的几种不同类型的“重链”。野生型重链包含一系列免疫球蛋白结构域,通常具有一个可变结构域 (VH) (其对结合抗原重要) 和几个恒定结构域 (CH1、CH2、CH3等)。

[0074] 术语“Fc结构域”在本文中用于定义包含至少一部分恒定区的免疫球蛋白重链的C-端区。例如在天然抗体中,Fc结构域由两个相同的蛋白片段组成,其源自IgG、IgA和IgD同种型中抗体的两条重链的第二和第三恒定结构域;IgM和IgE Fc结构域在每条多肽链中含有三个重链恒定结构域(CH结构域2-4)。如本文所用的“缺乏Fc结构域”是指本发明的双特异性抗体不包含CH2、CH3和CH4结构域;即恒定重链仅由一个或多个CH1结构域组成。

[0075] 如本文所用的“可变结构域”或“可变区”表示直接参与抗体与抗原结合的轻链和重链对中的每一者。轻链的可变结构域缩写为“VL”,重链的可变结构域缩写为“VH”。人轻链和重链的可变结构域具有相同的一般结构。每个可变结构域包含四个框架 (FR) 区,其序列是广泛保守的。FR通过三个“高变区”(或“互补决定区”,CDR) 连接。每条链上的CDR被这样的框架氨基酸分开。因此,抗体的轻链和重链从N-端至C-端方向包含结构域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。FR采用 β 片层构象,CDR可形成连接 β 片层结构的环。每条链中的CDR通过FR保持在其三维结构中并与来自另一条链的CDR一起形成“抗原结合位点”。特别地,重链的CDR3是对抗原结合贡献最大的区。CDR和FR区根据Kabat,等人Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD (1991) 的标准定义来确定。

[0076] 在本申请中使用的术语“恒定结构域”或“恒定区”表示除可变区以外的抗体结构域的总和。恒定区不直接参与抗原的结合,但表现出各种效应功能。

[0077] 根据其重链恒定区的氨基酸序列,将抗体分为以下类别:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,其中几个可进一步分成亚类,例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4、IgA1和IgA2。对应于不同抗体类别的重链恒定区分别被称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。可以在所有五种抗体类别中找到的轻链恒定区 (CL) 称为 κ (kappa) 和 λ (lambda)。如本文所用的“恒定结构域”来自人源,其来自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚类的人抗体的恒定重链区和/或恒定轻链 κ 或 λ 区。这样的恒定结构域和区在现有技术中是众所周知的,例如,由Kabat,等人Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD (1991) 描述。

[0078] 如本文所用,术语“三级结构”指根据本发明的抗体的几何形状。三级结构包含含有抗体结构域的多肽链骨架,而氨基酸侧链以多种方式相互作用并键结。

[0079] 如本文所用的术语“氨基酸”表示在位于羧基的 α 位置具有氨基部分的有机分子。氨基酸的实例包括：精氨酸、甘氨酸、鸟氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、甲硫氨酸、丝氨酸、脯氨酸。所用的氨基酸任选在每种情况下都是L-型。术语“带正电荷”或“带负电荷”的氨基酸是指在pH 7.4时氨基酸侧链的电荷。氨基酸可根据常见的侧链性质分组：

[0080] (1) 疏水性：正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

[0081] (2) 中性亲水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

[0082] (3) 酸性：Asp、Glu；

[0083] (4) 碱性：His、Lys、Arg；

[0084] (5) 影响链方向的残基：Gly、Pro；

[0085] (6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

[0086] 表-具有特定性质的氨基酸

氨基酸	3 字母	1 字母	侧链极性	侧链电荷 (pH 7.4)
丙氨酸	Ala	A	非极性	中性
精氨酸	Arg	R	碱性极性	正
天冬酰胺	Asn	N	极性	中性
天冬氨酸	Asp	D	酸性极性	负
半胱氨酸	Cys	C	非极性	中性
谷氨酸	Glu	E	酸性极性	负
谷氨酰胺	Gln	Q	极性	中性
甘氨酸	Gly	G	非极性	中性
组氨酸	His	H	碱性极性	正 (10%) 中性 (90%)
异亮氨酸	Ile	I	非极性	中性
亮氨酸	Leu	L	非极性	中性
赖氨酸	Lys	K	碱性极性	正
甲硫氨酸	Met	M	非极性	中性
苯丙氨酸	Phe	F	非极性	中性
脯氨酸	Pro	P	非极性	中性
丝氨酸	Ser	S	极性	中性
苏氨酸	Thr	T	极性	中性
色氨酸	Trp	W	非极性	中性
酪氨酸	Tyr	Y	极性	中性
缬氨酸	Val	V	非极性	中性

[0087]

[0088] 如本文所用，重链和轻链的所有恒定区和结构域的氨基酸位置根据Kabat, 等人，

Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service, National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991)中描述的Kabat编号系统编号,在本文中其被称为“根据Kabat等人编号”。具体而言,对于可变结构域和 κ 和 λ 同种型的轻链恒定结构域CL,使用Kabat,等人Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版, Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991)的Kabat编号系统(参见第647-660页),在本文中被称为“根据Kabat编号”,尽管如此,对于恒定重链结构域(CH1、铰链、CH2和CH3)使用Kabat EU索引编号系统(见第661-723页),在本文中被称为“根据Kabat的EU索引编号”。

[0089] 通过将适当的核苷酸改变引入抗体DNA或通过核苷酸合成来制备多特异性抗体的多肽链内的氨基酸取代(或突变)。但是,这样的修饰只能在非常有限的范围内进行,例如,如上所述。例如,这些修饰不会改变上述抗体特征,如IgG同种型和抗原结合,但可以进一步改善重组生产的产率、蛋白质稳定性或促进纯化。在某些实施方案中,提供了具有一个或多个保守氨基酸取代的抗体变体。

[0090] 通过重组方法产生根据本发明的抗体。重组产生抗体的方法在现有技术中广为人知,包括在原核和真核细胞中的蛋白质表达,随后分离抗体并通常纯化至药学上可接受的纯度。为了在宿主细胞中表达上述抗体,通过标准方法将编码相应(修饰的)轻链和重链的核酸插入到表达载体中。在合适的原核或真核宿主细胞如CHO细胞、NS0细胞、SP2/0细胞、HEK293细胞、COS细胞、PER.C6细胞、酵母或大肠杆菌细胞中进行表达,并从细胞(上清液或裂解后的细胞)中回收抗体。用于重组产生抗体的一般方法在现有技术中是公知的,并且描述在例如Makrides,S.C.,Protein Expr.Purif.17(1999)183-202;Geisse,S.等人Protein Expr.Purif.8(1996)271-282;Kaufman,R.J.,Mol.Biotechnol.16(2000)151-161;Werner,R.G.,Drug Res.48(1998)870-880的综述文章中。

[0091] 本文可互换使用的“多核苷酸”或“核酸”是指任何长度的核苷酸的聚合物,包括DNA和RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、修饰的核苷酸或碱基和/或其类似物,或可以通过DNA或RNA聚合酶或通过合成反应掺入聚合物的任何底物。多核苷酸可以包含修饰的核苷酸,如甲基化的核苷酸及其类似物。核苷酸序列可以被非核苷酸组分中断。多核苷酸可以包含合成后制备的修饰,如缀合至标记。其他类型的修饰包括例如“帽”、用类似物取代一个或多个天然存在的核苷酸、核苷酸间修饰,如,例如具有不带电荷的键(linkage)(例如甲基磷酸酯、磷酸三酯、磷酰胺酯、氨基甲酸酯等)和具有带电荷的键(例如,硫代磷酸酯,二硫代磷酸酯等)的那些修饰、含有悬垂(pendant)部分(如,例如蛋白质(例如核酸酶、毒素、抗体、信号肽、ply-L-赖氨酸等))的那些修饰,含有嵌入剂(例如吡啶、补骨脂素(psoralen)等)的那些修饰、含有螯合剂(例如金属、放射性金属、硼、氧化金属等)的那些修饰、含有烷化剂的那些修饰、具有修饰的键(例如 α 异头核酸等)的那些修饰、以及多核苷酸的未修饰形式。此外,通常存在于糖中的任何羟基可以被例如磷酸酯基团、磷酸酯基团置换、被标准保护基团保护、或被活化以制备另外的到其他核苷酸的键、或者可以被缀合到固体或半固体支持物。5'和3'端OH可被磷酸化或被胺或1至20个碳原子的有机加帽基团取代。其他羟基也可以衍生成标准保护基团。多核苷酸还可以含有本领域通常已知的核糖或脱氧核糖糖的类似物形式,包括例如2'-O-甲基-、2'-O-烯丙基-、2'-氟-或2'-叠氨基-核糖、碳环糖类似物、 α -异头糖、差向异构糖如阿拉伯糖、木糖或来苏糖、吡喃糖、呋喃糖、景

天庚酮糖、无环类似物和碱性核苷类似物如甲基核糖苷。一个或多个磷酸二酯键可以被替代的连接基团置换。这些替代的连接基团包括但不限于以下实施方案,其中磷酸盐被P(O)S (“硫代酸酯”)、P(S)S (“二硫代酸酯”)、(O)NR₂ (“酰胺化物”)、P(O)R、P(O)OR’、CO或CH₂ (“formacetal”) 置换,其中每个R或R’独立地为H或取代或未取代的烷基(1-20C),任选地含有醚(-O-)键、芳基、烯基、环烷基、环烯基或芳烷基(araldyl)。不是多核苷酸中的所有键都需要相同。前面的描述适用于本文涉及的所有多核苷酸,包括RNA和DNA。

[0092] “分离的”核酸是指已从其天然环境的组分中分离的核酸分子。分离的核酸包括通常含有核酸分子的细胞中含有的核酸分子,但核酸分子存在于染色体外或存在于与其天然染色体位置不同的染色体位置。

[0093] 如本文所用,术语“载体”是指能够使与其连接的另一核酸增殖的核酸分子。该术语包括作为自我复制的核酸结构的载体以及整合到其已掺入的宿主细胞基因组中的载体。该术语包括主要用于将DNA或RNA插入细胞中(例如染色体整合)的载体、主要用于复制DNA或RNA的载体复制、以及用于转录和/或翻译DNA或RNA的表达载体。还包括提供多于一种所描述功能的载体。

[0094] “表达载体”是能够指导其可操作地连接的核酸表达的载体。当表达载体被引入合适的宿主细胞时,它可以被转录并翻译成多肽。当在根据本发明的方法中转化宿主细胞时,使用“表达载体”;因此如本文所述与宿主细胞转化有关的术语“载体”意指“表达载体”。“表达系统”通常是指包含表达载体的合适的宿主细胞,所述表达载体可用于生产所需的表达产物。

[0095] 如本文所用,“表达”是指将核酸转录成mRNA的过程和/或转录的mRNA(也称为转录本)随后被翻译成肽、多肽或蛋白质的过程。转录本和编码的多肽统称为基因产物。如果多核苷酸源自基因组DNA,则在真核细胞中的表达可包括mRNA的剪接。

[0096] 如本文所用的术语“转化”是指将载体/核酸转移到宿主细胞中的过程。如果使用没有强大细胞壁屏障的细胞作为宿主细胞,则通过如Graham和Van der Eh, *Virology* 52 (1978) 546ff所述的磷酸钙沉淀方法进行转染。然而,也可以使用其他方法将DNA引入细胞,如通过核注射或通过原生质体融合。如果使用原核细胞或含有大量细胞壁构造的细胞,则一种转染方法是例如使用氯化钙的钙处理,如Cohen, F.N, 等人 *PNAS* 69 (1972) 7110et seq 所述。

[0097] 如在本申请中使用的术语“宿主细胞”表示可被工程化以产生根据本发明的抗体的任何种类的细胞系统。

[0098] 如本文所用,表述“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用,并且所有这样的指定包括子代。因此,词语“转化体”和“转化细胞”包括原代受试细胞和由其衍生的培养物,而不考虑转移的数量。还应该理解的是,由于有意或无意的突变,所有子代在DNA含量上可能不完全相同。包括与针对最初转化的细胞所筛选的具有相同功能或生物学活性的变体子代。在意图明确指定的地方,从上下文可以清楚地看出。

[0099] 在例如Barnes, L.M. 等人 *Cytotechnology* 32 (2000) 109-123; Barnes, L.M. 等人 *Biotech. Bioeng.* 73 (2001) 261-270中描述了NS0细胞中的表达。在例如Durocher, Y. 等人 *Nucl. Acids. Res.* 30 (2002) E9中描述了瞬时表达。Orlandi, R. 等人 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 3833-3837; Carter, P. 等人 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

89 (1992) 4285-4289; 和Norderhaug, L. 等人 *J. Immunol. Methods* 204 (1997) 77-87 描述了可变结构域的克隆。Schlaeger, E.-J. 和Christensen, K. 在 *Cytotechnology* 30 (1999) 71-83 中和Schlaeger, E.-J., *J. Immunol. Methods* 194 (1996) 191-199 中描述了优选的瞬时表达系统 (HEK 293)。

[0100] 可以对宿主细胞产生的抗体进行从重链C-端的一个或多个、特别是一个或两个氨基酸的翻译后切割。因此, 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, 或者其可以包括全长重链的切割变体 (本文中也称为切割的变体重链)。当重链的最后两个C-端氨基酸是甘氨酸 (G446) 和赖氨酸 (K447, 根据Kabat EU索引编号) 时, 可能是这种情况。

[0101] 因此, 如果未另外指明, 包含CH3结构域的重链的氨基酸序列在本文中表示不含C-端甘氨酸-赖氨酸二肽。

[0102] 本发明的组合物, 如本文所述的药物组合物, 包含本发明的抗体群。抗体群可以包含具有全长重链的抗体和具有切割的变体重链的抗体。在一个实施方案中, 抗体群由具有全长重链的抗体和具有切割的变体重链的抗体的混合物组成, 其中至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%的抗体具有切割的变体重链。

[0103] 通过标准技术 (包括碱/SDS处理、CsCl显带、柱色谱法、琼脂糖凝胶电泳和本领域公知的其他技术) 进行抗体纯化 (从宿主细胞培养物中回收抗体) 以消除细胞组分或其他污染物, 例如, 其他细胞核酸或蛋白质。参见Ausubel, F. 等人编辑 *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)。很好地建立了不同的方法并被广泛用于蛋白质纯化, 如使用微生物蛋白质的亲和色谱法 (例如蛋白A或蛋白G亲和色谱法)、离子交换色谱法 (例如阳离子交换 (羧甲基树脂)、阴离子交换 (氨基乙基树脂) 和混合模式交换)、亲硫吸附法 (例如用 β -巯基乙醇和其他SH配体)、疏水相互作用或芳族吸附色谱法 (例如用苯基-琼脂糖、氮杂-arenophilic树脂或间氨基苯基硼酸)、金属螯合物亲和色谱法 (例如用Ni (II) - 和Cu (II) - 亲和材料)、尺寸排阻色谱和电泳方法 (如凝胶电泳、毛细管电泳) (Vijayalakshmi, M.A., *Appl. Biochem. Biotech.* 75 (1998) 93-102)。

[0104] 术语“药物组合物”是指一种制剂, 其为允许其中所含活性成分的生物学活性有效的形式, 并且其不含对施用该组合物的受试者是不可接受的毒性的其他组分。本发明的药物组合物可以通过本领域已知的多种方法施用。如本领域技术人员将理解的, 施用的途径和/或模式将根据所需结果而变化。为了通过某些施用途径施用根据本发明的抗体, 可能需要用防止抗体失活的物质包被抗体或与防止抗体失活的物质共同施用抗体。例如, 抗体可以在合适的载体 (例如脂质体或稀释剂) 中施用给受试者。药学上可接受的稀释剂包括生理盐水和水性缓冲溶液。

[0105] “药学上可接受的载体”是指除了活性成分之外的药物制剂中的成分, 其对受试者是无毒的。药学上可接受的载体包括生理上相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。在一个优选的实施方案中, 载体适用于静脉内、肌肉内、皮下、肠胃外、脊髓或表皮施用 (例如通过注射或输注)。

[0106] 根据本发明的药物组合物还可以含有佐剂, 如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。可通过上文的灭菌程序和通过包括各种抗菌剂和抗真菌剂 (例如对羟基苯甲酸酯、氯丁

醇、苯酚、山梨酸等)来确保防止微生物的存在。还可能需要在组合物中包括等渗剂,如糖、氯化钠等。另外,可通过包括延迟吸收的试剂如单硬脂酸铝和明胶引起可注射药物形式的延长的吸收。

[0107] 如本文所用,短语“肠胃外施用”和“肠胃外施用”是指除肠内和局部施用之外的施用模式,通常通过注射施用,包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眼眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、被膜下、蛛网膜下、脊髓内、硬膜外和胸骨内注射和输注。

[0108] 无论选择何种施用途径,通过本领域技术人员已知的常规方法将本发明的化合物(其可以以合适的水合形式使用)和/或本发明的药物组合物配制成药学上可接受的剂型。

[0109] 本发明药物组合物中活性成分的实际剂量水平可以变化,以获得有效实现对特定患者、组合物和施用模式所需的治疗反应而对患者无毒性的活性成分的量。所选剂量水平将取决于多种药代动力学因素,包括所用本发明特定组合物的活性、施用途径、施用时间、所用特定化合物的排泄速率、治疗的持续时间、与所用特定组合物组合使用的其他药物、化合物和/或物质、所治疗患者的年龄、性别、体重、状况、一般健康状况和既往病史,以及医学领域众所周知的类似因素。

[0110] 组合物必须是无菌的并且流体达到组合物可以通过注射器递送的程度。除了水以外,在一个实施方案中,载体是等渗缓冲生理盐溶液。

[0111] 例如,通过使用如卵磷脂的包衣、通过维持在分散情况下的所需粒度和通过使用表面活性剂,可以维持适当的流动性。在许多情况下,优选在组合物中包含等渗剂,例如糖、多元醇如甘露糖醇或山梨醇和氯化钠。

[0112] “免疫缀合物”是与一种或多种异源分子(包括但不限于细胞毒性剂)缀合的抗体。

[0113] 如本文所用的术语“细胞毒性剂”是指抑制或防止细胞功能和/或引起细胞死亡或破坏的物质。细胞毒性剂包括但不限于放射性同位素(例如,At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、Pb²¹²和Lu的放射性同位素);化疗剂或药物(例如甲氨蝶呤、阿霉素、长春花生物碱(长春新碱、长春碱、依托泊苷)、多柔比星、美法仑、丝裂霉素C、苯丁酸氮芥、柔红霉素或其他嵌入剂);生长抑制剂;酶及其片段如核酸分解酶;抗生素;毒素如细菌、真菌、植物或动物来源的小分子毒素或酶促活性毒素,包括其片段和/或变体;以及下面公开的各种抗肿瘤或抗癌剂。

[0114] 如本文所用,术语“癌症”指增殖性疾病,如淋巴瘤、淋巴细胞性白血病、肺癌、非小细胞肺癌(NSCL)、细支气管肺泡细胞肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头或颈部癌、皮肤或眼内黑素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛门区癌、胃癌、胃癌、结肠癌、乳癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金病、食道癌、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、脊髓轴肿瘤、脑干胶质瘤、多形性成胶质细胞瘤、星形细胞瘤、许旺氏细胞瘤(schwannomas)、室管膜细胞瘤、成神经管细胞瘤、脑膜瘤、鳞状细胞癌、垂体腺瘤和尤文氏肉瘤,包括上述癌症的任何难治性版本,或一种或多种上述癌症的组合。

[0115] 如本文所用,“人VEGF”是指人血管内皮生长因子(VEGF/VEGF-A),其描述于例如Leung,D.W.等人Science 246(1989)1306-9;Keck,P.J.等人Science 246(1989)1309-12和

Connolly, D.T. 等人 *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 20017-24。VEGF 参与调节与肿瘤和眼内疾病相关的正常和异常血管生成和新血管形成 (Ferrara, N. 等人 *Endocr. Rev.* 18 (1997) 4-25; Berkman, R.A. 等人 *J. Clin. Invest.* 91 (1993) 153-159; Brown, L.F. 等人 *Human Pathol.* 26 (1995) 86-91; Brown, L.F. 等人 *Cancer Res.* 53 (1993) 4727-4735; Mattern, J. 等人 *Brit. J. Cancer.* 73 (1996) 931-934; 和 Dvorak, H. 等人 *Am. J. Pathol.* 146 (1995) 1029-1039)。VEGF 是从几种来源分离的同二聚体糖蛋白。VEGF 对内皮细胞显示高度特异的促有丝分裂活性。

[0116] 如本文中使用的“人 ANG-2”是指人血管生成素-2 (ANG-2) (或者缩写为 ANGPT2 或 ANG2), 其描述于 Maisonpierre, P.C. 等人 *Science* 277 (1997) 55-60 和 Cheung, A.H. 等人 *Genomics* 48 (1998) 389-91 中。血管生成素-1 和血管生成素-2 作为 Ties (选择性表达在血管内皮中的酪氨酸激酶家族) 的配体被发现 (Yancopoulos, G.D. 等人 *Nature* 407 (2000) 242-48)。现在有 4 个明确的血管生成素家族成员。血管生成素-3 和-4 (Ang-3 和 Ang-4) 可代表小鼠和人中相同基因座的广泛分歧的对应物 (Kim, I. 等人 *FEBS Lett.* 443 (1999) 353-56; Kim, I. 等人 *J Biol Chem* 274 (1999) 26523-28)。

[0117] 人 TWEAK (UniProtKB 043508, TNF 相关的凋亡弱诱导剂) 是细胞表面相关的 II 型跨膜蛋白。在 Chicheportiche, Y. 等人 *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 32401-32410; Marsters, S.A. 等人 *Curr. Biol.* 8 (1998) 525-528; Lynch, C.N. 等人 *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 8455-8459 中描述了 TWEAK。TWEAK 的活性形式是可溶性同三聚体。人和鼠 TWEAK 在受体结合结构域中显示 93% 的序列同一性。TWEAK 受体 Fn14 (成纤维细胞生长因子可诱导的 14kDa 蛋白质) 是 129aa 的 I 型跨膜蛋白, 其由配体结合结构域中的一个单个富含半胱氨酸的结构域组成。通过 NF- κ B 通路激活发生 TWEAK 的信号传导。TWEAK mRNA 在多种组织中表达, 并在大多数主要器官如心脏、脑、骨骼肌和胰腺、与免疫系统相关的组织 (如脾、淋巴结和胸腺) 中发现。已经在心脏、脑、肺、胎盘、血管 EC 和平滑肌细胞中检测到 Fn14 mRNA。无 TWEAK (TWEAK-null) 和无 Fn14 (Fn14-null) 的基因敲除小鼠是活的、健康的和可生育的, 并具有更多的自然杀伤细胞并显示增强的先天性炎症反应。TWEAK 参与凋亡、增殖、血管生成、缺血半影区、脑水肿、多发性硬化。

[0118] 人 IL-17 (也称为 IL17-A; CTLA-8, Swiss Prot Q16552, IL17) 是由参与多发性硬化的发病机制的记忆 T 细胞亚组 (称为 Th17) 产生的促炎性细胞因子。IL-17A 在诱导其他炎性细胞因子、趋化因子和粘附分子中起作用。用 IL-17A 中和抗体处理动物降低自身免疫性脑脊髓炎的发病率和严重程度 (Komiyama, Y. 等人 *J. Immunol.* 177 (2006) 566-573)。IL-17A 在 MS 患者的脑脊液中过表达 (Hellings, P.W. 等人 *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.* 28 (2003) 42-50; Matuszewicz, D. 等人 *Multiple Sclerosis* 5 (1999) 101-104; WO 2005/051422)。此外, IL-17A 中和抗体降低胶原蛋白诱导的关节炎的小鼠类风湿性关节炎模型的严重性和发病率, 并且可以在 RA 患者的炎症关节的滑液中检测到高水平的 IL-17A (Ziolkowska, M. 等人 *J. Immunol.* 164 (2000) 2832-2838; Kotake, S. 等人 *J. Clin. Invest.* 103 (1999) 1345-1352; Hellings, P.W. 等人 *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.* 28 (2003) 42-50)。

[0119] II) 发明具体实施方案的详细描述

[0120] 在 WO 2009/080253 和 Schaefer, W. 等人 *PNAS*, 108 (2011) 11187-11191 (其通过引用并入本文) 中详细描述了在一个结合臂中具有 CL-CH1 置换的多特异性抗体 (CrossMab^{CH1})

^{-CL})。利用这些抗体,可以显著降低由特异性结合第一抗原的第一抗体的轻链与特异性结合第二抗原的第二抗体的错误重链的错配引起的副产物形成(当与没有这种结构域交换的方法进行比较时)。然而,其制剂并不是完全没有副产物。副产物概况取决于在一个结合臂中具有CL-CH1置换/交换的多特异性抗体的结构。此外,有时一个结合臂中的CL-CH1置换/交换导致抗体聚集温度的轻微降低,其对于生产、纯化和长期稳定性是重要的性质。

[0121] 本发明提供通过用相反电荷的氨基酸分别取代CH1和CL结构域界面中的特定氨基酸来进一步降低不需要的副产物的形成和/或增加聚集温度的方法。用特定氨基酸对多特异性抗体的另一CL结构域中的另外的取代可能是更有益的。多特异性抗体的VH和VL结构域中的特定氨基酸的另外的取代可能是进一步有益的。

[0122] 因此,本发明涉及多特异性抗体,其包含

[0123] a) 源自特异性结合第一抗原的第一抗体的第一轻链和第一重链;和

[0124] b) 源自特异性结合第二抗原的第二抗体的第二轻链和第二重链,其中在第二轻链中恒定结构域CL被第二重链的恒定结构域CH1置换;和在第二重链中恒定结构域CH1被第二轻链的恒定结构域CL置换;和

[0125] i) 其中在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸彼此独立地被带正电荷的氨基酸取代;和其中在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸彼此独立地被带负电荷的氨基酸取代。

[0126] 根据本发明的概念,根据本发明的抗体在具有CH1/CL结构域置换的结合臂中不包括另外的VH/VL结构域交换。

[0127] 因此,本发明的一个实施方案涉及多特异性抗体,其包含

[0128] a) 源自特异性结合第一抗原的第一抗体的第一轻链和第一重链;和

[0129] b) 源自特异性结合第二抗原的第二抗体的第二轻链和第二重链,其中在第二轻链中恒定结构域CL被第二重链的恒定结构域CH1置换;和在第二重链中恒定结构域CH1被第二轻链的恒定结构域CL置换;和

[0130] i) 其中在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸彼此独立地被带正电荷的氨基酸取代;和其中在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸彼此独立地被带负电荷的氨基酸取代,

[0131] 其中第二轻链包含第二抗体的可变结构域VL,第二重链包含第二抗体的可变结构域VH。

[0132] 在本发明的一个实施方案中,带负电荷的氨基酸选自E和D。在本发明的一个实施方案中,带负电荷的氨基酸是E。在本发明的一个实施方案中,带负电荷的氨基酸是D。

[0133] 在本发明的一个实施方案中,带正电荷的氨基酸选自K、R和H。在本发明的一个实施方案中,带正电荷的氨基酸选自K和R。在本发明的一个实施方案中,带正电荷的氨基酸是K。在本发明的一个实施方案中,带正电荷的氨基酸是R。

[0134] 在一个实施方案中,本发明涉及多特异性抗体,其包含

[0135] a) 源自特异性结合第一抗原的第一抗体的第一轻链和第一重链;和

[0136] b) 源自特异性结合第二抗原的第二抗体的第二轻链和第二重链,其中在第二轻链中恒定结构域CL被第二重链的恒定结构域CH1置换;和在第二重链中恒定结构域CH1被第二轻链的恒定结构域CL置换;和

[0137] i) 其中在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸彼此独立地被选自K、R和H的氨基酸取代;和其中在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸彼此独立地被选自E或D的氨基酸取代。

[0138] 在本发明的一个实施方案中,在恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸彼此独立地被选自K和R的氨基酸取代。

[0139] 在本发明的一个实施方案中,在恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸被K取代。

[0140] 在本发明的一个实施方案中,在 λ 同种型的恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸被K取代。

[0141] 在本发明的一个实施方案中,在恒定结构域CL中,位置124的氨基酸被K取代,位置123的氨基酸被R取代(根据Kabat编号)。抗体的CL结构域内的这种突变可以另外提供抗体分子的有利安全概况(组合相应CH1结构域中,位置147和213的用带负电荷的氨基酸的突变,以及任选地任何另外的氨基酸取代,例如本文所公开的,在抗体的另一CL结构域中或在VH/VL中的取代)。与本文所述的其他突变进行比较时,所述CL结构域的氨基酸序列的分析揭示了较少的T细胞表位。

[0142] 在本发明的一个实施方案中,在恒定结构域CL中,位置124的氨基酸被R取代,位置123的氨基酸被K取代(根据Kabat编号)。

[0143] 在本发明的一个实施方案中,在 κ 同种型的恒定结构域CL中,位置124的氨基酸被R取代,位置123的氨基酸被K取代(根据Kabat编号)。

[0144] 在本发明的一个实施方案中,在恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸被R取代。

[0145] 在本发明的一个实施方案中,在恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸被E取代。

[0146] 在本发明的一个实施方案中,在恒定结构域CH1中,位置147的氨基酸被E取代,位置213的氨基酸被D取代(根据Kabat的EU索引编号)。

[0147] 在本发明的一个实施方案中,在恒定结构域CH1中,位置147的氨基酸被D取代,位置213的氨基酸被E取代(根据Kabat的EU索引编号)。

[0148] 在本发明的一个实施方案中,在恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸被D取代。

[0149] 在本发明的一个实施方案中,在恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸彼此独立地被选自K和R的氨基酸取代,在恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸彼此独立地被选自E或D的氨基酸取代。

[0150] 在本发明的一个实施方案中,在恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸被K取代,在恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸被E取代。

[0151] 在本发明的一个实施方案中,在恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸被K取代,在恒定结构域CH1中,位置147的氨基酸被E取代,以及位置213的氨基酸被D取代(根据Kabat的EU索引编号)。

[0152] 在本发明的一个实施方案中,在恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)

的氨基酸被K取代,在恒定结构域CH1中,位置147的氨基酸被D取代,和位置213的氨基酸被E取代(根据Kabat的EU索引编号)。

[0153] 在本发明的一个实施方案中,在恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸被K取代,在恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸被D取代。

[0154] 在本发明的一个实施方案中,在恒定结构域CL中,位置124的氨基酸被K取代,和位置123的氨基酸被R取代,在恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸被E代替。

[0155] 在本发明的一个实施方案中,在恒定结构域CL中,位置124的氨基酸被K取代,和位置123的氨基酸被R取代,在恒定结构域CH1中,位置147的氨基酸被E取代,和位置213的氨基酸被D取代(根据Kabat的EU索引编号)。

[0156] 在本发明的一个实施方案中,在恒定结构域CL中,位置124的氨基酸被K取代,和位置123的氨基酸被R取代,在恒定结构域CH1中,位置147的氨基酸被D取代,和位置213的氨基酸被E取代(根据Kabat的EU索引编号)。

[0157] 在本发明的一个实施方案中,在恒定结构域CL中,位置124的氨基酸被K取代,和位置123的氨基酸被R取代,在恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸被D取代。

[0158] 在本发明的一个实施方案中,在恒定结构域CL中,位置124的氨基酸被R取代,和位置123的氨基酸被K取代(根据Kabat编号),在恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸被E取代。

[0159] 在本发明的一个实施方案中,在恒定结构域CL中,位置124的氨基酸被R取代,和位置123的氨基酸被K取代(根据Kabat编号),在恒定结构域CH1中,位置147的氨基酸被E取代和位置213的氨基酸被D取代(根据Kabat的EU索引编号)。

[0160] 在本发明的一个实施方案中,在恒定结构域CL中,位置124的氨基酸被R取代,和位置123的氨基酸被K取代(根据Kabat编号),在恒定结构域CH1中,位置147的氨基酸被D取代和位置213的氨基酸被E取代(根据Kabat的EU索引编号)。

[0161] 在本发明的一个实施方案中,在恒定结构域CL中,位置124的氨基酸被R取代,和位置123的氨基酸被K取代(根据Kabat编号),在恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸被D取代。

[0162] 在本发明的一个实施方案中,在恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸被R取代,在恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸被E取代。

[0163] 在本发明的一个实施方案中,在恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸被R取代,在恒定结构域CH1中,位置147的氨基酸被E取代,和位置213的氨基酸被D取代(根据Kabat的EU索引编号)。

[0164] 在本发明的一个实施方案中,在恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸被R取代,在恒定结构域CH1中,位置147的氨基酸被D取代,和位置213的氨基酸被E取代(根据Kabat的EU索引编号)。

[0165] 在本发明的一个实施方案中,在恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)

的氨基酸被R取代,在恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸被D取代。

[0166] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸彼此独立地被选自K和R的氨基酸取代。

[0167] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸被K替代。

[0168] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124的氨基酸被K取代,和位置123的氨基酸被R取代(根据Kabat编号)。

[0169] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124的氨基酸被R取代,和位置123的氨基酸被K取代(根据Kabat编号)。

[0170] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸被R取代。

[0171] 在本发明的一个实施方案中,在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸被E取代。

[0172] 在本发明的一个实施方案中,在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147的氨基酸被E取代,和位置213的氨基酸被D取代(根据Kabat的EU索引编号)。

[0173] 在本发明的一个实施方案中,在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147的氨基酸被D取代,和位置213的氨基酸被E取代(根据Kabat的EU索引编号)。

[0174] 在本发明的一个实施方案中,在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸被D取代。

[0175] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123的氨基酸(根据Kabat编号)彼此独立地被选自K和R的氨基酸取代,在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸彼此独立地被选自E或D的氨基酸取代。

[0176] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸被K取代,在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸被E取代。

[0177] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸被K取代,在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147的氨基酸被E取代,位置213的氨基酸被D取代(根据Kabat的EU索引编号)。

[0178] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸被K取代,在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147的氨基酸被D取代,位置213的氨基酸被E取代(根据Kabat的EU索引编号)。

[0179] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸被K取代,在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)被D取代。

[0180] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124的氨基酸被K取代,位置123的氨基酸被R取代,在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸被E取代。

[0181] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124的氨基酸被K取代,位置123的氨基酸被R取代,在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147的氨基酸被E取代,位置213的氨基酸被D取代(根据Kabat的EU索引编号)。

[0182] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124的氨基酸被K取代,位置123的氨基酸被R取代,在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147的氨基酸被D取代,位置213的氨基酸被E取代(根据Kabat的EU索引编号)。

[0183] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124的氨基酸被K取代,位置123的氨基酸被R取代,在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147和213的氨基酸(根据Kabat的EU索引编号)被D替代。

[0184] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124的氨基酸被R取代,位置123的氨基酸被K取代(根据Kabat编号),在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸被E取代。

[0185] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124的氨基酸被R取代,位置123的氨基酸被K取代(根据Kabat编号),在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147的氨基酸被E取代,位置213的氨基酸被D取代(根据Kabat的EU索引编号)。

[0186] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124的氨基酸被R取代,位置123的氨基酸被K取代(根据Kabat编号),在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147的氨基酸被D取代,位置213的氨基酸被E取代(根据Kabat的EU索引编号)。

[0187] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124的氨基酸被R取代,位置123的氨基酸被K取代(根据Kabat编号),在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸被D取代。

[0188] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸被R取代,在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸被E取代。

[0189] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸被R取代,在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147的氨基酸被E取代,位置213的氨基酸被D取代(根据Kabat的EU索引编号)。

[0190] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸被R取代,在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147的氨基酸被D取代,位置213的氨基酸被E取代(根据Kabat的EU索引编号)。

[0191] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸被R取代,在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸被D取代。

[0192] 如本文所用的“抗体的轻链”是在N-端至C-端方向上包含抗体轻链可变结构域(VL)和抗体轻链恒定结构域(CL)(缩写为VL-CL)的多肽。如本文所用的“抗体的重链”是在N-端至C-端方向上包含抗体重链可变结构域(VH)和抗体重链恒定结构域1(CH1)的多肽。在本发明的一个优选实施方案中,抗体的重链在N-端至C-端方向上包含抗体重链可变结构域(VH)、抗体重链恒定结构域1(CH1)、抗体重链恒定结构域2(CH2)和抗体重链恒定结构域3(CH3),缩写为VH-CH1-CH2-CH3。

[0193] 因此,在根据本发明的多特异性抗体中,在源自所述第一抗体的所述第一轻链中,轻链结构域的顺序安排(CL-VL)保持不变。在源自所述第一抗体的所述第一重链中,重链结构域的顺序安排(CH1-CL或CH3-CH2-CH1-CL)保持不变。由于源自所述第一抗体的Fab区不包含结构域交叉,因此该区在本文中也称为根据本发明的多特异性抗体的“非交叉Fab区”。

[0194] 在本发明的一个实施方案中,多特异性抗体包含第一轻链和第一重链,所述第一轻链在N-端至C-端方向上包含顺序安排的VL和CL结构域(即从N-端至C-端方向的VL-CL),所述第一重链在N-端至C-端方向上包含顺序安排的VH和CH1结构域(即从N-端至C-端方向的VH-CH1),其中第一轻链和第一重链源自特异性结合第一抗原的第一抗体。

[0195] 在本发明的一个实施方案中,多特异性抗体包含第一轻链和第一重链,所述第一轻链在N-端至C-端方向上包含顺序安排的VL和CL结构域(即从N-端至C-端方向的VL-CL),所述第一重链在N-端至C-端方向上包含顺序安排的VH、CH1、CH2和CH3结构域(即从N-端至C-端方向的VH-CH1-CH2-CH3),其中第一轻链和第一重链源自特异性结合第一抗原的第一抗体。

[0196] 相反,在所述第二轻链(其在本文中也称为“修饰的第二轻链”或“LC*”)中,原始恒定结构域CL被(原始)第二重链的恒定结构域CH1置换。因此,修饰的第二轻链由第二轻链的原始可变结构域VL和来自所述第二抗体的第二重链的CH1结构域构成。因此,所述修饰的第二轻链的轻链结构域的顺序安排是VL-CH1(从N-端至C-端方向上)。

[0197] 另外,在所述第二重链(其在本文中也称为“修饰的第二重链”或“HC*”)中,原始恒定结构域CH1被(原始)第二轻链的恒定结构域CL置换。因此,修饰的第二重链至少包含第二重链的原始可变结构域VH和源自所述第二抗体的第二轻链的CL结构域的顺序安排构成。因此,所述修饰的第二重链的重链结构域的顺序安排至少是VH-CL(从N-端至C-端方向上)。

[0198] 总之,在源自所述第二抗体的所述第二重链和所述第二轻链中,恒定结构域CL和CH1相互置换。如上所述,由于源自所述第二抗体的Fab区包含CH1-CL结构域交叉,因此该区在本文中也称为根据本发明的多特异性抗体的“交叉CH1-CL Fab区”。因此,根据本发明的多特异性抗体包含至少一个非交叉Fab区和至少一个交叉CH1-CL Fab区。

[0199] 在本发明的一个实施方案中,根据本发明的多特异性抗体的修饰的重链由VH和第二轻链的CL结构域的顺序安排(N-端至C-端方向)组成(然而,如本发明所述,在所述VH和CL结构域中特定的氨基酸取代是可能的)。因此,在该实施方案中,多特异性抗体包含至少两个Fab片段,所述Fab片段包括源自所述第一抗体的第一Fab片段(非交叉Fab片段)和源自所述第二抗体的第二Fab片段(交叉CH1-CL Fab片段),其中根据该实施方案的多特异性抗体不包含所述第一和所述第二抗体的各自的Fc结构域(因此,该多特异性抗体缺乏Fc结构域)。在一个实施方案中,多特异性抗体包含2至5个Fab片段。在多特异性抗体的一个实施方案中,Fab片段通过肽接头彼此连接。如本文所用的术语“肽接头”表示具有氨基酸序列的肽,其优选为合成来源的。在一个实施方案中,使用肽接头将Fab片段之一连接至另一个Fab片段的C-或N-端以形成根据本发明的多特异性抗体。在一个优选实施方案中,所述肽接头是具有长度为至少5个氨基酸的氨基酸序列的肽,在一个实施方案中,长度为5至100,在进一步的实施方案中为10至50个氨基酸。在一个实施方案中,所述肽接头是 $(GxS)_n$ 或 $(GxS)_nGm$,其中G=甘氨酸,S=丝氨酸和 $(x=3,n=3,4,5或6,和m=0,1,2或3)$ 或 $(x=4,n=2,3,4或5和m=0,1,2或3)$,在一个实施方案中 $x=4$ 和 $n=2或3$,在进一步的实施方案中 $x=4$ 和 $n=$

2。在一个实施方案中,所述肽接头是(G4S)₂。肽接头用于连接第一和第二Fab片段。在一个实施方案中,第一Fab片段连接至第二Fab片段的C-或N-端。这种形式的多特异性抗体先前已在W02013/026835中描述。

[0200] 在本发明的一个实施方案中,多特异性抗体包含源自特异性结合所述第一抗原和第三抗原的第一抗体的第一轻链和第一重链。如先前所述(W02013/174873),该实施方案在所谓的双重作用Fab中包含可变轻链结构域和可变重链结构域。

[0201] 在本发明的一个实施方案中,多特异性抗体包含源自特异性结合所述第二抗原和第三抗原的第二抗体的第二轻链和第二重链。如先前所述(W02013/174873),该实施方案在所谓的双重作用Fab中包含可变轻链结构域和可变重链结构域。

[0202] 在本发明的一个实施方案中,多特异性抗体包含源自特异性结合所述第一抗原和第三抗原的第一抗体的第一轻链和第一重链,以及源自特异性结合所述第二抗原和第四抗原的第二抗体的第二轻链和第二重链。如先前所述(W02013/174873),该实施方案在所谓的双重作用Fab中包含可变轻链结构域和可变重链结构域。

[0203] 在本发明的一个实施方案中,多特异性抗体缺乏Fc结构域,并包含

[0204] a) 第一轻链和第一重链,所述第一轻链在N-端至C-端方向上包含顺序安排的VL和CL结构域(即从N-端至C-端方向的VL-CL),所述第一重链在N-端至C-端方向上包含顺序安排的VH和CH1结构域(即从N-端至C-端方向的VH-CH1),其中第一轻链和第一重链源自特异性结合第一抗原的第一抗体;和

[0205] b) 源自特异性结合第二抗原的第二抗体的第二轻链和第二重链,其中在第二轻链中,恒定结构域CL被第二重链的恒定结构域CH1置换;在第二重链中,恒定结构域CH1被第二轻链的恒定结构域CL置换;和

[0206] i) 其中在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸彼此独立地被带正电荷的氨基酸取代;其中在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸彼此独立地被带负电荷的氨基酸取代。

[0207] 在本发明的一个实施方案中,多特异性抗体包含

[0208] a) 第一轻链和第一重链,所述第一轻链在N-端至C-端方向上包含顺序安排的VL和CL结构域(即从N-端至C-端方向的VL-CL),所述第一重链在N-端至C-端方向上包含顺序安排的VH、CH1、CH2和CH3结构域(即从N-端至C-端方向的VH-CH1-CH2-CH3),其中第一轻链和第一重链源自特异性结合第一抗原的第一抗体;和

[0209] b) 源自特异性结合第二抗原的第二抗体的第二轻链和第二重链,其中在第二轻链中,恒定结构域CL被第二重链的恒定结构域CH1置换;在第二重链中,恒定结构域CH1被第二轻链的恒定结构域CL置换;和

[0210] i) 其中在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸彼此独立地被带正电荷的氨基酸取代;其中在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸彼此独立地被带负电荷的氨基酸取代。

[0211] 本发明的一个实施方案涉及多特异性抗体,其中除了上述修饰之外,在相应的其他CL结构域(即第二重链的CL结构域)中,位置124(根据Kabat编号)的氨基酸被带负电荷的氨基酸取代。在位置124引入的负电荷支持CL结构域与相应的CH1结构域配对(两个结构域源自第一或第二抗体)。这是由于以下事实:在CL结构域的位置124(根据Kabat编号)引入的

带负电荷的氨基酸面对在在多特异性抗体的三级结构中相应的CH1结构域位置124处带正电荷的氨基酸K。结果,通过引入第二带负电荷的氨基酸,增强了由CL结构域中的位置123(根据Kabat编号)的谷氨酸(E)残基引起的在该环境中原始存在的负电荷,从而改善了CL和CH1的配对。通过本实施方案的氨基酸取代,可以进一步改善多特异性抗体的产率,并且可以进一步损害副产物的形成。

[0212] 本发明的一个实施方案涉及多特异性抗体,其中在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸彼此独立地被带正电荷的氨基酸取代;其中在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸彼此独立地被带负电荷的氨基酸取代,以及其中在第二重链的恒定结构域CL中,位置124(根据Kabat编号)的氨基酸被带负电荷的氨基酸取代。

[0213] 本发明的一个实施方案涉及多特异性抗体,其中在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸彼此独立地被带正电荷的氨基酸取代;其中在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸彼此独立地被带负电荷的氨基酸取代,以及其中在第二重链的恒定结构域CL中,位置124(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E或D的氨基酸取代,在一个优选的实施方案中,被E取代。

[0214] 本发明的一个实施方案涉及多特异性抗体,其中在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸彼此独立地被选自K、R和H的氨基酸取代;其中在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸彼此独立地被选自E或D的氨基酸取代,以及其中在第二重链的恒定结构域CL中,位置124(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E或D的氨基酸取代,在一个优选的实施方案中,被E取代。

[0215] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸彼此独立地被选自K和R的氨基酸取代;在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸彼此独立地被选自E或D的氨基酸取代;以及在第二重链的恒定结构域CL中,位置124(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代,在一个优选实施方案中,被E取代。

[0216] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123的氨基酸(根据Kabat编号)被K取代;在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸被E取代;以及在第二重链的恒定结构域CL中,位置124(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代,在一个优选实施方案中,被E取代。

[0217] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123位(根据Kabat编号)的氨基酸被K取代,在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147的氨基酸被E取代,位置213的氨基酸被D取代(根据Kabat的EU索引编号);以及在第二重链的恒定结构域CL中,位置124(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代,在一个优选实施方案中,被E取代。

[0218] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸被K取代,在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147的氨基酸被D取代,位置213的氨基酸被E取代(根据Kabat的EU索引编号);以及在第二重链的恒定结构域CL中,位置124(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代,在一个优选实施方案中,被E取代。

[0219] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸被K取代,在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸被D取代;以及在第二重链的恒定结构域CL中,位置124(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代,在一个优选实施方案中,被E取代。

[0220] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124的氨基酸被K取代,位置123的氨基酸被R取代,在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸被E取代;以及在第二重链的恒定结构域CL中,位置124(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代,在一个优选实施方案中,被E取代。

[0221] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124的氨基酸被K取代,位置123的氨基酸被R取代,在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147的氨基酸被E取代,位置213的氨基酸被D取代(根据Kabat的EU索引编号),以及在第二重链的恒定结构域CL中,位置124(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代,在一个优选实施方案中,被E取代。

[0222] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124的氨基酸被K取代,位置123的氨基酸被R取代,在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147的氨基酸被D取代,位置213的氨基酸被E取代(根据Kabat的EU索引编号);以及在第二重链的恒定结构域CL中,位置124(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代,在一个优选实施方案中,被E取代。

[0223] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124的氨基酸被K取代,位置123的氨基酸被R取代,在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸被D取代;以及在第二重链的恒定结构域CL中,位置124(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代,在一个优选实施方案中,被E取代。

[0224] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124的氨基酸被R取代,位置123的氨基酸被K取代(根据Kabat编号),在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147和213的氨基酸(根据Kabat的EU索引编号)被E取代;以及在第二重链的恒定结构域CL中,位置124(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代,在一个优选实施方案中,被E取代。

[0225] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124的氨基酸被R取代,位置123的氨基酸被K取代(根据Kabat编号),在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147的氨基酸被E取代,位置213的氨基酸被D取代(根据Kabat的EU索引编号);以及在第二重链的恒定结构域CL中,位置124(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代,在一个优选实施方案中,被E取代。

[0226] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124的氨基酸被R取代,位置123的氨基酸被K取代(根据Kabat编号),在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147的氨基酸被D取代,位置213的氨基酸被E取代(根据Kabat的EU索引编号);以及在第二重链的恒定结构域CL中,位置124(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代,在一个优选实施方案中,被E取代。

[0227] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124的氨基酸被R取代,位置123的氨基酸被K取代(根据Kabat编号),在第一重链的恒定结构域CH1中,位置

147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸被D取代;以及在第二重链的恒定结构域CL中,位置124(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代,在一个优选实施方案中,被E取代。

[0228] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸被R取代,在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸被E取代;以及在第二重链的恒定结构域CL中,位置124(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代,在一个优选实施方案中,被E取代。

[0229] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸被R取代,在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147的氨基酸被E取代,位置213的氨基酸被D取代(根据Kabat的EU索引编号);以及在第二重链的恒定结构域CL中,位置124(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代,在一个优选实施方案中,被E取代。

[0230] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸被R取代,在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147的氨基酸被D取代,位置213的氨基酸被E取代(根据Kabat的EU索引编号);以及在第二重链的恒定结构域CL中,位置124(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代,在一个优选实施方案中,被E取代。

[0231] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸被R取代,在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸被D取代;以及在第二重链的恒定结构域CL中,位置124(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代,在一个优选实施方案中,被E取代。

[0232] 本发明的一个实施方案涉及多特异性抗体,其中在第一轻链的可变结构域VL中,位置38(根据Kabat编号)的氨基酸被选自K、R和H的氨基酸取代;其中在第一重链的可变结构域VH中,位置39(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代;以及其中在第二重链的可变结构域VL中,位置38(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代;其中在第二轻链的可变结构域VH中,位置39(根据Kabat编号)的氨基酸被选自K、R和H的氨基酸取代。

[0233] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的可变结构域VL中,位置38(根据Kabat编号)的氨基酸被K取代;在第一重链的可变结构域VH中,位置39(根据Kabat编号)的氨基酸被E取代;在第二重链的可变结构域VL中,位置38(根据Kabat编号)的氨基酸被E取代;以及在第二轻链的可变结构域VH中,位置39(根据Kabat编号)的氨基酸被K取代。

[0234] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸彼此独立地被选自K和R的氨基酸取代;其中在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸彼此独立地被选自E或D的氨基酸取代;在第一轻链的可变结构域VL中,位置38(根据Kabat编号)的氨基酸被选自K、R和H的氨基酸取代;在第一重链的可变结构域VH中,位置39(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代;在第二重链的可变结构域VL中,位置38(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代;以及在第二轻链的可变结构域VH中,位置39(根据Kabat编号)的氨基酸被选自K、R和H的氨基酸取代。

[0235] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸被K取代;其中在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸被E取代;在第一轻链的可变结构域VL中,位置38(根据Kabat编号)的氨基酸被选自K、R和H的氨基酸取代;在第一重链的可变结构域VH中,位置39(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代;在第二重链的可变结构域VL中,位置38(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代;以及在第二轻链的可变结构域VH中,位置39(根据Kabat编号)的氨基酸被选自K、R和H的氨基酸取代。

[0236] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123的氨基酸(根据Kabat编号)被K取代;其中在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸被E取代;在第一轻链的可变结构域VL中,位置38(根据Kabat编号)的氨基酸被K取代;在第一重链的可变结构域VH中,位置39(根据Kabat编号)的氨基酸被E取代;在第二重链的可变结构域VL中,位置38(根据Kabat编号)的氨基酸被E取代;以及在第二轻链的可变结构域VH中,位置39(根据Kabat编号)的氨基酸被K取代。

[0237] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸彼此独立地被选自K、R和H的氨基酸取代;其中在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸彼此独立地被选自E或D的氨基酸取代和在第二重链的恒定结构域CL中,位置124(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代;在第一轻链的可变结构域VL中,位置38(根据Kabat编号)的氨基酸被选自K、R和H的氨基酸取代;在第一重链的可变结构域VH中,位置39(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代;在第二重链的可变结构域VL中,位置38(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代;和在第二轻链的可变结构域VH中,位置39(根据Kabat编号)的氨基酸被选自K、R和H的氨基酸取代。

[0238] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸彼此独立地被选自K和R的氨基酸取代;其中在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸彼此独立地被选自E或D的氨基酸取代和在第二重链的恒定结构域CL中,位置124(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代;和在第一轻链的可变结构域VL中,位置38(根据Kabat编号)的氨基酸被选自K、R和H的氨基酸取代;在第一重链的可变结构域VH中,位置39(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代;在第二重链的可变结构域VL中,位置38(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代;和在第二轻链的可变结构域VH中,位置39(根据Kabat编号)的氨基酸被选自K、R和H的氨基酸取代。

[0239] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸彼此独立地被选自K和R的氨基酸取代;其中在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸彼此独立地被选自E或D的氨基酸取代,和在第二重链的恒定结构域CL中,位置124(根据Kabat编号)的氨基酸被E取代;和在第一轻链的可变结构域VL中,位置38(根据Kabat编号)的氨基酸被选自K、R和H的氨基酸取代;在第一重链的可变结构域VH中,位置39(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代;在第二重链的可变结构域VL中,位置38(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代;和在第二轻链的可变结构域VH中,位置39(根据Kabat编号)的氨基酸被选自K、R和H

的氨基酸取代。

[0240] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸被K取代;其中在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸被E取代,在第二重链的恒定结构域CL中,位置124(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代;在第一轻链的可变结构域VL中,位置38(根据Kabat编号)的氨基酸被选自K、R和H的氨基酸取代;在第一重链的可变结构域VH中,位置39(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代;在第二重链的可变结构域VL中,位置38(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代;以及在第二轻链的可变结构域VH中,位置39(根据Kabat编号)的氨基酸被选自K、R和H的氨基酸取代。

[0241] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸被K取代;其中在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸被E取代和在第二重链的恒定结构域CL中,位置124(根据Kabat编号)的氨基酸被E取代;在第一轻链的可变结构域VL中,位置38(根据Kabat编号)的氨基酸被选自K、R和H的氨基酸取代;在第一重链的可变结构域VH中,位置39(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代;在第二重链的可变结构域VL中,位置38(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代;和在第二轻链的可变结构域VH中,位置39(根据Kabat编号)的氨基酸被选自K、R和H的氨基酸取代。

[0242] 在本发明的一个实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸被K取代;其中在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸被E取代和在第二重链的恒定结构域CL中,位置124(根据Kabat编号)的氨基酸被E取代;在第一轻链的可变结构域VL中,位置38(根据Kabat编号)的氨基酸被K取代;在第一重链的可变结构域VH中,位置39(根据Kabat编号)的氨基酸被E取代;在第二重链的可变结构域VL中,位置38(根据Kabat编号)的氨基酸被E取代;和在第二轻链的可变结构域VH中,位置39(根据Kabat编号)的氨基酸被K取代。

[0243] 在根据本发明的多特异性抗体包含Fc区和/或[包含结构域VH-CH1-CH2-CH3的第一重链和包含结构域VL-CL-CH2-CH3的修饰的第二重链]的情况下,本发明的另一方面是提供一种方法,以便改善所需多特异性抗体与不希望的副产物(例如可以通过第一重链与另一第一重链错配形成或第二重链与另一第二重链错配形成)相比的比例。根据本发明,这可以分别通过第一重链和第二重链的CH3结构域中的氨基酸取代来另外支持。通过这些方法(其将在下面的段落中进一步详细描述),改善了第一重链和修饰的第二重链的异二聚化。

[0244] 因此,本发明的一个实施方案是根据本发明的多特异性抗体,其包含第一重链和第二重链,所述第一重链包含源自所述第一抗体的CH3结构域,所述第二重链包含源自所述第二抗体的CH3结构域,其中两个CH3结构域通过各自的氨基酸取代以互补的方式进行工程化,以便支持第一重链和修饰的第二重链的异二聚化。

[0245] 为了支持异二聚化,已经描述了用于CH3修饰的几种方法,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,其通过引用包含于此。典型地,在本领域已知的方法中,第一重链的CH3结构域和第二重链的CH3结构域都以互补的方式工程化,使得包含一个工程化的CH3结构域的重链不能

再与另一个相同结构的重链同二聚化(例如,CH3-工程化的第一重链不能再与另一个CH3-工程化的第一重链同二聚化;并且CH3-工程化的第二重链不能再与另一个CH3-工程化的第二重链同二聚化)。因此,包含一个工程化的CH3结构域的重链被迫与另一包含CH3结构域的重链(其以互补方式工程化)异二聚化。对于本发明的这个实施方案,第一重链的CH3结构域和第二重链的CH3结构域通过氨基酸取代以互补方式工程化,使得第一重链和第二重链被迫异二聚化,而第一重链和第二重链不能再同二聚化(例如出于空间原因)。

[0246] 上文引用和包括的本领域已知的支持重链异二聚化的不同方法被考虑作为用于根据本发明的多特异性抗体中的不同替代方案,其包含源自特异性结合第一抗原的第一抗体的“非交叉Fab区”,和源自特异性结合第二抗原的第二抗体的“交叉Fab区”,组合本发明上述特定氨基酸取代。

[0247] 在根据本发明的多特异性抗体的一个实施方案中,其包含第一重链和第二重链,所述第一重链包含源自所述第一抗体的CH3结构域,所述第二重链包含源自所述第二抗体的CH3结构域,第一和第二重链的CH3结构域通过所谓的“杵入臼”技术工程化,其提供了几个例子详细描述于例如WO 96/027011、Ridgway, J.B.等人Protein Eng.9(1996)617-621; Merchant, A.M.等人Nat. Biotechnol. 16(1998)677-681;和WO 98/050431,通过引用包含于此。在“杵入臼”技术中,在抗体的三级结构中第一重链的CH3结构域与第二重链的CH3结构域之间形成的界面内,每个CH3结构域上的特定氨基酸被工程化以分别在一条重链的CH3结构域中产生突起(“杵”)和在另一条重链的CH3结构域中产生空腔(“臼”)。在多特异性抗体的三级结构中,一条重链的CH3结构域中引入的突起可定位于另一条重链的CH3结构域中引入的空腔中。重链中的每一条可以在其CH3结构域中包含“杵”,而另一条重链在其CH3结构域中包含“臼”。

[0248] 因此,一个实施方案涉及根据本发明的多特异性抗体,其中在抗体的三级结构中,第一重链的CH3结构域和第二重链的CH3结构域形成位于相应抗体CH3结构域之间的界面,其中第一重链的CH3结构域和第二重链的CH3结构域的相应氨基酸序列各自包含位于抗体三级结构中的所述界面内的一组氨基酸,

[0249] -其中从位于一条重链的CH3结构域的界面中的氨基酸组中,至少一个氨基酸残基被具有比原始氨基酸残基更大的侧链体积的氨基酸残基取代,从而在界面内产生突起,其中所述突起位于一条重链的CH3结构域中,并且其中所述突起可定位于界面内另一条重链的CH3结构域中的空腔中;和

[0250] -其中从位于另一条重链的CH3结构域的界面中的氨基酸组中,至少一个氨基酸残基被具有比原始氨基酸残基更小的侧链体积的氨基酸残基取代,从而在界面内产生空腔,其中所述空腔位于另一条重链的CH3结构域中,并且其中在所述空腔中可定位位于一条重链的CH3结构域的界面内的突起。根据本实施方案的多特异性抗体在本文中也称为“CH3(KiH)工程化的多特异性抗体”(其中缩写“KiH”代表“杵入臼技术”)。

[0251] 换句话说,该实施方案涉及根据本发明的多特异性抗体,其中一条重链的CH3结构域和另一条重链的CH3结构域各自在界面相遇,该界面包含抗体CH3结构域之间的原始界面;其中所述界面被改变以促进多特异性抗体的形成,其中所述改变的特征在于:

[0252] a) 改变一条重链的CH3结构域,使得在与多特异性抗体内另一条重链的CH3结构域的原始界面相遇的一条重链的CH3结构域的原始界面内,

[0253] 氨基酸残基被具有较大侧链体积的氨基酸残基置换,从而在一条重链的CH3结构域的界面内产生突起,其可定位于另一条重链的CH3结构域的界面内的空腔中;和

[0254] b) 改变另一条重链的CH3结构域,

[0255] 使得在与多特异性抗体内的第一CH3结构域的原始界面相遇的第二CH3结构域的原始界面内

[0256] 氨基酸残基被具有较小侧链体积的氨基酸残基置换,从而在第二CH3结构域的界面内产生空腔,在该空腔内可定位第一CH3结构域的界面内的突起。根据本实施方案的多特异性抗体在本文中也称为“CH3 (KiH) 工程化的多特异性抗体”(其中缩写“KiH”代表“杵入臼技术”)。

[0257] 在下面进一步详细描述根据涉及CH3 (KiH) -工程化的多特异性抗体的本发明的该实施方案,CH3 (KiH) -工程化的多特异性抗体的特征以及所述CH3 (KiH) -工程化的多特异性抗体的各种实施方案,可以与如上所述的所述多特异性抗体的任意实施方案组合。

[0258] 在根据本发明的所述CH3 (KiH) -工程化的多特异性抗体的一个实施方案中,具有比原始氨基酸残基更大的侧链体积的所述氨基酸残基选自R、F、Y和W。

[0259] 在根据本发明的所述CH3 (KiH) -工程化的多特异性抗体的一个实施方案中,所述具有比原始氨基酸残基更小的侧链体积的氨基酸残基选自A、S、T和V。

[0260] 在根据本发明的所述CH3 (KiH) -工程化的多特异性抗体的一个实施方案中,具有比原始氨基酸残基更大的侧链体积的所述氨基酸残基选自R、F、Y和W;并且具有比原始氨基酸残基更小的侧链体积的所述氨基酸残基选自A、S、T和V。

[0261] 在根据本发明的所述CH3 (KiH) -工程化的多特异性抗体的一个实施方案中,在一条重链(包含“杵”的重链)的CH3结构域中,位置366(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸T被W取代;在另一条重链(包含“臼”的重链)的CH3结构域中,位置366(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸T被S取代,位置368(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸L被A取代,位置407(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸Y被V取代。

[0262] 在根据本发明的所述CH3 (KiH) -工程化的多特异性抗体的一个实施方案中,在一条重链(包含“杵”的重链)的CH3结构域中,位置366(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸T被W取代,位置409(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸R被D取代,位置370(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸K被E取代;以及在另一条重链(包含“臼”的重链)的CH3结构域中,位置366(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸T被S取代,位置368(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸L被A取代,位置407(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸Y被V取代,位置399(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸D被K取代,和位置357(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸E被K取代。

[0263] 除了通过“杵入臼”技术工程化第一和第二重链的CH3结构域之外,二硫键桥的引入进一步稳定了异二聚体(Atwell, S.等人J.Mol.Biol.270(1997)26-35;Merchant, A.M.等人Nature Biotech.16(1998)677-681)。由此另外引入二硫键桥进一步增加了根据本发明的多特异性抗体的产率。

[0264] 因此,在根据本发明的所述CH3 (KiH) -工程化的多特异性抗体的一个实施方案中,从位于一条重链的CH3结构域的界面中的氨基酸组中,第一氨基酸被半胱氨酸取代;并且从位于另一条重链的CH3结构域的界面中的氨基酸组中,第二氨基酸被半胱氨酸取代,其中第二氨基酸面向界面内的第一氨基酸;使得可通过引入的半胱氨酸残基在一条重链的CH3结

构域和另一条重链的CH3结构域之间形成二硫键桥。

[0265] 在根据本发明的所述CH3 (KiH) -工程化的多特异性抗体的一个实施方案中,具有比原始氨基酸残基更大的侧链体积的所述氨基酸残基选自R、F、Y和W;从位于一条重链的CH3结构域的界面中的氨基酸组中,第一氨基酸被半胱氨酸取代;并且从位于另一条重链的CH3结构域的界面中的氨基酸组中,第二氨基酸被半胱氨酸取代,其中第二氨基酸面向界面内的第一氨基酸;使得可通过引入的半胱氨酸残基在一条重链的CH3结构域和另一条重链的CH3结构域之间形成二硫键桥。

[0266] 在根据本发明的所述CH3 (KiH) -工程化的多特异性抗体的一个实施方案中,具有比原始氨基酸残基更小的侧链体积的所述氨基酸残基选自A、S、T和V;从位于一条重链的CH3结构域的界面中的氨基酸组中,第一氨基酸被半胱氨酸取代;并且从位于另一条重链的CH3结构域的界面中的氨基酸组中,第二氨基酸被半胱氨酸取代,其中第二氨基酸面向界面内的第一氨基酸;使得可通过引入的半胱氨酸残基在一条重链的CH3结构域和另一条重链的CH3结构域之间形成二硫键桥。

[0267] 在根据本发明的所述CH3 (KiH) -工程化的多特异性抗体的一个实施方案中,具有比原始氨基酸残基更大的侧链体积的所述氨基酸残基选自R、F、Y和W;具有比原始氨基酸残基更小的侧链体积的所述氨基酸残基选自A、S、T和V;从位于一条重链的CH3结构域的界面中的氨基酸组中,第一氨基酸被半胱氨酸取代;并且从位于另一条重链的CH3结构域的界面中的氨基酸组中,第二氨基酸被半胱氨酸取代,其中第二氨基酸面向界面内的第一氨基酸;使得可通过引入的半胱氨酸残基在一条重链的CH3结构域和另一条重链的CH3结构域之间形成二硫键桥。

[0268] 在根据本发明的所述CH3 (KiH) -工程化的多特异性抗体的一个实施方案中,具有比原始氨基酸残基更大的侧链体积的所述氨基酸残基选自R、F、Y和W;在一条重链(包含“杵”的重链)的CH3结构域中,位置356(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸E或位置354(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸S被C取代,在另一条重链(包含“臼”的重链)的CH3结构域中,位置349(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸Y被C取代。

[0269] 在根据本发明的所述CH3 (KiH) -工程化的多特异性抗体的一个实施方案中,具有比原始氨基酸残基更小的侧链体积的所述氨基酸残基选自A、S、T和V;在一条重链(包含“杵”的重链)的CH3结构域中,位置356(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸E或位置354(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸S被C取代,在另一条重链(包含“臼”的重链)的CH3结构域中,位置349(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸Y被C取代。

[0270] 在根据本发明的所述CH3 (KiH) -工程化的多特异性抗体的一个实施方案中,具有比原始氨基酸残基更大的侧链体积的所述氨基酸残基选自R、F、Y和W;具有比原始氨基酸残基更小的侧链体积的所述氨基酸残基选自A、S、T和V;在一条重链(包含“杵”的重链)的CH3结构域中,位置356(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸E或位置354(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸S被C取代,在另一条重链(包含“臼”的重链)的CH3结构域中,位置349(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸Y被C取代。

[0271] 在根据本发明的所述CH3 (KiH) -工程化的多特异性抗体的一个实施方案中,在一条重链(包含“杵”的重链)的CH3结构域中,位置366(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸T被W取代,位置356(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸E或位置354(根据Kabat的EU索引编号)

的氨基酸S被C取代;在另一条重链(包含“白”的重链)的CH3结构域中,位置366(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸T被S取代,位置368(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸L被A取代,位置407(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸Y被V取代,位置349(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸Y被C取代。

[0272] 在根据本发明的所述CH3(KiH)-工程化的多特异性抗体的一个实施方案中,在一条重链(包含“杵”的重链)的CH3结构域中,位置366(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸T被W取代,位置349(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸Y被C取代;在另一条重链(包含“白”的重链)的CH3结构域中,位置366(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸T被S取代,位置368(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸L被A取代,位置407(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸Y被V取代,并且位置356(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸E或位置354(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸S被C取代。

[0273] 在根据本发明的所述CH3(KiH)-工程化的多特异性抗体的一个实施方案中,在一条重链(包含“杵”的重链)的CH3结构域中,位置366(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸T被W取代,位置409(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸R被D取代,位置370(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸K被E取代,位置356(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸E或位置354(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸S被C取代;在另一条重链(包含“白”的重链)的CH3结构域中,位置366(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸T被S取代,位置368(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸L被A取代,位置407(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸Y被V取代,位置399(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸D被K取代,位置357(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸E被K取代,位置349(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸Y被C取代。

[0274] 在根据本发明的所述CH3(KiH)-工程化的多特异性抗体的一个实施方案中,在一条重链(包含“杵”的重链)的CH3结构域中,位置366(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸T被W取代,位置409(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸R被D取代,位置370(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸K被E取代,位置349(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸Y被C取代;在另一条重链(包含“白”的重链)的CH3结构域中,位置366(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸T被S取代,位置368(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸L被A取代,位置407(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸Y被V取代,位置399(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸D被K取代,位置357(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸E被K取代,位置356(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸E或位置354(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸S被C取代。

[0275] 除了“杵入白技术”之外,用于修饰多特异性抗体的重链的CH3结构域以增强异二聚化的其他技术是本领域已知的。这些技术,特别是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和WO 2013/096291中描述的技术在本文中被认为是“杵入白技术”的替代,与根据本发明的多特异性抗体组合。

[0276] 在根据本发明的多特异性抗体的一个实施方案中,EP 1870459中描述的方法用于支持多特异性抗体的第一重链和第二重链的异二聚化。该方法基于在第一和第二重链两者之间的CH3/CH3-结构域-界面中的特定氨基酸位置引入带有相反电荷的带电荷氨基酸。

[0277] 因此,该实施方案涉及根据本发明的多特异性抗体,其中在抗体的三级结构中,第一重链的CH3结构域和第二重链的CH3结构域形成位于相应抗体CH3结构域之间的界面,其

中第一重链的CH3结构域和第二重链的CH3结构域相应的氨基酸序列各自包含位于抗体三级结构中的所述界面内的一组氨基酸,其中从位于一条重链的CH3结构域的界面中的氨基酸组中,第一氨基酸被带正电荷的氨基酸取代,并且从位于另一条重链的CH3结构域的界面中的氨基酸组中,第二氨基酸被带负电荷的氨基酸取代。根据本实施方案的多特异性抗体在本文中也称为“CH3 (+/-) -工程化的多特异性抗体”(其中缩写“+/-”代表被引入相应CH3结构域中的带相反电荷的氨基酸)。

[0278] 在根据本发明的所述CH3 (+/-) -工程化的多特异性抗体的一个实施方案中,带正电荷的氨基酸选自K、R和H;带负电荷的氨基酸选自E或D。

[0279] 在根据本发明的所述CH3 (+/-) -工程化的多特异性抗体的一个实施方案中,带正电荷的氨基酸选自K和R;带负电荷的氨基酸选自E或D。

[0280] 在根据本发明的所述CH3 (+/-) -工程化的多特异性抗体的一个实施方案中,带正电荷的氨基酸是K;带负电荷的氨基酸是E。

[0281] 在根据本发明的所述CH3 (+/-) -工程化的多特异性抗体的一个实施方案中,在一条重链的CH3结构域中位置409(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸R被D取代,位置370(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸K被E取代;在另一条重链的CH3结构域中,位置399(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸D被K取代,位置357(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸E被K取代。

[0282] 在根据本发明的多特异性抗体的一个实施方案中,使用W02013/157953中描述的方法支持多特异性抗体的第一重链和第二重链的异二聚化。在根据本发明的所述CH3-工程化的多特异性抗体的一个实施方案中,在一条重链的CH3结构域中,位置366(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸T被K取代;在另一条重链的CH3结构域中,位置351(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸L被D取代。在根据本发明的所述CH3-工程化的多特异性抗体的另一个实施方案中,在一条重链的CH3结构域中,位置366(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸T被K取代,位置351(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸L被K取代;在另一条重链的CH3结构域中,位置351(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸L被D取代。

[0283] 在根据本发明的所述CH3-工程化的多特异性抗体的另一个实施方案中,在一条重链的CH3结构域中,位置366(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸T被K取代,位置351(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸L被K取代;在另一条重链的CH3结构域中,位置351(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸L被D取代。另外,以下取代中的至少一个包含在另一条重链的CH3结构域中:位置349(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸Y被E取代,位置349(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸Y被D取代,位置368(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸L被E取代。在一个实施方案中,位置368(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸L被E取代。

[0284] 在根据本发明的多特异性抗体的一个实施方案中,使用W02012/058768中描述的方法支持多特异性抗体的第一重链和第二重链的异二聚化。在根据本发明的所述CH3-工程化的多特异性抗体的一个实施方案中,在一条重链的CH3结构域中,位置351(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸L被Y取代,位置407(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸Y被A取代;在另一条重链的CH3结构域中,位置366(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸T被A取代,位置409(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸K被F取代。在另一个实施方案中,除了上述取代之外,在另一条重链的CH3结构域中,位置411(原始为T)、位置399(原始为D)、位置400(原始为

S)、位置405(原始为F)、位置390(原始为N)和位置392(原始为K)的氨基酸中的至少一个被取代。优选的取代是:

[0285] -用选自N、R、Q、K、D、E和W的氨基酸取代位置411(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸T;

[0286] -用选自R、W、Y和K的氨基酸取代位置399(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸D;

[0287] -用选自E、D、R和K的氨基酸取代位置400(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸S;

[0288] -用选自I、M、T、S、V和W的氨基酸取代位置405(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸F;

[0289] -用选自R、K和D的氨基酸取代位置390(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸N;和

[0290] -用选自V、M、R、L、F和E的氨基酸取代位置392(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸K。

[0291] 在根据本发明的所述CH₃-工程化的多特异性抗体(根据W02012/058768工程化)的另一个实施方案中,在一条重链的CH₃结构域中,位置351(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸L被Y取代,位置407(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸Y被A取代;在另一条重链的CH₃结构域中,位置366(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸T被V取代,位置409(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸K被F取代。在根据本发明的所述CH₃-工程化的多特异性抗体的另一个实施方案中,在一条重链的CH₃结构域中,位置407(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸Y被A取代;在另一条重链的CH₃结构域中,位置366(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸T被A取代,位置409(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸K被F取代。在所述最后提及的实施方案中,在所述另一条重链的CH₃结构域中,位置392(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸K被E取代,位置411(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸T被E取代,位置399(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸D被R取代,位置400(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸S被R取代。

[0292] 在根据本发明的多特异性抗体的一个实施方案中,使用W02011/143545中描述的方法支持多特异性抗体的第一重链和第二重链的异二聚化。在根据本发明的所述CH₃-工程化的多特异性抗体的一个实施方案中,在位置368和/或409处引入两条重链的CH₃结构域中的氨基酸修饰。

[0293] 在根据本发明的多特异性抗体的一个实施方案中,使用W02011/090762中描述的方法支持多特异性抗体的第一重链和第二重链的异二聚化。W02011/090762涉及根据“杵入臼”技术的氨基酸修饰。在根据本发明的所述CH₃(KiH)-工程化的多特异性抗体的一个实施方案中,在一条重链的CH₃结构域中,位置366(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸T被W取代;在另一条重链的CH₃结构域中,位置407(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸Y被A取代。在根据本发明的所述CH₃(KiH)-工程化的多特异性抗体的另一个实施方案中,在一条重链的CH₃结构域中,位置366(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸T被Y取代;在另一条重链的CH₃结构域中,位置407(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸Y被T取代。

[0294] 在根据本发明的多特异性抗体(其为IgG2同种型)的一个实施方案中,使用W02011/090762中描述的方法支持多特异性抗体的第一重链和第二重链的异二聚化。

[0295] 在根据本发明的多特异性抗体的一个实施方案中,使用W02009/089004中描述的方法支持多特异性抗体的第一重链和第二重链的异二聚化。在根据本发明的所述CH₃-工程化的多特异性抗体的一个实施方案中,在一条重链的CH₃结构域中,位置392(根据Kabat的

EU索引编号)的氨基酸K或N被带负电荷的氨基酸取代(在一个优选的实施方案中被E或D取代,在一个优选的实施方案中被D取代);在另一条重链的CH3结构域中,位置399的氨基酸D、位置356的氨基酸E或D或位置357的氨基酸E(根据Kabat的EU索引编号)被带正电荷的氨基酸取代(在一个优选的实施方案中,被K或R取代,在一个优选的实施方案中,被K取代,在一个优选的实施方案中,位置399或356的氨基酸被K取代)。在另一个实施方案中,除了上述取代之外,在一条重链的CH3结构域中,位置409(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸K或R被带负电荷的氨基酸取代(在一个优选的实施方案中,被E或D取代,在一个优选的实施方案中,被D取代)。在一个甚至进一步的实施方案中,除了上述取代之外或作为上述取代的替代,在一条重链的CH3结构域中,位置439的氨基酸K和/或位置370的氨基酸K(根据Kabat的EU索引编号)彼此独立地被带负电荷的氨基酸取代(在一个优选的实施方案中,被E或D取代,在一个优选的实施方案中,被D取代)。

[0296] 在根据本发明的多特异性抗体的一个实施方案中,使用W02007/147901中描述的方法支持多特异性抗体的第一重链和第二重链的异二聚化。在根据本发明的所述CH3-工程化的多特异性抗体的一个实施方案中,在一条重链的CH3结构域中,位置253(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸K被E取代,位置282(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸D被K取代,位置322(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸K被D取代;在另一条重链的CH3结构域中,位置239(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸D被K取代,位置240(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸E被K取代和位置292(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸K被D取代。

[0297] 在根据本发明的多特异性抗体的一个实施方案中,使用W02007/110205中描述的方法支持多特异性抗体的第一重链和第二重链的异二聚化。

[0298] 在本发明的一个实施方案中,多特异性抗体是双特异性抗体或三特异性抗体。在本发明的一个优选实施方案中,多特异性抗体是双特异性抗体。

[0299] 在本发明的一个实施方案中,抗体是二价、三价或四价抗体。在本发明的一个实施方案中,抗体是二价或三价抗体。在本发明的一个实施方案中,抗体是二价抗体。

[0300] 在本发明的一个实施方案中,多特异性抗体包含一种或多种免疫球蛋白类别的免疫球蛋白恒定区。免疫球蛋白类别包括IgG、IgM、IgA、IgD和IgE同种型,在IgG和IgA的情况下,包括其亚型。

[0301] 在本发明的一个实施方案中,多特异性抗体具有IgG型抗体的恒定结构域结构。在本发明的另一个实施方案中,多特异性抗体的特征在于所述多特异性抗体是人IgG1亚类或具有突变L234A和L235A的人IgG1亚类。在本发明的另一个实施方案中,多特异性抗体的特征在于所述多特异性抗体是人IgG2亚类。在本发明的另一个实施方案中,多特异性抗体的特征在于所述多特异性抗体是人IgG3亚类。在本发明的另一个实施方案中,多特异性抗体的特征在于所述多特异性抗体是人IgG4亚类或具有另外的突变S228P的人IgG4亚类。在本发明的另一个实施方案中,多特异性抗体的特征在于所述多特异性抗体是人IgG1或人IgG4亚类。在本发明的另一个实施方案中,多特异性抗体的特征在于所述多特异性抗体是具有突变L234A和L235A(根据Kabat的EU索引编号)的人IgG1亚类。在本发明的另一个实施方案中,多特异性抗体的特征在于所述多特异性抗体是具有突变L234A、L235A和P329G(根据Kabat的EU索引编号)的人IgG1亚类。在本发明的另一个实施方案中,多特异性抗体的特征在于所述多特异性抗体是具有突变S228P和L235E(根据Kabat的EU索引编号)的人IgG4亚

类。在本发明的另一个实施方案中,多特异性抗体的特征在于所述多特异性抗体是具有突变S228P、L235E和P329G(根据Kabat的EU索引编号)的人IgG4亚类。

[0302] 在一个实施方案中,包含重链(包括本文指定的CH3结构域)的抗体包含另外的C-端甘氨酸-赖氨酸二肽(G446和K447,根据Kabat的EU索引编号)。在一个实施方案中,包含重链(包括本文指定的CH3结构域)的抗体包含另外的C-端甘氨酸残基(G446,根据Kabat的EU索引编号)。

[0303] 本发明的另一方面是产生多特异性抗体的方法,所述多特异性抗体包含源自特异性结合第一抗原的第一抗体的第一轻链和第一重链;以及源自特异性结合第二抗原的第二抗体的第二轻链和第二重链,其中在第二轻链中,恒定结构域CL被第二重链的恒定结构域CH1置换;在第二重链中,恒定结构域CH1被第二轻链的恒定结构域CL置换;

[0304] -所述方法包括从两种抗体中选择具有较高的聚集起始温度(Tagg)和/或热稳定性的抗体作为第二抗体并引入结构域置换,

[0305] -所述方法还包括仅在具有较低聚集起始温度(Tagg)和/或热稳定性的第一抗体的重链的恒定结构域CH1和轻链的恒定结构域CL中引入以下氨基酸取代:

[0306] -在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸彼此独立地被选自K、R和H的氨基酸取代;和其中在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸彼此独立地被选自E或D的氨基酸取代,和任选地其中在第二重链的恒定结构域CL中,位置124(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代。

[0307] 通过重组方法制备多特异性抗体。因此,本发明还涉及用于制备根据本发明的多特异性抗体的方法,其包括以下步骤:

[0308] -用包含核酸的载体转化宿主细胞,所述核酸编码

[0309] a) 如根据本发明的多特异性抗体所限定的源自特异性结合第一抗原的第一抗体的第一轻链;

[0310] b) 如根据本发明的多特异性抗体所限定的源自特异性结合第一抗原的第一抗体的第一重链;

[0311] c) 如根据本发明的多特异性抗体所限定的源自特异性结合第二抗原的第二抗体的第二轻链;和

[0312] d) 如根据本发明的多特异性抗体所限定的源自特异性结合第二抗原的第二抗体的第二重链,

[0313] -在允许合成所述多特异性抗体的条件下培养所述宿主细胞;和

[0314] -从所述宿主细胞培养物中回收所述多特异性抗体。

[0315] 在根据本发明的方法的一个实施方案中,用包含核酸的载体转化宿主细胞,所述核酸编码:

[0316] a) 源自特异性结合第一抗原的第一抗体的第一轻链,其中在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸彼此独立地被选自K、R和H的氨基酸取代(在一个优选的实施方案中,被K或R取代,在一个优选的实施方案中,被K取代);

[0317] b) 源自特异性结合第一抗原的第一抗体的第一重链,其中在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸彼此独立地被选自E或D的氨基

酸取代(在一个优选的实施方案中,被E取代);

[0318] c) 源自特异性结合第二抗原的第二抗体的第二轻链,其中在第二轻链中恒定结构域CL被第二重链的恒定结构域CH1置换;和

[0319] d) 源自特异性结合第二抗原的第二抗体的第二重链,其中在第二重链中恒定结构域CH1被第二轻链的恒定结构域CL置换。

[0320] 在根据本发明的方法的一个实施方案中,用包含核酸的载体转化宿主细胞,所述核酸编码:

[0321] a) 源自特异性结合第一抗原的第一抗体的第一轻链;

[0322] b) 源自特异性结合第一抗原的第一抗体的第一重链;

[0323] c) 源自特异性结合第二抗原的第二抗体的第二轻链,其中在第二轻链中恒定结构域CL被第二重链的恒定结构域CH1置换,

[0324] 并且其中在第二重链的恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸彼此独立地被选自K、R和H的氨基酸取代(在一个优选的实施方案中,被K或R取代,在一个优选的实施方案中,被K取代);和

[0325] d) 源自特异性结合第二抗原的第二抗体的第二重链,其中在第二重链中恒定结构域CH1被第二轻链的恒定结构域CL置换,

[0326] 并且其中在第二轻链的恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸彼此独立地被选自E或D的氨基酸取代(在一个优选的实施方案中,被E取代)。

[0327] 本发明的另一个目的是通过根据本发明的方法产生的多特异性抗体。

[0328] 本发明的另一个目的是一种宿主细胞,其包含

[0329] a) 包含根据本发明的核酸的载体,所述核酸编码源自特异性结合第一抗原的第一抗体的第一轻链;

[0330] b) 包含根据本发明的核酸的载体,所述核酸编码源自特异性结合第一抗原的第一抗体的第一重链;

[0331] c) 包含根据本发明的核酸的载体,所述核酸编码源自特异性结合第二抗原的第二抗体的第二轻链;和

[0332] d) 包含根据本发明的核酸的载体,所述核酸编码源自特异性结合第二抗原的第二抗体的第二重链。

[0333] 本发明的另一个目的是编码根据本发明的多特异性抗体的核酸。

[0334] 在一个实施方案中,核酸编码根据本发明的多特异性抗体所限定的第一轻链。在一个实施方案中,核酸编码根据本发明的多特异性抗体所限定的第一轻链,其中在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸彼此独立地被选自K、R和H的氨基酸取代(在一个实施方案中被选自K和R的氨基酸取代,在一个实施方案中氨基酸为K)。在一个实施方案中,核酸编码根据本发明的多特异性抗体所限定的第一轻链,其中在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代(在一个实施方案中,氨基酸是E)。

[0335] 在一个实施方案中,核酸编码根据本发明的多特异性抗体所限定的第一重链。在一个实施方案中,核酸编码根据本发明的多特异性抗体所限定的第一重链,其中在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸彼此独立地被选

自E或D的氨基酸取代(在一个实施方案中,氨基酸为E)。

[0336] 在一个实施方案中,核酸编码根据本发明的多特异性抗体所限定的修饰的第二轻链。在另一个实施方案中,核酸编码根据本发明的多特异性抗体所限定的修饰的第二轻链,其中在可变结构域VH中,位置39(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代(在一个优选的实施方案中,被E取代)。

[0337] 在一个实施方案中,核酸编码根据本发明的多特异性抗体所限定的修饰的第二重链。在另一个实施方案中,核酸编码根据本发明的多特异性抗体所限定的修饰的第二重链,其中在恒定结构域CL中,位置124(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代(在一个实施方案中,被氨基酸E取代)。在另一个实施方案中,核酸编码根据本发明的多特异性抗体所限定的修饰的第二重链,其中在第二重链的可变结构域VL中,位置38(根据Kabat编号)的氨基酸被选自K、R和H的氨基酸取代(在一个优选的实施方案中,被K或R取代,在一个优选的实施方案中,被K取代)。在另一个实施方案中,核酸编码根据本发明的多特异性抗体所限定的修饰的第二重链,其中在恒定结构域CL中,位置124(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代;其中在第二重链的可变结构域VL中,位置38(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代(在一个优选实施方案中被E取代)。

[0338] 在一个实施方案中,根据本发明的核酸是分离的核酸。

[0339] 本发明的另一个目的是包含根据本发明的核酸的表达载体,其中所述载体能够在宿主细胞中表达所述核酸。

[0340] 本发明的另一个目的是包含根据本发明的核酸的宿主细胞。本发明的另一个目的是包含根据本发明的表达载体的宿主细胞。在一个实施方案中,宿主细胞是HEK293细胞或CHO细胞。

[0341] 本发明的另一个目的是产生抗体的方法,所述方法包括培养本发明的所述宿主细胞以产生抗体。在所述方法的一个实施方案中,该方法还包括从宿主细胞回收抗体。

[0342] 本发明的另一个目的是包含根据本发明的多特异性抗体的药物组合物。本发明的一个方面是包含根据本发明的多特异性抗体与至少一种药学上可接受的载体的组合的药物组合物。

[0343] 在一个实施方案中,包含本发明的抗体群的组合物(在一个优选的实施方案中为药物组合物)包含抗体,所述抗体包含重链(其含有本文指定的CH3结构域和另外的C-端甘氨酸-赖氨酸二肽(G446和K447,根据Kabat的EU索引编号)。在一个实施方案中,包含本发明的抗体群的组合物包含抗体,所述抗体包含重链(其含有本文指定的CH3结构域和另外的C-端甘氨酸残基(G446,根据Kabat的EU索引编号))。

[0344] 在一个实施方案中,这样的组合物包含由以下抗体组成的抗体群:包含重链(其含有本文指定的CH3结构域)的抗体;包含重链(其含有本文指定的CH3结构域和另外的C-端甘氨酸残基(G446,根据Kabat的EU索引编号)的抗体;和包含重链(其含有本文指定的CH3结构域和另外的C-端甘氨酸-赖氨酸二肽(G446和K447,根据Kabat的EU索引编号))的抗体。

[0345] 本发明的另一个目的是免疫缀合物,其包含与细胞毒性剂偶联的根据本发明的多特异性抗体。

[0346] 本发明的另一个目的是根据本发明的多特异性抗体用于制备药物组合物的用途。本发明的另一目的是用于制备包含根据本发明的多特异性抗体的药物组合物的方法,其包

括将根据本发明的多特异性抗体与至少一种药学上可接受的载体组合配制。

[0347] 本发明的另一个目的是根据本发明的多特异性抗体用作药物。本发明的另一个目的是根据本发明的多特异性抗体用于治疗癌症。本发明的另一个目的是根据本发明的多特异性抗体用于治疗炎性疾病、自身免疫性疾病、类风湿性关节炎、银屑病性关节炎 (psoriasis arthritis)、肌肉疾病 (例如肌营养不良)、多发性硬化症、慢性肾病、骨病 (例如多发性骨髓瘤中的骨退化)、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎和/或血管损伤。

[0348] 本发明的另一个目的是包含根据本发明的多特异性抗体与至少一种药学上可接受的载体组合的药物组合物,用作药物。本发明的另一个目的是包含根据本发明的多特异性抗体与至少一种药学上可接受的载体组合的药物组合物,用于治疗癌症。本发明的另一个目的是包含根据本发明的多特异性抗体与至少一种药学上可接受的载体组合的药物组合物,用于治疗炎性疾病、自身免疫性疾病、类风湿性关节炎、银屑病性关节炎 (psoriasis arthritis)、肌肉疾病 (例如肌营养不良)、多发性硬化症、慢性肾病、骨病 (例如多发性骨髓瘤中的骨退化)、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎和/或血管损伤。

[0349] 本发明的另一个目的是包含偶联细胞毒性剂的根据本发明的多特异性抗体的免疫缀合物用作药物。本发明的另一目的是包含偶联细胞毒性剂的根据本发明的多特异性抗体的免疫缀合物用于治疗癌症。本发明的另一个目的是包含偶联细胞毒性剂的根据本发明的多特异性抗体的免疫缀合物,用于治疗炎性疾病、自身免疫性疾病、类风湿性关节炎、银屑病性关节炎 (psoriasis arthritis)、肌肉疾病 (例如肌营养不良)、多发性硬化症、慢性肾病、骨病 (例如多发性骨髓瘤中的骨退化)、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎和/或血管损伤。

[0350] 本发明的另一个目的是根据本发明的多特异性抗体用于制备药物的用途。本发明的另一个目的是根据本发明的多特异性抗体用于制备用于治疗癌症的药物的用途。本发明的另一个目的是根据本发明的多特异性抗体用于制备用于治疗炎性疾病、自身免疫性疾病、类风湿性关节炎、银屑病性关节炎 (psoriasis arthritis)、肌肉疾病 (例如肌营养不良)、多发性硬化症、慢性肾病、骨病 (例如多发性骨髓瘤中的骨退化)、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎和/或血管损伤的药物的用途。

[0351] 本发明的另一个目的是通过向需要这种治疗的患者施用根据本发明的多特异性抗体来治疗患有疾病的患者的方法。本发明的另一个目的是通过向需要这种治疗的患者施用根据本发明的多特异性抗体来治疗患有癌症的患者的方法。本发明的另一个目的是通过向需要这种治疗的患者施用根据本发明的多特异性抗体来治疗患有至少一种以下疾病的患者的方法:所述疾病包括炎性疾病、自身免疫性疾病、类风湿性关节炎、银屑病性关节炎 (psoriasis arthritis)、肌肉疾病 (例如肌营养不良)、多发性硬化症、慢性肾病、骨病 (例如多发性骨髓瘤中的骨退化)、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎和血管损伤。

[0352] III) 本发明的具体实施方案

[0353] 列出了本发明的以下具体实施方案。

[0354] 1. 一种多特异性抗体,其包含

[0355] a) 源自特异性结合第一抗原的第一抗体的第一轻链和第一重链;和

[0356] b) 源自特异性结合第二抗原的第二抗体的第二轻链和第二重链,其中在第二轻链中恒定结构域CL被第二重链的恒定结构域CH1置换;在第二重链中恒定结构域CH1被第二轻链的恒定结构域CL置换;和

[0357] i) 其中在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸彼此独立地被选自K、R和H的氨基酸取代;其中在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸彼此独立地被选自E或D的氨基酸取代。

[0358] 2. 根据实施方案1所述的多特异性抗体,其中第二轻链包含第二抗体的可变结构域VL,第二重链包含第二抗体的可变结构域VH。

[0359] 3. 根据实施方案1或2所述的多特异性抗体,其中在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸彼此独立地被K或R取代(在一个优选的实施方案中被K取代),其中在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸彼此独立地被选自E或D的氨基酸取代(在一个优选的实施方案中被E取代)。

[0360] 4. 根据实施方案1至3中任一项所述的多特异性抗体,其中在第二重链的恒定结构域CL中,位置124(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代(在一个优选的实施方案中被E取代)。

[0361] 5. 根据前述实施方案中任一项所述的多特异性抗体,

[0362] i) 其中在第一轻链的可变结构域VL中,位置38(根据Kabat编号)的氨基酸被选自K、R和H的氨基酸取代(在一个优选的实施方案中,彼此独立地被K或R取代;在另一个优选的实施方案中被K取代);和

[0363] 其中在第一重链的可变结构域VH中,位置39(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代(在一个优选的实施方案中,被E取代);和

[0364] ii) 其中在第二重链的可变结构域VL中,位置38(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代(在一个优选的实施方案中被E取代);和

[0365] 其中在第二轻链的可变结构域VH中,位置39(根据Kabat编号)的氨基酸被选自K、R和H的氨基酸取代(在一个优选的实施方案中,被K或R取代,在一个实施方案中,被K取代)。

[0366] 6. 根据前述实施方案中任一项所述的多特异性抗体,其中第一轻链的恒定结构域CL和第二重链的恒定结构域CL为 κ 同种型。

[0367] 7. 根据实施方案1至6中任一项所述的多特异性抗体,其中第一轻链的恒定结构域CL为 κ 同种型,第二重链的恒定结构域CL为 λ 同种型。

[0368] 8. 根据实施方案1至6中任一项所述的多特异性抗体,其中第一轻链的恒定结构域CL为 λ 同种型,第二重链的恒定结构域CL为 κ 同种型。

[0369] 9. 根据实施方案1至6中任一项所述的多特异性抗体,其中第一轻链的恒定结构域CL和第二重链的恒定结构域CL为 λ 同种型。

[0370] 10. 根据实施方案1至9中任一项所述的多特异性抗体,其中所述多特异性抗体在第一轻链中包含 κ 同种型的恒定结构域CL,其中在第一轻链的恒定结构域CL中位置123(根据Kabat编号)的氨基酸E被选自K、R和H的氨基酸取代(在一个优选的实施方案中被K或R取代;在另一个优选的实施方案中被K取代),位置124(根据Kabat编号)的氨基酸E被选自K、R和H的氨基酸取代(在一个优选的实施方案中,被K或R取代;在另一个优选的实施方案中,被K取代)。

[0371] 11. 根据实施方案1至10中任一项所述的多特异性抗体,其中所述多特异性抗体包含第一轻链中的 λ 同种型的恒定结构域CL,其中在第一轻链的恒定结构域CL中,位置123(根据Kabat编号)的氨基酸E被选自K、R和H的氨基酸取代(在一个优选的实施方案中彼此独立

地被K或R取代;在另一个优选的实施方案中被K取代),位置124(根据Kabat编号)的氨基酸Q被选自K、R和H的氨基酸取代(在一个优选的实施方案中彼此独立地被K或R取代;在另一个优选的实施方案中被K取代)。

[0372] 12. 根据前述实施方案中任一项所述的多特异性抗体,其包含第一重链和第二重链,所述第一重链包含源自所述第一抗体的CH3结构域,所述第二重链包含源自所述第二抗体的CH3结构域,其中两个CH3结构域均通过氨基酸取代被工程化以支持第一重链和第二重链的异二聚化。

[0373] 13. 根据前述实施方案中任一项所述的多特异性抗体,其中在抗体的三级结构中,第一重链的CH3结构域和第二重链的CH3结构域形成位于相应抗体CH3结构域之间的界面,其中第一重链的CH3结构域和第二重链的CH3结构域的相应氨基酸序列各自包含位于抗体三级结构中的所述界面内的一组氨基酸,

[0374] -其中从位于一条重链的CH3结构域的界面中的氨基酸组中,至少一个氨基酸残基被具有比原始氨基酸残基更大的侧链体积的氨基酸残基取代,从而在界面内产生突起,其中所述突起位于一条重链的CH3结构域中,并且其中所述突起可定位于界面内另一条重链的CH3结构域中的空腔中;和

[0375] -其中从位于另一条重链的CH3结构域的界面中的氨基酸组中,至少一个氨基酸残基被具有比原始氨基酸残基更小的侧链体积的氨基酸残基取代,从而在界面内产生空腔,其中所述空腔位于另一条重链的CH3结构域中,并且其中在所述空腔中可定位位于一条重链的CH3结构域的界面内的突起。

[0376] 14. 根据前述实施方案中任一项所述的多特异性抗体,其中一条重链的CH3结构域和另一条重链的CH3结构域各自在界面相遇,该界面包含抗体CH3结构域之间的原始界面;其中所述界面被改变以促进多特异性抗体的形成,其中所述改变的特征在于:

[0377] a) 改变一条重链的CH3结构域,使得在与多特异性抗体内另一条重链的CH3结构域的原始界面相遇的一条重链的CH3结构域原始界面内,

[0378] 氨基酸残基被具有较大侧链体积的氨基酸残基置换,从而在一条重链的CH3结构域的界面内产生突起,其可定位于另一条重链的CH3结构域的界面内的空腔中;和

[0379] b) 改变另一条重链的CH3结构域,

[0380] 使得在与多特异性抗体内的第一CH3结构域的原始界面相遇的第二CH3结构域的原始界面内

[0381] 氨基酸残基被具有较小侧链体积的氨基酸残基置换,从而在第二CH3结构域的界面内产生空腔,在该空腔内可定位第一CH3结构域的界面内的突起。

[0382] 15. 根据实施方案13或14所述的多特异性抗体,其中所述具有比原始氨基酸残基更大的侧链体积的氨基酸残基选自R、F、Y和W;和/或其中所述具有比原始氨基酸残基更小的侧链体积的氨基酸残基选自A、S、T和V。

[0383] 16. 根据实施方案13至15中任一项所述的多特异性抗体,其中在一条重链的CH3结构域中,位置366(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸T被W取代;在另一条重链的CH3结构域中,位置366(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸T被S取代,位置368(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸L被A取代,和位置407(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸Y被V取代。

[0384] 17. 根据实施方案13至16中任一项所述的多特异性抗体,其中在一条重链的CH3结

构域中,位置366(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸T被W取代,位置409(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸R被D取代,位置370(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸K被E取代;在另一条重链的CH3结构域中,位置366(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸T被S取代,位置368(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸L被A取代和位置407(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸Y被V取代,位置399(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸D被K取代,位置357(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸E被K取代。

[0385] 18. 根据实施方案13至17中任一项所述的多特异性抗体,其中从位于一条重链的CH3结构域的界面中的氨基酸组中,第一氨基酸被半胱氨酸取代;并且从位于另一条重链的CH3结构域的界面中的氨基酸组中,第二氨基酸被半胱氨酸取代,其中第二氨基酸面向界面内的第一氨基酸;使得可通过引入的半胱氨酸残基在一条重链的CH3结构域和另一条重链的CH3结构域之间形成二硫键桥。

[0386] 19. 根据实施方案18所述的多特异性抗体,其中在一条重链的CH3结构域中,位置356(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸E或位置354(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸S被C取代,在另一条重链的CH3结构域中,位置349(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸Y被C取代。

[0387] 20. 根据实施方案19所述的多特异性抗体,其中在一条重链的CH3结构域中,位置349(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸Y被C取代;在另一条重链的CH3结构域中,位置354(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸S被C取代。

[0388] 21. 根据前述实施方案中任一项所述的多特异性抗体,其中所述抗体是双特异性、三特异性或四特异性。

[0389] 22. 根据前述实施方案中任一项所述的多特异性抗体,其中所述抗体是双特异性或三特异性。

[0390] 23. 根据前述实施方案中任一项所述的多特异性抗体,其中所述抗体是双特异性。

[0391] 24. 根据前述实施方案中任一项所述的多特异性抗体,其中所述抗体是二价、三价或四价。

[0392] 25. 根据前述实施方案中任一项所述的多特异性抗体,其中所述抗体是二价或三价。

[0393] 26. 根据前述实施方案中任一项所述的多特异性抗体,其中所述抗体是二价。

[0394] 27. 根据前述实施方案中任一项所述的多特异性抗体,其中所述抗体具有IgG型抗体的恒定结构域结构。

[0395] 28. 根据前述实施方案中任一项所述的多特异性抗体,其中所述抗体是人IgG1或人IgG4亚类。

[0396] 29. 根据前述实施方案中任一项所述的多特异性抗体,其中所述抗体是具有突变L234A和L235A(根据Kabat的EU索引编号)的人IgG1亚类。

[0397] 30. 根据前述实施方案中任一项所述的多特异性抗体,其中所述抗体是具有突变S228P和L235E(根据Kabat的EU索引编号)的人IgG4亚类。

[0398] 31. 根据实施方案29或30所述的多特异性抗体,其中所述抗体还包含P329G突变(根据Kabat的EU索引编号)。

[0399] 32. 根据实施方案1至11、21至28中任一项所述的多特异性抗体,其中所述抗体缺

乏Fc结构域。

[0400] 33. 根据前述实施方案中任一项的所述多特异性抗体,其特异性结合人血管生成素-2和人VEGF,其中

[0401] a) 抗体包含根据SEQ ID NO:26 (<VH Ang2>)的可变重链结构域(VH)和根据SEQ ID NO:27 (<VL Ang2>)的可变轻链结构域(VL);和

[0402] b) 抗体包含根据SEQ ID NO:24 (<VH VEGF>)的可变重链结构域(VH)和根据SEQ ID NO:25 (<VL VEGF>)的可变轻链结构域(VL)。

[0403] 34. 根据前述实施方案中任一项所述的多特异性抗体,其特异性结合人血管生成素-2和人VEGF,其中

[0404] a) 第一抗体包含根据SEQ ID NO:26 (<VH Ang2>)的可变重链结构域(VH)和根据SEQ ID NO:27 (<VL Ang2>)的可变轻链结构域(VL);和

[0405] b) 第二抗体包含根据SEQ ID NO:24 (<VH VEGF>)的可变重链结构域(VH)和根据SEQ ID NO:25 (<VL VEGF>)的可变轻链结构域(VL)。

[0406] 35. 一种特异性结合人血管生成素-2和人VEGF的双特异性抗体,其包含

[0407] a) 源自特异性结合人血管生成素-2的第一抗体的第一轻链和第一重链,在一个优选的实施方案中其包含根据SEQ ID NO:26的可变重链结构域和根据SEQ ID NO:27的可变轻链结构域;和

[0408] b) 源自特异性结合人VEGF的第二抗体的第二轻链和第二重链,在一个优选的实施方案中其包含根据SEQ ID NO:24的可变重链结构域和根据SEQ ID NO:25的可变轻链结构域,其中在第二轻链中,恒定结构域CL被第二重链的恒定结构域CH1置换;和

[0409] 在第二重链中,恒定结构域CH1被第二轻链的恒定结构域CL置换;和

[0410] i) 其中在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸彼此独立地被选自K、R和H的氨基酸取代(在一个优选的实施方案中彼此独立地被K或R取代;在另一个优选的实施方案中,被K取代);其中在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸彼此独立地被选自E或D的氨基酸取代(在一个优选的实施方案中被E取代)。

[0411] 36. 一种特异性结合人血管生成素-2和人VEGF的双特异性抗体,其包含

[0412] a) 源自特异性结合人血管生成素-2的第一抗体的第一轻链和第一重链,在一个优选的实施方案中其包含根据SEQ ID NO:26的可变重链结构域和根据SEQ ID NO:27的可变轻链结构域;和

[0413] b) 源自特异性结合人VEGF的第二抗体的第二轻链和第二重链,在一个优选的实施方案中其包含根据SEQ ID NO:24的可变重链结构域和根据SEQ ID NO:25的可变轻链结构域,其中在第二轻链中,恒定结构域CL被第二重链的恒定结构域CH1置换;和

[0414] 在第二重链中,恒定结构域CH1被第二轻链的恒定结构域CL置换;和

[0415] i) 其中在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸彼此独立地被选自K、R和H的氨基酸取代(在一个优选的实施方案中彼此独立地被K或R取代;在另一个优选的实施方案中,被K取代);其中在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸彼此独立地被选自E或D的氨基酸取代(在一个优选的实施方案中被E取代)。

[0416] 37. 根据实施方案33至36中任一项所述的特异性结合人血管生成素-2和人VEGF的双特异性抗体,

[0417] -其中在第一轻链的可变结构域VL中,位置38(根据Kabat编号)的氨基酸被选自K、R和H的氨基酸取代(在一个优选的实施方案中彼此独立地被K或R取代;在另一个优选的实施方案中,被K取代);其中在第一重链的可变结构域VH中,位置39(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代(在一个优选的实施方案中,被E取代);和

[0418] -其中在第二重链的可变结构域VL中,位置38(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代(在一个优选的实施方案中被E取代);和

[0419] 其中在第二轻链的可变结构域VH中,位置39(根据Kabat编号)的氨基酸被选自K、R和H的氨基酸取代(在一个优选的实施方案中,被K或R取代,在一个实施方案中,被K取代)。

[0420] 38. 根据前述实施方案中任一项所述的抗体,用作药物。

[0421] 39. 根据实施方案1至37中任一项所述的抗体,用于治疗癌症。

[0422] 40. 根据实施方案1至37中任一项所述的抗体,用于治疗炎症性疾病、自身免疫性疾病、类风湿性关节炎、银屑病性关节炎(psoriasis arthritis)、肌肉疾病(例如肌营养不良)、多发性硬化症、慢性肾病、骨病(例如多发性骨髓瘤中的骨退化)、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎和/或血管损伤。

[0423] 41. 根据实施方案1至37中任一项所述的抗体在制备药物中的用途,在一个优选的实施方案中,在制备用于治疗癌症或用于治疗炎症性疾病、自身免疫性疾病、类风湿性关节炎、银屑病性关节炎(psoriasis arthritis)、肌肉疾病(例如肌营养不良)、多发性硬化症、慢性肾病、骨病(例如多发性骨髓瘤中的骨退化)、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎和/或血管损伤的药物的用途。

[0424] 42. 一种制备根据实施方案1至37中任一项所述的多特异性抗体的方法,其包括以下步骤:

[0425] -用包含核酸的载体转化宿主细胞,所述核酸编码

[0426] a) 如实施方案1至37之一中所限定的第一轻链,其源自特异性结合第一抗原的第一抗体;

[0427] b) 如实施方案1至37之一中所限定的第一重链,其源自特异性结合第一抗原的第一抗体;

[0428] c) 如实施方案1至37之一中所限定的第二轻链,其源自特异性结合第二抗原的第二抗体;和

[0429] d) 如实施方案1至37之一中所限定的第二重链,其源自特异性结合第二抗原的第二抗体,

[0430] -在允许合成所述多特异性抗体的条件下培养所述宿主细胞;和

[0431] -从所述宿主细胞培养物中回收所述多特异性抗体。

[0432] 43. 在根据前述实施方案中的任一项的一个优选的实施方案中,用于降低在制备期间副产物形成和/或增加多特异性抗体的聚集温度的方法,其包括以下步骤:

[0433] -用包含核酸的载体转化宿主细胞,所述核酸编码

[0434] a) 源自特异性结合第一抗原的第一抗体的第一轻链和第一重链;和

[0435] b) 源自特异性结合第二抗原的第二抗体的第二轻链和第二重链,其中在第二轻链

中恒定结构域CL被第二重链的恒定结构域CH1置换；在第二重链中，恒定结构域CH1被第二轻链的恒定结构域CL置换；

[0436] 其中为了降低多特异性抗体副产物的形成：

[0437] i) 在第一轻链的恒定结构域CL中，位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸彼此独立地被选自K、R和H的氨基酸取代；在第一重链的恒定结构域CH1中，位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸彼此独立地被选自E或D的氨基酸取代；

[0438] -在允许合成所述多特异性抗体的条件下培养所述宿主细胞；和

[0439] -从所述宿主细胞培养物中回收所述多特异性抗体。

[0440] 44. 根据实施方案43所述的方法，其中为了降低多特异性抗体副产物的形成

[0441] i) 在第一轻链的恒定结构域CL中，位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸彼此独立地被选自K、R和H的氨基酸取代(在一个优选的实施方案中，彼此独立地被选自K或R的氨基酸取代；在另一个优选的实施方案中被K取代)；在第一重链的恒定结构域CH1中，位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸彼此独立地被选自E或D的氨基酸取代(在一个优选的实施方案中被E取代)，在第二重链的恒定结构域CL中，位置124(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代(在一个优选的实施方案中，被E取代)。

[0442] 45. 根据实施方案43至44中任一项所述的方法，其中为了降低副产物的形成和/或增加多特异性抗体的聚集温度，包括以下氨基酸取代

[0443] -在第一轻链的可变结构域VL中，位置38(根据Kabat编号)的氨基酸被选自K、R和H的氨基酸取代(在一个优选的实施方案中彼此独立地被K或R取代；在另一个优选的实施方案中被K取代)；在第一重链的可变结构域VH中，位置39(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代(在一个优选的实施方案中被E取代)；和

[0444] -其中在第二重链的可变结构域VL中，位置38(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代(在一个优选的实施方案中被E取代)；和

[0445] 其中在第二轻链的可变结构域VH中，位置39(根据Kabat编号)的氨基酸被选自K、R和H的氨基酸取代(在一个优选的实施方案中，被K或R取代，在一个实施方案中，被K取代)。

[0446] 46. 根据实施方案43至45中任一项所述的方法产生的多特异性抗体。

[0447] 47. 一种改善多特异性抗体的聚集起始温度的方法，所述多特异性抗体包含源自特异性结合第一抗原的第一抗体的第一轻链和第一重链；以及源自特异性结合第二抗原的第二抗体的第二轻链和第二重链，其中在第二轻链中，恒定结构域CL被第二重链的恒定结构域CH1置换；在第二重链中，恒定结构域CH1被第二轻链的恒定结构域CL置换；所述方法包括以下步骤：

[0448] -提供多特异性抗体的修饰的第一轻链，其中在恒定结构域CL中，位置124和123(根据Kabat编号)的氨基酸彼此独立地被选自K和R的氨基酸取代；

[0449] -提供多特异性抗体的修饰的第一重链，其中在第一重链的恒定结构域CH1中，位置147和213(根据Kabat的EU索引编号)的氨基酸彼此独立地被选自E或D的氨基酸取代；和

[0450] -提供多特异性抗体，其包含修饰的第一轻链、修饰的第一重链、第二轻链和第二重链。

[0451] 48. 根据实施方案47所述的方法，其中通过位置124的氨基酸被K取代提供修饰的第一轻链。

- [0452] 49. 根据实施方案47或48所述的方法,其中通过位置213的氨基酸被E取代提供修饰的第一重链。
- [0453] 50. 根据实施方案47至49中任一项所述的方法,其中通过位置147的氨基酸被E取代提供修饰的第一重链。
- [0454] 51. 根据实施方案47至50中任一项所述的方法,还包括以下步骤:
- [0455] -提供修饰的第二重链,其中在恒定结构域CL中,位置124(根据Kabat编号)的氨基酸被选自E和D的氨基酸取代,和
- [0456] -其中提供多特异性抗体,其包含修饰的第一轻链、修饰的第一重链、第二轻链和修饰的第二重链。
- [0457] 52. 通过实施方案47至51中任一项所述的方法可获得的多特异性抗体。
- [0458] 53. 一种核酸,其编码以下氨基酸序列
- [0459] a) 如实施方案1至37之一所限定的第一轻链,
- [0460] b) 如实施方案1至37之一所限定的第二轻链,
- [0461] c) 如实施方案1至37之一所限定的第一重链;或
- [0462] d) 如实施方案1至37之一所限定的第二重链。
- [0463] 54. 含有根据实施方案53所述的核酸的载体,其中所述载体能够在宿主细胞中表达所述核酸。
- [0464] 55. 包含根据实施方案53所述的核酸的表达载体,其中所述载体能够在宿主细胞中表达所述核酸。
- [0465] 56. 包含根据实施方案53所述的核酸的宿主细胞。
- [0466] 57. 一种宿主细胞,其包含根据实施方案54所述的载体或根据实施方案55所述的表达载体。
- [0467] 58. 一种药物组合物,其包含根据实施方案1至37中任一项所述的多特异性抗体与至少一种药学上可接受的载体的组合。
- [0468] 59. 根据实施方案58所述的药物组合物,用作药物。
- [0469] 60. 根据实施方案58所述的药物组合物,用于治疗癌症。
- [0470] 61. 根据实施方案58所述的药物组合物,用于治疗炎性疾病、自身免疫性疾病、类风湿性关节炎、银屑病性关节炎(psoriasis arthritis)、肌肉疾病(例如肌营养不良)、多发性硬化症、慢性肾病、骨病(例如多发性骨髓瘤中的骨退化)、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎和/或血管损伤。
- [0471] 62. 一种免疫缀合物,其包含与细胞毒性剂偶联的实施方案1至37之一的抗体。
- [0472] 63. 根据实施方案62所述的免疫缀合物用作药物。
- [0473] 64. 根据实施方案62所述的免疫缀合物,用于治疗癌症或用于治疗炎性疾病、自身免疫性疾病、类风湿性关节炎、银屑病性关节炎(psoriasis arthritis)、肌肉疾病(例如肌营养不良)、多发性硬化症、慢性肾病、骨病(例如多发性骨髓瘤中的骨退化)、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎和/或血管损伤。
- [0474] 氨基酸序列的描述

	SEQ ID NO:1	7571 -κ 轻链 (LC) <Ang-2> 野生型 (wt)
[0475]	SEQ ID NO:2	7595-重链(HC) <Ang-2> 野生型 (wt)
	SEQ ID NO:3	7594-轻链(LC) <VEGF>, 具有 CL-CH1 结构域交换野生型 (wt)
	SEQ ID NO:4	7593-重链(HC) <VEGF>, 具有 CL-CH1 结构域交换野生型 (wt)
	SEQ ID NO:5	17914 - κ 轻链 (LC) <Ang-2>, 具有 Q124K 取代
	SEQ ID NO:6	17911-重链(HC) <Ang-2>, 具有 K147E 取代
	SEQ ID NO:7	17912-重链(HC) <Ang-2>, 具有 K213E 取代
	SEQ ID NO:8	17913-κ 轻链 (LC) <Ang-2>, 具有 E123K 取代
	SEQ ID NO:9	17932-轻链(LC) <VEGF>, 具有 CL-CH1 结构域交换和 K147E 取代
	SEQ ID NO:10	17934-重链(HC) <VEGF>, 具有 CL-CH1 结构域交换和 Q124K 取代
	SEQ ID NO:11	17933-轻链(LC) <VEGF>, 具有 CL-CH1 结构域交换和 K213E 取代
	SEQ ID NO:12	17301-κ 轻链 (LC) <Ang-2>, 具有 E123R 和 Q124K 取代
	SEQ ID NO:13	14116-重链(HC) <Ang-2>, 具有 K147E 和 K213E 取代
	SEQ ID NO:14	17305-重链(HC) <Ang-2>, 具有 K147E 和 K213D 取代
	SEQ ID NO:15	17953 - κ 轻链 (LC) <Ang-2>, 具有 Q38E, E123K 和 Q124K 取代
	SEQ ID NO:16	17954 - 重链(HC) <Ang-2>, 具有 Q39K, K147E 和 K213E 取代
	SEQ ID NO:17	17938-轻链(LC) <VEGF>, 具有 CL-CH1 结构域交换和 Q38K 取代
[0476]	SEQ ID NO:18	17936-重链(HC) <VEGF>, 具有 CL-CH1 结构域交换和 Q39E 取代
	SEQ ID NO:19	14098 - κ 轻链 (LC) <Ang-2>, 具有 Q38K, E123K 和 Q124K 取代
	SEQ ID NO:20	14097 - 重链(HC) <Ang-2>, 具有 Q39E, K147E 和 K213E 取代
	SEQ ID NO:21	17937-重链(HC) <VEGF>, 具有 CL-CH1 结构域交换和具有 Q39E 和 Q124E 取代
	SEQ ID NO:22	17962 - κ 轻链 (LC) <Ang-2>, 具有 Q124E 取代
	SEQ ID NO:23	17935-重链(HC) <VEGF>, 具有 CL-CH1 结构域交换和 Q124E 取代
	SEQ ID NO:24	重链可变结构域<VEGF>
	SEQ ID NO:25	轻链可变结构域<VEGF>
	SEQ ID NO:26	重链可变结构域<Ang-2>
	SEQ ID NO:27	轻链可变结构域<Ang-2>
	SEQ ID NO:28	6413 - IL17 LC E123 (Wt)/ Q124 (Wt)
	SEQ ID NO:29	11738 - IL17 HC K147 (Wt)/ K213(Wt)
	SEQ ID NO:30	11755-Tweak xLC K147(Wt)/ K213(Wt)

	SEQ ID NO:31	11754-Tweak xHC E123(Wt)/ Q124(Wt)
	SEQ ID NO:32	17843 – IL17 LC Q124K
	SEQ ID NO:33	17844 – IL17 HC K147E
	SEQ ID NO:34	17845 – IL17 HC K213E
[0477]	SEQ ID NO:35	17846 – IL17 LC E123K
	SEQ ID NO:36	17847 – IL17 LC E123R/Q124K
	SEQ ID NO:37	17848 – IL17 HC K147E/K213E
	SEQ ID NO:38	17849 – IL17 HC K147E/K213D
	SEQ ID NO:39	17850-Tweak xHC Q124E

实施例

[0478] 提供以下实施例以帮助理解本发明,本发明的真实范围在所附权利要求中阐述。应该理解,可以在不背离本发明精神的情况下对所述程序进行修改。

[0479] 在以下部分中,如果没有另外说明,则LC*表示修饰的轻链<CH1-VL>,并且HC*表示修饰的重链<CH3-CH2-CL-VH>。

[0480] 材料和一般方法

[0481] 关于人免疫球蛋白轻链和重链的核苷酸序列的一般信息在以下文献中给出:Kabat,E.A.等人Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th ed.,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991)。根据Kabat(Kabat,E.A.等人Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991))的编号对抗体链的氨基酸进行编号和提及)。

[0482] 重组DNA技术

[0483] 使用标准方法操作DNA,如Sambrook,J.等人Molecular Cloning:A laboratory manual;Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York,1989所述。根据制造商的说明书使用分子生物学试剂。

[0484] 基因合成

[0485] 通过化学合成从寡核苷酸制备所需的基因区段。通过退火和连接寡核苷酸组装侧翼为单个限制性内切核酸酶切割位点的600-1800bp长的基因区段,包括PCR扩增和随后通过所示的限制性位点例如KpnI/SacI或AscI/PacI克隆到基于pPCRScrip(Stratagene)的pGA4克隆载体中。通过DNA测序确认亚克隆的基因片段的DNA序列。根据给定的规格在Geneart(Regensburg,Germany)预定基因合成片段。

[0486] DNA序列测定

[0487] 通过在MediGenomix GmbH(Martinsried,Germany)或Sequiserive GmbH(Vaterstetten,Germany)进行的双链测序确定DNA序列。

[0488] DNA和蛋白质序列分析和序列数据管理

[0489] 使用GCG's (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin) 软件包版本10.2和Infomax's Vector NT1Advance套件版本8.0用于序列创建、绘图、分析、注释和说明。

[0490] 表达载体

[0491] 为了表达所述抗体,基于具有或不具有CMV-内含子A启动子的cDNA组构或具有CMV启动子的基因组组构,应用于瞬时表达(例如在HEK293EBNA或HEK293-F)细胞的表达质粒的变体。

[0492] 除抗体表达盒外,载体还含有:

[0493] -允许该质粒在大肠杆菌中复制的复制起点,和

[0494] -在大肠杆菌中赋予氨苄青霉素抗性的 β -内酰胺酶基因。

[0495] 抗体基因的转录单元由以下元件组成:

[0496] -5'端独特的限制性位点

[0497] -来自人巨细胞病毒的立即早期增强子和启动子,

[0498] -在cDNA组构的情况下随后是内含子A序列,

[0499] -人抗体基因的5'非翻译区,

[0500] -免疫球蛋白重链信号序列,

[0501] -人抗体链(野生型或具有结构域交换)作为cDNA或作为具有免疫球蛋白外显子-内含子组构的基因组组构,

[0502] -具有聚腺苷酸化信号序列的3'非翻译区,和

[0503] -3'端的独特的限制性位点。

[0504] 通过PCR和/或基因合成产生包含如下所述的抗体链的融合基因,并通过已知的重组方法和技术通过连接相应的核酸区段(例如在相应的载体中使用独特的限制性位点)组装。通过DNA测序验证亚克隆的核酸序列。对于瞬时转染,通过从转化的大肠杆菌培养物的质粒制备(Nucleobond AX, Macherey-Nagel)制备更大量的质粒。

[0505] 细胞培养技术

[0506] 如Current Protocols in Cell Biology(2000), Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. and Yamada, K.M. (编辑), John Wiley & Sons, Inc. 所述使用标准细胞培养技术。

[0507] 如下所述,通过在粘附生长的HEK293-EBNA中或在悬浮生长的HEK29-F细胞中瞬时共转染相应的表达质粒来表达多特异性抗体。

[0508] 在HEK293-EBNA系统中的瞬时转染

[0509] 通过在补充有10%超低IgG FCS(胎牛血清, **Gibco®**)、2mM L-谷氨酰胺(**Gibco®**)和250 μ g/ml遗传霉素(**Gibco®**)的MEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, **Gibco®**)中培养的粘附生长的HEK293-EBNA细胞(表达EB病毒核抗原的人胚胎肾细胞系293;美国典型培养物收集中心(American type culture collection)保藏号ATCC# CRL-10852, Lot. 959 218)中瞬时共转染相应的表达质粒(例如编码重链和修饰的重链以及相应的轻链和修饰的轻链)表达多特异抗体。为了转染,以4:1(范围从3:1至6:1)的FuGENE™ 试剂(μ l)与DNA(μ g)的比率使用FuGENE™ 6转染试剂(Roche Molecular Biochemicals)。使用等摩尔比率的(修饰的和野生型)轻链和(修饰的和野生型)重链编码质粒从相应质粒表

达蛋白质。细胞在第3天用L-谷氨酰胺加入4mM、葡萄糖[Sigma]和NAA[Gibco®] 饲养。转染后从第5天至第11天通过离心收获含有多特异性抗体的细胞培养上清液,并储存于-20℃。关于在例如HEK293细胞中重组表达人免疫球蛋白的一般信息在以下文献中给出: Meissner, P. 等人Biotechnol. Bioeng. 75 (2001) 197-2033。

[0510] HEK293-F系统中的瞬时转染

[0511] 根据制造商的说明书,使用HEK293-F系统 (Invitrogen) 通过用相应质粒(例如,编码重链和修饰的重链,以及相应的轻链和修饰的轻链) 的瞬时转染产生多特异性抗体。简言之,用四种表达质粒和293fectin™或fectin (Invitrogen) 的混合物转染在摇瓶或在搅拌发酵罐中在无血清FreeStyle™293表达培养基 (Invitrogen) 中悬浮生长的HEK293-F细胞 (Invitrogen)。对于2L摇瓶 (Corning), 将HEK293-F细胞以 $1.0E*6$ 个细胞/mL的密度接种在600mL中并在120rpm, 8%CO₂下孵育。第二天以细胞密度约 $1.5E*6$ 个细胞/mL用约42mL的以下混合物转染细胞:A) 20mL Opti-MEM (Invitrogen) 和600μg总质粒DNA (1μg/mL) (等摩尔比分别编码重链和修饰的重链,以及相应的轻链或修饰的轻链), 和B) 20ml Opti-MEM+1.2mL 293fectin或fectin (2μl/mL)。根据在发酵过程中的葡萄糖消耗加入葡萄糖溶液。5-10天后收获含有分泌的抗体的上清液,并从上清液中直接纯化抗体或冷冻保存上清液。

[0512] 蛋白质测定

[0513] 根据Pace等人Protein Science, 1995, 4, 2411-1423, 使用基于氨基酸序列计算的摩尔消光系数,通过测定280nm的光密度 (OD) 来测定纯化的抗体和衍生物的蛋白质浓度。

[0514] 上清液中抗体浓度的测定

[0515] 用蛋白A琼脂糖珠 (Roche) 通过免疫沉淀估计细胞培养上清液中抗体和衍生物的浓度。将60μL蛋白A琼脂糖珠在TBS-NP40 (50mM Tris, pH 7.5、150mM NaCl、1%Nonidet-P40) 中洗涤三次。随后,将1-15mL细胞培养上清液施加到TBS-NP40中预平衡的蛋白A琼脂糖珠。在室温孵育1小时后,将珠用0.5mL TBS-NP40在Ultrafree-MC-过滤柱 (Amicon) 上洗涤一次,用0.5mL 2x磷酸盐缓冲液 (2xPBS, Roche) 洗涤两次,并用0.5mL 100mM柠檬酸钠 pH5.0简短地洗涤四次。通过加入35μl NuPAGE® LDS样品缓冲液 (Invitrogen) 洗脱结合的抗体。分别将样品的一半与NuPAGE®样品还原剂组合或保持非还原,然后在70℃加热10分钟。从而,将5-30μl施加到4-12% NuPAGE® Bis-Tris SDS-PAGE (Invitrogen) (具有用于非还原的SDS-PAGE的MOPS缓冲液和具有用于还原的SDS-PAGE的NuPAGE®抗氧化剂运行缓冲液添加剂 (Invitrogen) 的MES缓冲液) 并用考马斯蓝染色。

[0516] 通过亲和HPLC色谱法定量测量细胞培养上清液中抗体和衍生物的浓度。简言之,将含有结合蛋白A的抗体和衍生物的细胞培养上清液施加到在Agilent HPLC 1100系统上的200mM KH₂PO₄、100mM柠檬酸钠, pH 7.4中的Applied Biosystems Poros A/20柱,并用200mM NaCl、100mM柠檬酸, pH 2.5从基质洗脱。通过UV吸光度和峰面积的整合来定量洗脱的蛋白质。纯化的标准IgG1抗体用作标准。

[0517] 或者,通过夹心-IgG-ELISA测量细胞培养上清液中抗体和衍生物的浓度。简言之,用100μL/孔生物素化的抗人IgG捕获分子F(ab')₂<h-Fc γ>BI (Dianova) 以0.1μg/mL在室温下包被StreptaWell High Bind Streptavidin A-96孔微量滴定板 (Roche) 1小时或在4℃下过夜,随后用200μL/孔PBS, 0.05% Tween (PBST, Sigma) 洗涤三次。将含各抗体的细胞培养

上清液在PBS (Sigma)中的系列稀释液100 μ L/孔加入孔中,并在微量滴定板摇床上在室温下孵育1-2小时。用200 μ L/孔PBST洗涤孔三次,并用0.1 μ g/mL的100 μ l F(ab')₂<hFc γ >POD (Dianova)作为检测抗体在室温下在微量滴定板摇床上检测结合的抗体1-2小时。用200 μ L/孔PBST三次洗掉未结合的检测抗体,通过加入100 μ L ABTS/孔检测结合的检测抗体。在Tecan Fluor光谱仪上测定405nm的测量波长(参考波长492nm)下吸光度。

[0518] 蛋白质纯化

[0519] 参考标准方案从过滤的细胞培养上清液中纯化蛋白质。简言之,将抗体施加到蛋白A琼脂糖柱(GE healthcare)并用PBS洗涤。在pH 2.8获得抗体的洗脱,然后立即中和样品。通过尺寸排阻色谱法(Superdex200,GE Healthcare)在PBS中或在20mM组氨酸、150mM NaCl pH 6.0中将聚集的蛋白质从单体抗体分离。合并单体抗体级分,使用例如MILLIPORE Amicon Ultra (30MWC0)离心浓缩器浓缩(如果需要)、冷冻并储存在-20 $^{\circ}$ C或-80 $^{\circ}$ C。提供部分样品用于随后的蛋白质分析和分析表征,例如通过SDS-PAGE、尺寸排阻色谱法(SEC)或质谱法。

[0520] SDS-PAGE

[0521] 根据制造商的说明书使用**NuPAGE[®]** Pre-Cast凝胶系统(Invitrogen)。具体地,使用10%或4-12% **NuPAGE[®] Novex[®]** Bis-TRIS Pre-Cast凝胶(pH 6.4)和**NuPAGE[®]** MES (还原的凝胶,具有**NuPAGE[®]**抗氧化剂运行缓冲添加剂)或MOPS (非还原的凝胶)运行缓冲液。

[0522] CE-SDS

[0523] 使用微流体Labchip技术(PerkinElmer,USA)通过CE-SDS分析纯度和抗体完整性。根据制造商的说明书使用HT蛋白质表达试剂的试剂盒制备5 μ l蛋白质溶液用于CE-SDS分析,并使用HT蛋白质表达芯片在LabChip GXII系统上分析。使用LabChip GX软件分析数据。

[0524] 分析尺寸排阻色谱法

[0525] 通过HPLC色谱法进行用于测定抗体的聚集和寡聚状态的尺寸排阻色谱法(SEC)。简言之,将蛋白A纯化的抗体施加到Dionex **Ultimate[®]**系统(Thermo Fischer Scientific)上的300mM NaCl、50mM KH₂PO₄/K₂HPO₄,pH 7.5中的Tosoh TSKgel G3000SW柱,或者施加到Dionex HPLC系统上的2x PBS中的Superdex 200柱(GE Healthcare)。通过UV吸光度和峰面积的整合来定量洗脱的蛋白质。BioRad凝胶过滤标准151-1901作为标准。

[0526] 质谱法

[0527] 本节描述了具有CL-CH1结构域交换(CrossMab^{CH1-CL})的多特异性抗体的表征,重点在于它们的正确组装。通过去糖基化的完整CrossMab的电喷雾电离质谱法(ESI-MS)以及在去糖基化/限制性LysC消化的CrossMab的特殊情况下分析预期的一级结构。

[0528] 在蛋白质浓度为1mg/ml时,将CrossMab^{CH1-CL}用磷酸盐或Tris缓冲液中的N-糖苷酶F在37 $^{\circ}$ C下去糖基化至多17小时。用100 μ g去糖基化的CrossMab^{CH1-CL}在Tris缓冲液pH8中分别在室温下持续120小时和在37 $^{\circ}$ C下持续40分钟进行限制性LysC(Roche)消化。在质谱法之前,样品通过HPLC在Sephadex G25柱(GE Healthcare)上脱盐。通过ESI-MS在配备有TriVersa NanoMate源(Advion)的maXis 4G UHR-QTOF MS系统(Bruker Daltonik)上测定总质量。

[0529] 热稳定性(T_{agg} 和 T_m)

[0530] 在20mM组氨酸氯化物、140mM NaCl, pH 6.0中制备1mg/mL样品,并将其转移到9 μ L多比色皿阵列中。在Optim1000仪器(Avacta Analytical Inc.)中以0.1 $^{\circ}$ C/分钟的恒定速率将多比色皿阵列从35 $^{\circ}$ C加热至90 $^{\circ}$ C。该仪器连续记录266nm激光器的散射光强度,数据点大约为每0.5 $^{\circ}$ C。将光散射强度相对于温度作图。聚集起始温度(T_{agg})被定义为散射光强度开始增加时的温度。通过将荧光强度相对于温度作图而确定溶解温度 T_m ,并将 T_m 定义为这些曲线中的拐点。

[0531] 使用表面等离子体共振 (SPR) (BIAcore) 测定多特异性抗体与相应抗原的结合和结合亲和力

[0532] 根据以下程序评估VEGF结合:

[0533] 使用**BIAcore**[®] T200仪器(GE Healthcare)通过表面等离子体共振研究所示抗体与人VEGFA-121的结合。通过使用GE Healthcare提供的胺偶联试剂盒将大约10000 (RU) 抗His抗体(1 μ g/ml抗His抗体;订购代码:28995056;GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden) 偶联在系列S CM5芯片(GE Healthcare BR-1005-30)上, pH 5.0。在固定程序期间使用HBS-N(10mM HEPES、150mM NaCl pH 7.4, GE Healthcare)作为运行缓冲液。对于以下动力学表征,样品和运行缓冲液是pH 7.4的PBS-T(10mM磷酸盐缓冲液,包含0.05% Tween20)。流动池设置为25 $^{\circ}$ C-样品块设置为12 $^{\circ}$ C-并在动力学表征之前用运行缓冲液预处理(primed)两次。

[0534] 通过以5 μ L/分钟的流速注射0.5 μ g/ml溶液30秒来捕获VEGF-A-121-His。通过注射溶液中不同浓度的所示抗体180秒测量结合,流速30 μ L/分钟,从1000nM开始以1:3系列稀释。监测解离相长达600秒,并通过从样品溶液转换到运行缓冲液触发。通过用甘氨酸pH 1.5溶液以30 μ L/分钟的流速洗涤60秒再生表面。通过减去从抗His抗体表面获得的反应来校正本体(bulk)折射率差异。也减去空白注射(=双重参考)。为了计算 K_D 和其他动力学参数,使用Langmuir 1:1模型。

[0535] 根据以下程序评估Ang-2结合:

[0536] 使用**BIAcore**[®] T200仪器(GE Healthcare)通过表面等离子体共振研究所示抗体与人Ang-2-RBD-Fc的结合。通过使用GE Healthcare提供的胺偶联试剂盒将大约8000 (RU) 山羊抗人F(ab')₂(10 μ g/ml抗人F(ab')₂;订购代码:28958325;GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden) 偶联在系列S CM5芯片(GE Healthcare BR-1005-30)上, pH 5.0。在固定程序期间使用HBS-N(10mM HEPES、150mM NaCl pH 7.4, GE Healthcare)作为运行缓冲液。对于以下动力学表征,样品和运行缓冲液是pH 7.4的PBS-T(10mM磷酸盐缓冲液,包含0.05% Tween20)。流动池设置为25 $^{\circ}$ C-样品块设置为12 $^{\circ}$ C-并在动力学表征之前用运行缓冲液预处理两次。

[0537] 通过以5 μ L/分钟的流速注射5nM溶液25秒来捕获双特异性抗体。通过注射溶液中不同浓度的人Ang2-RBD-Fc 120秒测量结合,流速30 μ L/分钟,从100nM开始以1:3系列稀释。监测解离相长达180秒,并通过从样品溶液转换到运行缓冲液触发。通过用甘氨酸pH 2.1溶液以30 μ L/分钟的流速洗涤60秒再生表面。通过减去从山羊抗人F(ab')₂表面获得的反应来校正本体折射率差异。也减去空白注射(=双重参考)。为了计算表观KD,使用Langmuir 1:1模型。

[0538] 根据以下程序评估IL-17结合:

[0539] 通过使用GE Healthcare提供的胺偶联试剂盒将大约6000共振单位(RU)的捕获系统(15 μ g/ml山羊抗人F(ab')₂;订购代码:28958325;GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden)偶联在CM5芯片上,pH 5.0。样品和系统缓冲液是pH 7.4的PBS-T(10mM磷酸盐缓冲液,包含0.05%Tween20)。通过以10 μ l/分钟的流速注射50nM溶液90秒来捕获双特异性抗体。通过注射溶液中不同浓度的人IL17 3分钟测量结合,流速30 μ l/分钟,从50nM开始以1:1系列稀释。监测解离相长达10分钟,并通过从样品溶液转换到运行缓冲液触发。通过用10mM甘氨酸pH 2.1溶液以30 μ l/分钟的流速洗涤60秒两次再生表面。通过减去从山羊抗人F(ab')₂表面获得的反应来校正本体折射率差异。也减去空白注射(=双重参考)。为了计算表观K_D和其他动力学参数,使用Langmuir 1:1模型。

[0540] 根据以下程序评估TWEAK结合:

[0541] 由于TWEAK分析物与传感器表面的强烈非特异性结合,选择了使用TWEAK作为配体的反向设置。使用由GE Healthcare提供的胺偶联试剂盒,将约100RU的TWEAK固定在C1芯片表面上,pH5.0。样品和系统缓冲液是pH 7.4的PBS-T(10mM磷酸盐缓冲液,包含0.05% Tween20)。通过注射溶液中不同浓度的双特异性抗体3分钟测量结合,流速30 μ l/分钟,从50nM开始以1:1系列稀释。监测解离相长达10分钟,并通过从样品溶液转换到运行缓冲液触发。通过用3M MgCl₂溶液以30 μ l/分钟的流速洗涤30秒三次再生表面。通过减去从空白偶联表面获得的反应来校正本体折射率差异。也减去空白注射(=双重参考)。为了计算K_D和其他动力学参数,使用Langmuir 1:1模型。

[0542] 实施例1A

[0543] 产生和表达结合血管生成素-2(ANG2)和血管内皮生长因子(VEGF)的二价双特异性抗体,其在一个结合臂中具有CL-CH1结构域交换(CrossMab^{CH1/CL})以及在CH1/CL界面中有一个或两个带电荷的氨基酸取代

[0544] 在第一实施例中,如概述方法部分所述,通过经典分子生物学技术产生结合人血管生成素-2(ANG2)和人血管内皮生长因子(VEGF)的双特异性抗体,并如上所述在HEK293细胞中瞬时表达。

[0545] 图1给出了这些相应双特异性抗体的一般示意图。为了比较分析,制备了野生型(wt)CL-CH1结构域交换抗体,其在CH1/CL界面中没有带电荷的氨基酸取代。使用含有编码如表1所示的氨基酸序列的核酸的表达质粒表达双特异性抗体。

[0546] 表1:在VEGF Fab臂上具有CH1-CL结构域交换的Ang2-VEGF CrossMab^{CH1-CL}的氨基酸序列:野生型(wt)和具有带电荷的氨基酸取代的不同组合

双特异性抗体	Ang2_LC	Ang2_HC	VEGF_LC*	VEGF_HC*
	LC 1	HC1	xLC2(短链)	xHC2(长链)
[0547] Ang2VEGF-0454	SEQ ID NO: 1 E123(Wt)/ Q124(Wt)	SEQ ID NO: 2 K147(Wt)/ K213(Wt)	SEQ ID NO: 3 K147(Wt)/ K213(Wt)	SEQ ID NO: 4 E123(Wt)/ Q124(Wt)

双特异性抗体	Ang2_LC	Ang2_HC	VEGF_LC*	VEGF_HC*
CrossMAb ^{CHI-CL} , 在 CHI-CL 界面中具有一个额外的电荷对				
Ang2VEGF-0455	SEQ ID NO: 5 Q124K	SEQ ID NO: 6 K147E	SEQ ID NO: 3 Wt	SEQ ID NO: 4 Wt
Ang2VEGF-0456	SEQ ID NO: 5 Q124K	SEQ ID NO: 7 K213E	SEQ ID NO: 3 Wt	SEQ ID NO: 4 Wt
Ang2VEGF-0457	SEQ ID NO: 8 E123K	SEQ ID NO: 7 K213E	SEQ ID NO: 3 Wt	SEQ ID NO: 4 Wt
Ang2VEGF-0458	SEQ ID NO: 8 E123K	SEQ ID NO: 6 K147E	SEQ ID NO: 3 Wt	SEQ ID NO: 4 Wt
Ang2VEGF-0459	SEQ ID NO: 1 Wt	SEQ ID NO: 2 Wt	SEQ ID NO: 9 K147E	SEQ ID NO: 10 Q124K
Ang2VEGF-0460	SEQ ID NO: 1 Wt	SEQ ID NO: 2 Wt	SEQ ID NO: 11 K213E	SEQ ID NO: 10 Q124K
CrossMAbs ^{CHI-CL} , 在 CHI-CL 界面中具有两个额外的电荷对 (任选地在 CL 中一个额外的电荷 (Q124E))				
Ang2VEGF-0461	SEQ ID NO: 12 E123K/Q124R	SEQ ID NO: 13 K147E/ K213E	SEQ ID NO: 3 Wt	SEQ ID NO: 4 Wt
Ang2VEGF-0462	SEQ ID NO: 12 E123K/Q124R	SEQ ID NO: 14 K147E/ K213D	SEQ ID NO: 3 Wt	SEQ ID NO: 4 Wt
Ang2VEGF-0463	SEQ ID NO: 12 E123K/Q124R	SEQ ID NO: 14 K147E/ K213D	SEQ ID NO: 3 Wt	SEQ ID NO: 23 Q124E
CrossMAbs ^{CHI-CL} , 在 CHI-CL 界面中具有两个额外的电荷对以及在 VH-VL 界面中具有一个额外的电荷对 (任选地在 CL 中一个额外的电荷 (Q124E))				
Ang2VEGF-0464	SEQ ID NO: 15 Q38E/E123K/ Q124K	SEQ ID NO: 16 Q39K/K147E/ K213E	SEQ ID NO: 17 Q38K	SEQ ID NO: 18 Q39E
Ang2VEGF-0465	SEQ ID NO: 19 Q38K/E123K/ Q124K	SEQ ID NO: 20 Q39E/K147E/ K213E	SEQ ID NO: 17 Q38K	SEQ ID NO: 18 Q39E

[0548]

双特异性抗体	Ang2_LC	Ang2_HC	VEGF_LC*	VEGF_HC*
Ang2VEGF-0466	SEQ ID NO: 19 Q38K/E123K/ Q124K	SEQ ID NO: 20 Q39E/K147E/ K213E	SEQ ID NO: 17 Q38K	SEQ ID NO: 21 Q39E/Q124E
CrossMAb ^{CH1-CL} , 在 CH1-CL 界面中具有一个额外的电荷对以及在 CL 中一个额外的电荷 (Q124E) (或者仅在 CL 中两个额外的电荷 (Q124E))				
[0549] Ang2VEGF-0474	SEQ ID NO: 5 Q124K	SEQ ID NO: 7 K213E	SEQ ID NO: 3 wt	SEQ ID NO: 23 Q124E
Ang2VEGF-0475	SEQ ID NO: 22 Q124E	SEQ ID NO: 2 wt	SEQ ID NO: 3 wt	SEQ ID NO: 23 Q124E
Ang2VEGF-0476	SEQ ID NO: 22 Q124E	SEQ ID NO: 2 wt	SEQ ID NO: 11 K213E	SEQ ID NO: 10 Q124K
Ang2VEGF-0477	SEQ ID NO: 5 Q124K	SEQ ID NO: 6 K147E	SEQ ID NO: 3 wt	SEQ ID NO: 23 Q124E

[0550] 对于所有构建体使用杵入白异二聚化技术,在第一CH3结构域中具有典型的杵(T366W)取代和第二CH3结构域中具有相应的白取代(T366S、L368A和Y407V) (以及两个额外引入的半胱氨酸残基S354C/Y349'C) (包含在上述各个相应的重链(HC)序列中)。

[0551] 实施例1B

[0552] 蛋白A纯化结合ANG2和VEGF的二价双特异性抗体,其在一个结合臂中具有CH1-CL结构域交换(CrossMAb^{CH1-CL})和在Fab臂中具有电荷对取代和/或在CH1/CL界面中具有一个额外的带电荷氨基酸取代。

[0553] 通过蛋白A亲和色谱法和尺寸排阻色谱法的组合从上清液中纯化上述实施例1A中表达的双特异性抗体。所有双特异性抗体可以以良好的产率产生并且稳定。表征所得产物,针对鉴定通过质谱法和分析性质,如通过CE-SDS的纯度、单体含量和稳定性。

[0554] 如概述方法部分所述,通过去糖基化的完整CrossMAb和去糖基化/纤溶酶消化或替代地去糖基化/限制性LysC消化的CrossMAb的电喷雾电离质谱法(ESI-MS)分析预期的一级结构。

[0555] 表2中显示了蛋白A色谱法之后和蛋白A和SEC色谱法之后的纯度结果。表3、4、5和6给出了聚集起始温度。

[0556] 表2:蛋白A纯化后在CH1/CL界面中具有带电荷氨基酸取代的不同多特异性抗体的纯度

蛋白 A 纯化 (结果)			
THERAPS	1L 上清液计算的产率 [mg]	分析 SEC 单体[%]	CE-SDS 单体 [%]
Ang2VEGF-0454-0002 (WT)	67.5	82.36	83.59
CrossMAb ^{CH1-CL} , 在 CH1-CL 界面中具有一个额外的电荷对			
Ang2VEGF-0455-0002	2.12	71.79	89.87
Ang2VEGF-0456-0002	35.2	85.27	89.09
Ang2VEGF-0457-0002	71.5	87.69	95.26
Ang2VEGF-0458-0002	75	82.91	80.95
Ang2VEGF-0459-0002	15.3	71.00	86.47
Ang2VEGF-0460-0002	9.6	66.41	34.77
CrossMAbs ^{CH1-CL} , 在 CH1-CL 界面中具有两个额外的电荷对(任选地在 CL 中具有一个额外的电荷(Q124E))			
Ang2VEGF-0461-0002	30.4	85.29	81.8
Ang2VEGF-0462-0002	22.8	92.07	96.07
Ang2VEGF-0463-0002	13.5	98.83	100
CrossMAbs ^{CH1-CL} , 在 CH1-CL 界面中具有两个额外的电荷对, 以及在 VH-VL 界面中具有一个额外的电荷对(任选地在 CL 中具有一个额外的电荷(Q124E))			
Ang2VEGF-0464-0002	51.50	73.58	66.26
Ang2VEGF-0465-0002	10.90	87.07	88.77
Ang2VEGF-0466-0002	20.20	91.91	95.99
CrossMAb ^{CH1-CL} , 在 CH1-CL 界面中具有一个额外的电荷对, 以及在 CL 中具有一个额外的电荷(Q124E) (或者仅在 CL 中具有两个额外的电荷(Q124E))			
Ang2VEGF-0474	11.44	97.45	n.a.
Ang2VEGF-0475	16.72	57.38	43.37
Ang2VEGF-0476	23.32	83.49	85.46
Ang2VEGF-0477	30.72	97.51	>99

[0557]

[0558] 所有CrossMAb^{CH1-CL}都可以被表达和纯化。蛋白A色谱法之后获得的物质的纯度只是可获得纯度的第一粗略估计。因此,使用通过制备性SEC的额外纯化步骤更好地证实可以纯化双特异性抗体以最佳地获得最大所需单体形式的容易程度。仅在蛋白A和SEC纯化后应用额外的分析方法以更好地表征所获得的双特异性抗体的性质(例如热稳定性(聚集起始

温度)、质谱法和功能评估)。

[0559] 实施例2

[0560] 在CH1/CL界面中具有一个额外的电荷对的CrossMAb^{CH1-CL}的SEC纯化、分析表征和热稳定性。

[0561] 通过尺寸排阻色谱法进一步纯化双特异性抗体Ang2VEGF-0454 (对照)、-0455、-0456、-0457、-0458、-0459和-0460。所有双特异性抗体可以以良好的产率产生并且稳定。表征所得产物通过质谱法的鉴定和分析性质,如通过CE-SDS的纯度、单体含量和热稳定性。

[0562] 如概述方法部分所述,通过去糖基化的完整CrossMAb和去糖基化/纤溶酶消化或替代地去糖基化/限制性LysC消化的CrossMAb的电喷雾电离质谱法 (ESI-MS) 分析预期的一级结构。

[0563] 表3:具有一个额外的电荷对的CrossMAb^{CH1-CL}的纯度和聚集起始温度。通过在CH1/CL界面中的带电荷氨基酸取代增加聚集温度。

	蛋白 A 和制备性 SEC 纯化(结果)		T_agg/°C	通过 ESI-MS 鉴定
	分析 SEC 单体[%]	CE-SDS 单体[%]		
[0564] 双特异性抗体				
Ang2VEGF-0454 (WT)	97.01	90.07	52.8	确认的 92% CrossMab 3% HC 异二聚体 5% LC 异二聚体
1. CrossMAb ^{CH1-CL} , 在 CH1-CL 界面中具有一个额外的电荷对				
Ang2VEGF-0455	97.31	98.1	58.5	确认的 100% CrossMab

[0565]	Ang2VEGF-0456	>99	97.03	55.3	确认的 98% CrossMab 2% HC 异二聚体
	Ang2VEGF-0457	>99	98.44	56.1	确认的 99% CrossMab 1% HC 异二聚体
	Ang2VEGF-0458	96.38	86.78	52.9	确认的 97% CrossMab 3% HC 异二聚体
	Ang2VEGF-0459	98.53	97.62	54.5	确认的 100% CrossMab
	Ang2VEGF-0460	83.08	76.52	49.5	确认的 90% CrossMab 10% 未知质量 (102-103 kDa)

[0566] 在CrossMab^{CH1-CL}中引入一个额外的带电荷残基对显示：

[0567] • 获得的CrossMab的分析SEC的纯度随所选电荷对而增加

[0568] • 获得的CrossMab的CE-SDS的纯度随所选电荷对而增加

[0569] • 获得的CrossMab的热稳定性随所选电荷对而增加

[0570] • 获得的CrossMab的热稳定性随所选电荷对的位置而增加(交叉相对于非交叉Fab臂)

[0571] 基于这些结果,可以得出结论:轻链中Q124K和重链中K147E的电荷对是优选的电荷对。应该在wt Fab臂(非交叉)中引入额外的电荷。

[0572] 实施例3

[0573] 在非交叉的Fab臂上具有两个额外电荷对的CrossMabCH1-CL的SEC纯化、分析表征和热稳定性。

[0574] 双特异性抗体Ang2VEGF-0454(对照)、-0461、-0462和-0463通过尺寸排阻色谱进一步纯化。所有双特异性抗体可以以良好的产率产生并且稳定。表征所得产物通过质谱法的鉴定和分析性质,如通过CE-SDS的纯度、单体含量和热稳定性。

[0575] 如概述方法部分所述,通过去糖基化的完整CrossMab和去糖基化/纤溶酶消化或替代地去糖基化/限制性LysC消化的CrossMab的电喷雾电离质谱法(ESI-MS)分析预期的一级结构。

[0576] 表4:蛋白A和SEC色谱法之后具有两个额外的电荷对的CrossMab^{CH1-CL}的纯度和聚集起始温度。通过在CH1/CL界面中的带电氨基酸取代增加聚集起始温度。

	蛋白 A 和制备性 SEC 纯化(结果)		T _{agg} /°C	通过 ESI-MS 鉴定
双特异性抗体	分析 SEC 单体[%]	CE-SDS 单体 [%]		
Ang2VEGF-0454 (Ang2VEGF ^{CH1-CL} WT 对照)	97.01	90.07	52.8	确认的 92% CrossMab 3% HC 异二聚体 5% LC 异二聚体
[0577] CrossMAbs ^{CH1-CL} , 在 CH1-CL 界面中具有两个额外的电荷对(任选地在 CL 中具有一个额外的电荷(Q124E))				
Ang2VEGF-0461	>99	92.26	57.1	确认的 99% CrossMab 1% ½CrossMab
Ang2VEGF-0462	>99	98.33	56.4	确认的 100% CrossMab
Ang2VEGF-0463	>99	100	56.4	确认的 100% CrossMab

[0578] 在CrossMab^{CH1-CL}中引入两个额外的带电荷残基对显示:

[0579] • 聚集温度和热稳定性明显总体增加

[0580] • 获得的CrossMab的分析SEC的纯度在制备性SEC后不再随所选电荷对而增加,但在蛋白A色谱法后明显增加(参见表2)

[0581] • 在CE-SDS单体含量方面,在未交叉Fab臂的CH1中K213D似乎略优于K213E。

[0582] • 获得的CrossMab的CE-SDS纯度随所选电荷对而增加

[0583] • 获得的CrossMab的CE-SDS纯度明显通过在交叉Fab臂的位置Q124E中加入单个带电荷的氨基酸而增加

[0584] • 在CL中额外的单个带电荷氨基酸Q124E有利于总体纯度(CE-SDS和SEC),并且不导致热稳定性降低。

[0585] 基于这些结果,可以得出结论:轻链中的电荷对Q124K/E123R和重链中的K147E/K213E/D是非交叉Fab臂的优选电荷对。在交叉Fab臂的CL中加入一个单个带电荷的残基Q124E另外地又稍微改善了CrossMab CH1-CL(CE-SDS)的纯度,并且对热稳定性没有负面影响。

[0586] 实施例4

[0587] 在非交叉Fab臂上具有两个额外的电荷对以及在VH-VL界面中具有额外的电荷的CrossMabCH1-CL的SEC纯化、分析表征和热稳定性。

[0588] 双特异性抗体Ang2VEGF-0454(对照)、-0464、-0465和-0466通过尺寸排阻色谱法进一步纯化。所有双特异性抗体可以以良好的产率产生并且稳定。表征所得产物通过质谱法的鉴定和分析性质,如通过CE-SDS的纯度、单体含量和热稳定性。

[0589] 如概述方法部分所述,通过去糖基化的完整CrossMab和去糖基化/纤溶酶消化或

替代地去糖基化/限制性LysC消化的CrossMAb的电喷雾电离质谱法 (ESI-MS) 分析预期的一级结构。

[0590] 表5:在蛋白A和SEC色谱法后,具有两个额外的电荷对在VH-VL界面中一个额外的电荷对的CrossMAbCH1-CL的纯度和聚集起始温度。

	蛋白 A 和 SEC 纯化 (结果)		T _{agg} /°C	通过 ESI-MS 鉴定
	分析 SEC 单体[%]	CE-SDS 单体 [%]		
[0591]				
	97.01	90.07	52.8	确认的 92% CrossMab 3% HC 异二聚体 5% LC 异二聚体
	Ang2VEGF-0454 (Ang2VEGF ^{CH1-CL} WT 对照)			

CrossMAbs ^{CH1-CL} , 在 CH1-CL 界面中具有两个额外的电荷对在 VH-VL 界面中具有一个额外的电荷对(任选地在 CL 中具有一个额外的电荷 (Q124E))					
[0592]	Ang2VEGF-0464	96.94	97.37	56.4	确认的 100% CrossMab
	Ang2VEGF-0465	98.03	98.22	54.8	确认的 100% CrossMab
	Ang2VEGF-0466	98.61	98.94	55.6	确认的 100% CrossMab

[0593] 在CrossMAb^{CH1-CL}中引入两个额外的带电荷残基对在Vh (Q38) -V1 (Q39) 中引入一个额外的电荷对表明:

[0594] • 获得的CrossMAb的分析SEC的纯度在制备性SEC后不再随所选电荷对而增加(与CrossMAb^{CH1-CL}相比),但在蛋白A色谱法后明显增加(参见表2)

[0595] • 获得的CrossMAb的CE-SDS纯度随所选电荷对而增加

[0596] • 在CL中额外的带电荷氨基酸Q38E和Vh中的Q39K有利于总体纯度(CE-SDS和SEC),并且不导致热稳定性下降。在VL中的Q38E和Vh中的Q39K方向是优选的。

[0597] 基于这些结果,可以得出结论:在可变结构域中VL中Q38E和Vh中的Q39K的电荷对是非交叉Fab臂的优选电荷对,VL中的Q38K和VH中的Q39E是交叉Fab臂的优选电荷对。在交叉Fab臂的CL中加入一个单个带电荷残基Q124E进一步改善了CrossMAb CH1-CL的纯度(CE-SDS),并且对热稳定性没有负面影响。

[0598] 实施例5

[0599] 在非交叉的Fab臂或在交叉的Fab臂上具有一个额外的电荷对以及在无电荷对修饰的Fab臂的CL界面中具有一个额外的电荷(Q124E)的CrossMAb^{CH1-CL}的SEC纯化、分析表征和热稳定性。

[0600] 双特异性抗体Ang2VEGF-0454(对照)、-0464、-0465和-0466通过尺寸排阻色谱法

进一步纯化。所有双特异性抗体可以以良好的产率产生并且稳定。表征所得产物通过质谱法的鉴定和分析性质,如通过CE-SDS的纯度、单体含量和热稳定性。

[0601] 如概述方法部分所述,通过去糖基化的完整CrossMAb和去糖基化/纤溶酶消化或替代地去糖基化/限制性LysC消化的CrossMAb的电喷雾电离质谱法(ESI-MS)分析预期的一级结构。

[0602] 表6:蛋白A和SEC色谱法之后,具有一个额外的电荷对在另一Fab臂的CL中具有Q124E的CrossMAb^{CH1-CL}的纯度和聚集温度。描述了CH1/CL界面中带电荷氨基酸取代对聚集起始温度的影响。

	蛋白 A 和 SEC 纯化 (结果)		T _{agg} / °C	通过 ESI-MS 鉴定	
	分析 SEC 单体[%]	CE-SDS 单体 [%]			
	Ang2VEGF-0454 (Ang2VEGF ^{CH1-CL} WT 对照)	97.01	90.07	52.8	确认的
	CrossMAb ^{CH1-CL} , 在 CH1-CL 界面中具有一个额外的电荷对以及在 CL 中具有一个额外的电荷 (Q124E) (或者仅在 CL 中具有两个额外的电荷(Q124E))				
	Ang2VEGF-0474	>99	98,08	55.1	确认的 97% CrossMab 1% 杵 HC 二聚体 2% VEGF AK
[0603]	Ang2VEGF-0475	89.87	83.72	n.a.	确认的 69% 正确的 CrossMab 5% Ang2 AK 2% ¾ Ang2 AK 11% CrossMab 具有 2x LC Ang2 13% 白异二聚体, 具有 1 LC Ang2 和 1 LC VEGF
	Ang2VEGF-0476	>99	93.14	50.7	确认的 87% CrossMab 7% HC 异二聚体 6% LC 异二聚体
[0604]	Ang2VEGF-0477	>99	>99	56.6	确认的 100% CrossMab

[0605] 基于实施例2至5中的这些结果,可以得出结论,非交叉Fab臂中的电荷对Q124K

(CL) 和K147E (CH1) 以及交叉Fab臂的CL中的单个电荷取代Q124E是CrossMab^{CH1-CL}的优选电荷对修饰。总体而言,这四个电荷对取代 (CL:Q124K与CH1:K147E或K213E/D组合) 与第二Fab臂的CL中的单个电荷残基取代Q124E组合是CrossMab^{CH1-CL}形式最优选的电荷取代。在非交叉Fab臂中电荷对取代是优选的,而单个电荷取代 (CL中的Q124E) 优选位于交叉Fab臂中。与无带电荷氨基酸取代的亲本CrossMab^{CH1-CL}相比,这4个实施例和取代都清楚地显示出在纯度和热稳定性方面的有益增加。

[0606] 实施例6

[0607] 抗原结合

[0608] 如概述方法部分所述,通过 **Biacore®** 评估多特异性抗体与其相应的靶抗原 (即ANG2和VEGF) 的结合。

[0609] 作为比较实施例,平行评估了特异性结合Ang2和VEGF的参考抗体,其包含CH1/CL结构域交换/置换但缺乏带电荷的氨基酸取代 (Ang2VEGF-0454抗体)。

[0610] 用来自蛋白A和SEC纯化的纯化物质进行亲和力测量,结果总结在表7中。

[0611] 表7:所示抗体对VEGF的亲和力和所示抗体对Ang2的亲和力

[0612]

双特异性抗体	VEGF 121			Ang2 RBD		
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD* (nM)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	App.KD* (nM)
Ang2VEGF-0454-0002 (对照)	2.04E+04	8.65E-05	4	1.08E+07	1.82E-02	2
Ang2VEGF-0455-0002	1.26E+04	9.01E-05	7	1.06E+07	2.27E-02	2

[0613]

双特异性抗体	VEGF 121			Ang2 RBD		
Ang2VEGF-0456-0002	2.10E+04	8.40E-05	4	1.16E+07	2.52E-02	2
Ang2VEGF-0459-0002	1.70E+04	7.19E-05	4	8.80E+06	1.99E-02	2
Ang2VEGF-0460-0002	1.42E+04	8.18E-05	6	8.76E+06	1.63E-02	2
Ang2VEGF-0461-0002	1.92E+04	7.67E-05	4	1.07E+07	1.63E-02	2
Ang2VEGF-0462-0002	2.12E+04	7.52E-05	4	1.21E+07	2.52E-02	2
Ang2VEGF-0463-0002	1.76E+04	7.44E-05	4	9.54E+06	2.81E-02	3
Ang2VEGF-0464	1.66E+04	7.54E-05	5	8.81E+06	1.72E-02	2
Ang2VEGF-0465-0002	1.60E+04	7.96E-05	5	1.17E+07	3.25E-02	3
Ang2VEGF-0466-0002	1.86E+04	8.01E-05	4	1.06E+07	3.10E-02	3
Ang2VEGF-0474	2.13E+04	5.41E-05	3	2.04E+06	9.70E-03	5
Ang2VEGF-0475	1.05E+04	7.26E-05	7	1.38E+06	5.05E-03	4
Ang2VEGF-0476	1.85E+04	6.94E-05	4	1.32E+06	1.14E-02	9

[0614]	双特异性抗体	VEGF 121			Ang2 RBD		
	Ang2VEGF-0477	1.95E+04	6.11E-05	3	2.19E+06	8.23E-03	4

[0615] 测试抗体特异性结合两种靶标,即Ang2和VEGF,并且表现出纳摩尔范围内的抗原亲和力。与Ang2VEGF-0454CrossMAb(无带电荷的氨基酸取代)相比,所有使用的带电荷氨基酸取代使得CrossMAb^{CH1-CL}能够以对每个靶相似的亲和力结合Ang2和VEGF,并且不显示对靶结合的任何影响。

[0616] 实施例7

[0617] 产生和表达结合TWEAK和IL-17的二价双特异性抗体,其在一个结合臂中具有CL-CH1结构域交换(CrossMAb^{CH1/CL})以及在CH1/CL界面中具有一个或两个带电荷的氨基酸取代

[0618] 在进一步的实施例中,如概述方法部分所述通过经典分子生物学技术产生结合人TWEAK和人IL-17的双特异性抗体,并如上所述在HEK293细胞中瞬时表达。

[0619] 在图1中给出这些相应双特异性抗体的一般图解。为了比较分析,制备了在CH1/CL界面中无带电荷的氨基酸取代的野生型(wt)CL-CH1结构域交换的抗体。使用表达质粒表达双特异性抗体,所述表达质粒含有编码如表8所示的氨基酸序列的核酸。

[0620] 表8:在TWEAK Fab臂上具有CH1-CL结构域交换的TWEAK-IL17CrossMAb^{CH1-CL}的氨基酸序列:野生型(wt)和具有带电荷氨基酸取代的不同组合

双特异性 抗 体	IL17_LC	IL17_HC	Tweak_LC*	Tweak_HC*
	LC 1	HC1	xLC2 (短链)	xHC2 (长链)
TweakIL17 -0049	SEQ ID NO: 28 E123(Wt)/ Q124(Wt)	SEQ ID NO: 29 K147(Wt)/ K213(Wt)	SEQ ID NO: 30 K147(Wt)/ K213(Wt)	SEQ ID NO: 31 E123(Wt)/ Q124(Wt)
TweakIL17 -0129	SEQ ID NO: 32 Q124K	SEQ ID NO: 33 K147E	SEQ ID NO: 30 Wt	SEQ ID NO: 31 Wt
TweakIL17 -0130	SEQ ID NO: 35 E123K	SEQ ID NO: 34 K213E	SEQ ID NO: 30 Wt	SEQ ID NO: 31 Wt
TweakIL17 -0131	SEQ ID NO: 35 E123K	SEQ ID NO: 34 K147E	SEQ ID NO: 30 Wt	SEQ ID NO: 39 Q124E
TweakIL17 -0132	SEQ ID NO: 36 E123R/Q124K	SEQ ID NO: 37 K147E/K213E	SEQ ID NO: 30 Wt	SEQ ID NO: 31 Wt
TweakIL17 -0133	SEQ ID NO: 36 E123R/Q124K	SEQ ID NO: 38 K147E/K213D	SEQ ID NO: 30 Wt	SEQ ID NO: 39 Q124E
TweakIL17 -0134	SEQ ID NO: 32 Q124K	SEQ ID NO: 33 K147E	SEQ ID NO: 30 wt	SEQ ID NO: 39 Q124E

[0622] 对于所有构建体使用杵入白异二聚体技术,在第一CH3结构域中具有典型的杵(T366W)取代和在第二CH3结构域中具有相应的白取代(T366S、L368A和Y407V)(以及两个额外引入的半胱氨酸残基S354C/Y349'C)(包含在上述各相应的重链(HC)序列中)。

[0623] 如上所述,可以使用相应的方法和抗原表征这些抗体的特征性质。(参见例如方法和实施例1B至6)。

[0624] 实施例8

[0625] 结合TWEAK和IL-17的二价双特异性抗体的蛋白A纯化,其在一个结合臂中具有CL-CH1结构域交换(CrossMAb^{CH1/CL})并且在CH1/CL界面中具有一个或两个带电荷的氨基酸取代

[0626] 通过蛋白A亲和色谱法和尺寸排阻色谱法的组合从上清液中纯化上述实施例7中表达的双特异性抗体。所有双特异性抗体可以以良好的产率产生并且稳定。表征所得产物通过质谱法的鉴定和分析性质,如通过CE-SDS的纯度、单体含量和稳定性。

[0627] 如概述方法部分所述,通过去糖基化的完整CrossMAb和去糖基化/纤溶酶消化或替代地去糖基化/限制性LysC消化的CrossMAb的电喷雾电离质谱法(ESI-MS)分析预期的一级结构。

[0628] 表9中显示了蛋白A色谱法之后和蛋白A和SEC色谱法之后的纯度以及聚集起始温度的结果。

[0629] 表9:蛋白A纯化之后在CH1/CL界面中具有带电荷氨基酸取代的不同双特异性抗TWEAK/抗IL-17抗体的纯度和聚集起始温度

	蛋白 A 纯化			SEC 纯化			T _{agg} /°C	T _m (°C)
	量 [mg]	单 分析 SEC 体 [%]	单 CE-SDS 体 [%]	量 [mg]	单 分析 SEC 体 [%]	单 CE-SDS 体 [%]		
[0630] TweakIL17-0049 (对照)	3.5	82.38	80.63	1.2	>99	94.02	53.4	57.7
TweakIL17-0129	1.2	73.2	65.5	0.64	100	100	52.6	57.4
TweakIL17-0130	1.2	72.2	69.5	0.64	100	100	54.1	57.9
TweakIL17-0131	7	83.56	88.83	3.5	>99	>99	53.4	57.7
TweakIL17-0132	4	86.19	85.42	2.9	>99	>99	52	55.9
[0631] TweakIL17-0133	0.12	53.8	k. A.	0.07	100	k. A.	n.a.	n.a.
TweakIL17-0134	2.4	73.9	69.7	0.95	100	100	52.7	57

[0632] 所有CrossMab^{CH1-CL}都可以被表达和纯化。蛋白A色谱法之后获得的物质的纯度只是可获得纯度的第一粗略估计。因此,使用通过制备性SEC的额外纯化步骤更好地证实可以纯化双特异性抗体以最佳地获得最大所需单体形式的容易程度。

[0633] 蛋白A和SEC纯化之后所需双特异性CrossMab^{CH1-CL}的纯度得到改善,特别是如通过CE-SDS分析的单体含量。

[0634] 实施例9

[0635] 结合TWEAK和IL-17的二价双特异性抗体的抗原结合,所述抗体在一个结合臂中具有CL-CH1结构域交换(CrossMab^{CH1/CL})以及在CH1/CL界面中具有一个或两个带电荷的氨基酸取代

[0636] 如概述方法部分所述,通过**Biacore®**评估多特异性抗体与其相应的靶抗原(即IL17和TWEAK)的结合。

[0637] 作为比较实施例,平行评估了特异性结合IL17和TWEAK的参考抗体,其包含CH1/CL结构域交换/置换但缺乏带电荷的氨基酸取代(TweakIL17-0049抗体)。

[0638] 用来自蛋白A和SEC纯化的纯化物质进行亲和力测量,结果总结在表10中。

[0639] 表10:所示抗体对TWEAK的亲和力和所示抗体对IL17的亲和力(因为IL17是单二聚

体,测量表观KD)

[0640]	双特异性抗体	TWEAK			IL17		
[0641]	双特异性抗体	TWEAK			IL17		
		ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD* (nM)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	App.KD* (nM)
	TweakIL17-0049 (对照)	1.27E+06	4.82E-05	<0.1	1.34E+06	1.23E-04	<0.1
	TweakIL17-0129	7.07E+05	2.64E-05	<0.1	1.09E+07	2.04E-04	<0.1
	TweakIL17-0130	8.59E+05	2.83E-05	<0.1	1.04E+07	1.94E-04	<0.1
	TweakIL17-0131	1.20E+06	8.12E-05	<0.1	1.37E+06	1.25E-04	<0.1
	TweakIL17-0132	1.17E+06	4.79E-05	<0.1	1.39E+06	1.30E-04	<0.1
	TweakIL17-0134	8.70E+05	3.00E-05	<0.1	1.10E+07	2.08E-04	<0.1

序列表

<110> 豪夫迈·罗氏有限公司
 <120> 多特异性抗体
 <130> P33105-W0
 <150> EP 15188060.6
 <151> 2015-10-01
 <150> EP 16168918.7
 <151> 2016-05-10
 <160> 39
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 7571 - κ 轻链 (LC) <Ang-2> 野生型(wt)

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

[0001]

<210> 2
 <211> 459
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 7595 - 重链(HC) <Ang-2> 野生型(wt)

<400> 2
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
 100 105 110
 Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 130 135 140
 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 145 150 155 160
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 165 170 175
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 180 185 190

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 195 200 205
 Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 210 215 220
 Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 225 230 235 240
 Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly 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 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 Thr Val
 305 310 315 320
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 325 330 335
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 340 345 350
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
 355 360 365
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu 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 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 405 410 415
 Phe Leu Tyr 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 Asn His Tyr
 435 440 445
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 3
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0002]

<220>
 <223> 7594 - 轻链(LC) <VEGF>具有CL-CH1结构域交换野生型 (wt)

<400> 3

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 Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln 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
 210

<210> 4
 <211> 457
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 7593 - 重链(HC) <VEGF>具有CL-CH1结构域交换野生型 (wt)

<400> 4

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

[0003]

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
 50 55 60
 Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala
 115 120 125
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 130 135 140
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 145 150 155 160
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 165 170 175
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 180 185 190
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 195 200 205
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 210 215 220
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 225 230 235 240
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 245 250 255
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 260 265 270
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 275 280 285
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 290 295 300
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 305 310 315 320
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 325 330 335
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 340 345 350
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 355 360 365
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala 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
 Val 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 Asn His Tyr Thr Gln
 435 440 445
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455
 <210> 5
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 17914 - * 轻链 (LC) <Ang-2>具有Q124K取代
 <400> 5
 Gln Pro Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
 35 40 45
 Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
 85 90 95
 Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Arg Thr Val Ala
 100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Lys Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 6
<211> 459
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 17911 - 重链(HC) <Ang-2>具有K147E取代

<400> 6

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
100 105 110

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
130 135 140

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp
145 150 155 160

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
165 170 175

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
180 185 190

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
195 200 205

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
210 215 220

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
225 230 235 240

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly 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 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 Thr Val
305 310 315 320

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
325 330 335

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
340 345 350

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
355 360 365

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu 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 Tyr 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 Asn His Tyr
435 440 445

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

[0004]

450 455
 <210> 7
 <211> 459
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 17912 - 重链(HC) <Ang-2>具有K213E取代
 <400> 7
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
 100 105 110
 Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 130 135 140
 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 145 150 155 160
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 165 170 175
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 195 200 205
 Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 210 215 220
 Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 225 230 235 240
 Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly 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 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 Thr Val
 305 310 315 320
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 325 330 335
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 340 345 350
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
 355 360 365
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu 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 Tyr 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 Asn His Tyr
 435 440 445
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455
 <210> 8
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 17913 - * 轻链(LC) <Ang-2>具有E123K取代
 <400> 8
 Gln Pro Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr

```

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

```

```

<210> 9
<211> 212
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 17932 - 轻链(LC) <VEGF>具有CL-CHI结构域交换和 K147E取代

<400> 9

```

[0006]

```

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 Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
          20          25          30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
          35          40          45
Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50          55          60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
          65          70          75          80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
          85          90          95
Thr Phe Gly Gln 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 Glu 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
          210

```

```

<210> 10
<211> 457
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 17934 - 重链(HC) <VEGF>具有CL-CHI结构域交换和Q124K取代

<400> 10

```

```

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

```

```

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
225          230          235
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
245          250          255
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
260          265          270
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
275          280          285
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
290          295          300
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
305          310          315
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
325          330          335
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
340          345          350
Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
355          360          365
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala 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
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
405          410          415
Val 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 Asn His Tyr Thr Gln
435          440          445
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450          455

<210> 11
<211> 212
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 17933 - 轻链(LC) <VEGF>具有CL-CH1结构域交换和K213E取代

<400> 11
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 Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20          25          30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
35          40          45
Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50          55          60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65          70          75          80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
85          90          95
Thr Phe Gly Gln 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 Glu Lys Val Glu

```

[0007]

195 200 205
 Pro Lys Ser Cys
 210
 <210> 12
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 17301 - κ 轻链 (LC) <Ang-2>具有E123R和Q124K取代
 <400> 12
 Gln Pro Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
 35 40 45
 Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
 85 90 95
 Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Arg Thr Val Ala
 100 105 110
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Lys Arg Leu Lys Ser
 115 120 125
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140
 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160
 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

[0008]

<210> 13
 <211> 459
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 14116 - 重链 (HC) <Ang-2>具有K147E和K213E取代
 <400> 13
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
 100 105 110
 Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 130 135 140
 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp
 145 150 155 160
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 165 170 175
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 195 200 205
 Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 210 215 220
 Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 225 230 235 240
 Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly 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 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 Thr Val
 305 310 315 320
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 325 330 335
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 340 345 350
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
 355 360 365
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu 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 Tyr 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 Asn His Tyr
 435 440 445
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455
 <210> 14
 <211> 459
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 17305 - 重链(HC) <Ang-2>具有K147E和K213D取代
 <400> 14
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
 100 105 110
 Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 130 135 140
 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp
 145 150 155 160
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 165 170 175
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 195 200 205
 Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 210 215 220
 Asp Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 225 230 235 240
 Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly 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 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 Thr Val
 305 310 315 320
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 325 330 335
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 340 345 350
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
 355 360 365

[0009]

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu 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 Tyr 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 Asn His Tyr
 435 440 445
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 15
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 17953 - κ 轻链 (LC) <Ang-2>具有Q38E, E123K和Q124K取代

<400> 15

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

<210> 16
 <211> 459
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 17954 - 重链 (HC) <Ang-2>具有Q39K, K147E和K213E取代

<400> 16

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Lys Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
 100 105 110
 Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 130 135 140
 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp
 145 150 155 160
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 165 170 175
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 180 185 190

[0010]

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 195 200 205
 Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 210 215 220
 Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 225 230 235 240
 Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly 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 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 Thr Val
 305 310 315 320
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 325 330 335
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 340 345 350
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
 355 360 365
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu 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 Tyr 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 Asn His Tyr
 435 440 445
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 17
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0011]

<220>
 <223> 17938 - 轻链(LC) <VEGF>具有CL-CH1结构域交换和Q38K取代
 <400> 17

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 Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln 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
 210
 <210> 18
 <211> 457
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 17936 - 重链(HC) <VEGF>具有CL-CH1结构域交换和Q39E取代
 <400> 18

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Glu Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
 50 55 60
 Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala
 115 120 125
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 130 135 140
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 145 150 155 160
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 165 170 175
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 180 185 190
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 195 200 205
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 210 215 220
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 225 230 235 240
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 245 250 255
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 260 265 270
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 275 280 285
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 290 295 300
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 305 310 315 320
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 325 330 335
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 340 345 350
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 355 360 365
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala 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 Leu
 405 410 415
 Val 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 Asn His Tyr Thr Gln
 435 440 445
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455
 <210> 19
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 14098 - x 轻链 (LC) <Ang-2>具有Q38K, E123K和Q124K取代
 <400> 19
 Gln Pro Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
 35 40 45
 Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
 85 90 95
 Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Arg Thr Val Ala
 100 105 110

[0012]

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Lys Lys Leu Lys Ser
 115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 20
 <211> 459
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 14097 - 重链(HC) <Ang-2>具有Q39E, K147E和K213E取代

<400> 20

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Glu Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
 100 105 110

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 115 120 125

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 130 135 140

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp
 145 150 155 160

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 165 170 175

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 180 185 190

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 195 200 205

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 210 215 220

Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 225 230 235 240

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly 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 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 Thr Val
 305 310 315 320

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 325 330 335

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 340 345 350

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
 355 360 365

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu 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 Tyr 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 Asn His Tyr
 435 440 445

[0013]

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 21
<211> 457
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 17937 - 重链(HC) <VEGF>具有CL-CH1结构域交换和具有Q39E和Q124E取代

<400> 21

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Glu Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala
115 120 125

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Glu Leu Lys Ser Gly
130 135 140

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
145 150 155 160

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
165 170 175

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
180 185 190

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
195 200 205

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
210 215 220

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
225 230 235 240

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
245 250 255

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
260 265 270

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
275 280 285

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
290 295 300

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
305 310 315 320

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
325 330 335

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
340 345 350

Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
355 360 365

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala 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

Val 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 Asn His Tyr Thr Gln
435 440 445

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 22
<211> 215
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 17962 - κ 轻链(LC) <Ang-2>具有Q124E取代

<400> 22

Gln Pro Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val

[0014]

```

                20                25                30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
   35                40                45
Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
   50                55                60
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
   65                70                75                80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
   85                90                95
Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Arg Thr Val Ala
  100                105                110
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Glu Leu Lys Ser
  115                120                125
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
  130                135                140
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
  145                150                155                160
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
  165                170                175
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
  180                185                190
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
  195                200                205
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
  210                215
<210> 23
<211> 457
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 17935 - 重链(HC) <VEGF>具有CL-CH1结构域交换和Q124E取代

<400> 23
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
  1                5                10                15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
  20                25                30
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
  35                40                45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
  50                55                60
Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
  65                70                75                80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
  85                90                95
Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
  100                105                110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala
  115                120                125
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Glu Leu Lys Ser Gly
  130                135                140
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
  145                150                155                160
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
  165                170                175
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
  180                185                190
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
  195                200                205
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
  210                215                220
Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
  225                230                235                240
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
  245                250                255
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
  260                265                270
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
  275                280                285
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
  290                295                300
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
  305                310                315                320
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
  325                330                335
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
  340                345                350
Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
  355                360                365

```

[0015]

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala 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
 Val 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 Asn His Tyr Thr Gln
 435 440 445
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 24
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 可变重链结构域<VEGF>

<400> 24

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

<210> 25
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 可变轻链结构域<VEGF>

<400> 25

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

<210> 26
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 可变重链结构域<Ang-2>

<400> 26

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

[0016]

```

115          120          125
Ser
<210> 27
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 可变轻链结构域 <Ang-2>
<400> 27
Gln Pro Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1      5      10      15
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
20     25     30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
35     40     45
Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50     55     60
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
65     70     75     80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
85     90     95
Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100    105
<210> 28
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 6413 - IL17 LC E123 (Wt)/ Q124 (Wt)
<400> 28
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1      5      10      15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20     25     30
Asn Gly Asp Thr Tyr Phe His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35     40     45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50     55     60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65     70     75     80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Thr
85     90     95
Thr His Ala Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100    105    110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115    120    125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130    135    140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145    150    155    160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165    170    175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180    185    190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195    200    205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210    215
<210> 29
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 11738 - IL17 HC K147 (Wt)/ K213(Wt)
<400> 29
Glu Val Gln Leu Val Glu 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 Ser Leu Asp Ser Tyr
20     25     30
Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35     40     45
Ser Val Ile Trp Ser Asp Gly Thr Thr Thr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50     55     60
Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65     70     75     80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85     90     95

```

[0017]

Arg Asp Thr His Tyr Arg Leu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
 355 360 365
 Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445
 <210> 30
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 11755 - Tweak xLC K147(Wt)/ K213(Wt)
 <400> 30
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Ser Asn
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Thr Ala Ser Tyr Leu Ala Ser 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 Thr Ala Tyr Tyr Asn Ser Arg
 85 90 95
 Pro Asp Thr Val Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser
 100 105 110
 Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
 115 120 125
 Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 130 135 140
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 145 150 155 160
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 165 170 175
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys
 180 185 190
 Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 195 200 205
 Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly

[0018]

[0019]

```

210          215
<210> 31
<211> 451
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 11754 - Tweek xHC E123(Wt)/ Q124(Wt)

<400> 31
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 Phe Asp Phe Ser Thr Tyr
20          25          30
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35          40          45
Gly Thr Val Tyr Val Arg Gln Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Leu
50          55          60
Asn 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 Gly Gly Tyr Asn Tyr Asp Asp Ala Phe Val Ile Trp Gly Gln
100         105         110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val
115         120         125
Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
130         135         140
Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
145         150         155         160
Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
165         170         175
Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
180         185         190
Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
195         200         205
Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
210         215         220
Gly Glu Cys Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly
225         230         235         240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245         250         255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln
260         265         270
Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275         280         285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr
290         295         300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305         310         315         320
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile
325         330         335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340         345         350
Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355         360         365
Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370         375         380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385         390         395         400
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val
405         410         415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420         425         430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435         440         445
Leu Gly Lys
450

<210> 32
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 17843 - IL17 LC Q124K

<400> 32
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1          5          10          15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20          25          30
Asn Gly Asp Thr Tyr Phe His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

```

```

        35          40          45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50          55          60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65          70          75          80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Thr
          85          90          95
Thr His Ala Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
        100        105        110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
        115        120        125
Lys Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
        130        135        140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
        145        150        155        160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
        165        170        175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
        180        185        190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
        195        200        205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
        210        215
<210> 33
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 17844 - IL17 HC K147E
<400> 33
Glu Val Gln Leu Val Glu 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 Ser Leu Asp Ser Tyr
 20          25          30
Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35          40          45
Ser Val Ile Trp Ser Asp Gly Thr Thr Thr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50          55          60
Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
 65          70          75          80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85          90          95
Arg Asp Thr His Tyr Arg Leu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100         105         110
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115         120         125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130         135         140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145         150         155         160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165         170         175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180         185         190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195         200         205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210         215         220
Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser
 225         230         235         240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245         250         255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 260         265         270
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275         280         285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290         295         300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305         310         315         320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 325         330         335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
 340         345         350
Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
 355         360         365
Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370         375         380

```

[0020]

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 34
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 17845 - IL17 HC K213E

<400> 34

Glu Val Gln Leu Val Glu 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 Ser Leu Asp Ser Tyr
20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Trp Ser Asp Gly Thr Thr Thr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Thr His Tyr Arg Leu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
130 135 140

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

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
355 360 365

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 35
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 17846 - IL17 LC E123K

<400> 35

[0021]

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

<210> 36
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 17847 - IL17 LC E123R / Q124K
 <400> 36

[0022]

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

<210> 37
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 17848 - IL17 HC K147E / K213E
 <400> 37

Glu Val Gln Leu Val Glu 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 Ser Leu Asp Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Val Ile Trp Ser Asp Gly Thr Thr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Thr His Tyr Arg Leu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
130 135 140

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

Ser Trp Asn Ser Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
355 360 365

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 38
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 17849 - IL17 HC K147E / K213D

<400> 38

Glu Val Gln Leu Val Glu 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 Ser Leu Asp Ser Tyr
20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Trp Ser Asp Gly Thr Thr Thr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Thr His Tyr Arg Leu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
130 135 140

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

Ser Trp Asn Ser Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

[0023]

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Asp Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
 355 360 365
 Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445
 <210> 39
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 17850 - Tweak xHC Q124E
 <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 Phe Asp Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Thr Val Tyr Val Arg Gln Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Leu
 50 55 60
 Asn 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 Gly Gly Tyr Asn Tyr Asp Asp Ala Phe Val Ile Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Glu Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
 130 135 140
 Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
 145 150 155 160
 Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
 165 170 175
 Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
 180 185 190
 Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 195 200 205
 Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
 210 215 220
 Gly Glu Cys Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr

[0024]

[0025]

290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val
 405 410 415
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 Leu Gly Lys
 450

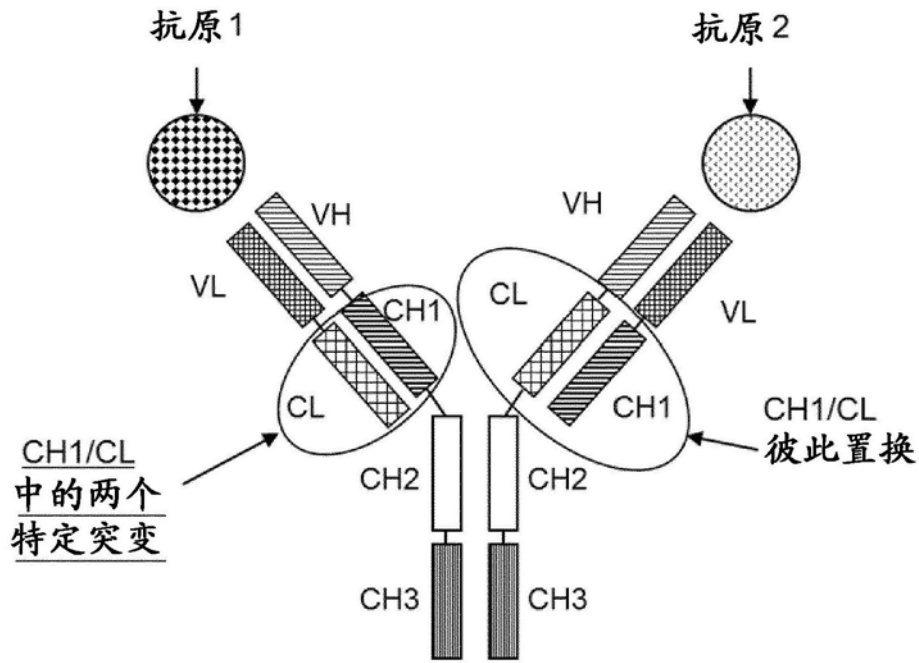


图1A

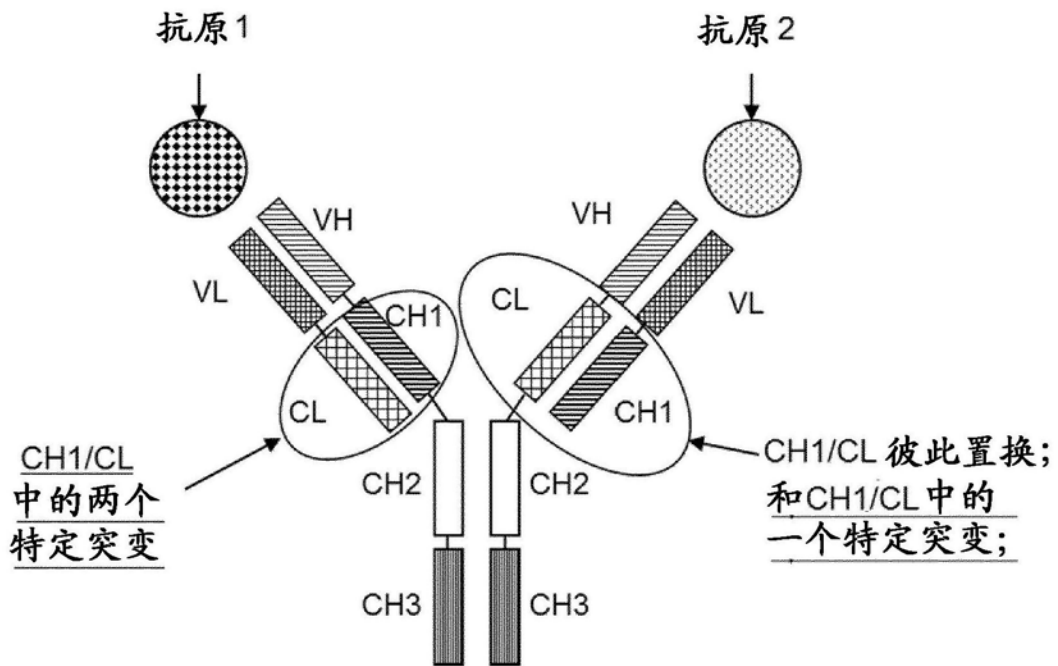


图1B

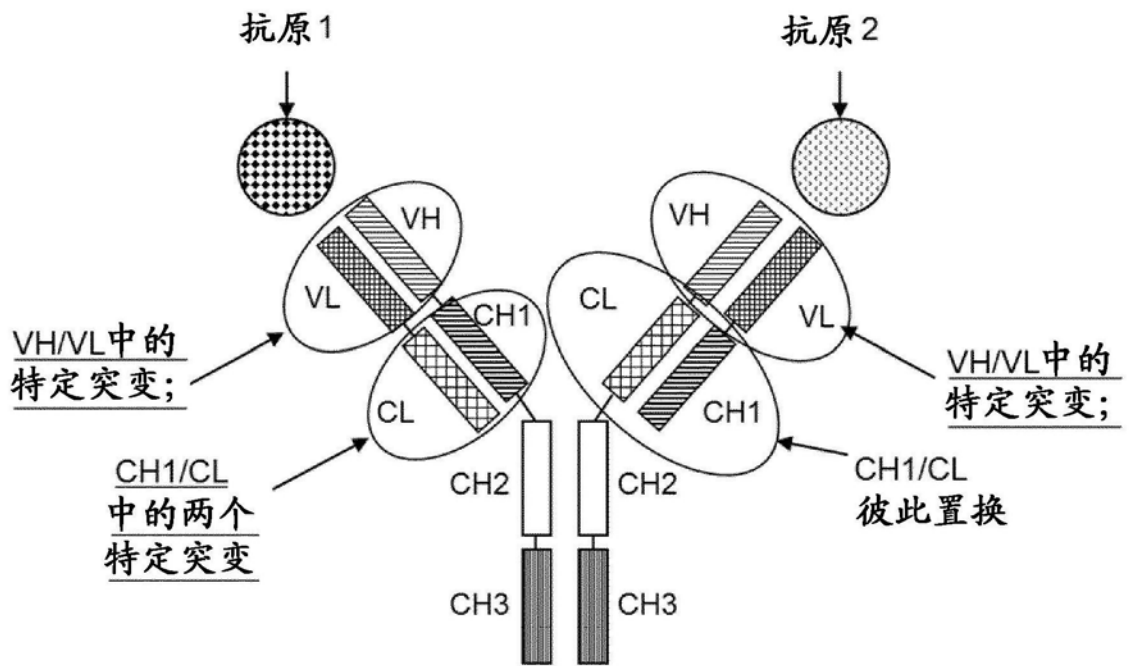


图1C

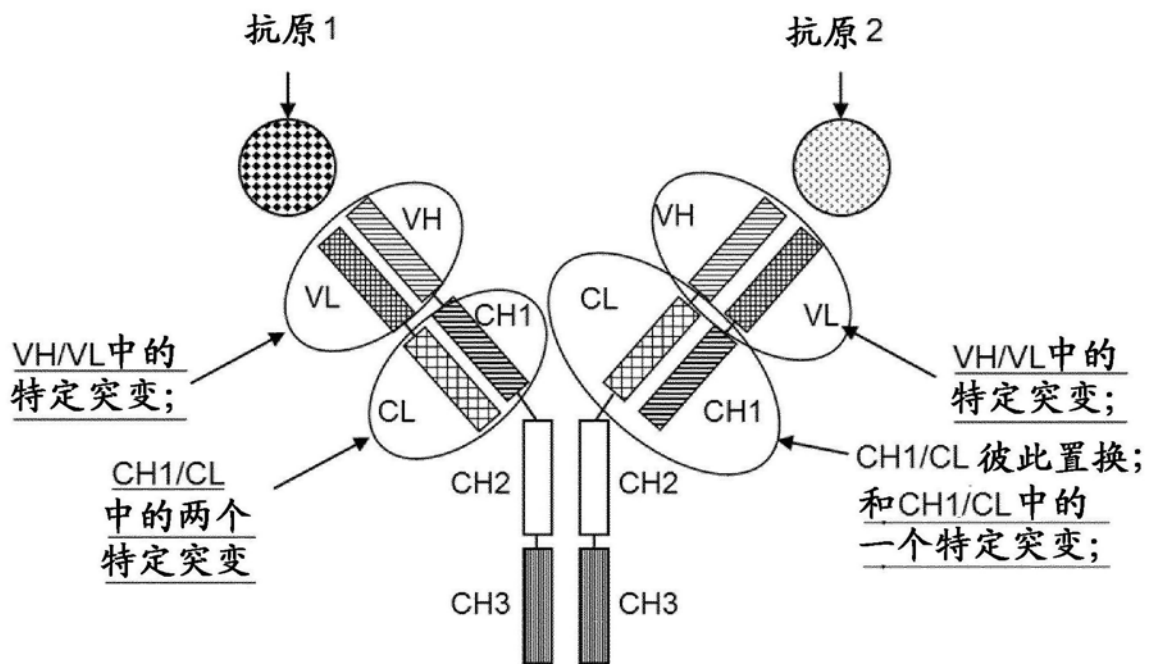


图1D

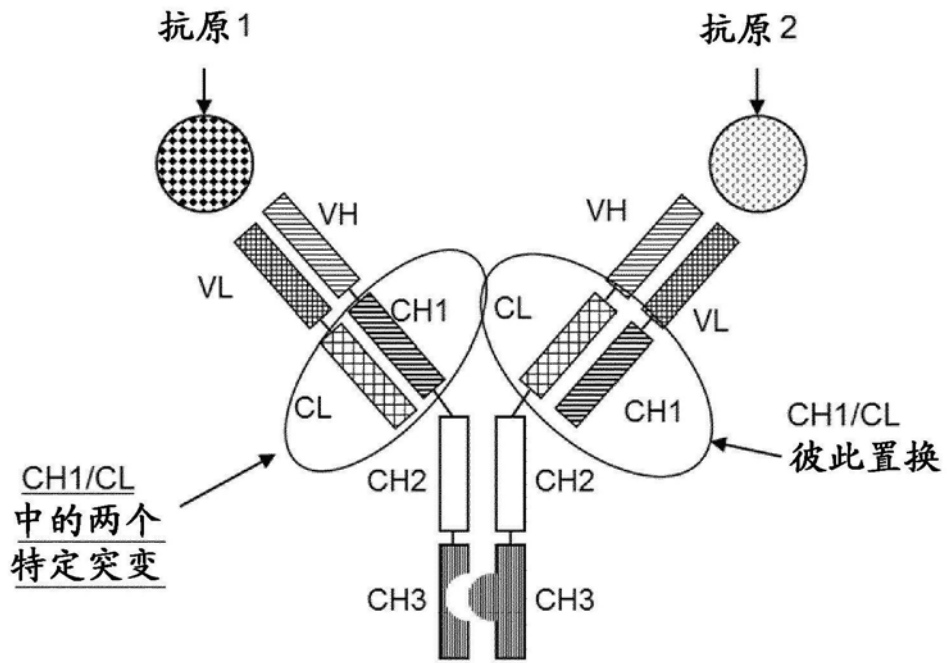


图1E

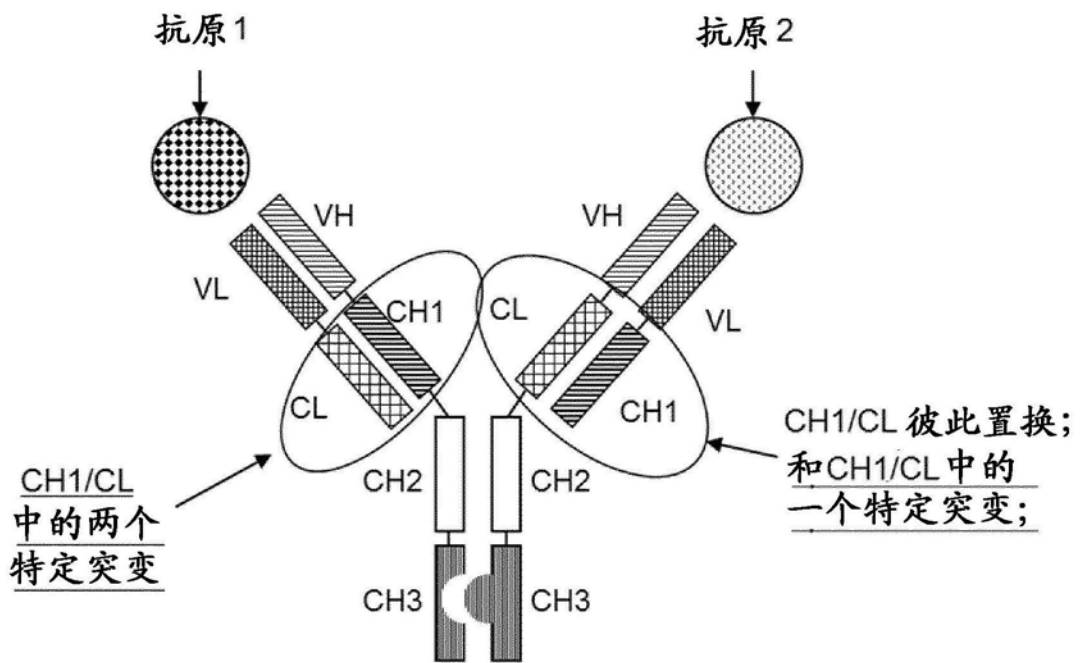


图1F

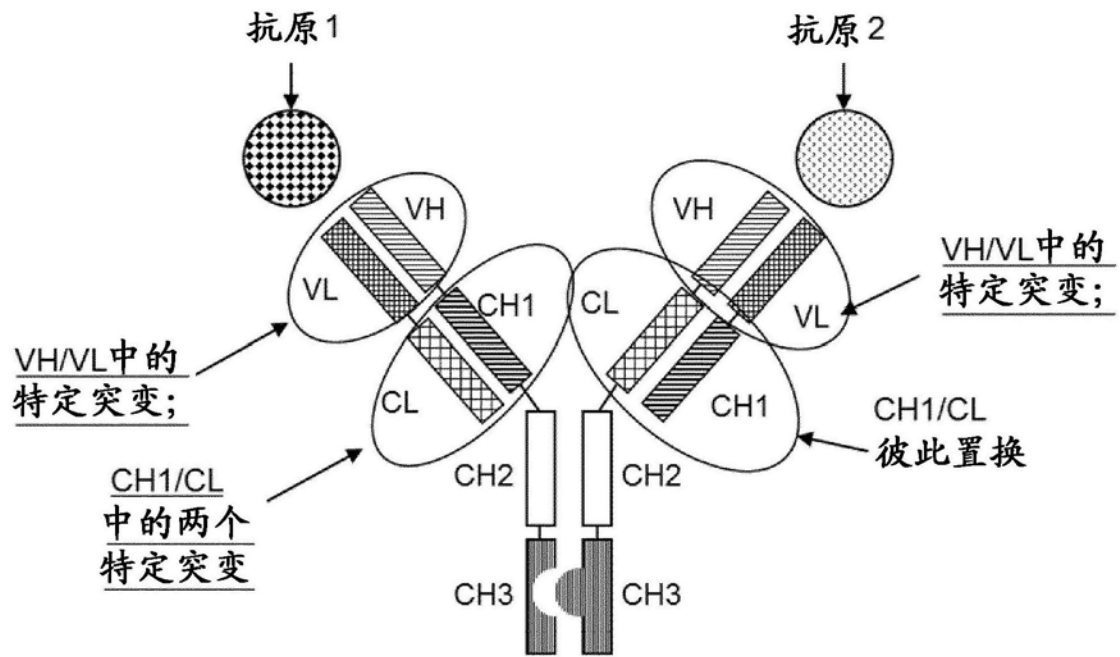


图1G

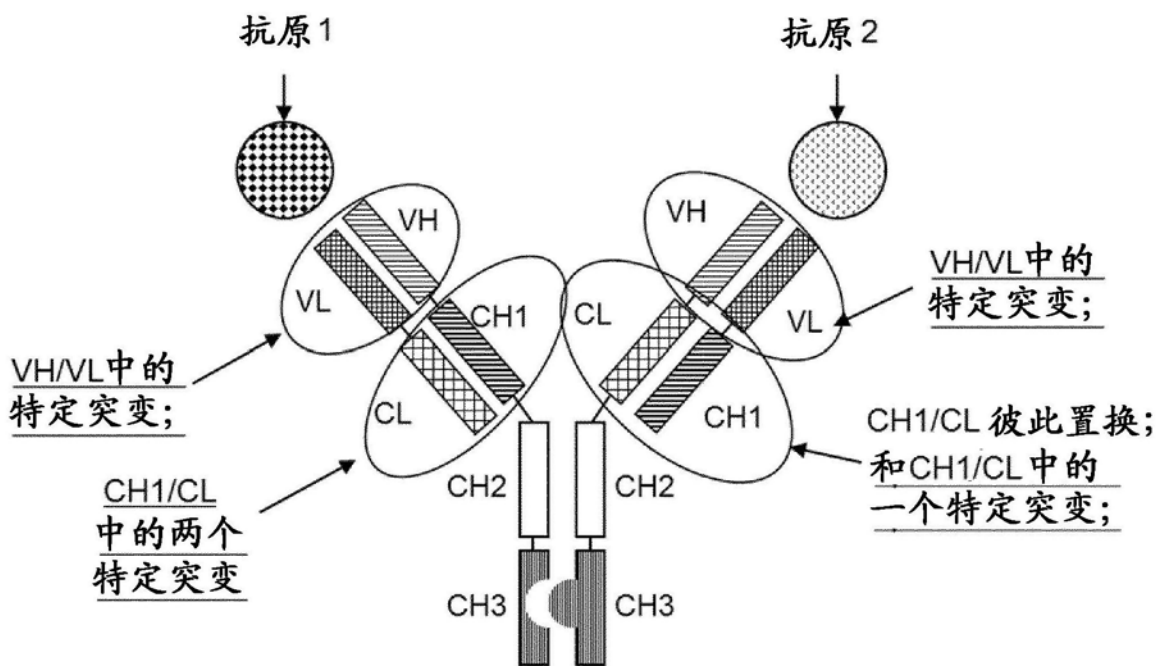


图1H

147	K	<p>ASTKGPSVFPLAAPSSTSGGTAALGCLVKRDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTTKVDKKVEPKSCDK</p> <p>ASTKGPSVFPLAPCSRSSTSES TAALGCLVKRDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTTKVDKTVERKCCVE</p> <p>ASTKGPSVFPLAPCSRSSTSGGTAALGCLVKRDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTTKVDKRVELKTPLG</p> <p>ASTKGPSVFPLAPCSRSSTSES TAALGCLVKRDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTTKVDKRVESKYGPP</p>
IGHG1		
IGHG2		
IGHG3		
IGHG4		

213



K

图2A

123 124
 ↙ ↘
 EQ EQ
 EQ EQ

kappa: TVAAAPSVFIFPPSDDEQLKSGTASVVCCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYSLSSITLTLISKADYERKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
 lambda: QPKAAPSVTLFPPSSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPPSKQSNKKAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTEVEKTVAPTECS

图2B