



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115038721 B

(45) 授权公告日 2025. 04. 01

(21) 申请号 202180011895.7

(22) 申请日 2021.01.29

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 115038721 A

(43) 申请公布日 2022.09.09

(30) 优先权数据
10-2020-0010336 2020.01.29 KR
10-2020-0148372 2020.11.09 KR
10-2020-0148373 2020.11.09 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2022.07.29

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2021/001237 2021.01.29

(87) PCT国际申请的公布数据
W02021/154046 KO 2021.08.05

(73) 专利权人 高丽大学校产学协力团
地址 韩国首尔

(72) 发明人 郑相泽 高翔焕 曹美京

(74) 专利代理机构 上海弼兴律师事务所 31283
专利代理师 水文钰 黄益澍

(51) Int.Cl.
C07K 16/32 (2006.01)

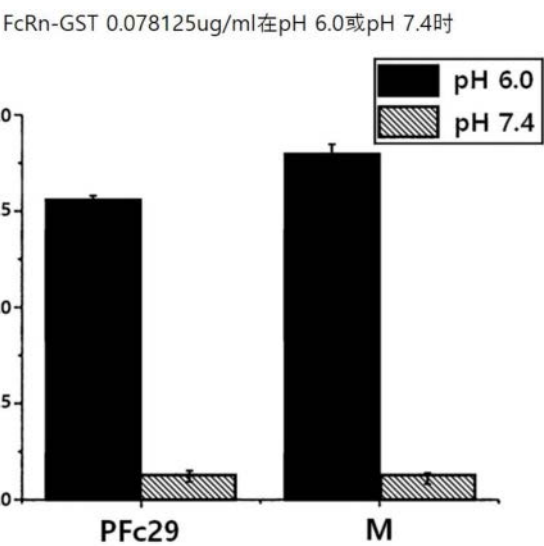
(56) 对比文件
KR 20100090266 A, 2010.08.13

审查员 孙露

权利要求书1页 说明书18页
序列表11页 附图13页

(54) 发明名称
pH敏感性Fc变体

(57) 摘要
本发明涉及通过pH依赖性与FcRn结合并离解的提高半衰期的Fc变体,本发明的Fc变体作为血清半衰期最大化的变体,相比于现有的提高血清半衰期的Fc变体表现出更加优秀的pH选择性FcRn结合及离解能力。因此,可通过在体内与多种低半衰期和低维持时间的肽药物治疗剂相结合来以增加的血清半衰期发挥长时间的药效。并且,可大幅减少抗体及生物药物的给药剂量及频率,由此,不仅降低新药开发成本,而且,具有可大幅提高新药开发可能性的效果。



1. 一种Fc变体,其特征在于,包含在野生型IgG1的Fc区域选自由基于Kabat编号系统的L309Y、Q311M及Q311W组成的组中的氨基酸残基的修饰,其中所述Fc变体由1) L309E、Q311M及M428L, 2) L309Y、Q311M及M428L或3) L309E、Q311W及M428L组成。

2. 根据权利要求1所述的Fc变体,其特征在于,在pH7.0至pH7.8的条件下,相比于野生型免疫球蛋白Fc区域,对FcRn表现出低结合亲和力。

3. 根据权利要求1所述的Fc变体,其特征在于,在pH5.6至pH6.5的条件下,相比于野生型免疫球蛋白Fc区域,对FcRn表现出高结合亲和力。

4. 一种多肽,其特征在于,包含权利要求1所述的Fc变体。

5. 根据权利要求4所述的多肽,其特征在于,相比于野生型,具有增加的生物体内半衰期。

6. 一种抗体,其特征在于,包含权利要求1所述的Fc变体。

7. 根据权利要求6所述的抗体,其特征在于,相比于野生型,具有增加的生物体内半衰期。

8. 一种核酸分子,其特征在于,对权利要求1所述的Fc变体、权利要求4所述的多肽、权利要求6所述的抗体进行编码。

9. 一种载体,其特征在于,包含权利要求8所述的核酸分子。

10. 一种宿主细胞,其特征在于,包含权利要求9所述的载体。

pH敏感性Fc变体

技术领域

[0001] 本发明涉及通过pH依赖性与FcRn结合及分离的提高半衰期的Fc变体。

背景技术

[0002] 由于蛋白质治疗剂对疾病靶点表现出非常高的特异性及较小的副作用、毒性,因此,可通过快速代替非特异性低分子化合物治疗剂来广泛应用于临床,在用于临床的蛋白质治疗剂中,当前主要使用抗体治疗剂和融合抗体Fc区域的Fc融合蛋白治疗剂。

[0003] 相比于现有的低分子药物,治疗用抗体对靶标表现出非常高的特异性,不仅具有生物毒性较低且副作用较小的优点,而且,因具有约3周的优秀血清半衰期而用作最有效癌症治疗方法中的一种。事实上,世界各地的大型制药公司和研究机构均致力于研究开发特异性结合于包括癌症发病原因子的癌细胞来有效去除的治疗用抗体。开发治疗用抗体的制药公司有罗氏、安进、强生、雅培、百时美施贵宝等,尤其,在2012年,作为罗氏的代表产品有用于抗癌治疗的赫赛汀 (Herceptin)、阿瓦斯汀 (Avastin) 和利妥昔单抗 (Rituxan) 等三种治疗用抗体在全球市场中实现约195亿美元的销售额,不仅创造出丰厚的利润,而且,引领了全球抗体药物市场。已知开发英夫利西单抗 (Remicade) 的强生公司也因销量的增加而在全球抗体市场中快速成长,而雅培、BMS等制药公司也保留有处于开发最后阶段的多种治疗用抗体。结果,在以低分子药物占据主导权的全球制药市场中,包含对于疾病靶点具备特异性且副作用较小的治疗用抗体的生物药物正迅速代替其位置。

[0004] 然而,当口服给药时,由于抗体及蛋白治疗剂通过消化器官的吸收率非常低且在消化器官内部容易变性或被蛋白水解酶容易降解而导致生物利用度非常低,因此,需通过静脉注射或皮下注射进行给药,为了实现明显的治疗效果,需要频繁接种,即使作为在血液内稳定性非常优秀的蛋白治疗剂中的一种抗体,为了实现成功治疗效果,需每2~3周给药一次高剂量的治疗用抗体 (2mg~8mg/体重kg)。通过上述注射方式的频繁给药不仅导致患者感到疼痛和不适,而且,存在可导致局部及全身产生浮肿、感染等副作用的问题。为了解决上述问题,应显著改善治疗用抗体及蛋白治疗剂在血液中的半衰期。

[0005] 据报告,免疫球蛋白 (抗体) 的生物体内半衰期由Fc对于FcRn的结合介导。免疫球蛋白的Fc片段通过非特异性细胞吸收作用被内皮细胞摄取 (uptake),随后引入于酸性内体内。在酸性pH (<6.5) 的条件下,FcRn在内体内与免疫球蛋白结合,在碱性pH (>7.4) 的条件下,FcRn在血流内释放免疫球蛋白。由此,FcRn从溶酶体退化途径回收免疫球蛋白。当血清免疫球蛋白数值降低时,可将更多FcRn分子用于免疫球蛋白结合来增加免疫球蛋白的量。相反,当血清免疫球蛋白数值上升时,可增加因FcRn饱和而退化的细胞吸收的免疫球蛋白的比例 (Ghetie及Ward, Annu. Rev. Immunol. 18: 739-766, 2000)。即,抗体的血清半衰期和持久性很大程度上取决于抗体的Fc部位置和IgG结合配体中的一个FcRn (新生儿Fc受体 (neonatal Fc receptor)) 结合。可收集免疫白细胞或血清补体分子并去除癌细胞或感染细胞等受损细胞的抗体的Fc部位置是指C γ 2及C γ 3结合域之间的部位置,介导与新生儿 (neonatal) 受体FcRn的相互作用,其结合从内体 (endosome) 向血流 (bloodstream) 再次循

环细胞内移入抗体 (Raghavan et al., 1996, Annu Rev Cell Dev Biol 12:181-220; Ghetie et al., 2000, Annu Rev Immunol 18:739-766)。在此过程中,因全长分子的巨大尺寸而与肾脏过滤(kidney filtration)的抑制有所关联,具有1周至3周范围的有利的抗体血清半衰期(antibody serum half-life)。并且,Fc对于FcRn的结合也对抗体转运起着重要作用。因此,Fc部位通过胞内运输(intracellular trafficking)及回收机制循环抗体来在维持延长血清持久性(prolonged serum persistence)方面发挥重要作用。

发明内容

[0006] 技术问题

[0007] 本发明的目的在于,开发引入如下突变的抗体,即,在细胞内体(在弱酸性PH条件下)增加对于FcRn的结合力,并且,在血液(在中性PH条件下)减少对于FcRn的结合力。

[0008] 技术方案

[0009] 为了实现上述目的,本发明提供pH敏感性Fc变体。

[0010] 并且,本发明提供包含pH敏感性Fc变体的多肽。

[0011] 并且,本发明提供包含pH敏感性Fc变体的抗体。

[0012] 并且,本发明提供编码pH敏感性Fc变体、多肽或抗体的核酸分子。

[0013] 并且,本发明提供包含上述核酸分子的载体。

[0014] 并且,本发明提供包含上述载体的宿主细胞。

[0015] 并且,本发明提供增加生物体内半衰期的蛋白质偶联物。

[0016] 发明的效果

[0017] 本发明的Fc变体作为血清半衰期最大化的变体,相比于现有的提高血清半衰期的Fc变体表现出更加优秀的pH选择性FcRn结合及离解能力。因此,可通过在体内与多种低半衰期及低维持时间的肽药物治疗剂相结合来以增加的血清半衰期发挥长时间的药效。并且,可大幅减少抗体及生物药物的给药剂量及频率,由此,不仅降低新药开发成本,而且,具有可大幅提高新药开发可能性的效果。

附图说明

[0018] 图1为示出通过酶联免疫吸附剂测定(ELISA)在pH6.0及pH7.4的条件下确认包含Q311M及M428L Fc变体的曲妥珠单抗与FcRn的结合力的图:

[0019] PFc29:包含Q311R及M428L Fc变体的曲妥珠单抗;以及

[0020] M:包含Q311M及M428L Fc变体的曲妥珠单抗。

[0021] 图2为示出包L309位置的氨基酸变体制备示意图(饱和突变(saturation mutagenesis))及包含各个Fc变体的曲妥珠单抗的表达纯化后的SDS-PAGE凝胶照片的图。

[0022] 图3为示出通过酶联免疫吸附剂测定在pH6.0的条件下确认包含Fc变体(Q311M、M428L及309位置的氨基酸变异)的曲妥珠单抗与FcRn的结合力的图:

[0023] PFc29:包含Q311R及M428L Fc变体的包含曲妥珠单抗;

[0024] FM:包含L309F、Q311M及M428L Fc变体的曲妥珠单抗;

[0025] IM:包含L309I、Q311M及M428L Fc变体的曲妥珠单抗;

[0026] MM:包含L309M、Q311M及M428L Fc变体的曲妥珠单抗;

- [0027] VM: 包含L309V、Q311M及M428L Fc变体的曲妥珠单抗;
- [0028] TM: 包含L309T、Q311M及M428L Fc变体的曲妥珠单抗;
- [0029] AM: 包含L309A、Q311M及M428L Fc变体的曲妥珠单抗;
- [0030] YM: 包含L309Y、Q311M及M428L Fc变体的曲妥珠单抗;
- [0031] HM: 包含L309H、Q311M及M428L Fc变体的曲妥珠单抗;
- [0032] QM: 包含L309Q、Q311M及M428L Fc变体的曲妥珠单抗;
- [0033] NM: 包含L309N、Q311M及M428L Fc变体的曲妥珠单抗;
- [0034] KM: 包含L309K、Q311M及M428L Fc变体的曲妥珠单抗;
- [0035] EM: 包含L309E、Q311M及M428L Fc变体的曲妥珠单抗;
- [0036] WM: 包含L309W、Q311M及M428L Fc变体的曲妥珠单抗;
- [0037] RM: 包含L309R、Q311M及M428L Fc变体的曲妥珠单抗;以及
- [0038] SM: 包含L309S、Q311M及M428L Fc变体的曲妥珠单抗。
- [0039] 图4a为示出通过酶联免疫吸附剂测定在pH6.0的条件下确认包含Fc变体的曲妥珠单抗与FcRn的结合力的图:
- [0040] PFc29: 包含Q311R及M428L Fc变体的曲妥珠单抗;
- [0041] ML: 包含Q311M及M428L Fc变体的曲妥珠单抗;以及
- [0042] YML: 包含L309Y、Q311M及M428L Fc变体的曲妥珠单抗。
- [0043] 图4b为示出通过酶联免疫吸附剂测定在pH7.4的条件下确认包含Fc变体的曲妥珠单抗与FcRn的结合力的图。
- [0044] 图4c为通过酶联免疫吸附剂测定在pH6.0及pH7.4的条件下确认包含Fc变体的曲妥珠单抗与FcRn的结合力的条形图。
- [0045] 图5为在弱酸性环境下的结合速度(on rate)及在中性环境下的离解速度(off rate)的示意图。
- [0046] 图6a为示出分析Fc变体在pH6.0的条件下的结合速度的结果图:
- [0047] PFc29: 包含Q311R及M428L Fc变体的曲妥珠单抗;
- [0048] PFc41: 包含L309G及M428L Fc变体的曲妥珠单抗;
- [0049] ML: 包含Q311M及M428L Fc变体的曲妥珠单抗;以及
- [0050] YML: 包含L309Y、Q311M及M428L Fc的包含曲妥珠单抗。
- [0051] 图6b为示出分析Fc变体在pH7.4的条件下的离解速度的结果图。
- [0052] 图6c为示出分析Fc变体的结合速度及离解速度的结果图。
- [0053] 图7为示出L309位置的饱和突变的示意图及包含Fc变体的曲妥珠单抗的表达纯化后的SDS-PAGE凝胶照片的图。
- [0054] 图8为通过酶联免疫吸附剂测定在pH6.0的条件下确认包含Fc变体的曲妥珠单抗与FcRn的结合力的图。
- [0055] 图9为示出通过酶联免疫吸附剂测定在pH6.0及pH7.4的条件下确认包含Fc变体的曲妥珠单抗与FcRn的结合力的图。
- [0056] 图10a为示出通过酶联免疫吸附剂测定在pH6.0的条件下确认包含EML变体的曲妥珠单抗与FcRn的结合力的图。
- [0057] 图10b为示出通过酶联免疫吸附剂测定在pH7.4的条件下确认包含EML变体的曲妥

珠单抗与FcRn的结合力的图。

[0058] 图11为示出用于确认在pH6.0的条件下Fc变体与FcRn的结合力的FACS分析的结果图。

[0059] 图12为示出曲妥珠单抗-Fc变体9种表达及纯化后的SDS-PAGE凝胶照片的图(M428L、L309G变体中Q311L、Q311I、Q311V、Q311T、Q311A、Q311Y、Q311H、Q311K或Q311W)。

[0060] 图13为示出通过酶联免疫吸附剂测定在pH6.0的条件下分析曲妥珠单抗-Fc变体9种与FcRn的结合力的结果图(M428L、L309G变体中Q311L、Q311I、Q311V、Q311T、Q311A、Q311Y、Q311H、Q311K或Q311W)。

[0061] 图14为示出通过酶联免疫吸附剂测定在pH6.0及pH7.4的条件下分析曲妥珠单抗-Fc变体3种与FcRn的结合力的结果图。

[0062] 图15为示出曲妥珠单抗-Fc变体30种表达及纯化后的SDS-PAGE凝胶照片的图。

[0063] 图16为通过酶联免疫吸附剂测定在pH6.0的条件下分析曲妥珠单抗-Fc变体30种与FcRn的结合力的结果图。

[0064] 图17a为示出通过酶联免疫吸附剂测定在pH6.0及pH7.4的条件下分析EWL(L309E/Q311W/M428L)变体与FcRn的结合力的结果图。

[0065] 图17b为示出通过酶联免疫吸附剂测定在pH6.0的条件下分析EWL(L309E/Q311W/M428L)变体与FcRn的结合力的结果图。

[0066] 图17c为示出通过酶联免疫吸附剂测定在pH7.4的条件下分析EWL(L309E/Q311W/M428L)变体与FcRn的结合力的结果图。

具体实施方式

[0067] 最佳实施方式

[0068] 以下,通过本发明的实例详细说明本发明。但是,以下实例仅为本发明的实例,本发明并不限于此,本发明可在发明要求保护范围相关说明及由此解释的等同范畴内产生多种变形及应用。

[0069] 除非另有定义,否则本申请所使用的所有技术术语及科学术语的含义与本发明所属技术领域的普通技术人员通常理解的含义相同。虽然,与本申请所表述内容相似或等效的任何方法及材料均可用于执行本发明的测试,但是,本申请仅说明优选的材料及方法。

[0070] 在本说明书的全文内容中,针对天然存在的氨基酸,除通常使用的单字及三字代码外,还使用其他通常用于氨基酸的三字代码,例如,Aib(α -氨基异丁酸)、Sar(N甲基甘氨酸)等。并且,在本发明中,以简称提及的氨基酸也可通过IUPAC-IUB命名法记载:

[0071] 丙氨酸:A、精氨酸:R、天冬酰胺:N、天冬氨酸:D、半胱氨酸:C、谷氨酸:E、谷氨酰胺:Q、甘氨酸:G、组氨酸:H、异亮氨酸:I、亮氨酸:L、赖氨酸:K、蛋氨酸:M、苯丙氨酸:F、脯氨酸:P、丝氨酸:S、苏氨酸:T、色氨酸:W、酪氨酸:Y及缬氨酸:V。

[0072] 在一实施方式中,本发明涉及Fc变体,其包含在野生型免疫球蛋白(immunoglobulin)的Fc区域基于Kabat编号系统(Kabat numbering system)的L309Y的氨基酸残基的修饰。

[0073] 在一实例中,本发明的Fc变体还可包含氨基酸残基的取代:M428L、Q311M或M428L及Q311M。

[0074] 在一实施方式中,本发明涉及Fc变体,其包含在野生型免疫球蛋白(immunoglobulin)的Fc区域基于Kabat编号系统(Kabat numbering system)的Q311M的氨基酸残基的修饰。

[0075] 在一实例中,本发明的Fc变体还可包含氨基酸残基的取代:M428L;L309E;L309Y;M428L及L309E或M428L及L309Y。

[0076] 在一实施方式中,本发明涉及Fc变体,其包含在野生型免疫球蛋白(immunoglobulin)的Fc区域基于Kabat编号系统(Kabat numbering system)的Q311M的氨基酸残基的修饰。

[0077] 在一实例中,本发明的Fc变体还可包含氨基酸残基的取代:M428L、L309E或M428L及L309E。

[0078] 在一实例中,免疫球蛋白可以为IgA、IgM、IgE、IgD、IgG或它们的修饰,可以为IgG1、IgG2、IgG3或IgG4,优先为抗-HER2抗体,更优选为曲妥珠单抗。抗体的木瓜蛋白酶分解形成两Fab片段及一个Fc片段,在人IgG分子中,Fc区域通过木瓜蛋白酶分解Cys 226的N末端来生成(Deisenhofer,Biochemistry 20:2361-2370,1981)。

[0079] 在一实例中,野生型免疫球蛋白的Fc区域可包含序列号1的氨基酸序列。

[0080] 在一实例中,Fc变体可包含序列号2的氨基酸序列(Q311M及M428L),可包含序列号3的氨基酸序列(L309Y、Q311M及M428L)。

[0081] 在一实例中,Fc变体可包含序列号4的氨基酸序列(L309E/Q311M/M428L)。

[0082] 在一实例中,Fc变体可包含序列号5的氨基酸序列(L309E/Q311W/M428L)。

[0083] 在一实例中,野生型免疫球蛋白的Fc区域可包含序列号6的碱基序列。

[0084] 在一实例中,Fc变体可包含序列号7的碱基序列(Q311M及M428L),可包含序列号8的碱基序列(L309Y、Q311M及M428L)。

[0085] 在一实例中,Fc变体可包含序列号9的碱基序列(L309E/Q311M/M428L)。

[0086] 在一实例中,Fc变体可包含序列号10的碱基序列(L309E/Q311W/M428L)。

[0087] 在一实例中,序列号11的氨基酸序列可包含野生型曲妥珠单抗重链(heavy chain),GFNIKDTY、IYPTNGYT及SRWGGDGFYAMDY序列分别表示CDR区域。在上述序列号11的氨基酸序列中,野生型曲妥珠单抗的Fc区域相当于从第225位置开始的序列。

[0088] 在一实例中,序列号12的氨基酸序列可包含野生型曲妥珠单抗轻链(light chain),QDVNTA、SAS、QQHYTTPPT序列分别表示CDR区域。

[0089] 在一实例中,本发明的Fc变体可以与FcRn产生pH选择性(依赖性)结合/离解反应。

[0090] 在一实例中,相比于野生型免疫球蛋白Fc区域,本发明的Fc变体可在pH7.0至7.8的条件下对FcRn表现出较低的结合亲和力,可在血液的正常pH范围内,可以为pH7.2至7.6。相比于野生型Fc结构域,本发明的Fc变体在上述pH范围内与FcRn的离解(dissociation)程度可相同或基本不变。

[0091] 在一实例中,相比于野生型免疫球蛋白Fc区域,本发明的Fc变体可在pH5.6至6.5的条件下对FcRn表现出较高的结合亲和力,可以为内体内弱酸性条件,可以为pH5.8至6.0。本发明的pH敏感性Fc变体在上述pH范围内对FcRn的结合亲和力可相比于野生型Fc结构域增加10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上或100%以上,或者,可相比于野生型Fc结构域增加2倍以上、3倍以上、4倍以上、5

倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上、9倍以上、10倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上或100倍以上。

[0092] 在本发明中,本发明的免疫球蛋白Fc区域中包括氨基酸变异的变体基于构成母免疫球蛋白Fc区域的氨基酸修饰来定义,通常的免疫球蛋白编号基于Kabat的EU索引(Kabat et al., Sequence of proteins of immunological interest, 5th Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, 1991)。

[0093] 本发明的序列号1至序列号5的氨基酸从Kabat编号第221位置开始。例如,作为本申请的序列号1的1位置氨基酸Asp(D, 1D)与Kabat编号221D相同,作为序列号2的第91位置氨基酸Met(M, 91M)与Kabat编号311M相同,作为序列号3的第89位置氨基酸Tyr(Y, 89Y)与Kabat编号309Y相同。

[0094] 在本发明中,所使用的术语“曲妥珠单抗-Fc变体”是指代替包含序列号11的氨基酸的野生型曲妥珠单抗重链的Fc区域而引入本申请的Fc变体。并且,包含含有序列号12的氨基酸的野生型曲妥珠单抗轻链。因此,上述“曲妥珠单抗-Fc变体”的制备代替野生型曲妥珠单抗重链的Fc区域制备引入本申请的Fc变体的表达载体,可通过制备引入含有序列号12的氨基酸的野生型曲妥珠单抗轻链的表达载体并将其转染于动物细胞来表达。

[0095] 在本发明中,所使用的术语“FcRn”或“新生儿Fc受体”是指与IgG抗体Fc区域结合的蛋白,其至少一部分由FcRn基因编码。但是,上述FcRn并不限于此,可来源于包括人、小鼠、大鼠、兔子及猴子在内的任意有机体。作为本发明所属技术领域的公知内容,功能性FcRn蛋白包含通常被称为轻链及重链的两个多肽。轻链为 β -2-微球蛋白(β -2-microglobulin),重链由FcRn基因编码。在本说明书中,除非另有说明,否则FcRn或一个FcRn蛋白是指FcRn重链和 β -2-微球蛋白的复合物。

[0096] 在发明中,所使用的术语“野生型(wild-type)多肽”是指随后被修饰产生衍生物的未修饰多肽。野生型多肽可以为自然发现的多肽、自然中发现的多肽的衍生物或改造的多肽。野生型多肽可以为多肽本身、包含上述野生型多肽的组合物或编码其的氨基酸序列。因此,在本发明中所使用的术语“野生型免疫球蛋白”是指因氨基酸残基被修饰而产生衍生物的未修饰免疫球蛋白多肽。与上述术语互换性地,可作为因引入氨基酸修饰而产生衍生物的未修饰免疫球蛋白多肽使用“母(parent)免疫球蛋白”。

[0097] 在本发明中,所使用的术语“氨基酸修饰”是指多肽序列的氨基酸的取代、插入和/或缺失,优选为取代的含义。在本发明中所使用的术语“氨基酸取代”或“取代”是指在野生型多肽序列的特定位置中的氨基酸被代替为其他氨基酸。例如,在包含L309Y取代的Fc变体中,作为野生型免疫球蛋白Fc片段的氨基酸序列中第309位置氨基酸残基的亮氨酸被代替为酪氨酸。

[0098] 在本说明书中,所使用的术语“Fc变体”是指相比于野生型免疫球蛋白Fc片段包含一个以上氨基酸残基的修饰。优选地,在本发明中,Fc变体包含选自由下列组成的组的一个以上氨基酸残基的修饰:L309Y、Q311M及M428L(上述编号基于Kabat所记载的EU索引);L309E、Q311M及M428L(上述编号基于Kabat所记载的EU索引);L309E、Q311W及M428L(上述编号基于Kabat所记载的EU索引),相比于野生型免疫球蛋白Fc片段(区域),因在弱酸性条件下对FcRn的结合亲和力增加且在中性条件下对FcRn的结合亲和力减少而提高在弱酸性的胞内内体与FcRn的结合速度,将在中性血液中快速离解。

[0099] 本发明提供对FcRn的结合亲和力和/或血清半衰期相比于野生型免疫球蛋白Fc片段有所增加的Fc变体。抗体及其他生理活性分子的生物体内半衰期(即,对象体的血清或其他组织中的持久性)为用于确定抗体(或任意其他药学分子)的给药量及频率的重要临床变数。因此,包括增加生物体内半衰期的抗体在内,上述生理活性分子在药剂学上非常重要。本发明的被取代的Fc变体的半衰期相比于野生型Fc结构域增加10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上或100%以上,或者,可相比于野生型Fc结构域增加2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上、9倍以上或10倍以上。

[0100] 相比于野生型免疫球蛋白Fc片段(区域或结合域),本发明的Fc变体包含一个以上的氨基酸修饰,由此,氨基酸序列将产生差异。本发明的Fc变体的氨基酸序列与野生型免疫球蛋白Fc片段的氨基酸序列实质相同。例如,本发明的pH敏感性Fc变异的氨基酸序列与野生型免疫球蛋白的Fc片段的氨基酸序列的同源性为约80%以上,优选为90%以上,最优选为95%以上。氨基酸修饰可通过分子生物学方法基于遗传层面执行,或者,也可通过酶或化学方法执行。

[0101] 在本发明中,曲妥珠单抗的生产及纯化等可参照韩国专利申请10-2017-0045142制备。

[0102] 本发明的Fc变体可通过相应技术领域所公开的任意方法制备。在一实施例中,本发明的免疫球蛋白的Fc变体可通过如下方法制备,即,针对含有特定氨基酸修饰的多肽序列进行编码后,在所期望的情况下,向宿主细胞内克隆,用于表达及验证的核酸形成。用于其的多种方法可参照文献(Molecular Cloning-A Laboratory Manual,3rd Ed., Maniatis,Cold Spring Harbor Laboratory Press,New York,2001;Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons)。

[0103] 对本发明的Fc变体进行编码的核酸可为了蛋白表达而插入于表达载体。表达载体包含普通调节序列或调控(regulatory)序列、选择标记、任意融合配偶体和/或与附加要素可操作连接的蛋白,即,放在功能关系中的蛋白。在适当状态下,本发明的Fc变体可通过转化为核酸的宿主细胞产生,优选地,可使用培养含有对本发明的Fc变体进行编码的核酸的表达载体来诱导蛋白表达的方法。可使用包含哺乳类细胞、细菌、昆虫细胞及酶的多种适当的宿主细胞,但并不限于此。用于将外源核酸引入宿主细胞的方法作为本发明所属技术领域所公知的方法,基于所使用的宿主细胞而产生变化。优选地,可将生产成本低廉且产业利用价值高的大肠杆菌作为宿主细胞生产本发明的Fc变体。

[0104] 因此,在本发明的范畴内,Fc变体的制备方法包括如下步骤:在蛋白表达适当的条件下,培养引入有编码Fc变体的核酸的宿主细胞;以及从宿主细胞纯化或分离表达的Fc变体。

[0105] 抗体可通过本发明所属技术领域所公知的多种方法进行分离或纯化。标准纯化方法可包括层析技术、电泳、免疫、沉降、透析、过滤、浓缩和色谱聚焦(chromatofocusing)技术。作为本发明所属技术领域的公知内容,例如,细菌蛋白A、G及L等多种天然蛋白与抗体结合,上述蛋白可用于纯化。通常,可用于通过特定融合配体的纯化。

[0106] 在一实施方式中,本发明涉及包含本发明的Fc变体的多肽。

[0107] 在一实施中,相比于野生型,上述多肽可具有增加的生物体内半衰期。

[0108] 在一实施方式中,本发明涉及包含Fc变体或上述多肽的抗体。

[0109] 在一实施中,相比于包含野生型Fc区域的抗体,本发明的抗体可具有增加的生物体内半衰期。

[0110] 在一实例中,上述抗体可以为多克隆抗体、单克隆抗体、微抗体(minibody)、结合域抗体、双特异性抗体、抗体模拟物、嵌合抗体、抗体偶联物(conjugate)、人抗体或人源化抗体或其片段。

[0111] 本发明的抗体可通过实现Fc区域的最优化(L309Y、Q311M及M428L;L309E、Q311M及M428L;L309E、Q311W及M428L)来最大限度地增加Fc结构域(区域)或包含其的多肽的半衰期。

[0112] 在一实施方式中,本发明涉及与本发明的Fc变体、非肽基聚合物及生理活性多肽通过共价键连接的增加生物体内半衰期的蛋白质偶联物。

[0113] 在一实例中,本发明的Fc变体可作为用于增加蛋白药物等生理活性多肽的生物体内半衰期的载体(carrier)有效使用。

[0114] 在一实例中,包含本发明的Fc变体的蛋白质偶联物可用作生物体内半衰期显著猪呢噶几的持久性药物制剂。

[0115] 可用于本发明的非肽基聚合物可选自由聚乙二醇、聚丙二醇、乙二醇和丙二醇的共聚物,聚氧乙烯化多元醇、聚乙烯醇、多糖、葡聚糖、聚乙烯基乙醚、聚乳酸(PLA, polylactic acid)及聚乳酸-乙醇酸(PLGA, polylactic-glycolic acid)等可生物降解高分子、脂质聚合物、甲壳素、透明质酸及它们的组合组成的组中,优选为聚乙二醇。在本发明所属技术领域中已知的它们的衍生物及以本发明所属技术领域的水平可轻易制备的衍生物均属于本发明的范围。

[0116] 对于可以与本发明的Fc变体结合的生理活性多肽并没有特别限制,只要需要增加血清半衰期即可。例如,可使用细胞因子、白介素、白介素结合蛋白、酶、抗体、生长因子、转录调节因子、血液因子、疫苗、结构蛋白、配体蛋白或受体、细胞表面抗原、受体拮抗物质等用于治疗或预防人疾病的多种生理活性多肽或它们的衍生物及类似物。

[0117] 可用于本发明的生理活性多肽有肝生长激素、生长激素释放激素、生长激素释放肽、干扰素类及干扰素受体类(例如,干扰素- α 、干扰素- β 、干扰素- γ 、可溶性1型干扰素受体)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CS)、胰高血糖素样肽-1(GLP-1)、G蛋白耦联受体(G-protein-coupled receptor)、白介素(例如,IL-1受体、IL-4受体)、酶类(例如,葡糖脑苷脂酶(glucocerebrosidase)、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶(iduronate-2-sulfatase)、 α -半乳糖苷酶-A、阿加糖苷酶 α (agalsidase alpha)、 β -L-艾杜糖醛酸酶、 α -L-艾杜糖醛酸酶(alpha-L-iduronidase)、丁酰胆碱酯酶(butyrylcholinesterase)、几丁质酶(chitinase)、谷氨酸脱羧酶(glutamate decarboxylase)、伊米昔酶(imiglucerase)、脂肪酶(lipase)、尿酸酶(uricase)、血小板活性因子乙酰水解酶(platelet-activatingfactor acetylhydrolase)、中性内肽酶(neutral endopeptidase)、髓过氧化物酶(myeloperoxidase)、白介素及细胞因子结合蛋白(例如,IL-18bp、TNF-结合蛋白)、巨噬细胞活性因子、巨噬细胞肽、B细胞因子、T细胞因子、蛋白A、过敏抑制因子、细胞坏死糖蛋白、免疫毒素、淋巴毒素、肿瘤坏死因子、肿瘤抑制因子、转移生长因子、 α -1抗胰蛋白酶、白蛋白、 α -乳白蛋白(alpha-lactalbumin)、载脂蛋

白-E、促红细胞生成因子、高糖基化促红细胞生成素、促血管生成素(angiotensin)、血红蛋白、凝血酶(thrombin)、凝血酶受体活性肽、血栓调节蛋白(thrombomodulin)、血液因子7、血液因子7a、血液因子8、血液因子9、血液因子13、纤溶酶原活性因子、血纤维蛋白结合肽、尿激酶、链激酶、水蛭素(hirudin)、蛋白C、C反应蛋白、肾素抑制剂、胶原酶抑制剂、超氧化物歧化酶、瘦素、血小板衍生生长因子、上皮细胞生长因子、表皮细胞生长因子、血管抑制素(angiotensin)、内皮抑制素(endostatin)、血管紧张素(angiotensin)、骨形成生长因子、骨形态发生蛋白、降钙素、胰岛素、心钠素、软骨诱导因子、依降钙素(elcatonin)、结缔组织激活剂、组织因子途径抑制剂(tissue factor pathway inhibitor)、促卵泡激素、促黄体生成素、促黄体生成素释放激素、神经生长因子类(例如,神经生长因子、睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor)、轴生成因子-1(axogenesis factor-1)、脑利钠肽(brain-natriuretic peptide)、胶质细胞源性神经营养因子(glial derived neurotrophic factor)、导蛋白(netrin)、嗜中性抑制因子(neutrophil inhibitor factor)、神经营养因子、微中子(neutrino)、甲状旁腺激素、松弛素、分泌素、生长调节素、胰岛素样生长因子、肾上腺皮质激素、胰高血糖素、胆囊收缩素、胰多肽、胃泌素释放肽、促肾上腺皮质激素释放因子、甲状腺刺激激素、自分泌运动因子(autotaxin)、乳铁蛋白(lactoferrin)、肌生长抑制素(myostatin)、受体类(例如,TNFR (P75)、TNFR (P55)、IL-1受体、VEGF受体、B细胞活性因子受体)、受体拮抗物质(例如,IL1-Ra)、细胞表面抗原(例如,CD 2、3、4、5、7、11a、11b、18、19、20、23、25、33、38、40、45、69)、单克隆抗体、多克隆抗体、抗体片段类(例如,scFv、Fab、Fab'、F(ab')₂及Fd)、病毒衍生疫苗抗原等多种类型,但并不限于此。抗体片段可选自能够与特定抗原结合的Fab、Fab'、F(ab')₂或scFv。

[0118] 在一实例中,抗体药物能够与包含Fc变体的蛋白质偶联物结合,癌症治疗用抗体药物可以为曲妥珠单抗(Trastuzumab)、西妥昔单抗(cetuximab)、贝伐单抗(bevacizumab)、利妥昔单抗(rituximab)、巴西利昔单抗(basiliximab)、英夫利昔单抗(infliximab)、伊匹单抗(ipilimumab)、派姆单抗(Pembrolizumab)、纳武单抗(Nivolumab)、阿特珠单抗(Atezolizumab)或阿维单抗(Avelumab)。

[0119] 本发明包括通过非肽基聚合物使得上述Fc变体与生理活性多肽通过共价键连接来制备持久性药物制剂的方法。

[0120] 本发明的制备方法可包括如下步骤:通过末端具有反应基的非肽基聚合物共价键连接生理活性多肽及Fc变体;以及分离与生理活性多肽、非肽基聚合物及Fc变体通过共价键连接的偶联物。

[0121] 在一实施方式中,本发明涉及对本发明的Fc变体、多肽或抗体进行编码的核酸分子。

[0122] 本发明的核酸分子可以为分离的或重组的,不仅包括单链及双链形式的DNA及RNA,而且,还包括相应的互补序列。在从天然来源分离的情况下,所分离的核酸为从已存在于分离核酸的个体中的周围遗传序列分离的核酸。在从模型通过酶或化学合成的核酸为PCR产物、cDNA分子或寡核苷酸的情况下,可将通过上述步骤生成的核酸理解为分离的核酸分子。分离的核酸分子是指作为分离片段或较大核酸的组分成分的核酸分子。当与其他核酸序列按照功能关系配置时,核酸可操作地连接。例如,当前序列或分泌前导(leader)的DNA被表达为分泌多肽前状态的前蛋白(preprotein)时,与多肽的DNA可操作地连接,因此,

若启动子或增强子影响多肽序列的转录,则可操作地连接编码序列,或者,当核糖体结合部位被配置成能够促进翻译时,可操作地连接编码序列。通常,可操作地连接是指DNA序列相邻定位置,在分泌前导的情况下,是指相邻存在于相同前导框架内。然而,增强子无需相邻定位置。连接通过在方便的限制酶部位置的连接反应来实现。当不存在上述部位置时,按照通常方法使用合成寡核苷酸连接或连接肽。

[0123] 在一实施方式中,本发明涉及包含上述核酸分子的载体。

[0124] 在本发明中,所使用的术语“载体”是指可为了向能够复制核酸序列的细胞引入而能够插入核酸序列的载体。核酸序列可以为外源性(exogenous)或异源性(heterologous)。载体可以为质粒、粘粒和病毒(例如,噬菌体),但并不限于此。本发明所属技术领域的普通技术人员可通过标准重组技术构造载体(Maniatis, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988; 及 Ausubel et al., In: Current Protocols in Molecular Biology, John, Wiley & Sons, Inc, NY, 1994等)。

[0125] 在本发明中,术语“表达载体”是指包含对转录基因产物中的至少一部分进行编码的核酸序列的载体。在部分情况下,随后RNA分子可被翻译为蛋白、多肽或肽。表达载体可包含多种调节序列。除用于调节转录及翻译的调节序列外,载体及表达载体也可一并包含提供其他功能的核酸序列。

[0126] 在一实施方式中,本发明涉及包含上述载体的宿主细胞。

[0127] 在本发明中,所使用的术语“宿主细胞”包含真核生物和原核生物,是指可复制上述载体或可表达由载体编码的基因的任何可转化生物。宿主细胞可被上述载体转染(transfected)或转化(transformed),这表示外源的核酸分子递送或引入宿主细胞内的过程。

[0128] 优选地,本发明的宿主细胞可以为细菌(bacteria)细胞、CHO细胞、HeLa细胞、HEK293细胞、BHK-21细胞、COS7细胞、COP5细胞、A549细胞、NIH3T3细胞等,但并不限于此。

[0129] 在一实施方式中,本发明涉及生理活性多肽的生物体内半衰期增加方法,其包括通过非肽基聚合物使得本发明的Fc变体与生理活性多肽通过共价键连接的步骤。

[0130] 在一实施方式中,本发明涉及用于预防或治疗癌症的药物组合物,其包含本发明的Fc变体、多肽或抗体。

[0131] 在一实例中,还可包含免疫原性细胞凋亡诱导剂。

[0132] 在一实例中,免疫原性细胞凋亡诱导剂可包含选自由蒽环类抗癌药、紫杉类抗癌药、抗EGFR抗体、BK通道激动剂、硼替佐米(Bortezomib)、强心苷(cardiac glycoside)、环磷酰胺抗癌药、GADD34/PP1抑制剂、LV-tSMAC、麻疹(Measles)病毒、博来霉素(bleomycin)、米托蒽醌(mitoxantrone)或奥沙利铂(oxaliplatin)组成的组中的一种以上,蒽环类抗癌药可以为柔红霉素(daunorubicin)、多柔比星(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、伊达比星(idarubicin)、匹克生琼(pixantrone)、沙巴柔比星(sabarubicin)或伐柔比星(valrubicin),紫杉类抗癌药可以为紫杉醇(paclitaxel)或多西他赛(docetaxel)。

[0133] 本发明的用于预防或治疗癌症的药物组合物可以与化学抗癌药(抗癌剂)等一并给药提高癌细胞的凋亡效果来增加现有抗癌剂的癌症治疗效果。并用给药可以与上述抗癌剂同时或依次进行。作为上述抗癌剂的示例,包括:氮芥(mechlorethamine)、苯丁酸氮芥

(chlorambucil)、苯丙氨酸(phenylalanine)、芥末(mustard)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、异环磷酰胺(ifosfamide)、卡莫司汀(BCNU, carmustine)、洛莫司汀(CCNU, lomustine)、链脲佐菌素(streptozotocin)、白消安(busulfan)、噻替帕(thiotepa)、顺铂(cisplatin)及卡铂(carboplatin)等DNA烷基化剂(DNA alkylating agents);放线菌素(dactinomycin; actinomycin D)、普卡霉素(plicamycin)及丝裂霉素C(mitomycin)等抗癌抗生素(anti-cancer antibiotics);以及长春新碱(vincristine)、长春碱(vinblastine)、依托泊苷(etoposide)、替尼泊苷(teniposide)、拓扑替康(topotecan)及伊立替康(iridotecan)等植物生物碱(plant alkaloids),但并不限于此。

[0134] 在一实例中,癌症包括:白血病(leukemias)及急性淋巴细胞性白血病(acute lymphocytic leukemia)、急性非淋巴细胞性白血病(acute nonlymphocytic leukemias)、慢性淋巴细胞性白血病(chronic lymphocytic leukemia)、慢性骨髓白血病(chronic myelogenous leukemia)、霍奇金病(Hodgkin's Disease)、非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphomas)及多发性骨髓瘤(multiple myeloma)等淋巴瘤(lymphomas);脑瘤(brain tumors)、神经母细胞瘤(neuroblastoma)、视网膜母细胞瘤(retinoblastoma)、肾母细胞瘤(Wilms Tumor)、骨瘤(bone tumors)及软组织肉瘤(soft-tissue sarcomas)等儿童实体瘤(childhood solid tumors);以及肺癌(lung cancer)、乳腺癌(breast cancer)、前列腺癌(prostate cancer)、泌尿系统癌(urinary cancers)、子宫癌(uterine cancers)、口腔癌(oral cancers)、胰腺癌(pancreatic cancer)、黑色素瘤(melanoma)及其他皮肤癌(skin cancers)、胃癌(stomach cancer)、卵巢癌(ovarian cancer)、脑肿瘤(brain tumors)、肝癌(liver cancer)、喉癌(laryngeal cancer)、甲状腺癌(thyroid cancer)、食道癌(esophageal cancer)及睾丸癌(testicular cancer)等成人常见实体瘤(common solid tumors),但是,本发明所要预防或治疗的癌症种类并不限于此。

[0135] 在本发明中,所使用的术语“预防”是指通过给药本发明的药物组合物来抑制或延缓癌症的发生、扩散及复发的所有作用。

[0136] 在本发明中,所使用的术语“治疗”是指通过给药本发明的组合物来有效改善癌细胞的凋亡或癌症症状的所有作用。本发明所属技术领域的普通技术人员可参照韩国医药协会等的公开资料准确了解本申请组合物有效的疾病标准,并且,可判断改善、增强及治疗的程度。

[0137] 在本发明中,与有效成分组合使用的术语“治疗有效量”是指有效预防或治疗目标疾病所需的组合物在药学上可接受的量,本发明组合物的治疗有效量可基于多种要素产生变化,例如,给药方法、目标部位、患者的状态等。因此,用于人体的给药量应考虑安全性及效率性确定适当量。也可基于通过动物实验确定的有效量来推定用于人体的量。或者,当确定有效量时,也可参照文献考虑注意事项,例如,Hardman and Limbird, eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed. (2001), Pergamon Press; 及 E.W. Martin ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed. (1990), Mack Publishing Co.。

[0138] 本发明的药物组合物应按照药学上接收的有效量进行给药。在本发明中,所使用的术语“药学有效量”是指按照能够适用于医疗的合理收益/风险的比例治疗疾病而不会引

起副作用的量,有效剂量的标准应基于包括患者的健康状况、癌症类型、严重程度、药物活性、药物敏感性、给药方法、给药时间、给药途径和排泄率、治疗时间、混合或同时使用的药物在内的因素及在其他医学领域中公知的要素来确定。本发明的组合物可用作单个治疗剂进行给药,或者,也可以与其他治疗剂联合给药,可以与现有的治疗剂依次或同时给药,可单独给药或多次给药。考虑到上述所有因素,能够以最小量获得最大效果且没有副作用的量进行给药尤为重要,这可由本发明所属技术领域的普通技术人员轻易确定。

[0139] 本发明的药物组合物还可包含药剂学上可接受的添加剂,在此情况下,可作为药剂学上可接受的添加剂使用淀粉、糊化淀粉、微晶纤维素、乳糖、聚维酮、胶体二氧化硅、磷酸氢钙、乳糖、甘露醇、糖浆、阿拉伯橡胶、预糊化淀粉、玉米淀粉、粉末纤维素、羟丙基纤维素、欧巴代、羟基乙酸淀粉钠、巴西棕榈酸铅、合成硅酸铝、硬脂酸、硬脂酸镁、硬脂酸铝、硬脂酸钙、白糖、葡萄糖、山梨糖醇及滑石粉等。优选地,相对于上述组合物,本发明的药剂学上可接受的添加剂可包含0.1重量份至90重量份,但并不限于此。

[0140] 本发明的组合物还可包含通常用于生物制剂的载体、稀释剂、赋形剂或其两个以上的组合。对于药剂学上可接受的载体并没有特别限制,只要适用于向生物体内传递组合物即可,例如,可使用Merck Index, 13th ed., Merck&Co. Inc. 所记载的化合物、盐水、无菌水、林格溶液、缓冲盐水、葡萄糖溶液、麦芽糖糊精溶液、甘油、乙醇或混合使用上述成分中的一种以上,可根据需求添加抗氧化剂、缓冲液、抑菌剂等通常使用的添加剂。并且,可额外添加稀释剂、分散剂、表面活性剂、结合剂及润滑剂来形成水溶液、悬浮液、乳浊液等注射剂、丸剂、胶囊剂、颗粒剂或片剂。进而,优选地,可按照各个疾病或成分通过本发明所属技术领域的适当方法或Remington's Pharmaceutical Science (Mack Publishing Company, Easton PA, 18th, 1990) 所公开的方法进行制剂。

[0141] 本发明的组合物可按照目标方法进行非肠道给药(例如,用于静脉内、皮下、腹腔内或局部注射制剂)或口服给药,给药量的范围基于患者的体重、年龄、性别、健康状态、饮食、给药时间、给药方法、排泄率及疾病的严重程度等而产生变化。对于本发明的组合物,每日给药量为0.0001~10mg/ml,优选为0.0001~5mg/ml,更优选地,应每天分为一次至多次进行给药。

[0142] 用于本发明组合物的口服给药的液体制剂有悬浮剂、液体溶液、内溶液体、乳剂、糖浆等,除水、液体石蜡等通常使用的稀释剂外,可包含湿润剂、甜味剂、芳香剂、保鲜剂等多种赋形剂。用于非肠道给药的制剂包含无菌的水溶液、非水溶剂、悬浮剂、乳剂、冷冻干燥制剂、栓剂等。

[0143] 在一实施方式中,本发明涉及生物体内半衰期相比于野生型有所增加的Fc变体相关制备方法,其包括如下步骤:培养包含含有编码本发明的Fc变体的核酸分子的载体的宿主细胞;以及回收通过上述宿主细胞表达的Fc变体。

[0144] 在一实施方式中,本发明涉及生物体内半衰期相比于野生型有所增加的Fc变体相关制备方法,其包括如下步骤:培养包含含有编码本发明的多肽的核酸分子的载体的宿主细胞;以及回收通过上述宿主细胞表达的多肽。

[0145] 在一实施方式中,本发明涉及包含生物体内半衰期相比于野生型有所增加的pH敏感性Fc变异的抗体相关制备方法,其包括如下步骤:培养包含含有编码本发明的抗体的核酸分子的载体的宿主细胞;以及纯化上述宿主细胞表达的抗体。

[0146] 在一实例中,抗体的纯化可包括过滤、高效液相色谱、阴离子交换或阳离子交换、高效液相层析(HPLC)、亲和度层析或它们的组合,优选地,可利用使用蛋白A(Protein A)的亲层层析。

[0147] 本发明的实施方式

[0148] 以下,通过实施例进一步详细说明本发明。但是,以下实施例仅用于具体实现本发明的内容,本发明并不限于此。

[0149] 实施例1.L309Y的氨基酸残基修饰Fc变体

[0150] 1-1.Fc变体(Q311M/M428L)的生产及纯化

[0151] 在现有研究中,对于已知有半衰期增加效果的YTE的M252Y、LS的M428L,在提高FcRn结合力的变体确认到Met被其他氨基酸取代(野生型Fc结构域氨基酸序列:序列号1)。基于这种理由,在抗体Fc的FcRn结合部位,Met被判断为抑制FcRn pH-依赖性结合力的氨基酸。为此,当引入于PFc29(Q311R及M428L Fc变体)时,为了确认FcRn结合力是否实际抑制结合力,制备向曲妥珠单抗重链(序列号11)引入Fc变体(Q311M/M428L)变体(序列号2)的曲妥珠单抗-ML并向Expi293F动物细胞转染。具体地,首先,以1:1的比例向30ml的Freestyle 293expression培养液(Gibco,12338-018)混合Met引入于上述Q311的Fc变体(Q311M/M428L)的重链基因及轻链基因。接着,在常温条件下,以4:1的比例混合聚乙烯亚胺(PEI, Polyethylenimine)(Polyscience,23966)和变体基因并放置20分钟后,混合前一天以 2×10^6 cells/ml的密度分注培养的Expi293F细胞株。在振荡培养器中以37°C、125rpm及8% CO₂的条件培养7天后,通过离心分离仅获得上清液。随后,利用25×PBS维持平衡(equilibrium)并利用0.2μm的过滤器(Merck Millipore)和瓶顶过滤器(bottle top filte)进行过滤。向所过滤的培养液添加500μl的蛋白A树脂并在4°C的温度条件下搅拌16小时。然后,通过柱流经回收树脂并用5ml的PBS清洗,用3ml的100mM甘氨酸(pH2.7)缓冲液洗脱后,使用1M Tris-HCl pH8.0进行中和。为了更换缓冲液而使用了离心过滤装置3K(Merck Millipore)。

[0152] 1-2.确认Fc变体(Q311M/M428L)的pH-依赖性结合力

[0153] 通过酶联免疫吸附剂测定(ELISA)确认上述实施例1-1纯化的曲妥珠单抗-ML对FcRn的pH-依赖性结合力。具体地,将向0.05M的Na₂CO₃ pH9.6稀释为4μg/ml的上述IgG Fc变体向Flat Bottom Polystyrene High Bind 96孔微孔板(costar)分别注入50μl并在4°C的温度条件下固定16小时。接着,在常温条件下,用100μl的4%脱脂牛奶(GenomicBase)(在0.05%PBST pH6.0中)封闭(blocking)2小时。用180μl的0.05%PBST(pH6.0)清洗4次后,将用1%脱脂牛奶(在0.05%PBST,pH6.0中)依次稀释的50μl的FcRn分注于每个孔并在常温条件下反应1小时。清洗过后,在常温条件下,用50μl的抗GST-HRP偶联物(GEHealthcare)进行1小时的抗体反应并清洗。随后,分别添加50μl的1-Step Ultra TMB-ELISA Substrate Solution(Thermo Fisher Scientific)进行发色后,分别添加50μl的2M H₂SO₄终止反应,然后,使用Epoch微孔板分光光度计(Epoch Microplate Spectrophotometer,BioTek)进行分析。

[0154] 其结果,预计抑制与FcRn结合的Met的结合反而在pH6.0下比PFc29更加优秀,确认到在pH7.4下表现出与PFC29相似的结合力。即,Q311M变体的结合在pH6.0下比PFc29更加优秀,并且,在pH7.4下表现出与PFc29相似的结合力(图1)。

[0155] 1-3.探索FcRn结合力增加的Fc变体

[0156] 为了额外发现与具备从上述实施例1-1筛选的Q311M及M428L的变异的Fc变体更具增加的FcRn结合力的变体。具体地,通过与上述实施例1-1相同方式制备在L309位置进入除L、G、P、C、D外的15种氨基酸的15种变体并在动物细胞中培养后进行纯化(图2)。

[0157] 1-4.确认包含Fc变体的抗体的pH-依赖性结合力

[0158] 为了确认在pH6.0中上述实施例1-3纯化的变体对FcRn的结合力,通过与上述实施例1-2相同方式执行酶联免疫吸附剂测定分析。其结果,可确保在pH6.0中具有最高结合力的L309Y、Q311M及M428L(曲妥珠单抗-YML)(图3的YM,以下,用YML表示,序列号3)变体(图3)。对此,通过酶联免疫吸附剂测定所筛选的YML变体对FcRn的pH-依赖性结合力。其结果,在pH6.0中的与FcRn的结合力高于现有的PFc29(Q311R及M428L Fc变体)及上述实施例1-1筛选的ML变体(Q311M及M428L Fc变体),在pH7.4中表现出相似程度的离解程度(图4a至图4c)。

[0159] 1-5.确认Fc变体对FcRn的血清半衰期增加效果

[0160] 为了提高血清半衰期,由于对FcRn的Fc的pH-依赖性结合力尤为重要(参照图5),参照Souders et al 2015在上述实施例1-1及实施例1-4筛选的曲妥珠单抗-ML(Q311M及M428L Fc变体)及曲妥珠单抗-YML(L309Y、Q311M及M428L Fc变体)中确认在弱酸性环境中的瞬间结合速度(on rate)及中性环境中的瞬间离解速度(off rate)。作为其对照组利用现有的Fc29(Q311R及M428L Fc变体)及PFc41(L309G及M428L Fc变体)。具体地,将40 μ g/ml的His标记的人FcRn向NI-NTA生物传感器(Pall Fortebio)固定3分钟。随后,用pH6.0的PBS缓冲液维持基准(baseline)后,结合700nM的各个抗体Fc变体(在PBS pH6.0中)20秒。在弱酸性环境(pH6.0)中抗体Fc抗体与FcRn结合的状态下,用pH7.4的PBS更换缓冲液离解5秒并通过生物层干涉测定法(biolayer interferometry assay,BLItz,Pall Fortebio)进行测定。在测定数据(sensorgram)中,基于在各pH中直线区间(pH6.0,association:2秒/pH7.4,dissociation:1秒)的倾斜来确认瞬间结合速度和瞬间离解速度。然后,为了比较Fc变体而除以各Fc变体的倾斜值并计算比例。按照结合速度比和离解速度比的平均进行评估(scoring)来确认结合速度和离解速度最高的Fc变体。其结果,筛选出预计半衰期增加效果最大的抗体Fc变体(YML,序列号3)(图6a至图6c)。

[0161] 实施例2.Q311M的氨基酸残基修饰Fc变体

[0162] 2-1.具有Q311M/M428L突变的曲妥珠单抗-Fc变体的生产及纯化

[0163] 通过现有研究已知,在FcRn结合力增加的变体中,Met被其他氨基酸取代(野生型Fc结构域氨基酸序列:序列号1)。由于这种理由,在抗体Fc的FcRn结合部位,Met被判断为抑制FcRn pH-依赖性结合力的氨基酸。因此,当向本发明人发现的PFc29(Q311R/M428L)引入Met时,为了确认FcRn结合力是否实际抑制结合力而进行本实验。

[0164] 更具体地,制备向野生型曲妥珠单抗重链(heavy chain)(序列号11)引入Fc变体(Q311M/M428L,序列号2)的重链表达载体和野生型曲妥珠单抗轻链(序列号12)表达载体。接着,向Expi293F动物细胞转染两个载体。在转染前一天,以 2×10^6 cells/ml的密度传代培养300ml的Expi293F细胞,第二天,使用聚乙烯亚胺(PEI,Polyethylenimine,Polyscience,23966)进行转染。首先,向30ml的Freestyle 293expression培养液(Gibco,12338-018)以1:1的比例混合变体的重链基因和轻链基因。随后,在常温条件下,以4:1的比例混合聚乙烯

亚胺和变体基因并放置20分钟后,混合前一天传代培养的细胞并在CO₂振荡培养箱中以37℃、125rpm及8%CO₂的条件培养7天后,通过离心分离仅获得上清液。之后,利用25×PBS维持平衡(equilibrium)并利用瓶顶过滤器(bottle top filte)向0.2μm的过滤器(Merck Millipore)进行过滤。向所过滤的培养液添加500μl的蛋白A树脂并在4℃的温度条件下搅拌16小时。然后,通过柱流经回收树脂并用5ml的PBS清洗,用3ml的100mM甘氨酸(pH2.7)缓冲液洗脱后,使用1M Tris-HCl pH8.0进行中和。为了更换缓冲液而使用了离心过滤装置3K(Merck Millipore)。

[0165] 2-2.纯化的曲妥珠单抗-Fc变体(Q311M/M428L)的酶联免疫吸附剂测定分析

[0166] 通过酶联免疫吸附剂测定(ELISA)确认上述实施例2-1纯化的曲妥珠单抗-ML对FcRn的pH-依赖性结合力。

[0167] 更具体地,将向0.05M的Na₂CO₃ pH9.6稀释为4μg/ml的IgG Fc变体向Flat Bottom Polystyrene High Bind 96孔微孔板(costar)分别注入50μl并在4℃的温度条件下固定16小时后,在常温条件下,用100μl的4%脱脂牛奶(GenomicBase)(在0.05%PBST pH6.0/pH7.4中)封闭(blocking)2小时。用180μl的0.05%PBST(pH6.0/pH7.4)清洗4次后,将用1%脱脂牛奶(在0.05%PBST,pH6.0/pH7.4中)依次稀释的50μl的FcRn分注于每个孔并在常温条件下反应1小时。清洗过后,在常温条件下,用50μl的抗GST-HRP偶联物(anti-GST-HRP conjugate,GEHealthcare)进行1小时的抗体反应并清洗。随后,分别添加50μl的1-Step Ultra TMB-ELISA Substrate Solution(Thermo Fisher Scientific)进行发色后,分别添加50μl的2M H₂SO₄终止反应,然后,使用Epoch微孔板分光光度计(BioTek)进行分析。其结果,预计抑制与FcRn结合的Met的结合反而在pH6.0下比PFc29更加优秀,确认到在pH7.4下表现出与PFC29相似的结合力(图1)。

[0168] 即,与实验前的预测相反,在Q311M突变的情况下,确认到在pH6.0中结合力增加。

[0169] 2-3.额外探索FcRn结合力增加的Fc变体及动物细胞表达纯化

[0170] 为了发现比上述筛选的Q311M/M428L更具结合力的变体。具体地,通过与实施例2-2相同方法在动物细胞中培养与FcRn结合尤为重要的L309位置进入除L、G、P、C、D外的15种氨基酸的15种变体并进行纯化(图7)。

[0171] 2-4.纯化的曲妥珠单抗(trastuzumab)-Fc变体的酶联免疫吸附剂测定分析

[0172] 为了确认上述实施例2-3制备的变体的FcRn在pH 6.0中的结合力,执行酶联免疫吸附剂测定。

[0173] 更具体地,为了确认对FcRn的pH-依赖性结合力,将向0.05M的Na₂CO₃ pH9.6稀释为4μg/ml的IgG Fc变体向Flat Bottom Polystyrene High Bind 96孔微孔板(costar)分别注入50μl并在4℃的温度条件下固定16小时后,在常温条件下,用100μl的4%脱脂牛奶(GenomicBase)(在0.05%PBST pH6.0中)封闭(blocking)2小时。用180μl的0.05%PBST(pH6.0)清洗4次后,将用1%脱脂牛奶(在0.05%PBST,pH6.0中)依次稀释的50μl的FcRn分注于每个孔并在常温条件下反应1小时。清洗过后,在常温条件下,用50μl的抗GST-HRP偶联物(GEHealthcare)进行1小时的抗体反应并清洗。随后,分别添加50μl的1-Step Ultra TMB-ELISA Substrate Solution(Thermo Fisher Scientific)进行发色后,分别添加50μl的2M H₂SO₄终止反应,然后,使用Epoch微孔板分光光度计(BioTek)进行分析。其结果,确保两种变体(图8),即,向在pH6.0中结合力高于PFc29的野生型曲妥珠单抗重链(heavy

chain) (序列号11) 引入Fc变体 (L309Y/Q311M/M428L, 序列号3) 的重链与野生型曲妥珠单抗轻链 (序列号12) 结合的曲妥珠单抗-YML; 以及向野生型曲妥珠单抗重链 (heavy chain) (序列号11) 引入Fc变体 (L309E/Q311M/M428L, 序列号3) 的重链与野生型曲妥珠单抗轻链 (序列号12) 结合的曲妥珠单抗-EML (序列号4)。

[0174] 2-5. 曲妥珠单抗Fc变体 (L309Y/Q311M/M428L (YML)、L309E/Q311M/M428L (EML)) 的 pH- 依赖性FcRn结合力分析

[0175] 为了确认上述实施例2-4纯化的曲妥珠单抗-YML、曲妥珠单抗-EML (序列号4) 两种变体对FcRn的pH- 依赖性结合力, 执行酶联免疫吸附剂测定。

[0176] 更具体地, 为了确认对FcRn的pH- 依赖性结合力, 将向0.05M的Na₂CO₃ pH9.6稀释为4μg/ml的IgG Fc变体向Flat Bottom Polystyrene High Bind 96孔微孔板 (costar) 分别注入50μl并在4°C的温度条件下固定16小时。随后, 在常温条件下, 用100μl的4%脱脂牛奶 (GenomicBase) (在0.05% PBST pH6.0中) 封闭 (blocking) 2小时。用180μl的0.05% PBST (pH6.0/pH7.4) 清洗4次后, 将用1%脱脂牛奶 (在0.05% PBST, pH6.0/pH7.4中) 依次稀释的50μl的FcRn分注于每个孔并在常温条件下反应1小时。清洗过后, 在常温条件下, 用50μl的抗GST-HRP偶联物 (GEHealthcare) 进行1小时的抗体反应, 清洗后, 分别添加50μl的1-Step Ultra TMB-ELISA Substrate Solution (Thermo Fisher Scientific) 进行发色后, 分别添加50μl的2M H₂SO₄终止反应, 然后, 使用Epoch微孔板分光光度计 (BioTek) 进行分析。

[0177] 其结果, YML相比于EML在pH6.0条件中表现出高于PFc29的结合力, 在YML的情况下, 确认到即使在pH7.4中结合力也有所增加 (图9)。

[0178] 由于, 在pH7.4中表现出与PFc29相似结合力且在pH6.0中表现出结合力增加的EML变体的pH依赖性结合力有所提高, 因此, 这可判断为通过提高抗体的再循环过程来增加血清半衰期 (图10a至图10b)。

[0179] 实施例3. Q311W的氨基酸残基修饰Fc变体

[0180] 3-1. 在PFc41 (L309G、M428L) 的Q311位置17种氨基酸取代变体制备及分析

[0181] 制备pMopac12-N1pA-Fc变体质粒, 在现有研究中, 基于半衰期增加的PFc41 (L309G、M428L) 及PFc29 (Q311R及M428L Fc变体) 固定L309G并通过细菌显示分析在Q311位置被除Q、CR外的17种氨基酸取代的变体。为了通过FACS在pH6.0条件下筛选对人FcRn增加结合力的变体, 对制备的质粒进行FACS分析。其结果, 筛选出相比于现有研究中发现的PFc29在pH6.0中更具结合力的Q311位置被L、I、V、T、A、Y、H、K、W取代的9种变体 (在M428L、L309G Fc变体中Q311L、Q311I、Q311V、Q311T、Q311A、Q311Y、Q311H、Q311K或Q311W) (图11)。

[0182] 3-2. 在PFc41 (L309G、M428L) 的Q311位置包含L、I、V、T、A、Y、H、K、W变体的曲妥珠单抗 (trastuzumab) Fc变体的生产及纯化

[0183] 为了确认上述实施例3-1筛选的9种变体在抗体格式中的特性, 制备野生型曲妥珠单抗重链 (heavy chain) (序列号11) 引入Fc变体的重链表达载体和野生型曲妥珠单抗轻链 (序列号12) 表达载体。随后, 向Expi293F动物细胞转染。

[0184] 更具体地, 在转染前一天, 以 2×10^6 cells/ml的密度传代培养300ml的Expi293F细胞, 第二天, 使用聚乙烯亚胺 (Polyethylenimine, Polyscience, 23966) 进行转染。首先, 向3ml的Freestyle 293expression培养液 (Gibco, 12338-018) 以1:1的比例混合变体的重链基因和轻链基因。随后, 在常温条件下, 以4:1的比例混合聚乙烯亚胺和变体基因并放置20

分钟后,混合前一天传代培养的细胞并在CO₂振荡培养箱中以37℃、125rpm及8%CO₂的条件培养7天后,通过离心分离仅获得上清液。之后,利用25×PBS维持平衡(equilibrium)。利用瓶顶过滤器(bottle top filte)向0.2μm的过滤器(Merck Millipore)进行过滤。向所过滤的培养液添加100μl的蛋白A树脂并在4℃的温度条件下搅拌16小时后,通过柱流经回收树脂(resin)。然后,用1ml的PBS清洗两次后,用1ml的100mM甘氨酸(pH2.7)缓冲液洗脱(elution)后,使用1M Tris-HCl pH8.0进行中和。为了更换缓冲液而使用了离心过滤装置30K(Merck Millipore)。利用SDS-PAGE凝胶确认完成的试样(图12)。

[0185] 3-3.纯化的曲妥珠单抗Fc变体的酶联免疫吸附剂测定(ELISA)分析

[0186] 为了测定向野生型曲妥珠单抗重链(heavy chain)(序列号11)引入Fc变体的重链与野生型曲妥珠单抗轻链(序列号12)结合的曲妥珠单抗-变体对FcRn的pH-依赖性结合力,执行酶联免疫吸附剂测定。为了确认在pH6.0条件中对FcRn的结合力,首先,将向0.05M的Na₂CO₃ pH9.6稀释为4μg/ml的IgG Fc变体向Flat Bottom Polystyrene High Bind 96孔微孔板(costar)分别注入50μl并在4℃的温度条件下固定16小时。接着,在常温条件下,用100μl的4%脱脂牛奶(GenomicBase)(在0.05%PBST pH6.0中)封闭(blocking)2小时。用180μl的0.05%PBST(pH6.0)清洗4次后,将用1%脱脂牛奶(在0.05%PBST, pH6.0中)依次稀释(serially dilution)的50μl的FcRn分注于每个孔并在常温条件下反应1小时。清洗过后,在常温条件下,用50μl的抗GST-HRP偶联物(GEHealthcare)进行1小时的抗体反应并清洗。随后,分别添加50μl的1-Step Ultra TMB-ELISA Substrate Solution(Thermo Fisher Scientific)进行发色后,分别添加50μl的2M H₂SO₄终止反应。然后,使用Epoch微孔板分光光度计(BioTek)进行分析。其结果,筛选出在pH6.0条件中对FcRn的结合力增加的前3个变体(L309G/Q311Y/M428L、L309G/Q311H/M428L、L309G/Q311W/M428L)(图13)。

[0187] 为了测定所筛选的三种曲妥珠单抗变体对FcRn的pH-依赖性结合力,执行酶联免疫吸附剂测定。首先,为了确认对FcRn的pH-依赖性结合力,将向0.05M的Na₂CO₃ pH9.6稀释为4μg/ml的IgG Fc变体向Flat Bottom Polystyrene High Bind 96孔微孔板(costar)分别注入50μl并在4℃的温度条件下固定16小时。接着,在常温条件下,用100μl的4%脱脂牛奶(GenomicBase)(在0.05%PBST pH6.0/pH7.4中)封闭(blocking)2小时。用180μl的0.05%PBST(pH6.0/pH7.4)清洗4次后,将用1%脱脂牛奶(在0.05%PBST, pH6.0/pH7.4中)依次稀释(serially dilution)的50μl的FcRn分注于每个孔并在常温条件下反应1小时。清洗过后,在常温条件下,用50μl的抗GST-HRP偶联物(GEHealthcare)进行1小时的抗体反应并执行清洗过程。随后,分别添加50μl的1-Step Ultra TMB-ELISA Substrate Solution(Thermo Fisher Scientific)进行发色后,分别添加50μl的2M H₂SO₄终止反应后,使用Epoch微孔板分光光度计(BioTek)进行分析。

[0188] 其结果,在pH6.0条件中对FcRn的结合力相比于PFc29有所提高,即使在pH7.4中的结合力也高于PFc29,因此,pH依赖性结合力并未提高(图14)。

[0189] 3-4.饱和突变(Saturation mutagenesis)及动物细胞表达及纯化

[0190] 制备在实施例3-3筛选的3种变体中(L309G/Q311Y/M428L、L309G/Q311H/M428L、L309G/Q311W/M428L)除外现有研究已知的Q311H并包含Q311Y或W的用于将L309位置被F、I、M、V、T、A、Y、H、Q、N、K、E、W、R、S取代的15种曲妥珠单抗变体表达为30种的质粒。利用所制备的表达用载体并通过与上述相同方法在动物细胞培养30种曲妥珠单抗变体并纯化后,通过

SDS-PAGE凝胶进行确认(图15)。

[0191] 3-5. 曲妥珠单抗-Fc变体在pH6.0条件中对FcRn的酶联免疫吸附剂测定分析

[0192] 为了测定实施例3-4的30种曲妥珠单抗变体在pH6.0中对FcRn的结合力,执行酶联免疫吸附剂测定分析。首先,为了确认对FcRn的pH-依赖性结合力,将向0.05M的 Na_2CO_3 pH9.6稀释为4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的IgG Fc变体向Flat Bottom Polystyrene High Bind 96孔微孔板(costar)分别注入50 μl 并在4 $^\circ\text{C}$ 的温度条件下固定16小时后,在常温条件下,用100 μl 的4%脱脂牛奶(GenomicBase)(在0.05%PBST pH6.0中)封闭(blocking)2小时。用180 μl 的0.05%PBST(pH6.0)清洗4次后,将用1%脱脂牛奶(在0.05%PBST, pH6.0中)依次稀释(serially dilution)的50 μl 的FcRn分注于每个孔并在常温条件下反应1小时。清洗过后,在常温条件下,用50 μl 的抗GST-HRP偶联物(GEHealthcare)进行1小时的抗体反应并清洗。随后,分别添加50 μl 的1-Step Ultra TMB-ELISASubstrate Solution(Thermo Fisher Scientific)进行发色后,分别添加50 μl 的2M H_2SO_4 终止反应后,使用Epoch微孔板分光光度计(BioTek)进行分析。其结果,发现在pH6.0中的结合力高于PFc29的L309E/Q311W/M428L(EWL,序列号8)变体(图16)。

[0193] 3-6. L309E/Q311W/M428L(EWL)突变引入的曲妥珠单抗-Fc变体的pH-依赖性FcRn结合力分析

[0194] 为了测定野生型曲妥珠单抗重链(heavy chain)(序列号11)包含EWL Fc变体的重链与曲妥珠单抗轻链(序列号12)结合的曲妥珠单抗-EWL对FcRn的pH-依赖性结合力,执行酶联免疫吸附剂测定。首先,为了确认对FcRn的pH-依赖性结合力,将向0.05M的 Na_2CO_3 pH9.6稀释为4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的IgG Fc变体向Flat Bottom Polystyrene High Bind 96孔微孔板(costar)分别注入50 μl 并在4 $^\circ\text{C}$ 的温度条件下固定16小时后在常温条件下,用100 μl 的4%脱脂牛奶(GenomicBase)(在0.05%PBST pH6.0/pH7.4中)封闭(blocking)2小时。用180 μl 的0.05%PBST(pH6.0/pH7.4)清洗4次后,将用1%脱脂牛奶(在0.05%PBST, pH6.0/pH7.4中)依次稀释(serially dilution)的50 μl 的FcRn分注于每个孔并在常温条件下反应1小时。

[0195] 清洗过后,在常温条件下,用50 μl 的抗GST-HRP偶联物(GEHealthcare)进行1小时的抗体反应并清洗。随后,分别添加50 μl 的1-Step Ultra TMB-ELISASubstrate Solution(Thermo Fisher Scientific)进行发色后,分别添加50 μl 的2M H_2SO_4 终止反应后,使用Epoch微孔板分光光度计(BioTek)进行分析。其结果,在pH6.0条件中与人FcRn的结合力高于PFc29,并且,在pH7.4条件中的结合力低于PFc29(图17a至17c)。因此,随着变体EWL的pH依赖性结合力提高,可通过最大化抗体的再循环过程来提高血清半衰期。

[0001]	序列表																		
[0002]	<110>	高丽大学校产学协力团																	
[0003]	<120>	pH敏感性Fc变体																	
[0004]	<130>	P22115167WP																	
[0005]	<150>	KR 10-2020-0010336																	
[0006]	<151>	2020-01-29																	
[0007]	<150>	KR 10-2020-0148372																	
[0008]	<151>	2020-11-09																	
[0009]	<150>	KR 10-2020-0148373																	
[0010]	<151>	2020-11-09																	
[0011]	<160>	12																	
[0012]	<170>	PatentIn version 3.5																	
[0013]	<210>	1																	
[0014]	<211>	227																	
[0015]	<212>	PRT																	
[0016]	<213>	未知(Unknown)																	
[0017]	<220>																		
[0018]	<223>	野生 Fc																	
[0019]	<400>	1																	
[0020]	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly			
[0021]	1				5					10					15				
[0022]	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met			
[0023]					20					25					30				
[0024]	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His			
[0025]					35					40					45				
[0026]	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val			
[0027]		50							55					60					
[0028]	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr			
[0029]	65						70					75				80			
[0030]	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly			
[0031]					85					90						95			
[0032]	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile			
[0033]					100					105						110			
[0034]	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val			
[0035]					115					120						125			
[0036]	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser			
[0037]					130					135						140			
[0038]	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu			

[0039]	145	150	155	160
[0040]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro			
[0041]	165	170	175	
[0042]	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val			
[0043]	180	185	190	
[0044]	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met			
[0045]	195	200	205	
[0046]	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser			
[0047]	210	215	220	
[0048]	Pro Gly Lys			
[0049]	225			
[0050]	<210> 2			
[0051]	<211> 227			
[0052]	<212> PRT			
[0053]	<213> 未知(Unknown)			
[0054]	<220>			
[0055]	<223> ML (Q311M/M428L)			
[0056]	<400> 2			
[0057]	Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly			
[0058]	1	5	10	15
[0059]	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met			
[0060]	20	25	30	
[0061]	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His			
[0062]	35	40	45	
[0063]	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val			
[0064]	50	55	60	
[0065]	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr			
[0066]	65	70	75	80
[0067]	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Met Asp Trp Leu Asn Gly			
[0068]	85	90	95	
[0069]	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile			
[0070]	100	105	110	
[0071]	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val			
[0072]	115	120	125	
[0073]	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser			
[0074]	130	135	140	
[0075]	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu			
[0076]	145	150	155	160
[0077]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro			

[0078]	165								170				175				
[0079]	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	
[0080]	180								185				190				
[0081]	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Leu	
[0082]	195								200				205				
[0083]	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	
[0084]	210								215				220				
[0085]	Pro	Gly	Lys														
[0086]	225																
[0087]	<210>	3															
[0088]	<211>	227															
[0089]	<212>	PRT															
[0090]	<213>	未知(Unknown)															
[0091]	<220>																
[0092]	<223>	YML (L309Y/Q311M/M428L)															
[0093]	<400>	3															
[0094]	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	
[0095]	1	5								10				15			
[0096]	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	
[0097]	20								25				30				
[0098]	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	
[0099]	35								40				45				
[0100]	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	
[0101]	50								55				60				
[0102]	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	
[0103]	65	70								75				80			
[0104]	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Tyr	His	Met	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	
[0105]	85								90				95				
[0106]	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	
[0107]	100								105				110				
[0108]	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	
[0109]	115								120				125				
[0110]	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	
[0111]	130								135				140				
[0112]	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	
[0113]	145	150								155				160			
[0114]	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	
[0115]	165								170				175				
[0116]	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	

[0156]	195	200	205
[0157]	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
[0158]	210	215	220
[0159]	Pro Gly Lys		
[0160]	225		
[0161]	<210> 5		
[0162]	<211> 227		
[0163]	<212> PRT		
[0164]	<213> 未知(Unknown)		
[0165]	<220>		
[0166]	<223> EWL (L309E/Q311W/M428L)		
[0167]	<400> 5		
[0168]	Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly		
[0169]	1 5 10 15		
[0170]	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met		
[0171]	20 25 30		
[0172]	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His		
[0173]	35 40 45		
[0174]	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
[0175]	50 55 60		
[0176]	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
[0177]	65 70 75 80		
[0178]	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Glu His Trp Asp Trp Leu Asn Gly		
[0179]	85 90 95		
[0180]	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile		
[0181]	100 105 110		
[0182]	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
[0183]	115 120 125		
[0184]	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser		
[0185]	130 135 140		
[0186]	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
[0187]	145 150 155 160		
[0188]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
[0189]	165 170 175		
[0190]	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		
[0191]	180 185 190		
[0192]	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu		
[0193]	195 200 205		
[0194]	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		

[0195]	210	215	220	
[0196]	Pro Gly Lys			
[0197]	225			
[0198]	<210> 6			
[0199]	<211> 681			
[0200]	<212> DNA			
[0201]	<213> 未知(Unknown)			
[0202]	<220>			
[0203]	<223> 野生型 Fc DNA 序列			
[0204]	<400> 6			
[0205]	gacaaaactc acacatgccc accgtgccc	gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc	60	
[0206]	ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc	ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca	120	
[0207]	tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac	cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac	180	
[0208]	ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag	ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac	240	
[0209]	cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac	caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag	300	
[0210]	tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc	cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa	360	
[0211]	gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc	ctgcccccat cccgggacga gctgaccaag	420	
[0212]	aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa	ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag	480	
[0213]	tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac	tacaagacca cgcctcccggt gctggactcc	540	
[0214]	gacggctcct tcttctctta cagcaagctc	accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg	600	
[0215]	aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag	gctctgcaca accactacac gcagaagagc	660	
[0216]	ctctccctgt ccccggttaa a		681	
[0217]	<210> 7			
[0218]	<211> 681			
[0219]	<212> DNA			
[0220]	<213> 未知(Unknown)			
[0221]	<220>			
[0222]	<223> ML DNA 序列			
[0223]	<400> 7			
[0224]	gacaaaactc acacatgccc accgtgccc	gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc	60	
[0225]	ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc	ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca	120	
[0226]	tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac	cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac	180	
[0227]	ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag	ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac	240	
[0228]	cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac	atggactggc tgaatggcaa ggagtacaag	300	
[0229]	tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc	cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa	360	
[0230]	gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc	ctgcccccat cccgggacga gctgaccaag	420	
[0231]	aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa	ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag	480	
[0232]	tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac	tacaagacca cgcctcccggt gctggactcc	540	
[0233]	gacggctcct tcttctctta cagcaagctc	accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg	600	

[0234]	aacgtcttct catgctccgt gctgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc	660
[0235]	ctctccctgt ccccggttaa a	681
[0236]	<210> 8	
[0237]	<211> 681	
[0238]	<212> DNA	
[0239]	<213> 未知(Unknown)	
[0240]	<220>	
[0241]	<223> YML DNA 序列	
[0242]	<400> 8	
[0243]	gacaaaactc acacatgccc accgtgccc gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc	60
[0244]	ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca	120
[0245]	tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac	180
[0246]	ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg aacagtacaa cagcacgtac	240
[0247]	cgtgtggtca gcgtcctcac cgtctatcac atggactggc tgaatggcaa ggagtacaag	300
[0248]	tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa	360
[0249]	gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag	420
[0250]	aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag	480
[0251]	tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cacctccgt gctggactcc	540
[0252]	gacggctcct tcttctctta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg	600
[0253]	aacgtcttct catgctccgt gctgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc	660
[0254]	ctctccctgt ccccggttaa a	681
[0255]	<210> 9	
[0256]	<211> 681	
[0257]	<212> DNA	
[0258]	<213> 未知(Unknown)	
[0259]	<220>	
[0260]	<223> EML DNA 序列	
[0261]	<400> 9	
[0262]	gacaaaactc acacatgccc accgtgccc gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc	60
[0263]	ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca	120
[0264]	tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac	180
[0265]	ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac	240
[0266]	cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcgaacac atggactggc tgaatggcaa ggagtacaag	300
[0267]	tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa	360
[0268]	gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag	420
[0269]	aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag	480
[0270]	tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cacctccgt gctggactcc	540
[0271]	gacggctcct tcttctctta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg	600
[0272]	aacgtcttct catgctccgt gctgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc	660

[0273]	ctctccctgt ccccggttaa a	681
[0274]	<210> 10	
[0275]	<211> 681	
[0276]	<212> DNA	
[0277]	<213> 未知(Unknown)	
[0278]	<220>	
[0279]	<223> EWL DNA 序列	
[0280]	<400> 10	
[0281]	gacaaaactc acacatgccc accgtgccc gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc	60
[0282]	ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca	120
[0283]	tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac	180
[0284]	ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac	240
[0285]	cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcgaacac tgggactggc tgaatggcaa ggagtacaag	300
[0286]	tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa	360
[0287]	gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggatga gctgaccaag	420
[0288]	aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag	480
[0289]	tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cacctccgt gctggactcc	540
[0290]	gacggctcct tcttctctca cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg	600
[0291]	aacgtcttct catgctccgt gctgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc	660
[0292]	ctctccctgt ccccggttaa a	681
[0293]	<210> 11	
[0294]	<211> 451	
[0295]	<212> PRT	
[0296]	<213> 未知(Unknown)	
[0297]	<220>	
[0298]	<223> Trastuzumab-WT (重链)	
[0299]	<400> 11	
[0300]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
[0301]	1 5 10 15	
[0302]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr	
[0303]	20 25 30	
[0304]	Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
[0305]	35 40 45	
[0306]	Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val	
[0307]	50 55 60	
[0308]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr	
[0309]	65 70 75 80	
[0310]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
[0311]	85 90 95	

[0312]	Ser	Arg	Trp	Gly	Gly	Asp	Gly	Phe	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
[0313]				100				105						110		
[0314]	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
[0315]				115				120						125		
[0316]	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala
[0317]				130				135						140		
[0318]	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser
[0319]				145				150						155		160
[0320]	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
[0321]					165					170					175	
[0322]	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
[0323]				180						185					190	
[0324]	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys
[0325]				195						200					205	
[0326]	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Pro	Lys	Ser	Cys
[0327]				210						215					220	
[0328]	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly
[0329]				225									235			240
[0330]	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
[0331]					245						250					255
[0332]	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His
[0333]				260							265					270
[0334]	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
[0335]				275							280					285
[0336]	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
[0337]				290							295					300
[0338]	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
[0339]				305								315				320
[0340]	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile
[0341]					325						330					335
[0342]	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
[0343]				340							345					350
[0344]	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
[0345]				355							360					365
[0346]	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
[0347]				370							375					380
[0348]	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
[0349]				385							390					400
[0350]	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val

[0351]	405							410							415		
[0352]	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	
[0353]	420							425							430		
[0354]	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	
[0355]	435							440							445		
[0356]	Pro	Gly	Lys														
[0357]	450																
[0358]	<210>	12															
[0359]	<211>	214															
[0360]	<212>	PRT															
[0361]	<213>	未知(Unknown)															
[0362]	<220>																
[0363]	<223>	Trastuzumab-WT (轻链)															
[0364]	<400>	12															
[0365]	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	
[0366]	1	5			10							15					
[0367]	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Asn	Thr	Ala	
[0368]	20				25							30					
[0369]	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	
[0370]	35				40							45					
[0371]	Tyr	Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	
[0372]	50				55							60					
[0373]	Ser	Arg	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	
[0374]	65	70				75							80				
[0375]	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	His	Tyr	Thr	Thr	Pro	Pro	
[0376]	85				90							95					
[0377]	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	
[0378]	100				105							110					
[0379]	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	
[0380]	115				120							125					
[0381]	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	
[0382]	130				135							140					
[0383]	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	
[0384]	145	150				155							160				
[0385]	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	
[0386]	165				170							175					
[0387]	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	
[0388]	180				185							190					
[0389]	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	

[0390]	195	200	205
[0391]	Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
[0392]	210		

FcRn-GST 0.078125ug/ml在pH 6.0或pH 7.4时

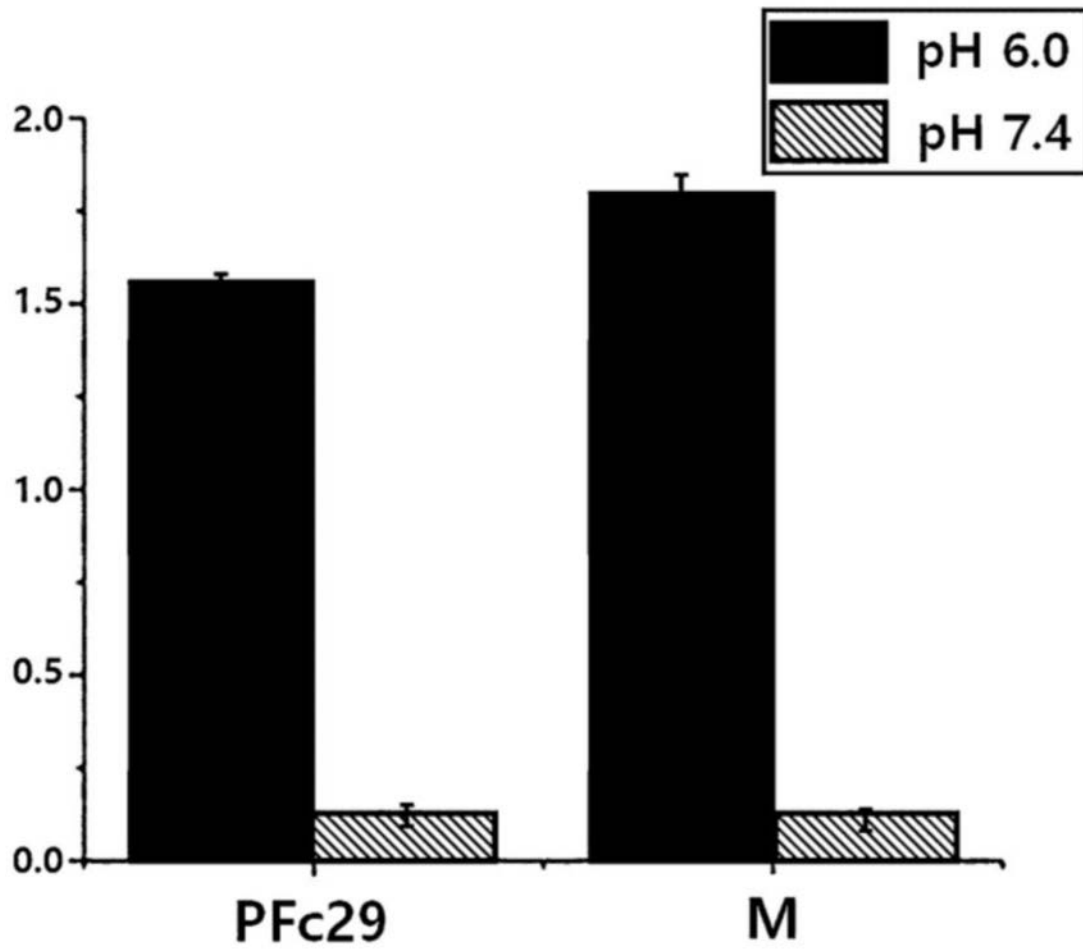


图1

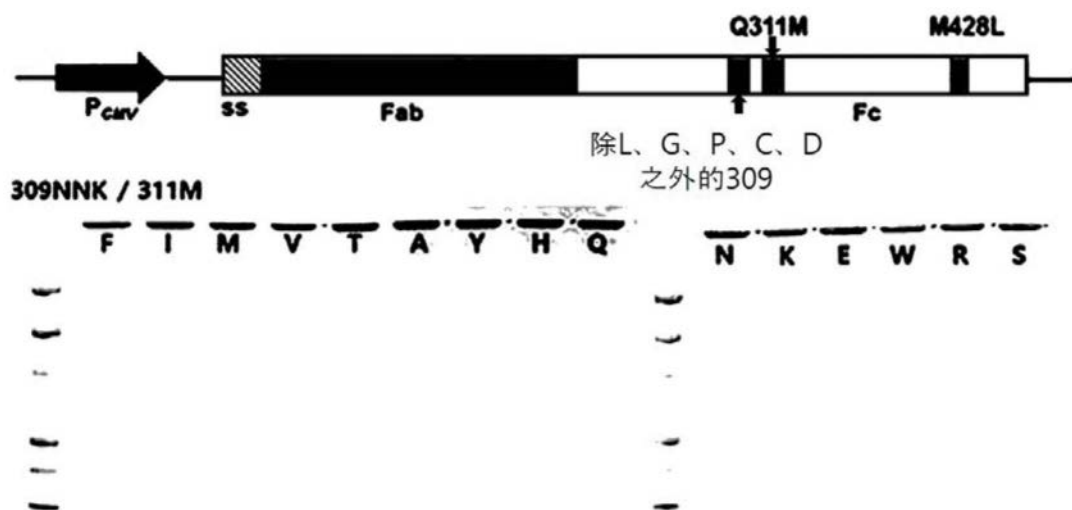


图2

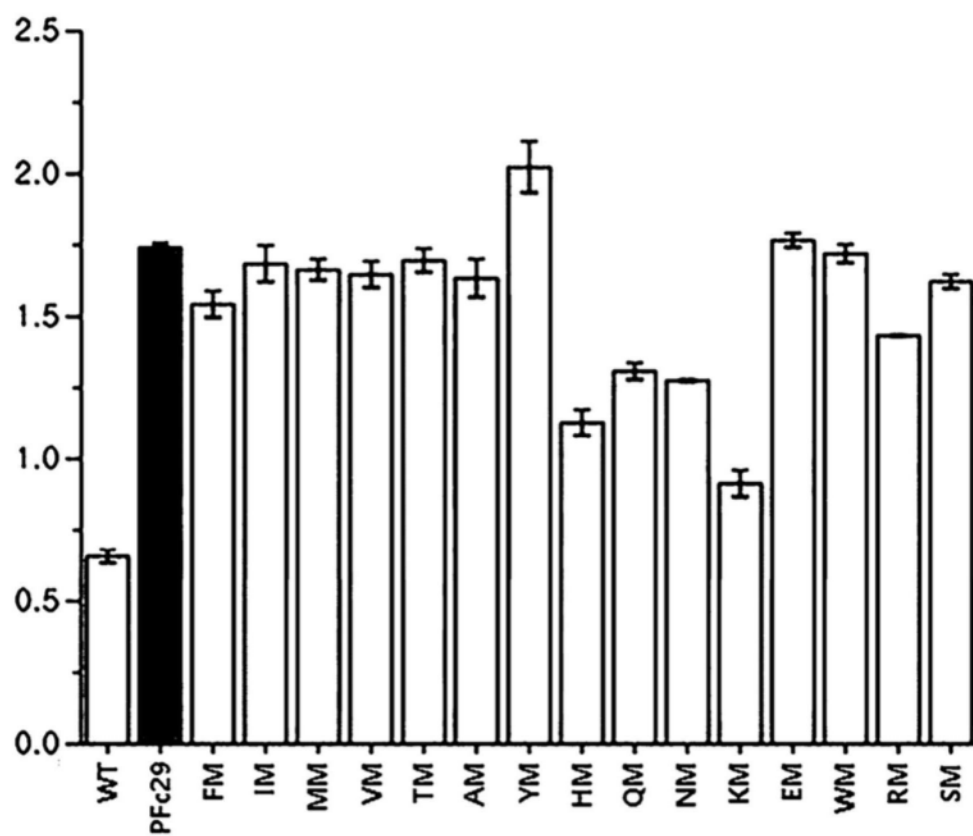


图3

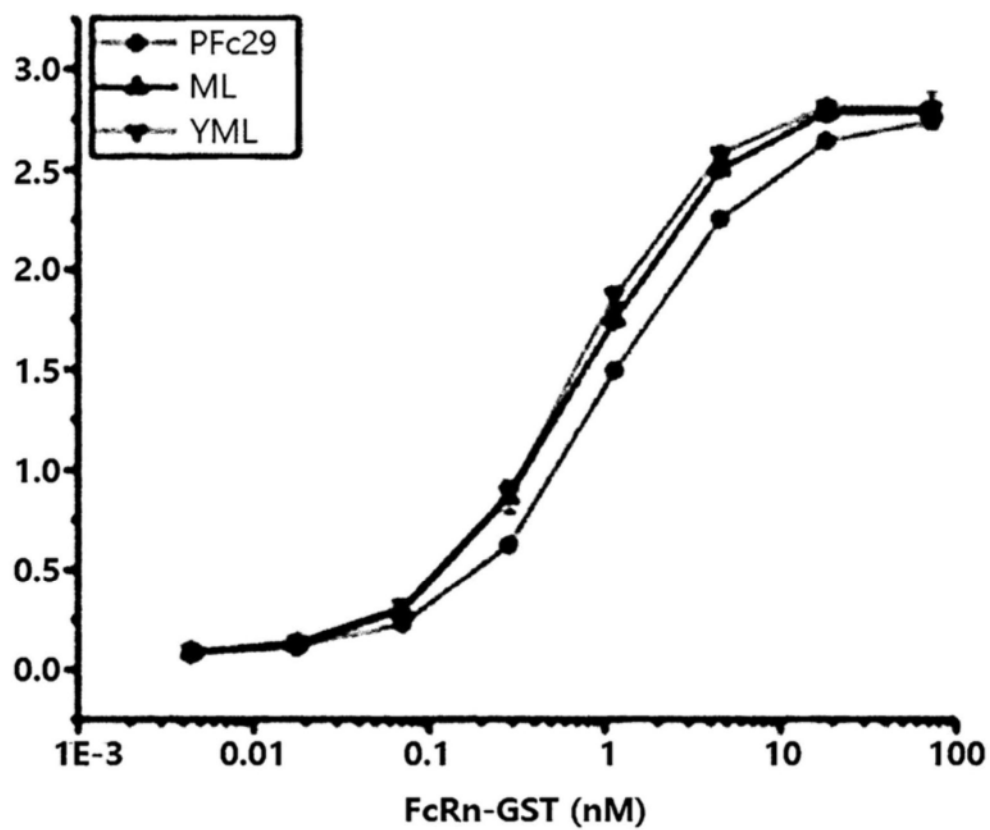


图4a

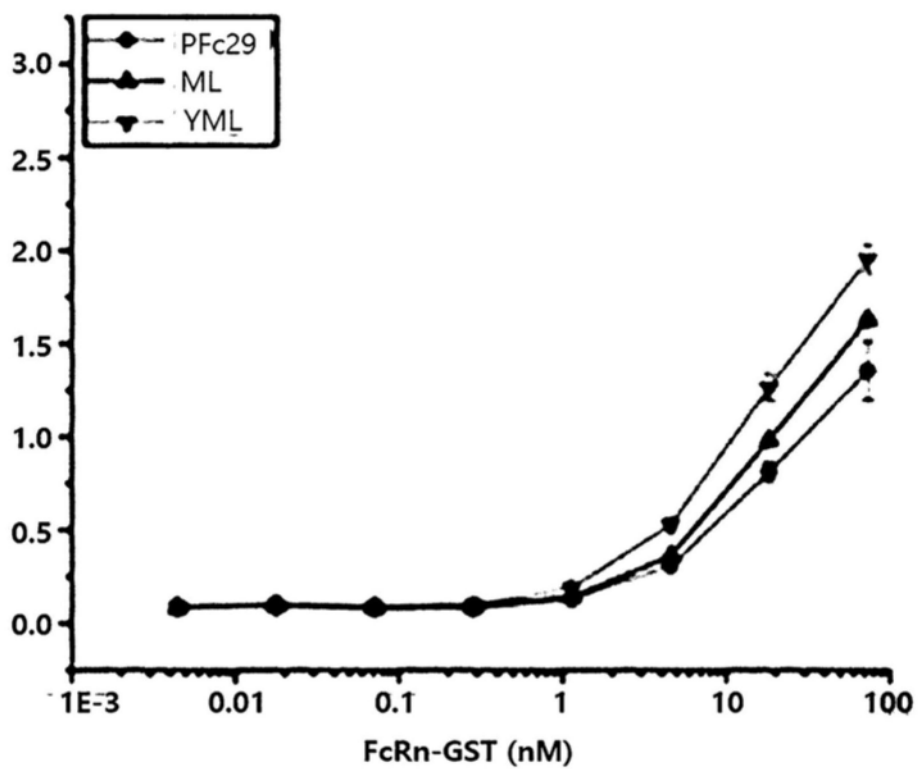


图4b

FcRn-GST 0.078125ug/ml在pH 6.0或pH 7.4时

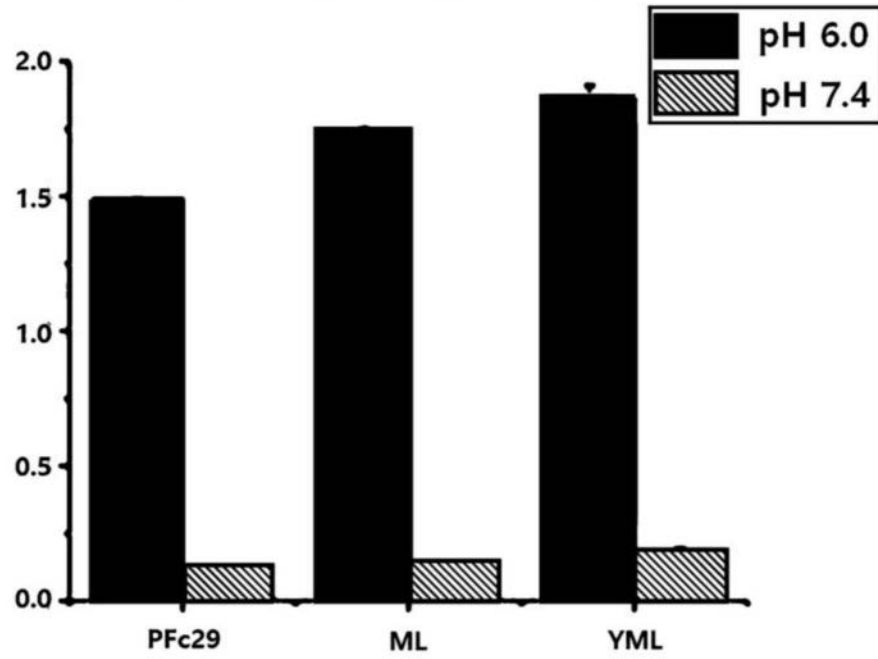


图4c

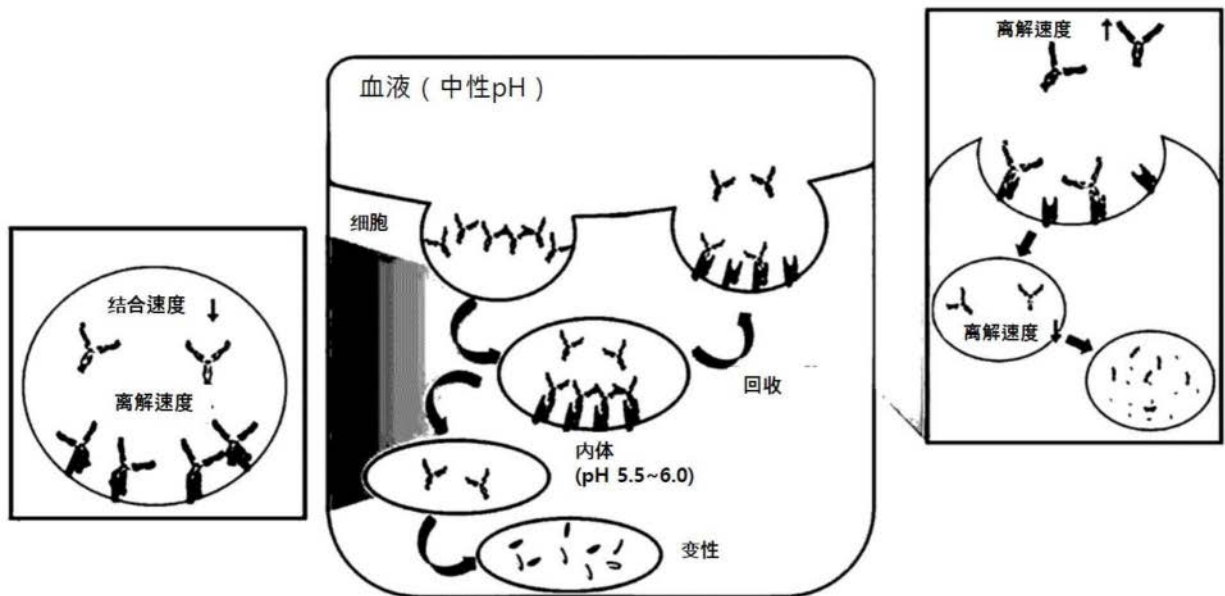


图5

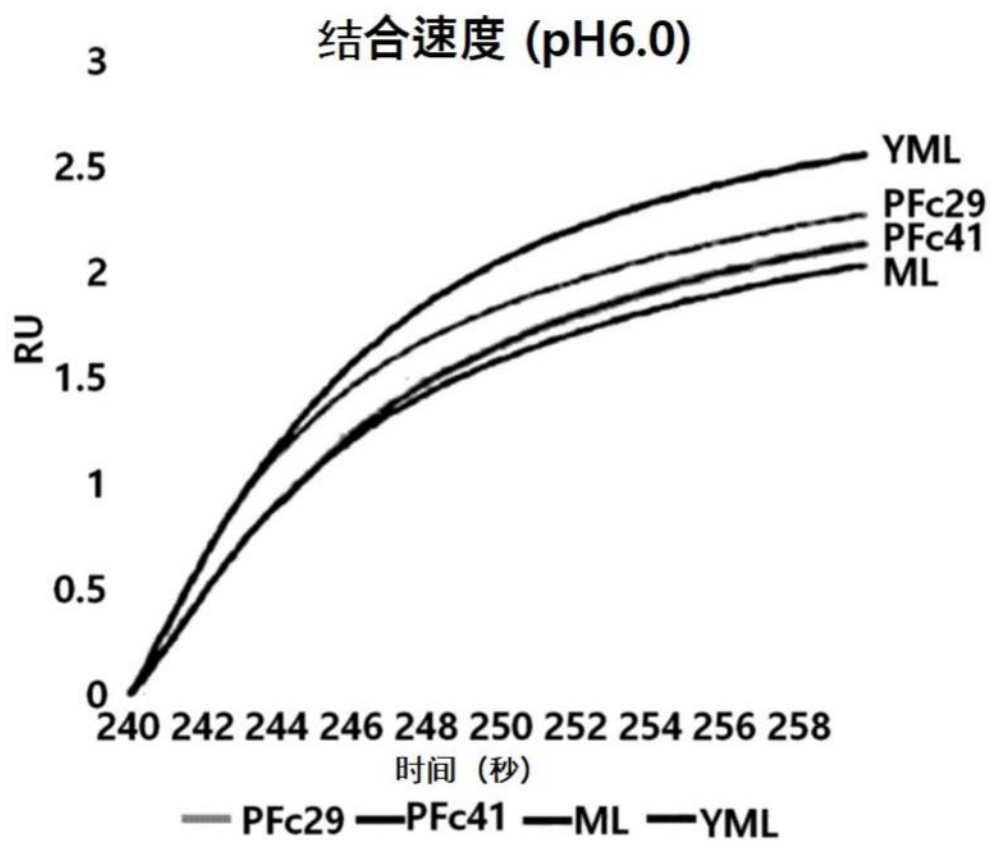


图6a

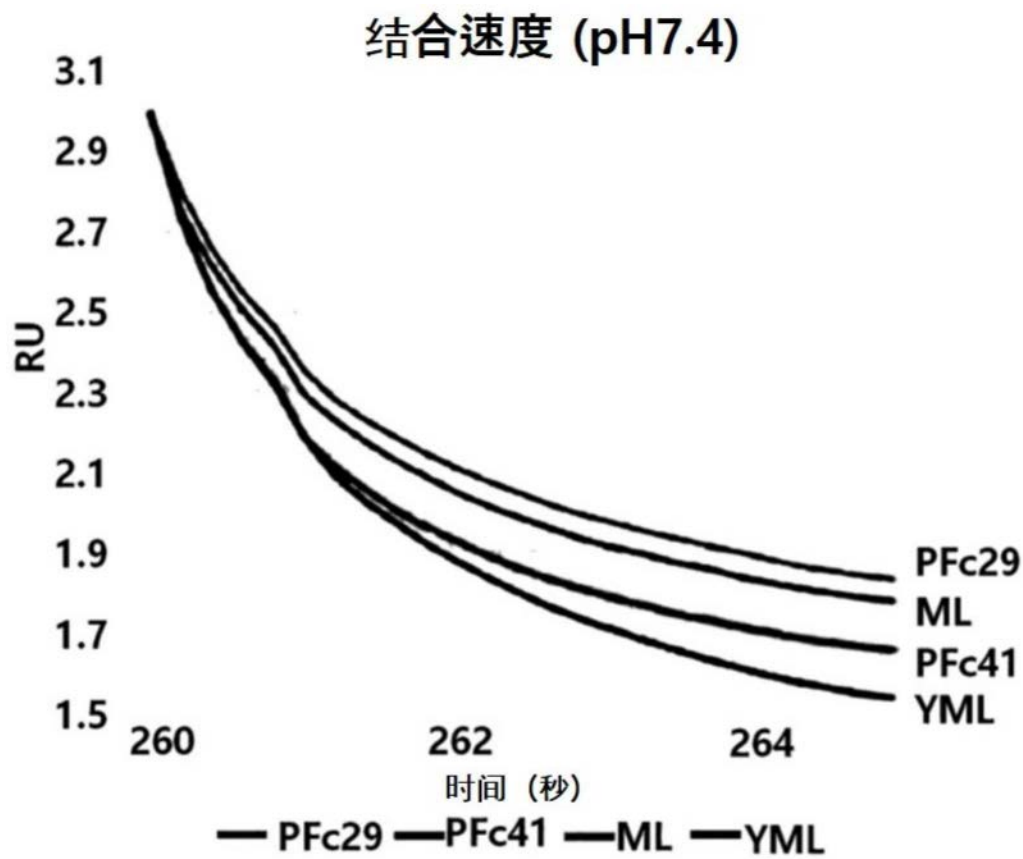


图6b

	瞬间结合速度 (RU/sec)	瞬间离解速度 (RU/sec)	提高瞬间结合 速度的倍数	提高瞬间离解 速度的倍数	改进的瞬间结合速度与瞬 间离解速度的比例	等级
PFc29	0.0656	0.125	1.34979424	1	1.273585	2
PFc41	0.0491	0.155	1.01028807	1.24	1.199009	3
ML	0.0486	0.1336	1	1.0688	1.107513	4
YML	0.0645	0.1559	1.32716049	1.2472	1.384213	1

图6c

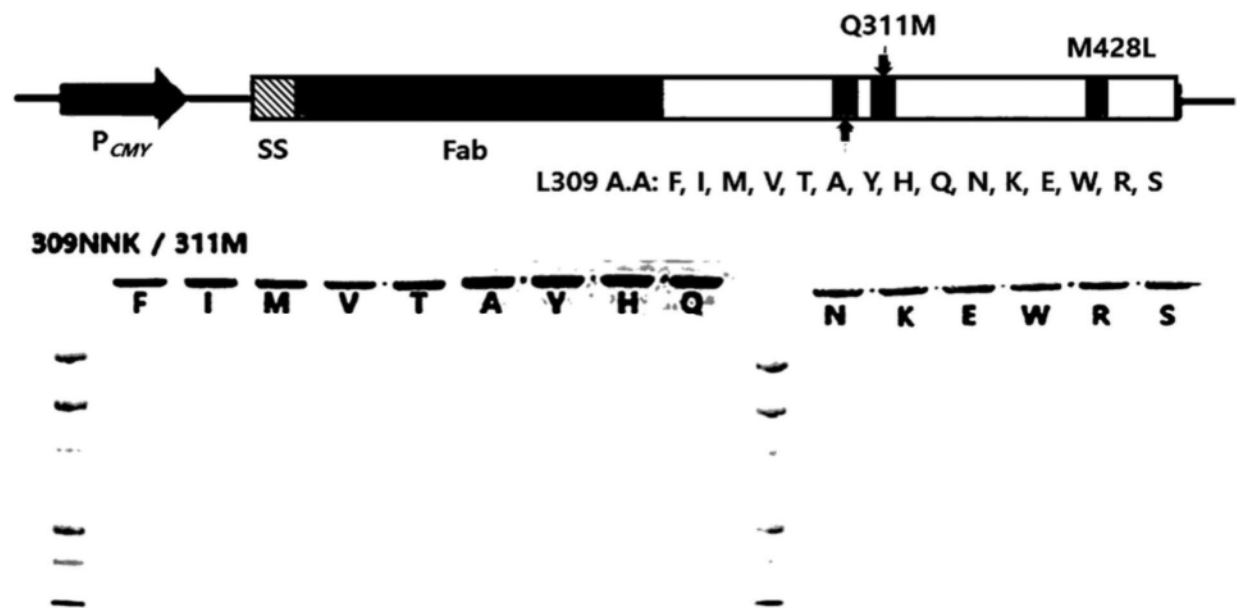


图7

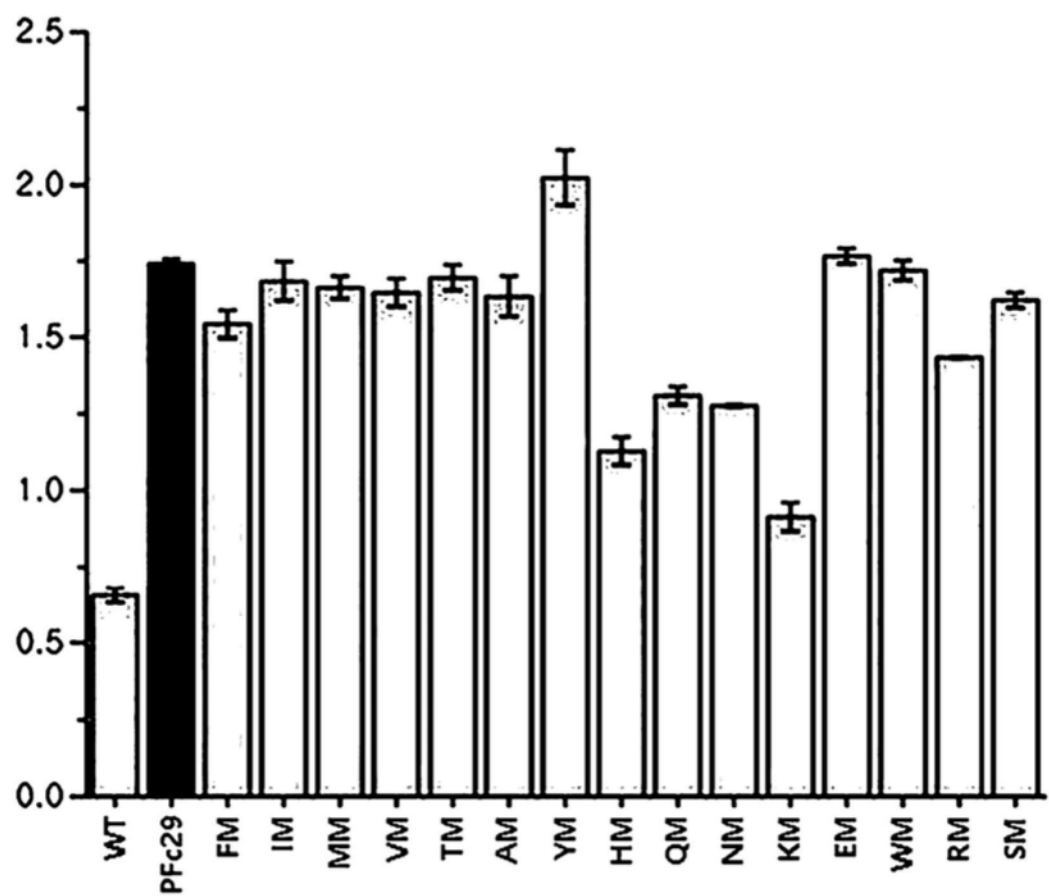


图8

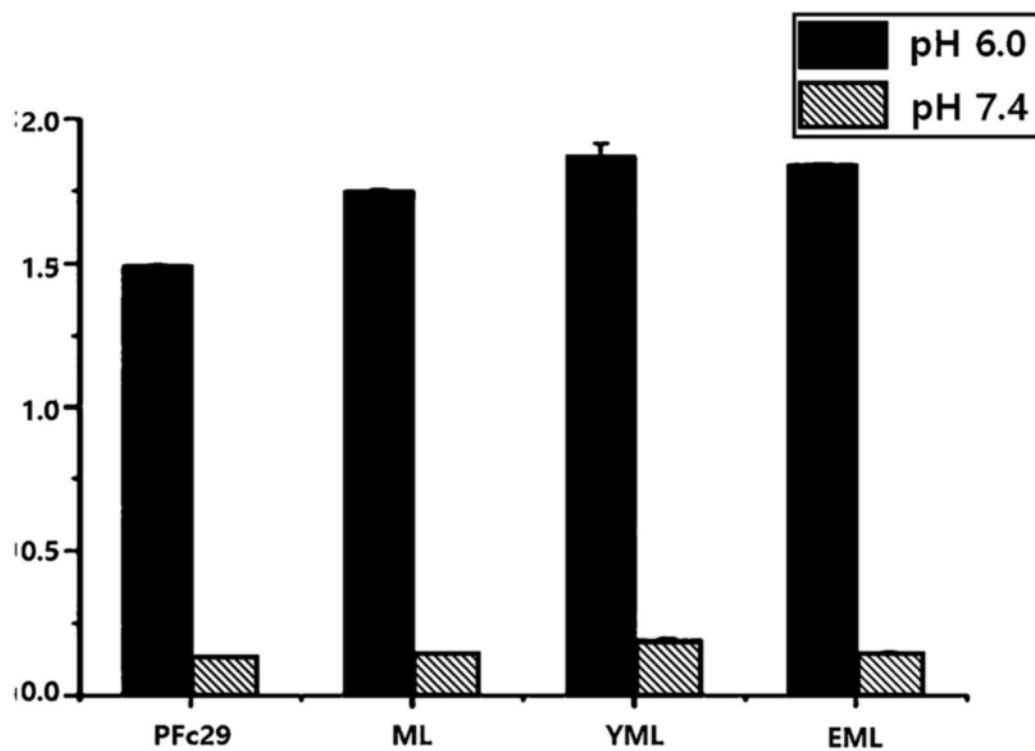


图9

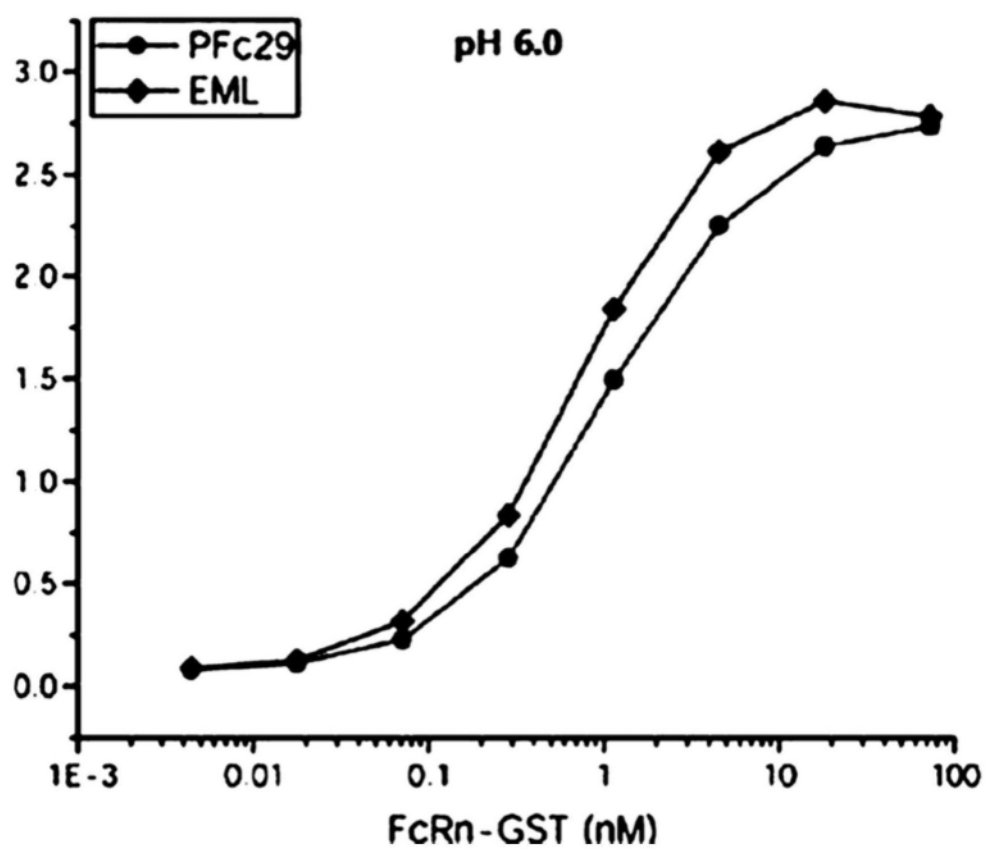


图10a

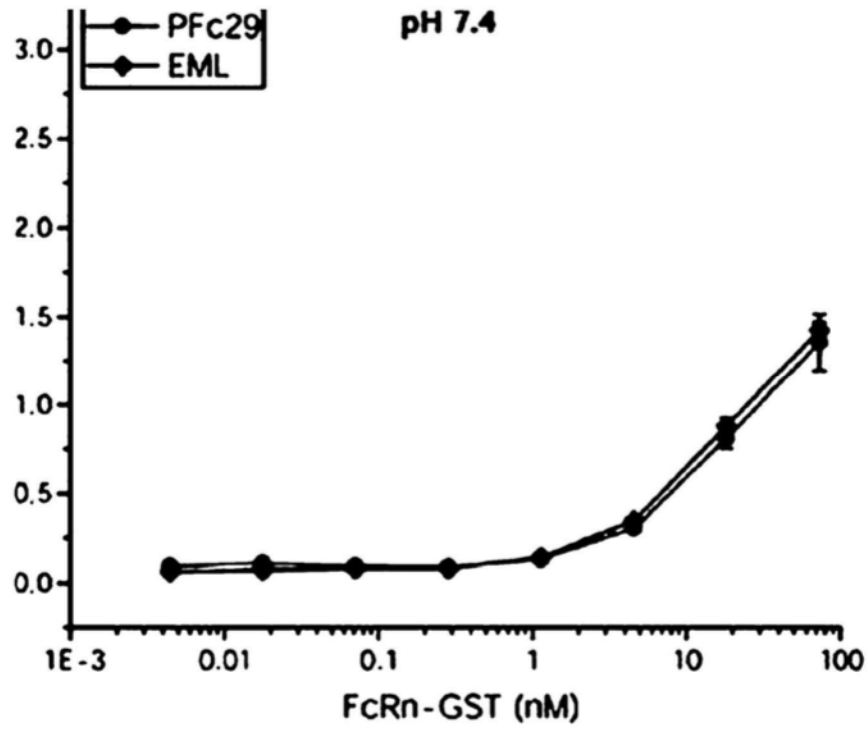


图10b

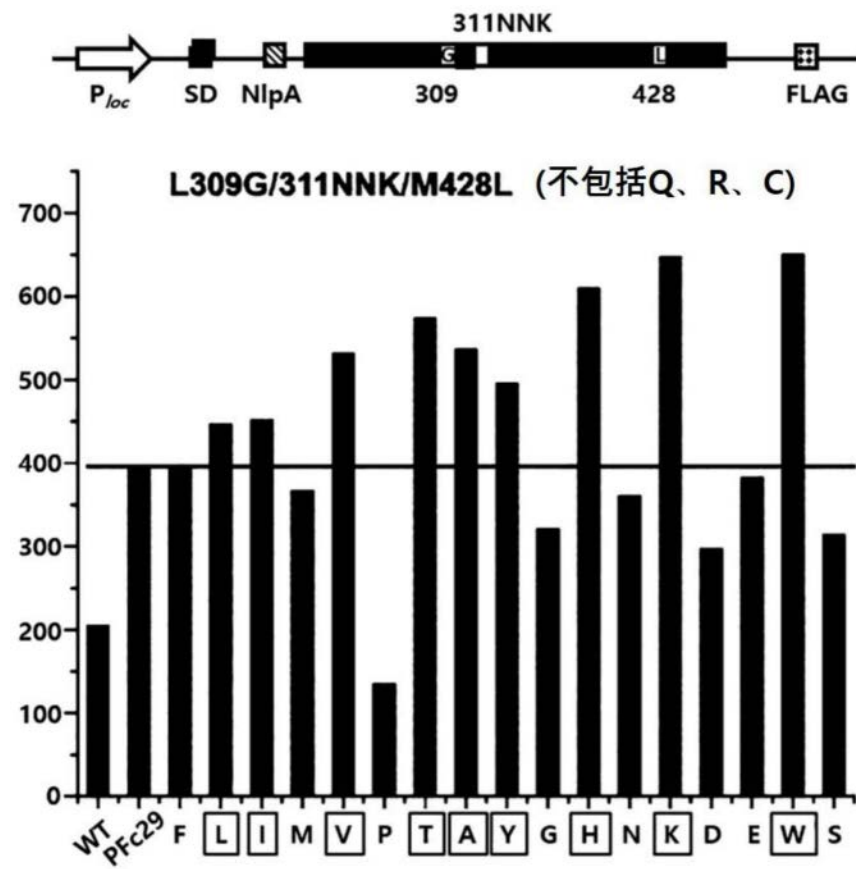


图11

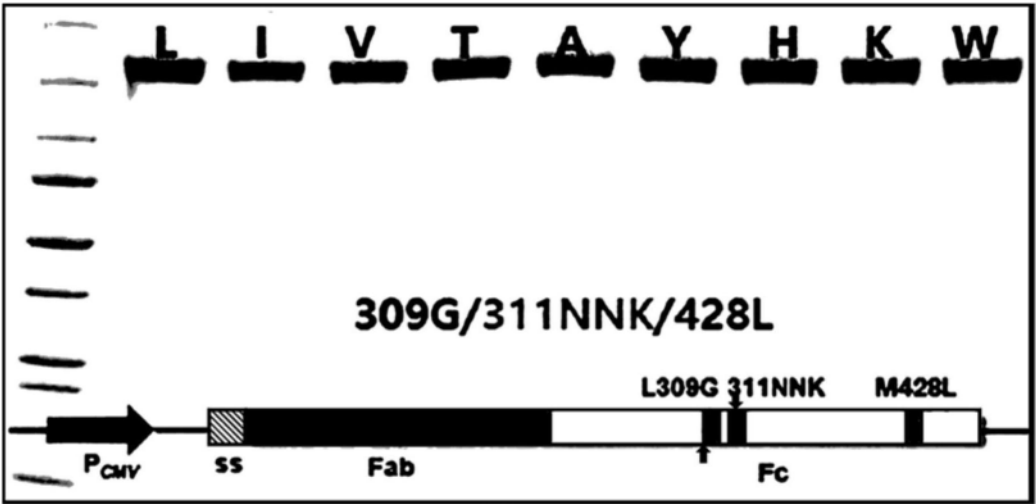


图12

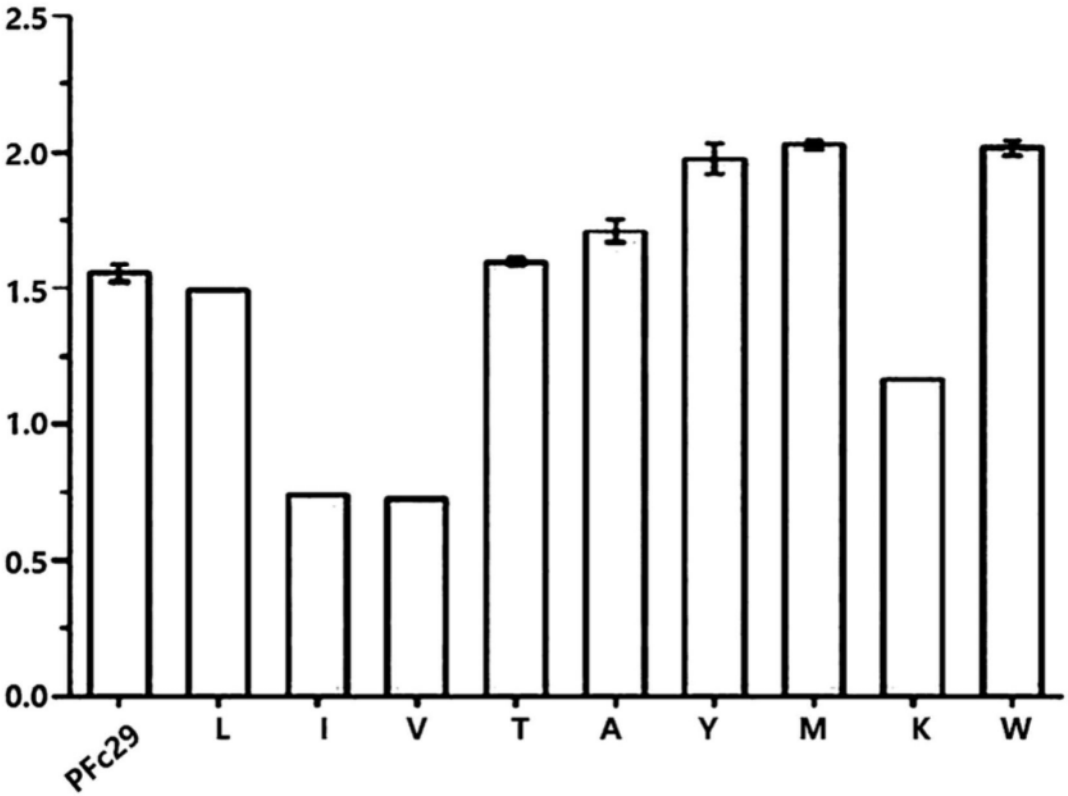


图13

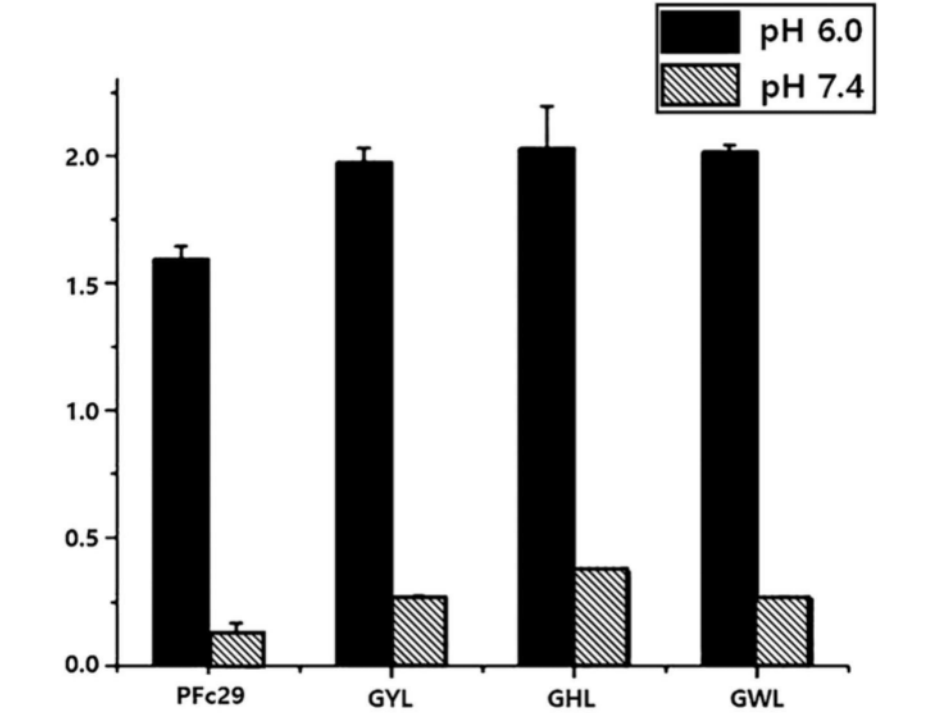


图14

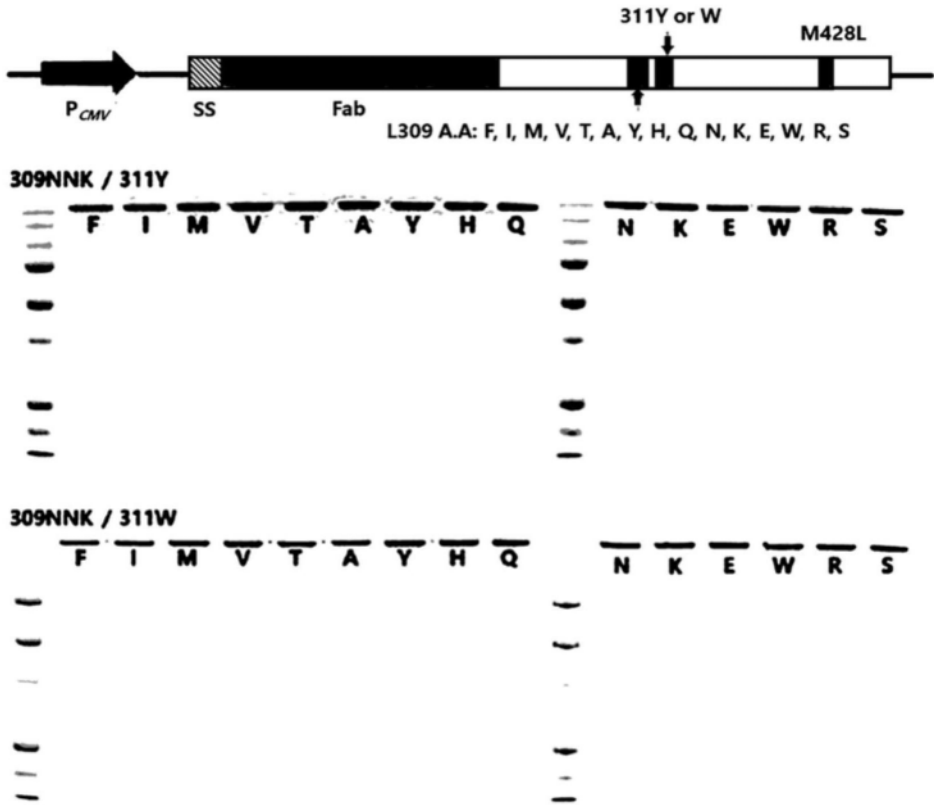


图15



图16

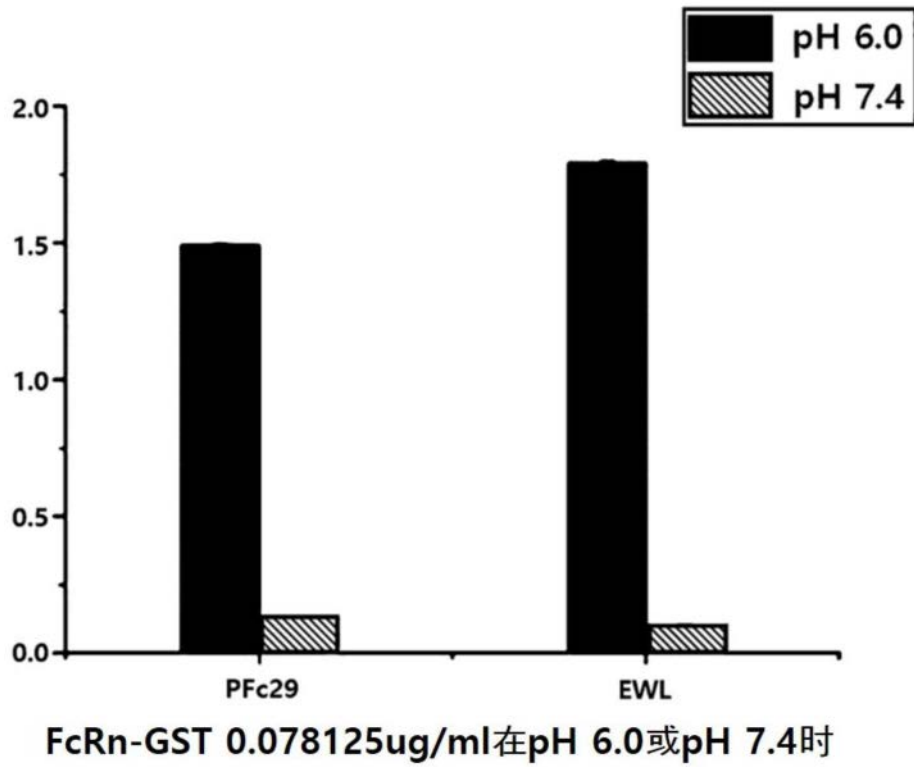


图17a

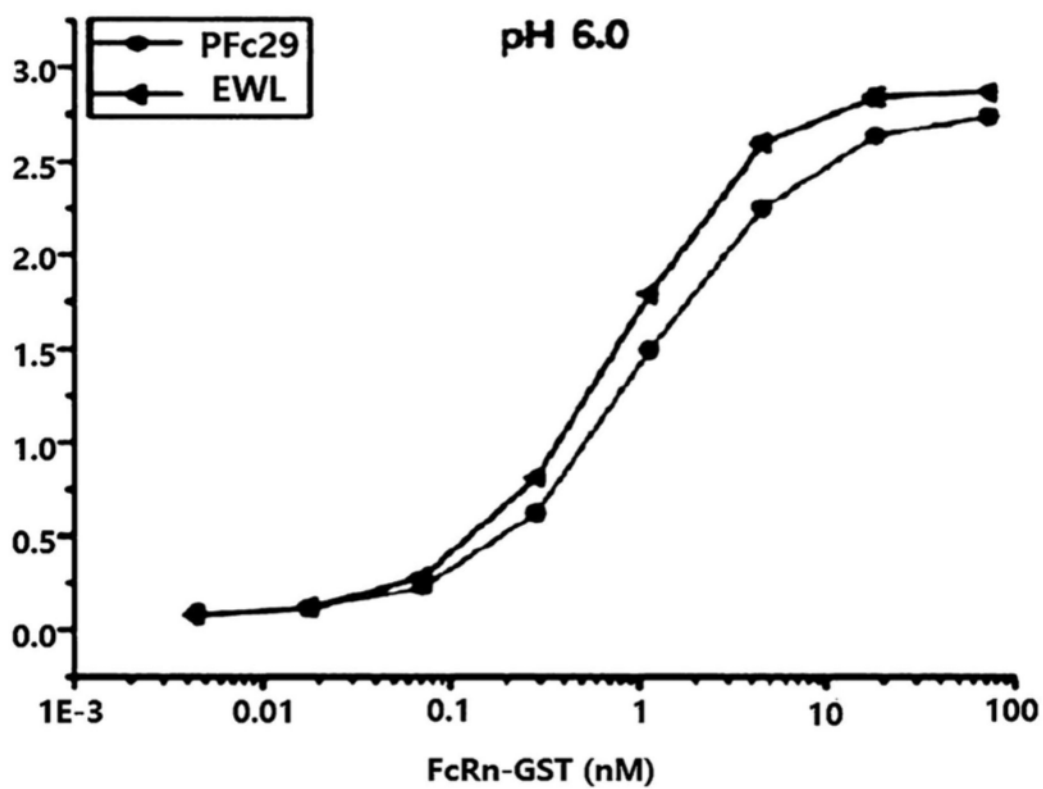


图17b

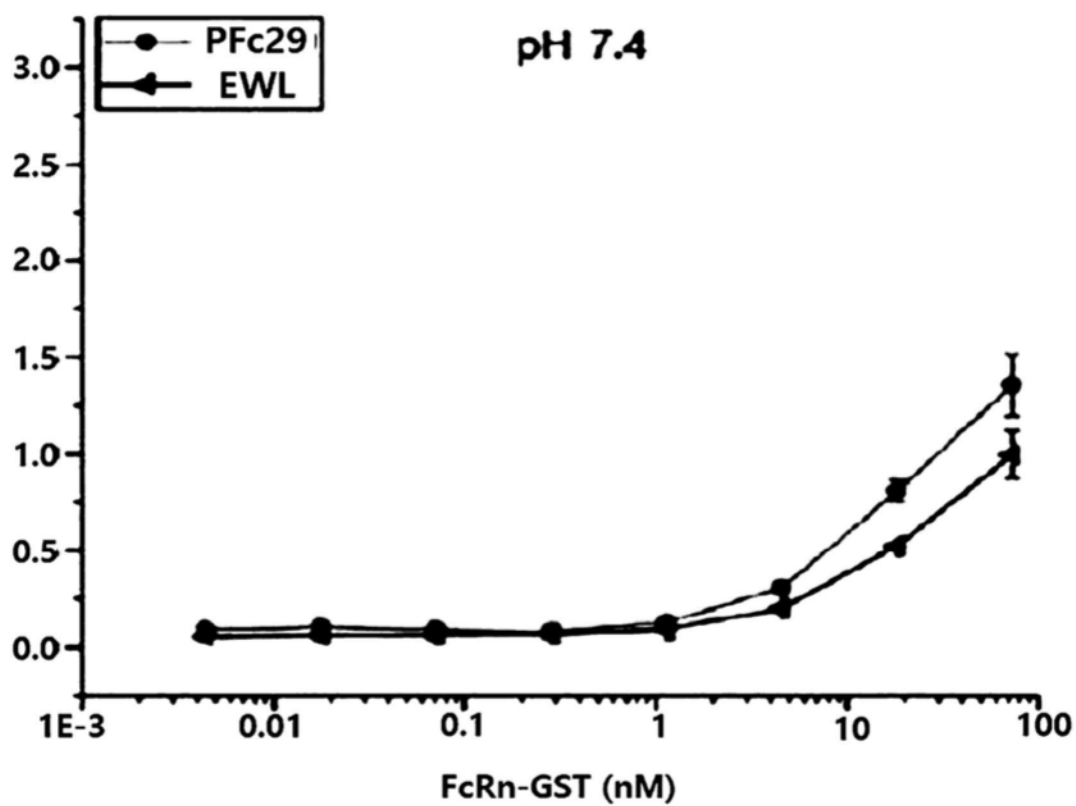


图17c