(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116547298 A
(43)申请公布日 2023.08.04

(21)申请号 202180081800.9

(22)申请日 2021.12.17

(30)优先权数据
63/127,313 2020.12.18 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.06.05

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2021/064097 2021.12.17

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/133252 EN 2022.06.23

(71)申请人 硕腾服务有限责任公司
地址 美国新泽西州

(72)发明人 H·L·坎波斯 S·A·M·莱特尔 L·M·伯杰龙

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司 72002
专利代理师 王子楠 林晓红

(51)Int.Cl.
C07K 14/735(2006.01)

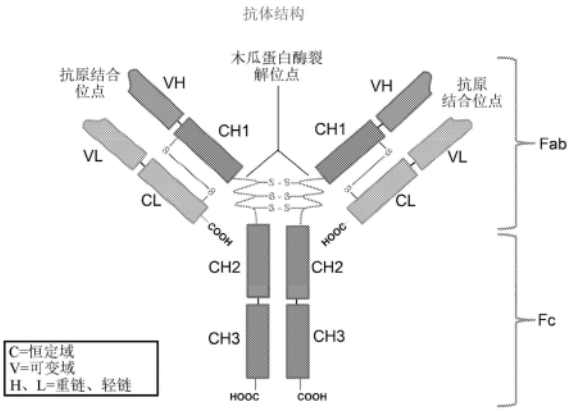
权利要求书5页 说明书45页
序列表18页 附图8页

(54)发明名称

猫抗体恒定区中的突变

(57)摘要

本发明大体上涉及猫抗体变体及其用途。具体来说,本发明涉及猫抗体的恒定区中用于改进各种特征的突变。



CN 116547298 A

1.一种经修饰IgG,其包括:猫IgG恒定域,其包括相对于野生型猫IgG恒定域的至少一个氨基酸取代,其中所述取代在根据如在Kabat中的Eu索引编号的氨基酸残基247、249、250、252、254、256、285、309、311、312、314、378、399、401、402、403、404、428、430、431、432、434、436或437处。

2.根据权利要求1所述的经修饰IgG,其中所述恒定域包括以下取代中的一者或多者:P247I、P247L、P247V、D249A、D249E、D249S、T250E、T250I、T250Q、T250S、T250V、S252A、S252C、S252D、S252E、S252F、S252G、S252H、S252I、S252K、S252L、S252N、S252P、S252Q、S252R、S252T、S252V、S252Y、S252M、S252W、S254A、S254D、S254E、S254F、S254G、S254H、S254K、S254L、S254M、S254C、S254I、S254N、S254P、S254Q、S254R、S254T、S254V、S254W、S254Y、T256A、T256C、T256D、T256E、T256F、T256G、T256H、T256I、T256K、T256L、T256M、T256N、T256P、T256Q、T256R、T256V、T256W、T256Y、T256S、Y285A、L309G、L309I、Q311F、Q311H、Q311I、Q311K、Q311L、Q311M、Q311R、Q311W、Q311Y、D312A、D312H、D312K、D312R、D312P、L314K、316Q、A378C、A378D、A378E、A378F、A378G、A378H、A378I、A378K、A378L、A378M、A378N、A378P、A378Q、A378R、A378S、A378T、A378V、A378W、A378Y、D399M、D399T、D399V、D401R、G402R、T403R、Y404Q、S428A、S428C、S428D、S428E、S428F、S428G、S428H、S428I、S428K、S428L、S428N、S428P、S428R、S428T、S428V、S428W、S428Y、S428M、E430I、E430Q、A431Q、A431R、A431V、A431K、L432S、S434A、S434C、S434D、S434E、S434F、S434G、S434H、S434I、S434K、S434L、S434M、S434N、S434P、S434Q、S434R、S434T、S434V、S434W、S434Y、H436G、H436K、H436M、H436R、H436Y、T437A及T437R。

3.根据权利要求1所述的经修饰IgG,其中相较于具有所述野生型猫IgG恒定域的IgG,所述经修饰IgG对FcRn具有更高的亲和力。

4.根据权利要求1所述的经修饰IgG,其中所述经修饰IgG为猫或猫类化IgG。

5.根据权利要求1所述的经修饰IgG,其中所述IgG为$IgG1_a$、$IgG1_b$或IgG2。

6.根据权利要求1所述的经修饰IgG,其中所述IgG恒定域为$IgG1_a$、$IgG1_b$或IgG2的恒定域。

7.根据权利要求1所述的经修饰IgG,其中所述IgG恒定域包括具有CH3域的Fc恒定区。

8.根据权利要求1所述的经修饰IgG,其中所述IgG恒定域包括具有CH2及CH3域的Fc恒定区。

9.根据权利要求1所述的经修饰IgG,其中所述野生型猫IgG恒定域包括SEQ ID NO.:1、3或4中所阐述的氨基酸序列。

10.一种药物组合物,其包括根据权利要求1所述的经修饰IgG及药学上可接受的载剂。

11.一种试剂盒,其包括在容器中的根据权利要求1所述的经修饰IgG及使用说明书。

12.一种多肽,其包括:猫IgG恒定域,其包括相对于野生型猫IgG恒定域的至少一个氨基酸取代,其中所述取代在根据如在Kabat中的EU索引编号的氨基酸残基247、249、250、252、254、256、285、309、311、312、314、378、399、401、402、403、404、428、430、431、432、434、436或437处。

13.根据权利要求12所述的多肽,其中所述恒定域包括以下取代中的一者或多者:P247I、P247L、P247V、D249A、D249E、D249S、T250E、T250I、T250Q、T250S、T250V、S252A、S252C、S252D、S252E、S252F、S252G、S252H、S252I、S252K、S252L、S252N、S252P、S252Q、

S252R、S252T、S252V、S252Y、S252M、S252W、S254A、S254D、S254E、S254F、S254G、S254H、S254K、S254L、S254M、S254C、S254I、S254N、S254P、S254Q、S254R、S254T、S254V、S254W、S254Y、T256A、T256C、T256D、T256E、T256F、T256G、T256H、T256I、T256K、T256L、T256M、T256N、T256P、T256Q、T256R、T256V、T256W、T256Y、T256S、Y285A、L309G、L309I、Q311F、Q311H、Q311I、Q311K、Q311L、Q311M、Q311R、Q311W、Q311Y、D312A、D312H、D312K、D312R、D312P、L314K、316Q、A378C、A378D、A378E、A378F、A378G、A378H、A378I、A378K、A378L、A378M、A378N、A378P、A378Q、A378R、A378S、A378T、A378V、A378W、A378Y、D399M、D399T、D399V、D401R、G402R、T403R、Y404Q、S428A、S428C、S428D、S428E、S428F、S428G、S428H、S428I、S428K、S428L、S428N、S428P、S428R、S428T、S428V、S428W、S428Y、S428M、E430I、E430Q、A431Q、A431R、A431V、A431K、L432S、S434A、S434C、S434D、S434E、S434F、S434G、S434H、S434I、S434K、S434L、S434M、S434N、S434P、S434Q、S434R、S434T、S434V、S434W、S434Y、H436G、H436K、H436M、H436R、H436Y、T437A及T437R。

14.根据权利要求12所述的多肽，其中相较于具有所述野生型猫IgG恒定域的所述IgG的多肽，所述多肽对FcRn具有更高的亲和力。

15.根据权利要求12所述的多肽，其中所述多肽为猫或猫类化IgG的多肽。

16.根据权利要求12所述的多肽，其中所述IgG为$IgG1_a$、$IgG1_b$或IgG2。

17.根据权利要求12所述的多肽，其中所述IgG恒定域为$IgG1_a$、$IgG1_b$或IgG2的恒定域。

18.根据权利要求12所述的多肽，其中所述IgG恒定域包括具有CH3域的Fc恒定区。

19.根据权利要求12所述的多肽，其中所述IgG恒定域包括具有CH2及CH3域的Fc恒定区。

20.根据权利要求12所述的多肽，其中所述野生型猫IgG恒定域包括SEQ ID NO.:1、3或4中所阐述的氨基酸序列。

21.一种抗体，其包括:猫IgG恒定域，其包括相对于野生型猫IgG恒定域的至少一个氨基酸取代，其中所述取代在根据如在Kabat中的EU索引编号的氨基酸残基247、249、250、252、254、256、285、309、311、312、314、378、399、401、402、403、404、428、430、431、432、434、436或437处。

22.根据权利要求21所述的抗体，其中所述恒定域包括以下取代中的一者或多者：P247I、P247L、P247V、D249A、D249E、D249S、T250E、T250I、T250Q、T250S、T250V、S252A、S252C、S252D、S252E、S252F、S252G、S252H、S252I、S252K、S252L、S252N、S252P、S252Q、S252R、S252T、S252V、S252Y、S252M、S252W、S254A、S254D、S254E、S254F、S254G、S254H、S254K、S254L、S254M、S254C、S254I、S254N、S254P、S254Q、S254R、S254T、S254V、S254W、S254Y、T256A、T256C、T256D、T256E、T256F、T256G、T256H、T256I、T256K、T256L、T256M、T256N、T256P、T256Q、T256R、T256V、T256W、T256Y、T256S、Y285A、L309G、L309I、Q311F、Q311H、Q311I、Q311K、Q311L、Q311M、Q311R、Q311W、Q311Y、D312A、D312H、D312K、D312R、D312P、L314K、316Q、A378C、A378D、A378E、A378F、A378G、A378H、A378I、A378K、A378L、A378M、A378N、A378P、A378Q、A378R、A378S、A378T、A378V、A378W、A378Y、D399M、D399T、D399V、D401R、G402R、T403R、Y404Q、S428A、S428C、S428D、S428E、S428F、S428G、S428H、S428I、S428K、S428L、S428N、S428P、S428R、S428T、S428V、S428W、S428Y、S428M、E430I、E430Q、A431Q、A431R、A431V、A431K、L432S、S434A、S434C、S434D、S434E、S434F、S434G、S434H、

S434I、S434K、S434L、S434M、S434N、S434P、S434Q、S434R、S434T、S434V、S434W、S434Y、H436G、H436K、H436M、H436R、H436Y、T437A及T437R。

23.根据权利要求21所述的抗体，其中相较于具有所述野生型猫IgG恒定域的所述IgG的多肽，所述多肽对FcRn具有更高的亲和力。

24.根据权利要求21所述的抗体，其中所述多肽为猫或猫类化IgG的多肽。

25.根据权利要求21所述的抗体，其中所述IgG为$IgG1_a$、$IgG1_b$或IgG2。

26.根据权利要求21所述的抗体，其中所述IgG恒定域为$IgG1_a$、$IgG1_b$或IgG2的恒定域。

27.根据权利要求21所述的抗体，其中所述IgG恒定域包括具有CH3域的Fc恒定区。

28.根据权利要求21所述的抗体，其中所述IgG恒定域包括具有CH2及CH3域的Fc恒定区。

29.根据权利要求21所述的抗体，其中所述野生型猫IgG恒定域包括SEQ ID NO.:1、3或4中所阐述的氨基酸序列。

30.一种药物组合物，其包括根据权利要求29所述的抗体及药学上可接受的载剂。

31.一种试剂盒，其包括在容器中的根据权利要求29所述的抗体及使用说明书。

32.一种载体，其包括编码根据权利要求21所述的抗体的氨基酸序列的核酸序列，其中所述野生型猫IgG恒定域包括SEQ ID NO.:1、3或4中所阐述的氨基酸序列。

33.一种经分离细胞，其包括根据权利要求32所述的载体。

34.一种制造抗体或分子的方法，所述方法包括：提供根据权利要求33所述的细胞；及培养所述细胞。

35.一种制造抗体的方法，所述方法包括：提供根据权利要求21至19中任一项所述的抗体。

36.一种融合分子，其包括：猫IgG恒定域，其包括相对于野生型猫IgG恒定域的至少一个氨基酸取代，其中所述取代在根据如在Kabat中的EU索引编号的氨基酸残基247、249、250、252、254、256、285、309、311、312、314、378、399、401、402、403、404、428、430、431、432、434、436或437处。

37.根据权利要求36所述的分子，其中所述恒定域包括以下取代中的一者或多者：P247I、P247L、P247V、D249A、D249E、D249S、T250E、T250I、T250Q、T250S、T250V、S252A、S252C、S252D、S252E、S252F、S252G、S252H、S252I、S252K、S252L、S252N、S252P、S252Q、S252R、S252T、S252V、S252Y、S252M、S252W、S254A、S254D、S254E、S254F、S254G、S254H、S254K、S254L、S254M、S254C、S254I、S254N、S254P、S254Q、S254R、S254T、S254V、S254W、S254Y、T256A、T256C、T256D、T256E、T256F、T256G、T256H、T256I、T256K、T256L、T256M、T256N、T256P、T256Q、T256R、T256V、T256W、T256Y、T256S、Y285A、L309G、L309I、Q311F、Q311H、Q311I、Q311K、Q311L、Q311M、Q311R、Q311W、Q311Y、D312A、D312H、D312K、D312R、D312P、L314K、316Q、A378C、A378D、A378E、A378F、A378G、A378H、A378I、A378K、A378L、A378M、A378N、A378P、A378Q、A378R、A378S、A378T、A378V、A378W、A378Y、D399M、D399T、D399V、D401R、G402R、T403R、Y404Q、S428A、S428C、S428D、S428E、S428F、S428G、S428H、S428I、S428K、S428L、S428N、S428P、S428R、S428T、S428V、S428W、S428Y、S428M、E430I、E430Q、A431Q、A431R、A431V、A431K、L432S、S434A、S434C、S434D、S434E、S434F、S434G、S434H、S434I、S434K、S434L、S434M、S434N、S434P、S434Q、S434R、S434T、S434V、S434W、S434Y、

H436G、H436K、H436M、H436R、H436Y、T437A及T437R。

38.根据权利要求36所述的分子，其中相较于具有所述野生型猫IgG恒定域的所述IgG的多肽，所述多肽对FcRn具有更高的亲和力。

39.根据权利要求36所述的分子，其中所述多肽为猫或猫类化IgG的多肽。

40.根据权利要求36所述的分子，其中所述IgG为$IgG1_a$、$IgG1_b$或IgG2。

41.根据权利要求36所述的分子，其中所述IgG恒定域为$IgG1_a$、$IgG1_b$或IgG2的恒定域。

42.根据权利要求36所述的分子，其中所述IgG恒定域包括具有CH3域的Fc恒定区。

43.根据权利要求36所述的分子，其中所述IgG恒定域包括具有CH2及CH3域的Fc恒定区。

44.根据权利要求36所述的分子，其中所述野生型猫IgG恒定域包括SEQ ID NO.:1、3或4中所阐述的氨基酸序列。

45.一种药物组合物，其包括根据权利要求36所述的分子及药学上可接受的载剂。

46.一种试剂盒，其包括在容器中的根据权利要求36所述的分子及使用说明书。

47.根据权利要求1所述的经修饰IgG，其中所述突变中的至少一者改进生物物理学特性。

48.根据权利要求47所述的经修饰IgG，其中所述生物物理学特性为多反应性。

49.根据权利要求12所述的多肽，其中所述突变中的至少一者改进生物物理学特性。

50.根据权利要求49所述的多肽，其中所述生物物理学特性为多反应性。

51.根据权利要求21所述的抗体，其中所述突变中的至少一者改进生物物理学特性。

52.根据权利要求51所述的抗体，其中所述生物物理学特性为多反应性。

53.根据权利要求36所述的分子，其中所述突变中的至少一者改进生物物理学特性。

54.根据权利要求53所述的分子，其中所述生物物理学特性为多反应性。

55.一种用于增加猫的抗体血清半衰期的方法，所述方法包括：向所述猫投予治疗有效量的包括猫IgG恒定域的抗体，所述猫IgG恒定域包括相对于野生型猫IgG恒定域的至少一个氨基酸取代，其中所述取代在根据如在Kabat中的EU索引编号的氨基酸残基氨基酸残基252、311或428处。

56.根据权利要求55所述的方法，其中所述猫IgG恒定域包括突变S252H、S252Y、Q311W、S428L、S428M及S428Y中的一者或多者。

57.根据权利要求55所述的方法，其中所述猫IgG恒定域包括选自以下群组的突变：(1)S428L；(2)S252H及S428M；(3)S252Y及S428M；(4)S428M及Q311W；或(5)S428Y及Q311W。

58.根据权利要求55所述的方法，其中所述猫IgG恒定域包括突变S428L。

59.根据权利要求55所述的方法，其中所述猫IgG恒定域包括突变S252H与S428M的组合。

60.根据权利要求55所述的方法，其中所述猫IgG恒定域包括突变S252Y与S428M的组合。

61.根据权利要求55所述的方法，其中所述猫IgG恒定域包括突变S428M与Q311W的组合。

62.根据权利要求55所述的方法，其中所述猫IgG恒定域包括突变S428Y与Q311W的组合。

63.根据权利要求55所述的方法，其中相较于具有所述野生型猫IgG恒定域的IgG，所述猫IgG恒定域具有更高的血清半衰期。

64.根据权利要求55所述的方法，其中所述IgG为$IgG1_a$、$IgG1_b$或IgG2。

65.根据权利要求55所述的方法，其中所述IgG恒定域为$IgG1_a$、$IgG1_b$或IgG2的恒定域。

66.根据权利要求55所述的方法，其中所述IgG恒定域包括具有CH3域的Fc恒定区。

67.根据权利要求55所述的方法，其中所述IgG恒定域包括具有CH2及CH3域的Fc恒定区。

68.根据权利要求55所述的方法，其中所述野生型猫IgG恒定域包括SEQ ID NO.:1、3或4中所阐述的氨基酸序列。

69.根据权利要求55所述的方法，其中所述抗体为抗IL31抗体。

70.一种治疗犬个体中的IL-31介导的瘙痒或过敏性病状的方法，所述方法包括：向所述个体投予治疗有效量的根据权利要求69所述的抗IL31抗体，藉此治疗所述犬个体中的所述IL-31介导的瘙痒或过敏性病状。

71.根据权利要求70所述的方法，其中所述IL-31介导的瘙痒或过敏性病状为选自由以下组成的群组的瘙痒病状：异位性皮肤炎、湿疹、牛皮癣、硬皮病及瘙痒性皮炎。

猫抗体恒定区中的突变

[0001] 相关申请案的交叉引用

[0002] 本申请案要求2020年12月18日提交的美国临时专利申请案63/127313的优先权及权益,所述美国临时专利申请案以全文引用的方式并入本文中。

技术领域

[0003] 本发明大体上涉及猫抗体变体和其用途。具体来说,本发明涉及猫抗体的Fc恒定区中用于改进各种特征的一个或多个突变。

背景技术

[0004] 正在研发猫IgG单克隆抗体(mAb)作为兽医学中的有效治疗剂。若干年前,鉴别及表征了猫IgG亚类(斯特里泽尔(Strietzel)等人,2014,兽医免疫病理学(Vet Immunol Immunopathol.),第158(3-4)卷,第214至223页)。然而,尚未对延长猫IgG的半衰期进行许多研究。

[0005] 经由循环机制,新生儿Fc受体(FcRn)在与其片段可结晶(Fc)区的pH依赖性相互作用中延长IgG的半衰期。具体来说,跨越CH2及CH3域的界面的Fc区与细胞表面上的FcRn相互作用以调节IgG内环境稳定。IgG胞饮之后的酸性相互作用有助于此相互作用且由此防止IgG降解。内吞IgG随后循环回至细胞表面且在碱性pH下释放至血流中,借此维持用于恰当功能的充足血清IgG。因此,IgG的药物动力学概况视其Fc区的结构及功能特性而定。

[0006] 三个猫IgG亚类结合猫FcRn,且已与人类IgG类似物进行比较。猫IgG的半衰期仍待进行充分研究,因为在无任何实验支持的情况下,吾人不能预期或预测其是否将与人类IgG紧密对齐。

[0007] IgG的半衰期延长可允许抗体药物的较不频繁给药及/或较低剂量,其继而减少兽医问诊,提高患者顺应性,且减少浓度依赖性细胞毒性/不良事件。

[0008] 因此,需要鉴别Fc恒定区中用以改进半衰期的突变。

发明内容

[0009] 本发明涉及突变猫IgG,其相对于野生型猫IgG提供更高的FcRn亲和力。具体来说,本申请案的发明人已发现,取代一个或多个氨基酸残基惊人且出乎意料地增强对FcRn的亲和力。

[0010] 在一个方面,本发明提供一种经修饰IgG,其包括:猫IgG恒定域,其包括相对于野生型猫IgG恒定域的至少一个氨基酸取代,其中所述取代在根据如在Kabat中的Eu索引编号的氨基酸残基247、249、250、252、254、256、285、309、311、312、314、378、399、401、402、403、404、428、430、431、432、434、436或437处。

[0011] 在一些实施例中,恒定域包括以下取代中的一者或多者:P247I、P247L、P247V、D249A、D249E、D249S、T250E、T250I、T250Q、T250S、T250V、S252A、S252C、S252D、S252E、S252F、S252G、S252H、S252I、S252K、S252L、S252N、S252P、S252Q、S252R、S252T、S252V、

S252Y、S252M、S252W、S254A、S254D、S254E、S254F、S254G、S254H、S254K、S254L、S254M、S254C、S254I、S254N、S254P、S254Q、S254R、S254T、S254V、S254W、S254Y、T256A、T256C、T256D、T256E、T256F、T256G、T256H、T256I、T256K、T256L、T256M、T256N、T256P、T256Q、T256R、T256V、T256W、T256Y、T256S、Y285A、L309G、L309I、Q311F、Q311H、Q311I、Q311K、Q311L、Q311M、Q311R、Q311W、Q311Y、D312A、D312H、D312K、D312R、D312P、L314K、316Q、A378C、A378D、A378E、A378F、A378G、A378H、A378I、A378K、A378L、A378M、A378N、A378P、A378Q、A378R、A378S、A378T、A378V、A378W、A378Y、D399M、D399T、D399V、D401R、G402R、T403R、Y404Q、S428A、S428C、S428D、S428E、S428F、S428G、S428H、S428I、S428K、S428L、S428N、S428P、S428R、S428T、S428V、S428W、S428Y、S428M、E430I、E430Q、A431Q、A431R、A431V、A431K、L432S、S434A、S434C、S434D、S434E、S434F、S434G、S434H、S434I、S434K、S434L、S434M、S434N、S434P、S434Q、S434R、S434T、S434V、S434W、S434Y、H436G、H436K、H436M、H436R、H436Y、T437A及T437R。

[0012] 在另一方面，本发明提供一种多肽，其包括：猫IgG恒定域，其包括相对于野生型猫IgG恒定域的至少一个氨基酸取代，其中所述取代在根据如在Kabat中的Eu索引编号的氨基酸残基247、249、250、252、254、256、285、309、311、312、314、378、399、401、402、403、404、428、430、431、432、434、436或437处。

[0013] 在又另一方面，本发明提供一种抗体，其包括：猫IgG恒定域，其包括相对于野生型猫IgG恒定域的至少一个氨基酸取代，其中所述取代在根据如在Kabat中的Eu索引编号的氨基酸残基247、249、250、252、254、256、285、309、311、312、314、378、399、401、402、403、404、428、430、431、432、434、436或437处。

[0014] 在另一方面，本发明提供一种用于产生或制造抗体或分子的方法，所述方法包括：提供具有包括猫IgG恒定域的抗体的载体或宿主细胞，所述猫IgG恒定域包括相对于野生型猫IgG恒定域的一个或多个氨基酸取代，其中所述一个或多个取代在氨基酸残基247、249、250、252、254、256、285、309、311、312、314、378、399、401、402、403、404、428、430、431、432、434、436、437或其组合处。

[0015] 在另一方面，本发明提供一种融合分子，其包括：猫IgG恒定域，其包括相对于野生型猫IgG恒定域的至少一个氨基酸取代，其中所述取代在根据如在Kabat中的Eu索引编号的氨基酸残基247、249、250、252、254、256、285、309、311、312、314、378、399、401、402、403、404、428、430、431、432、434、436或437处。

[0016] 在另一方面，本发明提供一种用于增加猫的抗体血清半衰期的方法，所述方法包括：向所述猫投予治疗有效量的包括猫IgG恒定域的抗体，所述猫IgG恒定域包括相对于野生型猫IgG恒定域的至少一个氨基酸取代，其中所述取代在根据如在Kabat中的EU索引编号的氨基酸残基氨基酸残基252、311或428处。在一个示范性实施例中，猫IgG恒定域包括突变S252H、S252Y、Q311W、S428L、S428M及S428Y中的一者或多者。在另一示范性实施例中，猫IgG恒定域包括选自以下群组的一个或多个突变：(1)S428L；(2)S252H及S428M；(3)S252Y及S428M；(4)S428M及Q311W；或(5)S428Y及Q311W。

[0017] 本发明的其它特征及优势将从以下详细描述实例及图式变得显而易见。然而，应理解，详细描述及特定实例虽然指示本发明的优选实施例，但仅以说明方式给出，因为所属领域的技术人员将由此详细描述显而易见本发明的精神及范围内的各种变化及修改。

附图说明

[0018] 专利或申请案文件含有至少一个彩制图式。在请求且支付必要费用后，专利局将提供具有彩图的此专利或专利申请公开案的复本。

[0019] 图1说明IgG的域结构。

[0020] 图2展示野生型(WT)人类IgG1、WT猫1gG1a、WT猫IgG1b、WT猫IgG2及具有铰链突变的突变猫IgG2的氨基酸序列的比对。氨基酸残基是根据如在Kabat中的Eu索引进行编号。CH1、铰链、CH2及CH3氨基酸残基分别呈红色、紫色、蓝色及绿色。

[0021] 图3展示猫Fc IgG1a WT核苷酸序列。

[0022] 图4展示猫IgG点突变增加家猫中的半衰期。

[0023] 序列表的简要说明

[0024] SEQ ID NO.:1为猫IgG1a野生型恒定区的氨基酸序列。

[0025] SEQ ID NO.:2为猫Fc IgG1a野生型恒定区的核酸序列。

[0026] SEQ ID NO.:3为猫IgG1b野生型恒定区的氨基酸序列。

[0027] SEQ ID NO.:4为猫IgG2野生型恒定区的氨基酸序列。

[0028] SEQ ID NO.:5为猫IgG2_铰链突变恒定区的氨基酸序列。

[0029] SEQ ID NO.:6为人类IgG1恒定区的氨基酸序列。

[0030] SEQ ID NO.:7为猫IgG1b野生型恒定区的核酸序列。

[0031] SEQ ID NO.:8为猫IgG2野生型恒定区的核酸序列。

[0032] SEQ ID NO.:9为抗IL31抗体(ZTS-5864)重链可变区的核酸序列。

[0033] SEQ ID NO.:10为抗IL31抗体(ZTS-5864)重链可变区的氨基酸序列。

[0034] SEQ ID NO.:11为抗IL31抗体(ZTS-5864)重链可变区CDR1的氨基酸序列。

[0035] SEQ ID NO.:12为抗IL31抗体(ZTS-5864)重链可变区CDR2的氨基酸序列。

[0036] SEQ ID NO.:13为抗IL31抗体(ZTS-5864)重链可变区CDR3的氨基酸序列。

[0037] SEQ ID NO.:14为抗IL31抗体(ZTS-5864)轻链可变区的核酸序列。

[0038] SEQ ID NO.:15为抗IL31抗体(ZTS-5864)轻链可变区的氨基酸序列。

[0039] SEQ ID NO.:16为抗IL31抗体(ZTS-5864)轻链可变区CDR1的氨基酸序列。

[0040] SEQ ID NO.:17为抗IL31抗体(ZTS-5864)轻链可变区CDR2的氨基酸序列。

[0041] SEQ ID NO.:18为抗IL31抗体(ZTS-5864)轻链可变区CDR3的氨基酸序列。

具体实施方式

[0042] 参考形成本发明的一部分的以下详细描述，可更容易地理解本发明主题。应理解，本发明不限于本文中所描述及/或展示的具体产物、方法、条件或参数，且本文中所使用的术语是出于仅借助于实例来描述特定实施例的目的，且不打算限制任何所要求的本发明。

[0043] 除非本文中另外定义，否则结合本申请案使用的科学及技术术语应具有所属领域的一般技术人员通常所理解的含义。此外，除非上下文另外需要，否则单数术语应包含复数，且复数术语应包含单数。

[0044] 如贯穿本发明所采用，除非另外指示，否则以下术语及缩写应理解为具有以下含义。

[0045] 定义

[0046] 在本发明中,除非上下文另外明确指示,否则单数形式“一(a/an)”及“所述(the)”包含多个参考物,且对特定数值的参考至少包含彼特定值。因此,举例来说,对“一分子”或“一化合物”的参考为对一种或多种此类分子或化合物及所属领域的技术人员已知的其等效物等的参考。如本文中所使用,术语“多个”意谓超过一个。当表述值范围时,另一实施例包含从一个特定值及/或至另一特定值。类似地,当通过在前面使用“约”以近似值表述值时,应理解,特定值形成另一实施例。所有范围均为包含性且可组合的。

[0047] 在说明书及权利要求书中,免疫球蛋白重链中的氨基酸残基的编号为如在卡巴特(Kabat)等人,具有免疫学意义的蛋白质的序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest),第5版.美国马里兰州贝塞斯达的国立卫生研究所的公共卫生服务部(Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.)(1991)中的Eu索引的编号。“如Kabat中的Eu索引”是指IgG抗体的残基编号且反映于本文中的图2中。

[0048] 术语“经分离”在关于核酸使用时为从其天然来源中通常与其相关的至少一种污染物核酸中鉴别且分离出的核酸。经分离的核酸可以与从然界中发现的形式或环境不同的形式或环境存在。因此,经分离的核酸分子区别于在天然细胞中存在的核酸分子。经分离的核酸分子包含细胞中含有的通常表达本文中所编码的多肽的核酸分子,其中例如所述核酸分子处于与天然细胞的质粒或染色体位置不同的质粒或染色体位置中。经分离的核酸可以单股或双股形式存在。当经分离的核酸分子用以表达蛋白质时,寡核苷酸或聚核苷酸将含有最小有义或编码股,但可含有有义股及反义股两者(即可为双股)。

[0049] 当核酸分子与另一核酸分子具有功能关系时,所述核酸分子经“可操作地连接(operably linked/operably attached)”。举例来说,如果启动子或强化子影响序列的转录,那么所述启动子或强化子可操作地连接至核酸的编码序列;或如果核糖体结合位点经定位以便促进翻译,那么所述核糖体结合位点可操作地连接至核酸的编码序列。如果编码变异Fc区的核酸分子经定位以使得所表达融合蛋白质包括与变异Fc区多肽上游或下游邻接的异源蛋白质或其功能片段,那么所述核酸分子可操作地连接至编码异源蛋白质(即当其存在于自然界中时不包括Fc区的蛋白质或其功能片段)的核酸分子;异源蛋白质可紧邻变异Fc区多肽,或可通过具有任何长度及组成的连接子序列与其间隔开。同样地,当多肽(在本文中与“蛋白质”同义地使用)分子与另一多肽具有功能关系时,所述多肽分子经“可操作地连接”。

[0050] 如本文中所使用,当参考多肽或蛋白质(例如变异Fc区或单克隆抗体)时,术语“功能片段”是指保留全长多肽的至少一个功能的彼蛋白质片段。片段的大小可介于六个氨基酸至全长多肽的整个氨基酸序列减一个氨基酸的范围内。本发明的变异Fc区多肽的功能片段保留至少一种如本文中所定义的“氨基酸取代”。变异Fc区多肽的功能片段保留所属领域中已知的与Fc区相关的至少一个功能(例如ADCC、CDC、Fc受体结合、Clq结合、细胞表面受体的下调或可例如增加与其可操作连接的多肽的活体内或试管内半衰期)。

[0051] 术语“经纯化”或“纯化”是指从样品中实质性去除至少一种污染物。举例来说,抗原特异性抗体可通过完全或实质性去除(至少90%、91%、92%、93%、94%、95%,或更优选地至少96%、97%、98%或99%)至少一种污染性非免疫球蛋白蛋白质来纯化;其亦可通过去除不结合至相同抗原的免疫球蛋白蛋白质来纯化。去除非免疫球蛋白蛋白质及/或去除

不结合特定抗原的免疫球蛋白使得样本中抗原特异性免疫球蛋白的百分比增加。在另一实例中，细菌性宿主细胞中表达的多肽(例如免疫球蛋白)通过完全或实质性去除宿主细胞蛋白质来纯化；借此增加样本中多肽的百分比。

[0052] 术语“天然的”在指多肽(例如Fc区)时在本文中用以指示所述多肽具有由自然界中通常存在的多肽或其天然存在的多晶型的氨基酸序列组成的氨基酸序列。天然多肽(例如天然Fc区)可通过重组手段来制备或可从天然存在源分离。

[0053] 如本文中所使用的术语“表达载体”是指含有所要编码序列及在特定宿主生物体中表达可操作地连接的编码序列所需的适当核酸序列的重组DNA分子。

[0054] 如本文中所使用，术语“宿主细胞”是指位于试管内或原位或活体内的任何真核或原核细胞(例如细菌细胞，例如大肠杆菌、CHO细胞、酵母细胞、哺乳动物细胞、禽类细胞、两栖动物细胞、植物细胞、鱼细胞及昆虫细胞)。

[0055] 如本文中所使用，术语“Fc区”是指免疫球蛋白重链的C端区。“Fc区”可为天然序列Fc区或变异Fc区。尽管免疫球蛋白重链的Fc区的一般可接受边界可变化，但猫IgG重链Fc区通常经限定以例如从位置231处的氨基酸残基延伸至其羧基端。在一些实施例中，变体仅包括Fc区的部分，且可包含或不包含羧基端。免疫球蛋白的Fc区一般包括两个恒定域：CH2及CH3。在一些实施例中，涵盖具有恒定域中的一者或多者的变体。在其它实施例中，涵盖不具有此类恒定域(或仅具有此类恒定域的部分)的变体。

[0056] 猫IgG Fc区的“CH2域”通常例如从约氨基酸231延长至约氨基酸340(参见图2)。CH2域的独特之处在于其不与另一域紧密配对。两个N连接的分支链碳水化合物链插入于完整天然IgG分子的两个CH2域之间。

[0057] 猫IgG Fc区的“CH3域”一般为残基C端向Fc区延长中的CH2域的延伸，例如约氨基酸残基341至约氨基酸残基447(参见图2)。

[0058] “功能性Fc区”拥有天然序列Fc区的“效应功能”。相对于包括天然Fc区或变体的亲本Fc区的多肽，包括本发明的变异Fc区的多肽的至少一种效应功能可增强或减弱。效应功能的实例包含但不限于：C1q结合；补体依赖性细胞毒性(CDC)；Fc受体结合；抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)；吞噬作用；细胞表面受体(例如B细胞受体；BCR)的下调等。此类效应功能可能需要Fc区可操作地连接至结合域(例如抗体可变域)，且可使用各种检定(例如Fc结合检定、ADCC检定、CDC检定、来自全部或分级分离的血液样品的目标细胞耗乏等)来评定。

[0059] “天然序列Fc区”或“野生型Fc区”是指与在自然界中通常发现的Fc区的氨基酸序列一致的氨基酸序列。示范性天然序列猫Fc区展示于图2中，且包含猫IgG1aFc区的天然序列。

[0060] “变异Fc区”包括与天然序列Fc区(或其片段)的氨基酸序列相差至少一个如本文中所定义的“氨基酸取代”的氨基酸序列。在优选实施例中，变异Fc区相比于天然序列Fc区或在亲本多肽的Fc区中具有至少一个氨基酸取代，优选地在天然序列Fc区中或在亲本多肽的Fc区中具有1、2、3、4或5个氨基酸取代。在一替代实施例中，变异Fc区可根据本文中所公开的方法来产生，且此变异Fc区可融合至所选异源多肽(例如抗体可变域)或非抗体多肽(例如受体或配位体的结合域)。

[0061] 如本文中所使用，在多肽的上下文中的术语“衍生物”是指包括已通过引入氨基酸

残基取代而改变的氨基酸序列的多肽。如本文中所使用，术语“衍生物”亦指已通过任何类型的分子与多肽的共价连接经修饰的多肽。举例来说(但不以限制方式)，抗体可例如通过糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、通过已知保护/阻断基团进行的衍生化、蛋白水解裂解、与细胞配位体或其它蛋白质连接等来修饰。衍生物多肽可通过化学修饰使用所属领域的技术人员所已知的技术来产生，所述技术包含但不限于特异性化学裂解、乙酰化、甲酰化、衣霉素的代谢合成等。此外，衍生物多肽拥有与其所衍生的多肽类似或相同的功能。应理解，包括本发明的变异Fc区的多肽可为如本文中所定义的衍生物，优选地，衍生化发生于Fc区内。

[0062] 如本文中参考多肽(例如Fc区或单克隆抗体)所使用的“大体上猫来源”指示多肽具有与天然猫氨基多肽的氨基酸序列至少80％、至少85％，更优选地至少90％、91％、92％、93％、94％，或甚至更优选地至少95％、95％、97％、98％或99％同源的氨基酸序列。

[0063] 术语“Fc受体”或“FcR”用以描述结合至Fc区(例如抗体的Fc区)的受体。优选FcR为天然序列FcR。此外，优选FcR为结合IgG抗体(γ受体)且包含FcγRI、FcγRII、FcγRIII亚类的受体(包含这些受体的对偶基因变体及交替剪接形式)的FcR。另一优选FcR包含新生受体FcRn，其负责将母体IgG转移至胎儿(盖耶(Guyer)等人，免疫学杂志(J.Immunol.)117:587(1976)及金姆(Kim)等人，免疫学杂志24:249(1994))。包含未来将鉴别的FcR的其它FcR由本文中的术语“FcR”涵盖。

[0064] 短语“抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”及“ADCC”是指细胞介导的反应，其中表达FcR的非特异性细胞毒性细胞(例如非特异性)(例如自然杀手(“NK”)细胞、嗜中性球及巨噬细胞)识别目标细胞上的经结合抗体，且随后促使目标细胞裂解。用于介导ADCC的原代细胞NK细胞仅表达FcγRIII，而单核细胞表达FcγRI、FcγRII及FcγRIII。

[0065] 如本文中所使用，短语“效应细胞”是指表达一种或多种FcR且执行效应功能的白血球(优选地猫)。优选地，细胞至少表达FcγRIII，且执行ADCC效应功能。介导ADCC的白血球的实例包含PBMC、NK细胞、单核细胞、细胞毒性T细胞及嗜中性细胞。效应细胞可从天然来源(例如从血液或PBMC)分离。

[0066] 具有“经改变”FcRn结合亲和力的变异多肽为在pH 6.0下测量时，与变体的亲本多肽或包括天然Fc区的多肽相比，具有增强(即增加的、更大的或更高的)或减弱(即降低的、减小的或更低的)FcRn结合亲和力的多肽。显示与FcRn的结合增加或结合亲和力增加的变异多肽以比亲本多肽更大的亲和力结合FcRn。显示与FcRn的结合减小或结合亲和力减小的变异多肽以比其亲本多肽更低的亲和力结合FcRn。显示与FcRn的结合减小的此类变体可拥有与FcRn极少或无可观的结合，例如与亲本多肽相比，0％至20％的与FcRn的结合。与其亲本多肽相比，以“增强的亲和力”结合FcRn的变异多肽为当在结合检定中变异多肽与亲本多肽的量基本上相同且所有其它条件一致时，以比亲本多肽更高的结合亲和力结合FcRn的多肽。举例来说，具有增强的FcRn结合亲和力的变异多肽可显示相比于亲本多肽，FcRn结合亲和力增加约1.10倍至约100倍(更典型地约1.2倍至约50倍)，其中例如在ELISA检定或所属领域的一般技术人员可用的其它方法中测定FcRn结合亲和力。

[0067] 如本文中所使用，“氨基酸取代”是指给定氨基酸序列中的至少一个现有氨基酸残基经另一不同“置换”氨基酸残基置换。一个或多个置换残基可为“天然存在的氨基酸残基”(即由遗传密码编码)，且选自：丙氨酸(Ala)；精氨酸(Arg)；天冬酰胺(Asn)；天冬氨酸

(Asp)；半胱氨酸(Cys)；谷氨酰胺(Gln)；谷氨酸(Glu)；甘氨酸(Gly)；组氨酸(His)；异亮氨酸(Ile)；亮氨酸(Leu)；赖氨酸(Lys)；甲硫氨酸(Met)；苯丙氨酸(Phe)；脯氨酸(Pro)；丝氨酸(Ser)；苏氨酸(Thr)；色氨酸(Trp)；酪氨酸(Tyr)；及缬氨酸(Val)。本文中的氨基酸取代的定义亦涵盖经一个或多个非天然存在的氨基酸残基的取代。“非天然存在的氨基酸残基”是指除上文所列的那些天然存在的氨基酸残基之外的能够共价结合多肽链中的一个或多个相邻氨基酸残基的残基。非天然存在的氨基酸残基的实例包含正亮氨酸、鸟氨酸、正缬氨酸、高丝氨酸及其它氨基酸残基类似物，例如埃尔曼(Ellman)等人，酶学方法(Meth.Enzym.)202:301-336(1991)中所描述的那些。

[0068] 术语“检定信号”是指来自检测蛋白质-蛋白质相互作用的任何方法的输出，包含但不限于比色检定的吸光度测量、荧光强度或每分钟的衰变量。检定格式可包含ELISA、facs或其它方法。“检定信号”的变化可反映细胞存活率的变化及/或动力学解离速率、动力学缔合速率或两者的变化。“更高检定信号”是指大于另一数值的所测量输出数值(例如在ELISA检定中，与亲本多肽相比，变体可具有更高(更大)的测量数值)。“更低”检定信号是指小于另一数值的所测量输出数值(例如在ELISA检定中，与亲本多肽相比，变体可具有更低(更小)的测量数值)。

[0069] 术语“结合亲和力”是指与各Fc受体-Fc结合相互作用相关的平衡解离常量(以浓度单位表述)。结合亲和力直接与动力学解离速率(一般以倒数时间单位报告，例如秒$^{-1}$)除以动力学缔合速率(一般以每单位时间的浓度单位报告，例如摩尔/秒)的比率相关。一般来说，不可能明确地陈述平衡解离常量(K_D或KD)的变化是由于缔合速率、解离速率抑或两者的差异，除非这些参数中的每一者以实验方式经测定(例如通过BIACORE或SAPIDYNE测量)。

[0070] 如本文中所使用，术语“铰链区”是指例如猫IgG1a中的氨基酸延伸(例如从猫IgG1a的位置216至位置230的延伸)。其它IgG同型的铰链区可通过将形成重链间二硫键(S-S)键结的第一及最后一个半胱氨酸残基放置于相同位置中而与IgG序列对齐。

[0071] “Clq”为包含针对免疫球蛋白的Fc区的结合位点的多肽。Clq连同两个丝氨酸蛋白酶Clr及Cls形成复合体Cl(CDC路径的第一组分)。

[0072] 如本文中所使用，术语“抗体”可与“免疫球蛋白”互换使用，或“Ig”以最广泛意义使用，且特定地涵盖单克隆抗体(包含全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)及抗体片段，只要其展现所要生物活性或功能活性。本发明及术语“抗体”也涵盖包括衍生自不同物种的部分的单链抗体及嵌合、猫或猫类化抗体，以及嵌合或CDR移植的单链抗体及其类似者。这些抗体的各种部分可通过常规技术以合成方式以化学方式接合在一起或可使用基因工程改造技术制备为连续蛋白质。举例来说，编码嵌合或猫类化链的核酸可表达以产生连续蛋白质。参见例如美国专利第4,816,567号；美国专利第4,816,397号；WO 86/01533；美国专利第5,225,539号；及美国专利第5,585,089号及第5,698,762号。关于灵长类化抗体，亦参见纽曼(Newman)，R.等人，生物技术(BioTechnology)，10:1455-1460,1993，且关于单链抗体，参见拉德纳(Ladner)等人，美国专利第4,946,778号及伯德(Bird)，R.E.等人，科学(Science)，242:423-426,1988。应理解，包括Fc区(或其部分)的抗体的所有形式在本文中涵盖于术语”抗体”内。此外，抗体可用可检测标记来标记，固定于固相上，且/或根据所属领域中已知的方法与异源化合物(例如酶或毒素)共轭。

[0073] 如本文中所使用，术语“抗体片段”是指完整抗体的一部分。抗体片段的实例包含

但不限于直链抗体;单链抗体分子;Fc或Fc'的肽、Fab及Fab片段,及由抗体片段形成的多特异性抗体。抗体片段优选地保留铰链的至少一部分,且任选地保留IgG重链的CH1区。在其它优选实施例中,抗体片段包括CH2区的至少一部分或整个CH2区。

[0074] 如本文中所使用,当参考单克隆抗体使用时,术语"功能片段"打算指单克隆抗体仍保持功能活性的部分。功能活性可为例如抗原结合活性或特异性、受体结合活性或特异性、效应功能活性及其类似者。单克隆抗体功能片段包含例如个别重链或轻链及其片段,例如VL、VH及Fd;单价片段,例如Fv、Fab及Fab';二价片段,例如F(ab')2;单链Fv(scFv);及Fc片段。此类术语例如描述于以下各者中:哈洛(Harlowe)及莱恩(Lane),抗体:实验室手册(Antibodies:A Laboratory Manual),纽约冷泉港实验室(Cold Spring Harbor Laboratory,New York)(1989);分子生物学及生物技术:综合的案头参考(Molec.Biology and Biotechnology:A Comprehensive Desk Reference)(迈尔斯(Myers),R.A.(编),纽约VCH出版有限公司(New York:VCH Publisher,Inc.));赫斯顿(Huston)等人,细胞生物物理学(Cell Biophysics),22:189-224(1993);普拉图恩(Pluckthun)及斯卡拉(Skerra),酶学方法(Meth.Enzymol.),178:497-515(1989);及达伊(Day),E.D.,高等免疫化学(Advanced Immunochemistry),第二版.,纽约威利-利斯有限公司(Wiley-Liss,Inc.,New York,N.Y.)(1990)。术语功能片段打算包含例如通过蛋白酶消化或单克隆抗体还原及通过所属领域的技术人员已知的重组DNA方法产生的片段。

[0075] 如本文中所使用,术语"片段"是指包括另一多肽的氨基酸序列的至少5、15、20、25、40、50、70、90、100或更多个相连氨基酸残基的氨基酸序列的多肽。在一优选实施例中,多肽的片段保留全长多肽的至少一个功能。

[0076] 如本文中所使用,术语"嵌合抗体"包含单价、二价或多价免疫球蛋白。单价嵌合抗体为由经由与嵌合轻链的二硫桥键缔合的嵌合重链形成的二聚体。二价嵌合抗体为由经由至少一个二硫桥键缔合的两个重链-轻链二聚体形成的四聚体。用于猫中的抗体的嵌合重链包括衍生自非猫抗体的重链的抗原结合区,所述抗原结合区连接至猫重链恒定区的至少一部分,例如CH1或CH2。用于猫中的抗体的嵌合轻链包括衍生自非猫抗体的轻链的连接至猫轻链恒定区(CL)的至少一部分的抗原结合区。具有相同或不同可变区结合特异性的嵌合重链及轻链的抗体、片段或衍生物亦可通过个别多肽链根据已知方法步骤的适当缔合来制备。通过此途径,将表达嵌合重链的宿主与表达嵌合轻链的宿主分开培养,且分开回收免疫球蛋白链,且随后进行缔合。可替代地,宿主可进行共培养,且使各链在培养基中自发地缔合,随后回收经组装的免疫球蛋白或片段,或重链及轻链皆可在相同宿主细胞中表达。用于产生嵌合抗体的方法为所属领域中熟知的(参见例如美国专利第6,284,471号;第5,807,715号;第4,816,567号;及第4,816,397号)。

[0077] 如本文中所使用,非猫(例如鼠)抗体的"猫类化"形式(即猫类化抗体)为含有衍生自非猫免疫球蛋白的最小序列或无衍生自非猫免疫球蛋白的序列的抗体。在极大程度上,猫类化抗体为猫免疫球蛋白(接受者抗体),其中来自接受者的高变区的残基经来自具有所要特异性、亲和力及能力的例如小鼠、大鼠、兔、人类或非人类灵长类动物的非猫物种(供者抗体)的高变区的残基置换。在一些情况下,猫免疫球蛋白的构架区(FR)残基经对应非猫残基置换。此外,猫类化抗体可包括在接受者抗体或供者抗体中未发现的残基。一般进行这些修饰以进一步改进抗体性能。一般来说,猫类化抗体将包括大体上全部至少一个,且典型地

两个可变域,其中全部或大体上全部高变环(CDR)对应于非猫免疫球蛋白的那些高变环,且全部或大体上全部FR残基为猫免疫球蛋白序列的那些FR残基。猫类化抗体也可包括免疫球蛋白恒定区(Fc)(典型地猫免疫球蛋白的免疫球蛋白恒定区)的至少一部分。

[0078] 如本文中所使用,术语“免疫粘附素”表示将异源“粘附素”蛋白质(例如受体、配位体或酶)的结合域与免疫球蛋白恒定域组合的抗体样分子。在结构上,免疫粘附素包括除抗体(即为“异源”)的抗原识别及结合位点(抗原组合位点)之外的粘附素氨基酸序列以所要结合特异性与免疫球蛋白恒定域序列的融合。

[0079] 如本文中所使用,术语“配位体结合域”是指任何天然受体或其保持对应天然受体的至少一种定性配位体结合能力的任何区或衍生物。在某些实施例中,受体是来自具有与免疫球蛋白超基因家族的成员同源的胞外域的细胞表面多肽。不为免疫球蛋白超基因家族成员,但此定义仍特定涵盖的其它受体为细胞介素的受体,且具体来说具有酪氨酸激酶活性的受体(受体酪氨酸激酶)(造血素及神经生长因子受体超家族的成员),及细胞粘附分子(例如E-选择素、L-选择素及P-选择素)。

[0080] 如本文中所使用,术语“受体结合域”是指受体的任何天然配位体,包含例如细胞粘附分子,或此天然配位体保持对应天然配位体的至少一种定性受体结合能力的任何区或衍生物。

[0081] 如本文中所使用,“经分离”的多肽为已从其天然环境的组分鉴别及分离及/或回收的多肽。其天然环境的污染组分为将干扰多肽的诊断或治疗用途的物质,且可包含酶、激素及其它蛋白质或非蛋白质溶质。在某些实施例中,经分离的多肽经纯化(1)至如通过洛瑞法(Lowry method)所测定的大于95重量%的多肽,且更优选地超过99重量%,(2)至足以通过使用旋转杯式定序仪而获得至少15个N端残基或内部氨基酸序列的程度,或(3)通过SDS-page在还原或非还原条件下使用库马斯蓝(Coomassie blue)或银染色达至均质性。因多肽的天然环境的至少一种组分将不存在,故经分离的多肽包含重组细胞内的原位多肽。然而,经分离的多肽通常将通过至少一个纯化步骤来制备。

[0082] 如本文中所使用,术语“病症”及“疾病”可互换使用以指代将得益于用变异多肽(包括本发明的变异Fc区的多肽)治疗的任何病状,包含慢性及急性病症或疾病(例如使患者易患特定病症的病理学病状)。

[0083] 如本文中所使用,术语“受体”是指能够结合至少一种配位体的多肽。优选受体为具有胞外配位体结合域及任选的其它域(例如跨膜域、胞内域及/或膜锚)的细胞表面或可溶性受体。在本文中所描述的检定中评估的受体可为完整受体或其片段或衍生物(例如包括与一种或多种异源多肽融合的受体的结合域的融合蛋白质)。此外,待针对其结合特性进行评估的受体可存在于细胞中,或经分离及任选地经涂布于检定板或一些其它固相上,或经直接标记且用作探针。

[0084] 猫野生型IgG

[0085] 猫IgG为所属领域中熟知的,且充分描述于例如斯特里泽尔(Strietzel)等人,2014,兽医免疫病理学,第158(3-4)卷,第214至223页中。在一个实施例中,猫IgG为$IgG1_a$。在另一实施例中,猫IgG为$IgG1_b$。在又另一实施例中,猫IgG为IgG2。在一特定实施例中,猫IgG为$IgG1_a$。

[0086] $IgG1_a$、$IgG1_b$及IgG2的氨基酸及核酸序列也为所属领域中熟知的。

[0087] 在一个实例中，本发明的IgG包括恒定域，例如CH1、CH2或CH3域或其组合。在另一实例中，本发明的恒定域包括Fc区，包含例如CH2或CH3域或其组合。

[0088] 在一特定实例中，野生型恒定域包括SEQ ID NO.:1、3或4中所阐述的氨基酸序列。在一些实施例中，野生型IgG恒定域为SEQ ID NO.:1、3或4的同源物、变体、异构体或功能片段，但不具有任何突变。各可能性代表本发明的单独实施例。

[0089] IgG恒定域也包含具有与重链及/或轻链的氨基酸序列大体上类似的氨基酸序列的多肽。大体上相同氨基酸序列在本文中定义为如通过FASTA搜索法根据皮尔森(Pearson)及李普曼(Lipman)，美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)85:2444-2448(1988)所测定，与所比较氨基酸序列具有至少70％、75％、80％、85％、90％、95％或99％一致性的序列。

[0090] 本发明也包含本文中所描述的编码IgG或其部分的核酸分子。在一个实施例中，核酸可编码包括例如CH1、CH2、CH3区或其组合的抗体重链。在另一实施例中，核酸可编码抗体重链，所述抗体重链包括例如VH区中的任一者或其部分，或VH CDR中的任一者，包含其任何变体。本发明也包含编码抗体轻链的核酸分子，所述抗体轻链包括例如CL区中的任一者或其部分、VL区中的任一者或其部分，或VL CDR中的任一者，包含其任何变体。在某些实施例中，核酸编码重链及轻链两者或其部分。

[0091] SEQ ID NO.:1、3或4中所阐述的野生型恒定域的氨基酸序列由分别包括SEQ ID NO.:2、7或8中所阐述的序列的核酸序列编码。

[0092] 经修饰猫IgG

[0093] 本申请案的发明人已发现，取代一个或多个氨基酸残基惊人且出乎意料地增强对FcRn的亲和力。如本文中所使用，氨基酸位置编号是指根据如在Kabat中的Eu索引编号的位置(卡巴特(Kabat)等人，具有免疫学意义的蛋白质的序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)，第5版.美国马里兰州贝塞斯达的国立卫生研究所的公共卫生服务部(Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.)(1991))。

[0094] 因此，在一个实施例中，本发明提供一种经修饰IgG，其包括：猫IgG恒定域，其包括相对于野生型猫IgG恒定域的至少一个氨基酸取代，其中所述取代在根据如在Kabat中的Eu索引编号的氨基酸残基247、249、250、252、254、256、285、309、311、312、314、378、399、401、402、403、404、428、430、431、432、434、436或437处。

[0095] 在一些实施例中，恒定域包括以下取代中的一者或多者：P247I、P247L、P247V、D249A、D249E、D249S、T250E、T250I、T250Q、T250S、T250V、S252A、S252C、S252D、S252E、S252F、S252G、S252H、S252I、S252K、S252L、S252N、S252P、S252Q、S252R、S252T、S252V、S252Y、S252M、S252W、S254A、S254D、S254E、S254F、S254G、S254H、S254K、S254L、S254M、S254C、S254I、S254N、S254P、S254Q、S254R、S254T、S254V、S254W、S254Y、T256A、T256C、T256D、T256E、T256F、T256G、T256H、T256I、T256K、T256L、T256M、T256N、T256P、T256Q、T256R、T256V、T256W、T256Y、T256S、Y285A、L309G、L309I、Q311F、Q311H、Q311I、Q311K、Q311L、Q311M、Q311R、Q311W、Q311Y、D312A、D312H、D312K、D312R、D312P、L314K、316Q、A378C、A378D、A378E、A378F、A378G、A378H、A378I、A378K、A378L、A378M、A378N、A378P、A378Q、A378R、A378S、A378T、A378V、A378W、A378Y、D399M、D399T、D399V、D401R、G402R、T403R、

Y404Q、S428A、S428C、S428D、S428E、S428F、S428G、S428H、S428I、S428K、S428L、S428N、S428P、S428R、S428T、S428V、S428W、S428Y、S428M、E430I、E430Q、A431Q、A431R、A431V、A431K、L432S、S434A、S434C、S434D、S434E、S434F、S434G、S434H、S434I、S434K、S434L、S434M、S434N、S434P、S434Q、S434R、S434T、S434V、S434W、S434Y、H436G、H436K、H436M、H436R、H436Y、T437A及T437R。

[0096] 在一特定实例中，本发明包括本文中所描述在SEQ ID NO.:1、3或4中所阐述的野生型氨基酸序列中的一个或多个突变。在一些实施例中，突变IgG恒定域为具有本文中所描述的一个或多个突变的同源物、变体、异构体或功能片段。各可能性代表本发明的单独实施例。

[0097] 突变恒定域的氨基酸序列由其对应突变核酸序列编码。

[0098] 用于制造本发明的抗体分子的方法

[0099] 用于制造抗体分子的方法为所属领域中熟知的，且充分描述于美国专利8,394,925；8,088,376；8,546,543；10,336,818；及9,803,023以及美国专利申请公开案20060067930中，所述专利以全文引用的方式并入本文中。可使用所属领域的技术人员已知的任何合适的方法、工艺或技术。具有本发明的变异Fc区的抗体分子可根据所属领域中熟知的方法来产生。在一些实施例中，变异Fc区可融合至所选异源多肽，例如抗体可变域或受体或配位体的结合域。

[0100] 随着分子生物学及重组技术的方法的出现，所属领域的技术人员可通过重组手段来产生抗体及抗体样分子，且借此产生编码在抗体的多肽结构中发现的特异性氨基酸序列的基因序列。此类抗体可通过克隆编码所述抗体的多肽链的基因序列或通过直接合成所述多肽链来产生，其中组装合成链以形成对特异性抗原决定基及抗原决定子具有亲和力的活性四聚体(H2L2)结构。这允许随时产生具有来自不同物种及来源的中和抗体的序列特征的抗体。

[0101] 不管抗体来源，或其如何以重组方式构建，或其如何使用转殖基因动物、实验室或商业规模的大型细胞培养、使用转殖基因植物进行试管内或活体内合成，或通过在工艺的任何阶段均不采用活生物体进行直接化学合成，所有抗体均具有类似的整体3维结构。此结构通常以H2L2形式给出，且是指抗体通常包括两条轻(L)氨基酸链及2条重(H)氨基酸链的事实。两条链具有能够与结构上互补的抗原目标相互作用的区。与目标相互作用的区称为“可变”或“V”区，且由来自具有不同抗原特异性的抗体的氨基酸序列差异表征。H或L链的可变区含有能够与抗原目标特异性结合的氨基酸序列。

[0102] 如本文中所使用，术语“抗原结合区”是指抗体分子的含有与抗原相互作用且赋予抗体对抗原的特异性及亲和力的氨基酸残基的部分。抗体结合区包含维持抗原结合残基的适当构形所必需的“构架”氨基酸残基。在提供抗原结合区的H或L链的可变区内为较小序列，归因于其在具有不同特异性的抗体之间的极端变异性，所述较小序列被称为“高变”。这类高变区又称为“互补决定区”或“CDR”区。这些CDR区引起抗体对特定抗原决定子结构的基本特异性。

[0103] CDR代表可变区内的非连续氨基酸延伸，但无论物种如何，已发现这些关键氨基酸序列在可变重链及轻链区内的定位位置在可变链的氨基酸序列内具有类似位置。所有抗体的可变重链及轻链各从具有三个CDR区，各区与其它区不相连。在所有哺乳动物物种中，抗

体肽含有恒定(即高度保守)区及可变区,且在后者内存在CDR及所谓的“构架区”,所述构架区由在重链或轻链的可变区内但在CDR外的氨基酸序列构成。

[0104] 本发明进一步提供一种载体,其包含上文所描述的核酸中的至少一者。因遗传密码为简并的,故可使用超过一个密码子来编码特定氨基酸。使用遗传密码,可确定一个或多个不同的核苷酸序列,其中的每一者将能够编码氨基酸。特定寡核苷酸实际上将构成实际编码序列的概率可通过考虑异常碱基配对关系及在表达抗体或部分的真核或原核细胞中实际上使用(编码特定氨基酸的)特定密码子的频率来估算。莱斯(Lathe),等人,183分子生物学杂志(J.Molec.Biol.)1-12(1985)公开了这类“密码子使用规则”。使用莱斯(Lathe)的“密码子使用规则”,可鉴别出含有理论上“最可能”的能够编码猫IgG序列的核苷酸序列的单核苷酸序列或核苷酸序列集合。也预期用于本发明中的抗体编码区又可通过使用产生本文中所描述的抗体及肽的变体的标准分子生物技术改变现有抗体基因来提供。这类变体包含但不限于抗体或肽的氨基酸序列的缺失、添加及取代。

[0105] 举例来说,一类取代为保守氨基酸取代。这类取代为猫抗体肽中的给定氨基酸经具有类似特征的另一氨基酸取代的那些取代。典型地视为保守性取代的是脂肪族氨基酸Ala、Val、Leu及lie当中的一者置换为另一者;羟基残基Ser与Thr的互换;酸性残基Asp与Glu的交换;酰胺残基Asn与Gin之间的取代;碱性残基Lys及Arg的交换;芳香族残基Phe、Tyr及其类似者当中的置换。关于哪些氨基酸变化有可能在表型上沉默的指南发现于鲍伊(Bowie)等人,247科学(Science)1306-10(1990)中。

[0106] 变异猫抗体或肽可为全功能的,或可在一个或多个活动中缺乏功能。全功能变体典型地仅含有保守变异或非关键残基或非关键区的变异。功能变体也可含有类似氨基酸的取代,这导致功能无变化或变化不显著。可替代地,这类取代可在一定程度上正面或负面地影响功能。非功能变体典型地含有一个或多个非保守氨基酸取代、缺失、插入、倒位或截短,或在关键残基或关键区中的取代、插入、倒位或缺失。

[0107] 功能必需的氨基酸可通过所属领域中已知的方法来鉴别,所述方法例如定点突变诱发或丙氨酸扫描突变诱发。坎宁安(Cunningham)等人,244科学1081-85(1989)。后一程序在分子中的每一残基处引入单一丙氨酸突变。随后测试所得突变分子的生物活性,例如抗原决定基结合或试管内ADCC活性。配位体-受体结合的关键位点亦可通过结构分析来确定,例如晶体学、核磁共振或光亲和性标记。史密斯(Smith)等人,224分子生物学杂志(J.Mol.Biol).899-904(1992);德福斯(de Vos)等人,255科学(Science)306-12(1992)。

[0108] 此外,多肽通常含有除二十种“天然存在”的氨基酸之外的氨基酸。此外,包含末端氨基酸的许多氨基酸可通过天然过程,例如加工及其它翻译后修饰,或通过所属领域中熟知的化学修饰技术来修饰。已知修饰包含但不限于乙酰化、酰化、ADP核糖基化、酰胺化、黄素的共价连接、血红素部分的共价连接、核苷酸或核苷酸衍生物的共价连接、脂质或脂质衍生物的共价连接、磷脂酰肌醇的共价连接、交联、环化、二硫键形成、去甲基化、共价交联的形成、胱氨酸的形成、焦谷氨酸的形成、甲酰化、γ羧化、糖基化、GPI锚形成、羟基化、碘化、甲基化、肉豆蔻酰化、氧化、蛋白质水解加工、磷酸化、异戊烯化、外消旋化、硒酰化、硫酸化、转移RNA介导的氨基酸添加至蛋白质,例如精氨酰化及泛素化。这类修饰为所属领域的技术人员熟知的,且已非常详细地描述于科学文献中。若干尤其常见的修饰(糖基化、脂质连接、硫酸化、谷氨酸残基的γ-羧化、羟基化及ADP核糖基化)例如描述于大部分基础文本中,例

如蛋白质结构及分子特性(Proteins-Structure and Molecular Properties)(第2版,T.E.Creighton,W.H.Freeman&Co.,N.Y.,1993)。可获得关于此主题的许多详细综述,例如沃尔德(Wold),蛋白质的翻译后共价修饰(Posttranslational Covalent Modification of proteins),1-12(约翰逊(Johnson)编.,美国学术出版社(Academic Press,N.Y.),1983);塞夫特(Seifter)等人.182酶学方法(Meth.Enzymol.)626-46(1990);及拉坦(Rattan)等人663纽约科学院年刊(Ann.NY Acad.Sci.)48-62(1992)。

[0109] 在另一方面,本发明提供抗体衍生物。抗体的"衍生物"含有通常并非蛋白质的一部分的额外化学部分。蛋白质的共价修饰包含于本发明的范围内。这类修饰可通过使抗体的目标氨基酸残基与能够与所选侧链或末端残基反应的有机衍生剂反应而引入分子中。举例来说,用所属领域中熟知的双官能剂进行衍生化可适用于将抗体或片段交联至水不溶性支持基质或其它大分子载体。

[0110] 衍生物也包含放射性标记的单克隆抗体,所述抗体经标记。举例来说,放射性碘(251、1311)、碳(4C)、硫(35S)、铟、氚(H^3)或其类似者;单克隆抗体与生物素或抗生素蛋白、与酶(例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、β-D-半乳糖苷酶、葡糖氧化酶、淀粉酶、羧酸去氢酶、乙酰胆碱酯酶、溶菌酶、苹果酸去氢酶或葡糖6-磷酸酯去氢酶)的结合物;以及单克隆抗体与生物发光剂(例如荧光素酶)、静默变化剂(例如吖啶酯)或荧光剂(例如藻胆蛋白)的结合物。

[0111] 本发明的另一衍生物双官能性抗体为通过组合两种单独抗体的识别两种不同抗原基团的部分而产生的双特异性抗体。这可通过交联或重组技术来达成。另外,可向抗体或其一部分添加部分以增加活体内半衰期(例如通过延长从血流中清除的时间)。这类技术包含例如添加PEG部分(又称为聚乙二醇化),且为所属领域中熟知的。参见美国专利申请公开案第20030031671号。

[0112] 在一些实施例中,将编码主题抗体的核酸直接引入宿主细胞中,且在足以诱导所编码抗体的表达的条件下培育细胞。在主题核酸已引入细胞中之后,典型地通常在37℃下(有时在选择下)将细胞培育约1至24小时的时段以便允许抗体表达。在一个实施例中,抗体分泌至细胞生长的培养基的上清液中。传统上,单克隆抗体已在鼠融合瘤细胞系中作为天然分子产生。除所述技术以外,本发明又提供抗体的重组DNA表达。这允许在所选宿主物种中产生抗体,以及一系列抗体衍生物及融合蛋白质。

[0113] 编码本发明的至少一种抗体、部分或多肽的核酸序列可根据常规技术与载体DNA重组,所述技术包含用于连接的平端式或交错端式末端、提供适当末端的限制酶消化、视需要对粘合末端的填充、避免非所要接合的碱性磷酸酶处理及利用适当连接酶的连接。用于这类操纵的技术例如由曼尼阿提斯(Maniatis)等人,分子克隆,实验室手册(MOLECULAR CLONING,LAB.MANUAL),(纽约冷泉港实验室出版(Cold Spring Harbor Lab.Press,NY),1982及1989)及奥苏贝尔(Ausubel)等人,1993同上所公开,可用以构建编码抗体分子或其抗原结合区的核酸序列。

[0114] 如果例如DNA的核酸分子含有含转录及翻译调节信息的核苷酸序列,且这类序列"可操作地连接"至编码多肽的核苷酸序列,那么称所述核酸分子为"能够表达"多肽。可操作键联为其中试图表达的调节DNA序列及DNA序列以准许基因表达为可回收量的肽或抗体部分的方式连接的键联。基因表达所需的调节区的精确性质可因生物体不同而不同,如类

似技术中所熟知。参见例如萨姆布鲁克(Sambrook)等人,2001同上;奥苏贝尔(Ausubel)等人,1993同上。

[0115] 因此,本发明涵盖原核或真核细胞中的抗体或肽的表达。合适的宿主包含细菌或真核宿主,包含活体内或原位的细菌、酵母、昆虫、真菌、鸟类及哺乳动物细胞,或哺乳动物、昆虫、鸟类或酵母来源的宿主细胞。哺乳动物细胞或组织可属于人类、灵长类、仓鼠、兔、啮齿类动物、乳牛、猪、绵羊、马、山羊、狗或猫来源。也可使用所属领域中已知的任何其它合适的哺乳动物细胞。

[0116] 在一个实施例中,本发明的核苷酸序列将并入至能够在接受者宿主中自发复制的质粒或病毒载体中。为此目的,可采用广泛多种载体中的任一种。参见例如奥苏贝尔(Ausubel)等人,1993同上。选择特定质粒或病毒载体的重要因素包含:可从不含有载体的那些接受者细胞中识别且选择出含有载体的接受者细胞的容易性;特定宿主中所需的载体的复本数目;及是否需要能够在不同物种的宿主细胞之间"穿梭"载体。

[0117] 所属领域中已知的实例原核载体包含质粒,例如能够在大肠杆菌中复制的那些质粒(例如pBR322、CoIE1、pSC101、184、pi.vX)。举例来说,这类质粒通过曼尼阿提斯(Maniatis)等人,1989同上;奥苏贝尔(Ausubel)等人,1993同上公开。芽孢杆菌质粒包含pC194、pC221、pT127等。这类质粒通过格雷赞(Gryczan)在细菌分子生物学(THE MOLEC.BIO.OF THE BACILLI)307-329(美国学术出版社(Academic Press,NY),1982)中公开。合适的链霉菌属质粒包含p1J101(肯德尔(Kendall)等人,169细菌杂志(J.Bacteriol.)4177-83(1987))及链霉菌属噬菌体,例如phLC31(蔡特(Chater)等人的第六届放线菌生物学国际研讨会(SIXTH INT'L SYMPOSIUM ON ACTINOMYCETALES BIO.)45-54(Akademiai Kaido,Budapest,Hungary 1986)中)。假单胞菌属质粒综述于约翰(John)等人,8感染疾病综述(Rev.Infect.Dis.)693-704(1986);和弘(lzaki),33日本细菌杂志(Jpn.J.Bacteriol.)729-42(1978);及奥苏贝尔(Ausubel)等人,1993同上中。

[0118] 可替代地,适用于表达编码抗体或肽的cDNA的基因表达元件包含但不限于(a)病毒转录启动子及其强化子元件,例如SV40早期启动子(冈山(Okayama)等人,3分子细胞生物学(Mol.Cell.Biol.)280(1983))、劳氏肉瘤病毒(Rous sarcoma virus)LTR(戈尔曼(Gorman)等人,79美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.,USA)6777(1982))及莫洛尼(Moloney)鼠白血病病毒LTR(格罗切德(Grosschedl)等人,41细胞(Cell)885(1985));(b)剪接区及聚腺苷酸化位点,例如衍生自SV40晚期区的那些(Okayarea等人,1983);及(c)例如SV40中的聚腺苷酸化位点(冈山(Okayama)等人,1983)。

[0119] 免疫球蛋白cDNA基因可如魏德勒(Weidle)等人,51基因(Gene)21(1987)所描述,使用以下各者作为表达元件来表达:SV40早期启动子及其强化子、小鼠免疫球蛋白H链启动子强化子、SV40晚期区mRNA剪接、兔S-球蛋白插入序列、免疫球蛋白及兔S-球蛋白多腺苷酸化位点及SV40多腺苷酸化元件。对于由部件cDNA、部件基因体DNA构成的免疫球蛋白基因(惠特尔(Whittle)等人,1蛋白质工程(Protein Engin.)499(1987)),转录启动子可为人类细胞巨大病毒,启动子强化子可为细胞巨大病毒及小鼠/人类免疫球蛋白,且mRNA剪接及聚腺苷酸化区可为天然染色体免疫球蛋白序列。

[0120] 在一个实施例中,对于在啮齿动物细胞中表达cDNA基因,转录启动子为病毒LTR序列,转录启动子强化子为小鼠免疫球蛋白重链强化子及病毒LTR强化子中的任一者或两者,

剪接区含有大于31bp的内含子,且多腺苷酸化及转录终止区衍生从对应于所合成的免疫球蛋白链的天然染色体序列。在其它实施例中,编码其它蛋白质的cDNA序列与上文列举的表达元件组合以达成蛋白质在哺乳动物细胞中的表达。

[0121] 各融合基因可组装于表达载体中或插入表达载体中。能够表达免疫球蛋白链基因产物的接受者细胞随后仅转染有肽或H或L链编码基因,或共转染有H及L链基因。经转染的接收者细胞在准许表达所并入基因的条件下进行培养,且从培养物回收所表达的免疫球蛋白链或完整抗体或片段。

[0122] 在一个实施例中,编码肽或H及L链或其部分的融合基因经组装于单独的表达载体中,所述表达载体随后用以共转染接受者细胞。可替代地,编码H及L链的融合基因可组装于相同表达载体上。对于表达载体的转染及抗体的产生,接受者细胞系可为骨髓瘤细胞。骨髓瘤细胞可合成、组装及分泌由经传染的免疫球蛋白基因编码的免疫球蛋白,且拥有免疫球蛋白的糖基化机制。骨髓瘤细胞可在培养物中或在小鼠腹腔中生长,其中所分泌的免疫球蛋白可从腹水液中获得。其它合适的接受者细胞包含淋巴细胞,例如猫或非猫来源的B淋巴细胞、猫或非猫来源的融合瘤细胞或种间异种融合瘤细胞。

[0123] 携载本发明的抗体构筑体或多肽的表达载体可通过多种合适的手段中的任一种引入适当宿主细胞中,所述手段包含生物化学手段,例如转化、转染、共轭、原生质粒融合、磷酸钙-沉淀及施用例如二乙氨基乙基(DEAE)葡聚糖的聚阳离子;及机械手段,例如电穿孔、直接显微注射及微弹轰击。约翰斯顿(Johnston)等人,240科学(Science)1538(1988)。

[0124] 对于免疫球蛋白H及L链的产生,酵母可提供优于细菌的显著优势。酵母进行包含糖基化的翻译后肽修饰。目前存在许多重组DNA策略,其利用可用于在酵母中产生所要蛋白质的强启动子序列及高复本数质粒。酵母识别经选殖哺乳动物基因产物之前导序列,且分泌携带前导序列的肽(即前肽)。希茨曼(Hitzman)等人,第11次国际酵母会议(11th Int'l Conference on Yeast),基因与分子生物学(Genetics&Molec.Biol.)(法国蒙彼利埃(Montpelier,France),1982)。

[0125] 针对肽、抗体、其片段及区的产生量、分泌量及稳定性,可常规地评估酵母基因表达系统。可利用一系列酵母基因表达系统中的任一者,所述系统并入有来自编码糖酵解酶的活跃表达基因的启动子及终止元件,当酵母在富含葡糖的培养基中生长时,所述糖酵解酶大量产生。已知糖酵解基因还可提供极有效的转录控制信号。举例来说,可利用磷酸甘油酸激酶(PGK)基因的启动子及终止子信号。可采取许多途径来评估在酵母中表达所选殖的免疫球蛋白cDNA的最优选表达质粒。参见第II卷DNA克隆(DNA Cloning),45-66,(格洛韦尔(Glover)编,)英国牛津IRL出版社(IRL Press,Oxford,UK)1985)。

[0126] 细菌菌株也可用作产生本发明所描述的抗体分子或肽的宿主。含有衍生自与宿主细胞相容的物种的复制子及控制序列的质粒载体与这些细菌宿主结合使用。载体携载复制位点以及能够在经转型细胞中提供表型选择的特异性基因。可采用许多途径来评估在细菌中产生由经克隆的免疫球蛋白cDNA编码的抗体、片段及区或抗体链的表达质粒(参见格洛韦尔(Glover),1985同上;奥苏贝尔(Ausubel),1993同上;萨姆布鲁克(Sambrook),2001同上;科利根(Colligan)等人编.免疫学最新协定(Current Protocols in Immunology),约翰威利父子出版公司(John Wiley&Sons,NY),N.Y.(1994-2001);科利根(Colligan)等人编.蛋白质科学最新协定(Current Protocols in Protein Science),约翰威利父子出版

公司(John Wiley&Sons,NY),N.Y.(1997-2001))。

[0127] 宿主哺乳动物细胞可试管内或活体内生长。哺乳动物细胞提供针对免疫球蛋白蛋白质分子的翻译后修饰,包含前导肽去除、H及L链的折叠及组装、抗体分子的糖基化及功能性抗体蛋白质的分泌。除上文所描述的淋巴来源的细胞以外,可适用作产生抗体蛋白质的宿主的哺乳动物细胞包含成纤维细胞来源的细胞,例如Vero(ATCC CRL 81)或CHO-K1(ATCC CRL 61)细胞。许多载体系统可用于在哺乳动物细胞中表达所选殖肽H及L链基因(参见格洛韦尔(Glover),1985同上)。可遵循不同途径以获得完整H2L2抗体。有可能在相同细胞中共表达H及L链以达成H及L链的胞内缔合及键联为完全四聚体H2L2抗体及/或肽。共表达可通过在相同宿主中使用相同或不同质粒来进行。H及L链两者及/或肽的基因可放置于相同质粒中,随后将所述质粒转染至细胞中,借此直接选择表达两条链的细胞。可替代地,可首先用编码一条链(例如L链)的质粒转染细胞,随后用含有第二可选标记的H链质粒转染所得细胞系。经由任一途径产生肽及/或H2L2分子的细胞系可用编码额外肽复本、H、L或H加L链以及额外可选标记的质粒转染以产生具有增强特性的细胞系,所述特性例如经组装H2L2抗体分子的较高产量或经转染细胞系的稳定性增强。

[0128] 对于长期、高产率产生重组抗体,可使用稳定表达。举例来说,可对稳定表达抗体分子的细胞系进行工程改造。可用免疫球蛋白表达盒及可选标记来转型宿主细胞,而非使用含有病毒复制起点的表达载体。在引入外来DNA之后,可使经工程改造的细胞在富集培养基中生长1至2天,且随后切换为选择性培养基。重组质粒中的可选标记赋予选择抗性,且允许细胞将质粒稳定集成至染色体中且生长以形成变异区(foci),所述变异区继而可克隆及扩增至细胞系中。此类经工程改造的细胞系在筛选及评估直接或间接与抗体分子相互作用的化合物/组分时可为尤其适用的。

[0129] 一旦已产生本发明的抗体,那么其可通过所属领域中已知用于纯化免疫球蛋白分子的任何方法来纯化,例如通过色谱法(例如离子交换,亲和力,尤其对蛋白质A之后的特异性抗原的亲和力,及筛分管柱色谱法)、离心、差异溶解性或通过用于纯化蛋白质的任何其它标准技术。在许多实施例中,抗体从细胞分泌至培养基中,且从培养基中采集。

[0130] 药学及兽医学应用

[0131] 本发明还提供一种药物组合物,其包括本发明的分子及一种或多种药学上可接受的载剂。更具体来说,本发明提供一种药物组合物,其包括药学上可接受的载剂或稀释剂及作为活性成分的根据本发明的抗体或肽。

[0132] “药学上可接受的载剂”包含对于以所采用剂量及浓度暴露于其中的细胞或动物为无毒的任何赋形剂。药物组合物可包含一种或额外治疗剂。

[0133] “药学上可接受”是指在合理医学判断的范围内,适用于与动物的组织接触而无过度毒性、刺激、过敏反应或其它与合理的效益/风险比相称的问题并发症的那些化合物、物质、组合物及/或剂型。

[0134] 药学上可接受的载剂包含溶剂、分散介质、缓冲剂、包衣、抗菌剂及抗真菌剂、润湿剂、防腐剂、buggers、螯合剂、抗氧化剂、等张剂及吸收延迟剂。

[0135] 药学上可接受的载剂包含水;生理盐水;磷酸盐缓冲盐水;右旋糖;甘油;醇,例如乙醇及异丙醇;磷酸、柠檬酸及其它有机酸;抗坏血酸;低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,例如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,

例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、精氨酸或赖氨酸;单醣、双醣及包含葡糖、甘露糖或糊精的其它碳水化合物;EDTA;例如钠的成盐相对离子;及/或非离子表面活性剂,例如TWEEN、聚乙二醇(PEG)及PLURONICS;等张剂,例如糖、多元醇(例如甘露醇及山梨醇)及氯化钠;以及其组合。

[0136] 本发明的药物组合物可以多种方式进行调配,所述方式包含例如液体、半固体或固体剂型,例如液体溶液(例如可注射及可输注溶液)、分散液或悬浮液、脂质粒、栓剂、锭剂、丸剂或粉剂。在一些实施例中,组合物呈可注射或可输注溶液的形式。组合物可呈适用于静脉内、动脉内、肌内、皮下、非经肠、经粘膜、经口、局部或经皮投药的形式。组合物可调配为立即、受控、延长或延迟释放组合物。

[0137] 本发明的组合物可以单独的治疗剂形式或与其它治疗剂组合形式进行投予。所述组合物可单独投予,但一般与基于所选投药途径及标准医药实践选择的药物载剂一起投予。本文中所公开的抗体的投予可通过任何合适的手段来进行,所述手段包含非经肠注射(例如腹膜内、皮下或肌内注射)、经口或通过向气道表面局部投予抗体(典型地携载于药物调配物中)。向气道表面的局部投予可通过鼻内投药(例如通过使用滴管、拭子或吸入器)来进行。向气道表面局部投予抗体亦可通过吸入投药来进行,例如通过将含有抗体的药物调配物的可吸入粒子(包含固体及液体粒子两者)形成为气溶胶悬浮液,且随后使个体吸入可吸入粒子。用于投予药物调配物的可吸入粒子的方法及设备为熟知的,且可采用任何常规技术。

[0138] 在一些所要实施例中,抗体通过非经肠注射进行投予。对于非经肠投药,抗体或分子可结合药学上可接受的非经肠媒剂而调配为溶液、悬浮液、乳液或冻干粉剂。举例来说,媒剂可为抗体的溶液或其溶解于可接受的载剂(例如水性载剂)中的混合液,此类媒剂为水、生理盐水、林格氏溶液(Ringer's solution)、右旋糖溶液、海藻糖或蔗糖溶液或5%血清白蛋白、0.4%生理盐水、0.3%甘氨酸及其类似者。还可使用脂质体及非水性媒剂,例如不易失性油。这些溶液为无菌的,且一般不含粒子物质。这些组合物可通过常规、熟知的灭菌技术来灭菌。组合物可含有接近生理条件所需的药学上可接受的辅助物质,例如pH调节剂及缓冲剂、毒性调节剂及其类似者,例如乙酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、乳酸钠等。这些调配物中的抗体的浓度可广泛变化,例如从小于约0.5重量%,通常为或至少约为1重量%至高达15重量%或20重量%,且将根据所选特定投药模式主要基于液体体积、粘度等来选择。媒剂或冻干粉剂可含有维持等张性的添加剂(例如氯化钠、甘露醇)及维持化学稳定性的添加剂(例如缓冲剂及防腐剂)。调配物通过常用技术来灭菌。用于制备非经肠可投予组合物的实际方法将为所属领域的技术人员已知或显而易见的,且更详细地描述于例如雷明顿药物科学(REMINGTON'S PHARMA.SCI.)(第15版,宾夕法尼亚州伊斯顿的马克出版有限公司(Mack Pub.Co.,Easton,Pa.),1980)中。

[0139] 本发明的抗体或分子可冻干以便存储,且在使用之前在合适的载剂中进行复原。此技术已展现对常规免疫球蛋白有效。可采用任何合适的冻干及复原技术。所属领域的技术人员将了解,冻干及复原可引起不同程度的抗体活性损失,且可能必须调整使用量以进行补偿。可投予含有本发明抗体或其混合液的组合物以用于预防现有疾病的复发及/或治疗性治疗现有疾病。合适的药物载剂描述于最新版本的雷明顿药物科学(REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES)(此技术领域中的标准参考文本)中。在治疗性应用中,以足以

治愈或至少部分遏制或减轻疾病及其并发症的量向已患有疾病的个体投予组合物。

[0140] 用于治疗如本文中所描述的病状或疾病的本发明的组合物的有效剂量视许多不同因素而变化,所述因素包含例如但不限于特定药剂的药效学特征及其投药模式及途径;目标位点;动物的生理状态;所投予的其它药物;治疗为防治性抑或治疗性的;接受者的年龄、健康状况及体重;症状的性质及程度、并行治疗的种类、治疗频率及所要效果。

[0141] 可进行组合物的单次或多次投予,其中剂量及模式由治疗兽医选择。在任何情况下,药物调配物应提供足以有效治疗个体的量的本发明的抗体。

[0142] 治疗剂量可使用所属领域的技术人员已知的常规方法来滴定以优化安全性及功效。

[0143] 本发明的药物组合物可包含“治疗有效量”。“治疗有效量”是指在所需剂量及时间段下有效达成所要治疗结果的量。分子的治疗有效量可根据例如个体的疾病病况、年龄、性别及体重以及分子在个体中引起所要反应的能力的因素而变化。治疗有效量也为治疗有益效果超过分子的任何毒性或不利影响的量。

[0144] 在另一方面,本发明的组合物可用于例如治疗猫中的各种疾病及病症。如本文中所使用,术语“治疗(treat/treatment)”是指治疗性治疗,包含防治性或预防性措施,其中目标为预防或减缓(减轻)与疾病或病状相关的非所要生理变化。不论可检测或不可检测,有益或所要临床结果均包含但不限于症状缓解、疾病或病状的程度减弱、疾病或病状稳定(即其中疾病或病状不恶化)、疾病或病状的进程延迟或减缓、疾病或病状改善或缓和及疾病或病状缓解(不论部分或整体)。需要治疗的那些者包含已患有所述疾病或病状以及易患有所述疾病或病状的那些者或应预防所述疾病或病状的那些。

[0145] 本说明书中所引用的所有专利及文献参考特此以全文引用的方式并入。

[0146] 提供以下实例以补充先前公开内容且提供对本文中所描述的主题的较佳理解。这些实例不应被视为限制所描述的主题。应理解,本文中所描述的实例及实施例仅用于说明的目的,且鉴于其各种修改或改变对于所属领域的技术人员将为显而易见的,且打算包含于本发明的真实范围内,且可在不脱离本发明的真实范围的情况下进行。

[0147] 实例

[0148] 实例1

[0149] 构建猫IgG Fc突变体

[0150] 如斯特里泽尔(Strietzel)等人(斯特里泽尔(Strietzel)等人,2014,兽医免疫病理学,第158(3-4)卷,第214至223页)所描述来进行所有猫IgG的构建(图1),其中利用含有编码IgG亚类1对偶基因a(IgG1a)的猫恒定区的序列的质粒,且本文中所探究的各mAb的VH/VL序列经插入于上游,且与编码恒定域的核苷酸同框。突变通过恒定区直接DNA合成为基因片段而并入各质粒的CH1、CH2或CH3域(图2)的各各别位置中,且随后经次克隆至各别所关注可变区中。

[0151] 表达及纯化

[0152] 单克隆抗体(mAb)突变体在获自赛默飞世尔(Thermo Fisher)的哺乳动物悬浮细胞系统EXPICHO-S(中国仓鼠卵巢(Chinese Hamster Ovary))细胞中表达。悬浮EXPICHO-S细胞在EXPICHO表达培养基(Gibco)中维持于0.14与8.0×10e6个细胞/毫升之间。细胞在第-1天及转染日遵循ExpiCHO方案用户手册进行稀释。使用来源于ExpiFectamine CHO转染

试剂盒(Gibco)的试剂,遵循最大滴度条件,如方案中所描述来转染经稀释的细胞。在12至14天培育之后,采集培养物且进行澄清。在已通过PBS预平衡的MabSelect Sure LX(美国通用电气医疗集团(GE Healthcare))上经由蛋白质A色谱法从经澄清的上清液纯化抗体。在样品装载之后,将树脂用PBS洗涤,且随后用20mM pH 5.5乙酸钠洗涤。用20mM pH 3.5乙酸从管柱洗脱样本。在洗脱之后,进行汇集,且通过添加1M乙酸钠而中和至4%。视可用体积及预期用途而定,有时将样本更换为最终缓冲剂(例如PBS、其它)。通过在280nm下的吸光度来测量浓度。

[0153] SDS-PAGE

[0154] 使用4至12%含Bis-Tris NuPAGE凝胶的MES-SDS操作缓冲剂及SeeBlue Plus2标准物(均来自英杰(Invitrogen))执行非还原性(nr)及还原性十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE)。对于非还原性样本,添加1mM的烷化剂N-乙基顺丁烯二酰亚胺(NEM),对于还原性样本,添加还原剂二硫苏糖醇(DTT)。用库马斯蓝对凝胶进行染色以检测蛋白质带。

[0155] 分析型SEC

[0156] 使用来自TOSOH BioScience的TSK凝胶SuperSW3000、4.6mm、10×30cm、4μm管柱在200mM磷酸钠(Na Phosphate)pH 7.2操作缓冲剂中以0.25毫升/分钟进行分析型SEC。

[0157] NR-CGE

[0158] 使用Beckman Coulter PA800 plus分析器使用A55625毛细管筒按照制造商说明书来执行非还原性毛细管凝胶电泳(nrCGE)。

[0159] SMAC

[0160] 使用Sepax Zenix SEC-300、4.6×300mm管柱在200mM磷酸钠pH 7.2操作缓冲剂中以0.35ml/min进行自立单层吸收色谱法(SMAC)。

[0161] HIC

[0162] 使用Sepax Proteomix HIC Butyl-NP5、4.6×100mm管柱进行疏水性相互作用层析(HIC)。以0.75ml/min应用从含100%1.8M硫酸铵的0.1M磷酸钠pH 6.5至100%0.1M磷酸钠pH 6.5的线性梯度持续20min。

[0163] Octet-BLI

[0164] 使用Forte Bio's Octet QKe通过胺反应性第二代生物传感器进行此检定。将样本更换为无钙及镁的1×Gibco PBS,且稀释至0.5mg/mL的浓度。在建立生物传感器基线之后,将生物传感器浸没至100uL的样本中持续600秒。

[0165] 经由Octet QKe定量(Pall ForteBio Corp,Menlo Park,CA,USA)筛检结合至蛋白质A传感器的抗体。如斯特里泽尔(Strietzel)等人针对蛋白质质量所描述来纯化及定量结合至蛋白质A的构筑体。

[0166] 实例2

[0167] FcRn结合检定

[0168] 分离、制备猫FcRn,且针对猫FcRn根据斯特里泽格(Strietzelg)等人来检定突变Fc IgG。使用标准RACE PCR来扩增猫FcRn-α次单元及β-微球蛋白。FcRn-α次单元及β-微球蛋白经共转染至HEK 293细胞中,且FcRn复合体通过经由c端His标签进行IMAC亲和纯化来纯化。FcRn复合体经由BirA酶促生物素酰化反应来进行生物素标记。通过Biacore 3000或Biacore T200(美国宾夕法尼亚州匹兹堡的通用电气医疗集团(GE Healthcare,

Pittsburgh,PA,USA))使用SA传感器芯片来测量KD。

[0169] 使用经修改的SA捕获方法将FcRn捕获于传感器表面上。10mM MES;150mM NaCl;0.005% Tween20;0.5mg/mL BSA;pH6用作捕获方法操作操作缓冲剂及滴定。1×HBS-P、0.5mg/mL BSA;pH7.4亦用于方法操作缓冲剂及滴定。使Fc突变IgG在受体表面上流动,且使用Scrubber2软件分析(BioLogic Software Pty,Ltd.,Campbell,Australia)或T200评估软件测定亲和力(表1及表4)。从所有操作中减除仅含有缓冲剂的空白操作。使用50mM Tris pH8更新流量槽。在15℃下执行操作。

[0170] 在各别位置处形成的突变对于IgG在pH6下对FcRn的亲和力具有明显影响。IgG的FcRn亲和力的增加并不依赖于VHVL域,且针对任何猫IgG1a为通用的。

[0171] 通过表面等离子体共振(Biacore)来测量野生型(WT)及突变IgG与猫FcRn的结合。另外执行生物物理学表征。

[0172] 表1.突变体对FcRn结合亲和力的影响。

[0173]

ID 编号	突变#1	突变#2	突变#3	突变#4	突变#5	突变#6	在 pH6 下的 KD	在 pH7.4 下的 KD
0	WT						2.02E-08	NBO
	缓冲剂						NBO	NBO
1	S252R						1.48E-09	5.06E-09
2	S434A						4.49E-09	NBO
3	S434C						1.18E-08	NBO
4	S434D						5.66E-09	NBO
5	S434E						3.35E-09	NBO
6	S434F						7.45E-10	2.10E-08
7	S434G						9.58E-09	2.16E-08
8	S434H						1.02E-09	NBO

[0174]

ID 编号	突变#1	突变#2	突变#3	突变#4	突变#5	突变#6	在 pH6 下的 KD	在 pH7.4 下的 KD
9	S434I						1.44E-08	NBO
10	S434K						6.76E-09	NBO
11	S434L						8.67E-09	NBO
12	S434M						2.80E-09	NBO
13	S434N						6.94E-09	NBO
14	S434P						5.64E-09	NBO
15	S434Q						4.80E-09	NBO
16	S434R						1.19E-09	1.63E-08
17	S434T						1.06E-08	NBO
18	S434V						3.71E-09	NBO
19	S434W						7.71E-10	2.16E-08
20	S434Y						4.33E-10	1.44E-08
21	D312A						6.95E-09	8.18E-06
22	D312H						7.33E-09	NBO
23	D312K						5.86E-09	5.61E-08
24	D312R						6.91E-09	2.50E-08
25	D399M						5.33E-09	4.68E-08
26	D399T						6.75E-09	NBO
27	D399V						8.29E-09	2.88E-06
28	D401R						4.77E-09	NBO
29	G402R						6.10E-09	1.20E-06
30	L309G						9.12E-09	5.45E-08
31	L309I						6.81E-09	4.53E-06
32	Q311F						8.85E-09	1.37E-06
33	Q311H						5.84E-09	9.37E-08
34	Q311I						7.00E-09	7.71E-08
35	Q311K						4.85E-09	1.75E-06
36	Q311L						6.38E-09	NBO
37	Q311M						4.97E-09	5.10E-06
38	Q311R						4.56E-09	6.72E-08
39	T403R						6.22E-09	8.40E-07
40	Y404Q						9.96E-09	9.94E-06
41	A431Q						6.64E-09	NBO
42	A431R						6.73E-09	NBO
43	A431V						7.08E-09	NBO
44	D249A						5.41E-09	NBO
45	D249E						5.84E-09	NBO
46	D249S						5.24E-09	NBO
47	E430I						5.89E-09	NBO
48	E430Q						6.58E-09	NBO

[0175]

ID 编号	突变#1	突变#2	突变#3	突变#4	突变#5	突变#6	在 pH6 下的 KD	在 pH7.4 下的 KD
49	H436G						1.09E-08	NBO
50	H436K						6.91E-09	NBO
51	H436M						8.25E-09	NBO
52	H436R						5.69E-09	NBO
53	L432S						6.58E-09	NBO
54	P247I						4.51E-09	NBO
55	P247L						4.72E-09	NBO
56	P247V						5.21E-09	NBO
57	T250E						6.07E-09	NBO
58	T250I						4.66E-09	NBO
59	T250Q						4.35E-09	NBO
60	T250S						4.94E-09	NBO
61	T250V						6.87E-09	NBO
62	T437A						8.79E-09	NBO
63	T437R						6.85E-09	NBO
64	Y285A						8.01E-09	NBO
65	A378C						7.73E-08	ND
66	A378D						1.00E-07	ND
67	A378E						6.36E-08	ND
68	A378F						7.48E-08	ND
69	A378G						8.83E-08	ND
70	A378H						4.93E-08	ND
71	A378I						5.83E-08	ND
72	A378K						1.04E-07	ND
73	A378L						3.47E-08	ND
74	A378M						2.66E-08	ND
75	A378N						2.86E-08	ND
76	A378P						6.84E-08	ND
77	A378Q						4.90E-08	ND
78	A378R						3.62E-08	ND
79	A378S						4.83E-08	ND
80	A378T						5.92E-08	ND
81	A378V						4.29E-08	ND
82	A378W						9.10E-08	ND
83	A378Y						6.96E-08	ND
84	S252A						2.71E-08	ND
85	S252C						9.22E-07	ND
86	S252D						9.35E-08	ND
87	S252E						1.63E-07	ND
88	S252F						1.23E-07	5.96E-06

[0176]

ID 编号	突变#1	突变#2	突变#3	突变#4	突变#5	突变#6	在 pH6 下的 KD	在 pH7.4 下的 KD
89	S252G						4.98E-08	ND
90	S252H						4.99E-08	8.41E-06
91	S252I						1.56E-07	ND
92	S252K						5.37E-08	ND
93	S252L						7.07E-08	ND
94	S252N						4.00E-07	ND
95	S252P						7.03E-06	ND
96	S252Q						1.92E-07	ND
97	S252R	S428L	S434F				6.43E-09	7.74E-07
98	S252T						1.19E-06	ND
99	S252V						4.47E-06	ND
100	S252Y						8.93E-07	1.27E-05
101	S254A						5.30E-08	ND
102	S254D						4.74E-07	ND
103	S254E						7.11E-10	ND
104	S254F						5.68E-07	ND
105	S254G						6.42E-08	ND
106	S254H						1.85E-06	ND
107	S254K						4.65E-08	ND
108	S254L						4.27E-08	ND
109	S254M						1.01E-07	ND
110	S428A						1.19E-07	ND
111	S428C						6.14E-08	ND
112	S428D						3.62E-07	ND
113	S428E						1.84E-07	ND
114	S428F						8.39E-08	ND
115	S428G						4.63E-08	ND
116	S428H						4.16E-08	ND
117	S428I						4.08E-08	ND
118	S428K						7.02E-08	ND
119	S434Y	S434F					3.61E-09	9.48E-08
120	S428L	S434Y					2.75E-09	4.69E-08
121	S428N						4.29E-08	ND
122	S428P						1.80E-08	ND
123	S428Q						3.83E-08	ND
124	S428R						6.86E-08	ND
125	S428T						2.73E-08	ND
126	S428V						1.92E-08	ND
127	S428W						3.64E-08	ND
128	S428Y						1.64E-08	1.87E-05

[0177]

ID 编号	突变#1	突变#2	突变#3	突变#4	突变#5	突变#6	在 pH6 下的 KD	在 pH7.4 下的 KD
129	A431K						1.01E-08	9.39E-09
130	D312P						3.96E-09	2.96E-06
131	H436Y						1.02E-08	4.34E-08
132	L314K						8.43E-09	4.15E-08
133	Q311W						4.18E-09	2.07E-07
134	Q311Y						5.53E-09	4.14E-08
135	S252F	S434H					1.69E-09	1.81E-08
136	S252M						5.50E-08	NBO
137	S252R	S434H					2.21E-09	4.13E-08
138	S252W						8.03E-08	NBO
139	S252Y	S434H					7.74E-10	1.17E-08
140	S254C						4.40E-08	2.16E-06
141	S254I						1.24E-08	1.61E-05
142	S428L						8.15E-08	NBO
143	S428M						2.18E-08	NBO
144	S254N						2.57E-08	NBO
145	S254P						2.73E-08	5.69E-06
146	S254Q						2.47E-08	NBO
147	S254R						2.15E-08	NBO
148	S254T						1.61E-08	NBO
149	S254V						9.91E-09	4.98E-05
150	S254W						6.09E-08	NBO
151	S254Y						7.85E-08	NBO
152	T256A						4.06E-08	NBO
153	T256C						1.54E-07	NBO
154	T256D						2.44E-07	NBO
155	T256E						5.09E-08	NBO
156	T256F						5.03E-08	4.27E-07
157	T256G						7.69E-08	NBO
158	T256H						8.74E-08	NBO
159	T256I						1.15E-07	NBO
160	T256K						1.07E-07	NBO
161	T256L						8.65E-08	NBO
162	T256M						1.93E-08	NBO
163	T256N						7.74E-08	NBO
164	T256P						5.76E-08	NBO
165	T256Q						5.86E-08	NBO
166	T256R						2.77E-08	NBO
167	T256V						1.95E-08	NBO
168	T256W						2.52E-08	NBO

[0178]

ID 编号	突变#1	突变#2	突变#3	突变#4	突变#5	突变#6	在 pH6 下的 KD	在 pH7.4 下的 KD
169	T256Y						2.20E-08	NBO
170	D312P	S434Y					2.26E-08	1.80E-06
171	L314K	S434Y					2.44E-07	7.43E-06
172	Q311W	D312P					2.76E-09	5.03E-08
173	Q311W	D312P	L314K				1.23E-06	NBO
174	Q311W	D312P	S434Y				1.53E-09	3.77E-08
175	Q311W	L314K					3.47E-09	5.58E-08
176	Q311W	S434Y					2.70E-08	NBO
177	S252F	S434F					1.73E-07	2.35E-06
178	S252F	S434W					6.15E-09	1.37E-06
179	S252F	S434Y					9.28E-09	1.47E-06
180	S252Y	D312P	L314K				2.67E-08	1.82E-06
181	S252Y	L314K					1.09E-08	NBO
182	S252Y	Q311W					2.69E-08	9.53E-07
183	S252Y	Q311W	D312P				3.52E-08	1.13E-06
184	S252Y	Q311W	L314K				1.08E-08	1.79E-07
185	S252Y	Q311W	S434Y				9.72E-08	NBO
186	S252Y	S428Y					1.72E-08	NBO
187	S252Y	S428Y	D312P				1.51E-08	4.08E-06
188	S252Y	S428Y	L314K				7.93E-09	2.33E-05
189	S252Y	S428Y	Q311W				6.77E-08	NBO
190	S252Y	S428Y	S434Y				7.81E-08	NBO
191	S252Y	S434F					1.97E-06	NBO
192	S252Y	S434F	Q311W				1.64E-07	NBO
193	S252Y	S434H	Q311W				8.39E-09	9.89E-07
194	S252Y	S434R	Q311W				1.43E-10	4.44E-09
195	S252Y	S434W					1.02E-08	8.38E-06
196	S252Y	S434W	Q311W				6.59E-09	2.19E-06
197	S252Y	S434Y					1.16E-07	NBO
198	S428Y	D312P	L314K				1.52E-08	6.86E-06
199	S428Y	L314K					7.63E-09	1.85E-06
200	S428Y	L314K	S434Y				7.93E-10	1.72E-08
201	S428Y	Q311W					1.27E-08	7.63E-06
202	S428Y	Q311W	D312P				2.60E-08	4.19E-06
203	S428Y	Q311W	L314K				1.01E-08	3.48E-07
204	S428Y	S434Y					4.65E-09	2.35E-07
205	T256S						2.14E-06	NBO
206	D312P	L314K					7.24E-09	3.11E-07
207	S252F	S434R					3.59E-09	3.98E-07
208		D312P					1.05E-08	NBO

[0179]

ID 编号	突变#1	突变#2	突变#3	突变#4	突变#5	突变#6	在 pH6 下的 KD	在 pH7.4 下的 KD
	S252Y							
209	S252Y	D312P	S434Y				2.21E-11	2.26E-09
210	S252Y	L314K	S434Y				4.96E-11	2.85E-09
211	S252Y	S434R					4.12E-09	1.09E-05
212	S428Y	D312P					3.41E-08	2.76E-06
213	S428Y	D312P	S434Y				1.48E-09	8.64E-07
214	S428Y	Q311W	S434Y				3.80E-09	1.51E-06
215	S252H	S428M	D312P				3.24E-09	4.12E-08
216	S252H	D312P					3.90E-09	2.67E-08
217	S252H	L314K					6.37E-09	2.00E-08
218	S252H	Q311W					6.04E-09	2.50E-08
219	S252H	Q311Y					1.21E-08	3.65E-08
220	S252H	S428M					2.65E-09	1.01E-07
221	S252H	S428M	D312P				8.22E-09	3.30E-07
222	S252H	S428M	Q311W				3.14E-09	5.46E-08
223	S252H	S428M	Q311Y				5.73E-09	1.41E-07
224	S252H	S428M,	S434F				1.21E-10	2.69E-08
225	S252H	S428M	S434L				8.59E-09	3.55E-09
226	S252H	S428M	S434P				7.45E-09	5.56E-08
227	S252H	S428M	S434W				1.35E-10	2.08E-08
228	S252H	S428M	S434Y				1.38E-10	2.07E-08
229	S252H	S434F					3.91E-10	2.41E-08
230	S252H	S434L					6.08E-09	3.79E-09
231	S252H	S434P					9.32E-09	1.28E-08
232	S252H	S434W					4.69E-10	3.11E-08
233	S252H	S434Y					1.4E-10	1.25E-08
234	S252M	S428M					7.27E-09	1.95E-08
235	S252M	S428M	S434N				8.51E-09	1.53E-08
236	S252M	S428M	S434N	H436Y			2.05E-08	2.87E-08
237	S252M	S434N					1.48E-08	3.38E-08
238	S252Y	S428M					2.58E-09	3.92E-08
239	S252Y	S428M	D312P				7.96E-10	2.53E-08
240	S252Y	S428M	L314K				2.13E-09	2.50E-08
241	S252Y	S428M	Q311W				5.06E-10	1.88E-08
242	S252Y	S428M	Q311Y				2.40E-09	3.99E-08
243	S252Y	S428M	S434F				2.07E-11	9.13E-09
244	S252Y	S428M	S434L				6.91E-09	2.89E-08
245	S252Y	S428M	S434P				4.86E-09	4.44E-08
246	S252Y	S428M	S434W				4.06E-11	7.91E-09

[0180]

ID 编号	突变#1	突变#2	突变#3	突变#4	突变#5	突变#6	在 pH6 下的 KD	在 pH7.4 下的 KD
247	S252Y	S428M	S434Y				9.02E-11	7.65E-09
248	S428M	D312P					5.70E-09	2.37E-08
249	S428M	L314K					9.78E-10	1.93E-05
250	S428M	Q311W					5.56E-09	3.32E-08
251	S428M	Q311Y					5.83E-09	2.03E-08
252	S428M	S434F					1.90E-10	2.74E-08
253	S428M	S434L					8.00E-09	NBO
254	S428M	S434N					1.06E-08	8.83E-09
255	S428M	S434P					7.53E-09	NBO
256	S428M	S434W					1.93E-10	3.16E-08
257	S428M	S434Y					2.64E-10	2.19E-08
258	WT 2						3.92E-08	NBO
259	S428L						2.45E-08	NBO
260	S252Y	S254T	T256E				1.32E-08	6.65E-08
261	WT 3						8.18E-08	NBO
262	S428L						2.54E-08	NBO
263	S252Y	S254T	T256E				1.40E-08	NBO
264	D312P	L314K	S434Y				7.17E-08	NBO
265	Q311W	D312P	L314K	S434Y			7.95E-09	NBO
266	Q311W	L314K	S434Y				2.80E-09	3.88E-07
267	S252F	S434F	Q311W				4.15E-09	4.03E-06
268	S252F	S434H	Q311W				1.43E-08	1.07E-05
269	S252F	S434R	Q311W				1.13E-08	1.52E-06
270	S252F	S434W	Q311W				3.68E-09	2.64E-06
271	S252F	S434Y	Q311W				9.69E-11	6.21E-09
272	S252R	S434F					7.96E-09	1.19E-05
273	S252R	S434F	Q311W				4.77E-09	4.76E-06
274	S252R	S434H	Q311W				5.62E-09	3.85E-06
275	S252R	S434R					7.86E-08	NBO
276	S252R	S434R	Q311W				2.87E-08	1.48E-05
277	S252R	S434W					7.10E-09	6.60E-06
278	S252R	S434H	Q311W				5.45E-09	5.91E-06
279	S252R	S434Y					1.08E-08	1.21E-05
280	S252R	S434Y	Q311W				2.87E-09	4.40E-06
281	S252Y	D312P	L314K	S434Y			2.35E-09	1.59E-06
282	S252Y	Q311W	D312P	L314K			3.00E-08	1.19E-07
283	S252Y	Q311W	D312P	L314K	S434Y		1.14E-09	3.00E-07
284	S252Y	Q311W	D312P	S434Y			7.27E-09	NBO
285	S252Y	Q311W	L314K	S434Y			1.21E-09	1.73E-06
286	S252Y	S428Y	D312P	L314K			2.70E-08	NBO

[0181]

ID 编号	突变#1	突变#2	突变#3	突变#4	突变#5	突变#6	在 pH6 下的 KD	在 pH7.4 下的 KD
287	S252Y	S428Y	D312P	L314K	S434Y		6.33E-10	1.27E-07
288	S252Y	S428Y	D312P	S434Y			2.68E-11	3.22E-09
289	S252Y	S428Y	L314K	S434Y			8.08E-10	1.32E-07
290	S252Y	S428Y	Q311W	D312P			3.08E-09	2.54E-07
291	S252Y	S428Y	Q311W	D312P	L314K		3.97E-08	1.67E-05
292	S252Y	S428Y	Q311W	D312P	L314K	S434Y	4.01E-09	2.72E-06
293	S252Y	S428Y	Q311W	D312P	S434Y		1.07E-09	2.93E-06
294	S252Y	S428Y	Q311W	L314K			6.92E-10	1.28E-08
295	S252Y	S428Y	Q311W	L314K	S434Y		6.75E-10	2.01E-07
296	S252Y	S428Y	Q311W	S434Y			5.44E-10	1.48E-06
297	S428Y	D312P	L314K	S434Y			8.98E-10	8.29E-08
298	S428Y	Q311W	D312P	L314K			2.53E-08	NBO
299	S428Y	Q311W	D312P	L314K	S434Y		1.17E-09	7.96E-08
300	S428Y	Q311W	D312P	S434Y			2.35E-10	1.82E-07
301	S428Y	Q311W	L314K	S434Y			1.11E-09	4.94E-07
302	A431K	S434P					2.17E-09	NBO
303	A431K	S434Y					1.33E-09	2.63E-08
304	D399M	D401R					5.43E-09	NBO
305	D399M	D401R	T403R				3.11E-03	NBO
306	D399M	T403R					1.28E-08	NBO
307	D401R	T403R					1.59E-08	NBO
308	P247V	S252H					5.61E-09	1.79E-08
309	P247V	T250Q					9.60E-09	NBO
310	P247V	T250Q	S252H				8.21E-09	2.44E-08
311	Q311H	D312P	L314K				1.44E-09	NBO
312	Q311K	D312P	L314K				6.07E-09	NBO
313	Q311M	D312P	L314K				1.89E-08	NBO
314	Q311R	D312P	L314K				2.13E-06	NBO
315	Q311Y	D312P	L314K				1.14E-08	NBO
316	S428M	A431K					4.87E-09	2.42E-06
317	S428M	A431K	S434P				2.22E-08	1.56E-08
318	S428M	A431K	S434Y				1.35E-10	2.53E-08
319	S428Y	D312P	A431K	S434P			6.96E-09	1.08E-06
320	S428Y	D312P	S434P				2.27E-08	NBO
321	S428Y	D312P	S434Y	A431K			5.39E-11	1.02E-08
322	S428Y	D312P	S434Y	D399M	D401R		4.02E-12	NBO
323	S428Y	D312P	S434Y	D399M	D401R	T403R	1.29E-13	1.30E-06
324	S428Y	D312P	S434Y	D399M	T403R		1.13E-10	2.16E-08
325	S428Y	D312P	S434Y	D401R	T403R		7.20E-12	1.11E-08
326	S428Y	D312P	S434Y	P247V	S252H		6.27E-11	1.37E-08

[0182]

ID 编号	突变#1	突变#2	突变#3	突变#4	突变#5	突变#6	在 pH6 下的 KD	在 pH7.4 下的 KD
327	S428Y	D312P	S434Y	P247V	T250Q		2.21E-10	2.74E-08
328	S428Y	D312P	S434Y	P247V	T250Q	S252H	4.18E-11	8.68E-09
329	S428Y	D312P	S434Y	Q311H	L314K		3.38E-10	1.89E-08
330	S428Y	D312P	S434Y	Q311K	L314K		9.06E-12	NBO
331	S428Y	D312P	S434Y	Q311M	L314K		2.59E-10	1.46E-08
332	S428Y	D312P	S434Y	Q311R	L314K		3.32E-10	2.86E-08
333	S428Y	D312P	S434Y	Q311Y	L314K		9.08E-10	2.59E-08
334	S428Y	D312P	S434Y	T250Q	S252H		1.82E-10	1.99E-08
335	T250Q	S252H					8.02E-09	3.69E-08
336	S252Y	S428M	S434F	A431K			3.59E-11	7.28E-09
337	S252Y	S428M	S434F	D312H			2.72E-11	8.96E-09
338	S252Y	S428M	S434F	D399T			2.72E-11	1.38E-08
339	S252Y	S428M	S434F	P247L			1.68E-11	6.73E-09
340	S252Y	S428M	S434F	Q311R			2.50E-11	3.30E-09
341	S252Y	S428M	S434F	D312A			3.53E-11	6.50E-09
342	S252Y	S428M	S434F	D312P			6.30E-12	3.29E-09
343	S252Y	S428M	S434F	D399M			4.10E-11	1.09E-08
344	S252Y	S428M	S434F	D401R			1.28E-11	1.10E-08
345	S252Y	S428M	S434F	E430I			2.27E-11	1.15E-08
346	S252Y	S428M	S434F	G402R			4.04E-11	9.95E-09
347	S252Y	S428M	S434F	L314K			5.67E-11	1.05E-08
348	S252Y	S428M	S434F	Q311H			9.49E-12	1.08E-08
349	S252Y	S428M	S434F	Q311K			1.92E-11	4.78E-09
350	S252Y	S428M	S434F	Q311M			8.79E-15	4.89E-09
351	S252Y	S428M	S434F	Q311W			1.10E-11	3.35E-09
352	S252Y	S428M	S434F	Q311Y			2.71E-11	6.48E-09
353	S252Y	S428M	S434F	S254V			1.97E-13	6.68E-09
354	S252Y	S428M	S434F	T250Q			1.92E-11	4.46E-09
355	S252Y	S428M	S434F	T256M			9.64E-11	1.57E-08
356	S252Y	S428M	S434F	T403R			2.49E-11	9.98E-09
357	S252Y	S434R	A431K				7.69E-10	2.59E-08
358	S252Y	S434R	A431K				7.48E-10	2.83E-08
359	S252Y	S434R	D312A				6.26E-10	2.53E-08
360	S252Y	S434R	D312H				1.09E-09	4.31E-08
361	S252Y	S434R	D312P				1.88E-10	2.07E-08
362	S252Y	S434R	D399M				1.14E-09	4.36E-08
363	S252Y	S434R	D399T				9.23E-10	3.89E-08
364	S252Y	S434R	D401R				7.32E-10	2.44E-08
365	S252Y	S434R	E430I				2.96E-10	2.89E-08
366	S252Y	S434R	E430I				3.22E-10	2.61E-08

[0183]

ID 编号	突变#1	突变#2	突变#3	突变#4	突变#5	突变#6	在 pH6 下的 KD	在 pH7.4 下的 KD
367	S252Y	S434R	G402R				8.85E-10	4.48E-08
368	S252Y	S434R	L314K				1.30E-09	2.56E-08
369	S252Y	S434R	P247L				4.42E-10	2.65E-08
370	S252Y	S434R	Q311H				9.74E-10	3.13E-08
371	S252Y	S434R	Q311K				4.88E-10	1.07E-08
372	S252Y	S434R	Q311M				4.43E-10	2.19E-08
373	S252Y	S434R	Q311R				3.65E-10	1.29E-08
374	S252Y	S434R	Q311Y				7.15E-10	3.03E-08
375	S252Y	S434R	S254V				5.51E-10	3.41E-08
376	S252Y	S434R	T250Q				3.94E-10	2.46E-08
377	S252Y	S434R	T256M				1.55E-09	2.56E-08
378	S252Y	S434R	T403R				8.59E-10	2.58E-08

[0184] 根据如在Kabat中的EU索引对突变体进行编号。NBO＝未观测到结合。ND＝未测定/无数据。

[0185] 表2.生物物理学表征。

[0186]

ID 编号	产率 (mg/L)	SEC%单体	SEC RT (min)	CGE%单体	多反应性	SMAC RT (min)
0	175.15	93.8	11.6	93.47	0.712	
6	49.984	94.55	12.1	92.4	0.264	8.538
16	83.264	95.25	11.6	95.6	0.610	8.285
19	27.968	91.14	12.1	92.55	0.296	9.214
20	34.56	97.11	11.7	91.99	0.291	8.5
88	27.264	95.97	11.6	91.64	0.433	8.328
90	30.464	96.91	11.6	88.95	0.404	8.322
100	63.36	91.93	11.6	93.74	0.944	8.312
128	64.64	96.77	11.6	93.57	0.408	8.331
130	41.792	97.93	11.6	93.02	0.529	8.306
132	0.832	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
133	42.816	96.11	11.8	94.08	0.219	8.547
143	154.98	94.75	11.6	93.31	0.707	
170	79.536	98.5	11.64		0.637	
170	44.8	98.08	11.68	94.27	N/A	
172	49.2	96.54	11.79		0.601	
172	29.696	98.5	11.84	94.28	N/A	
174	4.608	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
174	9.536	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
175	0.704	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
175	2.048	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
177	38.4	92.99	12.18	94.73	0.450	

[0187]

ID 编号	产率 (mg/L)	SEC%单体	SEC RT (min)	CGE%单体	多反应性	SMAC RT (min)
178	14.336	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
178	73.984	98.24	13.12	94.5	0.455	
179	54.66	97.99	11.59		0.677	
179	54.784	99.05	11.6	94.28	N/A	
180	3.264	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
180	3.456	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
181	67.26	97.09	11.61		0.536	
181	25.536	98.3	11.63	95.54	N/A	
182	45.568	97.5	11.86		0.269	
182	44.608	98.94	11.86	95.2	N/A	
183	2.88	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
183	6.592	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
184	79.3	95.47	11.87		0.736	
184	37.76	97.63	11.9	95.02	N/A	
185	7.2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
185	60.096	98.4	12.05	95.62	0.426	
186	115.38	95.85	11.63	94.26	0.735	
186	5.504	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
187	9.24	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
187	41.6	85.19	11.65	95.21	0.549	
188	40.384	94.23	11.7	93.22	0.187	8.313
188	18.112	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
188	36.544	98.5	11.64	95.52	0.372	
189	9.28	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
189	43.456	98.9	11.98	94.93	0.421	
190	9.9	96.93	11.8		N/A	
190	63.104	98.24	11.77	95.62	N/A	
193	85.1	96.03	12.03		0.773	
193	68.672	98.57	12.06	94.92	N/A	
194	98.56	97.28	11.91		0.723	
194	31.68	99.11	11.95	94.88	N/A	
195	51.2	89.02	13.1	95.28	0.729	
195	1.28	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
196	11.584	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
196	6.336	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
199	11.2	N/A	N/A		N/A	
199	7.232	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
200	23.744	N/A	N/A	93.56	N/A	
200	11.136	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
201	156.736	96.47	11.86		0.552	

[0188]

ID 编号	产率 (mg/L)	SEC%单体	SEC RT (min)	CGE%单体	多反应性	SMAC RT (min)
201	7.808	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
202	16.704	N/A	N/A	93.15	N/A	
202	32.704	97.26	11.85	95.18	0.492	
203	20.48	N/A	N/A	91.26	N/A	
203	11.776	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
204	9.408	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
204	16.448	N/A	N/A	93.68	N/A	
206	0.448	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
207	65.984	97.9	11.6	95.68	0.905	8.271
208	41.344	98.71	11.6	95.68	1.000	8.311
209	27.968	97.74	11.7	92.98	0.557	8.434
210	65.728	96.76	11.7	92.64	0.728	8.44
211	42.368	97.7	11.6	95.18	0.918	8.275
213	28.48	95.2	11.8	90.61	0.721	8.512
214	39.232	96.94	12.3	92.13	0.353	10.394
215	46.2	96.8	11.6	93.3	0.596	
216	140.952	95.85	11.6	95.28	0.642	
217	144.15	97.44	11.6	95.29	0.529	
218	132.308	95.19	11.8	94.44	0.365	
220	191.464	96.59	11.6	93.61	0.488	
222	45.42	97.3	11.8	91.82	0.191	
224	29.952	91.18	12.2	91.02	0.480	8.584
226	73.92	95.79	11.6	84.17	0.148	
227	42.816	75.37	12.8	93.28	0.713	8.917
228	31.168	91.76	11.7	91.69	0.589	8.483
229	66.112	96.04	12.1	91.2	0.162	
231	86.4	97.34	11.6	91.95	0.203	
232	35.648	89.81	13	91.21	0.254	
233	82.56	96.8	11.6	91.63	0.115	
234	40.14	95.52	11.6	92.46	0.317	
238	110.72	95.17	11.6	92.25	0.465	
239	194.112	96.79	11.6	94.92	0.888	
241	235.328	94.51	11.8	94.72	0.549	
243	2.688	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
245	48.64	96.14	11.6	93	0.197	
246	2.88	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
247	21.312	N/A	N/A	95.4	N/A	N/A
248	37.62	97.44	11.6	91.91	0.313	
249	167.832	96.69	11.6	93.31	0.410	
250	140.096	95.88	11.8	92.63	0.385	

[0189]

ID 编号	产率 (mg/L)	SEC%单体	SEC RT (min)	CGE%单体	多反应性	SMAC RT (min)
251	138.81	95.62	11.7	91.26	0.333	
252	72.768	93.2	12.2	92.86	0.683	8.561
253	80.384	95.81	11.7	91.9	0.259	
255	123.264	85.91	11.6	92.57	0.415	
256	20.672	N/A	N/A	92.46	N/A	N/A
257	47.936	95.97	11.7	93.72	0.243	8.471
266	111.42	98.34	12	95.15	0.435	
267	155.712	96.78	13.5	94.98	0.716	
268	20.9	N/A	N/A	94.52	N/A	
270	108.16	77.05	16.5	94.75	0.330	
271	105.12	97.25	11.9	94.77	0.396	
272	154.02	98.33	12.1	83.24	0.590	
273	114.05	89.38	13.7	88.03	0.530	
274	19.712	N/A	N/A	76.99	0.405	
276	113.45	98.35	11.8	85.09	0.562	
277	77.16	79.69	13.1	81.63	0.253	
278	126.85	53.21	16.6	86.53	0.448	
279	134.1	97.67	11.7	82.4	0.594	
280	119.424	98.8	12	88.95	0.355	
281	45.568	98.14	11.7	94.28	0.786	
282	31.04	99.29	11.8	93.67	0.829	
284	74.58	98.73	12	94.41	0.643	
285	61.8	95.96	12	92.86	0.424	
286	2.176	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
288	135.488	97.87	11.7	94.6	0.733	
289	63.36	97.42	11.7	93.84	0.217	
290	56.704	98.83	11.9	94.1	0.394	
294	146.64	98.83	11.9	94.71	0.731	
296	26.368	99.37	13.3	92.88	0.180	

[0190] 对于特异性突变编号，是指表1中的对应ID编号。SEC＝尺寸排阻色谱法;CGE＝毛细管凝胶电泳;RT＝滞留时间;SMAC＝自立单层吸收色谱法。

[0191] 关于生物物理学表征的数据显示，多个突变呈现尤其关于多反应性的改进的生物物理学特性。

[0192] 表3.表1及2中的突变的密码子。

[0193]

	按照 EU 编号系统的突变						密码子使用					
ID 编号	突变#1	突变#2	突变#3	突变#4	突变 #5	突变 #6	突变#1	突变 #2	突变 #3	突变 #4	突变 #5	突变 #6
0	WT											
	缓冲剂											
1	S252R						CGG					

[0194]

	按照 EU 编号系统的突变						密码子使用					
ID 编号	突变#1	突变#2	突变#3	突变#4	突变 #5	突变 #6	突变#1	突变 #2	突变 #3	突变 #4	突变 #5	突变 #6
2	S434A						GCT					
3	S434C						TGT					
4	S434D						GAT					
5	S434E						GAA					
6	S434F						TTC					
7	S434G						GGT					
8	S434H						CAT					
9	S434I						ATT					
10	S434K						AAA					
11	S434L						CTG					
12	S434M						ATG					
13	S434N						AAC					
14	S434P						CCC					
15	S434Q						CAA					
16	S434R						AGG					
17	S434T						ACT					
18	S434V						GTT					
19	S434W						TGG					
20	S434Y						TAC					
21	D312A						GCC					
22	D312H						CAC					
23	D312K						AAG					
24	D312R						AGG					
25	D399M						ATG					
26	D399T						ACC					
27	D399V						GTG					
28	D401R						AGG					
29	G402R						AGG					
30	L309G						GGC					
31	L309I						ATC					
32	Q311F						TTC					
33	Q311H						CAC					
34	Q311I						ATC					
35	Q311K						AAG					
36	Q311L						CTG					
37	Q311M						ATG					
38	Q311R						AGG					
39	T403R						AGG					
40	Y404Q						CAG					
41	A431Q						CAA					
42	A431R						CGT					
43	A431V						GTT					
44	D249A						GCT					
45	D249E						GAA					

[0195]

	按照 EU 编号系统的突变						密码子使用					
ID 编号	突变#1	突变#2	突变#3	突变#4	突变 #5	突变 #6	突变#1	突变 #2	突变 #3	突变 #4	突变 #5	突变 #6
46	D249S						AGT					
47	E430I						ATT					
48	E430Q						CAA					
49	H436G						GGT					
50	H436K						AAA					
51	H436M						ATG					
52	H436R						CGT					
53	L432S						AGT					
54	P247I						ATT					
55	P247L						CTG					
56	P247V						GTT					
57	T250E						GAA					
58	T250I						ATT					
59	T250Q						CAG					
60	T250S						AGT					
61	T250V						GTT					
62	T437A						GCT					
63	T437R						CGT					
64	Y285A						GCC					
65	A378C						TGC					
66	A378D						GAC					
67	A378E						GAG					
68	A378F						TTC					
69	A378G						GGC					
70	A378H						CAC					
71	A378I						ATC					
72	A378K						AAG					
73	A378L						CTG					
74	A378M						ATG					
75	A378N						AAC					
76	A378P						CCC					
77	A378Q						CAG					
78	A378R						CGG					
79	A378S						AGC					
80	A378T						ACC					
81	A378V						GTG					
82	A378W						TGG					
83	A378Y						TAC					
84	S252A						GCC					
85	S252C						TGC					
86	S252D						GAC					
87	S252E						GAG					
88	S252F						TTC					
89	S252G						GGC					

[0196]

	按照 EU 编号系统的突变						密码子使用					
ID 编号	突变#1	突变#2	突变#3	突变#4	突变 #5	突变 #6	突变#1	突变 #2	突变 #3	突变 #4	突变 #5	突变 #6
90	S252H						CAC					
91	S252I						ATC					
92	S252K						AAG					
93	S252L						CTG					
94	S252N						AAC					
95	S252P						CCC					
96	S252Q						CAG					
97	S252R	S428L	S434F				CGG	CTG	TTC			
98	S252T						ACC					
99	S252V						GTG					
100	S252Y						TAC					
101	S254A						GCC					
102	S254D						GAC					
103	S254E						GAG					
104	S254F						TTC					
105	S254G						GGC					
106	S254H						CAC					
107	S254K						AAG					
108	S254L						CTG					
109	S254M						ATG					
110	S428A						GCC					
111	S428C						TGC					
112	S428D						GAC					
113	S428E						GAG					
114	S428F						TTC					
115	S428G						GGC					
116	S428H						CAC					
117	S428I						ATC					
118	S428K						AAG					
119	S434Y	S434F					CTG	TTC				
120	S428L	S434Y					CTG	TAC				
121	S428N						AAC					
122	S428P						CCC					
123	S428Q						CAG					
124	S428R						CGG					
125	S428T						ACC					
126	S428V						GTG					
127	S428W						TGG					
128	S428Y						TAC					
129	A431K						AAA					
130	D312P						CCC					
131	H436Y						TAT					
132	L314K						AAG					
133	Q311W						TGG					

[0197]

	按照 EU 编号系统的突变						密码子使用					
ID 编号	突变#1	突变#2	突变#3	突变#4	突变 #5	突变 #6	突变#1	突变 #2	突变 #3	突变 #4	突变 #5	突变 #6
134	Q311Y						TAC					
135	S252F	S434H					TTC	CAT				
136	S252M						ATG					
137	S252R	S434H					CGG	CAT				
138	S252W						TGG					
139	S252Y	S434H					TAC	CAT				
140	S254C						TGC					
141	S254I						ATC					
142	S428L						CTG					
143	S428M						ATG					
144	S254N						AAC					
145	S254P						CCC					
146	S254Q						CAG					
147	S254R						CGG					
148	S254T						ACC					
149	S254V						GTG					
150	S254W						TGG					
151	S254Y						TAC					
152	T256A						GCC					
153	T256C						TGC					
154	T256D						GAC					
155	T256E						GAG					
156	T256F						TTC					
157	T256G						GGC					
158	T256H						CAC					
159	T256I						ATC					
160	T256K						AAG					
161	T256L						CTG					
162	T256M						ATG					
163	T256N						AAC					
164	T256P						CCC					
165	T256Q						CAG					
166	T256R						CGG					
167	T256V						GTG					
168	T256W						TGG					
169	T256Y						TAC					
170	D312P	S434Y					CCC	TAC				
171	L314K	S434Y					AAG	TAC				
172	Q311W	D312P					TGG	CCC				
173	Q311W	D312P	L314K				TGG	CCC	AAG			
174	Q311W	D312P	S434Y				TGG	CCC	TAC			
175	Q311W	L314K					TGG	AAG				
176	Q311W	S434Y					TGG	TAC				
177	S252F	S434F					TTC	TTC				

[0198]

	按照 EU 编号系统的突变						密码子使用					
ID 编号	突变#1	突变#2	突变#3	突变#4	突变 #5	突变 #6	突变#1	突变 #2	突变 #3	突变 #4	突变 #5	突变 #6
178	S252F	S434W					TTC	TGG				
179	S252F	S434Y					TTC	TAC				
180	S252Y	D312P	L314K				TAC	CCC	AAG			
181	S252Y	L314K					TAC	AAG				
182	S252Y	Q311W					TAC	TGG				
183	S252Y	Q311W	D312P				TAC	TGG	CCC			
184	S252Y	Q311W	L314K				TAC	TGG	AAG			
185	S252Y	Q311W	S434Y				TAC	TGG	TAC			
186	S252Y	S428Y					TAC	TAC				
187	S252Y	S428Y	D312P				TAC	TAC	CCC			
188	S252Y	S428Y	L314K				TAC	TAC	AAG			
189	S252Y	S428Y	Q311W				TAC	TAC	TGG			
190	S252Y	S428Y	S434Y				TAC	TAC	TAC			
191	S252Y	S434F					TAC	TTC				
192	S252Y	S434F	Q311W				TAC	TTC	TGG			
193	S252Y	S434H	Q311W				TAC	CAT	TGG			
194	S252Y	S434R	Q311W				TAC	AGG	TGG			
195	S252Y	S434W					TAC	TGG				
196	S252Y	S434W	Q311W				TAC	TGG	TGG			
197	S252Y	S434Y					TAC	TAC				
198	S428Y	D312P	L314K				TAC	CCC	AAG			
199	S428Y	L314K					TAC	AAG				
200	S428Y	L314K	S434Y				TAC	AAG	TAC			
201	S428Y	Q311W					TAC	TGG				
202	S428Y	Q311W	D312P				TAC	TGG	CCC			
203	S428Y	Q311W	L314K				TAC	TGG	AAG			
204	S428Y	S434Y					TAC	TAC				
205	T256S						AGC					
206	D312P	L314K					CCC	AAG				
207	S252F	S434R					TTC	AGG				
208	S252Y	D312P					TAC	CCC				
209	S252Y	D312P	S434Y				TAC	CCC	TAC			
210	S252Y	L314K	S434Y				TAC	AAG	TAC			
211	S252Y	S434R					TAC	AGG				
212	S428Y	D312P					TAC	CCC				
213	S428Y	D312P	S434Y				TAC	CCC	TAC			
214	S428Y	Q311W	S434Y				TAC	TGG	TAC			
215	S252H	S428M	D312P				CAC	ATG	CCC			
216	S252H	D312P					CAC	CCC				
217	S252H	L314K					CAC	AAG				
218	S252H	Q311W					CAC	TGG				
219	S252H	Q311Y					CAC	TAC				
220	S252H	S428M					CAC	ATG				
221	S252H	S428M	D312P				CAC	ATG	CCC			

[0199]

	按照 EU 编号系统的突变						密码子使用					
ID 编号	突变#1	突变#2	突变#3	突变#4	突变 #5	突变 #6	突变#1	突变 #2	突变 #3	突变 #4	突变 #5	突变 #6
222	S252H	S428M	Q311W				CAC	ATG	TGG			
223	S252H	S428M	Q311Y				CAC	ATG	TAC			
224	S252H	S428M,	S434F				CAC	ATG	TTC			
225	S252H	S428M	S434L				CAC	ATG	CTG			
226	S252H	S428M	S434P				CAC	ATG	CCC			
227	S252H	S428M	S434W				CAC	ATG	TGG			
228	S252H	S428M	S434Y				CAC	ATG	TAC			
229	S252H	S434F					CAC	TTC				
230	S252H	S434L					CAC	CTG				
231	S252H	S434P					CAC	CCC				
232	S252H	S434W					CAC	TGG				
233	S252H	S434Y					CAC	TAC				
234	S252M	S428M					ATG	ATG				
235	S252M	S428M	S434N				ATG	ATG	AAC			
236	S252M	S428M	S434N	H436Y			ATG	ATG	AAC	TAT		
237	S252M	S434N					ATG	AAC				
238	S252Y	S428M					TAC	ATG				
239	S252Y	S428M	D312P				TAC	ATG	CCC			
240	S252Y	S428M	L314K				TAC	ATG	AAG			
241	S252Y	S428M	Q311W				TAC	ATG	TGG			
242	S252Y	S428M	Q311Y				TAC	ATG	TAC			
243	S252Y	S428M	S434F				TAC	ATG	TTC			
244	S252Y	S428M	S434L				TAC	ATG	CTG			
245	S252Y	S428M	S434P				TAC	ATG	CCC			
246	S252Y	S428M	S434W				TAC	ATG	TGG			
247	S252Y	S428M	S434Y				TAC	ATG	TAC			
248	S428M	D312P					ATG	CCC				
249	S428M	L314K					ATG	AAG				
250	S428M	Q311W					ATG	TGG				
251	S428M	Q311Y					ATG	TAC				
252	S428M	S434F					ATG	TTC				
253	S428M	S434L					ATG	CTG				
254	S428M	S434N					ATG	AAC				
255	S428M	S434P					ATG	CCC				
256	S428M	S434W					ATG	TGG				
257	S428M	S434Y					ATG	TAC				
258	WT 2											
259	S428L						CTG					
260	S252Y	S254T	T256E				TAC					
261	WT 3											
262	S428L						CTG					
263	S252Y	S254T	T256E				TAC					
264	D312P	L314K	S434Y				CCC	AAG	TAC			
265	Q311W	D312P	L314K	S434Y			TGG	CCC	AAG	TAC		

[0200]

	按照 EU 编号系统的突变						密码子使用					
ID 编号	突变#1	突变#2	突变#3	突变#4	突变 #5	突变 #6	突变#1	突变 #2	突变 #3	突变 #4	突变 #5	突变 #6
266	Q311W	L314K	S434Y				TGG	AAG	TAC			
267	S252F	S434F	Q311W				TTC	TTC	TGG			
268	S252F	S434H	Q311W				TTC	CAT	TGG			
269	S252F	S434R	Q311W				TTC	AGG	TGG			
270	S252F	S434W	Q311W				TTC	TGG	TGG			
271	S252F	S434Y	Q311W				TTC	TAC	TGG			
272	S252R	S434F					CGG	TTC				
273	S252R	S434F	Q311W				CGG	TTC	TGG			
274	S252R	S434H	Q311W				CGG	CAT	TGG			
275	S252R	S434R					CGG	AGG				
276	S252R	S434R	Q311W				CGG	AGG	TGG			
277	S252R	S434W					CGG	TGG				
278	S252R	S434H	Q311W				CGG	CAT	TGG			
279	S252R	S434Y					CGG	TAC				
280	S252R	S434Y	Q311W				CGG	TAC	TGG			
281	S252Y	D312P	L314K	S434Y			TAC	CCC	AAG	TAC		
282	S252Y	Q311W	D312P	L314K			TAC	TGG	CCC	AAG		
283	S252Y	Q311W	D312P	L314K	S434Y		TAC	TGG	CCC	AAG	TAC	
284	S252Y	Q311W	D312P	S434Y			TAC	TGG	CCC	TAC		
285	S252Y	Q311W	L314K	S434Y			TAC	TGG	AAG	TAC		
286	S252Y	S428Y	D312P	L314K			TAC	TAC	CCC	AAG		
287	S252Y	S428Y	D312P	L314K	S434Y		TAC	TAC	CCC	AAG	TAC	
288	S252Y	S428Y	D312P	S434Y			TAC	TAC	CCC	TAC		
289	S252Y	S428Y	L314K	S434Y			TAC	TAC	AAG	TAC		
290	S252Y	S428Y	Q311W	D312P			TAC	TAC	TGG	CCC		
291	S252Y	S428Y	Q311W	D312P	L314K		TAC	TAC	TGG	CCC	AAG	
292	S252Y	S428Y	Q311W	D312P	L314K	S434Y	TAC	TAC	TGG	CCC	AAG	TAC
293	S252Y	S428Y	Q311W	D312P	S434Y		TAC	TAC	TGG	CCC	TAC	
294	S252Y	S428Y	Q311W	L314K			TAC	TAC	TGG	AAG		
295	S252Y	S428Y	Q311W	L314K	S434Y		TAC	TAC	TGG	AAG	TAC	
296	S252Y	S428Y	Q311W	S434Y			TAC	TAC	TGG	TAC		
297	S428Y	D312P	L314K	S434Y			TAC	CCC	AAG	TAC		
298	S428Y	Q311W	D312P	L314K			TAC	TGG	CCC	AAG		
299	S428Y	Q311W	D312P	L314K	S434Y		TAC	TGG	CCC	AAG	TAC	
300	S428Y	Q311W	D312P	S434Y			TAC	TGG	CCC	TAC		
301	S428Y	Q311W	L314K	S434Y			TAC	TGG	AAG	TAC		
302	A431K	S434P					AAA	CCC				
303	A431K	S434Y					AAA	TAC				
304	D399M	D401R					ATG	AGG				
305	D399M	D401R	T403R				ATG	AGG	AGG			
306	D399M	T403R					ATG	AGG				
307	D401R	T403R					AGG	AGG				
308	P247V	S252H					GTT	CAC				
309	P247V	T250Q					GTT	CAG				

[0201]

	按照 EU 编号系统的突变						密码子使用					
ID 编号	突变#1	突变#2	突变#3	突变#4	突变 #5	突变 #6	突变#1	突变 #2	突变 #3	突变 #4	突变 #5	突变 #6
310	P247V	T250Q	S252H				GTT	CAG	CAC			
311	Q311H	D312P	L314K				CAC	CCC	AAG			
312	Q311K	D312P	L314K				AAG	CCC	AAG			
313	Q311M	D312P	L314K				ATG	CCC	AAG			
314	Q311R	D312P	L314K				AGG	CCC	AAG			
315	Q311Y	D312P	L314K				TAC	CCC	AAG			
316	S428M	A431K					ATG	AAA				
317	S428M	A431K	S434P				ATG	AAA	CCC			
318	S428M	A431K	S434Y				ATG	AAA	TAC			
319	S428Y	D312P	A431K	S434P			TAC	CCC	AAA	CCC		
320	S428Y	D312P	S434P				TAC	CCC	CCC			
321	S428Y	D312P	S434Y	A431K			TAC	CCC	TAC	AAA		
322	S428Y	D312P	S434Y	D399M	D401R		TAC	CCC	TAC	ATG	AGG	
323	S428Y	D312P	S434Y	D399M	D401R	T403R	TAC	CCC	TAC	ATG	AGG	AGG
324	S428Y	D312P	S434Y	D399M	T403R		TAC	CCC	TAC	ATG	AGG	
325	S428Y	D312P	S434Y	D401R	T403R		TAC	CCC	TAC	AGG	AGG	
326	S428Y	D312P	S434Y	P247V	S252H		TAC	CCC	TAC	GTT	CAC	
327	S428Y	D312P	S434Y	P247V	T250Q		TAC	CCC	TAC	GTT	CAG	
328	S428Y	D312P	S434Y	P247V	T250Q	S252H	TAC	CCC	TAC	GTT	CAG	CAC
329	S428Y	D312P	S434Y	Q311H	L314K		TAC	CCC	TAC	CAC	AAG	
330	S428Y	D312P	S434Y	Q311K	L314K		TAC	CCC	TAC	AAG	AAG	
331	S428Y	D312P	S434Y	Q311M	L314K		TAC	CCC	TAC	ATG	AAG	
332	S428Y	D312P	S434Y	Q311R	L314K		TAC	CCC	TAC	AGG	AAG	
333	S428Y	D312P	S434Y	Q311Y	L314K		TAC	CCC	TAC	TAC	AAG	
334	S428Y	D312P	S434Y	T250Q	S252H		TAC	CCC	TAC	CAG	CAC	
335	T250Q	S252H					CAG	CAC				
336	S252Y	S428M	S434F	A431K			TAC	ATG	TTC	AAA		
337	S252Y	S428M	S434F	D312H			TAC	ATG	TTC	CAC		
338	S252Y	S428M	S434F	D399T			TAC	ATG	TTC	ACC		
339	S252Y	S428M	S434F	P247L			TAC	ATG	TTC	CTG		
340	S252Y	S428M	S434F	Q311R			TAC	ATG	TTC	AGG		
341	S252Y	S428M	S434F	D312A			TAC	ATG	TTC	GCC		
342	S252Y	S428M	S434F	D312P			TAC	ATG	TTC	CCC		
343	S252Y	S428M	S434F	D399M			TAC	ATG	TTC	ATG		
344	S252Y	S428M	S434F	D401R			TAC	ATG	TTC	AGG		
345	S252Y	S428M	S434F	E430I			TAC	ATG	TTC	ATT		
346	S252Y	S428M	S434F	G402R			TAC	ATG	TTC	AGG		
347	S252Y	S428M	S434F	L314K			TAC	ATG	TTC	AAG		
348	S252Y	S428M	S434F	Q311H			TAC	ATG	TTC	CAC		
349	S252Y	S428M	S434F	Q311K			TAC	ATG	TTC	AAG		
350	S252Y	S428M	S434F	Q311M			TAC	ATG	TTC	ATG		
351	S252Y	S428M	S434F	Q311 W			TAC	ATG	TTC	TGG		
352	S252Y	S428M	S434F	Q311Y			TAC	ATG	TTC	TAC		

[0202]

	按照 EU 编号系统的突变						密码子使用					
ID 编号	突变#1	突变#2	突变#3	突变#4	突变 #5	突变 #6	突变#1	突变 #2	突变 #3	突变 #4	突变 #5	突变 #6
353	S252Y	S428M	S434F	S254V			TAC	ATG	TTC	GTG		
354	S252Y	S428M	S434F	T250Q			TAC	ATG	TTC	CAG		
355	S252Y	S428M	S434F	T256M			TAC	ATG	TTC	ATG		
356	S252Y	S428M	S434F	T403R			TAC	ATG	TTC	AGG		
357	S252Y	S434R	A431K				TAC	AGG	AAA			
358	S252Y	S434R	A431K				TAC	AGG	AAA			
359	S252Y	S434R	D312A				TAC	AGG	GCC			
360	S252Y	S434R	D312H				TAC	AGG	CAC			
361	S252Y	S434R	D312P				TAC	AGG	CCC			
362	S252Y	S434R	D399M				TAC	AGG	ATG			
363	S252Y	S434R	D399T				TAC	AGG	ACC			
364	S252Y	S434R	D401R				TAC	AGG	AGG			
365	S252Y	S434R	E430I				TAC	AGG	ATT			
366	S252Y	S434R	E430I				TAC	AGG	ATT			
367	S252Y	S434R	G402R				TAC	AGG	AGG			
368	S252Y	S434R	L314K				TAC	AGG	AAG			
369	S252Y	S434R	P247L				TAC	AGG	CTG			
370	S252Y	S434R	Q311H				TAC	AGG	CAC			
371	S252Y	S434R	Q311K				TAC	AGG	AAG			
372	S252Y	S434R	Q311M				TAC	AGG	ATG			
373	S252Y	S434R	Q311R				TAC	AGG	AGG			
374	S252Y	S434R	Q311Y				TAC	AGG	TAC			
375	S252Y	S434R	S254V				TAC	AGG	GTG			
376	S252Y	S434R	T250Q				TAC	AGG	CAG			
377	S252Y	S434R	T256M				TAC	AGG	ATG			
378	S252Y	S434R	T403R				TAC	AGG	AGG			

[0203] 表4.突变体对FcRn结合亲和力的影响。

[0204]

按照 Eu 编号系统的突变				猫 FcRn 结合亲和力		密码子使用			
突变#1	突变#2	突变#3	突变#4	在 pH6 下的 KD	在 pH7.4 下的 KD	突变#1	突变#2	突变#3	突变#4
	S428L	S252H		5.94E-09	LS		CTG	CAC	
	S428L	S252Y		4.88E-09	LS		CTG	TAC	
	S428L	S252F		6.52E-09	LS		CTG	TTC	
	S428L	S252W		6.14E-09	LS		CTG	TGG	
Q311Y	S428L			5.72E-09	LS	TAC	CTG		
Q311W	S428L			8.08E-09	LS	TGG	CTG		
Q311H	S428L			7.19E-09	LS	CAC	CTG		
Q311K	S428L			5.62E-09	LS	AAG	CTG		
Q311L	S428L			6.03E-09	LS	CTG	CTG		
Q311M	S428L			6.44E-09	LS	ATG	CTG		

[0205]

按照 Eu 编号系统的突变				猫 FcRn 结合亲和力		密码子使用			
突变#1	突变#2	突变#3	突变#4	在 pH6 下的 KD	在 pH7.4 下的 KD	突变#1	突变#2	突变#3	突变#4
Q311R	S428L			5.47E-09	LS	CGG	CTG		
	S428L		S434Y	9.33E-10	2.22E-08		CTG		TAC
	S428L		S434R	4.66E-09	LS		CTG		CGG
	S428L		S434H	2.58E-09	4.39E-08		CTG		CAC
	S428L		S434F	1.39E-09	4.64E-08		CTG		TTC
	S428L		S434W	1.02E-09	4.18E-08		CTG		TGG
	S428M	S252H		6.83E-09	NBO		ATG	CAC	
	S428M	S252Y		5.12E-09	1.24E-07		ATG	TAC	
	S428M	S252F		5.90E-09	LS		ATG	TTC	
	S428M	S252W		4.65E-09	LS		ATG	TGG	
Q311Y	S428M			5.73E-09	LS	TAC	ATG		
Q311W	S428M			6.51E-09	LS	TGG	ATG		
Q311H	S428M			6.58E-09	LS	CAC	ATG		
Q311K	S428M			6.16E-09	LS	AAG	ATG		
Q311L	S428M			5.70E-09	LS	CTG	ATG		
Q311M	S428M			5.66E-09	LS	ATG	ATG		
Q311R	S428M			5.28E-09	LS	CGG	ATG		
	S428M		S434Y	8.88E-10	2.52E-08		ATG		TAC
	S428M		S434R	5.46E-09	LS		ATG		CGG
	S428M		S434H	3.09E-09	LS		ATG		CAC
	S428M		S434F	1.21E-09	3.82E-08		ATG		TTC
	S428M		S434W	9.37E-10	2.53E-08		ATG		TGG
	S428Y	S252H		6.41E-09	LS		TAC	CAC	
	S428Y	S252Y		8.58E-09	LS		TAC	TAC	
	S428Y	S252F		6.62E-09	LS		TAC	TTC	
	S428Y	S252W		2.95E-09	LS		TAC	TGG	
Q311Y	S428Y			5.57E-09	LS	TAC	TAC		
Q311W	S428Y			6.35E-09	LS	TGG	TAC		
Q311H	S428Y			6.92E-09	LS	CAC	TAC		
Q311K	S428Y			3.31E-09	3.59E-08	AAG	TAC		
Q311L	S428Y			4.74E-09	LS	CTG	TAC		
Q311M	S428Y			5.72E-09	LS	ATG	TAC		
Q311R	S428Y			4.81E-09	LS	CGG	TAC		
	S428Y		S434Y	1.12E-09	2.41E-08		TAC		TAC
	S428Y		S434R	3.85E-09	LS		TAC		CGG
	S428Y		S434H	2.27E-09	LS		TAC		CAC

[0206]

按照 Eu 编号系统的突变				猫 FcRn 结合亲和力		密码子使用			
突变#1	突变#2	突变#3	突变#4	在 pH6 下的 KD	在 pH7.4 下的 KD	突变#1	突变#2	突变#3	突变#4
	S428Y		S434F	1.57E-09	3.97E-08		TAC		TTC
	S428Y		S434W	1.39E-09	2.41E-08		TAC		TGG

[0207] LS＝低信号。NBO＝未观测到结合。

[0208] 结果明确显示，在各种位置处形成的突变对于IgG对FcRn的亲和力具有明显影响。

[0209] 实例3

[0210] 猫中的Fc突变IgG PK研究

[0211] 进行药物动力学(PK)研究以展示各种猫IgG点突变(1)S428L；(2)S252H、S428M；(3)S252Y、S428M；(4)S428M、Q311W；及(5)S428Y、Q311W的半衰期延长的效果。

[0212] 将表4中所列出的五个Fc经修饰猫单克隆抗体以及野生型猫单克隆抗体用于实验中。以单次1mg/kg皮下投药向3只猫给予各分子。在给药前、第7天、第14天、第28天、第42天及第56天从动物收集血清样品。使用配位体结合法评定各单克隆抗体的暴露。

[0213] 使用非隔室途径(用于AUC计算的线性梯形法则)借助于Watson™在猫中评估五个Fc经修饰猫单克隆抗体的药物动力学特征。通过Excel™执行额外计算，包含校正在第2次及第3次注射药物之后的浓度-时间特征曲线的重叠的AUC。使用Excel™或Watson™来计算简单统计(平均值、标准差、变异系数)下浓度-时间数据及药物动力学数据的概述。不进行其它统计分析。

[0214] 结果概述于以下表4中。

[0215] 表4.突变对增加半衰期的影响。

[0216]

突变	mAb (1mg/kg)	AUC 微克*天/毫升	外推 AUC 微克*天/毫升	Cmax μg/mL	Tmax 天	T1/2 天
S428L	ZTS515	545±75	782±161	14.6±0.2	7	28.7±4.0
S252H, S428M	ZTS520	493±72	698±158	16.0±1.3	7	29.4±6.7
S252Y, S428M	ZTS524	445±28	780±52	11.2±1.3	7	41.6±2.5
S428M, Q311W	ZTS530	473±115	695±221	13.1±3.6	9.3±4.0	30.4±6.3
S428Y, Q311W	ZTS534	447±149	643±300	14.1±2.0	7	27.2±12.2

[0217] ZTS515、ZTS520、ZTS524、ZTS530及ZTS534是指Fc经修饰猫类化抗IL31抗体。本文中所论述的ZTS5864为野生型猫类化抗IL31抗体。抗IL31抗体为所属领域中熟知的。参见例如美国专利10,526,405；10,421,807；9,206,253；8,790,651。

[0218] 野生型mAb ZTS5864的半衰期($T_{1/2}$)为12.4±2.2天。然而，Fc经修饰猫单克隆抗体ZTS515、ZTS520、ZTS524、ZTS530及ZTS534的半衰期($T_{1/2}$)分别为28.7±4.0、29.4±6.7、41.6±2.5、30.4±6.3及27.2±12.2。

[0219] 结果明确显示，猫IgG点突变(1)S428L；(2)S252H、S428M；(3)S252Y、S428M；(4)S428M、Q311W；及(5)S428Y、Q311W高效增加家猫中的半衰期。

[0220] 已描述本发明的优选实施例，应理解，本发明不限于确切实施例，且各种变化及修改可由所属领域的技术人员在不脱离如所附权利要求书中所定义的本发明的范围或精神的情况下在本文中实现。

序列表

<110> 硕腾服务有限责任公司

<120> 猫抗体恒定区中的突变

<130> ZP000370A

<160> 18

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 335
<212> PRT
<213> 家猫

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> 猫 IgG1a 野生型恒定区

<400> 1

[0001]

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

Thr Thr Ser Gly Ala Thr Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Leu Gly 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 Ala Ser Gly Leu Tyr Ser
    50                  55                  60

Leu Ser Ser Met Val Thr Val Pro Ser Ser Arg Trp Leu Ser Asp Thr
65                  70                  75                  80

Phe Thr Cys Asn Val Ala His Pro Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95
```

Thr Val Arg Lys Thr Asp His Pro Pro Gly Pro Lys Pro Cys Asp Cys
100 105 110

Pro Lys Cys Pro Pro Pro Glu Met Leu Gly Gly Pro Ser Ile Phe Ile
115 120 125

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Ser Ile Ser Arg Thr Pro Glu
130 135 140

Val Thr Cys Leu Val Val Asp Leu Gly Pro Asp Asp Ser Asp Val Gln
145 150 155 160

Ile Thr Trp Phe Val Asp Asn Thr Gln Val Tyr Thr Ala Lys Thr Ser
165 170 175

[0002]

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
180 185 190

Pro Ile Leu His Gln Asp Trp Leu Lys Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys
195 200 205

Val Asn Ser Lys Ser Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys
210 215 220

Ala Lys Gly Gln Pro His Glu Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Ala
225 230 235 240

Gln Glu Glu Leu Ser Arg Asn Lys Val Ser Val Thr Cys Leu Ile Lys
245 250 255

Ser Phe His Pro Pro Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ile Thr Gly Gln
260 265 270

Pro Glu Pro Glu Asn Asn Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp Ser
275 280 285

Asp Gly Thr Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Arg Ser His
290 295 300

Trp Gln Arg Gly Asn Thr Tyr Thr Cys Ser Val Ser His Glu Ala Leu
305 310 315 320

His Ser His His Thr Gln Lys Ser Leu Thr Gln Ser Pro Gly Lys
325 330 335

<210> 2
<211> 657
<212> DNA
<213> 家猫

[0003]

<220>
<221> misc_feature
<223> 猫Fc IgG1a野生型恒定区

<400> 2
ccccctgaga tgcttggagg accgtccatc ttcatcttcc ccccaaaacc caaggacacc 60

ctctcgattt cccggacgcc cgaggtcaca tgcttggtgg tggacttggg cccagatgac 120

tccgatgtcc agatcacatg gtttgtggat aacacccagg tgtacacagc caagacgagt 180

ccgcgtgagg agcagttcaa cagcacctac cgtgtggtca gtgtcctccc catcctacac 240

caggactggc tcaaggggaa ggagttcaag tgcaaggtca acagcaaatc cctcccctcc 300

cccatcgaga ggaccatctc caaggccaaa ggacagcccc acgagcccca ggtgtacgtc 360

ctgcctccag cccaggagga gctcagcagg aacaaagtca gtgtgacctg cctgatcaaa 420

tccttccacc cgcctgacat tgccgtcgag tgggagatca ccggacagcc ggagccagag 480

aacaactacc ggacgacccc gccccagctg gacagcgacg ggacctactt cgtgtacagc 540

aagctctcgg tggacaggtc ccactggcag aggggaaaca cctacacctg ctcggtgtca 600

cacgaagctc tgcacagcca ccacacacag aaatccctca cccagtctcc gggtaaa 657

<210> 3
<211> 335
<212> PRT
<213> 家猫

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> 猫 IgG1b 野生型恒定区

<400> 3

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

Thr Thr Ser Gly Ala Thr Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Leu Gly Tyr
20 25 30

[0004]

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 Ala Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Met Val Thr Val Pro Ser Ser Arg Trp Leu Ser Asp Thr
65 70 75 80

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

Thr Val Arg Lys Thr Asp His Pro Pro Gly Pro Lys Pro Cys Asp Cys
100 105 110

Pro Lys Cys Pro Pro Pro Glu Met Leu Gly Gly Pro Ser Ile Phe Ile
115 120 125

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Ser Ile Ser Arg Thr Pro Glu
130 135 140

Val Thr Cys Leu Val Val Asp Leu Gly Pro Asp Asp Ser Asp Val Gln
145 150 155 160

Ile Thr Trp Phe Val Asp Asn Thr Gln Val Tyr Thr Ala Lys Thr Ser
165 170 175

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
180 185 190

Pro Ile Leu His Gln Asp Trp Leu Lys Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys
195 200 205

[0005]

Val Asn Ser Lys Ser Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys
210 215 220

Asp Lys Gly Gln Pro His Glu Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Ala
225 230 235 240

Gln Glu Glu Leu Ser Arg Asn Lys Val Ser Val Thr Cys Leu Ile Glu
245 250 255

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ile Thr Gly Gln
260 265 270

Pro Glu Pro Glu Asn Asn Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp Ser
275 280 285

Asp Gly Thr Tyr Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Ser Val Asp Arg Ser Arg
290 295 300

Trp Gln Arg Gly Asn Thr Tyr Thr Cys Ser Val Ser His Glu Ala Leu
305 310 315 320

His Ser His His Thr Gln Lys Ser Leu Thr Gln Ser Pro Gly Lys
325 330 335

<210> 4
<211> 335
<212> PRT
<213> 家猫

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> 猫 IgG2 野生型恒定区

<400> 4

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

[0006]

Thr Thr Ser Gly Ala Thr Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Leu Gly 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 Ser Val Leu Gln Ala Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Met Val Thr Val Pro Ser Ser Arg Trp Leu Ser Asp Thr
65 70 75 80

Phe Thr Cys Asn Val Ala His Arg Pro Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val Pro Lys Thr Ala Ser Thr Ile Glu Ser Lys Thr Gly Glu Gly
100 105 110

Pro Lys Cys Pro Val Pro Glu Ile Pro Gly Ala Pro Ser Val Phe Ile
115 120 125

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Ser Ile Ser Arg Thr Pro Glu
130 135 140

Val Thr Cys Leu Val Val Asp Leu Gly Pro Asp Asp Ser Asn Val Gln
145 150 155 160

Ile Thr Trp Phe Val Asp Asn Thr Glu Met His Thr Ala Lys Thr Arg
165 170 175

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
180 185 190

[0007]

Pro Ile Leu His Gln Asp Trp Leu Lys Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys
195 200 205

Val Asn Ser Lys Ser Leu Pro Ser Ala Met Glu Arg Thr Ile Ser Lys
210 215 220

Ala Lys Gly Gln Pro His Glu Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Thr
225 230 235 240

Gln Glu Glu Leu Ser Glu Asn Lys Val Ser Val Thr Cys Leu Ile Lys
245 250 255

Gly Phe His Pro Pro Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ile Thr Gly Gln
260 265 270

Pro Glu Pro Glu Asn Asn Tyr Gln Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp Ser
275 280 285

Asp Gly Thr Tyr Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Ser Val Asp Arg Ser His
290 295 300

Trp Gln Arg Gly Asn Thr Tyr Thr Cys Ser Val Ser His Glu Ala Leu
305 310 315 320

His Ser His His Thr Gln Lys Ser Leu Thr Gln Ser Pro Gly Lys
325 330 335

<210> 5
<211> 335
<212> PRT
<213> 家猫

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> 猫 IgG2_铰链突变恒定区

[0008]

<400> 5

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

Thr Thr Ser Gly Ala Thr Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Leu Gly 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 Ser Val Leu Gln Ala Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Met Val Thr Val Pro Ser Ser Arg Trp Leu Ser Asp Thr
65 70 75 80

Phe Thr Cys Asn Val Ala His Arg Pro Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val Pro Lys Thr Ala Ser Thr Ile Glu Ser Lys Thr Gly Cys Gly
100 105 110

Cys Lys Cys Pro Val Pro Glu Ile Pro Gly Ala Pro Ser Val Phe Ile
115 120 125

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Ser Ile Ser Arg Thr Pro Glu
130 135 140

Val Thr Cys Leu Val Val Asp Leu Gly Pro Asp Asp Ser Asn Val Gln
145 150 155 160

Ile Thr Trp Phe Val Asp Asn Thr Glu Met His Thr Ala Lys Thr Arg
165 170 175

[0009]

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
180 185 190

Pro Ile Leu His Gln Asp Trp Leu Lys Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys
195 200 205

Val Asn Ser Lys Ser Leu Pro Ser Ala Met Glu Arg Thr Ile Ser Lys
210 215 220

Ala Lys Gly Gln Pro His Glu Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Thr
225 230 235 240

Gln Glu Glu Leu Ser Glu Asn Lys Val Ser Val Thr Cys Leu Ile Lys
245 250 255

Gly Phe His Pro Pro Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ile Thr Gly Gln
260 265 270

Pro Glu Pro Glu Asn Asn Tyr Gln Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp Ser
275 280 285

Asp Gly Thr Tyr Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Ser Val Asp Arg Ser His
290 295 300

Trp Gln Arg Gly Asn Thr Tyr Thr Cys Ser Val Ser His Glu Ala Leu
305 310 315 320

His Ser His His Thr Gln Lys Ser Leu Thr Gln Ser Pro Gly Lys
325 330 335

<210> 6
<211> 330
<212> PRT
<213> 智人

[0010]

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> 人类 IgG1 恒定区

<400> 6

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
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 Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

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

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

[0011]

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

[0012]

<210> 7
<211> 1005
<212> DNA
<213> 家猫

<220>
<221> misc_feature
<223> 猫 IgG1b 野生型恒定区

<400> 7
gcctccacca cggccccatc ggtgttccca ctggccccca gctgcgggac cacatctggc 60

gccaccgtgg ccctggcctg cctggtgtta ggctacttcc ctgagccggt gaccgtgtcc 120

tggaactccg gcgccctgac cagcggtgtg cacaccttcc cggccgtcct gcaggcctcg 180

gggctgtact ctctcagcag catggtgaca gtgccctcca gcaggtggct cagtgacacc 240

ttcacctgca acgtggccca cccgcccagc aacaccaagg tggacaagac cgtgcgcaaa 300

acagaccacc caccgggacc caaaccctgc gactgtccca aatgcccacc ccctgagatg 360

cttggaggac cgtccatctt catctttccc ccaaaaccca aggacaccct ctcgatttcc 420

cggacgcccg aggtcacatg cttggtggtg gacttgggcc cagatgactc cgatgtccag 480

atcacatggt ttgtggataa cacccaggtg tacacagcca agacgagtcc gcgtgaggag 540

cagttcaaca gcacctaccg tgtggtcagt gtcctcccca tcctgcacca ggactggctc 600

aaggggaagg agttcaagtg caaggtcaac agcaaatccc tcccctcccc catcgagagg 660

accatctcca aggacaaagg acagccccac gagccccagg tgtacgtcct gcctccagcc 720

caggaggagc tcagcaggaa caaagtcagt gtgacctgcc tgatcgaagg cttctacccg 780

tctgacattg ccgtcgagtg ggagatcacc ggacagccgg agccagagaa caactaccgg 840

acgaccccgc cccagctgga cagcgacggg acctacttcc tgtacagcag gctctcggtg 900

gacaggtccc gctggcagag gggaaacacc tacacctgct cggtgtcaca cgaagctctg 960

cacagccacc acacacagaa atccctcacc cagtctccgg gtaaa 1005

<210> 8
<211> 1005
<212> DNA
[0013] <213> 家猫

<220>
<221> misc_feature
<223> 猫 IgG2 野生型恒定区

<400> 8
gcctccacca cggcctcatc ggtgttccca ctggccccca gctgcgggac cacatctggc 60

gccaccgtgg ccctggcctg cctggtgtta ggctacttcc ctgagccggt gaccgtgtcc 120

tggaactccg gcgccctgac cagcggtgtg cacaccttcc catccgtcct gcaggcctcg 180

gggctgtact ctctcagcag catggtgaca gtgccctcca gcaggtggct cagtgacacc 240

ttcacctgca acgtggccca ccggcccagc agcaccaaag tggacaagac cgtacccaaa 300

acagcgtcta caatagagtc caaaaccggg gaaggtccca aatgcccagt tcctgagatt 360

cctggagcac cgtccgtctt catcttcccc ccaaaaccca aggacaccct ctcgatttcc 420

cggacgcccg aggtcacgtg cttggtggtg gacttgggcc cagatgactc caatgtccag 480

atcacatggt ttgtggataa caccgagatg cacacagcca agacgaggcc gcgtgaggag 540

cagttcaaca gcacctaccg tgtggtcagt gtcctcccca tcctacacca ggactggctc 600

aaggggaagg agttcaagtg caaggtcaac agcaaatccc tcccctctgc catggagagg 660

accatctcca aggccaaagg acagccccac gagccccagg tgtacgtcct gcctccaacc 720

caggaggagc tcagcgagaa caaagtcagt gtgacctgcc tgatcaaagg cttccacccg 780

cctgacattg ccgtcgagtg ggagatcacc ggacagccgg agccagagaa caactaccag 840

acgaccccgc cccagctgga cagcgacggg acctacttcc tgtacagcag gctctcggtg 900

gacaggtccc actggcagag gggaaacacc tacacctgct cggtgtcaca cgaagctctg 960

cacagccacc acacacagaa atccctcacc cagtctccgg gtaaa 1005

<210> 9
<211> 351
[0014] <212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> ZTS-5864 重链可变区

<400> 9
gacgtgcaat tggtggagtc tgggggagac ctggtgaagc ctgggggGtc cctgagactc 60

acctgtgtgg cctctggatt caccttcagt gactatgcaa tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctgcagtg ggtcgcaggt attgacagtg ttggaagtgg cacaagctac 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctcaa gaccgaggac acggccacat attactgtgc gagcgggttc 300

cctgggtcct ttgagcactg gggccaagga accctggtga cggtctcgag c 351

<210> 10
<211> 117
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> ZTS-5864 重链可变区

<400> 10

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

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

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Gln Trp Val
35 40 45

Ala Gly Ile Asp Ser Val Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

[0015]

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

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

Ala Ser Gly Phe Pro Gly Ser Phe Glu His Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 11
<211> 5
<212> PRT
<213> 家犬

<400> 11

Asp Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 12
<211> 17
<212> PRT
<213> 家犬

<400> 12

Gly Ile Asp Ser Val Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 13
<211> 8
<212> PRT
<213> 家犬

[0016]

<400> 13

Gly Phe Pro Gly Ser Phe Glu His
1 5

<210> 14
<211> 312
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> ZTS-5864 轻链可变区

<400> 14
cagtctgtgc tgactcagcc atcctcagtg tctgggaccc taggccagag gatcaccatc 60

tcctgcaccg gaagcagctc caacatcggg agtggttatg tgggctggta tcaacaagtc 120

ccaggaatgg gccccaaaac cgtcatctat tataatagcg accgaccctc tggagtccca 180

gataggttct ccggctccaa gtctggcagc tcaggcaccc tgaccatcac tggattgcag 240

gctgaagacg aggctgacta ttactgttca gtatatgaca gaactttcaa tgctgtgttc 300

ggcggaggga cc 312

<210> 15
<211> 104
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> ZTS-5864 轻链可变区

<400> 15

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

Arg Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Gly
20 25 30

[0017]

Tyr Val Gly Trp Tyr Gln Gln Val Pro Gly Met Gly Pro Lys Thr Val
35 40 45

Ile Tyr Tyr Asn Ser Asp Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Ser Ser Gly Thr Leu Thr Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

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

Asn Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr
100

<210> 16
<211> 13

<212> PRT
<213> 家犬

<400> 16

Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Gly Tyr Val Gly
1 5 10

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> 家犬

[0018] <400> 17

Tyr Tyr Asn Ser Asp Arg Pro
1 5

<210> 18
<211> 10
<212> PRT
<213> 家犬

<400> 18

Ser Val Tyr Asp Arg Thr Phe Asn Ala Val
1 5 10

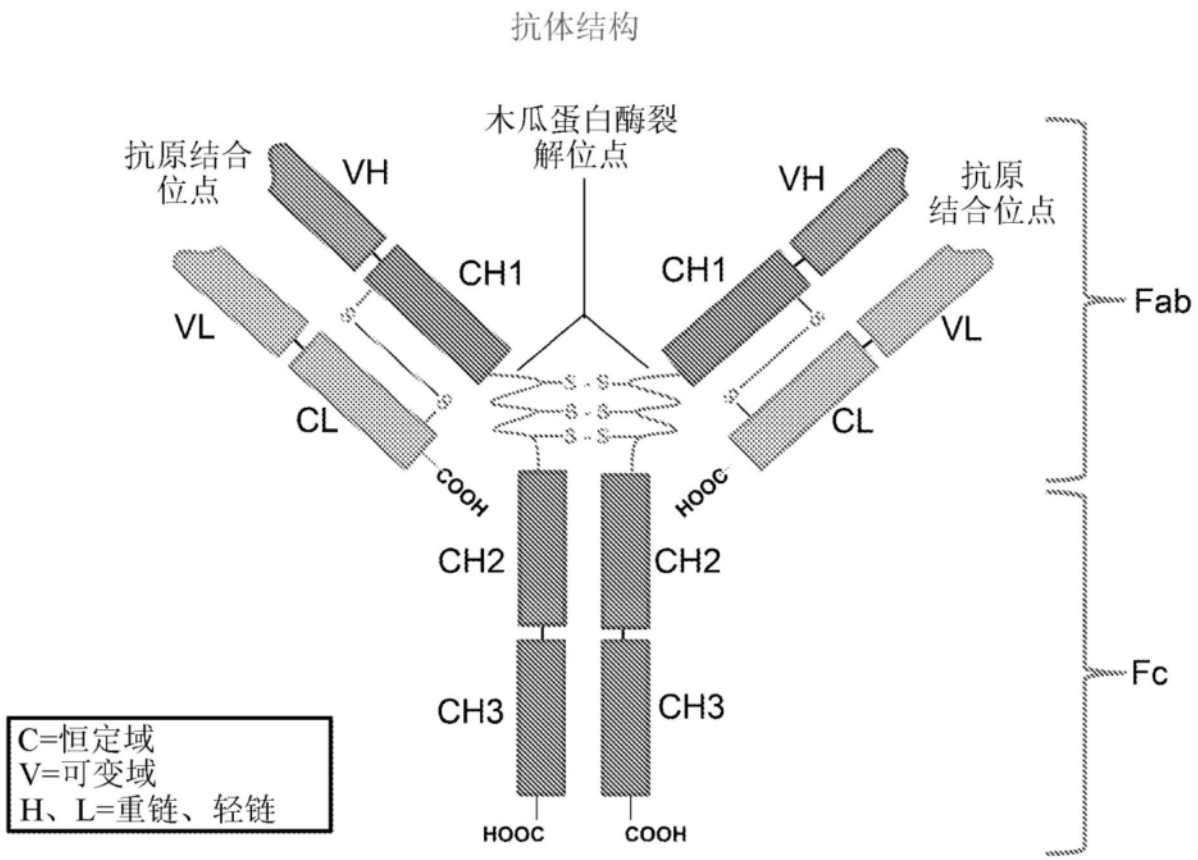

抗体结构
木瓜蛋白酶裂解位点
抗原结合位点
VH
CH1
VL
CL
COOH
VH
CH1
VL
CL
HOOC
抗原结合位点
Fab
CH2
CH2
CH3
CH3
Fc
HOOC
COOH
C=恒定域
V=可变域
H、L=重链、轻链

图1

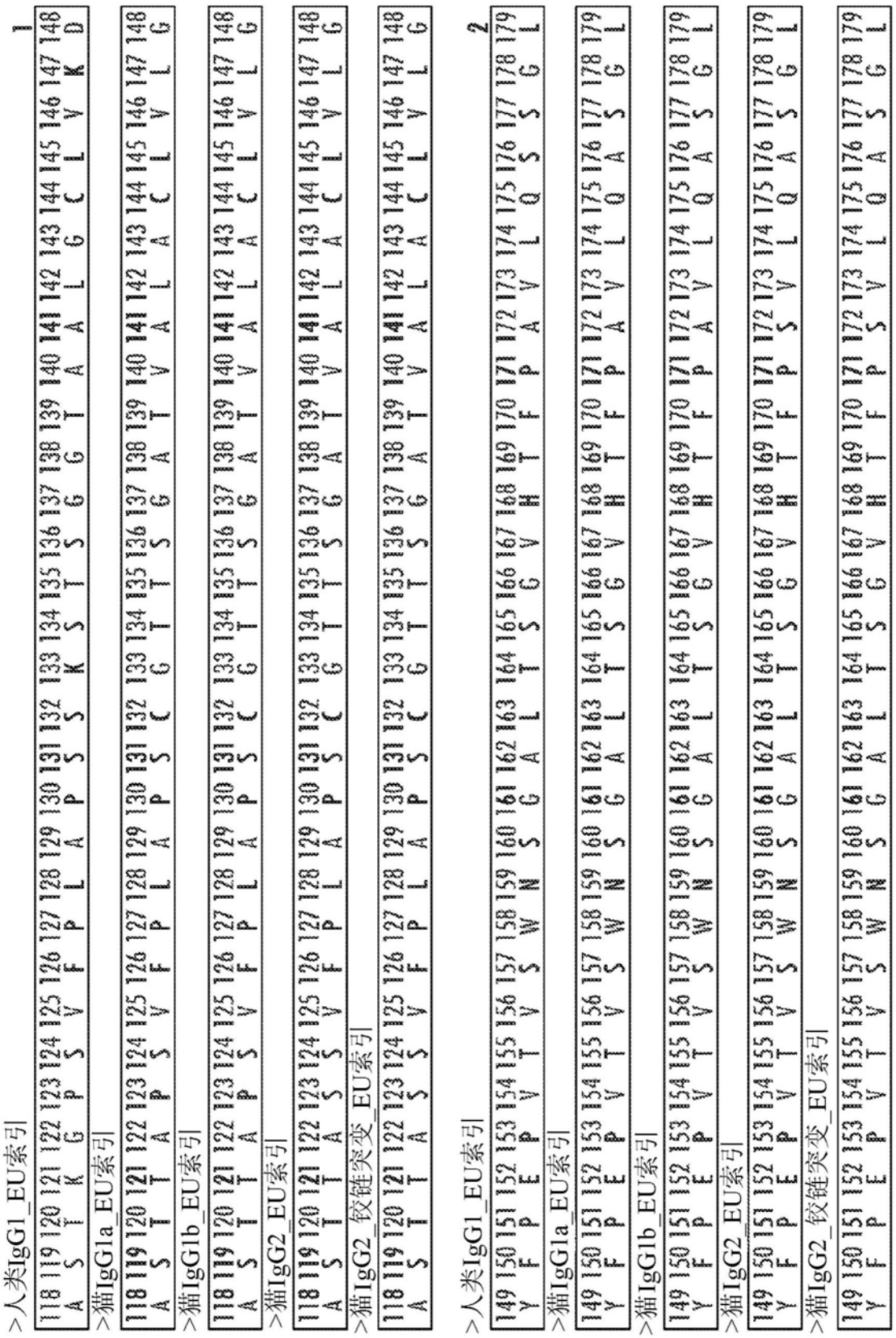

1
>人类IgG1_EU索引
118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148
A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D
>猫IgG1a_EU索引
118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148
A S T T A P S V F P L A P S C G T T S G A T V A L A C L V L G
>猫IgG1b_EU索引
118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148
A S T T A P S V F P L A P S C G T T S G A T V A L A C L V L G
>猫IgG2_EU索引
118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148
A S T T A S S V F P L A P S C G T T S G A T V A L A C L V L G
>猫IgG2_铰链突变_EU索引
118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148
A S T T A S S V F P L A P S C G T T S G A T V A L A C L V L G
2
>人类IgG1_EU索引
149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179
Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L
>猫IgG1a_EU索引
149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179
Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q A S G L
>猫IgG1b_EU索引
149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179
Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q A S G L
>猫IgG2_EU索引
149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179
Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P S V L Q A S G L
>猫IgG2_铰链突变_EU索引
149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179
Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P S V L Q A S G L

图2

3
>人类IgG1_EU索引
180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210
Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K
>猫IgG1a_EU索引
180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210
Y S L S S M V T V P S S R W L S D T F T C N V A H P P S N T K
>猫IgG1b_EU索引
180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210
Y S L S S M V T V P S S R W L S D T F T C N V A H P P S N T K
>猫IgG2_EU索引
180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210
Y S L S S M V T V P S S K W L S D T F T C N V A H R P S S T K
>猫IgG2_铰链突变_EU索引
180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210
Y S L S S M V T V P S S R W L S D T F T C N V A H R P S S T K
4
>人类IgG1_EU索引
211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241
V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F
>猫IgG1a_EU索引
211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234
V D K T V R K T D H P P G P K P C D - - - - C P K C P P P E M
>猫IgG1b_EU索引
211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234
V D K T V R K T D H P P G P K P C D - - - - C P K C P P P E M
>猫IgG2_EU索引
211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237
V D K T V - P K T A S T I E S K T G E G P K C P V P E I P G A
>猫IgG2_铰链突变_EU索引
211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237
V D K T V - P K T A S T I E S K T G C G C K C P V P E I P G A

图2(续)

5

>人类IgG1_EU索引

242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272
L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E

>猫IgG1a_EU索引

235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265
L G G P S I F I F P P K P K D T L S I S R T P E V T C L V V D

>猫IgG1b_EU索引

235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 449 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265
L G G P S I F I F P P K P K D T L S I S R T P E V T C L V V D

>猫IgG2_EU索引

238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268
P S V F I F P P K P K D T L S I S R T P E V T C L V V D L G P

>猫IgG2_铰链突变_EU索引

238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268
P S V F I F P P K P K D T L S I S R T P E V T C L V V D L G P

6

>人类IgG1_EU索引

273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303
Y K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T R L V V

>猫IgG1a_EU索引

266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296
L G P D D S D V Q I T W F V D N T Q V Y T A K T S P R E E Q F

>猫IgG1b_EU索引

266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296
L G P D D S D V Q I T W F V D N T Q V Y T A K T S P R E E Q F

>猫IgG2_EU索引

269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299
D D S N V Q I T W F V D N T E M H T A K T R P R E E Q F N S T

>猫IgG2_铰链突变_EU索引

269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299
D D S N V Q I T W F V D N T E M H T A K T R P R E E Q F N S T

图2(续)

7
>人类IgG1_EU索引
304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334
S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K
>猫IgG1a_EU索引
297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327
N S I Y R V V S V L P I L H Q D W L K G K E F K C K V N S K S
>猫IgG1b_EU索引
297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327
N S I Y R V V S V L P I L H Q D W L K G K E F K C K V N S K S
>猫IgG2_EU索引
300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330
Y R V V S V L P I L H Q D W L K G K E F K C K V N S K S L P S
>猫IgG2_铰链突变_EU索引
300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330
Y R V V S V L P I L H Q D W L K G K E F K C K V N S K S L P S
8
>人类IgG1_EU索引
335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365
T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L
>猫IgG1a_EU索引
328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358
L P S P I E R T I S K A K G Q P H E P Q V Y V L P P A Q E E L
>猫IgG1b_EU索引
328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358
L P S P I E R T I S K D K G Q P H E P Q V Y V L P P A Q E E L
>猫IgG2_EU索引
331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361
A M E R T I S K A K G Q P H E P Q V Y V L P P T Q E E L S E M
>猫IgG2_铰链突变_EU索引
331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361
A M E R T I S K A K G Q P H E P Q V Y V L P P T Q E E L S E M

图2(续)

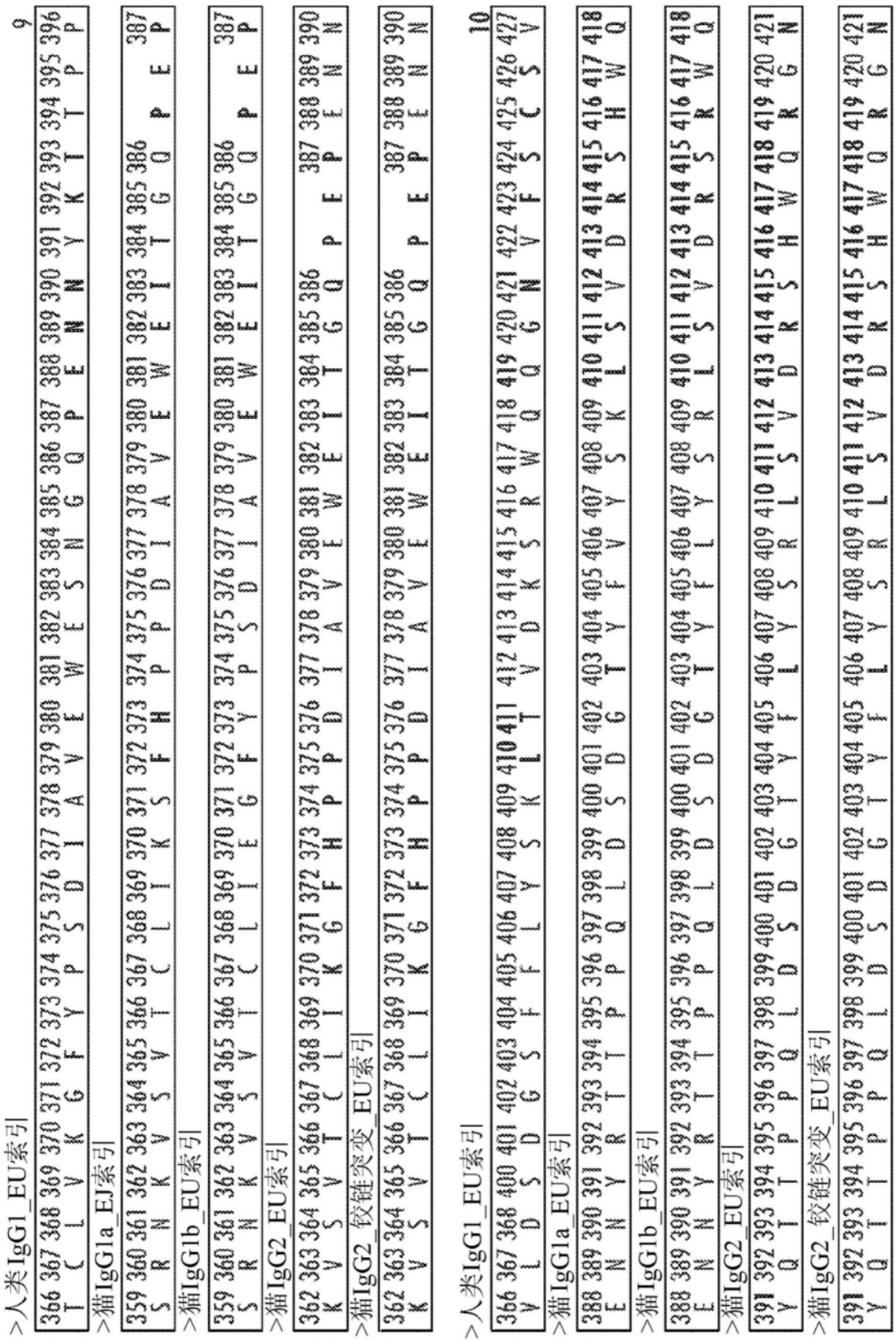

9
>人类IgG1_EU索引
>猫IgG1a_EJ索引
>猫IgG1b_EU索引
>猫IgG2_EU索引
>猫IgG2_铰链突变_EU索引
10
>人类IgG1_EU索引
>猫IgG1a_EU索引
>猫IgG1b_EU索引
>猫IgG2_EU索引
>猫IgG2_铰链突变_EU索引

图2(续)

>人类IgG1_EU索引
428 428 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447
M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K
>猫IgG1a_EU索引
419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 428 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447
R G N T Y T C S V S H E A L H S H H T Q K S L T Q S P G K
>猫IgG1b_EU索引
419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 428 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447
R G N T Y T C S V S H E A L H S H H T Q K S L T Q S P G K
>猫IgG2_EU索引
422 423 424 425 426 427 428 428 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447
T Y T C S V S H E A L H S H H T Q K S L T Q S P G K
>猫IgG2_铰链突变_EU索引
422 423 424 425 426 427 428 428 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447
T Y T C S V S H E A L H S H H T Q K S L T Q S P G K

图2(续)

猫Fc IgG1a野生型核苷酸序列
CCCCCTGAGATGCTTGGAGGACCGTCCATCTTCATCTTCCCCCCAA AACCCAAGGACACCCTCTCGATTTCCCGGACGCCCGAGGTCACAT GCTTGGTGGTGGACTTGGGCCCAGATGACTCCGATGTCCAGATCA CATGGTTTGTGGATAAACCCAGGTGTACACAGCCAAGACGAGTC CGCGTGAGGAGCAGTTCAACAGCACCTACCGTGTGGTCAGTGTCC TCCCCATCCTACACCAGGACTGGCTCAAGGGGAAGGAGTTCAGT GCAAGGTCAACAGCAAATCCCTCCCCTCCCCATCGAGAGGACA TCTCCAAGGCCAAAGGACAGCCCACGAGCCCCAGGTGTACGTCC TGCCTCCAGCCCAGGAGGAGCTCAGCAGGACAAAGTCAGTGTGA CCTGCCTGATCAAATCCTCCACCCGCCTGACATTGCCGTCGAGTG GGAGATCACCGGACAGCCGGAGCCAGAGAACAACTACCGGACGA CCCCGCCCCAGCTGGACAGCGACGGGACCTACTTCGTGTACAGCA AGCTCTCGGTGGACAGGTCCCACTGGAGAGGGGAAACACCTACA CCTGCTCGGTGTCACACGAAGCTCTGCACAGCCACCACACACAGA AATCCCTCACCCAGTCTCCGGGTAAA

图3

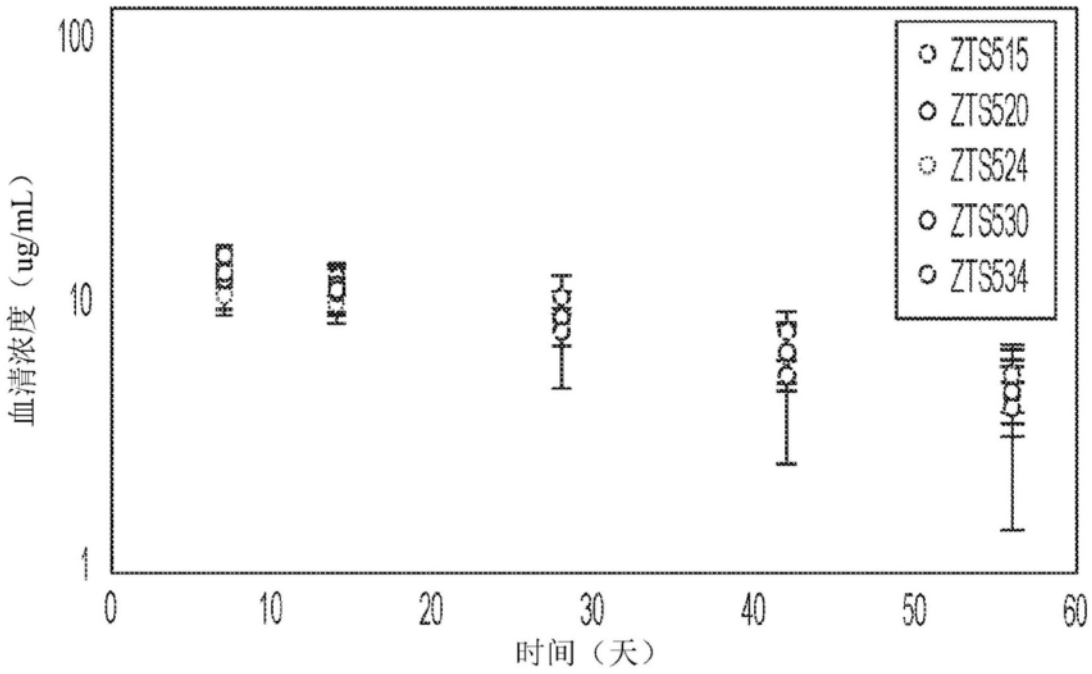


图4