202108613

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本　(11)公開編號：TW 202108613 A

(43)公開日： 中華民國 110 (2021) 年 03 月 01 日

(21)申請案號：109115418　(22)申請日： 中華民國 109 (2020) 年 05 月 08 日

(51)Int. Cl.：　*C07K16/00　(2006.01)*　*C07K16/28　(2006.01)*

*A61K39/00　(2006.01)*

(30)優先權：2019/05/09　歐洲專利局　19173633.9

(71)申請人：荷蘭商美勒斯公司 (荷蘭) MERUS N.V.　(NL)

荷蘭

(72)發明人：迪克夫　寇尼斯 A DE KRUIF, CORNELIS ADRIAAN (NL)；錫爾曼　彼得 B SILVERMAN, PETER BRIAN (US)；波諾　理查 BONNEAU, RICHARD (US)

(74)代理人：劉法正；尹重君

申請實體審查：無　申請專利範圍項數：76 項　圖式數：22　共 164 頁

(54)名稱

用於多聚化蛋白質及其分離的變異區域

(57)摘要

本發明係關於用於產生且分離包含第一免疫球蛋白多肽及第二免疫球蛋白多肽之免疫球蛋白蛋白質之手段及方法，尤其關於用於產生且分離包含該第一免疫球蛋白多肽及該第二免疫球蛋白多肽之蛋白質之手段及方法。藉由包括來自產生所需免疫球蛋白蛋白質之細胞之胺基酸變體及變異分離區域，可將如所產生之所需免疫球蛋白蛋白質與免疫球蛋白蛋白質混合物分離。

The current invention relates to means and methods for producing and isolating immunoglobulin proteins comprising a first and a second immunoglobulin polypeptide, in particular to means and methods for producing, and separating proteins comprising said first and second immunoglobulin polypeptide. By including variations to amino acids, and variant separation domains from a cell producing the desired immunoglobulin protein, a desired immunoglobulin protein as produced can be separated from mixtures of immunoglobulin proteins.

202108613

# 【發明摘要】

## 【中文發明名稱】

用於多聚化蛋白質及其分離的變異區域

## 【英文發明名稱】

VARIANT DOMAINS FOR MULTIMERIZING PROTEINS AND SEPARATION THEREOF

## 【中文】

本發明係關於用於產生且分離包含第一免疫球蛋白多肽及第二免疫球蛋白多肽之免疫球蛋白蛋白質之手段及方法，尤其關於用於產生且分離包含該第一免疫球蛋白多肽及該第二免疫球蛋白多肽之蛋白質之手段及方法。藉由包括來自產生所需免疫球蛋白蛋白質之細胞之胺基酸變體及變異分離區域，可將如所產生之所需免疫球蛋白蛋白質與免疫球蛋白蛋白質混合物分離。

## 【英文】

The current invention relates to means and methods for producing and isolating immunoglobulin proteins comprising a first and a second immunoglobulin polypeptide, in particular to means and methods for producing, and separating proteins comprising said first and second immunoglobulin polypeptide. By including variations to amino acids, and variant separation domains from a cell producing the desired immunoglobulin protein, a desired immunoglobulin protein as produced can be separated from mixtures of immunoglobulin proteins.

【指定代表圖】(無)

【代表圖之符號簡單說明】

(無)

【特徵化學式】

(無)

# 【發明說明書】

## 【中文發明名稱】

用於多聚化蛋白質及其分離的變異區域

## 【英文發明名稱】

VARIANT DOMAINS FOR MULTIMERIZING PROTEINS AND SEPARATION THEREOF

## 【技術領域】

【0001】本發明係有關於用於多聚化蛋白質及其分離的變異區域。

## 【先前技術】

發明背景

【0002】過去數十年之一類重要治療性分子已為單株抗體類。單株抗體已成功地治療包括癌症之各種疾病。在過去十年間，已發現靶向超過一個抗原決定基，例如腫瘤細胞上之超過一個抗原決定基亦可為有效的。可給予患者單獨地研發之單株抗體之組合以及來自一個細胞之單株抗體之組合。該等細胞可產生形成出於靶向一或多種細胞類型上之超過一個目標之目的而研發之抗體混合物之一部分的具有二種或更多種不同特異性的抗體。當二個抗體在一個細胞中表現時，可產生包括包含雙特異性抗體及單特異性抗體之各種抗體組合。

【0003】用於調適各種免疫球蛋白鏈之締合之技術為可用的。已研發出各種二聚化區域以有利於如此產生之細胞中之特定重鏈締合。可使用共同輕鏈以避免同源重鏈及輕鏈之誤配。在某些應用中，雙特異性抗體可置換二個抗體之組合之使用。雙特異性抗體亦可用於使個體中例如腫瘤細胞及免疫細胞(例如T細胞)之二個細胞合在一起。其實例為癌細胞上所存在之CD3及抗原決定基之組合靶向。類似地，已出現能夠結合相同或不同抗原或抗原決定基中之三個或更多個之多價多聚體或多特異性抗體。二個抗體之組合表示結合至相同或不同目

標上之不同抗原決定基之二個不同免疫球蛋白之混合物，但在雙特異性抗體中此係經由單個免疫球蛋白達成。在多特異性多聚體或多特異性抗體中，可靶向相同或不同抗原上之三個或更多個不同抗原決定基。

【0004】藉由結合至相同或不同目標上之二個抗原決定基，雙特異性抗體可具有相較於結合至相同抗原決定基之二個抗體之組合而言類似或優良之作用。此種情況亦應用於能夠結合三個或更多個目標之多特異性多聚體。雙特異性或多特異性免疫球蛋白蛋白質可集結細胞上之二個或更多個表面蛋白或可使免疫效應細胞接近異常細胞，在任一情況下均造成細胞凋亡。此外，組合單個分子中二個不同結合區之經分離雙特異性抗體亦展示相對於靶向同二個不同目標之二個抗體之混合物而言的有利作用。自技術及監管視角看，單個雙特異性抗體或多特異性多聚體或抗體之研發可不太複雜，此係因為製造、臨床前及臨床測試涉及單個分子。因此，基於雙特異性抗體或多特異性多聚體/抗體之療法可藉由不太複雜且具成本效益、同時附隨地具有提供更有效療法之潛能的藥物研發方法來促進。

【0005】諸如基於IgG格式之雙特異性抗體之雙特異性抗體已藉由各種方法產生。舉例而言，雙特異性抗體可藉由使用重組DNA技術在單個細胞中表現具有二個抗體之組分來產生。在一些實施例中，如本文先前所陳述，此等方法可產生多個抗體物種，例如其中二個不同重鏈及二個不同輕鏈係由細胞產生。除非經特定地調適，否則重鏈通常可與由細胞產生之任何輕鏈配對，若該等對不為正確同源對，則通常產生非功能性結合位點。在以上實例中，一個該重鏈可能與任一輕鏈配對。

【0006】除非經特定地調適，否則重鏈通常可與由細胞產生之任何其他重鏈配對。在未經調適環境中，至多十個不同免疫球蛋白分子可由細胞產生。抗體混合物之複雜度及非功能性重鏈及輕鏈組合之存在可藉由選擇共用共同輕鏈

之重鏈-輕鏈組合來解決。此亦應用於多特異性多聚體或抗體之產生及使用重組DNA技術將三個或更多個可變區域併入單個抗體中之情形。

【0007】 當使用共同輕鏈以及表現二個或更多個含有藉由單個生產細胞驅動不同重鏈之特定異源二聚化之修飾之重鏈時，仍可產生具有同一結合區域之成對重鏈之一些同源二聚體，從而產生單特異性抗體及雙特異性抗體之混合物。此種情況亦適用於使用共同輕鏈以及表現二個或更多個重鏈，且該等重鏈中之一或多者含有二個或更多個重鏈可變區，以使得單個生產細胞可產生多特異性多聚體或抗體及額外同源二聚體時。在需要特定同源二聚體之情況下，可產生一些異源二聚體。因此，在產生蛋白質之混合物之各情況下，可能需要將一或多個所需二聚體與所得混合物分離。因此，在此項技術中需要用於產生且分離單特異性抗體或雙特異性抗體或多價抗體或多聚體之改良技術及/或替代性技術。

【0008】 利用抗體或其片段之電荷及/或等電點(pI)或利用經由電荷層析法產生之所需蛋白質物種之等電聚焦或所得獨特峰之各種分離方法為可用的。本文揭露促進與混合物之分離之新型產物以及用於分離該等產物之新型方法。

## 【發明內容】

### 發明概要

【0009】 在本文提及帶電胺基酸之情況下，其係指在生理學相關pH下，包括例如在活體內條件下之電荷。

【0010】 在一個實施例中，本發明提供免疫球蛋白區，較佳地相較於原始免疫球蛋白區(較佳地原始CH1區且更佳地人類野生型CH1區)而言包含胺基酸之變體之CH1區，其中原始胺基酸在原始免疫球蛋白區中未經表面暴露，其中變體選自

- 中性胺基酸變帶負電胺基酸；

- 帶正電胺基酸變中性胺基酸；
- 帶正電胺基酸變帶負電胺基酸；
- 中性胺基酸變帶正電胺基酸；
- 帶負電胺基酸變中性胺基酸；以及
- 帶負電胺基酸變帶正電胺基酸。

【0011】在一個實施例中，本發明提供免疫球蛋白區，較佳地相較於原始該免疫球蛋白區(較佳地原始CH1區、CH2區或CH3區且更佳地人類野生型CH1區、CH2區或CH3區)而言包含在免疫球蛋白中未經表面暴露之胺基酸之變體之免疫球蛋白CH1區、CH2區、CH3區或該等區之組合，其中變體選自

- 中性胺基酸變帶負電胺基酸；
- 帶正電胺基酸變中性胺基酸；
- 帶正電胺基酸變帶負電胺基酸；
- 中性胺基酸變帶正電胺基酸；
- 帶負電胺基酸變中性胺基酸；以及
- 帶負電胺基酸變帶正電胺基酸。

【0012】相較於人類野生型CH1區而言，本發明之免疫球蛋白CH1區較佳包含一或多個未經表面暴露之胺基酸或較佳地內埋式胺基酸之一或多個變體，該一或多個變體選自由以下組成之群：

- 中性胺基酸變帶負電胺基酸之變體；
- 帶正電胺基酸變中性胺基酸之變體；
- 中性胺基酸變帶正電胺基酸之變體；以及
- 帶負電胺基酸變中性胺基酸之變體。

【0013】本發明亦提供相較於人類野生型CH1區而言包含在選自N159、N201、T120、K147、D148、Y149、V154、A172、Q175、S190以及K213之位

置(EU編號)處之胺基酸之變體的免疫球蛋白CH1區。胺基酸之變體較佳處於來自D148、Y149、V154、N159、A172、S190以及N201之位置處。在一較佳實施例中，變體係處於選自N159及/或N201之胺基酸之位置處。CH1區可包含該等胺基酸之二個或更多個變體。該二個或更多個變體較佳包含以下中之二者或更多者：

- 中性胺基酸變帶負電胺基酸；
- 帶正電胺基酸變中性胺基酸；
- 帶正電胺基酸變帶負電胺基酸；

或以下中之二者或更多者：

- 中性胺基酸變帶正電胺基酸；
- 帶負電胺基酸變中性胺基酸；以及
- 帶負電胺基酸變帶正電胺基酸。

【0014】 CH1區中之二個或更多個變體之合適組合包含選自以下之群之胺基酸之變體：A172/S190/N201、T197/K213、D148/Q175、N159/Q213、K147/Q175、Y149/V154/A172/S190、N201/K213、T120/N201、N201/N159、T120/N159、T120/N201/N159以及N201/K213/N159。

【0015】 本發明亦提供相較於人類野生型CH2區而言包含在位置(EU編號)V303處之胺基酸之變體的免疫球蛋白CH2區。在一個實施例中，免疫球蛋白CH2區為較佳包含L235G及G236R胺基酸變體之Fc沉默CH2區。

【0016】 本發明亦提供相較於人類野生型CH3區而言包含在位置(EU編號)K370、E382及/或E388處之一或多個胺基酸之變體的免疫球蛋白CH3區。在一個實施例中，免疫球蛋白CH3區包含用於促進較佳包含L351D及L368E變體或可替代地包含T366K及L351K變體之CH3/CH3界面處之異源二聚化的殘基變體。

【0017】 在一個實施例中，免疫球蛋白CH1區、CH2區、CH3區或其組合包含其中至少一變體為在免疫球蛋白中未經表面暴露之胺基酸之變體的胺基酸

之二個或更多個變體。在一個實施例中，免疫球蛋白CH1區、CH2區、CH3區或其組合包含在免疫球蛋白中未經表面暴露之胺基酸之二個或更多個變體。變體較佳選自

- 中性胺基酸變帶負電胺基酸；

- 帶正電胺基酸變中性胺基酸；

- 帶正電胺基酸變帶負電胺基酸；

- 中性胺基酸變帶正電胺基酸；

- 帶負電胺基酸變中性胺基酸；以及

- 帶負電胺基酸變帶正電胺基酸。一或多個變體較佳包含選自由以下組成之群之一或多個未經表面暴露之胺基酸或較佳地內埋式胺基酸之一或多個變體：

- 中性胺基酸變帶負電胺基酸之變體；

- 帶正電胺基酸變中性胺基酸之變體；

- 中性胺基酸變帶正電胺基酸之變體；以及

- 帶負電胺基酸變中性胺基酸之變體。至少一變體為較佳為內埋式胺基酸之胺基酸之變體。

【0018】 據稱包含中性胺基酸變帶負電胺基酸、帶正電胺基酸變中性胺基酸及/或帶正電胺基酸變帶負電胺基酸之變體之CH區為具有相對於原始CH區而言，較佳地相較於人類野生型CH區而言之負電荷差異之CH區。據稱變體本身向CH區提供負電荷差異。據稱具有中性胺基酸變帶正電胺基酸、帶負電胺基酸變中性胺基酸及/或帶負電胺基酸變帶正電胺基酸之變體之CH區為具有相對於原始CH區而言，較佳地相較於人類野生型CH區而言之正電荷差異之CH區。若CH區具有如本文所描述之胺基酸殘基之二個變體，則較佳地，二個變體均以同樣的方式向CH區提供相同電荷差異。若CH區具有如本文所描述之胺基酸殘基之三個或更多個變體，則較佳地，變體之淨結果向CH區提供電荷差異。免疫球蛋白

區較佳為人類免疫球蛋白區。在一些實施例中，免疫球蛋白區為IgG區，較佳地IgG1區。上文所揭露之免疫球蛋白區可例如有利地用作需要與抗體之混合物分離之抗體之一部分。

【0019】本發明進一步提供包含有包含如本文所描述之免疫球蛋白CH區之重鏈及輕鏈之抗體。舉例而言，當此類抗體作為混合物之一部分而產生時，向CH區提供之電荷變化可促進該抗體與該混合物之分離。在一較佳實施例中，抗體包含不同重鏈。在一較佳實施例中，抗體為諸如雙特異性抗體或三特異性抗體之多特異性抗體。在此情況下，向CH區提供之電荷變化可促進該雙特異性抗體或三特異性抗體與該混合物之分離。不同重鏈較佳包含可相容異源二聚化區，較佳地可相容異源二聚化CH3區。在一個實施例中，重鏈中之一者包含CH3變體L351D及L368E，且該等重鏈中之另一者包含CH3變體T366K及L351K。抗體較佳為IgG抗體，較佳地IgG1抗體。在一些實施例中，抗體包含各自包含如本文所描述之免疫球蛋白CH區中之一或多者之第一重鏈及第二重鏈。較佳地，包含CH3變體L351D及L368E之重鏈包含如本文所描述之一個CH區，且包含CH3變體T366K及L351K之重鏈包含如本文所描述之另一CH區。在該等情況下，較佳地，一個CH區及另一CH區包含具有不同電荷之CH區。在該等情況下，混合物中所得抗體之等電點差異應被進一步間隔，由此促進該抗體與該混合物中其他免疫球蛋白分子或其部分之分離。換言之，若一個CH區為具有相對於原始CH區而言之負電荷差異之CH區，則另一CH區較佳為具有相對於原始CH區而言之正電荷差異之CH區。類似地，若一個CH區為具有相對於原始CH區而言之正電荷差異之CH區，則另一CH區較佳為具有相對於原始CH區而言之負電荷差異之CH區。

【0020】具有可相容異源二聚化區(諸如具有如本文所描述之CH區之如本文所描述之可相容CH3異源二聚化區)之抗體通常在利用抗體或其片段之電荷及

/或等電點(pI)之分離步驟中更好地與具有相同重鏈之各別抗體及/或半抗體(若存在)分離。抗體較佳包含一或多個輕鏈。其較佳包含同一輕鏈。輕鏈較佳為如本文所描述之共同抗體輕鏈。共同輕鏈較佳包含圖13，例如圖13B或圖13D之輕鏈可變區。在一個實施例中，輕鏈具有如圖13C中所描繪之輕鏈恆定區。在一較佳實施例中，輕鏈具有圖13A或圖13E中所描繪之輕鏈之胺基酸序列。在一較佳實施例中，輕鏈具有圖13A中所描繪之輕鏈之胺基酸序列。共同輕鏈較佳為具有如圖13F中所描繪之CDR之輕鏈。

【0021】 如本文所描述之抗體、CH區或CH區域較佳為人類抗體或人類免疫球蛋白CH區或區域。其較佳為包含具有在野生型人類CH區內未經表面暴露且較佳地內埋式胺基酸位置處之變體之CH區的人類抗體、CH區域或CH區。

【0022】 包含如本文所描述之未經表面暴露之胺基酸之變體的免疫球蛋白區(較佳地CH區)或抗體較佳具有選自在CH1/CL界面處不存在、在CH2/CH2界面處不存在且/或在CH3/CH3界面處不存在之胺基酸之變體。根據Traxlmayer等人(2012; J Mol Biol. 10月26日; 423(3): 397-412. 論述及圖3)，CH3/CH3界面胺基酸列舉於圖22中。

【0023】 包含如本文所描述之未經表面暴露之胺基酸之變體的免疫球蛋白區(較佳地CH1區、CH2區或CH3區)或抗體並不會實質上不利地影響包括任何重鏈及輕鏈界面之所得CH1/CL區域、CH2區域或CH3區域或抗體的穩定性。包含如本文所描述之未經表面暴露之胺基酸之變體的免疫球蛋白區(較佳地CH1區、CH2區或CH3區)或抗體可包括支持產生電荷差異之一或多個變體之穩定性的一或多個額外變體。包含如本文所描述之未經表面暴露之胺基酸之變體的免疫球蛋白區(較佳地CH1區、CH2區或CH3區)或抗體可包括產生電荷差異之一或多個額外變體。

【0024】 本發明亦提供包含如本文所描述之免疫球蛋白區之免疫球蛋白

CH1/CL區域、CH2區域或CH3區域。CH2區域可進一步包含有較佳地包含在235及/或236處之CH3變體之Fc沉默突變。CH3區域可進一步包含較佳地包含於一個CH3區中之CH3變體L351D及L368E以及於另一CH3區上之CH3變體T366K及L351K的CH3異源二聚化區域。

【0025】 本發明進一步提供包含如本文所描述之一或多個CH1區、CH2區、CH3區或其組合之蛋白質。亦提供包含如本文所描述之一或多個CH1/CL區域、CH2區域、CH3區域或其組合之蛋白質。

【0026】 本發明進一步提供包含如本文所描述之一或多個CH1/CL區域、CH2區域、CH3區域或其組合之抗體，較佳地諸如雙特異性抗體之多特異性抗體。

【0027】 免疫球蛋白、多肽或蛋白質之一個鏈中之CH1區、CH2區、CH3區或其組合中之二個或更多個變體較佳全部包含在相同方向引導電荷，亦即全部朝向一或多個CH區或其組合之更加正之電荷或全部朝向一或多個CH區或其組合之更加負之電荷的變體。

【0028】 本發明進一步提供包含如本文所描述之免疫球蛋白區或抗體及醫藥載劑或醫藥賦形劑之組合物。進一步提供包含如本文所描述之免疫球蛋白區或抗體之醫藥組合物。醫藥組合物較佳包含醫藥載劑或醫藥賦形劑。

【0029】 進一步提供編碼如本文所描述之免疫球蛋白區或抗體之核酸。進一步提供一起編碼併有如本文所描述之免疫球蛋白區之抗體或多聚體蛋白之核酸的組合。核酸可或可不以物理方式連接。

【0030】 亦提供包含核酸或核酸組合之重組宿主細胞。

【0031】 本發明進一步提供產生如請求項之抗體之方法，其中該方法包含以下步驟：

提供編碼具有如本文所描述之CH1區、CH2區、CH3區或其組合之第一重鏈之核酸；

提供編碼第二重鏈之核酸，其中該第一重鏈及該第二重鏈可相同或不同；

提供編碼輕鏈之核酸；

將該核酸引入宿主細胞中且培養該等宿主細胞以表現該或該等核酸；以及

自宿主細胞培養物收集該抗體，該方法進一步包含在基於其他抗體及/或抗體片段之電荷之分離步驟中將該抗體與該等其他抗體或抗體片段分離。在一個實施例中，該第一重鏈及該第二重鏈包含可相容異源二聚化區，較佳地可相容CH3異源二聚化區。

【0032】本發明進一步提供產生如請求項之抗體之方法，其中該方法包含以下步驟：

提供編碼具有如本文所描述之CH1區、CH2區、CH3區或其組合之第一重鏈之核酸；

提供編碼第二重鏈之核酸，其中該第一重鏈及該第二重鏈可相同或不同；

提供編碼輕鏈之核酸；

將該核酸引入宿主細胞中且培養該等宿主細胞以表現該或該等核酸；以及

自宿主細胞培養物收集該抗體，該方法進一步包含執行收穫物澄清，

執行蛋白質捕獲，

執行陰離子交換層析，以及

執行陽離子交換層析以將該抗體與其他抗體或抗體片段分離。在一個實施例中，該第一重鏈及該第二重鏈包含可相容異源二聚化區，較佳地可相容CH3異源二聚化區。

【0033】本發明進一步提供產生如請求項之抗體之方法，其中該方法包含以下步驟：

提供編碼具有如本文所描述之CH1區、CH2區、CH3區或其組合之第一重鏈之核酸；

提供編碼第二重鏈之核酸，其中該第一重鏈及該第二重鏈可相同或不同；

提供編碼輕鏈之核酸；

將該核酸引入宿主細胞中且培養該等宿主細胞以表現該或該等核酸；以及

自宿主細胞培養物收集該抗體，該方法進一步包含在包含於凝膠上之等電聚焦之分離步驟中將該抗體與其他抗體或抗體片段分離。

【0034】進一步提供用於產生多特異性抗體之方法，該多特異性抗體包含等電點不同之第一重鏈及第二重鏈，其中該方法包含以下步驟：

(a) 表現編碼第一重鏈之核酸及編碼第二重鏈之核酸，以使得經編碼第一重鏈之等電點與經編碼第二重鏈之等電點不同，其中該核酸編碼在選自包含第一重鏈及/或第二重鏈之經編碼免疫球蛋白區之未經表面暴露之位置的一或多個胺基酸位置處的一或多個變體，較佳地CH1區，更佳地T120、K147、D148、Y149、V154、N159、A172、Q175、S190、N201以及K213；且/或較佳地CH2區，較佳地V303；且/或較佳地CH3區，較佳地K370、E382、E388 (EU編號)，以及

(b) 培養宿主細胞以表現該核酸；以及

(c) 使用等電點差異自宿主細胞培養物收集該多特異性抗體。

【0035】亦提供用於分離多特異性抗體之方法，該多特異性抗體包含等電點不同之第一重鏈及第二重鏈，其中該方法包含以下步驟：

(a) 表現編碼第一重鏈之胺基酸殘基之核酸及編碼第二重鏈之胺基酸殘基之核酸中之二者或任一者，以使得經編碼第一重鏈之等電點與經編碼第二重鏈之等電點不同，其中該核酸之一或多個位置為不同於在一或多個未經表面暴露之殘基處之經編碼CH1區、CH2區、CH3區或其組合的一或多個位置，較佳地選自T120、K147、D148、Y149、V154、N159、A172、Q175、S190、N201以及K213之一或多個胺基酸變體；且/或較佳地CH2區，較佳地V303；且/或較佳地CH3區，較佳地K370、E382、E388 (EU編號)，以及

(b) 培養宿主細胞以表現該核酸；以及

(c) 藉由層析法將該多特異性抗體與宿主細胞培養物分離。

【0036】 在一較佳實施例中，核酸編碼第一重鏈及第二重鏈，以使得第一重鏈、第一重鏈之同源多聚體、第二重鏈、第二重鏈之同源多聚體以及第一重鏈及第二重鏈之異源多聚體在經表現且於離子交換層析步驟中經分離時的滯留時間不同。

【0037】 在由該核酸編碼之一或多個位置處之變異胺基酸較佳選自在人類野生型CH1區、CH2區、CH3區或其組合中未經表面暴露之胺基酸且選自

- 中性胺基酸變帶負電胺基酸；

- 帶正電胺基酸變中性胺基酸；

- 帶正電胺基酸變帶負電胺基酸；

- 中性胺基酸變帶正電胺基酸；

- 帶負電胺基酸變中性胺基酸；以及

- 帶負電胺基酸變帶正電胺基酸。

【0038】 亦提供用於產生多特異性抗體之方法，該多特異性抗體包含等電點不同之第一重鏈及第二重鏈，其中該方法包含以下步驟：

提供編碼第一重鏈之CH1區、CH2區、CH3區或其組合之核酸及編碼第二重鏈之CH1區、CH2區、CH3區或其組合之核酸，以使得第一經編碼重鏈之等電點與第二經編碼重鏈之等電點不同，其中該等CH區中之至少一者包含在選自T120、K147、D148、Y149、V154、N159、A172、Q175、S190、N201、K213、V303、K370、E382以及E388 (EU編號)之位置處之胺基酸變體，以及

培養宿主細胞以表現該核酸；以及

使用等電點差異自宿主細胞培養物收集該多特異性抗體，此舉進一步包含以下步驟：

自該宿主細胞培養物收集該抗體，

執行收穫物澄清，

執行蛋白質捕獲，

執行陰離子交換層析，以及

執行陽離子交換層析以將該抗體與另一抗體或抗體片段分離。

【0039】進一步提供用於純化多特異性抗體之方法，該多特異性抗體包含等電點不同之第一重鏈及第二重鏈，其中該方法包含以下步驟：

提供編碼第一重鏈之CH1區、CH2區、CH3區或其組合之核酸及編碼第二重鏈之CH1區、CH2區、CH3區或其組合之核酸中之二者或任一者，以使得第一經編碼重鏈與第二經編碼重鏈之等電點不同，其中該等CH區中之至少一者包含在選自T120、K147、D148、Y149、V154、N159、A172、Q175、S190、N201、K213、V303、K370、E382以及E388 (EU編號)之位置處之胺基酸變體，以及

培養宿主細胞以表現該核酸；以及

藉由進行等電聚焦自宿主細胞培養物純化該多特異性抗體且將該多特異性抗體與另外抗體或抗體片段分離。

【0040】編碼第一重鏈之同源多聚體之一或多個核酸、編碼第二重鏈之同源多聚體之一或多個核酸以及編碼第一重鏈及第二重鏈之異源多聚體之一或多個核酸表現為具有不同等電點之蛋白質且在離子交換層析中產生不同滯留時間。

【0041】CH區之該一或多個胺基酸變體之一或多個位置較佳在多特異性抗體中未經表面暴露且較佳選自

- 中性胺基酸變帶負電胺基酸；
- 帶正電胺基酸變中性胺基酸；
- 帶正電胺基酸變帶負電胺基酸；

- 中性胺基酸變帶正電胺基酸；

- 帶負電胺基酸變中性胺基酸；以及

- 帶負電胺基酸變帶正電胺基酸。

【0042】 在變異位置處之胺基酸較佳包含一或多個未經表面暴露之胺基酸或較佳地內埋式胺基酸之一或多個變體，該一或多個變體選自由以下組成之群：

- 中性胺基酸變帶負電胺基酸；

- 帶正電胺基酸變中性胺基酸；

- 中性胺基酸變帶正電胺基酸；以及

- 帶負電胺基酸變中性胺基酸。第一重鏈及第二重鏈較佳包含CH3區，且該等CH3區較佳包含可相容CH3異源二聚化區。該等可相容CH3異源二聚化區中之一者較佳包含L351D及L368E且另一者較佳包含T366K及L351K。

【0043】 在由該核酸編碼之一或多個位置處之一或多個變異胺基酸較佳選自T120、K147、D148、Y149、V154、N159、A172、Q175、S190、N201、K213、V303、K370、E382以及E388。

【0044】 進一步提供包含在人類野生型CH1中之未經表面暴露之位置處，較佳地在位置120、位置147、位置148、位置149、位置154、位置159、位置172、位置175、位置190、位置201或位置213處之第一帶電胺基酸殘基之含CH1區或CH1免疫球蛋白多肽。除該帶電殘基以外，含CH1區或CH1免疫球蛋白多肽較佳亦包含在選自人類野生型CH1中之未經表面暴露之位置，較佳地位置120、位置147、位置148、位置149、位置154、位置159、位置172、位置175、位置190、位置201或位置213之不同位置處之第二帶電胺基酸殘基，該第二帶電胺基酸具有與第一帶電胺基酸相同之電荷。含CH1區或CH1免疫球蛋白多肽較佳包含在位置147及/或位置213處之中性或帶負電胺基酸殘基。含CH1區或CH1免疫球蛋白多肽較佳包含在位置148處及/或在位置216處之鉸鏈處之中性或帶正電胺基酸殘

基。進一步提供包含在人類野生型CH2中之未經表面暴露之位置處，較佳地在位置303處之帶電胺基酸殘基之含CH2區或CH2免疫球蛋白多肽。進一步提供包含在人類野生型CH3中之未經表面暴露之位置處，較佳地在位置370、位置382或位置388處之第一中性胺基酸殘基之含CH3區或CH3免疫球蛋白多肽。除中性殘基以外，含CH3區或CH3免疫球蛋白多肽較佳亦包含在不同於第一中性胺基酸之位置之選自人類野生型CH3中之未經表面暴露之位置，較佳地位置370、位置382或位置388之不同位置處的第二中性胺基酸殘基。可替代地，提供包含在人類野生型CH3中之未經表面暴露之位置處，較佳地在位置370處之第一負胺基酸殘基及在位置382或位置388處之正胺基酸之含CH3區或CH3免疫球蛋白多肽。

【0045】 在CH1區之位置T120處之變體較佳為中性胺基酸變帶電胺基酸之變體。實例為T120R、T120K、T120D以及T120E變體。變體較佳包含T120D或T120K變體。

【0046】 在CH1區之位置K147處之變體較佳為帶正電胺基酸變中性胺基酸或負胺基酸之變體。實例為K147Q、K147T、K147S、K147D以及K147E變體。變體較佳為K147E變體。

【0047】 在CH1區之位置D148處之變體較佳為中性胺基酸變帶電胺基酸之變體。實例為D148R、D148K、D148D以及D148E變體。變體較佳包含D148K變體。

【0048】 在CH1區之位置N159處之變體較佳為中性胺基酸變帶電胺基酸之變體。實例為N159R、N159K、N159D以及N159E變體。變體較佳包含N159K或N159D變體。

【0049】 在CH1區之位置Q175處之變體較佳為中性胺基酸變帶電胺基酸之變體。實例為Q175R、Q175K、Q175D以及Q175E變體。變體較佳包含Q175K或Q175E變體。

【0050】 在CH1區之位置N201處之變體較佳為中性胺基酸變帶電胺基酸之變體。實例為N201R、N201K、N201D以及N201E變體。變體較佳包含N201K或N201D變體。

【0051】 在CH1區之位置K213處之變體較佳為帶正電胺基酸變中性胺基酸或負胺基酸之變體。實例為K213Q、K213T、K213S、K213D以及K213E變體。變體較佳包含K213Q變體。

【0052】 在CH2區之位置V303處之變體較佳為中性胺基酸變帶電胺基酸之變體。實例為V303K、V303R、V303D以及V303E變體。變體較佳包含V303D或V303E變體。

【0053】 進一步提供包含在位置303處之帶電胺基酸殘基之含CH2免疫球蛋白多肽。

【0054】 亦提供包含在選自位置370、位置382或位置388之位置處之不帶電胺基酸殘基之含CH3免疫球蛋白多肽。

【0055】 如本文所描述之含CH2免疫球蛋白多肽及/或含CH3免疫球蛋白多肽可包含選自在位置303處之帶電胺基酸殘基或在位置370、位置382或位置388處之不帶電胺基酸殘基之胺基酸變體中的二者或更多者。

【0056】 如本文所指示之CH2區變體較佳為在位置V303處之CH2變體。該變體較佳為中性胺基酸變帶電胺基酸之變體。實例為V303R、V303K、V303D或V303E變體。較佳變體為如實例中所描述之V303K變體或V303E變體。

【0057】 如本文所指示之CH3區變體較佳為在位置K370、E382、E388或其組合處之CH3變體。在位置K370處之變體較佳為帶電胺基酸變中性胺基酸之變體。實例為K370Q、K370N、K370H、K370S、K370T或K370Y變體。較佳變體為如實例中所描述之K370S或K370T變體。在位置E382處之變體較佳為帶電胺基酸變中性胺基酸之變體。實例為E382Q、E382N、E382H、E382S、E382T或E382Y

變體。較佳變體為如實例中所描述之E382Q或E382T變體。在位置E388處之變體較佳為帶電胺基酸變中性胺基酸之變體。實例為E388Q、E388N、E388L、E388S、E388T或E388M變體。較佳變體為如實例中所描述之E388L、E388M或E388T變體。

【0058】 如本文所描述之免疫球蛋白多肽較佳為抗體，較佳地多特異性抗體。

【0059】 該抗體可進一步包含在鉸鏈位置216處之帶正電胺基酸殘基。

【0060】 該抗體可進一步包含在選自T197之胺基酸處及在鉸鏈位置E216處之變體。

【0061】 亦提供包含如本文所描述之免疫球蛋白區域、免疫球蛋白區多肽、蛋白質或抗體之組合物，該免疫球蛋白區域、免疫球蛋白區多肽、蛋白質或抗體進一步包含以下中之一或多者：CH1區域中之變體G122P、I199V、N203I、S207T以及V211I。

【0062】 本發明可用於提供如本文所描述之抗體或免疫球蛋白蛋白質之間、如本文所描述之雙特異性抗體與單特異性抗體之間、如本文所描述之多特異性抗體與其他多特異性及單特異性抗體及半抗體之間的分離。

【0063】 本發明亦可用於使由細胞產生之二個或更多個所需抗體之共純化最佳化。舉例而言，藉由提供可與共同輕鏈配對之三個或更多個重鏈且其中該等重鏈中之一者具有可相容異源二聚化區域之成員且其他重鏈具有可相容異源二聚化區域之另一成員，例如於一個重鏈中具有CH3 DE區且於其他重鏈中具有CH3 KK區，可產生二個或更多個雙特異性抗體。在利用電荷及/或pI之分離方法中，調適本發明之重鏈中之一或多者之電荷可提供含有共遷移之抗體的異源二聚體重鏈。電荷可經調適以使得與各別含有抗體及/或半抗體之單體重鏈相比，含有抗體之共遷移異源二聚體重鏈在不同位置處遷移。

【0064】進一步提供包含第一含CH1區或CH1免疫球蛋白多肽及第二含CH1區或CH1免疫球蛋白多肽之免疫球蛋白蛋白質，其中第一含CH1區或CH1免疫球蛋白多肽及/或第二含CH1區或CH1免疫球蛋白多肽包含選自在CH1區內未經表面暴露之胺基酸之一或多個胺基酸的一或多個變體，以使得包含第一含CH1區或CH1免疫球蛋白多肽及第二含CH1區或CH1免疫球蛋白多肽之免疫球蛋白蛋白質之等電點不同於僅含有第一CH1區或CH1-免疫球蛋白多肽之免疫球蛋白蛋白質或僅含有第二CH1區或CH1-免疫球蛋白多肽之免疫球蛋白蛋白質的等電點。

【0065】在一個實施例中，本發明係關於包含至少二個不同之包含重鏈區域之多肽之蛋白質，諸如包含例如至少二個不同重鏈可變區及一個共同輕鏈之雙特異性抗體或多價多聚體。本發明進一步關於產生且分離該等蛋白質之手段及方法。包含二個不同免疫球蛋白可變區多肽之蛋白質一般在本文中稱作雙特異性蛋白、雙特異性免疫球蛋白或雙特異性抗體。基於包含二個不同免疫球蛋白可變區多肽之蛋白質之格式，亦可產生包含對超過二個目標/抗原決定基具有特異性之區域之多特異性多聚體，包括三特異性及/或多特異性格式，參見例如PCT/NL2019/050199。儘管此項技術中存在用以增加所需雙特異性或多特異性蛋白或抗體之產量之策略，但無法容易地完全避免包括單特異性蛋白或半抗體之非所需物種之產生。因此，雙特異性或多特異性蛋白或抗體與單特異性半抗體或不合需要之副產物蛋白之分離對於分離所需雙特異性或多特異性蛋白或抗體為較佳的。此等雙特異性或多特異性蛋白或抗體之該分離進一步可為臨床研發或營銷該等蛋白質所需。

【0066】本發明人現已出乎意料地發現，藉由產生具有在恆定區內(較佳地CH1、CH2或CH3)未經表面暴露之胺基酸位置處之帶電殘基(包括在免疫球蛋白多肽內之內埋式殘基)之免疫球蛋白區，多特異性或雙特異性蛋白及單特異性蛋

白在產生時現可容易地藉由使用等電聚焦及例如基於非親和力之層析法(諸如離子交換層析法)之習知層析法來分離且獲得。

【0067】該等免疫球蛋白區包括向較佳地在CH1、CH2、CH3或其組合處之含恆定區免疫球蛋白多肽鏈中之一者或二者添加、移除或逆轉電荷。在本發明之前，一般而言，已避免任何蛋白質，特定言之免疫球蛋白之未經表面暴露之胺基酸或內埋式胺基酸之修飾，如所理解，更改該等殘基之電荷對結構及功能具有潛在地有害之影響，包括對免疫球蛋白造成去穩定化影響之潛在性。此外，未預期該等修飾更改層析特性，此係因為此等殘基不易於暴露以與層析樹脂相互作用。

【0068】出乎意料地發現，藉由產生具有在免疫球蛋白多肽鏈之未經表面暴露且內埋式胺基位置處(包括在構架區或恆定區內，較佳地CH1區、CH2區、CH3區或其組合)之帶電胺基酸之免疫球蛋白區，可產生具有差異電荷及不同等電點之單特異性、雙特異性及多特異性蛋白(參見例如圖1)，該差異電荷及該等不同等電點准許分離且分離該等單特異性蛋白與雙特異性或多特異性蛋白(或反之亦然)或分離所需蛋白質與其他不合需要之蛋白質副產物。此外，可產生包含在未經表面暴露之位置或內埋式位置處之帶電殘基及其他變體之免疫球蛋白區，相對於野生型區或區域或僅具有電荷變體之野生型區或區域而言，其可具有提高該等免疫球蛋白區之穩定性之潛能。

【0069】應理解，可應用包括恆定區域之變異區域及採用該等區域之方法以產生多聚化蛋白且以分離該等蛋白質。當不同蛋白質物種以混合物形式產生以使得該等不同物種具有類似等電點(pI)，難以進行分離時，可採用本文所闡述之變異區域及本文所描述之方法用於改善所需物種之分離之用途。

【0070】本發明揭露用於選擇不會有害地影響分離區域之結構及功能且在所產生之併有該等區域之不同多聚化蛋白質物種之間產生差異等電點之變體的

方法。本文所描述之發明應用於包含可應用於例如CL區、CH1區、CH2區及/或CH3區及VH/VL區(詳言之構架區)之各種免疫球蛋白區之分離區域的產物。一般而言，本發明可應用於任何多聚體蛋白。只要所產生之多聚體包含可形成不同多聚化蛋白質之至少二個不同蛋白質(例如標示為A及B)，例如以使得所產生之多聚體物種可包含AA、AB、BA或BB，本發明即可應用於其。在該等情形下，此等多聚化蛋白可採用針對鏈A及/或鏈B之本發明之變異區域，以使得多聚體物種中之各者可包含具有在未經表面暴露之位置或內埋式位置處之電荷之一或多個變異區域，且產生包含差異等電點之多聚體物種，該等差異等電點允許經由一般熟習此項技術者已知之方法，諸如藉由等電聚焦及/或在電荷層析法期間基於獨特滯留時間進行分離。

【0071】 上文原理亦可應用於製造雙特異性抗體(當二個不同重鏈及二個不同輕鏈經表現時產生至多十個物種，或當二個不同重鏈及一個共同輕鏈經表現時或當二個不同輕鏈及一個共同重鏈經表現時產生三個物種)。上文原理亦可應用於高級多聚體。

【0072】 在多聚體可為雙特異性抗體之情況下，可採用具有在未經表面或內埋式位置處之一或多個電荷變化(包括電荷添加、減少或逆轉)之變異免疫球蛋白區。舉例而言，可採用帶電CH1區(如圖1A-C中所例示)，或可採用帶電CH2區(如圖1D中所例示)，可採用輕鏈之帶電Cl區(圖1E)，或可採用帶電CH3區。

【0073】 該等多聚體亦可為三價或四價的以使得其可包含例如3個由VH及VL組成、包含(如圖2A及2B中所例示)例如CH1區或Cl區中之變體之可變區域。

【0074】 應理解，本文對諸如CH1區之免疫球蛋白區或任何其他合適區或區域之「變體」之提及並不意味著例如多聚體蛋白產物(諸如抗體)經突變，而實際上意味著多聚體蛋白包含例如不同於野生型區域之具有本文所闡述之分離變異體之區域。亦即，該等區域含有在野生型區域內之未經表面暴露之殘基處之

差異，由此產生可用於促進與多聚化蛋白混合物之分離之電荷差異。因此，術語變體係指以下事實：諸如包含於雙特異性抗體中之免疫球蛋白多肽之胺基酸序列具有不同，例如不同於諸如人類IgG1序列之參考序列的胺基酸序列。

【0075】 應理解，具有在所需位置處之所需殘基之胺基酸序列可選自包含例如在CH1區、CH2區、CH3區或其組合中之在相較於參考序列而言之胺基酸序列內之變體的庫。因此，術語變體係指獨立於獲得胺基酸序列之方式，具有在所需位置處之所需胺基酸殘基之胺基酸序列。代替提及例如在未經表面之胺基酸，較佳地內埋式胺基酸處之胺基酸之如本文所描述之胺基酸變體，吾人亦可提及「分離胺基酸殘基」，此係因為此等變體允許分離所需多聚體物種。

【0076】 蛋白質產物可由編碼蛋白質之DNA構築體產生，因此蛋白質產物之變體可具有於編碼該蛋白質之DNA構築體中之其起源。本文涵蓋生成此項技術中已知之該等變體之任何合適手段，例如自一開始包括可生成之包含編碼該等變體之核酸之構築體，例如經由在不採用原始核酸所必需之任何突變誘發、置換、取代、插入或刪除手段之情況下的DNA合成來進行。該產生變體區域之方式隨時可用且能夠與例如任何合適之編碼任何可變區(或包含於其中之CDR序列之任何組合，應使用經修飾可變區)之核酸組合。此外，可僅僅重新合成編碼與具有提供等電點分異之如本文所描述之合適胺基酸變體之經編碼恆定區組合之所選可變區的構築體。舉例而言，可提供CH1、CH2、CH3編碼序列且與所選VH編碼序列組合，此組合可電腦模擬進行(且重新合成)及/或活體外進行(例如使用諸如連接/選殖之分子生物學技術)，且生成表現卡匣。藉由提供合適可變區(如由核酸序列編碼)組合之序列，此等合適可變區組合可易於與編碼本發明之變體，例如具有較佳地在CH1區內之未經表面之胺基酸，較佳地內埋式胺基酸處之變體的本發明之合適恆定區(例如CL或CH1及CH2及/或CH3)組合。

【0077】 吾人亦可提供具有編碼例如多肽之包含多聚體蛋白(諸如一個共

同輕鏈及二個分離重鏈)之組分之合適表現卡匣的細胞。自一開始，該細胞可具有穩定地整合之編碼適用於分離之變異區域之核酸。其後，該等細胞僅需要與編碼所選VL區或VH區或二者之核酸整合(或置換VL區及/或VH區)，隨後可生成可基於一或多個變異區域容易地分離之多聚體蛋白的混合物。因此，此處所闡述之本發明之一個態樣包含具有穩定地整合至其基因組中之編碼共同輕鏈之核酸及包含有包含本文所闡述之分離胺基酸殘基之一或多個區域之恆定區的宿主細胞。較佳地，本發明包括編碼用於與重鏈可變區組合之包含負分離胺基酸殘基之區域及用於與第二重鏈可變區組合之包含正分離胺基酸殘基之區域的核酸。較佳地，該二個經編碼重鏈可變區具有不同pI，其中更加正之可變區可連接至包含正分離胺基酸殘基之區域且其中更加負之可變區可連接至包含負分離胺基酸殘基之區域。

【0078】 本發明亦揭露多個該等變體或分離胺基酸殘基。因為此等變體包括蛋白質之未經表面之殘基，故當此等變體可減少不合需要之免疫作用時前述情況亦為有利的，因為此等變體可能不會造成在例如多特異性蛋白，詳言之多特異性抗體中之用於分離之區域(諸如CH1區)表面處之潛在性抗原基元的暴露。此外，因為該等變體不處於蛋白質表面處，故一般而言，如本文所揭露之所選變體可有利地應用於任何包含一個包含如本文所揭露之變體之恆定區或構架區及一個包含免疫球蛋白多肽之可相容異源二聚化區(例如CL區域、CH2區域或CH3區域)，較佳地至少二個恆定區區域，更佳地CH1的雙特異性或多特異性蛋白。較佳地，本發明之具有可變重鏈區域及可變輕鏈區域之多特異性蛋白可具有在構架區或恆定區，較佳地CH1區內所選之未經表面暴露或內埋式之一或多個胺基酸變化，對於殘基在Fc界面處經修飾之CH1或CH2-CH3/CH2-CH3區域，該一或多個胺基酸變化不會有害地影響CH/CL界面。

【0079】 可替代地，本發明之多特異性蛋白可包含諸如不需要與CL配對之

CH1區之分離區域。舉例而言，CH1可能為駱駝CH1或基於駱駝CH1或諸如鯊魚之缺乏輕鏈之其他生物體，或可能為缺乏疏水性殘基且不與輕鏈配對之經修飾CH1區，其中區域包括在未經表面暴露之殘基處之變體以產生等電點差異，從而促進多特異性蛋白與其他蛋白質及片段之分離。

【0080】藉由包括CH1區中之該等變體，該等變體有益地不影響通常在CH2-CH3/CH2-CH3界面處之Fc/Fc受體相互作用或肽多聚化(例如異源二聚化或同源二聚化)。較佳地，與野生型區域相比或與僅包含一或多個分離殘基之區域相比，除另一變體以外，亦包含在構架區或恆定區，較佳地CH1區內所選之未經表面暴露或內埋式之一或多個分離殘基之本發明區域可有益地改善穩定性。

【0081】因此，在一個實施例中，提供包含第一含CH1免疫球蛋白多肽及第二含CH1免疫球蛋白多肽之雙特異性蛋白，詳言之抗體，其中第一含CH1免疫球蛋白多肽及/或第二含CH1免疫球蛋白多肽包含未經表面暴露或內埋式之一或多個變異分離胺基酸殘基，以使得包含第一含CH1免疫球蛋白多肽及第二含CH1免疫球蛋白多肽之免疫球蛋白蛋白質之等電點不同於僅具有第一含CH1免疫球蛋白多肽之蛋白質及/或僅具有第二含CH1免疫球蛋白多肽之蛋白質(例如親本蛋白)的等電點。

【0082】在一個實施例中，含CH1免疫球蛋白之變體延長或縮短該免疫球蛋白在離子交換層析時之滯留時間。

【0083】此同樣應用於包含與包含例如第三含CH1免疫球蛋白多肽之免疫球蛋白多肽二聚化之包含第一CH1區及第二CH1區之免疫球蛋白多肽的多特異性抗體，其中第一含CH1免疫球蛋白多肽及第二含CH1免疫球蛋白多肽包含選自在CH1區內未經表面暴露之胺基酸或內埋式胺基酸之一或多個胺基酸之一或多個變異分離殘基，以使得包含第一含CH1免疫球蛋白多肽及第二含CH1免疫球蛋白多肽以及第三含CH1免疫球蛋白多肽之免疫球蛋白蛋白質之等電點不同於僅

具有第一含CH1免疫球蛋白多肽及第二含CH1免疫球蛋白多肽之蛋白質及/或僅具有第三含CH1免疫球蛋白多肽之蛋白質(例如親本蛋白)的等電點。參見例如圖2B。

【0084】 應理解，包含第一含CH1免疫球蛋白多肽及第二含CH1免疫球蛋白多肽之雙特異性蛋白可難以使用諸如離子交換及其類似方法之其中各別蛋白質之等電點類似之習知層析法與親本蛋白(例如單特異性二價抗體)分離。如實例部分中所示，可顯現之等電點類似性為所選層析管柱中之類似滯留時間。如實例中所示，類似性亦可使用例如等電聚焦來測定。在產生含有免疫球蛋白區域之抗體或蛋白質之混合物期間，滯留時間可類似以使得各別蛋白質之峰重疊，難以進行分離。亦應理解，如關於第一含CH1免疫球蛋白多肽及第二含CH1免疫球蛋白多肽所提及之術語「第一」及「第二」並不意味著任何次序或偏好且僅僅用以指示此等鏈不同。

【0085】 應理解，本發明之CH1區之變體將影響雙特異性抗體之等電點，包括電荷添加、移除或逆轉。對於所產生之各免疫球蛋白多肽，向含CH1多肽或其類似物中之電荷添加可在一個CH1區或一或多個CH1區中之各者處進行。電荷添加可藉由各種手段獲得。中性胺基酸可變化(通常以表現構築體中之編碼DNA含量)且變成具有負電荷或正電荷之胺基酸，分別引起負電荷及正電荷添加。正胺基酸可變成具有中性電荷或負電荷之胺基酸，引起負電荷添加，其中自正電荷至負電荷之胺基酸變化引起相對較大之變化。相反地，負胺基酸可變成具有中性電荷或正電荷之胺基酸，引起正電荷添加，其中自負電荷至正電荷之胺基酸變化引起相對較大之變化。

【0086】 因此，在另一實施例中，本發明之免疫球蛋白蛋白質包含選自由以下組成之群之一或多個未經表面暴露之胺基酸或較佳地內埋式胺基酸之一或多個變體：

- 中性胺基酸變帶負電胺基酸；

- 帶正電胺基酸變中性胺基酸；

- 帶正電胺基酸變帶負電胺基酸；

- 中性胺基酸變帶正電胺基酸；

- 帶負電胺基酸變中性胺基酸；以及

- 帶負電胺基酸變帶正電胺基酸。

【0087】 具有正電荷之胺基酸為離胺酸(Lys，K)、精胺酸(Arg，R)以及組胺酸(His，H)。較佳地，當具有正電荷之胺基酸將包括於鏈中或在親本區域之間變化時，選擇離胺酸。具有負電荷之胺基酸為麩胺酸(Glu，E)及天門冬胺酸(Asp，D)。自等電點視角看，剩餘胺基酸代表中性胺基酸。較佳地，在另一實施例中，本發明之免疫球蛋白蛋白質包含選自由以下組成之群之一或多個未經表面暴露之胺基酸或較佳地內埋式胺基酸之一或多個變體：

- 中性胺基酸變帶負電胺基酸；

- 帶正電胺基酸變中性胺基酸；

- 中性胺基酸變帶正電胺基酸；以及

- 帶負電胺基酸變中性胺基酸。

【0088】 呈守恆設計更改形式之此等變體可為較佳的。

【0089】 如示意性地描繪本發明之單特異性抗體、雙特異性抗體及例示性多特異性抗體之圖1及2中所例示，含CH1免疫球蛋白中之任一者或二者可變化。應理解，針對含CH1免疫球蛋白中之一者或其類似物所選之變體較佳係同一類型，亦即當將正電荷添加至一個鏈中時，選擇將正電荷添加至彼鏈中(以具有相加效應)之一或多個變體。亦應理解，當鏈中之一者具有新增正電荷且另一鏈將同樣包括一或多個變體時，較佳選擇包含負電荷添加之針對另一鏈所選之一或多個變體，此係因為對不同之包含第一含CH1免疫球蛋白及第二含CH1免疫球蛋

白之成對免疫球蛋白蛋白質之等電點的作用可能通常以其他方式削弱或甚至抵消。

【0090】因此，在一個實施例中，提供包含第一含CH1免疫球蛋白多肽及第二含CH1免疫球蛋白多肽之免疫球蛋白蛋白質，其中第一含CH1免疫球蛋白多肽及/或第二含CH1免疫球蛋白多肽包含選自在CH1區內未經表面暴露之胺基酸之一或多個胺基酸之一或多個變體，其中第一含CH1免疫球蛋白多肽包含選自以下之變體：

- 中性胺基酸變帶負電胺基酸；

- 帶正電胺基酸變中性胺基酸；以及

- 帶正電胺基酸變帶負電胺基酸；

且其中第二含CH1免疫球蛋白多肽包含選自以下之變體：

- 中性胺基酸變帶正電胺基酸；

- 帶負電胺基酸變中性胺基酸；以及

- 帶負電胺基酸變帶正電胺基酸。

【0091】在另一實施例中，提供包含第一含CH1免疫球蛋白多肽及第二含CH1免疫球蛋白多肽之免疫球蛋白蛋白質，其中第一含CH1免疫球蛋白多肽及/或第二含CH1免疫球蛋白多肽包含選自在CH1區內未經表面暴露之胺基酸之一或多個胺基酸之一或多個變體，

其中第一含CH1免疫球蛋白多肽包含選自以下之變體：

- 中性胺基酸變帶負電胺基酸；以及

- 帶正電胺基酸變中性胺基酸；

且其中第二含CH1免疫球蛋白多肽包含選自以下之變體：

- 中性胺基酸變帶正電胺基酸；以及

- 帶負電胺基酸變中性胺基酸。

【0092】在一個實施例中，第一含CH1免疫球蛋白多肽及第二含CH1免疫球蛋白多肽在相對於CH1區之胺基酸序列比對時較佳地具實質一致性且較佳地僅在如本文所定義之胺基酸位置方面具差異。較佳地，在第一含CH1多肽及第二含CH1多肽之CH1區之間不同之胺基酸位置在未經表面暴露之胺基酸位置方面不同。該含CH1多肽較佳為人類IgG1免疫球蛋白CH1區。適用於生成包含如本文所描述之變異殘基之分離區域或與其比較之CH1區之胺基酸序列之實例描繪於圖14A中。

【0093】在另一實施例中，本發明之免疫球蛋白蛋白質在第一含CH1免疫球蛋白多肽及/或第二含CH1免疫球蛋白多肽中進一步包含進一步選自在CH1區內之胺基酸之穩定變體。可引入用以增加包含含有本文所描述之分離殘基之區域之多肽及/或雙特異性蛋白或多特異性蛋白之穩定性的另外變體。

【0094】較佳地，在免疫球蛋白多肽內之未經表面暴露之分離殘基或內埋式分離殘基可產生相較於諸如野生型區域之參考區域而言相對提高之穩定性。

【0095】如本文所使用之術語「未經表面暴露」意謂在使用預設參數之程式GETAREA 1.0 β中50%或更小之「比率(%)」評分，其中大於50%比率(%)在此程式中評分為「向外」或「經表面暴露」。如本文所使用之術語「內埋式」意謂在使用預設參數之程式GETAREA 1.0中20%或更小之比率(%)評分，其在此程式中評分為「向內」。Negi等人,「Solvent Accessible Surface Areas, Atomic Solvation Energies, and Their Gradients for Macromolecules」, 最後一次修正時間為2015年4月17日星期三3:00 PM。諸如本文實例中所提供，使用原代胺基酸及含有蛋白區域之區之結構模型作為輸入至GETAREA程式中之輸入物以在GETAREA輸出檔案中獲得「比率(%)」。在本文提及內埋式胺基酸之情況下，提及如表1及表20-22中所指示比率(%)評分為20%或更小且較佳地15%或更小之胺基酸或其變體。在一些實施例中，對內埋式胺基酸之提及係指如表1及表20-22中所指示比率(%)評

分為10%或更小之胺基酸或其變體。

【0096】 關於CH區之結構資訊可自含有數個CH區中之各者之高解析度結構之蛋白質資料庫獲得，或經由同源性模型化(例如使用同源性模型化工具以引起含有變體之CH區之結構模型化；https://swissmodel.expasy.org)獲得。如以pdb格式提供之所選CH1區或其類似物之結構資訊係在Getarea程式(蛋白質資料庫格式，提供來源於X射線繞射及NMR研究之巨分子結構資料之標準圖示)中輸入，該Getarea程式登記在提交以進行分析後之比率(%)評分。

【0097】 如本文所使用之「pI」係根據ExPASy，ProtParam工具使用預設參數基於原代胺基酸來加以計算。 ProtParam為允許計算儲存於Swiss-Prot或TrEMBL中之給定蛋白質或使用者進入蛋白質序列之各種物理及化學參數的工具。所計算之參數包括理論pI。Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A.；Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server；(In) John M. Walker (編): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press (2005) 第571-607頁。諸如本文實例中所提供，使用全多肽以量測理論pI。

【0098】 如實例部分中所示，可例如藉由諸如依賴於Rosetta軟體(3.1版<<https://www.rosettacommons.org/software>>)在不更改經表面暴露之殘基之情況下執行未經表面暴露且內埋式殘基之電腦模擬穩定性分析來作出針對沿感興趣之區域之各胺基酸位置之另一選擇。代替電腦模擬選擇，此亦可活體外進行。另外，諸如實例部分中所示，在第一種情況下，選擇可電腦模擬進行，隨後活體外確認其。

【0099】 「抗體」為含有結合抗原上之抗原決定基之一或多個區域之屬於免疫球蛋白類蛋白質之蛋白質分子，其中該等區域來源於抗體可變區或與抗體可變區共用序列同源性。抗體結合具有包括特異性及親和力之不同品質。特異

性決定何種抗原或其抗原決定基由結合區域特異性結合。親和力為與特定抗原或抗原決定基結合之強度之量度。此處宜注意，抗體之『特異性』係指抗體對特定抗原之選擇性，而『親和力』係指抗體之抗原結合位點與其所結合之抗原決定基之間之相互作用的強度。用於治療用途之抗體較佳儘可能地近似要被治療之個體之天然抗體(例如人類個體之人類抗體)。本發明之抗體不限於任何特定格式或其產生方法。

【0100】「雙特異性抗體」為如本文所描述之抗體，其中抗體之一個區域結合至第一抗原或抗原決定基，而抗體之第二區域結合至第二抗原或抗原決定基，其中該第一抗原及該第二抗原不具有一致性，或第一抗原決定基及第二抗原決定基不具有一致性。術語「雙特異性抗體」亦涵蓋其中一個重鏈可變區/輕鏈可變區(VH/VL)組合結合抗原上之第一抗原決定基且第二VH/VL組合結合第二抗原決定基的抗體。該術語進一步包括其中VH能夠特異性辨識第一抗原且免疫球蛋白可變區中與VH配對之VL能夠特異性辨識第二抗原的抗體。所得VH/VL對結合抗原1或抗原2。該等所謂之「二合一抗體」描述於例如WO 2008/027236、WO 2010/108127以及Schaefer等人(Cancer Cell 20, 472-486, 2011年10月)中。本發明之雙特異性抗體不限於任何特定雙特異性格式或其產生方法。雙特異性抗體為多特異性抗體。如本文所提及之多特異性多聚體或抗體涵蓋含有結合抗原上之抗原決定基之二個或更多個區域之屬於免疫球蛋白類蛋白質之蛋白質分子，其中該等區域來源於抗體可變區或與抗體可變區共用序列同源性；且包括結合三個或更多個如此項技術中已知之抗原，包括如先前申請之申請案US62/650,467中所描述之抗原的蛋白質分子。

【0101】本發明之區域包含不同於野生型或參考序列之構架區域或恆定區域以使得其包含帶負電胺基酸，其中野生型或參考序列之對應位置為未經表面暴露的或內埋式的；且含有中性胺基酸。可替代地，本發明之區域包含不同於

野生型或參考序列之構架區域或恆定區域以使得其包含帶正電胺基酸，其中野生型或參考序列之對應位置為未經表面暴露的或內埋式的；且含有中性胺基酸。可替代地，本發明之區域包含不同於野生型或參考序列之構架區域或恆定區域以使得其包含中性胺基酸，其中野生型或參考序列之對應位置為未經表面暴露的或內埋式的；且含有正胺基酸或負胺基酸。可替代地，本發明之區域包含上文所描述之實施例之組合以使得區域之淨pI之不同之處在於相對於野生型或參考序列之一或多個電荷。

【0102】 如本文所使用之術語『帶電胺基酸殘基』或『帶電殘基』意謂具有在生理學相關pH下之帶電側鏈之胺基酸殘基。此等帶電側鏈可為諸如精胺酸(Arg，R)、組胺酸(His，H)及離胺酸(Lys，K)中所存在之帶正電側鏈，或可為諸如天門冬胺酸(Asp，D)及麩胺酸(Glu，E)中所存在之帶負電側鏈。如本文所使用之術語『中性胺基酸殘基』或中性殘基係指不攜帶在生理學上相關pH下之帶電側鏈之全部其他胺基酸。此等中性殘基包括絲胺酸(Ser，S)、蘇胺酸(Thr，T)、天門冬醯胺酸(Asn，N)、麩醯胺酸(Glu，Q)、半胱胺酸(Cys，C)、甘胺酸(Gly，G)、脯胺酸(Pro，P)、丙胺酸(Ala，A)、纈胺酸(Val，V)、異白胺酸(Ile，I)、白胺酸(Leu，L)、甲硫胺酸(Met，M)、苯丙胺酸(Phe，F)、酪胺酸(Tyr，Y)以及色胺酸(Trp，T)。

【0103】 本發明之一較佳實施例包含如上文所描述之分離區域及/或包含此類分離區域之蛋白質。本發明之分離區域可併入具有免疫球蛋白區域之抗體或蛋白質中。其可併入任何子類之IgG或單特異性或多特異性T細胞受體區域或免疫球蛋白中。

【0104】 本發明之另一較佳實施例為包含一或多個結合區域之蛋白質且包含有包含N159K、N159H或N159R或N159D或N159E分離殘基且更佳地N159K或N159D分離殘基之CH1分離區域。本發明之另一較佳實施例為包含一或多個結合

區域之蛋白質且包含有包含N201K、N201H或N201R或N201D或N201E分離殘基且更佳地N201K或N201D分離殘基之CH1分離區域。

【0105】 如根據本發明所提供之併有本發明之分離區域之單特異性蛋白、雙特異性蛋白或多特異性蛋白可包含經選擇為來自人類IgG之CH1區之CH1區，在一個實施例中該CH1區包含選自包含以下之群之在CH1區內之胺基酸：T120、K147、D148、Y149、V154、N159、A172、Q175、S190、N201以及K213。此等胺基酸位置之編號係根據EU編號。

【0106】 本發明之CH1分離區域可進一步包含對應於T197D之穩定變體。

【0107】 本發明之CH1分離區域可進一步包含對應於在E216K處之鉸鏈之穩定變體。

【0108】 本發明之CH1分離區域可進一步包含對應於G122P、S157T、I199V、N203I、S207T以及V211I之穩定變體。

【0109】 藉由例如經由選自包含以下之群之變體殘基胺基酸產生且採用包含如本文所揭露之變體之分離區域：在人類IgG1免疫球蛋白多肽鏈之CH1區內之T120、K147、D148、Y149、V154、N159、A172、Q175、S190、N201以及K213，可產生具有在調配及分離期間所用之pH下之差異電荷，亦即不同等電點之單特異性蛋白、雙特異性蛋白或多特異性蛋白(參見例如圖1)，該等不同等電點允許分離且分離單特異性蛋白與雙特異性蛋白或多特異性蛋白(或分離且分離雙特異性蛋白與三特異性蛋白，諸如此類)。

【0110】 在一個實施例中，根據本發明產生單特異性蛋白、雙特異性蛋白或多特異性蛋白，其中免疫球蛋白多肽之CH1區包含選自由以下組成之群之在CH1區處為未經表面暴露之胺基酸或內埋式胺基酸之分離殘基：D148、Y149、V154、N159、A172、S190以及N201。該蛋白質較佳為人類蛋白，較佳地IgG蛋白，較佳地IgG1蛋白。

【0111】在一個實施例中，對於其中免疫球蛋白多肽之CH1區經選擇為來自人類IgG1之CH1區之本發明之雙特異性蛋白，在CH1區內之胺基酸選自由以下組成之群：T120、K147、D148、N159、Q175、N201、K213，此係因為此等胺基酸位置允許具有不同電荷(在中性胺基酸、帶正電胺基酸及帶負電胺基酸之間變化)之變體。在另一實施例中，在CH1區內為未經表面暴露之胺基酸之胺基酸選自由為內埋式胺基酸之胺基酸N159及N201組成之群。更佳地，該免疫球蛋白蛋白質為雙特異性抗體或多特異性蛋白。最佳地，該第一含CH1免疫球蛋白多肽及該第二含CH1免疫球蛋白多肽各自包含重鏈可變區，其中該可變區中之各者結合至不同抗原或抗原決定基。

【0112】在另一實施例中，根據本發明提供包含第一含CH1免疫球蛋白多肽及第二含CH1免疫球蛋白多肽之雙特異性蛋白，該CH1區為人類IgG1 CH1區，其中第一含CH1免疫球蛋白多肽或第二含CH1免疫球蛋白多肽包含選自在CH1區內之胺基酸之胺基酸之一或多個變體，該等變體包含選自由K147E、N159D、Q175E、N201D以及K213Q組成之群之一或多個變體或選自由T120K、D148K、N159K、Q175K、N201K組成之群之一或多個變體。最佳地，該雙特異性蛋白為雙特異性抗體。

【0113】在一較佳實施例中，本發明提供包含第一含CH1免疫球蛋白多肽及第二含CH1免疫球蛋白多肽之免疫球蛋白蛋白質，該CH1區為人類IgG1 CH1區，其中第一含CH1免疫球蛋白多肽或第二含CH1免疫球蛋白多肽中之一者包含變體N159K及在E216K處之鉸鏈位置處之變體。在另一實施例中，第一含CH1免疫球蛋白多肽或第二含CH1免疫球蛋白多肽中之另一者不包含變體或包含例如諸如選自T197D及K213Q之一或多個變體。較佳地，本發明之多聚化蛋白由二個多肽構成，其中第一多肽包含結合第一抗原或抗原決定基之第一可變區域且第二多肽包含結合不同於第一可變區域之抗原或抗原決定基之第二可變區域，其

中第一可變區域經由肽鍵連接至與二聚化區域(諸如CH3)連接之分離區域，其中該二聚化區域與經由肽鍵連接至該第二可變區域之第二二聚化區域(諸如第二CH3區域)形成界面；且優先連接至具有不同於第一分離區域之電荷之第二分離區域，其中該蛋白質較佳包含雙特異性或多特異性蛋白或抗體。

【0114】 在一個實施例中，根據本發明產生單特異性蛋白、雙特異性蛋白或多特異性蛋白，其中免疫球蛋白多肽之CH1區、CH2區、CH3區或其組合包含選自由以下組成之群之在CH區處為未經表面暴露之胺基酸或內埋式胺基酸之分離殘基：T120、K147、D148、Y149、V154、N159、A172、Q175、S190、N201及K213、V303、K370、EE382以及E388。該蛋白質較佳為人類蛋白，較佳地IgG蛋白，較佳地IgG1蛋白。

【0115】 在一個實施例中，對於其中免疫球蛋白多肽之CH區經選擇為來自人類IgG1之CH區之本發明之雙特異性蛋白，在CH區內之胺基酸選自由以下組成之群：T120、K147、D148、N159、Q175、N201、K213、V303、K370、E382以及E388，此係因為此等胺基酸位置允許具有不同電荷(在中性胺基酸、帶正電胺基酸及帶負電胺基酸之間變化)之變體。在另一實施例中，在CH區內為未經表面暴露之胺基酸之胺基酸選自由以下組成之群：為內埋式胺基酸之胺基酸N159及N201 (對於CH1)、V303 (對於CH2)以及E382及E388 (對於CH3)。更佳地，該免疫球蛋白蛋白質為雙特異性抗體或多特異性蛋白。最佳地，該第一含CH免疫球蛋白多肽及該第二含CH免疫球蛋白多肽各自包含重鏈可變區，其中該可變區中之各者結合至不同抗原或抗原決定基。

【0116】 在另一實施例中，根據本發明提供包含第一含CH免疫球蛋白多肽及第二含CH免疫球蛋白多肽之雙特異性蛋白，該CH區為人類IgG1 CH區，其中第一含CH免疫球蛋白多肽或第二含CH免疫球蛋白多肽包含選自在CH1區內之胺基酸之胺基酸之一或多個變體，該等變體包含選自由K147E、N159D、Q175E、

N201D、K213Q以及V303E組成之群之一或多個變體或選自由T120K、D148K、N159K、Q175K、N201K、V303K、E382Q、E382T、E388L、E388M、E388T組成之群之一或多個變體。最佳地，該雙特異性蛋白為雙特異性抗體。

【0117】 此項技術中已知，相對於單特異性抗體(或不合需要之蛋白質副產物)，可藉由具有一個雙特異性抗體或多特異性抗體優先產生雙特異性抗體或多特異性抗體，該一個雙特異性抗體或多特異性抗體包含有包含含變體L351D及L368E (「DE臂」)之CH3區之第一多肽及包含含變體T366K及L351K (「KK臂」)之第二CH3區之第二多肽(被集體地稱作「DEKK」異源二聚體) (EU編號)，以使得相對於包含DE/DE同源二聚體或KK/KK同源二聚體之二個多肽，形成DEKK之二個多肽優先配對。電荷工程改造之其他形式為此項技術中已知用於促進異源二聚化。

【0118】 在本文所描述之實施例中，在使用諸如CH1區之負分離區域之情況下，其優先與DE CH3區域配對，且在使用諸如CH1區之正分離區域之情況下，其優先與KK臂或前述物質之任何組合配對(例如一個多肽上之負分離區域及DE CH3區域以及另一多肽上之正分離區域及KK CH3區域以優先形成可更加容易地與雙正分離區域及KK/KK同源二聚體或雙負分離區域及DE/DE同源二聚體分離之異源二聚體)。在採用其他異源二聚化技術之情況下，如一般熟習此項技術者已知，本發明以相同方式藉由組合帶負電分離區域應用於帶負電異源二聚化區域且/或藉由組合帶正電分離區域應用於帶正電異源二聚化區域，以促進異源二聚體形成及該異源二聚體分離。

【0119】 在另一實施例中，根據本發明提供包含第一含CH1免疫球蛋白多肽及第二含CH1免疫球蛋白多肽之多聚化蛋白，較佳地雙特異性蛋白或多特異性蛋白，該CH1區為人類IgG1 CH1區，其中第一含CH1免疫球蛋白多肽包含選自在CH1區內之胺基酸之胺基酸之一或多個變體，該等變體包含選自由K147E、

N159D、Q175E、N201D以及K213Q組成之群之一或多個變體，且其中第二含CH1免疫球蛋白多肽包含選自在CH1區內之胺基酸之胺基酸之一或多個變體，該等變體包含選自由T120K、D148K、N159K、Q175K以及N201K組成之群之一或多個變體。最佳地，該雙特異性蛋白為雙特異性抗體。

【0120】在另一實施例中，根據本發明提供包含第一含CH1免疫球蛋白多肽及第二含CH1免疫球蛋白多肽之多聚化蛋白，較佳地雙特異性蛋白或多特異性蛋白，該CH1區為人類IgG1 CH1區，其中第一含CH1免疫球蛋白多肽或第二含CH1免疫球蛋白多肽包含選自在CH1區內之胺基酸之胺基酸之一或多個變體，該等變體選自由以下組成之群：K147E及Q175E；N201D及K213Q；T197D及K213Q；N159D及K213Q；以及K213Q，或該等變體選自由以下組成之群：T120K；N201K；D148K及Q175K；以及N159K及在鉸鏈殘基E216K處之胺基酸之變體。最佳地，該蛋白質為雙特異性抗體。

【0121】在又另一實施例中，根據本發明提供包含第一含CH1免疫球蛋白多肽及第二含CH1免疫球蛋白多肽之多聚化蛋白，較佳地雙特異性蛋白或多特異性蛋白，該CH1區為人類IgG1 CH1區，其中第一含CH1免疫球蛋白多肽包含選自在CH1區內之胺基酸之胺基酸之一或多個變體，該等變體選自由以下組成之群：K147E及Q175E；N201D及K213Q；T197D及K213Q；N159D及K213Q；以及K213Q，且其中第二含CH1免疫球蛋白多肽包含選自在CH1區內之胺基酸之胺基酸之一或多個變體，該等變體選自由以下組成之群：T120K；N201K；D148K及Q175K；以及N159K及在鉸鏈殘基E216K處之胺基酸之變體。最佳地，該免疫球蛋白蛋白質為雙特異性抗體。

【0122】在一個實施例中，根據本發明提供包含具有如表14部分B中所描繪之CH1區、CH2區或CH3區之序列之CH區的多聚化蛋白，較佳地雙特異性蛋白或多特異性蛋白。多聚化蛋白，較佳地雙特異性蛋白或多特異性蛋白可具有

為表14部分B之二個或三個CH區序列之組合的CH1區、CH2區或CH3區。在其具有如表14部分B中所描繪之二個CH1序列、二個CH2序列或二個CH3序列之情況下，較佳地，當與野生型CH區相比時，二個區具有相反電荷差異。因此若當與野生型CH相比時一個區具有更加正之電荷，則當與野生型CH相比時另一區較佳具有更加負之電荷。重鏈可藉由具有例如表14部分B之CH1序列、CH2序列及CH3序列中之二個或三個而具有表14之二個或三個序列。在此類情況下，當與野生CH相比時，二個或三個重鏈可具有相同電荷差異。當與野生型相比時，二個或三個重鏈全部具有更加正之電荷，或二個或三個重鏈全部具有更加負之電荷。此外，多聚化蛋白，較佳地雙特異性蛋白或多特異性蛋白可具有該等重鏈中之二個，在該等情況下，較佳地當與野生型重鏈相比時二個重鏈具有相反電荷差異。

【0123】 多聚化蛋白，較佳地雙特異性蛋白或多特異性蛋白較佳為多特異性抗體，較佳地雙特異性抗體。

【0124】 此項技術中描述各種方法以便促進諸如雙特異性抗體之感興趣之多特異性蛋白之形成，由此減少單特異性二價(親本)蛋白之含量。對於抗體，CH3-CH3相互作用為Fc二聚化之驅動器。可引入在二個CH3區之間之界面處之CH3區之胺基酸變體以促進雙特異性物形成且/或破壞單特異性親體形成(例如經由引入可相容/排斥性電荷或立體(不)相容性)。該等方法可有利地與如本文所描述之CH1區之變體組合。

【0125】 因此，在另一實施例中，提供本發明之免疫球蛋白蛋白質，其中第一含CH1免疫球蛋白多肽及第二含CH1免疫球蛋白多肽包含CH3區，且其中第一含CH1免疫球蛋白多肽及第二含CH1免疫球蛋白多肽中之一者包含CH3變體L351D及L368E，且另一者包含CH3變體T366K及L351K (亦稱作「DEKK」) (EU編號)。

【0126】 應理解，在向第一含CH1免疫球蛋白多肽及/或第二含CH1免疫球蛋白多肽中添加電荷之情況下，此等所謂之DEKK變體對準。此意謂當含CH1免疫球蛋白多肽包含已添加負電荷之變體時，彼鏈較佳地具有L351D及L368E CH3殘基，不需要為(但可為)變異CH1區之另一鏈具有CH3 T366K及L351K殘基。相反地，此意謂當含CH1免疫球蛋白多肽包含已添加正電荷之變體時，彼鏈較佳地具有T366K及L351K CH3變體，不需要為變異CH1區之另一鏈具有L351D及L368E CH3殘基。較佳地，本發明之該免疫球蛋白蛋白質包含人類免疫球蛋白Fc區，最佳地該人類免疫球蛋白Fc區為IgG1 Fc區。如上文所提及，在可採用其他電荷變體CH3技術以用於異源二聚體形成之情況下，本發明之多聚化蛋白之一較佳實施例包含進一步包含多聚化區域(諸如具有負電荷之CH3)之具有負電荷之含分離區域免疫球蛋白多肽及進一步包含多聚化區域(諸如具有正電荷之CH3)之具有正電荷之含分離區域免疫球蛋白多肽，以促進該多聚化蛋白之異源二聚化及分離。

【0127】 術語『CH1區』、『CH2區』及『CH3區』在此項技術中眾所周知。IgG結構具有四個鏈，亦即二個輕鏈及二個重鏈；各輕鏈通常具有二個區域，亦即可變輕鏈區域及恆定輕鏈區域(VL及CL)，且各重鏈通常具有四個區域，亦即可變重鏈(VH)區域及三個恆定重鏈區域(CH1、CH2、CH3)。重鏈之CH2區及CH3區稱為Fc (片段可結晶)部分、Fc片段、Fc骨架或簡言之Fc。IgG分子為具有在鉸鏈區處且在CH1與CL之間藉由二硫鍵(-S-S-)結合在一起之二個重鏈之異源四聚體。重鏈二聚化包括包含於CH3-CH3區域界面處之相互作用至在鉸鏈區處之相互作用。合適CH2區、CH3區及鉸鏈區之胺基酸序列之實例描繪於圖14中。

【0128】 在一個實施例中，本發明之免疫球蛋白蛋白質包含為抗體重鏈之第一含CH1多肽。在一個實施例中，本發明之免疫球蛋白蛋白質包含為抗體重鏈之第二含CH1多肽。在另一較佳實施例中，第一含CH1多肽及第二含CH1多肽二

者均為諸如人類IgG1重鏈之抗體重鏈。本發明之該免疫球蛋白蛋白質可進一步包含一或多個抗體輕鏈。最佳地，該抗體輕鏈為共同輕鏈。

【0129】因此，如本文所使用之術語『共同輕鏈』係指可具有一致性或具有一些胺基酸序列差異，同時在與重鏈配對之後仍保留所得抗體之結合特異性的輕鏈。舉例而言，有可能製備或發現不具有胺基酸序列一致性、但仍具有功能等效性之輕鏈，此係例如藉由引入且測試守恆胺基酸變化及/或不貢獻於或僅部分貢獻於當與重鏈配對時之結合特異性之區中之胺基酸變化及其類似胺基酸變化來進行。特定共同輕鏈及該等功能等效變異體之組合涵蓋在術語「共同輕鏈」內。關於共同輕鏈使用之詳細描述，參考WO 2004/009618。較佳地，本發明中使用為生殖系樣輕鏈，更佳地生殖系輕鏈，較佳地經重排生殖系人類κ輕鏈，最佳地經重排生殖系人類κ輕鏈IgVκ1-39/Jκ或IGVκ3-20/Jκ之共同輕鏈。涵蓋在本發明內之其他輕鏈包括IgKV3-15/JK1及亦在此項技術中已知用於構成共同輕鏈之替代輕鏈。

【0130】作為使用共同輕鏈及避免不匹配重鏈及輕鏈之誤配之替代方案，可涵蓋諸如描述於WO2009/080251、WO2009/080252及/或WO2009/080253中之用於使重鏈及輕鏈配對之手段。共同輕鏈可變區、共同輕鏈及/或共同輕鏈之CDR序列之胺基酸序列之實例描繪於圖13中。較佳共同輕鏈具有如圖13a中所描繪之序列。

【0131】當在CH1區內為如上文所描述之未經表面暴露之胺基酸或較佳地內埋式胺基酸之彼等胺基酸當中選擇CH1區之變異殘基時，該等變體特別地適用於人類雙特異性蛋白，此係因為此等變體允許最接近地類似於人類抗體之三級結構之雙特異性蛋白。應理解，關於蛋白質描述之術語人類並不意味著第一含CH1多肽及第二含CH1多肽之整體胺基酸序列需要具有人源，也不意味著胺基酸序列需要直接自人類獲得。應理解，對人類區域、蛋白質或抗體之提及係指可

包括例如CH2工程改造(針對Fc沉默而包括)、CH3工程改造(針對異源二聚化而包括)及/或Fc工程改造(針對影響Fc受體活動性而包括)之一些胺基酸序列更改及一些針對分離殘基包括之更改的蛋白質。如此項技術中已知，用於生成雙特異性蛋白或多特異性蛋白之人類區域可由自具有人類免疫系統之特點之小鼠獲得之核酸序列編碼，該等核酸序列諸如編碼人類可變區基因鏈段及/或恆定區之重基因座、輕基因座或雜交基因座。WO2009/157771。該等蛋白質亦可經由識別編碼人類免疫球蛋白區域之核酸來獲得，該等人類免疫球蛋白區域係由噬菌體呈現、酵母呈現及一般熟習此項技術者熟知之其他技術來識別。

【0132】本發明之多聚化蛋白可為雙特異性蛋白或多特異性蛋白，較佳地儘管不存在於自然界中、但亦可具有呈例如合併至人類雙特異性抗體中之二個重鏈及二個(共同)輕鏈之序列形式之人類序列之抗體，該等抗體可具有自胺基酸序列視角看少量例如如本文所描述之變體，包括CH1區且/或較佳地CH3工程改造及其類似者之變體。

【0133】在一個實施例中，進一步包含輕鏈之本發明之免疫球蛋白蛋白質較佳具有在CH1區內未經表面暴露且距CH1/CL界面遠之一或多個胺基酸之一或多個變體。可避免對包括重鏈及輕鏈配對之抗原結合區域功能具有任何潛在性作用之此方式。較佳地，本發明之雙特異性蛋白為雙特異性抗體。更佳地，該雙特異性抗體為人類雙特異性抗體。最佳地，為人類雙特異性抗體之該雙特異性抗體為IgG1抗體。

【0134】在一個實施例中，提供編碼本發明之分離區域之核酸，該本發明之分離區域諸如包含選自在CH1區內未經表面暴露之胺基酸之一或多個變體之免疫球蛋白含CH1多肽。此外，本發明之另一實施例為包含編碼本發明之分離區域之核酸之細胞或重組宿主細胞。此外，在另一實施例中，提供包含編碼本發明之第一含CH1免疫球蛋白多肽及第二含CH1免疫球蛋白多肽之一或多個核酸

之細胞或重組宿主細胞。該等經分離核酸、細胞及重組宿主細胞特別地適用於產生本發明之免疫球蛋白蛋白質且適用於分離該等免疫球蛋白蛋白質之方法。

【0135】亦提供包含編碼如本文所揭露之本發明之變異分離區域之核酸之宿主動物或轉殖基因動物。在一個實施例中，該等宿主動物或轉殖基因動物編碼包含對應於本發明之野生型免疫球蛋白區域之未經表面暴露之胺基酸殘基之一或多個分離殘基之免疫球蛋白區。較佳地，此類轉殖基因動物為嚙齒動物或鳥，更佳地小鼠、大鼠或雞，其中該小鼠、大鼠或雞之抗體組庫之至少一部分為人類或經人類化。

【0136】因此，在一個實施例中，提供包含如本文所描述之本發明之免疫球蛋白蛋白質之組合物。應理解，此類組合物可為例如粗細胞溶解物及/或經過濾粗溶解物或經半純化產物之中間產物。當對此類組合物進行進一步加工時，例如包括由於本發明之一或多個CH1區之變體而允許獲得雙特異性蛋白之分離步驟。可獲得醫藥組合物，亦即包含本發明之雙特異性蛋白且包含醫藥學上可接受之賦形劑之醫藥組合物。此類產物可呈液體形式或呈經冷凍乾燥之產物形式。可採用任何醫藥學上可接受之組合物。應理解，此類醫藥學上可接受之組合物可不必需直接投與至患者，但可經受例如將醫藥產品溶解或混合於適當患者輸注用溶液中之另外預備步驟。如通篇進一步所描述，以上步驟進一步應用於包含三特異性蛋白及包含除CH1區以外之分離區域之其他多特異性蛋白的組合物。

【0137】如下文所描述之另外實施例係關於用於產生本發明之免疫球蛋白蛋白質之方法。

【0138】在一個實施例中，提供用於產生本發明之變異雙特異性蛋白之方法，其包含以下步驟：

a) 提供編碼第一含CH免疫球蛋白多肽之核酸及編碼第二含CH免疫球蛋白

多肽之核酸，該第一含CH免疫球蛋白多肽及該第二含CH免疫球蛋白多肽編碼雙特異性蛋白；

b) 該編碼第一含CH免疫球蛋白多肽之核酸包含編碼在CH區內未經表面暴露之一或多個胺基酸之三重峰之一或多個變體，以使得包含第一含CH免疫球蛋白多肽及第二含CH免疫球蛋白多肽之變異雙特異性蛋白之等電點不同於僅含有第一含CH免疫球蛋白多肽之單特異性蛋白或僅含有第二含CH免疫球蛋白多肽之單特異性蛋白的等電點；

c) 提供具有編碼第一含CH免疫球蛋白多肽之核酸及編碼第二含CH免疫球蛋白多肽之核酸之細胞且產生變異雙特異性蛋白。

【0139】 如上文已經描述，應理解，任何變化可在上文及下文所描述之步驟a)及b)中電腦模擬執行。因此，第一含CH免疫球蛋白多肽及第二含CH免疫球蛋白多肽相較於參考序列而言可完全電腦模擬變化。應理解，該變化亦可包含僅僅提供該等(變異)核序列且接合此等例如合適可變區域。包括標準分子技術、DNA合成及/或電腦模擬設計之任何構築方式可根據本發明採用且用於如上文及下文所描述之步驟a)及b)中。亦應理解，向細胞提供核酸可包括諸如暫時及穩定轉染或其類似方法之任何合適方法。亦應理解，提供具有步驟c)之核酸之細胞之步驟亦可包括僅提供其部分，只要結果為細胞具備編碼第一含CH免疫球蛋白多肽之核酸及編碼第二含CH免疫球蛋白多肽之核酸且該細胞能夠產生變異雙特異性蛋白即可。在另一實施例中，提供用於產生本發明之變異雙特異性蛋白之方法，其中該方法包含以下步驟：

a) 提供編碼第一含CH免疫球蛋白多肽之核酸及編碼第二含CH免疫球蛋白多肽之核酸，該第一含CH免疫球蛋白多肽及該第二含CH免疫球蛋白多肽編碼雙特異性蛋白；

b) 其中編碼第一含CH免疫球蛋白多肽之核酸及編碼第二含CH免疫球蛋白

多肽之核酸包含編碼在CH區內未經表面暴露之一或多個胺基酸之三重峰之一或多個變體，以使得包含第一含CH免疫球蛋白多肽及第二含CH免疫球蛋白多肽之變異雙特異性蛋白之等電點不同於僅含有第一含CH免疫球蛋白多肽之親本蛋白或僅含有第二含CH免疫球蛋白多肽之親本蛋白的等電點；

c) 提供具有編碼第一含CH免疫球蛋白多肽及經修飾第二含CH免疫球蛋白多肽之核酸之細胞且產生變異免疫球蛋白雙特異性蛋白。

【0140】 較佳地，包含該等變體中之一或多者之本發明之該等方法選自：

- 將胺基酸自中性胺基酸改變成帶負電胺基酸；

- 將帶正電胺基酸改變成中性胺基酸；

- 將帶正電胺基酸改變成帶負電胺基酸；

- 將胺基酸自中性胺基酸改變成帶正電胺基酸；

- 將帶負電胺基酸改變成中性胺基酸；以及

- 將帶負電胺基酸改變成帶正電胺基酸。

【0141】 應理解，較佳地含CH免疫球蛋白多肽中之一者具有新增正電荷，或具有新增負電荷。二個含CH免疫球蛋白多肽均可具有新增電荷，其中較佳地，一個含CH免疫球蛋白多肽具有新增負電荷且另一含CH免疫球蛋白多肽具有新增正電荷。

【0142】 因此，在另一實施例中，提供用於產生包含第一含CH免疫球蛋白多肽及第二含CH免疫球蛋白多肽之本發明雙特異性蛋白之方法，其中該方法包含以下步驟：

a) 提供編碼第一含CH免疫球蛋白多肽之核酸及編碼第二含CH免疫球蛋白多肽之核酸；

其中第一含CH免疫球蛋白多肽及/或第二含CH免疫球蛋白多肽包含選自在CH區內未經表面暴露之胺基酸之一或多個胺基酸之一或多個變體，其中第一含

CH免疫球蛋白多肽包含選自以下之變體：

- 中性胺基酸變帶負電胺基酸；

- 帶正電胺基酸變中性胺基酸；以及

- 帶正電胺基酸變帶負電胺基酸；

且其中第二含CH免疫球蛋白多肽包含選自以下之變體：

- 中性胺基酸變帶正電胺基酸；

- 帶負電胺基酸變中性胺基酸；以及

- 帶負電胺基酸變帶正電胺基酸；

b) 提供具有編碼第一含CH免疫球蛋白多肽及第二含CH免疫球蛋白多肽之核酸之細胞且產生雙特異性蛋白。

【0143】 應理解，任何變化步驟可在步驟a)中電腦模擬執行。因此，第一含CH免疫球蛋白多肽及第二含CH免疫球蛋白多肽相較於參考序列而言可完全電腦模擬變化。應理解，該變化亦可包含僅僅提供該等核序列且接合此等例如合適可變區域。包括標準分子技術、DNA合成及/或電腦模擬設計之任何構築方式可根據本發明採用且用於步驟a)中。亦應理解，向細胞提供可包括諸如暫時及穩定轉染或其類似方法之任何合適方法。亦應理解，提供具有步驟b)之核酸之細胞之步驟亦可包括僅提供其部分，只要結果為細胞具備編碼第一含CH免疫球蛋白多肽之核酸及編碼第二含CH免疫球蛋白多肽之核酸且該細胞能夠產生變異雙特異性蛋白即可。

【0144】 在另一實施例中，改變含CH免疫球蛋白多肽之胺基酸序列之步驟另外包括在與CH區內之一或多個胺基酸對應之另外胺基酸位置處引入穩定修飾。

【0145】 以上步驟進一步應用於產生三特異性蛋白及其他多特異性蛋白、編碼該等蛋白之核酸及包含且編碼除CH區以外具有在未經表面暴露之殘基處之

變體之分離區域之核酸的方法。

【0146】 根據本發明，提供包含編碼至少第一包含本發明之多肽鏈之CH區域及第二包含本發明之多肽鏈之CH區域之核酸的細胞。本發明之該細胞可進一步包含編碼輕鏈，較佳地共同輕鏈之核酸。可採用用於製造本發明之免疫球蛋白蛋白質之任何細胞，其包括能夠表現重組DNA分子之任何細胞，包括細菌，諸如艾氏菌屬(Escherichia) (例如大腸桿菌)、腸桿菌屬(Enterobacter)、沙門氏菌屬(Salmonella)、芽孢桿菌屬(Bacillus)、假單胞菌屬(Pseudomonas)、鏈黴菌屬(Streptomyces)；酵母，諸如釀酒酵母(S. cerevisiae)、乳酸克魯維酵母(K. lactis)、巴斯德畢赤酵母(P. pastoris)、假絲酵母(Candida)或解脂耶氏酵母(Yarrowia)；絲狀真菌，諸如紅黴菌(Neurospora)、米麴菌(Aspergillus oryzae)、小巢狀麴菌(Aspergillus nidulans)及黑麴菌(Aspergillus niger)；昆蟲細胞，諸如草地黏蟲SF-9或SF-21細胞；且較佳地哺乳動物細胞，諸如中國倉鼠卵巢(CHO)細胞、BHK細胞、小鼠細胞(包括SP2/0細胞及NS-0骨髓瘤細胞)；靈長類動物細胞，諸如COS及Vero細胞、MDCK細胞、BRL 3A細胞、融合瘤、腫瘤細胞、永生化原代細胞；人類細胞，諸如W138、HepG2、HeLa、HEK293、HT1080或胚胎視網膜細胞(諸如PER.C6)及其類似物。

【0147】 所選表現系統常常涉及哺乳動物細胞表現載體及宿主以使得蛋白質經適當地糖基化。可使用人類細胞株以獲得具有完全人類糖基化型態(completely human glycosylation pattern)之雙特異性抗體。一般而言，用於最大化哺乳動物細胞培養物之生產率之原理、方案及實用技術可在Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach (M. Butler,編, IRL Press, 1991)中找到。細胞及重組宿主細胞中之抗體表現已在此項技術中得到廣泛描述。因此，編碼本發明之蛋白質之核酸包含允許表現雙特異性蛋白之組分(例如二個重鏈及一個輕鏈)之諸如啟動子序列、5'/3' UTR、內含子序列及其類似序列之全部元件。編碼本發

明之蛋白質之核酸可以染色體外(穩定地)經轉染複本形式存在且/或穩定地整合至宿主細胞染色體中。後者為較佳的。

【0148】本發明之免疫球蛋白多肽係在宿主細胞中表現且藉由熟習此項技術者熟知之方法自細胞或較佳地細胞培養基收穫。在收穫之後，可藉由使用此項技術中已知之習知方法來純化包含第一含CH免疫球蛋白肽及第二含CH免疫球蛋白肽之免疫球蛋白蛋白質(或其類似物)。該等方法可包括沈澱、離心、過濾、粒徑篩析層析法、親和力層析法。對於包含IgG多肽之抗體之混合物，可適當地使用蛋白質A或蛋白質G親和力層析法(參見例如美國專利4,801,687及5,151,504)。在使用親和力層析法進行捕獲之後，可使用利用適當程序參數之正交拋光(orthogonal polishing)步驟以移除諸如HCP及DNA之任何剩餘過程相關雜質。一般而言，為獲得經純化雙特異性抗體或多價多聚體，進行包含宿主細胞培養、收穫物澄清、接著為蛋白質捕獲、陰離子交換層析之數個步驟以移除宿主細胞DNA，且進行CIEX以移除宿主細胞蛋白質(HCP)、淋溶蛋白質A及潛在性聚集物，接著進行諸如病毒過濾之額外步驟。熟習此項技術者瞭解該等步驟可經修改或單獨步驟經取代之次序。舉例而言，拋光步驟之替代方案包括疏水相互作用層析及混合模式層析。

【0149】除如上文所描述之加工以外，加工雙特異性蛋白或其類似物之該等方法亦可進一步包含基於所產生之雙特異性蛋白與所產生之單特異性蛋白之間之等電點差異分離所產生之雙特異性蛋白與所產生之單特異性蛋白(或分離多特異性蛋白與其他所產生之蛋白質)之分離步驟。可採用任何合適之分離步驟。所選合適之分離步驟可為等電聚焦。可替代地或另外，包含分離所產生之雙特異性蛋白與所產生之親本蛋白之分離步驟之該方法包含離子交換或疏水相互作用。如實例部分中所示，在CH區內之未經表面暴露之胺基酸，較佳地內埋式胺基酸之變體允許關於電荷之分異，且可提供等電點及/或雙特異性蛋白與親本蛋

白之間之層析特性之分異。該分異允許使用包括離子交換及疏水相互作用之習知層析法分離此等蛋白質。較佳方法為用於加工諸如抗體之醫藥生物產物之工業適用分離方法。本發明之範疇內包括利用藉由使用分離區域及變體產生之電荷及/或等電點(pI)差異之替代性分離方法，包括例如為一般熟習此項技術者已知之技術之毛細管區及毛細管等速電泳以及毛細管等電聚焦。

【0150】 如上所述，儘管就其自身而言如本文所描述之諸如CH區之分離區域之變體可允許在如本文所描述之方法中充分地分離親本蛋白與雙特異性蛋白，但在於細胞中產生期間雙特異性蛋白之形成可例如藉由改變如包含於含CH免疫球蛋白多肽中之CH3區來促進。因此，提供本發明之另一方法，其中第一含CH免疫球蛋白多肽及第二含CH免疫球蛋白多肽包含CH3區，且其中該等CH3區包含增強第一含CH免疫球蛋白多肽與第二含CH免疫球蛋白多肽之間之配對的CH3變體。較佳地，第一含CH免疫球蛋白多肽及第二含CH免疫球蛋白多肽中之一者包含CH3變體L351D及L368E，且另一者包含CH3變體T366K及L351K。DEKK殘基係處於彼此相互作用以促進DE鏈及KK鏈之異源二聚化之二個區域之間之界面處，而二個經KK修飾之CH3區域具有排斥性。應理解，如上文所描述，DEKK變體較佳經選擇為對準(亦即向包含於同一多肽中之CH3區及CH區二者中添加正電荷或負電荷)。異源二聚化技術之其他形式為此項技術中已知的且可利用本文所描述之變化，例如使用杵-臼技術或靜電工程改造方法來採用。

【0151】 在如上文所描述之用於產生雙特異性蛋白之本發明之方法中，CH區之變體較佳為如本文通篇定義為適用於雙特異性蛋白之變體，且更佳地該雙特異性蛋白較佳地可經選擇以包含如本文通篇同樣描述之另外特點。

【0152】 較佳地，在本發明之方法中產生之該等蛋白質為雙特異性抗體，更佳地人類雙特異性抗體，最佳地人類IgG1雙特異性抗體。如在本發明之方法中所產生之該等雙特異性蛋白，其中免疫球蛋白多肽之CH區經選擇為來自人類

IgG1之CH區，且在CH區內之胺基酸包含在選自由T120、K147、D148、N159、Q175、N201、K213、V303、K370、E382、E388組成之群之位置處之相對於人類野生型CH區之電荷差異，此係因為如實例部分中所例示之此等胺基酸位置允許在此等位置處包含不同電荷(在中性胺基酸、帶正電胺基酸及帶負電胺基酸之間變化)之替代殘基。最佳為代表內埋式胺基酸之胺基酸N159及N201。最佳為代表內埋式胺基酸之胺基酸V303、E382、E388。最佳地，該第一含CH免疫球蛋白多肽及該第二含CH免疫球蛋白多肽代表提供不同抗原結合區域之不同重鏈，亦即主要關於重鏈可變區不同。

【0153】在另一實施例中，如根據本發明產生之雙特異性蛋白或多特異性蛋白包含第一含CH免疫球蛋白多肽及第二含CH免疫球蛋白多肽，該CH區為人類IgG1 CH區，其中第一含CH免疫球蛋白多肽或第二含CH免疫球蛋白多肽包含選自在CH區內之胺基酸之胺基酸之一或多個變體，該等變體包含選自由K147E、N159D、Q175E、N201D、K213Q、V303E、K370S、K370T組成之群之一或多個變體或選自由T120K、D148K、N159K、Q175K、N201K、V303K、E382Q、E382T、E388L、E388M、E388T組成之群之一或多個變體。較佳地，該經分離免疫球蛋白蛋白質為雙特異性抗體或多特異性抗體。

【0154】在另一實施例中，在本發明之方法中產生包含第一含CH免疫球蛋白多肽及第二含CH免疫球蛋白多肽之雙特異性蛋白或多特異性蛋白，該CH區為人類IgG1 CH區，其中第一含CH免疫球蛋白多肽包含選自在CH區內之胺基酸之胺基酸之一或多個變體，該等變體包含選自由K147E、N159D、Q175E、N201D、K213Q、V303E、K370S、K370T組成之群之一或多個變體，且其中第二含CH免疫球蛋白多肽包含選自在CH區內之胺基酸之胺基酸之一或多個變體，該等變體包含選自由T120K、D148K、N159K、Q175K、N201K、V303K、E382Q、E382T、E388L、E388M、E388T組成之群之一或多個變體。最佳地，該所產生之免疫球

蛋白蛋白質為雙特異性抗體或多特異性抗體。

【0155】在另一實施例中，在本發明之方法中產生包含第一含CH1免疫球蛋白多肽及第二含CH1免疫球蛋白多肽之雙特異性蛋白或多特異性蛋白，該CH1區為人類IgG1 CH1區，其中第一含CH1免疫球蛋白多肽或第二含CH1免疫球蛋白多肽包含選自在CH1區內之胺基酸之胺基酸之一或多個變體，該等變體選自由以下組成之群：K147E及Q175E；N201D及K213Q；T197D及K213Q；N159D及K213Q；以及K213Q，或該等變體選自由以下組成之群：T120K；N201K；D148K及Q175K；以及N159K及在鉸鏈殘基E216K處之胺基酸之變體。最佳地，該所產生之雙特異性蛋白或多特異性蛋白為雙特異性人類抗體或多特異性人類抗體。

【0156】在又另一實施例中，在本發明之方法中產生包含第一含CH1免疫球蛋白多肽及第二含CH1免疫球蛋白多肽之雙特異性蛋白或多特異性蛋白，該CH1區為人類IgG1 CH1區，其中第一含CH1免疫球蛋白多肽包含選自在CH1區內之胺基酸之胺基酸之一或多個變體，該等變體選自由以下組成之群：K147E及Q175E；N201D及K213Q；T197D及K213Q；N159D及K213Q；以及K213Q，且其中第二含CH1免疫球蛋白多肽包含選自在CH1區內之胺基酸之胺基酸之一或多個變體，該等變體選自由以下組成之群：T120K；N201K；D148K及Q175K；以及N159K、在鉸鏈殘基E216K處之胺基酸之變體。最佳地，該所產生之蛋白質為雙特異性人類抗體或多特異性人類抗體。

【0157】據稱進一步稱作包含中性胺基酸變帶負電胺基酸、帶正電胺基酸變中性胺基酸及/或帶正電胺基酸變帶負電胺基酸之變體之CH區之CH1區、CH2區或CH3區為具有相對於原始CH區而言，較佳地相較於人類野生型CH區而言之負電荷差異之CH區。變體向CH區提供在相關pH下之負電荷差異。據稱具有中性胺基酸變帶正電胺基酸、帶負電胺基酸變中性胺基酸及/或帶負電胺基酸變帶正電胺基酸之變體之CH區為具有相對於原始CH區而言，較佳地相較於人類野生

型CH區而言之正電荷差異之CH區。若CH區具有如本文所描述之胺基酸殘基之二個變體，則較佳地，二個變體均以同樣的方式向CH區提供相同電荷差異。若CH區具有如本文所描述之胺基酸殘基之三個或更多個變體，則較佳地，變體之淨結果向CH區提供電荷差異。免疫球蛋白區較佳為人類免疫球蛋白區。在一些實施例中，免疫球蛋白區為IgG區，較佳地IgG1區。上文所揭露之免疫球蛋白區可有利地用作需要與抗體之混合物分離之抗體之一部分。

【0158】本發明進一步提供包含有包含如本文所描述之免疫球蛋白CH區之重鏈及輕鏈之抗體。舉例而言，當此類抗體作為混合物之一部分而產生時，向CH區提供之電荷變化可促進該抗體與該混合物之分離。在一較佳實施例中，抗體包含不同重鏈。在一較佳實施例中，抗體為諸如雙特異性抗體或三特異性抗體之多特異性抗體。在此情況下，向CH區提供之電荷變化可促進該雙特異性抗體或三特異性抗體與該混合物之分離。不同重鏈較佳包含可相容異源二聚化區，較佳地可相容異源二聚化CH3區。在一個實施例中，重鏈中之一者包含CH3變體L351D及L368E，且該等重鏈中之另一者包含CH3變體T366K及L351K。抗體較佳為IgG抗體，較佳地IgG1抗體。在一些實施例中，抗體包含二個或更多個如本文所描述之免疫球蛋白CH區。較佳地，包含CH3變體L351D及L368E之重鏈包含如本文所描述之一個CH區，且包含CH3變體T366K及L351K之重鏈包含如本文所描述之另一CH區。在該等情況下，較佳地，一個CH區及另一CH區包含具有不同電荷之CH區。在該等情況下，混合物中所得抗體之等電點差異應被進一步間隔，由此促進該抗體與該混合物之分離。換言之，若一個CH區為具有相對於原始CH區而言之負電荷差異之CH區，則另一CH區較佳為具有相對於原始CH區而言之正電荷差異之CH區。類似地，若一個CH區為具有相對於原始CH區而言之正電荷差異之CH區，則另一CH區較佳為具有相對於原始CH區而言之負電荷差異之CH區。CH3變體L351D及L368E以及CH3變體T366K及L351K較佳匹

配CH變體之電荷差異。變體L351D及L368E較佳處於包含具有相對於原始CH區或原始或天然CH區中之比較殘基而言之負電荷差異之CH區的重鏈中。變體T366K及L351K較佳處於包含具有相對於原始CH區或原始或天然CH區中之比較殘基而言之正電荷差異之CH區的重鏈中。舉例而言，包含CH3變體L351D及L368E之多肽可與以下變體中之一或多者組合：K147E、N159D、Q175E、N201D、K213Q、V303E、K370S、K370T或增加如本文所闡述之多肽之負電荷之其他變體。類似地，包含CH3變體T366K及L351K之多肽可與以下變體中之一或多者組合：T120K、D148K、N159K、Q175K、N201K、V303K、E382Q、E382T、E388L、E388M、E388T或增加如本文所闡述之多肽之正電荷之其他變體。

【0159】具有可相容異源二聚化區(諸如具有該等CH1區之如本文所描述之可相容CH3異源二聚化區)之抗體通常在利用抗體或其片段之電荷及/或等電點(pI)之分離步驟中更好地與具有相同重鏈之各別抗體及/或半抗體(若存在)分離。抗體較佳包含一或多個輕鏈。其較佳包含同一輕鏈。輕鏈較佳為如本文所描述之共同抗體輕鏈。共同輕鏈較佳包含如圖13B或圖13D中所描繪之輕鏈可變區。在一個實施例中，輕鏈具有如圖13C中所描繪之輕鏈恆定區。在一較佳實施例中，輕鏈具有圖13A或圖13E中所描繪之輕鏈之胺基酸序列。共同輕鏈較佳為具有如圖13F中所描繪之CDR之輕鏈。抗體或CH區較佳為人類抗體或人類免疫球蛋白CH區，其中人類CH區包含在野生型人類CH區內未經表面暴露且較佳地內埋式之一或多個胺基酸位置處之變體。

【0160】包含如本文所描述之未經表面暴露且較佳地內埋式之胺基酸之變體之免疫球蛋白區，較佳地CH1區或抗體較佳具有選自不存在於CH1/CL界面處之胺基酸的變體。Q175位置係處於CH1/CL界面中，但仍例外地有效且穩定。

【0161】包含如本文所描述之未經表面暴露且較佳地內埋式之胺基酸之變體之免疫球蛋白區，較佳地CH3區或抗體較佳具有選自不存在於CH3界面處之胺

基酸的變體。K370位置除外。其處於CH3/CH3中(參見圖22)。儘管如此，其為用於引入如本文所指示之變體之良好位置，即使在補償變體不為諸如DEKK中所存在之相對CH3鏈之情況下亦如此。

【0162】包含如本文所描述之未經表面暴露之胺基酸之變體之免疫球蛋白區，較佳地CH1區、CH2區或CH3區或抗體較佳並不會實質上不利地影響包括任何重鏈及輕鏈界面之所得CH1區或抗體的穩定性。包含如本文所描述之未經表面暴露之胺基酸之變體的免疫球蛋白區(較佳地CH1區、CH2區或CH3區)或抗體可包括支持產生電荷差異之一或多個變體之穩定性的一或多個額外變體。包含如本文所描述之未經表面暴露之胺基酸之變體之免疫球蛋白區，較佳地CH1區或抗體可包括產生電荷差異的一或多個額外變體。

【0163】本發明進一步提供產生以上段落中任一段之抗體之方法，其中該方法包含以下步驟：

提供編碼具有如本文所描述之CH區之第一重鏈之核酸；

提供編碼第二重鏈之核酸，其中該第一重鏈及該第二重鏈可相同或不同；

提供編碼輕鏈之核酸；

將該核酸引入宿主細胞中且培養該等宿主細胞以表現該或該等核酸；以及

自宿主細胞培養物收集該抗體，該方法進一步包含在基於其他抗體及/或抗體片段之電荷之分離步驟中將該抗體與該等其他抗體或抗體片段分離。在一個實施例中，該第一重鏈及該第二重鏈包含可相容異源二聚化區，較佳地可相容CH3異源二聚化區。

【0164】本發明進一步提供產生以上段落中任一段之抗體之方法，其中該方法包含以下步驟：

提供編碼具有如本文所描述之CH區之第一重鏈之核酸；

提供編碼第二重鏈之核酸，其中該第一重鏈及該第二重鏈可相同或不同；

提供編碼輕鏈之核酸；

將該核酸引入宿主細胞中且培養該等宿主細胞以表現該或該等核酸；以及

自宿主細胞培養物收集該抗體，該方法進一步包含執行收穫物澄清，

執行蛋白質捕獲，

執行陰離子交換層析，以及

執行陽離子交換層析以將該抗體與其他抗體或抗體片段分離。在一個實施例中，該第一重鏈及該第二重鏈包含可相容異源二聚化區，較佳地可相容CH3異源二聚化區。

【0165】本發明進一步提供產生以上段落中任一段之抗體之方法，其中該方法包含以下步驟：

提供編碼具有如本文所描述之CH區之第一重鏈之核酸；

提供編碼第二重鏈之核酸，其中該第一重鏈及該第二重鏈可相同或不同；

提供編碼輕鏈之核酸；

將該核酸引入宿主細胞中且培養該等宿主細胞以表現該或該等核酸；以及

自宿主細胞培養物收集該抗體，該方法進一步包含在包含於凝膠上之等電聚焦之分離步驟中將該抗體與其他抗體或抗體片段分離。

【0166】進一步提供用於產生多特異性抗體之方法，該多特異性抗體包含等電點不同之第一重鏈及第二重鏈，其中該方法包含以下步驟：

(a) 表現編碼第一重鏈之核酸及編碼第二重鏈之核酸，以使得經編碼第一重鏈之等電點與經編碼第二重鏈之等電點不同，其中該核酸編碼在選自包含第一重鏈及/或第二重鏈之經編碼免疫球蛋白區之未經表面暴露之位置的一或多個胺基酸位置處的一或多個變體(較佳地CH1區、CH2區、CH3區，更佳地T120、K147、D148、Y149、V154、N159、A172、Q175、S190、N201、K213、V303、K370、E382以及E388 (在CH區中EU編號)，以及

(b) 培養宿主細胞以表現該核酸；以及

(c) 使用等電點差異自宿主細胞培養物收集該多特異性抗體。

【0167】 亦提供用於分離多特異性抗體之方法，該多特異性抗體包含等電點不同之第一重鏈及第二重鏈，其中該方法包含以下步驟：

(a) 表現編碼第一重鏈之胺基酸殘基之核酸及編碼第二重鏈之胺基酸殘基之核酸中之二者或任一者，以使得經編碼第一重鏈之等電點與經編碼第二重鏈之等電點不同，其中該核酸之一或多個位置為不同於一或多個未經表面暴露之殘基處之經編碼CH區之一或多個位置，較佳地一或多個胺基酸變體選自T120、K147、D148、Y149、V154、N159、A172、Q175、S190、N201、K213、V303、K370、E382以及E388 (在CH區中EU編號)，以及

(b) 培養宿主細胞以表現該核酸；以及

(c) 藉由層析法將該多特異性抗體與宿主細胞培養物分離。

【0168】 在一較佳實施例中，核酸編碼第一重鏈及第二重鏈，以使得第一重鏈、第一重鏈之同源多聚體、第二重鏈、第二重鏈之同源多聚體以及第一重鏈及第二重鏈之異源多聚體在經表現且於離子交換層析步驟中經分離時的滯留時間不同。

【0169】 在由該核酸編碼之一或多個位置處之一或多個變異胺基酸較佳選自在人類野生型CH區中未經表面暴露之胺基酸且選自

- 中性胺基酸變帶負電胺基酸；
- 帶正電胺基酸變中性胺基酸；
- 帶正電胺基酸變帶負電胺基酸；
- 中性胺基酸變帶正電胺基酸；
- 帶負電胺基酸變中性胺基酸；以及
- 帶負電胺基酸變帶正電胺基酸。

【0170】亦提供用於產生多特異性抗體之方法，該多特異性抗體包含等電點不同之第一重鏈及第二重鏈，其中該方法包含以下步驟：

提供編碼第一重鏈之CH區之核酸及編碼第二重鏈之CH區之核酸，以使得第一經編碼重鏈之等電點與第二經編碼重鏈之等電點不同，其中該等CH區中之至少一者包含在選自T120、K147、D148、Y149、V154、N159、A172、Q175、S190、N201、K213、V303、K370、E382以及E388 (EU編號)之位置處CH區中之胺基酸變體，以及

培養宿主細胞以表現該核酸；以及

使用等電點差異自宿主細胞培養物收集該多特異性抗體，此舉進一步包含以下步驟：

自該宿主細胞培養物收集該抗體，

執行收穫物澄清，

執行蛋白質捕獲，

執行陰離子交換層析，以及

執行陽離子交換層析以將該抗體與另一抗體或抗體片段分離。

【0171】進一步提供用於純化多特異性抗體之方法，該多特異性抗體包含等電點不同之第一重鏈及第二重鏈，其中該方法包含以下步驟：

提供編碼第一重鏈之CH區之核酸及編碼第二重鏈之CH區之核酸中之二者或任一者，以使得第一經編碼重鏈與第二經編碼重鏈之等電點不同，其中該等CH區中之至少一者包含在選自T120、K147、D148、Y149、V154、N159、A172、Q175、S190、N201、K213、V303、K370、E382以及E388 3 (CH區之EU編號)之位置處之胺基酸變體，以及

培養宿主細胞以表現該核酸；以及

藉由進行等電聚焦自宿主細胞培養物純化該多特異性抗體且將該多特異性

抗體與另外抗體或抗體片段分離。

【0172】編碼第一重鏈之同源多聚體之一或多個核酸、編碼第二重鏈之同源多聚體之一或多個核酸以及編碼第一重鏈及第二重鏈之異源多聚體之一或多個核酸表現為具有不同等電點之蛋白質且在離子交換層析中產生不同滯留時間。

【0173】本發明進一步提供用於產生或純化諸如如所描述之多特異性抗體之抗體之方法，其中該方法進一步包含測定重鏈相對於彼此之電荷或pI差異且選擇如該第一重鏈一樣具有更加負之電荷/pI之重鏈及如該第二重鏈一樣具有更加正之電荷/pI之重鏈。此實施例另外在諸如CIEX之電荷分離方法中促進多特異性抗體與同源二聚體及半抗體之分離。如本文在上文所指示，該第一重鏈較佳包含一或多個如本文所描述之向重鏈提供額外負電荷之CH1區、CH2區或CH3區。類似地，如本文在上文所指示，該第二重鏈較佳包含一或多個如本文所描述之向重鏈提供額外正電荷之CH1區、CH2區或CH3區。另外且如本文在上文亦提及，第一重鏈較佳包含CH3異源二聚化區域之DE變體，而該第二重鏈較佳包含CH3異源二聚化區域之KK變體。

【0174】在此等實施例中，重鏈、本文所描述之CH1區、CH2區及/或CH3區之胺基酸變體之間之天然電荷差異及任擇之由如本文所描述之DEKK CH3異源二聚化區域引入之電荷差異全部一起起作用以改善諸如本文所描述之雙特異性抗體及多特異性抗體之抗體的電荷分離。

【0175】可能引起二個重鏈之相對電荷差異之因素為可變區域之胺基酸序列差異。舉例而言，當同一輕鏈用於二個重鏈可變區時，該因素為重鏈可變區之胺基酸序列差異。在該等情況下，視具體情況而定測定可變區域或重鏈可變區相對於彼此之電荷或pI差異常常足矣。

【0176】可使用可變區域之電荷或pI差異以改善如上文所指示之產生及/或

純化。在一些實施例中，可變區域具有不同重鏈及相同輕鏈。因此可使用之輕鏈之實例描述於本文其他地方且一些輕鏈例如列舉於圖13中。在此類方法中可使用之重鏈可變區通常經選擇以與所選輕鏈良好配對。經選擇以與圖13a之輕鏈良好配對之重鏈可變區描述於實例中。該等重鏈可變區之其他實例描述於WO2015/130172、PCT/NL2020/050081、WO2019/031965、WO2019/009726、WO2019/009728以及WO2019/009727中，該等案出於此目的以引用之方式附於本文中。如本文所提及且上文參考文獻中所描述之重鏈可變區將視為重鏈之合適實例且不視為限制性清單。本發明可應用於各種可變區域及/或重鏈輕鏈組合。該等可變區域及/或重鏈輕鏈組合之一些實例描繪於圖1及2以及其描述中。重鏈及輕鏈組合之其他實例例如描述於WO2019190327中，該案出於彼目的以引用之方式在本文中提及。

【圖式簡單說明】

**【0177】 圖1A-1E.** 根據本發明之分離區域提供雙特異性抗體及單特異性抗體之示意性圖示。應注意，本發明之其他特點及態樣自詳細描述結合例如例示本發明實施例之特點之隨附圖式顯而易知。所提供之圖式中之各者為例示性的且不意欲使此等圖式限制本發明之範疇，該本發明之範疇由描述且能夠實現本發明之申請專利範圍及全範圍詳細揭露內容界定。在圖1A)-C)中，第一含CH1免疫球蛋白以黑色描繪，代表第一重鏈，且第二含CH1免疫球蛋白以灰色描繪，代表第二重鏈，且在輕鏈為共同輕鏈之情境下，輕鏈以白色描繪。在此等圖式中，第一重鏈包含分離CH1區(圖1A)，第二重鏈包含分離CH1區(圖1B)，且第一重鏈及第二重鏈二者均包含具有替代電荷之分離CH1區(圖1C)。此外，應理解，本發明不需要使用作為本發明實施例之實例而描繪之共同輕鏈。在圖1D中，第一含CH2免疫球蛋白以黑色描繪，代表第一重鏈，且第二含CH2免疫球蛋白以灰色描繪，代表第二重鏈，且輕鏈以白色描繪，其中第二重鏈包含分離CH2區域。

在圖1E中，單個重鏈被使用且以黑色描繪，且二個不同輕鏈以灰色及白色描繪。變化係由指示相較於未經修飾區域或參考區域而言之相對電荷變化之+或-以及用於未經修飾抗體或參考抗體之各別+及-符號之集成指示。在圖1A)-C)中CH1區包含本文所描述之本發明之分離殘基，在圖1D中輕鏈之CH2區且在圖1E中輕鏈之CL區為本發明所闡述之變異輕鏈。

A)在此情境下，第一重鏈具備一個正電荷(在CH1區中由+指示)，此引起二個單特異性抗體具有++電荷或中性電荷，其中雙特異性抗體具有+電荷。如所指示之電荷表示相較於缺乏分離區域之抗體而言之電荷變化。B)在此情境下，第二重鏈具備二個負電荷(在CH1區中由--指示)，此引起二個單特異性抗體具有----電荷或中性電荷，其中雙特異性抗體具有--電荷。C)在此情境下，第一重鏈具備一個正電荷(在CH1區中由+指示)，第二重鏈具備一個負電荷(在CH1區中由-指示)，此引起二個單特異性抗體具有--電荷或++電荷，其中雙特異性抗體具有中性電荷。D)在此情境下，第一重鏈缺乏分離區域，且第二重鏈包含具有-2電荷變化之負分離CH2區域。此引起二個單特異性抗體具有中性電荷或----電荷，而雙特異性抗體具有--電荷。E)在此情境下，採用二個CL區域，一個CL區域包含正CL分離區域且一個不包含分離區域，缺乏變體。此處所描繪之格式利用共同重鏈格式。此引起單特異性抗體具有++電荷或中性電荷，而雙特異性抗體具有+電荷。

【0178】 **圖2A-2B**. 根據本發明提供單特異性抗體、三特異性或三價抗體以及四特異性或四價抗體之示意性圖示。在圖A)及B)中，第一含CH1免疫球蛋白以黑色描繪，代表第一重鏈，經由連接子另外具有第二CH1-VH區域(黑色條紋狀)。第二重鏈以灰色描繪。共同輕鏈以白色描繪。此外，應理解，本發明不需要使用作為本發明實施例之實例而描繪之共同輕鏈。變化由指示相較於未經修飾鏈或未經修飾抗體而言之相對電荷變化之+或-指示。在圖2A)中，輕鏈之CL

區為分離區域，且在2B)中，第一重鏈之CH1區為分離區域。在圖2A)中，在此情境下，形成具有----電荷之四特異性或四價抗體及具有--電荷之單特異性抗體，而形成具有---電荷之三特異性抗體。在圖2B)中，形成具有--------電荷之四特異性或四價抗體及具有中性電荷之單特異性抗體，而形成具有----電荷之三特異性或三價抗體。

【0179】 **圖3**. 提供闡述與該具有野生型CH1之抗體及包含變異CH1區之抗體相關聯之二個峰之單特異性抗體的熔化曲線。

【0180】 **圖4**. 提供所產生之具有CH1變體之二價單特異性抗體之等電聚焦，展現基於電荷之帶分離。此等資料展示在等電聚焦期間分離區域增加或減少電荷及對應容量與帶狀分離包含此等區域之抗體之間之相關性。

【0181】 **圖5.** DE臂、KK臂及DE與KK臂之CIEX層析。上圖展示使用具有野生型CH1序列及重鏈可變區之DE臂產生之單特異性二價抗體(MF1516)之層析圖。下圖展示使用具有野生型CH1序列及不同重鏈可變區之KK臂產生之單特異性二價抗體(MF3462)之層析圖。中間圖展示使用上文所提及之具有野生型CH1序列之KK臂及上文所提及之具有野生型CH1序列之DE臂產生之雙特異性抗體的層析圖。在上圖中，箭頭指示所產生之二價單特異性抗體(DE/DE)，且在下圖中，箭頭指示所產生之單價單特異性「半抗體」(KK)。各抗體之輕鏈相同。

【0182】 **圖6**. 具有分離CH1區之DE臂、KK臂及DE與KK臂之CIEX層析。上圖展示使用具有有T197D變體及K213Q變體之CH1序列及重鏈可變區之DE臂產生之單特異性二價抗體(MF1516)的層析圖。下圖展示使用具有有N159K變體及鉸鏈殘基E216K變體之CH1序列及重鏈可變區之KK臂產生之單特異性二價抗體(MF3462)的層析圖。中間圖展示使用組合KK臂及DE臂產生之雙特異性抗體(MF1516/MF3462)之層析圖及二價DE、T197D、K213Q/KK、N159K、E216K與所形成之其他蛋白質之峰分離。各抗體之輕鏈相同。

【0183】 **圖7.** 雙特異性抗體分離-CIEX滯留時間

具有野生型CH1之DE臂及具有分離CH1區之KK臂之CIEX層析。上圖展示使用具有野生型CH1序列之DE與KK臂產生之抗體之層析圖。第二圖展示使用具有有T120K之CH1序列之KK臂及具有野生型CH1區之DE臂產生之抗體的層析圖。第三圖展示使用具有有N201K之CH1序列之KK臂及具有野生型CH1區之DE臂產生之抗體的層析圖。底部圖展示使用具有有N159K及鉸鏈殘基E216K之CH1序列之KK臂及具有野生型CH1區之DE臂產生之抗體的層析圖。白色箭頭指示所產生之二價單特異性抗體(DE/DE)。黑色箭頭指示所產生之二價雙特異性抗體(DE/KK)。灰色箭頭指示所產生之二價單特異性抗體(KK/KK)。各抗體之輕鏈相同。

【0184】 **圖8.** 雙特異性抗體分離-CIEX滯留時間

具有分離CH1區之DE臂及具有野生型CH1之KK臂之CIEX層析。上圖展示使用具有野生型CH1序列之DE與KK臂產生之抗體之層析圖。中間圖展示使用具有有T197D及K213Q之CH1序列之DE臂及具有野生型CH1區之KK臂產生之抗體的層析圖。底部圖展示使用具有有K213Q之CH1序列之DE臂及具有野生型CH1區之KK臂產生之抗體的層析圖。白色箭頭指示所產生之二價單特異性抗體(DE/DE)。黑色箭頭指示所產生之二價雙特異性抗體(DE/KK)。灰色箭頭指示所產生之二價單特異性抗體(KK/KK)。各抗體之輕鏈相同。

【0185】 **圖9.** 雙特異性抗體分離-CIEX滯留時間

具有野生型或分離CH1區之DE臂及KK臂之CIEX層析。上圖展示使用具有野生型CH1序列之DE與KK臂產生之抗體之層析圖。第二圖展示使用具有有T120K之CH1序列之KK臂及具有有T197D及K213Q之CH1序列之DE臂產生之抗體的層析圖。第三圖展示使用具有有N201K之CH1序列之KK臂及具有有T197D及K213Q之CH1序列之DE臂產生之抗體的層析圖。底部圖展示使用具有有

N159K及鉸鏈殘基E216K之CH1序列之KK臂及具有有T197D及K213Q之CH1序列之DE臂產生之抗體的層析圖。白色箭頭指示所產生之二價單特異性抗體(DE/DE)。黑色箭頭指示所產生之二價雙特異性抗體(DE/KK)。灰色箭頭指示所產生之二價單特異性抗體(KK/KK)。各抗體之輕鏈相同。

【0186】 **圖10**. 雙特異性抗體分離-CIEX滯留時間

具有野生型或分離CH1區之DE臂及KK臂之CIEX層析。上圖展示使用具有野生型CH1序列之DE與KK臂產生之抗體之層析圖。第二圖展示使用具有有T120K之CH1序列之KK臂及具有有K213Q之CH1序列之DE臂產生之抗體的層析圖。第三圖展示使用具有有N201K之CH1序列之KK臂及具有有K213Q之CH1序列之DE臂產生之抗體的層析圖。底部圖展示使用具有有N159K及鉸鏈殘基E216K之CH1序列之KK臂及具有有K213Q之CH1序列之DE臂產生之抗體的層析圖。白色箭頭指示所產生之二價單特異性抗體(DE/DE)。黑色箭頭指示所產生之二價雙特異性抗體(DE/KK)。灰色箭頭指示所產生之二價單特異性抗體(KK/KK)。各抗體之輕鏈相同。

【0187】 **圖11(1-5)-11(5-5)**.-單特異性二價抗體(MF1122/MF1122)之CIEX滯留時間。

具有CH1區中之變體之單特異性抗體之CIEX層析。分別測試各變異體，且圖式展示相較於包含二個人類野生型CH1區之單特異性二價抗體而言展現不同滯留時間之各變異體的CIEX滯留時間。

【0188】 **圖12**. 用於選殖之構築體之結構

用以製備表現具有分離CH1區之抗體之構築體的用於選殖之構築體。CH2區域及CH3區域係自MV1708構築體獲得。此構築體含有在CH2之N端處之獨特BspEI位點。重鏈可變區域(VH)係自MF1122構築體獲得。將CH1區選殖至藉由BstEII及BstEI限制位點側接之最終構築體中。

【0189】 **圖13A-13P**

A) 共同輕鏈之胺基酸序列；

B) 共同輕鏈可變區域(IGKV1-39/jk1)之DNA及胺基酸序列；

C) 共同輕鏈恆定區之DNA及胺基酸序列；

D) 共同輕鏈可變區域IGKV1-39/jk5之胺基酸序列；

E) V區IGKV1-39A之胺基酸序列；

F) 共同輕鏈之CDR1、CDR2及CDR3；

G) 人類共同輕鏈IGKV3-15/jk1之胺基酸序列；

H) 人類共同輕鏈IGKV3-20/jk1之胺基酸序列；

I) 人類共同輕鏈IGLV3-21/jl3之胺基酸序列；

J) V區IGKV3-15之胺基酸序列；

K) V區IGKV3-20之胺基酸序列；

L) 人類共同輕鏈IGKV1-39/jk5及κ恆定區之胺基酸序列；

M) 人類共同輕鏈IGKV3-15/jk1及κ恆定區之胺基酸序列；

N) 人類共同輕鏈IGKV3-20/jk1及κ恆定區之胺基酸序列；

O) 人類共同輕鏈IgVλ 3-21/IGJλ 3及λ 恆定區之胺基酸序列；

P) V區IGLV3-21之胺基酸序列。

【0190】 **圖14A-14E**. 用於生成雙特異性分子之IgG重鏈。A) CH1區。B)鉸鏈區。C) CH2區。D)含有變體L351K及T366K (KK)之CH3區域。E)含有變體L351D及L368E (DE)之CH3區域。

【0191】 **圖15**. 以暗灰色描繪根據EU編號之84位置201且以尖銳線箭頭展現其內埋式位置及蛋白質核內溶劑可接近性缺乏之人類野生型CH1區的三維模型。

【0192】 **圖16**. ELISA結果。具有指定CH1變異體之血纖維蛋白原或PD-L1

特異性IgG1抗體與血纖維蛋白原及PD-L1之結合。PG1122為具有二個一致重鏈及輕鏈之單特異性二價血纖維蛋白原結合抗體。二個可變區域具有有MF1122及圖13a之輕鏈之胺基酸序列的重鏈可變區。編號p113、p118等指示抗體之CH1區具有何種胺基酸變異體。此資訊提供於表16中。PG PD-L1為具有二個一致PD-L1結合可變區域之單特異性二價抗體。編號p06-p13指示抗體之CH1區具有何種胺基酸變異體。此資訊提供於表16中。

【0193】 **圖17**. 具有IgG1 CH1區、鉸鏈區、CH2區及CH3區之各別胺基酸之EU編號的IMGT表。出於編號胺基酸殘基位置之目的而包括在內。

【0194】 **圖18**. 雙特異性抗體及圖19之指定單特異性抗體之ELISA結果概述。全部所測試雙特異性抗體均以劑量依賴型方式結合c-MET及破傷風類毒素(Tetanus Toxoid)。

【0195】 **圖19**. 所測試抗體之特徵概述。每一列列舉一個抗體。PB指示具有二個不同可變區域之抗體，PG指示具有二個一致可變區域之抗體。PB後隨編號標識二個可變區域組合，在指示後隨有編號之MG之情況下標識該二個可變區域組合之重鏈可變區。下一欄中之MG1516…及MG3462…指示一個可變區域具有MF1516 VH且另一可變區域具有MF3462 VH。輕鏈區為圖13A之輕鏈。NA為不適用。不提及NA之MG1欄指示此抗體具有有DE CH3區域之重鏈。不提及NA之MG2欄指示此抗體具有有KK CH3區域之重鏈。WT IgG1指示此等抗體具有全部野生型IgG1恆定區、圖13a之輕鏈及MF1516或MF3462重鏈可變區。DEDE指示此等抗體僅具有有DE CH3區域之重鏈。KK指示此等抗體僅具有有KK CH3區域之重鏈。

【0196】 **圖20**. 雙特異性抗體及單特異性抗體之CIEX概況。各別抗體之碼在各別組之上方或下方指示。左箭頭指示DEDE同源二聚體。右箭頭指示KK-半抗體。抗體碼在圖19及表24中被解碼。

【0197】 **圖21.** 雙特異性抗體及單特異性抗體之CIEX概況。各別抗體之碼在各別組之上方或下方指示。左箭頭指示DEDE同源二聚體。右箭頭指示KK-半抗體。抗體碼在圖19及表24中被解碼。

【0198】 **圖22**. 根據Traxlmayer等人(2012). J Mol Biol. 10月26日; 423(3): 397-412. (參見論述及圖3)，被識別為在CH3/CH3同源二聚體之界面處之CH3殘基。

【實施方式】

較佳實施例之詳細說明

**實例1：識別未經表面之殘基以進行分離設計**

【0199】 根據具有VL區域之IgG1 CH1序列之結構資訊，藉由使用用預設參數之程式GETAREA 1.0識別在CH1區內經表面暴露之胺基酸殘基位置、未經表面暴露之胺基酸殘基位置及內埋式胺基酸殘基位置。Negi等人，「Solvent Accessible Surface Areas, Atomic Solvation Energies, and Their Gradients for Macromolecules」，最後一次修正時間為2015年4月17日星期三3:00 PM。將具有表1及圖13C之序列之CH1-CL區域之模型提交至Swiss-model網站(Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. Bioinformatics. 2006年1月15日;22(2):195-201)。藉由與PDB結構6C6X.pdb (自經疫苗接種之恆河獼猴分離之中東呼吸道症候群冠狀病毒中和抗體JC57-14之1.99 Å晶體結構)比對來獲得高品質同源性模型(具有在CH1區全長上之大於95%一致性)。許多其他PDB中之CH1區可能提供高品質起始結構(與此處所用之CH1區具有> 95%序列一致性及高品質結構)。用GETAREA 1.0 β加工此結構，上傳所生成之pdb檔案以測定所預測之可接近溶劑之各殘基表面積百分比。

【0200】 基於GETAREA 1.0 β之預設參數，經大於50%表面暴露之胺基酸

稱作「向外」或表面，未向外或未經表面暴露之殘基介於50%與大於20%之間，且小於20%可接近處被GETAREA 1.0 β提及為「向內」或如本文所提及為內埋式胺基酸(參見表1)。

表1a：

探針半徑 : 1.600

| 殘基 | | 總計 | 無極 | 骨架 | 側鏈 | 比率(%) | 向內/向外 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ALA | 1 | 96.46 | 36.86 | 86.27 | 10.19 | 15.7 | i |
| SER | 2 | 100.14 | 63.90 | 14.57 | 85.57 | 100.0 | o |
| THR | 3 | 71.48 | 25.80 | 20.58 | 50.90 | 47.9 | |
| LYS | 4 | 88.08 | 83.61 | 4.27 | 83.82 | 51.0 | o |
| GLY | 5 | 15.60 | 8.43 | 15.60 | 0.00 | 17.9 | i |
| PRO | 6 | 8.38 | 0.00 | 8.38 | 0.00 | 0.0 | i |
| SER | 7 | 44.54 | 23.43 | 10.17 | 34.38 | 44.4 | |
| VAL | 8 | 3.70 | 0.00 | 3.70 | 0.00 | 0.0 | i |
| PHE | 9 | 101.92 | 101.92 | 0.00 | 101.92 | 56.6 | o |
| PRO | 10 | 63.90 | 49.02 | 14.88 | 49.02 | 46.6 | |
| LEU | 11 | 72.30 | 72.23 | 6.15 | 66.15 | 45.2 | |
| ALA | 12 | 61.03 | 43.83 | 17.20 | 43.83 | 67.5 | o |
| PRO | 13 | 14.19 | 2.80 | 11.39 | 2.80 | 2.7 | i |
| SER | 14 | 66.46 | 53.17 | 14.10 | 52.36 | 67.6 | o |
| SER | 15 | 129.87 | 74.67 | 44.68 | 85.18 | 100.0 | o |
| LYS | 16 | 199.56 | 132.92 | 29.10 | 170.46 | 100.0 | o |
| SER | 17 | 26.37 | 12.21 | 21.94 | 4.43 | 5.7 | i |
| THR | 18 | 98.88 | 65.82 | 8.23 | 90.65 | 85.4 | o |
| SER | 19 | 118.70 | 62.69 | 24.19 | 94.51 | 100.0 | o |
| GLY | 20 | 75.24 | 38.21 | 75.24 | 0.00 | 86.3 | o |
| GLY | 21 | 23.73 | 22.10 | 23.73 | 0.00 | 27.2 | |
| THR | 22 | 90.44 | 44.60 | 16.22 | 74.22 | 69.9 | o |
| ALA | 23 | 2.96 | 2.96 | 2.96 | 0.00 | 0.0 | i |
| ALA | 24 | 55.34 | 49.03 | 6.31 | 49.03 | 75.5 | o |
| LEU | 25 | 2.47 | 2.47 | 2.47 | 0.00 | 0.0 | i |
| GLY | 26 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.0 | i |
| CYS | 27 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.0 | i |
| LEU | 28 | 50.30 | 50.30 | 0.00 | 50.30 | 34.4 | |
| VAL | 29 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.0 | i |
| LYS | 30 | 72.65 | 54.33 | 0.00 | 72.65 | 44.2 | |
| ASP | 31 | 27.99 | 2.43 | 0.00 | 27.99 | 24.8 | |
| TYR | 32 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.0 | i |
| PHE | 33 | 54.61 | 54.61 | 0.00 | 54.61 | 30.3 | |
| PRO | 34 | 44.56 | 44.56 | 0.00 | 44.56 | 42.4 | |
| GLU | 35 | 75.13 | 35.01 | 10.96 | 64.17 | 45.4 | |
| PRO | 36 | 91.37 | 90.40 | 0.98 | 90.40 | 85.9 | o |
| VAL | 37 | 12.46 | 0.09 | 12.38 | 0.08 | 0.1 | i |
| THR | 38 | 81.50 | 74.42 | 3.81 | 77.69 | 73.2 | o |
| VAL | 39 | 19.62 | 0.07 | 19.62 | 0.00 | 0.0 | i |
| SER | 40 | 43.68 | 37.75 | 4.85 | 38.83 | 50.2 | o |
| TRP | 41 | 0.05 | 0.05 | 0.00 | 0.05 | 0.0 | i |
| ASN | 42 | 26.68 | 16.57 | 11.74 | 14.94 | 13.1 | i |
| SER | 43 | 101.97 | 52.17 | 29.16 | 72.81 | 94.1 | o |
| GLY | 44 | 40.36 | 25.94 | 40.36 | 0.00 | 46.3 | |
| ALA | 45 | 92.86 | 67.14 | 40.49 | 52.36 | 80.7 | o |
| LEU | 46 | 36.55 | 34.54 | 2.63 | 33.92 | 23.2 | |
| THR | 47 | 101.76 | 68.88 | 15.06 | 86.70 | 81.6 | o |
| SER | 48 | 99.15 | 64.33 | 14.13 | 85.02 | 100.0 | o |
| GLY | 49 | 34.74 | 27.90 | 34.74 | 0.00 | 39.8 | |
| VAL | 50 | 36.27 | 17.50 | 18.77 | 17.50 | 14.3 | i |
| HIS | 51 | 117.55 | 88.13 | 4.51 | 113.04 | 73.1 | o |
| THR | 52 | 57.30 | 32.86 | 22.85 | 34.46 | 32.4 | |

| Residue | Total | Apolar | Backbone | Sidechain | Ratio(%) | In/Out |
|---|---|---|---|---|---|---|

| 殘基 | | 總計 | 無極 | 骨架 | 側鏈 | 比率(%) | 向內/向外 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| PHE | 53 | 106.87 | 106.72 | 0.99 | 105.88 | 58.8 | o |
| PRO | 54 | 123.36 | 121.33 | 14.74 | 108.62 | 100.0 | o |
| ALA | 55 | 19.73 | 0.64 | 19.10 | 0.63 | 1.0 | i |
| VAL | 56 | 110.89 | 110.89 | 3.68 | 107.21 | 87.7 | o |
| LEU | 57 | 102.18 | 83.44 | 18.74 | 83.44 | 57.1 | o |
| GLN | 58 | 44.42 | 33.86 | 10.63 | 33.79 | 23.5 | |
| SER | 59 | 142.95 | 77.35 | 49.58 | 93.36 | 100.0 | o |
| SER | 60 | 76.55 | 53.42 | 39.24 | 37.31 | 48.2 | |
| GLY | 61 | 24.28 | 24.26 | 24.28 | 0.00 | 27.8 | |
| LEU | 62 | 26.19 | 26.19 | 0.00 | 26.19 | 17.9 | i |
| TYR | 63 | 41.62 | 10.54 | 0.00 | 41.62 | 21.6 | |
| SER | 64 | 12.35 | 9.95 | 0.65 | 11.70 | 15.1 | i |
| LEU | 65 | 14.66 | 14.66 | 8.18 | 6.48 | 4.4 | i |
| SER | 66 | 26.24 | 15.50 | 0.34 | 25.90 | 33.5 | |
| SER | 67 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.0 | i |
| VAL | 68 | 31.44 | 31.44 | 0.00 | 31.44 | 25.7 | |
| VAL | 69 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.0 | i |
| THR | 70 | 62.47 | 34.59 | 9.93 | 52.55 | 49.5 | |
| VAL | 71 | 5.98 | 5.98 | 2.71 | 3.28 | 2.7 | i |
| PRO | 72 | 81.01 | 81.01 | 0.51 | 80.50 | 76.5 | o |
| SER | 73 | 17.25 | 7.69 | 9.56 | 7.69 | 9.9 | i |
| SER | 74 | 81.09 | 63.02 | 20.39 | 60.70 | 78.4 | o |
| SER | 75 | 18.99 | 18.99 | 1.80 | 17.19 | 22.2 | |
| LEU | 76 | 48.87 | 30.22 | 18.85 | 30.02 | 20.5 | |
| GLY | 77 | 82.92 | 48.29 | 82.92 | 0.00 | 95.1 | o |
| THR | 78 | 126.95 | 88.03 | 38.10 | 88.85 | 83.7 | o |
| GLN | 79 | 80.67 | 21.24 | 4.68 | 75.99 | 52.9 | o |
| THR | 80 | 80.15 | 63.59 | 5.79 | 74.37 | 70.0 | o |
| TYR | 81 | 5.72 | 1.57 | 0.39 | 5.33 | 2.8 | i |
| ILE | 82 | 53.28 | 53.28 | 0.00 | 53.28 | 36.2 | |
| CYS | 83 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.0 | i |
| ASN | 84 | 13.67 | 8.31 | 1.67 | 12.00 | 10.5 | i |
| VAL | 85 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.0 | i |
| ASN | 86 | 24.22 | 6.17 | 0.34 | 23.87 | 20.9 | |
| HIS | 87 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.0 | i |
| LYS | 88 | 153.55 | 97.12 | 9.44 | 144.11 | 87.6 | o |
| PRO | 89 | 56.09 | 36.24 | 34.61 | 21.48 | 20.4 | |
| SER | 90 | 33.23 | 14.05 | 24.77 | 8.46 | 10.9 | i |
| ASN | 91 | 143.48 | 40.64 | 29.16 | 114.32 | 100.0 | o |
| THR | 92 | 30.70 | 17.39 | 5.76 | 24.94 | 23.5 | |
| LYS | 93 | 148.72 | 78.74 | 25.22 | 123.51 | 75.1 | o |
| VAL | 94 | 38.30 | 38.30 | 5.13 | 33.17 | 27.1 | |
| ASP | 95 | 82.49 | 24.32 | 21.15 | 61.34 | 54.3 | o |
| LYS | 96 | 77.53 | 28.82 | 0.58 | 76.96 | 46.8 | |
| ARG | 97 | 122.18 | 58.53 | 1.85 | 120.33 | 61.6 | o |
| VAL | 98 | 0.28 | 0.00 | 0.28 | 0.00 | 0.0 | i |
| GLU | 99 | 131.88 | 49.33 | 13.14 | 118.75 | 84.1 | o |

【0201】 CH1序列及模型化資訊。位置由任意編號指示。殘基編號1對應於EU編號118，殘基編號2對應於EU編號119等。向內/向外欄指示胺基酸視為內埋式(i)或經表面暴露的(o)。開放空間指示未經表面暴露且亦非內埋式之胺基酸之值。

【0202】 下文列舉根據EU編號模型化之人類CH1區之胺基酸序列，其中加下劃線且斜體胺基酸代表未經表面暴露之胺基酸位置，且加粗胺基酸進一步代表內埋式胺基酸。

表1b.

118 ***A*** S
120 *T* K ***G*** ***P*** S ***V*** F *P* *L* A
130 ***P*** S S K ***S*** T S G *G* T
140 ***A*** A ***L*** ***G*** ***C*** *L* ***V*** *K* *D* ***Y***
150 *F* *P* *E* P ***V*** T ***V*** S ***W*** ***N***

160 S *G* A *L* T S *G* ***V*** H *T*
170 F P ***A*** V L ***Q*** S *S* *G* ***L***
180 *Y* ***S*** ***L*** *S* ***S*** *V* ***V*** *T* ***V*** P
190 ***S*** S *S* ***L*** G T Q T ***Y*** *I*
200 ***C*** ***N*** ***V*** ***N*** ***H*** K *P* ***S*** N *T*
210 K *V* D *K* R ***V***

【0203】（在設計模式中）使用Rosetta軟體(3.1版https://www.rosettacommons.org/software)以模型化未經表面之殘基之變體，結合電腦模擬穩定性分析，評估在此等位置處之變體之影響及對蛋白質穩定性之影響。Rosetta設計運行引起以下預測：在起始模型中具有< 20% SASA之殘基處之以下變體改善穩定性：A172P、S190A、Y149A、V154I。Rosetta亦預測以下變體改善穩定性：G122P、S157T、I199V、N203I、S207T以及V211I。在作出相對於第一輪經識別之未經表面之殘基之設計變化之後，進行二個額外Rosetta設計：1)其中若未經表面之殘基增加所預測之正電荷，則僅允許其變化(將殘基變成正電荷或移除D或E)，及2)其中若殘基增加所預測之負電荷，則僅允許其變化(自中性變成D或E，或自K及R變成不帶電)。

【0204】發現內埋式殘基N159 (N42)及N201 (N84)承受正電荷(K)及負電荷(D)殘基之變化，同時維持良好穩定性。識別到其他未經表面暴露之殘基，其具有支持電荷變化之潛能且不具有顯著之所預測CH1穩定性減損且包括根據生物資訊分析經預測以改善穩定性之特定變化(其中更加負之數值評分意謂更穩定)。

表2

-632.956之WT穩定性評分

| | | |
|---|---|---|
| 1. | [+1] N84K | [-631.518] |
| 2. | [-1] N84D | [-633.474] |
| 3. | [+1] N84K + A55P, S73A | [-637.087] |
| 4. | [-1] N84D + A55P, S73A | [-634.982] |
| 5. | [+1] N84K + A55P, S73A + V32A, V37I | [-636.455] |
| 6. | [-1] N84D + A55P, S73A + V32A, V37I | [-631.827] |

| | | |
|---|---|---|
| 7. | [+1] T3K | [-636.401] |
| 8. | [-2] T80D, K96Q | [-635.658] |
| 9. | [+1] T3K + G5P, S40T, I82V, N86I, P89A, S90T, V94I | [-659.697] |
| 10. | [-2] T80D, K96Q + G5P, S40T, I82V, N86I, P89A, S90T, V94I | [-655.606] |

| | | |
|---|---|---|
| 11. | [+3] D31K, Q58K | [-625.111] |
| 12. | [+3] N42K, E99K | [-635.678] |
| 13. | [+3] D31K, Q58K + G5P, S40T, I82V, N86I, P89A, S90T, V94I | **[-646.481]** |
| 14. | [+3] N42K, E99K + G5P, S40T, I82V, N86I, P89A, S90T, V94I | **[-650.221]** |

| | | |
|---|---|---|
| 15. | [-2] K96Q, N42D | [-638.840] |
| 16. | [-3] K30E, Q58E | [-626.254] |
| 17. | [-2] K96Q, N42D + G5P, S40T, I82V, N86I, P89A, S90T, V94I | **[-654.776]** |
| 18. | [-3] K30E, Q58E + G5P, S40T, I82V, N86I, P89A, S90T, V94I | **[-647.184]** |

| | | |
|---|---|---|
| 19. | [+7] N84K + D31K, Q58K + N42K, E99K | [-618.189] |
| 20. | [-3] N84D + K96Q, N42D | [-631.459] |
| 21. | [-6] N84D + K96Q, N42D + K30E, Q58E | **[-632.223]** |

| | | |
|---|---|---|
| 22. | [+7] N84K + D31K, Q58K + N42K, E99K + A55P, S73A + V32A, V37I | [-627.807] |
| 23. | [-3] N84D + K96Q, N42D + A55P, S73A + V32A, V37I | [-639.014] |
| 24. | [-6] N84D + K96Q, N42D + K30E, Q58E + A55P, S73A + V32A, V37I | [-632.645] |

**實例1 b：構築體設計**

【0205】使CH1中之未經表面之位置及內埋式位置變化以改變併有此等免疫球蛋白區之多聚化蛋白之電荷。產生總計13個例示性變異CH1區且併入單特異性抗體及多特異性抗體中以與具有野生型CH1區之單特異性抗體及多特異性抗體進行比較。如下製備用於表現包含此等分離CH1區之此等分子之構築體。

【0206】編碼CH2區域及CH3區域之片段係自MV1708構築體獲得。選擇MVl708，此係因為其含有在CH2之N端處之獨特BspEI位點。使用具有於其C端上之BstEII之編碼可變重鏈MF1122之片段。選擇MF1122，此係因為其不呈現任何生產、純化或CIEX問題且具有~13.4 min之在8.64之pI (VH)下之平均CIEX滯留時間。用於選殖之構築體及選殖策略展現於圖12中。

【0207】載體MV1708 (含有CH3中之DE變體)經修飾以含有WT CH3區。使用Sfil及BstEll-HF限制酶將來自MF1122之VH基因插入該載體中。藉由菌落PCR及定序選擇恰當菌落。

【0208】在構築體中，編碼CH1區之序列由限制位點BstEII及BspEI側接。此允許更換CH1編碼序列。產生含有野生型或變異CH1區之質體。下文列舉對各

變異CH1區具有特異性之序列。

【0209】 使用BstEll及BspEI自質體移去CHl編碼序列(363 bp) (2 μg CH1編碼構築體中之各者)。同時，使用BstEll及BspEI限制酶自質體移去所製備之載體(20 μg載體)。將質體與BspEI (0.25 μL酶/μg DNA)一起在緩衝液NEBuffer3.1中在37℃下培育至少1 h，接著將混合物加熱至60℃且添加BstEll。藉由凝膠電泳及凝膠提取純化經消化DNA。消化自骨架(~l0 kb)移除748 bp片段且自含CHl區域及鉸鏈之構築體移除363 bp片段。

【0210】 進行載體與CH1編碼序列之連接，接著轉型成DH5a細胞且塗鋪於含有安比西林(Ampicillin)之LB瓊脂盤上。藉由准許識別恰當CH1及恰當CH2-CH3之菌落PCR及定序來識別恰當構築體。藉由定序確認最終構築體之一致性。

**實例1 c：表現且純化具有CH1變異體之抗體**

【0211】 使用Versylene (無內毒素且無菌)水製造全部所用緩衝液。藉由與0.1 M NaOH一起培育至少16小時來由玻璃製品、Quixstand、Akta-explorer移除內毒素。用無內毒素質體DNA轉染Hek293細胞。轉染後六天，藉由低速離心(10分鐘，1000 g)、接著高速離心(10分鐘，4000 g)收穫含有重組抗體之條件培養基。將100 μl樣品儲存於4℃下。

【0212】 執行MabSelectSureLX (GE healthcare life sciences)純化：將抗體分批結合至2 ml MabSelectSureLX 4小時。藉由離心收穫含有經結合抗體之MabSelectSureLX瓊脂糖凝膠且轉移至重力流管柱中。藉由用PBS、含有1 M NaCl之PBS及PBS洗滌管柱來移除非特異性結合蛋白。使用100 nM檸檬酸鹽pH 3.5溶析經結合抗體，且在含有4 ml 1 M Tris pH 8.0之12 ml套管中收集5 ml溶離份以中和至pH 7。彙集含有蛋白質之溶離份。使用vivaspin20 10 kDa旋轉過濾器將MabSelectSureLX池濃縮至2.0-3.0 ml。藉由離心移除經濃縮池中之聚集物。將經

濃縮樣品儲存於4℃下，之後進行凝膠過濾。

【0213】 凝膠過濾：藉由使用superdex 200 16/600管柱進行凝膠過濾來進一步純化在PBS中經平衡之重組抗體。藉由LabChip (PerkinElmer)分析含有蛋白質之溶離份且彙集含有恰當抗體之溶離份。藉由使用0.22 μm針筒過濾器進行過濾來對池進行滅菌。將產物在4℃下儲存於含有1.8 ml之等分試樣中。藉由LabChip毛細管電泳(PerkinElmer)及LAL分析(內毒素分析)分析產物。

【0214】 在還原及非還原條件下執行LabChip分析。樣品之HP-SEC分析僅展示抗體之一個主峰，該主峰指示樣品不含有聚集物或半抗體。

**實例1d：生成用以產生經CH-1修飾之雙特異性抗體之構築體**

*用KK臂更換重鏈之DE臂*

【0215】 產生編碼重鏈之第二載體。由此載體編碼之重鏈包含KK臂以便區分該重鏈與具有DE臂之重鏈。產生2個不同重鏈允許優先形成雙特異性抗體。如下產生編碼KK重鏈之載體。

【0216】 用編碼抗體之DE臂之片段更換編碼KK臂之片段。使用構築體中之側接限制位點BspEI及AflII且使用如上文所描述之選殖技術交換該等臂。

【0217】 隨後，將DE重鏈與重鏈可變區域VH區MF1516組合，且將KK重鏈與重鏈可變區域VH區MF3462組合。使用限制酶SfiI及BstEII及如上文所描述之選殖技術執行此選殖步驟。藉由定序確認最終構築體之一致性。

【0218】 此選殖程序產生編碼具有不同結合特異性之二個重鏈之載體。當一起經表現時，重鏈優先形成雙特異性抗體。可藉由應用如上文所描述之選殖步驟將CH1變異體插入2個重鏈中之各者中。

**實例2：展現用以基於CH1分離區域中之pI分離殘基分離一致單特異性抗體之容量。**

【0219】 為表現抗體，使用核酸構築體組合。構築體編碼共同輕鏈(圖13a)

及包含靶向血纖維蛋白原之重鏈可變區之重鏈(MF1122) (闡述於下文中)。重鏈進一步包含具有相較於野生型人類CH1而言之負電荷差異或正電荷差異之CH1分離區域。構築體表現優先引起單特異性IgG1人類抗體之形成。使用經重排生殖系人類κ輕鏈IgVκ1-39*01/IGJκ1*01作為共同輕鏈。

表3：輕鏈序列

| cLC序列 | 序列 |
|---|---|
| 共同輕鏈可變區IgVκ1-39*01/IGJκ1*01之胺基酸序列 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQK PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIK |
| 輕鏈恆定區(CL)之胺基酸序列 | RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| IgVκ1-39*01/IGJκ1*01之DNA序列 | GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTG CATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGC AAGTCAGAGCATTAGCAGCTACTTAAATTGGTATCAG CAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATG CTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTT CAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC ATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTA CTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCCAACGTTCGGC CAAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA |
| 輕鏈恆定區(CL)之DNA序列 | CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCC ATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTT GTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCA AAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGG TAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAG GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTG CGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACA AAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT |

【0220】 下文列舉在此等實驗中使用之能夠結合血纖維蛋白原之重鏈可變區(MF1122)之胺基酸序列。CH1區、CH2區及CH3區為人類IgG1 (圖14)。

【0221】 重鏈可變區域之目標為纖維結合蛋白，重鏈可變區域之等電點為8.64 (pI)且全重鏈之等電點為8.54 (pI)。

【0222】 表4：能夠結合血纖維蛋白原之MF1122重鏈可變區之各種部分之胺基酸序列。進一步描述能夠結合PD-L1之重鏈可變區(VH PD-L1)。可變區域可併於具有共同輕鏈之可變區域中。MF1122重鏈可變區之pI為8.64。靶向PD-L1之重鏈可變區之pI為5.73。

| | MF1122重鏈可變區胺基酸序列 |
|---|---|
| FW1 | EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS |
| CDR1 | SYGMH |
| FW2 | WVRQAPGKGLEWVA |
| CDR2 | VISYDGSNKYYADSVKG |
| FW3 | RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR |
| CDR3 | ALFTTIAMDY |
| FW4 | WGQGTLVT |
| VH | EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWV AVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RALFTTIAMDYWGQGTLVTVSS |

【0223】 以下所測試CH1變異體提供於下，其中殘基變體係根據EU編號來加以標識。

表5：

| 根據EU編號之變異體位置 | 包含二個變異CH1區之抗體相對於包含野生型CH1之抗體而言之電荷差異 |
|---|---|
| T197D K213Q | -4 |
| K213Q N159D | -4 |
| K147E Q175E | -6 |
| N201D K213Q | -4 |
| K213Q | -2 |
| N201D | -2 |
| N201D A172P S190A | -2 |
| wt | 0 |
| Y149A, V154I, A172P S190A | 0 |
| T120K | +2 |
| N201K | +2 |
| N201K A172P S190A | +2 |
| D148K Q175K | +6 |
| N159K E216K(鉸鏈) | +6 |

【0224】 產生體積產量介於10-25 ml範圍內、濃度為約1.7 mg/mL之足夠且類似量之各抗體。

【0225】 測定各抗體之CIEX滯留時間。

【0226】 使用TSKgel SP-STAT (7 μm粒度，4.6 mM內徑× 10 cm長度，Tosoh 21964)系列之離子交換管柱進行CIEX-HPLC層析。CIEX分析使用裝有無孔樹脂粒子之基於親水性聚合物之管柱材料，該管柱材料之表面由具有多層陽離子交換基團(磺酸基團)之開放獲取網狀物組成，使其成為強陽離子交換劑且因此適用

於藉由使用NaCl鹽梯度來分離單株抗體之電荷異構體。帶正電抗體結合至帶負電管柱。

【0227】 在~50巴壓力下使用緩衝液A (磷酸鈉緩衝液，25 mM，pH 6.0)平衡TSKgel SP-STAT (7 μm粒度，4.6 mM內徑× 10 cm長度，Tosoh 21964)至少30 min。在此之後，注射對照及樣品IgG。全部測試樣品及對照(於PBS中)之注射樣品質量為10 μg蛋白質且注射體積為10-100 μl。藉由增加鹽濃度且運行緩衝液B梯度(25 mM磷酸鈉，1 mM NaCl，pH 6.0)自管柱排出抗體。流動速率設定為0.5 mL/min。針對基於220 nm結果觀測到之主峰之峰型態、滯留時間及峰面積來對層析圖加以分析。

【0228】 在此研究中，滯留時間與相較於野生型而言之總電荷差異相關，亦即新增正電荷愈多，滯留時間愈長，且新增負電荷愈多，滯留時間愈短。

表6：具有CH1變異體之單特異性抗體之CIEX滯留時間

| | | 實驗1<br>圖11 | |
|---|---|---|---|
| 變體(EU) | 相對於wt之總電荷差異 | CIEX RT | 相對於WT之RT差異 |
| T197D K213Q | -4 | 11.7 | -1.7 |
| K213Q N159D | -4 | 12.1 | -1.3 |
| K147E Q175E | -6 | 12.1 | -1.3 |
| N201D K213Q | -4 | 12.2 | -1.2 |
| K213Q | -2 | 12.4 | -1 |
| N201D | -2 | 13.2 | -0.2 |
| N201D A172P S190A | -2 | 13.3 | -0.1 |
| WT (無) | 0 | 13.4 | 0 |
| A172P S190A Y149A V154I | 0 | 13.5 | 0.1 |
| T120K | 2 | 15.6 | 2.2 |
| N201K | 2 | 15.7 | 2.3 |
| N201K A172P S190A | 2 | 15.8 | 2.4 |
| D148K Q175K | 6 | 17.7 | 4.3 |
| N159K E216K(鉸鏈) | 6 | 21 | 7.6 |

【0229】 全部CH1變異體之CIEX滯留時間展現於表6及圖11中。此等資料證實以其他方式具有一致pI之抗體一例如包含用於各重鏈之CH1分離區域且包

含野生型人類CH2區域及CH3區域及共同輕鏈之如上文所描述之二價單特異性人類IgG抗體—可僅基於使用上文所提供之分離殘基被充分分離，以使得藉由每個CH1分離區域併有一或多個正或負電荷差異殘基來生成相對於野生型CH1區而言之0.1至7.6之滯留差異。

**實例3：展現合適發展穩定性之併有分離殘基之抗體之穩定性分析**

【0230】 藉由冷凍且解凍於PBS中之二價單特異性抗體來測定該等抗體之穩定性，此指示全部二價單特異性抗體均具有與野生型單株抗體相當之穩定性。

【0231】 在1次冷凍/解凍循環之後用HP-SEC分析樣品組成。將樣品儲存於-80℃下隔夜且第二天在室溫下解凍。用HP-SEC分析溶解於PBS中之21 μg各抗體。全部抗體溶析為1個主峰，此指示所產生之抗體在一個冷凍-解凍循環之後穩定。因此，樣品在儲存於-80℃下時維持其組成。

【0232】 此外，藉由使用差示掃描量熱法(DSC)測定溫度熔化曲線來評估併有分離區域之抗體。為執行DSC，將抗體在PBS中稀釋直至0.5 mg/mL為止，且在透析緩衝液中透析。隨後，經由0.45 μm過濾器過濾抗體。在透析之後，將樣品稀釋至0.25 mg/mL之濃度以執行DCS分析且獲得各抗體之溫度熔化曲線。

【0233】 溫度熔化(TM)曲線描繪於圖3中。如由溫度熔化曲線測定之TM1及TM2列舉於下表7中(DSC)。

【0234】 在第二穩定性分析中，如表8中所闡述，使用UNcle (Unchained Labs)測定TM2。結果列於下表中。亦提供評級IgG關於TM2之穩定性之排行榜。以0.5℃/min在PBS緩衝液中將樣品自25℃加熱至95℃，且在7.4 pH下進行測試，其中蛋白質樣品介於0.2-1 mg/ml範圍內。隨後，由螢光信號計算Tm/Tagg溫度，且重複執行三次。

【0235】 使用UNCLE (Unchained Labs)以藉由差示掃描螢光測定法(DSF)及靜態光散射(SLS)執行熱穩定性研究。DSF係基於介於250 nm與720 nm之間之

內部胺基酸螢光之偵測且用於推斷變性後蛋白質去摺疊。SLS根據在266 nm情況下之雷射之光散射變化偵測聚集物含量變化。簡言之，分析在50 μg/mL下之蛋白質且使其經受自25℃至95℃之溫度升高(0.3或0.5℃/分鐘)。熱變性誘導所偵測且分析之蛋白質螢光變化(監測到介於250 nm與720 nm之間)及光散射變化(在266 nm情況下之雷射光)。螢光變化展現為隨溫度變化之BCM (重心平均值：所偵測之螢光譜以二個相等面積分配)。使用UNCLE分析軟體以計算隨溫度圖式變化之螢光變化差異且識別熔點(TM-發生螢光變化時之溫度)及溫度誘導之聚集(TAGG-在266 nm下之靜態光散射信號增加超過基線約10%時之溫度)的存在。

【0236】 表7：溫度熔化(TM)曲線之DSC分析產生TM1及TM2。溫度熔化曲線描繪於圖3中。

| **DSC** | | |
|---|---|---|
| **CH1型式(EU)** | **TM1** | **TM2** |
| Wt | 71.9 | 84.8 |
| T197D、K213Q | 70.6 | 84.7 |
| K213Q、N159D | 71.7 | 82.1 |
| K147E、Q175E | 70.6 | 79.0 |
| N201D、K213Q | 70.7 | 82.0 |
| K213Q | 70.7 | 84.8 |
| T120K | 71.6 | 83.6 |
| N201K | 70.6 | 83.7 |
| N201K 、 A172P 、 S190A | 70.6 | 83.4 |
| D148K、Q175K | 69.2 | 70.1 |
| N159K 、 E216K(鉸鏈) | 70.7 | 81.7 |

【0237】 表8：使用UNCLE及DSC量測抗體變異體之穩定性。Agg係指熔化之前發生之聚集。ND指示無資料(尚未用DSC分析此等樣品)。

| **排行榜** | **CH1變體** | **UNCLE** | **DSC** |
|---|---|---|---|
| | **(EU)** | **TM2** | **TM2** |
| 1 | wt (無) | 85.5 | 84.8 |
| 2 | T197D、K213Q | 85.5 | 84.7 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 3 | K213Q | 85 | 84.8 |
| 4 | T120K | 84 | 83.6 |
| 5 | K213Q、N159D | 83.9 | 82.1 |
| 6 | N201D、K213Q | 83.4 | 82 |
| 7 | N201K | 81.8 | 83.7 |
| 8 | N201K、A172P、S190A | 81 | 83.4 |
| 9 | N201D | 80.8 | ND |
| 10 | N201D、A172P、S190A | 80.2 | ND |
| 11 | N159K、E216K(鉸鏈) | 79.4 | 81.7 |
| 12 | K147E、Q175E | agg | 79 |
| 13 | D148K、Q175K | agg | 70.1 |
| 14 | A172P S190A Y149A V154I | agg | ND |

**實例4：等電聚焦**

【0238】 當產生時，在還原及非還原條件下在SDS-page凝膠上運行IgG。全部蛋白質尺寸均如所預期且各變異體之全部帶均處於相同高度。另外，在凝膠上使用等電聚焦運行所產生之IgG，其結果描繪於圖4中。凝膠上之帶之相對遷移與下文所列舉之所計算之pI相關(圖4)。

表9：SDS-page凝膠上之帶之相對遷移與所計算之pI相關

| | 總電荷 | 理論值 |
|---|---|---|
| CH1變體(EU) | 相對於wt之差異 | 全重鏈多肽pI |
| T197D K213Q | -4 | 8.36 |
| K213Q N159D | -4 | 8.36 |
| K147E Q175E | -6 | 8.19 |
| N201D K213Q | -4 | 8.36 |
| K213Q | -2 | 8.49 |
| N201D | -2 | 8.49 |
| N201D A172P S190A | -2 | 8.49 |
| 野生型(無) | 0 | 8.60 |
| A172P S190A Y149A V154I | 0 | 8.60 |
| T120K | 2 | 8.69 |
| N201K | 2 | 8.69 |
| N201K A172P S190A | 2 | 8.69 |
| D148K Q175K | 6 | 8.85 |
| N159K E216K(鉸鏈) | 6 | 8.85 |

**實例5：藉由使用CH1分離區域(包含分離殘基)分離雙特異性抗體及單特異**

**性抗體。**

【0239】 藉由一起表現2個不同重鏈產生雙特異性抗體。為形成抗體，將此等重鏈與如上文所描述之共同輕鏈配對。

【0240】 用具有DE臂之重鏈及具有KK臂之重鏈執行實驗。此等構築體之選殖描述於實例1d中。DE或KK修飾位於重鏈之CH3區域中。

【0241】 各重鏈由CH3區域、CH2區域、CH1區域以及VH區域組成。CH3區域允許重鏈抗體之異源二聚化且含有用於2個不同重鏈之DE殘基或KK殘基。CH2區域為人類CH2區域。VH決定抗體之特異性，從而DE重鏈靶向破傷風毒素(TT) (MF1516)且KK重鏈靶向cMet (MF3462)。序列提供於下表10及11處。

【0242】 重鏈之CH1區為產生相對於野生型區域之電荷差異之如本文所描述之野生型或分離區域。具有DE臂之重鏈為用於促進異源二聚化之人類野生型CH3區域之變異體。具有KK臂之重鏈為用於促進異源二聚化之人類野生型CH3之變異體。DE臂連接至具有相較於野生型區域而言之負電荷差異之分離區域，且KK臂連接至具有相較於野生型區域而言之正電荷差異之分離臂。

【0243】 表10：DE重鏈可變區之各種部分之胺基酸序列。重鏈靶向破傷風毒素(MF1516)。重鏈可變區之pI為8.64且全重鏈之pI為8.54。

| | |
|---|---|
| FW1 | EVQLVETGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS |
| CDR1 | QYAMH |
| FW2 | WVRQAPGKGLEWVA |
| CDR2 | IISHDERNKYYVDSGMG |
| FW3 | RFTISRDNSKNTLFLQMNSLRSEDTAVYYCAR |
| CDR3 | DMRKGGYYYGFDV |
| FW4 | WGQGTTVT |
| VH | EVQLVETGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSQYAMHWVRQAPGKGLEWVAII<br>SHDERNKYYVDSGMGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRSEDTAVYYCARDMR<br>KGGYYYGFDVWGQGTTVTVSS |

【0244】 表11 KK重鏈可變區及輕鏈可變區之各種部分之胺基酸序列。靶向cMet之重鏈(MF3462)之pI為8.04且全重鏈之pI為8.46。

| | |
|---|---|
| FW1 | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS |
| CDR1 | SYAMS |

| | |
|---|---|
| FW2 | WVRQAPGKGLEWVS |
| CDR2 | AISGSGGSTYYADSVKG |
| FW3 | RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR |
| CDR3 | GKSHYSWDAFDY |
| FW4 | WGQGTLVTVSS |
| VH | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGKSHYSWDAFDYWGQGTLVTVSS |

【0245】靶向經編號標識之破傷風類毒素之抗體之胺基酸序列具有胺基酸序列MF1337

MF1337:
EVQLVETGAEVKKPGASVKVSCKASDYIFTKYDINWVRQAPGQGLEWMGWMSANTGNTGYAQKFQGRV
TMTRDTSINTAYMELSSLTSGDTAVYFCARSSLFKTETAPYYHFALDVWGQGTTVTVSS

【0246】如下藉由將IgG1重鏈構築體及輕鏈構築體轉染至HEK293細胞中來產生雙特異性抗體。在搖動器平線區處在T125燒瓶中培育經懸浮液調適之293細胞直至密度為3.0 × 10^6個細胞/毫升為止。在24深孔盤之各孔中以0.3-0.5 × 10^6個活細胞/毫升之密度接種細胞。根據標準化程序暫時用單獨無菌DNA: PEI混合物轉染細胞且進一步培育。轉染後七天，收穫上清液且經由0.22 μM過濾器將其過濾。將無菌上清液儲存於4℃下直至藉由蛋白質-A親和力層析法純化抗體為止。隨後，藉由暫時轉染來在HEK293細胞中表現抗體且根據標準程序使用蛋白質-A親和力層析法自培養物上清液將其純化。

*用於功能性篩檢之IgG純化*

【0247】使用蛋白質-A親和力層析法小規模(< 500 μg)、中等規模(< 10 mg)及大規模(> 10 mg)執行IgG純化。在24孔過濾盤中在無菌條件下使用過濾執行小規模純化。首先，將培養基之pH調節至pH 8.0，且隨後將含IgG上清液與蛋白質A瓊脂糖凝膠CL-4B珠粒(50% v/v) (Pierce)一起在搖動平台上在600 rpm下在25℃下培育2小時。接下來，藉由過濾收穫珠粒。用PBS pH 7.4洗滌珠粒二次。隨後，在pH 3.0下用0.1 M檸檬酸鹽緩衝液溶析經結合IgG，且緊接著使用Tris pH 8.0中和溶析液。藉由使用多螢幕Ultracel 10多盤(Millipore)進行離心來執行緩衝液交

換。最後，在PBS pH 7.4中收穫樣品。使用Octet (ForteBio)量測IgG濃度。將蛋白質樣品儲存於4℃下。

【0248】製造以下構築體且用於實驗中。在進行實驗之前，關於序列驗證構築體。產生經編碼重鏈且在還原及非還原條件下使用SDS-page對其進行分析。全部重鏈均產生具有預期尺寸之雙特異性單價抗體及半抗體。

表12：具有DE臂或KK臂之重鏈中之CH1變體。

| 變異體(EU) | DE或KK |
|---|---|
| T197D K213Q | DE |
| K213Q | DE |
| T120K | KK |
| N201K | KK |
| N159K E216K(鉸鏈) | KK |
| wt | DE |
| wt | KK |

【0249】將各種DE重鏈與各種KK重鏈組合以便產生雙特異性抗體。如實例2中所描述用CIEX分析產物。對DE/KK抗體組合以及具有DE或KK之單臂產物二者均進行分析。具有DE之單臂產物產生DE/DE同源二聚體，且具有KK之單臂產物產生KK半抗體。未觀測到KK/KK同源二聚體產生。

【0250】下表描述各種抗體物種及單臂產物之滯留時間。雙特異性抗體(DE/KK)與同源二聚體(DE/DE)或KK半抗體之間之相對滯留時間差異指示CIEX譜中之峰之間之距離。較大差異使分離溶離份與雙特異性抗體，形成同源二聚體及半抗體更容易。

表13：具有CH1分離區域之雙特異性抗體之CIEX滯留時間。滯留時間(RT)，相對差異(ΔRT)

| CH1/DE臂(EU) | CH1/KK臂(EU) | 雙特異性(DEKK) | DEDE同源二聚體 | KK半抗體 | ΔRT (DEKK-DEDE同源二聚體) | ΔRT (DEKK-KK半抗體) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| wt | wt | 15.5 | 13.9 | 19.3 | 1.6 | 3.8 |
| wt | T120K | 15.8 | 13.8 | 19.9 | 2 | 4.1 |
| wt | N201K | 16.2 | 13.6 | 20.5 | 2.6 | 4.3 |
| wt | N159K | 18.7 | 13.6 | 23.2 | 5.1 | 4.5 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | E216K(鉸鏈) | | | | | |
| T197D<br>K213Q | wt | 14.3 | 12 | 18.9 | 2.3 | 4.6 |
| T197D<br>K213Q | T120K | 14.9 | 12 | 19.7 | 2.9 | 4.8 |
| T197D<br>K213Q | N201K | 15.4 | 12 | 20.5 | 3.4 | 5.1 |
| T197D<br>K213Q | N159K<br>E216K(鉸鏈) | 18 | 12 | 23.2 | 6 | 5.2 |
| K213Q | wt | 14.7 | 12.7 | 18.9 | 2 | 4.2 |
| K213Q | T120K | 15.2 | 12.7 | 19.7 | 2.5 | 4.5 |
| K213Q | N201K | 15.7 | 12.7 | 20.5 | 3 | 4.8 |
| K213Q | N159K<br>E216K(鉸鏈) | 18.2 | 12.7 | 23.2 | 5.5 | 5 |
| wt | - | NA | 13.6 | NA | NA | NA |
| T197D<br>K213Q | - | NA | 12 | NA | NA | NA |
| K213Q | - | NA | 12.7 | NA | NA | NA |
| - | wt | NA | NA | 18.9 | NA | NA |
| - | T120K | NA | NA | 19.7 | NA | NA |
| - | N201K | NA | NA | 20.5 | NA | NA |
| | N159K<br>E216K(鉸鏈) | NA | NA | 23.2 | | |

【0251】 如表13中所描述之各種抗體物種之滯留時間展現於圖5-10中。如圖5中所示，野生型DE/DE同源二聚體及KK半抗體之CIEX滯留時間為相對接近的。相比之下，用於此等重鏈之變異CH1分離區域以及DE及KK CH3異源二聚化區域之使用更改重鏈之CIEX滯留時間，從而增加同源二聚體、雙特異性異源二聚體及半抗體之滯留時間差異。在圖6中，具有變體T197D及K213Q之DE重鏈之CH1區。具有變體N159K及鉸鏈殘基E216K之KK重鏈之CH1區。因此，如圖6中所示，同源二聚體(DEDE)及半抗體(KK)之CIEX滯留時間具有更大滯留時間差異。現進一步將雙特異性抗體(DE/KK)與其他物種之滯留時間分離，允許更好地分離不同物種。

【0252】 CH1分離區域中之變體對雙特異性抗體之CIEX滯留時間之作用示於圖7-10中。

**表14 CH1、CH2及CH3變異分離區域之序列**

部分14A

CH1 WT:
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKX$_1$V

其中$X_1$ = K或R

CH2 WT:
231
APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK

CH2 Fc沉默：

231
APELGRGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK

CH3 WT:
341
GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN
YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS
LSLSPG

部分14B

CH1 N201K:
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICKVNHKPSNTKVDKRV

CH1 N201D:
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICDVNHKPSNTKVDKRV

CH1 A172P S190A N201K:
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPPVLQSSGLYSLSSV
VTVPASSLGTQTYICKVNHKPSNTKVDKRV

CH1 A172P S190A N201D:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPPVLQSSGLYSLSSV
VTVPASSLGTQTYICDVNHKPSNTKVDKRV

CH1 T120K:
ASKKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV

CH1 T120D:
ASDKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV

CH1 T197D K213Q:
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQDYICNVNHKPSNTKVDQRV

CH1 D148K Q175K:
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKKYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLKSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV

CH1 N159K:
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWKSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV

CH1 N159D:
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWDSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV

CH1 N159D K213Q:
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWDSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDQRV

CH1 K147E Q175E:
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLESSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV

CH1 Y149A V154I A172P S190A:
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDAFPEPITVSWNSGALTSGVHTFPPVLQSSGLYSLSSV
VTVPASSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV

CH1 K213Q:
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDQRV

CH1 N201D K213Q:
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICDVNHKPSNTKVDQRV

CH1 T120K N201K:

ASKKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICKVNHKPSNTKVDKRV

CH1 N201K N159K:
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWKSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICKVNHKPSNTKVDKRV

CH1 T120K N159K:
ASKKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWKSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV

CH1 T120K N201K N159K:
ASKKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWKSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICKVNHKPSNTKVDKRV

CH1 N201D N159D:
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWDSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICDVNHKPSNTKVDKRV

CH1 N201D K213Q N159D:
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWDSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICDVNHKPSNTKVDQRV

CH2 V303E:
231
APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVESVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK

CH2 V303K:
231
APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVKSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK

CH2 V303E Fc沉默：

231
APELGRGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVESVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK

CH2 V303K Fc沉默：

231
APELGRGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVKSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK

CH3 K370S:

341
GQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVSGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG

CH3 K370T:
341
GQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVTGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG

CH3 E382Q:
341
GQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WQSNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG

CH3 E382T:
341
GQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WTSNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG

CH3 E388L:
341
GQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPLNNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG

CH3 E388M:
341
GQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPMNNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG

CH3 E388T:
341
GQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPTNNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG

CH3 L351K; T366K; E382Q:
341
GQPREPQVYTKPPSREEMTK NQVSLKCLVKGFYPSDIAVE WQSNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG

CH3 L351K; T366K; E382T:
341
GQPREPQVYTKPPSREEMTK NQVSLKCLVKGFYPSDIAVE WTSNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG

CH3 L351K; T366K; E388L:
341
GQPREPQVYTKPPSREEMTK NQVSLKCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPLNNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG

CH3 L351K;T366K;E388M:
341
GQPREPQVYTKPPSREEMTK NQVSLKCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPMNNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG

CH3 L351K;T366K;E388T:
341
GQPREPQVYTKPPSREEMTK NQVSLKCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPTNNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG

CH3 L351D;L368E;K370S:
341
GQPREPQVYTDPPSREEMTK NQVSLTCEVSGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG

CH3 L351D;L368E;K370T:
341
GQPREPQVYTDPPSREEMTK NQVSLTCEVTGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG

**實例6：實例1-5之CH1變異體及新型CH1變異體之進一步分析。**

【0253】 如實例1中所指示產生抗體，其限制條件為此實例中之抗體為具有二個一致重鏈及二個一致輕鏈之單特異性二價抗體。因為抗體不為雙特異性抗體，故其具有野生型CH3區域。

【0254】 ELISA用於評估各種CH1變異體與經血纖維蛋白原塗佈之盤之結合。抗體為具有所指示CH1變異體之IgG1抗體。全部抗體均為具有有MF1122 VH及圖13A之共同輕鏈(指示為PG1122)之可變區域之二價單特異性抗體。在經相同血纖維蛋白原塗佈之盤(參見圖16：分別為血纖維蛋白原盤陽性樣品集1、血纖維蛋白原盤陽性樣品集2及血纖維蛋白原盤陰性樣品集)上測試作為陰性對照之相同但現具有PD-L1抗體VH (指示為PG PD-L1)的抗體。評估相同抗體與經PD-L1塗佈之盤之結合(參見圖16 PD-L1盤陽性樣品集及PD-L1盤陰性樣品集)。

【0255】 以10 μg/ml用人類血纖維蛋白原(Sigma Aldrich；目錄號F4753)塗佈血纖維蛋白原ELISA盤。在以5 μg/ml濃度起始且以0.005 μg/ml濃度結束之十倍濃度稀釋範圍內培育抗體。

【0256】 以2.5 μg/ml用人類PD-L1-Fc (R&D systems；目錄號156-B7)塗佈PD-L1 ELISA盤。在以5 μg/ml濃度起始且以0.005 μg/ml濃度結束之十倍濃度稀釋範圍內培育抗體。偵測到結合抗體及結合κ輕鏈之基於經1:1000稀釋之HRP結合蛋白質L之二級抗體(Pierce，目錄號32420)。

【0257】 攜帶PD-L1結合抗體作為含陰性對照之血纖維蛋白原ELISA，且攜帶血纖維蛋白原結合抗體作為含陰性對照之PD-L1 ELISA。具有相反結合特異性、但具有相同CH2序列、CH3序列及CH1變異體序列之陰性對照作為測試抗體。MF1122 VH可變區之胺基酸序列指示於表4中。各別CH1變異體之序列指示於表14中。因此，此等資料證實分離殘基不影響結合指定重鏈可變區之目標抗原。

【0258】 ELISA分析之結論為全部所測試抗體均結合至由可變區域序列規定之目標且重要地不結合至非特異性目標(圖16)。換言之，血纖維蛋白原特異性抗體結合至含血纖維蛋白原之血纖維蛋白原ELISA且不結合至含PD-L1之PD-L1 ELISA；且PD-L1特異性抗體結合至含PD-L1之PD-L1 ELISA且不結合至含血纖維蛋白原之血纖維蛋白原ELISA。

【0259】 表15：具有引入相較於WT IgG1 CH1而言之電荷差異之CH1變異體之抗體。

| CH1變異體<br>(EU編號) | 引入相較於wt CH1而言之電荷 |
|---|---|
| N201K | +1 |
| T120K | +1 |
| N159K | +1 |
| T120K、N201K | +2 |
| N201K、N159K | +2 |
| T120K、N159K | +2 |
| T120K、N201K、N159K | +3 |
| N201D | -1 |
| K213Q | -1 |
| N159D | -1 |
| N201D、K213Q | -2 |
| N201D、N159D | -2 |

| | |
|---|---|
| K213Q、N159D | -2 |
| N201D、K213Q、N159D | -3 |

【0260】在WT IgG1背景下分析所指示之變異體。亦指示CH1變異體是否與具有DE臂或KK臂之重鏈相關聯。重鏈之重鏈可變區(VH)具有MF1122之序列(參見表4)。已研究增加電荷之CH1變體(圖中之前7個條目)及PD-L1重鏈可變區(RT~11 min及FAB Tm ~76℃)。

【0261】將各種CH1變異體併於另一wtIgG1中以產生具有所指示可變區域及CH1變異體之IgG1抗體。抗體為具有一致重鏈及輕鏈之單特異性二價抗體。各抗體具有二個一致CH1區域及二個一致可變區域。如實例2中所描述用CIEX分析產物。具有同一可變區域及wtCH1 (WT)之IgG1抗體之各別CIEX滯留時間(RT)及相對滯留時間差異指示於表16中。較大差異使分離溶離份與雙特異性抗體，形成同源二聚體及半抗體更容易。

表16：具有CH1分離區域之二價單特異性抗體之CIEX滯留時間。滯留時間(RT)，相對差異(ΔRT)

| CH1變異體<br>(EU編號) | 重鏈可變區<br>MF | PG | RT | ΔRT<br>(變異CH1 - WT CH1) |
|---|---|---|---|---|
| WT | PD-L1 | PG PD-L1p14 | 9.4 | 0 |
| N159K | PD-L1 | PG PD-L1p17 | 12.1 | 2.7 |
| T120K | PD-L1 | PG PD-L1p15 | 12.3 | 2.9 |
| N201K | PD-L1 | PG PD-L1p16 | 12.8 | 3.4 |
| T120K, N159K | PD-L1 | PG PD-L1p20 | 15.1 | 5.7 |
| T120K, N201K | PD-L1 | PG PD-L1p18 | 15.9 | 6.5 |
| N201K, N159K | PD-L1 | PG PD-L1p19 | 17.3 | 7.9 |
| T120K, N201K, N159K | PD-L1 | PG PD-L1p21 | 20.3 | 10.9 |
| | | | | |
| N201D, K213Q, N159D | 1122 | PG1122p147 | 10.2 | -1.7 |
| K213Q, N159D | 1122 | PG1122p146 | 10.7 | -1.2 |
| N201D, K213Q | 1122 | PG1122p134 | 10.9 | -1 |
| K213Q | 1122 | PG1122p135 | 11.1 | -0.8 |
| N201D, N159D | 1122 | PG1122p145 | 11.4 | -0.5 |
| N159D | 1122 | PG1122p144 | 11.5 | -0.4 |
| WT | 1122 | PG1122p133 | 11.9 | 0 |
| N201D | 1122 | PG1122p136 | 11.9 | 0 |
| N159K | 1122 | PG1122p139 | 13.9 | 2 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| T120K | 1122 | PG1122p137 | 14.2 | 2.3 |
| N201K | 1122 | PG1122p138 | 14.4 | 2.5 |
| T120K, N159K | 1122 | PG1122p142 | 16.3 | 4.4 |
| T120K, N201K | 1122 | PG1122p140 | 17 | 5.1 |
| N201K, N159K | 1122 | PG1122p141 | 18.3 | 6.4 |
| T120K, N159K, N201K | 1122 | PG1122p143 | 21 | 9.1 |

【0262】 結論為如所預期，胺基酸變體增加Δ RT (定義為IgG變異體與IgG WT之間之RT差異)。一些變異體展現大於其他變異體之Δ RT。二個所測試VH序列(VH1122及PD-L1)均受變體類似程度地影響。

**併有分離殘基之抗體之穩定性分析**

【0263】 實例3描述用Uncle進行之穩定性分析。如下所指示之資料係用Uncle設備使用實例3中所描述之方法獲得。

【0264】 測試表16中所指示之單特異性二價抗體之各種穩定性參數。結果指示於表17中。

表17a PD-L1 VH

| CH1變異體 | 樣品 | Tm1 (℃) | Tm2 (℃) | Tm3 (℃) | Tagg 266 (℃) |
|---|---|---|---|---|---|
| N201K | 0.05 mg/ml | 70.3 | 74.2 | 78.7 | 80.2 |
| T120K | 0.05 mg/ml | 70.6 | 74.5 | 79.0 | 80.0 |
| N159K | 0.05 mg/ml | 66.6 | 70.6 | 78.0 | 79.7 |
| WT | 0.05 mg/ml | 70.2 | 78.0 | | 79.3 |
| N201K、N159K | 0.05 mg/ml | 71.2 | 78.0 | | 79.0 |
| T120K、N201K | 0.05 mg/ml | 71.0 | 76.7 | | 78.6 |
| T120K、N159K | 0.05 mg/ml | 70.7 | | | 77.7 |
| T120K、N159K、N201K | 0.05 mg/ml | 71.2 | | | 76.6 |

表17b MF1122 VH

| CH1變異體 | 樣品 | Tm1 (℃) | Tm2 (℃) | Tm3 (℃) | Tagg 266 (℃) |
|---|---|---|---|---|---|
| WT | 0.05 mg/ml | 70.5 | 80.0 | | 81.7 |
| K213Q | 0.05 mg/ml | 70.5 | 79.7 | | 81.0 |
| T120K | 0.05 mg/ml | 71.1 | 79.0 | | 79.6 |
| N201K | 0.05 mg/ml | 70.5 | 79.0 | | 79.6 |
| N159D | 0.05 mg/ml | 70.6 | 78.2 | | 79.6 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| N201K、N159K | 0.05 mg/ml | 69.7 | 78.6 | | 79.0 |
| N201D | 0.05 mg/ml | 70.0 | 78.1 | | 78.9 |
| N201D、K213Q | 0.05 mg/ml | 70.5 | 77.5 | | 78.7 |
| N159K | 0.05 mg/ml | 70.5 | 78.5 | | 78.7 |
| K213Q、N159D | 0.05 mg/ml | 70.2 | 77.6 | | 77.9 |
| T120K、N201K | 0.05 mg/ml | 70.1 | 75.0 | | 77.6 |
| N201D、N159D | 0.05 mg/ml | 71.0 | | | 77.0 |
| T120K、N159K、N201K | 0.05 mg/ml | 71.0 | | | 76.3 |
| T120K、N159K | 0.05 mg/ml | 70.5 | 75.0 | | 75.9 |
| N201D、K213Q、N159D | 0.05 mg/ml | 70.0 | | | 75.7 |

【0265】在所有情況下，數個變體之組合降低TAGG，然而，降低完全在容限位準內。二個VH之總體熱穩定性均受類似程度地影響，且被證明與相關聯可變區域中之特異性VH序列無關。在此分析中，用含有可變區域之抗PD-L1進行之N159向N159K之修改係與在~66℃下之早期熔化事件相關聯。此有可能為量測問題，因為具有含有可變區域之MF1122之此變異體之值不展示此與WT相同之差異。此趨勢亦見於具有通常不展示與WT相同之差異之N159K的各種組合中。

表18：當相較於具有WT CH1序列之抗體而言時增加具有變異體之抗體之電荷或pI之全部變異體的概述。

| CH1 變異體 | VH PD-L1 | | | | | | VH1122 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | CIEX | | 熱穩定性 | | | | CIEX | | 熱穩定性 | | |
| | RT | Δ RT (變異體-WT) | Tm1 (℃) | Tm2 (℃) | Tm3 (℃) | Tagg 266 (℃) | RT | Δ RT (變異體-WT) | Tm1 (℃) | Tm2 (℃) | Tagg 266 (℃) |
| WT | 9.4 | 0 | 70.2 | 78.0 | | 79.3 | 11.9 | 0 | 70.5 | 80.0 | 81.7 |
| N159K | 12.1 | 2.7 | 66.6 | 70.6 | 78.0 | 79.7 | 13.9 | 2 | 70.5 | 78.5 | 78.7 |
| T120K | 12.3 | 2.9 | 70.6 | 74.5 | 79.0 | 80.0 | 14.2 | 2.3 | 71.1 | 79.0 | 79.6 |

| | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| N201K | 12.8 | 3.4 | 70.3 | 74.2 | 78.7 | 80.2 | 14.4 | 2.5 | 70.5 | 79.0 | 79.6 |
| T120K, N159K | 15.1 | 5.7 | 70.7 | | | 77.7 | 16.3 | 4.4 | 70.5 | 75.0 | 75.9 |
| T120K, N201K | 15.9 | 6.5 | 71.0 | 76.7 | | 78.6 | 17.0 | 5.1 | 70.1 | 75.0 | 77.6 |
| N201K, N159K | 17.3 | 7.9 | 71.2 | 78.0 | | 79.0 | 18.3 | 6.4 | 69.7 | 78.6 | 79.0 |
| T120K, N159K, N201K | 20.3 | 10.9 | 71.2 | | | 76.6 | 21.0 | 9.1 | 71.0 | | 76.3 |

【0266】 當相較於表18中所列舉之其他CH1變異體而言時，單胺基酸變異體N201K似乎引起最強CIEX位移(2.5-3.4分鐘)，同時維持高熱穩定性(TAGG降低0℃-2℃)。此為二個所測試VH序列之情況，與其抗原結合特異性及其來源生殖系V區無關。其他所列單胺基酸變異體亦展現良好穩定性且展現有用CIEX滯留時間位移。

【0267】 表19：當相較於具有WT CH1序列之抗體而言時更改具有變異體之抗體之電荷或pI之全部變異體的概述。

| pI | CH1變異體 | CIEX | | 熱穩定性 | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | RT | Δ RT (變異體-WT) | Tm1 (℃) | Tm2 (℃) | Tagg 266 (℃) | Δ TAGG (變異體-WT) |
| 較低 | N201D、K213Q、N159D | 10.2 | -1.7 | 70.0 | | 75.7 | -6.0 |
| 較低 | K213Q、N159D | 10.7 | -1.2 | 70.2 | 77.6 | 77.9 | -3.9 |
| 較低 | N201D、K213Q | 10.9 | -1.0 | 70.5 | 77.5 | 78.7 | -3.0 |
| 較低 | K213Q | 11.1 | -0.8 | 70.5 | 79.7 | 81.0 | -0.7 |
| 較低 | N201D、N159D | 11.4 | -0.5 | 71.0 | | 77.0 | -4.8 |
| 較低 | N159D | 11.5 | -0.4 | 70.6 | 78.2 | 79.6 | -2.1 |
| 較低 | N201D | 11.9 | 0.0 | 70.0 | 78.1 | 78.9 | -2.8 |
| | WT | 11.9 | 0.0 | 70.5 | 80.0 | 81.7 | 0.0 |
| 較高 | N159K | 13.9 | 2.0 | 70.5 | 78.5 | 78.7 | -3.0 |
| 較高 | T120K | 14.2 | 2.3 | 71.1 | 79.0 | 79.6 | -2.1 |
| 較高 | N201K | 14.4 | 2.5 | 70.5 | 79.0 | 79.6 | -2.1 |
| 較高 | T120K、N159K | 16.3 | 4.4 | 70.5 | 75.0 | 75.9 | -5.8 |
| 較高 | T120K、N201K | 17.0 | 5.1 | 70.1 | 75.0 | 77.6 | -4.1 |
| 較高 | N201K、 | 18.3 | 6.4 | 69.7 | 78.6 | 79.0 | -2.8 |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | N159K | | | | | | |
| 較高 | T120K、N159K、N201K | 21.0 | 9.1 | 71.0 | | 76.3 | -5.4 |

【0268】所測試變異體全部具有類似Tm1值，而Tm2係在合適範圍內。單變體K213Q引起強CIEX位移(-0.8分鐘)，同時維持良好熱穩定性(TAGG降低0.7℃)。雙變異體N201K + N159K提供對CIEX滯留之明顯作用，同時具有對熱穩定性之有限作用。在此情況下，所測試三變異體具有最大CIEX滯留時間位移。

**實例7a：識別未經表面之殘基以進行分離設計**

【0269】根據具有另一CH2區表面之IgG1 CH2區之結構資訊，藉由使用用預設參數之程式GETAREA 1.0識別在CH2區內未經表面暴露之胺基酸殘基位置及內埋式胺基酸殘基位置。Negi等人,「Solvent Accessible Surface Areas, Atomic Solvation Energies, and Their Gradients for Macromolecules」, 最後一次修正時間為2015年4月17日星期三3:00 PM。將具有表20之序列之CH2區之模型提交至Swiss-model網站(Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. Bioinformatics. 2006年1月15日;22(2):195-201)。對IgG1 CH3區進行相同過程。

【0270】高品質CH2及CH3同源性模型係基本上如上文所解釋而獲得，自Swiss-Model網站伺服器使用1.3.0版Swiss-Model。數個適當晶體結構存在(為高品質結構且在許多本文實施例中具有與用作『原始』序列或模板序列之CH2區域具有> 95%序列一致性之比對)。許多其他PDB中之CH2區可能提供高品質起始結構(與此處所用之CH2區具有> 95%序列一致性及高品質結構)。如同實例1中一樣使用常用同源性模型化工具容易地識別許多未經表面暴露之殘基。以CH2查詢序列之PDB模板5vu0為起始物獲得具有在全長上之98.2%序列一致性之CH2區域之結構模型(注意錯配發生在經工程改造區及末端/連接子區中，且模型獲得0.99之1.3.0版Swiss-Model GMQE評分)。

【0271】用GETAREA 1.0 β加工此結構，上傳由Swiss-Model生成之pdb檔案。基於GETAREA 1.0 β之預設參數，經大於50%表面暴露之胺基酸稱作「向外」或表面，未向外或未經表面暴露之殘基介於50%與大於20%之間，且小於20%可接近處被GETAREA 1.0 β提及為「向內」或如本文所提及為內埋式胺基酸。

CH3

【0272】類似地，本文所體現之『原始』CH3區域或任何經工程改造CH3區域可模型化為同源二聚體(二個CH3鏈相互作用)或使用同源性模型化來模型化為單體。數個適當晶體結構存在(為高品質結構且在許多本文實施例中具有與用作『原始』序列之DE-CH3區域或KK-CH3區域具有> 92%序列一致性之比對)。許多其他PDB中之CH3區可能提供高品質起始結構(與此處所用之CH3區具有> 92%序列一致性及高品質結構)。如同實例1中一樣使用常用同源性模型化工具容易地識別許多未經表面暴露之殘基。舉例而言，吾等以DE-CH3查詢序列之PDB模板5w38為起始物產生具有在全長上之93.46%序列一致性之CH3區域(DE-CH3)之結構模型(注意錯配發生在經工程改造區及連接子/區域-末端區中，且模型獲得0.99之1.3.0版Swiss-Model GMQE評分)。用GETAREA 1.0 β加工此結構，上傳由Swiss-Model生成之pdb檔案。基於GETAREA 1.0 β之預設參數，經大於50%表面暴露之胺基酸稱作「向外」或表面，未向外或未經表面暴露之殘基介於50%與大於20%之間，且小於20%可接近處被GETAREA 1.0 β提及為「向內」或如本文所提及為內埋式胺基酸(參見表20-22)。

【0273】經模型化之CH2區為經修飾以在根據EU編號之位置235及236處沉默之人類CH2。經模型化之CH3區為經修飾以包括根據EU編號之表21之L351D及L368E變體以及表22之T366K及L351K變體的人類CH3，由此對CH3鏈模型化以用於CH3 DEKK異源二聚化區域。

表20：CH2 Fc沉默GetArea評分。

探針半徑：1.400

探針半徑 : 1.400

| 殘基 | | 總計 | 無極 | 骨架 | 側鏈 | 比率(%) | 向內/向外 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| PRO | 1 | 193.74 | 162.89 | 55.64 | 138.10 | 100.0 | o |
| ALA | 2 | 103.03 | 77.89 | 29.68 | 73.36 | 100.0 | o |
| PRO | 3 | 132.81 | 115.27 | 28.97 | 103.84 | 98.7 | o |
| GLU | 4 | 145.43 | 55.55 | 19.06 | 126.37 | 89.5 | o |
| LEU | 5 | 135.97 | 121.61 | 21.70 | 114.27 | 78.2 | o |
| GLY | 6 | 52.91 | 45.33 | 52.91 | 0.00 | 60.7 | o |
| ARG | 7 | 243.13 | 121.37 | 42.24 | 200.89 | 100.0 | o |
| GLY | 8 | 24.77 | 11.96 | 24.77 | 0.00 | 28.4 | |
| PRO | 9 | 6.33 | 2.66 | 3.67 | 2.66 | 2.5 | i |
| SER | 10 | 43.55 | 16.19 | 3.51 | 40.03 | 51.7 | o |
| VAL | 11 | 4.68 | 0.00 | 4.68 | 0.00 | 0.0 | i |
| PHE | 12 | 108.72 | 108.72 | 3.15 | 105.58 | 58.6 | o |
| LEU | 13 | 21.40 | 4.52 | 16.89 | 4.52 | 3.1 | i |
| PHE | 14 | 102.35 | 102.35 | 0.02 | 102.34 | 56.8 | o |
| PRO | 15 | 63.34 | 56.68 | 6.66 | 56.68 | 53.9 | o |
| PRO | 16 | 9.46 | 4.14 | 9.43 | 0.04 | 0.0 | i |
| LYS | 17 | 138.82 | 101.00 | 0.64 | 138.18 | 84.0 | o |
| PRO | 18 | 97.41 | 97.41 | 5.82 | 91.58 | 87.1 | o |
| LYS | 19 | 120.28 | 81.58 | 2.93 | 117.34 | 71.3 | o |
| ASP | 20 | 24.23 | 0.45 | 0.00 | 24.23 | 21.4 | |
| THR | 21 | 5.50 | 0.92 | 1.27 | 4.24 | 4.0 | i |
| LEU | 22 | 120.34 | 95.71 | 26.86 | 93.48 | 63.9 | o |
| MET | 23 | 114.40 | 114.40 | 3.68 | 110.71 | 69.9 | o |
| ILE | 24 | 147.67 | 140.44 | 8.78 | 138.90 | 94.3 | o |
| SER | 25 | 108.79 | 61.18 | 38.59 | 70.20 | 90.7 | o |
| ARG | 26 | 99.39 | 33.11 | 8.74 | 90.65 | 46.4 | |
| THR | 27 | 84.29 | 45.25 | 13.94 | 70.35 | 66.2 | o |
| PRO | 28 | 2.03 | 2.03 | 0.67 | 1.35 | 1.3 | i |
| GLU | 29 | 74.03 | 11.89 | 2.36 | 71.67 | 50.8 | o |
| VAL | 30 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.0 | i |
| THR | 31 | 31.24 | 20.30 | 0.00 | 31.24 | 29.4 | |
| CYS | 32 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.0 | i |
| VAL | 33 | 11.02 | 11.02 | 0.00 | 11.02 | 9.0 | i |
| VAL | 34 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.0 | i |
| VAL | 35 | 37.54 | 37.54 | 0.00 | 37.54 | 30.7 | |
| ASP | 36 | 70.47 | 15.73 | 9.38 | 61.09 | 54.1 | o |
| VAL | 37 | 0.19 | 0.19 | 0.12 | 0.07 | 0.1 | i |
| SER | 38 | 44.61 | 40.83 | 9.52 | 35.09 | 45.3 | |
| HIS | 39 | 88.36 | 62.17 | 13.44 | 74.92 | 48.5 | |
| GLU | 40 | 149.40 | 73.31 | 30.26 | 119.14 | 84.4 | o |
| ASP | 41 | 28.81 | 1.73 | 0.89 | 27.92 | 24.7 | |
| PRO | 42 | 25.65 | 25.04 | 0.61 | 25.04 | 23.8 | |
| GLU | 43 | 117.21 | 55.73 | 6.38 | 110.83 | 78.5 | o |
| VAL | 44 | 23.94 | 1.82 | 23.00 | 0.94 | 0.8 | i |
| LYS | 45 | 124.86 | 98.22 | 5.73 | 119.13 | 72.4 | o |
| PHE | 46 | 24.15 | 5.11 | 19.04 | 5.11 | 2.8 | i |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ASN | 47 | 24.44 | 4.30 | 4.30 | 20.14 | 17.6 | i |
| TRP | 48 | 4.21 | 3.88 | 0.33 | 3.88 | 1.7 | i |
| TYR | 49 | 37.06 | 26.77 | 0.05 | 37.01 | 19.2 | i |
| VAL | 50 | 22.89 | 21.30 | 1.59 | 21.30 | 17.4 | i |
| ASP | 51 | 75.33 | 37.74 | 25.52 | 49.81 | 44.1 | |
| GLY | 52 | 60.12 | 33.43 | 60.12 | 0.00 | 68.9 | o |
| VAL | 53 | 110.66 | 110.66 | 4.89 | 105.77 | 86.5 | o |
| GLU | 54 | 66.84 | 18.07 | 13.03 | 53.80 | 38.1 | |
| VAL | 55 | 40.38 | 36.18 | 7.70 | 32.69 | 26.7 | |
| HIS | 56 | 157.04 | 105.36 | 35.49 | 121.55 | 78.6 | o |
| ASN | 57 | 89.31 | 55.03 | 22.99 | 66.32 | 58.0 | o |
| ALA | 58 | 31.86 | 8.47 | 23.55 | 8.32 | 12.8 | i |
| LYS | 59 | 150.21 | 106.48 | 6.84 | 143.36 | 87.2 | o |
| THR | 60 | 72.64 | 36.55 | 27.94 | 44.70 | 42.1 | |
| LYS | 61 | 106.53 | 65.14 | 6.32 | 100.21 | 60.9 | o |
| PRO | 62 | 121.87 | 119.66 | 16.64 | 105.23 | 100.0 | o |
| ARG | 63 | 91.66 | 20.30 | 14.82 | 76.84 | 39.3 | |
| GLU | 64 | 109.22 | 38.87 | 6.04 | 103.18 | 73.1 | o |
| GLU | 65 | 95.40 | 25.89 | 23.90 | 71.51 | 50.6 | o |
| GLN | 66 | 58.41 | 19.49 | 10.88 | 47.54 | 33.1 | |
| TYR | 67 | 237.61 | 174.37 | 31.97 | 205.64 | 100.0 | o |
| ASN | 68 | 105.09 | 50.26 | 26.26 | 78.83 | 69.0 | o |
| SER | 69 | 69.30 | 40.30 | 3.56 | 65.74 | 84.9 | o |
| THR | 70 | 35.84 | 33.97 | 0.92 | 34.92 | 32.9 | |
| TYR | 71 | 43.46 | 10.57 | 0.00 | 43.46 | 22.5 | |
| ARG | 72 | 74.94 | 20.74 | 1.23 | 73.72 | 37.7 | |
| VAL | 73 | 7.91 | 7.91 | 0.54 | 7.36 | 6.0 | i |
| VAL | 74 | 15.80 | 15.67 | 0.12 | 15.67 | 12.8 | i |
| SER | 75 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.0 | i |
| VAL | 76 | 12.37 | 11.48 | 0.88 | 11.48 | 9.4 | i |
| LEU | 77 | 2.50 | 2.50 | 0.12 | 2.38 | 1.6 | i |
| THR | 78 | 57.73 | 39.31 | 7.53 | 50.20 | 47.3 | |
| VAL | 79 | 5.26 | 3.64 | 5.26 | 0.00 | 0.0 | i |
| LEU | 80 | 129.98 | 129.25 | 1.46 | 128.52 | 87.9 | o |
| HIS | 81 | 26.08 | 21.14 | 0.61 | 25.47 | 16.5 | i |
| GLN | 82 | 111.49 | 66.99 | 0.51 | 110.98 | 77.2 | o |
| ASP | 83 | 26.33 | 0.36 | 0.48 | 25.85 | 22.9 | |
| TRP | 84 | 18.21 | 10.40 | 0.05 | 18.16 | 8.1 | i |
| LEU | 85 | 53.50 | 44.95 | 8.55 | 44.95 | 30.7 | |
| ASN | 86 | 103.14 | 23.60 | 33.10 | 70.04 | 61.3 | o |
| GLY | 87 | 32.76 | 15.59 | 32.76 | 0.00 | 37.6 | |
| LYS | 88 | 69.15 | 39.00 | 2.63 | 66.52 | 40.4 | |
| GLU | 89 | 85.88 | 19.30 | 0.49 | 85.39 | 60.5 | o |
| TYR | 90 | 2.54 | 2.02 | 0.00 | 2.54 | 1.3 | i |
| LYS | 91 | 59.65 | 27.60 | 0.00 | 59.65 | 36.3 | |
| CYS | 92 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.0 | i |
| LYS | 93 | 42.70 | 12.03 | 0.18 | 42.52 | 25.9 | |
| VAL | 94 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.0 | i |
| SER | 95 | 28.95 | 24.24 | 1.86 | 27.09 | 35.0 | |
| ASN | 96 | 14.37 | 6.88 | 13.83 | 0.54 | 0.5 | i |
| LYS | 97 | 167.65 | 121.92 | 31.24 | 136.40 | 82.9 | o |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ALA | 98 | 47.07 | 36.13 | 22.90 | 24.17 | 37.2 | |
| LEU | 99 | 15.12 | 4.67 | 10.64 | 4.49 | 3.1 | i |
| PRO | 100 | 101.58 | 73.35 | 44.85 | 56.73 | 53.9 | o |
| ALA | 101 | 63.20 | 59.97 | 6.37 | 56.84 | 87.6 | o |
| PRO | 102 | 69.59 | 54.52 | 15.36 | 54.23 | 51.5 | o |
| ILE | 103 | 28.78 | 28.78 | 3.94 | 24.83 | 16.9 | i |
| GLU | 104 | 85.12 | 27.43 | 18.14 | 66.98 | 47.4 | |
| LYS | 105 | 86.57 | 44.26 | 5.34 | 81.24 | 49.4 | |
| THR | 106 | 66.88 | 35.96 | 25.68 | 41.20 | 38.8 | |
| ILE | 107 | 35.27 | 35.27 | 6.06 | 29.21 | 19.8 | i |
| SER | 108 | 38.47 | 2.27 | 15.77 | 22.70 | 29.3 | |
| LYS | 109 | 77.36 | 45.77 | 6.40 | 70.96 | 43.1 | |
| ALA | 110 | 94.75 | 83.95 | 25.21 | 69.54 | 100.0 | o |
| LYS | 111 | 252.60 | 132.84 | 47.34 | 205.25 | 100.0 | o |

【0274】 CH2序列及模型化資訊。位置由任意編號指示。具有編號2之殘基ALA對應於EU編號231，具有編號3之殘基PRO對應於EU編號232等，直至具有編號111之殘基LYS具有根據EU編號之位置編號340 (參見圖17中描繪之IMGT表)。

【0275】 CH2區之序列包含在位置235及236處之Fc沉默變體(L235G及G236R變體)。向內/向外欄指示胺基酸視為內埋式(i)或經表面暴露的(o)。開放空間指示未經表面暴露且亦非內埋式之胺基酸之值。

表21：CH3 mut模型DE變異體

探針半徑 : 1.400

| 殘基 | | 總計 | 無極 | 骨架 | 側鏈 | 比率(%) | 向內/向外 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| GLY | 1 | 93.09 | 41.16 | 93.09 | 0.00 | 100.0 | o |
| GLN | 2 | 155.68 | 61.13 | 7.43 | 148.25 | 100.0 | o |
| PRO | 3 | 73.51 | 55.46 | 18.05 | 55.46 | 52.7 | o |
| ARG | 4 | 98.09 | 60.52 | 6.40 | 91.69 | 46.9 | |
| GLU | 5 | 86.26 | 24.01 | 5.26 | 81.00 | 57.4 | o |
| PRO | 6 | 4.08 | 0.00 | 4.08 | 0.00 | 0.0 | i |
| GLN | 7 | 73.96 | 26.14 | 6.11 | 67.85 | 47.2 | |
| VAL | 8 | 5.60 | 0.45 | 5.14 | 0.45 | 0.4 | i |
| TYR | 9 | 111.59 | 87.13 | 4.60 | 106.99 | 55.4 | o |
| THR | 10 | 28.41 | 0.00 | 17.68 | 10.74 | 10.1 | i |
| ASP | 11 | 57.13 | 21.71 | 0.01 | 57.12 | 50.5 | o |
| PRO | 12 | 80.78 | 68.74 | 12.04 | 68.74 | 65.3 | o |
| PRO | 13 | 13.72 | 4.86 | 13.59 | 0.13 | 0.1 | i |
| SER | 14 | 66.96 | 55.58 | 17.00 | 49.96 | 64.5 | o |
| ARG | 15 | 202.77 | 95.36 | 10.47 | 192.31 | 98.4 | o |
| GLU | 16 | 155.84 | 60.11 | 24.88 | 130.97 | 92.8 | o |
| GLU | 17 | 44.56 | 18.97 | 3.47 | 41.09 | 29.1 | |
| MET | 18 | 41.84 | 39.31 | 2.53 | 39.31 | 24.8 | |
| THR | 19 | 130.40 | 93.72 | 34.74 | 95.66 | 90.1 | o |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| LYS | 20 | 127.83 | 81.65 | 6.71 | 121.12 | 73.6 | o |
| ASN | 21 | 132.13 | 39.17 | 14.75 | 117.38 | 100.0 | o |
| GLN | 22 | 71.05 | 17.44 | 4.87 | 66.18 | 46.1 | |
| VAL | 23 | 0.40 | 0.40 | 0.40 | 0.00 | 0.0 | i |
| SER | 24 | 25.15 | 14.87 | 0.85 | 24.30 | 31.4 | |
| LEU | 25 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.0 | i |
| THR | 26 | 31.92 | 16.70 | 0.00 | 31.92 | 30.1 | |
| CYS | 27 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.0 | i |
| GLU | 28 | 36.91 | 0.13 | 0.00 | 36.91 | 26.1 | |
| VAL | 29 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.0 | i |
| LYS | 30 | 81.64 | 38.53 | 0.00 | 81.64 | 49.6 | |
| GLY | 31 | 9.38 | 7.19 | 9.38 | 0.00 | 10.8 | i |
| PHE | 32 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.0 | i |
| TYR | 33 | 60.64 | 26.00 | 0.00 | 60.64 | 31.4 | |
| PRO | 34 | 41.03 | 41.03 | 0.00 | 41.03 | 39.0 | |
| SER | 35 | 35.30 | 7.93 | 1.45 | 33.85 | 43.7 | |
| ASP | 36 | 117.22 | 39.01 | 10.75 | 106.47 | 94.2 | o |
| ILE | 37 | 37.55 | 12.12 | 31.56 | 5.99 | 4.1 | i |
| ALA | 38 | 57.19 | 56.62 | 8.29 | 48.90 | 75.3 | o |
| VAL | 39 | 17.59 | 2.52 | 16.21 | 1.38 | 1.1 | i |
| GLU | 40 | 62.61 | 13.86 | 0.00 | 62.61 | 44.3 | |
| TRP | 41 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.0 | i |
| GLU | 42 | 19.49 | 11.64 | 0.00 | 19.49 | 13.8 | i |
| SER | 43 | 11.51 | 6.66 | 5.59 | 5.92 | 7.7 | i |
| ASN | 44 | 136.96 | 45.44 | 38.58 | 98.38 | 86.1 | o |
| GLY | 45 | 68.61 | 43.68 | 68.61 | 0.00 | 78.7 | o |
| GLN | 46 | 125.81 | 51.62 | 0.79 | 125.03 | 87.0 | o |
| PRO | 47 | 82.82 | 69.87 | 12.95 | 69.87 | 66.4 | o |
| GLU | 48 | 23.57 | 4.09 | 9.96 | 13.60 | 9.6 | i |
| ASN | 49 | 154.67 | 40.12 | 37.73 | 116.94 | 100.0 | o |
| ASN | 50 | 69.84 | 23.21 | 3.31 | 66.53 | 58.2 | o |
| TYR | 51 | 63.47 | 27.21 | 16.57 | 46.90 | 24.3 | |
| LYS | 52 | 157.61 | 112.86 | 5.40 | 152.22 | 92.5 | o |
| THR | 53 | 48.95 | 25.39 | 23.68 | 25.27 | 23.8 | |
| THR | 54 | 63.07 | 61.04 | 3.84 | 59.23 | 55.8 | o |
| PRO | 55 | 109.22 | 109.22 | 7.42 | 101.79 | 96.8 | o |
| PRO | 56 | 46.68 | 30.88 | 15.80 | 30.88 | 29.4 | |
| VAL | 57 | 76.40 | 76.40 | 4.59 | 71.81 | 58.7 | o |
| LEU | 58 | 114.86 | 96.63 | 18.23 | 96.63 | 66.1 | o |
| ASP | 59 | 48.98 | 5.83 | 9.34 | 39.64 | 35.1 | |
| SER | 60 | 123.45 | 65.29 | 42.65 | 80.79 | 100.0 | o |
| ASP | 61 | 87.54 | 53.72 | 30.83 | 56.71 | 50.2 | o |
| GLY | 62 | 38.91 | 31.91 | 38.91 | 0.00 | 44.6 | |
| SER | 63 | 1.29 | 0.00 | 0.00 | 1.29 | 1.7 | i |
| PHE | 64 | 36.04 | 36.04 | 0.00 | 36.04 | 20.0 | |
| PHE | 65 | 52.00 | 52.00 | 0.00 | 52.00 | 28.9 | |
| LEU | 66 | 1.67 | 1.67 | 0.00 | 1.67 | 1.1 | i |
| TYR | 67 | 89.25 | 55.41 | 0.35 | 88.91 | 46.0 | |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| SER | 68 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.0 | i |
| LYS | 69 | 95.84 | 74.80 | 0.58 | 95.26 | 57.9 | o |
| LEU | 70 | 0.03 | 0.03 | 0.00 | 0.03 | 0.0 | i |
| THR | 71 | 25.63 | 14.52 | 3.11 | 22.52 | 21.2 | |
| VAL | 72 | 3.92 | 3.92 | 3.88 | 0.04 | 0.0 | i |
| ASP | 73 | 68.40 | 12.10 | 0.79 | 67.61 | 59.8 | o |
| LYS | 74 | 60.53 | 31.65 | 0.27 | 60.26 | 36.6 | |
| SER | 75 | 51.92 | 36.67 | 1.04 | 50.87 | 65.7 | o |
| ARG | 76 | 78.71 | 47.13 | 0.19 | 78.52 | 40.2 | |
| TRP | 77 | 5.79 | 3.39 | 0.00 | 5.79 | 2.6 | i |
| GLN | 78 | 100.97 | 30.38 | 15.96 | 85.01 | 59.2 | o |
| GLN | 79 | 132.46 | 44.70 | 34.32 | 98.14 | 68.3 | o |
| GLY | 80 | 29.46 | 15.57 | 29.46 | 0.00 | 33.8 | |
| ASN | 81 | 54.55 | 11.80 | 9.35 | 45.20 | 39.5 | |
| VAL | 82 | 82.61 | 76.15 | 6.46 | 76.15 | 62.3 | o |
| PHE | 83 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.0 | i |
| SER | 84 | 15.68 | 2.85 | 0.00 | 15.68 | 20.3 | |
| CYS | 85 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.0 | i |
| SER | 86 | 4.52 | 3.63 | 0.89 | 3.63 | 4.7 | i |
| VAL | 87 | 0.65 | 0.65 | 0.65 | 0.00 | 0.0 | i |
| MET | 88 | 111.58 | 110.80 | 0.79 | 110.80 | 70.0 | o |
| HIS | 89 | 8.00 | 8.00 | 8.00 | 0.00 | 0.0 | i |
| GLU | 90 | 88.28 | 32.85 | 17.49 | 70.79 | 50.1 | o |
| ALA | 91 | 30.88 | 17.12 | 24.75 | 6.13 | 9.4 | i |
| LEU | 92 | 13.46 | 7.12 | 6.44 | 7.02 | 4.8 | i |
| HIS | 93 | 154.34 | 126.25 | 15.36 | 138.97 | 89.9 | o |
| ASN | 94 | 117.74 | 34.72 | 27.06 | 90.68 | 79.3 | o |
| HIS | 95 | 107.94 | 87.80 | 0.02 | 107.92 | 69.8 | o |
| TYR | 96 | 96.25 | 70.36 | 8.92 | 87.33 | 45.2 | |
| THR | 97 | 32.61 | 17.68 | 7.29 | 25.32 | 23.8 | |
| GLN | 98 | 83.62 | 20.27 | 18.63 | 64.99 | 45.2 | |
| LYS | 99 | 88.44 | 45.20 | 4.77 | 83.67 | 50.9 | o |
| SER | 100 | 66.87 | 30.31 | 16.66 | 50.22 | 64.9 | o |
| LEU | 101 | 17.62 | 17.62 | 5.67 | 11.95 | 8.2 | i |
| SER | 102 | 33.50 | 1.16 | 15.46 | 18.04 | 23.3 | |
| LEU | 103 | 77.59 | 71.45 | 7.26 | 70.33 | 48.1 | |
| SER | 104 | 89.76 | 44.75 | 29.35 | 60.41 | 78.0 | o |
| PRO | 105 | 190.98 | 114.92 | 49.18 | 141.81 | 100.0 | o |

---

【0276】 CH3序列及模型化資訊。位置由任意編號指示。具有編號1之殘基GLY對應於EU編號341，具有編號2之殘基GLN對應於EU編號342等，直至具有編號103之殘基LEU具有根據EU編號之位置編號443 (參見圖17中描繪之IMGT表)。

【0277】 CH3區之所用序列包含在位置351及368處之DE異源二聚化變體

(在上文編號中分別為位置11及位置28之L351D變體及L368E變體)。向內/向外欄指示胺基酸視為內埋式(i)或經表面暴露的(o)。開放空間指示未經表面暴露且亦非內埋式之胺基酸之值。

表22：CH3 mut模型KK變異體

探針半徑 : 1.400

| 殘基 | | 總計 | 無極 | 骨架 | 側鏈 | 比率(%) | 向內/向外 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| GLY | 1 | 93.09 | 41.02 | 93.09 | 0.00 | 100.0 | o |
| GLN | 2 | 155.60 | 61.06 | 7.43 | 148.16 | 100.0 | o |
| PRO | 3 | 73.53 | 55.44 | 18.09 | 55.44 | 52.7 | o |
| ARG | 4 | 98.41 | 60.63 | 6.39 | 92.02 | 47.1 | |
| GLU | 5 | 85.96 | 23.95 | 5.17 | 80.79 | 57.2 | o |
| PRO | 6 | 4.18 | 0.00 | 4.18 | 0.00 | 0.0 | i |
| GLN | 7 | 73.97 | 26.02 | 5.89 | 68.08 | 47.4 | |
| VAL | 8 | 5.78 | 0.46 | 5.32 | 0.46 | 0.4 | i |
| TYR | 9 | 115.12 | 90.27 | 4.56 | 110.56 | 57.3 | o |
| THR | 10 | 31.62 | 0.00 | 20.23 | 11.39 | 10.7 | i |
| LYS | 11 | 97.36 | 87.29 | 0.02 | 97.34 | 59.2 | o |
| PRO | 12 | 54.87 | 51.32 | 3.55 | 51.32 | 48.8 | |
| PRO | 13 | 12.12 | 3.82 | 11.88 | 0.24 | 0.2 | i |
| SER | 14 | 62.86 | 50.86 | 13.37 | 49.49 | 63.9 | o |
| ARG | 15 | 202.59 | 95.58 | 10.04 | 192.55 | 98.5 | o |
| GLU | 16 | 155.43 | 59.84 | 25.05 | 130.38 | 92.3 | o |
| GLU | 17 | 45.66 | 17.81 | 3.71 | 41.96 | 29.7 | |
| MET | 18 | 42.26 | 39.82 | 2.44 | 39.82 | 25.2 | |
| THR | 19 | 130.36 | 93.70 | 34.75 | 95.61 | 90.0 | o |
| LYS | 20 | 128.39 | 82.23 | 6.69 | 121.71 | 74.0 | o |
| ASN | 21 | 132.12 | 39.02 | 14.71 | 117.41 | 100.0 | o |
| GLN | 22 | 71.88 | 17.54 | 5.70 | 66.18 | 46.1 | |
| VAL | 23 | 0.55 | 0.55 | 0.55 | 0.00 | 0.0 | i |
| SER | 24 | 27.04 | 14.16 | 3.04 | 24.01 | 31.0 | |
| LEU | 25 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.0 | i |
| LYS | 26 | 59.33 | 56.45 | 0.00 | 59.33 | 36.1 | |
| CYS | 27 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.0 | i |
| LEU | 28 | 33.08 | 33.08 | 0.00 | 33.08 | 22.6 | |
| VAL | 29 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.0 | i |
| LYS | 30 | 84.57 | 40.83 | 0.00 | 84.57 | 51.4 | o |
| GLY | 31 | 9.17 | 7.06 | 9.17 | 0.00 | 10.5 | i |
| PHE | 32 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.0 | i |
| TYR | 33 | 60.68 | 25.90 | 0.00 | 60.68 | 31.4 | |
| PRO | 34 | 41.14 | 41.14 | 0.00 | 41.14 | 39.1 | |
| SER | 35 | 35.36 | 7.78 | 1.45 | 33.92 | 43.8 | |
| ASP | 36 | 117.07 | 38.94 | 10.61 | 106.45 | 94.2 | o |
| ILE | 37 | 37.58 | 12.18 | 31.59 | 5.99 | 4.1 | i |
| ALA | 38 | 57.23 | 56.66 | 8.29 | 48.94 | 75.4 | o |
| VAL | 39 | 17.62 | 2.52 | 16.23 | 1.38 | 1.1 | i |
| GLU | 40 | 62.29 | 13.95 | 0.00 | 62.29 | 44.1 | |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| TRP | 41 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.0 | i |
| GLU | 42 | 19.50 | 11.41 | 0.00 | 19.50 | 13.8 | i |
| SER | 43 | 11.50 | 6.60 | 5.67 | 5.83 | 7.5 | i |
| ASN | 44 | 136.92 | 45.31 | 38.50 | 98.42 | 86.1 | o |
| GLY | 45 | 68.62 | 43.83 | 68.62 | 0.00 | 78.7 | o |
| GLN | 46 | 125.98 | 51.63 | 0.80 | 125.18 | 87.1 | o |
| PRO | 47 | 82.84 | 69.88 | 12.97 | 69.88 | 66.4 | o |
| GLU | 48 | 23.62 | 4.07 | 10.01 | 13.60 | 9.6 | i |
| ASN | 49 | 154.66 | 39.97 | 37.74 | 116.92 | 100.0 | o |
| ASN | 50 | 69.94 | 23.32 | 3.33 | 66.61 | 58.3 | o |
| TYR | 51 | 63.35 | 27.06 | 16.51 | 46.84 | 24.3 | |
| LYS | 52 | 157.10 | 112.33 | 5.40 | 151.70 | 92.2 | o |
| THR | 53 | 48.93 | 25.37 | 23.71 | 25.22 | 23.7 | |
| THR | 54 | 61.62 | 59.83 | 3.87 | 57.75 | 54.4 | o |
| PRO | 55 | 109.26 | 109.26 | 7.47 | 101.79 | 96.8 | o |
| PRO | 56 | 46.61 | 30.82 | 15.79 | 30.82 | 29.3 | |
| VAL | 57 | 76.20 | 76.20 | 4.63 | 71.57 | 58.5 | o |
| LEU | 58 | 114.88 | 96.67 | 18.21 | 96.67 | 66.1 | o |
| ASP | 59 | 48.22 | 5.78 | 9.18 | 39.04 | 34.6 | |
| SER | 60 | 123.72 | 65.51 | 43.16 | 80.56 | 100.0 | o |
| ASP | 61 | 87.28 | 54.01 | 30.73 | 56.55 | 50.0 | o |
| GLY | 62 | 39.07 | 32.04 | 39.07 | 0.00 | 44.8 | |
| SER | 63 | 1.25 | 0.00 | 0.00 | 1.25 | 1.6 | i |
| PHE | 64 | 36.09 | 36.09 | 0.00 | 36.09 | 20.0 | |
| PHE | 65 | 49.15 | 49.15 | 0.00 | 49.15 | 27.3 | |
| LEU | 66 | 1.65 | 1.65 | 0.00 | 1.65 | 1.1 | i |
| TYR | 67 | 75.47 | 46.74 | 0.29 | 75.18 | 38.9 | |
| SER | 68 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.0 | i |
| LYS | 69 | 95.90 | 74.90 | 0.52 | 95.38 | 58.0 | o |
| LEU | 70 | 0.03 | 0.03 | 0.00 | 0.03 | 0.0 | i |
| THR | 71 | 25.40 | 14.67 | 3.09 | 22.31 | 21.0 | |
| VAL | 72 | 4.01 | 4.01 | 3.97 | 0.04 | 0.0 | i |
| ASP | 73 | 68.35 | 12.16 | 0.76 | 67.59 | 59.8 | o |
| LYS | 74 | 60.62 | 31.68 | 0.27 | 60.35 | 36.7 | |
| SER | 75 | 52.04 | 36.69 | 1.05 | 50.99 | 65.9 | o |
| ARG | 76 | 78.94 | 47.28 | 0.18 | 78.77 | 40.3 | |
| TRP | 77 | 5.62 | 3.18 | 0.00 | 5.62 | 2.5 | i |
| GLN | 78 | 100.88 | 30.49 | 15.98 | 84.90 | 59.1 | o |
| GLN | 79 | 132.35 | 44.53 | 34.29 | 98.06 | 68.2 | o |
| GLY | 80 | 29.49 | 15.52 | 29.49 | 0.00 | 33.8 | |
| ASN | 81 | 54.67 | 11.85 | 9.34 | 45.33 | 39.7 | |
| VAL | 82 | 82.47 | 76.04 | 6.43 | 76.04 | 62.2 | o |
| PHE | 83 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.0 | i |
| SER | 84 | 15.48 | 2.85 | 0.00 | 15.48 | 20.0 | i |
| CYS | 85 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.0 | i |
| SER | 86 | 4.43 | 3.50 | 0.94 | 3.50 | 4.5 | i |
| VAL | 87 | 0.65 | 0.65 | 0.65 | 0.00 | 0.0 | i |
| MET | 88 | 111.53 | 110.73 | 0.80 | 110.73 | 69.9 | o |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| HIS | 89 | 7.99 | 7.99 | 7.99 | 0.00 | 0.0 | i |
| GLU | 90 | 88.29 | 32.90 | 17.51 | 70.78 | 50.1 | o |
| ALA | 91 | 30.79 | 17.10 | 24.66 | 6.13 | 9.4 | i |
| LEU | 92 | 13.43 | 7.16 | 6.37 | 7.06 | 4.8 | i |
| HIS | 93 | 154.33 | 126.31 | 15.44 | 138.89 | 89.8 | o |
| ASN | 94 | 117.65 | 34.62 | 26.99 | 90.66 | 79.3 | o |
| HIS | 95 | 107.74 | 87.65 | 0.01 | 107.72 | 69.7 | o |
| TYR | 96 | 95.92 | 70.08 | 8.95 | 86.97 | 45.0 | |
| THR | 97 | 32.60 | 17.86 | 7.28 | 25.32 | 23.8 | |
| GLN | 98 | 83.59 | 20.55 | 18.53 | 65.05 | 45.3 | |
| LYS | 99 | 88.47 | 45.23 | 4.85 | 83.62 | 50.8 | o |
| SER | 100 | 66.59 | 30.70 | 16.42 | 50.17 | 64.8 | o |
| LEU | 101 | 17.64 | 17.64 | 5.75 | 11.90 | 8.1 | i |
| SER | 102 | 33.57 | 1.17 | 15.51 | 18.06 | 23.3 | |
| LEU | 103 | 77.51 | 71.44 | 7.19 | 70.33 | 48.1 | |
| SER | 104 | 89.68 | 44.61 | 29.48 | 60.20 | 77.8 | o |
| PRO | 105 | 190.73 | 114.96 | 49.16 | 141.57 | 100.0 | o |

---

【0278】 CH3序列及模型化資訊。位置由任意編號指示。具有編號1之殘基GLY對應於EU編號341，具有編號2之殘基GLN對應於EU編號342等，直至具有編號103之殘基LEU具有根據EU編號之位置編號443 (參見圖17中描繪之IMGT表)。

【0279】 CH3區之所用序列包含在位置351及366處之KK異源二聚化變體(在上文編號中分別為位置11及位置26之L351K變體及T366K變體)。向內/向外欄指示胺基酸視為內埋式(i)或經表面暴露的(o)。開放空間指示未經表面暴露之胺基酸之值。

**實例7b：構築體設計**

【0280】 使CH2及CH3中之未經表面之位置及內埋式位置變化以改變併有此等免疫球蛋白區之多聚化蛋白之電荷。產生總計9個例示性變異CH2及CH3區且併入單特異性抗體及多特異性抗體中以與具有野生型CH2及CH3區之單特異性抗體及多特異性抗體進行比較。與實例1中所詳述之方法類似來製備用於表現包含此等分離CH2/CH3區之重鏈分子之構築體。

【0281】 所測試變異體之胺基酸變體描繪於表23中。

表23：人類IgG1之CH2區域及CH3區域中之胺基酸變體(EU編號)

| 區域 | 殘基 | 變體 | 相較於野生型CH區而言之電荷差異 |
|---|---|---|---|
| CH2 | V303 | V303E | -1 |
| | | V303K | +1 |
| CH3 | K370 | K370S | -1 |
| | | K370T | -1 |
| | E382 | E382Q | +1 |
| | | E382T | +1 |
| | E388 | E388L | +1 |
| | | E388M | +1 |
| | | E388T | +1 |

【0282】 變異體全部包含如表20中所指示之CH2區中之Fc沉默變體。變異體進一步含有如表21中所描繪用於DE變異體且如表22中所描繪用於KK變異體之CH3異源二聚化區域。將提供負電荷增加之變異體整合至DE CH3骨架中。對於提供正電荷增加之變異體，將其整合至KK CH3骨架中。

【0283】 產生具有重鏈可變區之各別重鏈，其連同圖13a之共同輕鏈一起形成結合破傷風類毒素(TT)或結合c-MET之胞外部分之可變區域。TT可變區域具有有MF1516之胺基酸序列之重鏈可變區。c-MET可變區域具有有MF3462之胺基酸序列之重鏈可變區。VH MF1516及MF3462之胺基酸序列指示於上文中。具有可相容異源二聚化區之重鏈之產生允許雙特異性抗體之優先形成。具有VH MF1516之重鏈含有DE變異CH3區域，而具有VH3462之重鏈具有KK變異CH3區域。

【0284】 藉由定序確認最終構築體之一致性。為產生雙特異性抗體，一個重鏈含有MF1516可變區、wtCH1區及鉸鏈區、Fc沉默CH2區以及DE CH3區。另一重鏈含有MF3462可變區、wtCH1區及鉸鏈區、Fc沉默CH2區以及KK CH3區。如上文所提及，將表23中所指示之提供負電荷增加之變異體整合至具有DE CH3區之重鏈中。將提供正電荷增加之變異體整合至具有KK CH3區之重鏈中。當本文在下文提及WT時，參考具有上文重鏈及輕鏈、但不具有表23中所描述之變異體中之一者之雙特異性抗體。

【0285】 藉由組合二個重鏈產生雙特異性抗體。表現抗體且使用基本上描述於實例1c中之方法對其進行純化。簡言之：將表現二個重鏈及一個具有圖13a之序列之共同輕鏈之構築體引入Hek293細胞中。轉染後六天，收穫細胞培養基。隨後，用如實例1中所描述之方法自此培養基純化抗體。以此方式產生之抗體列於圖19中。

【0286】 使用具有不含可相容異源二聚化CH3區域之CH3區域之重鏈產生具有表23之變異體之單特異性二價抗體。重鏈具有有MF1516或MF3462胺基酸序列之VH、wtCH1區及鉸鏈區、Fc沉默CH2區以及WT CH3區。將表23中所指示之胺基酸變體引入Fc沉默CH2區或WT CH3區中。將表23中所指示之提供負電荷增加之變異體整合至具有MF1516 VH區之重鏈中。將提供正電荷增加之變異體整合至具有MF3462區之重鏈中。當本文在下文提及WT時，參考具有上文重鏈及輕鏈、但不具有表23中所描述之變異體中之一者之抗體。簡言之：將表現所指示重鏈及具有圖13a之序列之共同輕鏈之構築體引入Hek293細胞中。轉染後六天，收穫細胞培養基。隨後，用如實例1中所描述之方法自此培養基純化抗體。以此方式產生之抗體列於圖19中。

ELISA

【0287】 用c-MET、破傷風類毒素或甲狀腺球蛋白塗佈ELISA盤以評估各種抗體之結合(2.5 μg/ml c-MET (R&D systems目錄號358-MT/CF)、2 μg/ml破傷風類毒素(Statens institute目錄號T162-2)及10 μg/ml甲狀腺球蛋白(Sigma Aldrich目錄號T1126-500MG))。以10、1、0.1、0.01 μg/mL培育抗體。偵測到結合抗體及結合κ輕鏈之基於經1:2000稀釋之HRP結合蛋白質L之二級抗體(Pierce，目錄號32420)。

【0288】 ELISA結果概述於圖18中。

【0289】 抗體PG1337為單特異性二價TT IgG1抗體。抗體PG1025為單特異

性二價甲狀腺球蛋白IgG1抗體。抗體PG2994為單特異性二價cMET IgG1抗體。得出結論：全部雙特異性抗體均以劑量依賴型方式結合c-MET及破傷風類毒素。雙特異性抗體不結合至陰性對照抗原(甲狀腺球蛋白)。具有WT CH2/CH3區或其變異體之抗體之間之結合似乎並不會不同。

**實例8：各別雙特異性抗體之CIEX概況。**

【0290】 CIEX實驗係如實例2中所描述執行。各別抗體之結果描繪於圖20及21中且概述於表24中。

【0291】 表24：具有CH2及CH3分離區域之雙特異性抗體及單特異性抗體之CIEX滯留時間。各別(半)抗體之滯留時間(RT)指示為以下：對於DEDE異源二聚體，RT DEDE；對於雙特異性抗體，RT PB；對於KK半抗體，RT KK；且對於KK異源二聚體，RT KKKK。相對於DEDE分子及KK分子之相對差異(ΔRT)示於最後二欄中。全部所測試變異體均影響CIEX RT。位移方向如所預期。對於V303L變異體，觀測到最佳位移。

| | | | | | RT DEDE | RT PB | RT KK | RT KKKK | ΔRT (PB-DEDE) | ΔRT (PB-KK) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| DE | KK | PG/PB/Po編號 | 第1 MG | 第2 MG | | | | | | |
| WT | WT | PB27538p43 | MG1516C3209 | MG3462C3215 | 12.9 | 14.3 | 18.0 | 19.5 | 1.4 | 3.7 |
| WT | WT | PB27538p44 | MG1516C3209 | MG3462C3215 | 13.0 | 14.3 | 18.0 | 19.5 | 1.3 | 3.7 |
| K370S | WT | PB27538p45 | MG1516C3210 | MG3462C3215 | 12.5 | 14.1 | 17.9 | 19.5 | 1.6 | 3.9 |
| K370T | WT | PB27538p46 | MG1516C3211 | MG3462C3215 | 12.5 | 14.1 | 17.9 | 19.5 | 1.6 | 3.9 |
| V303E | WT | PB27538p47 | MG1516C3212 | MG3462C3215 | 12.3 | 13.9 | 17.9 | 19.4 | 1.6 | 4.0 |
| WT | V303K | PB27538p48 | MG1516C3209 | MG3462C3216 | 13.0 | 15.0 | 19.2 | 20.7 | 2.0 | 4.2 |
| WT | E382Q | PB27538p49 | MG1516C3209 | MG3462C3217 | 13.0 | 14.7 | 18.8 | 20.4 | 1.7 | 4.1 |
| WT | E382T | PB27538p50 | MG1516C3209 | MG3462C3218 | 13.0 | 14.7 | 18.8 | 20.4 | 1.7 | 4.1 |
| WT | E388L | PB27538p51 | MG1516C3209 | MG3462C3219 | 13.0 | 14.7 | 19.0 | 20.6 | 1.7 | 4.3 |
| WT | E388T | PB27538p52 | MG1516C3209 | MG3462C3221 | 12.9 | 14.8 | | | 1.9 | |
| WT | | PG1516p27 | MG1516C3209 | | 12.9 | | | | | |
| K370S | | PG1516p28 | MG1516C3210 | | 12.4 | | | | | |
| K370T | | PG1516p29 | MG1516C3211 | | 11.7 | | | | | |
| V303E | | PG1516p30 | MG1516C3212 | | 12.3 | | | | | |
| | WT | PG3462p29 | MG3462C3215 | | | | 17.7 | 19.3 | | |
| | V303K | PG3462p30 | MG3462C3216 | | | | 19.0 | 20.5 | | |
| | E382Q | PG3462p31 | MG3462C3217 | | | | 18.6 | 20.2 | | |
| | E382T | PG3462p32 | MG3462C3218 | | | | 18.7 | 20.2 | | |
| | E388L | PG3462p33 | MG3462C3219 | | | | 18.8 | 20.3 | | |
| | E388T | PG3462p34 | MG3462C3221 | | | | | | | |

**實例9：各別含有CH2 CH3分離區域之抗體之熔化溫度**

【0292】 如實例6中所解釋，藉由UNCLE測定熱穩定性。

表25：Uncle穩定性

| DE | KK | 孔 | 樣品 | Tm1 (℃) - 半IgG | Tm2 (℃) - Fc部分 | Tm3 (°C) - Fab | Tagg 266 (°C) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| WT | WT | A1 | 0.21 mg/ml PB27538p33 | ((52.7)) | 68.2 | 79.5 | 79.1 |
| WT | WT | B1 | 0.22 mg/ml PB27538p34 | | 67.9 | 79.0 | 78.6 |
| K370S | WT | C1 | 0.21 mg/ml PB27538p35 | | 68.0 | 79.1 | 78.7 |
| K370T | WT | D1 | 0.19 mg/ml PB27538p36 | | 68.5 | 78.6 | 78.6 |
| V303E | WT | E1 | 0.23 mg/ml PB27538p37 | | 66.6 | 78.2 | 77.9 |
| WT | V303K | F1 | 0.21 mg/ml PB27538p38 | | 65.5 | 78.0 | 77.6 |
| WT | E382Q | G1 | 0.2 mg/ml PB27538p39 | | 66.6 | 78.5 | 77.9 |
| WT | E382T | H1 | 0.2 mg/ml PB27538p40 | | 66.5 | 78.0 | 78.7 |
| WT | E388L | I1 | 0.19 mg/ml PB27538p41 | | 66.1 | 78.5 | 78.1 |
| WT | E388T | J1 | 0.18 mg/ml PB27538p42 | | 66.1 | 78.1 | 78.2 |
| WT | | M1 | 0.23 mg/ml PG1516p22 | 55.2 | | 78.5 | 77.7 |
| K370S | | N1 | 0.23 mg/ml PG1516p23 | 56.0 | | 78.7 | 77.9 |
| K370T | | A2 | 0.21 mg/ml PG1516p24 | 56.0 | | 79.5 | 78.8 |
| V303E | | B2 | 0.23 mg/ml PG1516p25 | 55.7 | | 79.5 | 78.6 |
| | WT | C2 | 0.17 mg/ml PG3462p22 | 54.6 | | ? | 81.0 |
| | V303K | D2 | 0.15 mg/ml PG3462p23 | 53.3 | | | 80.2 |
| | E382Q | E2 | 0.15 mg/ml PG3462p24 | 54.4 | | | 80.7 |
| | E382T | F2 | 0.18 mg/ml PG3462p25 | 55.0 | | 81.5 | 80.7 |
| | E388L | G2 | 0.14 mg/ml PG3462p26 | 54.0 | | | 80.7 |
| | E388T | H2 | 0.06 mg/ml PG3462p27 | ? | | | 83.7? |

【0293】大部分具有分離變異體之雙特異性抗體僅展現熔化溫度之適度降低(約2℃-3℃)。

【0294】 TM1：半IgG

在半IgG及一個PB中發現之早期TM有可能歸因於彼PB製備中之半IgG。全部半IgG之TM1為類似的(相較於DE半轉染而言，KK之TM1較低；V303K之TM1最低)。

【0295】 TM2：Fc熔化

具有於KK側上之變體之PB具有經降低之TM2 (降低2℃-3℃)。

V303變體(於DE側及KK側二者上)引起PB中之TM2 s降低。

【0296】 TM3：Fab熔化

如自WT IgG1對照所預期，在全部PB中偵測到約~78-79℃(參見圖20及21)。此指示PB之穩定性不受Fc變體嚴重影響。

【0297】 TAGG：在全部PB中均相同，在KK半IgG中較高

E388T半IgG具有高TAGG。

概述

表26

| PB | | CIEX | | | | | | 熱穩定性 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| DE | KK | RT DEDE | RT PB | RT KK | RT KKKK | ΔRT (PB-DEDE) | ΔRT (PB-KK) | Tm (°C) - Fc | Tagg 266 (°C) |
| WT | WT | 12.9 | 14.3 | 18.0 | 19.5 | 1.4 | 3.7 | 68.2 | 79.1 |
| WT | WT | 13.0 | 14.3 | 18.0 | 19.5 | 1.3 | 3.7 | 67.9 | 78.6 |
| K370S | WT | 12.5 | 14.1 | 17.9 | 19.5 | 1.6 | 3.9 | 68.0 | 78.7 |
| K370T | WT | 12.5 | 14.1 | 17.9 | 19.5 | 1.6 | 3.9 | 68.5 | 78.6 |
| V303E | WT | 12.3 | 13.9 | 17.9 | 19.4 | 1.6 | 4.0 | 66.6 | 77.9 |
| WT | V303K | 13.0 | 15.0 | 19.2 | 20.7 | 2.0 | 4.2 | 65.5 | 77.6 |
| WT | E382Q | 13.0 | 14.7 | 18.8 | 20.4 | 1.7 | 4.1 | 66.6 | 77.9 |
| WT | E382T | 13.0 | 14.7 | 18.8 | 20.4 | 1.7 | 4.1 | 66.5 | 78.7 |
| WT | E388L | 13.0 | 14.7 | 19.0 | 20.6 | 1.7 | 4.3 | 66.1 | 78.1 |
| WT | E388T | 12.9 | 14.8 | | | 1.9 | | 66.1 | 78.2 |

【0298】所測試之CH2變異體及CH3變異體全部有利地影響雙特異性抗體與DEDE分子及KK分子之分離。一些變異體具有較高作用。熱穩定性僅適度地受分離變異體影響。此等相對粗製備物中之半抗體百分比相比於各別分離變異體而言亦相對恆定且與WT類似，有效地具有0%半抗體之E388T除外。

【0299】本發明提供作為本發明之一部分之以下態樣。

態樣

【0300】態樣1. 一種免疫球蛋白CH1區，其包含在一免疫球蛋白中未經表面暴露之一胺基酸之一變體，其中該變體選自

- 一中性胺基酸變一帶負電胺基酸；
- 一帶正電胺基酸變一中性胺基酸；
- 一帶正電胺基酸變一帶負電胺基酸；
- 一中性胺基酸變一帶正電胺基酸；
- 一帶負電胺基酸變一中性胺基酸；以及
- 一帶負電胺基酸變一帶正電胺基酸。

【0301】態樣2. 如態樣1之免疫球蛋白區，其包含在一免疫球蛋白中未經

表面暴露之胺基酸之二個或更多個變體。

【0302】 態樣3. 如態樣1或態樣2之免疫球蛋白區，其為一人類免疫球蛋白區。

【0303】 態樣4. 如態樣1至3中任一態樣之免疫球蛋白區，其中該或該等未經表面暴露之胺基酸為內埋式的。

【0304】 態樣5. 如態樣1至4中任一態樣之免疫球蛋白區，其為一IgG區，較佳地一IgG1區。

【0305】 態樣6. 一種免疫球蛋白CH1區，其包含選自以下之一胺基酸之一變體：T120、K147、D148、Y149、V154、N159、A172、Q175、S190、N201以及K213 (EU編號)。

【0306】 態樣7. 如態樣6之免疫球蛋白CH1區，其包含選自以下之一胺基酸之一變體：D148、Y149、V154、N159、A172、S190以及N201。

【0307】 態樣8. 如態樣6或態樣7之免疫球蛋白CH1區，其包含選自N159及/或N201之一胺基酸之一變體。

【0308】 態樣9. 一種抗體，其包含一如態樣1至8中任一態樣之CH1區。

【0309】 態樣10. 如態樣9之抗體，其包含二個或更多個如態樣1至8中任一態樣之CH1區。

【0310】 態樣11. 如態樣9或態樣10之抗體，其包含不同重鏈。

【0311】 態樣12. 如態樣11之抗體，其為一多特異性抗體。

【0312】 態樣13. 如態樣11或12之多特異性抗體，其中該等重鏈包含可相容異源二聚化區。

【0313】 態樣14. 如態樣13之多特異性抗體，其包含可相容異源二聚化CH3區。

【0314】 態樣15. 如態樣12至14之多特異性抗體，其中該等重鏈中之一者包

含CH3變體L351D及L368E，且該等重鏈中之另一者包含CH3變體T366K及L351K。

【0315】 態樣16. 如態樣9至15中任一態樣之抗體，其為一IgG1抗體。

【0316】 態樣17. 如態樣9至16中任一態樣之抗體，其包含一或多個抗體輕鏈。

【0317】 態樣18. 如態樣9至17中任一態樣之抗體，其包含一共同抗體輕鏈。

【0318】 態樣19. 一種組合物，其包含如態樣1至8中任一態樣之免疫球蛋白區或如態樣9至18中任一態樣之抗體。

【0319】 態樣20. 一種醫藥組合物，其包含如態樣1至8中任一態樣之免疫球蛋白區或如態樣9至18中任一態樣之抗體。

【0320】 態樣21. 一種核酸，其編碼如態樣1至8中任一態樣之CH1區或如態樣9至18中任一態樣之抗體。

【0321】 態樣22. 一種核酸，其編碼如態樣9至18中任一態樣之抗體。

【0322】 態樣23. 一種重組宿主細胞，其包含如態樣21或態樣22之核酸。

【0323】 態樣24. 一種產生如態樣9至18中任一態樣之抗體之方法，其中該方法包含以下步驟：

提供編碼具有如態樣1至8中任一態樣之CH1區之一第一重鏈之一核酸；

提供編碼一第二重鏈之一核酸，其中該第一重鏈及該第二重鏈可相同或不同；

提供編碼一輕鏈之一核酸；

將該核酸引入宿主細胞中且培養該等宿主細胞以表現該或該等核酸；以及藉由執行以下步驟中之至少一個來產生該抗體：

自宿主細胞培養物收集該抗體，

執行收穫物澄清，

執行蛋白質捕獲，

執行陰離子交換層析，以及

執行陽離子交換層析以將該抗體與另一抗體或一抗體片段分離。

【0324】 態樣25. 一種產生如態樣9至18中任一態樣之抗體之方法，其中該方法包含以下步驟：

提供編碼具有如態樣1至8中任一態樣之CH1區之一第一重鏈之一核酸；

提供編碼一第二重鏈之一核酸，其中該第一重鏈及該第二重鏈可相同或不同；

提供編碼一輕鏈之一核酸；

將該核酸引入宿主細胞中且培養該等宿主細胞以表現該或該等核酸；以及

自宿主細胞培養物收集該抗體，以及

在一分離步驟中藉由在一凝膠上進行等電聚焦來將該抗體與其他抗體或抗體片段分離。

【0325】 態樣26. 如態樣24或25之方法，其中該第一重鏈及該第二重鏈包含可相容異源二聚化區，較佳地一可相容CH3異源二聚化區。

【0326】 態樣27. 一種用於產生一多特異性抗體之方法，該多特異性抗體包含等電點不同之一第一重鏈及一第二重鏈，其中該方法包含以下步驟：

提供編碼該第一重鏈之一CH1區之一核酸及編碼該第二重鏈之一CH1區之一核酸，以使得第一經編碼重鏈之等電點與第二經編碼重鏈之等電點不同，其中該等CH1區中之至少一者包含在選自T120、K147、D148、Y149、V154、N159、A172、Q175、S190、N201以及K213 (EU編號)之一位置處之一胺基酸變體，以及

培養宿主細胞以表現該核酸；以及

使用等電點差異自宿主細胞培養物收集該多特異性抗體，此舉進一步包含

以下步驟：

自該宿主細胞培養物收集該抗體，

執行收穫物澄清，

執行蛋白質捕獲，

執行陰離子交換層析，以及

執行陽離子交換層析以將該抗體與另一抗體或一抗體片段分離。

【0327】 態樣28. 一種用於純化一多特異性抗體之方法，該多特異性抗體包含等電點不同之一第一重鏈及一第二重鏈，其中該方法包含以下步驟：

提供編碼該第一重鏈之一CH1區之一核酸及編碼該第二重鏈之一CH1區之一核酸中之二者或任一者，以使得第一經編碼重鏈與第二經編碼重鏈之等電點不同，其中該等CH1區中之至少一者包含在選自T120、K147、D148、Y149、V154、N159、A172、Q175、S190、N201以及K213 (EU編號)之一位置處之一胺基酸變體，以及

培養宿主細胞以表現該核酸；以及

藉由進行等電聚焦自宿主細胞培養物純化該多特異性抗體且將該多特異性抗體與另外抗體或一抗體片段分離。

【0328】 態樣29. 如態樣27或態樣28之方法，其中編碼該第一重鏈之一同源多聚體之核酸、編碼該第二重鏈之一同源多聚體之核酸以及編碼該第一重鏈及該第二重鏈之一異源多聚體之核酸表現為具有不同等電點之蛋白質且在離子交換層析中產生不同滯留時間。

【0329】 態樣30. 如態樣27-29中任一態樣之方法，其中該一或多個胺基酸變體之一或多個位置選自

- 一中性胺基酸變一帶負電胺基酸；

- 一帶正電胺基酸變一中性胺基酸；

- 一帶正電胺基酸變一帶負電胺基酸；

- 一中性胺基酸變一帶正電胺基酸；

- 一帶負電胺基酸變一中性胺基酸；以及

- 一帶負電胺基酸變一帶正電胺基酸。

【0330】 態樣31. 如態樣27至30中任一態樣之方法，其中該第一重鏈及該第二重鏈包含可相容CH3異源二聚化區。

【0331】 態樣32. 如態樣31之方法，其中該等可相容CH3異源二聚化區中之一者包含一L351D及L368E變體且另一者包含一T366K及L351K變體。

【0332】 態樣33. 一種含CH1免疫球蛋白多肽，其包含在位置120、位置147、位置148、位置149、位置154、位置159、位置172、位置175、位置190、位置201或位置213處之一第一帶電胺基酸殘基。

【0333】 態樣34. 如態樣33之含CH1免疫球蛋白多肽，除如態樣33之帶電殘基以外，其亦包含在選自位置120、位置147、位置148、位置149、位置154、位置159、位置172、位置175、位置190、位置201或位置213之一不同位置處之一第二帶電胺基酸殘基。

【0334】 態樣35. 一種含CH1免疫球蛋白多肽，其包含在位置197及/或位置213處之一中性胺基酸殘基或一帶負電胺基酸殘基。

【0335】 態樣36 一種含CH1免疫球蛋白多肽，其包含在位置159處之一中性胺基酸殘基或一帶正電胺基酸殘基及在一鉸鏈位置216處之帶正電胺基酸殘基。

【0336】 態樣37. 一種免疫球蛋白蛋白質，其包含一第一含CH1免疫球蛋白多肽及一第二含CH1免疫球蛋白多肽，其中該第一含CH1免疫球蛋白多肽及/或該第二含CH1免疫球蛋白多肽包含選自在CH1區內未經表面暴露之胺基酸之一或多個胺基酸之一或多個變體，以使得包含該第一含CH1免疫球蛋白多肽及該第

二含CH1免疫球蛋白多肽之該免疫球蛋白蛋白質之等電點不同於僅含有第一CH1-免疫球蛋白多肽之免疫球蛋白蛋白質或僅含有第二CH1-免疫球蛋白多肽之蛋白質的等電點。

【0337】 態樣38. 如態樣37之免疫球蛋白蛋白質，其中該一或多個胺基酸之一或多個變體選自在內埋式CH1區內之胺基酸。

【0338】 態樣39. 一種組合物，其包含如態樣1至18中任一態樣之免疫球蛋白區或抗體，該免疫球蛋白區或抗體進一步包含在選自T197之一胺基酸處及在一鉸鏈位置E216處之一變體。

【0339】 態樣40. 一種免疫球蛋白蛋白質，其包含一第一含CH1區免疫球蛋白多肽及一第二含CH1區免疫球蛋白多肽，其中一個CH1區包含未經表面暴露之一胺基酸之一或多個變體，其中該一胺基酸之一或多個變體來自：

- 一中性胺基酸變一帶負電胺基酸；
- 一帶正電胺基酸變一中性胺基酸；以及
- 一帶正電胺基酸變一帶負電胺基酸；或來自：
- 一中性胺基酸變一帶正電胺基酸；
- 一帶負電胺基酸變一中性胺基酸；以及
- 一帶負電胺基酸變一帶正電胺基酸。

【0340】 態樣41. 一種免疫球蛋白蛋白質，其包含一第一含CH1區免疫球蛋白多肽及一第二含CH1區免疫球蛋白多肽，其中一個CH1區包含未經表面暴露之一胺基酸之一或多個變體，其中該一胺基酸之一或多個變體來自：

- 一中性胺基酸變一帶負電胺基酸；
- 一帶正電胺基酸變一中性胺基酸；以及
- 一帶正電胺基酸變一帶負電胺基酸；

且另一CH1區包含未經表面暴露之一胺基酸之一或多個變體，其中該一胺基

酸之一或多個變體來自：

- 一中性胺基酸變一帶正電胺基酸；

- 一帶負電胺基酸變一中性胺基酸；以及

- 一帶負電胺基酸變一帶正電胺基酸。

【0341】 態樣42. 一種免疫球蛋白蛋白質，其包含一第一含CH1區免疫球蛋白多肽及一第二含CH1區免疫球蛋白多肽，其中該第一含CH1區免疫球蛋白多肽及/或該第二含CH1區免疫球蛋白多肽包含選自在該CH1區內未經表面暴露之胺基酸之一或多個胺基酸之一或多個變體，以使得包含該第一含CH1區免疫球蛋白多肽及該第二含CH1區免疫球蛋白多肽之該免疫球蛋白蛋白質之等電點不同於僅含有第一CH1區免疫球蛋白多肽之免疫球蛋白蛋白質的等電點且不同於僅含有第二CH1區免疫球蛋白多肽之免疫球蛋白蛋白質的等電點。

【0342】 態樣43. 如態樣40至42中任一態樣之免疫球蛋白蛋白質，其包含一人類CH1區。

【0343】 態樣44. 如態樣40至43中任一態樣之免疫球蛋白蛋白質，其為一IgG。

【0344】 態樣45. 如態樣40至44中任一態樣之免疫球蛋白蛋白質，其中該或該等未經表面暴露之胺基酸為內埋式的。

【0345】 態樣46. 如態樣40至44中任一態樣之免疫球蛋白蛋白質，其包含在具有選自T120、K147、D148、Y149、V154、N159、A172、Q175、S190、N201以及K213之一胺基酸之一CH1區中之一胺基酸的一變體。

【0346】 態樣47. 如態樣46之免疫球蛋白蛋白質，其包含選自D148、Y149、V154、N159、A172、S190以及N201之一胺基酸之一變體。

【0347】 態樣48. 如態樣47之免疫球蛋白蛋白質，其包含N159及/或N201之一胺基酸之一變體。

【0348】 態樣49. 如態樣40至48中任一態樣之免疫球蛋白蛋白質，其中該第一含CH1區免疫球蛋白多肽及該第二含CH1區免疫球蛋白多肽為重鏈。

【0349】 態樣50. 如態樣40至49中任一態樣之免疫球蛋白蛋白質，其為一抗體。

【0350】 態樣51. 如態樣50之抗體，其為一雙特異性抗體。

【0351】 態樣52. 如態樣50之抗體，其為一多特異性抗體。

【0352】 態樣53. 如態樣40至52中任一態樣之免疫球蛋白蛋白質，其進一步包含在選自T197之一胺基酸處及在一鉸鏈位置E216處之一變體。

【0353】 態樣54. 一種組合物，其包含如態樣1至8中任一態樣之免疫球蛋白區或如態樣9至18中任一態樣之抗體，該免疫球蛋白區或該抗體進一步包含以下變體中之一或多者：G122P、I199V、N203I、S207T以及V211I。

# 【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種免疫球蛋白CH1、CH2、CH3區或該等區之一組合，所述區包含一在一免疫球蛋白中未經表面暴露之一胺基酸之變體(variation)，其中該變體選自

- 一中性胺基酸變一帶負電胺基酸；
- 一帶正電胺基酸變一中性胺基酸；
- 一帶正電胺基酸變一帶負電胺基酸；
- 一中性胺基酸變一帶正電胺基酸；
- 一帶負電胺基酸變一中性胺基酸；以及
- 一帶負電胺基酸變一帶正電胺基酸。

【請求項2】 如請求項1之免疫球蛋白區，其包含二個或更多個在一免疫球蛋白中未經表面暴露之胺基酸之變體。

【請求項3】 如請求項1或2之免疫球蛋白區，其中該一胺基酸之變體不處於CH1/CL、CH2/CH2區域或CH3/CH3區域界面中。

【請求項4】 如請求項1至3中任一項之免疫球蛋白區，其為一IgG區，較佳為一IgG1區。

【請求項5】 如請求項1至4中任一項之免疫球蛋白區，其中該或該等未經表面暴露之胺基酸為內埋式的(buried)。

【請求項6】 一種免疫球蛋白CH1區，其包含選自以下之一胺基酸之一變體：N159、N201、T120、K147、D148、Y149、V154、A172、Q175、S190以及K213 (EU編號)。

【請求項7】 如請求項5之免疫球蛋白CH1區，其包含選自以下之一胺基酸之一變體：D148、Y149、V154、N159、A172、S190以及N201。

【請求項8】 如請求項6或7之免疫球蛋白CH1區，其包含選自N159及/或

N201之一胺基酸之一變體。

【請求項9】 如請求項1至8中任一項之免疫球蛋白CH1區，其包含二個或更多個該等胺基酸之變體。

【請求項10】如請求項9之免疫球蛋白CH1區，其中該二個或更多個變體包含以下中之二者或更多者：

- 一中性胺基酸變一帶負電胺基酸；

- 一帶正電胺基酸變一中性胺基酸；

- 一帶正電胺基酸變一帶負電胺基酸；

或以下中之二者或更多者：

- 一中性胺基酸變一帶正電胺基酸；

- 一帶負電胺基酸變一中性胺基酸；以及

- 一帶負電胺基酸變一帶正電胺基酸。

【請求項11】如請求項9或10之免疫球蛋白CH1區，其包含選自以下之群之胺基酸之變體：A172/S190/N201、T197/K213、D148/Q175、N159/Q213、K147/Q175、Y149/V154/A172/S190、N201/K213、T120/N201、N201/N159、T120/N159、T120/N201/N159以及N201/K213/N159。

【請求項12】一種免疫球蛋白CH2區，其包含胺基酸V303之一變體。

【請求項13】一種免疫球蛋白CH3區，其包含選自以下之一胺基酸之一變體：K370、E382以及E388，較佳係E388。

【請求項14】如請求項6至13之免疫球蛋白區，其中該變體選自

- 一中性胺基酸變一帶負電胺基酸；

- 一帶正電胺基酸變一中性胺基酸；

- 一帶正電胺基酸變一帶負電胺基酸；

- 一中性胺基酸變一帶正電胺基酸；

- 一帶負電胺基酸變一中性胺基酸；以及

- 一帶負電胺基酸變一帶正電胺基酸。

【請求項15】如請求項1至5之免疫球蛋白區，其包含如請求項6至14之免疫球蛋白區。

【請求項16】一種免疫球蛋白CH1/CL區域、CH2區域或CH3區域，其包含如請求項1至15之免疫球蛋白區。

【請求項17】如請求項16之免疫球蛋白CH2區域，其進一步包含一Fc沉默突變(silent mutation)。

【請求項18】如請求項16之免疫球蛋白CH3區域，其進一步包含一CH3異源二聚化區域(heterodimerization domain)，其較佳包含於一個CH3區中之CH3變體L351D及L368E以及於另一CH3區上之CH3變體T366K及L351K。

【請求項19】一種蛋白質，其包含如請求項16至18之免疫球蛋白區域。

【請求項20】一種抗體，較佳地一種多特異性抗體(multispecific antibody)，其包含如請求項16至19之免疫球蛋白區域。

【請求項21】如請求項20之多特異性抗體，其包含不同重鏈。

【請求項22】如請求項20或21之抗體，其包含有包含選自以下之一或多個變體之一第一重鏈：

- 一中性胺基酸變一帶負電胺基酸；

- 一帶正電胺基酸變一中性胺基酸；

- 一帶正電胺基酸變一帶負電胺基酸；以及

不同於該第一重鏈之包含選自以下之一或多個變體之一第二重鏈：

- 一中性胺基酸變一帶正電胺基酸；

- 一帶負電胺基酸變一中性胺基酸；以及

- 一帶負電胺基酸變一帶正電胺基酸。

【請求項23】如請求項20至22之多特異性抗體，其中該等重鏈包含可相容異源二聚化區。

【請求項24】如請求項23之多特異性抗體，其包含可相容CH3異源二聚化區。

【請求項25】如請求項21至24之多特異性抗體，其中該等重鏈中之一者包含CH3變體L351D及L368E，且該等重鏈中之另一者包含CH3變體T366K及L351K。

【請求項26】如請求項20至25中任一項之抗體，其包含一第一重鏈及一不同第二重鏈，且其中該第一重鏈包含選自以下之一或多個變體：

- 一中性胺基酸變一帶負電胺基酸；

- 一帶正電胺基酸變一中性胺基酸；以及

- 一帶正電胺基酸變一帶負電胺基酸；且

其中該第一重鏈進一步包含CH3變體L351D及L368E；且該第二重鏈包含CH3變體T366K及L351K。

【請求項27】如請求項20至26中任一項之抗體，其包含一第一重鏈及一不同第二重鏈，且其中該第二重鏈包含選自以下之一或多個變體：

- 一中性胺基酸變一帶正電胺基酸；

- 一帶負電胺基酸變一中性胺基酸；以及

- 一帶負電胺基酸變一帶正電胺基酸；且

其中該第一重鏈進一步包含CH3變體L351D及L368E；且該第二重鏈包含CH3變體T366K及L351K。

【請求項28】如1至19之免疫球蛋白區或區域、如請求項20之蛋白質或如請求項21至28之抗體，其包含一表14部分B之一CH1區序列、一CH2區序列及/或一CH3區序列。

【請求項29】如1至18之免疫球蛋白區或區域、如請求項19之蛋白質或如請求項20至27之抗體或如請求項28之免疫球蛋白區或區域、蛋白質或抗體，其包含一人類免疫球蛋白區，較佳係一IgG區，較佳係一IgG1區。

【請求項30】如請求項20至29中任一項之抗體，其為一IgG1抗體。

【請求項31】如請求項20至30中任一項之抗體，其包含一或多個抗體輕鏈。

【請求項32】一種組合物，其包含如1至31之免疫球蛋白區、免疫球蛋白區域、蛋白質或抗體。

【請求項33】一種醫藥組合物，其包含如1至32之免疫球蛋白區、免疫球蛋白區域、蛋白質或抗體且較佳包含一醫藥學上可接受之賦形劑。

【請求項34】一種核酸，其編碼如1至33之免疫球蛋白區、免疫球蛋白區域、蛋白質或抗體。

【請求項35】一種核酸，其編碼如請求項20至31之抗體。

【請求項36】一種重組宿主細胞，其包含如請求項34或35之核酸。

【請求項37】一種產生如請求項20至31中任一項之抗體之方法，其中該方法包含以下步驟：

提供編碼具有如請求項1至15中任一項之CH1、CH2、CH3區或其組合或如請求項16至18之區域之一第一重鏈之核酸；

提供編碼一第二重鏈之一核酸，其中該第一重鏈及該第二重鏈可相同或不同；

提供編碼一輕鏈之一核酸；

將該核酸引入宿主細胞中且培養該等宿主細胞以表現該或該等核酸；以及藉由執行以下步驟中之至少一個來產生該抗體：

自宿主細胞培養物收集該抗體，

執行收穫物澄清(harvest clarification)，

執行蛋白質捕獲，

執行陰離子交換層析，以及

執行陽離子交換層析以將該抗體與另一抗體或一抗體片段分離。

【請求項38】一種產生如請求項20至31中任一項之抗體之方法，其中該方法包含以下步驟：

提供編碼具有如請求項1至15中任一項之CH1、CH2、CH3區或其組合或如請求項16至20之區域之一第一重鏈之一核酸；

提供編碼一第二重鏈之一核酸，其中該第一重鏈及該第二重鏈可相同或不同；

提供編碼一輕鏈之一核酸；

將該核酸引入宿主細胞中且培養該等宿主細胞以表現該或該等核酸；以及

自宿主細胞培養物收集該抗體，以及

在一分離步驟中藉由在一凝膠上進行等電聚焦來將該抗體與其他抗體或抗體片段分離。

【請求項39】如請求項37或38之方法，其中該第一重鏈及該第二重鏈包含可相容異源二聚化區，較佳係一可相容CH3異源二聚化區。

【請求項40】一種用於產生一多特異性抗體之方法，該多特異性抗體包含等電點不同之一第一重鏈及一第二重鏈，其中該方法包含以下步驟：

提供編碼該第一重鏈之一CH1、CH2、CH3區或其組合之一核酸及編碼該第二重鏈之一CH1、CH2、CH3區或其組合之一核酸，以使得第一經編碼重鏈之等電點與第二經編碼重鏈之等電點不同，其中該等CH1區中之至少一者包含在選自N159、N201、T120、K147、D148、Y149、V154、A172、Q175、S190以及K213 (EU編號)之一位置處之一胺基酸變體或在位置V303 (EU編號)處之一CH2區胺基酸變體或在選自K370、E382以及E388 (EU編號)之一位置處之一CH3區胺基酸變

體或該等CH區胺基酸變體之一組合，以及

培養宿主細胞以表現該核酸；以及

利用等電點差異自宿主細胞培養物收集該多特異性抗體，其進一步包含以下步驟：

自該宿主細胞培養物收集該抗體，

執行收穫物澄清，

執行蛋白質捕獲，

執行陰離子交換層析，以及

執行陽離子交換層析以將該抗體與另一抗體或一抗體片段分離。

【請求項41】一種用於純化一多特異性抗體之方法，該多特異性抗體包含等電點不同之一第一重鏈及一第二重鏈，其中該方法包含以下步驟：

提供編碼該第一重鏈之一CH1、CH2、CH3區或其一組合之一核酸及編碼該第二重鏈之一CH1、CH2、CH3區或其區一組合之一核酸中之二者或任一者，以使得第一經編碼重鏈與第二經編碼重鏈之等電點不同，其中該等區中之至少一者包含在選自N159、N201、T120、K147、D148、Y149、V154、A172、Q175、S190以及K213 (EU編號)之一位置處之一CH1區胺基酸變體或在位置V303 (EU編號)處之一CH2區胺基酸變體或在選自K370、E382以及E388 (EU編號)之一位置處之一CH3區胺基酸變體或該等CH區胺基酸變體之一組合，以及

培養宿主細胞以表現該核酸；以及

藉由進行等電聚焦自宿主細胞培養物純化該多特異性抗體且將該多特異性抗體與另外抗體或一抗體片段分離。

【請求項42】如請求項40或41之方法，其中編碼該第一重鏈之一同源多聚體(homomultimer)之核酸、編碼該第二重鏈之一同源多聚體之核酸以及編碼該第一重鏈及該第二重鏈之一異源多聚體(heteromultimer)之核酸表現為具有不同等

電點之蛋白質且在離子交換層析中產生不同滯留時間。

【請求項43】如請求項40至42中任一項之方法，其中該一或多個胺基酸變體之一或多個位置選自

- 一中性胺基酸變一帶負電胺基酸；

- 一帶正電胺基酸變一中性胺基酸；

- 一帶正電胺基酸變一帶負電胺基酸；

- 一中性胺基酸變一帶正電胺基酸；

- 一帶負電胺基酸變一中性胺基酸；以及

- 一帶負電胺基酸變一帶正電胺基酸。

【請求項44】如請求項40至43中任一項之方法，其中該第一重鏈及該第二重鏈包含可相容CH3異源二聚化區。

【請求項45】如請求項40至44中任一項之方法，其中該第一重鏈包含選自以下之一或多個變體：

- 一中性胺基酸變一帶負電胺基酸；

- 一帶正電胺基酸變一中性胺基酸；

- 一帶正電胺基酸變一帶負電胺基酸；且

不同於該第一重鏈之該第二重鏈包含選自以下之一或多個變體：

- 一中性胺基酸變一帶正電胺基酸；

- 一帶負電胺基酸變一中性胺基酸；以及

- 一帶負電胺基酸變一帶正電胺基酸。

【請求項46】如請求項44或45之方法，其中該等可相容CH3異源二聚化區中之一者包含一L351D及L368E變體且另一者包含一T366K及L351K變體。

【請求項47】如請求項44至46中任一項之方法，其中該第一重鏈包含CH3變體L351D及L368E且該第二重鏈包含CH3變體T366K及L351K。

【請求項48】一種含CH1免疫球蛋白多肽，其包含在位置159、位置201、位置120、位置147、位置148、位置149、位置154、位置172、位置175、位置190或位置213處之一第一帶電胺基酸殘基。

【請求項49】如請求項48之含CH1免疫球蛋白多肽，其除該帶電殘基以外，亦包含在選自位置159、位置201、位置120、位置147、位置148、位置149、位置154、位置172、位置175、位置190或位置213之一不同位置處之一第二帶電胺基酸殘基。

【請求項50】一種含CH1免疫球蛋白多肽，其包含在位置197及/或位置213處之一中性胺基酸殘基或一帶負電胺基酸殘基。

【請求項51】一種含CH1免疫球蛋白多肽，其包含在位置159處之一中性胺基酸殘基或一帶正電胺基酸殘基及在一鉸鏈位置216處之帶正電胺基酸殘基。

【請求項52】一種免疫球蛋白蛋白質，其包含一第一含CH1免疫球蛋白多肽及一第二含CH1免疫球蛋白多肽，其中該第一含CH1免疫球蛋白多肽及/或該第二含CH1免疫球蛋白多肽包含選自在CH1區內未經表面暴露之胺基酸之一或多個胺基酸之一或多個變體，以使得包含該第一含CH1免疫球蛋白多肽及該第二含CH1免疫球蛋白多肽之該免疫球蛋白蛋白質之等電點不同於僅含有第一CH1-免疫球蛋白多肽之免疫球蛋白蛋白質或僅含有第二CH1-免疫球蛋白多肽之蛋白質的等電點。

【請求項53】如請求項52之免疫球蛋白蛋白質，其中該選自在CH1區內之胺基酸之一或多個胺基酸之一或多個變體為內埋式的。

【請求項54】一種組合物，其包含如請求項1至31中任一項之免疫球蛋白區、免疫球蛋白區域或抗體，該免疫球蛋白區、免疫球蛋白區域或抗體進一步包含在選自T197之一胺基酸處及在一鉸鏈位置E216處之一變體。

【請求項55】一種免疫球蛋白蛋白質，其包含一第一含CH1區免疫球蛋白

多肽及一第二含CH1區免疫球蛋白多肽，其中一個CH1區包含未經表面暴露之一胺基酸之一或多個變體，其中該一胺基酸之一或多個變體來自：

- 一中性胺基酸變一帶負電胺基酸；

- 一帶正電胺基酸變一中性胺基酸；以及

- 一帶正電胺基酸變一帶負電胺基酸；或者

- 一中性胺基酸變一帶正電胺基酸；

- 一帶負電胺基酸變一中性胺基酸；以及

- 一帶負電胺基酸變一帶正電胺基酸。

【請求項56】一種免疫球蛋白蛋白質，其包含一第一含CH1區免疫球蛋白多肽及一第二含CH1區免疫球蛋白多肽，其中一個CH1區包含未經表面暴露之一胺基酸之一或多個變體，其中該一胺基酸之一或多個變體來自：

- 一中性胺基酸變一帶負電胺基酸；

- 一帶正電胺基酸變一中性胺基酸；以及

- 一帶正電胺基酸變一帶負電胺基酸；

且另一CH1區包含未經表面暴露之一胺基酸之一或多個變體，其中該一胺基酸之一或多個變體來自：

- 一中性胺基酸變一帶正電胺基酸；

- 一帶負電胺基酸變一中性胺基酸；以及

- 一帶負電胺基酸變一帶正電胺基酸。

【請求項57】一種免疫球蛋白蛋白質，其包含一第一含CH1區免疫球蛋白多肽及一第二含CH1區免疫球蛋白多肽，其中該第一含CH1區免疫球蛋白多肽及/或該第二含CH1區免疫球蛋白多肽包含選自在該CH1區內未經表面暴露之胺基酸之一或多個胺基酸之一或多個變體，以使得包含該第一含CH1區免疫球蛋白多肽及該第二含CH1區免疫球蛋白多肽之該免疫球蛋白蛋白質之等電點不同於僅

含有第一CH1區免疫球蛋白多肽之免疫球蛋白蛋白質的等電點且不同於僅含有第二CH1區免疫球蛋白多肽之免疫球蛋白蛋白質的等電點。

【請求項58】如請求項55至57中任一項之免疫球蛋白蛋白質，其包含一人類CH1區。

【請求項59】如請求項55至58中任一項之免疫球蛋白蛋白質，其為一IgG。

【請求項60】如請求項55至59中任一項之免疫球蛋白蛋白質，其中該或該等未經表面暴露之胺基酸為內埋式的。

【請求項61】如請求項55至60中任一項之免疫球蛋白蛋白質，其包含在具有選自T120、K147、D148、Y149、V154、N159、A172、Q175、S190、N201以及K213之一胺基酸之一CH1區中之一胺基酸的一變體。

【請求項62】如請求項61之免疫球蛋白蛋白質，其包含選自D148、Y149、V154、N159、A172、S190以及N201之一胺基酸之一變體。

【請求項63】如請求項62之免疫球蛋白蛋白質，其包含N159及/或N201之一胺基酸之一變體。

【請求項64】如請求項55至63中任一項之免疫球蛋白蛋白質，其中該第一含CH1區免疫球蛋白多肽及該第二含CH1區免疫球蛋白多肽為重鏈。

【請求項65】如請求項55至64中任一項之免疫球蛋白蛋白質，其為一抗體。

【請求項66】如請求項65之抗體，其為一多特異性抗體。

【請求項67】如請求項65或66之抗體，其為一雙特異性抗體。

【請求項68】如請求項55至67中任一項之免疫球蛋白蛋白質，其進一步包含在選自T197之一胺基酸處及在一鉸鏈位置E216處之一變體。

【請求項69】一種組合物，其包含如請求項1至8中任一項之免疫球蛋白區或如請求項9至31中任一項之抗體，該免疫球蛋白區或該抗體進一步包含以下變體中之一或多者：G122P、I199V、N203I、S207T以及V211I。

【請求項70】一種含CH2免疫球蛋白多肽，其包含在位置303處之一帶電胺基酸殘基。

【請求項71】一種含CH3免疫球蛋白多肽，其包含在選自位置370、位置382或位置388之一位置處之一不帶電胺基酸殘基。

【請求項72】如請求項70或請求項71之含CH2免疫球蛋白多肽及/或含CH3免疫球蛋白多肽，其包含選自在位置303處之一帶電胺基酸殘基或在位置370、位置382或位置388處之一不帶電胺基酸殘基之胺基酸變體中之二個或更多個。

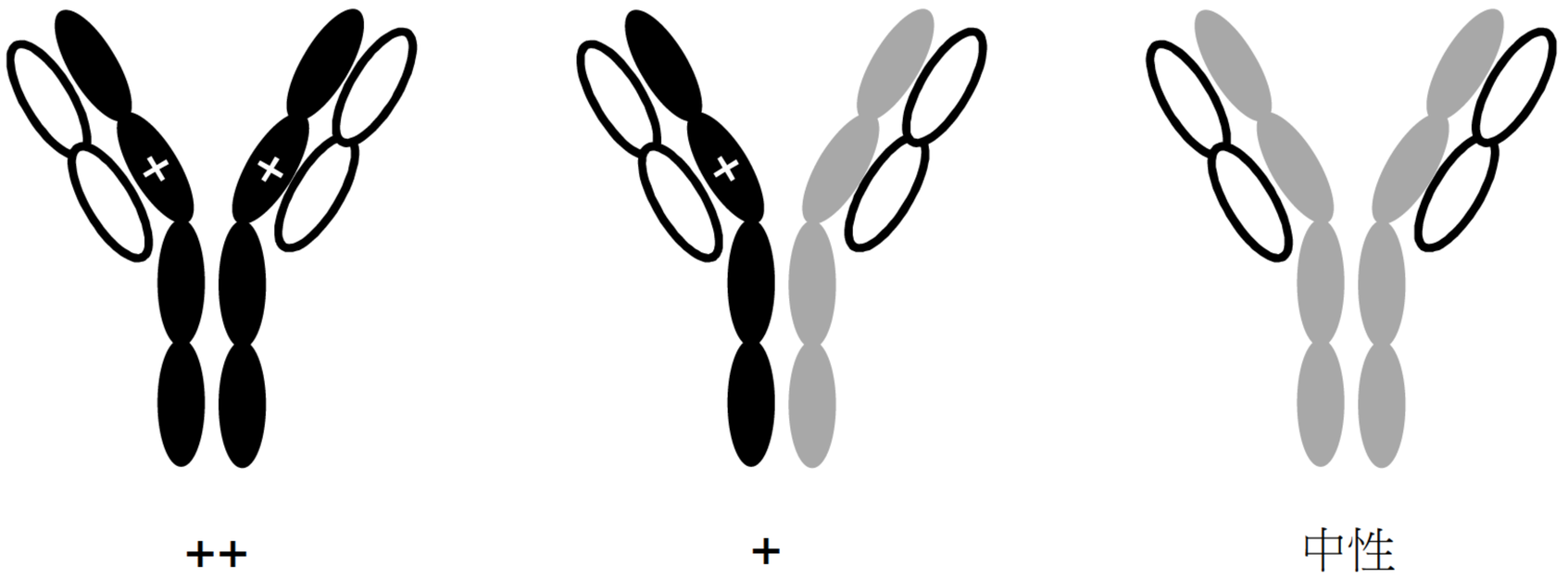
【請求項73】如請求項70至72之含CH2免疫球蛋白多肽及/或含CH3免疫球蛋白多肽，其為一抗體，較佳為一多特異性抗體。

【請求項74】如請求項73之抗體，其包含在一鉸鏈位置216處之帶正電胺基酸殘基。

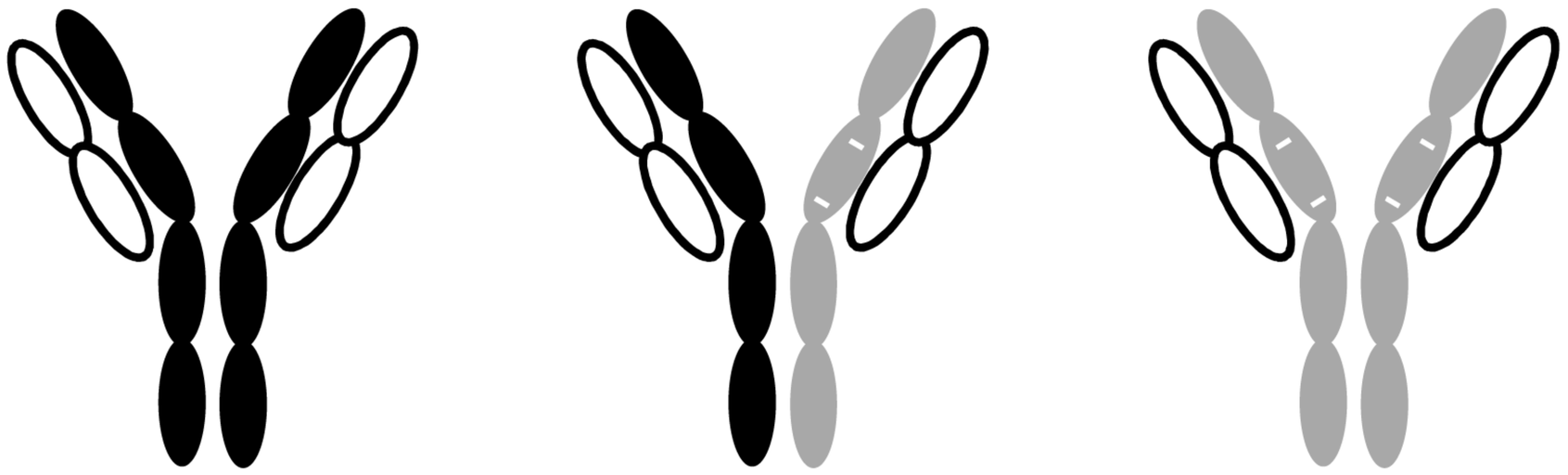
【請求項75】如請求項9至31中任一項之抗體，其進一步包含在選自T197之一胺基酸處及在一鉸鏈位置E216處之一變體。

【請求項76】一種組合物，其包含如請求項1至8中任一項之免疫球蛋白區或如請求項9至31、73至75中任一項之抗體，該免疫球蛋白區或該抗體進一步包含以下變體中之一或多者：G122P、I199V、N203I、S207T以及V211I。

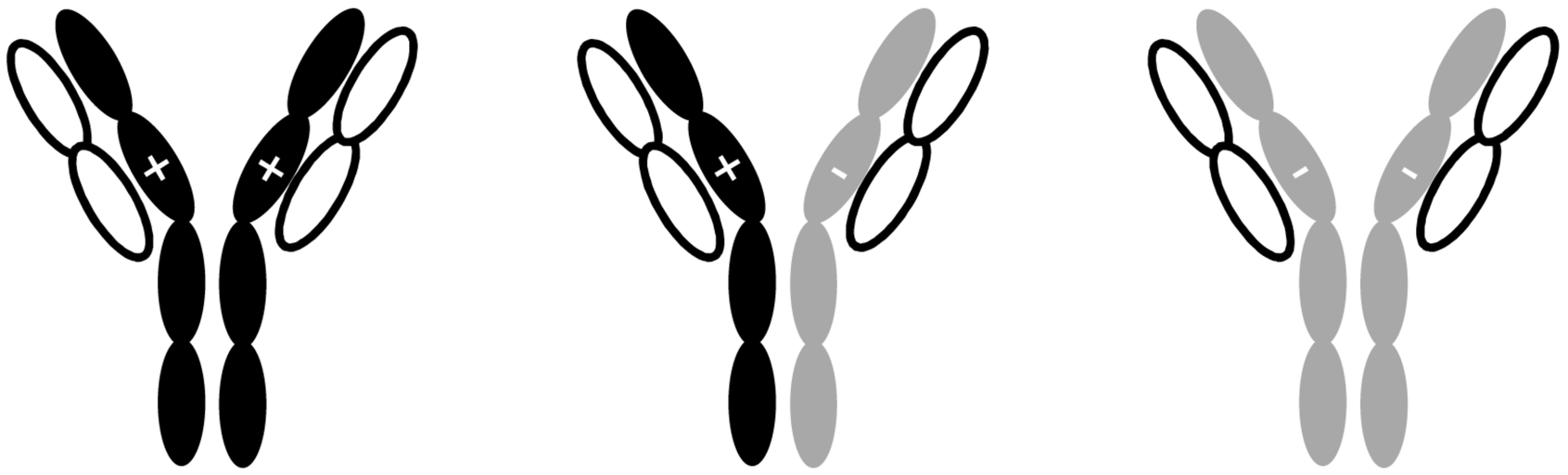
# 【發明圖式】



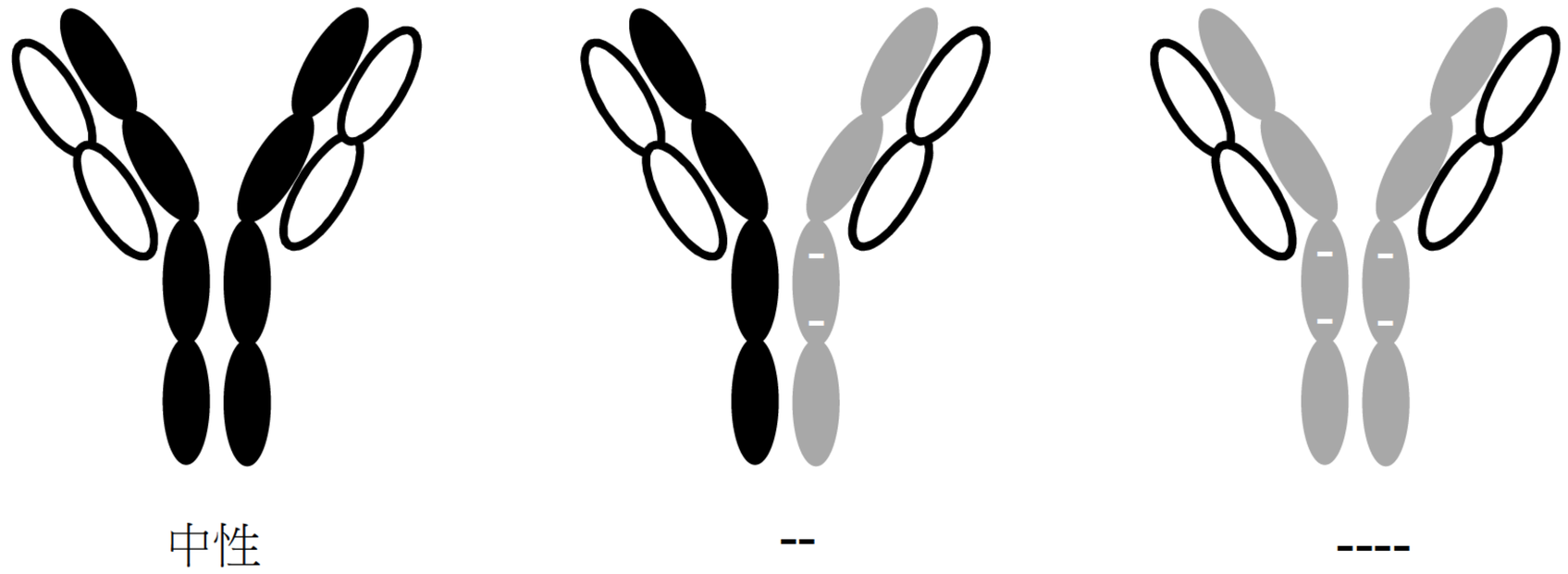

【圖1A】



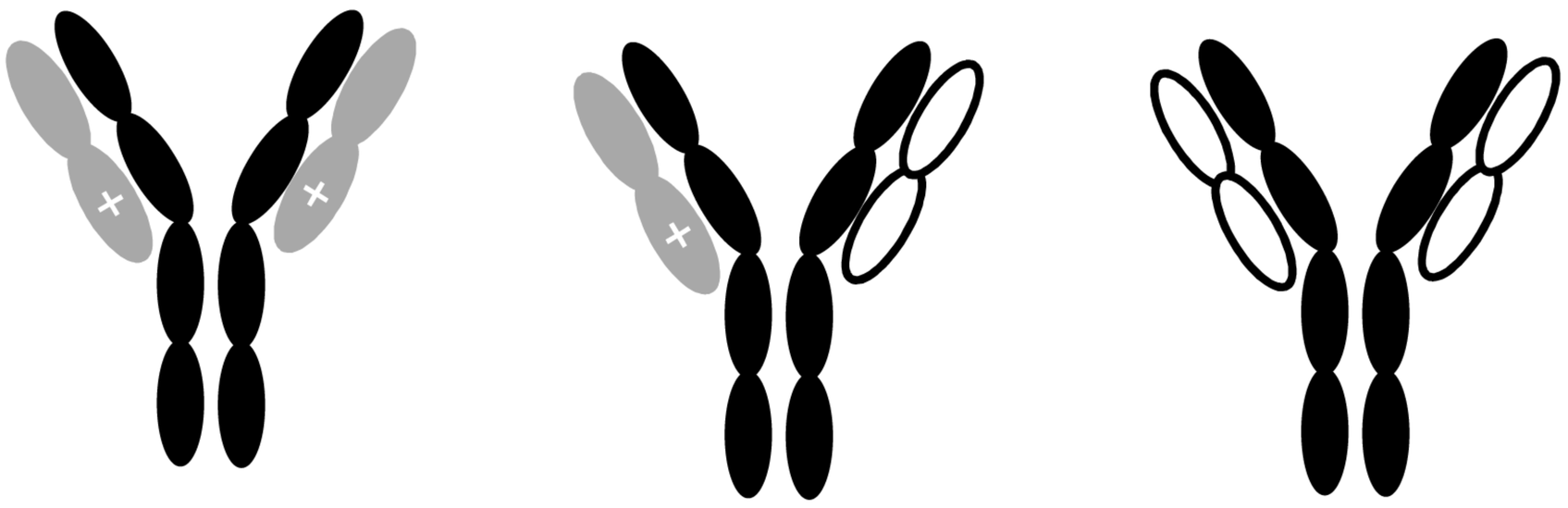

【圖1B】



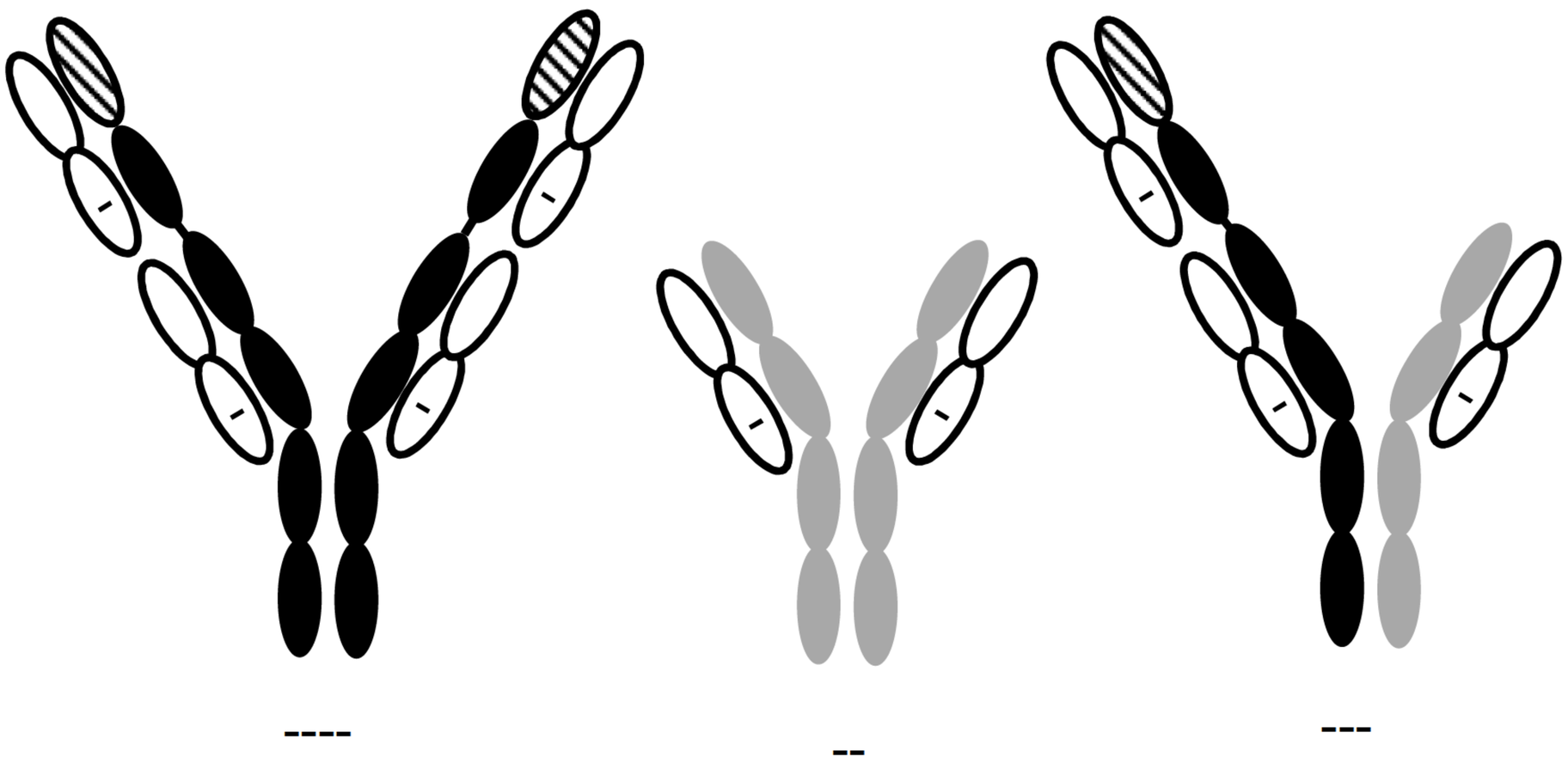

【圖1C】



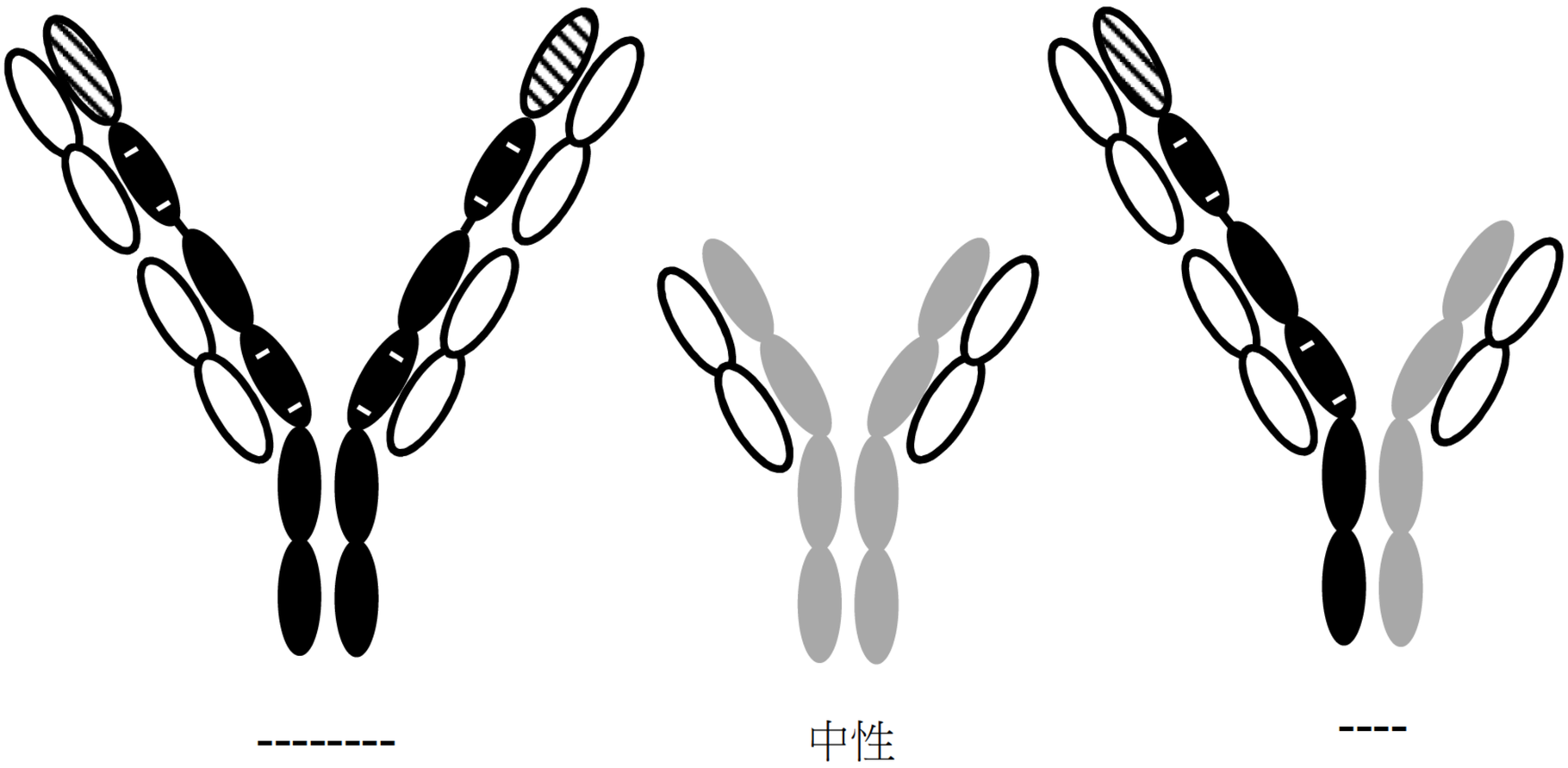

【圖1D】



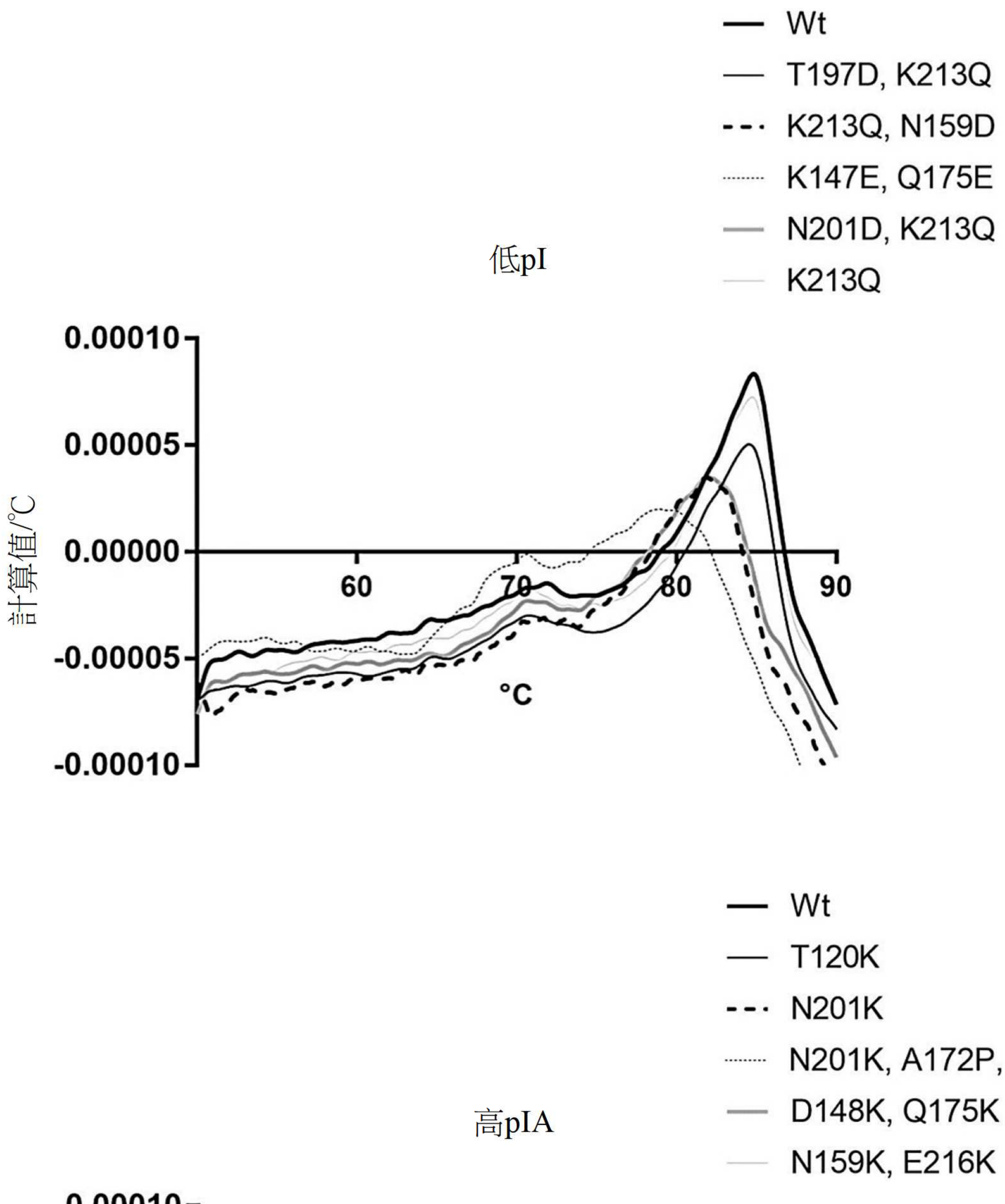

【圖1E】



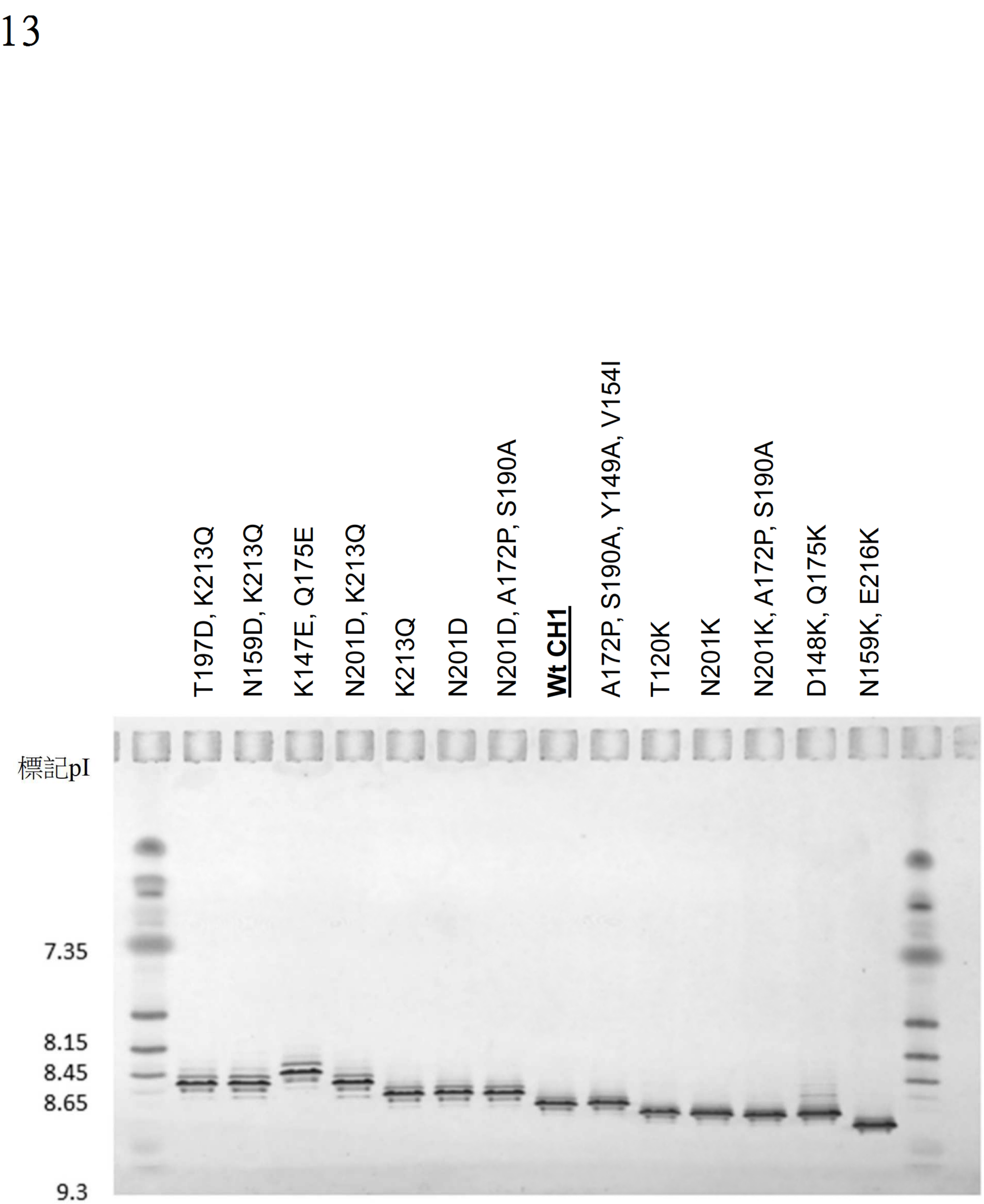

【圖2A】



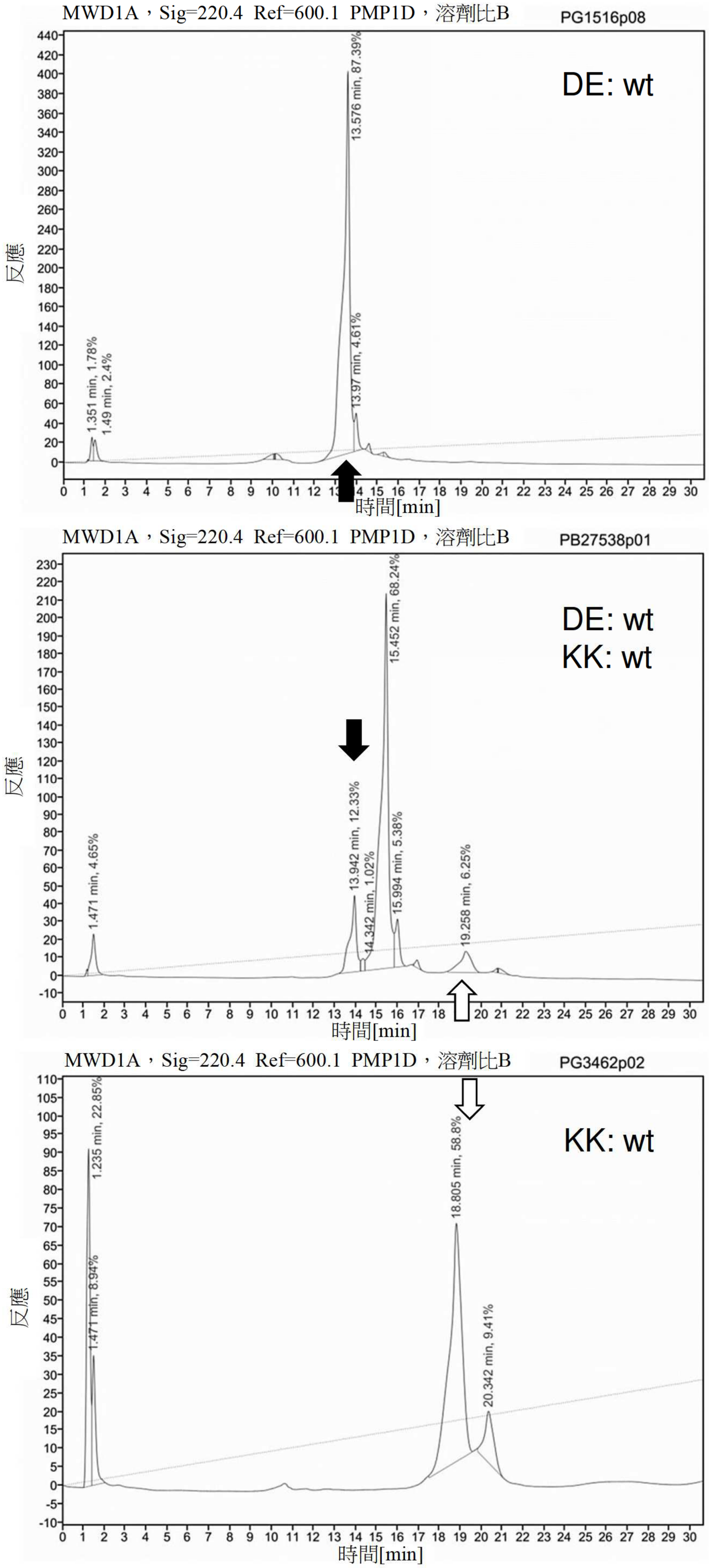

【圖2B】


Wt
T197D, K213Q
K213Q, N159D
K147E, Q175E
N201D, K213Q
K213Q
低pI
0.00010
0.00005
0.00000
-0.00005
-0.00010
計算值/°C
60
70
80
90
°C
Wt
T120K
N201K
N201K, A172P, S190A
D148K, Q175K
N159K, E216K
高pIA
0.00010
0.00005
0.00000
-0.00005
-0.00010
計算值/°C
60
70
80
90
°C

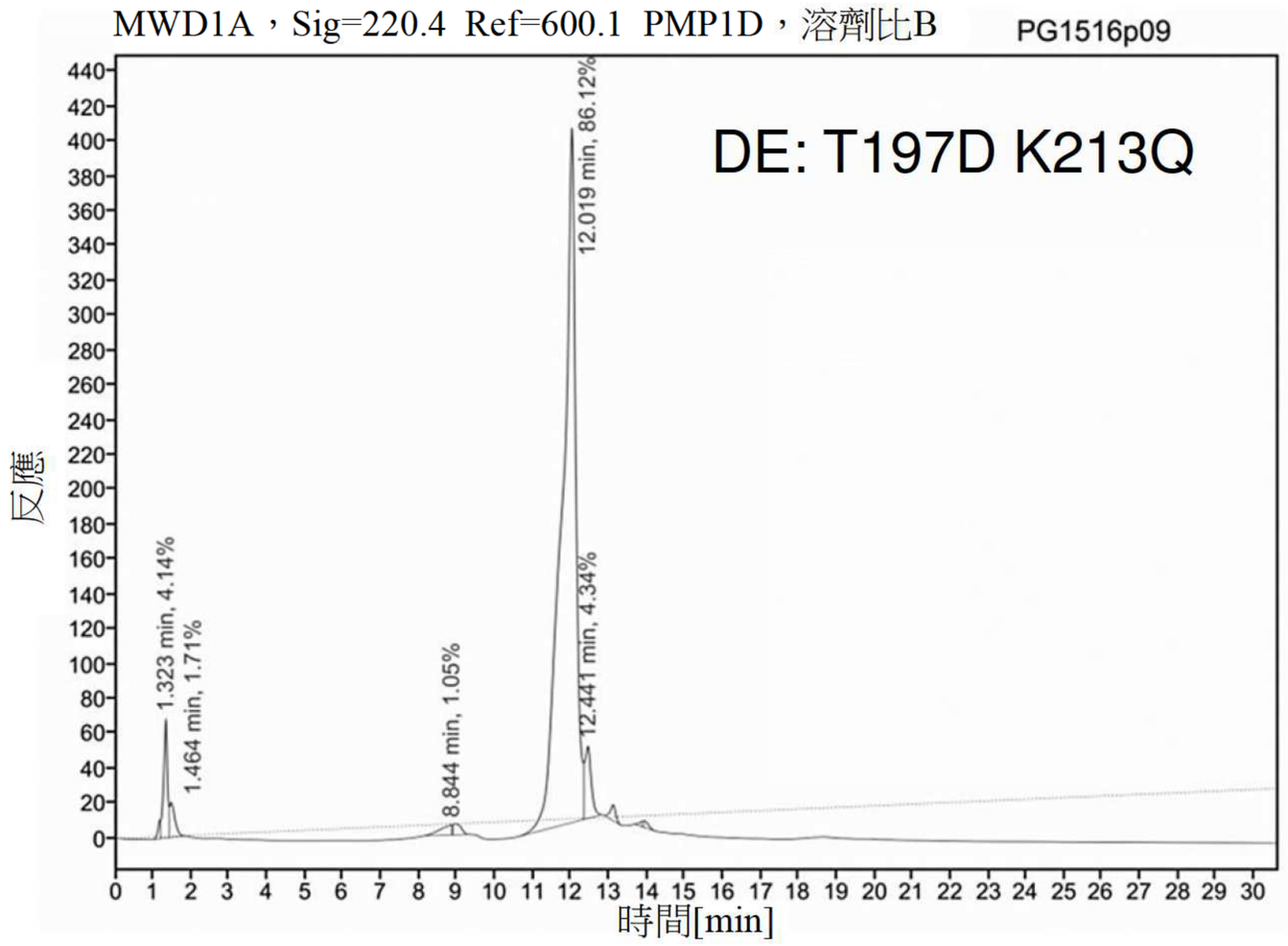
【圖3】

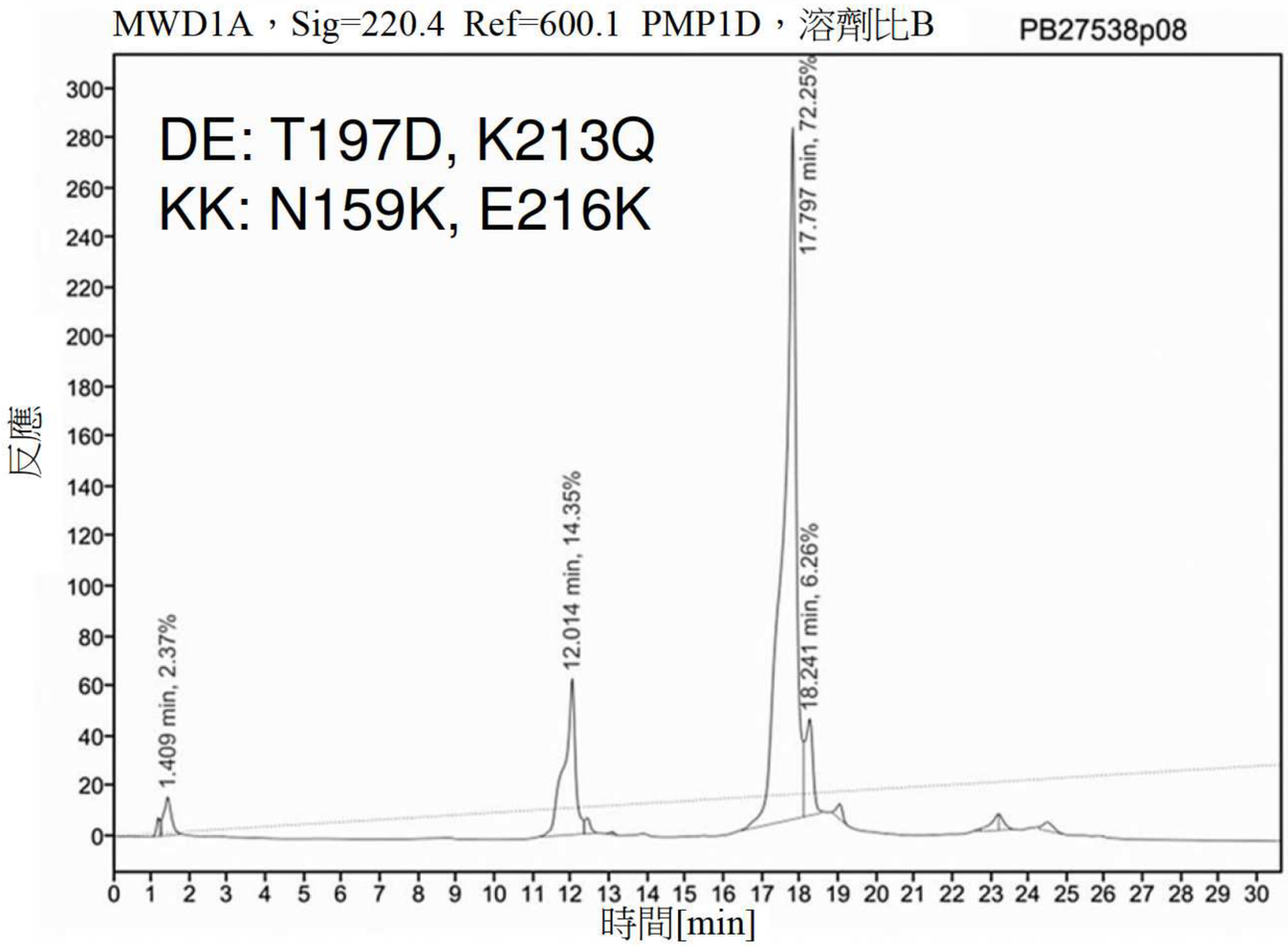

T197D, K213Q
N159D, K213Q
K147E, Q175E
N201D, K213Q
K213Q
N201D
N201D, A172P, S190A
Wt CH1
A172P, S190A, Y149A,
T120K
N201K
N201K, A172P, S190A
D148K, Q175K
N159K, E216K
V154I
標記pI
7.35
8.15
8.45
8.65
9.3

【圖4】

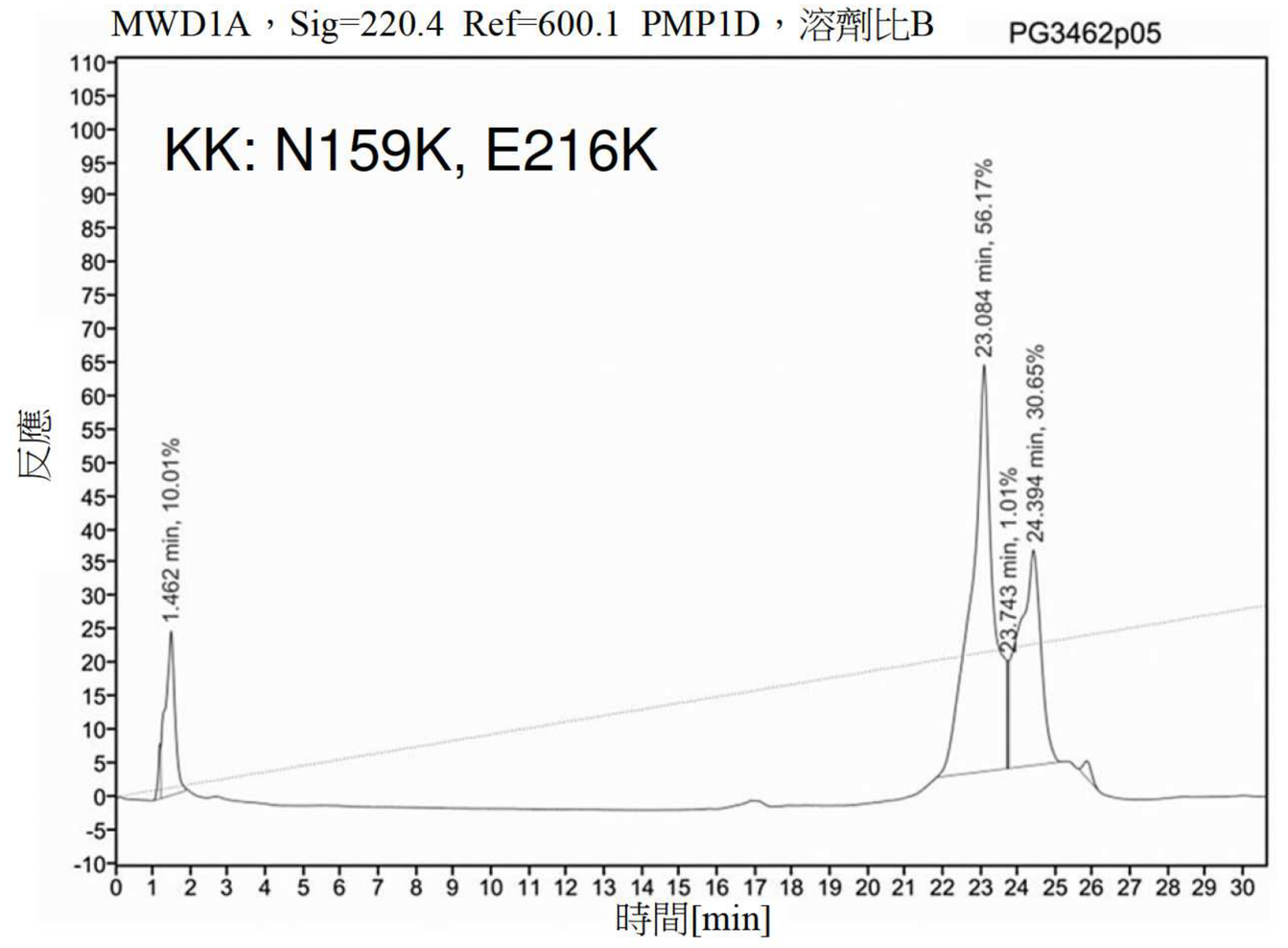

MWD1A，Sig=220.4 Ref=600.1 PMP1D，溶劑比B
PG1516p08
DE: wt
13.576 min, 87.39%
1.351 min, 1.78%
1.49 min, 2.4%
13.97 min, 4.61%
反應
時間[min]
MWD1A，Sig=220.4 Ref=600.1 PMP1D，溶劑比B
PB27538p01
DE: wt
KK: wt
15.452 min, 68.24%
13.942 min, 12.33%
14.342 min, 1.02%
15.994 min, 5.38%
1.471 min, 4.65%
19.258 min, 6.25%
反應
時間[min]
MWD1A，Sig=220.4 Ref=600.1 PMP1D，溶劑比B
PG3462p02
KK: wt
1.235 min, 22.85%
1.471 min, 8.94%
18.805 min, 58.8%
20.342 min, 9.41%
反應
時間[min]

【圖5】

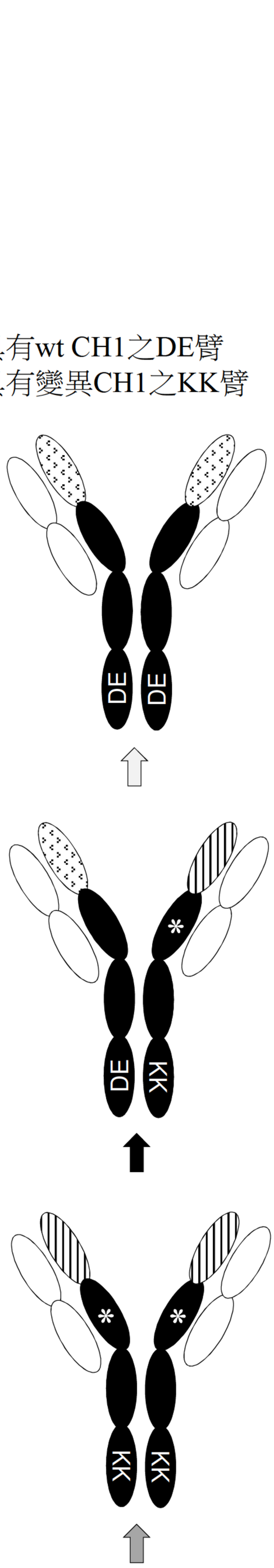

MWD1A，Sig=220.4 Ref=600.1 PMP1D，溶劑比B
PG1516p09
DE: T197D K213Q
12.019 min, 86.12%
1.323 min, 4.14%
1.464 min, 1.71%
8.844 min, 1.05%
12.441 min, 4.34%
反應
時間[min]

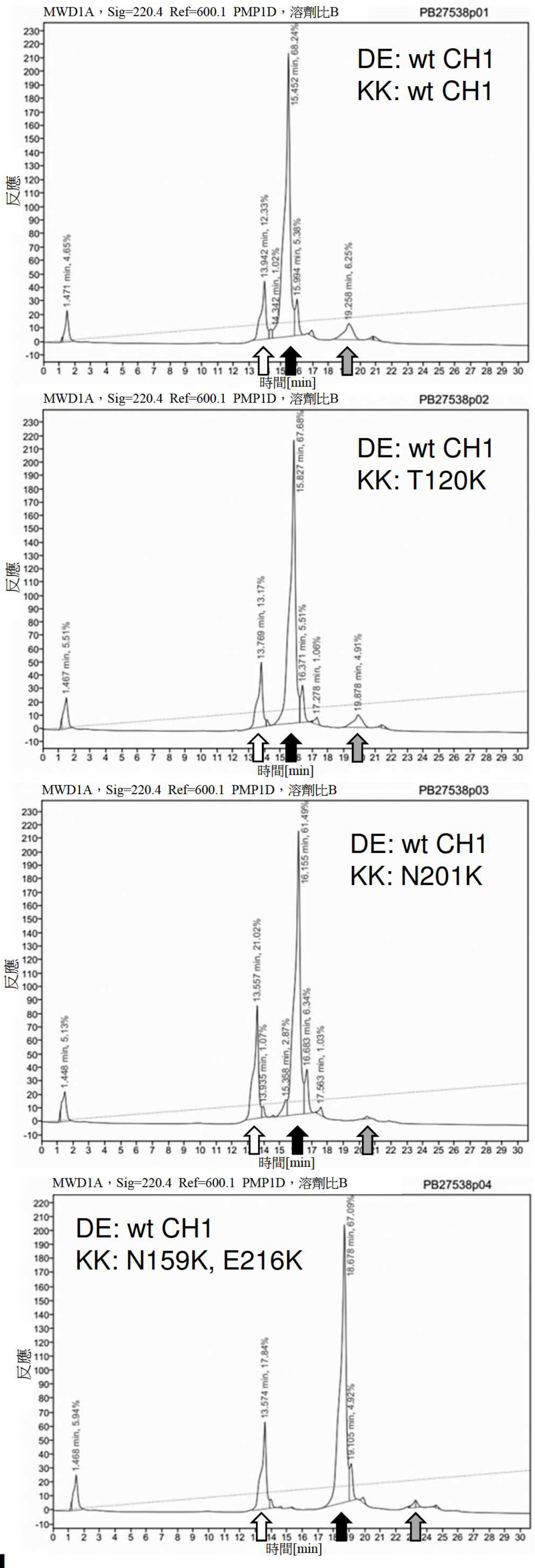

MWD1A，Sig=220.4 Ref=600.1 PMP1D，溶劑比B
PB27538p08
DE: T197D, K213Q
KK: N159K, E216K
17.797 min, 72.25%
1.409 min, 2.37%
12.014 min, 14.35%
18.241 min, 6.26%
反應
時間[min]

【圖6】


MWD1A，Sig=220.4 Ref=600.1 PMP1D，溶劑比B
PG3462p05
KK: N159K, E216K
23.084 min, 56.17%
1.462 min, 10.01%
23.743 min, 1.01%
24.394 min, 30.65%
反應
時間[min]

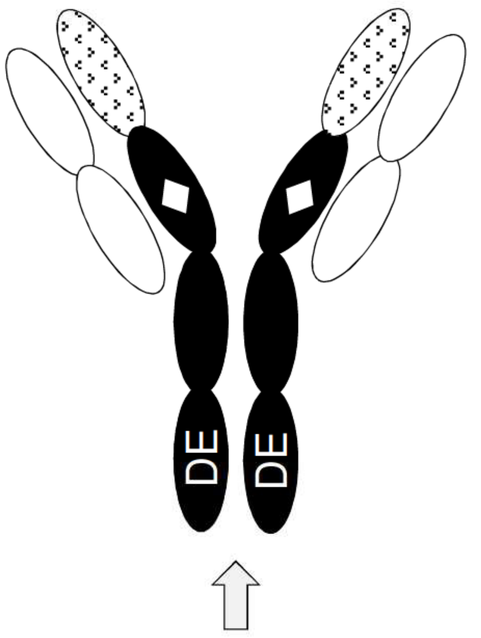
具有wt CH1之DE臂
具有變異CH1之KK臂

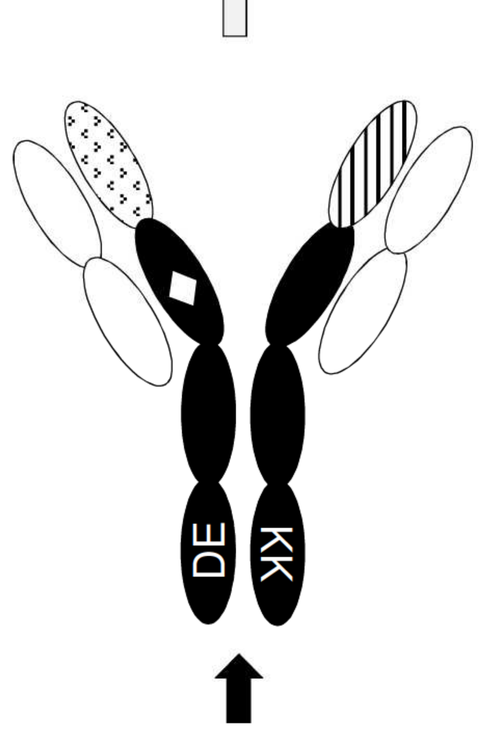


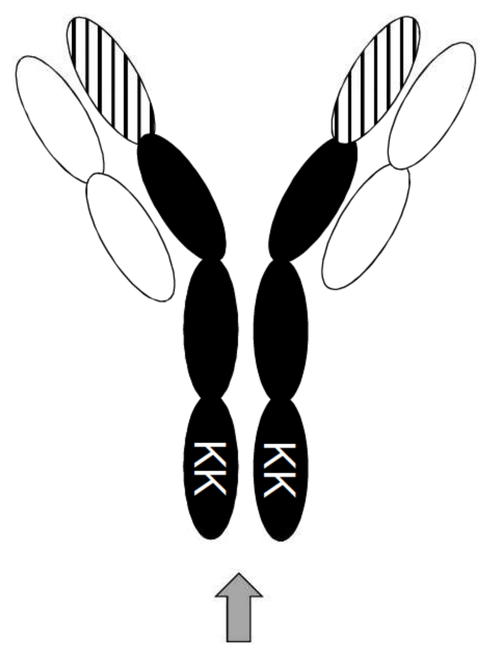



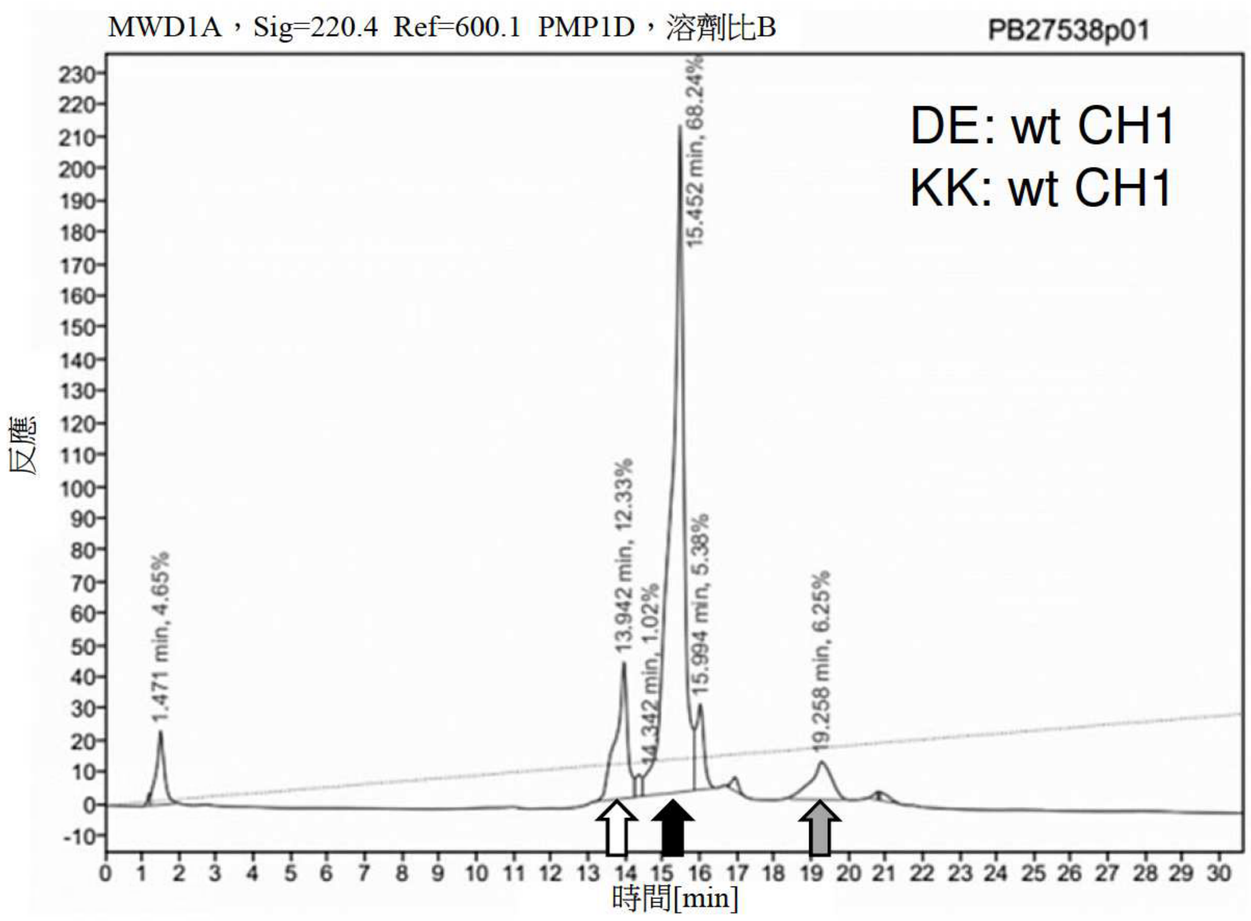

【圖7】

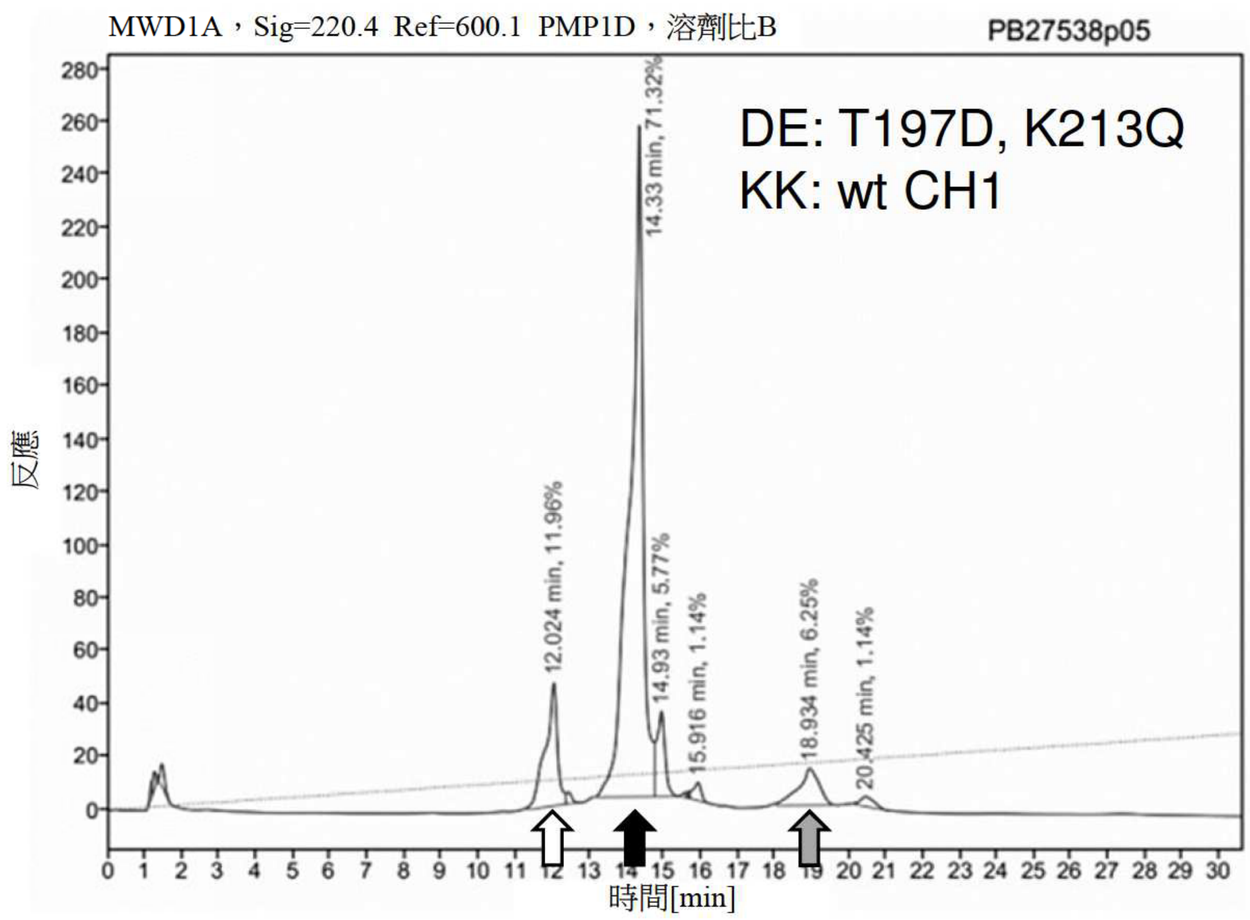
具有變異CH1之DE臂及
具有wt CH1之KK臂

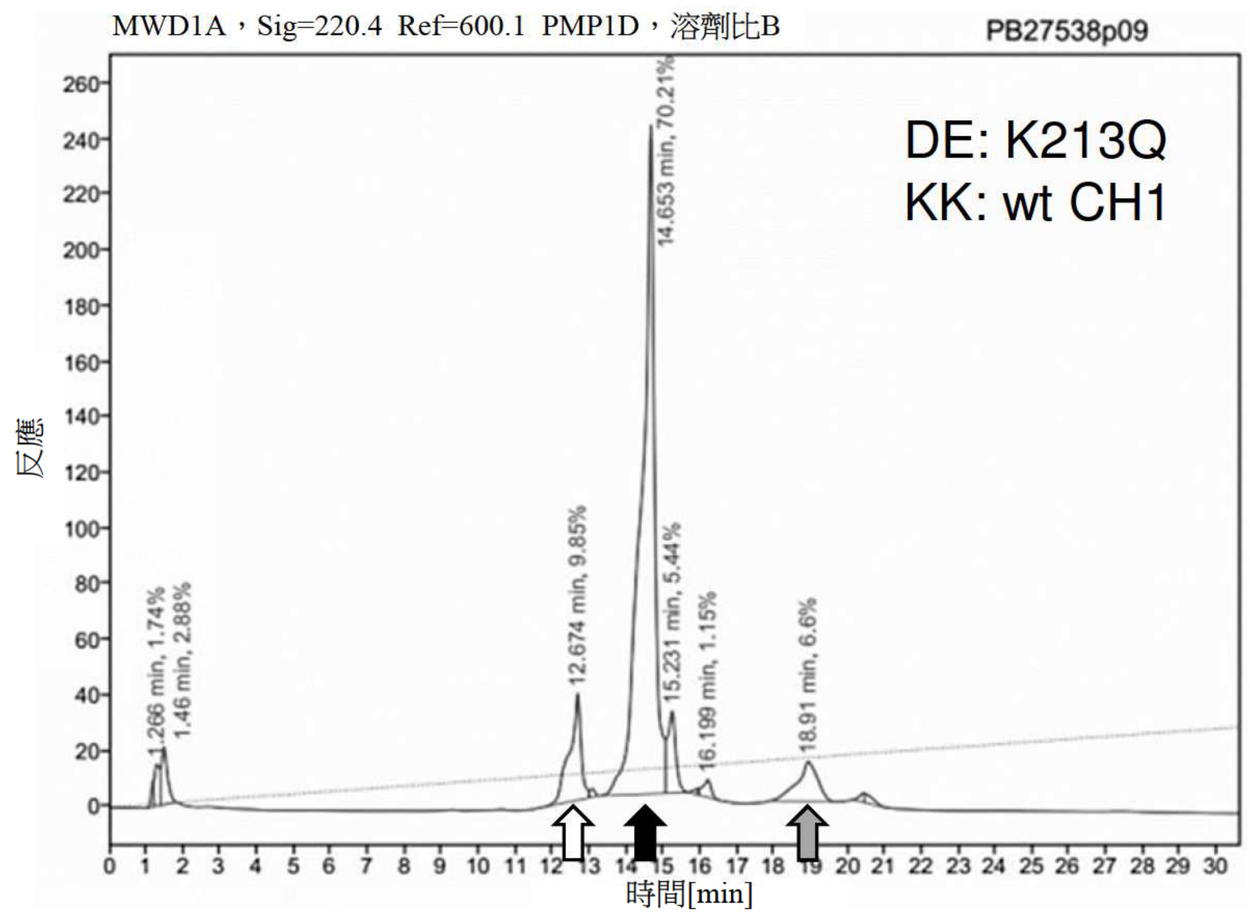


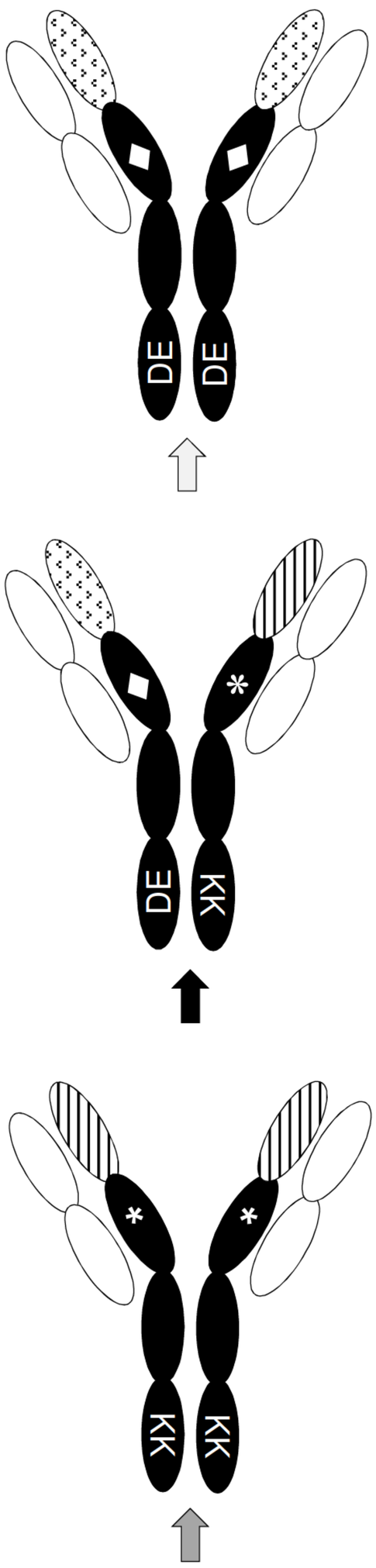



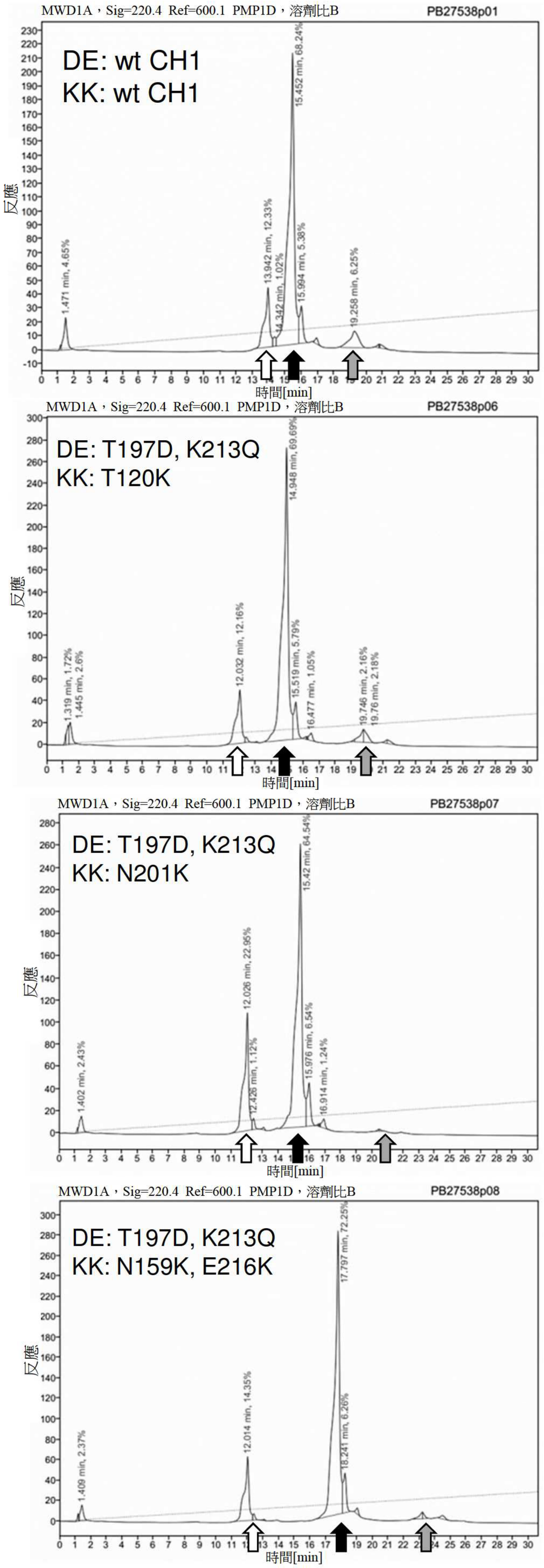




【圖8】

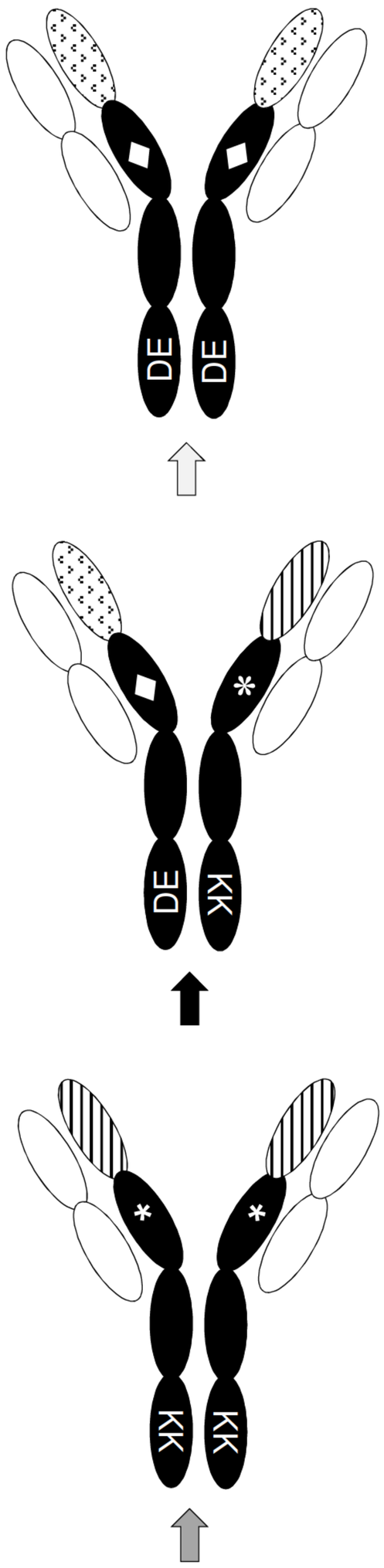
具有T197D、K213Q之DE臂
具有變異CH1之KK臂

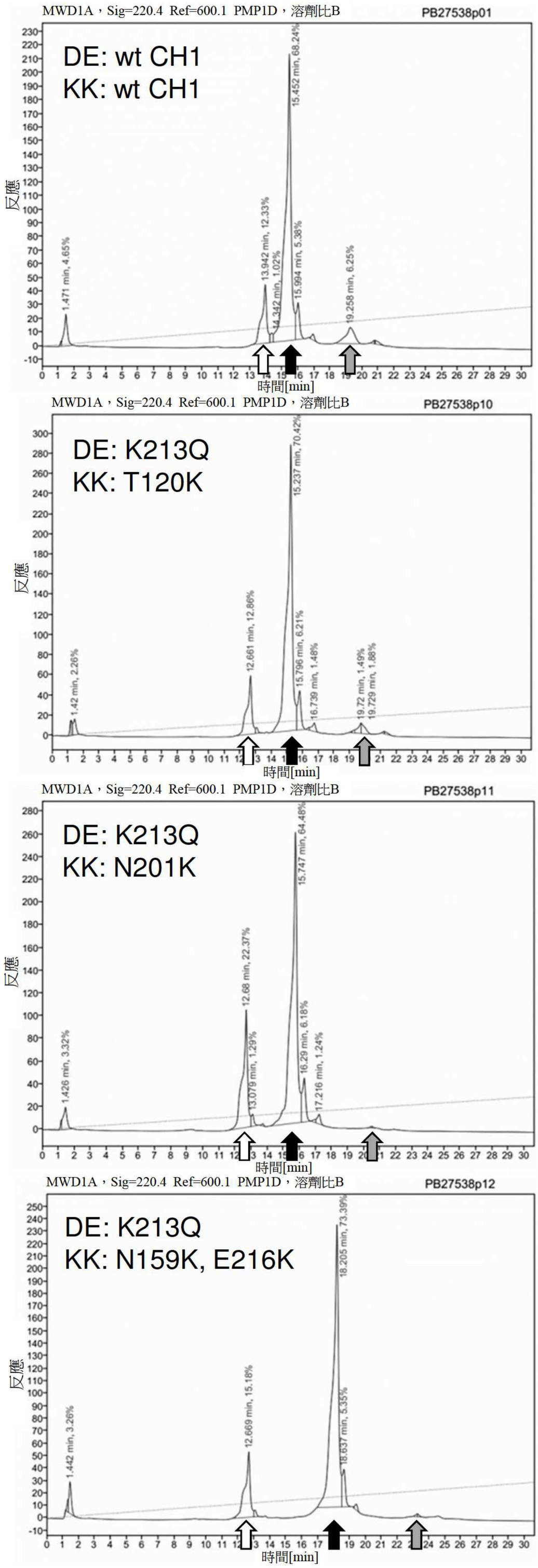


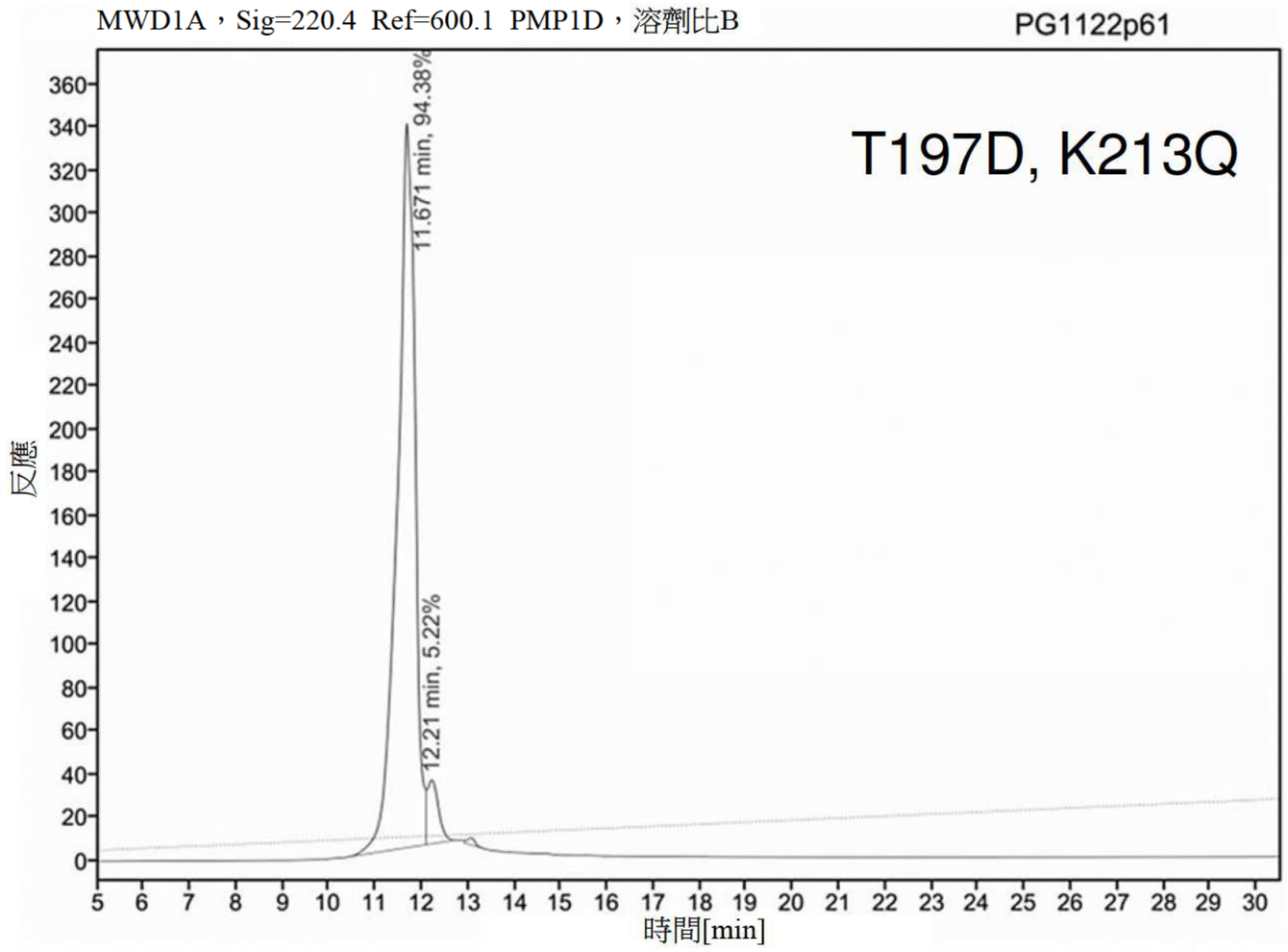

【圖9】

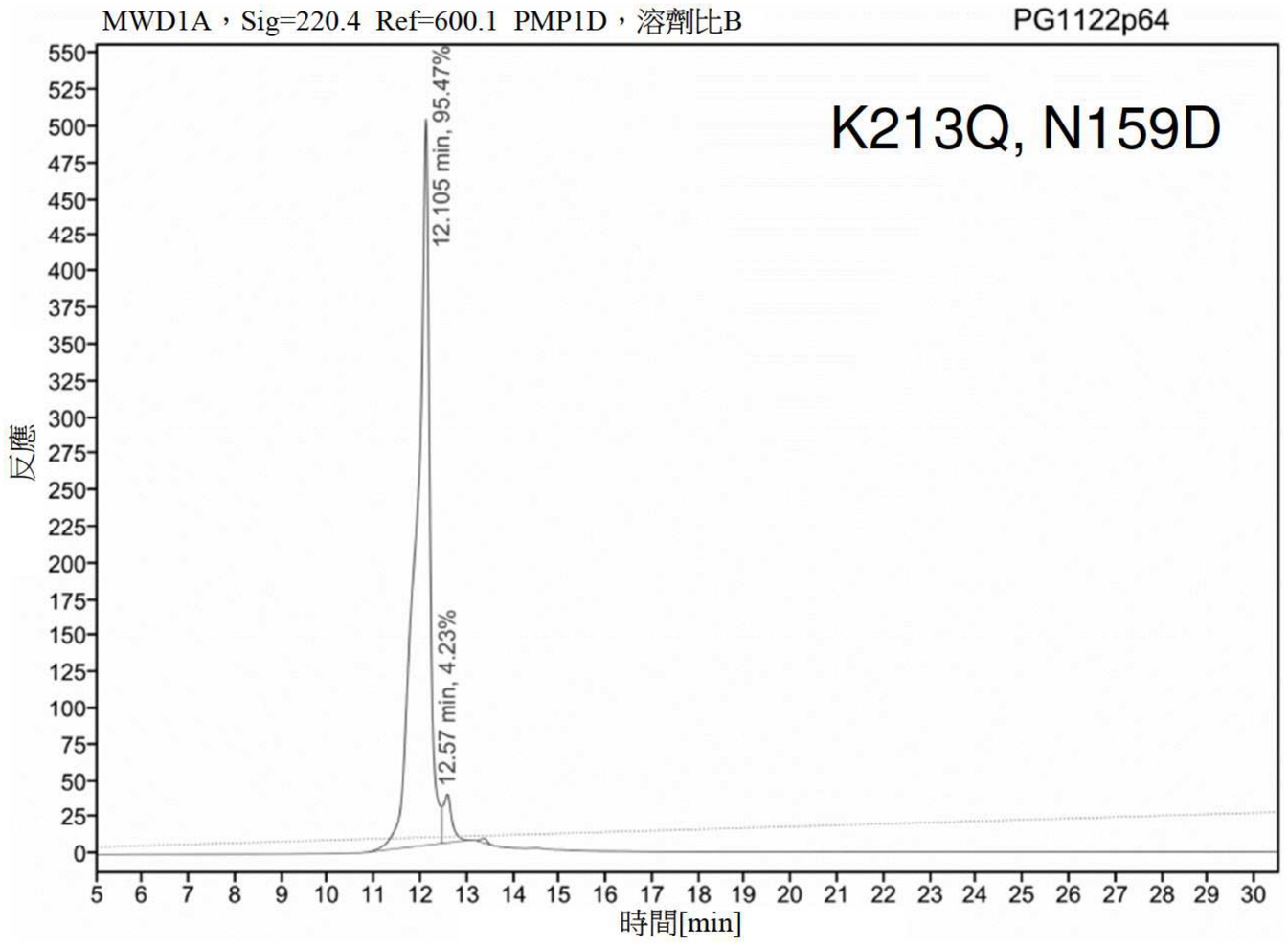
具有K213Q之DE臂
具有變異CH1之KK臂

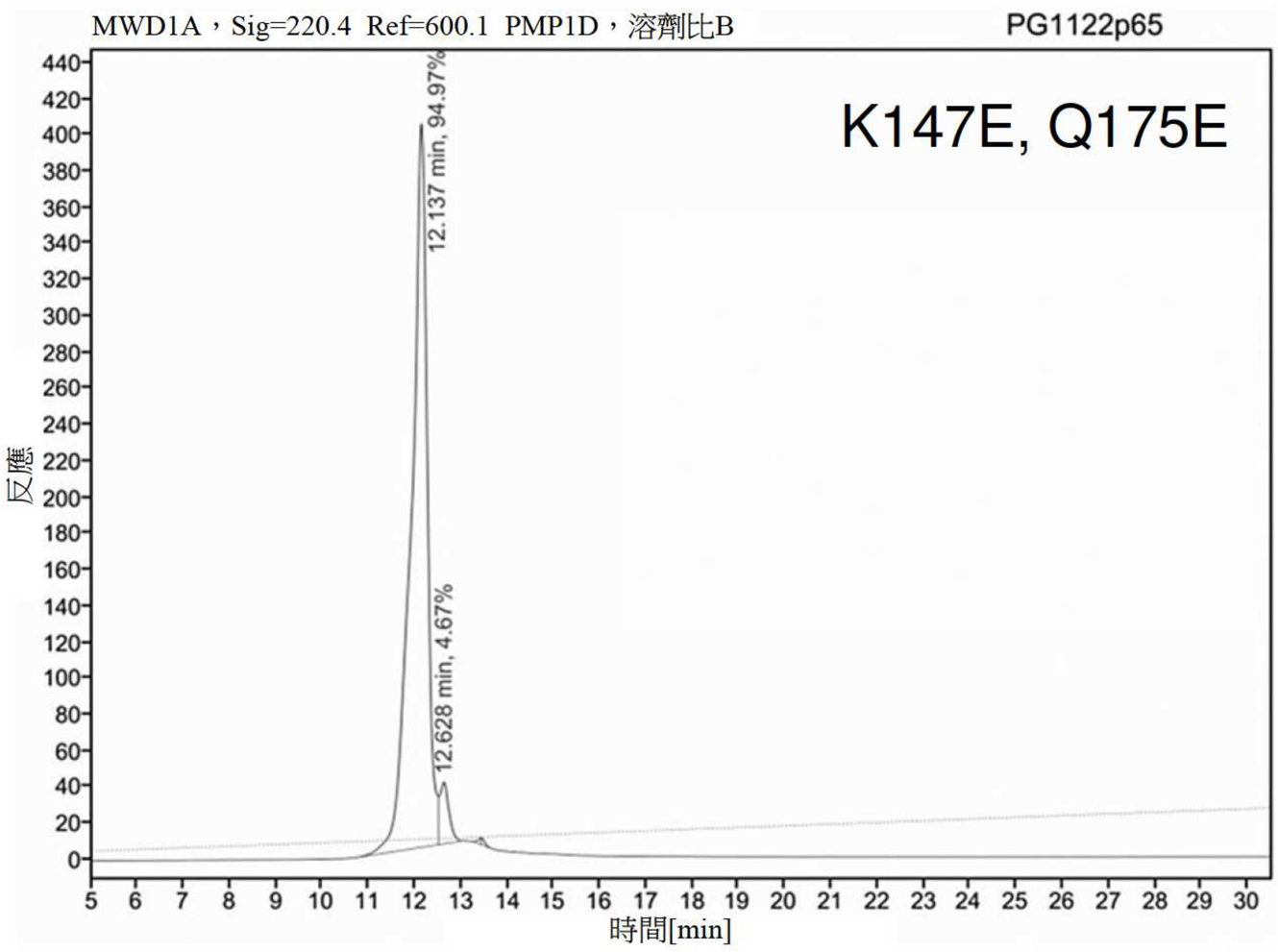


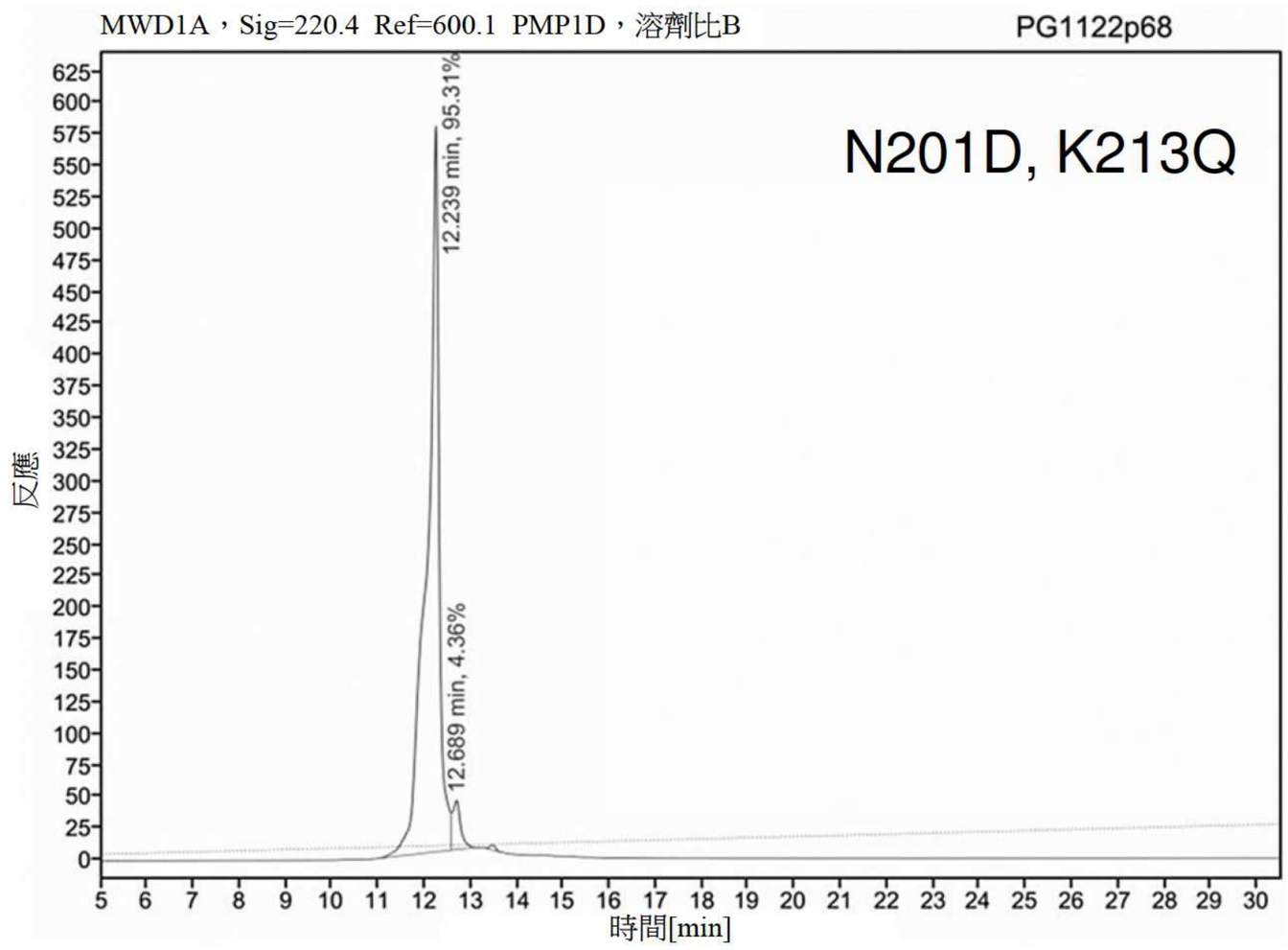

【圖10】

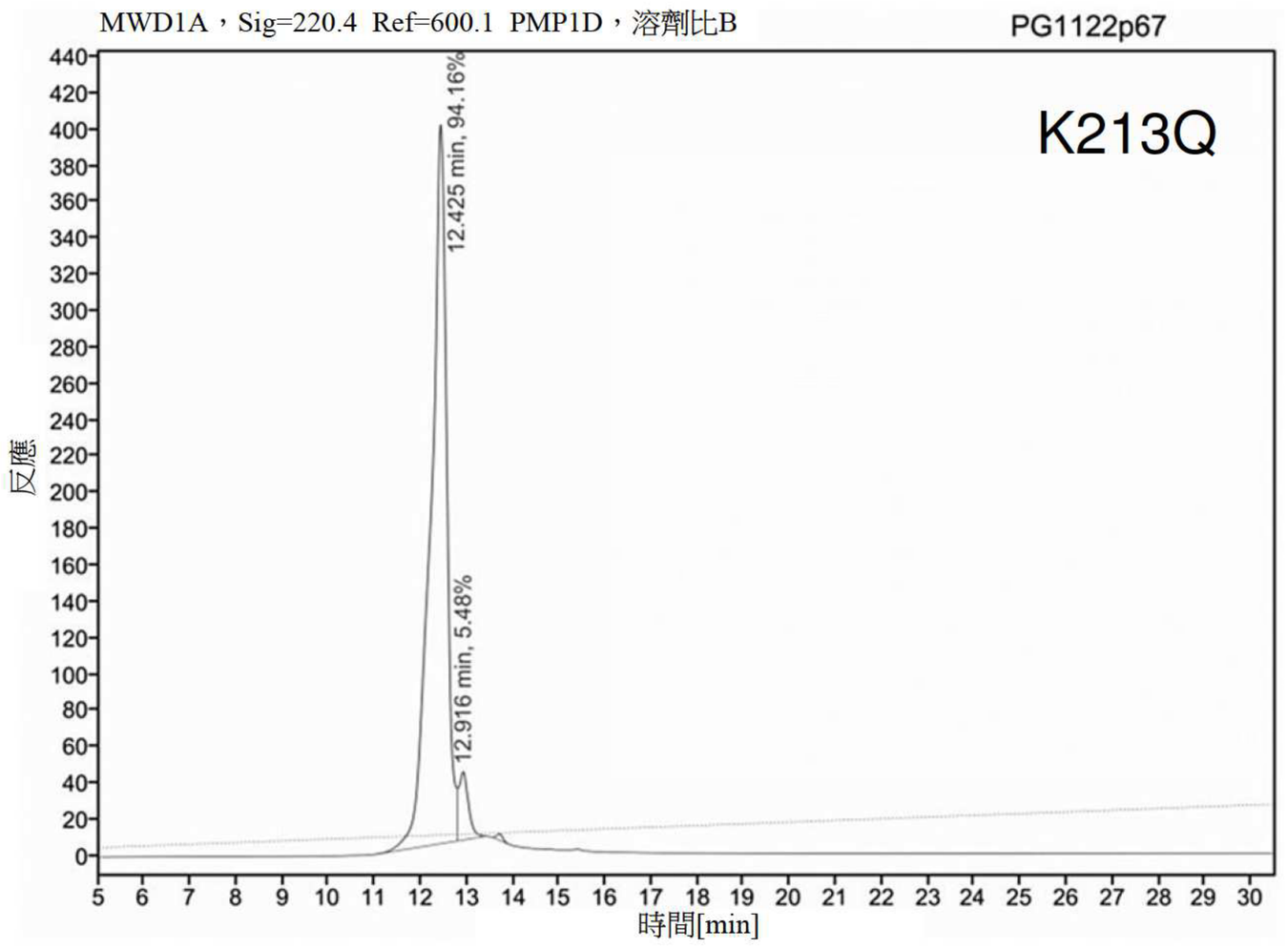

MWD1A，Sig=220.4 Ref=600.1 PMP1D，溶劑比B
PG1122p61
T197D, K213Q
11.671 min, 94.38%
12.21 min, 5.22%
反應
時間[min]

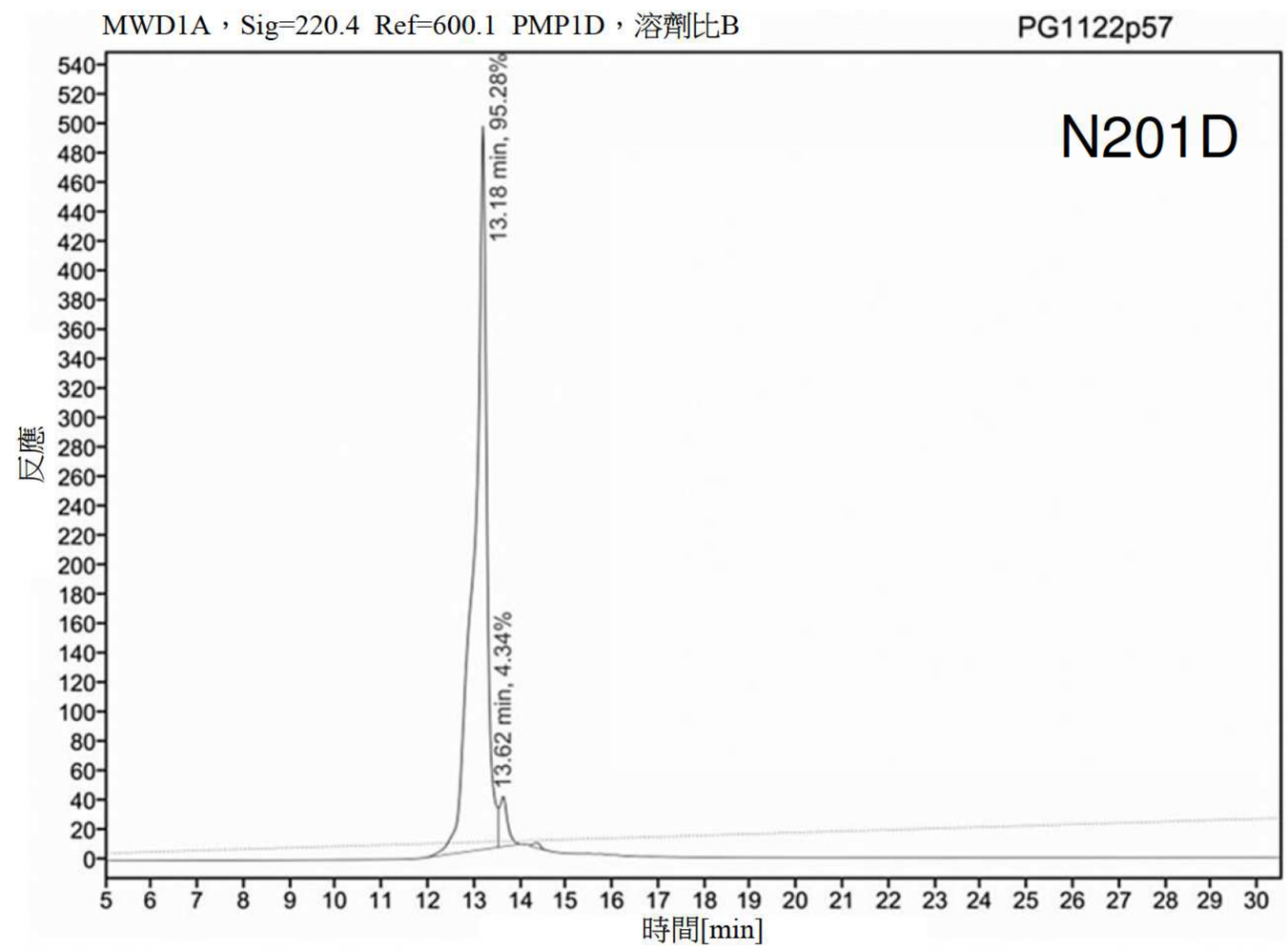

MWD1A，Sig=220.4 Ref=600.1 PMP1D，溶劑比B
PG1122p64
K213Q, N159D
12.105 min, 95.47%
12.57 min, 4.23%
反應
時間[min]


MWD1A，Sig=220.4 Ref=600.1 PMP1D，溶劑比B
PG1122p65
K147E, Q175E
12.137 min, 94.97%
12.628 min, 4.67%
反應
時間[min]

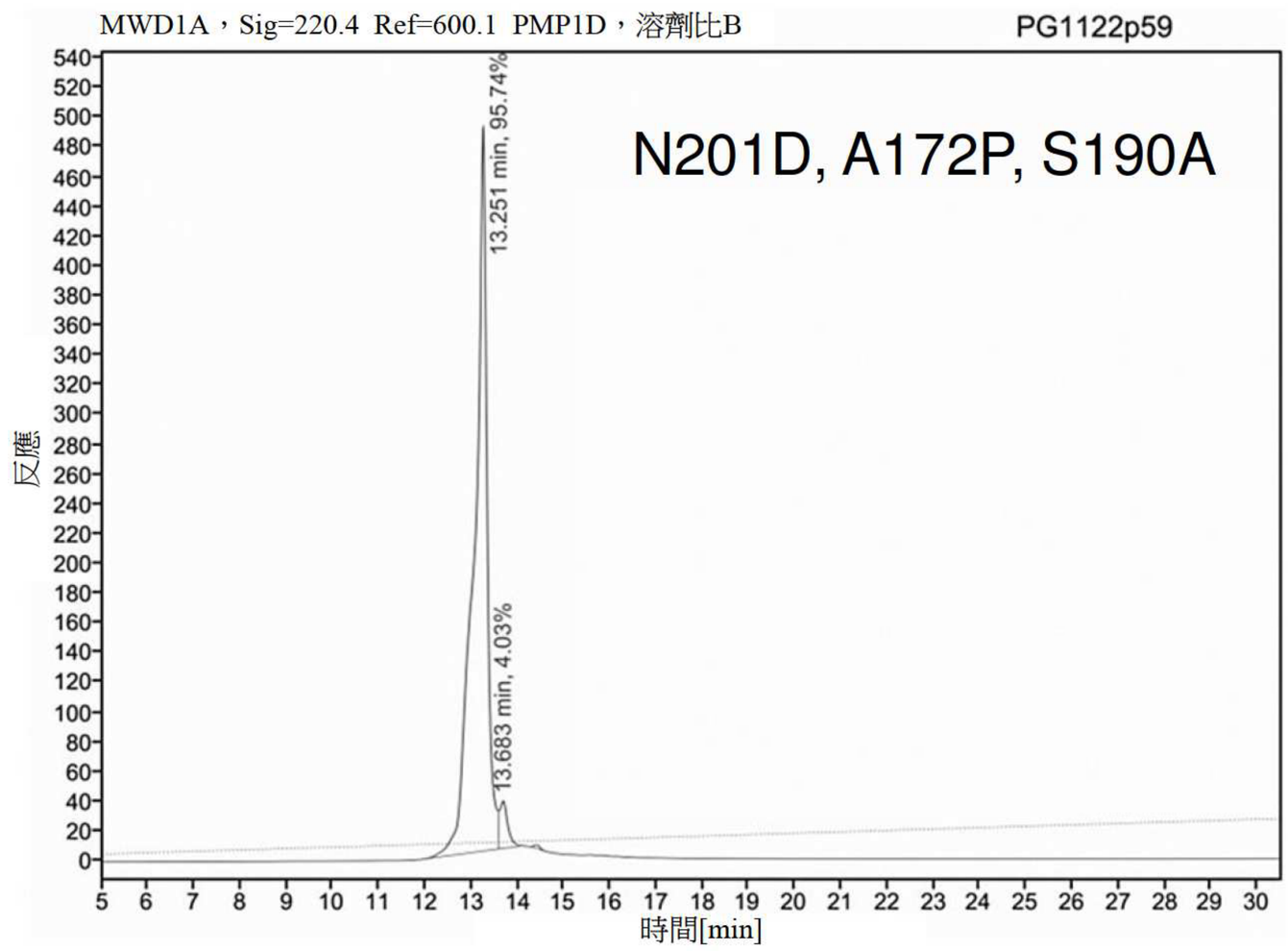
【圖11(1-5)】

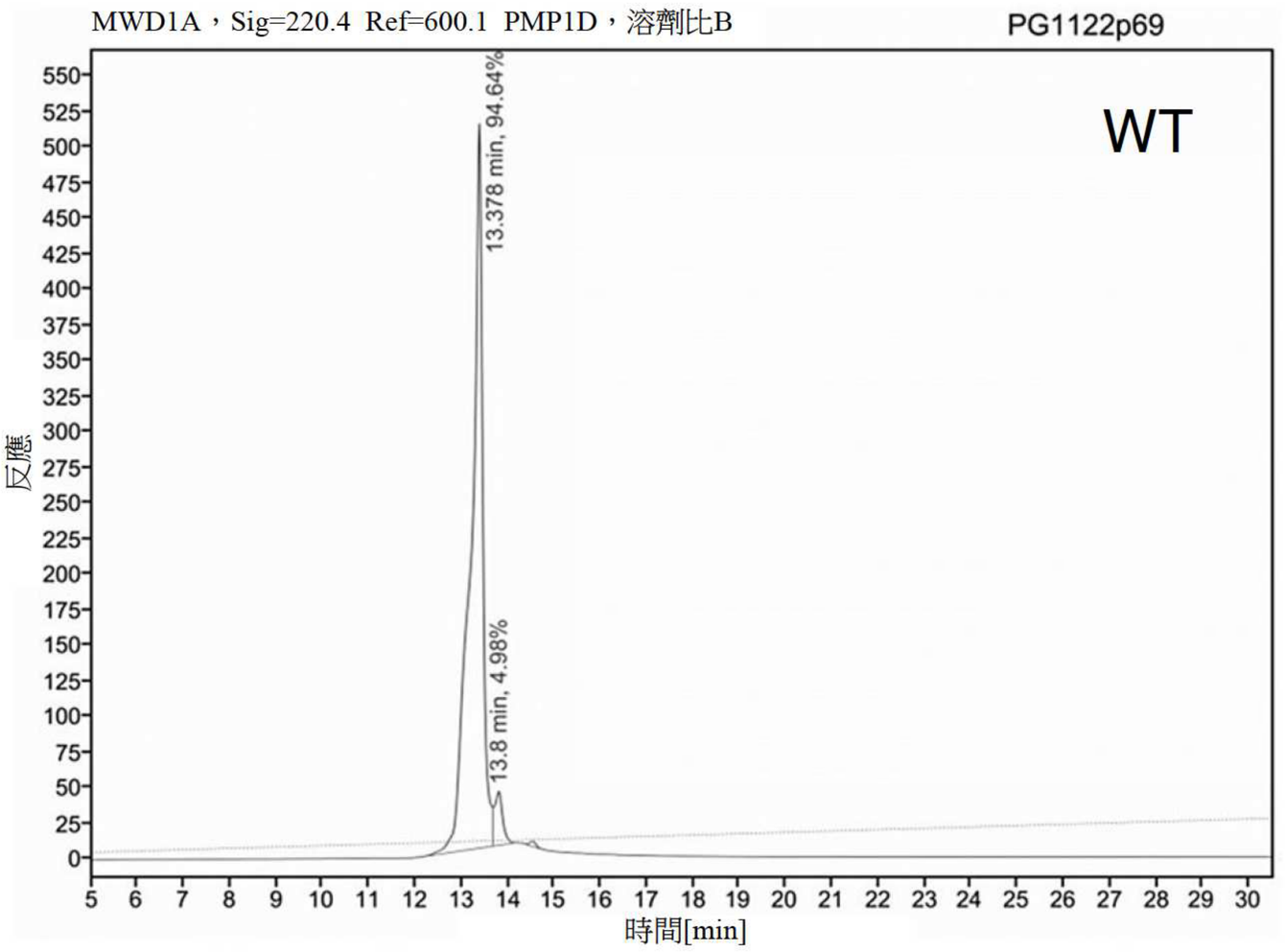

MWD1A，Sig=220.4 Ref=600.1 PMP1D，溶劑比B
PG1122p68
N201D, K213Q
12.239 min, 95.31%
12.689 min, 4.36%
反應
時間[min]

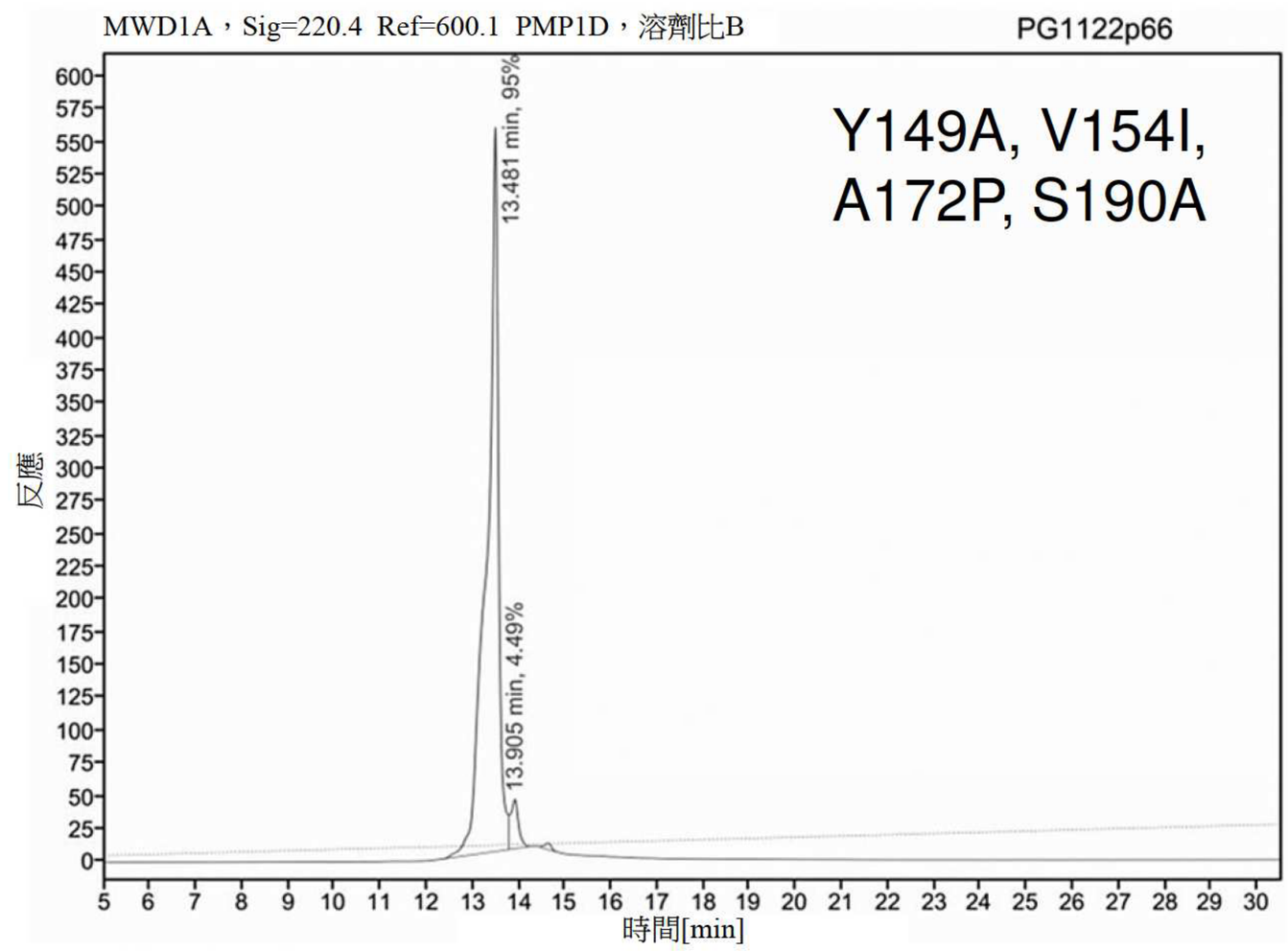

MWD1A，Sig=220.4 Ref=600.1 PMP1D，溶劑比B
PG1122p67
K213Q
12.425 min, 94.16%
12.916 min, 5.48%
反應
時間[min]


MWD1A，Sig=220.4 Ref=600.1 PMP1D，溶劑比B
PG1122p57
N201D
13.18 min, 95.28%
13.62 min, 4.34%
反應
時間[min]

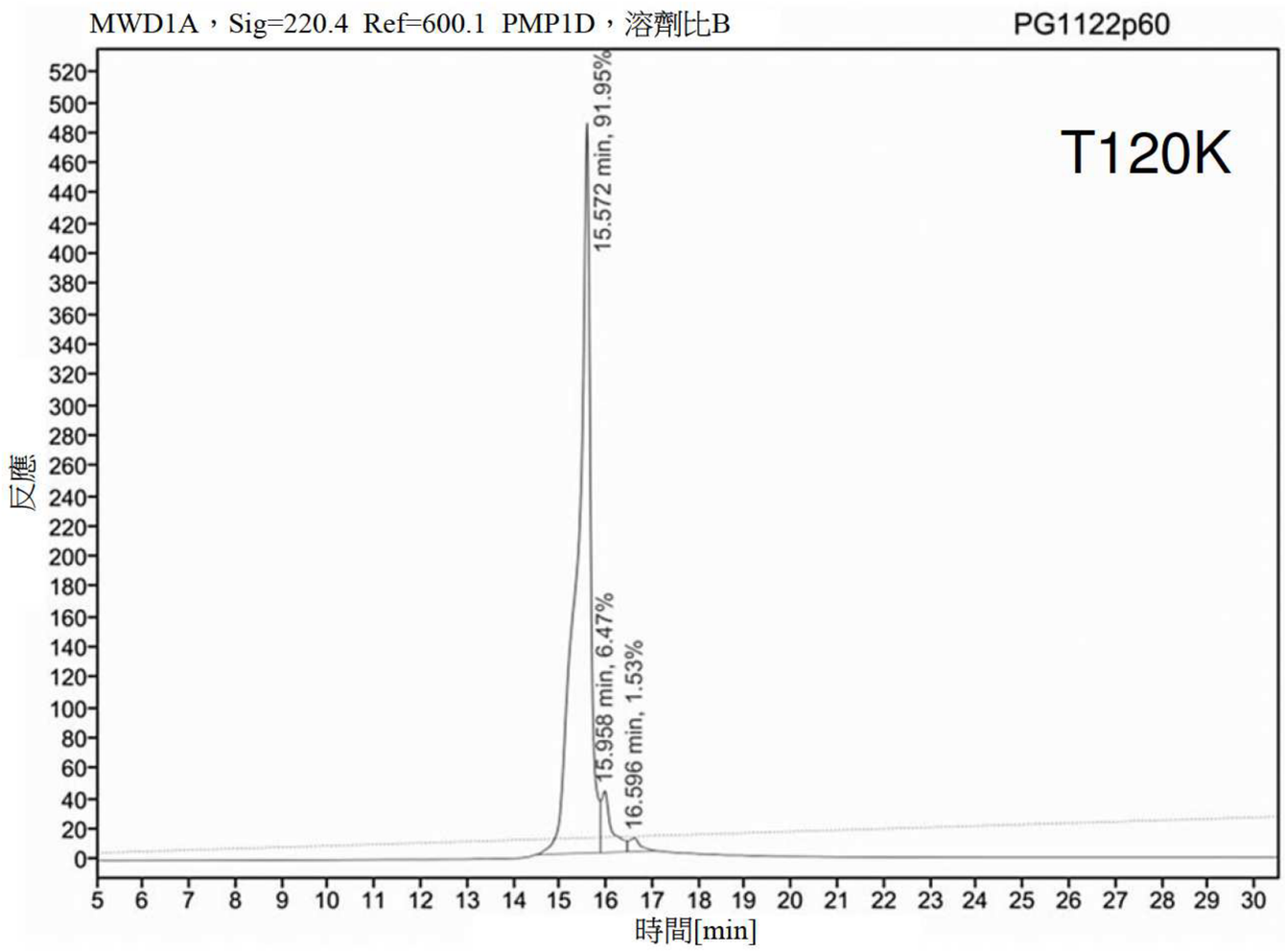
【圖11(2-5)】

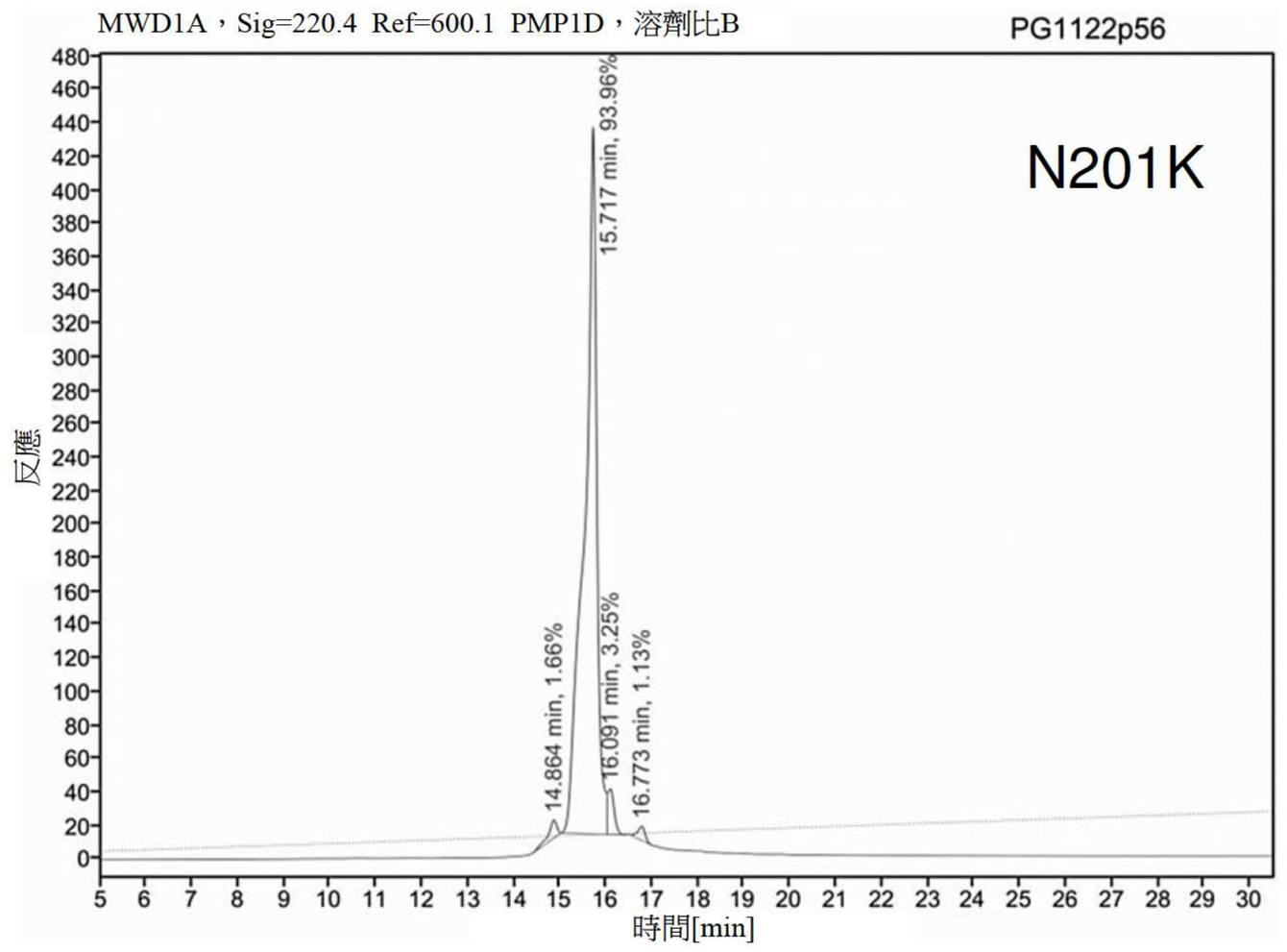

MWD1A，Sig=220.4 Ref=600.1 PMP1D，溶劑比B
PG1122p59
N201D, A172P, S190A
13.251 min, 95.74%
13.683 min, 4.03%
反應
時間[min]

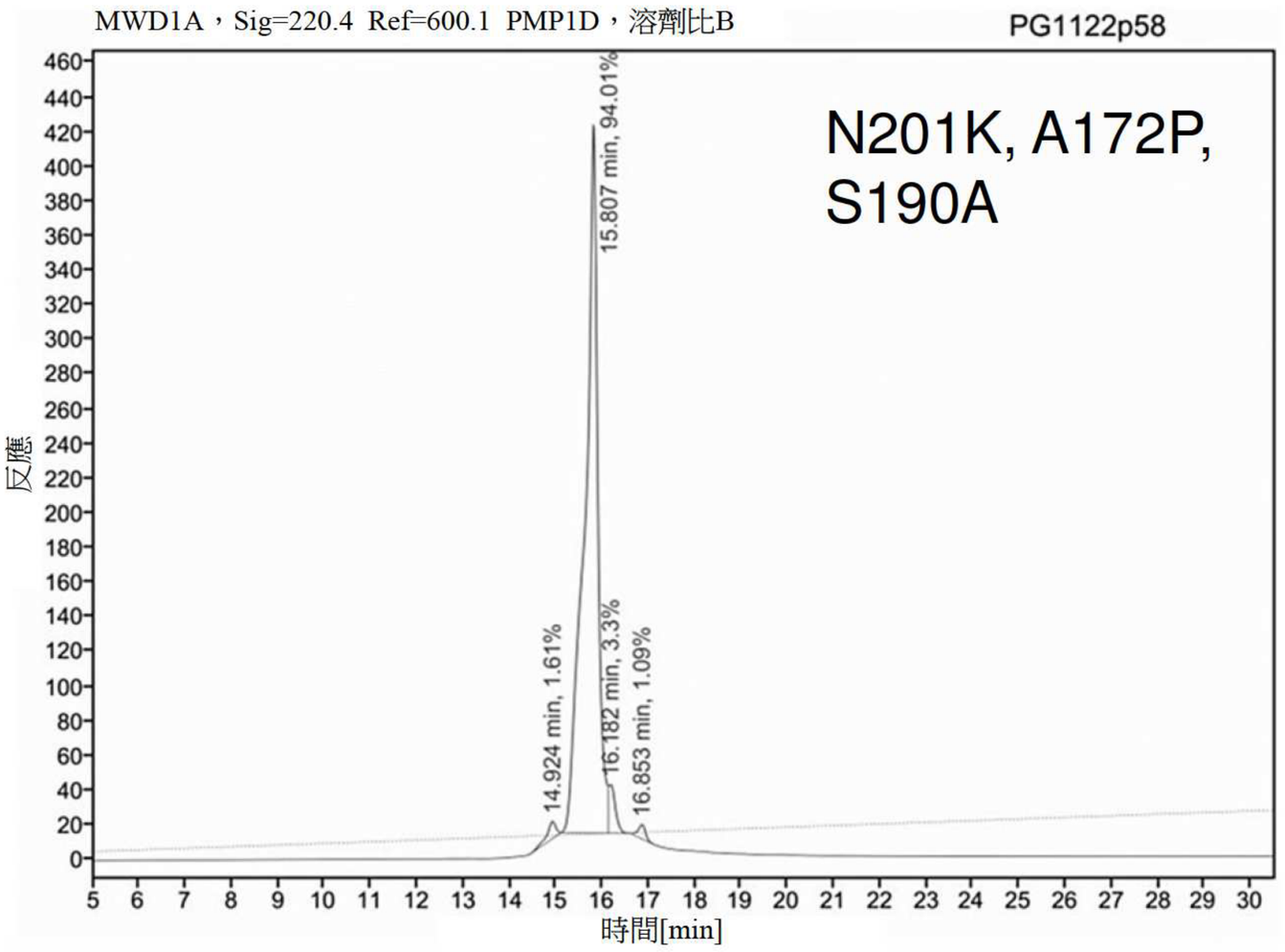

MWD1A，Sig=220.4 Ref=600.1 PMP1D，溶劑比B
PG1122p69
WT
13.378 min, 94.64%
13.8 min, 4.98%
反應
時間[min]


MWD1A，Sig=220.4 Ref=600.1 PMP1D，溶劑比B
PG1122p66
Y149A, V154I,
A172P, S190A
13.481 min, 95%
13.905 min, 4.49%
反應
時間[min]

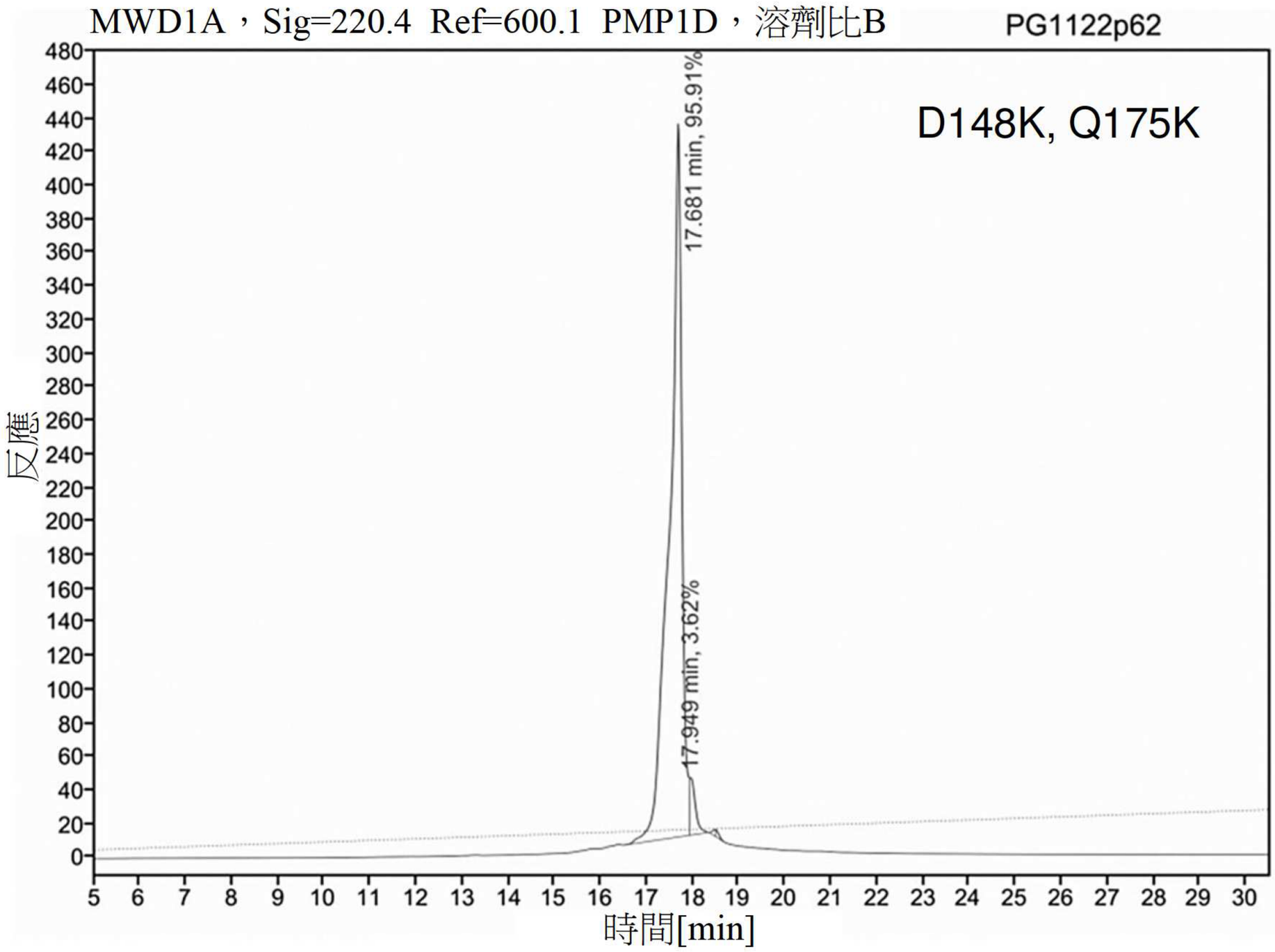
【圖11(3-5)】

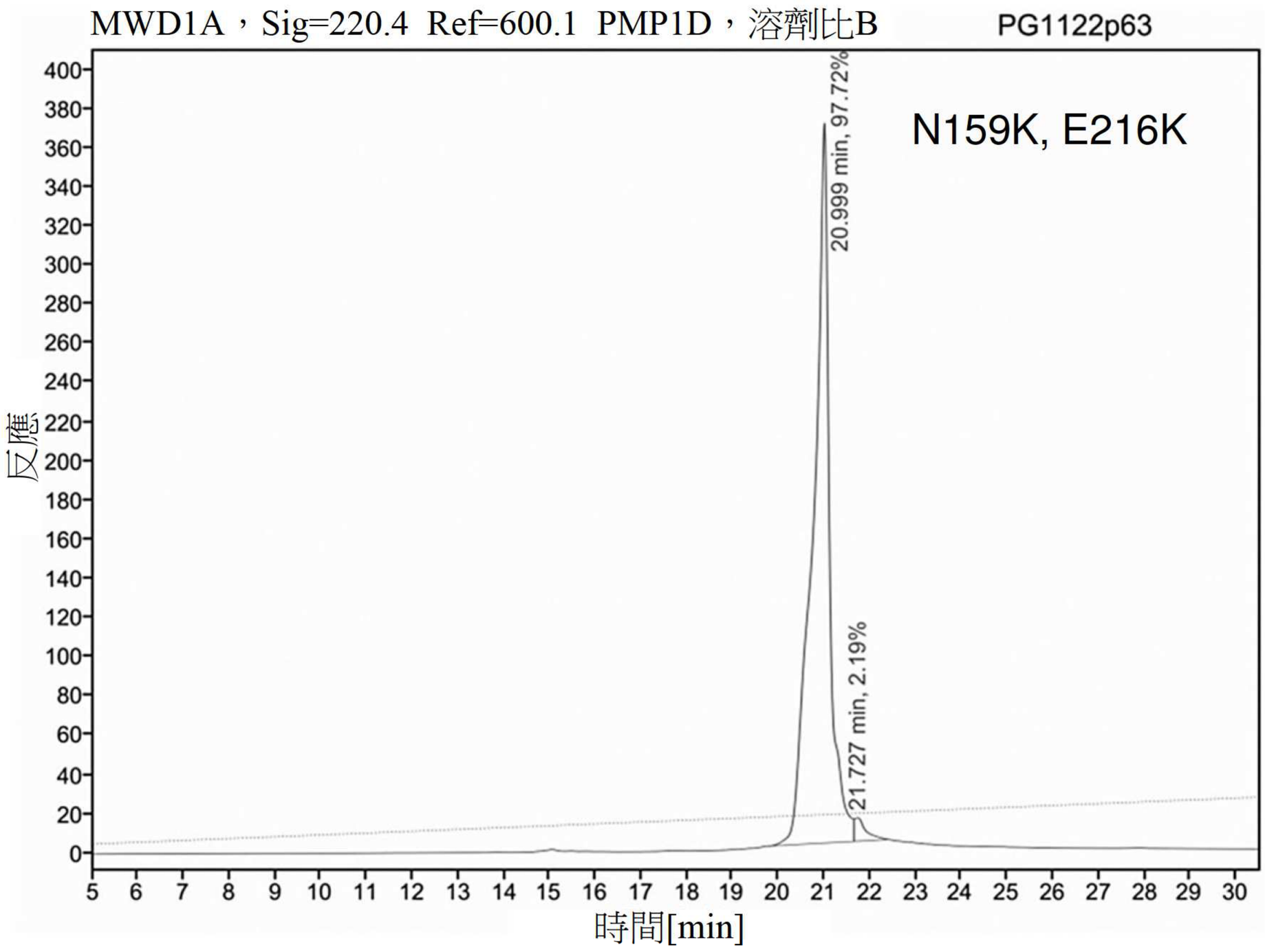

MWD1A，Sig=220.4 Ref=600.1 PMP1D，溶劑比B
PG1122p60
T120K
15.572 min, 91.95%
15.958 min, 6.47%
16.596 min, 1.53%
反應
時間[min]


MWD1A，Sig=220.4 Ref=600.1 PMP1D，溶劑比B
PG1122p56
N201K
15.717 min, 93.96%
14.864 min, 1.66%
16.091 min, 3.25%
16.773 min, 1.13%
反應
時間[min]

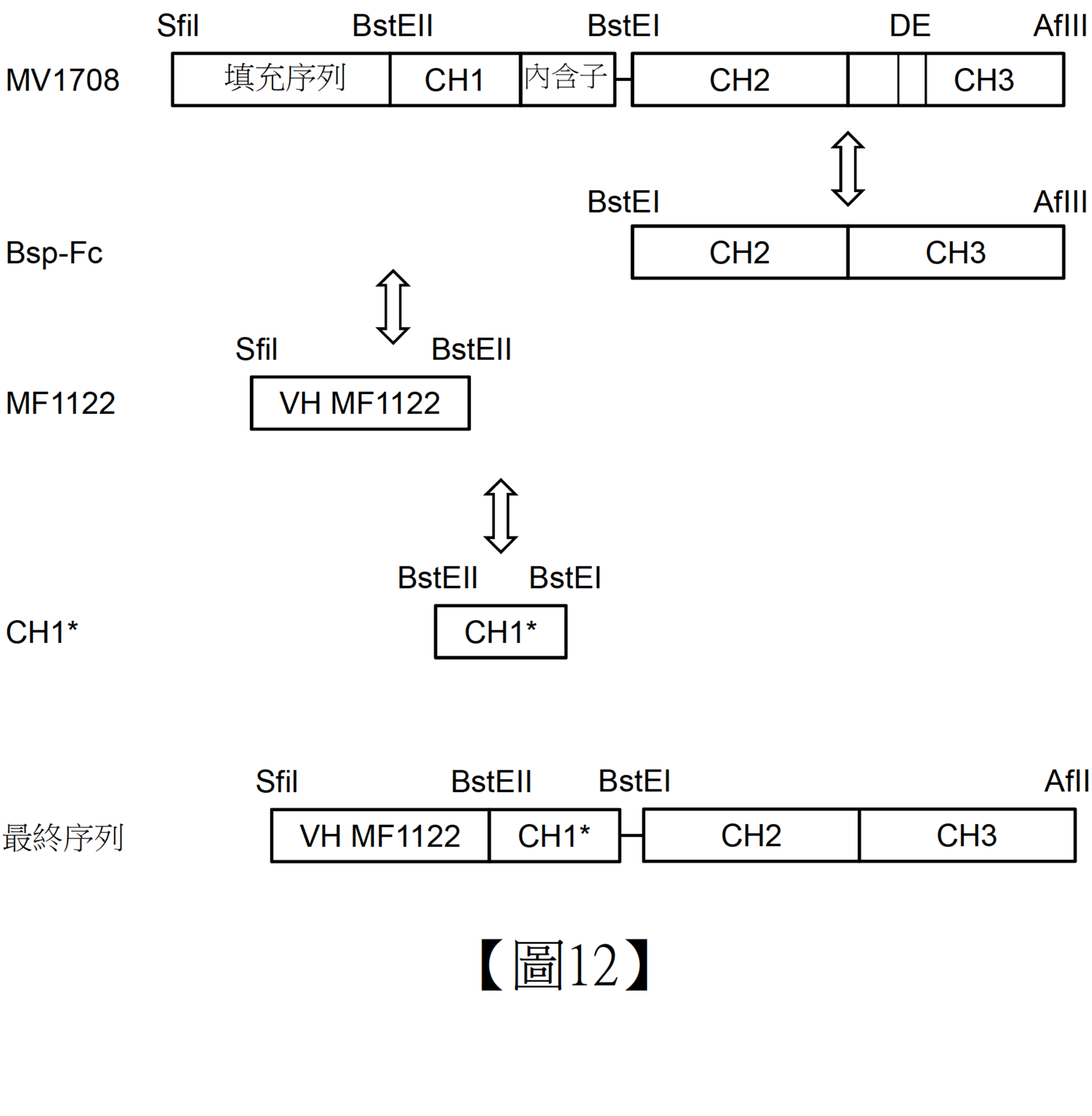

MWD1A，Sig=220.4 Ref=600.1 PMP1D，溶劑比B
PG1122p58
N201K, A172P,
S190A
15.807 min, 94.01%
14.924 min, 1.61%
16.182 min, 3.3%
16.853 min, 1.09%
反應
時間[min]

【圖11(4-5)】


MWD1A，Sig=220.4 Ref=600.1 PMP1D，溶劑比B
PG1122p62
D148K, Q175K
17.681 min, 95.91%
17.949 min, 3.62%
反應
時間[min]


MWD1A，Sig=220.4 Ref=600.1 PMP1D，溶劑比B
PG1122p63
N159K, E216K
20.999 min, 97.72%
21.727 min, 2.19%
反應
時間[min]

【圖11(5-5)】


SfiI
BstEII
BstEI
DE
AflII
MV1708
填充序列
CH1
內含子
CH2
CH3
BstEI
AflII
Bsp-Fc
CH2
CH3
SfiI
BstEII
MF1122
VH MF1122
BstEII
BstEI
CH1*
CH1*
SfiI
BstEII
BstEI
AflII
最終序列
VH MF1122
CH1*
CH2
CH3

【圖12】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【圖13A】

GACAT CCAGA TGACC CAGTC TCCAT CCTCC CTGTC TGCAT CTGTA GGAGA
CAGAG TCACC ATCAC TTGCC GGGCA AGTCA GAGCA TTAGC AGCTA CTTAA
ATTGG TATCA GCAGA AACCA GGGAA AGCCC CTAAG CTCCT GATCT ATGCT
GCATC CAGTT TGCAA AGTGG GGTCC CATCA AGGTT CAGTG GCAGT GGATC
TGGGA CAGAT TTCAC TCTCA CCATC AGCAG TCTGC AACCT GAAGA TTTTG
CAACT TACTA CTGTC AACAG AGTTA CAGTA CCCCT CCAAC GTTCG GCCAA
GGGAC CAAGG TGGAG ATCAAA

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIK

【圖13B】

CGAAC TGTGG CTGCA CCATC TGTCT TCATC TTCCC GCCAT CTGAT GAGCA
GTTGA AATCT GGAAC TGCCT CTGTT GTGTG CCTGC TGAAT AACTT CTATC
CCAGA GAGGC CAAAG TACAG TGGAA GGTGG ATAAC GCCCT CCAAT CGGGT
AACTC CCAGG AGAGT GTCAC AGAGC AGGAC AGCAA GGACA GCACC TACAG
CCTCA GCAGC ACCCT GACGC TGAGC AAAGC AGACT ACGAG AAACA CAAAG
TCTAC GCCTG CGAAG TCACC CATCA GGGCC TGAGC TCGCC CGTCA CAAAG
AGCTT CAACA GGGGA GAGTG TTAG

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【圖13C】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK

【圖13D】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP

【圖13E】

CDR1 - QSISSY,
CDR2 – AAS,
CDR3 – QQSYSTP,亦即IGKV1-39之CDR (根據IMGT)

【圖13F】

IgVκ3-15/IGJκ1

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSG
SGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPWTFGQGTKVEIK

【圖13G】

IgVκ3-20/IGJκ1

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFS
GSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK

【圖13H】

IgVλ3-21/IGJλ3

SYVLTQPPSVSVAPGETARITCGGDNIGRKSVYWYQQKSGQAPVLVIYYDSDRPSGIPERFSGS
NSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDGSSDHWVFGGGTKLTVL

【圖13I】

IgVκ3-15

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSG
SGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWP

【圖13J】

IgVκ3-20

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFS
GSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP

【圖13K】

VK1-39/IGJK5/Cκ

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【圖13L】

IgVκ3-15/IGJκ1/Cκ

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSG
SGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【圖13M】

IgVκ3-20/IGJκ1/Cκ

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFS
GSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【圖13N】

IgVλ3-21/IGJλ3/Cλ

SYVLTQPPSVSVAPGETARITCGGDNIGRKSVYWYQQKSGQAPVLVIYYDSDRPSGIPERFSGS
NSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDGSSDHWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQ
ANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRS
YSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

【圖13O】

IgVλ3-21

SYVLTQPPSVSVAPGETARITCGGDNIGRKSVYWYQQKSGQAPVLVIYYDSDRPSGIPERFSGS
NSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDGSSDH

【圖13P】

CH1:

```
gctagcaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctggg
 A   S   T   K   G   P   S   V   F   P   L   A   P   S   S   K   S   T   S   G
ggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcg
 G   T   A   A   L   G   C   L   V   K   D   Y   F   P   E   P   V   T   V   S
tggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctca
 W   N   S   G   A   L   T   S   G   V   H   T   F   P   A   V   L   Q   S   S
ggactctactccctcagcagcgtcgtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacc
 G   L   Y   S   L   S   S   V   V   T   V   P   S   S   S   L   G   T   Q   T
tacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagtt
 Y   I   C   N   V   N   H   K   P   S   N   T   K   V   D   K   R   V
```

【圖14A】

鉸鏈：

```
gagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgccca
 E   P   K   S   C   D   K   T   H   T   C   P   P   C   P
```

【圖14B】

CH2:

```
gcacctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacacc
 A   P   E   L   L   G   G   P   S   V   F   L   F   P   P   K   P   K   D   T
ctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagac
 L   M   I   S   R   T   P   E   V   T   C   V   V   V   D   V   S   H   E   D
cctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaag
 P   E   V   K   F   N   W   Y   V   D   G   V   E   V   H   N   A   K   T   K
ccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcac
 P   R   E   E   Q   Y   N   S   T   Y   R   V   V   S   V   L   T   V   L   H
caggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcc
 Q   D   W   L   N   G   K   E   Y   K   C   K   V   S   N   K   A   L   P   A
cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaa
 P   I   E   K   T   I   S   K   A   K
```

【圖14C】

CH3：L351K及T366K

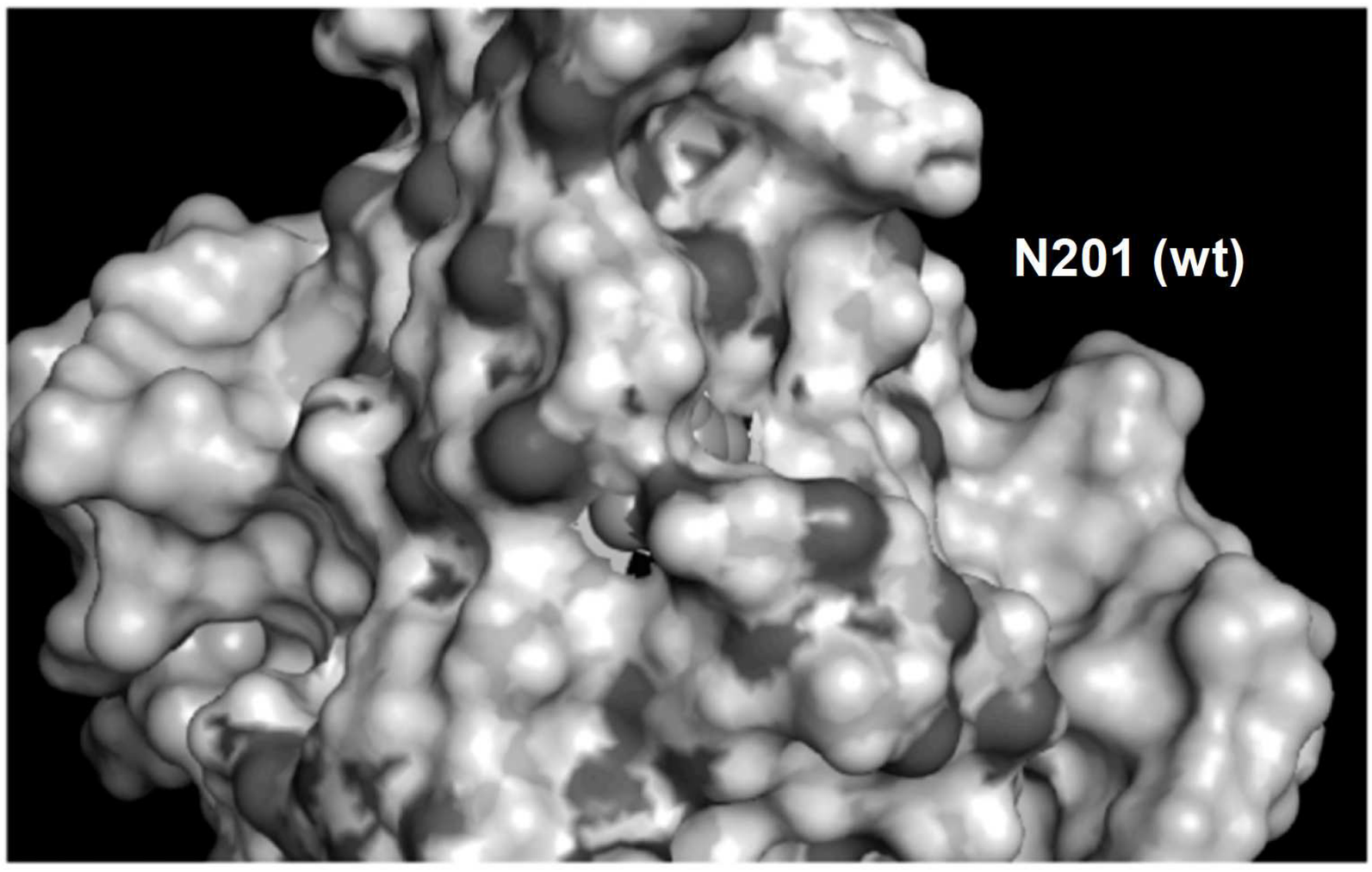
```
gggcagccccgagaaccacaggtgtacaccaagcccccatcccgggaggagatgaccaag
 G   Q   P   R   E   P   Q   V   Y   T   K   P   P   S   R   E   E   M   T   K
aaccaggtcagcctgaagtgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag
 N   Q   V   S   L   K   C   L   V   K   G   F   Y   P   S   D   I   A   V   E
tgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactcc
 W   E   S   N   G   Q   P   E   N   N   Y   K   T   T   P   P   V   L   D   S
gacggctccttcttcctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggg
 D   G   S   F   F   L   Y   S   K   L   T   V   D   K   S   R   W   Q   Q   G
aacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagc
 N   V   F   S   C   S   V   M   H   E   A   L   H   N   H   Y   T   Q   K   S
ctctccctgtctccgggttga
 L   S   L   S   P   G   -
```

【圖14D】

CH3：L351D及L368E

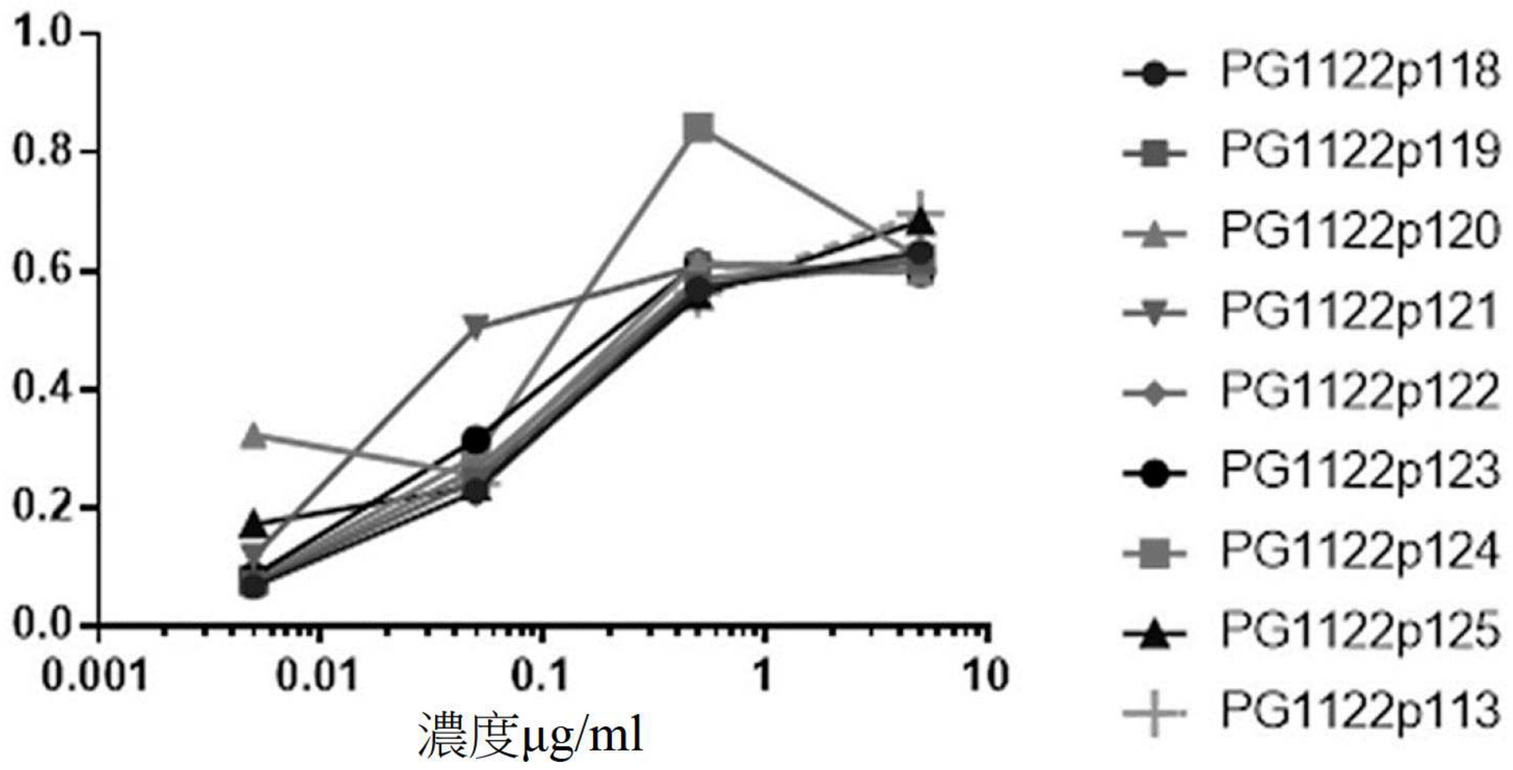
```
gggcagccccgagaaccacaggtgtacaccgacccccccatcccgggaggagatgaccaag
 G   Q   P   R   E   P   Q   V   Y   T   D   P   P   S   R   E   E   M   T   K
aaccaggtcagcctgacctgcgaggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag
 N   Q   V   S   L   T   C   E   V   K   G   F   Y   P   S   D   I   A   V   E
tgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactcc
 W   E   S   N   G   Q   P   E   N   N   Y   K   T   T   P   P   V   L   D   S
gacggctccttcttcctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggg
 D   G   S   F   F   L   Y   S   K   L   T   V   D   K   S   R   W   Q   Q   G
aacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagc
 N   V   F   S   C   S   V   M   H   E   A   L   H   N   H   Y   T   Q   K   S
ctctccctgtctccgggttga
 L   S   L   S   P   G   -
```

【圖14E】

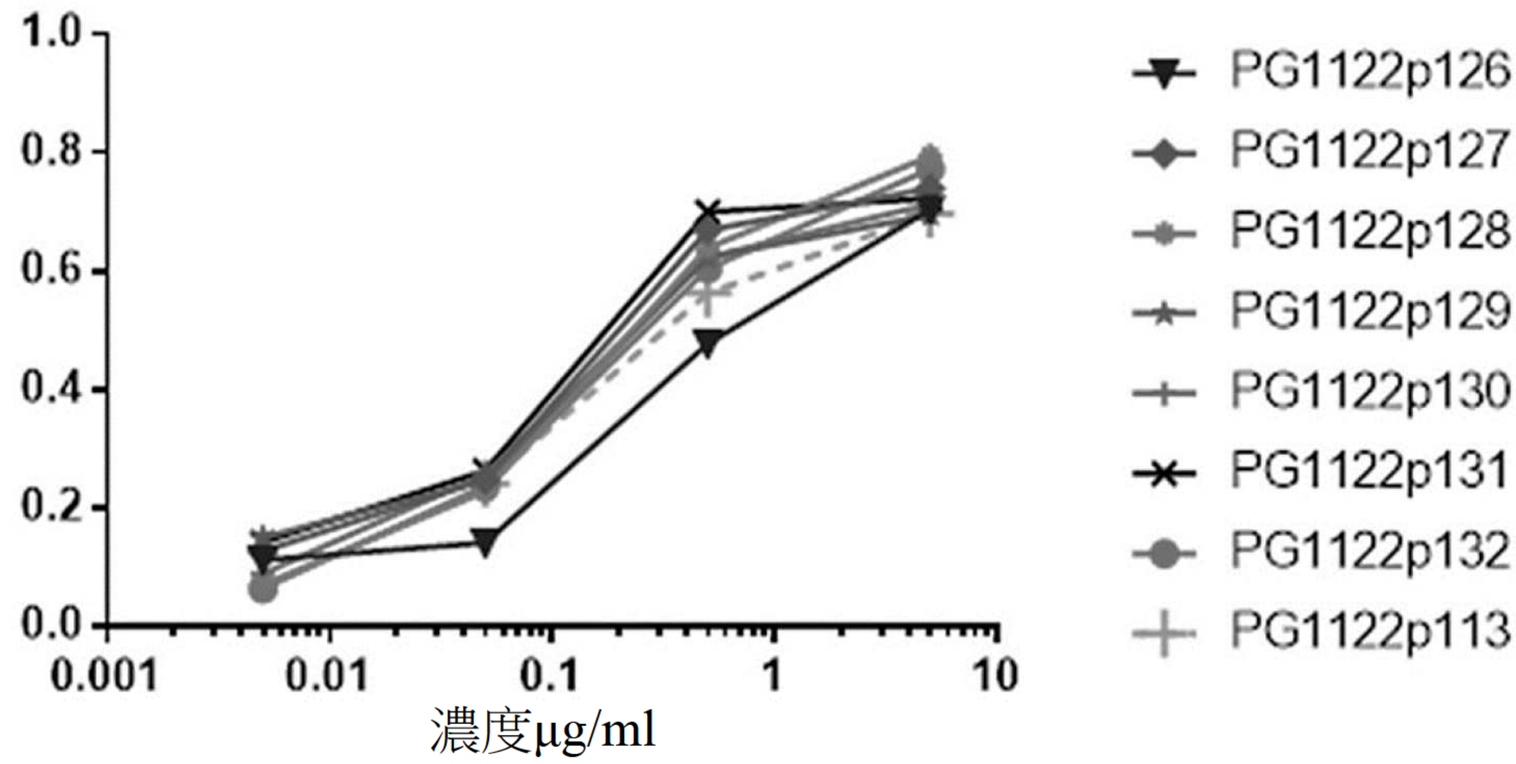



【圖15】

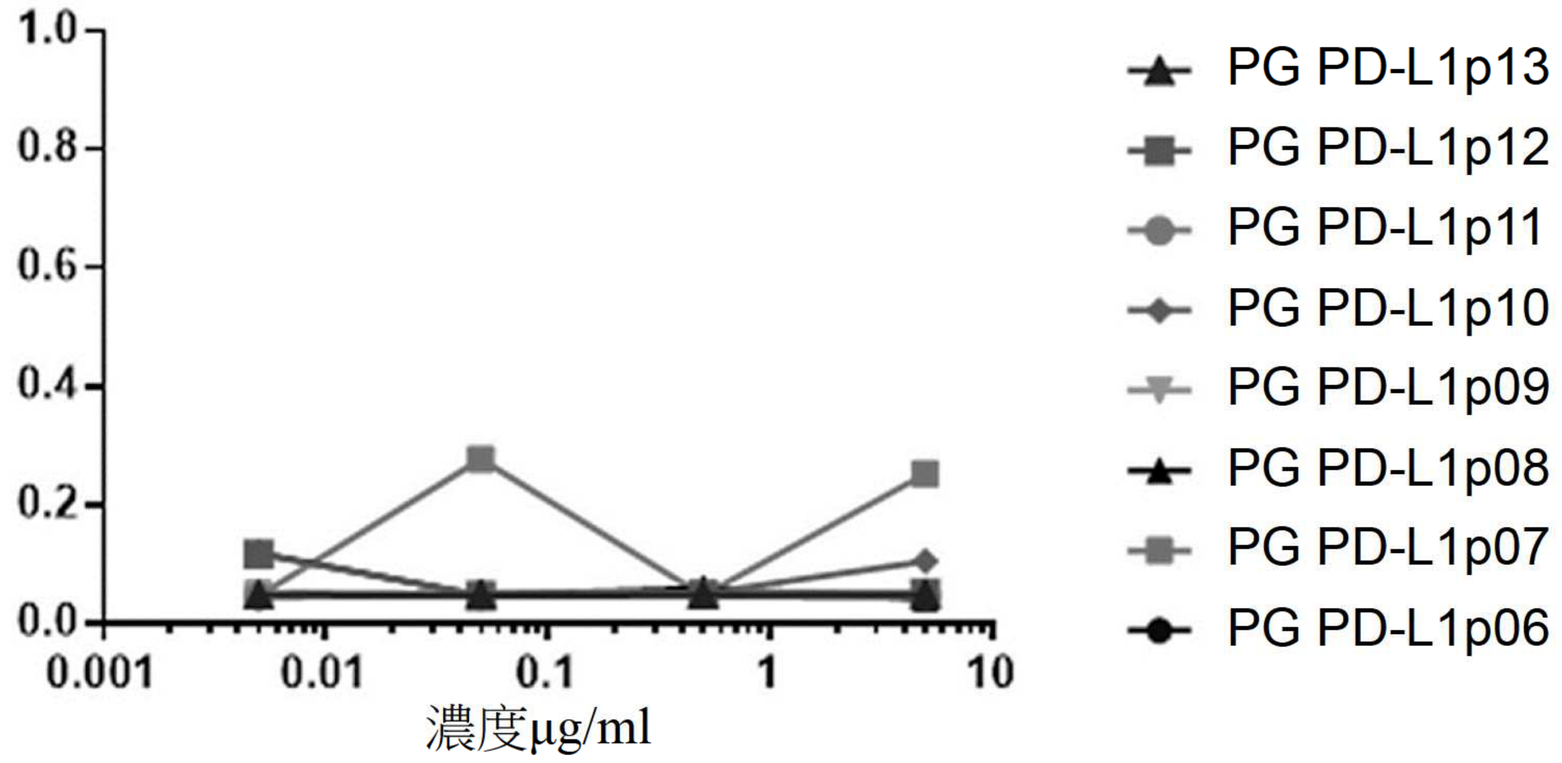
血纖維蛋白原盤陽性樣品集1



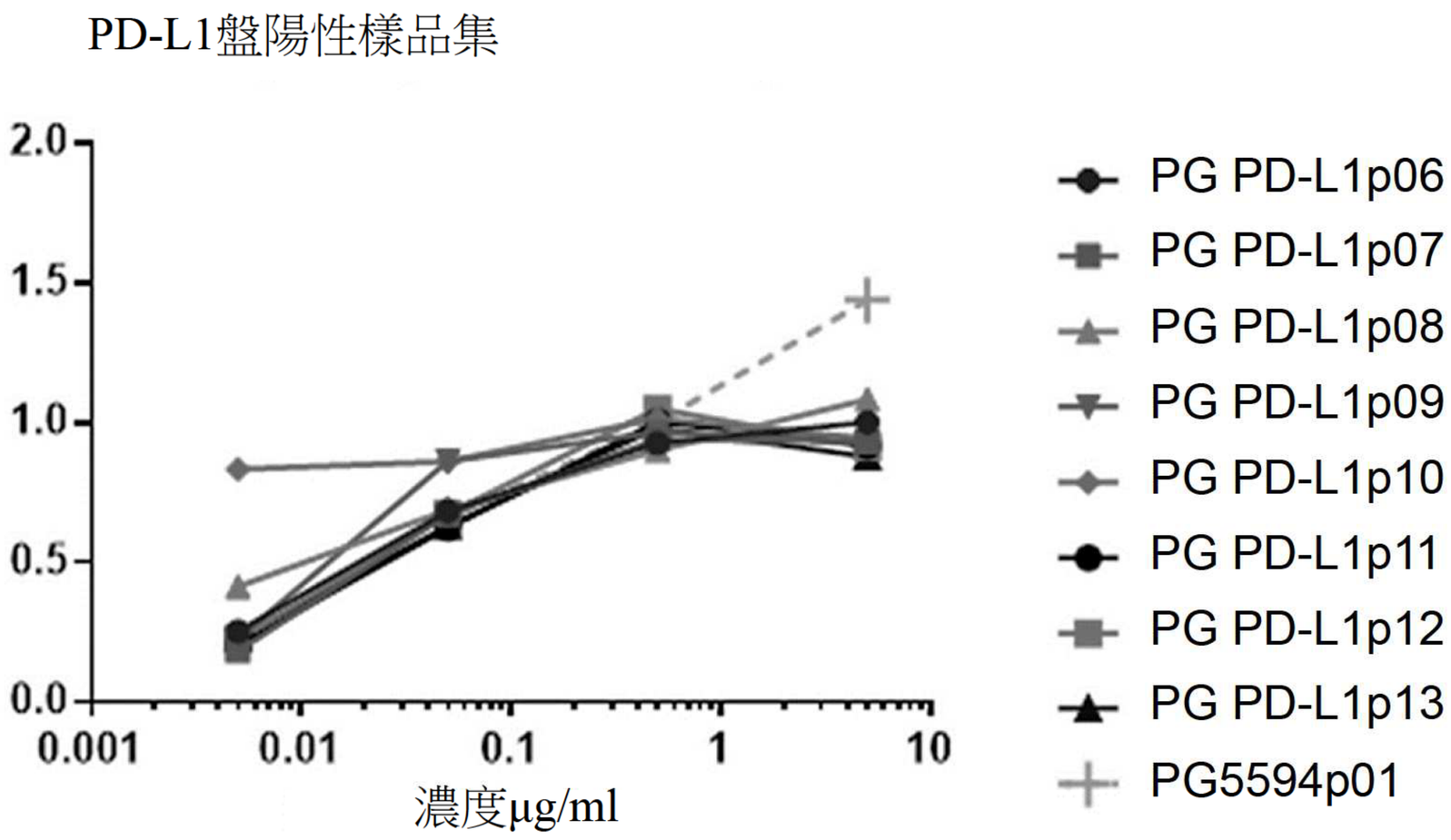

血纖維蛋白原盤陽性樣品集2

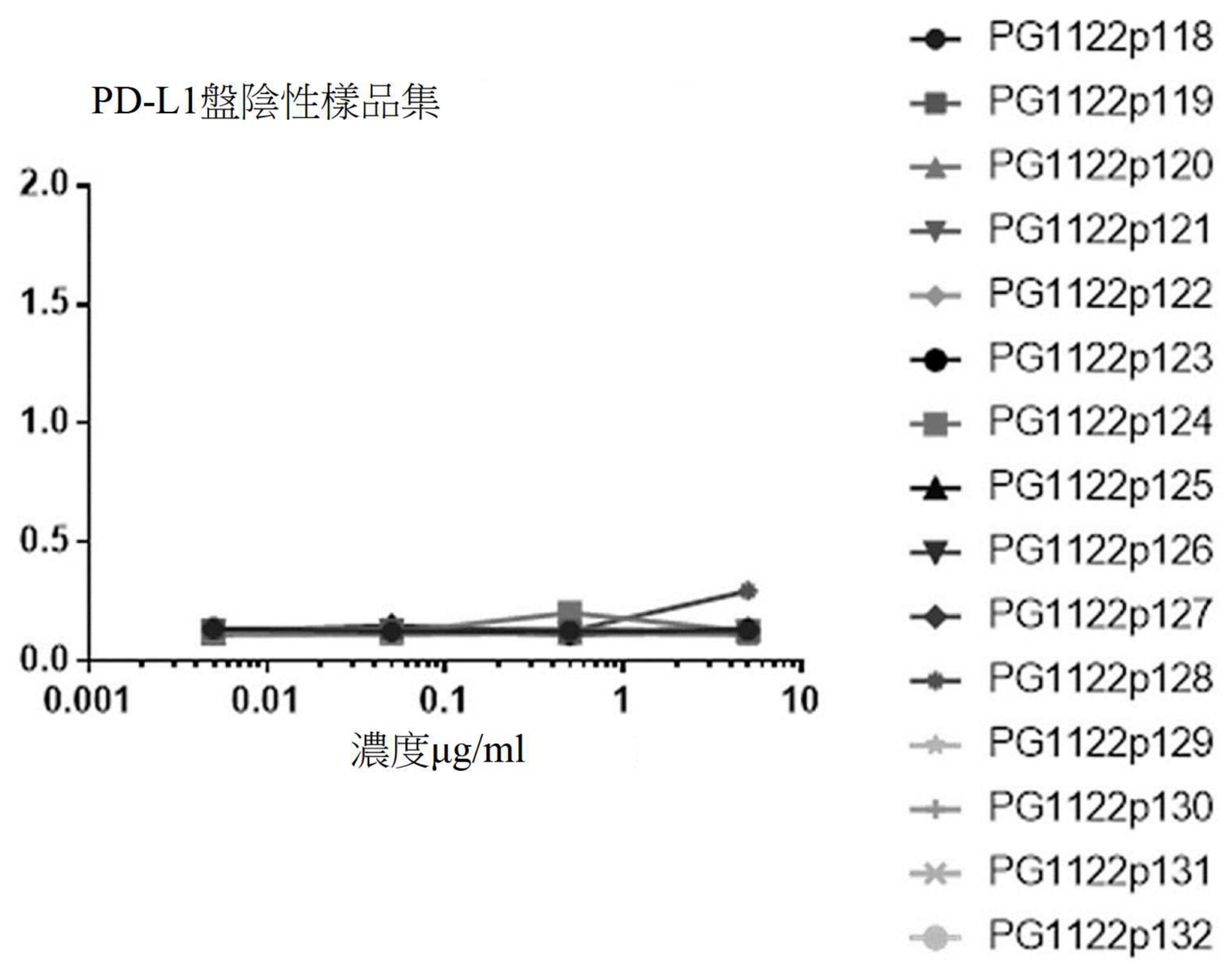



血纖維蛋白原盤陰性樣品集




【圖16】


PD-L1盤陽性樣品集
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.001
0.01
0.1
1
10
濃度μg/ml
PG PD-L1p06
PG PD-L1p07
PG PD-L1p08
PG PD-L1p09
PG PD-L1p10
PG PD-L1p11
PG PD-L1p12
PG PD-L1p13
PG5594p01


PD-L1盤陰性樣品集
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.001
0.01
0.1
1
10
濃度μg/ml
PG1122p118
PG1122p119
PG1122p120
PG1122p121
PG1122p122
PG1122p123
PG1122p124
PG1122p125
PG1122p126
PG1122p127
PG1122p128
PG1122p129
PG1122p130
PG1122p131
PG1122p132

【圖16】(續)

| C-區域之股、轉角及環(5) | C-區域之IMGT獨特編號 | CH1 | | | | C-區域之股、轉角及環(5) | C-區域之IMGT獨特編號 | CH2 | | | | C-區域之股、轉角及環(5) | C-區域之IMGT獨特編號 | CH3 | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | IGHG1胺基酸轉譯 J00228 (1) | IMGT外顯子編號 1-98 | Eu編號 [1] (1) (98 aa) 118-215 | Kabat編號[2] | | | IGHG1胺基酸轉譯 J00228 (1) | IMGT外顯子編號 1-110 | Eu編號 [1] (1) (110 aa) (2) 231-340 | Kabat編號[2] | | | IGHG1胺基酸轉譯 J00228 (1) | IMGT外顯子編號 1-107 | Eu編號 [1] (1) (107 aa) (3) 341-446 | Kabat編號[2] |
| | 1.8 | - | - | - | - | | 1.8 | - | - | - | - | | 1.8 | - | - | - | - |
| | 1.7 | - | - | - | - | | 1.7 | - | - | - | - | | 1.7 | - | - | - | - |
| | 1.6 | - | - | - | - | | 1.6 | (A) | 1 | 231 | 244 | | 1.6 | - | - | - | - |
| | 1.5 | - | - | - | - | | 1.5 | P | 2 | 232 | 245 | | 1.5 | - | - | - | - |
| | 1.4 | (A) | 1 | 118 | 114 | | 1.4 | E | 3 | 233 | 246 | | 1.4 | (G) | 1 | 341 | 361 |
| | 1.3 | S | 2 | 119 | 115 | | 1.3 | L | 4 | 234 | 247 | | 1.3 | Q | 2 | 342 | 363 |
| | 1.2 | T | 3 | 120 | 116 | | 1.2 | L | 5 | 235 | 248 | | 1.2 | P | 3 | 343 | 364 |
| | 1.1 | K | 4 | 121 | 117 | | 1.1 | G | 6 | 236 | 249 | | 1.1 | R | 4 | 344 | 365 |
| A-股 | 1 | G | 5 | 122 | 118 | A-股 | 1 | G | 7 | 237 | 250 | A-股 | 1 | E | 5 | 345 | 366 |
| | 2 | P | 6 | 123 | 119 | | 2 | P | 8 | 238 | 251 | | 2 | P | 6 | 346 | 367 |
| | 3 | S | 7 | 124 | 120 | | 3 | S | 9 | 239 | 252 | | 3 | Q | 7 | 347 | 368 |
| | 4 | V | 8 | 125 | 121 | | 4 | V | 10 | 240 | 253 | | 4 | V | 8 | 348 | 369 |
| | 5 | F | 9 | 126 | 122 | | 5 | F | 11 | 241 | 254 | | 5 | Y | 9 | 349 | 370 |
| | 6 | P | 10 | 127 | 123 | | 6 | L | 12 | 242 | 255 | | 6 | T | 10 | 350 | 371 |
| | 7 | L | 11 | 128 | 124 | | 7 | F | 13 | 243 | 256 | | 7 | L | 11 | 351 | 372 |
| | 8 | A | 12 | 129 | 125 | | 8 | P | 14 | 244 | 257 | | 8 | P | 12 | 352 | 373 |
| | 9 | P | 13 | 130 | 126 | | 9 | P | 15 | 245 | 258 | | 9 | P | 13 | 353 | 374 |
| | 10 | S | 14 | 131 | 127 | | 10 | K | 16 | 246 | 259 | | 10 | S | 14 | 354 | 375 |
| | 11 | S | 15 | 132 | 128 | | 11 | P | 17 | 247 | 260 | | 11 | R | 15 | 355 | 376 |
| | 12 | K | 16 | 133 | 129 | | 12 | K | 18 | 248 | 261 | | 12 | D | 16 | 356 | 377 |
| | 13 | S | 17 | 134 | 130 | | 13 | D | 19 | 249 | 262 | | 13 | E | 17 | 357 | 378 |
| | 14 | T | 18 | 135 | 133 | | 14 | T | 20 | 250 | 263 | | 14 | L | 18 | 358 | 381 |
| | 15 | S | 19 | 136 | 134 | | 15 | L | 21 | 251 | 264 | | 15 | T | 19 | 359 | 382 |
| AB-轉角 | 15.1 | - | - | - | - | AB-轉角 | 15.1 | M | 22 | 252 | 265 | AB-轉角 | 15.1 | - | - | - | - |
| | 15.2 | - | - | - | - | | 15.2 | I | 23 | 253 | 266 | | 15.2 | - | - | - | - |
| | 15.3 | - | - | - | - | | 15.3 | - | - | - | - | | 15.3 | - | - | - | - |

【圖17】

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| B-股 | **16** | G | 20 | 137 | 135 | B-股 | **16** | S | 24 | 254 | 267 | B-股 | **16** | K | 20 | 360 | 383 |
| | **17** | G | 21 | 138 | 136 | | **17** | R | 25 | 255 | 268 | | **17** | N | 21 | 361 | 384 |
| | **18** | T | 22 | 139 | 137 | | **18** | T | 26 | 256 | 269 | | **18** | Q | 22 | 362 | 385 |
| | **19** | A | 23 | 140 | 138 | | **19** | P | 27 | 257 | 270 | | **19** | V | 23 | 363 | 386 |
| | **20** | A | 24 | 141 | 139 | | **20** | E | 28 | 258 | 271 | | **20** | S | 24 | 364 | 387 |
| | **21** | L | 25 | 142 | 140 | | **21** | V | 29 | 259 | 272 | | **21** | L | 25 | 365 | 388 |
| | **22** | G | 26 | 143 | 141 | | **22** | T | 30 | 260 | 273 | | **22** | T | 26 | 366 | 389 |
| | **23** | C | 27 | 144 | 142 | | **23** | C | 31 | 261 | 274 | | **23** | C | 27 | 367 | 390 |
| | **24** | L | 28 | 145 | 143 | | **24** | V | 32 | 262 | 275 | | **24** | L | 28 | 368 | 391 |
| | **25** | V | 29 | 146 | 144 | | **25** | V | 33 | 263 | 276 | | **25** | V | 29 | 369 | 392 |
| | **26** | K | 30 | 147 | 145 | | **26** | V | 34 | 264 | 277 | | **26** | K | 30 | 370 | 393 |
| BC-環 | **27** | D | 31 | 148 | 146 | BC-環 | **27** | D | 35 | 265 | 278 | BC-環 | **27** | G | 31 | 371 | 394 |
| | **28** | Y | 32 | 149 | 147 | | **28** | V | 36 | 266 | 279 | | **28** | F | 32 | 372 | 395 |
| | **29** | F | 33 | 150 | 148 | | **29** | S | 37 | 267 | 280 | | **29** | Y | 33 | 373 | 396 |
| | **30** | P | 34 | 151 | 149 | | **30** | H | 38 | 268 | 281 | | **30** | P | 34 | 374 | 397 |
| | **31** | - | - | - | - | | **31** | E | 39 | 269 | 282 | | **31** | - | - | - | - |
| | **34** | - | - | - | - | | **34** | D | 40 | 270 | 283 | | **34** | - | - | - | - |
| | **35** | E | 35 | 152 | 150 | | **35** | P | 41 | 271 | 284 | | **35** | S | 35 | 375 | 398 |
| | **36** | P | 36 | 153 | 151 | | **36** | E | 42 | 272 | 285 | | **36** | D | 36 | 376 | 399 |
| | **37** | V | 37 | 154 | 152 | | **37** | V | 43 | 273 | 286 | | **37** | I | 37 | 377 | 400 |
| | **38** | T | 38 | 155 | 153 | | **38** | K | 44 | 274 | 287 | | **38** | A | 38 | 378 | 401 |
| C-股 | **39** | V | 39 | 156 | 154 | C-股 | **39** | F | 45 | 275 | 288 | C-股 | **39** | V | 39 | 379 | 402 |
| | **40** | S | 40 | 157 | 156 | | **40** | N | 46 | 276 | 289 | | **40** | E | 40 | 380 | 405 |
| | **41** | W | 41 | 158 | 157 | | **41** | W | 47 | 277 | 290 | | **41** | W | 41 | 381 | 406 |
| | **42** | N | 42 | 159 | 162 | | **42** | Y | 48 | 278 | 291 | | **42** | E | 42 | 382 | 407 |
| | **43** | S | 43 | 160 | 163 | | **43** | V | 49 | 279 | 292 | | **43** | S | 43 | 383 | 408 |
| | **44** | G | 44 | 161 | 164 | | **44** | D | 50 | 280 | 295 | | **44** | N | 44 | 384 | 410 |
| | **45** | A | 45 | 162 | 165 | | **45** | G | 51 | 281 | 296 | | **45** | G | 45 | 385 | 411 |
| CD-股 | **45.1** | **L** | 46 | 163 | 166 | CD-股 | **45.1** | **V** | 52 | 282 | 299 | CD-股 | **45.1** | **Q** | 46 | 386 | 414 |
| | **45.2** | **T** | 47 | 164 | 167 | | **45.2** | **E** | 53 | 283 | 300 | | **45.2** | **P** | 47 | 387 | 415 |
| | **45.3** | **S** | 48 | 165 | 168 | | **45.3** | **V** | 54 | 284 | 301 | | **45.3** | **E** | 48 | 388 | 416 |
| | **45.4** | - | - | - | - | | **45.4** | **H** | 55 | 285 | 302 | | **45.4** | **N** | 49 | 389 | 417 |
| | **45.5** | - | - | - | - | | **45.5** | - | - | - | - | | **45.5** | - | - | - | - |
| | **45.6** | - | - | - | - | | **45.6** | - | - | - | - | | **45.6** | - | - | - | - |
| | **45.7** | - | - | - | - | | **45.7** | - | - | - | - | | **45.7** | - | - | - | - |

【圖17】(續)

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| D-股 | **77** | G | 49 | 166 | 169 | D-股 | **77** | N | 56 | 286 | 303 | D-股 | **77** | N | 50 | 390 | 418 |
| | **78** | V | 50 | 167 | 171 | | **78** | A | 57 | 287 | 304 | | **78** | Y | 51 | 391 | 419 |
| | **79** | H | 51 | 168 | 172 | | **79** | K | 58 | 288 | 305 | | **79** | K | 52 | 392 | 420 |
| | **80** | T | 52 | 169 | 173 | | **80** | T | 59 | 289 | 306 | | **80** | T | 53 | 393 | 421 |
| | **81** | F | 53 | 170 | 174 | | **81** | K | 60 | 290 | 307 | | **81** | T | 54 | 394 | 422 |
| | **82** | P | 54 | 171 | 175 | | **82** | P | 61 | 291 | 308 | | **82** | P | 55 | 395 | 423 |
| | **83** | A | 55 | 172 | 176 | | **83** | R | 62 | 292 | 309 | | **83** | P | 56 | 396 | 424 |
| | **84** | V | 56 | 173 | 177 | | **84** | E | 63 | 293 | 310 | | **84** | V | 57 | 397 | 425 |
| DE-轉角 | **84.1** | **L** | 57 | 174 | 178 | DE-轉角 | **84.1** | **E** | 64 | 294 | 311 | DE-轉角 | **84.1** | **L** | 58 | 398 | 426 |
| | **84.2** | **Q** | 58 | 175 | 179 | | **84.2** | **Q** | 65 | 295 | 312 | | **84.2** | **D** | 59 | 399 | 427 |
| | **84.3** | **S** | 59 | 176 | 180 | | **84.3** | **Y** | 66 | 296 | 313 | | **84.3** | **S** | 60 | 400 | 428 |
| | **84.4** | **S** | 60 | 177 | 182 | | **84.4** | **N** | 67 | 297 | 314 | | **84.4** | **D** | 61 | 401 | 430 |
| | **84.5** | - | - | - | - | | **84.5** | - | - | - | - | | **84.5** | - | - | - | - |
| | **84.6** | - | - | - | - | | **84.6** | - | - | - | - | | **84.6** | - | - | - | - |
| | **84.7** | - | - | - | - | | **84.7** | - | - | - | - | | **84.7** | - | - | - | - |
| | **85.7** | - | - | - | - | | **85.7** | - | - | - | - | | **85.7** | - | - | - | - |
| | **85.6** | - | - | - | - | | **85.6** | - | - | - | - | | **85.6** | - | - | - | - |
| | **85.5** | - | - | - | - | | **85.5** | - | - | - | - | | **85.5** | - | - | - | - |
| | **85.4** | **G** | 61 | 178 | 183 | | **85.4** | **S** | 68 | 298 | 317 | | **85.4** | **G** | 62 | 402 | 433 |
| | **85.3** | **L** | 62 | 179 | 184 | | **85.3** | **T** | 69 | 299 | 318 | | **85.3** | **S** | 63 | 403 | 434 |
| | **85.2** | **Y** | 63 | 180 | 185 | | **85.2** | **Y** | 70 | 300 | 319 | | **85.2** | **F** | 64 | 404 | 435 |
| | **85.1** | **S** | 64 | 181 | 186 | | **85.1** | **R** | 71 | 301 | 320 | | **85.1** | **F** | 65 | 405 | 436 |
| E-股 | **85** | L | 65 | 182 | 187 | E-股 | **85** | V | 72 | 302 | 321 | E-股 | **85** | L | 66 | 406 | 437 |
| | **86** | S | 66 | 183 | 188 | | **86** | V | 73 | 303 | 322 | | **86** | Y | 67 | 407 | 438 |
| | **87** | S | 67 | 184 | 189 | | **87** | S | 74 | 304 | 323 | | **87** | S | 68 | 408 | 439 |
| | **88** | V | 68 | 185 | 190 | | **88** | V | 75 | 305 | 324 | | **88** | K | 69 | 409 | 440 |
| | **89** | V | 69 | 186 | 191 | | **89** | L | 76 | 306 | 325 | | **89** | L | 70 | 410 | 441 |
| | **90** | T | 70 | 187 | 192 | | **90** | T | 77 | 307 | 326 | | **90** | T | 71 | 411 | 442 |
| | **91** | V | 71 | 188 | 193 | | **91** | V | 78 | 308 | 327 | | **91** | V | 72 | 412 | 443 |
| | **92** | P | 72 | 189 | 194 | | **92** | L | 79 | 309 | 328 | | **92** | D | 73 | 413 | 444 |
| | **93** | S | 73 | 190 | 195 | | **93** | H | 80 | 310 | 329 | | **93** | K | 74 | 414 | 445 |
| | **94** | S | 74 | 191 | 196 | | **94** | Q | 81 | 311 | 330 | | **94** | S | 75 | 415 | 446 |
| | **95** | S | 75 | 192 | 197 | | **95** | D | 82 | 312 | 331 | | **95** | R | 76 | 416 | 447 |
| | **96** | L | 76 | 193 | 198 | | **96** | W | 83 | 313 | 332 | | **96** | W | 77 | 417 | 448 |
| EF-轉角 | **96.1** | - | - | - | - | EF-轉角 | **96.1** | - | - | - | - | EF-轉角 | **96.1** | - | - | - | - |
| | **96.2** | - | - | - | - | | **96.2** | - | - | - | - | | **96.2** | - | - | - | - |

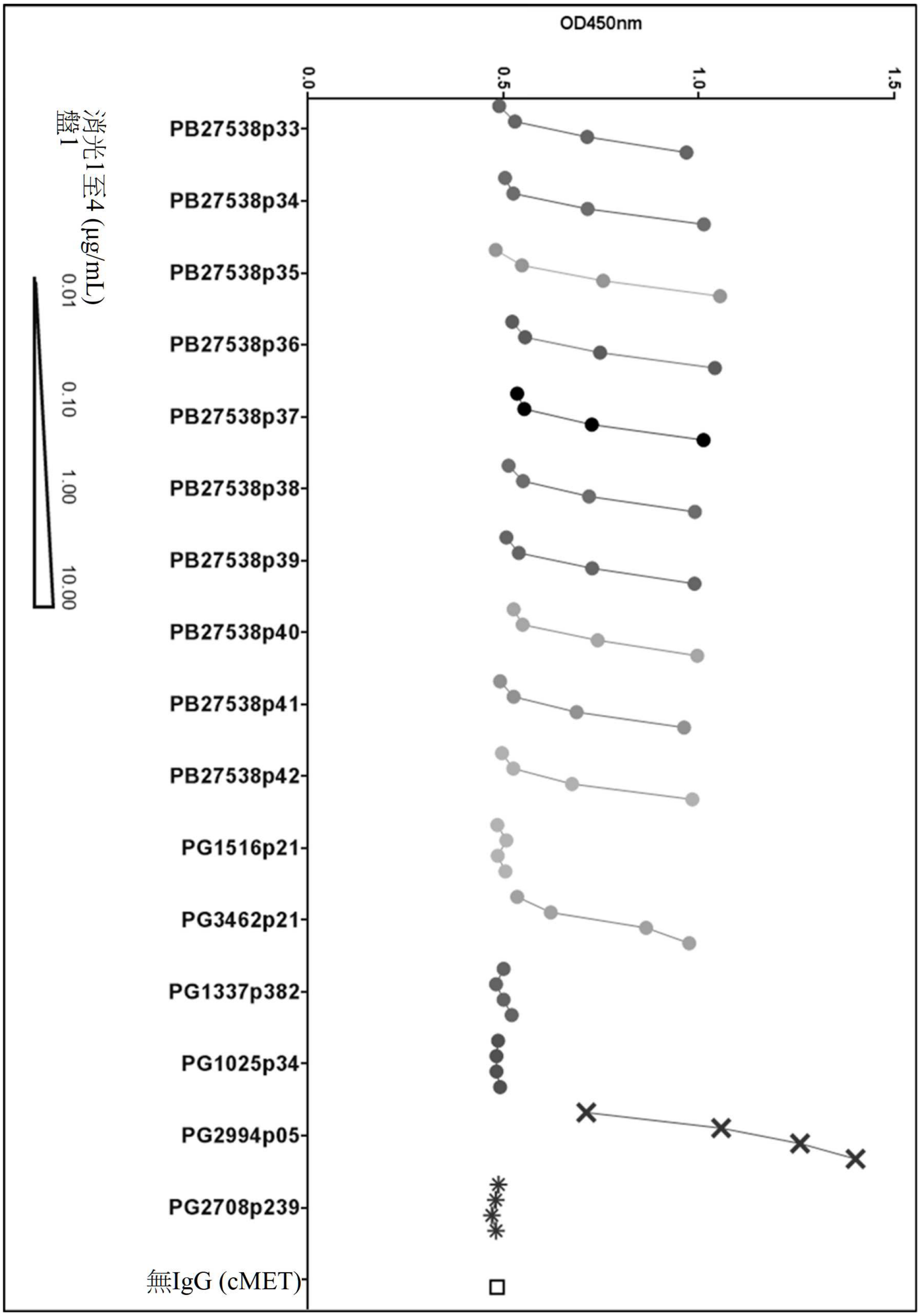
【圖17】(續)

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| F-股 | **97** | - | - | - | - | F-股 | **97** | L | 84 | 314 | 333 | F-股 | **97** | Q | 78 | 418 | 449 |
| | **98** | G | 77 | 194 | 199 | | **98** | N | 85 | 315 | 334 | | **98** | Q | 79 | 419 | 450 |
| | **99** | T | 78 | 195 | 200 | | **99** | G | 86 | 316 | 335 | | **99** | G | 80 | 420 | 451 |
| | **100** | Q | 79 | 196 | 203 | | **100** | K | 87 | 317 | 336 | | **100** | N | 81 | 421 | 452 |
| | **101** | T | 80 | 197 | 205 | | **101** | E | 88 | 318 | 337 | | **101** | V | 82 | 422 | 453 |
| | **102** | Y | 81 | 198 | 206 | | **102** | Y | 89 | 319 | 338 | | **102** | F | 83 | 423 | 454 |
| | **103** | I | 82 | 199 | 207 | | **103** | K | 90 | 320 | 339 | | **103** | S | 84 | 424 | 455 |
| | **104** | C | 83 | 200 | 208 | | **104** | C | 91 | 321 | 340 | | **104** | C | 85 | 425 | 456 |
| FG-環 | **105** | N | 84 | 201 | 209 | FG-環 | **105** | K | 92 | 322 | 341 | FG-環 | **105** | S | 86 | 426 | 457 |
| | **106** | V | 85 | 202 | 210 | | **106** | V | 93 | 323 | 342 | | **106** | V | 87 | 427 | 458 |
| | **107** | N | 86 | 203 | 211 | | **107** | S | 94 | 324 | 343 | | **107** | M | 88 | 428 | 459 |
| | **108** | H | 87 | 204 | 212 | | **108** | N | 95 | 325 | 344 | | **108** | H | 89 | 429 | 460 |
| | **109** | K | 88 | 205 | 213 | | **109** | K | 96 | 326 | 345 | | **109** | E | 90 | 430 | 461 |
| | **110** | P | 89 | 206 | 214 | | **110** | A | 97 | 327 | 346 | | **110** | A | 91 | 431 | 462 |
| | **111** | - | - | - | - | | **111** | - | - | - | - | | **111** | - | - | - | - |
| | **112** | - | - | - | - | | **112** | - | - | - | - | | **112** | L | 92 | 432 | 463 |
| | **113** | S | 90 | 207 | 215 | | **113** | L | 98 | 328 | 347 | | **113** | H | 93 | 433 | 464 |
| | **114** | N | 91 | 208 | 216 | | **114** | P | 99 | 329 | 348 | | **114** | N | 94 | 434 | 465 |
| | **115** | T | 92 | 209 | 217 | | **115** | A | 100 | 330 | 349 | | **115** | H | 95 | 435 | 466 |
| | **116** | K | 93 | 210 | 218 | | **116** | P | 101 | 331 | 350 | | **116** | Y | 96 | 436 | 467 |
| | **117** | V | 94 | 211 | 219 | | **117** | I | 102 | 332 | 351 | | **117** | T | 97 | 437 | 468 |
| G-股 | **118** | D | 95 | 212 | 220 | G-股 | **118** | E | 103 | 333 | 352 | G-股 | **118** | Q | 98 | 438 | 469 |
| | **119** | K | 96 | 213 | 221 | | **119** | K | 104 | 334 | 353 | | **119** | K | 99 | 439 | 470 |
| | **120** | K | 97 | 214 | 222 | | **120** | T | 105 | 335 | 354 | | **120** | S | 100 | 440 | 471 |
| | **121** | V | 98 | 215 | 223 | | **121** | I | 106 | 336 | 355 | | **121** | L | 101 | 441 | 472 |
| | **122** | - | - | - | - | | **122** | S | 107 | 337 | 357 | | **122** | S | 102 | 442 | 473 |
| | **123** | - | - | - | - | | **123** | K | 108 | 338 | 358 | | **123** | L | 103 | 443 | 474 |
| | **124** | - | - | - | - | | **124** | A | 109 | 339 | 359 | | **124** | S | 104 | 444 | 475 |
| | **125** | - | - | - | - | | **125** | K | 110 | 340 | 360 | | **125** | P | 105 | 445 | 476 |
| | **126** | - | - | - | - | | **126** | - | - | - | - | | **126** | - | - | - | - |
| | **127** | - | - | - | - | | **127** | - | - | - | - | | **127** | - | - | - | - |
| | **128** | - | - | - | - | | **128** | - | - | - | - | | **128** | - | - | - | - |
| | **129** | - | - | - | - | | **129** | - | - | - | - | | 129 | G | CHS 106 | 446 | 477 |
| | **130** | - | - | - | - | | **130** | - | - | - | - | | 130 | K | CHS 107 | 447 | 478 |

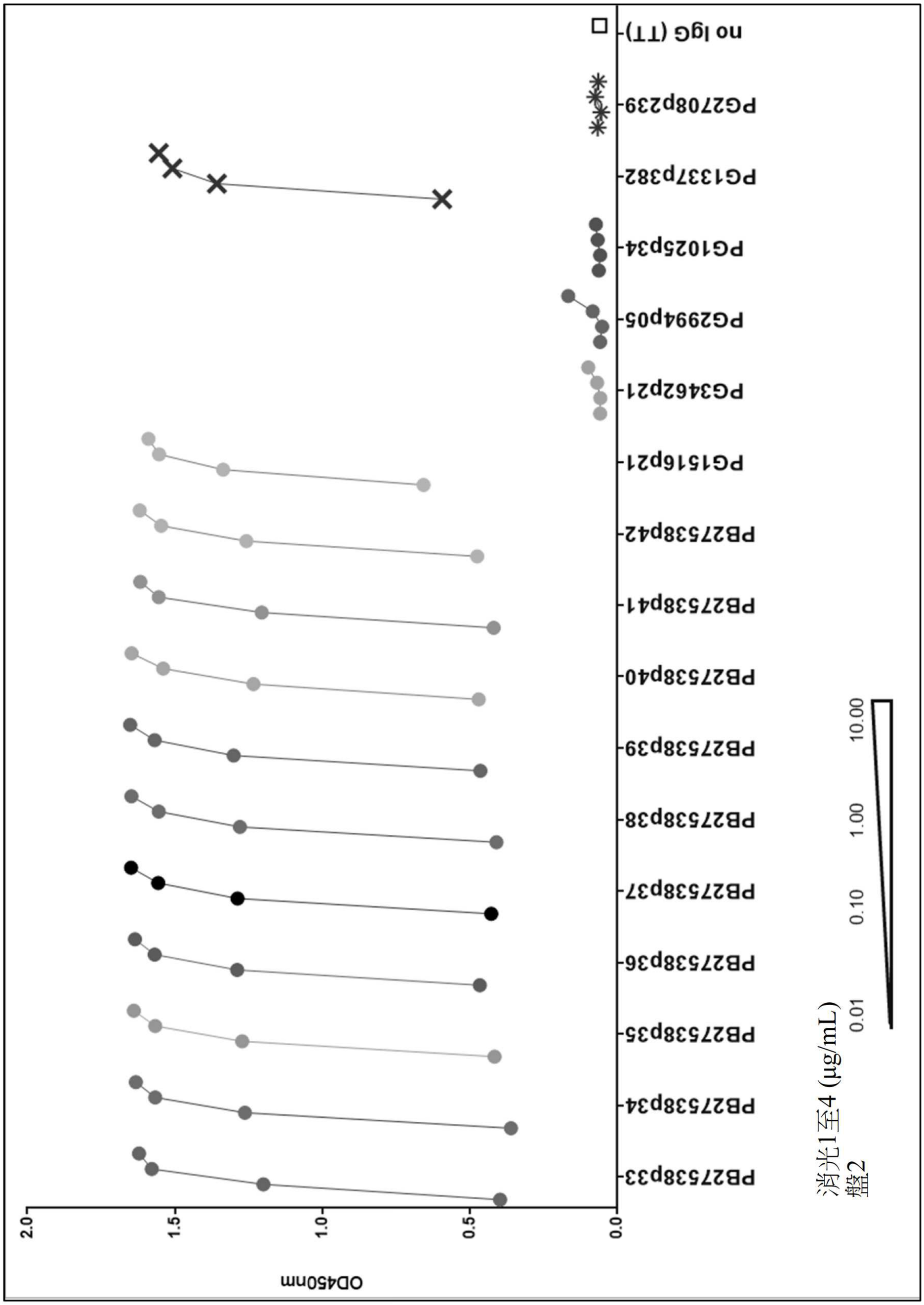
【圖17】(續)

| 鉸鏈之<br>IMGT編號 | IGHG1<br>胺基酸轉譯<br>J00228 | IMGT<br>外顯子<br>編號 | Eu編號<br>[1] (4) | Kabat<br>編號<br>[2] (4) |
|---|---|---|---|---|
| **1** | (E) | 1 | 216 | 226 |
| **2** | P | 2 | 217 | 227 |
| **3** | K | 3 | 218 | 228 |
| **4** | S | 4 | 219 | 232 |
| **5** | C | 5 | 220 | 233 |
| **6** | D | 6 | 221 | 234 |
| **7** | K | 7 | 222 | 235 |
| **8** | T | 8 | 223 | 236 |
| **9** | H | 9 | 224 | 237 |
| **10** | T | 10 | 225 | 238 |
| **11** | C | 11 | 226 | 239 |
| **12** | P | 12 | 227 | 240 |
| **13** | P | 13 | 228 | 241 |
| **14** | C | 14 | 229 | 242 |
| **15** | P | 15 | 230 | 243 |

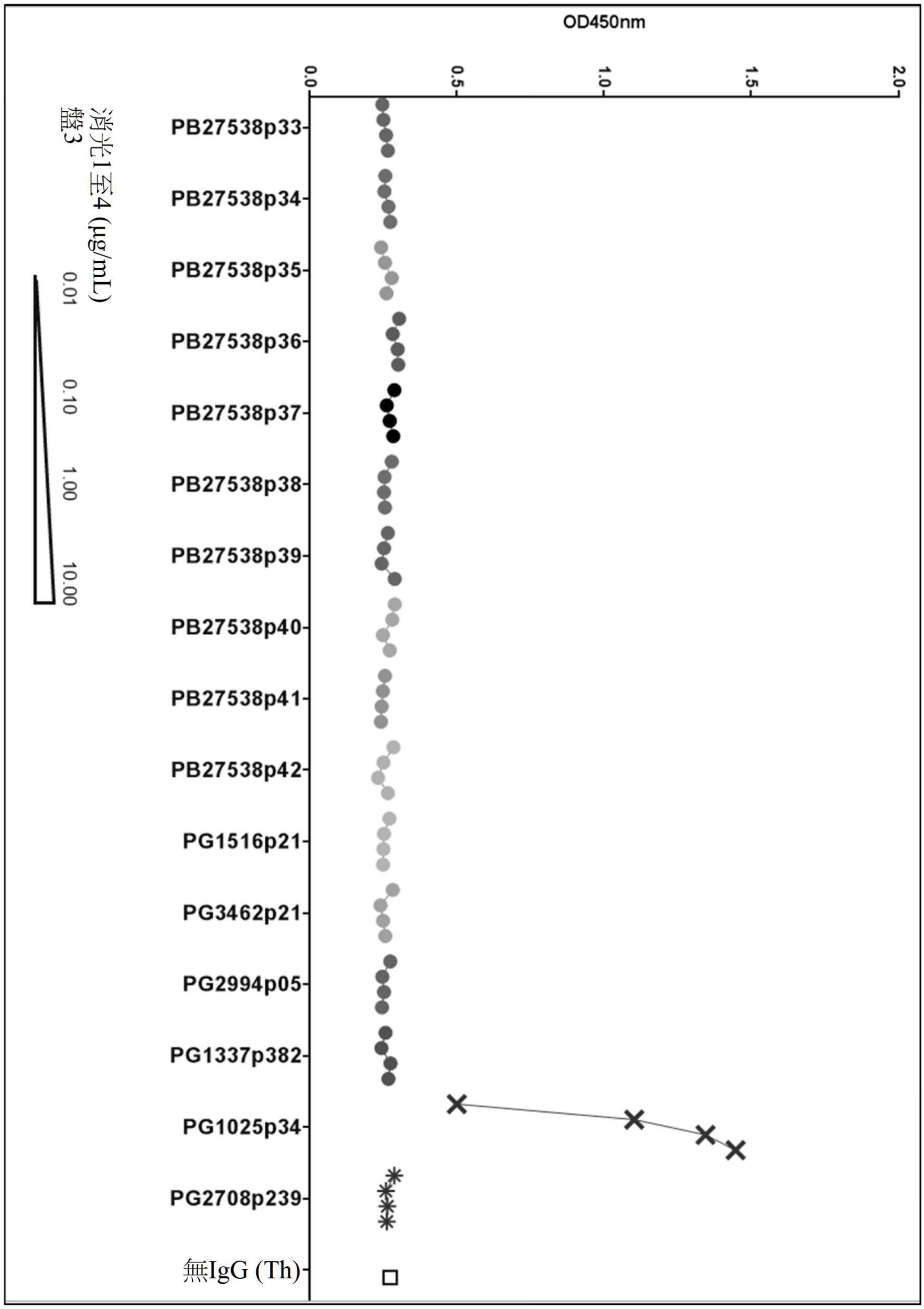
【圖17】(續)


OD450nm
0.0
0.5
1.0
1.5
PB27538p33
PB27538p34
PB27538p35
PB27538p36
PB27538p37
PB27538p38
PB27538p39
PB27538p40
PB27538p41
PB27538p42
PG1516p21
PG3462p21
PG1337p382
PG1025p34
PG2994p05
PG2708p239
無IgG (cMET)
經c-MET塗佈
濃光1至4 (μg/mL)
盤1
0.01
0.10
1.00
10.00

【圖18】


經TT塗佈
OD450nm
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
消光1至4 (μg/mL)
0.01
0.10
1.00
10.00
盤2
PB27538p33
PB27538p34
PB27538p35
PB27538p36
PB27538p37
PB27538p38
PB27538p39
PB27538p40
PB27538p41
PB27538p42
PG1516p21
PG3462p21
PG2994p05
PG1025p34
PG1337p382
PG2708p239
no IgG (TT)

【圖18】(續)


OD450nm
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
PB27538p33
PB27538p34
PB27538p35
PB27538p36
PB27538p37
PB27538p38
PB27538p39
PB27538p40
PB27538p41
PB27538p42
PG1516p21
PG3462p21
PG2994p05
PG1337p382
PG1025p34
PG2708p239
無IgG (Th)
經甲狀腺球蛋白塗佈盤3
消光1至4 (μg/mL)
0.01
0.10
1.00
10.00

【圖18】(續)

| | 孔編號 | PB | MG1 | MG1變異體 | MG2 | MG2變異體 | 目標 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| PB | A1 | PB27538p33 | MG1516C3209 | WT | MG3462C3215 | WT | TTxc-MET |
| | B1 | PB27538p34 | MG1516C3209 | WT | MG3462C3215 | WT | TTxc-MET |
| | C1 | PB27538p35 | MG1516C3210 | K370S | MG3462C3215 | WT | TTxc-MET |
| | D1 | PB27538p36 | MG1516C3211 | K370T | MG3462C3215 | WT | TTxc-MET |
| | E1 | PB27538p37 | MG1516C3212 | V303E | MG3462C3215 | WT | TTxc-MET |
| | F1 | PB27538p38 | MG1516C3209 | WT | MG3462C3216 | V303K | TTxc-MET |
| | G1 | PB27538p39 | MG1516C3209 | WT | MG3462C3217 | E382Q | TTxc-MET |
| | H1 | PB27538p40 | MG1516C3209 | WT | MG3462C3218 | E382T | TTxc-MET |
| | A2 | PB27538p41 | MG1516C3209 | WT | MG3462C3219 | E388L | TTxc-MET |
| | B2 | PB27538p42 | MG1516C3209 | WT | MG3462C3221 | E388T | TTxc-MET |
| WT IgG1 | C2 | PG1516p21 | MG1516C1057 | WT | NA | NA | TT |
| | D2 | PG3462p21 | MG3462C1057 | WT | NA | NA | c-MET |
| DEDE | E2 | PG1516p22 | MG1516C3209 | WT | NA | NA | TT |
| | F2 | PG1516p23 | MG1516C3210 | K370S | NA | NA | TT |
| | A3 | PG1516p24 | MG1516C3211 | K370T | NA | NA | TT |
| | B3 | PG1516p25 | MG1516C3212 | V303E | NA | NA | TT |
| KK | C3 | PG3462p22 | NA | NA | MG3462C3215 | WT | c-MET |
| | D3 | PG3462p23 | NA | NA | MG3462C3216 | V303K | c-MET |
| | E3 | PG3462p24 | NA | NA | MG3462C3217 | E382Q | c-MET |
| | F3 | PG3462p25 | NA | NA | MG3462C3218 | E382T | c-MET |
| | G3 | PG3462p26 | NA | NA | MG3462C3219 | E388L | c-MET |
| | H3 | PG3462p27 | NA | NA | MG3462C3221 | E388T | c-MET |

【圖19】

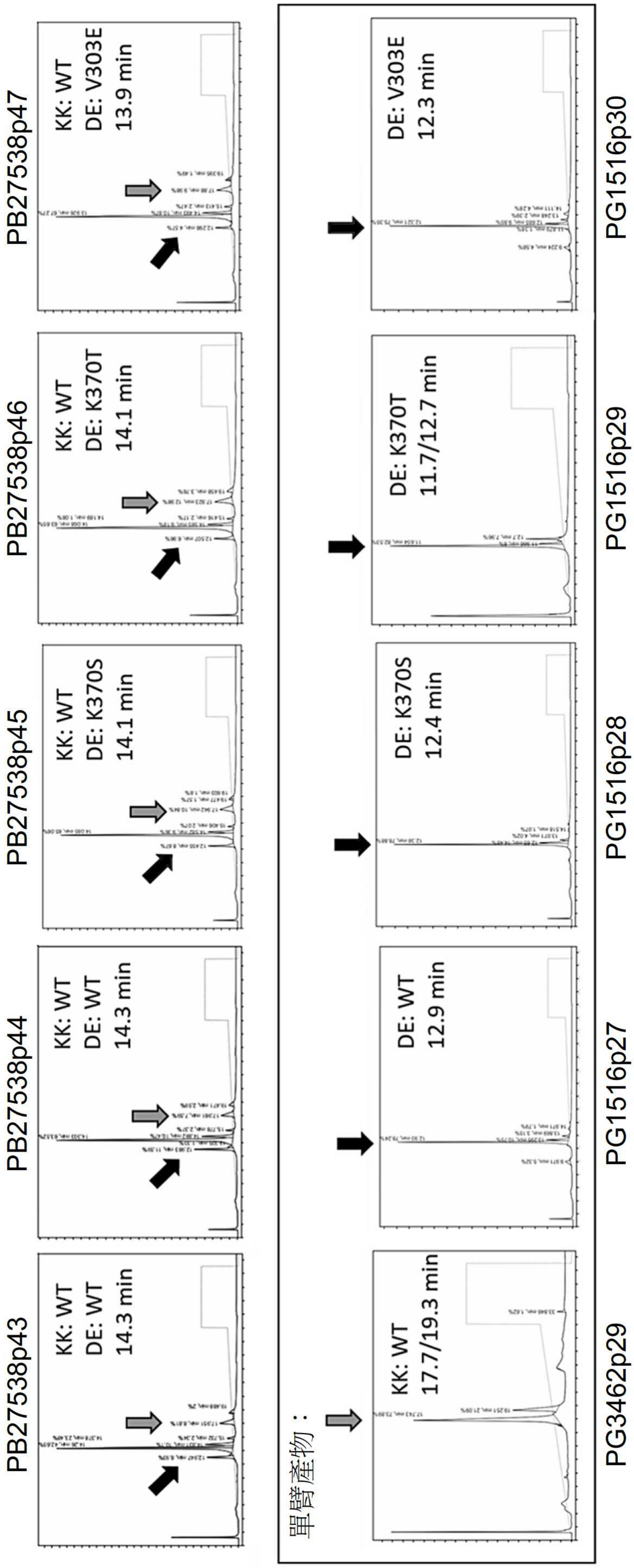
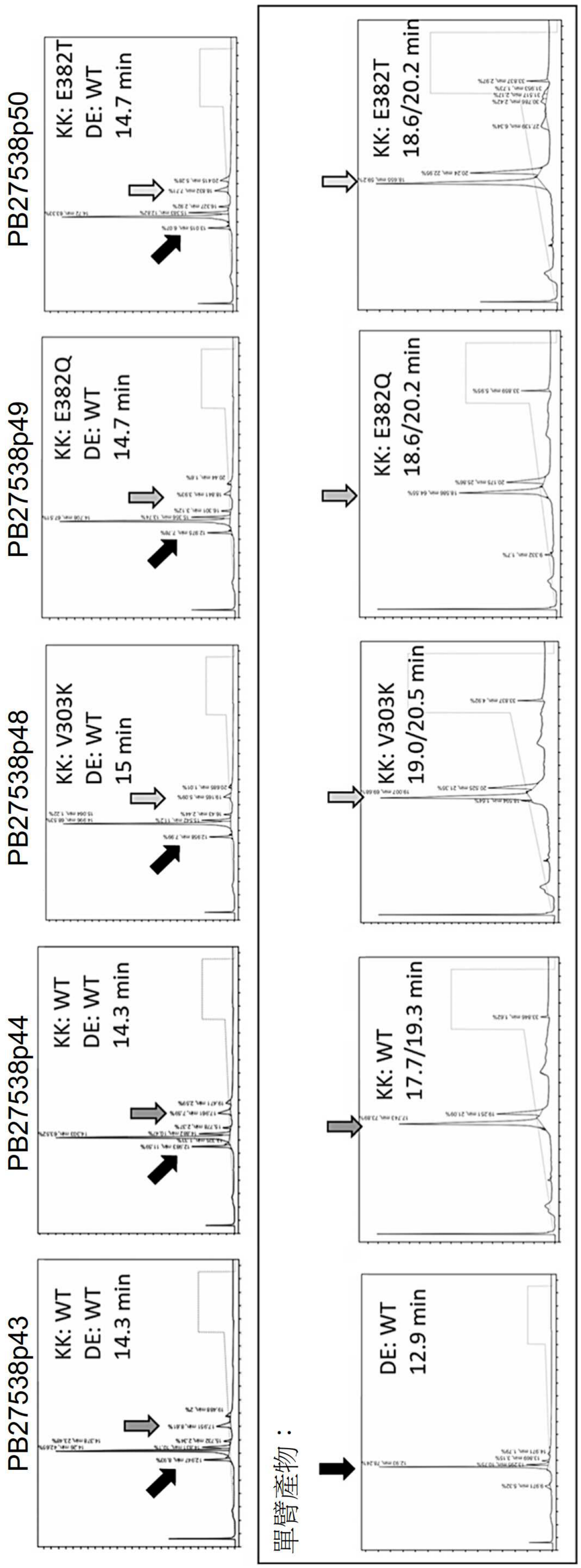

PB27538p47
KK: WT
DE: V303E
13.9 min
PG1516p30
DE: V303E
12.3 min
PB27538p46
KK: WT
DE: K370T
14.1 min
PG1516p29
DE: K370T
11.7/12.7 min
PB27538p45
KK: WT
DE: K370S
14.1 min
PG1516p28
DE: K370S
12.4 min
PB27538p44
KK: WT
DE: WT
14.3 min
PG1516p27
DE: WT
12.9 min
PB27538p43
KK: WT
DE: WT
14.3 min
單臂產物：
KK: WT
17.7/19.3 min
PG3462p29

圖20


PB27538p50
KK: E382T
DE: WT
14.7 min
PG3462p32
KK: E382T
18.6/20.2 min
PB27538p49
KK: E382Q
DE: WT
14.7 min
PG3462p31
KK: E382Q
18.6/20.2 min
PB27538p48
KK: V303K
DE: WT
15 min
PG3462p30
KK: V303K
19.0/20.5 min
PB27538p44
KK: WT
DE: WT
14.3 min
PG3462p29
KK: WT
17.7/19.3 min
PB27538p43
KK: WT
DE: WT
14.3 min
單臂產物：
DE: WT
12.9 min
PG1516p27

【圖21】

CH3/CH3同源二聚體界面殘基清單

Y349
T350
L351
S354
D356
E357
K360
S364
T366
L368
K370
N390
K392
T394
P395
V397
L398
D399
S400
F405
Y407
K409
K439

【圖22】