



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106103478 B

(45)授权公告日 2020.04.03

(21)申请号 201580015172.9

(22)申请日 2015.03.17

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106103478 A

(43)申请公布日 2016.11.09

(30)优先权数据

14161103.8 2014.03.21 EP

(续)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.09.20

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2015/055482 2015.03.17

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/140126 EN 2015.09.24

(73)专利权人 豪夫迈·罗氏有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 T·埃姆里希 H·克腾伯格

T·施洛特豪尔 A·肖赫

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 陈迎春 黄革生

(51)Int.Cl.

C07K 16/00(2006.01)

(续)

(56)对比文件

WO 2013120929 A1, 2013.08.22,

OLAFSEN TOVE.Fc engineering:serum half-life modulation through FcRn binding.《Methods In Molecular Biology》.2012,第907卷第537-556页.

W.WANG et al.Monoclonal Antibodies with Identical Fc Sequences Can Bind to FcRn Differentially with Pharmacokinetic Consequences.《DRUG METABOLISM AND DISPOSITION》.2011,第39卷(第9期),第1474-1476页.

ROOPENIAN DERRY C et al.FcRn:the neonatal Fc receptor comes of age.《The Journal of Immunology》.2007,第7卷(第9期),第715-725页.

JACQUELINE M.BENSON et al.Discovery and mechanism of ustekinumab:A human monoclonal antibody targeting interleukin-12 and interleukin-23 for treatment of immune-mediated disorders.《MABS》.2011,第3卷(第6期),第535-545页.

Schlothauer T et al.Analytical FcRn affinity chromatography for functional characterization of monoclonal antibodies.《MABs》.2013,第5卷(第4期),第576-586页.

审查员 李谦

权利要求书1页 说明书68页

序列表48页 附图23页

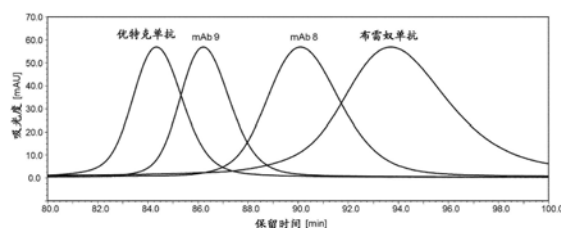
(54)发明名称

抗体体内半寿期的体外预测

(57)摘要

本文中报道了一种用于确定抗体-Fc-FcRn复合物中存在影响体内半寿期的抗体-Fab-FcRn相互作用的方法,所述方法包括步骤a)在第一氯化钠浓度存在下确定抗体在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,和b)在第二氯化钠浓度存在下确定抗体在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,因而

如果步骤a)中确定的保留时间和步骤b)中确定的保留时间实质上不同,则确定抗体-Fc-FcRn复合物中存在影响体内半寿期的抗体-Fab-FcRn相互作用。



[转续页]

[接上页]

(30) 优先权数据

14165987.0 2014.04.25 EP

(51) Int.Cl.

G07K 1/22(2006.01)

1. 一种选择相对于亲本抗体具有增加或减少的体内半衰期的Fab变体抗体的方法,包括以下步骤:

a) 在第一盐浓度存在下确定Fab变体抗体和亲本抗体在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,

b) 在第二盐浓度存在下确定Fab变体抗体和亲本抗体在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,

因此,在选择相对于亲本抗体具有增加的体内半衰期的Fab变体抗体的情况下,如下Fab变体抗体得到选择,其具有i) 在步骤a) 中确定的保留时间比步骤a) 中测定的亲本抗体的保留时间长至少5%,和ii) 步骤a) 中测定的保留时间在步骤b) 中测定的保留时间的5%以内,

因此,在选择相对于亲本抗体具有降低的体内半衰期的Fab变体抗体的情况下,如下Fab变体抗体得到选择,其具有i) 在步骤a) 中确定的保留时间比步骤a) 中测定的亲本抗体的保留时间短至少5%,和ii) 步骤a) 中测定的保留时间在步骤b) 中测定的保留时间的5%以内,

其中正线性pH梯度为pH5.5至pH8.8,

其中盐是氯化钠,

其中第一盐浓度在50mM和200mM之间,和

其中第二盐浓度在300mM和600mM之间。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中方法用于选择Fab变体抗体,所述Fab变体抗体具有与IgG1、IgG3或IgG4亚类的其亲本抗体相比增加的相对体内半寿期。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中第一盐浓度是约140mM。

4. 根据权利要求1或2所述的方法,其中第二盐浓度是约400mM。

5. 根据权利要求1或2所述的方法,其中保留时间与盐浓度的平方根分之一 ($1/\text{SQRT}(c(\text{盐}))$) 成正比。

抗体体内半寿期的体外预测

[0001] 本发明属于重组抗体技术领域,特别地属于定制抗体领域。本文中报道了一种基于FcRn亲和层析柱上确定的保留时间预测抗体体内半寿期的方法。

[0002] 发明背景

[0003] G类人免疫球蛋白(IgG)含有两个赋予靶抗原特异性的抗原结合(Fab)区和一个负责与Fc受体相互作用的恒定区(Fc区) ([1,2])。人IgG亚类1、2和4具有21天的平均血清半寿期,其长于任何其他已知血清蛋白的平均血清半寿期 ([3])。这种长半寿期主要由Fc区和新生Fc受体(FcRn)之间的相互作用介导 ([4,5])。这是为何使用IgG或含有Fc的融合蛋白作为一类广泛治疗药的原因之一。

[0004] 新生Fc受体FcRn是涉及IgG和白蛋白稳态、母源IgG跨胎盘转运及抗原-IgG免疫复合物吞噬的膜结合受体 ([6,9])。人FcRn是由糖基化I类主要组织相容性复合体样蛋白(α -FcRn)和 β_2 微球蛋白(β_{2m})亚基组成的异二聚体 ([10])。FcRn与Fc区的 C_{H2} - C_{H3} 区域中的位点结合 ([11-14])并且两个FcRn分子可以同时与Fc区结合 ([15,16])。FcRn和Fc区之间的亲和力是pH依赖的,在内体pH 5-6显示纳摩尔亲和力及在生理pH 7.4显示可忽略不计的结合作用 ([13,17,18])。赋予IgG长半寿期的基础机制可以由三个基本步骤解释。首先,IgG受到多种细胞类型的非特异性胞饮作用 ([19,20])。其次,IgG在酸性内体中在pH 5-6遇到并结合FcRn,因而保护IgG免遭溶酶体降解 ([11,21])。最后,IgG在胞外间隙中在生理pH 7.4释放 [4]。这种严格的pH依赖性结合和释放机制对IgG再生至关重要并且在不同pH值的结合特征的任何偏差可能强烈地影响IgG的循环半寿期 ([22])。

[0005] 除Fc区与FcRn特异性相互作用之外,还已经提出Fab区有助于FcRn结合 ([23-25])。例如,在中性pH时Fab介导的残余结合作用与一组治疗性抗体的药代动力学特性相关,这表明在pH 7.3与FcRn过多结合的IgG遭遇终末半寿期减少 ([24])。最近,Schlothauer等人 ([25])已经描述了一种新的pH梯度FcRn亲和层析方法,所述方法密切模拟FcRn和IgG之间解离的生理状况。另外,他们显示,具有相同Fc区的IgG在其从FcRn解离方面有差异,因而提示Fab区影响FcRn结合作用。

[0006] 但是,Fab区如何影响FcRn结合作用的基础机制仍未阐明。

[0007] Schlothauer,T.等人报道了用于功能性表征单克隆抗体的分析性FcRn亲和层析 ([25])。Wang,W.等人 ([24])报道,具有相同Fc序列的单克隆抗体可以与FcRn差异性结合,连同药代动力学结果。Suzuki,T.等人报道了新生FcR在调节含有人IgG1Fc结构域的治疗性蛋白的血清半寿期中的重要性 ([23])。Igawa,T.等人 ([37])报道了通过工程化可变区减少IgG抗体的消除。Vaccaro,C.等人报道了工程化免疫球蛋白G的Fc区以调节体内抗体水平 ([22])。Prabhat,P.等人 ([40])报告通过使用多焦平面显微术,阐明导致胞吐Fc受体(FcRn)的胞内再生途径。Putnam,W.S.等人报道了单克隆抗体的药代动力学、药效动力学和免疫原性可比性评估策略 ([36])。Boswell,C.A.等人 ([38])报道了电荷对抗体组织分布和药代动力学的影响。Khawli,L.A.等人报道了用生物素化学修饰后放射碘化的嵌合TNT-1、-2和-3单克隆抗体的药代动力学特征和生物分布 ([35])。

[0008] 在WO 2013/120929中报道了基于Fc受体的亲和层析。在US 2011/0111406中报道

了一种将抗原结合分子与抗原多次结合的方法。在US 2014/0013456中报道了组氨酸工程化的轻链抗体和用于产生相同轻链抗体的基因修饰的非人类动物。

[0009] 最近已经讨论了Fab区对FcRn相互作用的影响([23,24,25])。

[0010] 然而,具有相同Fc区的抗体并不简单地必然具有相似的PK特征。已经报道Fab区对FcRn结合作用的额外贡献,但是基础机制仍未知([47],[24],[25])。

[0011] 除Fc区与FcRn的特异性相互作用之外,还提出Fab区有助于FcRn-IgG相互作用([37,24,25])。

[0012] 推迟发表的Li,B.等人([48])报道,框架选择可以通过分子电荷的差异影响人源化治疗性抗体的药代动力学。

[0013] Sampei,Z.等人([49])报告模拟因子VIII辅因子活性的功能的非对称双特异性IgG抗体的鉴定和多维优化。

[0014] Wang等人([24])报道,具有不同靶特异性和Fab区但Fc序列相同的IgG可以具有不同的FcRn亲和力。在近乎生理pH时Fab介导的残余结合作用与一组治疗性抗体的药代动力学特性相关,这表明在pH 7.3与FcRn过多结合的IgG遭遇终末半寿期减少。

[0015] 最近,Schlothauer等人([25])已经描述了一种新的pH梯度FcRn亲和层析方法,所述方法密切模拟FcRn和IgG之间解离的生理状况。另外,他们显示,具有相同Fc区的IgG在体外从FcRn解离方面有差异,因而提示Fab区影响FcRn-IgG结合作用。

[0016] Benson,J.M.等人([50])报道了优特克单抗(Ustekinumab)(用于治疗免疫介导疾病的靶向白介素-12和白介素-23的人单克隆抗体)的发现和机制。

[0017] WO 2013/087911中报道了抗体布雷奴单抗(Briakinumab)的氨基酸序列(SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40),WO 2013/087911中报道了抗体优特克单抗的氨基酸序列(SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38)并且药物库条目DB00112中报道了抗体贝伐单抗的氨基酸序列。

[0018] 发明简述

[0019] 已经发现,Fv结构域中的电荷分布影响抗体-FcRn结合并导致抗体和FcRn之间的额外相互作用。这改变了FcRn结合作用特征,尤其相对于抗体-FcRn复合物在pH 7.4的解离而言,因而减少抗体的FcRn依赖性终末半寿期。

[0020] 如本文中报道的一个方面是一种用于确定存在影响抗体体内半寿期的抗体-Fab-FcRn相互作用的方法,所述方法包括以下步骤:

[0021] a) 在第一盐浓度存在下确定抗体在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,

[0022] b) 在第二盐浓度存在下确定抗体在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,

[0023] 因而如果步骤a)中确定的保留时间和步骤b)中确定的保留时间实质上不同,则确定存在影响抗体体内半寿期的抗体-Fab-FcRn相互作用。

[0024] 抗体-Fab-FcRn相互作用是抗体的Fab-区域与FcRn之间的相互作用。如果确实存在,在抗体已经由FcRn结合后,这种相互作用出现。因此,这种相互作用的建立是两步骤过程。在第一步骤中,形成抗体-FcRn复合物,更精确地,抗体-Fc-FcRn复合物。在抗体-Fc-FcRn复合物已经形成后的第二步骤是抗体-Fab-FcRn相互作用的建立。如可以从这里见到,仅采用全长抗体时,才可以建立这两种相互作用,即抗体-Fc-FcRn相互作用和抗体-Fab-

FcRn相互作用。

[0025] 如本文中报道的一个方面是一种用于确定抗体-FcRn复合物中存在影响体内半寿期的Fab-FcRn相互作用的方法,所述方法包括以下步骤:

[0026] a) 在第一盐浓度存在下确定抗体在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,

[0027] b) 在第二盐浓度存在下确定抗体在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,

[0028] 因而如果步骤a)中确定的保留时间和步骤b)中确定的保留时间实质上不同,则确定抗体-FcRn复合物中存在影响体内半寿期的Fab-FcRn相互作用。

[0029] 如本文中报道的另一个方面是一种用于确定抗体相对体内半寿期(the relative in vivo half-life)的方法,所述方法包括以下步骤:

[0030] a) 在第一盐浓度存在下确定抗体在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,

[0031] b) 在第二盐浓度存在下确定抗体在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,

[0032] 因而如果步骤a)中确定的保留时间和步骤b)中确定的保留时间实质上不同,则抗体具有与IgG类的标准/天然抗体相比减少的相对体内半寿期。

[0033] 在一个实施方案中,IgG类的抗体是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚类的抗体。在一个实施方案中,IgG类的抗体是IgG1、IgG3或IgG4亚类的抗体。在一个实施方案中,IgG类的抗体是IgG1或IgG4亚类的抗体。在一个实施方案中,IgG类的抗体是IgG1亚类的抗体。在一个实施方案中,IgG类的抗体是IgG4亚类的抗体。

[0034] 如本文中报道的又一个方面是一种用于确定变异抗体相对于其亲本抗体的体内半寿期增加或减少的方法,所述方法包括以下步骤:

[0035] a) 在第一盐浓度存在下确定变异抗体和其亲本抗体在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,

[0036] b) 在第二盐浓度存在下确定变异抗体和其亲本抗体在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,

[0037] 因而如果i) 步骤a)中确定的变异抗体的保留时间比步骤a)中确定的其亲本抗体的保留时间更长,并且ii) 步骤a)中确定的变异抗体的保留时间和步骤b)中确定的变异抗体的保留时间基本上相同,则变异抗体的体内半寿期相对于其亲本抗体增加,因而如果i) 步骤a)中确定的变异抗体的保留时间比步骤a)中确定的其亲本抗体的保留时间更短,并且ii) 步骤a)中确定的变异抗体的保留时间和步骤b)中确定的变异抗体的保留时间基本上相同,则变异抗体的体内半寿期相对于其亲本抗体减少。

[0038] 如本文中报道的另一个方面是一种用于确定体内半寿期相对于参考抗体而增加或减少的抗体的方法,所述方法包括以下步骤:

[0039] a) 在第一盐浓度存在下确定抗体和参考抗体在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,

[0040] b) 在第二盐浓度存在下确定抗体和参考抗体在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,

[0041] 因而在选择体内半寿期相对于参考抗体而增加的抗体情况下,选择这样的抗体,所述抗体具有i)步骤a)中确定的比步骤a)中确定的参考抗体的保留时间更长的保留时间,和ii)步骤a)中确定的与步骤b)中确定的保留时间基本上相同的保留时间,

[0042] 因而在选择体内半寿期相对于参考抗体而减少的抗体情况下,选择这样的抗体,所述抗体具有i)步骤a)中确定的比步骤a)中确定的参考抗体的保留时间更短的保留时间,和ii)步骤a)中确定的与步骤b)中确定的保留时间基本上相同的保留时间。

[0043] 如本文中报道的另一个方面是一种用于选择无影响抗体体内半寿期的抗体-Fab-FcRn相互作用的抗体的方法:

[0044] a) 在第一盐浓度存在下确定抗体在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,

[0045] b) 在第二盐浓度存在下确定抗体在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,

[0046] 因而选出这样的抗体,所述抗体具有步骤a)中确定的并非与步骤b)中确定的保留时间实质上不同的保留时间,并且因而选择无影响抗体体内半寿期的抗体-Fab-FcRn相互作用的抗体。

[0047] 如本文中报道的一个方面是一种用于产生抗体的方法,所述方法包括以下步骤

[0048] a) 提供包含一种或多种核酸的细胞,所述核酸编码用如本文报道的方法选择的相对于参考抗体而言半寿期增加或减少的抗体,并且

[0049] b) 在培养基中培养细胞并从细胞或培养基回收抗体,并且因而产生该抗体。

[0050] 如本文中报道的一个方面是一种用于增加抗体体内半寿期的方法,所述方法包括以下步骤:

[0051] -将抗体轻链中位置27、55和94处的带电荷氨基酸残基改变成疏水性或中性亲水氨基酸残基(根据Kabat编号)并且因而增加抗体的体内半寿期。

[0052] 如本文中报道的一个方面是一种用于确定存在影响抗体体内半寿期的抗体-Fab-FcRn相互作用的方法,所述方法包括以下步骤:

[0053] a) 在第一pH值处用盐梯度洗脱确定抗体和参考抗体在FcRn亲和层析柱上的保留时间,

[0054] b) 在第二pH值处用盐梯度洗脱确定抗体和参考抗体在FcRn亲和层析柱上的保留时间,

[0055] 因而如果步骤a)中确定的抗体保留时间和参考抗体保留时间的比率实质上与步骤b)中确定的抗体保留时间和参考抗体保留时间的比率不同,确定存在影响抗体体内半寿期的抗体-Fab-FcRn相互作用。

[0056] 如本文中报道的一个方面是一种用于确定存在影响抗体体内半寿期的抗体-Fab-FcRn相互作用的方法,所述方法包括以下步骤:

[0057] a) 使用表面等离子体共振法确定变异抗体和其亲本抗体在pH 6的 K_D 值,

[0058] b) 在高盐浓度存在下确定变异抗体和其亲本抗体在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,

[0059] 因而如果在变异抗体和其亲本抗体之间 K_D 值相差最多10倍和步骤b)中确定的保留时间实质上不同,则确定存在影响抗体体内半寿期的抗体-Fab-FcRn相互作用。

[0060] 如本文中报道的一个方面是一种用于确定抗体相对体内半寿期的方法,所述方法包括以下步骤:

[0061] a) 使用表面等离子体共振法确定变异抗体和其亲本抗体在pH 6的 K_D 值,

[0062] b) 在高盐浓度存在下确定变异抗体和其亲本抗体在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,

[0063] 因而如果 K_D 值相差最多10倍并且步骤b)中确定的变异抗体的保留时间比其亲本抗体的保留时间更短/更小,则抗体具有与其亲本抗体相比减少的相对体内半寿期,以及

[0064] 因而如果 K_D 值相差最多10倍并且步骤b)中确定的变异抗体的保留时间比其亲本抗体的保留时间更长/更大,则抗体具有与其亲本抗体相比增加的相对体内半寿期。

[0065] 如本文中报道的一个方面是一种用于确定抗体体内半寿期增加或减少的方法,所述方法包括以下步骤:

[0066] a) 使用表面等离子体共振法确定变异抗体和其亲本抗体在pH 6的 K_D 值,

[0067] b) 在高盐浓度存在下确定变异抗体和其亲本抗体在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,

[0068] 因而如果 K_D 值相差最多10倍并且步骤b)中确定的变异抗体的保留时间比其亲本抗体的保留时间更短/更小,则抗体具有与其亲本抗体相比减少的体内半寿期,以及

[0069] 因而如果 K_D 值相差最多10倍并且步骤b)中确定的变异抗体的保留时间比其亲本抗体的保留时间更长/更大,则抗体具有与其亲本抗体相比增加的体内半寿期。

[0070] 在一个实施方案中,抗体是全长抗体。

[0071] 在全部方面的一个实施方案中,正线性pH梯度是从约pH 5.5至约pH 8.8。

[0072] 在全部方面的一个实施方案中,盐选自氯化钠、硫酸钠、氯化钾、硫酸钾、柠檬酸钠、或柠檬酸钾。

[0073] 在全部方面的一个实施方案中,盐是氯化钠。

[0074] 在全部方面的一个实施方案中,第一盐浓度在50mM和200mM之间。

[0075] 在全部方面的一个实施方案中,第一盐浓度是约140mM。

[0076] 在全部方面的一个实施方案中,第二盐浓度在300mM和600mM之间。

[0077] 在全部方面的一个实施方案中,第二盐浓度是约400mM。

[0078] 在全部方面的一个实施方案中,在步骤a)和步骤b)中实质上不同的保留时间相差至少5%。

[0079] 在全部方面的一个实施方案中,在步骤a)和步骤b)中实质上不同的保留时间相差至少10%。

[0080] 在全部方面的一个实施方案中,在步骤a)和步骤b)中实质上不同的保留时间相差至少15%。

[0081] 在全部方面的一个实施方案中,如果保留时间在步骤a)和步骤b)中实质上不同,则步骤a)中的保留时间比步骤b)中更大/更长。

[0082] 在全部方面的一个实施方案中,如果保留时间在步骤a)和步骤b)中实质上不同,则步骤b)中的保留时间比步骤a)中更小/更短。

[0083] 在全部方面的一个实施方案中,如果保留时间在步骤a)和步骤b)中实质上不同,则保留时间与盐浓度的平方根分之一(约 $1/\text{SQRT}(c(\text{盐}))$)成正比。

[0084] 在全部方面的一个实施方案中,亲本或参考抗体是具有IgG1亚类的SEQ ID NO:01 (重链)和SEQ ID NO:02 (轻链)的抗IL-1R抗体和具有IgG4亚类的SEQ ID NO:03 (重链)和SEQ ID NO:04 (轻链)的抗IL-1R抗体。

[0085] 在全部方面的一个实施方案中,亲本或参考抗体是具有IgG1亚类的SEQ ID NO:36 (重链)和SEQ ID NO:37 (轻链)的抗HER2抗体和具有IgG4亚类的SEQ ID NO:38 (重链)和SEQ ID NO:39 (轻链)的抗HER2抗体。

[0086] 在全部方面的一个实施方案中,亲本或参考抗体是具有如图5中所示的轻链和重链氨基酸序列的优特克单抗。

[0087] 在全部方面的一个实施方案中,FcRn亲和层析柱包含新生Fc受体 (FcRn) 和 β -2-微球蛋白 (b2m) 的非共价复合物。

[0088] 在全部方面的一个实施方案中,FcRn亲和层析柱包含新生Fc受体 (FcRn) 和 β -2-微球蛋白 (b2m) 的共价复合物。

[0089] 在全部方面的一个实施方案中,新生Fc受体 (FcRn) 和 β -2-微球蛋白 (b2m) 的复合物与固相结合。

[0090] 在全部方面的一个实施方案中,固相是色谱材料。

[0091] 在全部方面的一个实施方案中,新生Fc受体 (FcRn) 和 β -2-微球蛋白 (b2m) 的复合物是生物素酰化并且固相用链霉亲和素衍生化。

[0092] 在全部方面的一个实施方案中, β -2-微球蛋白来自与新生Fc受体 (FcRn) 相同的物种。

[0093] 在全部方面的一个实施方案中, β -2-微球蛋白来自与FcRn不同的物种。

[0094] 在全部方面的一个实施方案中,FcRn选自人FcRn、食蟹猴FcRn、小鼠FcRn、大鼠FcRn、羊FcRn、犬FcRn、猪FcRn、迷你猪FcRn和兔FcRn。

[0095] 在全部方面的一个实施方案中,抗体是融合多肽的单特异性抗体或抗体片段、或融合多肽的双特异性抗体或抗体片段、或融合多肽的三特异性抗体或抗体片段、或融合多肽的四特异性抗体或抗体片段。

[0096] 在一个实施方案中,抗体是IgG类抗体。在一个实施方案中,抗体是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚类的抗体。在一个实施方案中,抗体是IgG1或IgG4亚类的抗体。

具体实施方案

[0097] 合并FcRn-mAb (mAb=单克隆抗体) 相互作用的结构性分析结果导致以下结论:Fv结构域和尤其轻链可变结构域 (VL) 对FcRn-mAb解离造成主要影响。这项结果出乎意料之外,因为Fv结构域远离同族的FcRn-结合位点。

[0098] 抗体在pH 6.0不显示亲和力差异,因此Fab区似乎不影响在pH 6.0时的结合作用。与之相反,FcRn和抗体之间的解离受Fab区影响。

[0099] FcRn-IgG解离pH在体外与体内终末半寿期线性相互关联。综上所述,这些结果支持以下假设:在较高pH值显示较慢解离的抗体被运输返回细胞并且随后遭降解,而非释放返回血液循环。

[0100] 已经发现,Fv结构域中的电荷分布影响抗体-FcRn结合并导致抗体和FcRn之间的额外相互作用。这改变了FcRn结合作用特征,尤其相对于抗体-FcRn复合物在pH 7.4的解离

而言,因此减少抗体的FcRn依赖性终末半寿期。

[0101] I. 定义

[0102] 术语“a”和“an”指一或两或三或四或五或六及直至 10^9 。

[0103] 术语“约”指下文数值的 $\pm 20\%$ 范围。在一个实施方案中,术语“约”指下文数值的 $\pm 10\%$ 范围。在一个实施方案中,术语“约”指下文数值的 $\pm 5\%$ 范围。

[0104] 术语“包含”也包括术语“由……组成”。

[0105] 术语“改变”指亲本抗体或融合多肽(例如至少包含Fc区的FcRn结合部分的融合多肽)中突变(置换)、插入(添加)、修饰(衍生化)或缺失一个或多个氨基酸残基以获得修饰的抗体或融合多肽。术语“突变”指所指的氨基酸残基置换为不同的氨基酸残基。例如突变L234A指抗体Fc区(多肽)中第234位置处的氨基酸残基赖氨酸置换为氨基酸残基丙氨酸(赖氨酸置换为丙氨酸)(根据EU index编号)。

[0106] 术语“氨基酸突变”指至少一个现有的氨基酸残基置换为另一个不同的氨基酸残基(=替换性氨基酸残基)。替换性氨基酸残基可以是“天然存在氨基酸残基”并且选自丙氨酸(三字母代码:ala,单字母代码:A)、精氨酸(arg,R)、天冬酰胺(asn,N)、天冬氨酸(asp,D)、半胱氨酸(cys,C)、谷氨酰胺(gln,Q)、谷氨酸(glu,E)、甘氨酸(gly,G)、组氨酸(his,H)、异亮氨酸(ile,I)、亮氨酸(leu,L)、赖氨酸(lys,K)、甲硫氨酸(met,M)、苯丙氨酸(phe,F)、脯氨酸(pro,P)、丝氨酸(ser,S)、苏氨酸(thr,T)、色氨酸(trp,W)、酪氨酸(tyr,Y)和缬氨酸(val,V)。替换性氨基酸残基可以是“非天然存在的氨基酸残基”。参见例如US 6,586,207、WO 98/48032、WO 03/073238、US 2004/0214988、WO 2005/35727、WO 2005/74524,Chin, J.W.等人,J.Am.Chem.Soc.124(2002)9026-9027;Chin,J.W.和Schultz,P.G.,ChemBioChem 11(2002)1135-1137;Chin,J.W.等人,PICAS United States of America 99(2002)11020-11024;以及Wang,L.和Schultz,P.G.,Chem.(2002)1-10(全部文献均通过引用的方式完整并入本文)。

[0107] 术语“氨基酸插入”指在氨基酸序列中预定的位置处(额外)并入至少一个氨基酸残基。在一个实施方案中,插入将是插入一个或两个氨基酸残基。插入的氨基酸残基可以是任何天然存在的或非天然存在的氨基酸残基。

[0108] 术语“氨基酸缺失”指在氨基酸序列中的预定位置处移除至少一个氨基酸残基。

[0109] 术语“抗体”在本文中以广意使用并且涵盖多种抗体结构物,包括但不限于单克隆抗体和多特异性抗体(例如,双特异性抗体、三特异性抗体),只要它们是全长抗体并且显示出所需的抗原结合活性和/或FcRn结合活性。

[0110] 术语“与抗原结合”指抗体在体外测定法中的结合。在一个实施方案中,在抗体与表面结合并通过表面等离子体共振(SPR)测量抗原与抗体结合的结合测定法中测定结合作用。结合意指例如 10^{-8} M或更小、在一些实施方案中 10^{-13} 至 10^{-8} M、在一些实施方案中 10^{-13} 至 10^{-9} M的结合亲和力(K_D)。

[0111] 可以通过BIAcore测定法(GE Healthcare Biosensor AB,乌普萨拉,瑞典)研究结合作用。结合作用的亲和力由术语 k_a (来自抗体/抗原复合物的抗体的缔合速率常数)、 k_d (解离常数)和 K_D (k_d/k_a)定义。

[0112] 术语“缓冲物质”指在溶液中时可以使溶液的pH值改变变成水平的物质,例如因添加或释放酸性或碱性物质所致。

[0113] 术语“CH2结构域”指抗体重链多肽的大约从EU位置231延伸至EU位置340的部分(根据Kabat的EU编号体系)。在一个实施方案中,CH2结构域具有SEQ ID NO:05的氨基酸序

APELLGG PSVFLFPPKP

列: KDTLMIS RTP EVTCVWDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQ 术语
E STYRWSVLT VLHQDWLNGK EYCKVSNKA LPAPIEKTIS KAK。

“CH3结构域”指抗体重链多肽的大约从EU位置341延伸至EU位置446的部分。在一个实施方案中,CH3结构域具有SEQ ID NO:06的氨基酸序列:

GQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP

[0114] ENNYKTTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV
MHEALHNHYT QKSLSLSPG.

[0115] 抗体的“类”指由其重链拥有的恒定结构域或恒定区的类型。存在五个主要类别的抗体:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且这些类别中的几种可以进一步划分成亚类(同种型),例如,IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁和IgA₂。对应于不同免疫球蛋白类别的重链恒定域分别称作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。

[0116] 药剂(例如,药物制剂)的“有效量”指在剂量和必要的时间段内有效实现所需治疗性或预防性结果的量。

[0117] 术语“Fc-融合多肽”指结合结构域(例如抗原结合结构域如单链抗体,或多肽如受体的配体)与显示所需靶结合和/或蛋白A结合和/或FcRn-结合活性的抗体Fc区的融合物。

[0118] 术语“人源Fc区”指人源免疫球蛋白重链的C端区域,其至少含有一部分的铰链区、CH2结构域和CH3结构域。在一个实施方案中,人IgG重链Fc区从Cys226或从Pro230延伸至重链的羧基端。在一个实施方案中,Fc区具有SEQ ID NO:07的氨基酸序列。然而,Fc区的C端赖氨酸(Lys447)可以存在或可以不存在。除非本文中另外说明,否则Fc区或恒定区中的氨基酸残基的编号根据如Kabat,E.A.等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD (1991),NIH Publication 91 3242中所述的EU编号体系,也称作EU index。Fc区由两条重链Fc区多肽组成,所述重链Fc区多肽可以借助形成多肽间二硫键的铰链区半胱氨酸残基彼此共价连接。

[0119] 术语“FcRn”指人新生Fc-受体。FcRn起到再利用来自溶酶体降解途径的IgG的作用,导致清除率减少和半寿期增加。FcRn是由两条多肽组成的异二聚体蛋白:50kDa I类主要组织相容性复合体样蛋白(α -FcRn)和15kDa β 2-微球蛋白(β 2m)。FcRn以高亲和力与IgG的Fc区的CH2-CH3部分结合。在IgG和FcRn之间的相互作用严格依赖pH并且以1:2化学计量发生,即一个IgG通过其两条重链与两个FcRn分子结合(Huber,A.H.等人,J.Mol.Biol.230 (1993) 1077-1083)。FcRn结合作用在内体中酸性pH(pH<6.5)发生并且IgG在中性细胞表面(pH约7.4)释放。这种相互作用的pH敏感性促进FcRn介导保护胞饮入细胞的IgG通过在内体酸性环境内部与受体结合而免遭胞内降解。FcRn随后促进IgG再循环到细胞表面并随后在FcRn-IgG复合物暴露于细胞外部中性pH环境时释放入血流。

[0120] 术语“Fc区的FcRn结合部分”指抗体重链多肽的部分,所述部分从大约EU位置243延伸至EU位置261,并且从大约EU位置275延伸至EU位置293,并且从大约EU位置302延伸至EU位置319,并且从大约EU位置336延伸至EU位置348,并且从大约EU位置367延伸至EU位置

393及EU位置408,并且从大约EU位置424延伸至EU位置440。在一个实施方案中,改变根据Kabat的EU编号的以下一个或多个氨基酸残基:F243,P244,P245P,K246,P247,K248,D249,T250,L251,M252,I253,S254,R255,T256,P257,E258,V259,T260,C261,F275,N276,W277,Y278,V279,D280,V282,E283,V284,H285,N286,A287,K288,T289,K290,P291,R292,E293,V302,V303,5304,V305,L306,T307,V308,L309,H310,Q311,D312,W313,L314,N315,G316,K317,E318,Y319,I336,S337,K338,A339,K340,G341,Q342,P343,R344,E345,P346,Q347,V348,C367,V369,F372,Y373,P374,S375,D376,I377,A378,V379,E380,W381,E382,S383,N384,G385,Q386,P387,E388,N389,Y391,T393,S408,S424,C425,S426,V427,M428,H429,E430,A431,L432,H433,N434,H435,Y436,T437,Q438,K439,和S440(EU编号)。

[0121] 术语“全长抗体”指这样的抗体,所述抗体具有基本上与天然抗体结构相似的结构。全长抗体包含两条全长抗体轻链和两条全长抗体重链,所述全长抗体轻链包含轻链可变结构域和轻链恒定结构域,所述全长抗体重链包含重链可变结构域、第一恒定结构域、铰链区、第二恒定结构域和第三恒定结构域。全长抗体可以包含其他结构域,例如与全长抗体的一个条或多条链缀合的额外scFv或scFab。这些缀合物也由术语全长抗体涵盖。

[0122] 术语“铰链区”指抗体重链多肽的部分,所述部分连接CH1结构域和CH2结构域,例如根据Kabat的EU编号体系从约位置216至约位置230。在一个实施方案中,铰链区是包含根据Kabat的EU编号体系从残基221至230的缩短铰链区。铰链区正常情况下是由具有相同氨基酸序列的两条多肽组成的二聚体分子。铰链区通常包含约25个氨基酸残基并且是柔性的,允许抗原结合区独立地移动。铰链区可以再划分成三个结构域:上部、中部和下部铰链结构域(Roux等人,J.Immunol.161(1998)4083)。

[0123] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”互换使用并且指已经向其中引入外源核酸的细胞,包括这类细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“转化的细胞”,其包括原代转化细胞和从其衍生的后代,而无论传代次数是多少。后代可以在核酸含量方面不与亲本细胞完全相同,反而可以含有突变。本文中包括突变子代,所述突变子代具有与最初转化的细胞中所筛选或选择的相同的功能或生物活性。

[0124] 术语“衍生自”指通过在至少一个位置引入改变而衍生自亲本氨基酸序列的氨基酸序列。因此,衍生的氨基酸序列在至少一个相应位置(根据抗体Fc区的Kabat EU index)处与相应的亲本氨基酸序列不同。在一个实施方案中,衍生自亲本氨基酸序列的氨基酸序列在相应位置相异1至15个氨基酸残基。在一个实施方案中,衍生自亲本氨基酸序列的氨基酸序列在相应位置相异1至10个氨基酸残基。在一个实施方案中,衍生自亲本氨基酸序列的氨基酸序列在相应位置相异1至6个氨基酸残基。同样地,衍生的氨基酸序列与其亲本氨基酸序列具有高氨基酸序列同一性。在一个实施方案中,衍生自亲本氨基酸序列的氨基酸序列具有80%或更大的氨基酸序列同一性。在一个实施方案中,衍生自亲本氨基酸序列的氨基酸序列具有90%或更大的氨基酸序列同一性。在一个实施方案中,衍生自亲本氨基酸序列的氨基酸序列具有95%或更大的氨基酸序列同一性。

[0125] 术语“人Fc区多肽”指与“天然”或“野生型”人Fc区多肽相同的氨基酸序列。术语“变异(人)Fc区多肽”指因至少一个“氨基酸改变”而衍生自“天然”或“野生型”Fc区多肽的氨基酸序列。“人Fc区”由两条人Fc区多肽组成。“变异(人)Fc区”由两条Fc区多肽组成,因而二者均可以是变异(人)Fc区多肽或一个是人Fc区多肽并且另一个是变异(人)Fc区多肽。

[0126] 在一个实施方案中,人Fc区多肽具有SEQ ID NO:07的人IgG1Fc区多肽氨基酸序列、或SEQ ID NO:08的人IgG2Fc区多肽氨基酸序列、或SEQ ID NO:09的人IgG3Fc区多肽氨基酸序列、或SEQ ID NO:10的人IgG4Fc区多肽氨基酸序列。在一个实施方案中,Fc区多肽衍生自SEQ ID NO:07、或08、或09、或10的Fc区多肽并且与SEQ ID NO:07、或08、或09、或10的Fc区多肽相比具有至少一个氨基酸突变。在一个实施方案中,Fc区多肽包含/具有从约1个至约10个氨基酸突变,并在一个实施方案中具有约1个至约5个氨基酸突变。在一个实施方案中,Fc区多肽与人Fc区多肽SEQ ID NO:07、或08、或09、或10具有至少约80%同源性。在一个实施方案中,Fc区多肽与人Fc区多肽SEQ ID NO:07、或08、或09、或10具有至少约90%同源性。在一个实施方案中,Fc区多肽与人Fc区多肽SEQ ID NO:07、或08、或09、或10具有至少约95%同源性。

[0127] 从SEQ ID NO:07、或08、或09、或10的人Fc区多肽衍生的Fc区多肽由所含的氨基酸改变限定。因此,例如,术语P329G指从相对于SEQ ID NO:07、或08、或09、或10的人Fc区多肽在氨基酸位置329具有脯氨酸至甘氨酸突变的人Fc区多肽衍生的Fc区多肽。

[0128] 对于本发明中讨论的全部重链位置,根据EU index进行编号。EU index或如Kabat或Kabat EU index中的EU index或EU编号方案指EU抗体的编号(Edelman等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 63(1969)78-85,因而通过引用的方式完整并入)。轻链残基的编号根据Kabat命名进行(Kabat,E.A.等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991),NIH Publication 91 3242)。

[0129] 人IgG1 Fc区多肽具有以下氨基酸序列:

[0130] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:07)。

[0131] 人IgG1 Fc区衍生的具有突变L234A、L235A的Fc区多肽具有以下氨基酸序列:

[0132] DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:11)。

[0133] 人IgG1 Fc区衍生的具有Y349C、T366S、L368A和Y407V突变的Fc区多肽具有以下氨基酸序列:

[0134] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:12)。

[0135] 人IgG1 Fc区衍生的具有S354C、T366W突变的Fc区多肽具有以下氨基酸序列:

[0136] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNHYTQKS

LSLSPGK (SEQ ID NO:13)。

[0137] 人IgG1 Fc区衍生的具有L234A、L235A突变和Y349C、T366S、L368A、Y407V突变的Fc区多肽具有以下氨基酸序列：

[0138] DKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVS
LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKS
LSLSPGK (SEQ ID NO:14)。

[0139] 人IgG1 Fc区衍生的具有L234A、L235A和S354C、T366W突变的Fc区多肽具有以下氨基酸序列：

[0140] DKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVS
LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKS
LSLSPGK (SEQ ID NO:15)。

[0141] 人IgG1 Fc区衍生的具有P329G突变的Fc区多肽具有以下氨基酸序列：

[0142] DKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKS
LSLSPGK (SEQ ID NO:16)。

[0143] 人IgG1 Fc区衍生的具有L234A、L235A突变和P329G突变的Fc区多肽具有以下氨基酸序列：

[0144] DKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEMNYKTTPVLDSGSSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKS
LSLSPGK (SEQ ID NO:17)。

[0145] 人IgG1 Fc区衍生的具有P329G突变和Y349C、T366S、L368A、Y407V突变的Fc区多肽具有以下氨基酸序列：

[0146] DKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVS
LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKS
LSLSPGK (SEQ ID NO:18)。

[0147] 人IgG1 Fc区衍生的具有P329G突变和S354C、T366W突变的Fc区多肽具有以下氨基酸序列：

[0148] DKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVS
LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKS
LSLSPGK (SEQ ID NO:19)。

[0149] 人IgG1 Fc区衍生的具有L234A、L235A、P329G和Y349C、T366S、L368A、Y407V突变的Fc区多肽具有以下氨基酸序列：

[0150] DKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK

TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:20)。

[0151] 人IgG1 Fc区衍生的具有L234A、L235A、P329G突变和S354C、T366W突变的Fc区多肽具有以下氨基酸序列：

[0152] DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:21)。

[0153] 人IgG4 Fc区多肽具有以下氨基酸序列：

[0154] ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQ KSLSLSLGK (SEQ ID NO:10)。

[0155] 人IgG4 Fc区衍生的具有S228P和L235E突变的Fc区多肽具有以下氨基酸序列：

[0156] ESKYGPPCPSCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQ KSLSLSLGK (SEQ ID NO:22)。

[0157] 人IgG4 Fc区衍生的具有S228P、L235E突变和P329G突变的Fc区多肽具有以下氨基酸序列：

[0158] ESKYGPPCPSCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQ KSLSLSLGK (SEQ ID NO:23)。

[0159] 人IgG4 Fc区衍生的具有S354C、T366W突变的Fc区多肽具有以下氨基酸序列：

[0160] ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQ KSLSLSLGK (SEQ ID NO:24)。

[0161] 人IgG4 Fc区衍生的具有Y349C、T366S、L368A、Y407V突变的Fc区多肽具有以下氨基酸序列：

[0162] ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPQEEMTKNQ VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQ KSLSLSLGK (SEQ ID NO:25)。

[0163] 人IgG4 Fc区衍生的具有S228P、L235E和S354C、T366W突变的Fc区多肽具有以下氨基酸序列：

[0164] ESKYGPPCPSCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN

AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQ
VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQ
KSLSLSLGK (SEQ ID NO:26)。

[0165] 人IgG4 Fc区衍生的具有S228P、L235E和Y349C、T366S、L368A、Y407V突变的Fc区多肽具有以下氨基酸序列：

[0166] ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVCTLPSSQEEMTKNQ
VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQ
KSLSLSLGK (SEQ ID NO:27)。

[0167] 人IgG4 Fc区衍生的具有P329G突变的Fc区多肽具有以下氨基酸序列：

[0168] ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLGSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQ
KSLSLSLGK (SEQ ID NO:28)。

[0169] 人IgG4 Fc区衍生的具有P329G和Y349C、T366S、L368A、Y407V突变的Fc区多肽具有以下氨基酸序列：

[0170] ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLGSSIEKTIISKAKGQPREPQVCTLPSSQEEMTKNQ
VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQ
KSLSLSLGK (SEQ ID NO:29)。

[0171] 人IgG4 Fc区衍生的具有P329G和S354C、T366W突变的Fc区多肽具有以下氨基酸序列：

[0172] ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLGSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQ
VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQ
KSLSLSLGK (SEQ ID NO:30)。

[0173] 人IgG4 Fc区衍生的具有S228P、L235E、P329G和Y349C、T366S、L368A、Y407V突变的Fc区多肽具有以下氨基酸序列：

[0174] ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLGSSIEKTIISKAKGQPREPQVCTLPSSQEEMTKNQ
VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQ
KSLSLSLGK (SEQ ID NO:31)。

[0175] 人IgG4 Fc区衍生的具有S228P、L235E、P329G和S354C、T366W突变的Fc区多肽具有以下氨基酸序列：

[0176] ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLGSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQ
VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQ
KSLSLSLGK (SEQ ID NO:32)。

[0177] 下文显示不同人Fc区的比对结果(EU编号)：

		2		2		
		3		5		
		0		0		
	IGG1	DKTHTCPPCP	APELLGGPSV	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSHED
	IGG2	...VECPPCP	APP.VAGPSV	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSHED
	IGG3	DTPPPCPRCP	APELLGGPSV	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSHED
	IGG4	...PPCPSCP	APEFLGGPSV	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSQED
		-- HINGE -	-- CH2	-----		
				3		
				0		
				0		
[0178]	IGG1	PEVKFNWYVD	GVEVHNAKTK	PREEQYNSTY	RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK
	IGG2	PEVQFNWYVD	GVEVHNAKTK	PREEQFNSTF	RVVSVLTVVH	QDWLNGKEYK
	IGG3	PEVQFKWYVD	GVEVHNAKTK	PREEQYNSTF	RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK
	IGG4	PEVQFNWYVD	GVEVHNAKTK	PREEQFNSTY	RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK
		-- CH2	-----			
				3		
				5		
				0		
	IGG1	CKVSNKALPA	PIEKTISKAK	GQPREPQVYT	LPPSRDELTK	NQVSLTCLVK
	IGG2	CKVSNKGLPA	PIEKTISKTK	GQPREPQVYT	LPPSREEMTK	NQVSLTCLVK
	IGG3	CKVSNKALPA	PIEKTISKTK	GQPREPQVYT	LPPSREEMTK	NQVSLTCLVK
	IGG4	CKVSNKGLPS	SIEKTISKAK	GQPREPQVYT	LPPSQEEMTK	NQVSLTCLVK
		-- CH2	-----	CH2 --	-- CH3	-----
				4		
				0		
				0		
	IGG1	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YKTTTPVLDS	DGSFFLYSKL	TVDKSRWQQG
	IGG2	GFYPSDISVE	WESNGQPENN	YKTTTPMLDS	DGSFFLYSKL	TVDKSRWQQG
	IGG3	GFYPSDIAVE	WESSGQPENN	YNTTPMLDS	DGSFFLYSKL	TVDKSRWQQG
	IGG4	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YKTTTPVLDS	DGSFFLYSRL	TVDKSRWQEG
		-- CH3	-----			
[0179]				4		
				4		
				7		
	IGG1	NVFSCSVMHE	ALHNHYTQKS	LSLSPGK		
	IGG2	NVFSCSVMHE	ALHNHYTQKS	LSLSPGK		
	IGG3	NIFSCSVMHE	ALHNRFTQKS	LSLSPGK		
	IGG4	NVFSCSVMHE	ALHNHYTQKS	LSLSLGK		
		-- CH3	-----			

[0180] “人源化”抗体指包含来自非人类HVR的氨基酸残基和来自人FR的氨基酸残基的嵌合抗体。在某些实施方案中，人源化抗体将包含至少1个、并且一般2个可变结构域的基本上全部，其中全部或基本上全部的HVR (例如，CDR) 与非人抗体的那些HVR对应并且全部或基本上全部的FR区与人抗体的那些FR对应。人源化抗体任选地可以包含从人抗体衍生的抗体恒定区的至少一部分。抗体的“人源化形式”例如，非人抗体，指已经历过人源化的抗体。

[0181] “个体”或“受试者”是哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯化动物 (例如，奶牛、羊、猫、犬和马)、灵长类 (例如，人和非人灵长类如猴)、兔和啮齿类 (例如，小鼠和大鼠)。在某些实施方案中，个体或受试者是人。

[0182] “分离的”抗体是已经与其自然环境的组分分离的一种抗体。在一些实施方案中，将抗体纯化至大于95%或99%纯度，如通过例如电泳（例如，SDS-PAGE、等电聚焦（IEF）、毛细管电泳法）或色谱（例如，大小排阻色谱或离子交换或反相HPLC）所确定。关于评估抗体纯度的方法的综述，参见，例如，Flatman, S. 等人, J.Chrom.B 848 (2007) 79-87。

[0183] “分离的”核酸指已经与其自然环境的组分分离的核酸分子。分离的核酸包括在细胞内（所述细胞通常含有该核酸分子）所含的核酸分子，但是该核酸分子存在于染色体外或与其天然染色体位置不同的染色体位置处。

[0184] 如本文中所用的术语“单克隆抗体”指从基本上均一的抗体群体获得的抗体，即，构成该群体的各个抗体是相同的和/或结合相同的表位，除了可能的变体抗体之外（例如，含有天然存在突变或在产生单克隆抗体制备物期间出现），这类变体通常以微小的量存在。与一般包括针对不同决定簇（表位）的不同抗体的多克隆抗体制备物相反，单克隆抗体制备物的每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。因此，修饰语“单克隆的”指示该抗体的特征为从基本上均一的抗体群体获得，并且不得解释为要求通过任何特定方法产生该抗体。例如，可以通过多种技术产生待根据本发明使用的单克隆抗体，所述技术包括但不限于杂交瘤方法、重组DNA方法、噬菌体展示方法和利用含有全部或部分的人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法，本文中描述了用于产生单克隆抗体的这类方法和其他示例性方法。

[0185] “天然抗体”指具有不定结构的天然存在的免疫球蛋白分子。例如，天然IgG抗体是由二硫键结合的两条相同轻链和两条相同重链组成的约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白。从N端至C端，每条重链具有一个可变区（VH），也称作可变重结构域或重链可变结构域，随后是三个恒定结构域（CH1，CH2和CH3）。类似地，从N端至C端，每条轻链具有一个可变区（VL），也称作可变轻链域或轻链可变结构域，随后一个恒定轻链（CL）结构域。抗体的轻链可以基于其恒定域的氨基酸序列而划分成两种类型之一，称作 κ （ κ ）和 λ （ λ ）。

[0186] 术语“负线性pH梯度”指在高（即中性或碱性）pH值开始并在较低（即中性或酸性）pH值结束的pH梯度。在一个实施方案中，负线性pH梯度始于pH值约8.8并止于pH值约5.5。

[0187] 术语“非天然存在氨基酸残基”指除如上文所列的天然存在氨基酸残基之外的可以在多肽链中与毗邻氨基酸残基共价结合的氨基酸残基。非天然存在氨基酸残基的例子是正亮氨酸、鸟氨酸、正缬氨酸、高丝氨酸。其他例子在Ellman等人, Meth.Enzym. 202 (1991) 301-336中列出。用于合成非天然存在氨基酸残基的示例性方法在例如，Noren等人, Science 244 (1989) 182和Ellman等人, 上文中报道。

[0188] 术语“药物制剂”指一种制备物，所述制备物处于这类形式从而允许其中所含的有效成分的生物活性有效，并且不含有对于将会施用该制剂的受试者不可接受地有毒的额外组分。

[0189] “可药用载体”指药物制剂中除有效成分之外的对受试者无毒的成分。可药用载体包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0190] 如本文所用，术语“质粒”指能够增殖与其连接的另一种核酸的核酸分子。该术语包括作为自我复制型核酸结构的质粒以及并入已经将该载体引入其中的宿主细胞的基因组内的质粒。某些质粒能够指导与它们有效连接的核酸表达。此类质粒在本文中称作“表达质粒”。

[0191] 术语“正线性pH梯度”指在低（即更酸性）pH值开始并在较高（即酸性更小、中性或

碱性)pH值结束的pH梯度。在一个实施方案中,正线性pH梯度始于pH值约5.5并止于pH值约8.8。

[0192] 如本文所用,术语“重组抗体”指通过重组手段制备、表达、产生或分离的全部抗体(嵌合、人源化和人抗体)。这包括从宿主细胞如NS0或CHO细胞或从相对于人免疫球蛋白基因为转基因的动物(例如小鼠)中分离的抗体或使用转染至宿主细胞中的重组表达质粒所表达的抗体。此类重组抗体具有重排形式的可变区和恒定区。如本文中报道的重组抗体可以经历体内体细胞超变。因此,重组抗体的VH和VL区的氨基酸序列是尽管源自人种系VH和VL序列并且与之相关,但可以不天然存在于体内人抗体种系库内部的序列。

[0193] “固相”指非流体物质并且包括由多种材料如聚合物、金属(顺磁性、铁磁性粒子)、玻璃和陶瓷制成的粒子(包括微粒子和珠);凝胶物质如二氧化硅、氧化铝和聚合物凝胶;可以由聚合物、金属、玻璃、和/或陶瓷构成的毛细管;沸石和其他多孔物质;电极;微量滴定板;固态条;和比色皿、管或其他谱仪样品容器。测定法的固相组分与惰性固体表面的区别在于,“固相支持物”在其表面上含有意在与分子发生化学相互作用的至少一种部分。固相可以是固定组分,如芯片、管、条、比色皿或微量滴定板,或可以是非固定组分,如珠和微粒子。微粒子也可以用作均相分析模式的固相支持物。可以使用允许与蛋白质和其他物质非共价或共价接合的多种微粒子。这类粒子包括聚合物粒子如聚苯乙烯和聚(甲基丙烯酸甲酯);金粒子如金纳米粒子和金胶体;和陶瓷粒子如石英玻璃,和金属氧化物粒子。参见例如Martin,C.R.等人,Analytical Chemistry-News&Features,May 1 (1998) 322A-327A,所述文献通过引用方式并入本文。在一个实施方案中,固相支持物是琼脂糖凝胶。

[0194] 术语“基本上相同的”指两个值,例如两种不同抗体在FcRn亲和层析柱上的保留时间,彼此处于5%范围内,即它们相差小于5%。例如,第一保留时间80分钟和第二保留时间84分钟是基本上相同的,而保留时间80分钟和保留时间85分钟不是基本上相同的,这些保留时间是不同的。在一个实施方案中,基本上相同的指两个值彼此处于3.5%范围内,即它们相差3.5%或更小。在一个实施方案中,基本上相同的指两个值彼此处于2.5%范围内,即它们相差2.5%或更小。取两个值的较小者为这种计算的基础。

[0195] 如本文所用,名词“治疗”(和其语法变型如动词“治疗”或分词“治疗”)指意欲改变正在接受治疗的个体的天然过程的临床介入,并且可以旨在预防或在临床病理学过程期间实施。想要的治疗效果包括,但不限于防止疾病出现或复发、减轻症状、减小疾病的任何直接或间接病理学后果、防止转移、降低病情进展速率、改善或缓和疾病状态,以及缓解或预后改善。在一些实施方案中,如本文中报道的抗体或Fc区融合多肽用来延缓疾病的形成或用来减慢疾病的进展。

[0196] 如本申请中所用,术语“价态”指(抗体)分子中存在指定数目的结合位点。就这一点而论,术语“双价”、“四价”和“六价”指(抗体)分子中分别存在2个结合位点、4个结合位点和6个结合位点。在一个优选的实施方案中,如本文中报道的双特异性抗体是“双价的”。

[0197] 术语“可变区”或“可变结构域”指抗体重链或轻链的参与使抗体结合其抗原的结构域。抗体重链和轻链的可变结构域(分别是VH和VL)通常具有相似的结构,每种结构域包含四个框架区(FR)和三个高变区(HVR)(参见,例如Kindt,T.J.等人,Kuby Immunology,第6版,W.H.Freeman and Co.,N.Y.(2007),第91页)。单个VH域或VL结构域可能足以赋予抗原结合特异性。另外,结合特定抗原的抗体可以利用来自结合该抗原的抗体的VH或VL结构域

分别筛选互补性VL结构域或VH结构域的文库而进行分离。参见,例如,Portolano,S.等人,J.Immunol.150(1993)880-887;Clackson,T.等人,Nature 352(1991)624-628)。

[0198] 术语“变体”、“修饰的抗体”和“修饰的融合多肽”指具有与亲本分子的氨基酸序列不同的氨基酸序列的分子。一般,这类分子具有一个或多个改变、插入或缺失。在一个实施方案中,修饰的抗体或修饰的融合多肽包含这样的氨基酸序列,所述氨基酸序列包含Fc区的非天然存在的至少一部分。这类分子具有小于100%的与亲本抗体或亲本融合多肽序列的同一性。在一个实施方案中,变异抗体或变异融合多肽具有这样的氨基酸序列,所述氨基酸序列与亲本抗体或亲本融合多肽的氨基酸序列具有从约75%至小于100%、尤其从约80%至小于100%、尤其从约85%至小于100%、尤其从约90%至小于100%和尤其从约95%至小于100%的氨基酸序列同一性。在一个实施方案中,亲本抗体或亲本融合多肽与变异抗体或变异融合多肽相差一个(单个)、两个或三个氨基酸残基。

[0199] II.如本文中报道的方法

[0200] 本发明至少部分地基于以下发现:Fv结构域中的电荷分布影响抗体-FcRn结合并导致抗体和FcRn之间的额外相互作用。这改变了FcRn结合作用特征,尤其相对于抗体-FcRn复合物在pH 7.4的解离而言,减少抗体的FcRn依赖性终末半寿期。

[0201] a)新生Fc-受体(FcRn)

[0202] 新生Fc-受体(FcRn)对IgG类抗体体内的代谢命运重要。FcRn起到再利用来自溶酶体降解途径的野生型IgG的作用,导致清除率减少和半寿期增加。它是由两条多肽组成的异二聚体蛋白:50kDa I类主要组织相容性复合体样蛋白(α -FcRn)和15kDa β 2-微球蛋白(β 2m)。FcRn以高亲和力与IgG类抗体的Fc区的CH2-CH3部分结合。在IgG类抗体和FcRn之间的相互作用严格依赖pH并且以1:2化学计量发生,即一个IgG抗体分子可以通过其两条重链Fc区多肽与两个FcRn分子相互作用(参见,例如,[16])。

[0203] 因此,IgG体外FcRn结合特性/特征指示其在血液循环中的体内药代动力学特性。

[0204] 重链CH2结构域和CH3结构域的不同氨基酸残基参与FcRn和IgG类抗体Fc区之间的相互作用。与FcRn相互作用的氨基酸残基位于大约EU位置243和EU位置261之间、大约EU位置275和EU位置293之间、大约EU位置302和EU位置319之间、大约EU位置336和EU位置348之间、大约EU位置367和EU位置393之间、位于EU位置408处以及大约EU位置424和EU位置440之间。更具体地,根据Kabat EU编号的以下氨基酸残基参与Fc区和FcRn之间的相互作用:

[0205] FcRn:F243,P244,P245P,K246,P247,K248,D249,T250,L251,M252,I253,S254,R255,T256,P257,E258,V259,T260,C261,F275,N276,W277,Y278,V279,D280,V282,E283,V284,H285,N286,A287,K288,T289,K290,P291,R292,E293,V302,V303,S304,V305,L306,T307,V308,L309,H310,Q311,D312,W313,L314,N315,G316,K317,E318,Y319,I336,5337,K338,A339,K340,G341,Q342,P343,R344,E345,P346,Q347,V348,C367,V369,F372,Y373,P374,S375,D376,I377,A378,V379,E380,W381,E382,5383,N384,G385,Q386,P387,E388,N389,Y391,T393,S408,S424,C425,S426,V427,M428,H429,E430,A431,L432,H433,N434,H435,Y436,T437,Q438,K439,和S440。

[0206] 位点定向诱变研究已经证明IgG的Fc区中针对FcRn的关键结合位点是组氨酸310、组氨酸435和异亮氨酸253并且程度更低地是组氨酸433和酪氨酸436(参见例如Kim,J.K.等人,Eur.J.Immunol.29(1999)2819-2825;Raghavan,M.等人,Biochem.34(1995)14649-

146579;Medesan,C.等人,J.Immunol.158(1997)2211-2217)。

[0207] 增加IgG与FcRn结合的方法已经通过在以下各种氨基酸残基处突变IgG来实施:苏氨酸250、甲硫氨酸252、丝氨酸254、苏氨酸256、苏氨酸307、谷氨酸380、甲硫氨酸428、组氨酸433和天冬酰胺434(参见Kuo,T.T.等人,J.Clin.Immunol.30(2010)777-789)。

[0208] 在一些情况下需要在血液循环中半寿期降低的抗体。例如,玻璃体内施加用药物应当在眼部中具有长半寿期并且在患者循环中具有短半寿期。这类抗体还具有疾病部位如眼中暴露量增加的优点。

[0209] 影响FcRn结合并且影响血液循环中半寿期的不同突变是已知的。已经通过位点定向诱变鉴定了对小鼠Fc-小鼠FcRn相互作用至关重要的Fc区残基(参见例如Dall'Acqua,W.F.等人,J.Immunol.169(2002)5171-5180)。残基I253、H310、H433、N434、和H435(根据Kabat的EU编号)参与这种相互作用(Medesan,C.等人,Eur.J.Immunol.26(1996)2533-2536;Firan,M.等人,Int.Immunol.13(2001)993-1002;Kim,J.K.等人,Eur.J.Immunol.24(1994)542-548)。发现残基I253、H310和H435对人Fc与鼠FcRn的相互作用至关重要(Kim,J.K.等人,Eur.J.Immunol.29(1999)2819-2825)。通过蛋白质-蛋白质相互作用研究,Dall'Acqua等人已经描述残基M252Y、S254T、T256E改善FcRn结合(Dall'Acqua,W.F.等人,J.Biol.Chem.281(2006)23514-23524)。人Fc-人FcRn复合物的研究已经显示残基I253、S254、H435和Y436对这种相互作用至关重要(Firan,M.等人,Int.Immunol.13(2001)993-1002;Shields,R.L.等人,J.Biol.Chem.276(2001)6591-6604)。在Yeung,Y.A.等人(J.Immunol.182(2009)7667-7671)中,已经报道并研究了残基248至259和301至317和376至382和424至437的各种突变体。下表1中列出示例性突变和它们对FcRn结合作用的影响。

[0210] 表1:不同Fc区突变的搭配和它们对FcRn结合作用和体内半寿期的影响。

[0211]	突变	对 FcRn 结合作用的影响	循环中的半寿期	参考文献
	H285 H310Q/H433N (鼠 IgG1)	减少 (鼠)	减少 (小鼠中)	Kim, J.K., Scand. J. Immunol. 40 (1994) 457-465

[0212]

突变	对 FcRn 结合作用的影响	循环中的半寿期	参考文献
I253A H310A H435A H436A (鼠 IgG1)	减少 (鼠)	减少 (小鼠中)	Ghetie, V.和 Ward, E.S., Immunol. Today 18 (1997) 592-598
T252L/T254S/T256F T252A/T254S/T256A (鼠 IgG1)	增高 (鼠)	增高 (小鼠中)	Ghetie, V.和 Ward, E.S., Immunol. Today 18 (1997) 592-598
I253A H310A H435A H436A H433A/N434Q (鼠 IgG1)	减少 (鼠)	减少 (小鼠中)	Medesan, C.等人, J. Immunol. 158 (1997) 2211-2217
I253A H310A H435A H435R (人 IgG1)	减少的 H310A : 至 muFcRn< 0.1 相对结合作用 (鼠)	减少 (小鼠中)	Kim, J.K., Eur.J. Immunol. 29 (1999) 2819-2825
H433A (人 IgG1)	至 muFcRn 的 1.1 相对结合作用, 至 huFcRn 的 0.4 相对结合作用 (鼠)		Kim, J.K., Eur.J. Immunol. 29 (1999) 2819-2825
I253A S254A H435A Y436A (人 IgG1)	减少 至 huFcRn 的 <0.1 相对结合作用	减少	Shields, R.L.等人, J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604

[0213]

突变	对 FcRn 结合作用的影响	循环中的半寿期	参考文献
R255A K288A L309A S415A H433A (人 IgG1)	减少 (人)	减少	Shields, R.L.等人, J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604
P238A T256A E272A V305A T307A Q311A D312A K317A D376A A378Q E380A E382A S424A N434A K288A/N434A E380A/N434A T307A/E380A/N434A (人 IgG1)	增高 (人)	增高	Shields, R.L.等人, J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604
H435A (人源化 IgG1)	减少 至 huFcRn 的 <0.1 相对结合作用	减少	Firan, M. 等人, Int.Immunol. 13 (2001) 993-1002

[0214]

突变	对 FcRn 结合作用的影响	循环中的半寿期	参考文献
I253A (无结合作用) M252W M252Y M252Y/T256Q M252F/T256D N434F/Y436H M252Y/S254T/T256E G385A/Q386P/N389S H433K/N434F/Y436H H433R/N434Y/Y436H G385R/Q386T/P387R/N389P M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F/Y436H M252Y/S254T/T256E/G385R/Q386T/P387R/N389P (人 IgG1)	增高 (鼠和人)	减少 (小鼠中)	Dall'Acqua, J. Immunol. 169 (2002) 5171-5180
M428L T250Q/M428L (人 IgG2)	增高 (人)	增高 (猴中)	Hinton, P.R.等人, J. Biol. Chem. 279 (2004) 6213-6216
M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F (人 IgG)	增高 (人)	增高 (小鼠中)	Vaccaro, C. 等人, Nat. Biotechnol. 23 (2005) 1283-1288
T307A/E380A/N434A (嵌合 IgG1)	增高	转基因小鼠中增加	Pop, L.M. 等人, Int.Immunopharmacol. 5 (2005) 1279-1290

[0215]

突变	对 FcRn 结合作用的影响	循环中的半寿期	参考文献
T250Q E380A M428L N434A K288A/N434A E380A/N434A T307A/E380A/N434A (人 IgG1)	增高 (人)	转基因小鼠中增加	Petkova, S.B. 等人, Int.Immunol 18 (2006) 1759-1769
I253A (人 IgG1)	减少 (人)	转基因小鼠中减少	Petkova, S.B. 等人, Int.Immunol 18 (2006) 1759-1769
S239D/A330L/I332E M252Y/S254T/T256E (人源化)	增高 (人和食蟹猴)	食蟹猴中增加	Dall'Acqua, W.F. 等人, J. Biol. Chem. 281 (2006) 23514-23524
T250Q M428L T250Q/M428L (人 IgG1)	增高 (人)	恒河猴中增加	Hinton, P.R. 等人, J. Immunol. 176 (2006) 346-356
T250Q/M428L P257I/Q311I (人源化 IgG1)	增高 (小鼠和食蟹猴)	食蟹猴中无变化 小鼠中增加	Datta-Mannan, A. 等人, J. Biol. Chem. 282 (2007) 1709-1717
P257I/Q311I P257I/N434H D376V/N434H (人源化 IgG1)	在 pH 6 增高 (人、食蟹猴、小鼠)	小鼠中减少 P257I/N434H 食蟹猴中减少	Datta-Mannan, A. 等人, Drug Metab.Dispos. 35 (2007) 86-94

[0216]

突变	对 FcRn 结合作用影响	循环中的半寿期	参考文献
消除 FcRn 结合作用: I253 H310 H433 H435 减少 FcRn 结合作用: Y436 增加 FcRn 结合作用: T250 N252 S254 T256 T307 M428 N434	增加和减少	减少 IgG 对 FcRn 的结合能力减少其血清持久性; 较高亲和力 FcRn-IgG 相互作用延长血清中 IgG 和 Fc-偶联药物的半寿期	Ropeenian, D.C. 和 Akilesh, S., <i>Nat. Rev. Immunol.</i> 7 (2007) 715-725
N434A T307Q/N434A T307Q/N434S V308P/N434A T307Q/E380A/N434A (人 IgG1)	增加 (食蟹猴)	食蟹猴中增加	Yeung, Y.A. 等人, <i>Cancer Res.</i> 70 (2010) 3269-3277
256P 280 K 339T 385H 428L 434W/Y/F/A/H (人 IgG)	在中性 pH 增加		WO 2011/122011

[0217] 已经发现, Fv结构域中的电荷分布影响抗体-FcRn结合并可以导致抗体和FcRn之间的额外相互作用。这改变了FcRn结合作用特征, 尤其相对于抗体-FcRn复合物在pH 7.4的解离而言, 因此影响(减少)抗体的FcRn依赖性终末半寿期。

[0218] 人新生Fc受体(FcRn)在IgG分解代谢中发挥重要作用。IgG体外FcRn结合特性/特征指示其体内药代动力学特性。这类体外方法将在抗体开发期间具有巨大价值, 因为可以避免重复的体内研究(减少动物实验、时间和成本)。

[0219] IgG-FcRn相互作用使用等离子体表面共振 (SPR) 测定法可以分析 (Wang, W. 等人,

Drug Metab. Disp. 39 (2011) 1469-1477; Datta-Mannan, A. 等人, Drug Metab. Disp. 40 (2012) 1545-1555; Vaughn, D. E. 和 Bjorkman, P. J., Biochemistry 36 (1997) 9374-9380; Raghavan, M. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 11200-11204; Martin, W. L. 和 Bjorkman, P. J., Biochemistry 38 (1999) 12639-12647)。

[0220] 也已经描述了评估IgG对FcRn的结合亲和力的量热法和非对称流场流分级法 (Huber, A. H. 等人, J. Mol. Biol. 230 (1993) 1077-1083; Pollastrini, J. 等人, Anal. Biochem. 414 (2011) 88-98)。

[0221] 除了成为复杂测定法外, 调查由SPR所确定的体外FcRn结合参数和抗体的体内血清半寿期之间相关性的几项研究迄今未能证实这种相关性, 即便结合反应条件改进和适宜建模 (Gurbaxani, B. 等人, Mol. Immunol. 43 (2006) 1462-1473; Gurbaxani, B. M. 和 Morrison, S. L., Mol. Immunol. 43 (2006) 1379-1389; Gurbaxani, B., Clin. Immunol. 122 (2007) 121-124)。

[0222] 工程化IgG1的Fc区以改善IgG1在pH 6和在中性pH对FcRn的亲和力(如通过SPR技术所测量)未导致食蟹猴中的药代动力学改善 (Yeung, Y. A. 等人, J. Immunol. 182 (2009) 7663-7671)。然而, N434A IgG1变体中在pH 7.4并未同时显著结合FcRn的情况下仅pH 6 FcRn亲和力的适度升高就导致灵长类中的药代动力学改善, 显示FcRn在pH 7.4释放的重要性 (参见Yeung, Y. A., 上文)。

[0223] 例如, IgG-FcRn相互作用的SPR分析提供了提示样品的预期或异常结合特性的定性结果, 但是既没有给出引起异常结合作用的线索, 也没有给出具有异常结合作用的抗体量的定量估计。

[0224] 使用正线性梯度洗脱的FcRn亲和层析方法已经在WO 2013/120929中报道。

[0225] b) FcRn-Fab电荷介导的相互作用

[0226] 已知对Fc区的特定操作通过改变在Fc区和FcRn之间相互作用影响PK参数并且这种操作已经用来设计具有特定PK特性的治疗性抗体 [33, 34]。

[0227] 当具有相同野生型人Fc区序列、但Fab区不同的抗体显示FcRn亲和力差异和改变的PK时, 最近已经讨论了Fab区对FcRn相互作用的影响。这种相互作用的机制仍不清楚 [23, 24]。

[0228] 为了显示Fab区对FcRn介导的IgG稳态的影响因素, 使用抗体对布雷奴单抗 (Ozespa™) 和优特克单抗 (Stelara™) 作为模型系统。布雷奴单抗和优特克单抗均是全人单克隆IgG1抗体。它们与白介素12 (IL-12) 和白介素23 (IL-23) 的相同人p40-亚基结合 [26] 并且它们与相应的小鼠IL-12和IL-23无交叉反应 [27, 28]。布雷奴单抗和优特克单抗分别是具有VH₅和V_κ1D种系家族可变重链和轻链结构域的IgG1_κ抗体和具有VH₃和V_λ1种系家族可变重链和轻链结构域的IgG1_λ抗体。除不同的可变结构域之外, 布雷奴单抗和优特克单抗还显示恒定结构域中几个同种异型特异性氨基酸的差异 (参见图5)。然而, 这些氨基酸残基位于 (同族) FcRn结合区外部并且可以因此认为在FcRn-依赖性PK中不发挥作用 [11]。有趣地, 优特克单抗具有22天的 (报道) 中位终末半寿期 [29], 而布雷奴单抗具有仅8-9天的终末半寿期 [26, 30, 31]。

[0229] c) 电荷分布和pH依赖性净电荷

[0230] 布雷奴单抗在生理pH 7.4显示出非均匀的电荷分布 (参见, 例如, 发表的优特克单

抗晶体结构[27]和布雷奴单抗的同源性模型)。布雷奴单抗在Fv结构域上显示一个庞大的带正电荷区域(参见图1a),该区域在优特克单抗中不存在(参见图1b)。另外,FcRn拥有一个强大和延长的带负电荷区域(参见图1c),然而该区域不涉及同族Fc区结合作用。已经计算布雷奴单抗和优特克单抗的等电点分别是9.7和9.4。另外,布雷奴单抗的净电荷在整个pH范围内略微更为阳性(参见图1d)。

[0231] 布雷奴单抗和优特克单抗的FcRn结合亲和力在pH 6.0是相当的,即两个值最多相差一个数量级或幅度,在一个实施方案中相差最多5倍,而从FcRn的解离过程非常不同。使用布雷奴单抗和优特克单抗的变体时,可以显示,相互作用优势地是静电相互作用并且与带正电荷区域的范围相关(参见下文)。

[0232] d) pH依赖性FcRn-IgG相互作用

[0233] 已经合成布雷奴单抗和优特克单抗的十个变体并且已经通过FcRn亲和层析法就其FcRn结合特性方面对其表征(参见表2)。在变体中,已经修饰可变区并且分别使用表面等离子体共振法(SPR)和FcRn亲和层析测试其FcRn pH 6结合亲和力和FcRn解离(参见表3)。

[0234] 表2:布雷奴单抗和优特克单抗的全面工程化变体

[0235] 在布雷奴单抗(浅)和优特克单抗(深)之间交换结构性部分如Fv、LC和CDR:mAb 1-6。对于mAb 7和mAb 8,将布雷奴单抗的HC中的3个和5个碱性氨基酸(通过位点定向诱变)分别交换成丙氨酸残基。MAb 9是其中轻链CDR的三个碱性氨基酸交换成丙氨酸残基的布雷奴单抗并且mAb 10代表额外交换HC中5个碱性氨基酸的mAb 9。单个碱性氨基酸的交换由圆圈显示,三氨基酸交换绘制为1个圆圈并且五氨基酸交换绘制为2个圆圈。

[0236]

编号	名称	说明		FcRn 柱 保 留 时 间 [min]			T1/2 [h]
				pH梯度	pH梯度+ 高盐	盐梯度	
1	布雷奴单抗	布雷奴单抗 野生型		93.7	83.1	59.6	48
2	优特克单抗	优特克单抗 野生型		84.3	80.4	31.3	137
3	mAb 1	优特克单抗 Fv + 布雷奴单抗 恒定结构域		84.3	80.4	33.0	
4	mAb 2	布雷奴单抗 Fv + 优特克单抗 恒定结构域		93.0	83.0	58.5	
5	mAb 3	优特克单抗 HC + 布雷奴单抗 LC		92.4	83.0	53.9	
6	mAb 4	布雷奴单抗 HC + 优特克单抗 LC		84.5	80.9	34.0	
7	mAb 5	布雷奴单抗上的优特克 单抗 CDR		85.1	80.9	37.4	
8	mAb 6	优特克单抗上的布雷奴 单抗 CDR		86.2	81.4	40.7	
9	mAb 7	布雷奴单抗 R19HCA, K64HCA, R83HCA*		90.4	82.7	52.1	

[0237]

编号	名称	说明		FcRn 柱保留时间 [min]			T1/2 [h]
10	mAb 8	布雷奴单抗 R16HCA, R19HCA, K57HCA, K64HCA R83HCA*		90.1	82.6	49.5	78
11	mAb 9	布雷奴单抗 R27LCA, R55LCA, R94LCA*		86.2	81.6	38.1	109
12	mAb 10	布雷奴单抗 R16HCA, R19HCA, K57HCA, K64HCA R83HCA, R27LCA, R55LCA, R94LCA*		85.0	81.3	22.4	

[0238] 表3:全部测试抗体的FcRn结合亲和力和电荷分布。根据FcRn柱保留时间分选抗体。将平衡解离常数 K_D 计算为稳态亲和力并且对优特克单抗的 K_D 归一化。将相对 K_D 值(优特克单抗=1)的比较展示为均数($n=3$) $\pm$ 标准偏差(SD)。计算Fv结构域在pH 6.0和pH 7.4的等电点和净电荷(SaWI-Tools)。FcRn柱保留时间与Fv结构域在pH 6.0或pH 7.4的等电点或净电荷不相关。

[0239]

名称	优特克单抗	mAb 1	mAb 4	mAb 5	mAb 6	mAb 9	mAb 8	mAb 7	mAb 3	mAb 2	布雷奴单抗
保留时间 [min]	84.3	84.3	84.5	85.1	86.2	86.2	90.1	90.4	92.4	93.0	93.7
rel. K_D	1.00	1.0 $\pm$ 0.22	0.5 $\pm$ 0.08	0.9 $\pm$ 0.16	0.4 $\pm$ 0.17	0.4 $\pm$ 0.04	0.4 $\pm$ 0.07	0.2 $\pm$ 0.03	0.2 $\pm$ 0.06	0.3 $\pm$ 0.19	0.2 $\pm$ 0.07
calc. pI (IgG)	9.4	9.5	9.5	9.6	9.4	9.4	9.3	9.4	9.5	9.4	9.7
q(VL) pH 6.0	2.1	2.1	2.1	2.1	3.9	0.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8
q(VL) pH 7.4	1.9	1.9	1.9	1.9	3.0	0.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
q(VH) pH 6.0	3.1	3.1	6.4	4.1	5.4	6.4	1.4	3.4	3.1	6.4	6.4
q(VH) pH 7.4	2.9	2.9	4.3	3.9	3.3	4.3	-0.7	1.3	2.9	4.3	4.3
q(Fv) pH 6.0	5.2	5.2	8.4	6.1	9.2	7.2	5.2	7.2	6.9	10.2	10.2
q(Fv) pH 7.4	4.9	4.9	6.2	5.9	6.3	4.3	2.3	4.3	6.0	7.3	7.3

[0240] 对于全部11种抗体,在pH 6的FcRn结合亲和力落入一个狭窄范围(参见表3)。相对于优特克单抗(优特克单抗=1.0)计算平衡解离常数(K_D)。布雷奴单抗具有0.2的相对 K_D 并且9个变体的 K_D 在布雷奴单抗和优特克单抗之间。因此,可以得出结论,不同终末体内半寿期不由FcRn在pH 6.0的不同结合所引起。

[0241] 如本文中报道的一个方面是一种用于确定抗体-Fc-FcRn复合物存在影响抗体体内半寿期的抗体-Fab-FcRn相互作用的方法,所述方法包括以下步骤:

[0242] a) 使用表面等离子体共振法确定变异抗体和其亲本抗体在pH 6的 K_D 值,

[0243] b) 在高盐浓度存在下确定变异抗体和其亲本抗体在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,

[0244] 因而如果在变异抗体和其亲本抗体之间 K_D 值相差最多10倍和步骤b)中确定的保留时间实质上不同,则确定抗体-Fc-FcRn复合物中存在影响抗体体内半寿期的抗体-Fab-FcRn相互作用。

[0245] 如本文中报道的一个方面是一种用于确定抗体相对体内半寿期的方法,所述方法包括以下步骤:

- [0246] a) 使用表面等离子体共振法确定变异抗体和其亲本抗体在pH 6的 K_D 值,
- [0247] b) 在高盐浓度存在下确定变异抗体和其亲本抗体在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,
- [0248] 因而如果 K_D 值相差最多10倍并且步骤b)中确定的变异抗体的保留时间比其亲本抗体的保留时间更短/更小,则抗体具有与其亲本抗体相比减少的相对体内半寿期,以及
- [0249] 因而如果 K_D 值相差最多10倍并且步骤b)中确定的变异抗体的保留时间比其亲本抗体的保留时间更长/更大,则抗体具有与其亲本抗体相比增加的相对体内半寿期。
- [0250] 如本文中报道的一个方面是一种用于确定抗体体内半寿期增加或减少的方法,所述方法包括以下步骤:
- [0251] a) 使用表面等离子体共振法确定变异抗体和其亲本抗体在pH 6的 K_D 值,
- [0252] b) 在高盐浓度存在下确定变异抗体和其亲本抗体在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,
- [0253] 因而如果 K_D 值相差最多10倍并且步骤b)中确定的变异抗体的保留时间比其亲本抗体的保留时间更短/更小,则抗体具有与其亲本抗体相比减少的体内半寿期,以及
- [0254] 因而如果 K_D 值相差最多10倍并且步骤b)中确定的变异抗体的保留时间比其亲本抗体的保留时间更长/更大,则抗体具有与其亲本抗体相比增加的体内半寿期。
- [0255] 使用具有正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和柱,分析12种抗体的洗脱图,(参见图2)。优特克单抗和在布雷奴单抗恒定区部分上携带优特克单抗Fv结构域的mAb 1显示约84分钟的不可区分性保留时间,表明Fv结构域影响与FcRn相互作用。在另一方面,布雷奴单抗在保留时间94分钟洗脱并且因此具有与优特克单抗相比明显不同的保留时间。IdeS切割的布雷奴单抗Fc区(85.7分钟)和优特克单抗(85.2分钟)的不可区分性保留时间显示Fc区的作用可忽略不计。含有优特克单抗LC(LC=轻链,HC=重链)和布雷奴单抗HC的MAb 4具有接近于优特克单抗的保留时间,显示LC影响FcRn结合。
- [0256] 变异抗体mAb 5和mAb 6在布雷奴单抗框架上携带优特克单抗CDR(重链部分和轻链部分)并且反之亦然。在布雷奴单抗上移植优特克单抗CDR(mAb 5)使mAb 5的保留时间偏移接近于优特克单抗的保留时间。在优特克单抗上移植布雷奴单抗CDR(mAb 6)描述/展示了仍然接近于优特克单抗的洗脱图。
- [0257] 对于mAb 9(其为其中轻链CDR的三个带正电荷残基突变成丙氨酸残基的布雷奴单抗变体),观察到保留时间从布雷奴单抗按优特克单抗的方向强烈偏移。
- [0258] 在mAb 7和mAb 8中布雷奴单抗重链中的3个和5个带正电荷残基分别突变。在这些变体中,保留时间相对于布雷奴单抗偏移。
- [0259] 包含优特克单抗HC和布雷奴单抗LC的MAb 3以及在优特克单抗恒定结构域上含有布雷奴单抗Fv结构域的mAb 2均按照接近于布雷奴单抗的方式洗脱。
- [0260] 总之,数据显示Fv结构域影响FcRn解离并且不影响FcRn结合(在pH 6.0)。
- [0261] FcRn柱保留时间与抗体的等电点和净电荷相符。在溶酶体pH 6.0或生理pH 7.4不能观察到FcRn柱保留时间和Fv结构域的等电点或净电荷之间的相关性(参见表3)。但是,测量的FcRn柱保留时间随带正电荷区域的范围增加,特别在轻链可变结构域周围是这样(参见图2)。
- [0262] 如本文中报道的一个方面是一种用于增加抗体体内半寿期的方法,所述方法包括

以下步骤:

[0263] -将抗体轻链中位置27、55和94处的带电荷氨基酸残基改变成疏水性或中性亲水氨基酸残基(根据Kabat编号)并且因而增加抗体的体内半寿期。

[0264] 氨基酸可以根据常见的侧链特性分组:

[0265] (1) 疏水性:正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu;Ile;

[0266] (2) 中性亲水:Cys、Ser、Thr、Asn;Gln;

[0267] (3) 酸性:Asp、Glu;

[0268] (4) 碱性:His、Lys、Arg;

[0269] (5) 影响链方向的残基:Gly、Pro;

[0270] (6) 芳族:Trp、Tyr、Phe。

[0271] 酸性和碱性氨基酸残基一起属于带电荷氨基酸残基组。

[0272] 还在流动相中离子强度增加的不同设置下,即在盐浓度增加的情况下确定FcRn柱保留时间。已知电荷介导的相互作用在高离子强度条件下削弱,而疏水相互作用一般由盐增强。已经发现布雷奴单抗的FcRn柱保留时间在盐存在下缩短并且与离子强度的平方根倒数成正比,如Debye-Hückel电荷筛选定律建议那样[32]。优特克单抗的保留时间保持基本上不受影响(参见图6)。因此,过度FcRn-布雷奴单抗相互作用的显著部分是电荷介导的。

[0273] 综上,工程化变体的FcRn亲和层析显示,具有相同Fv结构域(mAb 1与mAb 2)和相同LC(mAb 3和mAb 4)的抗体在几乎相同的FcRn柱保留时间洗脱。此外,在布雷奴单抗(mAb 5)上移植优特克单抗CDR使洗脱pH偏移接近于优特克单抗的洗脱pH。因此,轻链CDR对布雷奴单抗的FcRn结合作用造成主要影响。

[0274] 在优特克单抗(mAb 6)上移植布雷奴单抗CDR展示了仍然接近于优特克单抗的洗脱图。因此,在不受这个理论约束的情况下,破坏布雷奴单抗的庞大带正电荷区域比产生更小带正电荷区域可能更影响抗体-FcRn相互作用。如MD模拟提示那样(参见下文),在带正电荷的Fv区和FcRn上带负电荷区域之间的直接、稳定性相互作用是轻易可行的。因此,FcRn-Fv相互作用可以导致FcRn-IgG复合物在生理条件下比正常更慢的解离。

[0275] e) FcRn洗脱pH与人FcRn转基因小鼠中药代动力学的相关性

[0276] 先前研究已经讨论了通过影响抗体和在内皮细胞表面上带负电荷基团之间的静电相互作用,净电荷是药代动力学特性改变的驱动力[35,36]。例如,Igawa等人[37]观察到,因可变区中工程化而具有较低等电点(pI)的IgG4抗体具有较低的流动相胞饮速率并且转而具有降低的消除速率。另外,Boswell等人[38]提出pI差异需要是至少一个单位以影响PK。

[0277] 布雷奴单抗、优特克单抗、mAb 8和mAb 9的pI在9.3和9.7之间变动。因此,可以假定对流动相胞饮的影响因pI差异而最小。然而,高离子强度条件下布雷奴单抗的较短FcRn柱保留时间(参见上文)以及MD模拟中与优特克单抗相比,静电对FcRn-Fv相互作用较大贡献(参见下文)显示,特定存在的电荷可以是FcRn-IgG相互作用的主要影响因素。使用具有在布雷奴单抗HC中突变了3个(mAb 7)和5个(mAb 8)带正电荷残基的突变体以及轻链CDR中三个带正电荷残基突变的布雷奴单抗(mAb 9),分析Fv结构域中电荷的影响。MAb7和mAb 8显示保留时间在优特克单抗方向的小偏移,证实电荷介导的相互作用,而mAb 9显示保留时间在优特克单抗方向的明显偏移。因此,轻链CDR中特定存在的电荷强烈地影响FcRn解离。

[0278] 为了评估布雷奴单抗可变结构域中突变的带电荷残基对FcRn结合作用的影响是否转换成调节的体内PK特性,在人FcRn-转基因小鼠中实施PK研究。测试了布雷奴单抗和优特克单抗,连同具有在布雷奴单抗和优特克单抗之间FcRn柱保留时间的两种布雷奴单抗变体(mAb 8和mAb 9)。4种抗体的分布和消除过程与其他IgG PK研究一致(参见图3a)。布雷奴单抗显示在 α -相比其他抗体减少更快。有趣地,布雷奴单抗和优特克单抗分别显示48小时和137小时的终末半寿期(参见图3b)。在Fv结构域中具有更小带正电荷区域的变体mAb 8和mAb 9分别具有78小时和109小时的终末半寿期。可以在布雷奴单抗和优特克单抗、布雷奴单抗和mAb 9以及优特克单抗和mAb 8的终末半寿期之间检出统计显著性。优特克单抗,mAb 9,mAb 8,和布雷奴单抗在分别对应于洗脱pH 7.4、7.5、7.7和7.9的84.3、86.2、90.1和93.7分钟处洗脱。因此,已经发现4种IgG的终末半寿期与体外FcRn柱洗脱pH值线性相关(参见图3b)。

[0279] 在PK实验中,检验了终末半寿期,所述终末半寿期完全在FcRn再生占优的消除阶段计算[39]。4种抗体的终末半寿期与体外FcRn柱洗脱pH线性相关:FcRn柱洗脱pH越高,终末半寿期越短,因而显示FcRn柱是体外FcRn解离的预示/敏感工具。终末半寿期和FcRn柱洗脱pH之间的相关性证实了FcRn-IgG在生理pH快速解离的重要性。

[0280] 在不受这个理论约束的情况下,FcRn-IgG复合物在pH 6.0积累于内体中,因此,较少的结合作用导致IgG再生较少和清除更快。通过胞吐,FcRn-IgG复合物释放到质膜,在这里IgG和FcRn的解离不得不在生理pH 7.4在短时间内发生[40]。因此,在生理pH解离对长期半寿期也重要[22,40]。

[0281] 因此,已经发现在更高的pH值解离提示从FcRn解离得更慢。在不受这个理论约束的情况下,这可能导致抗体在溶酶体中降解而非释放抗体返回血液循环。

[0282] 因此,已经发现IgG Fv结构域中的电荷通过改变IgG和FcRn之间的相互作用,影响终末半寿期。Fab中与FcRn相互作用的结构部分已经定位并且已经证实这种相互作用是电荷介导的。PK研究揭示出体外FcRn-IgG解离和体内终末半寿期之间的线性相关体。

[0283] f) FcRn-IgG模型的分子动力学(MD)模拟

[0284] 使用发表的大鼠FcRn结构作为模板,生成FcRn-Fc复合物的同源性模型。基于完整IgG1的晶体结构(PDB代码1HZH),对布雷奴单抗和优特克单抗的Fv结构域的位置建模。这些同源性模型在一个完整IgG分子上含有FcRn(α -FcRn连同 β_2m)的两个拷贝(参见图4a)。FcRn和Fv结构域之间的距离在起始结构中 $>40\text{\AA}$ 并且在生理条件下超过大约 $0.8\text{\AA}$ 的Debye长度[32]。通过在100纳秒时间范围内在明确水和生理学离子强度下分子动力学模拟法,模拟FcRn-IgG复合物的动力学。在模拟期间,两个Fab区之一靠近FcRn的顶端并且以这种构象维持剩余的模拟时间(参见图4b、c、d)。迄今尚未描述在FcRn上发现与Fv结构域相互作用的区域参与IgG结合。令人惊讶地,在MD模拟中布雷奴单抗和优特克单抗均采取Fv和FcRn彼此相互作用的构象(参见图4b、c)。已经发现在两种复合物中,非对称起始结构中Fv和FcRn结构域的两个不同对彼此靠近。发现布雷奴单抗中静电对FcRn-Fv相互作用的贡献约2倍于优特克单抗中(参见图4e)。

[0285] 总之,已经发现FcRn-IgG复合物的Fab臂的内在灵活性在结构上允许Fv结构域与FcRn顶端的直接、稳定相互作用。

[0286] g) 本发明方法

[0287] g.i) 用不同盐浓度的线性正pH梯度洗脱

[0288] 本文中报道了一种方法,所述方法包括以下两个步骤:

[0289] a) 第一盐浓度存在下确定抗体在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,

[0290] b) 在第二盐浓度存在下确定抗体在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间。

[0291] 第二盐浓度通常高于/大于第一盐浓度,从而这些浓度大致不相同,即它们相差至少10%,在一个实施方案中相差至少20%。

[0292] 采用这种方法,可以通过比较不同盐浓度存在下获得的保留时间(参见图13)或通过比较完整抗体及其Fc区的保留时间,在简单的色谱方法中确定抗体-Fc-FcRn复合物中抗体-Fab-FcRn相互作用的存在。这是重要的,因为抗体-Fab-FcRn相互作用影响抗体的体内半寿期。

[0293] 对于抗体/参考抗体对,就它们在FcRn亲和层析柱上的保留时间和就它们的FcRn相互作用而言存在不同关系:

[0294] 1) 抗体和参考抗体在步骤a) 和步骤b) 中具有基本上相同的保留时间:在这种情况下两种抗体的体内半寿期应当基本上相同,即体内半寿期不受抗体-Fab-FcRn相互作用影响,或

[0295] 2) 抗体和参考抗体在步骤a) 中具有基本上相同的保留时间,但在步骤b) 中具有不同的保留时间:在这种情况下抗体的体内半寿期短于参考抗体的体内半寿期,即体内半寿期受到抗体-Fab-FcRn相互作用影响。

[0296] 抗体可以是亲本抗体的变异抗体,在这种情况下参考抗体是亲本抗体。

[0297] 在一个情况下,参考抗体是具有与在IdeS切割或木瓜蛋白酶切割后其Fc区基本上相同的保留时间的抗体。

[0298] 为了提供治疗方案以治疗如今已知的多样疾病并且还治疗在未来将会揭示的那些疾病,需要定制抗体以及含有Fc区的多肽。

[0299] 为了定制FcRn结合特征,修饰抗体的参与FcRn相互作用的残基并且不得不测试所产生的修饰抗体。如果不符合需要的特征,则再次进行相同过程。

[0300] 因此,提供下述方法将是有利,所述方法基于简单色谱方法预测修饰抗体的特征特性变化并且不需要体内研究以分析修饰的抗体中特征的变化。

[0301] 在一些情况下,需要半寿期延长的抗体。例如,半寿期在需要治疗的患者的循环中延长的药物需要降低的剂量或增加的给药间隔时间。这类抗体还具有疾病部位如肿瘤中暴露增加的优点。

[0302] 体内半寿期与FcRn亲和层析柱上的保留时间相关。如果抗体和FcRn之间的相互作用几乎单独由抗体Fc区中的残基介导,则尤其如此。但是如果抗体Fc区外部(例如在抗体-Fab中)的残基还与FcRn相互作用,则这种相关性不得不进一步证实。这可以利用具有正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析方法中保留时间的变化在低盐和高盐浓度存在下或完整抗体和Fv区切割的抗体(=Fc区)存在下,以如本文中报道的方法进行。如果保留时间基本上不受从低浓度至高盐浓度的变化影响或不受Fc区切割的影响,则不存在抗体-Fab-FcRn相互作用并且FcRn亲和层析柱上较高的保留时间与增加的体内半寿期相关。但是如果保留时

间受从低浓度至高盐浓度的变化影响或受Fc区的切割影响,尤其如果它因其而减少,则体内半寿期与FcRn亲和层析柱上的保留时间差异性相关,即FcRn亲和层析柱上较长的保留时间因抗体-FcRn在生理pH解离减少并且(在不受这个理论约束的情况下)抗体的溶酶体降解增加而与较短的体内半寿期相关。

[0303] 本中使用的FcRn亲和层析柱包含基质和基质结合的色谱官能团,其中基质结合的色谱官能团包含新生Fc受体(FcRn)和 β -2-微球蛋白的非共价复合物。

[0304] 通常,如本文中报道的方法的起点是与其与FcRn结合为特征的亲本抗体或参考抗体。

[0305] 如本文中报道的一个方面是如本文中报道的方法用于确定抗体-Fc-FcRn复合物中存在影响体内半寿期的抗体-Fab-FcRn相互作用的用途,所述方法包括以下步骤:

[0306] a) 在第一盐浓度存在下确定抗体在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,

[0307] b) 在第二盐浓度存在下确定抗体在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,

[0308] 因而如果步骤a)中确定的保留时间和步骤b)中确定的保留时间实质上不同,则确定抗体-Fc-FcRn复合物中存在影响体内半寿期的抗体-Fab-FcRn相互作用。

[0309] 如本文中报道的一个方面是一种用于确定抗体-Fc-FcRn复合物中存在影响体内半寿期的抗体-Fab-FcRn相互作用的方法,所述方法包括以下步骤:

[0310] a) 在第一盐浓度存在下确定抗体在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,

[0311] b) 在第二盐浓度存在下确定抗体在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,

[0312] 因而如果步骤a)中确定的保留时间和步骤b)中确定的保留时间实质上不同,则确定抗体-Fc-FcRn复合物中存在影响体内半寿期的抗体-Fab-FcRn相互作用。

[0313] 与亲本抗体多肽相比或与参考抗体相比时,变体抗体显示与FcRn的结合增加或减少,并且因此,与亲本/参考抗体相比在血清中具有受调节的半寿期。

[0314] 通常,首先预测对FcRn的亲和力增加(即与亲本抗体或参考抗体相比,在FcRn柱上的保留时间增加)的Fc区变体具有与对FcRn的亲和力减少(即与亲本抗体或参考抗体相比,在FcRn柱上的保留时间减少)的那些Fc区变体相比较长的血清半寿期。

[0315] 此后不得不证实这种预测的体内半寿期。对于这种证实,可以使用如本文中报道的方法。

[0316] 体内半寿期增加的抗体变体应用于治疗哺乳动物、尤其治疗人的方法中,其中需要所施用抗体的长半寿期,如用于治疗慢性疾病或病症。

[0317] 对FcRn亲和力减少的抗体变体应用于治疗哺乳动物、尤其治疗人的方法中,其中需要所施用抗体或融合多肽的短半寿期,如体内诊断性成像。

[0318] 很可能的是,FcRn结合亲和力减少的抗体变体将能够穿过胎盘,并且因此可以用于治疗孕妇中尤其未出生孩子的疾病或病症。此外,对于意图施加/运输至脑、肾、和/或肝的那些药物,可能需要减少的FcRn结合亲和力。

[0319] 如本文中报道的一个方面是如本文中报道的方法用于确定抗体的用途,所述抗体

显示出从血管系统跨肾小球上皮的运输减少。

[0320] 如本文中报道的一个方面是如本文中报道的方法用于确定抗体的用途,所述抗体显示出从脑跨血脑屏障进入脉管间隙的运输减少。

[0321] 在如本文中报道的全部方面的一个实施方案中,FcRn选自人FcRn、食蟹猴FcRn、小鼠FcRn、大鼠FcRn、绵羊FcRn、犬FcRn、猪FcRn、迷你猪FcRn和兔FcRn。

[0322] 在如本文中报道的全部方面的一个实施方案中, β -2-微球蛋白来自与FcRn相同的物种。

[0323] 在如本文中报道的全部方面的一个实施方案中, β -2-微球蛋白来自与FcRn不同的物种。

[0324] 在一个实施方案中,亲本抗体包含至少一个结合结构域和至少一个Fc区。在一个实施方案中,亲本抗体包含两个结合结构域和两个Fc区。

[0325] 在一个实施方案中,亲本抗体包含至少一个与靶特异性结合的结合结构域,所述靶特介导生物学效果(在一个实施方案中,能够与细胞表面受体结合的配体或能够结合配体的细胞表面受体)并且介导负向或正向信号传播至细胞。在一个实施方案中,亲本抗体包含至少一个对被靶向以便减少或清除的抗原(在一个实施方案中,细胞表面抗原或可溶性抗原)特异的结合结构域和至少一个Fc区。

[0326] 可以在哺乳动物中通过多次皮下或腹膜内注射有关抗原(例如纯化的抗原、包含这类抗原的细胞或细胞提取物,或编码这种抗原的DNA)和任选地佐剂,产生与靶特异性结合的抗体。

[0327] 在一个实施方案中,抗体是全长抗体。

[0328] 在一个实施方案中,抗体是单克隆抗体。

[0329] 在一个实施方案中,亲本抗体是双特异性抗体。

[0330] 在一个实施方案中,亲本抗体是嵌合抗体。

[0331] 在先前全部方面的一个实施方案中,pH梯度是从约pH 5.5至约pH8.8的梯度。

[0332] 通常,在哺乳动物细胞中将带C末端His-Avi Tag (SEQ ID NO:34)的FcRn(对于人FcRn,SEQ ID NO:33)的可溶性胞外结构域与 β 2-微球蛋白(对于人 β -2-微球蛋白,SEQ ID NO:35)共表达。将非共价FcRn-微球蛋白复合物生物素酰化并且加载于链霉亲和素衍生化的琼脂糖凝胶上。

[0333] 在如本文中报道的全部方面的一个实施方案中,新生Fc受体(FcRn)和 β -2-微球蛋白的非共价复合物与固相结合。

[0334] 在一个实施方案中,借助N末端和/或 ϵ -氨基(赖氨酸)、不同赖氨酸的 ϵ -氨基、抗体的氨基酸主链的羧基、硫氢基、羟基和/或酚官能团和/或抗体的糖结构的糖醇基,通过化学结合作用,进行非共价复合物与固相的缀合。

[0335] 在一个实施方案中,非共价复合物借助特异性结合对与固相缀合。在一个实施方案中,非共价复合物与生物素缀合并借助固相支持物固定的抗生物素蛋白或链霉亲和素进行固定化至固相支持物。

[0336] 在一个实施方案中,特异性结合对(第一组分/第二组分)选自链霉亲和素或抗生物素蛋白/生物素、抗体/抗原(参见,例如,Hermanson,G.T.等人,Bioconjugate Techniques,Academic Press(1996))、凝集素/多糖、类固醇/类固醇结合蛋白、激素/激素

受体、酶/底物、IgG/蛋白A和/或蛋白G等。

[0337] 原则上,任何缓冲物质可以用于如本文中报道的方法中。

[0338] 已经通过位点定向诱变鉴定了对小鼠Fc-小鼠FcRn相互作用至关重要的Fc残基(参见例如Dall'Acqua,W.F.等人,J.Immunol.169(2002)5171-5180)。残基I253、H310、H433、N434、和H435(根据Kabat的EU编号)参与这种相互作用(Medesan,C.等人,Eur.J.Immunol.26(1996)2533;Firan,M.等人,Int.Immunol.13(2001)993;Kim,J.K.等人,Eur.J.Immunol.24(1994)542)。发现残基I253、H310和H435对人Fc与鼠FcRn的相互作用至关重要(Kim,J.K.等人,Eur.J.Immunol.29(1999)2819)。通过蛋白质-蛋白质相互作用研究,Dall'Acqua等人已经描述残基M252Y、S254T、T256E改善FcRn结合(Dall'Acqua,W.F.等人,J.Biol.Chem.281(2006)23514-23524)。人Fc-人FcRn复合物的研究已经显示残基I253、S254、H435和Y436对这种相互作用至关重要(Firan,M.等人,Int.Immunol.13(2001)993;Shields,R.L.等人,J.Biol.Chem.276(2001)6591-6604)。在Yeung,Y.A.等人(J.Immunol.182(2009)7667-7671)中,已经报道并研究了残基248至259和301至317和376至382和424至437的各种突变体。

[0339] 表4:用不同洗脱缓冲液和梯度获得的不同抗体的保留时间。

[0340]

洗脱缓冲液	基于以下的方法	保留时间[分钟]				
		布雷奴单抗	优特克单抗	抗-Ox40L抗体	抗-A β 抗体	抗HER2抗体 (I253H-突变体)
20 mM Tris/HCl, 含 50 mM NaCl, 调节至 pH 8.8	实施例 5	未测定	未测定	43	44	未测定
20 mM Tris/HCl, 含 140 mM NaCl, 调节至 pH 8.8	实施例 2	93.7	84.3	未测定	未测定	未测定
20 mM Tris/HCl, 含 150 mM NaCl, 调节至 pH 8.8	实施例 5	未测定	未测定	45	45.5	不结合
20 mM HEPES, 含 150 mM NaCl, 调节至 pH 8.6	实施例 5	未测定	未测定	48	48.5	未测定
20 mM Tris/HCl, 含 300 mM NaCl, 调节至 pH 8.8	实施例 5	未测定	未测定	42.5	43	未测定
20 mM Tris/HCl, 含 400 mM NaCl, 调节至 pH 8.8	实施例 3	83.1	80.4	未测定	未测定	未测定

[0341] 术语YTE-突变体指三重突变M252Y/S254T/T256E。

[0342] 在一个实施方案中,使用可药用的缓冲物质,如例如磷酸或其盐、乙酸或其盐、柠檬酸或其盐、吗啉或其盐、2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)或其盐、组氨酸或其盐、甘氨酸或其盐、三(羟甲基)氨基甲烷(TRIS)或其盐、(4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸(HEPES)或其盐。

[0343] 在一个实施方案中,缓冲物质选自磷酸或其盐、或乙酸或其盐、或柠檬酸或其盐、或组氨酸或其盐。

[0344] 在一个实施方案中,缓冲物质具有10mM至500mM的浓度。在一个实施方案中,缓冲物质具有10mM至300mM的浓度。在一个实施方案中,缓冲物质具有10mM至250mM的浓度。在一个实施方案中,缓冲物质具有10mM至100mM的浓度。在一个实施方案中,缓冲物质具有15mM

至50mM的浓度。在一个实施方案中,缓冲物质具有约20mM的浓度。

[0345] 在一个实施方案中,正线性pH梯度的示例性起始溶液包含20mM MES和140mM NaCl,调节至pH 5.5。

[0346] 在一个实施方案中,正线性pH梯度的示例性终溶液包含20mM TRIS和140mM NaCl,调节至pH 8.8。

[0347] 在梯度期间,将起始溶液和最终溶液的混合物施加至FcRn亲和层析柱,因而正线性梯度始于100%的起始溶液(即纯的起始溶液),此后起始溶液的比例从100%降低至0%并且最终溶液的比例从0%增加至100%,从而在正线性pH梯度后,将100%的最终溶液施加至柱。

[0348] 在一个实施方案中,起始溶液和最终溶液包含额外的盐。在一个实施方案中,额外的盐选自氯化钠、硫酸钠、氯化钾、硫酸钾、柠檬酸钠、或柠檬酸钾。在一个实施方案中,溶液包含50mM至1000mM的额外盐。在一个实施方案中,溶液包含50mM至750mM的额外盐。在一个实施方案中,溶液包含50mM至500mM的额外盐。在一个实施方案中,溶液包含50mM至750mM的额外盐。在一个实施方案中,溶液包含约140mM至约400mM的额外盐。

[0349] 在一个实施方案中,起始溶液和最终溶液包含氯化钠。在一个实施方案中,起始溶液和最终溶液包含约140mM至约400mM氯化钠。

[0350] 已经发现盐和缓冲物质的种类影响保留时间和分离度。可以确定抗体与FcRn结合的最佳盐浓度(140mM NaCl)。如果盐浓度较高(400mM),则与FcRn的结合因溶液的离子强度增加干扰电荷相互作用而减少,并且获得较短的保留时间。

[0351] 因此,如本文报道的方法中,步骤a)和步骤b)中使用的溶液以及在步骤a)和步骤b)中应用的梯度以及在步骤a)和步骤b)中柱的载量以及在步骤a)和步骤b)中柱的尺度和FcRn亲和层析材料的量以及在步骤a)和步骤b)中FcRn亲和层析材料的FcRn亲和配体密度以及在步骤a)和步骤b)中FcRn与固相的缀合以及在步骤a)和步骤b)中b2m和FcRn的性质是相同的或甚至完全相同。因此,在如本文报道的方法中,在步骤a)和步骤b)中的FcRn亲和层析除了盐浓度在相同条件下进行,所述盐浓度在步骤a)和步骤b)之间不同。在一个实施方案中,第二盐浓度大于第一盐浓度。在一个实施方案中,第二盐浓度至少2倍于第一盐浓度。

[0352] 如可以从图7见到,所施加抗体的量显示与洗脱峰的曲线下面积线性相关。

[0353] 将8种抗体作为完整抗体和用酶IdeS切割后分析。通过SDS PAGE和分析性SEC控制切割。通过制备性SEC分离Fc区和抗体-Fab。

[0354] 表5:完整抗体、抗体-Fab和Fc区的保留时间的比较。

[0355]

根据实施 例确定	抗体	保留时间[分钟]		
		完整抗体	Fc 区	抗体-Fab
5	抗 IGF-1R 抗体	44.5	45	不结合
5	抗 IL13R α 抗体	44.5	45	不结合
5	抗 HER2 抗体	45	45	不结合
5	抗 IL6R 抗体	45	45	不结合
5	抗-Ox40L 抗体	45	45	不结合
2	布雷奴单抗	93.7	85.7	未测定
2	优特克单抗	84.3	85.2	未测定

[0356] 通常,在实施例5的条件下具有野生型Fc区的抗体(IgG1或IgG2或IgG4)的保留时间在45分钟和49分钟之间变动(用针对36种抗原的35种治疗性抗体测试,数据未显示)。如果使用实施例2的条件,保留时间随着梯度更长而增加至约85分钟。

[0357] 表6:相对于固定化FcRn受体/克柱材料的量而言保留时间(实施例5的色谱条件)。

[0358]

洗脱缓冲液: 20 mM Tris/HCl, 含 150 mM NaCl, 调节至 pH 8.8		保留时间[分钟]	
		抗-Ox40L 抗体	抗-A β 抗体
1.2 mg FcRn/g 固相		42.5	42.5
3 mg FcRn/g 固相		45	45.5
6 mg FcRn/g 固相		48.5	49
12 mg FcRn/g 固相		48.5	49

[0359] 通常,如本文报道的方法和用途中保留时间取决于pH梯度和所用盐浓度的陡度。如果使用野生型抗体作为参考,则更弱的结合作用由较短的保留时间指示(=洗脱更早)而更强的结合作用由较长的保留时间指示(=洗脱更迟)。

[0360] 不同的IgG Fc区突变体在FcRn柱上行为不同,显示了受调节的保留时间。

[0361] 例如,抗IGF-1R抗体突变体YTE显示增加的保留时间(参见图8)。

[0362] 表7:保留时间相对于Fc区突变的变化。

[0363]

抗体	保留时间[分钟]
抗IGF-1R抗体(野生型)	44.5
抗IGF-1R抗体(YTE-突变体)	57.5

[0364] 术语YTE-突变体指三重突变M252Y/S254T/T256E。

[0365] 如本文中报道的一个方面是一种用于确定抗体相对体内半寿期的方法,所述方法包括以下步骤:

[0366] a) 在第一盐浓度存在下确定抗体在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,

[0367] b) 在第二盐浓度存在下确定抗体在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,

[0368] 因而如果步骤a)中确定的保留时间和步骤b)中确定的保留时间实质上不同,则抗体具有与IgG1、IgG3或IgG4亚类的标准/天然抗体相比减少的相对体内半寿期。

[0369] 如本文中报道的一个方面是如本文中报道的方法用于确定抗体相对体内半寿期的用途,其中所述方法包括以下步骤:

[0370] a) 在第一盐浓度存在下确定抗体在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,

[0371] b) 在第二盐浓度存在下确定抗体在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,

[0372] 因而如果步骤a)中确定的保留时间和步骤b)中确定的保留时间实质上不同,则抗体具有与IgG1、IgG3或IgG4亚类的标准/天然抗体相比减少的相对体内半寿期。

[0373] 如本文中报道的一个方面是一种用于确定变异抗体相对于其亲本抗体的体内半寿期增加或减少的方法,所述方法包括以下步骤:

[0374] a) 在第一盐浓度存在下确定变异抗体和其亲本抗体在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,

[0375] b) 在第二盐浓度存在下确定变异抗体和其亲本抗体在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,

[0376] 因而如果i) 步骤a)中确定的变异抗体的保留时间比步骤a)中确定的其亲本抗体的保留时间更大/更长,并且ii) 步骤a)中确定的变异抗体的保留时间和步骤b)中确定的变异抗体的保留时间基本上相同,则变异抗体的体内半寿期相对于其亲本抗体增加,

[0377] 因而如果i) 步骤a)中确定的变异抗体的保留时间比步骤a)中确定的其亲本抗体的保留时间更小/更短,并且ii) 步骤a)中确定的变异抗体的保留时间和步骤b)中确定的变异抗体的保留时间基本上相同,则变异抗体的体内半寿期相对于其亲本抗体减少。

[0378] 如本文中报道的一个方面是如本文中报道的方法用于确定变异抗体相对于其亲本抗体的体内半寿期增加或减少的用途,其中所述方法包括以下步骤:

[0379] a) 在第一盐浓度存在下确定变异抗体和其亲本抗体在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,

[0380] b) 在第二盐浓度存在下确定变异抗体和其亲本抗体在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,

[0381] 因而如果i) 步骤a)中确定的变异抗体的保留时间比步骤a)中确定的其亲本抗体的保留时间更大/更长,并且ii) 步骤a)中确定的变异抗体的保留时间和步骤b)中确定的变异抗体的保留时间基本上相同,则变异抗体的体内半寿期相对于其亲本抗体增加,

[0382] 因而如果i) 步骤a)中确定的变异抗体的保留时间比步骤a)中确定的其亲本抗体的保留时间更小/更短,并且ii) 步骤a)中确定的变异抗体的保留时间和步骤b)中确定的变

异抗体的保留时间基本上相同,则变异抗体的体内半寿期相对于其亲本抗体减少。

[0383] 已经发现,显示从FcRn柱洗脱延迟(即在FcRn柱上具有较长保留时间)并且未显示抗体-Fab-FcRn相互作用的抗体具有较长的体内半寿期(参见实施例6)。

[0384] 表8:体内数据。

[0385]	抗体	保留时间[分钟]	体内半寿期[h]
	抗-A β 抗体 (野生型)	45.5 (实施例 5)	103 +/- 51
	抗 IGF-1R 抗体(野生型)	45.5 (实施例 5)	97 +/- 9
	抗 IGF-1R 抗体(YTE-突变体)	58 (实施例 5)	211 +/- 41
	布雷奴单抗	93.7 (实施例 2)	48
	具有 HC 突变 R16A、 R19A、 K57A、 K64A、 R83A 的布雷奴单抗	90.1 (实施例 2)	78
	具有 LC 突变 R27A、 R55A、 R94A 的布雷奴单抗	86.2 (实施例 2)	109
[0386]	优特克单抗	84.3 (实施例 2)	137

[0387] 术语YTE-突变体指三重突变M252Y/S254T/T256E。

[0388] 如本文中报道的一个方面是如本文中报道的方法用于确定抗体的体内半寿期的用途。

[0389] 一组用野生型IgG和在Fc区中带YTE-突变的IgG变体实施的体外和在体内实验允许显示FcRn亲和层析的结果与采用人FcRn转基因小鼠的体内药代动力学研究的那些结果的半定量相关性(Spiekerman,G.M.等人,J.Exp.Med.196(2002)303-310;Dall'Acqua,W.F.等人,J.Biol.Chem.281(2006)23514-23524)。YTE-突变导致显著延长的半寿期和更慢的血浆清除率。更长的体内半寿期对应于FcRn色谱中更长的保留时间。最近显示Fc工程化的曲妥珠单抗变体的延长的半寿期具有增强的体外FcRn结合作用,如通过流式细胞术所测量(Petkova,S.B.等人,Int.Immunol.18(2006)1759-1769)。FcRn亲和力改善11倍的抗VEGF IgG1抗体贝伐单抗的变体显示出在人FcRn转基因小鼠中具有延长5倍的半寿期并且在食蟹猴中具有三倍更长的半寿期(Zalevsky,J.等人,Nat.Biotechnol.28(2010)157-159)。

[0390] 已经显示抗体样式对结合至FcRn柱没有影响。对杵臼(knob-into-hole)样式和几种双特异性抗体样式证实这一点。因此,如本文中报道的方法可以用于评价新抗体样式。

[0391] 在一个实施方案中,将复合物单一生物素酰化。

[0392] 在一个实施方案中,作为配体的包含新生Fc受体(FcRn)和 β -2-微球蛋白的非共价复合物的色谱材料在如本文报道的方法和用途中具有至少100次循环的稳定性。循环是从相应方法或用途的第一pH值至第二pH值的pH梯度,因为对于材料的再生,除方法或用途的最终条件外,不需要条件的其他变化。由此,在一个实施方案中,一个循环是从约pH值pH

5.5至约pH值pH 8.8的pH梯度。

[0393] g.ii) 在相同盐浓度用线性正pH梯度洗脱抗体及其Fc区

[0394] 本文中报道了一种方法,所述方法包括以下两个步骤:

[0395] a) 在第一盐浓度存在下确定抗体在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,

[0396] b) 在第一盐浓度存在下确定抗体的Fc区在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间。

[0397] 采用这种方法,可以通过比较抗体及其Fc区的保留时间,在简单的色谱方法中确定抗体-Fc-FcRn复合物中抗体-Fab-FcRn相互作用的存在。Fc区例如可以通过用酶IdeS或木瓜蛋白酶进行酶促切割获得,或可以重组产生。这是重要的,因为抗体-Fab-FcRn相互作用影响抗体的体内半寿期。

[0398] 对于抗体/抗体-Fc区对,就它们在FcRn亲和层析柱上的保留时间和同样地就它们的FcRn相互作用而言存在不同关系:

[0399] 1) 抗体及其Fc区具有基本上相同的保留时间:在这种情况下抗体的体内半寿期不受抗体-Fab-FcRn相互作用影响,

[0400] 2) 抗体及其Fc区具有不同的保留时间并且Fc区的保留时间短于抗体的保留时间:在这种情况下,抗体的体内半寿期受到抗体-Fab-FcRn相互作用影响。

[0401] 在所讨论的抗体是变异抗体的情况下,不得不考虑其他方面:在变异抗体中,抗体-Fc-FcRn相互作用以及抗体-Fab-FcRn相互作用可以因相对于亲本抗体引入的修饰而改变。

[0402] 因此,在亲本抗体、变异抗体及其相应的Fc区之间存在以下可能的关系(参见图10):

[0403] 1) 亲本抗体(1)、变异抗体(3)和相应的Fc区(2,4)具有基本上相同的保留时间:在这种情况下变异抗体的体内半寿期i) 不受抗体-Fab-FcRn相互作用影响和ii) 对应于亲本抗体的体内半寿期(参见图10A),

[0404] 2) 变异抗体(3)及其Fc区(4)具有不同的保留时间,变异抗体的Fc区的保留时间短于变异抗体的保留时间,并且亲本抗体(1)\亲本抗体的Fc区(2)和变异抗体的Fc区(4)具有基本上相同的保留时间:在这种情况下,变异抗体的体内半寿期是i) 受到抗体-Fab-FcRn相互作用影响并且ii) 短于亲本抗体的体内半寿期(参见图10B),

[0405] 3) 亲本抗体(1)和变异抗体(3)具有不同的保留时间,变异抗体的Fc区(4)的保留时间基本上与变异抗体(3)的保留时间相同,并且变异抗体的保留时间长于亲本抗体(1)的保留时间:在这种情况下变异抗体的体内半寿期i) 不受抗体-Fab-FcRn相互作用影响并且ii) 长于亲本抗体的体内半寿期(参见图10C),

[0406] 4) 亲本抗体(1)和变异抗体(3)具有不同的保留时间,变异抗体的Fc区(4)的保留时间基本上与变异抗体(3)的保留时间相同,并且变异抗体(3)的保留时间短于亲本抗体(1)的保留时间:在这种情况下变异抗体的体内半寿期i) 不受抗体-Fab-FcRn相互作用影响并且ii) 短于亲本抗体的体内半寿期,

[0407] 5) 亲本抗体(1)和变异抗体(3)具有不同的保留时间,变异抗体的Fc区(4)的保留时间与变异抗体(3)的保留时间不同并且还于亲本抗体(1)及其Fc区(2)的保留时间不同,

并且变异抗体的Fc区(4)的保留时间在变异抗体(3)和亲本抗体(4)的保留时间之间:在这种情况下变异抗体的体内半寿期i)受到抗体-Fab-FcRn相互作用影响和ii)并且与亲本抗体的体内半寿期不同(参见图10D)。

[0408] 在一个情况下,参考抗体是具有与在IdeS切割或木瓜蛋白酶切割后其Fc区基本上相同的保留时间的抗体。

[0409] 如上文概述,抗体-Fab-FcRn相互作用可以对抗体的体内半寿期具有影响。还如上文概述,抗体-Fc-FcRn相互作用可以对抗体的体内半寿期具有影响。因此,两种相互作用不得不加以解释。

[0410] 例如,Ropeenian和Akilesh(Nat.Rev.Immunol.7(2007)715-725)报道:人源化IgG1抗体hu4D5(Herceptin;Genentech;ERBB2特异性单克隆抗体)变体Asn434Ala(N434A)和三重置换的变体Thr307Ala/Asn434Ala/Glu380Ala(T307A/N434A/Q380A)在pH 6.0分别以高于野生型hu4D5抗体3倍和12倍的亲和力结合人FcRn。出乎意料地,在FcRn转基因人源化小鼠中,这两种变体抗体的半寿期基本上等同。根据Ropeenian和Akilesh,这种不一致性可以由三重置换变体在pH 7.4对FcRn的亲和力增加解释。在pH 7.4以及在pH 6.0改善结合亲和力的Fc区突变可以实际上在体内加速抗体清除而非延长其半寿期。

[0411] 因此,已经进一步考虑变异抗体的Fc区的保留时间是否长于临界保留时间。在不受这个理论约束的情况下,这导致以下影响:在pH 7.4的相互作用如此增加,从而抗体-FcRn复合物在pH 7.4的解离减少,导致抗体的降解增加(参见图11)。

[0412] 本发明一个方面一种用于选择抗体的方法,所述方法包括以下步骤(参见图12):

[0413] a) 使用相同洗脱条件,确定i) 抗体(3)、ii) 抗体的Fc区(4)、iii) 参考抗体(1)、iv) 参考抗体的Fc区(2)和v) 在Fc区中具有突变N434A的参考抗体(5)在FcRn亲和层析柱上的保留时间,

[0414] b) 选择这样的抗体,对于所述抗体

[0415] b-i) 参考抗体(1)、变异抗体(3)和相应的Fc区(2、4)具有基本上相同的保留时间,并且抗体的保留时间短于在Fc区中具有突变N434A的参考抗体(5)的保留时间并且因而选择其体内半寿期i) 不受抗体-Fab-FcRn相互作用影响和ii) 对应于亲本抗体的体内半寿期的抗体(参见图12A),

[0416] b-ii) 抗体(3)及其Fc区(4)具有不同的保留时间,抗体Fc区(4)的保留时间短于抗体(3)的保留时间并且等于或长于参考抗体(1)或其Fc区(2)的保留时间,参考抗体(1)、参考抗体的Fc区(2)和抗体(3)的保留时间短于在Fc区中具有突变N434A的参考抗体(5)的保留时间和因而选择其体内半寿期i) 受到抗体-Fab-FcRn相互作用影响和ii) 比参考抗体的体内半寿期短的抗体(参见图12B),

[0417] b-iii) 参考抗体(1)和抗体(3)具有不同的保留时间,抗体的Fc区(4)的保留时间基本上与抗体(3)的保留时间相同,抗体(3)的保留时间长于参考抗体(1)的保留时间,并且抗体(3)的保留时间短于在Fc区中具有突变N434A的参考抗体(5)的保留时间并且因而选择其体内半寿期i) 不受抗体-Fab-FcRn相互作用影响和ii) 比参考抗体的体内半寿期长的抗体(参见图12C),

[0418] b-iv) 参考抗体(1)和抗体(3)具有不同的保留时间,抗体的Fc区(4)的保留时间基本上与抗体(3)的保留时间相同,抗体(3)的保留时间短于参考抗体(1)的保留时间,并且抗

体(3)的保留时间短于在Fc区中具有突变N434A的参考抗体(5)的保留时间并且因而选择其体内半寿期i)不受抗体-Fab-FcRn相互作用影响和ii)比参考抗体的体内半寿期短的抗体(参见图12D),

[0419] b-v) 参考抗体(1)和抗体(3)具有不同的保留时间,抗体的Fc区(4)的保留时间与抗体(3)的保留时间不同并且也与参考抗体(1)及其Fc区(2)的保留时间不同,抗体的Fc区(3)的保留时间在抗体(3)和参考抗体(1)的保留时间之间,并且抗体(3)的保留时间短于在Fc区中具有突变N434A的参考抗体(5)的保留时间并且因而选择其体内半寿期i)受到抗体-Fab-FcRn相互作用影响和ii)与参考抗体的体内半寿期不同的抗体(参见图12E)。

[0420] 在一个实施方案中,通过正线性pH梯度在恒定盐浓度时或通过使用线性盐梯度在恒定pH值时洗脱。

[0421] 在一个实施方案中,抗体是亲本抗体的变异抗体并且参考抗体是亲本抗体。在一个实施方案中,变异抗体在抗体-Fab中或/和在抗体-Fc区中具有氨基酸改变。

[0422] g.iii) 用盐梯度洗脱

[0423] 本文中报道了一种方法,所述方法包括以下步骤:

[0424] a) 在第一pH值处用盐梯度洗脱确定抗体和参考抗体在FcRn亲和层析柱上的保留时间,

[0425] b) 在第二pH值处用盐梯度洗脱确定抗体和参考抗体在FcRn亲和层析柱上的保留时间,

[0426] 已经发现除了在恒定盐浓度处用pH梯度洗脱外,在恒定pH值处用盐梯度洗脱也可以用来确定在抗体-Fc-FcRn复合物中是否存在抗体-Fab-FcRn相互作用。

[0427] 如上文已经概述,抗体-Fab-FcRn相互作用是(如果的确存在)在抗体-Fc-FcRn复合物已经形成后建立的次生相互作用。

[0428] 两种相互作用,即抗体-Fc-FcRn和抗体-Fab-FcRn相互作用,是电荷介导的非共价相互作用。

[0429] 如本文中报道的一个方面是一种用于确定存在影响抗体体内半寿期的抗体-Fab-FcRn相互作用的方法,所述方法包括以下步骤:

[0430] a) 在第一pH值处用盐梯度洗脱确定抗体和参考抗体在FcRn亲和层析柱上的保留时间,

[0431] b) 在第二pH值处用盐梯度洗脱确定抗体和参考抗体在FcRn亲和层析柱上的保留时间,

[0432] 因而如果步骤a)中确定的抗体保留时间和参考抗体保留时间的比率实质上与步骤b)中确定的抗体保留时间和参考抗体保留时间的比率不同,确定存在影响抗体体内半寿期的抗体-Fab-FcRn相互作用。

[0433] 在一个实施方案中,第一pH值是5.5。在一个实施方案中,第二pH值是8.8。

[0434] 在一个实施方案中,步骤a)和步骤b)中的盐梯度是相同的。

[0435] 在一个实施方案中,盐梯度是氯化钠梯度。

[0436] 在一个实施方案中,盐梯度是从0mM至250mM盐。

[0437] h) 贝伐单抗和贝伐单抗-突变体

[0438] 选择CDR中无电荷簇的另一个分子以在LC-CDR中产生正电荷簇,以验证上文报告

的结果：在这个位置的正电荷通常影响抗体的FcRn结合亲和力。

[0439] 选择贝伐单抗是因为它在LC-CDR中仅具有少量电荷。使用布雷奴单抗鉴定的三个碱性氨基酸残基是精氨酸残基R27、R55和R94。在贝伐单抗氨基酸序列中，将天冬氨酸D27、亮氨酸L54和苏氨酸T93交换成赖氨酸残基以产生正电荷簇（参见图14）。

[0440] 图9中显示贝伐单抗-野生型和贝伐单抗-突变体的FcRn亲和力色谱图并且下表9中列出相应的保留时间。

[0441] 表9：贝伐单抗-野生型和贝伐单抗-突变体的FcRn柱保留时间。

[0442]	样品	保留时间[分钟]
	优特克单抗	83.6
	布雷奴单抗	91.6
	贝伐单抗-野生型	84.7
	贝伐单抗-突变体	86.9

[0443] 贝伐单抗-野生型具有84.7分钟的保留时间，而贝伐单抗-突变体在86.9分钟后洗脱。因此，贝伐单抗的Fv中的正电荷簇造成2.2分钟的保留时间偏移。结果表明在IgG1Fv中的电荷通常影响FcRn结合亲和力，尤其影响从FcRn解离。

[0444] 附图简述

[0445] 图1电荷分布和pH依赖性净电荷。在pH 7.4质子化和在2k_BT/e绘制的蛋白质等势表面；黑色：正/负。(a) 布雷奴单抗。轻链以浅灰色显示，重链以深灰色显示。中间图像和右图像的视图通过分别围绕垂直轴和水平轴的转动与左小图中的视图相关。(b) 优特克单抗。轻链和重链分别以浅灰色和深灰色显示。各视图与(a)相同。(c) 与人β₂微球蛋白(β_{2m})复合的人FcRn同源性模型的2k_BT/e处绘制的等势表面。为清晰起见，显示Fc结构域。(d) 基于序列的计算净电荷vs. 布雷奴单抗和优特克单抗的pH。以DiscoveryStudio编制蛋白质结构。

[0446] 图2 pH依赖性FcRn-IgG相互作用。为清晰起见，11种IgG变体的FcRn亲和力色谱图经强度归一化(intensity-normalized)。在pH 7.4质子化的结构模型的分子表面图示与2k_BT/e处绘制的等势表面叠加。视图与图1a中的右小图相同并且聚焦于CDR区。第二水平轴显示从离线pH量值内插而来的洗脱pH。

[0447] 图3 FcRn洗脱pH对人FcRn转基因小鼠中药代动力学的影响。抗体作为10mg/kg单次静脉内快速浓注施用至6只动物/组。数据点代表均数±标准偏差。(a) 布雷奴单抗(橙色)、优特克单抗(绿色)、mAb 8(紫)和mAb 9(蓝色)的血液水平曲线。(b) 终末半寿期与FcRn柱洗脱pH之间的相关性。

[0448] 图4 FcRn-IgG模型的分子动力学模拟。

[0449] (a) 模拟开始时的构象。短划线显示在Fv区中和FcRn中两个示例氨基酸之间的距离，所述氨基酸在MD模拟期间接近，如平面(c)中所示。颜色与图1相同。(b) 模拟结束时的构象(t=100纳秒)。箱线表示(c)中所示分子的组成部分。(c) FcRn和Fv结构域之间相互作用的详细视图。注意相互作用的框架残基、CDR残基和FcRn残基在布雷奴单抗和优特克单抗中不同。(d) 模拟期间分别在残基245(FcRn)和残基100(优特克单抗LC)和残基29(布雷奴单抗LC)之间的距离。(e) 模拟结束时的相互作用能(在96、97、98、99和100纳秒时构象的平均数和标准偏差)。“VDW”和“静电”分别指对FcRn-Fab相互作用的范德瓦尔斯贡献和静电贡献。以PyMol™(Schrodinger LLC)编制蛋白质结构。

[0450] 图5布雷奴单抗和优特克单抗轻链和重链的序列比对。VH区和VL区以斜体显示；CDR用星号(*)标记；#号(#)指起始结构中紧邻($<4\text{\AA}$)FcRn的氨基酸。“□”符号标出出于MD目的突变成Cys以与FcRn建立二硫键的残基。

[0451] 图6布雷奴单抗和优特克单抗的FcRn亲和柱保留时间的盐依赖性。布雷奴单抗和优特克单抗经历在渐增量的NaCl存在下采用pH梯度洗脱的FcRn柱层析。数据拟合为平方根函数倒数以解释溶解盐所致的电荷屏蔽效应。布雷奴单抗保留时间随 $\frac{1}{\sqrt{c(\text{NaCl})}}$ 减少($r^2=0.898$)，而优特克单抗的保留时间保持基本上不受影响。

[0452] 图7施加的抗体和使用如本文报道的FcRn柱的色谱的曲线下面积的线性度。

[0453] 图8抗IGF-1R抗体野生型和YTE-突变体在如本文报道的FcRn柱上的色谱图。

[0454] 图9 Avastin-野生型和Avastin-突变体的FcRn亲和力和色谱图。

[0455] 图10 FcRn亲和层析柱上取决于Fc区和抗体-Fab的抗体-FcRn相互作用的保留时间变化的示意图；1:亲本抗体,2:亲本抗体Fc区,3:变异抗体,4:变异抗体Fc区；实线:完整抗体(抗体-Fab+Fc-区域)，点线:仅Fc区；

[0456] A:野生型样Fc区,无抗体-Fab-FcRn相互作用；

[0457] B:野生型样Fc区,抗体-Fab-FcRn相互作用；

[0458] C:FcRn结合作用改善的工程化Fc区,无抗体-Fab-FcRn相互作用；

[0459] D:FcRn结合作用,抗体-Fab-FcRn相互作用改善的工程化Fc区；

[0460] 图11显示工程化抗体的方案,所述工程化抗体具有改善的FcRn结合作用、抗体-Fab-FcRn相互作用,但是体内半寿期减少,原因在于抗体-FcRn相互作用导致清除率改善(保留时间高于临界保留时间)。

[0461] 图12 FcRn亲和层析柱上取决于Fc区和抗体-Fab的抗体-FcRn相互作用的保留时间变化的示意图；1:参考抗体,2:参考抗体Fc区,3:抗体,4:抗体Fc区；实线:完整抗体(抗体-Fab+Fc-区域)，点线:仅Fc区。

[0462] 图13 FcRn亲和层析保留时间对盐浓度和抗体-Fab-FcRn相互作用的依赖性。

[0463] 图14贝伐单抗和贝伐单抗变体轻链可变结构域的序列比对。相同和相似的氨基酸以灰色显示；CDR用星号(*)标记。

[0464] 图15布雷奴单抗、优特克单抗和mAb 1-6的IL-12相互作用；1:布雷奴单抗,2:优特克单抗,3:mAb 1,4:mAb 2,5:mAb 3,6:mAb 4,7:mAb 5,8:mAb 6。

[0465] 图16雷奴单抗,优特克单抗和mAb 7-10的IL-12相互作用；1:布雷奴单抗,2:优特克单抗,3:mAb 7,4:mAb 8,5:mAb 9,6:mAb 10。

[0466] 具体实施方案

[0467] 1.一种用于选择抗体的方法,包括以下步骤

[0468] i)在第一盐浓度存在下确定抗体和参考抗体在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的第一保留时间,并且在第二盐浓度存在下确定抗体和参考抗体在采用线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的第二保留时间,或

[0469] ii)在第一pH值确定抗体和参考抗体在采用线性盐梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的第一保留时间,并且在第二pH值确定抗体和参考抗体在采用正线性盐梯度洗脱的FcRn亲

和层析柱上的第二保留时间,或

[0470] iii) 使用表面等离子体共振法确定抗体和参考抗体在pH 6的 K_D 值,并且在高盐浓度存在下确定抗体和参考抗体在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,或

[0471] iv) 使用表面等离子体共振法确定抗体和参考抗体在pH 6的 K_D 值,并且确定抗体和参考抗体在采用线性盐梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,或

[0472] v) 确定抗体及其Fc区在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,或

[0473] vi) 在高pH值确定抗体及其Fc区在采用线性盐梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,或

[0474] vii) 使用表面等离子体共振法确定抗体及其Fc区在pH 6的 K_D 值,并且在高盐浓度存在下确定抗体及其Fc区在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,或

[0475] viii) 使用表面等离子体共振法确定抗体及其Fc区在pH 6的 K_D 值,并且在高pH值确定抗体及其Fc区在采用线性盐梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,

[0476] 和通过选择

[0477] a) 抗体,所述抗体具有与第二保留时间基本上相同的第一保留时间,或

[0478] b) 抗体,所述抗体具有与参考抗体的 K_D 值不同最多10倍的 K_D 值并且具有与参考抗体的保留时间基本上相同的保留时间,或

[0479] a) 抗体,所述抗体具有与其Fc区的保留时间基本上相同的保留时间,或

[0480] d) 抗体,所述抗体具有与其Fc区的 K_D 值不同最多10倍的 K_D 值并且具有与其Fc区的保留时间基本上相同的保留时间。

[0481] 2.一种用于选择抗体的方法,包括以下步骤

[0482] -在第一盐浓度存在下确定抗体和参考抗体在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的第一保留时间,并且在第二盐浓度存在下确定抗体和参考抗体在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的第二保留时间,和

[0483] -选择

[0484] a) 抗体,所述抗体具有与第二保留时间基本上相同的第一保留时间,或

[0485] b) 抗体,所述抗体具有与参考抗体的 K_D 值不同最多10倍的 K_D 值并且具有与参考抗体的保留时间基本上相同的保留时间,或

[0486] c) 抗体,所述抗体具有与其Fc区的保留时间基本上相同的保留时间,或

[0487] d) 抗体,所述抗体具有与其Fc区的 K_D 值不同最多10倍的 K_D 值并且具有与Fc区的保留时间基本上相同的保留时间。

[0488] 3.一种用于选择抗体的方法,包括以下步骤

[0489] -在第一pH值确定抗体和参考抗体在采用线性盐梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的第一保留时间,并且在第二pH值确定抗体和参考抗体在采用线性盐梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的第二保留时间,和

[0490] -选择

[0491] a) 抗体,所述抗体具有与第二保留时间基本上相同的第一保留时间,或

[0492] b) 抗体,所述抗体具有与参考抗体的 K_D 值不同最多10倍的 K_D 值并且具有与参考抗

体的保留时间基本上相同的保留时间,或

[0493] c) 抗体,所述抗体具有与其Fc区的保留时间基本上相同的保留时间,或

[0494] d) 抗体,所述抗体具有与其Fc区的 K_D 值不同最多10倍的 K_D 值并且具有与Fc区的保留时间基本上相同的保留时间。

[0495] 4. 一种用于选择抗体的方法,包括以下步骤

[0496] -使用表面等离子体共振法确定抗体和参考抗体在pH 6的 K_D 值,并且在高盐浓度存在下确定抗体和参考抗体在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,和

[0497] -选择

[0498] a) 抗体,所述抗体具有与第二保留时间基本上相同的第一保留时间,或

[0499] b) 抗体,所述抗体具有与参考抗体的 K_D 值不同最多10倍的 K_D 值并且具有与参考抗体的保留时间基本上相同的保留时间,或

[0500] c) 抗体,所述抗体具有与其Fc区的保留时间基本上相同的保留时间,或

[0501] d) 抗体,所述抗体具有与其Fc区的 K_D 值不同最多10倍的 K_D 值并且具有与Fc区的保留时间基本上相同的保留时间。

[0502] 5. 一种用于选择抗体的方法,包括以下步骤

[0503] -确定抗体和参考抗体在pH 6的 K_D 值使用表面等离子体共振,和确定抗体和参考抗体在采用线性盐梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,并且

[0504] -选择

[0505] a) 抗体,所述抗体具有与第二保留时间基本上相同的第一保留时间,或

[0506] b) 抗体,所述抗体具有与参考抗体的 K_D 值不同最多10倍的 K_D 值并且具有与参考抗体的保留时间基本上相同的保留时间,或

[0507] c) 抗体,所述抗体具有与其Fc区的保留时间基本上相同的保留时间,或

[0508] d) 抗体,所述抗体具有与其Fc区的 K_D 值不同最多10倍的 K_D 值并且具有与Fc区的保留时间基本上相同的保留时间。

[0509] 6. 一种用于选择抗体的方法,包括以下步骤

[0510] -确定抗体及其Fc区在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,和

[0511] -选择

[0512] a) 抗体,所述抗体具有与第二保留时间基本上相同的第一保留时间,或

[0513] b) 抗体,所述抗体具有与参考抗体的 K_D 值不同最多10倍的 K_D 值并且具有与参考抗体的保留时间基本上相同的保留时间,或

[0514] c) 抗体,所述抗体具有与其Fc区的保留时间基本上相同的保留时间,或

[0515] d) 抗体,所述抗体具有与其Fc区的 K_D 值不同最多10倍的 K_D 值并且具有与Fc区的保留时间基本上相同的保留时间。

[0516] 7. 一种用于选择抗体的方法,包括以下步骤

[0517] -确定抗体及其Fc区在高pH值采用线性盐梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,并且

[0518] -选择

[0519] a) 抗体,所述抗体具有与第二保留时间基本上相同的第一保留时间,或

[0520] b) 抗体,所述抗体具有与参考抗体的 K_D 值不同最多10倍的 K_D 值并且具有与参考抗体的保留时间基本上相同的保留时间,或

[0521] c) 抗体,所述抗体具有与其Fc区的保留时间基本上相同的保留时间,或

[0522] d) 抗体,所述抗体具有与其Fc区的 K_D 值不同最多10倍的 K_D 值并且具有与Fc区的保留时间基本上相同的保留时间。

[0523] 8.一种用于选择抗体的方法,包括以下步骤

[0524] -使用表面等离子体共振法确定抗体及其Fc区在pH 6的 K_D 值,并且在高盐浓度存在下确定抗体及其Fc区在采用正线性pH梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,和

[0525] -选择

[0526] a) 抗体,所述抗体具有与第二保留时间基本上相同的第一保留时间,或

[0527] b) 抗体,所述抗体具有与参考抗体的 K_D 值不同最多10倍的 K_D 值并且具有与参考抗体的保留时间基本上相同的保留时间,或

[0528] c) 抗体,所述抗体具有与其Fc区的保留时间基本上相同的保留时间,或

[0529] d) 抗体,所述抗体具有与其Fc区的 K_D 值不同最多10倍的 K_D 值并且具有与Fc区的保留时间基本上相同的保留时间。

[0530] 9.一种用于选择抗体的方法,包括以下步骤

[0531] 使用表面等离子体共振法确定抗体及其Fc区在pH 6的 K_D 值,并且在高pH值确定抗体及其Fc区在采用线性盐梯度洗脱的FcRn亲和层析柱上的保留时间,并且

[0532] -选择

[0533] a) 抗体,所述抗体具有与第二保留时间基本上相同的第一保留时间,或

[0534] b) 抗体,所述抗体具有与参考抗体的 K_D 值不同最多10倍的 K_D 值并且具有与参考抗体的保留时间基本上相同的保留时间,或

[0535] c) 抗体,所述抗体具有与其Fc区的保留时间基本上相同的保留时间,或

[0536] d) 抗体,所述抗体具有与其Fc区的 K_D 值不同最多10倍的 K_D 值并且具有与Fc区的保留时间基本上相同的保留时间。

[0537] 10.根据实施方案1至10中任一个实施方案的方法,其中方法用于选择这样的抗体,所述抗体不含影响抗体体内半寿期的抗体-Fab-FcRn相互作用。

[0538] 11.根据实施方案1、6、7、8和9中任一个实施方案的方法,其中

[0539] -方法用于选择这样的抗体,所述抗体具有与IgG1、IgG3或IgG4亚类的抗体相比增加的相对体内半寿期,并且

[0540] -进一步确定参考抗体或参考Fc区的保留时间,并且

[0541] -通过选择

[0542] a) 抗体,所述抗体具有比参考抗体的第一保留时间长的第一保留时间和与第二保留时间基本上相同的第一保留时间,或

[0543] b) 抗体,所述抗体具有与参考抗体的 K_D 值不同最多10倍的 K_D 值并且具有比参考抗体的保留时间长的保留时间,或

[0544] c) 抗体,所述抗体具有与其Fc区的保留时间基本上相同并且比参考抗体的保留时间更长的保留时间,或

[0545] d) 抗体,所述抗体具有与其Fc区的 K_D 值不同最多10倍的 K_D 值并且具有与其Fc区的

保留时间基本上相同并且比参考抗体的保留时间更长的保留时间。

[0546] 12. 根据实施方案1、6、7、8和9中任一实施方案的方法, 其中

[0547] -方法用于确定抗体体内半寿期相对于参考抗体相对而增加或减少, 和

[0548] -进一步确定参考抗体或参考Fc区的保留时间, 并且

[0549] -进一步确定含突变N434A的IgG Fc区的保留时间, 并且

[0550] -通过选择

[0551] a) 抗体, 所述抗体具有比参考抗体的第一保留时间更长的第一保留时间、具有基本上相同的第一保留时间和第二保留时间及具有比含突变N434A的Fc区保留时间短的第一保留时间, 并且因而选出体内半寿期相对增加的抗体, 或

[0552] b) 抗体, 所述抗体具有与参考抗体的 K_D 值不同最多10倍的 K_D 值、具有比参考抗体的保留时间长的保留时间及具有比含突变N434A的Fc区保留时间短的第一保留时间, 并且因而选出体内半寿期相对增加的抗体, 或

[0553] c) 抗体, 所述抗体具有比参考抗体的第一保留时间短的第一保留时间和具有基本上相同的第一保留时间和第二保留时间, 并且因而选出体内半寿期相对减少的抗体, 或

[0554] d) 抗体, 所述抗体具有与参考抗体的 K_D 值不同最多10倍的 K_D 值并且具有比参考抗体的保留时间短的保留时间, 并且因而选出体内半寿期相对增加的抗体。

[0555] 13. 根据实施方案1、2、4、6、8和10至12中任一实施方案的方法, 其中正线性pH梯度从约pH 5.5至约pH 8.8。

[0556] 14. 根据实施方案1至13中任一实施方案的方法, 其中盐选自氯化钠、硫酸钠、氯化钾、硫酸钾、柠檬酸钠、或柠檬酸钾。

[0557] 15. 根据实施方案1至14中任一实施方案的方法, 其中盐是氯化钠。

[0558] 16. 根据实施方案1、2和10至15中任一实施方案的方法, 其中第一盐浓度在50mM和200mM之间。

[0559] 17. 根据实施方案1、2和10至16中任一实施方案的方法, 其中第一盐浓度是约140mM。

[0560] 18. 根据实施方案1、2和10至17中任一实施方案的方法, 其中第二盐浓度在300mM和600mM之间。

[0561] 19. 根据实施方案1、2和10至18中任一实施方案的方法, 其中第二盐浓度是约400mM。

[0562] 20. 根据实施方案1、3、5、7和9至19中任一实施方案的方法, 其中线性盐梯度盐梯度是从0mM盐至500mM盐。

[0563] 21. 根据实施方案1、3、5、7和9至20中任一实施方案的方法, 其中线性盐梯度是从0mM盐至250mM盐。

[0564] 22. 根据实施方案1、3和10至21中任一实施方案的方法, 其中第一pH值是约5.5。

[0565] 23. 根据实施方案1、3和10至22中任一实施方案的方法, 其中第二pH值是约7.4。

[0566] 24. 根据实施方案1、4、8和10至23中任一实施方案的方法, 其中高盐浓度在250mM和600mM之间。

[0567] 25. 根据实施方案1、4、8和10至24中任一实施方案的方法, 其中高盐浓度是约400mM。

[0568] 26. 根据实施方案1、7和9至25中任一实施方案的方法,其中高pH值在pH 6.5和pH 8.8之间。

[0569] 27. 根据实施方案1、7和9至26中任一实施方案的方法,其中高pH值是约pH 7.4。

[0570] 28. 根据实施方案1至27中任一实施方案的方法,其中实质上不同的保留时间相差至少5%。

[0571] 29. 根据实施方案1至28中任一实施方案的方法,其中实质上不同的保留时间相差至少10%。

[0572] 30. 根据实施方案1至29中任一实施方案的方法,其中实质上不同保留时间相差至少15%。

[0573] 31. 根据实施方案1至30中任一实施方案的方法,其中基本上相同的保留时间相差小于5%。

[0574] 32. 根据实施方案1至31中任一实施方案的方法,其中基本上相同的保留时间相差3.5%或更小。

[0575] 33. 根据实施方案1至32中任一实施方案的方法,其中基本上相同的保留时间相差2.5%或更小。

[0576] 34. 根据实施方案1至33中任一实施方案的方法,其中如果保留时间实质上不同,则保留时间与盐浓度的平方根分之一(约 $1/\text{SQRT}(c(\text{盐}))$)成正比。

[0577] 35. 根据实施方案1至34中任一实施方案的方法,其中参考抗体是具有IgG1亚类的SEQ ID NO:01(重链)和SEQ ID NO:02(轻链)的抗IL-1R抗体和具有IgG4亚类的SEQ ID NO:03(重链)和SEQ ID NO:04(轻链)的抗IL-1R抗体,或参考抗体是具有IgG1亚类的SEQ ID NO:36(重链)和SEQ ID NO:37(轻链)的抗HER2抗体和具有IgG4亚类的SEQ ID NO:38(重链)和SEQ ID NO:39(轻链)的抗HER2抗体。

[0578] 36. 根据实施方案1至35中任一实施方案的方法,其中FcRn亲和层析柱包含新生Fc受体(FcRn)和 β -2-微球蛋白(b2m)的非共价复合物。

[0579] 37. 根据实施方案1至36中任一实施方案的方法,其中FcRn亲和层析柱包含新生Fc受体(FcRn)和 β -2-微球蛋白(b2m)的共价复合物。

[0580] 38. 根据实施方案36至37中任一实施方案的方法,其中新生Fc受体(FcRn)和 β -2-微球蛋白(b2m)的复合物与固相结合。

[0581] 39. 根据实施方案38的方法,其中固相是色谱材料。

[0582] 40. 根据实施方案36至39中任一实施方案的方法,其中新生Fc受体(FcRn)和 β -2-微球蛋白(b2m)的复合物是生物素酰化并且固相用链霉亲和素衍生化。

[0583] 41. 根据实施方案36至40中任一实施方案的方法,其中 β -2-微球蛋白来自与新生Fc受体(FcRn)相同的物种。

[0584] 42. 根据实施方案36至40中任一实施方案的方法,其中 β -2-微球蛋白来自与FcRn不同的物种。

[0585] 43. 根据实施方案1至42中任一实施方案的方法,其中FcRn选自人FcRn、食蟹猴FcRn、小鼠FcRn、大鼠FcRn、绵羊FcRn、犬FcRn、猪FcRn、迷你猪FcRn和兔FcRn。

[0586] 44. 根据实施方案1至43中任一实施方案的方法,其中抗体是融合多肽的单特异性抗体或抗体片段、或融合多肽的双特异性抗体或抗体片段、或融合多肽的三特异性抗体

或抗体片段、或融合多肽的四特异性抗体或抗体片段。

[0587] 45. 根据实施方案1至44中任一个实施方案的方法, 其中抗体是全长抗体。

[0588] 46. 根据实施方案1至45中任一个实施方案的抗体, 其中抗体是单克隆抗体。

[0589] 47. 用于产生抗体的方法, 所述方法包括以下步骤:

[0590] a) 提供包含一种或多种核酸的细胞, 所述核酸编码用根据实施方案1至46中任一个实施方案的方法选择的抗体,

[0591] b) 在培养基中培养细胞, 并且

[0592] c) 从细胞或培养基回收抗体, 并且因而产生该抗体。

[0593] 参考文献清单

[0594] 1. Edelman, G.M., Scand. J. Immunol. 34 (1991) 1-22。

[0595] 2. Reff, M.E. 和 Heard, C., Crit. Rev. Oncol. Hematol. 40 (2001) 25-35。

[0596] 3. Waldmann, T.A. 和 Strober, W., Prog. Allergy 13 (1969) 1-110。

[0597] 4. Ghetie, V. 和 Ward, E.S., Annu. Rev. Immunol. 18 (2000) 739-766。

[0598] 5. Chaudhury, C. 等人, J. Exp. Med. 197 (2003) 315-322。

[0599] 6. Brambell, F.W. 等人, Nature 203 (1964) 1352-1354。

[0600] 7. Brambell, F.W., Proc. Nutr. Soc. 28 (1969) 35-41。

[0601] 8. Simister, N.E. 和 Mostov, K.E., Nature 337 (1989) 184-187。

[0602] 9. Ropeenian, D.C. 等人, J. Immunol. 170 (2003) 3528-3533。

[0603] 10. Kuo, T.T. 等人, J. Clin. Immunol. 30 (2010) 777-789。

[0604] 11. Ropeenian, D.C. 和 Akilesh, S., Nat. Rev. Immunol. 7 (2007) 715-725。

[0605] 12. Martin, W.L. 等人, Mol. Cell 7 (2001) 867-877。

[0606] 13. Goebel, N.A. 等人, Mol. Biol. Cell 19 (2008) 5490-5505。

[0607] 14. Kim, J.K. 等人, Eur. J. Immunol. 24 (1994) 542-548。

[0608] 15. Sanchez, L.M. 等人, Biochemistry 38 (1999) 9471-9476。

[0609] 16. Huber, A.H. 等人, J. Mol. Biol. 230 (1993) 1077-1083。

[0610] 17. Ober, R.J. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (2004) 11076-11081。

[0611] 18. Ober, R.J. 等人, J. Immunol. 172 (2004) 2021-2029。

[0612] 19. Akilesh, S. 等人, J. Immunol. 179 (2007) 4580-4588。

[0613] 20. Montoyo, H.P. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106 (2009) 2788-2793。

[0614] 21. Rodewald, R., J. Cell Biol. 71 (1976) 666-669。

[0615] 22. Vaccaro, C. 等人, Nat. Biotechnol. 23 (2005) 1283-1288。

[0616] 23. Suzuki, T. 等人, J. Immunol. 184 (2010) 1968-1976。

[0617] 24. Wang, W. 等人, Drug Metab Dispos. 39 (2011) 1469-1477。

[0618] 25. Schlothauer, T. 等人, MAbs. 5 (2013) 576-586。

[0619] 26. Gandhi, M. 等人, Semin. Cutan. Med. Surg. 29 (2010) 48-52。

[0620] 27. Luo, J. 等人, J. Mol. Biol. 402 (2010) 797-812。

[0621] 28. Traczewski, P. 和 Rudnicka, L., BioDrugs. 26 (2012) 9-20。

[0622] 29. Zhu, Y. 等人, J. Clin. Pharmacol. 49 (2009) 162-175。

[0623] 30. Lima, X.T. 等人 Expert. Opin. Biol. Ther. 9 (2009) 1107-1113。

- [0624] 31.Weger,W.,Br.J.Pharmacol.160(2010)810-820。
- [0625] 32.Israelachvili,J.N.,Intermolecular和Surface Forces,Academic Press Inc.(1985)。
- [0626] 33.Petkova,S.B.等人,Int.Immunol.18(2006)1759-1769。
- [0627] 34.Dall'Acqua,W.F.等人,J.Biol.Chem.281(2006)23514-23524。
- [0628] 35.Khawli,L.A.等人,Cancer Biother.Radiopharm.17(2002)359-370。
- [0629] 36.Putnam,W.S.等人,Trends Biotechnol.28(2010)509-516。
- [0630] 37.Igawa,T.等人,Protein Eng.Des.Sel.23(2010)385-392。
- [0631] 38.Boswell,C.A.等人,Bioconjug.Chem.21(2010)2153-2163。
- [0632] 39.Ropeenian,D.C.等人,Methods Mol.Biol.602(2010)93-104。
- [0633] 40.Prabhat,P.等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 104(2007)5889-5894。
- [0634] 41.Faber,C.等人,Immunotechnology.3(1998)253-270。
- [0635] 42.Li,L.等人,BMC.Biophys.5(2012)9。
- [0636] 43.Shields,R.L.等人,J.Biol.Chem.276(2001)6591-6604。
- [0637] 44.Hess,B.等人,J.Chem.Theory Comput.4(2008)435-447。
- [0638] 45.Kortkhonjia,E.等人,MAbs.5(2013)306-322。
- [0639] 46.Jorgensen,W.L.等人,J.Am.Chem.Soc.118(1996)11225-11236。
- [0640] 47.Zelevsky,J.等人,Nat.Biotechnol.28(2010)157-159。
- [0641] 48.Li,B.等人(mAbs 6(2014)1255-1264)。
- [0642] 49.Sampe,Z.等人(PLoS One 8(2013)e57479)。
- [0643] 50.Benson,J.M.等人,mAbs 3(2011)535-545。
- [0644] 51.Ding,C.等人,Curr.Opin.Investig.Drugs 9(2008)515-522。
- [0645] 52.Weber,J.,和Keam,S.J.,BioDrugs.23(2009)53-61。
- [0646] 提供以下实施例、附图和序列以辅助理解本发明,本发明的真实范围在所附权利要求书中阐述。可以理解,可以对所述方法作修改而不脱离本发明的精神。
- [0647] 材料和方法
- [0648] 抗体
- [0649] 实验中使用的抗体是优特克单抗(CNT01275,StelaraTM)、CAS登录号815610-63-0,可变结构域在SEQ ID NO:42和43中),布雷奴单抗(ABT874,J695,OzespTM,可变结构域在SEQ ID NO:40和41中)以及优特克单抗和布雷奴单抗的10种变体和突变体,此后分别称作mAb 1至mAb 10。总计研究了12种IgG(参见表2)。
- [0650] 在Geneart(Life technologies GmbH,Carlsbad,CA,美国)产生优特克单抗、布雷奴单抗、mAb 5和mAb 6的合成基因。位点定向诱变用来交换特定氨基酸以产生mAb 1、mAb 2、mAb 7、mAb 8和mAb 9。MAb 3用编码优特克单抗重链和布雷奴单抗轻链的质粒转染产生并且mAb 4用编码优特克单抗轻链和布雷奴单抗重链的质粒转染产生。
- [0651] 本文所用的单克隆抗体在HEK293细胞中瞬时表达(参见下文)和使用标准程序通过蛋白A层析进行纯化(参见下文)。
- [0652] 生物化学表征包括大小排阻层析(Waters BioSuiteTM250 7.8x 300mm,洗脱:200mM KH₂PO₄,250mM KCl,pH 7.0)和使用BioAnalyzer 2100(Agilent technologies,

Santa Clara, CA, 美国) 分析分子量分布。

[0653] 通过使用FabRICATOR-试剂盒 (GENOVIS, Lund, 瑞典) 在37℃在30分钟内IdeS消化抗体获得Fc片段。

[0654] 表达质粒

[0655] 为了表达上述的抗体, 使用了基于采用或不采用CMV-内含子A启动子的cDNA结构 (organization) 或基于采用CMV启动子的基因组结构的表达质粒变体以瞬时表达 (例如在HEK293-F细胞中)。

[0656] 除了抗体表达盒之外, 质粒还含有:

[0657] -允许该质粒在大肠杆菌中复制的复制起点,

[0658] -在大肠杆菌中赋予氨苄青霉素抗性的 β -内酰胺酶基因, 和

[0659] -作为真核细胞中选择标记的来自小家鼠 (*Mus musculus*) 的二氢叶酸还原酶基因。

[0660] 抗体基因的转录单位由以下元件组成:

[0661] -在5'末端的单一限制性位点

[0662] -来自人巨细胞病毒的立即早期增强子和启动子,

[0663] -在cDNA组织化的情况下后续内含子A序列,

[0664] -人抗体基因的5'非翻译区,

[0665] -免疫球蛋白重链信号序列,

[0666] -作为cDNA或作为具有免疫球蛋白外显子-内含子组织化结构的基因组结构的人抗体链

[0667] -具有多聚腺苷化信号序列的3'非翻译区, 和

[0668] -在3'末端的单一限制性位点

[0669] 包含抗体链的融合基因通过PCR和/或基因合成法生成并通过连接相应的核酸区段, 例如利用相应质粒中的单一限制性位点连接, 通过已知的重组方法和技术装配。通过DNA测序验证亚克隆核酸序列。为了瞬时转染, 从转化的大肠杆菌培养物 (Nucleobond AX, Macherey-Nagel) 制备质粒, 制得大量的质粒。

[0670] 细胞培养物技术

[0671] 使用如Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. 和 Yamada, K.M. (编著), John Wiley & Sons, Inc. 中所述的标准细胞培养物技术。

[0672] HEK293-F系统中的瞬时转染

[0673] 使用HEK293-F系统 (Invitrogen), 根据制造商的说明书, 通过用相应质粒 (例如编码重链以及相应轻链的质粒) 瞬时转染, 产生抗体。简而言之, 将摇瓶或搅拌式发酵器中无血清FreeStyle™293表达培养基 (Invitrogen) 内以悬浮方式生长的HEK293-F细胞 (Invitrogen) 用相应表达质粒和293fectin™或fectin (Invitrogen) 的混合物转染。对于2L摇瓶 (Corning), 将HEK293-F细胞以密度 1×10^6 个细胞/mL接种在600mL中并且以120转/分钟, 8%CO₂孵育。该日之后, 将约 1.5×10^6 个细胞/mL细胞密度的细胞用大约42mL以下混合物转染: A) 20mL Opti-MEM (Invitrogen) 与600 μ g以等摩尔比率分别编码重链及相应轻链的总质粒DNA (1 μ g/mL) 的混合物以及B) 20mL Opti-MEM+1.2mL 293fectin或fectin (2 μ L/mL) 的

混合物。在发酵过程期间根据葡萄糖消耗量,添加葡萄糖溶液。5-10天后收获含有分泌型抗体的上清液并且将抗体直接从上清液纯化或将上清液冷冻并存储。

[0674] 纯化

[0675] 通过使用MabSelectSure-Sepharose™ (GE Healthcare,瑞典)的亲和色谱、使用丁基-琼脂糖凝胶 (GE Healthcare,瑞典)的疏水相互作用色谱和Superdex 200大小排阻 (GE Healthcare,瑞典)色谱,从细胞培养上清液纯化抗体。

[0676] 简而言之,在用PBS缓冲液 (10mM Na₂HPO₄, 1mM KH₂PO₄, 137mM NaCl和2.7mM KCl, pH 7.4)平衡的MabSelectSuRe树脂上捕获无菌过滤的细胞培养上清液,用平衡缓冲液洗涤并且用25mM pH 3.0柠檬酸钠洗脱。将洗脱的抗体级分汇集并用2M Tris, pH 9.0中和。通过添加1.6M硫酸铵溶液至终浓度0.8M硫酸铵并使用乙酸调节pH至pH 5.0,将抗体汇集物准备好用于疏水相互作用色谱。用35mM乙酸钠, 0.8M硫酸铵, pH 5.0平衡丁基-琼脂糖凝胶树脂后,将抗体施加至树脂,用平衡缓冲液洗涤并且用线性梯度洗脱至35mM乙酸钠pH 5.0。将含有抗体的级分汇集并且使用以20mM组氨酸, 140mM NaCl, pH 6.0平衡的Superdex 20026/60GL (GE Healthcare,瑞典)柱,进一步通过大小排阻色谱纯化。将含有抗体的级分汇集,使用Vivaspin超滤装置 (Sartorius Stedim Biotech S.A.,法国)浓缩至要求的浓度并贮存在-80℃。

[0677] 表10:抗体产率

[0678]

样品	纯化的成品数量[mg]	纯化的成品浓度[mg/mL]
布雷奴单抗	23.50	2.36
优特克单抗	12.55	2.67
mAb 1	6.96	2.32
mAb 2	1.89	1.66
mAb 3	4.26	2.14
mAb 4	3.50	2.1
mAb 5	13.64	3.03
mAb 6	2.04	0.4
mAb 7	11.60	2.9
mAb 8	23.25	3.1
mAb 9	16.80	3.15
mAb 10	33.00	4.08

[0679] 每种纯化步骤后使用微流体Labchip技术 (Caliper Life Science,美国)通过CE-SDS分析纯度和抗体完整性。根据制造商的说明书,使用HT蛋白质表达试剂盒,制备5μl用于CE-SDS分析的蛋白质溶液,并使用HT蛋白质表达芯片,在LabChip GXII系统上分析。使用LabChip GX软件分析数据。

[0680] 表11:全部mAb的生物化学表征概述。浓度作为3次测量的平均数给定。通过SEC层析图的积分确定单体含量。通过完整mAb和在DTT还原后的CE-SDS确定抗体种类的纯度。相对于低疏水性和高疏水性RS展示疏水性。

样品	浓度 [mg/mL]	SEC [%]	CE-SDS [%]			疏水性 [%]
		单体含量	完整 mAb	HC	LC	
布雷奴单抗	2.36	99.9	92	67	33	7
优特克单抗	2.67	99.0	84	64	32	-1
mAb 1	2.32	99.4	74	66	31	-6
mAb 2	1.66	98.1	91	64	32	8
mAb 3	2.14	99.3	80	66	28	8
mAb 4	2.10	99.8	82	64	32	-4
mAb 5	3.03	99.5	90	70	30	13
mAb 6	0.40	97.1	95	66	32	12
mAb 7	2.90	97.2	85	65	33	13
mAb 8	3.10	98.9	85	64	34	24
mAb 9	3.15	99.1	80	70	29	16
mAb 10	4.08	98.6	88	70	28	34

[0682] 功能性表征

[0683] 功能性表征包括分析与靶(人IL-12)的相互作用以检验布雷奴单抗和优特克单抗是否正确地产生并且靶结合作用是否仍然有功能。mAb变体在Fab区中被修饰并且对所述变体测试这些修饰是否改变靶结合作用。另外,分析小鼠PK研究中使用的抗体与小鼠IL-12/-23相互作用以排除小鼠研究中靶介导的清除效应。此外,测量与小鼠Fc γ 受体I(muFc γ RI)的结合水平,因为与小鼠Fc γ RI的更强结合可能导致PK研究中下降更快,原因在于更快摄入抗原呈递细胞中。

[0684] -与人IL-12相互作用

[0685] 布雷奴单抗、优特克单抗和在Fab区中具有可能影响IL-12结合的结构性差异的变体,因此详细展示全部mAb的结果。

[0686] -ELISA

[0687] 图15和图16中分别显示具有交叉交换的变体(mAb 1-6)和具有调整的电荷分布的变体(mAb 7-10)的吸光度-浓度曲线。使用布雷奴单抗校准曲线的拟合结果计算每种mAb的浓度,以获得相对于布雷奴单抗的IL-12结合作用(布雷奴单抗=100%)。评定 $\leq 30\%$ 的结合差异显示与布雷奴单抗相似的IL-12结合作用, $\geq 30\%$ 的结合差异显示减弱的IL-12结合作用。布雷奴单抗、优特克单抗和具有交换的Fv结构域的mAb(mAb 1和mAb 2)显示相似的IL-12结合特征。布雷奴单抗,优特克单抗和mAb 2的结合范围在20%窗口中,mAb 3在30%窗口中。具有交换的LC的MAb(mAb 3和mAb 4)和具有交换的CDR的mAb(mAb 5和mAb 6)不与IL-12结合。

[0688] 具有调整的电荷分布的布雷奴单抗变体(mAb 7-9)在相对于布雷奴单抗的30%范围内结合IL-12,显示相似的IL-12结合作用。仅mAb 10显示IL-12结合作用减少,与布雷奴单抗相比为63%结合。

[0689] -表面等离子体共振法

[0690] SPR用来证实靶特异性ELISA的结果。优特克单抗和布雷奴单抗具有几乎相同的结合速率常数(k_a) (k_a (布雷奴单抗) 8×10^5 1/Ms vs. k_a (优特克单抗) 9×10^5 1/Ms)。IL-12和

mAb的解离非常缓慢,因此解离速率常数(k_d)的计算值和随后平衡解离常数(K_D)的计算值可以与实际值不同。尽管该方法在这种背景下有局限性,但是计算值可以产生总体评价并且可以用来证实ELISA结果。布雷奴单抗和优特克单抗以高亲和力结合IL-12并且 K_D 在低nM范围中(K_D (布雷奴单抗)=0.2nM vs. K_D (优特克单抗)=0.07nM)。具有分别为 8×10^5 1/Ms、 6×10^{-5} 1/s和70pM的 k_a , k_d 和 K_D 值的布雷奴单抗的经测量的亲和力与文献数据相符(k_a 5×10^5 1/Ms, k_d 5.1×10^{-5} 1/s, K_D =100pM) ([51])。文献中还描述了优特克单抗对IL-12高的亲和力([52])。

[0691] 表12:靶相互作用的计算动力学参数的总结。具有交换的Fv结构域的单克隆抗体(mAb 1和mAb 2)和具有调整的电荷分布的mAb (mAb 7-10)具有与布雷奴单抗和优特克单抗相似的针对IL-12的亲和力。MAb 3和mAb 5不与IL-12结合并且mAb 4和mAb 6显示与IL-12结合非常弱。该数据与ELISA结果相符。

[0692] 表12:mAb和IL-12的SPR参数。使用稳态亲和力计算 K_D 、 k_a 和 k_d 。

[0693]

样品	k_a [1/Ms]	k_d [1/s]	K_D [nM]
优特克单抗	9×10^5	1.8×10^{-4}	0.20
布雷奴单抗	8×10^5	6×10^{-5}	0.07
mAb 1	1.7×10^6	4.1×10^{-4}	0.24
mAb 2	1.2×10^6	3×10^{-4}	0.25
mAb 3	不结合	不结合	不结合
mAb 4	1.2×10^7	2.3	191
mAb 5	不结合	不结合	不结合
mAb 6	2×10^6	1.9×10^{-2}	9.62
mAb 7	1×10^6	7.9×10^{-5}	0.08
mAb 8	1.2×10^6	9.1×10^{-5}	0.07
mAb 9	8.8×10^6	1.3×10^{-4}	0.01
mAb 10	1.4×10^7	1.3×10^{-4}	0.01

[0694] 在pH 6.0的FcRn-mAb亲和力

[0695] 相对于优特克单抗(优特克单抗=1.0)计算 K_D 。为了评价 K_D 值,如果相对于优特克单抗-FcRn K_D ,差异小于一个十次幂(decimal power),则评定mAb和FcRn的亲和力与优特克单抗-FcRn亲和力相似。如果相对于优特克单抗-FcRn K_D , K_D 差异大于一个十次幂(decimal power),则评定 K_D 是不同的。对于全部mAb,在pH 6.0的FcRn亲和力落入一个狭窄范围。布雷奴单抗具有0.2的相对 K_D 并且各变体的 K_D 在布雷奴单抗和优特克单抗之间,例外是具有相对 K_D 为1.1的mAb 10。

[0696] 表13:全部mAb对FcRn的相对 K_D 。将相对 K_D 值(优特克单抗=1)展示为均数($n=3$) ± 标准偏差。

[0697]

样品	rel.K _D	
优特克单抗	1	
布雷奴单抗	0.2	± 0.07
mAb 1	1.0	± 0.22
mAb 2	0.3	± 0.19

[0698]

样品	rel.K _D	
mAb 3	0.2	± 0.06
mAb 4	0.5	± 0.08
mAb 5	0.9	± 0.16
mAb 6	0.4	± 0.17
mAb 7	0.2	± 0.03
mAb 8	0.4	± 0.07
mAb 9	0.4	± 0.04
mAb 10	1.1	± 0.09

[0699] FcRn-mAb解离

[0700] 通过SPR和FcRn亲和层析分析FcRn和mAb的解离。

[0701] -使用SPR时FcRn-mAb解离

[0702] 为了评价K_D值,评定低于1μM的K_D值表示中度亲和力,在1-5μM之间的K_D值表示弱亲和力和高于5μM的K_D值不表示与FcRn结合。布雷奴单抗和优特克单抗在pH 6.0显示相似的亲和力。优特克单抗在pH 6.6显示非常弱亲和力并且在pH 6.8无亲和力。与之相反,布雷奴单抗直至pH 6.8仍显示中度亲和力,在pH 7.0显示弱亲和力并且在pH 7.2无结合作用。

[0703] 表14:布雷奴单抗和优特克单抗对FcRn的K_D。使用pH值渐增的缓冲液计算K_D。高于5μM的K_D值划归为无结合作用。

[0704]

	布雷奴单抗K _D [μM]	优特克单抗K _D [μM]
pH 6.0	0.09	0.39
pH 6.4	0.10	1.00
pH 6.6	0.36	3.10
pH 6.8	0.60	不结合
pH 7.0	4.20	不结合
pH 7.2	不结合	不结合

[0705] 全部抗体的生物化学表征未显示布雷奴单抗、优特克单抗和变体之间的明显差异。

[0706] 抗体片段的产生

[0707] 通过在37℃使用FabRICATOR-试剂盒(GENOVIS,Lund,瑞典)孵育30分钟,制备F(ab')₂片段和Fc区片段。使用ÄKTA Explorer色谱系统(GE Healthcare,乌普萨拉,瑞

典)在大小排阻层析(SEC)柱(Superdex200,GE Healthcare,苏黎世,瑞士)上分离所得到的裂解产物F(ab')₂和Fc区并且汇集峰级分。相同柱上的分子量标准起到基于保留时间鉴定两种裂解产物的作用。

[0708] FcRn表面等离子体共振 (SPR) 分析

[0709] 使用BIAcoreT100仪(BIAcore AB,乌普萨拉,瑞典),通过表面等离子体共振 (SPR) 技术分析抗体对FcRn的结合特性。该体系经充分建立用于研究分子相互作用。它允许连续实时监测配体/分析物结合作用,并且因此在多种分析环境下测定动力学参数。SPR-技术基于测量靠近镀金生物传感器芯片表面的折射率。折射率的变化表示固定化配体与溶液中注射的分析物相互作用所引起的该表面上的质量变化。如果分子与表面上的固定化配体结合,则质量增加,在解离的情况下,则质量减少。在当前测定法中,借助胺偶联法,将FcRn受体固定在BIAcoreCM5-生物传感器芯片 (GE Healthcare Bioscience,乌普萨拉,瑞典) 到400响应单位 (RU) 水平。该测定法在室温实施,以PBS,0.05% Tween20 pH 6.0 (GE Healthcare Bioscience) 作为运行缓冲液和稀释缓冲液。将200nM天然抗体样品或氧化抗体样在室温以流速50μL/分钟进样。结合时间是180秒,解离相耗时360秒。通过短暂注射HBS-P, pH 8.0,实现芯片表面再生。通过比较进样后180秒和进样后300秒的生物学反应信号高度,进行SPR-数据的评价。相应参数是RU最高水平(进样后180秒)和晚期稳定性(进样结束后300秒)。

[0710] 在pH 6.0使用BIAcore T100SPR仪 (GE Healthcare, Little Chalfont, 英国) 确定huFcRn和IgG的稳态结合水平和平衡解离常数(K_D)。将人FcRn通过胺-偶联法在BIAcoreCM5-生物传感器芯片 (GE Healthcare Bioscience) 上固定至50响应单位 (RU) 的水平。对于mAb 5和mAb 6,使用CM4-生物传感器芯片。使用调节至pH 6.0的含0.05% Tween 20的PBS(二者均来自Roche Diagnostics,曼海姆,德国)作为运行缓冲液和稀释缓冲液,在室温进行该测定法。制备在1500nM至23nM范围内的样品浓度系列并且以流速5μL/分钟注射每份样品。分别使用600秒和360秒的结合时间和解离时间。通过注射pH 7.5含有.05% Tween 20的PBS,使芯片再生。将平衡解离常数K_D计算为稳态亲和力并且对优特克单抗的K_D归一化。

[0711] 小鼠

[0712] 将小鼠FcRnα-链基因缺陷、但是对人FcRnα-链基因为半合子转基因的B6.Cg-Fcgrt^{tm1Dcr} Tg (FCGRT) 276Dcr小鼠(muFcRn-/-huFcRn tg+/-,品系276)用于药代动力学研究[39]。小鼠饲养在无特定病原体条件下实施。小鼠从Jackson实验室(Bar Harbor, ME, 美国)(雌性,年龄4-10周,在给药时体重17-22g)获得。全部动物实验均由德国上巴伐利亚政府(许可编号55.2-1-54-2532.2-28-10)批准并根据欧洲联盟实验动物护理与使用规范在AAALAC认证的动物设施中开展。动物圈养在标准笼舍中并且在整个研究期间自由摄食和饮水。

[0713] 药代动力学研究

[0714] 将单次剂量的抗体借助外侧尾静脉以剂量水平10mg/kg进行静脉内注射。将小鼠分成3各组,每组6只小鼠,以涵盖总计9个血清采集时间点(在给药后0.08、2、8、24、48、168、336、504和672小时)。每只小鼠接受2次眶后出血,在异氟烷TM (CP-Pharma GmbH, Burgdorf, 德国) 轻度麻醉下进行;在安乐死时采集第三份血液样品。采集血液至血清管 (Microvette 500Z-Gel, Sarstedt, Nümbrecht, 德国)。在2小时孵育后,将样品以9,300g离心3分钟以获得血清。在离心后,血清样品冷冻贮藏在-20℃直至分析。

[0715] 人抗体血清浓度的测定

[0716] 通过特异性酶联免疫测定法测定鼠血清中优特克单抗、布雷奴单抗、mAb 8和mAb 9的浓度。对抗体特异的生物素酰化白介素12和洋地黄甙标记的抗人-Fc小鼠单克隆抗体 (Roche Diagnostics, 彭茨贝格, 德国) 分别用于捕获和检测。链霉亲和素包被的微量滴定板 (Roche Diagnostics, 彭茨贝格, 德国) 用分析缓冲液 (Roche Diagnostics, 彭茨贝格, 德国) 中稀释的生物素酰化的捕获抗体包被1小时。洗涤后, 以各种稀释度添加血清样品, 随后是另一个孵育步骤1小时。在反复洗涤后, 通过后续与检测抗体孵育, 随后与缀合于辣根过氧化物酶 (HRP; Roche Diagnostics, 彭茨贝格, 德国) 的抗洋地黄甙抗体孵育, 检测结合的人抗体。使用ABTS (2,2' 联氮-双[3-乙基苯并噻唑啉-磺酸]; Roche Diagnostics, 德国) 作为HRP底物以形成有色反应产物。使用Tecan sunrise平板读数仪 (**Männedorf**, 瑞士), 采用490nm处的参考波长, 在405nm读取所产生的反应产物的吸光度。

[0717] 将全部血清样品、阳性对照样品和阴性对照样品一式两份分析并且针对提供的参考标准校准。

[0718] PK分析

[0719] 使用WinNonlin™1.1.1 (Pharsight, CA, 美国), 通过非区室分析计算药代动力学参数。

[0720] 简而言之, 因抗体的非线性减少而通过对数梯形法计算曲线下面积 (AUC_{0-inf}) 值并且使用表观终末速率常数 λ_z , 将所述值外推至无限, 从最后时间点处的观测浓度外推。

[0721] 将血浆清除率计算为剂量速率 (D) 除以 AUC_{0-inf} 。表观终末半寿期 ($T_{1/2}$) 从等式 $T_{1/2} = \ln 2 / \lambda_z$ 推算。

[0722] 统计分析

[0723] 使用Nalimov离群值检验检出离群血清浓度并且从进一步分析中排除。

[0724] 使用Tukey忠实显著性检验 (Tukey's HSD检验) 作为分析终末半寿期统计显著差异的统计检验。

[0725] pH依赖性净电荷的计算

[0726] pH依赖性净电荷 (“滴定曲线”) 用开源程序EMBOSS iep计算, 假定全部半胱氨酸均参与二硫键。

[0727] 布雷奴单抗同源性模型的生成和等势表面的计算

[0728] 使用modeller 9v7, 使用PDB结构1AQK[41]作为模板, 生成布雷奴单抗Fab片段的同源性模型。分别从这个模型 (布雷奴单抗) 或优特克单抗的晶体结构 (PDB ID 3HMX) 计算布雷奴单抗Fab和优特克单抗Fab的等势表面。使用DiscoveryStudio Pro第3.5版 (Accelrys Inc., 圣迭戈, 美国) 中的“制备蛋白质”方案连同CHARMm力场在pH 7.4和离子强度0.145M, 使各结构质子化。用激活DelPhi程序的DiscoveryStudio Pro中的“静电位”方案计算静电位[42]。

[0729] 布雷奴单抗-FcRn复合物和优特克单抗-FcRn复合物的分子动力学模拟

[0730] 以无聚糖的完整IgG1 (PDB ID 1HZH) 的晶体结构作为模板, 使用DiscoveryStudio Pro第3.5版建立布雷奴单抗和优特克单抗作为完整IgG的同源性模型。认为这种简化是适宜的, 因为在体外, 糖基化对FcRn结合作用没有明显影响[43]。在比对其CH1结构域和CL结构域后, 将这个模板中的Fab结构域替换为上文描述的Fab结构。使用大鼠FcRn-Fc复合物

(PDB ID1I1A) 作为模板,用DiscoveryStudio Pro建立人FcRn的同源性模型。用DiscoveryStudio Pro的“制备蛋白质”脚本建立遗失的残基。通过将大鼠Fc结构域的C-α原子在FcRn周围5Å范围内与人Fc区上的其同源对应物叠加,将人FcRn的同源性模型针对布雷单抗IgG模型和优特克单抗IgG模型的两条重链建模。对于MD模拟,在FcRn:Fc界面(在FcRn中的残基108和Fc中的残基255之间,图S1)中引入二硫键以防止复合物在模拟时间期间解离。所得到的结构物代表携带两个拷贝的FcRn/β2mg异二聚体的完整IgG。

[0731] 用GROMACS 4.6.2模拟软件包(在www.gromacs.org处可获得)[44],基本上如Kortkhonjia等人描述[45]那样进行IgG-FcRn复合物的分子动力学(MD)模拟。模拟在运行Linux操作系统的计算机集群的160个处理器上并行执行。使用OPLSAA力场[46]并且结构用大约128,000个TIP3水分子充分溶剂化。添加氯原子或钠原子以中和系统的总电荷。使用具备定期交界条件的截短八面体,蛋白质周围是7.5埃边界。使用PME加合法计算静电相互作用,实空间静电临界值为1.0nm。Lennard-Jones电势的临界值为1.0nm。LINCS用来约束全部蛋白质键长,允许2飞秒时间阶跃。使用V-重新标定算法,温度在300K保持恒定。在能量最小化(目标:最大力<1000kJ/mol/nm)后,经100纳秒时长模拟轨迹前进行30皮秒平衡。

[0732] IgG-FcRn相互作用能量的计算

[0733] 用DiscoveryStudio Pro计算静电对FcRn结构域和MD轨迹中靠近FcRn的Fab结构域之间未约束的相互作用的贡献。对于能量计算,在pH 7.4、145mM的离子强度和37℃温度采用与上文所述相同的环境,使蛋白质质子化。在使用DiscoveryStudio Pro中的“计算相互作用能量”方案连同CHARMm力场计算相互作用能量前,以最多1000个步骤的“智能最小化”方案使结构物最小化。使用明确水和GBMV静电模型。这种计算在轨迹起点(0纳秒)和在96纳秒至100纳秒以1纳秒间隔进行。

[0734] 实施例1

[0735] FcRn亲和柱的制备

[0736] 在HEK293细胞中表达FcRn

[0737] 通过用含有FcRn和β-2-微球蛋白的编码性序列的两种质粒转染HEK293细胞,瞬时表达FcRn。转染的细胞在摇瓶中在36.5℃,120转/分钟(振荡器幅度5cm),80%湿度和7%CO₂培养。每2-3天将细胞稀释至密度3至4×10⁵个细胞/ml。

[0738] 对于瞬时表达,以培养物体积8L在36.5℃,pH 7.0±0.2,pO₂35%(以N₂和空气通气,气体总流速200ml min⁻¹)和搅拌器速度100-400转/分钟启用14L不锈钢生物反应器。当细胞密度达到20×10⁵个细胞/ml时,10mg质粒DNA(等摩尔量的两种质粒)稀释于400ml Opti-MEM(Invitrogen)中。将20ml 293fectin(Invitrogen)添加至这种混合物,随后所述混合物在室温孵育15分钟并随后转移至发酵器中。从次日起,向细胞以连续模式供应养分:饲养溶液以500ml/日的速率添加并根据需要添加葡萄糖以维持高于2g/l的水平。转染后7天使用带11吊篮的吊篮离心机(swing head centrifuge)以4000转/分钟持续90分钟收获上清液。通过Sartobran P滤器(0.45μm+0.2μm,Sartorius)净化上清液(13L)并从中纯化FcRnβ-2-微球蛋白复合物。

[0739] 新生Fc受体的生物素酰化

[0740] 3mg FcRn溶解/稀释于含有150mM氯化钠的5.3mL 20mM磷酸二氢钠缓冲液中并添加至250μl PBS和1片完整蛋白酶抑制剂(完整ULTRA片,Roche Diagnostics GmbH)。使用来

自Avidity的生物素酰化试剂盒根据制造商说明书 (Bulk BIRA,Avidity LLC),使FcRn生物素酰化。生物素酰化反应在室温过夜进行。

[0741] 将生物素酰化的FcRn在4℃对包含150mM NaCl的pH 7.5 20mM磷酸二氢钠缓冲液透析过夜以移除过量的生物素。

[0742] 偶联于链霉亲和素琼脂糖凝胶

[0743] 为了偶联至链霉亲和素琼脂糖凝胶,将1克链霉亲和素琼脂糖凝胶 (GE Healthcare,英国)添加至生物素酰化和透析的FcRn并在4℃孵育过夜。将FcRn衍生化的琼脂糖凝胶填充于1mL XK柱 (GE Healthcare,英国)中并且FcRn柱随后用含有140mM氯化钠,pH 5.5的20mM 2-(N-吗啉)-乙磺酸 (MES) 钠盐缓冲液平衡。

[0744] 实施例2

[0745] 使用FcRn亲和柱和pH梯度的色谱

[0746] 将受体衍生化的琼脂糖凝胶填充于1mL XK柱 (GE Healthcare) 中并且FcRn柱随后用含有140mM NaCl,pH 5.5的20mM 2-(N-吗啉)-乙磺酸 (MES) 缓冲液平衡。

[0747] 条件:

柱尺度: 50 mm x 5 mm

床高度: 5 cm

[0748]

载量: 30 µg 样品

平衡缓冲液: 20 mM MES, 含 140 mM NaCl, 调节至 pH 5.5

洗脱缓冲液: 20 mM Tris/HCl, 含 140 mM NaCl, 调节至 pH 8.8

[0749]

洗脱: 7.5 CV 平衡缓冲液, 在 120 分钟内至 100%洗脱缓冲液, 10 CV 洗脱缓冲液

[0750] 样品在20mM 2-(N-吗啉)-乙磺酸 (MES) 钠盐,140mM氯化钠,pH 5.5中配制。每次注射每份样品含有30µg mAb。使用20mM 2-(N-吗啉)-乙磺酸 (MES) 钠盐,140mM氯化钠,pH 5.5和20mM三(羟甲基)氨基甲烷TRIS,140mM氯化钠,pH 8.8作为洗脱剂和0.5ml/分钟流量,借助120分钟内部从pH 5.5至8.8的线性pH梯度洗脱抗体。FcRn柱层析在酸性pH (pH 5.5-6.0) 显示结合并且在较高pH值释放。为了完全洗脱抗体,将pH以梯度增加直至pH 8.8。通过使用Chromleon软件 (Dionex,德国),手工将色谱图积分。实验在室温进行。通过连续测量280nm处的吸光度获得洗脱图。为了在特定的保留时间测定洗脱pH,每5分钟收集样品并且离线测量pH。

[0751] 实施例3

[0752] 使用FcRn亲和柱、pH梯度和高盐条件的色谱

[0753] 将受体衍生化的琼脂糖凝胶填充于1mL XK柱 (GE Healthcare) 中并且FcRn柱随后用含有400mM NaCl,pH 5.5的20mM 2-(N-吗啉)-乙磺酸 (MES) 缓冲液平衡。

[0754] 条件:

柱尺度: 50 mm x 5 mm

床高度: 5 cm

载量: 30 µg 样品

[0755] **平衡缓冲液:** 20 mM MES, 含 400 mM NaCl, 调节至 pH 5.5

洗脱缓冲液: 20 mM Tris/HCl, 含 400 mM NaCl, 调节至 pH 8.8

洗脱: 7.5 CV 平衡缓冲液, 在 120 分钟内至 100%洗脱缓冲液, 10 CV 洗脱缓冲液

[0756] 样品在20mM 2-(N-吗啉)-乙磺酸(MES)钠盐,400mM氯化钠,pH5.5中配制。每次注射每份样品含有30µg mAb。使用20mM 2-(N-吗啉)-乙磺酸(MES)钠盐,400mM氯化钠,pH 5.5和20mM三(羟甲基)氨基甲烷TRIS,400mM氯化钠,pH 8.8作为洗脱剂和0.5ml/分钟流量,借助120分钟内从pH 5.5至8.8的线性pH梯度洗脱抗体。FcRn柱层析在酸性pH(pH 5.5-6.0)显示结合并且在较高pH值显示释放。为了完全洗脱抗体,将pH以梯度增加直至pH 8.8。通过使用Chromleon软件(Dionex,德国),手工将色谱图积分。实验在室温进行。通过连续测量280nm处的吸光度获得洗脱图。为了在特定的保留时间测定洗脱pH,每5分钟收集样品并且离线测量pH。

[0757] 实施例4

[0758] 使用FcRn亲和柱和盐梯度的色谱

[0759] 将受体衍生化的琼脂糖凝胶填充于1mL XK柱(GE Healthcare)中并且FcRn柱随后用pH 7.8的10mM 2-(N-吗啉)-乙磺酸(MES)缓冲液平衡。

[0760] 条件:

柱尺度: 50 mm x 5 mm

床高度: 5 cm

载量: 30 µg 样品

[0761] **平衡缓冲液:** 10 mM MES, 调节至 pH 7.8

洗脱缓冲液: 10 mM MES, 含 250 mM NaCl, 调节至 pH 7.8

洗脱: 7.5 CV 平衡缓冲液, 在 60 分钟内至 100%洗脱缓冲液, 10 CV 洗脱缓冲液

[0762] 样品在10mM 2-(N-吗啉)-乙磺酸(MES)钠盐,pH 7.8中配制。每次注射每份样品含有30µg mAb。使用10mM 2-(N-吗啉)-乙磺酸(MES)钠盐,pH 7.8和10mM 2-(N-吗啉)-乙磺酸(MES)钠盐,250mM氯化钠,pH 7.8作为洗脱剂和0.5ml/分钟流量,借助60分钟内部从0nM至250nM氯化钠的线性盐梯度洗脱抗体。实验在室温进行。通过连续测量280nm处的吸光度获得洗脱图。通过使用Chromleon软件(Dionex,德国),手工将色谱图积分。

[0763] 实施例5

[0764] 使用FcRn亲和柱的色谱

[0765] 将受体衍生化的琼脂糖凝胶填充于1mL XK柱(GE Healthcare)中并且FcRn柱随后

用含有150mM NaCl, pH 5.5的20mM 2-(N-吗啉)-乙磺酸(MES)缓冲液平衡。

[0766] 条件:

柱尺度: 50 mm x 5 mm

床高度: 5 cm

载量: 50 µg 样品

[0767] **平衡缓冲液:** 20 mM MES, 含 150 mM NaCl, 调节至 pH 5.5

洗脱缓冲液: 20 mM Tris/HCl, 含 150 mM NaCl, 调节至 pH 8.8

洗脱: 7.5 CV 平衡缓冲液, 在 30 CV 内至 100%洗脱缓冲液, 10 CV 洗脱缓冲液

[0768] 将含有50至100µg蛋白质的抗体或融合蛋白样品调节至pH 5.5并使用**ÄKTA**探索者10XT或Dionex Summit (Dionex, Idstein, 德国)施加至FcRn柱。随后用5-10个柱体积的平衡缓冲液20mM MES, 150mM NaCl, pH 5.5洗涤5cm床高度的柱。用直至20mM Tris/HCl, 150mM NaCl, pH 8.8的pH梯度以30个柱体积洗脱亲和力结合的含有Fc的蛋白质。为了完全洗脱修饰的抗体, 将pH以梯度增加直至pH 8.8。实验在室温实施。通过连续测量280nm处的吸光度获得洗脱图。样品进样后分析物峰X抵达检测器所耗费的时间称作保留时间。

[0769] 实施例6

[0770] FcRn柱上的保留时间与体内半寿期的相关性

[0771] 在人FcRn转基因C57BL/6J小鼠中单次静脉内给药10mg/kg (n=8) 后测量体内半寿期并且将其与FcRn柱上的保留时间比较(参见表15)。发现显示从FcRn柱洗脱晚的抗体在FcRn转基因小鼠中具有较长的半寿期。

[0772] 表15.

[0773]	抗体	保留时间 [分钟]	体内半寿期 [h]
	抗 Aβ 抗体(野生型)	45.5	103 +/- 51
	抗 IGF-1R 抗体(野生型)	45.5	97 +/- 9
	抗 IGF-1R 抗体(YTE-突变体)	58	211 +/- 41

[0774] 实施例7

[0775] 人FcRn、小鼠FcRn和食蟹猴FcRn的纯化

[0776] 将含有六组氨酸标签的蛋白质的澄清上清液在4℃加载于Ni-NTA亲和层析树脂(Qiagen, Hanbrechtikon, 瑞士)上。用包含pH 7.4的500mM NaCl并分别含有20mM、100mM咪唑的20mM磷酸钠缓冲液洗涤步骤后, 使用含有300mM咪唑的相同缓冲液的分批洗脱在**ÄKTA**Prime色谱系统(Amersham Pharmacia Biotech, 乌普萨拉, 瑞典)上以流速2ml/分

钟洗脱蛋白质。汇集各级分并在含有500mM NaCl的磷酸钠缓冲液中在大小排阻层析(Superdex™200,GE Healthcare,苏黎世,瑞士)上进一步纯化。使用Nanodrop分光光度计(Nanodrop Technologies,Wilmington,DE),定量纯化的蛋白质并在NuPAGE 4-12%Bis-Tris凝胶上在MES缓冲液中变性和还原条件下通过SDS PAGE分析。

[0777] 实施例8

[0778] 小鼠和食蟹猴FcRn亲和柱层析

[0779] 下表16中,给出示例性人抗体在包含来自食蟹猴的FcRn的亲和柱上的保留时间。使用以下条件获得数据:洗脱缓冲液:20mM TRIS/HCl,150mM NaCl,pH 8.5。进一步描述:参见实施例2。术语YTE-突变体指三重突变M252Y/S254T/T256E。

[0780] 表16:

[0781]	抗体	保留时间[分钟]
	抗 IGF-1R 抗体(野生型)	51.2

[0782]	抗 IGF-1R 抗体(YTE-突变体)	63.0
--------	-----------------------------	-------------

[0783] 下表17中,给出示例性人抗体在鼠FcRn上的保留时间。使用以下条件,获得数据:1.2mg偶联在1ml琼脂糖凝胶上的受体。洗脱缓冲液:20mM TRIS/HCl,150mM NaCl,pH 8.5。进一步描述:参见实施例2。该表中未包括YTE-突变体,因为除非洗脱缓冲液已经调节至9.5,否则它们不可能洗脱。

[0784] 表17.

[0785]	抗体	保留时间[分钟]
	抗IGF-1R抗体(野生型)	48.8

[0786] 关于人源化抗体的结合作用,食蟹猴FcRn亲和柱的行为类似于人FcRn亲和柱。在另一方面,人源化抗体与鼠FcRn柱的结合强于人FcRn亲和柱,如可以通过保留更迟见到。

[0787] 实施例9

[0788] 抗体片段的产生

[0789] 通过添加1μg IdeS半胱氨酸蛋白酶/50μg抗体并在37℃孵育2小时,切割1:1用100mM Tris,pH 8.0稀释的全长抗体,制备F(ab')₂片段和Fc区片段。使用ÄKTA Explorer色谱系统(GE Healthcare,乌普萨拉,瑞典)在大小排阻层析(SEC)柱(Superdex200,GE Healthcare,苏黎世,瑞士)上分离所得到的裂解产物F(ab')₂和Fc并且汇集峰级分。相同柱上的分子量标准起到基于保留时间鉴定两种裂解产物的作用。

[0790] 全长抗体的保留时间明显地变动。与之相反,全部测试抗体的相应Fc部分的保留时间事实上彼此并无不同(<1%)。

[0791] 当纤溶酶用于切割全长抗体时,获得相同结果(数据未显示)。

[0792] 实施例10

[0793] 人FcRn小鼠中的药代动力学研究

[0794] 全部程序均根据实验动物评估和认可委员会指南实施(www.aaalac.org)。该研究由德国Oberbayern的区域议会理事会批准。

[0795] 在整个药代动力学研究期间使用雄性和雌性C57BL/6J小鼠(背景);FcRn缺陷型,但呈人FcRn半合子转基因的小鼠(huFcRn(276)-/tg(30,31))。

[0796] 在施用,动物重量在17g和25g之间。相应的抗体作为单次静脉内快速浓注射经尾静脉给予。归因于小鼠的血液容积有限,需要各自含四只雄性动物和四只雌性动物的三个组以覆盖9个采样时间点,即每只动物三个采样时间点。在组1中施用后5分钟、24小时和336小时、在组2中施用后2小时、168小时和504小时及在组3中施用后8小时、48小时和672小时取得血液样品。约100μL血液样品通过眼球后穿刺法获得并在室温贮存60分钟以允许凝血。通过在4℃以9300x g离心3分钟获得至少40μL血清样品并将其立即冷冻并贮存在-20℃直至分析。

[0797] 通过对所施用的抗体和其变体的抗原结合区(Fab)特异的抗原捕获酶联免疫吸附测定法(ELISA),测定鼠血清中人治疗性抗体的血清浓度。全部试剂或样品均在室温在摇床上以400转/分钟孵育。每个洗涤步骤包括三个循环。简而言之,链霉亲和素包被的微量滴定板用分析缓冲液中稀释的生物素酰化抗体包被。用磷酸盐缓冲盐水-聚山梨醇酯-20(Tween 20)洗涤后,添加各个稀释度的血清样品并孵育1小时。在洗涤后,通过后续和与小鼠IgG交叉反应的缀合至洋地黄甙的人Fcγ-特异性单克隆抗体Fab片段孵育,检测结合的人治疗性抗体。在洗涤后,添加与辣根过氧化物酶(HRP)缀合的抗洋地黄甙抗体并孵育1小时。在洗涤后,添加ABTS(2,2'联氮-双[3-乙基苯并噻唑啉磺酸];Roche Diagnostics,德国)作为HRP底物以形成有色反应产物。采用490nm处的参考波长,在405nm读取所产生的反应产物的吸光度。将全部血清样品、阳性对照样品或阴性对照样品一式两份分析并且针对提供的参考标准校准。

[0798] 使用药代动力学评价程序WinNonlin™(Pharsight, St. Louis, MO, 美国)第5.2.1版,通过非区室分析计算药代动力学参数。简而言之,通过线性梯形法(连同线性插值法)从时间0至无限计算浓度/时间曲线下面积AUC₍₀₋₆₇₂₎。表观终末半寿期(T_{1/2})从等式:T_{1/2}=ln2/λ_z推算。身体总清除率(CL)计算为剂量/AUC。通过ANOVA分析确定野生型抗体和其变体之间药代动力学参数的统计显著差异。

[0799] 在小鼠FcRn缺陷、但是对人FcRn(huFcRn(276)-/tg)为半合子转基因的C57BL/6J小鼠中的药代动力学研究显示,YTE突变增强抗体的药代动力学。在统计显著性水平,与野生型抗体相比,YTE突变体具有1.74倍较高的AUC₍₀₋₆₇₂₎、1.95倍较慢的清除率和2.2倍较长的终末半寿期(表14)。

[0800] 表18:通过非区室分析单次静脉内快速浓注10mg/kg至人FcRn转基因小鼠后通过ELISA测量的血清浓度获得的野生型抗体及其三重突变YTE的药代动力学参数。均值±SD,n=8只/组,与野生型抗体相比ANOVA分析显著性(+++,p<0,001)。AUC₍₀₋₆₇₂₎,从时间0至672小时的血清浓度-时间曲线下面积。

[0801]

抗体	AUC ₍₀₋₆₇₂₎ [h*μg/ml]	清除率 (ml/分钟/kg)	终末半寿期 [h]
野生型抗体	15.693 ± 1.879	0.0107 ± 0.0013	96.8 ± 8.9
YTE-突变体	27.359 ± 2.731	0.0055 ± 0.0006	211.4 ± 40.6

[0802] 实施例11

[0803] 人FcRn小鼠中的药代动力学研究

[0804] 全部程序均根据实验动物评估和认可委员会指南实施(www.aaalac.org)。该研究由德国Oberbayern的区域议会理事会批准。

[0805] 在整个药代动力学研究期间使用雄性和雌性C57BL/6J小鼠(背景);FcRn缺陷型,但呈人FcRn半合子转基因的小鼠(huFcRn(276)-/tg(30,31))。

[0806] 在体内研究中使用4种抗体:布雷奴单抗、优特克单抗、mAb 8和mAb 9。

[0807] 相应的抗体作为单次静脉内快速浓注注射(10mg/kg)给予。归因于小鼠的血液容积有限,需要各自含六只动物的三个组以覆盖9个采样时间点。最后采样点是施用后4周。

[0808] 图3中显示结果。

[0809] 表19:布雷奴单抗,优特克单抗和抗体变体mAb 8和mAb 9的药代动力学参数。

[0810]	mAb	AUC 0-inf [h* μ g/mL]	Cl [mL/min/kg]	Vss [L/kg]	T 1/2 [h]
	布雷奴单抗	4228 $\pm$ 119	0.0394 $\pm$ 0.001	0.162 $\pm$ 0.015	48 $\pm$ 9
	优特克单抗	12238 $\pm$ 864	0.0137 $\pm$ 0.001	0.116 $\pm$ 0.006	137 $\pm$ 48
	mAb 8	11459 $\pm$ 843	0.0146 $\pm$ 0.001	0.101 $\pm$ 0.013	78 $\pm$ 22
	mAb 9	16039 $\pm$ 936	0.0104 $\pm$ 0.001	0.099 $\pm$ 0.011	109 $\pm$ 13

[0811] 为了证实人FcRn转基因小鼠中的终末半寿期差异由不同的FcRn-mAb相互作用引起,在FcRn敲除小鼠中实施了第二项体内研究。为了减少这项研究中使用的小鼠数目,仅使用三种抗体:布雷奴单抗、优特克单抗和mAb 9。

[0812] 在静脉内施用10mg/kg抗体后,FcRn敲除小鼠中全部抗体的清除均比人FcRn转基因小鼠中快得多,原因在于FcRn介导的IgG再生遗失。 α 相和 β 相中的划分不可明确界定,因为抗体非常快速地消除。可以显示,布雷奴单抗具有不同的药代动力学行为,与优特克单抗和mAb 9相比,施用后第一小时内分布得更快。还在人FcRn转基因小鼠中观察到这些结果,从而表明施用后第一小时内的分布过程不是FcRn介导的。

[0813] 计算和总结以下PK参数:AUC_{0-inf}、Cl、V_{SS}和T_{1/2}。

[0814] 表20:FcRn敲除小鼠中的PK参数。在施用10mg/kg至6只动物/组后计算PK参数。PK数据代表均数 $\pm$ 标准偏差。

[0815]	样品	AUC _{0-inf} [h*mg/mL]	Cl [mL/min/kg]	V _{SS} [L/kg]	T _{1/2} [h]
	布雷奴单抗	1.0 $\pm$ 0.1	0.163 $\pm$ 0.008	0.113 $\pm$ 0.004	10.6 $\pm$ 0.6
	优特克单抗	3.3 $\pm$ 0.1	0.051 $\pm$ 0.002	0.077 $\pm$ 0.004	22.8 $\pm$ 1.1
	mAb 9	2.9 $\pm$ 0.1	0.059 $\pm$ 0.003	0.093 $\pm$ 0.005	23.2 $\pm$ 1.2

[0816] 就AUC_{0-inf}、Cl、V_{SS}和T_{1/2}而言,优特克单抗和mAb 9相当。布雷奴单抗具有比优特克单抗和mAb 9更小的AUC_{0-inf}、更快的Cl和更小的T_{1/2}。T_{1/2}的计算值可能与实际值不同,因为将会需要3天和4天后的时间点以更精确地计算终末半寿期。

[0817] 使用Tukey HSD检验计算终末半寿期的统计分析结果。可以在布雷奴单抗和优特克单抗、布雷奴单抗和mAb 9的终末半寿期之间检出统计显著性。

[0818] 通过检测药物/ADA免疫复合物检验ADA的形成。在FcRn敲除小鼠中,施用10mg/kg布雷奴单抗导致布雷奴单抗/ADA免疫复合物在约168-192小时(7-8天)后形成。

[0819] 表21:在FcRn敲除小鼠中布雷奴单抗施用后的ADA-阳性样品。在FcRn敲除小鼠中静脉内施用10mg/kg布雷奴单抗后每个采样时间点的血清浓度。ADA-阳性样品分别显示为*和**,其描述中度和重度药物/ADA免疫复合物的形成。

时间 [h/d]	M 1 [μg/mL]	M 2 [μg/mL]	M 3 [μg/mL]	M 4 [μg/mL]	M 5 [μg/mL]	M 6 [μg/mL]
0.08	192	181	200	187	186	178
2	86	79	74	91	89	91
8	31	32	36	31	29	33
24/ 1	6.7	12	7.9	11	6.9	8.0
48/ 2	1.8	2.3	2.7	2.6	2.4	2.2
168/ 7	b.l.q.	b.l.q.	b.l.q. **	b.l.q.	b.l.q. **	b.l.q.
192/ 8	b.l.q. *	b.l.q. *	b.l.q. **	b.l.q. *	b.l.q. **	b.l.q. **
216/ 9	b.l.q. *	b.l.q.	b.l.q. **	b.l.q. **	b.l.q. *	b.l.q. **
336/ 14	b.l.q.	b.l.q. **	b.l.q. *	b.l.q. **	b.l.q. **	b.l.q. *

[0821] b.l.q=低于定量限。

[0822] 在施用mAb 9后,药物/ADA免疫复合物也在约168小时(7天,表28)后首次检出。在施用优特克单抗后,FcRn敲除小鼠中未检出优特克单抗/ADA复合物(表27表27:)。布雷奴单抗和mAb 9的浓度-时间曲线未显示因ADA形成所致的快速下降。优特克单抗和mAb 9具有非常相似的浓度-时间曲线,这表明在mAb 9施用后ADA形成不影响PK。

[0823] 表22:人FcRn转基因小鼠中布雷奴单抗的血清浓度在。在施用10mg/kg单次剂量静脉内注射剂至每组6只动物后测定血清浓度。形成中度和重度药物/ADA免疫复合物的ADA-阳性样品分别显示为*和**。

时间 [h/d]	M 1 [μg/mL]	M 2 [μg/mL]	M 3 [μg/mL]	M 4 [μg/mL]	M 5 [μg/mL]	M 6 [μg/mL]	Mean [μg/mL]	SD [μg/mL]
0.08	201	174	188	192	214	194	194	13
2	109	105	106	105	110	110	107	2.4
8	50	53	53	54	56	58	54	2.8
24/ 1	37	32	30	34	35	35	34	2.4
48/ 2	27	23	24	27	24	28	25	2.2
168/ 7	6.2	5.4	6.7	6.7 *	6.4	6.8	6.4	0.5
336/ 14	0.4	1.0 *	0.1 **	0.2 **	0.7 *	0.1 **	0.4	0.4
504/ 21	b.l.q.	b.l.q.**	b.l.q.**	b.l.q.**	b.l.q.**	b.l.q.**	b.l.q.	-
672/ 28	b.l.q.	b.l.q.**	b.l.q.	b.l.q.**	b.l.q.**	b.l.q.**	b.l.q.	-

[0825] 表23:人FcRn转基因小鼠中优特克单抗的血清浓度。在施用10mg/kg单次剂量静脉内注射剂至每组6只动物后测定血清浓度。形成中度和重度药物/ADA免疫复合物的ADA-阳性样品分别显示为*和**。

[0826]

时间 [h/d]	M 1 [μg/mL]	M 2 [μg/mL]	M 3 [μg/mL]	M 4 [μg/mL]	M 5 [μg/mL]	M 6 [μg/mL]	Mean [μg/mL]	SD [μg/mL]
0.08	205	219	212	225	202	226	215	10
2	156	161	191	175	153	215	175	24
8	120	116	110	114	114	115	115	3.2
24/ 1	73	77	72	73*	69	76	73	2.9
48/ 2	58	57	64	57	56	59	59	2.7
168/ 7	18	19	27	22	20	25	22	3.5
336/ 14	7.2	6.8	8.0	6.2	8.3	4.8	6.9	1.3
504/ 21	2.2	2.2	2.5	2.3	2.5	3.0 *	2.5	0.3
672/ 28	0.9	0.8	2.1	1.1	1.0	1.8	1.3	0.5

[0827] 表24:人FcRn转基因小鼠中mAb 8的血清浓度。在施用10mg/kg单次剂量静脉内注射剂至每组6只动物后测定血清浓度。形成中度和重度药物/ADA免疫复合物的ADA-阳性样品分别显示为*和**。

[0828]

时间 [h/d]	M 1 [μg/mL]	M 2 [μg/mL]	M 3 [μg/mL]	M 4 [μg/mL]	M 5 [μg/mL]	M 6 [μg/mL]	Mean [μg/mL]	SD [μg/mL]
0.08	241	177	174	203	220	217	206	26
2	146	175	155	120	109	146	142	24
8	90	95	97	106	108	85	97	8.7
24/ 1	76	55	55	59	80	72	66	10.9
48/ 2	65	52	56	71	71	68	64	8.1
168/ 7	24	28	25	28	27	21 **	25	2.6
336/ 14	7.7	2.9 *	4.4	1.3 *	2.4 **	6.7 *	4.2	2.5
504/ 21	3.1	0.1 **	2.3	2.1	0.1 **	0.1	1.3	1.4
672/ 28	b.l.q. **	b.l.q. **	b.l.q. **	b.l.q. **	b.l.q. *	b.l.q. **	b.l.q.	-

[0829] 表25:人FcRn转基因小鼠中mAb 9的血清浓度。在施用10mg/kg单次剂量静脉内注射剂至每组6只动物后测定血清浓度。形成中度和重度药物/ADA免疫复合物的ADA-阳性样品分别显示为*和**。

[0830]

时间 [h/d]	M 1 [μg/mL]	M 2 [μg/mL]	M 3 [μg/mL]	M 4 [μg/mL]	M 5 [μg/mL]	M 6 [μg/mL]	Mean [μg/mL]	SD [μg/mL]
0.08	194	254	198	270	295	233	241	40
2	151	183	124	143	165	137	150	21
8	126	104	109	89	111	114	109	12
24/ 1	73	80	64	89	94	77	80	11
48/ 2	65	81	66	69	83	60	71	9.2
168/ 7	34	37	31	30 *	38	36	34	3.1
336/ 14	13	15 **	14 **	15 **	13 **	9.6 **	13	1.9
504/ 21	4.2	0.3 **	4.5 *	4.9 **	0.1 **	4.8 **	3.1	2.3
672/ 28	0.1 **	2.4 *	1.4 *	1.5 *	2.5	0.1 *	1.3	1.1

[0831] 表26:FcRn敲除小鼠中布雷奴单抗的血清浓度。在施用10mg/kg单次剂量静脉内注射剂至每组6只动物后测定血清浓度。形成中度和重度药物/ADA免疫复合物的ADA-阳性样品分别显示为*和**。

[0832]

时间 [h/d]	M 1 [μg/mL]	M 2 [μg/mL]	M 3 [μg/mL]	M 4 [μg/mL]	M 5 [μg/mL]	M 6 [μg/mL]	Mean [μg/mL]	SD [μg/mL]
0.08	192	181	200	187	186	178	187	8.0
2	86	79	74	91	89	91	85	7.1
8	31	32	36	31	29	33	32	2.3
24/ 1	6.7	12	7.9	11	6.9	8.0	8.7	2.1
48/ 2	1.8	2.3	2.7	2.6	2.4	2.2	2.3	0.3
168/ 7	b.l.q.	b.l.q.	b.l.q. **	b.l.q.	b.l.q. **	b.l.q.	b.l.q.	-
192/ 8	b.l.q. *	b.l.q. *	b.l.q. **	b.l.q. *	b.l.q. **	b.l.q. **	b.l.q.	-

[0833]

216/ 9	b.l.q. *	b.l.q.	b.l.q. **	b.l.q. **	b.l.q. *	b.l.q. **	b.l.q.	-
336/ 14	b.l.q.	b.l.q. **	b.l.q. *	b.l.q. **	b.l.q. **	b.l.q. *	b.l.q.	-

[0834] 表27:FcRn敲除小鼠中优特克单抗的血清浓度。在施用10mg/kg单次剂量静脉内注射剂至每组6只动物后测定血清浓度。

[0835]

时间 [h/d]	M 1 [μg/mL]	M 2 [μg/mL]	M 3 [μg/mL]	M 4 [μg/mL]	M 5 [μg/mL]	M 6 [μg/mL]	Mean [μg/mL]	SD [μg/mL]
0.08	209	221	229	228	220	219	221	7.4
2	153	164	158	155	157	149	156	4.8
8	80	95	88	96	104	95	93	8.0
24/ 1	50	47	37	44	38	37	42	5.5
48/ 2	16	16	17	13	11	14	15	2.2
168/ 7	0.4	0.6	0.4	0.3	0.6	0.4	0.5	0.1
192/ 8	0.5	0.2	0.1	0.1	0.2	0.4	0.2	0.2
216/ 9	b.l.q.	b.l.q.	b.l.q.	b.l.q.	b.l.q.	b.l.q.	b.l.q.	-
336/ 14	b.l.q.	b.l.q.	b.l.q.	b.l.q.	b.l.q.	b.l.q.	b.l.q.	-

[0836] 表28:FcRn敲除小鼠中mAb 9的血清浓度。在施用10mg/kg单次剂量静脉内注射剂至每组6只动物后测定血清浓度。形成中度和重度药物/ADA免疫复合物的ADA-阳性样品分别显示为*和**。

[0837]

时间 [h/d]	M 1 [μg/mL]	M 2 [μg/mL]	M 3 [μg/mL]	M 4 [μg/mL]	M 5 [μg/mL]	M 6 [μg/mL]	Mean [μg/mL]	SD [μg/mL]
0.08	249	292	232	214	242	226	242	27
2	119	130	139	136	123	129	129	7.3
8	62	65	74	80	83	87	75	10
24/ 1	31	37	37	32	35	36	35	2.6
48/ 2	16	15	17	12	13	16	15	1.9
168/ 7	0.2 *	0.4 **	0.5	0.5	0.5	0.3	0.4	0.1
192/ 8	0.2	0.1 **	0.2	0.1 **	0.1 **	0.2	0.2	0.2
216/ 9	b.l.q.	b.l.q. **	b.l.q. **	b.l.q.	b.l.q. *	b.l.q. **	b.l.q.	-
336/ 14	b.l.q. *	b.l.q. **	b.l.q.	b.l.q.	b.l.q. *	b.l.q.	b.l.q.	-

序 列 表

<110> 豪夫迈·罗氏有限公司

<120> 抗体体内半寿期的体外预测

<130> P32047-W0

<150> EP14161103.8

<151> 2014-03-21

<150> EP14165987.0

<151> 2014-04-25

<160> 45

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 445

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-IL-1R 抗体 IgG 1 HC

[0001]

<400> 1

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Leu Ser Leu Thr Ser Asn
20 25 30

Ser Ile Thr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Met
35 40 45

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

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Val Leu
65 70 75 80

Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Tyr Asn Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115 120 125

	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	
	130						135					140					
	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	
	145					150					155					160	
	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	
					165					170						175	
	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	
				180					185						190		
	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	
		195						200						205			
	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	
		210					215					220					
	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	
	225					230					235					240	
	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	
				245						250						255	
[0002]	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	
				260					265					270			
	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	
		275						280					285				
	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	
		290					295					300					
	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	
	305				310						315					320	
	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	
				325						330					335		
	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	
				340					345					350			
	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	
		355						360					365				
	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	
		370					375					380					
	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	
	385					390					395					400	

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

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

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

<210> 2

<211> 218

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-IL-1R 抗体 IgG 1 LC

<400> 2

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Asn Arg
20 25 30

[0003]

Gly Val Ser Tyr Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Gly Ser Asn Leu Ala Phe Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

Gly His Pro Asp Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

					165						170						175
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys		
			180						185				190				
His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro		
		195					200					205					
Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys								
	210					215											
<210>	3																
<211>	442																
<212>	PRT																
<213>	人工序列																
<220>																	
<223>	抗-IL-1R 抗体 IgG 4 HC																
<400>	3																
Gln	Leu	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Gln		
1				5					10					15			
[0004]	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Leu	Ser	Leu	Thr	Ser	Asn	
			20					25					30				
Ser	Ile	Thr	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Pro	Glu	Trp	Met		
	35					40						45					
Gly	Met	Ile	Trp	Ser	Asn	Gly	Asp	Thr	Asp	Tyr	Ser	Thr	Ser	Leu	Lys		
	50					55					60						
Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Val	Leu		
65					70					75					80		
Thr	Met	Thr	Asn	Met	Asp	Pro	Val	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala		
			85					90						95			
Arg	Tyr	Asn	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr		
		100						105					110				
Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro		
		115					120					125					
Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val		
	130					135					140						
Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala		
145					150					155					160		

	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	
					165					170						175	
	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	
				180						185						190	
	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	
				195					200						205		
	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser	Cys	
		210						215					220				
	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	
	225					230					235					240	
	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	
					245					250						255	
	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	
				260						265					270		
	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	
				275					280						285		
[0005]	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	
		290						295					300				
	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	
	305					310					315					320	
	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	
					325					330						335	
	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	
				340						345					350		
	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	
				355					360					365			
	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	
		370						375					380				
	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	
	385					390					395					400	
	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	
					405					410						415	
	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	
				420						425						430	

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 4

<211> 218

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-IL-1R 抗体 IgG 4 LC

<400> 4

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Asn Arg
20 25 30

Gly Val Ser Tyr Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Gly Ser Asn Leu Ala Phe Gly Val Pro Ser
50 55 60

[0006] Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

Gly His Pro Asp Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

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

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 5
<211> 107
<212> PRT
<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 5

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Trp Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
35 40 45

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
50 55 60

Glu Ser Thr Tyr Arg Trp Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
65 70 75 80

[0007]

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
85 90 95

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
100 105

<210> 6
<211> 106
<212> PRT
<213> 人

<400> 6

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1 5 10 15

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
100 105

<210> 7

<211> 227

<212> PRT

<213> 人

<400> 7

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

[0008] Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 8

<211> 326

<212> PRT

<213> 人

<400> 8

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

[0009]

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

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

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp

	180	185	190
	Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro		
	195	200	205
	Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu		
	210	215	220
	Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn		
	225	230	235 240
	Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile		
	245	250	255
	Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr		
	260	265	270
	Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys		
	275	280	285
	Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys		
	290	295	300
	Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu		
	305	310	315 320
[0010]	Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
	325		
	<210> 9		
	<211> 377		
	<212> PRT		
	<213> 人		
	<400> 9		
	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg		
	1	5	10 15
	Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr		
	20	25	30
	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		
	35	40	45
	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser		
	50	55	60
	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr		
	65	70	75 80

	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	
					85					90					95		
	Arg	Val	Glu	Leu	Lys	Thr	Pro	Leu	Gly	Asp	Thr	Thr	His	Thr	Cys	Pro	
				100					105						110		
	Arg	Cys	Pro	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Thr	Pro	Pro	Pro	Cys	Pro	Arg	
			115						120						125		
	Cys	Pro	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Thr	Pro	Pro	Pro	Cys	Pro	Arg	Cys	
		130						135					140				
	Pro	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Thr	Pro	Pro	Pro	Cys	Pro	Arg	Cys	Pro	
	145					150					155					160	
	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	
				165						170						175	
	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	
				180						185						190	
	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Lys	Trp	Tyr	
				195					200					205			
[0011]	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	
		210						215					220				
	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	
	225					230					235					240	
	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	
				245						250					255		
	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	
				260					265						270		
	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	
				275					280					285			
	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	
		290					295					300					
	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Ser	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	
	305					310					315					320	
	Tyr	Asn	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	
				325						330					335		
	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Ile	
				340					345					350			

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
355 360 365

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375

<210> 10

<211> 229

<212> PRT

<213> 人

<400> 10

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe
1 5 10 15

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
35 40 45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
50 55 60

[0012]

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
100 105 110

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
115 120 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
130 135 140

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

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
180 185 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser

	195	200	205
	Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser		
	210	215	220
	Leu Ser Leu Gly Lys		
	225		
	<210> 11		
	<211> 227		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 人 IgG1 Fc 区衍生的具有下述突变的 Fc 区多肽: L234A, L235A		
	<400> 11		
	Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly		
	1	5	10 15
	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met		
	20	25	30
[0013]	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His		
	35	40	45
	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
	50	55	60
	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
	65	70	75 80
	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
	85	90	95
	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile		
	100	105	110
	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
	115	120	125
	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser		
	130	135	140
	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
	145	150	155 160
	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
	165	170	175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 12

<211> 227

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人 IgG1 Fc 区衍生的具有下述突变的 Fc 区多肽: Y349C, T366S, L368A 和 Y407V

<400> 12

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

[0014] Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 13

<211> 227

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人 IgG1 Fc 区衍生的具有下述突变的 Fc 区多肽: S354C, T366W

<400> 13

[0015]

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

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

<210> 14
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0016] <220>
 <223> 人 IgG1 Fc 区衍生的具有下述突变的 Fc 区多肽: L234A, L235A 和 Y349C, T366S, L368A, Y407V

<400> 14

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

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

[0017]

<210> 15

<211> 227

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人 IgG1 Fc 区衍生的具有下述突变的 Fc 区多肽: L234A, L235A 和 S354C, T366W

<400> 15

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

	85	90	95
	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile		
	100	105	110
	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
	115	120	125
	Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser		
	130	135	140
	Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
	145	150	155
	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
	165	170	175
	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		
	180	185	190
	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
	195	200	205
	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
	210	215	220
[0018]	Pro Gly Lys		
	225		
	<210> 16		
	<211> 227		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 人 IgG1 Fc 区衍生的具有下述突变的 Fc 区多肽: P329G		
	<400> 16		
	Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly		
	1	5	10
	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met		
	20	25	30
	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His		
	35	40	45
	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
	50	55	60

	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	
	65					70					75					80	
	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	
					85					90					95		
	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	
				100					105					110			
	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	
			115					120					125				
	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	
		130					135					140					
	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	
	145				150						155					160	
	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	
				165					170						175		
	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	
			180					185						190			
[0019]	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	
		195					200						205				
	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	
		210					215					220					
	Pro	Gly	Lys														
	225																
	<210>	17															
	<211>	227															
	<212>	PRT															
	<213>	人工序列															
	<220>																
	<223>	人 IgG1 Fc 区衍生的具有下述突变的 Fc 区多肽: L234A, L235A 和 P329G															
	<400>	17															
	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	
	1				5					10					15		
	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	
				20					25					30			
	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	
			35					40					45				

	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val	
	50 55 60	
	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr	
	65 70 75 80	
	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly	
	85 90 95	
	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile	
	100 105 110	
	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val	
	115 120 125	
	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser	
	130 135 140	
	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu	
	145 150 155 160	
	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro	
	165 170 175	
[0020]	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val	
	180 185 190	
	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met	
	195 200 205	
	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser	
	210 215 220	
	Pro Gly Lys	
	225	
	<210> 18	
	<211> 227	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人 IgG1 Fc 区衍生的具有下述突变的 Fc 区多肽: P239G 和 Y349C, T366S, L368A, Y407V	
	<400> 18	
	Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly	
	1 5 10 15	

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

[0021]

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 19

<211> 227

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人 IgG1 Fc 区衍生的具有下述突变的 Fc 区多肽: P329G 和 S354C, T366W

<400> 19

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

[0022]

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 20

<211> 227

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人 IgG1 Fc 区衍生的具有下述突变的 Fc 区多肽: L234A, L235A, P329G 和 Y349C, T366S, L368A, Y407V

<400> 20

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

[0023]

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 21
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人 IgG1 Fc 区衍生的具有下述突变的 Fc 区多肽: L234A, L235A, P329G 和 S354C, T366W

<400> 21

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60

[0024] His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
 100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 22

<211> 229

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人 IgG4 Fc 区衍生的具有下述突变的 Fc 区多肽: S228P 和 L235E

<400> 22

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
1 5 10 15

Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
35 40 45

[0025] Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
100 105 110

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
115 120 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
130 135 140

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

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu

	180	185	190
	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser		
	195	200	205
	Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser		
	210	215	220
	Leu Ser Leu Gly Lys		
	225		
	<210> 23		
	<211> 229		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 人 IgG4 Fc 区衍生的具有下述突变的 Fc 区多肽: S228P, L235E 和 P329G		
	<400> 23		
	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe		
	1	5	10
[0026]	Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr		
	20	25	30
	Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		
	35	40	45
	Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		
	50	55	60
	Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser		
	65	70	75
	Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu		
	85	90	95
	Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Gly Ser		
	100	105	110
	Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro		
	115	120	125
	Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln		
	130	135	140
	Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala		
	145	150	155
			160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
180 185 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
195 200 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
210 215 220

Leu Ser Leu Gly Lys
225

<210> 24

<211> 229

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人 IgG4 Fc 区衍生的具有下述突变的 Fc 区多肽: S354C, T366W

<400> 24

[0027] Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe
1 5 10 15

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
35 40 45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
100 105 110

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
115 120 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
130 135 140

Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
145 150 155 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
180 185 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
195 200 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
210 215 220

Leu Ser Leu Gly Lys
225

<210> 25

<211> 229

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0028]

<223> 人 IgG4 Fc 区衍生的具有下述突变的 Fc 区多肽： Y349C, T366S, L368A, Y407V

<400> 25

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe
1 5 10 15

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
35 40 45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
100 105 110

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro

	115	120	125
	Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln		
	130	135	140
	Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala		
	145	150	155 160
	Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr		
	165	170	175
	Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Arg Leu		
	180	185	190
	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser		
	195	200	205
	Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser		
	210	215	220
	Leu Ser Leu Gly Lys		
	225		
[0029]	<210>	26	
	<211>	229	
	<212>	PRT	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人 IgG4 Fc 区衍生的具有下述突变的 Fc 区多肽： S228P, L235E 和 S354C, T366W	
	<400>	26	
	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe		
	1	5	10 15
	Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr		
	20	25	30
	Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		
	35	40	45
	Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		
	50	55	60
	Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser		
	65	70	75 80
	Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu		
	85	90	95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
100 105 110

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
115 120 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
130 135 140

Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
145 150 155 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
180 185 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
195 200 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
210 215 220

[0030] Leu Ser Leu Gly Lys
225

<210> 27

<211> 229

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人 IgG4 Fc 区衍生的具有下述突变的 Fc 区多肽: S228P, L235E 和 Y349C, T366S, L368A, Y407V

<400> 27

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
1 5 10 15

Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
35 40 45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser

65	70	75	80
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu			
	85	90	95
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser			
	100	105	110
Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro			
	115	120	125
Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln			
	130	135	140
Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala			
	145	150	155
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr			
	165	170	175
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Arg Leu			
	180	185	190
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser			
	195	200	205
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser			
	210	215	220
Leu Ser Leu Gly Lys			
225			
<210> 28			
<211> 229			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人 IgG4 Fc 区衍生的具有下述突变的 Fc 区多肽: P329G			
<400> 28			
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe			
1	5	10	15
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr			
	20	25	30
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val			
	35	40	45

[0031]

	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	
	50						55					60					
	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	
	65					70				75					80		
	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	
					85					90					95		
	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Gly	Ser	
				100					105					110			
	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	
		115						120					125				
	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	
	130					135						140					
	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	
	145					150					155				160		
	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	
					165					170					175		
[0032]	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	
				180					185						190		
	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	
		195						200					205				
	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	
		210						215					220				
	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys												
	225																
	<210>	29															
	<211>	229															
	<212>	PRT															
	<213>	人工序列															
	<220>																
	<223>	人 IgG4 Fc 区衍生的具有下述突变的 Fc 区多肽: P239G 和 Y349C, T366S, L368A, Y407V															
	<400>	29															
	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	
	1				5					10					15		
	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	

	20	25	30
	Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		
	35	40	45
	Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		
	50	55	60
	Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser		
	65	70	75 80
	Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu		
	85	90	95
	Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Gly Ser		
	100	105	110
	Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro		
	115	120	125
	Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln		
	130	135	140
	Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala		
[0033]	145	150	155 160
	Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr		
	165	170	175
	Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Arg Leu		
	180	185	190
	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser		
	195	200	205
	Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser		
	210	215	220
	Leu Ser Leu Gly Lys		
	225		
	<210>	30	
	<211>	229	
	<212>	PRT	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人 IgG4 Fc 区衍生的具有下述突变的 Fc 区多肽： P329G 和 S354C, T366W	
	<400>	30	

	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	
	1				5					10					15		
	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	
				20				25						30			
	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	
			35					40					45				
	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	
	50						55					60					
	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	
	65					70					75					80	
	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	
				85						90					95		
	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Gly	Ser	
				100					105					110			
	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	
				115				120					125				
[0034]	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	
	130					135						140					
	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	
	145					150					155					160	
	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	
				165						170					175		
	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	
				180					185						190		
	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	
				195				200					205				
	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	
		210					215					220					
	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys												
	225																
	<210>	31															
	<211>	229															
	<212>	PRT															
	<213>	人工序列															
	<220>																

<223> 人 IgG4 Fc 区衍生的具有下述突变的 Fc 区多肽: S228P, L235E, P329G 和 Y349C, T366S, L368A, Y407V

<400> 31

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
1 5 10 15

Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
35 40 45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Gly Ser
100 105 110

[0035]

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
115 120 125

Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
130 135 140

Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
145 150 155 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Arg Leu
180 185 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
195 200 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
210 215 220

Leu Ser Leu Gly Lys
225

<210> 32

<211> 229

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人 IgG4 Fc 区衍生的具有下述突变的 Fc 区多肽: S228P, L235E, P329G 和 S354C, T366W

<400> 32

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
1 5 10 15

Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
35 40 45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
65 70 75 80

[0036] Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Gly Ser
100 105 110

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
115 120 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
130 135 140

Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
145 150 155 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
180 185 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
195 200 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
210 215 220

Leu Ser Leu Gly Lys
225

<210> 33
<211> 274
<212> PRT
<213> 人

<400> 33

Ala Glu Ser His Leu Ser Leu Leu Tyr His Leu Thr Ala Val Ser Ser
1 5 10 15

Pro Ala Pro Gly Thr Pro Ala Phe Trp Val Ser Gly Trp Leu Gly Pro
20 25 30

Gln Gln Tyr Leu Ser Tyr Asn Ser Leu Arg Gly Glu Ala Glu Pro Cys
35 40 45

Gly Ala Trp Val Trp Glu Asn Gln Val Ser Trp Tyr Trp Glu Lys Glu
50 55 60

Thr Thr Asp Leu Arg Ile Lys Glu Lys Leu Phe Leu Glu Ala Phe Lys
65 70 75 80

[0037]

Ala Leu Gly Gly Lys Gly Pro Tyr Thr Leu Gln Gly Leu Leu Gly Cys
85 90 95

Glu Leu Gly Pro Asp Asn Thr Ser Val Pro Thr Ala Lys Phe Ala Leu
100 105 110

Asn Gly Glu Glu Phe Met Asn Phe Asp Leu Lys Gln Gly Thr Trp Gly
115 120 125

Gly Asp Trp Pro Glu Ala Leu Ala Ile Ser Gln Arg Trp Gln Gln Gln
130 135 140

Asp Lys Ala Ala Asn Lys Glu Leu Thr Phe Leu Leu Phe Ser Cys Pro
145 150 155 160

His Arg Leu Arg Glu His Leu Glu Arg Gly Arg Gly Asn Leu Glu Trp
165 170 175

Lys Glu Pro Pro Ser Met Arg Leu Lys Ala Arg Pro Ser Ser Pro Gly
180 185 190

Phe Ser Val Leu Thr Cys Ser Ala Phe Ser Phe Tyr Pro Pro Glu Leu
195 200 205

Gln Leu Arg Phe Leu Arg Asn Gly Leu Ala Ala Gly Thr Gly Gln Gly

210	215	220
Asp Phe Gly Pro Asn Ser Asp Gly Ser Phe His Ala Ser Ser Ser Leu		
225	230	235 240
Thr Val Lys Ser Gly Asp Glu His His Tyr Cys Cys Ile Val Gln His		
	245	250 255
Ala Gly Leu Ala Gln Pro Leu Arg Val Glu Leu Glu Ser Pro Ala Lys		
	260	265 270
Ser Ser		

<210> 34
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> HIS-AVITAG

 <400> 34

[0038]

His His His His His His Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys
1 5 10 15
Ile Glu Trp His Glu
20
<210> 35
<211> 99
<212> PRT
<213> 人
<400> 35
Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg His Pro Ala Glu
1 5 10 15
Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser Gly Phe His Pro
20 25 30
Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu Arg Ile Glu Lys
35 40 45
Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Leu
50 55 60
Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp Glu Tyr Ala Cys
65 70 75 80

Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile Val Lys Trp Asp
85 90 95

Arg Asp Met

<210> 36

<211> 450

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-HER2 抗体 IgG1 HC

<400> 36

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

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

[0039]

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

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

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

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

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

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

	180	185	190
	Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys		
	195	200	205
	Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp		
	210	215	220
	Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly		
	225	230	235 240
	Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile		
	245	250	255
	Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu		
	260	265	270
	Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
	275	280	285
	Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg		
	290	295	300
	Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys		
	305	310	315 320
[0040]	Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu		
	325	330	335
	Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr		
	340	345	350
	Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		
	355	360	365
	Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp		
	370	375	380
	Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val		
	385	390	395 400
	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp		
	405	410	415
	Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His		
	420	425	430
	Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
	435	440	445
	Gly Lys		

450

<210> 37

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-HER2 抗体 IgG1 LC

<400> 37

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

[0041]

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 38

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-HER2 抗体 IgG4 HC

<400> 38

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

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

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

[0042] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

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

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

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

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

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

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

	Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro	
	210	215 220
	Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val	
	225	230 235 240
	Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr	
		245 250 255
	Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu	
		260 265 270
	Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys	
		275 280 285
	Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser	
		290 295 300
	Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys	
	305	310 315 320
	Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile	
		325 330 335
[0043]	Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro	
		340 345 350
	Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu	
		355 360 365
	Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn	
		370 375 380
	Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser	
	385	390 395 400
	Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg	
		405 410 415
	Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu	
		420 425 430
	His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys	
		435 440 445
	<210>	39
	<211>	214
	<212>	PRT
	<213>	人工序列

<220>

<223> 抗-HER2 抗体 IgG4 LC

<400> 39

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

[0044]

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 40

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 布雷奴单抗的重链可变区的氨基酸序列 (CJ-695, ABT-874).

<400> 40

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

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

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

Ala Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Lys Thr His Gly Ser His Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr
100 105 110

[0045]

Val Ser Ser
115

<210> 41

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 布雷奴单抗的轻链可变区的氨基酸序列 (J-695, ABT-874).

<400> 41

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

Thr Val Lys Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Tyr Asn Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Arg Tyr Thr
85 90 95

His Pro Ala Leu Leu Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 42

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 优特克单抗的重链可变区的氨基酸序列 (CTN0-1275)

<400> 42

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Thr Tyr
20 25 30

[0046]

Trp Leu Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Ile
35 40 45

Gly Ile Met Ser Pro Val Asp Ser Asp Ile Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

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

Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Arg Pro Gly Gln Gly Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 43

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 优特克单抗的轻链可变区的氨基酸序列 (CTN0-1275)

<400> 43

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 44

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 贝伐单抗重链可变结构域(Drug 库 DB00112)

<400> 44

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

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

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

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

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

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

[0047]

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

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

<210> 45

<211> 104

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 贝伐单抗轻链可变结构域(Drug 库 DB00112)

<400> 45

[0048]

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
100

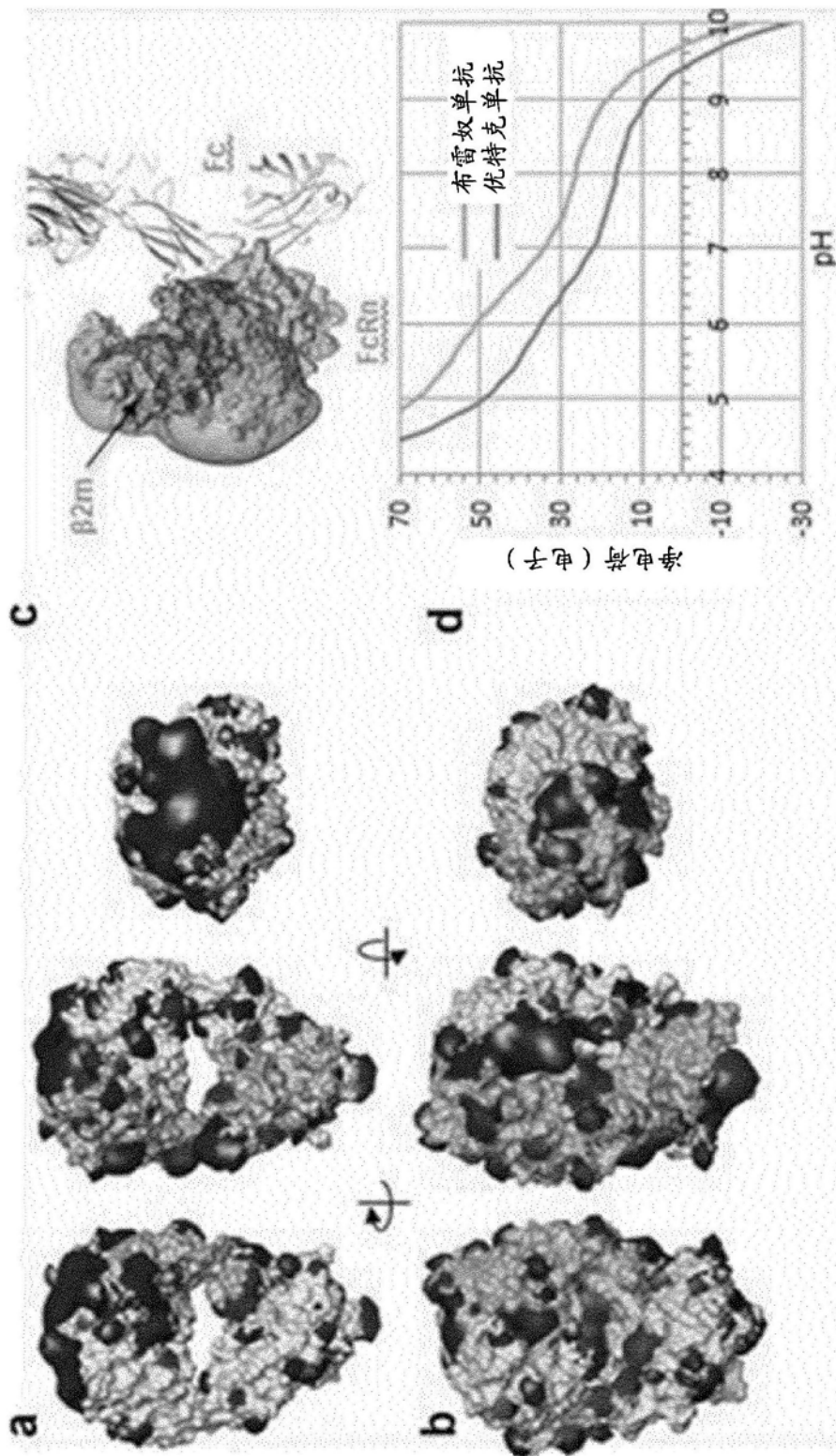


图1

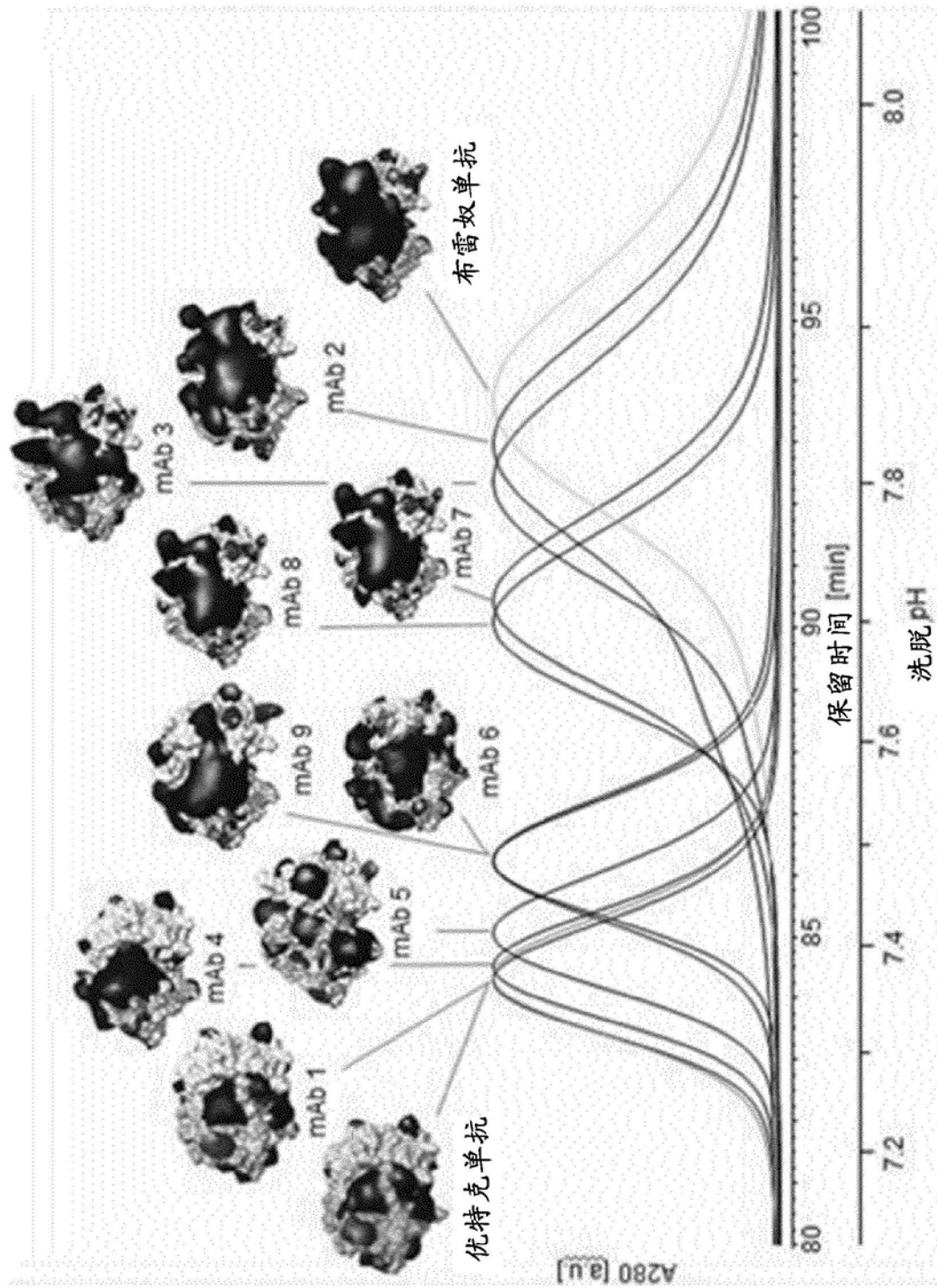


图2

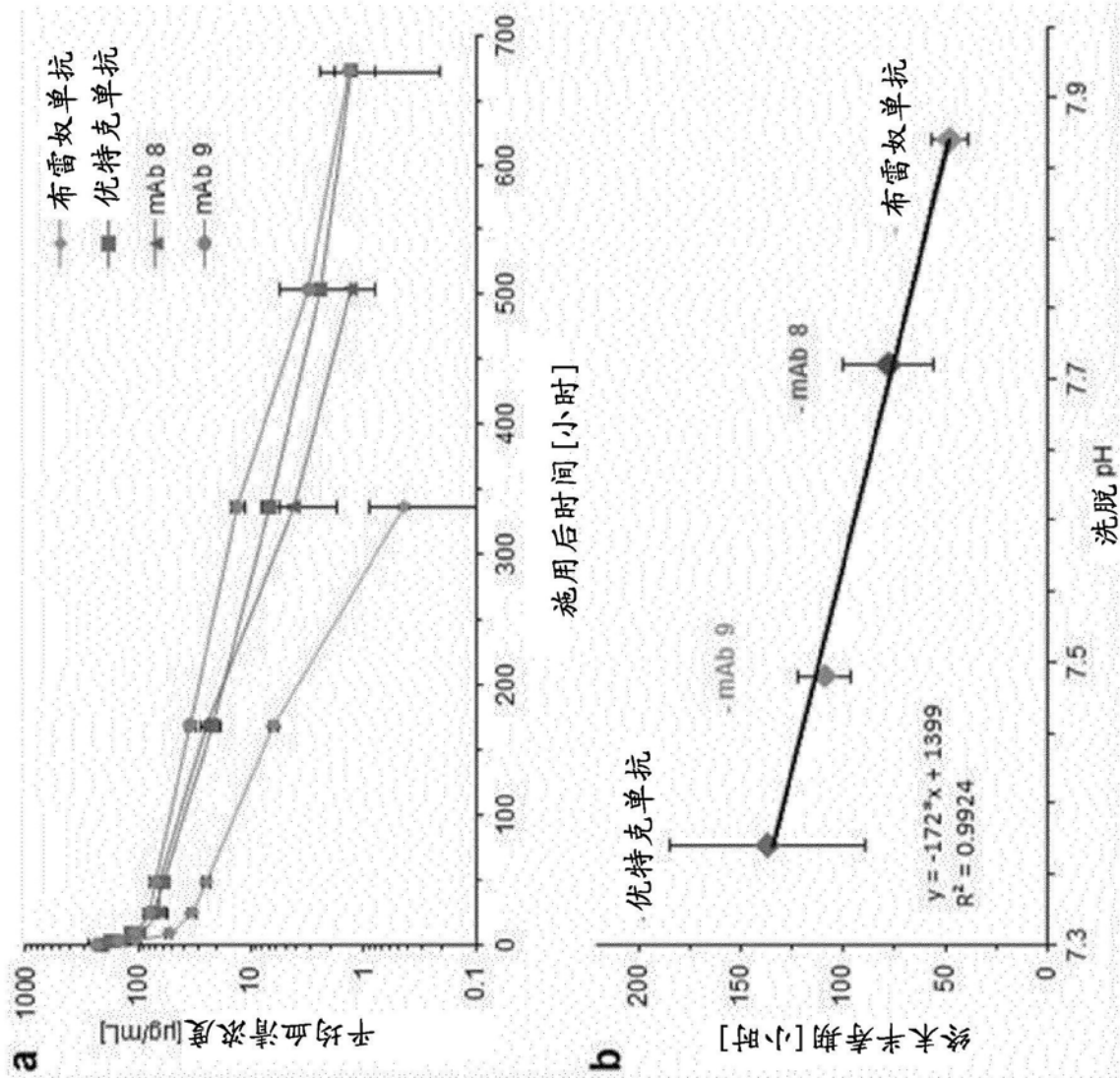


图3

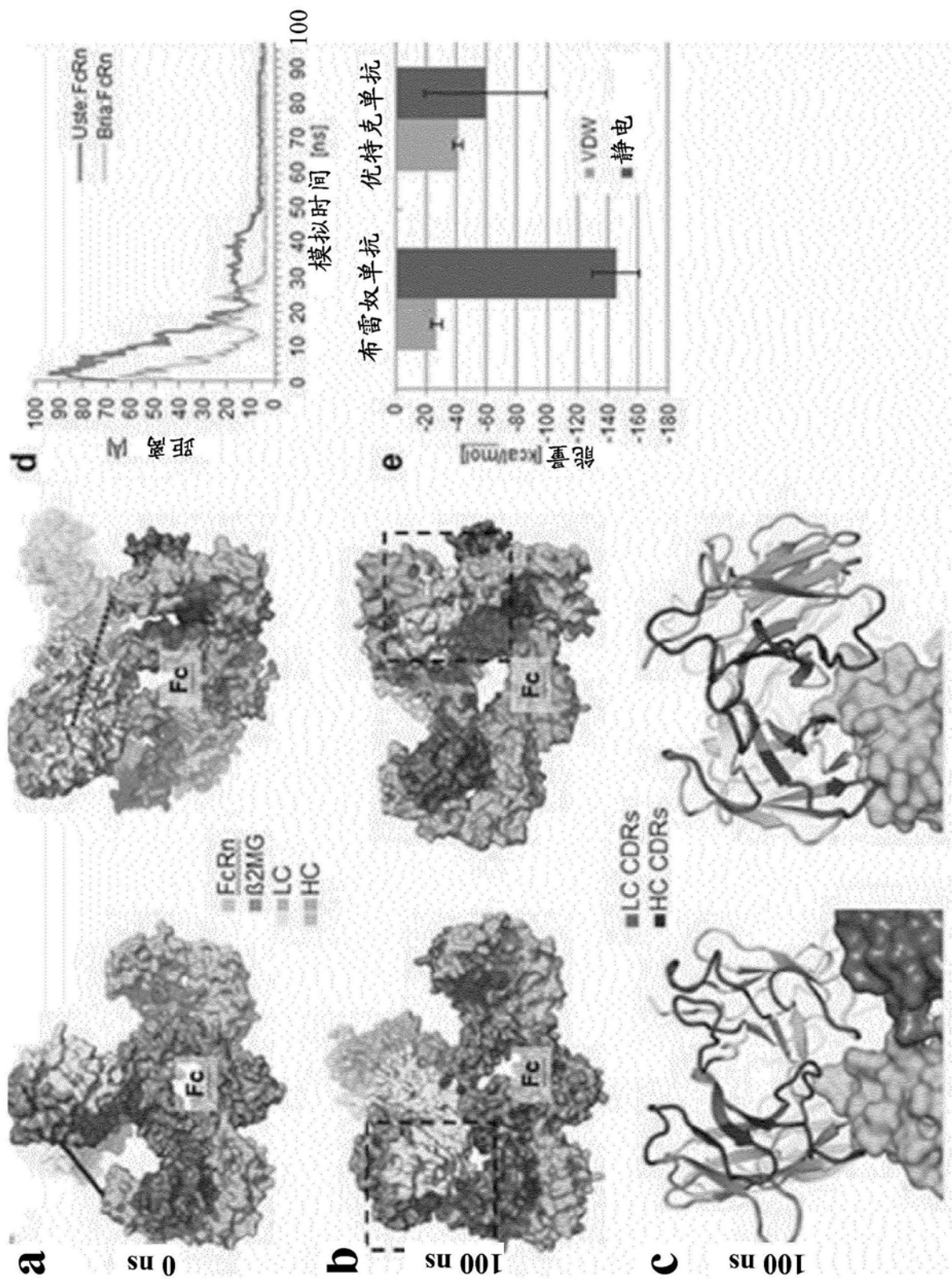


图4

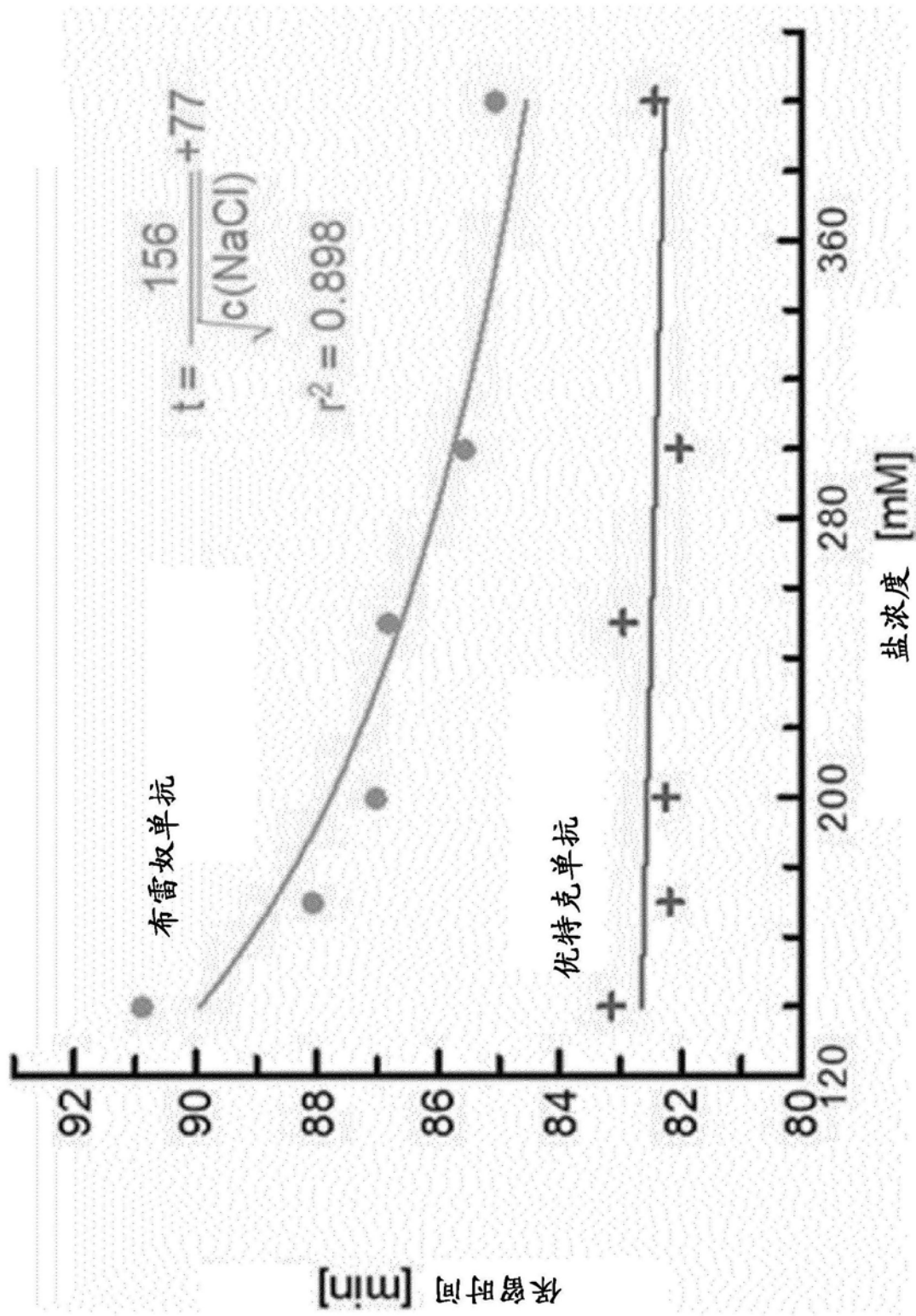


图6

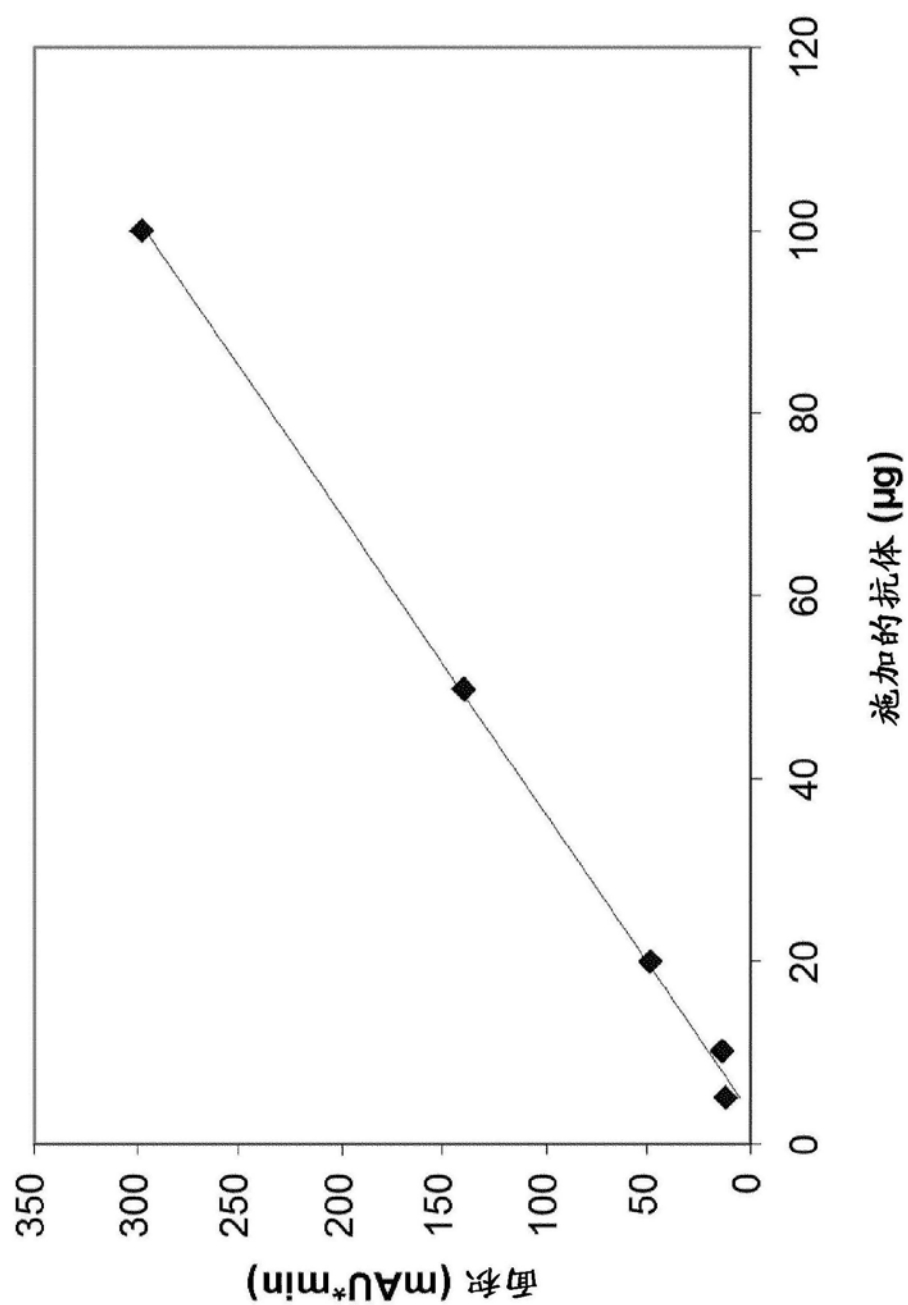


图7

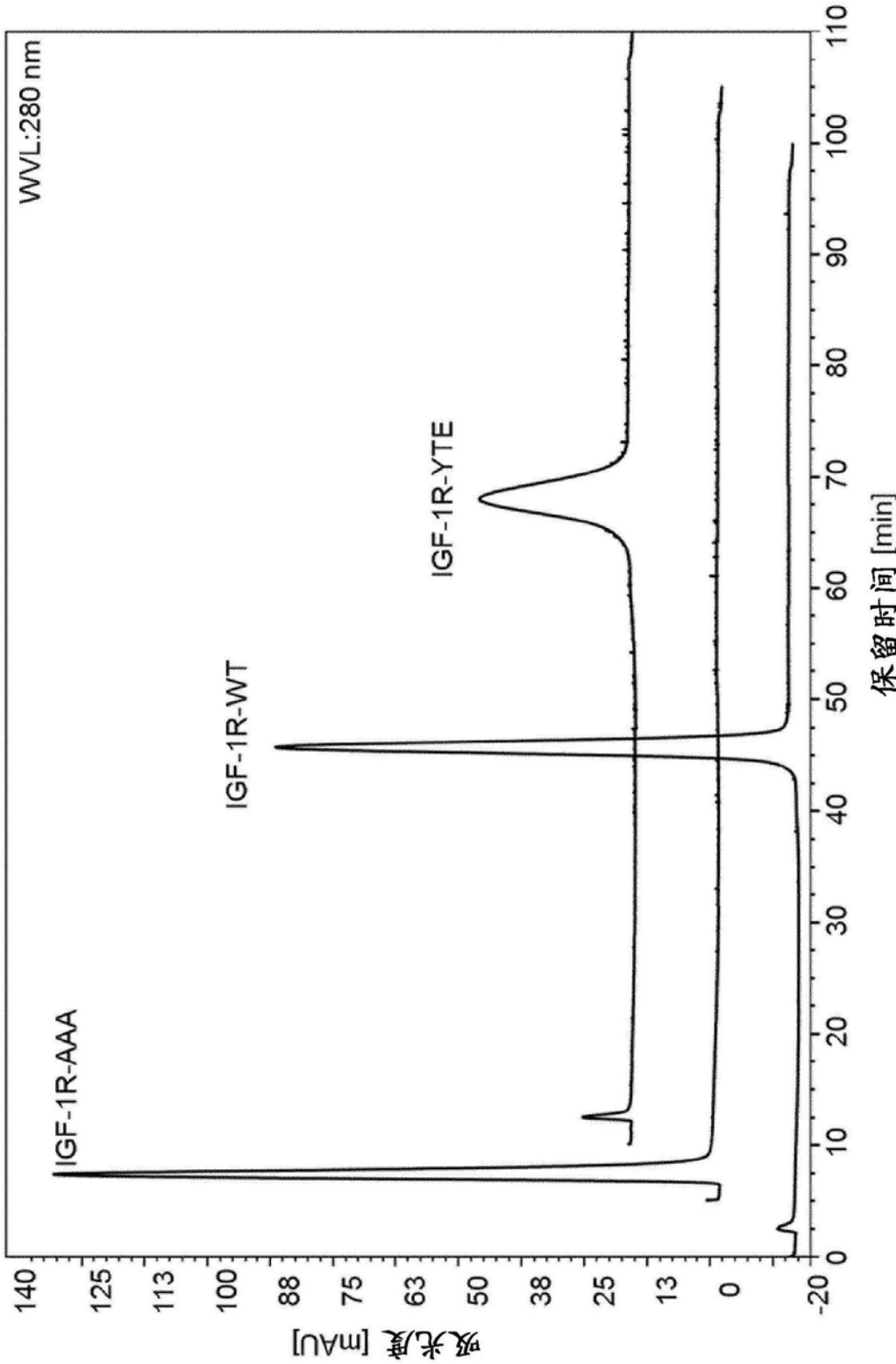


图8

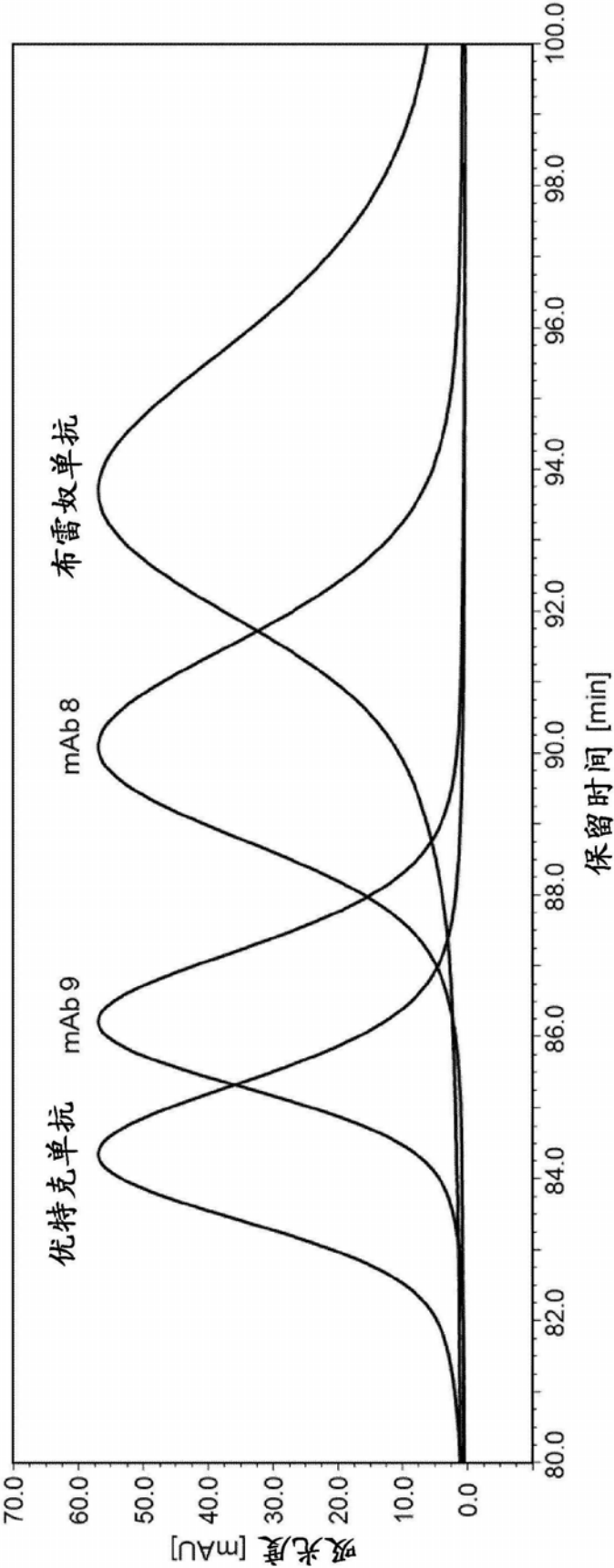


图9

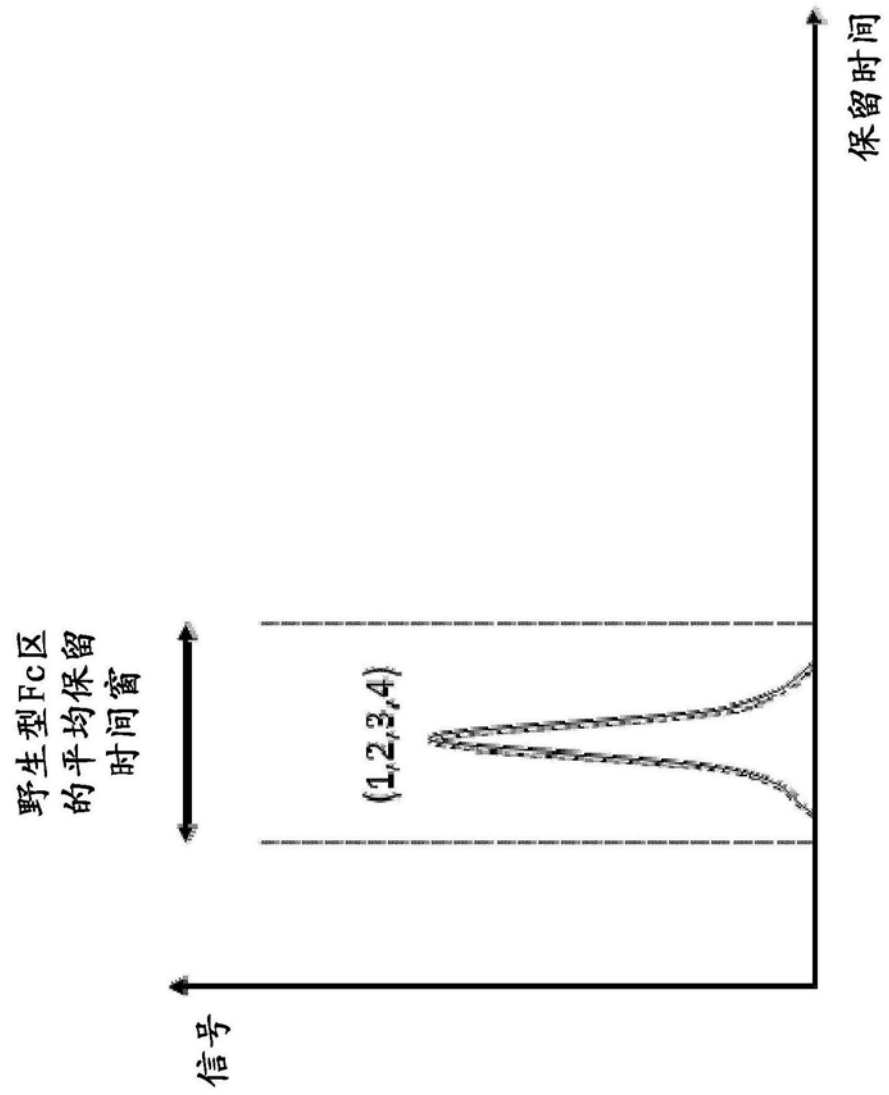


图10A

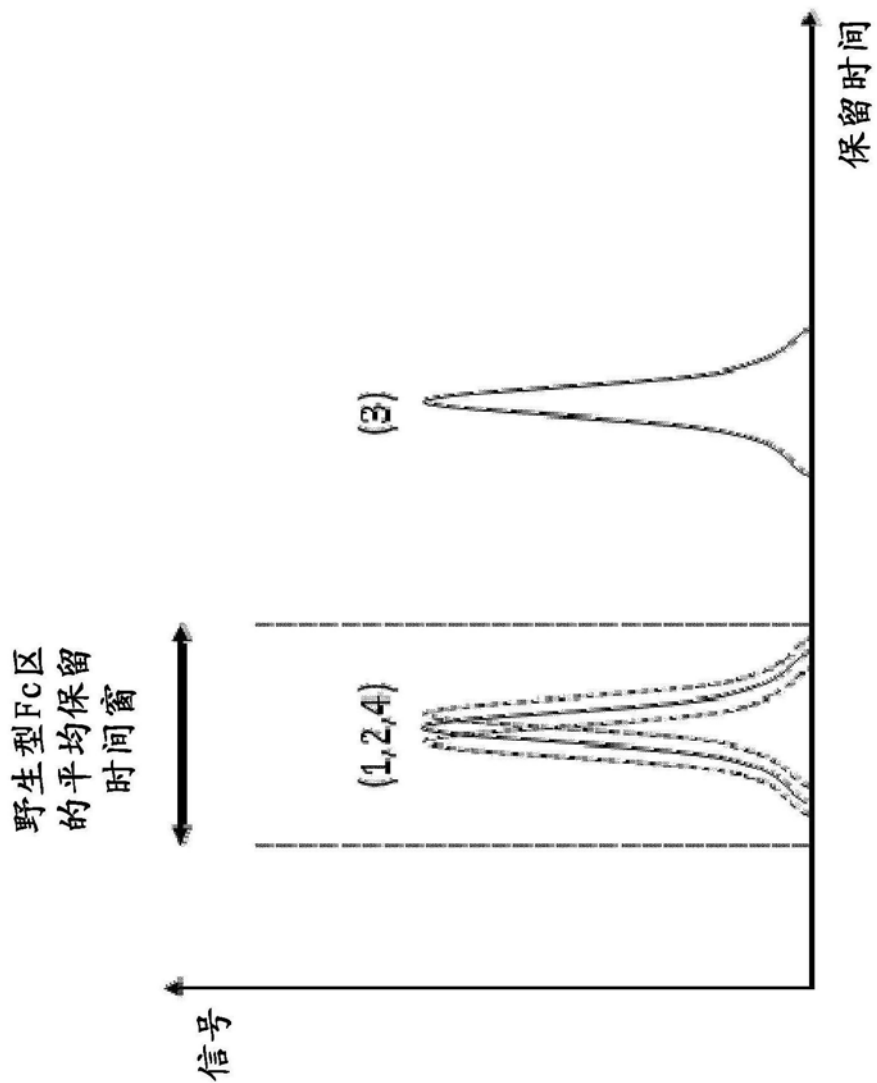


图10B

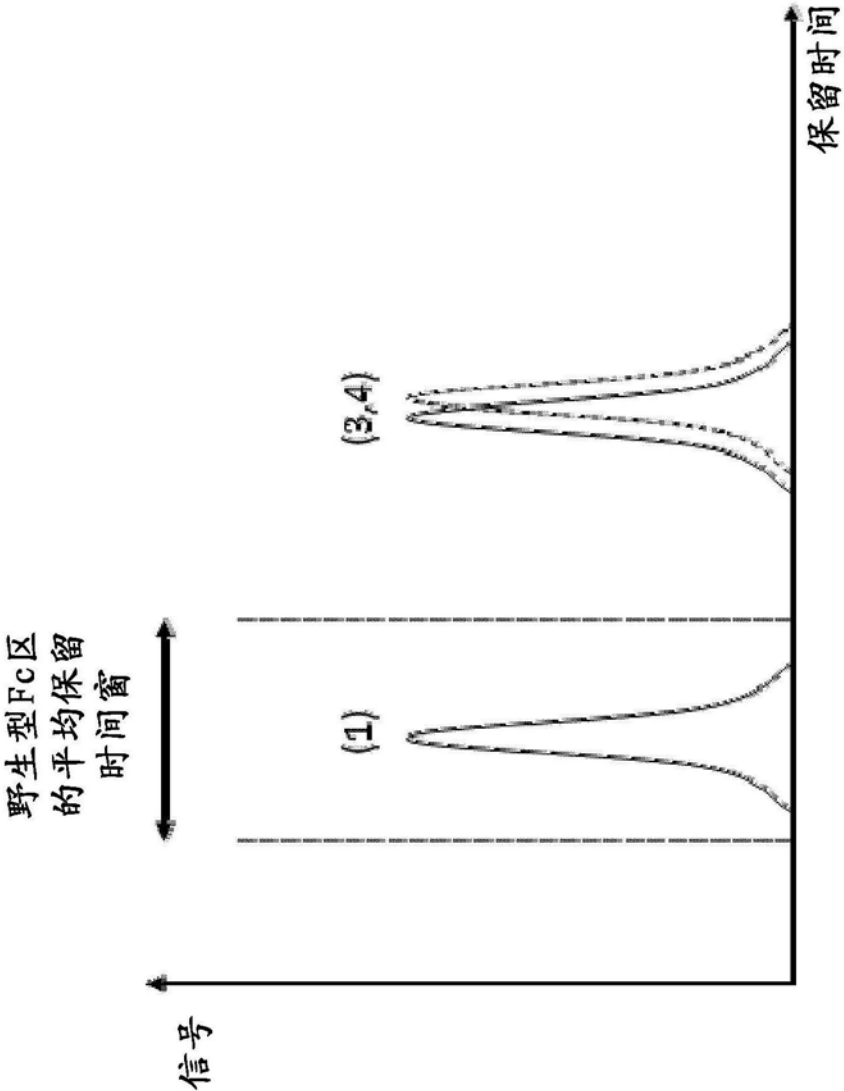


图10C

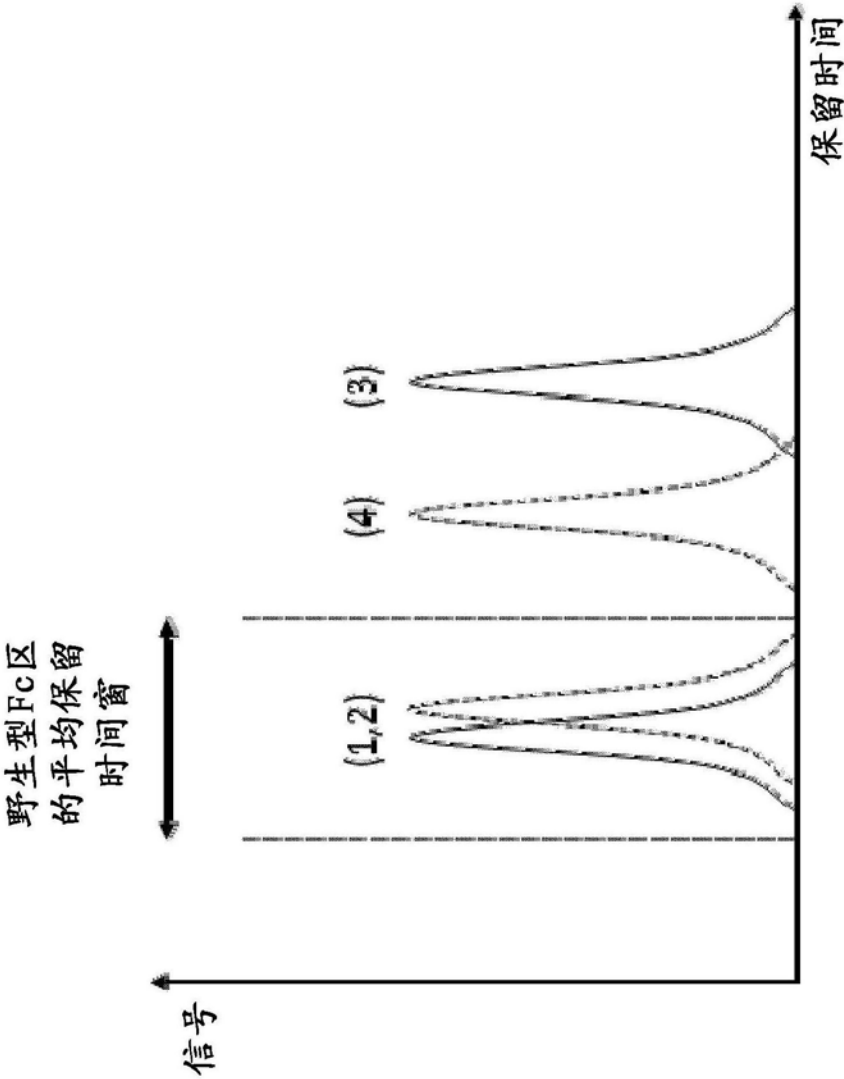


图10D

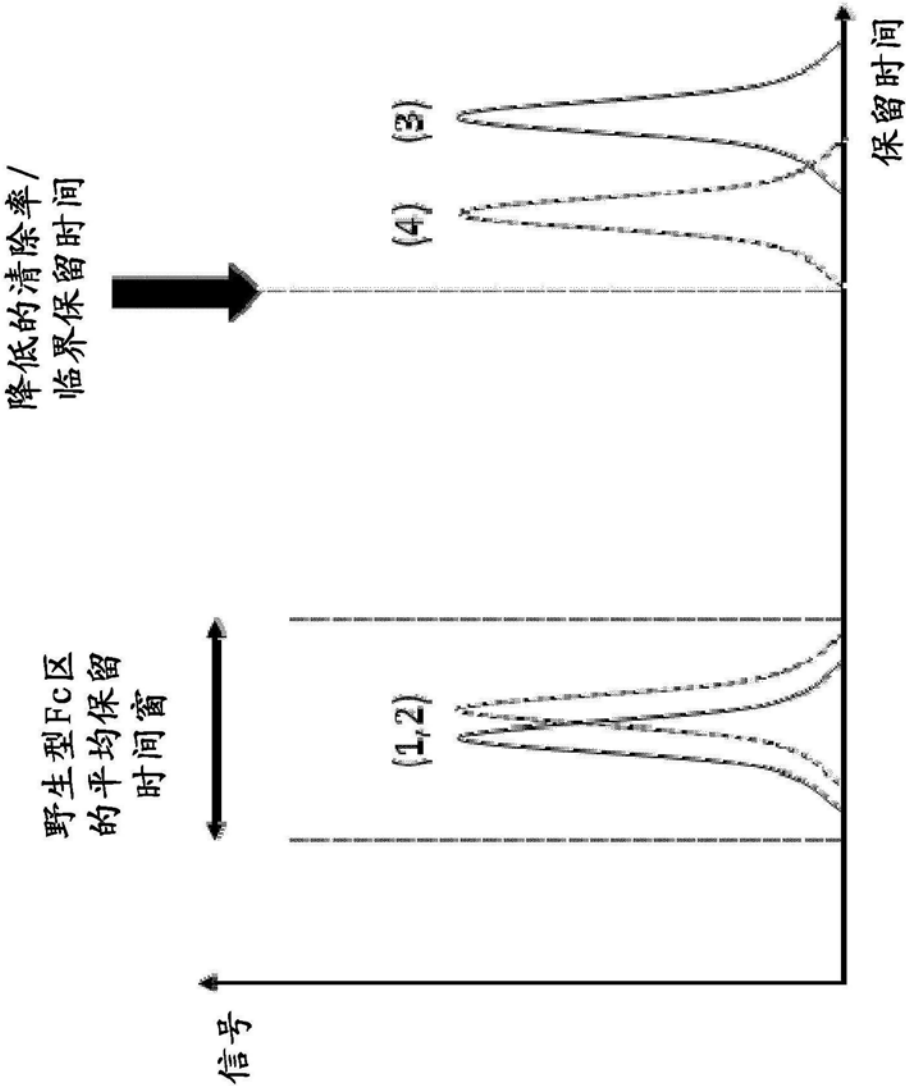


图11

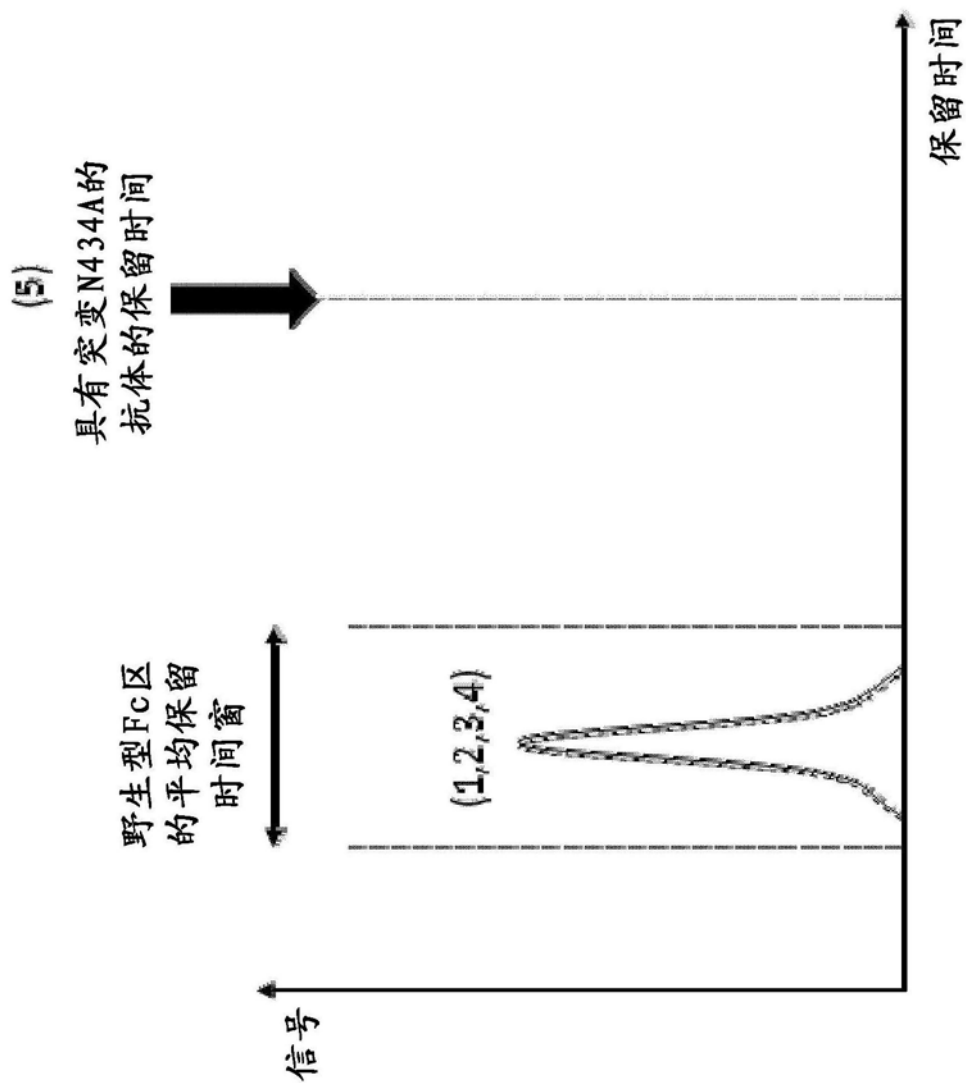


图12A

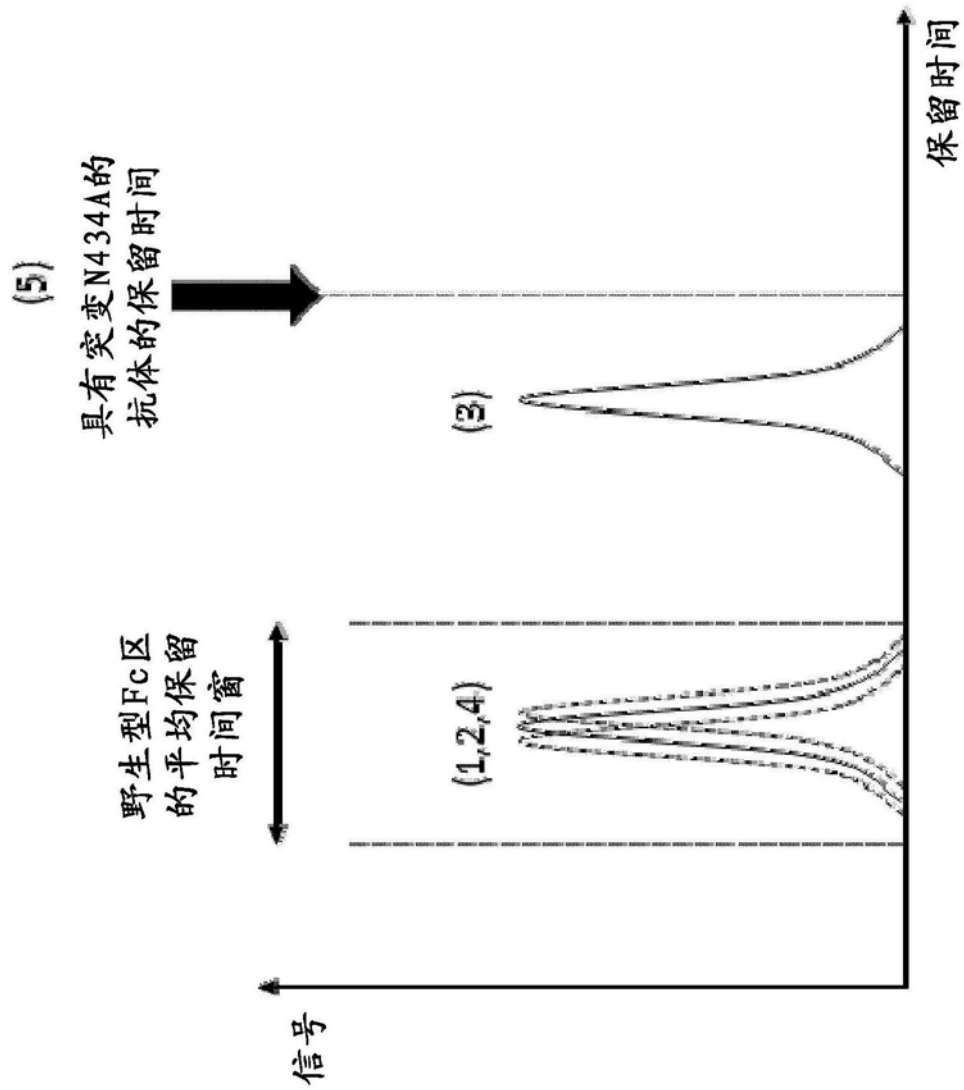


图12B

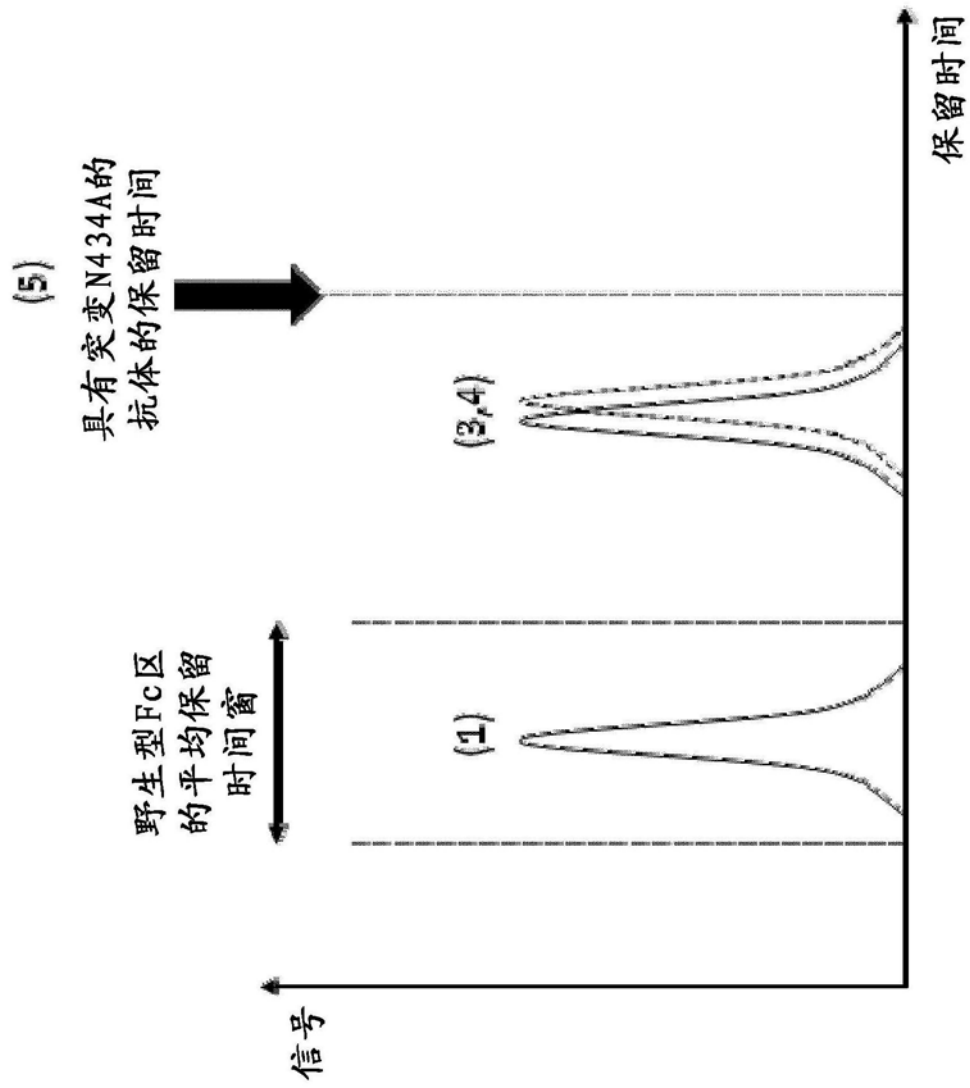


图12C

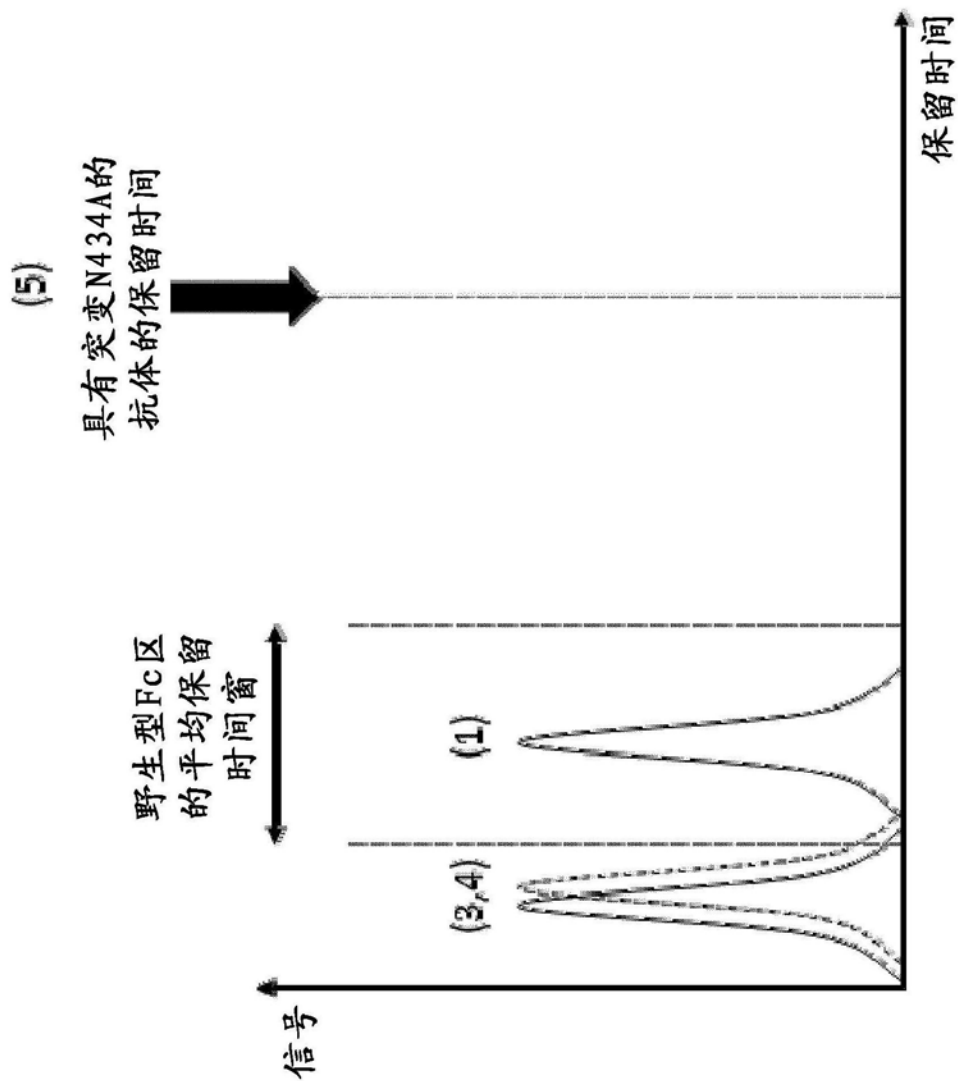


图12D

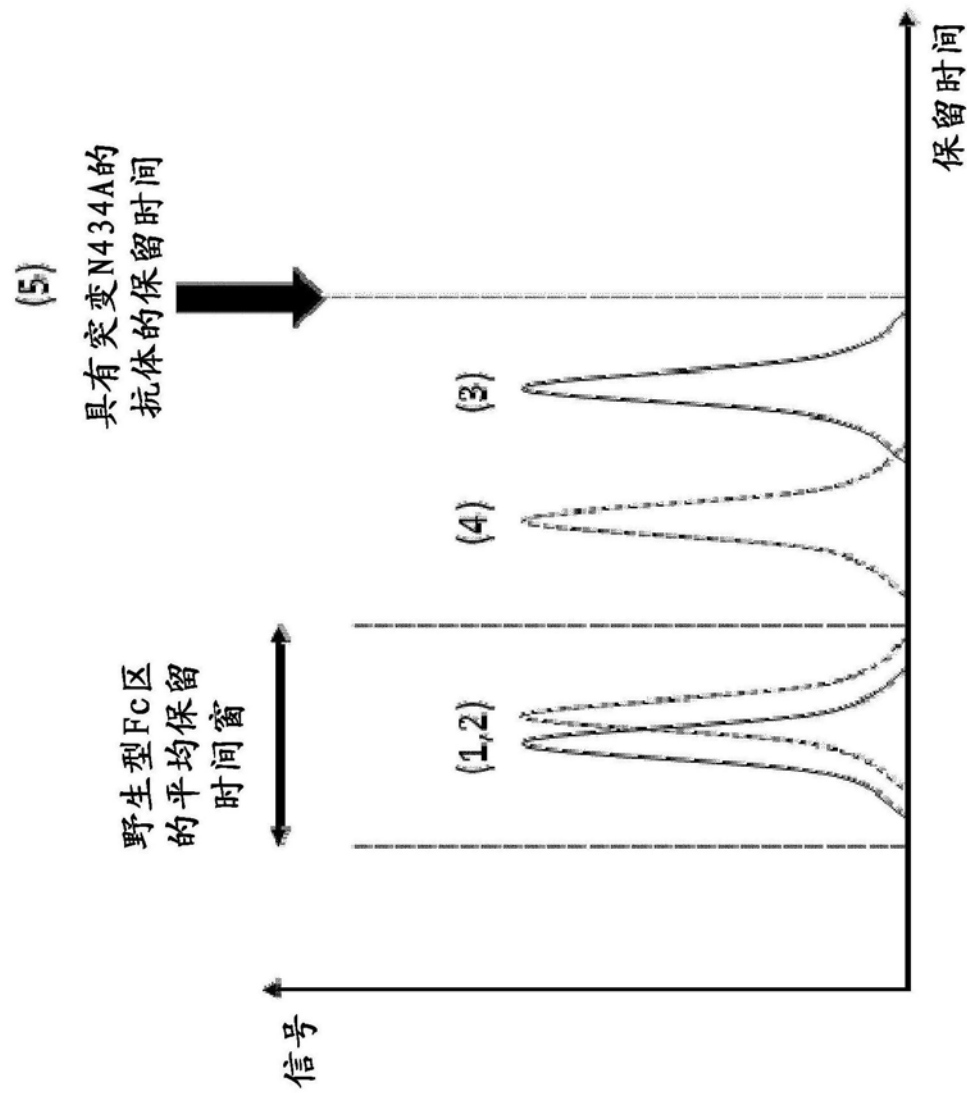


图12E

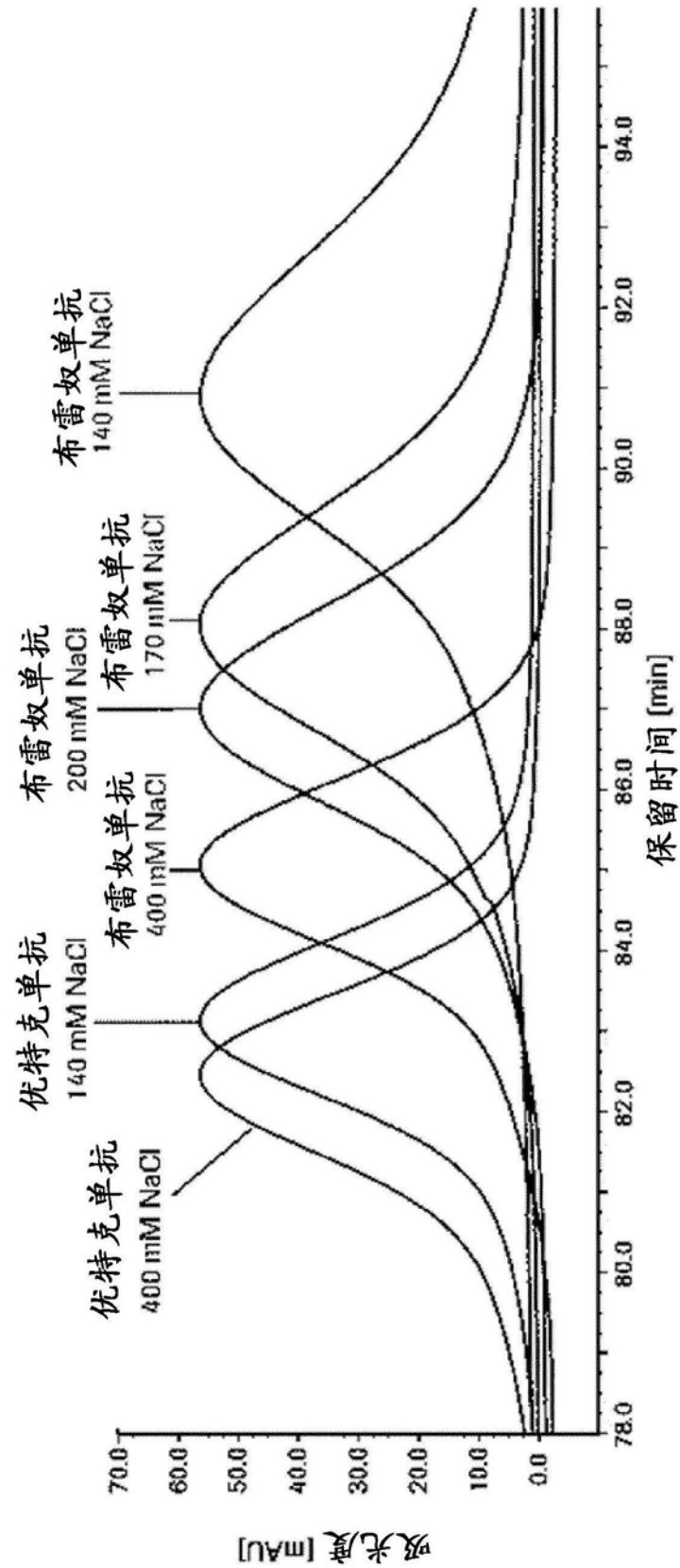


图13

贝伐单抗
贝伐单抗变体

DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT I TCSASQDIS NYLNWYQOKP TSSLHSGVPS
DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT I TCSASQKIS NYLNWYQOKP TSSKHSGVPS

贝伐单抗
贝伐单抗变体

RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYCCQ YSTVPWTFGQ GTRVEIKRIV
RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYCCQ YSKVPWTFGQ GTRVEIKRIV

图14

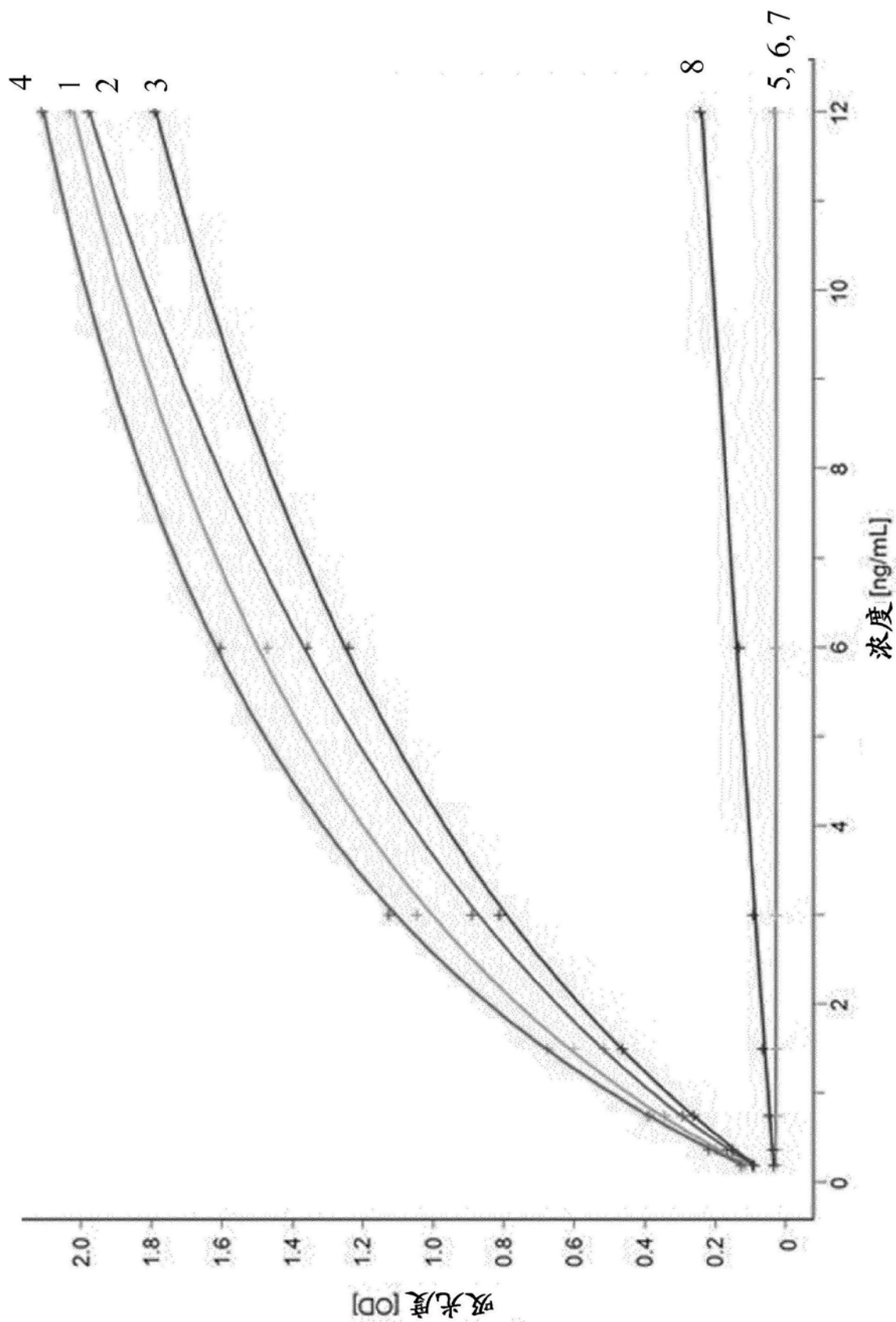


图15

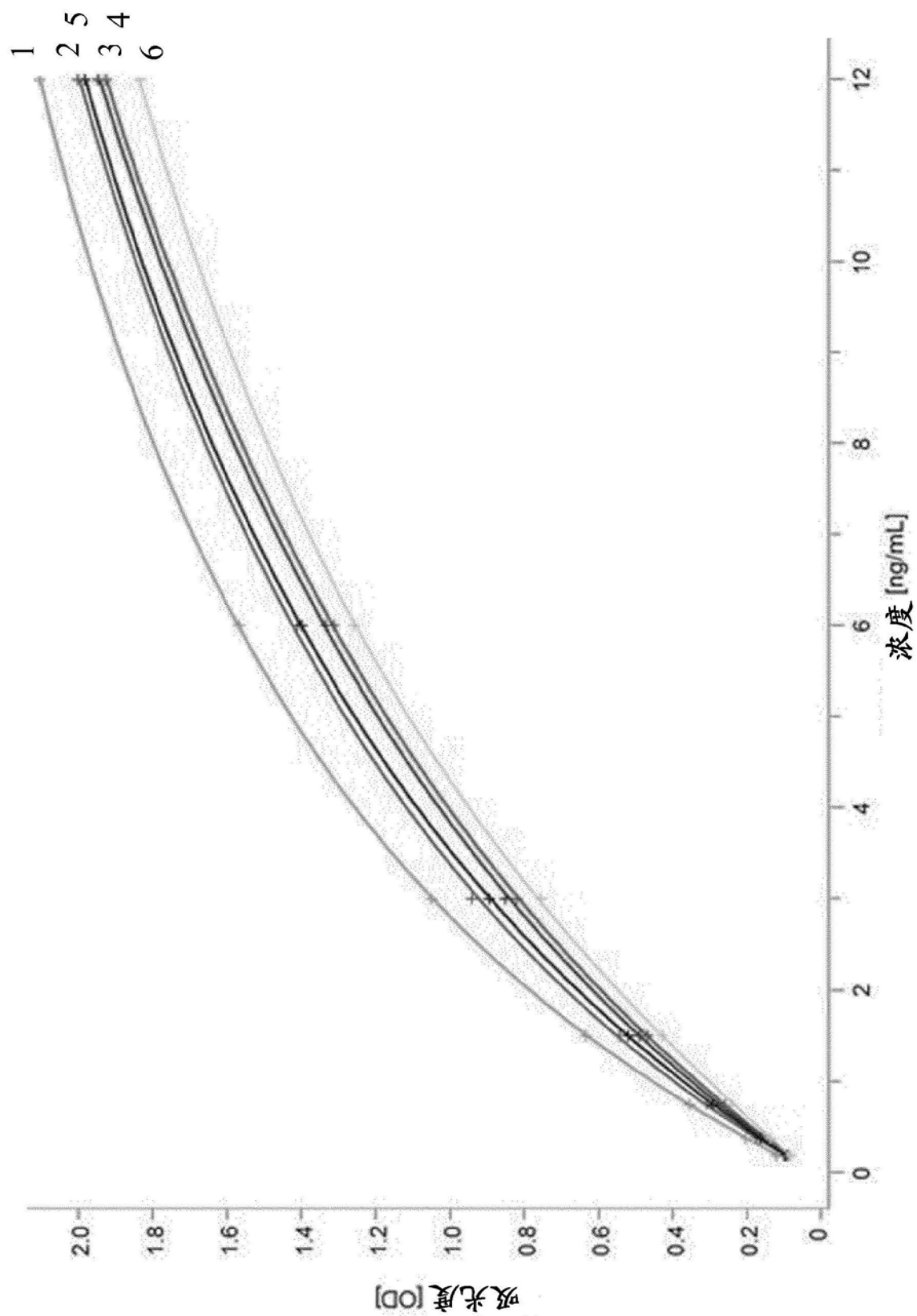


图16