



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116333129 A

(43) 申请公布日 2023.06.27

(21) 申请号 202211129413.0

(22) 申请日 2018.05.24

(30) 优先权数据

62/511,178 2017.05.25 US

62/599,221 2017.12.15 US

(62) 分案原申请数据

201880034275.3 2018.05.24

(71) 申请人 百时美施贵宝公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 A·P·延纽克 艾伦·J·科曼

M·J·塞尔比 B·C·巴恩哈特

N·朗伯格 M·斯里尼瓦桑

K·A·海宁 M·M·韩 M·雷

L·施维瑞 S·V·哈切尔

A·拉贾帕尔

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理师 封新琴

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

权利要求书1页 说明书149页

序列表(电子公布) 附图56页

(54) 发明名称

包含经修饰的重链恒定区的抗体

(57) 摘要

本文提供了重链恒定区(称为“经修饰的重链恒定区”)或其功能上等同的片段,所述重链恒定区或其功能上等同的片段相对于未修饰形式的相同抗体增强了抗体的生物学特性。示例性的经修饰的重链恒定区包含一个IgG2铰链和三个恒定结构域(即,CH1、CH2和CH3结构域),其中所述恒定区结构域中的一个或多个是非IgG2同种型(例如是IgG1、IgG3或IgG4)的。所述重链恒定区可以包含野生型人IgG结构域序列或这些序列的变体。本文还提供了用于增强包含非IgG2铰链的抗体的某些生物学特性(如内化、激动作用和拮抗作用)的方法,其中所述方法包括用IgG2铰链替代所述抗体的非IgG2铰链。

1. 一种包含经修饰的重链恒定区的抗体,其中所述经修饰的重链恒定区以从N末端到C末端的顺序包含CH1结构域、铰链、CH2结构域和CH3结构域,其中所述铰链是IgG2同种型的,并且所述CH1、CH2或CH3结构域中的至少一个不是IgG2同种型的。

2. 根据权利要求1所述的抗体,其中所述铰链是野生型人IgG2铰链或包含与野生型人IgG2铰链的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。

3. 根据权利要求1或2所述的抗体,其中所述铰链含有减少二硫键形成的一个或多个修饰。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述铰链包含氨基酸取代C219S。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述铰链包含SEQ ID NO:8、21-23、126-132或134-147中任何一个的氨基酸序列或如下序列,所述序列包含在CVE与CPP之间插入的1-3个氨基酸。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述CH1结构域为IgG2CH1结构域。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述CH1结构域是野生型人IgG2 CH1结构域或者包含与野生型人IgG2 CH1结构域的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述IgG2 CH1结构域包含氨基酸序列ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTV (SEQ ID NO:7)。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述CH2结构域为IgG1 CH2结构域。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述CH2结构域是野生型人IgG1 CH2结构域或者包含与野生型人IgG1 CH2结构域的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。

## 包含经修饰的重链恒定区的抗体

[0001] 本申请是申请号为2018800342753的中国发明专利申请(申请日:2018年5月24日,发明名称:包含经修饰的重链恒定区的抗体)的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求美国临时申请号62/511,178(2017年5月25日提交)和62/599,221(2017年12月15日提交)的优先权。贯穿本说明书引用的任何专利、专利申请和参考文献的内容均通过引用以其整体特此并入。

### 背景技术

[0004] 抗体治疗剂是疾病(如癌症和免疫障碍)治疗中发展最快的领域之一。然而,通过治疗性抗体有效靶向抗原仍然是卫生保健的主要挑战。因此,抗体工程已经成为制药领域的主要焦点。从这一焦点出发,已经出现了大量新的工程化抗体,如抗体片段、抗体药物缀合物(ADC)、具有经修饰的效应子区域的抗体和双特异性抗体。

[0005] 抗体通过许多不同的机制促进其治疗特性。抗体可以直接抑制或激活靶抗原,从而调节细胞信号传导。抗体可以抑制配体与受体的结合。抗体还可以例如通过增强受试者的免疫系统(例如,作为T细胞激活中的共刺激物)来诱导或抑制免疫应答以抵抗感染或癌症。

[0006] 此外,抗体介导的细胞表面受体/抗原的内化被认为是治疗性抗体的主要作用机理。在这种情况下,抗体通过诱导靶标到细胞中的内化将靶标从细胞表面去除并使其无法发挥功能。实际上,抗体治疗剂先驱者之一是用于治疗乳腺癌的曲妥珠单抗。曲妥珠单抗靶向ErbB2受体并诱导受体/抗体内化,从而抑制EGFR信号传导。然而,抗体并不总是展示出有效的内化品质,因此对具有改善的内化功能的抗体存在持续的需求。因此,非常需要用于改善已知治疗性抗体的内化的方法。

### 发明内容

[0007] 本发明提供了重链恒定区(称为“经修饰的重链恒定区”)或其功能上等同的片段,所述重链恒定区或其功能上等同的片段相对于未修饰形式的相同抗体增强或修饰抗体的生物学特性。例如,包含经修饰的恒定区的抗体展现出增加的内化和/或激动或拮抗活性。因此,本发明的抗体是原始未修饰抗体的优化形式。在某些实施方案中,重链包含经修饰的恒定区,所述经修饰的恒定区包含相对于野生型重链恒定区的一个或多个突变或修饰。在某些实施方案中,经修饰的重链恒定区包含一个IgG2铰链和三个恒定结构域(即,CH1、CH2和CH3结构域),其中所述恒定区结构域中的一个或多个是非IgG2人同种型(例如IgG1、IgG3或IgG4)或其功能上等同的片段。经修饰的恒定区可以包含相应的野生型氨基酸序列或其变体,例如在铰链或CH1、CH2、CH3结构域内相对于野生型氨基酸序列的一个或多个(例如在1-10之间或更多)氨基酸取代或缺失。因此,铰链和/或每个恒定结构域的氨基酸序列与相应的野生型氨基酸序列至少约80%、85%、90%、95%或更多(即,96%、97%、98%、99%或100%)相同。

[0008] 在一个实施方案中,经修饰的重链恒定区包含野生型人IgG2铰链或与野生型人IgG2铰链的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。所述铰链可以进一步含有另外的修饰,例如以减少二硫键的形成。在一个实施方案中,所述铰链相对于野生型人IgG2铰链包含氨基酸取代C219S。在某些实施方案中,所述铰链包含SEQ ID NO:8、21-23、126-132和134-147中任何一个所示的氨基酸序列或如下序列之一,所述序列包含在CVE与CPP之间插入的1-3个氨基酸。

[0009] 在某些实施方案中,经修饰的重链恒定区包含IgG2 CH1结构域,例如野生型人IgG2 CH1结构域或与野生型人IgG2 CH1结构域的氨基酸序列(SEQ ID NO:7)至少95%相同的氨基酸序列。

[0010] 在某些实施方案中,经修饰的重链恒定区包含IgG1 CH2结构域,例如野生型人IgG1 CH2结构域或与野生型人IgG1 CH2结构域的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。所述CH2结构域可含有另外的修饰(例如,以降低或消除效应子功能)。在某些实施方案中,所述CH2结构域相对于野生型全长人IgG1 CH2包含氨基酸取代A330S和P331S。在某些实施方案中,所述CH2结构域包含SEQ ID NO:24。

[0011] 在某些实施方案中,经修饰的重链恒定区包含IgG1 CH3结构域,例如野生型人IgG1 CH3结构域或与野生型人IgG1 CH3结构域的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。所述CH3结构域可以进一步含有赋予特定同种异型的另外的修饰。在一个实施方案中,相对于不同同种异型(例如,“fa”同种异型,其分别在以下那些位置处具有D和L)的野生型全长人IgG1,所述CH3结构域在位置356处含有氨基酸残基E并且在位置358处含有氨基酸M(“f”同种异型)。在某些实施方案中,所述CH3结构域包含SEQ ID NO:5。

[0012] 在特定的实施方案中,所述抗体包含经修饰的重链恒定区,其中(a)所述CH1结构域是具有或不具有另外的修饰的野生型人IgG2 CH1结构域或野生型IgG1 CH1结构域,(b)所述铰链是具有或不具有C219S取代的野生型IgG2铰链,(c)所述CH2结构域是具有或不具有另外的修饰的野生型人IgG1CH2结构域或野生型IgG2 CH2结构域,并且(d)所述CH3结构域是具有或不具有位置356处的氨基酸E和位置358处的氨基酸M的野生型人IgG1 CH3结构域或野生型人IgG2 CH3结构域(如同种异型f或fa的)。在特定的实施方案中,所述经修饰的重链恒定区包含本文所述的氨基酸序列,例如SEQ ID NO:26-37和78-93中的任何一个所示的氨基酸序列。

[0013] 与不具有经修饰的重链恒定区的相同抗体相比,本发明的抗体(即,具有经修饰的恒定区的抗体)可以是完全人抗体或人源化的抗体,并且还展现出一种或多种增强或改变的特征。这些特征可以包括增加或改变的细胞内化、激动活性、大的交联复合物的形成、ADCC、受体介导的信号传导、拮抗剂活性、免疫调节活性和抗肿瘤活性;或引入新的特性(例如激动剂活性)。

[0014] 还提供了含有本发明的经修饰的恒定区的双特异性分子和免疫缀合物,以及含有所述抗体、双特异性分子或免疫缀合物和可接受的药物载体的组合物。此类组合物还可以包含一种或多种另外的治疗剂,例如刺激免疫系统的药剂,如检查点抑制剂、共刺激分子、抗CD39抗体或抗A2AR抗体。

[0015] 还提供了用于制备包含经修饰的重链恒定区的抗体的方法。与包含非IgG2同种型的铰链的相同抗体相比,本文提供的某些方法包括增加细胞对抗体的内化的方法以及用于

增加抗体的激动剂活性的方法。此类方法包括以下步骤：提供具有不是IgG2铰链的铰链的抗体，以及将所述铰链用IgG2铰链（如作为野生型人IgG2铰链的铰链、具有与野生型人IgG2铰链的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列的铰链或经修饰以减少二硫键形成的铰链，例如包含氨基酸取代C219S的铰链）替代。在一个实施方案中，所述抗体的内化增强或增加了至少10%、30%、50%、75%、2倍、3倍、5倍或更多，从而导致 $T_{1/2}$ 降低了至少10%、30%、50%、75%、2倍、3倍、5倍或更多。在某些实施方案中，激动剂活性增加或增强了至少10%、30%、50%、75%、2倍、3倍、5倍或更多，如通过效应T细胞中增加的细胞因子释放或增加的增殖所定义的；如果在Treg上的接合降低Treg功能，则通过降低的T调节细胞活性来定义；或通过增加的Treg耗竭来定义。

[0016] 在某些实施方案中，所述方法进一步包括用不同同种型的CH1、CH2或CH3结构域替代CH1、CH2或CH3结构域中的至少一个的步骤。此类替代包括，例如：(a) 将所述CH1结构域用IgG1 CH1结构域或IgG2 CH1结构域替代；(b) 将所述CH2结构域用IgG1 CH2结构域或IgG2 CH2结构域替代；和/或 (b) 将所述CH3结构域用IgG1 CH3结构域或IgG2 CH3结构域替代，其中所述替代结构域具有所述野生型序列或与所述野生型序列具有至少95%同一性。在某些实施方案中，所述CH1结构域包含如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列。在某些实施方案中，将所述CH2结构域修饰以降低或消除效应子功能，例如所述CH2结构域包含氨基酸取代A330S和P331S (SEQ ID NO:24)。在某些实施方案中，所述CH3结构域包含位置356处的氨基酸残基E和位置358处的氨基酸M (SEQ ID NO:5, 同种异型“f”)，并且在某些实施方案中，所述CH3结构域包括同种异型“fa”。

[0017] 本文提供的方法包括通过给予包含经修饰的重链恒定区的抗体、双特异性分子或免疫缀合物来治疗受试者的方法。也可以共给予一种或多种另外的治疗剂，例如刺激免疫系统的治疗剂，如检查点抑制剂、共刺激分子。

[0018] 本文提供了包含经修饰的重链恒定区的抗体，所述经修饰的重链恒定区以从N末端到C末端的顺序包含CH1结构域、铰链、CH2结构域和CH3结构域，并且其中 (a) 所述CH1结构域包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列或与其有最多5个氨基酸的差异或与SEQ ID NO:7至少95%相同的氨基酸序列，并且其中C131、R133、E137、S138或R217中的至少一个未取代或缺失；(b) 铰链，其包含SEQ ID NO:8、21-23、126-132或134-147中的任何一个或如下序列，所述序列包含在C<sub>VE</sub>与C<sub>PP</sub>之间插入的1-3个氨基酸或者所述序列与SEQ ID NO:8、21-23、126-132或134-147中的任何一个有最多5个氨基酸的差异，其中所述铰链在C219和C220两处均不包含取代或缺失；(c) 所述抗体相对于包含IgG1铰链和CH1结构域的同抗体具有至少一种增强的特性或新引入的特性；和(d) 所述经修饰的重链恒定区不是野生型IgG2恒定区或包含C219S和/或C220S的IgG2恒定区。所述铰链可以包含氨基酸序列ERKXCVECPPCPAP (SEQ ID NO:129) 或ERKCXVECPPCPAP (SEQ ID NO:130)，其中X是除半胱氨酸以外的任何氨基酸。例如，所述铰链可以包含氨基酸序列ERKSCVECPPCPAP (SEQ ID NO:131) 或ERKCSVECPPCPAP (SEQ ID NO:132)。在某些实施方案中，氨基酸残基P233、V234、A235和G237中的至少一个或全部是缺失的或被另一个氨基酸残基例如IgG1铰链中的相应氨基酸取代。在某些实施方案中，氨基酸残基R133、E137、S138和R217中的任何一个或C131、R133、E137、S138和R217中的任何一个都没有被取代或缺失。在某些实施方案中，N192和/或F193被另一个氨基酸取代。所述抗体可以包含与野生型IgG1的CH2结构域至少95%相同的CH2结构域。所述抗体可以包

含与野生型IgG1的CH3结构域至少95%相同的CH3结构域。在某些实施方案中,所述CH2和/或CH3结构域不是野生型IgG1 CH2和/或CH3结构域,并且所述抗体的效应子功能比野生型IgG1的效应子功能更有力。在某些实施方案中,所述CH2和/或CH3结构域不是野生型IgG1 CH2和/或CH3结构域,并且所述抗体的效应子功能不如野生型IgG1的效应子功能。在某些实施方案中,所述抗体包含与野生型IgG1或IgG4的CH2结构域和/或CH1结构域至少95%相同的CH2结构域和/或CH1结构域。在某些实施方案中,所述抗体具有选自以下项的至少一种增强的特性:激动剂活性、抗体介导的受体内化、ADCC、受体介导的信号传导、拮抗剂活性、免疫调节活性或抗肿瘤活性;或新引入的特性,其为激动剂活性。

[0019] 在某些实施方案中,抗体包含经修饰的重链恒定区,其中(a)所述CH1结构域是野生型人IgG2 CH1结构域;(b)所述铰链包含SEQ ID NO:8、21-23、126-132或134-147中的任何一个或如下序列,所述序列包含在CVE与CPP之间插入的1-3个氨基酸;(c)所述CH2结构域是野生型人IgG1 CH2结构域或赋予所述抗体增强或降低的效应子功能的经修饰的CH2结构域;和(d)所述CH3结构域是野生型人IgG1 CH3结构域或赋予所述抗体增强或降低的效应子功能的经修饰的CH3结构域。经修饰的重链恒定结构域可以包含SEQ IDNO:26-37、54-56、78-125、152-232、234-245和247-262中任何一个所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:26-37、54-56、78-125、152-232、234-245和247-262中的一个或多个至少95%相同的氨基酸序列。对于包含具有与这些序列中的任何一个至少95%相同的氨基酸序列的Fc的重链,优选不改变这些序列中用于调节生物活性的特定氨基酸突变。

[0020] 在某些实施方案中,抗体包含经修饰的重链恒定区,其中所述重链恒定区包含CH1结构域和铰链,所述铰链包含序列

[0021] ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCCVECPAPPVAG (SEQ ID NO:133) 或者与SEQ ID NO:133有最多10个氨基酸的差异或与SEQ ID NO:133至少90%相同的氨基酸序列,其中(i) C131、R133、E137、S138和R217中的至少一个未被另一个氨基酸取代或缺失;(ii) C219和C220可以被另一个氨基酸取代或缺失,但C219和C220不能同时被取代或缺失;(iii)可以在所述铰链中的CVE与CPP之间插入1-3个氨基酸;(iv)所述铰链任选地在C末端包含另外的氨基酸,例如G;(v)氨基酸P233、V234、A235和G237中的一个或多个可以被另一个氨基酸(例如来自IgG1的相应氨基酸)取代或缺失;(vi)所述CH2和CH3结构域可以是野生型或经修饰的IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 CH2和CH3结构域;(vii)所述经修饰的重链恒定区不是具有C219S或C220S的野生型IgG2重链恒定区或野生型IgG2重链恒定结构域;并且(viii)所述抗体相对于包含IgG1铰链和CH1结构域的同抗体具有至少一种增强的特性或新引入的特性。在某些实施方案中,所述抗体具有选自以下项的至少一种增强的特性:激动剂活性、抗体介导的受体内化、ADCC、受体介导的信号传导、拮抗剂活性、免疫调节活性或抗肿瘤活性;或新引入的特性,其为激动剂活性。在某些实施方案中,氨基酸C131、R133、E137、S138、R217中的任何一个都没有被另一个氨基酸取代或缺失。在某些实施方案中,N192和/或F193未被取代或分别为N192S和/或F193L。在某些实施方案中,C219为C219S,C220为C220S,P233-G237被取代或缺失;V234-G237被取代或缺失;A235-G237被取代或缺失;G237被取代或缺失;P233被取代或缺失;P233-V234被取代或缺失;或P233-A235被取代或缺失。所述抗体可以具有效应子功能,或者失去效应子功能。所述抗体可以包含野生型或经修饰的IgG1 CH2结构域和或

野生型或经修饰的IgG1 CH3结构域。

[0022] 在某些实施方案中,抗体包含经修饰的重链恒定区,其中所述重链恒定区包含CH1结构域,所述CH1结构域包含序列ASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV~~D~~HKPSNTKVDK~~T~~VE (SEQ ID NO:7) 或者与SEQ ID NO:7有最多10个氨基酸的差异或与SEQ ID NO:7至少90%相同的氨基酸序列,其中(i) C131、R133、E137、S138和R217中的至少一个未被取代或缺失;(ii)所述经修饰的重链恒定区不是具有C219S或C220S的野生型IgG2重链恒定区或野生型IgG2重链恒定结构域;并且(iii)所述抗体相对于包含IgG1铰链和CH1结构域的同抗体具有至少一种增强的特性或新引入的特性。所述抗体可以具有选自以下项的至少一种增强的特性:激动剂活性、抗体介导的受体内化、ADCC、受体介导的信号传导、拮抗剂活性、免疫调节活性或抗肿瘤活性;或新引入的特性,其为激动剂活性。在某些实施方案中,氨基酸C131、R133、E137和S138中的任何一个都没有被另一个氨基酸取代或缺失。在某些实施方案中,N192和/或F193未被取代或分别为N192S和/或F193L。所述抗体可以具有效应子功能,或者失去效应子功能。所述抗体可以包含野生型或经修饰的IgG1 CH2结构域和或野生型或经修饰的IgG1 CH3结构域。

[0023] 抗体可以包含经修饰的重链恒定区,其中所述重链恒定区包含铰链,所述铰链包含序列

[0024] ERKCCVECP~~P~~CPAPPVAG (SEQ ID NO:8) 或者与SEQ ID NO:8有最多5个氨基酸差异的氨基酸序列,其中(i) C219和C220可以被另一个氨基酸取代或缺失,但C219和C220不能同时被取代或缺失;(ii) 氨基酸P233、V234、A235和G237中的一个或多个可以被取代或缺失;(iii)可以在所述铰链中的CVE与CPP之间插入1-3个氨基酸;(iv)所述铰链任选地在C末端包含另外的氨基酸,例如G;(v)所述CH2和CH3结构域可以是野生型或经修饰的IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 CH2和CH3结构域;(vi)所述经修饰的重链恒定区不是具有C219S或C220S的野生型IgG2重链恒定区或野生型IgG2重链恒定结构域;并且(vii)所述抗体相对于包含IgG1铰链和CH1结构域的同抗体具有至少一种增强的特性或新引入的特性。所述抗体可以具有选自以下项的至少一种增强的特性:激动剂活性、抗体介导的受体内化、ADCC、受体介导的信号传导、拮抗剂活性、免疫调节活性或抗肿瘤活性;或新引入的特性,其为激动剂活性。在某些实施方案中,C219为C219S,C220为C220S,P233-G237被取代或缺失;V234-G237被取代或缺失;A235-G237被取代或缺失;G237被取代或缺失;P233被取代或缺失;P233-V234被取代或缺失;或P233-A235被取代或缺失。所述抗体可以具有效应子功能,或者失去效应子功能。所述抗体可以包含野生型或经修饰的IgG1 CH2结构域和或野生型或经修饰的IgG1 CH3结构域。

[0025] 还提供了包含经修饰的重链恒定区的抗体,其中所述重链恒定区包含IgG1或IgG2铰链,并且其中所述铰链缺少1-7个氨基酸,并且其中所述抗体相对于包含IgG1铰链和CH1结构域的同抗体具有至少一种增强的特性或新引入的特性。所述抗体可以具有选自以下项的至少一种增强的特性:激动剂活性、抗体介导的受体内化、ADCC、受体介导的信号传导、拮抗剂活性、免疫调节活性或抗肿瘤活性;或新引入的特性,其为激动剂活性。所述铰链可以是缺少1-4个氨基酸,例如氨基酸C219、C220、V222和E224的IgG2铰链。所述铰链是缺少氨基酸S219、C220、D221、K222、T223、H224和T225的IgG1铰链。所述抗体可以包含野生型或经修饰的IgG2 CH1结构域;野生型或经修饰的IgG1 CH1结构域,以及IgG1、IgG2或IgG4 CH2结

构域和IgG1、IgG2或IgG4 CH3结构域。

[0026] 具有经修饰的重链恒定区的抗体可以是人抗体或人源化抗体或者其抗原结合部分。在某些实施方案中,所述抗体与涉及免疫调节的抗原特异性地结合。所述抗体可以是共刺激受体的激动剂或抑制性受体的拮抗剂。例如,所述抗体可以与如下共刺激受体结合,所述共刺激受体例如选自B7-1、B7-2、CD28、4-1BB、GITR、OX40、ICOS、CD70、CD27、CD40、DR3或CD28H的组,或者所述抗体可以与如下抑制性受体结合,所述抑制性受体例如选自CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG-3、TIM-3、半乳糖凝集素9、CEACAM-1、BTLA、CD69、半乳糖凝集素-1、TIGIT、CD113、GPR56、VISTA、2B4、CD48、GARP、PD1H、LAIR1、TIM-1和TIM-4的组。所述抗原可以是需要内化的抗原,例如CD73。所述抗原可以是CD39。

[0027] 在某些实施方案中,包含经修饰的重链恒定区的抗体与共刺激受体例如GITR、OX40、4-1BB、CD28、ICOS、CD40、CD27或任何其他TNFR超家族成员特异性地结合,并且包含选自以下项的组的经修饰的重链恒定区:SEQ ID NO:26-37、54-56、78-125、152-232、234-245和247-262。在某些实施方案中,所述抗体相对于具有相同可变区和轻链但包含IgG1重链恒定区的抗体展现出增强或改变的激动剂活性。

[0028] 在某些实施方案中,包含经修饰的重链恒定区的抗体与细胞表面分子例如CD73特异性地结合并触发抗体介导的细胞表面分子内化,并且所述包含经修饰的重链恒定区的抗体包含选自以下项的组的经修饰的重链恒定区:SEQ ID NO:26-37、54-56、78-125和152-232。在某些实施方案中,所述抗体相对于具有相同可变区和轻链但包含IgG1重链恒定区的抗体具有增强或改变的内化特性。抗CD73抗体也可以与具有选自SEQ ID NO:234-245和247-262的任何氨基酸序列的Fc连接。

[0029] 在某些实施方案中,包含经修饰的重链恒定区的抗体与抑制性受体例如CTLA-4、PD-1、LAG-3、TIM-3、半乳糖凝集素9、CEACAM-1、BTLA、CD69、半乳糖凝集素-1、TIGIT、CD113、GPR56、VISTA、2B4、CD48、GARP、PD1H、LAIR1、TIM-1和TIM-4特异性地结合,并且包含选自以下项的组的经修饰的重链恒定区:SEQ ID NO:26-37、54-56、78-125、152-232、234-245和247-262。在某些实施方案中,所述抗体相对于具有IgG1重链恒定区的相同抗体展现出更有力或改变的拮抗剂活性或引入新的活性。在某些实施方案中,所述Fc包含一个或多个突变以调节例如降低效应子功能。

[0030] 在某些实施方案中,包含经修饰的重链恒定区的抗体与细胞表面分子特异性地结合并触发细胞内信号传导,其中所述抗体包含选自以下项的组的经修饰的重链恒定区:SEQ ID NO:26-37、54-56、78-125、152-232、234-245和247-262。在某些实施方案中,细胞内信号传导介导激动剂活性、拮抗剂活性、细胞表面分子的内化或ADCC。在某些实施方案中,所述抗体相对于具有相同可变区和轻链但包含IgG1重链恒定区的抗体触发更有力的细胞内信号传导。

[0031] 在某些实施方案中,包含经修饰的重链恒定区的抗体与细胞表面分子特异性地结合并触发高分子量抗体-细胞表面分子复合物的形成,其中所述抗体包含选自以下项的组的经修饰的重链恒定区:SEQ ID NO:26-37、54-56、78-125、152-232、234-245和247-262。在某些实施方案中,所述抗体相对于具有相同可变区和轻链但包含IgG1重链恒定区的抗体触发更高分子量复合物的形成。

[0032] 在某些实施方案中,包含经修饰的重链恒定区的抗体与细胞表面分子特异性地结

合并触发所述细胞表面分子的聚集或低聚,其中所述抗体包含选自以下项的组的经修饰的重链恒定区:SEQ ID NO:26-37、54-56、78-125、152-232、234-245和247-262。在某些实施方案中,所述抗体相对于具有相同可变区和轻链但包含IgG1重链恒定区的抗体触发所述细胞表面分子更多的聚集或低聚。

[0033] 本文还提供了包含抗体的双特异性分子,所述抗体包含与具有第二结合特异性的分子连接的经修饰的重链恒定区。本文还提供了包含抗体的免疫缀合物,所述抗体包含与第二药剂连接的经修饰的重链恒定区。还提供了包含本文所述的抗体、双特异性分子或免疫缀合物和载体的组合物。组合物可以包含一种或多种另外的治疗剂,例如治疗剂刺激免疫系统并且是例如检查点抑制剂或共刺激受体的拮抗剂。

[0034] 本文还提供了制备包含经修饰的重链恒定区的抗体的方法,其中所述抗体以从N末端到C末端的顺序包含CH1结构域、铰链、CH2结构域和CH3结构域,所述方法包括以下步骤:(a)提供包含不是IgG2铰链和/或IgG2 CH1结构域的铰链和/或CH1结构域的抗体;和(b)将所述铰链和/或所述CH1结构域分别用IgG2铰链和/或IgG2 CH1结构域替代。本文进一步提供了增加细胞对抗体的内化的方法,其包括:(a)提供包含不是IgG2铰链和/或IgG2 CH1结构域的铰链和/或CH1结构域的抗体;和(b)将所述铰链和/或所述CH1结构域分别用IgG2铰链和/或IgG2 CH1结构域替代。所述抗体的内化与包含非IgG2同种型的铰链的相同抗体,例如包含IgG1恒定区的抗体的内化相比可增加。还提供了增加抗体的激动剂活性的方法,其包括:(a)提供包含不是IgG2铰链和/或IgG2 CH1结构域的铰链和/或CH1结构域的抗体;和(b)将所述铰链和/或所述CH1结构域分别用IgG2铰链和/或IgG2 CH1结构域替代。所述激动剂活性与包含非IgG2同种型的铰链的相同抗体,例如包含IgG1恒定区的抗体的激动剂活性相比可增加。IgG2铰链可以是野生型人IgG2铰链,或者包含与野生型人IgG2铰链的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列,并且可以包含例如表4中所示的序列。一种方法可以包括以下步骤:将所述CH1、CH2或CH3结构域中的至少一个分别用不同同种型的CH1、CH2或CH3结构域替代。一种方法可以包括以下步骤:(a)将所述CH1结构域用IgG2 CH1结构域替代;(b)将所述CH2结构域用IgG1 CH2结构域替代;和/或(b)将所述CH3结构域用IgG1 CH3结构域替代。一种方法可以包括以下步骤:(a)将所述CH1结构域用野生型人IgG2 CH1结构域或与其至少95%相同的结构域替代;(b)将所述CH2结构域用野生型人IgG1 CH2结构域或与其至少95%相同的结构域替代;和/或(b)将所述CH3结构域用野生型人IgG1 CH3结构域或与其至少95%相同的结构域替代。一种方法可以包括以下步骤:将所述重链恒定区用包含SEQ ID NO:26-37、54-56、78-125、152-232、234-245和247-262中任何一个的经修饰的重链恒定区或与SEQ ID NO:26-37、54-56、78-125、152-232、234-245和247-262至少95%相同的区域替代(或在Fc中引入这些序列的氨基酸突变)。可以将所述铰链修饰以减少或改变二硫键的形成。所述铰链可以包含氨基酸取代C219S。所述铰链可以包含SEQ ID NO:8、21-23、126-132或134-147中任何一个所示的氨基酸序列或如下序列,所述序列包含在CVE与CPP之间插入的1-3个氨基酸。所述CH1结构域可以包含氨基酸序ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTV (SEQ ID NO:7)。可以将所述CH2结构域修饰以降低或消除效应子功能。所述CH2结构域可以包含氨基酸取代A330S和P331S。所述CH2结构域可以包含氨基酸序列

[0035] PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV

LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK (SEQ ID NO:4)。所述CH2结构域可以包含氨基酸取代A330S和P331S。所述CH3结构域可以包含氨基酸序列

[0036] GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:5)。

[0037] 本文还提供了经修饰的重链恒定区,其具有与一种或多种Fc $\gamma$ R (例如CD16、CD32、CD64)的减少的或不可检测的结合。此类经修饰的重链恒定区相对于野生型重链恒定区可以具有1-5、1-3、1-2个或单个突变(例如取代)。

[0038] 还提供了通过本文所述例如上文所述的方法产生的抗体或其抗原结合部分,例如人抗体或人源化抗体。本文还涵盖了用本文所述的任何抗体治疗受试者例如患有癌症的受试者的方法。所述方法可以包括给予一种或多种另外的治疗剂,例如刺激免疫系统的治疗剂。例如,治疗剂可以靶向检查点抑制剂或共刺激分子。方法可以包括给予本文所述的组合物、双特异性分子或免疫缀合物。

## 附图说明

[0039] 图1A示出了以下抗体在H2228细胞(非小细胞肺癌细胞系)中的由抗体介导的CD73内化的动力学:H2228细胞中的11F11、4C3、6D11、具有4C3Vk1轻链的CD73.3-IgG1.1f(“3-Vh-hHC-IgG1.1f/4C3Vk1”)、具有11F11 Vk2轻链的CD73.4-IgG2CS(“4-Vh-hHC-IgG2-C219S/11F11-Vk2”)、CD73.10-IgG2CS(“CD73.10-Vh-hHC-IgG2-C219S”)、CD73.10-IgG2CS-IgG1.1f(“CD73.10-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f”)和CD73.10-IgG1.1f(“CD73.10-Vh-hHC-IgG1.1f”)抗体。11F11(其属于IgG2同种型)、CD73.4-IgG2CS、CD73.10-IgG2CS和CD73.10-IgG2CS-IgG1.1f抗体比属于IgG1同种型的其他测试抗体的内化更快且程度更高。

[0040] 图1B示出了与图1A所示那些相同的抗体在HCC15细胞(非小细胞肺癌细胞系)中的由抗体介导的CD73内化的动力学,其显示出与在H2228细胞中获得的那些相似的结果。

[0041] 图1C示出了与图1A和图1B中所示那些相同的抗体以及CD73.11-IgG2CS(“11-Vh-hVC-IgG2-C219S”)在Calu6细胞中的由抗体介导的CD73内化的动力学,其显示出与在H2228和HCC15细胞中获得的那些相似的结果。

[0042] 图1D示出了与图1C中所示那些相同的抗体在NCI-2030细胞(非小细胞肺癌细胞系)中的抗体介导的CD73内化的动力学,其显示出与在H2228、HCC15和Calu6细胞中获得的那些相似的结果。

[0043] 图1E示出了如通过流式细胞术测量的所示抗体在Calu6细胞中的由抗体介导的CD73内化的动力学。

[0044] 图1F示出了如通过流式细胞术测量的所示抗体在NCI-H292细胞(粘液表皮样肺癌细胞系)中的由抗体介导的CD73内化的动力学,但是其中在将细胞与抗体进行第一次孵育后没有洗出抗体。

[0045] 图1G示出了在用所示抗体处理的Calu6细胞中内化的CD73的百分比,其显示出随着时间的推移所示抗体在Calu6细胞中的由抗体介导的CD73内化。

[0046] 图1H示出了随着时间的推移在用所示抗体处理的NCI-H292细胞中内化的CD73的百分比,其显示出随着时间的推移所示抗体在NCI-H292细胞中的由抗体介导的CD73内化。

[0047] 图1I示出了随着时间的推移在用所示抗体处理的SNU-C1细胞(结肠癌细胞系)中

内化的CD73的百分比,其显示出随着时间的推移所示抗体在SNU-C1细胞中的由抗体介导的CD73内化。

[0048] 图1J示出了随着时间的推移在用所示抗体处理的NCI-H1437细胞(非小细胞肺癌细胞系)中内化的CD73的百分比,其显示出随着时间的推移所示抗体在NCI-H1437细胞中的由抗体介导的CD73内化。

[0049] 图2示出了所示抗人GITR抗体与抗CD3(涂板的)和CD28激活的人CD4T细胞的结合动力学,以及从图中得出的其相应的EC50值。

[0050] 图3A、图3B和图3C示出了来自用具有不同重链恒定区的可溶性抗人GITR抗体刺激的供体CD4 T细胞的IFN- $\gamma$ 和IL-2分泌。图3A示出了来自用表达OKT3的CHO细胞以及各种浓度的具有IgG2-IgG1恒定区的抗人GITR抗体刺激的供体CD4 T细胞的IFN- $\gamma$ 分泌。图3B示出了来自用表达OKT3的CHO细胞以及各种浓度的IgG1重链恒定结构域或IgG2-IgG1杂合体重链恒定结构域刺激的供体CD4 T细胞的IL-2分泌。图3C示出了来自用表达OKT3的CHO细胞以及图3A和图3B中各种浓度的无效应子形式的抗体(IgG1.1)刺激的供体CD4 T细胞的IL-2分泌。

[0051] 图4示出了在渐增量的所示抗人GITR抗体:杂交瘤抗GITR(IgG2)和重组衍生物(如IgG1f、IgG1.1(无效应子)或如与IgG2铰链的嵌合体)的存在下,来自在抗CD3单克隆抗体涂覆的板上培养的3A9-hGITR细胞的IL-2分泌。

[0052] 图5A、图5B、图5C和图5D示出了IgG2铰链对抗体/抗原复合物的的大小的影响。图5A、图5B和图5C示出了hCD73-his与含有不同恒定区的抗体CD73.4的复合物的SEC色谱图数据、DLS数据和MALS数据。图5D示出了来源于图5C中MALS确定的质量的质量的hCD73-his/mAb复合物的图解模型。

[0053] 图6示出了CD73/mAb复合物的SEC-MALS数据。

[0054] 图7示出了CD73/mAb复合物的DLS数据。

[0055] 图8A示出了随着时间的推移在用所示抗体处理的Calu6细胞中内化的CD73的百分比,其显示出随着时间的推移所示抗体在Calu6细胞中的由抗体介导的CD73内化。

[0056] 图8B示出了随着时间的推移在用所示抗体处理的NCI-H292细胞中内化的CD73的百分比,其显示出随着时间的推移所示抗体在Calu6细胞中的由抗体介导的CD73内化。

[0057] 图8C示出了用5 $\mu$ g/ml的所示抗体处理0、5、15或30分钟的Calu6细胞的表面上CD73的水平。

[0058] 图9示出了在具有所示恒定区的抗GITR抗体的存在下,与CHO-OKT3细胞共培养的CD4+T细胞分泌的IL-2水平。

[0059] 图10示出了在添加每种所示抗体后1、4或21小时由抗体介导的CD73内化的百分比。每种抗体的条形按21小时(左)、4小时(中)和1小时(右)的顺序显示。

[0060] 图11A示出了hCD73-his与包含不同恒定区序列的16种不同CD73.4抗体的1:1摩尔复合物的SEC色谱图数据的叠加。

[0061] 图11B示出了来自图11A的色谱图的11-19.5min的色谱图数据的扩展,其中指示了4种不同的洗脱物质。

[0062] 图11C示出了针对16种不同抗体/CD73-his复合物绘制的图11B的峰2的UV色谱图信号面积的百分比。数据按照峰面积渐增的顺序从左到右排列。

[0063] 图12示出了抗体与抗his Fab捕获的Fc $\gamma$ R-his蛋白的结合。假定1:1的mAb:Fc $\gamma$ R结合化学计量比,将结合反应绘制为理论Rmax的百分比。每种抗体的条形按照片子底部的颜色图例所提供的顺序显示。

[0064] 图13示出了抗体与抗his Fab捕获的Fc $\gamma$ R-his蛋白的结合。假定1:1的mAb:Fc $\gamma$ R结合化学计量比,将结合反应绘制为理论Rmax的百分比。每种抗体的条形按照片子底部的颜色图例所提供的顺序显示。

[0065] 图14A示出了抗体与抗-His Fab捕获的Fc $\gamma$ R-his蛋白的结合。假定1:1的mAb:Fc $\gamma$ R结合化学计量比,将结合反应绘制为理论Rmax的百分比。每种抗体的条形按照片子底部的颜色图例所提供的顺序显示。

[0066] 图14B示出了抗体与抗his Fab捕获的Fc $\gamma$ R-his蛋白的结合。假定1:1的mAb:Fc $\gamma$ R结合化学计量比,将结合反应绘制为理论Rmax的百分比。每种抗体的条形按照片子底部的颜色图例所提供的顺序显示。

[0067] 图15示出了抗GITR抗体的内化时间进程分析。

[0068] 图16A示出了在时间零点处的GITR和早期内体标记物EEA2共定位分析。

[0069] 图16B示出了在时间30和120分钟处的GITR和早期内体标记物EEA2共定位分析。

[0070] 图16C示出了图16A和图16B中所示的内体共定位的定量结果,将其绘制为共定位的像素强度相对于总染色的比率。

[0071] 图17A示出了用所示的抗GITR抗体处理的CD8+T细胞中的NF $\kappa$ B信号传导激活。

[0072] 图17B示出了用所示的抗GITR抗体处理的CD4+T细胞中的NF $\kappa$ B信号传导激活。

[0073] 图18示出了用所示的抗GITR抗体处理的CD4+T细胞中的P38激活。

[0074] 图19示出了具有构象A、B或A/B的IgG2抗体中二硫键的构型。

[0075] 图20A示出了在不同浓度的具有所示恒定区的抗GITR抗体的存在下,与CHO-OKT3细胞共培养的CD4+T细胞分泌的IL-2水平。

[0076] 图20B示出了在5 $\mu$ g/ml的具有所示恒定区的抗GITR抗体的存在下,与CHO-OKT3细胞共培养的CD4+T细胞分泌的IL-2水平(与图20A中的实验相同的实验)。

[0077] 图20C示出了在1.25 $\mu$ g/ml的具有所示恒定区的抗GITR抗体的存在下,与CHO-OKT3细胞共培养的CD4+T细胞分泌的IL-2水平(与图20A中的实验相同的实验)。

[0078] 图20D示出了在0.313 $\mu$ g/ml的具有所示恒定区的抗GITR抗体的存在下,与CHO-OKT3细胞共培养的CD4+T细胞分泌的IL-2水平(与图20A中的实验相同的实验)。

[0079] 图21示出了hIgG1f的一部分的氨基酸序列,其中加下划线的序列在下面重现并显示了hIgG1、hIgG1.1f、hIgG1.3f和hIgG1-P238K氨基酸序列中相对于野生型IgG1的突变的位置。

[0080] 图22A、图22B、图22C、图22D、图22E、图22F、图22G、图22H、图22I、图22J、图22K和图22L示出了基于传感图数据在不同Fc区的背景下抗体Y1238与所示Fc受体的解离速率的比较。

[0081] 图23A、图23B、图23C、图23D、图23E和图23F示出了如通过icIEF表征的dAb-Fc分子的电荷图谱。

## 具体实施方式

[0082] 在某些实施方案中,本发明至少部分基于以下发现:当抗体相对于包含非IgG2铰链的相同抗体(或相对于包含IgG1恒定区的相同抗体)而言包含IgG2铰链时,抗体的以下特性得以增强或改变:(i)内化;(ii)激动剂功能;(iii)受体介导的细胞内信号传导;(iv)ADCC;和(v)抗体/抗原复合物的重量。另外,当抗体除了IgG2铰链以外还包含IgG2 CH1结构域时,所述抗体的这些增强或改变的特征进一步增强或改变。还已经观察到,与具有IgG1 CH1结构域的相同抗体相比,具有IgG2 CH1结构域而非IgG2铰链的抗体具有增强或改变的活性。不希望受限于特定的作用机理,已经发现IgG2铰链的增强作用与抗体/抗原复合物的尺寸增加相关。当抗体具有IgG2铰链时,抗体/抗原复合物的尺寸增加可能是由于IgG2铰链相对于其他同种型具有更高的刚性。此外,已经显示IgG2铰链和CH1结构域的特定区域或氨基酸残基可以是经修饰的,而其他区域或氨基酸残基优选未修饰,以保留所述增强或改变的活性。

[0083] 如本文进一步所述,赋予抗体增强或修饰的活性的这些经修饰的重链恒定区(或其抗原结合区)可以具有效应子功能。因此,显示出可以产生具有由IgG2铰链和/或CH1结构域赋予的有利特性并且还有效应子功能的抗体。

[0084] 本发明还至少部分基于以下发现:相对于具有IgG1恒定区的抗体,IgG1或IgG2抗体中铰链某些部分的缺失导致抗体具有增强或改变的特性。

[0085] 本文还描述了具有降低ADCC和/或CDC效应子功能的突变(例如P238突变,例如P238K)的经修饰的重链区,并且在一些实施方案中,将这种一个或多个突变与增强(i)内化;(ii)激动剂功能;(iii)受体介导的细胞内信号传导;(iv)ADCC;和/或(v)抗体/抗原复合物的重量的突变组合。

[0086] 因此,本文提供了(i)具有经修饰的重链恒定区的抗体和其使用方法,所述经修饰的重链恒定区赋予抗体的抗原结合区增强或改变的特性,和(ii)用于增强或改变包含非IgG2铰链和/或CH1结构域的抗体的某些生物学特性(如内化、激动作用和拮抗作用)的方法,其中所述方法包括用IgG2铰链和/或IgG2 CH1结构域或其部分替代抗体的非IgG2铰链和/或CH1结构域。

[0087] 本文提供了“经修饰的重链恒定区”,其相对于具有不同恒定区的相同抗体,增强抗体(例如具有非IgG2铰链和/或非IgG2 CH1结构域的抗体)的某些生物学特性。示例性的经修饰的重链恒定区包含IgG2铰链、CH1结构域、CH2结构域和CH3结构域,其中这些恒定结构域中的至少一个不是IgG2同种型的并且可以例如是IgG1、IgG3或IgG4的。在某些实施方案中,经修饰的重链恒定区包含IgG2铰链以及IgG1 CH2和CH3结构域。在某些实施方案中,经修饰的重链恒定区包含IgG2 CH1结构域和IgG2铰链。在某些实施方案中,经修饰的重链恒定区包含IgG2 CH1结构域、IgG2铰链、IgG1 CH2结构域和IgG1CH3结构域。经修饰的重链恒定区可以具有与野生型IgG1的效应子功能相似的效应子功能,或者可以工程化为具有相对于野生型IgG的效应子功能降低或增强的效应子功能。经修饰的重链恒定区可以包含野生型CH1、铰链、CH2和/或CH3结构域或其变体,例如相对于相应的野生型结构域具有一个或多个氨基酸取代、缺失或添加和/或具有与相应的野生型序列至少90%相同或更多相同的氨基酸序列的CH1、铰链、CH2和/或CH3结构域。

[0088] 还提供了包含IgG1.3重链恒定区的抗体和融合蛋白。包含IgG1.3重链恒定区的抗

体可以是拮抗剂抗体或激动剂抗体,如针对检查点抑制剂的拮抗剂抗体或针对检查点刺激剂的激动剂抗体。

[0089] 定义

[0090] 为了更容易理解本说明书,首先定义某些术语。另外的定义贯穿详细说明而阐述。

[0091] 如本文所用,术语“抗体”可以包括完整抗体和其任何抗原结合片段(例如,包含铰链的抗原结合片段,包含铰链和CH1结构域的抗原结合片段,包含铰链和CH2结构域的抗原结合片段,或包含铰链、CH2结构域和一部分的CH3结构域的抗原结合片段)或单链。在一个实施方案中,“抗体”是指包含通过二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的蛋白质(例如糖蛋白)或其抗原结合部分。每条重链由重链可变区(在本文缩写为 $V_H$ )和重链恒定区构成。在某些天然存在的IgG、IgD和IgA抗体中,重链恒定区由铰链、CH1结构域、CH2结构域和CH3结构域构成。在某些天然存在的抗体中,每个轻链由轻链可变区(在本文中简称为 $V_L$ )和轻链恒定区构成。轻链恒定区由一个结构域CL构成。 $V_H$ 和 $V_L$ 区域可以进一步细分为具有高变性的区域,称为互补决定区(CDR),散布有更保守的区域,称为框架区(FR)。每个 $V_H$ 和 $V_L$ 由三个CDR和四个FR组成,按照以下顺序从氨基末端到羧基末端排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。所述重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,所述宿主组织或因子包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补体系统的第一成分(C1q)。

[0092] 免疫球蛋白可以来自任何公知的同种型,包括但不限于IgA、分泌型IgA、IgG和IgM。IgG同种型在某些物种中分为亚类:人中的IgG1、IgG2、IgG3和IgG4,和小鼠中的IgG1、IgG2a、IgG2b和IgG3。在某些实施方案中,本文描述的抗体属于人IgG1或IgG2亚型。免疫球蛋白(例如人IgG1)以若干种同种异型存在,这些同种异型彼此有最多几个氨基酸的差异。举例来说,“抗体”可以包括天然存在的抗体和非天然存在的抗体;单克隆抗体和多克隆抗体;嵌合抗体和人源化抗体;人抗体和非人抗体;全合成抗体;和单链抗体。

[0093] 在某些实施方案中,抗体的重链包含C末端赖氨酸;C末端甘氨酸(丢失了C末端赖氨酸)或缺乏GK或缺乏K。当提及包含本文描述的经修饰的重链恒定区的抗体时,所述抗体可以包含具有C末端GK或K或者可替代地缺乏GK或K的所提供序列。

[0094] 氨基酸编号是根据如在Kabat.Kabat等人(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, MD中的EU索引并根据美国专利申请公开号2008/0248028的图3c-图3f。

[0095] 如本文所用,术语抗体的“抗原结合部分”是指保留与抗原特异性地结合的能力的抗体的一个或多个片段。抗体的抗原结合部分可以是“含有铰链的抗原结合部分”。已经显示抗体的抗原结合功能可以由全长抗体的片段执行。包含在本文所述的抗体的“抗原结合部分”术语内的结合片段的例子包括(i) Fab片段,即由 $V_L$ 、 $V_H$ 、CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')<sub>2</sub>片段,即包含由铰链区的二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;(iii) 由 $V_H$ 和CH1结构域组成的Fd片段;(iv) 由抗体单臂的 $V_L$ 和 $V_H$ 结构域组成的Fv片段;(v) dAb片段(Ward等人, (1989) Nature 341:544-546), 其由 $V_H$ 结构域组成;和(vi) 分离的互补决定区(CDR)或(vii) 两个或更多个分离的CDR的组合,所述两个或更多个分离的CDR可以任选地通过合成接头来连接。此外,尽管Fv片段的两个结构域 $V_L$ 和 $V_H$ 由分开的基因编码,但是它们可以使用重组方法通过合成的接头进行连接,从而将它们制成单个蛋白质链,在所述单个蛋

白质链中 $V_L$ 和 $V_H$ 区域配对形成单价分子,称为单链Fv(scFv);参见例如Bird等人(1988) *Science* 242:423-426;和Huston等人(1988) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 85:5879-5883。此类单链抗体也旨在包含在抗体的“抗原结合部分”术语内。这些和其他潜在的构建体描述在Chan和Carter(2010) *Nat.Rev.Immunol.* 10:301中。这些抗体片段是使用本领域技术人员已知的常规技术获得的,并且以与完整抗体相同的方式针对效用筛选所述片段。抗原结合部分可以通过重组DNA技术或通过完整的免疫球蛋白的酶促或化学切割来产生。

[0096] 可变结构域的“CDR”是根据以下定义或本领域熟知的CDR测定方法来鉴定的在高变区内的氨基酸残基:Kabat、Chothia、Kabat和Chothia的组合、AbM、接触和/或构象定义。可将抗体CDR鉴定为最初由Kabat等人定义的高变区。参见例如Kabat等人,1992, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*,第5版,Public Health Service,NIH,华盛顿。也可以将CDR的位置鉴定为通过Chothia等等最初描述的结构环结构。参见例如Chothia等人,1989, *Nature* 342:877-883。用于CDR鉴定的其他方法包括“AbM定义”,它是Kabat与Chothia之间的折中方案并且是使用Oxford Molecular的AbM抗体建模软件(现在为Accelrys®)推导的;或者是基于观察到的抗原接触的对CDR的“接触定义”,如MacCallum等人,1996, *J.Mol.Biol.*, 262:732-745中所述。在本文称为CDR的“构象定义”的另一种方法中,可以将CDR的位置鉴定为对抗原结合做出焓贡献的残基。参见例如Makabe等人,2008, *Journal of Biological Chemistry*, 283:1156-1166。还有其他CDR边界定义可能并不严格遵循上述方法之一,但仍会与Kabat CDR的至少一部分重叠,但它们根据以下预测或实验发现可能会缩短或延长,所述预测或实验发现即特定残基或残基的组或甚至整个CDR不显著影响抗原结合。如本文所用,CDR可以指通过本领域已知的任何方法(包括方法的组合)定义的CDR。本文使用的方法可以利用根据这些方法中的任何一种定义的CDR。对于任何给定的含有多于一个CDR的实施方案,可以根据Kabat、Chothia、延伸的、AbM、接触和/或构象定义中的任何一种来定义CDR。

[0097] 如本文所用,“同种型”是指由重链恒定结构域基因编码的抗体种类(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD和IgE抗体)。每个野生型人IgG恒定区(包括所有结构域,即CH1结构域、铰链、CH2结构域和CH3结构域)的全长氨基酸序列可以例如作为P01857(IgG1)、P01859(IgG2)、P01860(IgG3)和P01861(IgG4)或其不同的同种异型(分别为SEQ ID NO:1、6、11和16)编入网上可获得的UniProt数据库中。如本文所用,重链恒定区的结构域(例如铰链)是“IgG1同种型”、“IgG2同种型”、“IgG3同种型”或“IgG4同种型”的,条件是所述结构域包含各同种型的相应结构域或其变体(所述变体与各同种型的相应结构域的同源性高于与其他同种型的相应结构域的同源性)的氨基酸序列。

[0098] “同种异型”是指特定同种型组内天然存在的变体,所述变体在一些氨基酸上有所不同(参见例如Jefferies等人(2009) *mAbs* 1:1)。本文所述的抗体可以属于任何同种异型。

[0099] “野生型”蛋白质或其部分是如在自然界中发现的蛋白质的一种形式。野生型蛋白质的氨基酸序列(例如重链恒定区)是如在自然界中存在的蛋白质的氨基酸序列。由于同种异型差异,野生型蛋白质可能存在多于一种氨基酸序列。例如,存在天然存在的人IgG1重链恒定区的几种同种异型(参见例如Jefferies等人(2009) *mAbs* 1:1)。

[0100] “Fc区”(片段可结晶区)或“Fc结构域”或“Fc”是指抗体的重链的C末端区,其介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,包括与位于免疫系统的各种细胞(例如效应细胞)上

的Fc受体的结合,或与经典补体系统的第一成分(C1q)的结合。因此,同种型IgG的抗体的Fc区包含抗体中除第一恒定区免疫球蛋白结构域(CH1)以外的重链恒定区。在IgG、IgA和IgD抗体同种型中,在抗体的两条重链中的每条重链中,Fc区包含C<sub>H2</sub>和C<sub>H3</sub>恒定结构域;IgM和IgE Fc区在每条多肽链中包含三个重链恒定结构域(C<sub>H</sub>结构域2-4)。对于IgG,所述Fc区包含由铰链、CH2和CH3组成的免疫球蛋白结构域。出于本文的目的,将所述Fc区定义为在氨基酸216处开始并且在氨基酸447处结束,其中氨基酸编号是根据如在Kabat.Kabat等人(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,National Institutes of Health,Bethesda,MD中的EU索引并根据美国专利申请公开号2008/0248028的图3c-图3f。Fc可以是天然的(或天然存在的或野生型)Fc(包括任何同种异型变体)或包含例如1、2、3、4、5、1-5、1-10或5-10个或更多个氨基酸突变(例如取代、添加或缺失)的变体Fc(例如,非天然存在的Fc)。例如,变体Fc可以包含与野生型Fc至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。经修饰或突变的Fc可以具有增强的或降低的效应子功能和/或半衰期。CH2和CH3区域是效应子功能和FcRn结合的主要位点。Fc可以单独地或在包含Fc的蛋白质多肽(如“包含Fc区的结合蛋白”,也称为“Fc融合蛋白”(例如抗体或免疫粘附素))的上下文中指代此区。

[0101] “效应子功能”是指抗体Fc区与Fc受体或配体的相互作用或由此产生的生化事件。示例性的“效应子功能”包括C1q结合、补体依赖性细胞毒性(CDC)、Fc受体结合、Fc $\gamma$ R介导的效应子功能(如ADCC和抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP))、和细胞表面受体(例如,B细胞受体;BCR)的下调。此类效应子功能通常需要Fc区与结合结构域(例如抗体可变结构域)组合。

[0102] “Fc受体”或“FcR”是与免疫球蛋白的Fc区结合的受体。与IgG抗体结合的FcR包含Fc $\gamma$ R家族的受体,包括这些受体的等位基因变体并且可替代地包括剪接形式。Fc $\gamma$ R家族由三种激活性受体(小鼠中的Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RIII和Fc $\gamma$ RIV;人中的Fc $\gamma$ RIA、Fc $\gamma$ RIIA和Fc $\gamma$ RIIIA)和一个抑制性受体(Fc $\gamma$ RIIB)组成。表1中总结了人Fc $\gamma$ R的各种特性。大多数先天性效应细胞类型共表达一种或多种激活性Fc $\gamma$ R和抑制性Fc $\gamma$ RIIB,而自然杀伤(NK)细胞选择性地表达一种激活性Fc受体(小鼠中的Fc $\gamma$ RIII和人中的Fc $\gamma$ RIIIA),但在小鼠和人中不表达抑制性Fc $\gamma$ RIIB。人IgG1与大多数人Fc受体结合,就其所结合的激活性Fc受体的类型而言,所述人IgG1被认为等同于鼠IgG2a。

[0103] 表1. 人Fc $\gamma$ R的特性

Fc $\gamma$	等位基因 变体	对人IgG的亲 和力	同种型偏好	细胞分布
Fc $\gamma$ RI (CD64)	未描述	高 (K <sub>D</sub> 为约 10 nM)	IgG1=3>4>>2	单核细胞、巨噬细胞、激 活的嗜中性粒细胞、树突 细胞?
Fc $\gamma$ RIIA (CD32a)	H131	低到中	IgG1>3>2>4	嗜中性粒细胞、单核细胞、 巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、 树突细胞、血小板
	R131	低	IgG1>3>4>2	
Fc $\gamma$ RIIA CD16a)	V158	中	IgG1=3>>4>2	NK细胞、单核细胞、巨噬 细胞、肥大细胞、嗜酸性 粒细胞、树突细胞?
	F158	低	IgG1=3>>4>2	
Fc $\gamma$ RIIB (CD32b)	I232	低	IgG1=3=4>2	B细胞、单核细胞、巨噬细 胞、树突细胞、肥大细胞
	T232	低	IgG1=3=4>2	

[0105] “铰链”、“铰链结构域”或“铰链区”或“抗体铰链区”是指重链恒定区的结构域，其将CH1结构域与CH2结构域连接并且包括所述铰链的上部、中部和下部 (Roux等人 J. Immunol. 1998 161:4083)。铰链提供了在抗体的结合区与效应子区之间不同水平的柔性，并且还提供了在两个重链恒定区之间的分子间二硫键键合的位点。如本文所用，对于所有IgG同种型，铰链在Glu216处开始并且在Gly237处结束 (Roux等人, 1998 J Immunol 161:4083)。表2中示出了野生型IgG1、IgG2、IgG3和IgG4铰链的序列。

[0106] 表2.

#### 铰链区氨基酸

Ig类型	C末端 CH1*	上部铰链	中部铰链	下部铰链
IgG1	VDKRV (SEQ ID NO:57)	EPKSCDKTHT (SEQ ID NO:59)	CPPCP (SEQ ID NO:64)	APELLGG (SEQ ID NO:70)
IgG2	VDKTV (SEQ ID NO:58)	ERK (SEQ ID NO:60)	CCVECPCP (SEQ ID NO:65)	APPVAG (SEQ ID NO:71)
IgG3 (17-15-15)	VDKRV	ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO:61)	CPRCP (SEQ ID NO:66) (EPKSCDTPPPCPRCP) <sub>3</sub> (SEQ ID NO:67)	APELLGG
[0108] IgG3 (17-15-15)	VDKRV	ELKTPLGDTTHT	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP) <sub>2</sub>	APELLGG
IgG3 (17-15)	VDKRV	ELKTPLGDTTHT	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP) <sub>1</sub>	APELLGG
IgG3 (15-15-15)	VDKRV	EPKS (SEQ ID NO:62)	CDTPPPCPRCP (SEQ ID NO:68) (EPKSCDTPPPCPRCP) <sub>2</sub>	APELLGG
IgG3 (15) IgG4	VDKRV VDKRV	EPKS ESKYGPP (SEQ ID NO:63)	CDTPPPCPRCP CPSCP (SEQ ID NO:69)	APELLGG APEFLGG

[0109] \*CH1结构域的C末端氨基酸序列。

[0110] 术语“铰链”包括野生型铰链(如表3中列出的那些)及其变体(例如非天然存在的铰链或经修饰的铰链)。例如,术语“IgG2铰链”包括如表3中所示的野生型IgG2铰链以及具有1、2、3、4、5、1-3、1-5、3-5个和/或至多5、4、3、2或1个突变(例如替代、缺失或添加)的变体。示例性的IgG2铰链变体包括其中1、2、3或全部4个半胱氨酸(C219、C220、C226和C229)被改变为另一个氨基酸的IgG2铰链。在特定实施方案中,IgG2铰链包含C219X或C220X取代,其中X是除半胱氨酸以外的任何氨基酸。IgG2铰链可以包含取代,所述取代单独地或与重链或轻链的其他区域中的一个或多个取代一起导致包含所述铰链的抗体采用A或B形式(参见例如Allen等人(2009) *Biochemistry* 48:3755)。在某些实施方案中,铰链是包含来自至少两个同种型的序列的杂合体铰链。例如,铰链可以包含来自一个同种型的上部、中部或下部铰链,并且所述铰链的其余部分来自一个或多个其他同种型。例如,铰链可以是IgG2/IgG1铰链,并且可以包含例如IgG2的上部和中部铰链以及IgG1的下部铰链。铰链可以具有效应子功能或失去效应子功能。例如,野生型IgG1的下部铰链提供效应子功能。

[0111] “非IgG2”铰链是指不是IgG2同种型的铰链。

[0112] 术语“CH1结构域”是指将可变结构域与重链恒定结构域中的铰链连接的重链恒定区。如本文所用,CH1结构域在A118处开始并且在V215处结束。术语“CH1结构域”包括野生型CH1结构域(如对于IgG1,具有SEQ ID NO:2,并且对于IgG2,具有SEQ ID NO:7;表3)及其变体(例如,非天然存在的CH1结构域或经修饰的CH1结构域)。例如,术语“CH1结构域”包括野生型CH1结构域及其具有1、2、3、4、5、1-3、1-5、3-5和/或至多5、4、3、2或1个突变(例如取代、缺失或添加)的变体。示例性的CH1结构域包括具有突变的CH1结构域,所述突变改变抗体的生物活性,如ADCC、CDC或半衰期。本文提供对CH1结构域的修饰,所述修饰影响抗体的生物活性。

[0113] 术语“CH2结构域”是指将重链恒定结构域中的铰链与CH3结构域连接的重链恒定区。如本文所用,CH2结构域在P238处开始并且在K340处结束。术语“CH2结构域”包括野生型CH2结构域(如对于IgG1,具有SEQ ID NO:4;表3)以及其变体(例如,非天然存在的CH2结构域或经修饰的CH2结构域)。例如,术语“CH2结构域”包括野生型CH2结构域及其具有1、2、3、4、5、1-3、1-5、3-5和/或至多5、4、3、2或1个突变(例如取代、缺失或添加)的变体。示例性的CH2结构域包括具有突变的CH2结构域,所述突变改变抗体的生物活性,如ADCC、CDC或半衰期。在某些实施方案中,CH2结构域包含降低效应子功能的取代A330S/P331S。本文提供对CH2结构域的其他修饰,所述其他修饰影响抗体的生物活性。

[0114] 术语“CH3结构域”是指在重链恒定结构域中的CH2结构域的C末端的重链恒定区。如本文所用,CH3结构域在G341处开始并且在K447处结束。术语“CH3结构域”包括野生型CH3结构域(如对于IgG1,具有SEQ ID NO:5;表3)以及其变体(例如,非天然存在的CH3结构域或经修饰的CH3结构域)。例如,术语“CH3结构域”包括野生型CH3结构域及其具有1、2、3、4、5、1-3、1-5、3-5和/或至多5、4、3、2或1个突变(例如取代、缺失或添加)的变体。示例性的CH3结构域包括具有突变的CH3结构域,所述突变改变抗体的生物活性,如ADCC、CDC或半衰期。本文提供对CH3结构域的修饰,所述修饰影响抗体的生物活性。

[0115] 表3

[0116]	结构域	氨基酸序列	SEQ ID NO:
	IgG1 CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKV	2
	IgG1 铰链	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG	3
	IgG1 CH2	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	4
	IgG1 CH3	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	5
	IgG2 CH1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFG TQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV	7
	IgG2 铰链	ERKCCVECPAPPVAG	8
	IgG2 CH2	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQD WLNQKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK	9
	IgG2 CH3	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPMLDSGDFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	10
[0117]	IgG3 CH1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRV	12
	IgG3 铰链	ELKTPGDTTHTCPRCE	13
	IgG3 CH2	PKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPC PRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRV VSVLTVLHQDWLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTK	14
	IgG3 CH3	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESSGQPENNYNTTPMLDSGDFFLYSKLTVDKSR WQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK	15
	IgG4 CH1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT KTYTCNVDHKPSNTKVDKRV	17
	IgG4 铰链	ESKYGPPCPCPAPEFLGG	18
	IgG4 CH2	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK	
	IgG4 CH3	GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK	20

[0118] 如本文所用,术语“单克隆抗体”是指对特定表位展示出单一结合特异性和亲和力的抗体,或抗体组合物,在所述抗体组合物中所有抗体对特定表位展示出单一结合特异性和亲和力。通常,此类单克隆抗体将衍生自编码所述抗体的单个细胞或核酸,并且将在没有故意引入任何序列改变的情况下繁殖。因此,术语“人单克隆抗体”是指具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变和任选恒定区的单克隆抗体。在一个实施方案中,人单克隆抗体是由杂交瘤产生的,所述杂交瘤是例如通过融合获自转基因或转染色体非人动物(例如,具有

包含人重链转基因和轻链转基因的基因组的转基因小鼠)的B细胞与永生化细胞而获得的。

[0119] 如本文所用,术语“重组人抗体”包括通过重组方法制备、表达、产生或分离的所有人抗体,如(a)从对于人免疫球蛋白基因而言是转基因或转染色体的动物(例如,小鼠)或者由其制备的杂交瘤分离的抗体,(b)从转化用于表达所述抗体的宿主细胞(例如从转染瘤)分离的抗体,(c)从重组的组合人抗体文库分离的抗体,和(d)通过涉及将人免疫球蛋白基因序列剪接到其他DNA序列的任何其他手段制备、表达、产生或分离的抗体。此类重组人抗体包含可变区和恒定区,所述可变区和恒定区利用特定人种系免疫球蛋白序列(由种系基因编码),但包括发生在例如抗体成熟过程中的后续重排和突变。如本领域中已知的(参见例如Lonberg (2005) *Nature Biotech.* 23 (9):1117-1125),可变区含有由如下各种基因编码的抗原结合结构域,所述各种基因重排以形成对外来抗原具有特异性的抗体。除重排外,还可以通过多个单氨基酸变化(称为体细胞突变或超突变)进一步修饰可变区,以增加抗体对外来抗原的亲和力。进一步响应于抗原,恒定区将改变(即,同种型转换)。因此,编码对抗原有反应的轻链和重链免疫球蛋白多肽的重排或体细胞突变的核酸序列可以与原始种系序列不相同,但基本上相同或相似(即,具有至少80%同一性)。

[0120] “人”抗体(HuMAb)是指具有可变区的其中框架区和CDR区二者均衍生自人种系免疫球蛋白序列的抗体。此外,如果抗体含有恒定区,则恒定区也衍生自人种系免疫球蛋白序列。本文描述的抗体可以包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变)。然而,如本文所用,术语“人抗体”不旨在包括其中衍生自另一种哺乳动物物种(如小鼠)的种系的CDR序列已经被移植到人框架序列上的抗体。术语“人”抗体和“完全人”抗体同义使用。

[0121] “人源化”抗体是指其中非人抗体的CDR结构域外的一些、大部分或所有氨基酸被衍生自人免疫球蛋白的相应氨基酸替代的抗体。在人源化形式的抗体的一个实施方案中,CDR结构域外的一些、大部分或所有氨基酸已被来自人免疫球蛋白的氨基酸替代,而一个或多个CDR区内的一些、大部分或所有氨基酸未改变。氨基酸的少量添加、缺失、插入、取代或修饰是被允许的,只要它们不消除抗体结合特定抗原的能力即可。“人源化”抗体保留与原始抗体相似的抗原特异性。

[0122] “嵌合抗体”是指其中可变区衍生自一个物种并且恒定区衍生自另一物种的抗体,如其中可变区衍生自小鼠抗体并且恒定区衍生自人抗体的抗体。

[0123] “双特异性”或“双功能抗体”是具有两个不同的重链/轻链对从而产生了对不同抗原具有特异性的两个抗原结合位点的人工杂合体抗体。双特异性抗体可以通过多种方法产生,所述方法包括杂交瘤的融合或Fab'片段的连接。参见例如Songsivilai&Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321(1990);Kostelny等人, *J. Immunol.* 148,1547-1553(1992)。

[0124] 短语“识别抗原的抗体”和“对抗原具有特异性的抗体”与术语“与抗原特异性地结合的抗体”在本文中可互换使用。

[0125] 如本文所用,“分离的抗体”旨在指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体(例如,与抗原“x”特异性地结合的分离的抗体基本上不含特异性地结合除抗原“x”以外的抗原的抗体)。然而,与抗原“x”的表位特异性地结合的分离的抗体可能与来自不同物种的其他抗原“x”蛋白具有交叉反应性。

[0126] 如本文所用,“激动剂抗体”是指作为共刺激受体的激动剂的抗体,例如能够通过

刺激蛋白质(如B7-1、B7-2、CD28、4-1BB(CD137)、4-1BBL、GITR、ICOS、ICOS-L、OX40、OX40L、CD70、或CD27、DR3或CD28H蛋白)的活性从而刺激免疫细胞(例如T细胞)来增强受试者的免疫系统(或免疫应答)的抗体。在某些实施方案中,激动剂抗体是增强抑制性受体例如CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、或LAG-3、TIM-3、半乳糖凝集素9、CEACAM-1、BTLA、CD69、半乳糖凝集素-1、TIGIT、CD113、GPR56、VISTA、2B4、CD48、GARP、CD73、PD1H、LAIR1、TIM-1或TIM-4的活性从而抑制免疫应答的抗体。

[0127] 如本文所用,“拮抗剂抗体”是指作为免疫细胞(例如T细胞)上的抑制信号的拮抗剂的抗体,例如能够抑制或阻断如下蛋白质的抗体,所述蛋白质(例如,免疫检查点抑制剂)例如为CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、或LAG-3、TIM-3、半乳糖凝集素9、CEACAM-1、BTLA、CD69、半乳糖凝集素-1、TIGIT、CD113、GPR56、VISTA、2B4、CD48、GARP、CD73、PD1H、LAIR1、TIM-1或TIM-4抑制T细胞激活从而刺激免疫应答。在某些实施方案中,拮抗剂抗体是抑制刺激性受体(例如,B7-1、B7-2、CD28、4-1BB(CD137)、4-1BBL、GITR、ICOS、ICOS-L、OX40、OX40L、CD70、或CD27、DR3或CD28H)的活性从而抑制免疫应答的抗体。

[0128] 激动剂抗体和拮抗剂抗体二者均会导致放大抗原特异性T细胞应答,或导致抑制抗原特异性T细胞应答(免疫检查点调节剂)。

[0129] 术语“表位”或“抗原决定簇”是指抗原(例如GITR)上免疫球蛋白或抗体所特异性地结合的位点。蛋白质抗原中的表位可以由连续氨基酸(通常为线性表位)形成,或由通过蛋白质的三级折叠并置的非连续氨基酸(通常为构象表位)形成。由连续氨基酸形成的表位通常(但不总是)在暴露于变性溶剂时保留,然而通过三级折叠形成的表位通常在用变性溶剂处理时丢失。表位通常包含处于独特空间构象的至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个氨基酸。用于确定给定抗体结合哪些表位的方法(即表位作图)是本领域熟知的,并且包括例如免疫印迹和免疫沉淀测定,其中测试重叠或连续肽与给定抗体的反应性。确定表位的空间构象的方法包括本领域中的技术和本文描述的那些技术,例如X射线晶体学、二维核磁共振和HDX-MS(参见例如Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology,第66卷,G.E.Morris,编著(1996))。

[0130] 如本文所用的应用于对象的术语“天然存在的”是指对象可以在自然界中发现的事实。例如,存在于生物(包括病毒)中的可以从天然来源分离且尚未经实验室的人员有意修饰的多肽或多核苷酸序列是天然存在的。

[0131] “多肽”是指包含至少两个连续连接的氨基酸残基的链,所述链的长度没有上限。蛋白质中的一个或多个氨基酸残基可以含有修饰,例如但不限于糖基化、磷酸化或二硫键。“蛋白质”可以包含一种或多种多肽。

[0132] 如本文所用,术语“核酸分子”旨在包括DNA分子和RNA分子。核酸分子可以是单链或双链的,并且可以是cDNA。

[0133] 还提供了本文所述的序列的“保守序列修饰”,包括例如保守的核苷酸和氨基酸取代以及核苷酸和氨基酸添加和缺失。例如,可以通过本领域已知的标准技术(如定点诱变和PCR介导的诱变)将修饰引入SEQ ID NO:1-74中。保守序列修饰包括保守氨基酸取代,其中将氨基酸残基用具有相似侧链的氨基酸残基替代。本领域已经定义了具有相似侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括具有以下项的氨基酸:碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰

胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性的侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、 $\beta$ -分支侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)、以及芳香族侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。

[0134] 在一个实施方案中,对重链恒定区或其结构域的氨基酸序列修饰不会修饰或消除重链恒定区的某些特性。这些特性包括例如较链的刚性或硬度以及抗体的激动剂或拮抗剂活性。在某些实施方案中,对重链恒定区或其结构域的氨基酸序列修饰确实修饰或消除了重链恒定区的某些特性。

[0135] 鉴定消除和/或不消除抗体和/或恒定区特性的氨基酸保守取代的方法是本领域熟知的,例如,如本文实施例部分中所描述的。

[0136] 对于核酸,术语“实质同源性”指示当最佳比对和比较时,两个核酸或其指定的序列在至少约80%的核苷酸、通常至少约90%至95%的核苷酸、以及更优选至少约98%至99.5%的核苷酸中是相同的,其中具有适当的核苷酸插入或缺失。可替代地,当区段在选择性杂交条件下与链的互补体杂交时,存在实质同源性。

[0137] 对于多肽,术语“实质同源性”指示当最佳比对和比较时,两个多肽或其指定的序列在至少约80%的氨基酸、通常至少约90%至95%、以及更优选至少约98%至99.5%的氨基酸中相同,其中具有适当的氨基酸插入或缺失。

[0138] 两个序列之间的同一性百分比是当序列进行最佳比对时序列共有的相同位置数的函数(即,同源性% = 相同位置数/总位置数 $\times$  100),其中确定的最佳比对考虑了空位的数量以及每个空位的长度,需要引入这些空位以实现两个序列的最佳比对。序列的比较和两个序列之间的同一性百分比的确定可以使用数学算法来完成,如以下非限制性例子中所描述的。

[0139] 可以使用GCG软件包(可以在<http://www.gcg.com>上获得)中的GAP程序,使用NWSgapdna.CMP矩阵和空位权重40、50、60、70或80和长度权重1、2、3、4、5或6来确定两个核苷酸序列之间的同一性百分比。也可以使用已并入ALIGN程序(2.0版)的E.Meyers和W.Miller(CABIOS, 4:11-17(1989))的算法,使用PAM120权重残基表、空位长度罚分12和空位罚分4来确定两个核苷酸或氨基酸序列之间的同一性百分比。此外,可以使用已并入GCG软件包(可以在<http://www.gcg.com>上获得)中的GAP程序中的Needleman和Wunsch(J.Mol.Biol. (48):444-453(1970))的算法,使用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵以及空位权重16、14、12、10、8、6或4和长度权重1、2、3、4、5或6来确定两个氨基酸序列之间的同一性百分比。

[0140] 本文描述的核酸和蛋白质序列还可以用作“查询序列”,以在公共数据库中进行搜索从而例如鉴定相关序列。可以使用Altschul等人(1990)J.Mol.Biol. 215:403-10的NBLAST和XBLAST程序(2.0版)进行此类搜索。BLAST核苷酸搜索可用NBLAST程序来进行,得分=100,字长=12,以获得与本文描述的核酸分子同源的核苷酸序列。BLAST蛋白质搜索可用XBLAST程序来进行,得分=50,字长=3,以获得与本文描述的蛋白质分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的空位比对,可以如Altschul等人,(1997)Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402中所描述的使用空位BLAST(Gapped BLAST)。当使用BLAST和空位BLAST程序时,可以使用各程序(例如XBLAST和NBLAST)的默认参数。参见[www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)。

[0141] 如本文所用,术语“抗原”是指任何天然或合成的免疫原性物质,如蛋白质、肽或半抗原。抗原可以是全长或成熟蛋白或其片段。

[0142] “免疫应答”是指脊椎动物内针对外来因子(agent)的生物反应,所述反应保护生物免受这些因子和由其引起的疾病的侵害。免疫应答是由免疫系统的细胞(例如,T淋巴细胞、B淋巴细胞、天然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、树突细胞或嗜中性粒细胞)和通过这些细胞或肝脏中的任何一种产生的可溶性大分子(包括抗体、细胞因子和补体)的作用介导的,所述作用导致选择性靶向、结合、损伤、破坏和/或消除脊椎动物中侵入的病原体、感染病原体的细胞或组织、癌性或其他异常细胞,或者在自身免疫性或病理性炎症的情况下导致选择性靶向、结合、损伤、破坏和/或消除正常的人细胞或组织。免疫反应包括例如T细胞(例如效应T细胞(如CD4+或CD8+T细胞)或Th细胞)的激活或抑制,或Treg细胞的抑制。

[0143] “免疫调节剂”(“immunomodulator”或“immunoregulator”)是指可以参与调制、调节或修饰免疫应答的药剂,例如信号传导途径的组分。“调节”(“modulating”、“regulating”)或“修饰”免疫应答是指免疫系统的细胞或这种细胞(例如,效应T细胞)的活性的任何改变。这种调节包括对免疫系统的刺激或抑制,这可以通过各种细胞类型数量的增加或减少、这些细胞的活性的增加或降低或免疫系统内可能发生的任何其他变化来显示。已经鉴定了抑制性和刺激性免疫调节剂,其中一些在肿瘤微环境中可能具有增强的功能。在优选的实施方案中,所述免疫调节剂位于T细胞的表面上。“免疫调节靶标”(“immunomodulator”或“immunoregulator”)是如下免疫调节剂,所述免疫调节剂被靶向用于与物质、药剂、部分、化合物或分子结合,并且所述免疫调节剂的活性通过物质、药剂、部分、化合物或分子的结合而改变。免疫调节靶标包括例如细胞表面上的受体(“免疫调节受体”)和受体配体(“免疫调节配体”)。

[0144] “免疫疗法”是指通过包括诱导、增强、抑制或以其他方式修饰免疫应答的方法治疗患有疾病或者有感染疾病或遭受疾病复发风险的受试者。

[0145] “免疫刺激疗法”或“免疫刺激性疗法”是指导致增加(诱导或增强)受试者中的免疫应答从而例如治疗癌症的疗法。

[0146] “增强内源性免疫应答”意指增加受试者中现有免疫应答的有效性或效力。有效性和效力的这种提高可以例如通过以下方式来实现:克服抑制内源宿主免疫应答的机制或者刺激增强内源性宿主免疫应答的机制。

[0147] “T效应”(“T<sub>eff</sub>”)细胞是指具有细胞溶解活性的T细胞(例如CD4+和CD8+T细胞)以及分泌细胞因子并激活和引导其他免疫细胞的T辅助(Th)细胞,但不包括调节性T细胞(Treg细胞)。

[0148] 如本文所用,术语“连接的”是指两个或更多个分子的缔合。所述连接可以是共价的或非共价的。所述连接也可以是遗传的(即重组融合的)。可以使用多种本领域公认的技术(如化学缀合和重组蛋白生产)来实现此类连接。

[0149] 如本文所用,术语“给予”是指使用本领域技术人员已知的任何不同方法和递送系统将包含治疗剂的组合物物理引入受试者。本文描述的抗体的优选给予途径包括静脉内、腹膜内、肌内、皮下、脊髓或其他肠胃外给予途径,例如通过注射或输注。如本文所用,短语“肠胃外给予”意指除肠内和局部给予以外的给予模式(通常通过注射给予)并且包括但不

限于静脉内、腹膜内、肌内、动脉内、鞘内、淋巴内、病灶内、囊内、眼眶内、心脏内、皮内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注以及体内电穿孔。可替代地,本文描述的抗体可以经由非肠胃外途径(如局部、表皮或粘膜给予途径)给予,例如鼻内、口服、阴道、直肠、舌下或局部给予。给予还可以例如进行一次、多次和/或经一个或多个延长的时间段。

[0150] 如本文所用,术语“T细胞介导的应答”是指由T细胞介导的应答,所述T细胞包括效应T细胞(例如CD8<sup>+</sup>细胞)和辅助T细胞(例如CD4<sup>+</sup>细胞)。T细胞介导的应答包括例如T细胞的细胞毒性和增殖。

[0151] 如本文所用,术语“细胞毒性T淋巴细胞(CTL)应答”是指由细胞毒性T细胞诱导的免疫应答。CTL应答主要由CD8<sup>+</sup> T细胞介导。

[0152] 如本文所用,术语“抑制”或“阻断”(例如,指配体对其受体或对随后的细胞内应答的抑制/阻断)可互换使用,并且包括部分和完全抑制/阻断。在一些实施方案中,抗体将结合抑制至少约50%,例如至少约60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%,例如,如本文进一步描述所确定的。

[0153] 如本文所用,“癌症”是指广泛的一组疾病,其特征在于体内异常细胞的不受控制的生长。不受调节的细胞分裂可导致恶性肿瘤或细胞的形成,所述恶性肿瘤或细胞侵入邻近组织并且可以通过淋巴系统或血流转移到身体的远端部分。

[0154] 如本文所用,术语“治疗”(“treat”、“treating”和“treatment”)是指对受试者进行的任何类型的干预或过程,目的是逆转、减轻、缓解、抑制或减缓或防止症状、并发症、病症或与疾病有关的生化指标的进展、发展、严重程度或复发。预防是指向未患疾病的受试者给予以预防疾病的发生或(如果发生疾病)使疾病的影响减至最小。

[0155] “血液恶性肿瘤”包括淋巴瘤、白血病、骨髓瘤或淋巴恶性肿瘤以及脾和淋巴结的癌症。示例性淋巴瘤包括B细胞淋巴瘤和T细胞淋巴瘤两者。B细胞淋巴瘤包括霍奇金淋巴瘤(Hodgkin's lymphomas)和大多数非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphomas)两者。B细胞淋巴瘤的非限制性例子包括弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、粘膜相关淋巴组织淋巴瘤、小细胞淋巴瘤(与慢性淋巴细胞性白血病重叠)、套细胞淋巴瘤(MCL)、伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、纵隔大B细胞淋巴瘤、华氏巨球蛋白血症(Waldenström macroglobulinemia)、淋巴结边缘区B细胞淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、淋巴瘤样肉芽肿病。T细胞淋巴瘤的非限制性例子包括淋巴结外T细胞淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤和血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤。血液恶性肿瘤还包括白血病,例如但不限于继发性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病和急性淋巴母细胞性白血病。血液恶性肿瘤还包括骨髓瘤,例如但不限于多发性骨髓瘤和冒烟型多发性骨髓瘤。术语血液恶性肿瘤包括其他血液癌症和/或B细胞或T细胞相关的癌症。

[0156] 将术语“有效剂量”(“effective dose”或“effective dosage”)定义为足以达到或至少部分达到所需效果的量。“治疗有效量”或“治疗有效剂量”的药物或治疗剂是当单独地或与另一种治疗剂组合使用时,促进通过疾病症状的严重程度的降低、无疾病症状时期的频率和持续时间的增加或由于疾病困扰引起的损伤或残疾的预防所证实的疾病消退的任何量的药物。“预防有效量”或“预防有效剂量”的药物是当单独地或与另一种治疗剂组合

给予至处于发展疾病或发生疾病复发的风险的受试者时,抑制疾病的发展或复发的量的药物。可以使用本领域技术人员已知的各种方法评价治疗剂或预防剂促进疾病消退或抑制疾病发展或复发的能力,如在临床试验期间的人类受试者中、在预测人类中功效的动物模型系统中、或通过测定药剂在体外测定中的活性来评价。

[0157] 举例来说,抗癌剂是在受试者中减缓癌症进展或促进癌症消退的药物。在优选的实施方案中,治疗有效量的药物促进癌症消退至消除癌症的程度。“促进癌症消退”意指单独地或与抗肿瘤剂组合给予有效量的药物导致肿瘤生长或大小的减小、肿瘤坏死、至少一种疾病症状的严重程度降低、无疾病症状时期的频率和持续时间的增加、由于疾病困扰引起的损伤或伤残的预防、或者患者中疾病症状以其他方式的改善。药理学有效性是指药物促进患者中癌症消退的能力。生理安全性是指由药物的给予引起的在细胞、器官和/或生物水平上可接受的低水平毒性或其他不利生理效应(不利效应)。

[0158] 对于肿瘤的治疗举例来说,相对于未治疗的受试者,治疗有效量或剂量的药物优选抑制细胞生长或肿瘤生长至少约20%、更优选至少约40%、甚至更优选至少约60%、以及还更优选至少约80%。在最优选的实施方案中,治疗有效量或剂量的药物完全抑制细胞生长或肿瘤生长,即,优选100%抑制细胞生长或肿瘤生长。可以使用下文描述的测定来评价化合物抑制肿瘤生长的能力。可替代地,可以通过检查化合物抑制细胞生长的能力来评价化合物的这种特性,可以通过技术人员已知的测定在体外测量这种抑制。在本文描述的其他优选的实施方案中,可以观察到肿瘤消退并且可以持续至少约20天、更优选至少约40天、或甚至更优选至少约60天的时间。

[0159] 术语“患者”和“受试者”是指接受预防性或治疗性治疗的任何人或非人动物。例如,本文描述的方法和组合物可用于治疗患有癌症的受试者。术语“非人动物”包括所有脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物,如非人灵长类、绵羊、狗、母牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。

[0160] 在以下小节中将进一步详细描述本文所述的各个方面。

[0161] I. 经修饰的重链恒定区

[0162] 本文描述了“经修饰的重链恒定区”,当存在于抗体中时相对于不具有经修饰的重链恒定区的相同抗体(如含非IgG2铰链的抗体,例如IgG1抗体),增强或改变抗体的某些生物学特性或特征。抗体的增强或改变的生物学特性包括:

[0163] (a) 增加或改变的细胞内化;

[0164] (b) 增加或改变的激动剂活性;

[0165] (c) 增加或改变的拮抗剂活性或阻断活性;

[0166] (d) 增强的ADCC;

[0167] (d) 产生新的特性;

[0168] (e) 增加或改变的信号转导;

[0169] (f) 形成较大的抗体/抗原交联复合物;

[0170] (g) 靶细胞表面分子的增加的聚集或低聚;

[0171] (h) 免疫应答的增加的刺激或增强;和/或

[0172] (i) 对免疫应答的增加的抑制。

[0173] 本文还提供了包含重链的抗体,所述重链包含调节效应子功能,例如降低效应子

功能的一个或多个氨基酸突变。

[0174] 在某些实施方案中,包含经修饰的重链恒定区的抗体相对于不包含经修饰的重链恒定区并且包含例如IgG1重链的相同抗体,更有效地介导抗体依赖性受体(或配体或表面分子)内化,例如,在所述抗体与其在细胞膜上的靶标结合后,所述抗体以更高的内化速率和/或程度使靶分子或表面分子(例如受体或配体)内化和/或使自身内化至细胞中。抗体内化的速率和程度可以例如如实施例中所示来确定。如例如通过内化的 $T_{1/2}$ 所测量的内化速率(如实施例中所示)可以增强或增加至少10%、30%、50%、75%、2倍、3倍、5倍或更多,从而导致 $T_{1/2}$ 降低至少10%、30%、50%、75%、2倍、3倍、5倍或更多。例如,代替具有10分钟的 $T_{1/2}$ ,经修饰的重链恒定区可以增加内化速率,从而将 $T_{1/2}$ 缩短至5分钟(即内化速率增加2倍或 $T_{1/2}$ 缩短2倍)。将“ $T_{1/2}$ ”定义为达到最大内化的一半的时间,如从将抗体添加至细胞的时间开始测量的。在某些实施方案中, $T_{1/2}$ 缩短至少10分钟、30分钟或1小时。内化的最大水平可以是针对抗体浓度或时间绘制的代表内化的图的平台处的内化水平。经修饰的重链恒定区可以使抗体的最大内化水平提高至少10%、30%、50%、75%、2倍、3倍、5倍或更多。比较不同抗体(如具有经修饰的重链恒定区的抗体和不具有经修饰的重链恒定区的相同抗体)的内化效力的另一种方法是通过比较给定抗体浓度(例如100nM)下和/或在给定时间(例如2分钟、5分钟、10分钟或30分钟)它们的内化水平。还可以通过比较内化的 $EC_{50}$ 水平来比较内化的水平。一种抗体的内化水平可以相对于给定的(参考)抗体(例如本文描述的抗体,例如11F11或CD73.4-IgG2CS-IgG1)来定义,并且可以表示为用给定(参考)抗体获得的值的百分比。可以将内化程度提高至少10%、30%、50%、75%、2倍、3倍、5倍或更多,如通过这些方法中的任何一种所比较的。

[0175] 在某些实施方案中,包含经修饰的重链恒定区的抗体相对于不包含经修饰的重链恒定区并且包含例如IgG1重链的相同抗体,具有更有力的激动剂活性。在某些实施方案中,增强的激动剂活性增强了靶分子(例如GITR)或者刺激或共刺激免疫应答的其他分子的刺激活性,例如T细胞活性。在某些实施方案中,增强的激动剂活性增强了抑制免疫应答的靶分子(例如检查点抑制剂)的抑制活性,例如T细胞活性。调节T细胞活性的抗体的增强的激动剂活性可以例如如实施例中所示,例如通过测量来自与抗体接触的T细胞的IFN- $\gamma$ 或IL-2分泌水平来确定。与刺激性靶标结合的抗体的激动剂活性可以增强至少10%、30%、50%、75%、2倍、3倍、5倍或更多,如通过效应T细胞的增加的细胞因子释放或增加的增殖所定义的;如果在Treg上的接合降低Treg功能,则通过降低的T调节细胞活性来定义;或通过增加的Treg耗竭来定义。例如,用包含经修饰的重链恒定区的与刺激性靶标结合的抗体刺激的T细胞所分泌的IFN- $\gamma$ 或IL-2的量可以比用不包含经修饰的重链恒定区的相同抗体刺激的T细胞所分泌的IFN- $\gamma$ 或IL-2的量高至少10%、30%、50%、75%、2倍、3倍、5倍或更多。与抑制性靶标结合的抗体的激动剂活性可以增强至少10%、30%、50%、75%、2倍、3倍、5倍或更多,如通过减少的细胞因子释放或减少的效应T细胞增殖;增加的T调节细胞活性;或减少的Treg耗竭所确定的。例如,用包含经修饰的重链恒定区的与抑制性靶标结合的抗体刺激的T细胞所分泌的IFN- $\gamma$ 或IL-2的量可以比用不包含经修饰的重链恒定区的相同抗体刺激的T细胞所分泌的IFN- $\gamma$ 或IL-2的量低至少10%、30%、50%、75%、2倍、3倍、5倍或更多。

[0176] 在某些实施方案中,包含经修饰的重链恒定区的抗体相对于不包含经修饰的重链恒定区并且包含例如IgG1重链的相同抗体,具有更有力的拮抗剂活性或阻断活性。可以例

如通过在包括T细胞激活条件的情况下测量细胞因子释放和/或增殖来确定抗体的增强的拮抗剂活性。拮抗剂活性可以增强至少10%、30%、50%、75%、2倍、3倍、5倍或更多。

[0177] 在某些实施方案中,包含经修饰的重链恒定区的抗体相对于不包含经修饰的重链恒定区并且包含例如IgG1重链的相同抗体,具有增强的ADCC活性。可以根据本领域已知的方法确定增强的ADCC。ADCC可以增强至少10%、30%、50%、2倍、5倍或更多。

[0178] 在某些实施方案中,包含经修饰的重链恒定区的抗体相对于不包含经修饰的重链恒定区并且包含例如IgG1重链的相同抗体,具有形成更大的抗体/抗原交联复合物的能力。可以如例如在实施例中所描述的确形成复合物的能力。与包含经修饰的重链恒定区的抗体形成的抗体/抗原复合物可以比与不包含经修饰的重链恒定区的相同抗体形成的复合物大至少50%、2倍、3倍、5倍或10倍。在某些实施方案中,至少2,000kDa、3,000kDa、5000kDa、10,000kDa、50,000kDa或100,000kDa的复合物是用具有经修饰的重链恒定区的抗体形成的。

[0179] 在某些实施方案中,包含经修饰的重链恒定区的抗体相对于不包含经修饰的重链恒定区并且包含例如IgG1重链的相同抗体,触发细胞表面上的靶分子更多的聚集或低聚。可以例如通过测量抗体/抗原复合物的的大小来确定聚集或低聚的程度。

[0180] 在某些实施方案中,包含经修饰的重链恒定区的抗体相对于不包含经修饰的重链恒定区并且包含例如IgG1重链的相同抗体,转导更高水平或不同类型的信号传导或信号转导。可以通过确定信号转导途径中一种或多种蛋白质的激活水平来监测信号转导。在某些实施方案中,通过测量信号转导蛋白例如NFkB或p38的活性(或磷酸化)来确定信号转导,如例如实施例中所描述的。由包含经修饰的重链恒定区的抗体触发的信号转导可以比用不包含经修饰的重链恒定区的相同抗体触发的信号转导高或低至少10%、20%、50%、2倍、5倍或更多。例如,相对于用具有IgG1重链的相同抗体获得的信号转导,由与刺激分子(例如,GITR)结合并且包含经修饰的重链恒定区的抗体触发的信号转导可以增强至少10%。例如,NFkB的EC<sub>50</sub>或p38活性(例如,磷酸化)可以降低至少50%、2倍、5倍或更多。

[0181] 在某些实施方案中,包含经修饰的重链恒定区的抗体相对于不包含经修饰的重链恒定区并且包含例如IgG1重链的相同抗体,具有增加的刺激或增强免疫应答或免疫系统的能力。增加的刺激免疫应答或免疫系统的能力可能是由于增强的T细胞共刺激受体的激动剂活性和/或增强的抑制性受体的拮抗剂活性导致的。增加的刺激免疫应答或免疫系统的能力可以在测量免疫应答的测定,例如测量细胞因子或趋化因子释放、细胞溶解活性(在靶细胞上直接测定的或经由检测CD107a或颗粒酶间接测定的)和增殖的变化的测定中通过EC<sub>50</sub>或最大活性水平的倍数增加来反映。刺激免疫应答或免疫系统活性的能力可以增强至少10%、30%、50%、75%、2倍、3倍、5倍或更多。

[0182] 在某些实施方案中,包含经修饰的重链恒定区的抗体相对于不包含经修饰的重链恒定区并且包含例如IgG1重链的相同抗体,具有增加的抗增殖或抗肿瘤活性。可以例如通过在已用抗体治疗的动物中肿瘤的生长来确定抗体的增强的抗肿瘤活性。抗肿瘤活性可以增强至少10%、30%、50%、75%、2倍、3倍、5倍或更多。抗肿瘤活性可以测量为例如肿瘤负荷的减少,例如通过减少的肿瘤生长动力学和完全的肿瘤消退来显示的。

[0183] 在某些实施方案中,包含经修饰的重链恒定区的抗体相对于不包含经修饰的重链恒定区并且包含例如IgG1重链的相同抗体,具有增加的抑制(“inhibit”或“suppress”)免

疫应答或免疫系统的能力。增加的抑制(“inhibit”或“suppress”)免疫应答或免疫系统的能力可能是由于增强的T细胞共刺激受体的拮抗剂活性和/或增强的抑制性受体的激动剂活性导致的。增加的刺激免疫应答或免疫系统的能力可以在测量免疫应答的测定,例如测量细胞因子或趋化因子释放、细胞溶解活性(在靶细胞上直接测定的或经由检测CD107a或颗粒酶间接测定的)和增殖的变化的测定中通过EC<sub>50</sub>或最大活性水平的倍数增加来反映。抑制(“inhibit”或“suppress”)免疫应答或免疫系统活性的能力可以增强至少10%、30%、50%、75%、2倍、3倍、5倍或更多。

[0184] 在某些实施方案中,与其他重链恒定区例如IgG1、IgG2、IgG3和/或IgG4重链恒定区相比,经修饰的重链恒定区或其一部分(例如铰链)的刚性更大。例如,经修饰的重链恒定区是非天然存在的重链恒定区,与天然存在的重链恒定区或其铰链相比,所述非天然存在的重链恒定区的刚性更大或者具有刚性更大的一部分(例如,铰链)。重链恒定区或其一部分(如铰链)的刚性可以通过例如计算机建模、电子显微镜、光谱法(如核磁共振(NMR)、X射线晶体学(B因子))或用于测量或比较包含所述铰链的抗体的回转半径的沉降速度分析超速离心(AUC)来确定。可替代地,可以通过测量抗体/抗原复合物的大小来确定重链恒定区或其部分的刚性,例如,如本文进一步所述的。

[0185] 包含经修饰的重链恒定区并展现出如根据本领域已知和本文描述的方法所确定的增强的功能特性的抗体应理解为涉及特定活性相对于在具有不同重链恒定区的相同抗体中所观察到的特定活性的在统计上的显著差异。

[0186] 在某些实施方案中,经修饰的重链恒定区包含IgG2同种型的铰链(“IgG2铰链”)以及CH1、CH2和CH3结构域。在某些实施方案中,经修饰的重链恒定区包含IgG2铰链以及CH1、CH2和CH3结构域,其中CH1、CH2和CH3结构域中的至少一个不是IgG2同种型的。在某些实施方案中,经修饰的重链恒定区包含IgG2铰链以及CH1、CH2和CH3结构域,其中所述重链恒定结构域不是野生型IgG2恒定区或者不是具有氨基酸219或220处突变的IgG2恒定区。IgG2铰链可以是野生型IgG2铰链,例如野生型人IgG2铰链(例如,具有SEQ ID NO:8)或其变体,条件是IgG2铰链保留赋予抗体相对于包含非IgG2铰链或包含IgG1重链的相同抗体而言增强的活性的能力。在某些实施方案中,IgG2铰链变体保留与野生型IgG2铰链的刚性或硬度类似的刚性或硬度。铰链的刚性可以通过例如计算机建模、电子显微镜、光谱法(如核磁共振(NMR)、X射线晶体学(B因子))或用于测量或比较包含所述铰链的抗体的回转半径的沉降速度分析超速离心(AUC)来确定。铰链具有相对于另一铰链的刚性类似或更高的刚性,条件是包含所述铰链的抗体具有从在先前句子中描述的测试之一获得的如下值,该值与具有不同铰链(例如IgG1铰链)的相同抗体的值相差少于5%、10%、25%、50%、75%或100%。通过解释这些测试的结果,本领域技术人员将从测试中确定铰链是否具有至少类似于另一铰链的刚性。

[0187] 示例性的人IgG2铰链变体是IgG2铰链,其包含四个半胱氨酸残基(即C219、C220、C226和C229)中一个或多个被另一个氨基酸的取代。半胱氨酸可以由丝氨酸替代。示例性的IgG2铰链是包含C219X突变或C220X突变的人IgG2铰链,其中X是除半胱氨酸以外的任何氨基酸。在某些实施方案中,IgG2铰链不包含C219X和C220X取代二者。在某些实施方案中,IgG2铰链包含C219S或C220S,但不同时包含C219S和C220S。可以使用的其他IgG2铰链变体包括包含C220、C226和/或C229取代(例如C220S、C226S或C229S突变(其可以与C219S突变组

合))的人IgG2铰链。IgG2铰链也可以是其中所述铰链的一部分是另一同种型(即,其是嵌合或杂合体铰链)的一部分的IgG2铰链,条件是嵌合铰链的刚性至少类似于野生型IgG2铰链的刚性。例如,IgG2铰链可以是其中下部铰链(如表2中所定义)属于IgG1同种型并且是例如野生型IgG1下部铰链的IgG2铰链。

[0188] “杂合体”或“嵌合”铰链被称为属于特定的同种型,条件是铰链的连续氨基酸的多于一半来自该同种型。例如,具有IgG2的上部和中部铰链以及IgG1的下部铰链的铰链被认为是IgG2杂合体铰链。

[0189] 在某些实施方案中,抗体包含经修饰的重链恒定区,所述经修饰的重链恒定区包含含有表4中所示的序列(例如以下氨基酸序列之一:8、21、22、23、126-129和134-147)的IgG2铰链。在某些实施方案,铰链包含SEQ ID NO:8、21、126、134或135,其中1、2、3或所有4个氨基酸P233、V234、A235和G237(对应于C末端4个氨基酸“PVAG”(SEQ ID NO:148)是缺失的或被另一个氨基酸(例如IgG1铰链的C末端的氨基酸(ELLG(SEQ ID NO:149)或ELLGG(SEQ ID NO:150))取代。在某些实施方案中,铰链包含SEQ ID NO:8、21、126、134或135,其中V234、A235和G237是缺失的或被另一个氨基酸取代。在某些实施方案中,铰链包含SEQ ID NO:8、21、126、134或135,其中A235和G237是缺失的或被另一个氨基酸取代。在某些实施方案中,铰链包含SEQ ID NO:8、21、126、134或135,其中G237是缺失的或被另一个氨基酸取代。在某些实施方案中,铰链包含SEQ ID NO:8、21、126、134或135,其中V234和A235是缺失的或被另一个氨基酸取代。用IgG1铰链的相应氨基酸(即(ELLG(SEQ ID NO:144)或ELLGG(SEQ ID NO:145))取代IgG2中的PVAG(SEQ ID NO:143)以获得具有SEQ ID NO:22或138(参见例如表4)的杂合体铰链或其变体,从而提供具有IgG2铰链的优点和IgG1铰链的效应子功能的铰链。

[0190] 在某些实施方案中,经修饰的重链恒定区包含由表4中的序列(例如SEQ ID NO:8、21、22、23、127-132和134-141)之一组成或基本上由其组成的铰链,并且在某些实施方案中,所述经修饰的重链恒定区不包含另外的铰链氨基酸残基。

[0191] 表4:示例性IgG2铰链

[0192]

IgG2铰链描述	氨基酸序列	SEQ ID NO:
野生型IgG2	ERKCCVECPCPAPPVAG	8
具有C219S的IgG2	ERKSCVECPCPAPPVAG	21
具有C220S的IgG2	ERKCSVECPCPAPPVAG	126
具有C219X的IgG2	ERKXCVECPCPAPPVAG	134
具有C220X的IgG2	ERKCXVECPCPAPPVAG	135
具有C末端X的野生型IgG2	ERKCCVECPCPAPPVAGX	143
具有C219S和C末端X的IgG2	ERKSCVECPCPAPPVAGX	144
具有C220S和C末端X的IgG2	ERKCSVECPCPAPPVAGX	145
具有C219X和C末端X的IgG2	ERKXCVECPCPAPPVAGX	146
具有C220X和C末端X的IgG2	ERKCXVECPCPAPPVAGX	147
IgG2/IgG1杂合体	ERKCCVECPCPAPELLGG	22
具有C219S的IgG2/IgG1杂合体	ERKSCVECPCPAPELLGG	23
具有C220S的IgG2/IgG1杂合体	ERKCSVECPCPAPELLGG	127

具有C219X的IgG2/IgG1杂合体	ERKXCVECPPCPAPELLGG	136
具有C220X的IgG2/IgG1杂合体	ERKCXVECPPCPAPELLGG	137
IgG2/IgG1杂合体 $\delta$ G	ERKCCVECPPCPAPELLG	138
具有C219S $\delta$ G的IgG2/IgG1杂合体	ERKSCVECPPCPAPELLG	139
具有C220S $\delta$ G的IgG2/IgG1杂合体	ERKCSVECPPCPAPELLG	140
具有C219X $\delta$ G的IgG2/IgG1杂合体	ERKXCVECPPCPAPELLG	141
具有C220X $\delta$ G的IgG2/IgG1杂合体	ERKCXVECPPCPAPELLG	142
截短的野生型IgG2	ERKCCVECPPCPAP	128
具有C219S的截短的野生型IgG2	ERKSCVECPPCPAP	129
具有C220S的截短的野生型IgG2	ERKCSVECPPCPAP	130
具有C219X的截短的野生型IgG2	ERKXCVECPPCPAP	131
具有C220X的截短的野生型IgG2	ERKCXVECPPCPAP	132

[0193] X是除半胱氨酸以外的任何氨基酸。

[0194] 在某些实施方案中,经修饰的重链恒定区包含表4中所示的IgG2铰链,其中在氨基酸残基CVE与CPP之间插入1-5、1-3、1-2或1个氨基酸。在某些实施方案中,插入THT或GGG。在某些实施方案中,可以在铰链与CH2结构域之间插入1、1-2或1-3个氨基酸。例如,可以在铰链与CH2结构域之间插入另外的甘氨酸。

[0195] 在某些实施方案中,经修饰的重链恒定区是IgG1或IgG2恒定区,其中铰链包含1-10个氨基酸的缺失。如实施例所示,与具有野生型IgG1恒定区的相同抗体相比,缺乏氨基酸残基SCDKTHT(S219、C220、D221、K222、T223、H224和T225;SEQ ID NO:151)的IgG1抗体更有效地赋予了抗体介导的CD73内化。类似地,与具有野生型IgG1恒定区的相同抗体相比,在IgG2抗体的情况下,缺乏氨基酸残基CCVE(C219、C220、V222和E224;SEQ ID NO:152)的IgG2抗体更有效地赋予了抗体介导的CD73内化。因此,本文提供了经修饰的重链恒定区,其中铰链包含1、2、3、4、5、6或7个氨基酸残基的缺失,对于IgG1抗体,所述氨基酸残基选自残基S219、C220、D221、K222、T223、H224和T225,并且对于IgG2抗体,所述氨基酸残基选自残基C219、C220、V222和E224。

[0196] 在某些实施方案中,经修饰的重链恒定区包含CH1结构域,其是IgG1或IgG2同种型的野生型CH1结构域(分别为“IgG1 CH1结构域”或“IgG2 CH1结构域”)。也可以使用同种型IgG3和IgG4的CH1结构域(分别为“IgG3 CH1结构域”和“IgG2 CH1结构域”)。CH1结构域也可以是野生型CH1结构域的变体,例如野生型IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 CH1结构域的变体。CH1结构域的示例性变体包括A114C、C131S和/或T173C。CH1结构域(例如IgG2 CH1结构域)可以包含取代C131S,所述取代之为IgG2抗体或具有IgG2 CH1的抗体和铰链赋予了B形式(或构象)。

[0197] 在某些实施方案中,经修饰的重链恒定区包含IgG2同种型的CH1结构域。在某些实施方案中,CH1结构域是野生型IgG2 CH1结构域,其例如具有以下氨基酸序列:

[0198] **ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQV**  
**HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSMFQGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTV**

(SEQ ID NO: 7)。在某些实施方案中,CH1结构域是SEQ ID NO:7的变体并且包含相对于

SEQ ID NO:7的1-10、1-5、1-2或1个氨基酸取代或缺失。如在实施例中进行进一步描述的,本文已经显示,IgG2 CH1结构域或其变体赋予抗体相对于IgG1抗体增强的特性,并且当所述抗体还包含IgG2铰链时,赋予甚至更强的特性。在某些实施方案中,IgG2 CH1变体在以下氨基酸残基:C131、R133、E137和S138中的一个或多个氨基酸残基处不包含氨基酸取代或缺失,这些氨基酸残基在上文所示的SEQ ID NO:7中以粗体加下划线显示。例如,经修饰的重链恒定区可以包含如下IgG2 CH1结构域,其中R133、E137和S138都未被另一个氨基酸取代或都未缺失或者其中C131、R133、E137和S138都未被另一个氨基酸取代或都未缺失。在某些实施方案中,C131被另一个氨基酸例如C131S取代,所述取代触发抗体采用构象B。具有经修饰的重链恒定区的构象A和构象B抗体两者相对于具有IgG1恒定区的相同抗体,都在本文中已显示出增强的活性。

[0199] 在某些实施方案中,N192和/或F193(在上文所示的SEQ ID NO:7中显示为斜体加下划线的残基)被另一个氨基酸,例如被IgG1中的相应氨基酸取代,即N192S和/或F193L。

[0200] 在某些实施方案中,IgG2 CH1结构域的一个或多个氨基酸残基被IgG4中的相应氨基酸残基取代。例如,N192可以是N192S;F193可以是F193L;C131可以是C131K;和/或T214可以是T214R。

[0201] 抗体可以包含经修饰的重链恒定区,所述经修饰的重链恒定区包含IgG2 CH1结构域或其变体和IgG2铰链或其变体。铰链和CH1结构域可以是本文描述的任何IgG2铰链和IgG2 CH1结构域的组合。在某些实施方案中,IgG2 CH1和铰链包含以下氨基酸序列:

[0202] **ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV**  
**HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSMFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTV**

**KCCVECPCPAPPVAG** (SEQ ID NO: 133)或与其有最多1-10个氨基酸差异的氨基酸序列。氨基酸变体是如上文对于铰链和CH1结构域所述的。

[0203] 在某些实施方案中,抗体至少包含IgG2铰链,并且还任选地包含IgG2CH1结构域或铰链和/或CH1结构域的片段或衍生物,并且抗体已采用形式(构象)A(参见例如Allen等人(2009)Biochemistry 48:3755)。在某些实施方案中,抗体至少包含IgG2铰链,并且还任选地包含IgG2 CH1结构域或铰链和/或CH1结构域的片段或衍生物,并且抗体已采用了形式B(参见例如Allen等人(2009)Biochemistry 48:3755)。

[0204] 在某些实施方案中,经修饰的重链恒定区包含CH2结构域,其是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型的野生型CH2结构域(分别为“IgG1 CH2结构域”、“IgG2 CH2结构域”、“IgG3 CH2结构域”或“IgG4 CH2结构域”)。CH2结构域也可以是野生型CH2结构域的变体,例如野生型IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 CH2结构域的变体。CH2结构域的示例性变体包括调节抗体的Fc区的生物活性(如ADCC或CDC)或调节抗体的半衰期或其稳定性的变体。在一个实施方案中,CH2结构域是具有A330S和/或P331S突变的人IgG1 CH2结构域,其中相对于没有突变的相同CH2突变,CH2结构域具有降低的效应子功能。CH2结构域可能具有增强的效应子功能。CH2结构域可以包含以下突变中的一个或多个:SE(S267E)、SELF(S267E/L328F)、SDIE(S239D/I332E)、SEFF、GASDALIE(G236A/S239D/A330L/I332E)和/或以下氨基酸:E233、L235、G237、P238、H268、P271、L328、A330和K322处的一个或多个突变。需要注意的是,这些突变中的一些实际上是铰链的一部分,而不是如本文所定义的CH2结构域的一部分。其他突变在本文其

他地方进一步阐述。

[0205] 在某些实施方案中,经修饰的重链恒定区包含CH3结构域,其是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型的野生型CH3结构域(分别为“IgG1 CH3结构域”、“IgG2 CH3结构域”、“IgG3 CH3结构域”或“IgG4 CH3结构域”)。CH3结构域也可以是野生型CH3结构域的变体,例如野生型IgG1、IgG2、IgG3或IgG4CH3结构域的变体。CH3结构域的示例性变体包括调节抗体的Fc区的生物活性(如ADCC或CDC)或调节抗体的半衰期或其稳定性的变体。

[0206] 通常,CH1、铰链、CH2或CH3结构域的变体可以包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多的突变,和/或至多10、9、8、7、6、5、4、3、2或1突变,或1-10或1-5个突变,或者包含与相应的野生型结构域(分别为CH1、铰链、CH2或CH3结构域)的氨基酸序列至少约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,条件是包含特定变体的重链恒定区保留必需的生物活性。

[0207] 表5列出了包含人CH1、铰链、CH2和/或CH3结构域的示例性人重链恒定区,其中每个结构域都是为重链恒定区提供所需生物活性的野生型结构域或其变体。表5中未填充的单元格指示结构域存在或不存在,如果存在,则可以是任何同种型例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的。例如,包含表5中的重链恒定区1的抗体是包含至少含有IgG2铰链的重链恒定区并且也可以包含CH1、CH2和/或CH3结构域(并且如果存在的话,所述CH1、CH2和/或CH3结构域是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型的)的抗体。作为用于理解表5的另一个例子,包含重链恒定区8的抗体是包含含有IgG1 CH1结构域和IgG2铰链、IgG1 CH2结构域的重链恒定区的抗体,并且所述重链恒定区也可以包含或不包含CH3结构域,其存在时可以是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型的。

[0208] 表5

[0209]

MHCCR*	CH1	铰链	CH2	CH3
1		IgG2		
2	IgG1	IgG2		
3	IgG2	IgG2		
4		IgG2	IgG1	
5		IgG2	IgG2	
6		IgG2		IgG1
7		IgG2		IgG2
8	IgG1	IgG2	IgG1	
9	IgG1	IgG2	IgG2	
10	IgG2	IgG2	IgG1	
11	IgG2	IgG2	IgG2	
12	IgG1	IgG2		IgG1
13	IgG1	IgG2		IgG2
14	IgG2	IgG2		IgG1
15	IgG2	IgG2		IgG2
16		IgG2	IgG1	IgG1
17		IgG2	IgG1	IgG2

18		IgG2	IgG2	IgG1
19		IgG2	IgG2	IgG2
20	IgG1	IgG2	IgG1	IgG1
21	IgG1	IgG2	IgG1	IgG2
22	IgG1	IgG2	IgG2	IgG1
23	IgG1	IgG2	IgG2	IgG2
24	IgG2	IgG2	IgG1	IgG1
25	IgG2	IgG2	IgG1	IgG2
26	IgG2	IgG2	IgG2	IgG1
27	IgG2	IgG2	IgG2	IgG2

[0210] \*经修饰的重链恒定区

[0211] 在某些实施方案中,包含表5中所示的重链恒定区的抗体相对于不包含该特定重链恒定区的包含重链恒定区的相同抗体或者相对于包含IgG1恒定区的相同抗体,具有增强的生物活性。

[0212] 在某些实施方案中,用于改善包含非IgG2铰链和/或非IgG2 CH1结构域的抗体的生物活性的方法包括提供包含非IgG2铰链和/或非IgG2 CH1结构域的抗体,并将非IgG2铰链和非IgG2 CH1结构域分别用IgG2铰链和IgG2 CH1结构域替代。用于改善不包含经修饰的重链恒定区的抗体的生物活性的方法可以包括提供不包含经修饰的重链恒定区的抗体,并将其重链恒定区用经修饰的重链恒定区替代。

[0213] 示例性的经修饰的重链恒定区提供于表6中,其列出了每个结构域的身份。

[0214] 表6

[0215]

经修饰的重链恒定区	CH1	铰链	CH2	CH3	整体MHCC R的SEQ ID NO
IgG1-IgG2-IgG1	IgG1 野生型 SEQ ID NO: 2	IgG2/IgG1 SEQ ID NO:22	IgG1野生型 SEQ ID NO: 4	IgG1野生型 SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO:26
IgG1-IgG2-IgG12	IgG1 野生型 SEQ ID NO: 2	IgG2野生型 SEQ ID NO: 8	IgG1野生型 SEQ ID NO: 4	IgG1野生型 SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO:27
IgG1-IgG2CS-IgG1	IgG1 野生型 SEQ ID NO: 2	IgG2C219S/IgG1 SEQ ID NO:23	IgG1野生型 SEQ ID NO: 4	IgG1野生型 SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO:32
IgG1-IgG2CS-IgG12	IgG1 野生型 SEQ ID NO: 2	IgG2 C219S SEQ ID NO:21	IgG1野生型 SEQ ID NO: 4	IgG1野生型 SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO:33
IgG2-IgG1	IgG2 野生型 SEQ ID NO: 7	IgG2/IgG1 SEQ ID NO:22	IgG1野生型 SEQ ID NO: 4	IgG1野生型 SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO:28
IgG2-IgG12	IgG2 野生型 SEQ ID NO: 7	IgG2野生型 SEQ ID NO: 8	IgG1野生型 SEQ ID NO: 4	IgG1野生型 SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO:29
IgG2CS-IgG1	IgG2 野生型 SEQ ID NO: 7	IgG2C219S/IgG1 SEQ ID NO:23	IgG1野生型 SEQ ID NO: 4	IgG1野生型 SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO:34
IgG2CS-IgG12	IgG2 野生型 SEQ ID NO: 7	IgG2 C219S SEQ ID NO:21	IgG1野生型 SEQ ID NO: 4	IgG1野生型 SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO:35
IgG1CH1-IgG2铰链-IgG1CH2 (A330S, P331S) -IgG1CH3 或 IgG1-IgG2-IgG1.1	IgG1 野生型 SEQ ID NO: 2	IgG2野生型 SEQ ID NO: 8	IgG1 A330S/P331S SEQ ID NO:24	IgG1野生型 SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO:30

	IgG1CH1-IgG2 铰链 (C219S)-IgG1CH2 (A330S, P331S)-IgG1CH3 或 IgG1-IgG2CS-IgG1.1	IgG1 野生型 SEQ ID NO: 2	IgG2 C219S SEQ ID NO:21	IgG1 A330S/P331S SEQ ID NO:24	IgG1 野生型 SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO:36
[0216]	IgG2-IgG1.1	IgG2 野生型 SEQ ID NO: 7	IgG2野生型 SEQ ID NO: 8	IgG1 A330S/P331S SEQ ID NO:24	IgG1 野生型 SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO:31
	IgG2CS-IgG1.1	IgG2 野生型 SEQ ID NO: 7	IgG2 C219S SEQ ID NO:21	IgG1 A330S/P331S SEQ ID NO: 24	IgG1 野生型 SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO:37

[0217] 在某些实施方案中,抗体包含经修饰的重链恒定区,所述经修饰的重链恒定区包含含有SEQ ID NO:8、21、22、23、126-132、134-136和137中任何一个的IgG2铰链或其变体,如包含如下氨基酸序列的IgG2铰链,所述氨基酸序列(i)与SEQ ID NO:8、21、22、23、126-132、134-136和137中的任何一个有1、2、3、4或5个氨基酸取代、添加或缺失的差异;(ii)与SEQ ID NO:8、21、22、23、126-132、134-136和137中的任何一个有最多5、4、3、2或1个氨基酸取代、添加或缺失的差异;(iii)与SEQ ID NO:8、21、22、23、126-132、134-136和137中的任何一个有1-5、1-3、1-2、2-5或3-5个氨基酸取代、添加或缺失的差异和/或(iv)包含与SEQ ID NO:8、21、22、23、126-132、134-136或137中的任何一个至少约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,其中在(i)-(iv)中的任何一项中,氨基酸取代可以是保守氨基酸取代或非保守氨基酸取代;并且其中经修饰的重链恒定区相对于另一个重链恒定区(例如包含非IgG2铰链的重链恒定区)或相对于包含非IgG2铰链的相同的经修饰的重链恒定区,具有增强的生物活性。

[0218] 在某些实施方案中,铰链包含作为SEQ ID NO:8、21、22、23、126-132、134-136和137中任何一个的变体的序列,其中R217(野生型IgG2铰链中的第二个氨基酸(SEQ ID NO:8))是未缺失的或未被另一个氨基酸取代。在其中铰链是SEQ ID NO:8、21、22、23、126-132、134-136和137中任何一个的变体的某些实施方案中,铰链具有与野生型IgG2的硬度类似的硬度。

[0219] 在某些实施方案中,抗体包含经修饰的重链恒定区,所述经修饰的重链恒定区包含含有SEQ ID NO:2的IgG1 CH1结构域或含有SEQ ID NO:7的IgG2 CH1结构域或者SEQ ID NO:2或7的变体,所述变体(i)与SEQ ID NO:2或7有1、2、3、4或5个氨基酸取代、添加或缺失的差异;(ii)与SEQ ID NO:2或7有最多5、4、3、2或1个氨基酸取代、添加或缺失的差异;(iii)与SEQ IDNO:2或7有1-5、1-3、1-2、2-5或3-5个氨基酸取代、添加或缺失的差异和/或(iv)包含与SEQ ID NO:2或7至少约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,其中在(i)-(iv)中的任何一项中,氨基酸取代可以是保守氨基酸取代或非保守氨基酸取代;并且其中经修饰的重链恒定区相对于另一个重链恒定区(例如包含非IgG2铰链的重链恒定区)或相对于包含非IgG2铰链的相同的经修饰的重链恒定区,具有增强的生物活性。

[0220] 某些实施方案中,抗体包含经修饰的重链恒定区,所述经修饰的重链恒定区包含含有SEQ ID NO:4或24或者SEQ ID NO:4或24的变体的IgG1 CH2结构域,所述变体(i)与SEQ ID NO:4或24有1、2、3、4或5个氨基酸取代、添加或缺失的差异;(ii)与SEQ ID NO:4或24有最多5、4、3、2或1个氨基酸取代、添加或缺失的差异;(iii)与SEQ ID NO:4或24有1-5、1-3、1-2、2-5或3-5个氨基酸取代、添加或缺失的差异和/或(iv)包含与SEQ ID NO:4或24至少约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,其中在(i)-(iv)中的任何一项中,氨基酸取代可以是保守氨基酸取代或非保守氨基酸取代;并且其中经修饰的重链恒定区相对于另一个重链恒定区(例如包含非IgG2铰链的重链恒定区)或相对于包含非IgG2铰链的相同的经修饰的重链恒定区,具有增强的生物活性。

[0221] 在某些实施方案中,抗体包含经修饰的重链恒定区,所述经修饰的重链恒定区包含含有SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:5的变体的IgG1 CH3结构域,所述变体(i)与SEQ ID NO:5有1、2、3、4或5个氨基酸取代、添加或缺失的差异;(ii)与SEQ ID NO:5有最多5、4、3、2或1个氨基酸取代、添加或缺失的差异;(iii)与SEQ ID NO:5有1-5、1-3、1-2、2-5或3-5个氨基酸取代、添加或缺失的差异和/或(iv)包含与SEQ ID NO:5至少约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,其中在(i)-(iv)中的任何一项中,氨基酸取代可以是保守氨基酸取代或非保守氨基酸取代;并且其中经修饰的重链恒定区相对于另一个重链恒定区(例如包含非IgG2铰链的重链恒定区)或相对于包含非IgG2铰链的相同的经修饰的重链恒定区,具有增强的生物活性。

[0222] 经修饰的重链恒定区也可以包含上述CH1、铰链、CH2和CH3结构域的组合。

[0223] 在某些实施方案中,抗体包含本文描述的经修饰的重链恒定区或本文描述的经修饰的重链恒定区的变体,所述变体(i)与本文描述的经修饰的重链恒定区有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个氨基酸取代、添加或缺失的差异;(ii)与本文描述的经修饰的重链恒定区有最多10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸取代、添加或缺失的差异;(iii)与本文描述的经修饰的重链恒定区有1-5、1-3、1-2、2-5、3-5、1-10或5-10个氨基酸取代、添加或缺失的差异和/或(iv)包含与本文描述的经修饰的重链恒定区至少约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,其中在(i)-(iv)中的任何一项中,氨基酸取代可以是保守氨基酸取代或非保守氨基酸取代;并且其中经修饰的重链恒定区相对于另一个重链恒定区(例如包含非IgG2铰链的重链恒定区)或相对于包含非IgG2铰链的相同的经修饰的重链恒定区,具有增强的生物活性。

[0224] 在某些实施方案中,抗体包含经修饰的重链恒定区,所述经修饰的重链恒定区包含SEQ ID NO:26-37、54-56、78-125、152-232、234-245和247-262中任何一个或SEQ ID NO:26-37、54-56、78-125、152-232、234-245和247-262中任何一个的变体,所述变体(i)与SEQ ID NO:26-37、54-56、78-125、152-232、234-245和247-262中任何一个有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个氨基酸取代、添加或缺失的差异;(ii)与SEQ ID NO:26-37、54-56、78-125、152-232、234-245和247-262中任何一个有最多10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸取代、添加或缺失的差异;(iii)与SEQ ID NO:26-37、54-56、78-125、152-232、234-245和247-262中任何一个有1-5、1-3、1-2、2-5、3-5、1-10或5-10个氨基酸取代、添加或缺失的差异和/或(iv)包含与SEQ IDNO:26-37、54-56、78-125、152-232、234-245和247-262中任何一个至少约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,其中在(i)-

(iv)中的任何一项中,氨基酸取代可以是保守氨基酸取代或非保守氨基酸取代;并且其中经修饰的重链恒定区相对于另一个重链恒定区(例如包含非IgG2铰链的重链恒定区)或相对于包含非IgG2铰链的相同的经修饰的重链恒定区,具有增强的生物活性(和/或降低的效应子功能)。

[0225] 经修饰的重链恒定区可以具有(i)相对于野生型重链恒定区的类似、降低或增加的效应子功能(例如,与Fc $\gamma$ R的结合)和/或(ii)相对于野生型重链恒定区的类似、减小或增加的半衰期(或与FcRn受体的结合)。

[0226] 在某些实施方案中,抗体(或其抗原结合片段)包含经修饰的重链恒定区,所述经修饰的重链恒定区包含SEQ ID NO:198或其含有P238K的部分或者SEQ ID NO:198或其部分中任何一个的变体,所述变体(i)与SEQ ID NO:198或其含有P238K的部分有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个氨基酸取代、添加或缺失的差异;(ii)与SEQ ID NO:198或其含有P238K的部分有最多10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸取代、添加或缺失的差异;(iii)与SEQ ID NO:198或其含有P238K的部分有1-5、1-3、1-2、2-5、3-5、1-10或5-10个氨基酸取代、添加或缺失的差异和/或(iv)包含与SEQ ID NO:198或其含有P238K的部分至少约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,其中氨基酸取代可以是保守氨基酸取代或非保守氨基酸取代;并且其中经修饰的重链恒定区具有降低的效应子功能,例如与低亲和力Fc $\gamma$ R(例如,CD32a、CD32b和CD16a)的不可检测的结合和任选地与高亲和力Fc $\gamma$ R(CD64)的不可检测的结合,如在本文描述的测定中所确定的。

[0227] 在某些实施方案中,相对于野生型IgG1 Fc,包含P238K突变的IgG1 Fc(例如,包含SEQ ID NO:198或其部分)不包含其他突变,例如本文所述的那些。在某些实施方案中,相对于野生型人IgG1 Fc,包含P238K突变的IgG1Fc(例如,包含SEQ ID NO:198或其部分)包含1-5个氨基酸变化以及P238K,例如,所述包含P238K突变的IgG1 Fc包含SEQ ID NO:198或其部分以及相对于SEQ ID NO:198或其部分的1-5个氨基酸变化,条件是所述IgG1 Fc具有降低的效应子功能。

[0228] 在某些实施方案中,包含P238K突变的IgG1 Fc不包含降低效应子功能的任何其他突变。在某些实施方案中,包含P238K突变的IgG1 Fc包含降低效应子功能的1-5个突变。

[0229] 在某些实施方案中,包含P238K突变的IgG Fc也包含L235E突变和/或K322A突变,并且在某些实施方案中可以不含有的调节Fc效应子功能的任何另外的Fc突变,例如,所述包含P238K突变的IgG Fc不包含P330、P331处的突变或在下部铰链中例如氨基酸234和236-237处的突变。IgG可以是IgG1或IgG2。

[0230] 在某些实施方案中,抗体包含含有IgG2恒定结构域或至少其铰链的重链恒定区,其中IgG2恒定结构域或其铰链包含选自P238A、P238K、L235A、K322A的突变和任选C219和/或C220处的突变,例如C219S和/或C220S。

[0231] 在某些实施方案中,抗体包含重链恒定区,所述重链恒定区包含含有L234A、L235E和G237A中的一个或多个的IgG1恒定结构域。如本文所用,“IgG1.3”是指包含L234A、L235E和G237A(参见例如SEQ ID NO:248)的IgG1重链。包含这三个突变的IgG1恒定区也可以包含另外的突变,如本文描述的那些。本文在序列表中提供了包含L234A、L235E和G237A突变和另外的突变的示例性序列。IgG1.3 Fc提供了效应子功能(如ADCC和CDC)显著降低的抗体。在某些实施方案中,Fc包含IgG1.3的突变和另外的突变,例如P238K。

[0232] 在某些实施方案中,抗体包含IgG1.3重链恒定区,所述恒定区除了L234A、L235E和G237A以外,不包含调节效应子功能的任何其他突变。在某些实施方案中,抗体包含IgG1.3重链恒定区,所述恒定区除了L234A、L235E和G237A以外,不包含任何其他突变。

[0233] 重链恒定区提供于序列表中。在某些实施方案中,抗体包含表中列出的重链恒定区之一,其中恒定区除了表中列出的序列以外,不包含任何突变。在某些实施方案中,抗体包含表中列出的重链恒定区之一,其中恒定区(i)与序列表中的序列有1、2、3、4或5个氨基酸取代、添加或缺失的差异;(ii)与序列表中的序列有最多5、4、3、2或1个氨基酸取代、添加或缺失的差异;(iii)与序列表中的序列有1-5、1-3、1-2、2-5或3-5个氨基酸取代、添加或缺失的差异和/或(iv)包含与序列表中的序列至少约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸,其中在(i)-(iv)中任何一项中,氨基酸取代可以是保守氨基酸取代或非保守氨基酸取代;并且其中恒定区的生物活性未被这些突变显著改变。

[0234] 重链恒定区可以包含突变的组合,所述突变为包含重链区的抗体赋予了通过每个单独突变所赋予的生物活性的组合。例如,可以将增强大细胞表面复合物的激动剂活性形成或增强抗体内化的一个或多个突变与调节效应子功能的一个或多个突变组合。序列表中列出了包含赋予不同生物学功能的突变的组合的示例性恒定链序列。

[0235] II. 具有经修饰的重链恒定区的抗体及其靶抗原

[0236] 经修饰的重链恒定区可以用于多种抗体,如需要内化(例如,抗体药物缀合物(ADC)和抗CD73抗体)、激动剂活性(例如,有效调节免疫应答例如刺激T细胞激活的抗体,如激动剂抗GITR抗体)、拮抗剂活性(例如,抑制或阻断可抑制免疫应答例如T细胞激活的蛋白质的抗体,如拮抗剂PD-1抗体)、效应子功能(例如ADCC和CDC)或降低的效应子功能、信号转导或抗肿瘤活性的抗体。例如,细胞表面抑制性受体的内化可以限制与其一个或多个受体相互作用并降低一种或多种细胞功能的能力。

[0237] 在一个实施方案中,包含经修饰的重链恒定结构域的抗体是需要通过例如当它们与细胞表面结合时诱导受体介导的内吞作用进行内化以实现其活性的抗体(例如,对细胞表面受体具有特异性的抗体)。此类抗体可以用作针对药物、毒素、酶或DNA的靶向递送的媒介物,以用于治疗应用。因此,期望增加这些抗体的内化特性。可以受益于有效内化的示例性抗体是抗体药物缀合物。用于测量抗体的内化特性的各种测定是本领域已知的并且在本文中进行了描述。这些测定利用例如多种染料进行抗体标记,所述染料可以用于基于洗涤或淬灭的测定中以监测内化。也可以在依赖荧光标记的免洗测定中监测抗体内化。

[0238] 在一个实施方案中,包含经修饰的重链恒定结构域的抗体是需要其所结合的抗原(例如,细胞表面分子,如受体或配体)内化以实现活性的抗体。因此,针对需要被下调以用于生物学(例如治疗)活性的细胞表面蛋白的抗体可以使用本文描述的经修饰的重链恒定区。

[0239] 在某些实施方案中,包含经修饰的重链恒定结构域的抗体与细胞表面分子结合并激动或拮抗细胞表面分子的生物活性,所述细胞表面分子例如为免疫细胞(例如,T细胞、Teff细胞、Th1细胞、Th2细胞、CD4+T细胞、CD8+T细胞、Treg细胞、树突细胞、巨噬细胞、单核细胞、朗格汉斯细胞(Langerhans cell)、NK细胞、髓源性抑制细胞、B细胞或任何其他免疫细胞)上的细胞表面分子。细胞表面分子可以是刺激分子,例如共刺激分子(例如,GITR、OX40、CD137、CD40、ICOS和其他TNFR家族成员),并且抗体可以进一步刺激活性(激动剂抗

体)或抗体可以抑制活性(拮抗剂抗体)。细胞表面分子可以是抑制性分子(例如,CTLA-4、PD-1、PD-L1、LAG-3、TIM-3),并且抗体可以进一步刺激活性(激动剂抗体)或抗体可以抑制活性(拮抗剂抗体)。

[0240] 在某些实施方案中,包含经修饰的重链恒定结构域的抗体是刺激(或共刺激)分子的激动剂抗体(例如,抗GITR抗体),所述激动剂抗体例如通过诱导从T细胞分泌IL-2和/或IFN- $\gamma$ 来增强受试者的免疫系统。已显示其他激动剂抗体可激活APC、促进抗肿瘤T细胞应答和/或培育在不存在T细胞免疫的情况下具有控制癌症的潜力的细胞毒性骨髓细胞。刺激分子的激动剂抗体不同于抑制性分子的拮抗剂抗体(如抗CTLA-4或抗PD-1),所述拮抗剂抗体阻断负性免疫检查点。可以使用本领域已知的多种方法来测量激动剂活性,如T细胞增殖。

[0241] 在某些实施方案中,包含经修饰的重链恒定结构域的抗体是检查点抑制剂的拮抗剂抗体(如抗CTLA-4或抗PD-1抗体),所述拮抗剂抗体例如通过靶向激活的T细胞上表达的抑制性受体来阻断或抑制负性免疫检查点从而增强受试者的免疫应答。可以使用本领域已知的多种方法来测量拮抗剂活性,如T细胞增殖的抑制。

[0242] 在一个实施方案中,抗体是例如T细胞上的(i)共刺激受体的激动剂或(ii)抑制信号的拮抗剂,两者均可导致放大免疫应答,例如抗原特异性T细胞应答(免疫检查点调节剂)。在某些实施方案,抗体是例如T细胞上的(i)共刺激受体的拮抗剂或(ii)抑制信号的激动剂。共刺激和共抑制分子可以是免疫球蛋白超家族(IgSF)的成员,并且具有经修饰的重链恒定区的抗体可以与它们中的任何一个结合。与共刺激或共抑制受体结合的膜结合配体的一个重要家族是B7家族,其包括B7-1、B7-2、B7-H1(PD-L1)、B7-DC(PD-L2)、B7-H2(ICOS-L)、B7-H3、B7-H4、B7-H5(VISTA)和B7-H6,并且具有经修饰的重链恒定区的抗体可以与它们中的任何一个结合。与共刺激或共抑制受体结合的膜结合配体的另一个家族是与同源TNF受体(TNFR)家族成员结合的分子的TNF家族,其包括CD40和CD40L、OX-40、OX-40L、CD70、CD27L、CD30、CD30L、4-1BBL、CD137、TRAIL/Apo2-L、TRAILR1/DR4、TRAILR2/DR5、TRAILR3、TRAILR4、OPG、RANK、RANKL、TWEAKR/Fn14、TWEAK、BAFFR、EDAR、XEDAR、TACI、APRIL、BCMA、LT $\beta$ R、LIGHT、DcR3、HVEM、VEGI/TL1A、TRAMP/DR3、EDAR、EDA1、XEDAR、EDA2、TNFR1、淋巴毒素 $\alpha$ /TNF $\beta$ 、TNFR2、TNF $\alpha$ 、LT $\alpha$ 、LT $\beta$ 、LT $\beta$ R、淋巴毒素 $\alpha$ 1 $\beta$ 2、FAS、FASL(CD178)、DR3(TNFRSF25)、RELT、DR6、TROY、NGFR(参见例如Tansey(2009)Drug Discovery Today 00:1)。因此,本文描述的抗体可以与这些表面分子中的任何一个结合,并且它们可以是例如(i)IgSF家族或B7家族或TNFR家族中抑制T细胞激活的蛋白质的激动剂或拮抗剂(或抑制剂或阻断剂)或者抑制T细胞激活的细胞因子(例如,IL-6、IL-10、TGF- $\beta$ 、VEGF;“免疫抑制细胞因子”)的拮抗剂和/或(ii)IgSF家族、B7家族或TNF家族的刺激性受体的或者刺激T细胞激活的细胞因子的激动剂或拮抗剂,用于调节例如刺激免疫应答,例如从而治疗增殖性疾病(如癌症)。

[0243] 因此,具有经修饰的重链恒定结构域的抗体可以用作以下药剂中的一种:

[0244] (1) 刺激例如T细胞激活的蛋白质如B7-1、B7-2、CD28、4-1BB(CD137)、4-1BBL、GITR、ICOS、ICOS-L、OX40、OX40L、CD70、CD27、CD40、DR3或CD28H的激动剂;或

[0245] (2) 如上所述抑制T细胞激活的蛋白质(例如,免疫检查点抑制剂,如CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2和LAG-3)的拮抗剂以及以下蛋白质TIM-3、半乳糖凝集素9、CEACAM-1、BTLA、CD69、半乳糖凝集素-1、TIGIT、CD113、GPR56、VISTA、2B4、CD48、GARP、CD73、PD1H、LAIR1、

TIM-1、TIM-4、CD39中任何一种的拮抗剂(抑制剂或阻断剂)。

[0246] 其他抗体包括NK细胞上抑制性受体(例如KIR、TIGIT、NKG2A)的拮抗剂和NK细胞上激活性受体的激动剂。

[0247] 通常,可受益于经修饰的重链恒定区的抗体包括,例如连接正性共刺激受体的激动剂抗体、通过抑制性受体减弱信号传导的阻断抗体、拮抗剂抗体、和全身性地增加抗肿瘤T细胞频率的抗体、克服肿瘤微环境内不同免疫抑制途径(例如,阻断抑制性受体参与(例如,PD-L1/PD-1相互作用)、耗竭或抑制Treg(例如,抗CD25单克隆抗体)、抑制代谢酶(如IDO)或逆转/预防T细胞无能或衰竭)的抗体以及触发肿瘤位点处的先天免疫激活和/或炎症的抗体。抑制性受体的增加的内化可以转化为较低水平的潜在抑制剂。

[0248] 在某些实施方案中,包含经修饰的重链恒定区的抗体是与治疗剂缀合以形成免疫缀合物(如抗体药物缀合物(ADC))的抗体,所述免疫缀合物需要内化以实现其活性。在ADC中,所述抗体用作靶向剂以将ADC引导至表达其抗原(如癌细胞上的抗原)的靶细胞。在这种情况下,所述抗原可以是肿瘤相关抗原,即由癌细胞独特表达或过表达的抗原。一旦到达靶细胞,所述药物就会在靶细胞内部或其附近释放以充当治疗剂。有关ADC在癌症疗法中的作用机理和用途的综述,请参见Schrama等人,Nature Rev. Drug Disc. 2006, 5, 147。

[0249] 对于癌症治疗,ADC的治疗剂或药物优选地是引起靶向癌细胞死亡的细胞毒性药物。可用于ADC的细胞毒性药物包括以下类型的化合物及其类似物和衍生物:

[0250] (a) 烯二炔类,如加里刹霉素(calicheamicin)(参见例如Lee等人,J. Am. Chem. Soc. 1987, 109, 3464和3466)和非那霉素(uncialamycin)(参见例如Davies等人,WO 2007/038868 A2(2007)和Chowdari等人,US 8,709,431 B2(2012));

[0251] (b) 微管溶素(tubulysins)(参见例如Domling等人,US 7,778,814 B2(2010); Cheng等人,US 8,394,922 B2(2013);和Cong等人,US 2014/0227295A1);

[0252] (c) CC-1065和杜卡霉素(duocarmycin)(例如参见Boger,US 6,5458,530B1(2003);Sufi等人,US 8,461,117 B2(2013);和Zhang等人,US2012/0301490A1(2012));

[0253] (d) 埃博霉素(参见例如Vite等人,US 2007/0275904 A1(2007)和US RE42930E(2011));

[0254] (e) 奥瑞他汀(auristatins)(参见例如Senter等人,US 6,844,869 B2(2005)和Doronina等人,US 7,498,298 B2(2009));

[0255] (f) 吡咯并苯并二氮杂卓(PBD)二聚体(参见例如Howard等人,US2013/0059800A1(2013);US 2013/0028919 A1(2013);和WO 2013/041606 A1(2013));和

[0256] (g) 美登木素生物碱,如DM1和DM4(参见例如Chari等人,US 5,208,020(1993)和Amphlett等人,US 7,374,762 B2(2008))。

[0257] 在ADC中,所述抗体和治疗剂可以经由接头,例如可切割的接头(如肽基、二硫键或脞接头)进行缀合。例如,所述接头可以是肽基接头,如Val-Cit、Ala-Val、Val-Ala-Val、Lys-Lys、Pro-Val-Gly-Val-Val、Ala-Asn-Val、Val-Leu-Lys、Ala-Ala-Asn、Cit-Cit、Val-Lys、Lys、Cit、Ser或Glu。可以如以下文献中所述制备ADC:美国专利号7,087,600、6,989,452和7,129,261,PCT公开W002/096910、W0 07/038658、W0 07/051081、W0 07/059404、W0 08/083312和W0 08/103693,美国专利公开20060024317、20060004081和20060247295,其披露内容通过引用并入本文。

[0258] 可以用经修饰的重链恒定区增强的ADC的示例性靶标包括B7H4 (Korman等人, US 2009/0074660 A1); CD19 (Rao-Naik等人, 8,097,703B2); CD22 (King等人, US 2010/0143368 A1); CD30 (Keler等人, US 7,387,776 B2 (2008)); CD70 (Terrett等人, US 8,124,738 B2); CTLA-4 (Korman等人, US 6,984,720 B1 (2006)); PD-1 (Korman等人, US 8,008,449 B2 (2011)); PSMA (Huang等人, US 2009/0297438 A1和Cardarelli等人, US 7,875,278 B2); PTK7 (Terrett等人, US 2010/0034826 A1); 磷脂酰肌醇聚糖-3 (Terrett等人, US 2010/0209432 (A1)); RG1 (Harkins等人, US 7,335,748 B2 (2008)); 间皮素 (Terrett等人, US 8,268,970 B2 (2012)); 和CD44 (Xu等人, US 2010/0092484A1)。

[0259] 经修饰的重链恒定结构域也可以是用于肿瘤学以外的用途,例如免疫学疾病(如类风湿性关节炎、狼疮等)的抗体的一部分。

[0260] 经修饰的重链恒定结构域也可以与非抗体分子(或其抗体变体)或其片段融合,并且可以与需要Fc存在的任何多肽融合。经修饰的重链恒定结构域可以与抗体的抗原结合片段融合,如本文(例如,在定义部分中)进一步定义的。

[0261] 在某些实施方案中,缺乏某些效应子功能的包含P238K突变的重链恒定结构域或其部分与多肽,例如抗体的抗原结合片段的重链部分融合。如本文进一步所述,可以将包含P238K突变并包含例如SEQ ID NO:198所示的氨基酸序列的IgG(例如IgG1)Fc与抗体的重链可变结构域融合,其中抗体与任何靶标,例如本文所述的靶蛋白(例如CD40或CD40L)结合。具有P238K突变的IgG1 Fc(例如,具有氨基酸序列SEQ ID NO:198的P238K IgG1 fa或在具有同种异型f的IgG1的情况下)可用于任何抗体或其任何抗原结合片段,所述任何抗体或其任何抗原结合片段不需要效应子功能,特别是与Fc  $\gamma$  RCD32a、CD32b和CD16a的结合。除P238K以外,重链恒定区还可以包含减少与Fc  $\gamma$  RCD64结合的另外1或2个突变(例如,取代),或者P238K可以用于IgG2铰链(例如包含C219S的IgG2铰链)的情况中,如本文进一步所述。

### III. 修饰抗体的生物活性的方法

[0262] 本文提供了用于增强某些抗体的生物活性,如以下生物活性中的一种或多种的方法:

- [0263] (a) 增加或改变的细胞内化;
- [0264] (b) 增加或改变的激动剂活性;
- [0265] (c) 增加或改变的拮抗剂活性或阻断活性;
- [0266] (d) 增强或降低的ADCC;
- [0267] (d) 产生新的特性;
- [0268] (e) 增加或改变的信号转导;
- [0269] (f) 形成较大的抗体/抗原交联复合物;
- [0270] (g) 靶细胞表面分子的增加的聚集或低聚;
- [0271] (h) 免疫应答的增加的刺激或增强;和/或
- [0272] (i) 对免疫应答的增加的抑制。

[0273] 用于增强抗体的生物活性的方法可以包括将重链恒定区或其部分(例如铰链和/或CH1结构域)用经修饰的重链恒定区或其部分(例如IgG2铰链和/或IgG2 CH1结构域)替代。

[0274] 在某些实施方案中,用于改善抗体的生物活性的方法包括:(i) 提供不包含如本文

所述的经修饰的重链恒定区的抗体；和(ii)将抗体的重链恒定区用增强抗体的生物活性的经修饰的重链恒定区或其部分替代。在某些实施方案中，用于改善抗体的生物活性的方法包括：(i)提供包含非IgG2铰链(例如，IgG1铰链、IgG3铰链或IgG4铰链)的抗体；和(ii)将抗体的非IgG2铰链用IgG2铰链替代。在某些实施方案中，用于改善抗体的生物活性的方法包括：(i)提供包含非增强型IgG2铰链的抗体；(ii)将抗体的非增强型IgG2铰链用IgG2铰链替代。“非增强型IgG2铰链”是变体IgG2铰链，它与IgG2铰链的区别在于它不再具有增强抗体生物活性所需的特性，所述变体IgG2铰链例如不再具有野生型IgG2铰链的硬度的变体铰链。

[0275] 用于增强抗体的生物活性的示例性方法包括(i)提供包含非IgG2铰链或非增强型IgG2铰链的抗体，和(ii)将所述铰链用包含SEQ ID NO:8、21、22、23、126-132、134-136或137的铰链或其变体，例如本文描述的变体替代。用于增强抗体的生物活性的方法还可以包括(i)提供包含非经修饰的重链恒定区的重链恒定区的抗体，和(ii)将所述重链恒定区用经修饰的重链恒定区替代。替代重链恒定区可以包括替代CH1、铰链、CH2和/或CH3结构域。例如，可以通过将所述铰链用IgG2铰链或其变体替代和/或通过CH1结构域用IgG1或IgG2 CH1结构域或其变体替代来修饰重链恒定区。在某些实施方案中，将所述铰链用IgG2铰链替代，并且将CH2结构域用IgG1 CH2结构域替代。在某些实施方案中，将所述铰链用IgG2铰链替代，并且将CH3结构域用IgG1 CH3结构域替代。在某些实施方案中，将所述铰链用IgG2铰链替代，将CH1用IgG2铰链替代，将CH2结构域用IgG1 CH2结构域替代，并将CH3结构域用IgG1 CH3结构域替代。在某些实施方案中，将重链恒定区用以上表5中列出的经修饰的重链区1-27或表6中列出或本文中描述的重链恒定区替代。

[0276] 本文还提供了用于增强IgG1或IgG2抗体的生物活性的方法，其包括分别在IgG1或IgG2抗体的铰链中缺失1-10个氨基酸。例如，氨基酸S219、C22、D221、K222、T223、H224和T225中的一个或多个可以是缺失的。在一个实施方案中，氨基酸S219、C22、D221、K222、T223、H224和T225全部都是缺失的。

[0277] 本文进一步提供了例如通过使P238突变为例如P238K来制备和提供无效应子抗体或其抗原结合片段以消除或降低抗体的效应子功能的方法。

[0278] 在某些实施方案中，替代抗体的重链恒定区例如以修饰其生物活性，并不伴随其与靶抗原的结合活性的降低或显著降低。如实施例中所述，取代抗GITR和抗CD73抗体的重链恒定区没有显著改变它们分别对于人GITR和人CD73抗原的亲和力。

[0279] 应理解的是，当提及用不同同种型的相同结构域或用包含突变(例如，P238突变)的结构域替代特定同种型的结构域时，不必真正替代所述结构域，而可能只需要改变两个同种型之间不同的氨基酸。

[0280] 用于评价抗体针对不同种类的抗原的结合能力的标准测定是本领域已知的，并且在本文中进行了进一步的描述，所述标准测定包括例如ELISA、Western印迹和RIA。在实施例中详细描述了合适的测定。抗体的结合动力学(例如，结合亲和力)也可以通过本领域已知的标准测定，如通过BIACORE® SPR分析来评估。用于评价具有经修饰的恒定区的抗体的特性(例如，配体结合、T细胞增殖、细胞因子产生)的测定在下文和实施例中进行了进一步详细的描述。

[0281] 可如本文所述进行修饰的示例性抗体包括例如用于治疗癌症的抗体，如：Yervoy™

(易普利姆玛)或曲美利木单抗(针对CTLA-4)、加利昔单抗(针对B7.1)、BMS-936558(针对PD-1)、CT-011(针对PD-1)、MK-3475(针对PD-1)、AMP224(针对B7DC)、BMS-936559(针对B7-H1)、MPDL3280A(针对B7-H1)、MEDI-570(针对ICOS)、AMG557(针对B7H2)、MGA271(针对B7H3)、IMP321(针对LAG-3)、BMS-663513(针对CD137)、PF-05082566(针对CD137)、CDX-1127(针对CD27)、抗OX40(Providence Health Services)、huMAbOX40L(针对OX40L)、阿塞西普(针对TACI)、CP-870893(针对CD40)、鲁卡妥木单抗(针对CD40)、达塞妥珠单抗(针对CD40)、莫罗单抗-CD3(针对CD3)、伊匹单抗(Ipilimumab,针对CTLA-4)。

[0282] 可如本文所述进行修饰的其他抗体包括PD-1和PD-L1拮抗剂抗体。可以如本文所述进行修饰的示例性抗PD-1抗体是纳武单抗(BMS-936558);包含WO 2006/121168中描述的抗体17D8、2D3、4H1、5C4、7D3、5F4和4A11中的一种的CDR或可变区的抗体;WO 2012/145493中描述的MK-3475(Lambrolizumab);WO 2012/145493中描述的AMP-514;CT-011(Pidilizumab;先前称为CT-AcTibody或BAT;参见例如Rosenblatt等人(2011) *J. Immunotherapy* 34:409);WO 2009/014708、WO 03/099196、WO2009/114335、WO 2011/066389、WO 2011/161699、WO 2012/145493、WO2013/173223、美国专利号7,635,757和8,217,149以及美国专利公开号2009/0317368中描述的那些。

[0283] 可以进行修饰的其他抗体包括抗PD-L1抗体,例如BMS-936559(在WO2007/005874和美国专利号7,943,743中被称为12A4);包含在PCT公开案W007/005874和美国专利号7,943,743中描述的3G10、12A4、10A5、5F8、10H10、1B12、7H1、11E6、12B7和13G4的CDR或可变区的抗体;MEDI4736(也称为抗B7-H1);MPDL3280A(也称为RG7446);在WO 2013/173223、WO2011/066389、WO 2012/145493、美国专利号7,635,757和8,217,149以及美国公开号2009/145493中披露的任何抗PD-L1抗体。

[0284] 可以进行修饰的其他抗体包括抗CTLA-4抗体,例如Yervoy™(易普利姆玛或抗体10D1,描述于PCT公开WO 01/14424中);曲美利木单抗(先前称为ticilimumab,CP-675,206);描述于任何一个以下公开中的单克隆抗体或抗CTLA-4抗体:WO 98/42752、WO 00/37504、美国专利号6,207,156、Hurwitz等人(1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(17):10067-10071、Camacho等人(2004) *J. Clin. Oncology* 22(145):Abstract No.2505(抗体CP-675206)和Mokyr等人(1998) *Cancer Res.* 58:5301-5304;以及WO 2013/173223中披露的任何抗CTLA-4抗体。

[0285] 可以进行修饰的其他抗体包括抗LAG-3抗体,例如BMS-986016;描述于US 2011/007023中的IMP731;以及IMP-321。

[0286] 可以进行修饰的其他抗体包括描述于WO 2006/105021中的抗GITR激动剂抗体,例如抗GITR抗体6C8或其人源化形式;描述于WO 2011/028683中的抗体;和描述于JP 2008278814中的抗体。

[0287] 也可以修饰靶向其他抗原的抗体,包括本文其他地方描述的那些。例如,可以如本文所述修饰需要内化的抗Her2抗体,例如曲妥珠单抗(赫赛汀)。IV. 另外的重链恒定结构域修饰

[0288] 除了本文描述的针对抗体的修饰以增强其生物活性或降低效应子功能外,还可以例如对CH1、铰链、CH2或CH3结构域进行其他突变,例如以进一步降低抗体的效应子功能、与Fc $\gamma$ R的结合和/或稳定性。例如,本文中例如下文描述的任何修饰可以如在IgG1或IgG1-

IgG2杂合体Fc或其部分中与P238(例如P238K)突变组合。

[0289] Fc和经修饰的Fc

[0290] 本文描述的抗体可以包含含有一个或多个修饰的Fc,通常用于改变抗体的一种或多种功能特性,如血清半衰期、补体固定、Fc受体结合和/或

[0291] 抗原依赖性细胞毒性。例如,可以在Fc区中进行修饰以产生如下Fc变体,相对于亲本Fc,所述Fc变体具有:(a)增加或降低的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC),(b)增加或降低的补体介导的细胞毒性(CDC),(c)增加或降低的对于C1q的亲合力和/或(d)增加或降低的对于Fc受体的亲合力。此类Fc区变体通常将在Fc区中包含至少一个氨基酸修饰。人们认为将氨基酸修饰进行组合是可取的。例如,变体Fc区可以在其中,例如在本文鉴定的特定Fc区位置包含两个、三个、四个、五个等取代。示例性的Fc序列变体披露在本文中,并且也提供于美国专利号5,624,821;6,277,375;6,737,056;6,194,551;7,317,091;8,101,720;PCT专利公开WO 00/42072;WO 01/58957;WO 04/016750;WO 04/029207;WO 04/035752;WO 04/074455;W004/099249;WO 04/063351;WO 05/070963;WO 05/040217、WO 05/092925和WO 06/020114中。

[0292] 降低效应子功能

[0293] 通过修饰Fc区可以降低ADCC活性。在某些实施方案中,可以(例如,通过突变)去除影响与Fc受体结合的位点,所述位点优选为挽救受体结合位点以外的位点。在其他实施方案中,可以修饰Fc区以去除ADCC位点。ADCC位点是本领域已知的;有关IgG1中的ADCC位点参见例如(1992)Molec.Immunol.29(5):633-9。在一个实施方案中,人IgG1的G236R和L328R变体有效地消除了Fc $\gamma$ R结合。Horton等人(2011)J.Immunol.186:4223和Chu等人(2008)Mol.Immunol.45:3926。在其他实施方案中,具有降低的与Fc $\gamma$ R的结合的Fc包含氨基酸取代L234A、L235E和G237A。Gross等人(2001)Immunity15:289。

[0294] 也可以通过修饰Fc区来降低CDC活性。IgG1位置D270、K322、P329和P331处的突变,特别是丙氨酸突变D270A、K322A、P329A和P331A显著地降低了相应抗体结合C1q和激活补体的能力。Idusogie等人(2000)J.Immunol.164:4178;WO 99/51642。已显示IgG1的位置331的修饰(例如P331S)降低了补体结合。Tao等人(1993)J.Exp.Med.178:661以及Canfield和Morrison(1991)J.Exp.Med.173:1483。在另一个例子中,氨基酸位置231至239内的一个或多个氨基酸残基被改变,从而降低了抗体固定补体的能力。WO 94/29351。

[0295] 在一些实施方案,具有降低的补体固定的Fc具有氨基酸取代A330S和P331S。Gross等人(2001)Immunity 15:289。

[0296] 为了用于完全避免效应子功能的用途,例如当单独的抗原结合足以产生所需的治疗益处,并且效应子功能仅导致不需要的副作用(或增加不需要的副作用的风险)时,可以使用IgG4抗体,或者可以设计缺乏Fc区的抗体或其片段或实质部分,或者可以使Fc突变以完全消除糖基化(例如,N297A)。可替代地,已经产生了人IgG2(C<sub>H</sub>1结构域和铰链区)和人IgG4(C<sub>H</sub>2和C<sub>H</sub>3结构域)的杂合体构建体,其没有效应子功能,缺乏结合Fc $\gamma$ R的能力(如IgG2)并且不能激活补体(如IgG4)。Rother等人(2007)Nat.Biotechnol.25:1256。也参见Mueller等人(1997)Mol.Immunol.34:441;Labrijn等人(2008)Curr.Op.Immunol.20:479(讨论用于降低效应子功能的Fc修饰)。

[0297] 在其他实施方案中,通过用不同的氨基酸残基替代至少一个氨基酸残基来改变Fc

区,以降低抗体的所有一种或多种效应子功能。例如,可以将选自氨基酸残基234、235、236、237、297、318、320和322的一种或多种氨基酸用不同的氨基酸残基替代,使得抗体对于效应子配体的亲和力降低但保留亲本抗体的抗原结合能力。对其亲和力改变的效应子配体可以是例如Fc受体(残基234、235、236、237、297)或补体的C1成分(残基297、318、320、322)。美国专利号5,624,821和5,648,260,两者均出自Winter等人。

[0298] WO 88/007089提出在IgG Fc区中进行修饰,以减少与Fc $\gamma$ RI的结合从而降低ADCC(234A;235E;236A;G237A),或阻断与补体成分C1q的结合从而消除CDC(E318A或V/K320A和K322A/Q)。也参见Duncan和Winter(1988)Nature 332:563;Chappel等人(1991)Proc.Nat'l Acad.Sci.(美国)88:9036;和Sondermann等人(2000)Nature 406:267(讨论这些突变对Fc $\gamma$ RIII结合的影响)。

[0299] 降低效应子功能的Fc修饰还包括位置234、235、236、237、267、269、325和328处的取代、插入和缺失,如234G、235G、236R、237K、267R、269R、325L和328R。Fc变体可以包含236R/328R。用于降低Fc $\gamma$ R和补体相互作用的其他修饰包括取代297A、234A、235A、237A、318A、228P、236E、268Q、309L、330S、331S、220S、226S、229S、238S、233P和234V。这些和其他修饰在Strohl(2009)Current Opinion in Biotechnology 20:685-691中进行了综述。通过使位置233-236和327-331中的一个或多个位置处的IgG残基突变(如IgG1中的E233P、L234V、L235A,任选G236 $\delta$ 、A327G、A330S和P331S;IgG4中的E233P、F234V、L235A,任选G236 $\delta$ ;和IgG2中的A330S和P331S),可以降低效应子功能(ADCC和补体激活两者),同时保持新生的FcR结合(保持半衰期)。参见Armour等人(1999)Eur.J.Immunol.29:2613;WO 99/58572。降低效应子功能的其他突变包括IgG1中的L234A和L235A(Alegre等人(1994)Transplantation 57:1537);IgG2中的V234A和G237A(Cole等人(1997)J.Immunol.159:3613;也参见美国专利号5,834,597);以及IgG4的S228P和L235E(Reddy等人(2000)J.Immunol.164:1925)。人IgG1中用于降低效应子功能的突变的另一种组合包括L234F、L235E和P331S。Oganessian等人(2008)Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.64:700。通常参见Labrijn等人(2008)Curr.Op.Immunol.20:479。在Fc(IgG1)融合蛋白(阿巴西普)的情况下被发现可降低效应子功能的另外的突变是C226S、C229S和P238S(EU残基编号)。Davis等人(2007)J.Immunol.34:2204。

[0300] 具有降低的ADCC和/或CDC的其他Fc变体披露于Glaesner等人(2010)Diabetes Metab.Res.Rev.26:287(IgG4中用于降低的ADCC和ADCP的F234A和L235A);Hutchins等人(1995)Proc.Nat'l Acad.Sci.(美国)92:11980(IgG4中的F234A、G237A和E318A);An等人(2009)MAbs 1:572和美国专利申请公开2007/0148167(IgG2中的H268Q、V309L、A330S和P331S);McEarchern等人(2007)Blood 109:1185(IgG1中的C226S、C229S、E233P、L234V、L235A);Vafa等人(2014)Methods 65:114(IgG2中的V234V、G237A、P238S、H268A、V309L、A330S、P331S)中。

[0301] 在某些实施方案中,选择基本上无效应子功能的Fc,即其具有与Fc $\gamma$ R的降低的结合和降低的补体固定。无效应子的示例性Fc(例如IgG1 Fc)包含以下五个突变:L234A、L235E、G237A、A330S和P331S。Gross等人(2001)Immunity 15:289。这五个取代也可以与N297A组合以消除糖基化。

[0302] 增强效应子功能

[0303] 可替代地,可通过修饰Fc区来增加ADCC活性。关于ADCC活性,人IgG1 $\cong$ IgG3 $\gg$ IgG4 $\cong$ IgG2,因此在需要ADCC的药物中可以选择使用IgG1恒定结构域而不是IgG2或IgG4。可替代地,可以通过修饰以下位置处的一个或多个氨基酸来修饰Fc区以增加抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和/或增加对Fc $\gamma$ 受体的亲和力:234、235、236、238、239、240、241、243、244、245、247、248、249、252、254、255、256、258、262、263、264、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、299、301、303、305、307、309、312、313、315、320、322、324、325、326、327、329、330、331、332、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、433、434、435、436、437、438或439。参见WO 2012/142515;也参见WO 00/42072。示例性取代包括236A、239D、239E、268D、267E、268E、268F、324T、332D和332E。示例性变体包括239D/332E、236A/332E、236A/239D/332E、268F/324T、267E/268F、267E/324T和267E/268F/324T。例如,已显示包含G236A变体的人IgG1Fc(其可以任选地与I332E组合)使Fc $\gamma$  IIA/Fc $\gamma$  IIB结合亲和力之比增加约15倍。Richards等人(2008)*Mol. Cancer Therap.* 7:2517;Moore等人(2010)*mAbs* 2:181。用于增强Fc $\gamma$ R和补体相互作用的其他修饰包括但不限于取代298A、333A、334A、326A、247I、339D、339Q、280H、290S、298D、298V、243L、292P、300L、396L、305I和396L。这些和其他修饰在Strohl(2009)*Current Opinion in Biotechnology* 20:685-691中进行了综述。具体地,ADCC和CDC两者均可以通过IgG1的位置E333处的变化(例如E333A)而增强。Shields等人(2001)*J. Biol. Chem.* 276:6591。IgG1中P247I和A339D/Q突变用于增强效应子功能的用途披露于WO 2006/020114中,并且D280H、K290S $\pm$ S298D/V披露于WO 2004/074455。已显示K326A/W和E333A/S变体在人IgG1中增加效应子功能,并且E333S在IgG2中增加效应子功能。Idusogie等人(2001)*J. Immunol.* 166:2571。

[0304] 具体地,已经在人IgG1上绘制了Fc $\gamma$  RI、Fc $\gamma$  RII、Fc $\gamma$  RIII和Fc $\gamma$  Rn的结合位点,并且已经描述了具有改善的结合的变体。Shields等人(2001)*J. Biol. Chem.* 276:6591-6604。显示出位置256、290、298、333、334和339处的特定突变改善与Fc $\gamma$  RIII的结合,所述特定突变包括组合突变体T256A/S298A、S298A/E333A、S298A/K224A和S298A/E333A/K334A(具有增强的Fc $\gamma$  RIIIa结合和ADCC活性)。已鉴定与Fc $\gamma$  RIIIa结合的大大增强的其他IgG1变体,包括具有S239D/I332E和S239D/I332E/A330L突变的变体,这些变体在食蟹猴中显示出对Fc $\gamma$  RIIIa的亲力的最大增加、Fc $\gamma$  RIIb结合的减少、以及强细胞毒活性。Lazar等人(2006)*Proc. Nat' l Acad Sci. (美国)* 103:4005;Awan等人(2010)*Blood* 115:1204;Desjarlais和Lazar(2011)*Exp. Cell Res.* 317:1278。将三重突变引入抗体如阿仑单抗(CD52特异性)、曲妥珠单抗(HER2/neu特异性)、利妥昔单抗(CD20特异性)和西妥昔单抗(EGFR特异性)中转化为体外极大增强的ADCC活性,并且S239D/I332E变体在猴子中显示出增强的耗竭B细胞的能力。Lazar等人(2006)*Proc. Nat' l Acad Sci. (美国)* 103:4005。另外,已鉴定了在B细胞恶性肿瘤和乳腺癌模型中表达人Fc $\gamma$  RIIIa的转基因小鼠中展现出与RIIIa增强的结合和随之增强的ADCC活性的IgG1突变体,所述IgG1突变体含有L235V、F243L、R292P、Y300L、V305I和P396L突变。Stavenhagen等人(2007)*Cancer Res.* 67:8882;美国专利号8,652,466;Nordstrom等人(2011)*Breast Cancer Res.* 13:R123。

[0305] 不同的IgG同种型也展现出不同的CDC活性(IgG3 $\gg$ IgG1 $\gg$ IgG2 $\approx$ IgG4)。Dangl等人(1988)*EMBO J.* 7:1989。对于需要增强CDC的用途,也可以引入增加与C1q的结合的突变。可

以通过IgG2中K326和/或E333处的突变(如K326W,其降低ADCC活性,以及E333S)来增强募集补体的能力(CDC),以增加与C1q(即补体级联的第一成分)的结合。Idusogie等人(2001) *J. Immunol.* 166:2571。将S267E/H268F/S324T(单独或以任何组合的形式)引入人IgG1中可增强C1q结合。Moore等人(2010) *mAbs* 2:181。Natsume等人(2008) *Cancer Res.* 68:3863的IgG1/IgG3杂合体同种型抗体“113F”的Fc区(其中的图1)也赋予了增强的CDC。也参见Michaelsen等人(2009) *Scand. J. Immunol.* 70:553和Redpath等人(1998) *Immunology* 93:595。

[0306] 可以增加或降低效应子功能的另外的突变披露于Dall'Acqua等人(2006) *J. Immunol.* 177:1129。也参见Carter(2006) *Nat. Rev. Immunol.* 6:343;Presta(2008) *Curr. Op. Immunol.* 20:460。

[0307] 也可以使用增强对抑制性受体Fc $\gamma$ RIIb的亲力的Fc变体,例如以增强细胞凋亡诱导的活性或佐剂活性。Li和Ravetch(2011) *Science* 333:1030;Li和Ravetch(2012) *Proc. Nat' l Acad. Sci (美国)* 109:10966;美国专利申请公开2014/0010812。此类变体可以提供具有与Fc $\gamma$ RIIb<sup>+</sup>细胞有关的免疫调节活性的抗体,所述细胞包括例如B细胞和单核细胞。在一个实施方案中,相对于一种或多种激活受体,Fc变体提供对Fc $\gamma$ RIIb的选择性地增强的亲和力。根据所述,用于改变与Fc $\gamma$ RIIb的结合的修饰包括在选自根据EU索引的234、235、236、237、239、266、267、268、325、326、327、328和332的位置处的一个或多个修饰。用于增强Fc $\gamma$ RIIb亲和力的示例性取代包括但不限于234D、234E、234F、234W、235D、235F、235R、235Y、236D、236N、237D、237N、239D、239E、266M、267D、267E、268D、268E、327D、327E、328F、328W、328Y和332E。示例性取代包括235Y、236D、239D、266M、267E、268D、268E、328F、328W和328Y。用于增强与Fc $\gamma$ RIIb的结合的其他Fc变体包括235Y/267E、236D/267E、239D/268D、239D/267E、267E/268D、267E/268E和267E/328F。具体地,人IgG1的S267E、G236D、S239D、L328F和I332E变体(包括S267E+L328F双变体)在特异性地增强对抑制性Fc $\gamma$ RIIb受体的亲和力方面具有特殊价值。Chu等人(2008) *Mol. Immunol.* 45:3926;美国专利申请公开2006/024298;WO 2012/087928。对Fc $\gamma$ RIIb的增强(如与Fc $\gamma$ RIIa<sup>R131</sup>不同)的特异性可以通过添加P238D取代而获得。Mimoto等人(2013) *Protein. Eng. Des. & Selection* 26:589;WO 2012/115241。

#### [0308] 糖基化

[0309] 将抗体的糖基化进行修饰以增加或降低效应子功能。例如,可以通过使位置297处保守的天冬酰胺残基突变(例如N297A)从而消除补体和Fc $\gamma$ RI结合来制备缺乏所有效应子功能的去糖基化抗体。Bolt等人(1993) *Eur. J. Immunol.* 23:403。也参见Tao和Morrison(1989) *J. Immunol.* 143:2595(使用IgG1中的N297Q消除位置297处的糖基化)。

[0310] 尽管去糖基化抗体通常缺乏效应子功能,但可以引入突变来恢复该功能。去糖基化抗体,例如由于N297A/C/D/或H突变导致或不使蛋白质糖基化的系统(例如大肠杆菌(*E. coli*))中产生的那些可以进一步突变(例如S298G和/或T299A/G/或H(WO 2009/079242)或E382V和M428I)以恢复Fc $\gamma$ R结合(Jung等人(2010) *Proc. Nat' l Acad. Sci (美国)* 107:604)。

[0311] 另外,可以通过改变糖基化来制备具有增强的ADCC的抗体。例如,已显示从重链Asn297连接的低聚糖去除岩藻糖在改善的与Fc $\gamma$ RIIIa的结合的基础上增强了ADCC。

Shields等人(2002) *JBC* 277:26733; Niwa等人(2005) *J. Immunol. Methods* 306:151; Cardarelli等人(2009) *Clin. Cancer Res.* 15:3376 (MDX-1401); Cardarelli等人(2010) *Cancer Immunol. Immunotherap.* 59:257 (MDX-1342)。此类低岩藻糖抗体可以例如在缺乏岩藻糖基转移酶(FUT8)的敲除中国仓鼠卵巢(CHO)细胞(Yamane-Ohnuki等人(2004) *Biotechnol. Bioeng.* 87:614)中或在产生去岩藻糖基化抗体的其他细胞中产生。参见例如Zhang等人(2011) *mAbs* 3:289和Li等人(2006) *Nat. Biotechnol.* 24:210(两篇文献均描述了糖工程化巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)中的抗体产生); Mossner等人(2010) *Blood* 115:4393; Shields等人(2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733; Shinkawa等人(2003) *J. Biol. Chem.* 278:3466; EP 1176195B1。也可以如PCT公开WO 03/035835中所述来增强ADCC, 该文献披露了变体CHO细胞系Lec13的用途, 所述细胞系具有降低的将岩藻糖附接至Asn(297)连接的碳水化合物的能力, 从而也导致该宿主细胞中表达的抗体的低岩藻糖基化(也参见Shields, R.L.等人(2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740)。可替代地, 可以在抗体产生期间将岩藻糖类似物添加至培养基中, 以抑制岩藻糖掺入抗体上的碳水化合物中。WO 2009/135181。

[0312] 在抗体连接的低聚糖中增加二等分G1cNac结构也会增强ADCC。Umana等人的PCT公开WO 99/54342描述了如下细胞系, 其被工程化为表达修饰糖蛋白的糖基转移酶(例如,  $\beta$ (1,4)-N乙酰基葡萄糖胺转移酶III(GnTIII)), 使得在工程化细胞系中表达的抗体展现出增加的二等分G1cNac结构, 这导致抗体的ADCC活性增加(还参见Umana等人(1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180)。

[0313] 已开发了不含半乳糖、唾液酸、岩藻糖和木糖残基(所谓的GNGN糖型)的另外的糖基化变体, 其展现出增强的ADCC和ADCP但降低的CDC; 以及开发了不含唾液酸、岩藻糖和木糖(所谓的G1/G2糖型)的其他糖基化变体, 其展现出增强的ADCC、ADCP和CDC。美国专利申请公开号2013/0149300。任选地在其中已敲除内源性木糖基和岩藻糖基转移酶基因的经遗传修饰的本塞姆氏烟草(*N. benthamiana*)植物中产生具有这些糖基化模式的抗体。

[0314] 糖工程化也可以用于通过改变在Fc区的Asn297处附接的碳水化合物链的 $\alpha$ 2,6唾液酸含量来修饰IgG构建体的抗炎特性, 其中 $\alpha$ 2,6唾液酸化形式的比例增加导致增强的抗炎作用。参见Nimmerjahn等人(2008) *Ann. Rev. Immunol.* 26:513。相反, 在不需要抗炎特性的情况下, 降低具有 $\alpha$ 2,6唾液酸化碳水化合物的抗体的比例可能是有用的。例如通过选择性纯化 $\alpha$ 2,6唾液酸化形式或通过酶促修饰来改变抗体的 $\alpha$ 2,6唾液酸化含量的方法提供于美国专利申请公开号2008/0206246中。在其他实施方案中, 可以例如通过包含F241A修饰来修饰Fc区的氨基酸序列以模拟 $\alpha$ 2,6唾液酸化的作用。WO 2013/095966。

[0315] 本文描述的抗体可以在轻链或重链可变区中含有一个或多个糖基化位点。此类糖基化位点可以导致增加的抗体免疫原性或由于改变的抗原结合而使抗体的pK改变(Marshall等人(1972) *Annu Rev Biochem* 41:673-702; Gala和Morrison(2004) *J. Immunol* 172:5489-94; Wallick等人(1988) *J Exp Med* 168:1099-109; Spiro(2002) *Glycobiology* 12:43R-56R; Parekh等人(1985) *Nature* 316:452-7; Mimura等人(2000) *Mol Immunol* 37:697-706)。已知糖基化发生在含有N-X-S/T序列的基序上。

[0316] 生物半衰期

[0317] 在某些实施方案中, 将所述抗体进行修饰以增加其生物半衰期。可使用多种方法。

例如,这可以通过增加Fc区对于FcRn的结合亲和力来进行。在一个实施方案中,使抗体在CH1或CL区域内改变以含有从IgG的Fc区的CH2结构域的两个环取得的挽救受体结合表位,如在Presta等人的美国专利号5,869,046和6,121,022中所述。增加与FcRn的结合和/或改善药代动力学特性的其他示例性Fc变体包括位置259、308和434处的取代,其包括例如259I、308F、428L、428M、434S、434H、434F、434Y和434M。增加Fc与FcRn结合的其他变体包括:250E、250Q、428L、428F、250Q/428L(Hinton等人,2004,J.Biol.Chem.279(8):6213-6216,Hinton等人2006Journal of Immunology176:346-356)、256A、272A、305A、307A、311A、312A、378Q、380A、382A、434A(Shields等人,Journal of Biological Chemistry,2001,276(9):6591-6604)、252F、252Y、252W、254T、256Q、256E、256D、433R、434F、434Y、252Y/254T/256E、433K/434F/436H(Del'Acqua等人Journal of Immunology,2002,169:5171-5180,Dall'Acqua等人,2006,Journal of Biological Chemistry 281:23514-23524)。参见美国专利号8,367,805。

[0318] 已提出IgG Fc中的某些保守残基(I253/H310/Q311/H433/N434)的修饰如N434A变体(Yeung等人(2009)J.Immunol.182:7663)作为增加FcRn亲和力从而增加抗体在循环中的半衰期的方法。WO 98/023289。已显示包含M428L和N434S的Fc变体的组合增加FcRn结合并使血清半衰期增加高达五倍。Zalevsky等人(2010)Nat.Biotechnol.28:157。包含T307A、E380A和N434A修饰的组合Fc变体也可延长IgG1变体的半衰期。Petkova等人(2006)Int.Immunol.18:1759。另外,已显示包含M252Y/M428L、M428L/N434H、M428L/N434F、M428L/N434Y、M428L/N434A、M428L/N434M和M428L/N434S变体的组合Fc变体也可延长半衰期。WO 2009/086320。

[0319] 此外,包含M252Y、S254T和T256E的组合Fc变体使半衰期增加近4倍。Dall'Acqua等人(2006)J.Biol.Chem.281:23514。提供增加的FcRn亲和力但降低的pH依赖性的相关IgG1修饰(M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F)已用于产生IgG1构建体("MST-HN Abdeg"),所述IgG1构建体用作竞争剂以防止其他抗体与FcRn的结合,从而导致所述其他抗体(内源性IgG(例如在自身免疫环境中)或另一种外源性(治疗性)mAb)的清除率增加。Vaccaro等人(2005)Nat.Biotechnol.23:1283;WO 2006/130834。

[0320] 用于增加FcRn结合的其他修饰描述于Yeung等人(2010)J.Immunol.182:7663-7671;6,277,375;6,821,505;WO 97/34631;WO2002/060919。

[0321] 在某些实施方案中,杂合体IgG同种型可以用于增加FcRn结合,并且可能增加半衰期。例如,可以通过将CH2和/或CH3区域中的IgG1位置用两个同种型中不同的位置处的来自IgG3的氨基酸取代来构建IgG1/IgG3杂合体变体。因此,可以构建包含一个或多个取代(例如274Q、276K、300F、339T、356E、358M、384S、392N、397M、422I、435R和436F)的杂合体变体IgG抗体。在本文描述的其他实施方案中,可以通过将CH2和/或CH3区域中的IgG2位置用两个同种型中不同的位置处的来自IgG1的氨基酸取代来构建IgG1/IgG2杂合体变体。因此,可以构建杂合体变体IgG抗体,其包含一个或多个取代,例如以下氨基酸取代中的一个或多个:233E、234L、235L、-236G(指在位置236处插入甘氨酸)和327A。参见美国专利号8,629,113。已产生了据称增加血清半衰期并改善表达的IgG1/IgG2/IgG4序列的杂合体。美国专利号7,867,491(其中序列号为18)。

[0322] 也可以通过聚乙二醇化增加本发明的抗体的血清半衰期。可以将抗体聚乙二醇化

以例如增加抗体的生物(例如,血清)半衰期。为了将抗体聚乙二醇化,通常在一个或多个PEG基团附接至抗体或抗体片段的条件下,使抗体或其片段与聚乙二醇(PEG)试剂(如PEG的反应性酯或醛衍生物)反应。优选地,经由与反应性PEG分子(或类似反应性水溶性聚合物)的酰化反应或烷基化反应进行聚乙二醇化。如本文所用,术语“聚乙二醇”旨在涵盖已用于衍生化其他蛋白质的任何形式的PEG,如单(C1-C10)烷氧基-或芳氧基-聚乙二醇或聚乙二醇-马来酰亚胺。在某些实施方案中,待聚乙二醇化的抗体是去糖基化的抗体。用于聚乙二醇化蛋白质的方法是本领域已知的并且可以应用于本文描述的抗体。参见例如Nishimura等人的EP 0154316和Ishikawa等人的EP 0401384。

[0323] 可替代地,在一些情况下,可能希望减小而不是增加本发明抗体的半衰期。在人IgG1的Fc中的修饰如I253A(Hornick等人(2000)J.Nucl.Med.41:355)和H435A/R I253A或H310A(Kim等人(2000)Eur.J.Immunol.29:2819)可以减少FcRn结合从而减小半衰期(增加清除率),以用于优选快速清除的情况(如医学成像)中。也参见Kenanova等人(2005)Cancer Res.65:622。提高清除率的其他方法包括将本发明的抗原结合结构域改变形式为缺乏与FcRn结合的能力的抗体片段(如Fab片段)。这种修饰可以将抗体的循环半衰期从几周降低至几小时。然后,如果需要的话,可以使用抗体片段的选择性PEG化来微调(增加)抗体片段的半衰期。Chapman等人(1999)Nat.Biotechnol.17:780。抗体片段也可以与人血清白蛋白例如在融合蛋白构建体中融合以增加半衰期。Yeh等人(1992)Proc.Nat'l Acad.Sci.89:1904。可替代地,可以用本发明的第一抗原结合结构域和与人血清白蛋白(HSA)结合的第二抗原结合结构域构建双特异性抗体。参见国际申请公开WO 2009/127691和其中引用的专利参考文献。可替代地,可以将专门的多肽序列(例如“XTEN”多肽序列)添加至抗体片段以增加半衰期。Schellenberger等人(2009)Nat.Biotechnol.27:1186;国际专利申请公开WO 2010/091122。

[0324] 稳定性

[0325] 可以通过D221G和K222S修饰消除IgG1构建体的铰链中潜在的蛋白酶切割位点,从而提高抗体的稳定性。WO 2014/043344。

[0326] 在某些实施方案中,本文描述的抗体不含有天冬酰胺异构位点。天冬酰胺的脱酰胺作用可能发生在N-G或D-G序列上并且可能导致异天冬氨酸残基的产生,这可能将扭结引入多肽链中并可能降低其稳定性(异天冬氨酸作用)。

[0327] 每种抗体都有独特的等电点(pI),其通常在6与9.5之间的pH范围内。IgG1抗体的pI通常在7-9.5的pH范围内,而IgG4抗体的pI通常在6-8的pH范围内。推测pI值超出正常范围的抗体在体内条件下可能具有一定的展开和不稳定性。因此,优选具有含有在正常范围内的pI值的抗体。这可以通过选择pI在正常范围内的抗体或通过使带电表面残基突变来实现。

[0328] 每种抗体将具有特征性的解链温度,其中更高的解链温度指示在体内更大的总体稳定性(Krishnamurthy R和Manning M C(2002)Curr Pharm Biotechnol 3:361-71)。通常,优选的是 $T_{M1}$ (初始展开的温度)大于60°C、优选大于65°C、甚至更优选大于70°C。可以使用差示扫描量热法(Chen等人(2003)Pharm Res 20:1952-60;Ghirlando等人(1999)Immunol Lett 68:47-52)或圆二色性(Murray等人(2002)J.Chromatogr Sci 40:343-9)来测量抗体的熔点。

[0329] 在优选的实施方案中,选择不会迅速降解的抗体。可以使用毛细管电泳(CE)和MALDI-MS(Alexander A J和Hughes D E(1995)Anal Chem67:3626-32)测量抗体的降解。

[0330] 当使用IgG4恒定结构域时,它通常优选包含取代S228P,其模拟IgG1中的铰链序列并因此稳定IgG4分子,从而例如减少在治疗的患者中治疗性抗体与内源性IgG4之间的Fab臂交换。Labrijn等人(2009)Nat.Biotechnol.27:767;Reddy等人(2000)J.Immunol.164:1925。类似地,在含有IgG2铰链的抗体中,C219S和/或C220S突变使包含IgG2铰链的抗体稳定。

#### [0331] 聚集

[0332] 在另一个优选的实施方案中,选择具有最小聚集作用的抗体,所述聚集作用可导致触发不希望的免疫应答和/或改变的或不利的药代动力学特性。通常,可接受抗体具有25%或更少、优选20%或更少、甚至更优选15%或更少、甚至更优选10%或更少、以及甚至更优选5%或更少的聚集。可以通过几种技术来测量聚集,所述技术包括尺寸排阻柱(SEC)、高效液相色谱法(HPLC)和光散射。

#### [0333] V. 非抗体蛋白和抗体衍生物

[0334] 本文描述的本发明也可以应用于非全长抗体的分子,条件是它们包含铰链。例如,可以制备具有增强的生物活性或缺乏效应子功能的IgG融合蛋白。因此,本文提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含与包含IgG2铰链和任选CH2和CH3结构域的IgG恒定区(例如Fc区)或其部分连接(例如,共价连接),或与具有降低的效应子功能(例如包含P238处的突变,例如P238K)的IgG(例如,IgG1)或其部分连接的活性部分。所述Fc可以是本文描述的经修饰的重链恒定区的任何Fc,如表5、6或序列列表中列出的经修饰的重链恒定区的Fc部分。

[0335] 本文描述的抗体也可以用于形成双特异性分子或用于CAR-T疗法的分子。可以将抗体或其抗原结合部分衍生或连接至另一种功能分子,例如另一种肽或蛋白质(例如另一种抗体或受体的配体)以产生与至少两种不同结合位点或靶分子结合的双特异性分子。可以将本文描述的抗体衍生或连接至多于一种其他功能分子,以产生与多于两种不同结合位点和/或靶分子结合的多特异性分子;此类多特异性分子也旨在由本文所用的术语“双特异性分子”涵盖。为了产生双特异性分子,本文描述的抗体可以与一种或多种其他结合分子(如另一种抗体、抗体片段、肽或结合模拟物)功能性地连接(例如,通过化学偶联、遗传融合、非共价缔合或其他方式),使得产生双特异性分子。

#### [0336] VI. 组合物

[0337] 进一步提供了与药学上可接受的载体一起配制的组合物(例如药物组合物),其含有一种本文描述的抗体或其抗原结合部分或者本文描述的抗体或其抗原结合部分的组合。此类组合物可以包含一种本文描述的抗体或免疫缀合物或双特异性分子或者(例如,两种或更多种不同的)本文描述的抗体或免疫缀合物或双特异性分子的组合。例如,本文描述的药物组合物可以包含与靶抗原上的不同表位结合或具有互补活性的抗体(或免疫缀合物或双特异性抗体)的组合。

[0338] 在某些实施方案中,组合物包含浓度为至少1mg/ml、5mg/ml、10mg/ml、50mg/ml、100mg/ml、150mg/ml、200mg/ml、1-300mg/ml或100-300mg/ml的本文描述的抗体。

[0339] 本文描述的药物组合物也可以在组合疗法中给予,即与其他药剂组合。例如,所述组合疗法可以包括与至少一种其他抗癌药剂和/或T细胞刺激(例如,激活)药剂组合的本文

描述的抗体。可在组合疗法中使用的治疗剂的例子在下文关于本文描述的抗体的用途的部分中更详细地进行了描述。

[0340] 在一些实施方案中,本文公开的治疗性组合物可以包含用于治疗癌症的其他化合物、药物和/或药剂。此类化合物、药物和/或药剂可以包括例如刺激对给定癌症的免疫应答的化疗药物、小分子药物或抗体。在一些情况下,治疗性组合物可以包含,例如抗CTLA-4抗体、抗PD-1抗体、抗PDL-1抗体、抗OX40(也称为CD134、TNFRSF4、ACT35和/或TXGP1L)抗体或抗LAG-3抗体中的一种或多种。

[0341] 如本文所用,“药学上可接受的载体”包括生理上相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。优选地,载体适用于静脉内、肌内、皮下、肠胃外、脊髓或表皮给予(例如,通过注射或输注)。根据给予的途径,可以将活性化合物(即抗体、免疫缀合物或双特异性分子)包被在材料中以保护化合物免受酸和可能使化合物失活的其他自然条件的作用。

[0342] 本文描述的药物化合物可以包含一种或多种药学上可接受的盐。“药学上可接受的盐”是指保留所需的母体化合物的生物活性并且不赋予任何不希望的毒理作用的盐(参见例如Berge, S.M.等人(1977) J.Pharm.Sci. 66:1-19)。此类盐的例子包括酸加成盐和碱加成盐。酸加成盐包括衍生自无毒无机酸(如盐酸、硝酸、磷酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、亚磷酸等)以及衍生自无毒有机酸(如脂肪族单羧酸和脂肪族二羧酸、苯基取代的链烷酸、羟基链烷酸、芳香酸、脂肪族和芳香族磺酸等)的那些。碱加成盐包括衍生自碱土金属(如钠、钾、镁、钙等)以及衍生自无毒有机胺(如N,N'-二苄基乙二胺、N-甲基葡糖胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、普鲁卡因等)的那些。

[0343] 本文描述的药物组合物也可以包含药学上可接受的抗氧化剂。药学上可接受的抗氧化剂的例子包括:(1)水溶性抗氧化剂,如抗坏血酸、半胱氨酸盐酸盐、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠等;(2)油溶性抗氧化剂,如抗坏血酸棕榈酸酯、丁基化羟基茴香醚(BHA)、丁基化羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 $\alpha$ -生育酚等;和(3)金属螯合剂,如柠檬酸,乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨糖醇、酒石酸、磷酸等。

[0344] 本文描述的药物组合物中可使用的合适的水性和非水性载体的例子包括水、乙醇、多元醇(如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其合适的混合物,植物油(如橄榄油)和可注射的有机酯(如油酸乙酯)。可以例如通过使用诸如卵磷脂的包衣材料、在分散液的情况下通过维持所要求的粒度、以及通过使用表面活性剂来维持适当流动性。

[0345] 这些组合物还可以含有佐剂,如防腐剂、润湿剂、乳化剂以及分散剂。可以通过上述灭菌程序以及通过包含各种抗菌剂和抗真菌剂(例如对羟基苯甲酸酯,氯丁醇,苯酚山梨酸等)两种方法来确保防止微生物的存在。在组合物中包含等渗剂,如糖、氯化钠等可能也是可取的。另外,可以通过包含延迟吸收的药剂(如单硬脂酸铝和明胶)来实现可注射药物形式的延长吸收。

[0346] 药学上可接受的载体包括无菌水溶液或分散液以及用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。此类介质和药剂用于药物活性材料的用途是本领域已知的。除非任何常规介质或药剂与活性化合物不相容,否则考虑其在本文描述的药物组合物中的用途。补充性活性化合物也可掺入到组合物中。

[0347] 在制造和储存条件下,治疗性组合物通常必须是无菌且稳定的。可以将组合物配

制成溶液、微乳液、脂质体或其他适合高药物浓度的有序结构。载体可以是溶剂或分散介质,所述溶剂或分散介质含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适的混合物。例如,通过使用包衣如卵磷脂、通过在分散液的情况下维持所需的粒度、以及通过使用表面活性剂,可以维持适当的流动性。在许多情况下,优选在组合物中包含等渗剂,例如糖、多元醇(如甘露糖醇、山梨糖醇)或氯化钠。通过在所述组合物中包含延迟吸收的药剂例如单硬脂酸盐和明胶,可以实现可注射组合物的延长吸收。

[0348] 可以通过将活性化合物以所需的量掺入适当的溶剂中,随后微过滤灭菌来制备无菌可注射溶液,所述溶剂根据需要具有以上列举的一种成分或多种成分的组合。通常,通过将所述活性化合物掺入无菌媒介物中来制备分散液,所述无菌媒介物含有碱性分散介质和来自以上列举的那些的所需其他成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选制备方法为真空干燥和冷冻干燥(冻干),所述真空干燥和冷冻干燥由先前无菌过滤的溶液产生活性成分和任何另外的所需成分的粉末。

[0349] 可以与载体材料组合以产生单一剂型的活性成分的量将根据正在被治疗的受试者和特定的给药模式而变化。可以与载体材料组合以产生单一剂型的活性成分的量通常是产生治疗效果的组合物的量。通常,从百分比来说,该量范围在约0.01%至约99%的活性成分,优选约0.1%至约70%、最优选约1%至约30%的活性成分内,所述活性成分与药学上可接受的载体相组合。

[0350] 可以调整剂量方案以提供最佳的所需反应(例如,治疗反应)。例如,可以给予单次推注,可以随时间给予几个分开的剂量,或者可以如根据治疗情况的紧急程度指示的按比例减少或增加剂量。以剂量单位形式配制肠胃外组合物是尤其有利的,以便于给予和剂量的均匀。本文所用的剂量单位形式是指适合作为待治疗受试者的单位剂量的物理上离散的单位;每个单位含有经计算与所需的药物载体联合可产生所需治疗作用的预定量的活性化合物。本文描述的剂量单位形式的规格取决于或直接依赖于(a)活性化合物的独特特征和要实现的特定治疗作用,和(b)在合成用于治疗个体中的敏感性的这种活性化合物的领域中固有的限制。

[0351] 对于抗体的给予,剂量在约0.0001至100mg/kg宿主体重且更通常在0.01至5mg/kg宿主体重的范围内。例如剂量可以是0.3mg/kg体重、1mg/kg体重、3mg/kg体重、5mg/kg体重或10mg/kg体重或者在1-10mg/kg的范围内。示例性的治疗方案需要每周给予一次、每两周给予一次、每三周给予一次、每四周给予一次、每月给予一次、每3个月给予一次或每三至6个月给予一次。本文描述的抗体的优选剂量方案包括经由静脉内给予1mg/kg体重或3mg/kg体重,其中使用以下给药时间表中的一种给予所述抗体:(i)每四周,持续六个剂量,随后每三个月;(ii)每三周;(iii)一次3mg/kg体重,然后每三周1mg/kg体重。

[0352] 在一些方法中,同时给予具有不同结合特异性的两种或更多种单克隆抗体,在这种情况下,所给予的每种抗体的剂量都在所示范围内。通常在多种场合给予抗体。单剂量之间的间隔可以是例如每周、每月、每三个月或每年。如通过测量患者中针对靶抗原的抗体的血液水平所指示,间隔也可以是不规则的。在一些方法中,调整剂量以达到约1-1000 $\mu$ g/ml的血浆抗体浓度,并且在一些方法中,达到约25-300 $\mu$ g/ml。

[0353] 抗体可以作为持续释放制剂给予,在这种情况下需要较不频繁的给予。剂量和频率根据患者中抗体的半衰期而变化。通常,人抗体显示出最长的半衰期,其次是人源化抗

体、嵌合抗体和非人抗体。给予的剂量和频率可以根据治疗是预防性的还是治疗性的而变化。在预防性应用中,以相对不频繁的间隔长时间给予相对低的剂量。一些患者在余生持续接受治疗。在治疗性应用中,有时需要间隔相对短的相对高的剂量,直到疾病的进展减少或终止,并且优选直到患者显示疾病症状的部分或完全改善。此后,可以向患者给予预防性方案。

[0354] 可以改变本文描述的药物组合物中活性成分的实际剂量水平,以便获得有效于实现针对特定患者、组合物和给药方式的所希望治疗反应的量的活性成分,而不会对患者造成毒性。所选的剂量水平将取决于多种药代动力学因素,包括所采用的本文描述的特定组合物或其酯、盐或酰胺的活性,给药途径,给药时间,所采用的特定化合物的排泄速率,治疗持续时间,与所采用的特定化合物组合使用的其他药物、化合物和/或材料,所治疗患者的年龄、性别、体重、病症、一般健康状况和既往病史,以及医学领域中熟知的类似因素。

[0355] 本文描述的抗体的“治疗有效剂量”优选导致疾病症状的严重程度的降低、无疾病症状时期的频率和持续时间的增加、或由于疾病困扰引起的损伤或残疾的预防。在癌症的情况下,治疗有效剂量优选预防与癌症有关的身体症状的进一步恶化。癌症的症状是本领域中是熟知的,并且包括例如异常的痣特征、痣外观(包括不对称性、边界、颜色和/或直径)的变化、新色素化的皮肤区域、异常痣、指甲下变黑的区域、乳房肿块、乳头变化、乳房囊肿、乳房疼痛、死亡、体重减轻、无力、过度疲劳、进食困难、食欲不振、慢性咳嗽、恶化的呼吸困难、咳血、尿中带血、大便带血、恶心、呕吐、肝转移瘤、肺转移瘤、骨转移瘤、腹部饱胀感、腹胀、腹腔积液、阴道出血、便秘、腹胀、结肠穿孔、急性腹膜炎(感染、发烧、疼痛)、疼痛、吐血、大量出汗、发烧、高血压、贫血、腹泻、黄疸、头晕、发冷、肌肉痉挛、结肠转移瘤、肺转移瘤、膀胱转移瘤、肝转移瘤、骨转移瘤、肾转移瘤和胰腺转移瘤、吞咽困难等。

[0356] 治疗有效剂量可以预防或延迟癌症的发作,如当出现疾病的早期或初步体征时可能需要所述治疗有效剂量。用于诊断癌症的实验室测试包括化学、血液学、血清学和放射学。因此,监测前述任何一项的任何临床或生化测定可用于确定特定治疗是否是用于治疗癌症的治疗有效剂量。本领域普通技术人员将能够基于此类因素(如受试者的体型、受试者症状的严重程度以及所选择的给予的特定组合物或途径)来确定这种量。

[0357] 可以使用本领域已知的多种方法中的一种或多种经由一种或多种给予途径给予本文描述的组合物。如本领域技术人员所理解的,给药途径和/或方式将根据所希望的结果而变化。本文描述的抗体的优选给予途径包括静脉内、肌内、皮内、腹膜内、皮下、脊髓或其他肠胃外给予途径,例如通过注射或输注。如本文所用,短语“肠胃外给予”意指除肠内和局部给予以外的给予模式(通常通过注射给予),并且包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眼眶内、心脏内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注。

[0358] 可替代地,本文描述的抗体可以经由非肠胃外途径(如局部、表皮或粘膜给予途径)给予,例如鼻内、口服、阴道、直肠、舌下或局部给予。

[0359] 可以将活性化合物与保护化合物免于快速释放的载体(如控释制剂,包括植入物、透皮贴剂和微囊递送系统)一起制备。可以使用可生物降解的生物相容性聚合物,如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。用于制备此类制剂的许多方法已获得专利或通常是本领域技术人员已知的。参见例如Sustained and Controlled Release

Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, 编辑, Marcel Dekker, Inc., 纽约, 1978。

[0360] 可以将治疗性组合物用本领域已知的医疗装置给予。例如, 在优选的实施方案中, 可以将本文描述的治疗性组合物用无针皮下注射装置, 如在美国专利号5,399,163、5,383,851、5,312,335、5,064,413、4,941,880、4,790,824或4,596,556中披露的装置给予。用于与本文描述的抗体一起使用的熟知的植入物和模块的例子包括: 美国专利号4,487,603, 其披露了一种用于以受控制的速率分配药物的可植入的微输注泵; 美国专利号4,486,194, 其披露了用于通过皮肤给予药物的治疗装置; 美国专利号4,447,233, 其披露了用于以精确的输注速率递送药物的药物输注泵; 美国专利号4,447,224, 其披露了用于连续药物递送的可变流量可植入输注设备; 美国专利号4,439,196, 其披露了具有多室区室的渗透性药物递送系统; 和美国专利号4,475,196, 其披露了渗透性药物递送系统。这些专利通过引用并入本文。许多其他此类植入物、递送系统和模块是本领域技术人员已知的。

[0361] 在某些实施方案中, 可以将本文描述的抗体配制以确保体内适当分布。例如, 血脑屏障 (BBB) 排除了许多高度亲水性化合物。为了确保本文描述的治疗性化合物穿过 BBB (如果需要的话), 可以将它们配制在例如脂质体中。有关制造脂质体的方法, 参见例如美国专利4,522,811、5,374,548和5,399,331。脂质体可以包含选择性地转移到特定细胞或器官中从而增强靶向药物递送的一个或多个部分 (参见例如 V.V. Ranade (1989) J.Clin.Pharmacol. 29:685)。示例性的靶向部分包括叶酸或生物素 (参见例如 Low 等人的美国专利5,416,016); 甘露糖苷 (Umezawa 等人, (1988) Biochem.Biophys.Res.Comm. 153:1038); 抗体 (P.G. Bloeman 等人 (1995) FEBS Lett. 357:140; M. Owais 等人 (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180); 表面活性剂蛋白 A 受体 (Briscoe 等人 (1995) Am.J.Physiol. 1233:134); p120 (Schreier 等人 (1994) J.Biol.Chem. 269:9090); 也参见 K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273。

#### [0362] VII. 用途和方法

[0363] 本文描述的抗体、抗体组合物和方法具有许多体外和体内效用, 所述效用涉及例如多种障碍 (例如癌症) 的治疗。例如, 本文描述的抗体可以在体外或离体给予至培养物中的细胞, 或者例如在体内给予至人类受试者。因此, 本文提供了治疗受试者的方法, 其包括向受试者给予包含经修饰的重链恒定区的抗体从而进行治疗。本文还提供了改变受试者中免疫应答的方法, 其包括向受试者给予抗体从而改变受试者中的免疫应答。优选地, 所述应答被增强、刺激或上调。然而, 在其他实施方案中, 免疫应答被抑制。

[0364] 优选的受试者包括在其中期望增强免疫应答的人类患者。所述方法特别适用于治疗患有可通过增加免疫应答 (例如, T 细胞介导的免疫应答) 来治疗的障碍的人类患者。在特定的实施方案中, 所述方法特别适用于在体内治疗癌症。在一个实施方案中, 所述受试者是荷瘤受试者, 并且刺激了针对肿瘤的免疫应答。肿瘤可以是实体瘤或液体瘤, 例如血液恶性肿瘤。在某些实施方案中, 肿瘤是免疫原性肿瘤。在某些实施方案中, 肿瘤是非免疫原性的。在某些实施方案中, 肿瘤是 PD-L1 阳性的。在某些实施方案中, 肿瘤是 PD-L1 阴性的。受试者也可以是携带病毒的受试者, 并且刺激了针对病毒的免疫应答。

[0365] 进一步提供了用于抑制受试者中肿瘤细胞生长的方法, 其包括向受试者给予本文描述的抗体从而在受试者中抑制肿瘤的生长。进一步提供了治疗受试者中病毒感染的方

法,其包括向受试者给予本文描述的抗体从而在受试者中治疗病毒感染。

[0366] 本文还涵盖了用于从患有肿瘤(例如,癌性肿瘤)的受试者的肿瘤微环境耗竭Treg细胞的方法,其包括向受试者给予治疗有效量的本文描述的抗体,所述抗体包含刺激肿瘤微环境中T<sub>reg</sub>细胞的耗竭的Fc。Fc可以是例如具有效应子功能或增强的效应子功能,如与一种或多种激活Fc受体的结合或增强的结合的Fc。

[0367] 在某些实施方案中,包含经修饰的重链恒定区的抗体与刺激分子结合并抑制刺激分子的活性,即所述抗体是刺激分子的拮抗剂,或者所述抗体与抑制性分子结合并刺激抑制性分子的活性,即所述抗体是抑制性分子的激动剂。此类抗体可用于治疗其中免疫系统或免疫应答应当下调的疾病(例如自身免疫病)或预防移植排斥。

[0368] 癌症

[0369] 本文提供了用于治疗患有癌症的受试者的方法,其包括向受试者给予本文描述的抗体,使得受试者得到治疗,例如使得癌性肿瘤的生长被抑制或减少和/或使得肿瘤消退。例如,通过抗GITR抗体激活GITR可以增强患者中针对癌细胞的免疫应答。所述抗体可单独用于抑制癌性肿瘤的生长。可替代地,所述抗体可以与另一种药剂(例如其他免疫原性药剂)、标准癌症治疗或其他抗体联合使用。

[0370] 可以使用本文描述的抗体抑制其生长的癌症包括通常对免疫疗法有反应的癌症。用于治疗癌症的非限制性例子包括鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、鳞状非小细胞肺癌(NSCLC)、非NSCLC、神经胶质瘤、胃肠道癌、肾癌(例如透明细胞癌)、卵巢癌、肝癌、结直肠癌、子宫内膜癌、肾癌(例如肾细胞癌(RCC))、前列腺癌(例如激素难治性前列腺癌)、甲状腺癌、神经母细胞瘤、胰腺癌、胶质母细胞瘤(多形胶质母细胞瘤)、宫颈癌、胃癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌和头颈癌(或癌)、胃癌、生殖细胞瘤、小儿肉瘤、鼻窦自然杀伤细胞、黑色素瘤(例如转移性恶性黑色素瘤,如皮肤或眼内恶性黑色素瘤)、骨癌、皮肤癌、子宫癌、肛区癌、睾丸癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、儿童期实体瘤、输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统肿(CNS)瘤、原发性CNS淋巴瘤、肿瘤血管生成、脊髓轴肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤(Kaposi's sarcoma)、表皮样癌、鳞状细胞癌、T细胞淋巴瘤、环境诱发的癌症(包括石棉诱发的那些)、与病毒有关的癌症(例如与人乳头瘤病毒(HPV)有关的肿瘤),和源自两个主要血细胞谱系即骨髓细胞系(其产生粒细胞、红细胞、血小板、巨噬细胞和肥大细胞)或淋巴细胞系(其产生B细胞、T细胞、NK细胞和浆细胞)的血液恶性肿瘤,如所有类型的白血病、淋巴瘤和骨髓瘤,例如急性、慢性、淋巴细胞性和/或骨髓性白血病(如急性白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)和慢性骨髓性白血病(CML)、未分化AML(M0)、原始粒细胞性白血病(M1)、原始粒细胞性白血病(M2;伴随细胞成熟)、早幼粒细胞性白血病(M3或M3变体[M3V])、髓单核细胞白血病(M4或M4变体伴随嗜酸性粒细胞增多症[M4E])、单核细胞白血病(M5)、红白血病(M6)、巨核细胞白血病(M7)、孤立的粒细胞肉瘤和绿色瘤);淋巴瘤,如霍奇金淋巴瘤(HL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、B细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、淋巴浆细胞样淋巴瘤、单核细胞样B细胞淋巴瘤、粘膜相关淋巴样组织(MALT)淋巴瘤、间变性(例如Ki 1+)大细胞淋巴瘤、成人T细胞淋巴瘤/白血病、套细胞淋巴瘤、血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤、血管中心性淋巴瘤、肠道T细胞淋巴瘤、原发性纵隔B细胞淋巴瘤、前体T淋巴母细胞性淋巴瘤、T淋巴母细胞性淋巴瘤;和淋巴瘤/白

血病(T-Lbly/T-ALL)、外周T细胞淋巴瘤、淋巴母细胞淋巴瘤、移植后淋巴增生性障碍、真正的组织细胞性淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、淋巴母细胞性淋巴瘤(LBL)、淋巴谱系的造血系统肿瘤、急性淋巴母细胞性白血病、弥漫性大B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、弥漫性组织细胞淋巴瘤(DHL)、免疫原性大细胞淋巴瘤、前体B淋巴母细胞性淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤(CTLC)(也称为蕈样肉芽肿病或塞扎里综合征(Sezary syndrome))、和伴随华氏巨球蛋白血症的淋巴浆细胞样淋巴瘤(LPL);骨髓瘤,如IgG骨髓瘤、轻链骨髓瘤、非分泌型骨髓瘤、冒烟型骨髓瘤(也称为无痛性骨髓瘤)、孤立性浆细胞瘤和多发性骨髓瘤、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、毛细胞淋巴瘤;骨髓谱系的造血系统肿瘤、间充质起源的肿瘤(包括纤维肉瘤和横纹肌肉瘤);精原细胞瘤、畸胎瘤、中枢神经和外周神经的肿瘤(包括星形细胞瘤、神经鞘瘤);间充质起源的肿瘤(包括纤维肉瘤、横纹肌肉瘤和骨肉瘤);和其他肿瘤,包括黑色素瘤、着色性干皮病、角化棘皮瘤、精原细胞瘤、甲状腺滤泡癌和畸胎瘤、淋巴谱系的造血系统肿瘤(例如T细胞和B细胞肿瘤,包括但不限于T细胞障碍(如T早幼淋巴细胞性白血病(T-PLL)),包括小细胞和脑形细胞类型的T细胞障碍);大颗粒淋巴细胞白血病(LGL),优选T细胞类型的大颗粒淋巴细胞白血病;a/d T-NHL肝脾淋巴瘤;外周/胸腺后T细胞淋巴瘤(多形和免疫母细胞亚型);血管中心性(鼻)T细胞淋巴瘤;头癌或颈癌、肾癌、直肠癌、甲状腺癌;急性骨髓淋巴瘤,以及所述癌症的任何组合。本文描述的方法也可以用于治疗转移性癌症、难治性癌症(例如,先前的免疫疗法(例如用阻断CTLA-4或PD-1抗体)难治的癌症)、和复发性癌症。

#### [0371] 组合疗法

[0372] 除以上提供的疗法外,本文描述的抗体还可以与另一种疗法组合使用。例如,对于癌症治疗,可以将本文描述的抗体给予至还正在接受另一种癌症治疗(如化疗、放射、手术或基因疗法)的受试者。

[0373] 治疗方法可以包括将本文描述的抗体(例如,拮抗剂抗体、激动剂抗体和具有经修饰的重链恒定区的ADC)与另一种分子例如抗体(例如,拮抗剂抗体、激动剂抗体和ADC)共给予。可以将本文描述的刺激免疫系统的抗体与刺激免疫系统的另一种分子(例如,作为共刺激分子的激动剂或抑制性分子的抑制剂的分子)一起给予。

[0374] 可以将本文描述的抗体单独或与一种或多种另外的免疫刺激抗体(例如,CTLA-4和/或PD-1和/或PD-L1和/或LAG-3阻断物)一起与标准的癌症治疗组合。例如,可以将本文描述的抗体单独或与一种或多种另外的抗体一起有效地与化疗方案组合。在这些情况下,可以减少与本公开文本的组合一起给予的其他化疗剂的剂量(Mokyr等人(1998) Cancer Research 58:5301-5304)。这种组合的例子是本文描述的抗体在有或没有另外的抗体的情况下进一步与氮烯咪胺(decarbazine)或IL-2的组合,以用于治疗黑色素瘤。

[0375] 本文描述的抗体可以与抗肿瘤抗体组合,所述抗肿瘤抗体例如Rituxan®(利妥昔单抗)、Herceptin®(曲妥珠单抗)、Bexxar®(托西莫单抗)、Zevalin®(替伊莫单抗)、Campath®(阿仑单抗)、Lymphocide®(依帕珠单抗)、Avastin®(贝伐单抗)和Tarceva®(埃罗替尼)等。本文描述的抗体也可以与以下化疗剂中的一种或多种组合:喜树碱(CPT-11)、5-氟尿嘧啶(5-FU)、顺铂、阿霉素、伊立替康、紫杉醇、吉西他滨、顺铂、紫杉醇、卡铂-紫杉醇(Taxol)、阿霉素、5-fu或喜树碱+apo21/TRAIL(6X组合);蛋白酶体抑制剂(例

如硼替佐米或MG132) ;Bcl-2抑制剂(例如BH3I-2' (bcl-x1抑制剂)、吡啶胺双加氧酶-1 (ID01)抑制剂(例如INCB24360)、AT-101(R-(-)-棉子酚衍生物)、ABT-263(小分子)、GX-15-070(obatoclox)或MCL-1(骨髓性白血病细胞分化蛋白-1)拮抗剂)、iAP(细胞凋亡蛋白的抑制剂)拮抗剂(例如smac7、smac4、小分子smac模拟物、合成smac肽(参见Fulda等人,Nat Med 2002;8:808-15)、ISIS23722(LY2181308)或AEG-35156(GEM-640))、HDAC(组蛋白脱乙酰酶)抑制剂、抗CD20抗体(例如利妥昔单抗)、血管生成抑制剂(例如贝伐单抗)、靶向VEGF和VEGFR的抗血管生成剂(例如阿瓦斯丁)、合成三萜类(参见Hyer等人,Cancer Research 2005;65:4799-808)、c-FLIP(细胞FLICE抑制性蛋白)调节剂(例如PPAR $\gamma$ (过氧化物酶体增殖剂激活的受体 $\gamma$ )的天然和合成配体、5809354或5569100)、激酶抑制剂(例如索拉非尼)、曲妥珠单抗、西妥昔单抗、坦罗莫司、mTOR抑制剂(如雷帕霉素和坦罗莫司)、硼替佐米、JAK2抑制剂、HSP90抑制剂、PI3K-AKT抑制剂、来那度胺、GSK3 $\beta$ 抑制剂、IAP抑制剂和/或遗传毒性药物。

[0376] 本文描述的抗体和组合抗体疗法可以进一步与一种或多种抗增殖细胞毒性剂组合使用。可用作抗增殖细胞毒性剂的化合物的种类包括但不限于以下化合物:

[0377] 烷基化剂(包括但不限于氮芥、乙烯亚胺衍生物、烷基磺酸盐、亚硝基脲和三氮烯):尿嘧啶芥、盐酸氮芥、环磷酰胺(CYTOXAN<sup>TM</sup>)、磷酰胺、美法仑、苯丁酸氮芥、胍血生、曲他胺、三亚乙基硫代磷胺、白消安、卡莫司汀、洛莫司汀、链脲佐菌素、达卡巴嗪和替莫唑胺。

[0378] 抗代谢物(包括但不限于叶酸拮抗剂,嘧啶类似物,嘌呤类似物和腺苷脱氨酶抑制剂):甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶、氟尿苷、阿糖胞苷、6-巯基嘌呤、6-硫代鸟嘌呤、磷酸氟达拉滨、戊他汀和吉西他滨。

[0379] 用于与本文描述的抗体组合的合适的抗增殖剂包括但不限于紫杉烷、紫杉醇(紫杉醇可作为TAXOL<sup>TM</sup>商购获得)、多西他赛、圆皮海绵内酯(DDM)、dictyostatin(DCT)、黄柏苷A(Peloruside A)、埃博霉素、埃博霉素A、埃博霉素B、埃博霉素C、埃博霉素D、埃博霉素E、埃博霉素F、呋喃酮D、脱氧埃博霉素B1、[17]-脱氢脱氧埃博霉素B、[18]脱氢脱氧埃博霉素B、C12,13-环丙基-埃博霉素A、C6-C8桥接埃博霉素A、反式-9,10-脱氢埃博霉素D、顺式-9,10-脱氢埃博霉素D,16-去甲基埃博霉素B、埃博霉素B10、二甲酰胺、帕妥匹隆(EPO-906)、KOS-862、KOS-1584、ZK-EPO、ABJ-789、XAA296A(圆皮海绵内酯)、TZT-1027(soblidotin)、ILX-651(tasidotin盐酸盐)、软海绵素B、甲磺酸艾瑞布林(E-7389)、Hemiasterlin(HTI-286)、E-7974、Cryptophycins、LY-355703、美登素(Maytansinoid)免疫缀合物(DM-1)、MKC-1、ABT-751、T1-38067、T-900607、SB-715992(依品昔布(ispinesib))、SB-743921、MK-0731、STA-5312、软珊瑚醇(eleutherobin)、17 $\beta$ -乙酰氧基-2-乙氧基-6-氧代-B-高-雌甾-1,3,5(10)-三烯-3-醇、环链素、异莱利霉素(isolaulimalide)、莱利霉素(laulimalide)、4-表-7-脱羟基-14,16-二去甲基-(+)-圆皮海绵内酯和隐硫酮1以及还有本领域已知的其他微管蛋白稳定剂。

[0380] 组合治疗可以同时或顺序给予。在某些例子中,组合是固定剂量组合。

[0381] 在需要连同用本文描述的抗体治疗一起或在用本文描述的抗体治疗之前使增殖性细胞静止的情况下,也可以将激素和类固醇(包括合成类似物)如17 $\alpha$ -炔雌醇、己烯雌酚、睾酮、泼尼松、氟甲睾酮、屈他雄酮丙酸酯、睾内酯、醋酸孕甾酮、甲基泼尼松龙、甲基-睾酮、泼尼松龙、去炎松、氯烯雌醚、羟孕酮、氨鲁米特、雌莫司汀、醋酸甲羟孕酮、亮丙瑞林、氟他

米特、托瑞米芬、ZOLADEX<sup>TM</sup>给予至患者。当采用本文描述的方法或组合物时,也可以根据需要给予在临床环境中用于调节肿瘤生长或转移的其他药剂(如抗模拟物)。

[0382] 用于安全且有效给予化疗剂的方法是本领域技术人员已知的那些。另外,它们的给予在标准文献中进行了描述。例如,许多化疗剂的给予描述于Physicians' Desk Reference (PDR), 例如1996版(Medical Economics Company, Montvale, N.J. 07645-1742, 美国)中;其披露内容通过引用并入本文。

[0383] 可以根据本领域熟知的治疗方案来给予一种或多种化疗剂和/或放射疗法。对于本领域技术人员清楚的是,一种或多种化疗剂和/或放射疗法的给予可以根据所治疗的疾病以及一种或多种化疗剂和/或放射疗法对所述疾病的已知作用而变化。而且,根据熟练临床医生的知识,鉴于观察到的所给予的治疗剂对患者的效果并且鉴于观察到的疾病对所给予的治疗剂的反应,治疗方案(例如,剂量和给予时间)可以变化。

[0384] 通过以下实施例进一步说明本公开文本,不应将所述实施例视为进一步限制。本申请中引用的所有附图和所有参考文献、基因库(Genbank)序列、专利和公开的专利申请的内容通过引用明确地并入本文。具体地,PCT申请WO 09/045957、WO 09/073533、WO 09/073546、WO 09/054863、PCT/US2013/072918、PCT/US15/61632和美国专利公开号2011/0150892的披露内容通过引用明确地并入本文。

[0385] 实施例

[0386] 实施例1:具有IgG2铰链的抗CD73抗体相对于具有非IgG2铰链的相同抗体而言的增强的内化

[0387] 已经观察到,在细胞CD73抑制测定中具有IgG2恒定区的杂交瘤来源的抗CD73抗体11F11比作为IgG1或IgG1.1(无效应子的IgG1)的11F11抗体更有力,并且比具有IgG1恒定区的其他抗CD73抗体更有力。至少基于此观察结果,假设相对于具有非IgG2铰链(如IgG1铰链)的抗CD73抗体,具有IgG2铰链的抗CD73抗体的抑制活性增加是由于抗体的内化增加。为了检验此假设,在内化测定中测试了具有IgG1或IgG2恒定区的抗CD73抗体或其部分。

[0388] 表7列出了所使用的抗体,该表提供了每种抗体的(全部为人类的)恒定区的结构域中每一个结构域(包括特定突变(如果存在的话))的身份。

[0389] 表7

抗体名称	VH	CH1	铰链	CH2	CH3	HC SEQ ID NO <sup>1</sup>	LC SEQ ID NO <sup>2</sup>
11F11	11F11	IgG2	IgG2	IgG2	IgG2	44	72
4C3	4C3	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	45	73
6D11	6D11	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	46	74
CD73.10-IgG2-C219S	CD73.10	IgG2	IgG2 (C219S)	IgG2	IgG2	47	72
CD73.10-IgG2-C219S-IgG1.1	CD73.10	IgG2	IgG2 (C219S)	IgG1.1 (A330S/P331S)	IgG2	48	72
CD73.10-IgG1.1	CD73.10	IgG1.1	IgG1.1 (L234A/L235E/G237A)	IgG1.1 (A330S/P331S)	IgG1.1	49	72
CD73.4-IgG2-C219S	CD73.10	IgG2	IgG2 (C219S)	IgG2	IgG2	50	72
CD73.3-IgG1.1	CD73.3	IgG1.1	IgG1.1 (L234A/L235E/G237A)	IgG1.1 (A330S/P331S)	IgG1.1	51	73

[0391] <sup>1</sup>全长重链的SEQ ID NO

[0392] <sup>2</sup>全长轻链的SEQ ID NO

[0393] 通过在HEK293-6E细胞中表达重链和轻链来制备抗体，并在转染后5天收获培养基。

[0394] 测量了构建体与Fc $\gamma$ R的结合。对于IgG1.1和IgG2分子的hCD64和hCD32a-H131结合数据与对于不同Fc的预期值一致。IgG1.1f是最惰性的Fc。IgG2和IgG2-C219S显示出FcR对于IgG2的典型结合。正如所预期的，IgG2-C219S-G1.1f的数据表明比野生型IgG1或IgG2显著更弱的结合但与IgG1.1f相比结合增加。

[0395] 测量抗体对于人CD73的亲和力，以确定恒定区的变化是否影响亲和力。如下通过表面等离子体共振 (SPR) 确定亲和力。在25°C下通过表面等离子体共振 (SPR) 使用Biacore T100仪器 (GE Healthcare) 研究CD73结合动力学和亲和力。此实验中测试了hCD73的N末端结构域 (由人CD73的残基26-336组成；称为N-hCD73) 与被捕获在固定化蛋白A表面上的抗体的结合。对于这些实验，在0.01M HEPES (pH 7.4)、0.15M NaCl、3mM EDTA、0.005% v/v吐温20的运行缓冲液中，使用标准乙基 (二甲基氨基丙基) 碳二亚胺 (EDC) /N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 化学反应将蛋白A (Pierce) 在CM5传感器芯片 (GE Healthcare) 的流动池1-4上固定至3000-4000RU的密度，用乙醇胺封闭。通过以下方法进行动力学实验，首先使用30s接触时间以10 $\mu$ l/min在蛋白A上捕获抗体 (5-10 $\mu$ g/ml)，使用180s缔合时间和360s解离时间以30 $\mu$ l/min流速结合600、200、66.7、22.2、7.4和2.5nM N-hCD73-his。动力学实验的运行缓冲液是10mM磷酸钠、130mM氯化钠、0.05%的吐温20，pH为7.1。在每个循环后，使用10mM甘氨酸 (pH 1.5) 以30 $\mu$ l/min流速的两个30s脉冲再生表面。将传感图数据进行双重参照 (double-referenced)，然后使用Biacore T100评价软件v2.0.4拟合到1:1朗缪尔模型 (Langmuir model)，以确定缔合速率常数 (ka)、解离速率常数 (kd) 和平衡解离常数 (KD)。

[0396] 结果显示于表8中。所述表汇总了来自不同实验的数据。对于显示了两组数字的抗

体,每组对应于在单独实验中获得的数据。

[0397] 表8

[0398]

mAb	Fc	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)
11F11	IgG2	2.6E+05	4.2E-04	1.6
		2.9E+05	1.6E-04	0.56
4C3	IgG1	2.2E+04	2.4E-03	110
		2.4E+04	2.2E-03	92
6E11	IgG1	5.7E+04	1.4E-03	25
CD73.10	IgG1.1	2.7E+05	1.3E-03	4.7
CD73.10	IgG2-C219S	2.2E+05	1.4E-03	6.2
		2.2E+05	1.8E-03	8.3
CD73.10	IgG2-C219S-IgG1.1	2.4E+05	1.4E-03	5.7
		2.3E+05	1.60E-03	6.8
CD73.4	IgG2-C219S	2.9E+05	1.6E-04	0.55
		2.8E+05	3.3E-04	1.2
		2.9E+05	3.7E-04	1.3
CD73.3	IgG1.1	1.6E+04	3.6E-03	220

[0399] 结果指示抗体(例如CD73.10)中不同恒定区的存在没有改变抗体对人CD73的亲合力。

[0400] 在两种不同的测定中测量了抗CD73抗体的内化。

[0401] A. 高含量内化测定(2小时固定时间测定)

[0402] 通过在抗体孵育2小时后评估细胞表达,使用抗CD73抗体来测试在Calu6细胞中抗CD73抗体依赖性CD73内化。将20 $\mu$ l完全培养基(含10%热灭活的胎牛血清的Gibco RPMI Media 1640)中的细胞(2,000个细胞/孔)铺板在384BD Falcon板中,并在37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>和95%湿度下生长过夜。将抗CD73抗体用含0.2% BSA的PBS缓冲液连续稀释,并以5 $\mu$ l/孔添加至细胞板中。将细胞与抗体在37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>和95%湿度下孵育2小时,然后用PBS缓冲液洗涤一次。然后将甲醛(在PBS中最终为4%)以20 $\mu$ l/孔添加至细胞板中,并将所述板在室温下孵育10分钟。之后,吸取所有液体并将细胞用30 $\mu$ l PBS洗涤一次。将检测抗体(2.5 $\mu$ g/孔的抗CD73 Ab CD73.10.IgG2C219S)以15 $\mu$ g/孔添加至固定细胞板中。将细胞在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜。第二天,将板用PBS缓冲液洗涤两次,然后添加含有Alexa-488山羊抗人的二抗和DAPI,在室温下染色1小时。在PBS缓冲液中洗涤3次后,将板在Arraysan Vti (Cellomics,匹兹堡,宾夕法尼亚州)上成像。测量IC<sub>50</sub>和Ymax。通过与100nM剂量的11F11(作为内部最大值)比较确定Ymax。将所有计算结果确定为与此对照(将其设置为100%)相比的内化百分比。

[0403] 结果提供于表9中。

[0404] 表9

[0405]

mAb	恒定区	表位组	EC50 (nM)	Ymax
11F11	IgG2	1	0.58	98
4D4	IgG2	1	0.38	104
10D2	IgG1	1	ND	29

24H2	IgG1	1	8.2	51
7A11	IgG1	1	2.59	50
CD73.4	IgG2-C219S-IgG1.1	1	1.2	97
CD73.10	IgG1.1	1	6.18	64
CD73.10	IgG2-C219S	1	0.67	99
CD73.10	IgG2-C219S-IgG1.1	1	0.87	99

[0406] ND=未检测到

[0407] NA=不适用

[0408] 结果显示,具有IgG2铰链的抗CD73抗体具有较低的EC50和较高的Ymax。

[0409] 进行了动力学内化研究以评估内化速率。测试了几个细胞系:H2228细胞、HCC15细胞、Calu6细胞和NCI-H2030。将20 $\mu$ l完全培养基(含10%热灭活的胎牛血清的Gibco RPMI Media 1640)中的细胞(2,000个细胞/孔)铺板在384BD Falcon板中,并在37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>和95%湿度下生长过夜。将CD73抗体用含0.2% BSA的PBS缓冲液稀释至10 $\mu$ g/ml并以5 $\mu$ l/孔添加至细胞板中。将细胞与抗体在37 $^{\circ}$ C下孵育0-2小时的时间历程,然后用PBS缓冲液洗涤一次。随后将细胞在室温下用甲醛(在PBS中最终为4%)固定10分钟,然后用30 $\mu$ l PBS洗涤一次。将检测抗体(2.5 $\mu$ g/孔的抗-CD73 Ab CD73.10.IgG2C219S)用含0.2% BSA的PBS缓冲液稀释,并以15 $\mu$ l/孔添加至固定细胞板中。将所述板在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜。第二天,在PBS缓冲液中洗涤3次后,添加二抗Alexa488山羊抗人和DAPI。将细胞在室温下染色60分钟,洗涤3次后,使用Arrayscan Vti (Cellomics,匹兹堡,宾夕法尼亚州)获取图像。结果提供于图1A至图1J和表10和表11中。表10中的值来源于图1A至图1J中显示的数据。

[0410] 表10

细胞系	11F11 (IgG2) T <sub>1/2</sub> (min)	6E11 (IgG1) T <sub>1/2</sub> (min)	CD73.10.IgG1.1f T <sub>1/2</sub> (min)
Calu6	3.9	60.9	14.4
HCC44	3.3	27.9	23.5
H2030	3.3	40.3	18.3
H647	45.7	N/A	N/A
H2228	10.9	36.5	35.7
HCC15	2.2	84.4	37.9
SKLU1	6.8	18.0	17.2
SKMES1	2.2	62.8	32.3
SW900	10.3	94.9	43.4

[0411] 表11:4种人类细胞系中CD73抗体的T<sub>1/2</sub>和内化%

	H228细胞		HCC15细胞		Calu6细胞		H2030细胞	
	T <sub>1/2</sub> min	内 化%						
[0413] CD73.11-IgG2CS	-	-	-	-	4.1	89	4.6	85
CD73.10-IgG2CS	9.7	93	2.6	91	3.0	91	3.3	85
CD73.10-IgG2CS-IgG1.1f	9.4	92	3.0	91	3.1	91	4.3	87
[0413] CD73.4-IgG2CS	13.8	94	3.1	94	6.5	88	3.7	89
CD73.10-IgG1.1f	35.7	33	37.9	71	14.4	63	18.3	67
CD73.3-IgG1.1f	16.5	-47	>240	38	111.4	79	>120	27
[0414] 11F11	10.9	96	2.2	94	3.9	87	3.3	90
4C3	7.6	-48	141.5	28	0.6	-6	>120	-34
6E11	36.5	13	84.4	64	107.4	68	40.32	51

[0415] 结果指示11F11 (IgG2抗体) 在数分钟内内化, 在30分钟内达到平台, 而6E11 (IgG1抗体) 内化更慢, 在约1hr时达到平台 (图1A至图1J)。类似地, 具有IgG1恒定区的11F11比具有IgG2恒定区的11F11的内化更慢。在几种细胞系中观察到了这种趋势 (表10和表11和图1A至图1J)。

#### [0416] B. 通过流式细胞术测量的内化

[0417] 还通过流式细胞术测试了抗CD73抗体介导的CD73内化。将所示细胞与10 $\mu$ g/mL的所示抗体在冰上孵育30分钟, 洗涤几次, 并转移至37 $^{\circ}$ C持续指示的时间。在指示的孵育时间后, 同时收获细胞。再次将细胞用一抗 (用于初次孵育的相同抗体) 染色, 然后用抗人二抗染色。然后通过流式细胞术分析细胞的CD73表达。

[0418] 显示于图1E和表11中的结果与上述内化测定中获得的那些结果一致, 并且指示所有具有IgG2铰链和CH1的抗体均诱导快速且完全的内化。在洗出后22小时之后, CD73水平仍然是低的, 这指示内化是持久的。

[0419] 在NCI-H292细胞系中获得了图1F和表11中所示的类似结果, 其中抗体在孵育时间内保持培养 (无洗出)。此外, 这些数据指示内源性CD73的快速且显著的内化以及内源性CD73的下调的维持。

[0420] 还使用人SNU-C1 (结肠癌细胞系) 和NCI-H1437 (非小细胞肺癌细胞系) 细胞进行了内化测定。显示于图1I和图1J中的结果还指示在5小时内达到具有最高水平的快速内化, 而CD73.4. IgG2-C219S-IgG1.1f在SNU-C1中达到约50%的最高内化水平并且在NCI-H1437细胞中达到60%的最高内化水平。图1G和图1H显示了Calu6和NCI-H292细胞中CD73.4. IgG2-C219S-IgG1.1f的内化的类似动力学。对于显示内化CD73%的图, 此数字是如下获得的:

$$[0421] \quad \text{内化CD73\%} = 100 - \left( \frac{MFI_{t=x} - MFI_{\text{背景}}}{MFI_{t=0} - MFI_{\text{背景}}} \times 100 \right)$$

[0422] 其中对于每种抗体,  $MFI_{t=x}$  是给定时间点的MFI,  $MFI_{t=0}$  是在  $t=0$  时的最大荧光, 并

且MFI<sub>背景</sub>仅是二级Ab的MFI。

[0423] 表12:几种细胞系中抗体介导的CD73内化的EC<sub>50</sub>(来自图1G至图1I的数据)

	Calu6		NCI-H292		SNU-C1		SNU-C1 (未洗涤)		NCI-H143 7		NCI-H1437 (未洗涤)	
	Ymax (%)	T <sub>1/2</sub> (hr)	Ymax (%)	T <sub>1/2</sub> (hr)	Ymax (%)	T <sub>1/2</sub> (hr)	Ymax (%)	T <sub>1/2</sub> (hr)	Ymax (%)	T <sub>1/2</sub> (hr)	Ymax (%)	T <sub>1/2</sub> (hr)
[0424] mAb-CD73.4-IgG2-IgG1.1f	76.8	0.5661	77.64	0.2633	48.96	0.4954	38.39	1.025	63.12	0.3164	62.78	0.3418
mAb-CD73.4-IgG2	75.59	0.6003	78.42	0.2766	-	-	-	-	-	-	-	-
mAb-CD73.4-IgG1.1f	44.99	1.737	51.49	0.2087	30.58	0.9915	33.16	2.33	49.76	0.4915	49.95	0.5384

[0425] 因此,相对于具有IgG1铰链的抗CD73抗体,具有IgG2铰链的抗CD73抗体内化更快并且内化程度更高。

[0426] 实施例2:具有IgG2铰链的GITR抗体相对于具有IgG1铰链的相同抗体而言的增强的激动剂活性

[0427] 此实施例证实,包含IgG2铰链的抗GITR抗体相对于具有IgG1铰链的相同抗体具有增强的诱导T细胞IL-2和IFN- $\gamma$ 分泌的能力。

[0428] 在上述的CHO-OKT3和3A9测定中已经观察到,与其中将重链恒定区转换为IgG1或无效应子IgG1(IgG1.1)的重链恒定区的相同抗体相比,具有IgG2恒定区的杂交瘤来源的抗体在刺激细胞因子分泌方面更有力。因此,在这些测定中进一步测试了IgG2恒定区或铰链对抗GITR抗体的影响。

[0429] 抗人GITR抗体的重链可变区(SEQ ID NO:75)与表13所示的重链恒定区连接。抗GITR抗体的轻链包含SEQ ID NO:77。表13显示了恒定区的每个结构域的身份:

[0430] 表13:此实施例中使用的抗体的重链恒定区

抗体名称	CH1	铰链	CH2	CH3	SEQ ID NO*
[0431] 抗GITR	IgG2 SEQ	IgG2 SEQ ID NO:8	IgG2 SEQ ID NO:9	IgG2 SEQ	SEQ ID

	ID NO:7			ID NO:10	NO:52
	抗GITR-IgG2 IgG2 SEQ ID NO:7	IgG2 SEQ ID NO:8	IgG2 SEQ ID NO:9	IgG2 SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:52
	抗GITR-IgG1 IgG1 SEQ ID NO:2	IgG1 SEQ ID NO:3	IgG1 SEQ ID NO:4	IgG1 SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:53
[0432]	抗GITR-IgG1.1 IgG1.1 SEQ ID NO:2	IgG1.1 (L234A/L235E/ G237A) SEQ ID NO:25	IgG1.1 (A330S/P331S) SEQ ID NO:24	IgG1.1 SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:54
	抗 GITR-IgG2-IgG1 或抗GITR.g2.g1 IgG2 SEQ ID NO:7	IgG2/IgG1 hybrid SEQ ID NO:22	IgG1 SEQ ID NO:4	IgG1 SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:55
	抗 GITR-IgG2-IgG1.1 或抗GITR.g2.g1.1 IgG2 SEQ ID NO:7	IgG2 SEQ ID NO:8	IgG1.1 (A330S/P331S) SEQ ID NO:24	IgG1 SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:56

[0433] \*全长重链恒定区的SEQ ID NO

[0434] 首先,将这些GITR抗体的结合亲和力与具有IgG1铰链的GITR抗体的结合亲和力进行比较。如下通过Biacore确定抗GITR抗体与可溶性GITR的结合亲和力。将抗GITR抗体捕获在人κ包被的芯片(约5KRU;Southernbiotech目录号2060-01)上,并使重组人GITR(rHGITR/Fc;R&D systems,目录号689-GR)以500nM、250nM、125nM、62nM和31nM的浓度流过芯片。mAb/体积的捕获浓度为2-40μg/mL(5μL,在10μL/min下)。抗原缔合时间在15μL/min下为5分钟,抗原解离时间为6分钟,并用50mM HCl/50mM NaOH(各12μL,在100μL/min下)进行再生。

[0435] 显示于图2中的结果指示具有IgG2铰链的所有三种GITR抗体对激活的T细胞具有类似的亲和力,因为GITR抗体具有IgG1或IgG1.1恒定区。

[0436] 接下来,测试具有IgG1恒定区或IgG2铰链/IgG1 Fc结构域的GITR抗体诱导从用表达抗CD3scFv(OKT3)的CHO细胞刺激的人供体T细胞分泌IL-2和IFN-γ的能力。CHO细胞表达低水平的OKT3以促进次优刺激,从而能够观察到抗GITR抗体的激动作用。用表达OKT3的CHO细胞和抗GITR抗体刺激来自供体的CD4+ T细胞,并测量IL-2和IFN-γ分泌。实验如下进行。对于用CD4+ T细胞进行的实验,CD4+ T细胞是根据制造商的方案从具有RosetteSep Human CD4+T细胞富集混合物(StemCell Technology#15062)的人PBMC获得的。将表达抗CD3scFv(OKT3)(CHO-OKT3)的CHO细胞用RPMI培养基洗涤两次,并以50K Rad的剂量进行照射。将细胞收获并将其以 $2.5 \times 10^5$ /mL重悬于培养基(补充有10%胎牛血清、2mM L-谷氨酰胺、55nMβ-巯基乙醇、1mM丙酮酸钠和100U/mL青霉素/链霉素的RPMI-1640)中。在96孔TC级平底板(Costar)中每孔接种 $2.5 \times 10^4$ 个CHO-OKT3细胞和 $1 \times 10^5$ 个T细胞。将细胞与8点、4倍滴定的GITR抗体(从40μg/mL开始)孵育。以40μg/mL添加不相关的hIgG1作为同种型对照。仅含有细胞的样品被包括在内以显示未经任何处理的基线活性。在第2天收获每个样品的上清液用于IL-2测量(仅针对使用CD4+T细胞的测定)(BD opt EIA人IL-2ELISA试剂盒;BD

Bioscience#555190),并在第3天收获每个样品的上清液用于IFN- $\gamma$ 测量(BD optEIA人IFN-g ELISA试剂盒;BD Bioscience#555142)。

[0437] 如图3A和图3B所示,具有IgG2铰链/IgG1 Fc结构域的抗体(抗GITR.g2.g1)诱导从T细胞分泌IL-2和IFN- $\gamma$ 的程度高于具有IgG1恒定区的抗体(抗GITR.g1)。这些恒定结构域的无效应子形式获得了类似的结果(图3C)。

[0438] 为了进一步证实包含IgG2铰链的抗GITR抗体增强T细胞的激活,测试了不同实验形式中的IL-2分泌。在此实验中,如下测试了GITR抗体诱导从3A9-hGITR细胞(异位表达人GITR的小鼠T细胞杂交瘤3A9细胞系)分泌IL-2的能力。将异位表达人GITR的小鼠T细胞杂交瘤3A9细胞系(3A9-hGITR)在存在增加量的所示抗体的情况下在抗CD3单克隆抗体包被的板上培养。将 $5 \times 10^4$ 个3A9-hGITR细胞在用 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 抗CD3抗体(克隆145-2C11;BD Biosciences)包被的板上培养,并用所示浓度的抗体处理7小时。

[0439] 如图4所示,所有具有IgG2铰链的抗体(抗GITR.g2、抗GITR.g2.g1f和抗GITR.g2.g1.f)诱导从3A9-hGITR细胞分泌IL-2的程度都高于其含有IgG1恒定区的对应物(抗GITR.g1f和抗GITR.g1.1f)。

[0440] 这些结果共同表明,具有IgG2铰链和g1或g1.1恒定区的抗GITR抗体比具有IgG1铰链的相同抗体更有力。

[0441] 实施例3:不同铰链/Fc组合对抗体/抗原复合物大小的影响

[0442] 如以上实施例中所示,与具有IgG1铰链的相同抗体相比,具有IgG2铰链的抗CD73抗体是更好的CD73细胞活性抑制剂并更好地内化,并且具有IgG2铰链的抗GITR抗体是比具有IgG1铰链的相同抗体更有力的激动剂。基于此观察结果以及IgG2铰链比IgG1铰链更僵硬的事实,可以推测,相对于具有IgG1铰链的抗体,在抗原与具有IgG2铰链的抗体之间形成较大的复合物。进行以下实验以分析此假设。

[0443] 通过SEC-MALS和DLS检查溶液中CD73/抗体复合物的结构和低聚状态。对于这些研究,将含有IgG1或IgG2恒定区的抗体与重组蛋白以不同的摩尔比混合,所述重组蛋白包含人CD73中含有C末端多组氨酸标签的全长细胞外结构域(人CD73的氨基酸残基26-546,称为hCD73-his)或对应于人CD73的N末端结构域的片段(氨基酸残基26-336,称为N-hCD73-his)。

[0444] 通过与在线多角度光散射检测器耦合的尺寸排阻色谱法(SEC-MALS)检查CD73/抗体复合物的低聚状态。在与Prominence Shimadzu UFLC连接的Shodex PROTEIN KW-803柱上,在以 $0.5 \text{ mL}/\text{min}$ 运行的含有 $200 \text{ mM K}_2\text{HPO}_4$ 、 $150 \text{ mM NaCl}$  (pH 6.8)、含有 $0.02\%$ 叠氮化钠( $0.1 \mu\text{m}$ 过滤的)的缓冲液中进行等度分离。使用SIL-20AC Prominence Shimadzu自动进样器将样品注入柱中,并从串联的三个在线检测器获得数据:Prominence SPD-20AD二极管阵列UV/vis分光光度计,接着是Wyatt miniDAWN<sup>TM</sup>TREOS多角度光散射检测器,然后是Wyatt Optilab T-rEX折射率检测器。使用Astra(Wyatt)和Labsolutions(Shimadzu)软件收集数据并进行分析。

[0445] 动态光散射(DLS)研究是在 $25^\circ\text{C}$ 下在384孔板中的Wyatt DynaPro读板器上进行的。实验参数是每次测量的20个采集,每个采集5s,并一式四份记录测量结果,报告平均值和标准差。使用Dynamics软件(Wyatt Technologies)中的“正则化(Regularization)”算法来拟合强度自相关函数。

[0446] SEC-MALS和DLS的总结提供于图6和图7中。单独分析抗体显示了每种抗体的保留时间(约16-17min)、质量(140-150kDa)和流体动力学半径(5.0-5.4nm),这些对于单体单克隆抗体而言是典型的。hCD73-his蛋白的数据与在溶液中采用预期的二聚体结构的蛋白质一致;具体地,根据SEC-MALS数据确定的质量(120kDa)与CD73-his二聚体的预期质量(117kDa)一致,而与hCD73-his单体的预期质量(58.5kDa)不一致。N-hCD73的数据与在溶液中作为单体的重组N-结构域蛋白一致(SEC-MALS测量的质量=38kDa,与预期单体质量=35.0kDa相比),这是预期的,因为全长CD73细胞外结构域中与蛋白质的二聚有关的区域包含在C-末端结构域内,而对N-结构域残基没有贡献。

[0447] 发现给定抗体与N-hCD73-his的等摩尔混合物在SEC中洗脱为单一类型,其保留时间比单独抗体或N-hCD73-his的保留时间短,并且通过DLS得到的流体动力学半径(Rh)也更大,这与复合物的形成是一致的。MALS数据指示这些复合物的质量为约210kDa。这与一个N-hCD73-his分子结合给定抗体的两个Fab结构域中的每一个以形成1:2抗体N-hCD73-his复合物是一致的。

[0448] 抗CD73抗体与hCD73-his二聚体的混合物的SEC-MALS数据显示,所述混合物比单独的hCD73-his或抗体更早地洗脱,这表明形成了复合物。含有相同可变区但不同恒定结构域的mAb的数据的比较显示,hCD73-his与含有IgG2恒定结构域(IgG2-C219S、IgG2-C219S-IgG1.1f)的mAb的复合物的洗脱时间比hCD73-his与含有IgG1.1f恒定结构域的mAb的复合物的洗脱时间更早。另外,hCD73-his与含有IgG2恒定结构域的mAb的复合物的MALS测定质量大于hCD73-his与含有IgG1恒定结构域的mAb的复合物的MALS测定质量。DLS数据进一步显示,hCD73-his与含有IgG2恒定结构域的mAb的复合物的流体动力学半径大于hCD73-his与含有IgG1恒定结构域的mAb的复合物的流体动力学半径。例如,具有三个不同恒定区(IgG2-C219S、IgG2-C219S-IgG1.1f或IgG1.1f)的CD73.4的SEC-MALS和DLS数据显示于图5中。在这里可以看出,与hCD73-his和CD73.4-IgG1.1f的复合物相比,hCD73-his与含有IgG2恒定结构域的CD73.4的复合物具有更短的保留时间(图5A)、更大的流体动力学半径(图5B)和更大的MALS测定质量(图5C)。基于MALS质量,hCD73-his与抗体之间的复合物的结构和化学计量比的示意模型显示于图5D中,其中含有CD73.4-IgG1.1f的复合物主要形成较小的2:2(峰1=约550kDa)或4:4mAb/CD73二聚体复合物(峰2=约1300kDa),而CD73.4-IgG2-C219S或CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f与hCD73-his形成大得多的复合物(>3000kDa),其精确的结构和化学计量比无法确信地建模。

[0449] SEC-MALS和DLS数据共同证实,与含有IgG1较链区(IgG1.1f)的mAb相比,hCD73-his与含有IgG2较链区(IgG2-C219S或IgG2-C219S-IgG1.1f)的mAb之间形成更大的复合物。

[0450] 实施例4: IgG2同种型的CH1进一步改善抗体介导的CD73内化

[0451] 在Ca1u6和H292细胞中进行了另外的内化测定以进一步区分同种型对内化的作用。如实施例1A和实施例1B中所述进行内化测定(不含抗体的洗出步骤的流式细胞术方案),并且将表14中显示的不同杂交体同种型的抗体在孵育时间内以10 $\mu$ g/mL维持在培养物中。对于流式细胞术实验,实施例1B的方法适于在96孔板(与48孔板相对)中以每孔50,000个细胞进行高通量分析。

[0452] 表14: 用CD73.4的可变区测试的恒定区:

构建体	恒定区的SEQ	
	ID	NO
IgG1f	78	野生型IgG1f
IgG1.1f	83	标准惰性IgG1.1f
IgG2.3	79	IgG2 A型 (C219S)
IgG2.5	82	IgG2 B型 (C131S)
IgG2.3G1-KH	81	IgG2.3的CH1、上部铰链和下部铰链/上部CH2, 其他所有为IgG1f
IgG2.5G1-KH	90	IgG2.5的CH1、上部铰链和下部铰链/上部CH2, 其他所有为IgG1f
IgG2.3G1-AY	80	IgG2.3的CH1和上部铰链, 其他所有为IgG1f
IgG2.5G1-AY	89	IgG2.5的CH1和上部铰链, 其他所有为IgG1f
IgG1-G2.3G1-KH	93	IgG1的CH1, IgG2.3的上部铰链和下部铰链/上部CH2, 其他所有为IgG1f
IgG1-G2.3G1-AY	92	IgG1的CH1, IgG2.3的上部铰链, 其他所有为IgG1f
IgG2.3G1.1f-KH	84	IgG2.3的CH1、上部铰链和下部铰链/上部CH2, 其他所有为IgG1.1f
IgG2.5G1.1f-KH	88	IgG2.5的CH1、上部铰链和下部铰链/上部CH2, 其他所有为IgG1.1f
IgG1- $\delta$ THT	85	IgG1, 其中从铰链去除了THT序列
IgG2.3-加THT	86	IgG2.3, 其中THT序列 (来自IgG1) 添加至铰链
IgG2.5-加THT	91	IgG2.5, 其中THT序列 (来自IgG1) 添加至铰链
IgG2.3-加GGG	87	IgG2.3, 其中柔性GGG序列添加至铰链

[0454] 显示Fc  $\gamma$  R结合正如对于每种构建体所预期的, 即, Fc  $\gamma$  R结合由下部铰链/CH2区域驱动。

[0455] 结果显示于图8A、图8B和图8C以及表15和表16中。表15中所示的数据是使用与实施例1B中所述相同的方案生成的 (未洗出抗体)。表16中显示的数据是使用与实施例1A中所述相同的方案生成的。

[0456] 表15: 在Calu6和NCI-292细胞中抗体介导的CD73内化的Ymax和T<sub>1/2</sub>

	Calu6		NCI-H292	
	Ymax (%)	T <sub>1/2</sub> (hr)	Ymax (%)	T <sub>1/2</sub> (hr)
mAb-CD73.4-IgG1f/LC-11F11-Vk2	55.72	0.8452	73.05	0.5014
mAb-CD73.4-IgG2.3G1-AY-pTT5-SP	85.07	0.3326	90.25	0.272
mAb-CD73.4-IgG2.3G1-KH	81.62	0.3962	91.61	0.2801

	mAb-CD73.4-G1-G2.3-G1-AY	72.7	0.4229	84.51	0.3083
	mAb-CD73.4-IgG1- $\delta$ THT	69.27	0.5652	83.63	0.3441
	mAb-CD73.4-G1-G2.3-G1-KH	65.67	0.5674	83.29	0.343
	mAb-CD73.4-IgG2.3-加THT	81.19	0.3551	91.41	0.2935
	mAb-CD73.4-IgG2.3-加GGG	81.72	0.3355	91.6	0.2712
	mAb-CD73.4-IgG2.5	78.98	0.3485	89.56	0.3057
[0458]	mAb-CD73.4-IgG2.5G1.1f-KH	79.63	0.3527	90.86	0.2993
	mAb-CD73.4-IgG2.5G1-AY	81.91	0.2901	91.3	0.2452
	mAb-CD73.4-IgG2.5G1-KH	76	0.2837	90.75	0.256
	mAb-CD73.4-IgG2.5加THT/LC	80.15	0.2869	89.6	0.2565
	mAb-CD73.4-IgG2-C219S/LC	82.35	0.3725	88.91	0.2866
	mAb-CD73.4-IgG2-C219S/LC	82.54	0.3639	87.66	0.2845
	mAb-CD73.4-IgG1.1f+K/LC	57.07	1.519	70.4	0.4969
	mAb-CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f	80.98	0.3508	90.35	0.2764

[0459] 表16:Ca1u6细胞中具有不同恒定区的CD73.4的内化特征

CD73_mAb_克隆	内化 最大值	速度
CD73.4-IgG1f/LC-11F11-Vk2	+	+
CD73.4-Vh-hHC-IgG2.3G1-AY-pTT5-SP5	++++	++++
CD73.4-Vh-hHC-IgG2.3G1-KH	++++	+++
CD73.4-Vh-hHC-G1-G2.3-G1-AY	++	++
CD73.4-Vh-hHC-G1-G2.3-G1-KH	++	++
CD73.4-Vh-hHC-IgG1- $\delta$ THT	++	+++
CD73.4-Vh-hHC-IgG2.3-加THT	++++	++++
[0460] CD73.4-Vh-hHC-IgG2.3-加GGG	++++	++++
CD73.4-Vh-hHC-IgG2.5	++++	++++
CD73.4-Vh-hHC-IgG2.5G1.1f-KH	++	++++
CD73.4-Vh-hHC-IgG2.5G1-AY	+++	++++
CD73.4-Vh-hHC-IgG2.5G1-KH	+++	++++
CD73.4-Vh-hHC-IgG2.5加THT/LC	++++	++++
CD73.4-Vh-hHC-IgG2-C219S/LC	++++	++++
CD73.4-Vh-hHC-IgG2-C219S/LC	++++	++++
CD73.4-Vh-hHC-IgG1.1f+K/LC	+	+
CD73.4-Vh-hCh-IgG2-C219S-IgG1.1f	++++	++++

[0461] 图8A至图8C和表15和表16指示,具有IgG2同种型的铰链和CH1结构域的抗体最有效地驱动CD73的内化,而具有IgG1铰链和CH1结构域的抗体对应于图中较低的曲线即内化程度较低、另外,与人IgG1铰链相比,仅含有来自IgG2的铰链的抗体具有增加的内化。因此,相对于具有IgG1同种型的抗体,具有IgG2同种型的铰链和CH1结构域的抗体具有优越的内化特性。

[0462] 因此,取决于测试的细胞系,抗CD73抗体mAb-CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f(具有C219S取代和IgG2 CH1结构域的IgG2铰链)诱导快速内化。内化的 $T_{1/2}$ 在几分钟到一个小时的范围内。大多数测试的细胞系具有低于10分钟的 $T_{1/2}$ 。对于一些细胞系诱导了几乎完全的内化,并且测试的大多数细胞系的表面CD73表达降低至少50%,所述表面CD73表达在5小时达到

最高水平,这比在一些情况下要短得多。

[0463] 实施例5: IgG2 CH1增强GITR Ab诱导的由CD4+T细胞分泌IL-2

[0464] 此实施例显示,相对于具有IgG1同种型的CH1结构域的抗体, IgG2同种型的CH1结构域增强抗GITR抗体诱导的T细胞活性。

[0465] 将实施例4中使用的相同的经修饰的重链恒定区与(实施例2的)抗GITR抗体的可变区连接。将供体CD4+T细胞与表达OKT3-scFv的CHO细胞和多种抗GITR抗体一起孵育,并测量分泌的IL-2水平。这根据实施例2中所述来进行。

[0466] 显示于图9中的结果指示,具有IgG2同种型的CH1结构域以及IgG2同种型的铰链的所有抗GITR抗体比具有IgG1铰链和CH1的那些更有效地刺激从CD4+T分泌IL-2。

[0467] 因此,此实施例显示,相对于不具有IgG2同种型的铰链和/或CH1结构域,激动剂抗GITR抗体中IgG2铰链和IgG2 CH1结构域的存在进一步增强抗体的激动剂活性。相对于具有IgG2同种型的铰链而非CH1的抗体,同时具有IgG2同种型的铰链和CH1结构域的抗体具有更强的激动剂作用。另外,具有来自IgG2的CH1结构域的抗体比具有来自IgG1同种型的CH1结构域的抗体具有更强的激动剂活性。具有来自IgG2的铰链和来自IgG1的CH1结构域的抗体比具有来自IgG1同种型的CH1和铰链的抗体具有更强的激动剂活性。

[0468] 实施例6: IgG2 CH1和铰链中的某些氨基酸残基与改善抗体介导的CD73内化的相关性

[0469] 制备具有表17所示的重链恒定区的抗CD73抗体(CD73.4),并如上所述将其在抗体介导的CD73内化测定中进行测试。

[0470] 表17: 与抗CD73可变区融合的重链恒定区

描述	构建体	恒定区的SEQ ID NO
IgG2的CH1结构域, 其他所有为IgG1。另外, Cys > Ser突变体以减少潜在的二硫键不均匀性:	G2-G1-G1-G1	94
	G2.5-G1-G1-G1	95
IgG1的CH1结构域, 其他所有为IgG2.3:	G1-G2.3-G2-G2	96
将IgG1中的CH1区域用IgG2中的那些互换, 单独或一起:	G1-KRGE GSSNLF	97
	G1-KRGE GS	98
	G1-SNLF	99
	IgG1-ITNDRTPR	100
	G1-SNLFPR	101
将IgG2中的CH1区域用IgG1中的那些互换, 单独或一起:	G2-RKEGSGNSFL	102
	G2-RKEGSG	103
	G2-NSFL	104
	IgG2-TIDNTRRP	105
	G2-NSFLRP	106
具有IgG2的CH2结构域残基的IgG1	G1-G1-G2-G1-AY	107
	G1-G1-G2-G1-KH	108
具有IgG1的CH2结构域残基的IgG2:	G2-G2.3-G1-G2-KH	109
	G2.5-G2.3-G1-G2-KH	110
	G2-G2.3-G1-G2-AY	111
在IgG1与IgG2之间互换铰链区域:	G2.5-G2.3-G1-G2-AY	112
	G1-G2.3-G1-G1-KH	113
	G2-G1-G2-G2-AY	114
	G2.5-G1-G2-G2-AY	115
	G1-G2-G1-G1-AY	116
	G2-G1-G2-G2-KH	117
	G2.5-G1-G2-G2-KH	118
铰链截短物	IgG1-deltaHinge	119
	IgG2-deltaHinge	120
	IgG2.5-deltaHinge	121
	IgG1-deltaG237	122
	IgG2-plusG237	123
其他	IgG2.4	124
	IgG2.3/4	125

[0471] 具有IgG2的CH2结构域残基的IgG1

[0472] 显示于图10中的结果提供了以下在CD73内化的情况下的信息:

[0473] • CH2结构域显现没有产生影响, 如以下各项所示:

[0474] o a) 观察到在具有形式“AY”的包含经修饰的重链恒定区的抗体(具有IgG2铰链 ERKCCVECPPCAPPVAG (SEQ ID NO:8))与具有形式“KH”的抗体(ERKCCVECPPCAPELLGG (SEQ ID NO:22))

[0475] 之间在内化能力方面非常小的差异(组5、组6和组7);

[0476] o b) CH2互换与野生型G1或G2是可比较的(组5和组6);和

[0477] o c) 残基237对内化没有影响:向IgG2铰链添加“G”残基或在IgG1铰链中缺失C末端“G”都未对内化产生影响(组9)。

[0478] 这表明CH2结构域不影响内化(即,CH2结构域可以来自IgG1或IgG2);

[0479] • 将IgG1中的组3中所示的CH1区域(KRGE GSSNLF、KRGE GS、SNLF、ITNDRTPR和 SNLFPR)与IgG2的那些CH1区域互换几乎没有提供益处,即内化仍然类似于IgG1的内化(参见组3);

[0480] • 将IgG2中的组4中所示的CH1区域(RKEGSGNSFL、RKEGSG、NSFL、TIDNTRRP和

NSFLRP) 与IgG1的那些CH1区域互换产生可变的影响:改变NSFL没有影响,而改变其他2个区域产生影响(RKEGSG和RP)(参见组4)。根据组3和组4的结果,显现CH1区域与铰链之间存在相互作用,其中RKEGSG和RP区域比NSFL区域更重要。

[0481] • 铰链区影响内化,即相对于IgG1的铰链,IgG2的铰链提供更好的内化(参见组7和组8)。另外,相对于IgG1,具有缺失的IgG1(G1- $\delta$ -铰链)改善了内化。具有缺失的IgG2(G2- $\delta$ -铰链)提供了与IgG2铰链的内化水平类似的內化水平。这表明铰链区影响内化,这种影响通过IgG2 CH1增强(G2-G1-G2-G2-AY与G1-G2-G1-G1-AY是可比较的);

[0482] • 与IgG2.3(C219S)相比,IgG2.4(C220S)具有类似或减少的内化。与单独IgG2.3或IgG2.4相比,IgG2.3/4(C219S/C220S)的内化大大降低(参见组10)。这表明具有IgG2铰链和C219S的抗体的内化与具有C220S的IgG2铰链的内化大致相同,两者均比具有C219S和C220S的IgG2铰链的内化要好得多;

[0483] • 与具有C131的构建体相比,IgG2.5(C131S突变)的内化降低(参见组1、组6和组7)。

[0484] 因此,这些结果指示CH1结构域和铰链均与抗体介导的CD73内化有关,并且相对于具有来自IgG1的这些区域的抗体,具有来自这些结构域的IgG2序列的抗体内化效果更好。

[0485] 实施例7:具有IgG2铰链和/或CH1结构域的抗体形成高分子量复合物

[0486] 还通过SEC-MALS和DLS实验,针对高分子量复合物的形成测试了具有表14中列出的重链恒定区的CD73.4抗体,如实施例3中所述。

[0487] 先前测试了本研究16种抗体中的三种:CD73.4-IgG1.1f,CD73.4-IgG2-C219S(也称为CD73.4-IgG2.3)和CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f(也称为CD73.4-IgG2.3G1.1f-KH)。单独抗体的SEC-MALS和DLS数据显示了每种抗体的保留时间、质量和流体动力学半径,这些对于单体单克隆抗体而言是典型的。与单独抗体或hCD73-his相比,每种抗体(5.5 $\mu$ M)与hCD73-his(5.5 $\mu$ M)的等摩尔复合物显示对于所有复合物的保留时间都较慢,这指示复合物的形成。16种复合物中每种复合物的SEC色谱图数据的覆盖显示于图11A中。色谱图数据可分为4个不同的峰,其显示于图11B中。峰1含有最大的种类,其MALS测定质量表明复合物的质量当量大于4:4hCD73-his:mAb复合物。峰2含有如下种类,其MALS测定质量表明复合物为约2:2hCD73-his:mAb复合物。峰3是次要种类,其具有低的信号并且MALS测定质量表明了约1:1hCD73-his:mAb复合物。峰4对应于单独mAb的洗脱,其MALS测定质量与游离抗体一致。为了定量每个种类的相对量,将每个色谱图的4个峰按照峰1(<12.9min)、峰2(12.9-15.1min)、峰3(15.1-16.7min)、峰4(16.7-19.3min)进行积分。积分还包括另外的积分范围(称为峰5(>19.3min))以解释任何低分子量种类,发现这些种类是可忽略不计的(<所有复合物的3.5%)。来自这种积分的每个物种的百分比总结于表18中。所有复合物都含有类似小百分比的峰3(约6%-9%),但其他峰的量是可变的。最值得注意的是,hCD73-his与含有来自hIgG1的CH1结构域的抗体之间的所有复合物均具有较大百分比的较小复合物(峰2),而含有来自hIgG2的CH1结构域的那些具有较大百分比的较大复合物(峰1)(表18和图11C)。这表明在较高阶的复合物形成中,铰链区和CH1结构域均具有重要作用。

[0488] 表18:具有经修饰的重链恒定区的CD73.4抗体的保留时间

	UV%				
	峰1	峰2	峰3	峰4	峰5
<b>复合物</b>	<b>&lt; 12.9 min</b>	<b>12.9-15.1 min</b>	<b>15.1-16.7min</b>	<b>16.7-19.3min</b>	<b>&gt; 19.3 min</b>
[0489] CD73.4-IgG2.3 + hCD73-his	37.0	23.8	7.7	28.6	2.9
CD73.4-IgG2.3G1.1f-KH + hCD73-his	36.0	23.8	7.9	29.3	3.0
CD73.4-IgG1.1f + hCD73-his	28.4	36.2	7.4	25.6	2.3
CD73.4-IgG1f + hCD73-his	26.0	36.5	7.5	27.8	2.2
CD73.4-IgG2.3G1-AY + hCD73-his	30.2	24.3	8.1	34.4	3.0
CD73.4-IgG2.3G1-KH + hCD73-his	34.9	23.4	7.9	30.7	3.0
CD73.4-IgG1-G2.3G1-AY + hCD73-his	14.6	29.2	6.4	48.3	1.6
CD73.4-IgG1-G2.3G1-KH + hCD73-his	23.8	32.6	7.0	34.5	2.1
CD73.4-IgG1- $\delta$ THT + hCD73-his	28.3	35.4	7.0	26.9	2.4
[0490] CD73.4-IgG2.3-加THT + hCD73-his	30.6	24.3	8.3	33.7	3.2
CD73.4-IgG2.3-加GGG + hCD73-his	30.0	23.9	8.2	34.9	2.9
CD73.4-IgG2.5 + hCD73-his	31.7	24.4	8.4	32.5	3.1
CD73.4-IgG2.5G1.1f-KH + hCD73-his	30.7	24.3	8.9	32.7	3.4
CD73.4-IgG2.5G1-AY + hCD73-his	26.3	24.8	8.1	38.3	2.6
CD73.4-IgG2.5G1-KH + hCD73-his	21.4	24.1	7.0	45.6	1.9
CD73.4-IgG2.5-加THT + hCD73-his	32.6	23.5	8.3	32.6	3.0

[0491] 实施例8:对于具有工程化恒定结构域的抗体的Fc受体结合

[0492] 此实施例证实,具有包含IgG2的CH1和铰链的经修饰的重链恒定区的抗体在其含有IgG1的CH2和CH3结构域时与Fc  $\gamma$  R结合。

[0493] 除了通过可变结构域结合抗原外,抗体还可以通过与恒定结构域相互作用而与Fc- $\gamma$ 受体(Fc $\gamma$ R)接合。这些相互作用介导效应子功能,如抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)。IgG1同种型的效应子功能活性高;但IgG2和IgG4的效应子功能活性非常低或不存在,因为这些同种型对Fc $\gamma$ R具有较低的亲和力。另外,可以通过恒定区域内氨基酸残基的突变来修饰IgG1的效应子功能,以改变Fc $\gamma$ R亲和力和选择性。

[0494] 使用包括Biacore表面等离子体共振(SPR)和Fortebio Biolayer干涉法(BLI)在内的生物传感器技术研究了抗体与Fc  $\gamma$ 受体(Fc  $\gamma$  R或Fc $\gamma$ R)的结合。SPR研究是在25°C下在Biacore T100仪器(GE Healthcare)上进行的。使用EDC/NHS将来自鼠抗6xHis抗体的Fab片段固定在CM5传感器芯片上,达到约3000RU的密度。使用10 $\mu$ l/min下接触时间30s经由C-末端his-tag捕获多种组氨酸标记的Fc $\gamma$ R(7 $\mu$ g/ml),并在10mM NaPO<sub>4</sub>、130mM NaCl、0.05%

p20 (PBS-T) 的 pH 7.1 的运行缓冲液中评价 1.0 μM 抗体的结合。用于这些实验的 FcγR 包括 CD64 (FcγRI)、CD32a-H131 (FcγRIIa-H131)、CD32a-R131 (FcγRIIa-R131)、CD32b (FcγRIIb)、CD16a-V158 (FcγRIIIa-V158)、CD16b-NA1 (FcγRIIIb-NA1) 和 CD16B-NA2 (FcγRIIIb-NA2)。BLI 实验是在 Fortebio Octet RED 仪器 (Pa11, Fortebio) 上于 25°C 下在 10 mM NaPO<sub>4</sub>、130 mM NaCl、0.05% p20 (PBS-T) (pH 7.1) 中进行的。将抗体从未稀释的表达清液中捕获在蛋白 A 包被的传感器上, 然后结合 1 μM hCD32a-H131、hCD32a-R131、hCD32b、hCD16a-V158 或 0.1 μM hCD64 分析物。

[0495] 首先, 制备与各种靶标结合的抗体, 其含有包含取代 S267E (SE) 和 S267E/L328F (SELF) 以及突变 P238D、P271G、H268D、A330R、G237D、E233D (称为 V4、V7、V8、V9 和 V12) 的各种组合的经修饰的 IgG1 Fc 结构域。通过 Biacore SPR 研究了这些抗体的结合, 其中与 IgG1f、IgG2.3 (IgG2-C219S) 和 IgG4.1 (IgG4-S228P) 抗体以及已工程化为降低与所有 FcγR 的结合的 IgG1.1f 抗体进行比较。显示于图 12 中的结果证实了对于 IgG1f、IgG2.3 和 IgG4.1 以及突变 IgG1 抗体所预期的 FcγR 结合特性, 包括对于 SE 和 SELF 而言增加的 CD32a-H131、CD32a-R131 和 CD32b 结合, 以及 CD32b 相对于 CD32a-H131 和 CD32a-R131 而言 V4、V7、V8、V9 和 V12 突变体增加的选择性, 图 12。

[0496] 下一组构建体用于将效应子功能工程化为原本效应子功能为负的 IgG2 同种型。对于本研究, 在 IgG2.3 恒定区或称为 IgG2.3G1-AY 的 IgG2.3/IgG1f 杂交体的情况下 (表 19), 引入上述突变。将抗体以上清液的形式小规模表达, 并使用 Fortebio Octet BioLayer 干涉法生物传感器技术测试与 FcγR 的结合。由于抗体以低浓度存在于上清液中, 因此通过使用蛋白 A 包被的传感器从上清液捕获抗体, 然后在溶液中结合 FcγR 分析物来进行实验。还包括纯化的且上清液的对照 IgG1f (包括野生型 IgG1、SE、P238D、V4 和 V12 抗体) 以供比较, 并且这些对照抗体均展现出预期的 FcγR 结合特性, 图 13。IgG2.3 抗体也展现出预期的结合图谱, 即仅与 CD32a-H131 具有明显结合。然而, 用于将 S267E、L328F、P238D、P271G、H268D、A330R、G237D 或 E233D 突变引入 IgG2.3 中的所有突变均无法概括相应工程化 IgG1 mAb 的 FcγR 亲和力, 图 13。相比之下, IgG2.3G1-AY 构建体在保留 IgG2.3 的 CH1 和铰链区时能够完全保存野生型 IgG1 的 FcγR 结合特性。另外, 含有 S267E、L328F、P238D、P271G、H268D、A330R、G237D 和 E233D 的所有 IgG2.3G1-AY 突变体均展现出与含有相同突变的 IgG1 形式 mAb 可比较的 FcγR 结合特性, 图 13。这证实了具有 IgG2 的 CH1 和铰链区 (与野生型或突变体 IgG1 的效应子功能相组合) 的抗体的成功工程化。

[0497] 表 19: 工程化 IgG2 构建体

组	ID	构建体	Seq ID#
[0498] 1	IgG2.3	hHC-IgG2-C219S	
	IgG2.3-V13	hHC-IgG2-C219S - P238D	

[0499]	2	IgG2.3-V14	hHC-IgG2-C219S – P238D,P271G	
		IgG2.3-V15	hHC-IgG2-C219S – P238D,H268D,P271G	
		IgG2.3-V16	hHC-IgG2-C219S – P238D,P271G,A330R	
		IgG2.3-V17	hHC-IgG2-C219S – P238D,H268D,P271G,A330R	
		IgG2.3-V18	hHC-IgG2-C219S – S267E	
		IgG2.3-V19	hHC-IgG2-C219S – S267E,L328F	
	IgG2.3G1	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f		
	IgG2.3G1-AY-V20	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f – P238D		
	IgG2.3G1-AY-V21	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f – P238D,P271G		
	IgG2.3G1-AY-V22	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f P238D,H268D,P271G	–	
	IgG2.3G1-AY-V23	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f P238D,P271G,A330R	–	
	IgG2.3G1-AY-V24	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f P238D,H268D,P271G,A330R	–	
	IgG2.3G1-AY-V25	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f G237D,P238D,H268D,P271G,A330R	–	
	IgG2.3G1-AY-V26	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f E233D,G237D,P238D,H268D,P271G,A330R	–	
	IgG2.3G1-AY-V27	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f – S267E		
	IgG2.3G1-AY-V28	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f – S267E,L328F		

[0500] 通过产生用IgG2.3G1-AY、IgG2.3G1-AY-S267E (IgG2.3G1-AY-V27) 以及IgG2-B形式变体 (IgG2.5G1-AY和IgG2.5G1-AY-V27) 改变形式的其他抗体和含有IgG1和IgG2恒定结构域的不同组合的其他杂交体抗体, 进一步探索了这种工程化策略, 并使用Biacore SPR技术测试这些抗体与抗his Fab捕获的his标记的FcγR的结合。与Octet上清液数据一致, SPR数据显示, IgG2.3G1-AY和IgG2.3G1-AY-V27抗体分别具有与IgG1f和IgG1f-S267E可比较的FcγR结合特性, 但所述抗体含有A型IgG2抗体 (IgG2.3) 的CH1和铰链区 (图14A和图14B和表20)。使用IgG2.5G1-AY和IgG2.5G1-AY-V27抗体也获得了类似的数据, 这证实了具有IgG1f或经修饰的IgG1f样效应子功能的B型IgG2抗体 (含有称为IgG2.5的C131S突变) 的成功工程化。具有IgG2.3G1-AY, IgG2.3G1-AY-V27, IgG2.5G1-AY, or IgG2.5G1-AY-V27恒定区但可变区不同的其他几种抗体的数据显示, 这种工程化策略不依赖于可变结构域而广泛适用于其他抗体 (图14A和B和表20)。展现出IgG1f样FcγR结合特性的其他构建体是IgG1-G2.3G1-AY和IgG1δTHT, 而几个经修饰的恒定区构建体无法保留IgG1f样FcγR结合特性, 所述几个经修饰的恒定区构建体包括IgG2.3G1-KH、IgG2.5G1-KH、IgG2.3加THT、IgG2.5加THT和IgG2.3加GGG构建体 (图14A和图14B和表20)。

[0501] 表20: 与抗his Fab捕获的FcγR-his蛋白结合的1μM抗体的R<sub>max</sub>%值

[0502]

mAb	hCD64	hCD32 a-H131	hCD32 a-R131	hCD32b	hCD16 a-V158	hCD16 B-NA2
mAb8-IgG1f	80%	82%	51%	27%	51%	21%
mAb9-IgG1f	70%	33%	19%	4%	28%	10%
CD73.4-IgG1f	65%	46%	26%	6%	43%	17%
GITR.6-IgG1f	66%	35%	25%	8%	41%	19%
CD73.4-IgG1.1f	2%	0%	2%	1%	0%	0%
GITR.6-IgG1.1f	2%	0%	3%	1%	0%	0%
mAb11-IgG2.3	2%	44%	17%	5%	1%	0%
CD73.4-IgG2.3	3%	48%	11%	1%	1%	0%
mAb6-IgG2.3	3%	66%	14%	3%	1%	0%
GITR.6-IgG2.3	4%	40%	10%	1%	2%	0%
mAb4-IgG2.3	1%	39%	6%	1%	1%	0%
mAb5-IgG2.3	6%	100%	30%	4%	3%	0%
mAb12-IgG2.3	2%	39%	7%	1%	1%	0%
mAb13-IgG2.3	2%	40%	7%	1%	1%	0%
mAb11-IgG2.5	0%	40%	13%	3%	0%	-1%
mAb7-IgG2.5	4%	72%	19%	2%	2%	0%
mAb8-IgG2.5	3%	59%	14%	3%	2%	0%
mAb10-IgG2.5	1%	29%	5%	1%	1%	0%
CD73.4-IgG2.5	3%	40%	7%	1%	1%	0%
mAb6-IgG2.5	3%	75%	17%	4%	2%	0%
GITR.6-IgG2.5	4%	43%	13%	2%	2%	1%
mAb4-IgG2.5	2%	46%	8%	1%	1%	0%
mAb5-IgG2.5	6%	89%	26%	5%	4%	1%
mAb12-IgG2.5	1%	36%	6%	1%	1%	0%
mAb13-IgG2.5	-2%	39%	4%	-2%	0%	-2%
mAb8-IgG2.3G1-AY	77%	61%	38%	10%	38%	13%
mAb10-IgG2.3G1-AY	67%	23%	14%	4%	24%	8%
CD73.4-IgG2.3G1-AY	65%	38%	20%	5%	38%	14%
GITR.6-IgG2.3G1-AY	66%	43%	33%	16%	42%	21%
mAb7-IgG2.5G1-AY	80%	73%	45%	12%	47%	19%
mAb8-IgG2.5G1-AY	77%	70%	45%	17%	48%	22%
CD73.4-IgG2.5G1-AY	65%	43%	24%	7%	40%	16%
GITR.6-IgG2.5G1-AY	65%	38%	27%	10%	41%	19%
CD73.4-IgG2.3G1-KH	2%	15%	2%	0%	2%	0%
GITR.6-IgG2.3G1-KH	3%	13%	3%	0%	3%	1%
CD73.4-IgG2.5G1- KH	2%	17%	2%	0%	3%	0%
GITR.6-IgG2.5G1- KH	2%	15%	3%	0%	3%	1%
CD73.4-IgG2.3G1.1f-KH	1%	10%	1%	0%	1%	0%
GITR.6-IgG2.3G1.1f-KH	2%	9%	2%	0%	1%	0%

	CD73.4-IgG2.5G1.1f-KH	1%	6%	1%	0%	1%	0%
	GITR.6-IgG2.5G1.1f-KH	3%	15%	4%	0%	2%	0%
	mAb7-IgG2.3G1-AY-V27	84%	68%	92%	76%	26%	7%
	mAb8-IgG2.3G1-AY-V27	78%	67%	80%	67%	24%	7%
	mAb10-IgG2.3G1-AY-V27	69%	24%	57%	40%	12%	3%
	mAb7-IgG2.5G1-AY-V27	81%	74%	89%	84%	32%	9%
	mAb8-IgG2.5G1-AY-V27	77%	76%	79%	77%	33%	10%
	CD73.4-IgG1-G2.3G1-AY	66%	50%	31%	10%	48%	23%
	GITR.6-IgG1-G2.3G1-AY	66%	36%	25%	7%	42%	19%
[0503]	CD73.4-IgG1-G2.3G1-KH	2%	18%	2%	0%	4%	1%
	GITR.6-IgG1-G2.3G1-KH	2%	21%	2%	0%	5%	1%
	CD73.4-IgG1 $\delta$ THT	65%	43%	23%	6%	42%	17%
	GITR.6-IgG1 $\delta$ THT	66%	57%	42%	17%	48%	27%
	CD73.4-IgG2.3加THT	3%	42%	8%	1%	1%	0%
	GITR.6-IgG2.3加THT	6%	45%	17%	2%	3%	1%
	CD73.4-IgG2.5加THT	2%	34%	7%	1%	1%	0%
	GITR.6-IgG2.5加THT	5%	44%	15%	2%	3%	1%
	CD73.4-IgG2.3加GGG	3%	43%	8%	1%	1%	0%
	GITR.6-IgG2.3加GGG	6%	45%	17%	2%	3%	1%

[0504] 这些数据共同显示,铰链区中保守CPPCPAP基序的C-末端紧接的序列赋予Fc $\gamma$ R介导的效应子功能,而抗体的CH1和铰链上部可以被IgG2或经修饰的IgG2序列替代,从而潜在地将IgG1和经修饰的IgG1的效应子功能与含有IgG2CH1和/或铰链区的抗体的优越内化或信号传导特性组合。

[0505] 实施例9:在具有IgG2铰链和CH1结构域的抗体中,GITR激动剂Ab内化得到增强

[0506] 为了诱导GITR表达,将细胞与20ng/ml抗CD3+1000ng/ml CD28在37°C下孵育72h。作为T细胞激活的另一种方法,通过三阶段培养方案制备了大批激活的CD4<sup>+</sup> T细胞。简而言之,将CD4<sup>+</sup> T细胞用补充有1ug/ml可溶性CD28的板结合的CD3(1.5ug/ml)在37°C下刺激72h,在存在20u/ml IL2的情况下在培养物中扩增14天,最后通过添加10ug/ml PHA、2u/ml IL2和1ug/ml CD28在37°C下进行另一轮激活持续72h。将刺激的T细胞接种到384孔PDL成像板中持续2h以粘附细胞,在4°C下冷却15min,然后分别添加alexa 488标记的GITR抗体持续1h。最后将板通过HCS成像,并将数据报告为每个细胞的总强度。

[0507] 已经使用上述T细胞激活方法评价了三种不同的GITR抗体。它们是作为G1同种型的GITR.6抗体和不能与Fc受体结合的惰性(IgG1.1)同种型,以及具有IgG2铰链而非IgG1铰链的嵌合体。

[0508] 使用alexa淬灭测定形式在CD3刺激的CD4<sup>+</sup>T细胞中评估GITR抗体诱导的内化。将新鲜获得的CD4阳性T细胞在如上所述条件下孵育以诱导GITR表达。刺激后,将细胞重悬于新鲜培养基中并铺板用于如下的内化测定。将细胞与抗体如上所述一起孵育,用温热的培

培养基洗涤,并在固定和淬灭之前在37°C下孵育指示的时间。将内化抗体测量为在零时观察到的不可淬灭的小信号之上增加的荧光,然后针对最初与细胞结合的总荧光“未淬灭的对照”进行归一化。如图15所示,对于所测试的每种抗体,GITR连接导致30-60分钟之间快速达到内化峰,而发现对照抗体则维持在质膜上的定位。结果指示,IgG2铰链区增强了GITR连接诱导的内化。

[0509] 为了进一步剖析内化和相关动力学的详细机制,分析了抗体内吞作用以及向早期内体区室的递送。在此实验中,用未标记的抗体对细胞进行脉冲追踪分析。固定后,将细胞进行透性化处理并针对早期内体标记物EEA1进行染色(细胞信号传导技术),洗涤并随后用 alexa fluor-488 缀合的抗兔二抗(EEA1)和 alexa fluor-647 缀合的抗人抗体(GITR)检测。将板在具有60X水浸物镜的Opera共聚焦系统上成像。结果指示在膜结合的抗GITR抗体染色与细胞内EEA1信号之间明显的分离。加热培养物后,检测到一些抗体的聚集,其显现与内体蛋白共定位。使用HCS Studio软件对内体共定位进行定量,并将结果绘制为共定位像素强度与总染色之比(图16)。GITR抗体和早期内体的共定位在30分钟时最为明显。在此测试时间点处,GITR.6.G2.G1f显示出比GITR.6.G1f抗体更高的共定位分数。共定位结果与使用上述 alexa 淬灭方法获得的观察结果相关,并支持如下模型,所述模型表明G2铰链对于诱导GITR内化比G1具有潜在的优势。

[0510] 实施例10:在具有IgG2铰链和CH1结构域的抗体中,T细胞受体激活的CD4+和CD8+T细胞中的GITR激动剂Ab信号传导得到增强

[0511] 为了进一步研究抗GITR激动剂抗体的机制,监测了涉及T细胞激活的几种信号传导途径,如NFkB和P38信号传导途径。

[0512] 用板包被的0.4µg/ml抗CD3和0.4µg/ml抗CD28激活来自健康供体(M6576)的CD4+和CD8+T细胞。3天后,收集细胞并将其铺板在384孔图像板上以进行信号传导激活。细胞在板中静置2小时后,将它们用GITR抗体处理15分钟,然后通过向测定板中添加甲醛达到最终10%来终止信号传导事件。然后将细胞进行透性化处理并用磷-p65 NFkB抗体染色以进行信号传导检测。如图17所示,在CD4+和CD8+T细胞中,与GITR.6.G1f相比,GITR.6.G2和GITR.6.G2.G1f抗体具有更高的信号传导反应。尽管没有直接的证据表明内化和信号传导途径激活之间存在联系,但有趣的是,与GITR.6的IgG1相比,G2同种型似乎在抗体功能活性的两个方面都有所改善。

[0513] 为了定量每种抗体的信号传导活性,计算了每种抗体的EC50和Emax,因为这两个参数对于捕获全部范围的信号传导事件至关重要。选择GITR.6.G2.G1f的反应水平为100%对照,并将所有其他抗体针对其进行归一化。如表21对于通过抗CD3和抗CD28抗体激活的CD4+和CD8+T细胞群体所示,就效力(EC50)和功效(Emax%)而言,GITR抗体具有某个范围内的活性。尽管GITR.6.G2、GITR.6.G2.G1f和GITR.6.G1f在10nM范围内显示出类似的效力(EC50),但不同同种型的功效(Emax)却大不相同,这表明G1抗体不能像G2或嵌合同种型一样有效地发信号。

[0514] 表21.TCTR激活的CD4+和CD8+T细胞中GITR HuMab NFkB信号传导活性的总结

抗体	CD4+ T细胞		CD8+ T细胞	
	EC50 (nM)	E <sub>max</sub> (%)	EC50 (nM)	E <sub>max</sub> (%)
[0515] <b>GITR.6.G2</b>	<b>12.8</b>	<b>69</b>	<b>9.00</b>	<b>85</b>
<b>GITR.6.G2.G1f</b>	<b>9.00</b>	<b>100</b>	<b>3.77</b>	<b>92</b>
<b>GITR.6.G1f</b>	<b>7.3</b>	<b>10.8</b>	<b>20.05</b>	<b>27</b>
<b>hIgG1同种型对照</b>	<b>非激活</b>	<b>4</b>	<b>非激活</b>	<b>6</b>

[0516] 为了进一步确认GITR.6.G2和GITR.6.G2.G1f与GITR.6.G1f的信号传导差异是否仅限于NFκB信号传导,或者对于其他信号传导事件是否也是如此,探索了P38MAPK信号传导读出。如图18所示,在CD4+细胞p38 MAPK激活测定中,与GITR.6.G1f抗体相比,GITR.6.G2和GITR.6.G2.G1f抗体具有更高的信号传导反应。因此,与G1同种型相比,对于GITR.6G2同种型的更好的信号传导活性不仅限于NFκB信号传导。

[0517] 除了增强的激动剂活性和内化之外,还显示出经修饰的重链恒定区可以(例如为刺激性受体的激动剂)赋予增强的ADCC,并为抗体提供新的活性。例如,发现改变抗体(此抗体与抑制性细胞表面分子结合并阻止所述细胞表面分子对本文描述的经修饰的重链恒定区的抑制活性(拮抗剂))的恒定重链结构域导致抗体失去了成为拮抗剂的能力,而赋予它激动剂活性(对抑制活性的激动剂活性)。

[0518] 实施例11:确认IgG2.3和IgG2.5构建体的二硫键

[0519] 通过比较未还原的和还原的Lys-C消化物,确认了包含恒定结构域IgG2.3(A形式)、IgG2.3G1(A形式)和IgG2.5(B形式)的抗体中的二硫键结构是正确的。

[0520] 用Lys-C消化抗体样品,所述Lys-C特异性地切割赖氨酸(K,Lys)残基的羧基末端侧上的肽键。使用Waters ACQUITY BEH C18柱(1.7μm,2.1x150mm,反相HPLC柱)分离消化物中的肽,并用紫外(UV)检测器在214nm处和Thermo LTQ质谱仪进行检测。

[0521] Lys-C酶促消化和二硫键还原:在含有100μg抗体样品的小瓶中,添加120μL变性缓冲液,得到3.7M GuHCl、0.2M Tris溶液(pH 7.0)。将混合物在55℃下孵育30分钟。通过在上述溶液中添加1μL 50mM碘乙酰胺,然后在黑暗中于室温下孵育30分钟来进行蛋白质的烷基化。用80μL dH<sub>2</sub>O稀释烷基化的样品,并以1:10的酶与底物的比例添加Waco Lys-C。在黑暗中于室温下将抗体消化过夜。消化后,从Lys-C消化的样品移取100μL等分试样,并添加10μL的0.5M DTT。将此样品在室温下孵育1小时以减少二硫键。

[0522] 获得的结果如下:

[0523] IgG2.3和IgG2.3G1抗体(A型)的二硫键结构:在重链的Fab区域内,Cys22(H)与Cys98(H)连接并且Cys151(H)与Cys207(H)连接。在重链的Fc区内,Cys265(H)与Cys325(H)连接并且Cys371(H)与Cys429(H)连接。在轻链的Fab区域内,Cys23(L)与Cys88(L)连接并且Cys134(L)与Cys194(L)连接。轻链Cys214(L)的C-末端在Cys138(H)处与重链连接。重链的铰链区含有三个半胱氨酸残基Cys227(H)、Cys230(H)和Cys233(H),它们提供三个链间二硫键。最可能的连接是Cys227(H)与Cys227(H)、Cys230(H)与Cys230(H)和Cys233(H)与Cys233(H),这是IgG2A形式的正确理论二硫键布置。

[0524] IgG2.5抗体(B型)的二硫键结构:在重链的Fab区域内,Cys22(H)与Cys98(H)连接

并且Cys151 (H) 与Cys207 (H) 连接。在重链的Fc区内,Cys264 (H) 与Cys324 (H) 连接并且Cys370 (H) 与Cys428 (H) 连接。在轻链的Fab区域内,Cys23 (L) 与Cys88 (L) 连接并且Cys134 (L) 与Cys194 (L) 连接。重链的铰链区含有四个半胱氨酸残基Cys226 (H)、Cys227 (H)、Cys230 (H) 和Cys233 (H)。轻链的C-末端Cys214 (L) 在铰链区中与重链的半胱氨酸残基连接,并且其余三个半胱氨酸残基提供三个链间二硫键。最可能的连接是Cys214 (L) 与Cys226 (H),然后是Cys227 (H) 至Cys227 (H)、Cys230 (H) 与Cys230 (H) 和Cys233 (H) 与Cys233 (H),这是正确的IgG2B形式的理论二硫键布置。另外,利用使用了离子阱质谱仪的电子转移解离(ETD)触发的串联质谱法来确认铰链区中的二硫键连接。

[0525] 实施例12: IgG2 CH1和铰链中某些氨基酸残基与改善T细胞上的GITR激动作用的相关性

[0526] 制备具有表17中所示的重链恒定区的抗GITR抗体(GITR.6)并将其如实施例2中所述在IL-2产生测定中进行测试,但在所述测定中上清液是在40小时而不是48小时收获的。

[0527] 显示于图20A至图20D中的结果与用具有与此实施例中所使用的那些相同的重链恒定区的抗CD73抗体获得的CD73内化结果(参见图10)基本一致。

[0528] 实施例13: 用P238K突变消除效应子功能

[0529] 将抗体的可变区与如下IgG1 Fc融合,所述IgG1 Fc与野生型IgG1 Fc相差单个氨基酸残基:P238K(SEQ ID NO:198)。在具有此单个突变的情况下,抗体展现出缺乏效应子功能,对低亲和力Fc $\gamma$ R hCD32a-H131、hCD32a-R131、hCD32b、hCD16a-V158或hCD16b-NA2基本上无可检测的结合信号(参见实施例14中的数据)。另外,具有IgG1 P238K的抗体显示出对高亲和力Fc $\gamma$ R CD64的结合亲和力显著降低(参见实施例14中的数据)。相对于具有野生型IgG1恒定结构域的抗体,抗体与CD64的结合展现出更快的解离速率(解离常数)。

[0530] 抗体变体也证实了具有P238K突变的IgG1 Fc(SEQ ID NO:198)缺乏效应子功能。

[0531] 因此,具有单个突变(P238K)的人IgG1 Fc(例如其中重链恒定区包含氨基酸序列SEQ ID NO:198)可用于不需要效应子功能的任何抗体中。

[0532] 实施例14: 用P238K和另外的突变消除效应子功能

[0533] 用具有一个或多个突变的Fc产生另外的抗体,以进一步降低效应子功能,优选ADCC和CDC两者。产生突变体以进一步减少如表22所示的FcR结合。具体地,如上所示,P238K消除了除CD64以外的可检测的FcR结合,因此目标是将P238K与用于减少CD64结合的另外的突变组合。在IgG1同种型、IgG2.3和IgG2.5同种型以及IgG2.3G1同种型形式的情况下测试突变。这些抗体中使用的Fc包含具有SEQ ID NO:234-245和247-262的氨基酸序列中的一个。

[0534] 突变的位置显示于图21中。

[0535] 使用Biacore 8K系统(GE Healthcare),通过表面等离子体共振研究了人Fc $\gamma$ R与抗体的结合。对于这些研究,在10mM HEPES(pH 7.4)、150mM NaCl、3mM EDTA、0.05%表面活性剂p20的运行缓冲液中,使用标准乙基(二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)/N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)化学反应将蛋白A在CM5传感器芯片的流动池1-4上固定至约3000RU的密度,用乙醇胺封闭。将纯化的抗体(10 $\mu$ g/mL)或表达上清液(稀释至约10 $\mu$ g/mL)捕获在蛋白A表面达到约1000-1200RU的密度,并在由10mM NaPO<sub>4</sub>、130mM NaCl、0.05%p20、缓冲液(PBS-T)组成的pH 7.1的运行缓冲液中于25 $^{\circ}$ C下使用120s缔合时间和120s解离时间以20 $\mu$ L/min的流速

测试Fc $\gamma$ R分析物的结合。通过以下方式使用Biacore 8K评价软件分析数据：假设100%分数的活性并仅考虑没有糖基化的蛋白质质量，根据捕获的抗体水平，将测量的结合反应确定为每种抗体的理论最大结合反应的百分比(Rmax%)。为了比较不同分子的Fc $\gamma$ R结合，通过将最大结合反应计算为理论上最大结合反应的百分比(Rmax%)来分析SPR结合数据，所述计算总体如等式1所示：

$$[0536] \quad \%R_{max} = \frac{\left( \frac{\text{观察到的结合反应分析物}}{\text{理论上最大的结合反应分析物}} \right)}{\left( \right)} \text{等式1}$$

[0537] 具体地，使用以下等式计算Rmax%：

$$[0538] \quad \%R_{max} = \frac{\left( \frac{\text{分析物}}{\text{配体}} \right) \times \left( \frac{\text{结合反应分析物}}{\text{反应配体}} \right) \times \left( \frac{\text{分析物:配体化学计量比}}{\left( \right)} \right)}{\left( \right)} \text{等式2}$$

[0539] 其中“分析物”是抗体并且“配体”是捕获的Fc $\gamma$ R蛋白。此分析未考虑抗体或Fc $\gamma$ R的糖基化的质量，并假设捕获的配体具有100%分数的活性。

[0540] “Rmax%分析”对于评价“低亲和力”Fc $\gamma$ R(例如hCD32a-H131、hCD32a-R131、hCD32b、hCD16a-V158、hCD16a-F158、hCD16b-NA1和hCD16b-NA2)的结合特别有用，它们具有相对较快的缔合和解离速率以及接近或低于测试分析物浓度(1微摩尔( $\mu$ M))的亲和力，因此在这些条件下通常不能实现表面的饱和。相比之下，与其他Fc $\gamma$ R相比，“高亲和力”Fc $\gamma$ R hCD64以更高的亲和力和更慢的解离动力学结合，特别是对于IgG1和IgG4；因此这些同种型通常在微摩尔分析物浓度下确实使hCD64表面饱和，并且更难使用Rmax%区分亲和力。对于这些相互作用，可以通过比较传感图数据中的解离速率容易地观察到抗体之间的差异。

[0541] 结果显示于表22中并且示例性传感图数据提供于图22A至图22L中。

[0542]

表 22: 以 Rmax 的百分比显示的具有野生型或突变 Fc 的抗体与 FcγR 的结合

抗体	样品	1 uM hCD64	10 uM hCD32a-H131	10 uM hCD32a-R131	10 uM hCD32b	10 uM hCD16a-V158	10 uM hCD16a-F158	0.1 uM hCD64	1 uM hCD32a-H131	1 uM hCD32a-R131	1 uM hCD32b	1 uM hCD16a-V158	1 uM hCD16a-F158
Ab1-hlgG1f	纯化的	126%	98%	93%	61%	116%	45%	126%	54%	43%	13%	81%	10%
Ab2-hlgG1f	纯化的	123%	98%	96%	73%	116%	65%	124%	65%	56%	20%	94%	17%
Ab1-NF	纯化的	125%	97%	98%	76%	124%	130%	125%	55%	59%	22%	123%	104%
Ab33-IgG2.3	纯化的	16%	100%	69%	29%	27%	4%	2%	60%	21%	7%	6%	2%
Ab4-hz1-P238K	纯化的	116%	0%	1%	1%	-1%	-1%	88%	0%	0%	0%	0%	0%
Ab2-IgG1.3f-P238K	上清液	1%	1%	3%	2%	0%	0%	0%	1%	1%	1%	0%	0%
Ab2-IgG1f-P238K	上清液	109%	-3%	-2%	-2%	-4%	-4%	89%	1%	1%	1%	0%	0%
Ab2-IgG1f-L235E-P238K	上清液	11%	1%	3%	3%	0%	-1%	2%	0%	1%	1%	0%	0%
Ab2-IgG1f-L235E-P238K-K322A	上清液	11%	2%	5%	3%	0%	0%	2%	1%	1%	1%	1%	0%
Ab2-IgG2.3G1.3f-P238K	上清液	2%	1%	3%	1%	0%	0%	0%	0%	1%	1%	0%	0%
Ab2-IgG2.3G1-L235E-P238K	上清液	16%	1%	4%	3%	1%	0%	2%	1%	1%	1%	1%	1%
Ab2-IgG2.3G1-L235E-P238K-K322A	上清液	16%	2%	5%	3%	0%	0%	2%	1%	1%	1%	1%	0%
Ab2-IgG2.5G1.3f-P238K	上清液	2%	1%	3%	2%	0%	0%	0%	1%	1%	1%	1%	1%
Ab2-IgG2.5G1-L235E-P238K-K322A	上清液	15%	2%	5%	3%	0%	0%	2%	1%	1%	1%	1%	1%
Ab4-IgG1fa	上清液	124%	99%	95%	71%	116%	59%	125%	63%	53%	19%	91%	15%
Ab4-IgG1.3fa	上清液	7%	2%	29%	17%	4%	1%	1%	0%	4%	2%	1%	0%
Ab4-IgG1fa-P238K	上清液	116%	1%	1%	1%	0%	0%	87%	1%	1%	1%	0%	0%
Ab4-IgG1fa-L235A-P238K	上清液	51%	0%	1%	0%	-1%	-1%	10%	0%	0%	0%	0%	0%
Ab4-IgG1fa-L235E-P238K	上清液	9%	0%	3%	2%	0%	0%	1%	0%	1%	1%	0%	0%
Ab4-IgG1.3fa-P238K	上清液	1%	0%	2%	1%	0%	-1%	0%	0%	1%	0%	0%	0%
Ab4-IgG1fa-L235E-P238K-K322A	上清液	11%	1%	4%	1%	-1%	-1%	2%	0%	1%	0%	0%	0%
Ab4-IgG2.3	上清液	16%	98%	73%	31%	34%	4%	2%	66%	23%	6%	7%	2%
Ab4-IgG2.3-P238K	上清液	1%	1%	2%	1%	0%	0%	0%	2%	2%	2%	1%	1%
Ab4-IgG2.3G1	上清液	123%	95%	93%	72%	113%	62%	123%	62%	55%	21%	90%	16%
Ab4-IgG2.3G1-P238K	上清液	116%	0%	1%	1%	-1%	-2%	91%	0%	0%	0%	0%	-1%
Ab4-IgG2.5G1-P238K	上清液	118%	1%	2%	2%	0%	0%	94%	1%	1%	1%	1%	1%
Ab4-IgG2.3G1-L235E-P238K	上清液	13%	0%	3%	3%	0%	0%	2%	0%	1%	1%	0%	0%

[0543] 如表22和图22所示,组合突变体展现出非常弱的FcR结合。向P238K同种型中添加L235突变使CD64结合减少至与IgG1.3f类似的水平。对于减少CD64结合,L235E优于L235A突

变。向IgG2中添加P238K突变(IgG2.3-P238K)产生了完全惰性的同种型,这证实与任何FcR蛋白均无可检测到的结合。在IgG1和IgG2.xG1形式的情况下,突变也显示出类似的趋势。减少c1q结合(CDC活性)并在一些构建体中添加的K322A突变对FcR结合的影响最小,因此未观察到K322A的太大影响。

[0544] 实施例14:用IgG1.3 Fc消除效应子功能

[0545] 此实施例在共同提交和共同拥有的标题为“经修饰的IgG1 Fc结构域和与其他的抗CD40结构域抗体融合物”(MODIFIED IgG1 Fc DOMAINS AND ANTI-CD40 DOMAIN ANTIBODY FUSIONS THEREWITH)的PCT申请的实施例2和实施例3中进行了描述。

[0546] 此实施例显示具有IgG1.3 Fc的抗体或多肽基本上没有与CD16、CD32a、CD32b和CD64的结合。也已在IgG1.3 Fc与抗TIM3抗体的可变结构域连接时观察到这一点(参见W0 2018/013818)。IgG1.3是通过从“IgG1.1”Fc(“IgG1.1”是具有L234A、L235E、G237A、A330S和P331S突变的IgG1)去除A330S和P331S从而保留5个突变中的3个即L234A、L235E、G237A而得到的。出人意料地发现,在IgG1.1 Fc中不存在A330S和P331S不会显著影响该Fc的惰性。以下是含有IgG1.1和IgG1.3(以及其他用于比较的Fc)的抗体和融合蛋白的示例性Fc $\gamma$ R结合测量结果,比较了IgG1.1和IgG1.3在抗体情况下以及在非抗体蛋白的情况下的惰性。

[0547] 此实施例中使用的材料和方法包括以下内容。

[0548] Fc $\gamma$ R结合SPR:可以使用Biacore<sup>TM</sup>表面等离子体共振(SPR)使用纯化的Fc $\gamma$ R在体外测量Fc $\gamma$ R结合。本文使用了两种方法。

[0549] 一种方法测试纯化的抗体或dAb-Fc蛋白与His标记的Fc $\gamma$ R蛋白(Fc $\gamma$ R-His(“Fc $\gamma$ R”与“Fc $\gamma$ R”可互换使用))的结合,所述His标记的Fc $\gamma$ R蛋白被捕获在抗His抗体的固定化Fab片段上。这些实验是在Biacore<sup>TM</sup>T100or Biacore<sup>TM</sup>T200仪器(GE Healthcare)上于25°C下进行的。在10毫摩尔(mM)HEPES(pH 7.4)、150mM NaCl、3mM EDTA、0.05%表面活性剂p20(HBS-EP+)的运行缓冲液中,使用标准乙基(二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)/N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)化学反应将来自鼠抗6xHis抗体(内部产生的)的Fab片段在CM5传感器芯片上固定至约3000共振单位RU的密度,用乙醇胺封闭。使用10mM NaPO<sub>4</sub>、130mM NaCl、0.05%p20(PBS-T)的pH 7.1的运行缓冲液进行所有剩余的研究。使用10 $\mu$ l/min下接触时间30秒(s)将含有C-末端6x聚组氨酸标记的各种Fc $\gamma$ R蛋白(内部产生的)捕获在此表面上(通常使用约7 $\mu$ g/ml的Fc $\gamma$ R-His蛋白浓度)。例如使用30 $\mu$ l/min下缔合时间120秒和30 $\mu$ l/min下解离时间120秒,测试各种浓度的纯化抗体或dAb-Fc蛋白的结合。这些研究中测试的Fc $\gamma$ R蛋白包括“高亲和力”Fc $\gamma$ R hCD64(hFc $\gamma$ RI),以及“低亲和力”Fc $\gamma$ R hCD32a-H131(Fc $\gamma$ RIIa-H131)、hCD32a-R131(Fc $\gamma$ RIIa-R131)、hCD32b(Fc $\gamma$ RIIb)、hCD16a-V158(Fc $\gamma$ RIIIa-V158)、hCD16a-F158(Fc $\gamma$ RIIIa-F158)、hCD16b-NA1(Fc $\gamma$ RIIIb-NA1)和hCD16b-NA2(Fc $\gamma$ RIIIb-NA2)。

[0550] 为了定量地分析结合反应和比较不同分子的Fc $\gamma$ R结合,可以通过将最大结合反应计算为理论上最大结合反应的百分比(Rmax%)来分析SPR结合数据,所述计算总体如等式1所示:

$$[0551] \quad \%R_{max} = \left( \frac{\text{观察到的结合反应分析物}}{\text{理论上最大的结合反应分析物}} \right) \quad \text{等式1}$$

[0552] 具体地,使用以下等式计算Rmax%:

$$[0553] \quad \%R_{max} = \frac{\left( \frac{\text{分析物}}{\text{配体}} \right) \times \left( \frac{\text{结合反应分析物}}{\text{反应配体}} \right) \times \left( \frac{\text{分析物:配体化学计量比}}{\text{分析物:配体化学计量比}} \right)}{\left( \frac{\text{分析物}}{\text{配体}} \right)} \text{ 等式2}$$

[0554] 其中“分析物”是抗体或dAb-Fc并且“配体”是捕获的FcγR蛋白。此分析未考虑抗体、dAb-Fc或FcγR的糖基化的质量,并假设捕获的配体具有100%分数的活性。

[0555] “Rmax%分析”对于评价“低亲和力”FcγR(例如hCD32a-H131、hCD32a-R131、hCD32b、hCD16a-V158、hCD16a-F158、hCD16b-NA1和hCD16b-NA2)的结合特别有用,它们具有相对较快的缔合和解离速率以及接近或低于测试分析物浓度(1微摩尔(μM))的亲和力,因此在这些条件下通常不能实现表面的饱和。相比之下,与其他FcγR相比,“高亲和力”FcγR hCD64以更高的亲和力和更慢的解离动力学结合,特别是对于IgG1和IgG4;因此这些同种型通常在微摩尔分析物浓度下确实使hCD64表面饱和,并且更难使用Rmax%区分亲和力。对于这些相互作用,可以通过比较传感图数据中的解离速率容易地观察到抗体之间的差异。

[0556] 用于测试抗体或dAb-Fc蛋白与FcγR蛋白之间相互作用的第二种SPR测定是蛋白A捕获方法。这些实验也是在Biacore™T100 or Biacore™T200仪器(GE Healthcare)上于25℃下进行的。对于这些研究,在10mM HEPES(pH 7.4)、150mM NaCl、3mM EDTA、0.05%表面活性剂p20的运行缓冲液中,使用标准乙基(二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)/N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)化学反应将蛋白A在CM5传感器芯片的流动池1-4上固定至约3000RU的密度,用乙醇胺封闭。将抗体或dAb-Fc蛋白(通常约3-10μg/ml)捕获在蛋白A表面上,并在由10mM NaPO<sub>4</sub>、130mM NaCl、0.05%p20、缓冲液(PBS-T)组成的pH 7.1且在25℃下的运行缓冲液中使用例如在30μL/min的流速下120sec缔合时间和180sec解离时间来测试FcγR分析物的结合。

[0557] 蛋白A捕获测定还可用于分析含有抗体或dAb-Fc分子的未纯化的上清液。对于此分析,可以从未稀释的上清液或从用运行缓冲液稀释的上清液捕获抗体或dAb-Fc蛋白。为了定量地分析结合反应和比较不同分子的FcγR结合,可以通过使用上述等式1计算Rmax%来分析SPR结合数据,其中分析物是纯化的FcγR蛋白,并且配体是捕获的抗体或dAb-Fc蛋白。

[0558] 除了Rmax%分析外,也可以通过针对与蛋白A捕获的抗体或dAb-Fc蛋白的结合测试FcγR分析物的滴定来对结合的动力学和亲和力进行定量分析。例如,可以将3:1系列稀释液中的FcγR从10μM滴定至0.15nM(hCD64)或1.5nM(所有其他FcγR)。可以使用Biacore™T200评价软件将这些动力学数据拟合到1:1Langmuir模型或稳态结合模型,以获得动力学和亲和力值。

[0559] dAb-Fc:此实施例中研究的dAb-Fc显示于表23中。在这些序列中,单个可变结构域3h56-269残基为氨基酸1-118(加下划线)。接头AST是加双下划线的。

[0560] 表23

[0561]

Seq #	样品ID	序列
263	3h56-269-IgG4.1 OR BMS-986090	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRDYEMWWVR</u> <u>QAPGKGLERVSAINPQGTRTYYADSVKGRFTISRDN SKN</u> <u>TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLPFRFSDRGQGTLVTVS</u> <u>SASTESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR</u> <u>TPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR</u> <u>EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS</u> <u>SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK</u> <u>GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSR</u> <u>LTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK</u>
264	3h56-269-CT	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRDYEMWWVR</u>

[0562]

Seq #	样品ID	序列
		<u>QAPGKGLERVSAINPQGTRTYYADSVKGRFTISRDN SKN</u> <u>TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLPFRFSDRGQGTLVTVS</u> <u>SASTEPKSSDKTHTSPPPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLM</u> <u>ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK</u> <u>PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA</u> <u>LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC</u> <u>LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL</u> <u>YSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLS</u> <u>PGK</u>
265	3h56-269-IgG1.1 f	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRDYEMWWVR</u> <u>QAPGKGLERVSAINPQGTRTYYADSVKGRFTISRDN SKN</u> <u>TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLPFRFSDRGQGTLVTVS</u> <u>SASTEPKSCDKTHTCPPCAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTL</u> <u>MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK</u> <u>TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN</u> <u>KALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL</u> <u>TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF</u> <u>FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLS</u> <u>LSPGK</u>
266	3h56-269-IgG1.3 f	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRDYEMWWVR</u> <u>QAPGKGLERVSAINPQGTRTYYADSVKGRFTISRDN SKN</u> <u>TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLPFRFSDRGQGTLVTVS</u> <u>SASTEPKSCDKTHTCPPCAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTL</u> <u>MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK</u> <u>TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN</u> <u>KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL</u> <u>TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF</u> <u>FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLS</u> <u>LSPGK</u>
267	3h56-269-IgG1- D265A	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRDYEMWWVR</u> <u>QAPGKGLERVSAINPQGTRTYYADSVKGRFTISRDN SKN</u> <u>TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLPFRFSDRGQGTLVTVS</u> <u>SASTEPKSCDKTHTCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL</u> <u>MISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK</u> <u>TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN</u> <u>KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL</u> <u>TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF</u> <u>FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLS</u> <u>LSPGK</u>

[0563] 表23中所示的均以“EPK”开始的IgG1.1f和IgG1.3f的序列(即,SEQ ID NO:77和78中的序列)与SEQ ID NO:83和248中以EPK开始的序列相同。

[0564] 对照mAb:对照单克隆抗体(1F4)也用类似的Fc结构域突变改变形式。各个链序列显示于表24中,所述链序列包括1F4重链中包含可变区和CH1区域的部分的序列(SEQ ID NO:268)。此序列是在重链序列(SEQ ID NO:269-275)中加下划线的。每个1F4 mAb变体的重链和轻链序列对显示于表25中。

[0565] 表24

[0566]

Seq ID No.	序列同一性	序列
268	1F4重链可变区和CH1	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYAMSWVRQ</u> <u>APGKGLEWVSAISDSGGRTYFADSVRGRFTISRDNKNT</u> <u>LSLQMNSLRAEDTAVYYCAKVDYSNYLFFDYWGQGT</u> <u>VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE</u> <u>PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS</u> <u>SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV</u>
269	1F4轻链可变区和CL	<u>EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSISSSYLAWYQQK</u> <u>PGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP</u> <u>EDFAVYYCQQYGSSPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP</u> <u>SDEQLKSGTASVCLLNFPYFREAKVQWKVDNALQSG</u> <u>NSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV</u> <u>THQGLSSPVTKSFNRGEC</u>
270	1F4-IgG1f重链	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYAMSWVRQ</u> <u>APGKGLEWVSAISDSGGRTYFADSVRGRFTISRDNKNT</u> <u>LSLQMNSLRAEDTAVYYCAKVDYSNYLFFDYWGQGT</u> <u>VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE</u> <u>PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS</u> <u>SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV</u> <u>EPKSCDKTHTCPPCP</u> <u>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED</u> <u>PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT</u> <u>VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE</u> <u>PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN</u> <u>GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV</u> <u>FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>
271	1F4-IgG4.1重链	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYAMSWVRQ</u> <u>APGKGLEWVSAISDSGGRTYFADSVRGRFTISRDNKNT</u> <u>LSLQMNSLRAEDTAVYYCAKVDYSNYLFFDYWGQGT</u> <u>VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE</u> <u>PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS</u> <u>SLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV</u> <u>ESKYGPPCPPCAPE</u> <u>FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEV</u> <u>QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH</u> <u>QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY</u> <u>TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE</u> <u>NNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV</u> <u>MHEALHNHYTQKSLSLSL</u>
272	1F4-IgG1.1f重链	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYAMSWVRQ</u> <u>APGKGLEWVSAISDSGGRTYFADSVRGRFTISRDNKNT</u> <u>LSLQMNSLRAEDTAVYYCAKVDYSNYLFFDYWGQGT</u> <u>VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE</u> <u>PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS</u> <u>SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV</u> <u>EPKSCDKTHTCPPCP</u> <u>APEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED</u> <u>DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL</u> <u>TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPRE</u> <u>PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN</u> <u>GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV</u> <u>FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>

Seq ID No.	序列同一性	序列
273	1F4-IgG1.3f重链	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYAMSWVRQ</u> <u>APGKGLEWVSAISDSGGRTYFADSVRGRFTISRDNKNT</u> <u>LSLQMNSLRAEDTAVYYCAKVDYSNYLFFDYWGQGLT</u> <u>VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE</u> <u>PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS</u> <u>SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP</u> <u>APEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHE</u> <u>DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL</u> <u>TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR</u> <u>EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES</u> <u>NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN</u> <u>VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>
274	1F4-D265A重链	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYAMSWVRQ</u> <u>AGKGLEWVSAISDSGGRTYFADSVRGRFTISRDNKNTL</u> <u>SLQMNSLRAEDTAVYYCAKVDYSNYLFFDYWGQGLTV</u> <u>TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP</u> <u>VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS</u> <u>LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA</u> <u>PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDP</u> <u>EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV</u> <u>LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP</u> <u>QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIVEWESNGQ</u> <u>PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC</u> <u>SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>
275	1F4-CT重链	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYAMSWVRQ</u> <u>APGKGLEWVSAISDSGGRTYFADSVRGRFTISRDNKNT</u> <u>LSLQMNSLRAEDTAVYYCAKVDYSNYLFFDYWGQGLT</u> <u>VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE</u> <u>PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS</u> <u>SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTSPSP</u> <u>APELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED</u> <u>PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT</u> <u>VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE</u> <u>PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN</u> <u>GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV</u> <u>FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>

[0568] 表25

mAb名称	HC	LC
1F4-IgG1f	SEQ#: 270	SEQ#: 269
1F4-IgG4.1	SEQ#: 271	SEQ#: 269
1F4-IgG1.1f	SEQ#: 272	SEQ#: 269
1F4-IgG1.3f	SEQ#: 273	SEQ#: 269
1F4-D265A	SEQ#: 274	SEQ#: 269
1F4-CT	SEQ#: 275	SEQ#: 269

[0570] 结果:dAb-Fc分子是在Fc结构域中发生可减少Fc $\gamma$ R结合的突变而产生的。具体地,将抗CD40结构域抗体3h56-269用以下Fc结构域变体改变形式:IgG1.1f、IgG1.3f和IgG1-

D265A。在3h-56-269-IgG1.1f (SEQ ID NO:77)、3h-56-269-IgG1.3f (SEQ ID NO:78) 和3h-56-269-IgG1-D265A (SEQ ID NO:79) 中的每一个中,氨基酸1-116是3h-56-269dAb,氨基酸117-119是接头并且氨基酸120-351是Fc结构域。

[0571] 确认了这些dAb-Fc融合蛋白中的每一个以及3h56-269-IgG4.1和3h56-269-CT中的每一个均以高亲和力与纯化的人CD40单体(内部产生的hCD40单体)结合,如通过Biacore™SPR所测量的。如表26所示,对于不同的Fc变体,KD值在7.3nM与11.5nM之间的范围内。dAb-Fc分子中的每一个也以高亲和力结合人CD40,如使用在传感器芯片的表面上的hCD40-Fc和在溶液中作为可溶性分析物的dAb-Fc分子通过SPR所测量的,其中将250nM和25nM dAb-Fc分析物注射液的数据拟合到1:1朗缪尔模型以估算所有dAb-Fc<1nM时的亲和力影响的表观KD值(KD<sub>表观</sub>)。参见表26。

[0572] 表26:dAb-Fc分子与人CD40结合的SPR数据。

配体	hCD40单体与捕获在固定化蛋白A表面上的dAb-Fc分子的结合(亲和力)			dAb-Fc与固定化hCD40-Fc表面的结合(亲和力)
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)	KD <sub>表观</sub> (nM)
3h56-269-IgG4.1	8.5E+03	9.7E-05	11.5	<1
3h56-269-CT	1.6E+04	1.3E-04	8.0	<1
	1.6E+04	1.2E-04	7.3	<1
3h56-269-CT (UCOE-CHO)*	1.6E+04	1.3E-04	7.7	<1
	1.9E+04	1.4E-04	7.0	<1
3h56-269-IgG1.1f	9.6E+03	1.0E-04	10.8	<1
3h56-269-IgG1.3f	9.9E+03	9.1E-05	9.2	<1
	1.1E+04	1.1E-04	9.8	<1
3h56-269-IgG1-D265A	1.1E+04	9.9E-05	9.0	<1

[0574] \*由UCOE-CHO细胞表达并纯化的3h-56-269-CT。

[0575] dAb-Fc分子和各种对照单克隆1F4抗体的FcγR结合特性通过SPR来表征。第一种测定涉及1μM或10μM dAb-Fc或人IgG1f抗体对照(1F4-IgG1f)与抗His Fab捕获的FcγR-His表面的结合。这些数据显示于表27中。

[0576] 表27:1μM或10μM dAb-Fc或1F4-IgG1f抗体对照与抗His Fab捕获的hFcγR-His蛋白合的Rmax%数据。

样品	浓度 (μM)	抗His Fab捕获的FcγR					
		高亲和力 FcγR	低亲和力FcγR				
		hCD64	hCD32a	hCD32a	hCD32b	hCD16	hCD16b
[0577]							

			-H131	-R131		a-V158	-NA2	
[0578]	1F4-IgG1f	1	65%	31%	19%	5%	31%	13%
	3h56-269-IgG4.1	1	68%	27%	30%	20%	6%	1%
	3h56-269-IgG1-D265A	1	68%	7%	2%	0%	1%	0%
	3h56-269-IgG1.1f	1	11%	1%	10%	3%	0%	0%
	3h56-269-IgG1.3f	1	12%	1%	8%	3%	1%	0%
	3h56-269-CT	1	72%	0%	1%	0%	1%	0%
	1F4-IgG1f	10	65%	62%	51%	24%	52%	36%
	3h56-269-IgG4.1	10	69%	65%	66%	57%	27%	9%
	3h56-269-IgG1-D265A	10	69%	33%	17%	2%	2%	-1%
	3h56-269-IgG1.1f	10	39%	6%	43%	21%	3%	2%
	3h56-269-IgG1.3f	10	39%	6%	37%	19%	5%	4%
	3h56-269-CT	10	70%	2%	10%	3%	6%	-1%

[0579] 在另一种测定中,测试了FcγR分析物(1μM或10μM)与蛋白A捕获的dAb-Fc表面的结合(数据显示于表28中)和与抗体表面的结合(数据显示于表29中)。

[0580] 表28:1μM或10μM FcγR与蛋白A捕获的dAb-Fc蛋白结合的R<sub>Max</sub>%数据。

样品	浓度(μM)	蛋白A捕获的dAb-Fc蛋白					
		3h56-269-IgG4.1	3h56-269-IgG1-D265A	3h56-269-IgG1.1f	3h56-269-IgG1.3f	3h56-269-CT	
[0581]	hCD64	1	99%	41%	1%	2%	80%
	hCD32a-H131	1	29%	3%	0%	1%	1%
	hCD32a-R131	1	31%	1%	4%	5%	1%
	hCD32b	1	19%	0%	1%	2%	1%
	hCD16a-V158	1	12%	0%	0%	1%	1%
	hCD16B-NA2	1	2%	0%	0%	0%	0%
	hCD64	10	119%	85%	3%	7%	114%
	hCD32a-H131	10	70%	18%	4%	6%	7%
	hCD32a-R131	10	71%	4%	18%	26%	7%
	hCD32b	10	59%	1%	9%	12%	4%
	hCD16a-V158	10	47%	2%	2%	6%	7%
	hCD16B-NA2	10	13%	0%	1%	3%	1%

[0582] 表29:与蛋白A捕获的抗体结合的1μM或10μM FcγR的R<sub>max</sub>%数据。

样品	浓度(μM)	蛋白A捕获的抗体						
		1F4-IgG1f	1F4-IgG4.1	1F4-D265A	1F4-IgG1.1f	1F4-IgG1.3f	1F4-CT	
[0583]	hCD64	1	138%	126%	96%	8%	5%	120%
	hCD32a-H131	1	62%	29%	7%	2%	1%	2%
	hCD32a-R131	1	48%	33%	3%	5%	3%	2%
	hCD32b	1	11%	17%	1%	1%	1%	1%
	hCD16a-V158	1	97%	15%	1%	3%	2%	2%
	hCD16B-NA2	1	33%	4%	1%	4%	3%	0%

样品	浓度 ( $\mu\text{M}$ )	蛋白A捕获的抗体					
		1F4-IgG1f	1F4-IgG4.1	1F4-D265A	1F4-IgG1.1f	1F4-IgG1.3f	1F4-CT
hCD64	10	155%	139%	131%	17%	14%	131%
hCD32a-H131	10	99%	79%	38%	7%	6%	11%
hCD32a-R131	10	101%	87%	17%	28%	24%	13%
hCD32b	10	55%	68%	4%	11%	12%	8%
hCD16a-V158	10	125%	59%	2%	5%	7%	11%
hCD16B-NA2	10	81%	16%	-2%	4%	6%	1%

[0585] 根据这些实验中存在结合反应或缺乏结合反应,选择具有最强结合反应的较高亲和力和dAb-Fc/FcgR或Ab/FcgR相互作用的亚组使用分析物滴定(与蛋白A捕获的抗体或dAb-Fc结合的FcgR分析物)进行动力学/亲和力表征。这些数据呈现于表30中。

[0586] 表30:与蛋白A捕获的抗体或dAb-Fc结合的纯化FcgR分析物的KD值(以nM为单位)。

样品	hCD64	hCD32a-H131	hCD32a-R131	hCD32b	hCD16a-V158	hCD16B-NA2
	1F4-IgG1f	0.2	920	1400	>5000	430
1F4-IgG4.1	0.58	3700	2400	3100	>5000	>5000
3h56-269-IgG4.1	2.8	>5000	2200	>5000	>5000	>5000
3h56-269-IgG1-D265A	62					
3h56-269-IgG1.1f	>5000					
3h56-269-IgG1.3f	>5000	>5000	>5000	>5000	>5000	>5000
3h56-269-CT	4.6	>5000	>5000	>5000	>5000	>5000

[0588] 共同地,这些与FcgR结合SPR数据显示,与经修饰的Fc变体IgG1-D265A、IgG1.1f、IgG1.3f或CT分子相比,IgG1f和IgG4.1同种型分子在所有FcgR中均具有显著更高的FcgR亲和力。在经修饰的Fc变体中,hCD64结合亲和力对于3h56-269-CT最强(KD=4.6nM),对于3h56-269-IgG1-D265A最弱(KD=62nM),并且对于3h56-269-IgG1.1f和3h56-269-IgG1.3f最弱,它们的亲和力太弱以致无法在测试条件下进行定量(KD>5 $\mu\text{M}$ ,5 $\mu\text{M}$ 是测试的最高分析物浓度的一半)。IgG1-D265A、IgG1.1f、IgG1.3f和CT变体的所有其他FcgR相互作用(hCD32a-H131、hCD32a-R131、hCD32b、hCD16a-V158、hCD16b-NA2)同样太弱以致无法获得可靠的KD值(K<sub>D</sub>>5 $\mu\text{M}$ )。然而,可以在R<sub>max</sub>%数据中观察到相对结合反应的差异。例如,与IgG1.1f、IgG1.3f或CT变体相比,IgG1-D265A变体对hCD32a-H131具有更强的结合反应(表28)。相比之下,与IgG1-D265A和CT变体相比,IgG1.1f和IgG1.3f变体对hCD32a-R131具有更强的结合反应(表28)。

[0589] 通过DSC、icIEF和质谱法评估含有IgG1.3的融合蛋白或抗体。材料和方法描述如下。

[0590] 差示扫描量热法:DSC实验在MicroCal VP-Capillary DSC仪器(Malvern Instruments,马尔文,英文)上在10mM NaPO<sub>4</sub>、130mM NaCl(pH 7.1)中进行。使用10 $^{\circ}\text{C}$ -110 $^{\circ}\text{C}$ 的扫描范围和90 $^{\circ}\text{C}/\text{hr}$ 的扫描速率测试1mg/ml dAb-Fc或抗体的样品。使用MicroCal-Origin 7.0软件分析数据。

[0591] 成像毛细管等电聚焦:icIEF实验在ProteinSimple iCE3<sup>TM</sup>系统(ProteinSimple,圣何塞,加利福尼亚州)上进行。对于这些研究,将通常浓度为2mg/ml的dAb-Fc或抗体样品

与由2M脲、0.35%甲基纤维素、1%Pharmalyte 5-8、3% Pharmalyte 8-10.5和pI标记物5.85和10.10组成的载体两性电解质混合物进行混合,达到最终蛋白质浓度为0.20mg/mL,并使用1.5kV下预聚焦时间1min和3kV下聚焦时间10min进行分析。

[0592] 质谱法:对于质谱法(mass spec)分析,使用100mM DTT还原样品,并使用肽:N-糖苷酶(FPNGaseF)进行N-去糖基化。使用的液相色谱-质谱法(LC/MS)仪器是具有Waters Acquity®UPLC(超高效液相色谱法)的Waters Synapt®G2(Waters Corporation,米尔福德,马塞诸塞州)。UPLC柱是Waters Acquity®BEH(乙烯桥接的杂一体颗粒)C4(2.1x150mm, 300 Å,1.7µm颗粒)。梯度为200µL/min流速下在10min内10%到38%(流动相B)。流动相A为水中的0.1%甲酸。流动相B为乙腈中的0.1%甲酸。柱温度为60°C。借助于Waters MassLynx™软件手动进行数据分析;使用MaxEnt1算法进行光谱反卷积。

[0593] 加速稳定性研究:加速稳定性研究是通过首先在4°C下在目标制剂缓冲液中广泛透析dAb-Fc分子进行的。使用Amicon®超离心过滤器装置(Merck KgaA,德国)回收并浓缩样品,并将其以不同的目标浓度制备在透析缓冲液中。将这些样品在多种温度(通常为4°C、25°C、32°C和/或40°C)下孵育数周,移取等分试样,并通过分析型尺寸排阻色谱法进行分析。分析型尺寸排阻色谱法是使用Shodex™K403-4F柱(Showa Denko America, Inc.,纽约市,纽约州)在100mM磷酸钠、150mM氯化钠的pH 7.3的流动相中以0.3ml/min的流速在Agilent 1260 HPLC上进行的。

[0594] 结果-差示扫描量热法:DSC可用于测量蛋白质的热稳定性。最佳拟合T<sub>m</sub>值总结于表31中。

[0595] 表31:如通过DSC测定的dAb-Fc分子的热解链温度(T<sub>m</sub>)值。

样品	T <sub>m</sub> dAb和CH2结构域		T <sub>m</sub> CH3结构域 (°C)
	T <sub>m1</sub> (°C)	T <sub>m2</sub> (°C)	
3h56-269-IgG4.1	62.8		69.6
3h56-269-CT	55.4	60.4	83.2
3h56-269-IgG1.1f	59.0	61.6	82.3
3h56-269-IgG1.3f	57.0	62.8	81.9
3h56-269-IgG1-D265A	56.4	61.4	82.4

[0597] 根据IgG Fc结构域的特征性热变性图谱,将3h56-269-IgG4.1的Fc CH3结构域转变指定为具有69.6°C的中点(T<sub>m</sub>)值的转变;并且将各种IgG1分子的Fc CH3结构域指定为具有接近约82°C-83°C的T<sub>m</sub>的转变。将dAb-Fc的dAb结构域和CH2结构域的变性指定为低于65°C的一种或多种转变,其关于热变性的开始(T<sub>开始</sub>)、展开转变的形状以及最合适的T<sub>m</sub>值在不同的构建体之间有所不同。例如,3h56-269-IgG4.1的dAb和CH2结构域的热转变表现为单个重叠或协同转变,T<sub>m</sub>值为62.8°C。3h56-269-IgG1-D265A、3h56-269-IgG1.1f和3h56-269-IgG1.3f的dAb和CH2结构域的变性图谱全部都与更不对称的转变一致,具有约56°C-63°C之间的T<sub>m</sub>值的两种转变最佳地描述了这种现象。3h56-269-CT具有最低的T<sub>开始</sub>,在接近40°C开始展开,其中具有宽范围的热转变和T<sub>m1</sub>=55.4°C和T<sub>m2</sub>=60.4°C的最低拟合T<sub>m</sub>值。

[0598] 结果-成像毛细管等电聚焦(icIEF):成像毛细管等电聚焦(icIEF)可以用于表征样品均匀性或不均匀性。产生均匀产品的能力是另一个重要的可开发性标准。因此,在发现和最优化新型蛋白质治疗剂的过程中,使用各种分析方法来表征和定量样品均匀性,并选

择最均匀的分。

[0599] dAb-Fc分子的电荷图谱通过icIEF进行了表征。数据显示于图23中。3h56-269-IgG4.1(图23A)、3h56-269-IgG1.1f(图23E)和3h56-269-IgG1.3f(图23F)的icIEF图谱都相对简单,每个图谱都由面积为69%-86%并且在处于较低丰度的两个与四个电荷变体之间的明显主峰组成。此icIEF图谱类似于针对抗体获得的典型图谱。3h56-269-IgG1-D265A(图23D)的主峰的丰度较低(49%),其中具有至少六种可检测的种类的酸性变体的水平相应较高。相比之下,3h56-269-CT的图谱(图23B)是高度不均匀的,该图谱由至少16种不同的种类组成并且没有清晰的主峰。在不同细胞系(UCOE-CHO)中表达的3h56-269-CT的icIEF图谱同样是不均匀的(图23C),尽管电荷变体的分布与HEK293表达的物质明显不同。

[0600] 结果-质谱法:对IgG或含Fc蛋白质的Fc结构域的典型糖基化是G0F、G1F和一些G2F种类的混合。发现其他糖型(如唾液酸化或非岩藻糖基化形式)的丰度通常要低得多或处于不可检测的水平。

[0601] 为了表征dAb-Fc蛋白的糖基化图谱和比较dAb-Fc蛋白与具有类似Fc突变的对照抗体,进行了质谱实验。数据显示于表32中。

[0602] 表32:如通过质谱法测定的dAb-Fc和抗体分子中的可检测糖型。

[0603]

样品	G0F	G1F	G2F	G2FS1	G2FS2
3h56-269-IgG4.1	67%	29%	4%		
3h56-269-IgG1.1f	32%	58%	9%		
3h56-269-IgG1.3f	42%	55%	3%		
3h56-269-IgG1-D265A	4%	37%	43%	13%	2%
1F4-IgG1f	68%	32%			
1F4-IgG1.3f	26%	64%	10%		
1F4-D265A	27%	40%	27%	4%	2%

[0604] 对照抗体1F4-IgG1f和1F4-IgG1.3f以及dAb-Fc抗体3h56-269-IgG4.1、3h56-269-IgG1.1f、3h56-269-IgG1.3f的质谱数据显示,这些蛋白质由G0F、G1F糖型的典型混合物组。

[0605] 因此,IgG1.3(重链恒定区和Fc)基本上没有与CD16、CD32a、CD32b和CD64的结合,并具有良好的生物物理学特性。也已在IgG1.3 Fc与抗TIM3抗体的可变结构域连接时观察到这一点(参见WO 2018/013818)。已显示包含IgG1.3的抗TIM3抗体具有良好的热稳定性( $T_{m1}=68.1^{\circ}\text{C}$ 、 $T_{m2}=80.3^{\circ}\text{C}$ 、 $T_{m3}=82.6^{\circ}\text{C}$ )和热可逆性(74°C下95.6%,80°C下25.5%),这表明所述分子在热应力下保持其结构完整性并在应力释放时具有稳健的重折叠特性。

[0606] 综上所述,本申请包括但不限于以下各项:

[0607] 1.一种包含经修饰的重链恒定区的抗体,其中所述经修饰的重链恒定区以从N末端到C末端的顺序包含CH1结构域、铰链、CH2结构域和CH3结构域,其中所述铰链是IgG2同种型的,并且所述CH1、CH2或CH3结构域中的至少一个不是IgG2同种型的。

[0608] 2.根据项1所述的抗体,其中所述铰链是野生型人IgG2铰链或包含与野生型人IgG2铰链的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。

[0609] 3.根据项1或2所述的抗体,其中所述铰链含有减少二硫键形成的一个或多个修饰。

[0610] 4.根据前述项中任一项所述的抗体,其中所述铰链包含氨基酸取代C219S。

- [0611] 5. 根据前述项中任一项所述的抗体,其中所述铰链包含SEQ ID NO:8、21-23、126-132或134-147中任何一个的氨基酸序列或如下序列,所述序列包含在CVE与CPP之间插入的1-3个氨基酸。
- [0612] 6. 根据前述项中任一项所述的抗体,其中所述CH1结构域为IgG2 CH1结构域。
- [0613] 7. 根据前述项中任一项所述的抗体,其中所述CH1结构域是野生型人IgG2CH1结构域或者包含与野生型人IgG2 CH1结构域的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。
- [0614] 8. 根据前述项中任一项所述的抗体,其中所述IgG2 CH1结构域包含氨基酸序列
- [0615] ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPVSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV (SEQ ID NO:7)。
- [0616] 9. 根据前述项中任一项所述的抗体,其中所述CH2结构域为IgG1 CH2结构域。
- [0617] 10. 根据前述项中任一项所述的抗体,其中所述CH2结构域是野生型人IgG1CH2结构域或者包含与野生型人IgG1 CH2结构域的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。
- [0618] 11. 根据前述项中任一项所述的抗体,其中所述CH2结构域包含降低或消除效应子功能的一个或多个修饰。
- [0619] 12. 根据前述项中任一项所述的抗体,其中所述CH2结构域包含氨基酸取代A330S和P331S。
- [0620] 13. 根据前述项中任一项所述的抗体,其中所述CH2结构域包含氨基酸序列PSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK (SEQ ID NO:4)。
- [0621] 14. 根据前述项中任一项所述的抗体,其中所述CH3结构域为IgG1 CH3结构域。
- [0622] 15. 根据前述项中任一项所述的抗体,其中所述CH3结构域是野生型人IgG1 CH3结构域或者包含与野生型人IgG1 CH3结构域的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。
- [0623] 16. 根据前述项中任一项所述的抗体,其中所述CH3结构域包含氨基酸序列GQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
- [0624] ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:5)。
- [0625] 17. 根据前述项中任一项所述的抗体,其中所述CH3结构域包含氨基酸取代
- [0626] E356D和M358L。
- [0627] 18. 根据项1-17中任一项所述的抗体,其相对于包含IgG1铰链和CH1结构域的相同抗体具有至少一种增强的特性或新引入的特性。
- [0628] 19. 根据项18所述的抗体,其中所述抗体具有选自以下项的至少一种增强的特性:激动剂活性、抗体介导的受体内化、ADCC、受体介导的信号传导、拮抗剂活性、免疫调节活性和抗肿瘤活性;或新引入的特性,其为激动剂活性。
- [0629] 20. 一种包含经修饰的重链恒定区的抗体,所述经修饰的重链恒定区以从N末端到C末端的顺序包含CH1结构域、铰链、CH2结构域和CH3结构域,并且其中
- [0630] (a) 所述CH1结构域包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列或者与其有最多5个氨基酸的差异或与SEQ ID NO:7至少95%相同的氨基酸序列,并且其中C131、R133、E137、S138或R217中的至少一个没有被取代或缺失;
- [0631] (b) 铰链,其包含SEQ ID NO:8、21-23、126-132或134-147中的任何一个或如下序

列,所述序列包含在CVE与CPP之间插入的1-3个氨基酸或者所述序列与SEQ ID NO:8、21-23、126-132或134-147中的任何一个有最多5个氨基酸的差异,其中所述铰链在C219和C220两处均不包含取代或

[0632] 缺失;

[0633] (c)所述抗体相对于包含IgG1铰链和CH1结构域的同抗体具有至少一种增强的特性或新引入的特性;并且

[0634] (d)所述经修饰的重链恒定区不是野生型IgG2恒定区或包含C219S和/或

[0635] C220S的IgG2恒定区。

[0636] 21.根据项20所述的抗体,其中所述铰链包含氨基酸序列ERKXCVEPCPPAP(SEQ ID NO:129)或ERKCXVEPCPPAP(SEQ IDNO:130),其中X是除半胱氨酸以外的任何氨基酸。

[0637] 22.根据项21所述的抗体,其中所述铰链包含氨基酸序列ERKSCVEPCPPAP(SEQ ID NO:131)或ERKCSVEPCPPAP(SEQ IDNO:132)。

[0638] 23.根据项20-22中任一项所述的抗体,其中P233、V234、A235或G237中的至少一个是缺失的或被另一个氨基酸残基取代。

[0639] 24.根据项23所述的抗体,其中P233、V234、A235和G237是缺失的或被另一个氨基酸残基取代。

[0640] 25.根据项20-24中任一项所述的抗体,其中氨基酸残基R133、E137、S138

[0641] 和R217中的任何一个都没有被取代或缺失。

[0642] 26.根据项24所述的抗体,其中氨基酸残基C131、R133、E137、S138和R217

[0643] 中的任何一个都没有被取代或缺失。

[0644] 27.根据项20-26中任一项所述的抗体,其中N192被另一个氨基酸取代。

[0645] 28.根据项20-27中任一项所述的抗体,其中F193被另一个氨基酸取代。

[0646] 29.根据项20-28中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含与野生型IgG1的CH2结构域至少95%相同的CH2结构域。

[0647] 30.根据项20-29中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含与野生型IgG1的CH3结构域至少95%相同的CH3结构域。

[0648] 31.根据项28-30中任一项所述的抗体,其中所述CH2和/或CH3结构域不是野生型IgG1 CH2和/或CH3结构域,并且其中所述抗体的效应子功能比野生型IgG1的效应子功能更有力。

[0649] 32.根据项28-30中任一项所述的抗体,其中所述CH2和/或CH3结构域不是野生型IgG1 CH2和/或CH3结构域,并且其中所述抗体的效应子功能不如野生型IgG1的效应子功能有力。

[0650] 33.根据项20-32中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含与野生型IgG4的CH2结构域至少95%相同的CH2结构域。

[0651] 34.根据项20-33中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含与野生型IgG4的CH3结构域至少95%相同的CH3结构域。

[0652] 35.根据项20-34中任一项所述的抗体,其中所述抗体具有选自以下项的至少一种增强的特性:激动剂活性、抗体介导的受体内化、ADCC、受体介导的信号传导、拮抗剂活性、免疫调节活性或抗肿瘤活性;或新引入的特性,其为激动剂活性。

- [0653] 36. 根据项35所述的抗体,其中
- [0654] (a) 所述CH1结构域为野生型人IgG2 CH1结构域;
- [0655] (b) 所述铰链包含SEQ ID NO:8、21-23、126-132或134-147中的任何一个或如下序列,所述序列包含在CVE与CPP之间插入的1-3个氨基酸;
- [0656] (c) 所述CH2结构域是野生型人IgG1 CH2结构域或赋予所述抗体增强或降低的效应子功能的经修饰的CH2结构域;并且
- [0657] (d) 所述CH3结构域是野生型人IgG1 CH3结构域或赋予所述抗体增强或降低的效应子功能的经修饰的CH3结构域。
- [0658] 37. 根据前述项中任一项所述的抗体,其包含SEQ ID NO:26-37、54-56、78-125、152-232、234-245和247-262中任何一个所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:26-37、54-56、78-125、152-232、234-245和247-262至少95%相同的氨基酸序列。
- [0659] 38. 一种包含经修饰的重链恒定区的抗体,其中所述重链恒定区包含CH1结构域和铰链,所述铰链包含序列
- [0660] ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPVSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPCPAPPVAG (SEQ ID NO:133) 或者与SEQ ID NO:
- [0661] 133有最多10个氨基酸的差异或与SEQ ID NO:133至少90%相同的氨基酸序列,其中
- [0662] C131、R133、E137、S138和R217中的至少一个没有被另一个氨基酸取代或缺失;
- [0663] C219和C220可以被另一个氨基酸取代或缺失,但是C219和C220不能同时被取代或缺失。
- [0664] 可以在所述铰链中的CVE与CPP之间插入1-3个氨基酸;
- [0665] 所述铰链任选地在C末端包含另外的氨基酸,例如G;
- [0666] 氨基酸P233、V234、A235和G237中的一个或多个可以被另一个氨基酸(例如,来自IgG1的相应氨基酸)取代或缺失;
- [0667] 所述CH2和CH3结构域可以是野生型或经修饰的IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 CH2和CH3结构域;
- [0668] 所述经修饰的重链恒定区不是具有C219S或C220S的野生型IgG2重链恒定区或野生型IgG2重链恒定结构域;并且
- [0669] 所述抗体相对于包含IgG1铰链和CH1结构域的同抗体具有至少一种增强的特性或新引入的特性。
- [0670] 39. 根据项38所述的抗体,其中所述抗体具有选自以下项的至少一种增强的特性:激动剂活性、抗体介导的受体内化、ADCC、受体介导的信号传导、拮抗剂活性、免疫调节活性或抗肿瘤活性;或新引入的特性,其为激动剂活性。
- [0671] 40. 根据项38或39所述的抗体,其中氨基酸C131、R133、E137、S138、R217
- [0672] 中的任何一个都没有被另一个氨基酸取代或缺失。
- [0673] 41. 根据项38-40中任一项所述的抗体,其中N192和/或F193未被取代或分别为N192S和/或F193L。
- [0674] 42. 根据项38-41中任一项所述的抗体,其中C219是C219S。

- [0675] 43. 根据项38-41中任一项所述的抗体,其中C220是C220S。
- [0676] 44. 根据项38-43中任一项所述的抗体,其中P233-G237被取代或缺失。
- [0677] 45. 根据项38-43中任一项所述的抗体,其中V234-G237被取代或缺失。
- [0678] 46. 根据项38-43中任一项所述的抗体,其中A235-G237被取代或缺失。
- [0679] 47. 根据项38-43中任一项所述的抗体,其中G237被取代或缺失。
- [0680] 48. 根据项38-43中任一项所述的抗体,其中P233被取代或缺失。
- [0681] 49. 根据项38-43中任一项所述的抗体,其中P233-V234被取代或缺失。
- [0682] 50. 根据项38-43中任一项所述的抗体,其中P233-A235被取代或缺失。
- [0683] 51. 根据项38-50中任一项所述的抗体,其中所述抗体具有效应子功能。
- [0684] 52. 根据项38-50中任一项所述的抗体,其中所述抗体不具有效应子功能。
- [0685] 53. 根据项38-52中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含野生型或经修饰的IgG1 CH2结构域。
- [0686] 54. 根据项38-52中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含野生型或经修饰的IgG1 CH3结构域。
- [0687] 55. 一种包含经修饰的重链恒定区的抗体,其中所述重链恒定区包含CH1结构域,所述CH1结构域包含序列
- [0688] ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE (SEQ ID NO:7) 或者与SEQ ID NO:7有最多10个氨基酸的差异或与SEQ ID NO:7至少90%相同的氨基酸序列,其中
- [0689] C131、R133、E137、S138和R217中的至少一个未被取代或缺失;
- [0690] 所述经修饰的重链恒定区不是具有C219S或C220S的野生型IgG2重链恒定区或野生型IgG2重链恒定结构域;并且
- [0691] 所述抗体相对于包含IgG1铰链和CH1结构域的同抗体具有至少一种增强特性或新引入的特性。
- [0692] 56. 根据项55所述的抗体,其中所述抗体具有选自以下项的至少一种增强特性:激动剂活性、抗体介导的受体内化、ADCC、受体介导的信号传导、拮抗剂活性、免疫调节活性或抗肿瘤活性;或新引入的特性,其为激动剂活性。
- [0693] 57. 根据项55或56所述的抗体,其中氨基酸C131、R133、E137和S138中的任何一个都没有被另一个氨基酸取代或缺失。
- [0694] 58. 根据项55-57中任一项所述的抗体,其中N192和/或F193未被取代或分别为N192S和/或F193L。
- [0695] 59. 根据项55-58中任一项所述的抗体,其中所述抗体具有效应子功能。
- [0696] 60. 根据项55-58中任一项所述的抗体,其中所述抗体不具有效应子功能。
- [0697] 61. 根据项55-60中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含野生型或经修饰的IgG1 CH2结构域。
- [0698] 62. 根据项55-61中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含野生型或经修饰的IgG1 CH3结构域。
- [0699] 63. 一种包含经修饰的重链恒定区的抗体,其中所述重链恒定区包含铰链,所述铰链包含序列

- [0700] ERKCCVECPAPPVAG (SEQ ID NO:8) 或与 SEQ ID NO:8 有最多5个氨基酸差异的氨基酸序列,其中
- [0701] C219和C220可以被另一个氨基酸取代或缺失,但是C219和C220不能同时被取代或缺失。
- [0702] 氨基酸P233、V234、A235和G237中的一个或多个可以被取代或缺失;
- [0703] 可以在所述铰链中的CVE与CPP之间插入1-3个氨基酸;
- [0704] 所述铰链任选地在C末端包含另外的氨基酸,例如G;
- [0705] 所述CH2和CH3结构域可以是野生型或经修饰的IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 CH2和CH3结构域;
- [0706] 所述经修饰的重链恒定区不是具有C219S或C220S的野生型IgG2重链恒定区或野生型IgG2重链恒定结构域;并且
- [0707] 所述抗体相对于包含IgG1铰链和CH1结构域的同抗体具有至少一种增强的特性或新引入的特性。
- [0708] 64. 根据项63所述的抗体,其中所述抗体具有选自以下项的至少一种增强的特性:激动剂活性、抗体介导的受体内化、ADCC、受体介导的信号传导、拮抗剂活性、免疫调节活性或抗肿瘤活性;或新引入的特性,其为激动剂活性。
- [0709] 65. 根据项63-64中任一项所述的抗体,其中C219是C219S。
- [0710] 66. 根据项63-64中任一项所述的抗体,其中C220是C220S。
- [0711] 67. 根据项63-66中任一项所述的抗体,其中P233-G237是突变或缺失的。
- [0712] 68. 根据项63-66中任一项所述的抗体,其中V234-G237是突变或缺失的。
- [0713] 69. 根据项63-66中任一项所述的抗体,其中A235-G237是突变或缺失的。
- [0714] 70. 根据项63-66中任一项所述的抗体,其中G237是突变或缺失的。
- [0715] 71. 根据项63-66中任一项所述的抗体,其中P233是突变或缺失的。
- [0716] 72. 根据项63-66中任一项所述的抗体,其中P233-V234是突变或缺失的。
- [0717] 73. 根据项63-66中任一项所述的抗体,其中P233-A235是突变或缺失的。
- [0718] 74. 根据项63-73中任一项所述的抗体,其中所述抗体具有效应子功能。
- [0719] 75. 根据项63-73中任一项所述的抗体,其中所述抗体不具有效应子功能。
- [0720] 76. 根据项63-75中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含野生型或经修饰的IgG1 CH2结构域。
- [0721] 77. 根据项63-76中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含野生型或经修饰的IgG1 CH3结构域。
- [0722] 78. 一种包含经修饰的重链恒定区的抗体,其中所述重链恒定区包含IgG1或IgG2铰链,并且其中所述铰链缺少1-7个氨基酸,并且其中所述抗体相对于包含IgG1铰链和CH1结构域的同抗体具有至少一种增强的特性或新引入的特性。
- [0723] 79. 根据项78所述的抗体,其中所述抗体具有选自以下项的至少一种增强的特性:激动剂活性、抗体介导的受体内化、ADCC、受体介导的信号传导、拮抗剂活性、免疫调节活性或抗肿瘤活性;或新引入的特性,其为激动剂活性。
- [0724] 80. 根据项78或79所述的抗体,其中所述铰链是缺少1-4个氨基酸的IgG2铰链。
- [0725] 81. 根据项80所述的抗体,其中所述IgG2铰链缺少氨基酸C219、C220、V222和E224。

- [0726] 82. 根据项78或79所述的抗体,其中所述铰链是缺少氨基酸S219、C220、D221、K222、T223、H224和T225的IgG1铰链。
- [0727] 83. 根据项78-82中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含野生型或经修饰的IgG2 CH1结构域。
- [0728] 84. 根据项78-82中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含野生型或经修饰的IgG1 CH1结构域。
- [0729] 85. 根据项78-84中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含IgG2 CH2结构域。
- [0730] 86. 根据项78-84中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含IgG1 CH2结构域。
- [0731] 87. 根据项78-86中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含IgG2 CH3结构域。
- [0732] 88. 根据项78-86中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含IgG1 CH3结构域。
- [0733] 89. 根据前述项中任一项所述的抗体,其是人抗体或人源化抗体或者其抗原结合部分。
- [0734] 90. 根据前述项中任一项所述的抗体,其中所述抗体与涉及免疫调节的抗原特异性地结合。
- [0735] 91. 根据项90所述的抗体,其中所述抗体是共刺激受体的激动剂或抑制性受体的拮抗剂。
- [0736] 92. 根据项91所述的抗体,其中所述共刺激受体选自B7-1、B7-2、CD28、4-1BB、GITR、OX40、ICOS、CD70、CD27、CD40、DR3或CD28H的组。
- [0737] 93. 根据项91所述的抗体,其中所述刺激性受体选自CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG-3、TIM-3、半乳糖凝集素9、CEACAM-1、BTLA、CD69、半乳糖凝集素-1、TIGIT、CD113、GPR56、VISTA、2B4、CD48、GARP、PD1H、LAIR1、TIM-1和TIM-4的组。
- [0738] 94. 根据项90所述的抗体,其中所述抗原是CD73或CD39。
- [0739] 95. 一种抗体,其与共刺激受体特异性地结合,并且包含选自以下项的组的经修饰的重链恒定区:SEQ ID NO:26-37、54-56、78-125、152-232、234-245和247-262。
- [0740] 96. 根据项95所述的抗体,其中所述共刺激受体是GITR、OX40、4-1BB、CD28、ICOS、CD40L、CD27或任何其他TNFR超家族成员。
- [0741] 97. 根据项95或96所述的抗体,其中所述抗体相对于具有相同可变区和轻链但包含IgG1重链恒定区的抗体展现出增强或改变的激动剂活性。
- [0742] 98. 一种抗体,其与细胞表面分子特异性地结合并触发抗体介导的所述细胞表面分子内化,并且所述抗体包含选自以下项的组的经修饰的重链恒定区:SEQ ID NO:26-37、54-56、78-125、152-232、234-245和247-262。
- [0743] 99. 根据项98所述的抗体,其中所述细胞表面分子是CD73。
- [0744] 100. 根据项98或99所述的抗体,其中所述抗体相对于具有相同可变区和轻链但包含IgG1重链恒定区的抗体具有增强或改变的内化特性。
- [0745] 101. 一种抗体,其与抑制性受体特异性地结合,并且包含选自以下项的组的经修饰的重链恒定区:SEQ ID NO:26-37、54-56、78-125、152-232、234-245和247-262。
- [0746] 102. 根据项101所述的抗体,其中所述抑制性受体是CTLA-4、PD-1、LAG-3、TIM-3、半乳糖凝集素9、CEACAM-1、BTLA、CD69、半乳糖凝集素-1、TIGIT、CD113、GPR56、VISTA、2B4、CD48、GARP、PD1H、LAIR1、TIM-1和TIM-4。

- [0747] 103. 根据项101或102所述的抗体,其中所述抗体相对于具有IgG1重链恒定区的相同抗体展现出更有力或改变的拮抗剂活性或引入新的活性。
- [0748] 104. 一种抗体,其与细胞表面分子特异性地结合并触发细胞内信号传导,其中所述抗体包含选自以下项的组的经修饰的重链恒定区:SEQ ID NO:26-37、54-56、78-125、152-232、234-245和247-262。
- [0749] 105. 根据项104所述的抗体,其中所述细胞内信号传导介导激动剂活性、拮抗剂活性、细胞表面分子的内化或ADCC。
- [0750] 106. 根据项104或105所述的抗体,其中所述抗体相对于具有相同可变区和轻链但包含IgG1重链恒定区的抗体触发更有力的细胞内信号传导。
- [0751] 107. 一种抗体,其与细胞表面分子特异性地结合并触发高分子量抗体-细胞表面分子复合物的形成,其中所述抗体包含选自以下项的组的经修饰的重链恒定区:SEQ ID NO:26-37、54-56、78-125、152-232、234-245和247-262。
- [0752] 108. 根据项107所述的抗体,其中所述抗体相对于具有相同可变区和轻链但包含IgG1重链恒定区的抗体触发更高分子量复合物的形成。
- [0753] 109. 一种抗体,其与细胞表面分子特异性地结合并触发所述细胞表面分子的聚集或低聚,其中所述抗体包含选自以下项的组的经修饰的重链恒定区:SEQ ID NO:26-37、54-56、78-125、152-232、234-245和247-262。
- [0754] 110. 根据项109所述的抗体,其中所述抗体相对于具有相同可变区和轻链但包含IgG1重链恒定区的抗体触发所述细胞表面分子更多的聚集或低聚。
- [0755] 111. 一种双特异性分子,其包含与具有第二结合特异性的分子连接的根据前述项中任一项所述的抗体。
- [0756] 112. 一种免疫缀合物,其包含与第二药剂连接的根据前述项中任一项所述的抗体。
- [0757] 113. 一种包含根据项1-112中任一项所述的抗体、双特异性分子或免疫缀合物以及载体的组合物。
- [0758] 114. 根据项44所述的组合物,其进一步包含一种或多种另外的治疗剂。
- [0759] 115. 根据项45所述的组合物,其中所述另外的治疗剂刺激免疫系统。
- [0760] 116. 根据项46所述的组合物,其中所述治疗剂是检查点抑制剂或共刺激受体的拮抗剂。
- [0761] 117. 一种制备包含经修饰的重链恒定区的抗体的方法,其中所述抗体以从N末端到C末端的顺序包含CH1结构域、铰链、CH2结构域和CH3结构域,所述方法包括以下步骤:
- [0762] (a) 提供包含不是IgG2铰链和/或IgG2 CH1结构域的铰链和/或CH1结构域的抗体;
- [0763] (b) 将所述铰链和/或所述CH1结构域分别用IgG2铰链和/或IgG2 CH1结构域替代。
- [0764] 118. 一种增加细胞对抗体的内化的方法,其包括:
- [0765] (a) 提供包含不是IgG2铰链和/或IgG2 CH1结构域的铰链和/或CH1结构域的抗体;
- [0766] (b) 将所述铰链和/或所述CH1结构域分别用IgG2铰链和/或IgG2 CH1结构域替代。
- [0767] 119. 根据项118所述的方法,其中所述抗体的内化与包含非IgG2同种型的铰链的相同抗体,例如包含IgG1恒定区的抗体的内化相比增加了。
- [0768] 120. 一种增加抗体的激动剂活性的方法,其包括:

- [0769] (a) 提供包含不是IgG2铰链和/或IgG2 CH1结构域的铰链和/或CH1结构域的抗体；
- [0770] (b) 将所述铰链和/或所述CH1结构域分别用IgG2铰链和/或IgG2 CH1结构域替代。
- [0771] 121. 根据项120所述的方法, 其中所述激动剂活性与包含非IgG2同种型的铰链的相同抗体, 例如包含IgG1恒定区的抗体的激动剂活性相比增加了。
- [0772] 122. 根据项117-121中任一项所述的方法, 其中所述IgG2铰链是野生型人IgG2铰链或包含与野生型人IgG2铰链的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。
- [0773] 123. 根据项117-122中任一项所述的方法, 其包括将所述CH1、CH2或CH3结构域中的至少一个分别用不同同种型的CH1、CH2或CH3结构域替代的步骤。
- [0774] 124. 根据项117-123中任一项所述的方法, 其包括以下步骤:
- [0775] (a) 将所述CH1结构域用IgG2 CH1结构域替代;
- [0776] (b) 将所述CH2结构域用IgG1 CH2结构域替代; 和/或
- [0777] (c) 将所述CH3结构域用IgG1 CH3结构域替代。
- [0778] 125. 根据项117-124中任一项所述的方法, 其包括以下步骤:
- [0779] (a) 将所述CH1结构域用野生型人IgG2 CH1结构域或与其至少95%相同的结构域替代;
- [0780] (b) 将所述CH2结构域用野生型人IgG1 CH2结构域或与其至少95%相同的结构域替代; 和/或
- [0781] (c) 将所述CH3结构域用野生型人IgG1 CH3结构域或与其至少95%相同的结构域替代。
- [0782] 126. 根据项117-125中任一项所述的方法, 其包括以下步骤:
- [0783] 将所述重链恒定区用包含SEQ ID NO:26-37、54-56、78-125、152-232、234-245和247-262中任何一个的重链恒定区或与SEQ ID NO:26-37、
- [0784] 54-56、78-125、152-232、234-245和247-262至少95%相同的区域替代。
- [0785] 127. 根据项117-126中任一项所述的方法, 其中将所述铰链修饰以减少二硫键的形成。
- [0786] 128. 根据项117-127中任一项所述的方法, 其中所述铰链包含氨基酸取代C219S。
- [0787] 129. 根据项117-128中任一项所述的方法, 其中所述铰链包含SEQ ID NO:8、21-23、126-132或134-147中任何一个所示的氨基酸序列或如下序列, 所述序列包含在CVE与CPP之间插入的1-3个氨基酸。
- [0788] 130. 根据项117-129中任一项所述的方法, 其中所述CH1结构域包含氨基酸序列
- [0789] ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTV (SEQ ID NO:7)。
- [0790] 131. 根据项117-130中任一项所述的方法, 其中将所述CH2结构域修饰以降低或消除效应子功能。
- [0791] 132. 根据项117-131中任一项所述的方法, 其中所述CH2结构域包含氨基酸取代A330S和P331S。
- [0792] 133. 根据项117-132中任一项所述的方法, 其中所述CH2结构域包含氨基酸序列
- [0793] PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK (SEQ ID NO:4)。

- [0794] 134. 根据项117-133中任一项所述的方法, 其中所述CH2结构域包含氨基酸取代A330S和P331S。
- [0795] 135. 根据项117-134中任一项所述的方法, 其中所述CH3结构域包含氨基酸序列
- [0796] GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS  
KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:5)。
- [0797] 136. 一种通过根据项117-135中任一项所述的方法产生的抗体或其抗原结合部分。
- [0798] 137. 根据项136所述的抗体或其抗原结合部分, 所述抗体或其抗原结合部分是人抗体或人源化抗体。
- [0799] 138. 一种治疗受试者的方法, 其包括给予前述项中任一项所述的抗体或其抗原结合部分。
- [0800] 139. 根据项138所述的方法, 其进一步包括给予一种或多种另外的治疗剂的步骤。
- [0801] 140. 根据项139所述的方法, 其中所述治疗剂刺激免疫系统。
- [0802] 141. 根据项140所述的方法, 其中所述治疗剂是检查点抑制剂或共刺激分子。
- [0803] 142. 一种治疗受试者的方法, 其包括给予根据前述项中任一项所述的组合物、双特异性分子或免疫缀合物。
- [0804] 143. 一种包含经修饰的重链恒定结构域的抗体(或其抗原结合片段), 所述经修饰的重链恒定结构域包括人IgG重链恒定结构域, 其中位置238处的氨基酸不是P, 并且所述经修饰的重链恒定结构域相对于在位置238处的氨基酸是脯氨酸的相同IgG重链恒定结构域, 具有降低的效应子功能。
- [0805] 144. 根据项143所述的抗体, 其中所述IgG重链恒定结构域是人IgG1重链恒定结构域。
- [0806] 145. 根据项143或144所述的抗体, 其中所述在位置238处的氨基酸是K。
- [0807] 146. 根据项143-145中任一项所述的抗体, 其中所述经修饰的重链恒定区包含与SEQ ID NO:198至少90%相同的氨基酸序列, 其中P238不是P(或者不是P也不是S)而是例如P238K。
- [0808] 147. 根据项146所述的抗体, 其中所述经修饰的重链恒定区包含与SEQ IDNO:198至少95%相同的氨基酸序列, 其中P238不是P(或者不是P也不是S)而是例如P238K。
- [0809] 148. 根据项147所述的抗体, 其中所述经修饰的重链恒定区包含与SEQ IDNO:198至少99%相同的氨基酸序列, 其中P238不是P(或者不是P也不是S)而是例如P238K。
- [0810] 149. 根据项143-148中任一项所述的抗体, 其中所述经修饰的重链恒定区不包含美国专利号5,637,481(其内容通过引用特别地并入本文)中披露的非P238氨基酸修饰中的一个或多个, 所述非P238氨基酸修饰例如为C220S、C226S和C229S。
- [0811] 150. 根据项143-149中任一项所述的抗体, 其中所述经修饰的重链恒定区包含由SEQ ID NO:198组成的氨基酸序列。
- [0812] 151. 根据项143-150中任一项所述的抗体, 其中所述抗体是抗体中与所述经修饰的重链恒定区连接的抗原结合片段(例如Dab或scFv)。
- [0813] 152. 根据项143-150中任一项所述的抗体, 其中所述抗体包含与所述经修饰的重链恒定结构域连接的重链可变结构域和与轻链恒定结构域连接的轻链可变结构域。

[0814] 153. 根据项143-152中任一项所述的抗体,其中所述抗体是全长抗体(重链和轻链分别是全长重链和轻链)。

[0815] 154. 根据项143-153中任一项所述的抗体,其中所述经修饰的重链恒定结构域不包含降低效应子功能的一个或多个其他突变。

[0816] 155. 根据项154所述的抗体,其中所述经修饰的重链恒定结构域不包含降低效应子功能的本文公开的一个或多个其他突变。

[0817] 156. 根据项143-153中任一项所述的抗体,其中所述经修饰的重链恒定结构域包含降低效应子功能的1-3个其他突变。

[0818] 157. 根据项156所述的抗体,其中所述经修饰的重链恒定结构域包含降低效应子功能的本文公开的1-3个其他突变。

[0819] 158. 根据项143-157中任一项所述的抗体,其中所述抗体的效应子功能与IgG2抗体的效应子功能大致相同。

[0820] 159. 根据项143-158中任一项所述的抗体,其中所述抗体相对于具有野生型IgG1的抗体,对低亲和力Fc $\gamma$ R的结合亲和力较低。

[0821] 160. 根据项159所述的抗体,其中所述抗体与低亲和力Fc $\gamma$ R没有可检测的结合。

[0822] 161. 根据项159或160所述的抗体,其中所述低亲和力Fc $\gamma$ R是hCD32a-H131、hCD32a-R131、hCD32b、hCD16a-V158和hCD16b-NA2。

[0823] 162. 根据项161所述的抗体,其中所述抗体与低亲和力Fc $\gamma$ R:hCD32a-H131、hCD32a-R131、hCD32b、hCD16a-V158或hCD16b-NA2没有可检测的结合(例如,在抗体浓度为10 $\mu$ M的情况下)。

[0824] 163. 根据项143-162中任一项所述的抗体,其中所述抗体以相对于具有野生型IgG1恒定区的抗体而言更快的解离率(解离速率)与高亲和力Fc $\gamma$ RCD64(hFc $\gamma$ RI)结合。

[0825] 164. 根据项143-163中任一项所述的抗体,其中所述抗体与低亲和力Fc $\gamma$ R:hCD32a-H131、hCD32a-R131、hCD32b、hCD16a-V158或hCD16b-NA2没有可检测的结合(例如,在抗体浓度为10 $\mu$ M的情况下),并且所述抗体相对于具有野生型恒定区的抗体具有更快的解离率。

[0826] 165. 根据项159-164中任一项所述的抗体,其中通过Biacore来确定对于Fc $\gamma$ R的结合亲和力和解离率。

[0827] 166. 根据项143-165中任一项所述的抗体,其中所述抗体相对于具有野生型IgG1恒定区的抗体具有优越的热稳定性。

[0828] 167. 根据项143-166中任一项所述的抗体,其中所述抗体相对于具有野生型IgG1恒定区的抗体具有降低的异质性。

[0829] 168. 一种包含重链恒定区的抗体,所述重链恒定区包含突变L234A、L235E和G337A,但不含有降低效应子功能的在A330和/或P331处的突变(例如不包含A330S和/或P331S),其中所述抗体相对于不具有这些突变的相同抗体具有降低的效应子功能(降低的ADCC和任选降低的CDC)。

[0830] 169. 根据项168所述的抗体,其与免疫细胞例如T细胞上的抑制性受体结合。

[0831] 170. 根据项168或169所述的抗体,其以相对于不具有这些突变的相同抗体而言降低的亲和力与Fc $\gamma$ R:hCD32a-H131、hCD32a-R131、hCD32b、hCD16a-V158、hCD16b-NA2和

hCD64结合。

[0832] 171. 根据项168-170中任一项所述的抗体,其中所述重链恒定区包含与SEQ ID NO:234或248至少95%相同的氨基酸序列。

[0833] 172. 根据项168-171中任一项所述的抗体,其中所述重链恒定区包含氨基酸序列SEQ ID NO:234或248,所述氨基酸序列包括1-5、1-4、1-3、1-2或1个氨基酸取代(例如保守氨基酸取代),其中所述氨基酸取代不会显著增加与一种或多种Fc $\gamma$ R的结合。

[0834] 173. 根据项168-172中任一项所述的抗体,其中所述重链恒定区包含氨基酸序列SEQ ID NO:234或248,所述氨基酸序列包括或不包括C末端赖氨酸。

[0835] 174. 根据项168-172中任一项所述的抗体,其中所述重链恒定区包含氨基酸序列SEQ ID NO:236、249、252、253、259或260,所述氨基酸序列包括或不包括C末端赖氨酸。

[0836] 175. 根据项168-174中任一项所述的抗体,其中所述抗体是全长抗体(或包含全长重链和全长轻链),其具有或不具有C末端赖氨酸。

[0837] 176. 根据项168-175中任一项所述的抗体,其中所述抗体是检查点抑制剂的拮抗剂或检查点刺激剂的激动剂。

[0838] 177. 根据项168-176中任一项所述的抗体,其中所述抗体不是W02018/013818中披露的抗体。

[0839] 178. 根据项168-177中任一项所述的抗体,其中所述抗体不与人TIM3结合。

[0840] 179. 一种包含重链恒定区的融合蛋白,所述重链恒定区包含突变L234A、L235E和G337A,但不含有降低效应子功能的在A330和/或P331处的突变(例如不包含A330S和/或P331S),其中所述抗体相对于不具有这些突变的相同抗体具有降低的效应子功能(降低的ADCC和任选降低的CDC)。

[0841] 180. 根据项179所述的融合蛋白,其以相对于不具有这些突变的相同抗体而言降低的亲和力与Fc $\gamma$ R:hCD32a-H131、hCD32a-R131、hCD32b、hCD16a-V158、hCD16b-NA2和hCD64结合。

[0842] 181. 根据项179或180所述的融合蛋白,其中所述重链恒定区包含与SEQ ID NO:234或248至少95%相同的氨基酸序列。

[0843] 182. 根据项179-181中任一项所述的融合蛋白,其中所述重链恒定区包含氨基酸序列SEQ ID NO:234或248,所述氨基酸序列包括1-5、1-4、1-3、1-2或1个氨基酸取代(例如保守氨基酸取代),其中所述氨基酸取代不会显著增加与一种或多种Fc $\gamma$ R的结合。

[0844] 183. 根据项179-182中任一项所述的融合蛋白,其中所述重链恒定区包含氨基酸序列SEQ ID NO:234或248,所述氨基酸序列包括或不包括C末端赖氨酸。

[0845] 184. 根据项179-183中任一项所述的抗体,其中所述重链恒定区包含氨基酸序列SEQ ID NO:236、249、252、253、259或260,所述氨基酸序列包括或不包括C末端赖氨酸。

[0846] 185. 一种包含重链恒定区的抗体,所述重链恒定区包含序列表中列出的氨基酸序列或与其至少95%相同的序列。

[0847] 序列表33

SEQ ID NO	描述	序列
1	全长IgG1野生型	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC <u>DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT</u> PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN YKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
2	CH1 IgG1野生型	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEV
3	铰链IgG1野生型	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
4	CH2 IgG1野生型	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AK
5	CH3 IgG1野生型	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQK SLSPGK
[0848] 6	全长IgG2野生型	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV <u>ERKCC</u> <u>VECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT</u> CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
7	CH1 IgG2野生型	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV
8	铰链IgG2野生型	ERKCCVECPCPAPPVAG
9	CH2 IgG2野生型	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSV LTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISK TK
10	CH3 IgG2野生型	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQK SLSPGK
11	全长IgG3野生型	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV

		TVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTP LGDTHHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTP PCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESSGQPENNYNTTPPMLDSGDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK
12	CH1 IgG3野生型	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRV
13	铰链IgG3野生型	ELKTPLGDTTHTCPRCPE
14	CH2 IgG3野生型	PKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCD PPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKTK
15	CH3 IgG3野生型	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSGDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSL LSPGK
16	全长IgG4野生型	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGKTYTCNVNDHKPSNTKVDKRVESKYG PPCSPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGK
17	CH1 IgG4野生型	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGKTYTCNVNDHKPSNTKVDKRV
18	铰链IgG4野生型	ESKYGPSPCAPEFLGG
19	CH2 IgG4野生型	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA K
20	CH3 IgG4野生型	GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSR LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL LSLGGK
21	经修饰的IgG2铰链 (C219S)	ERKSCVECPCPAPPVAG
22	IgG2/IgG1 杂合体铰链	ERKCCVECPCPAPELLGG
23	IgG2	ERKSCVECPCPAPELLGG

[0849]

[0850]

	C219S/IgG1 杂合体铰链	
24	经修饰的CH2 IgG1 (A330S/P331S)	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAK
25	IgG1.1 铰链 (L234A/L235E/G237A)	EPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGA
26	IgG1-IgG2-IgG1 (IgG1-IgG2/IgG1(SEQ#22)-IgG1-IgG1)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVERKCCVECPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
27	IgG1-IgG2-IgG12 (IgG1-IgG2(SEQ#8)-IgG1-IgG1)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVERKCCVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
28	IgG2-IgG1 (IgG2-IgG2/IgG1(SEQ#22)-IgG1-IgG1)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
29	IgG2-IgG12 (IgG2-IgG2(SEQ#8)-IgG1-IgG1)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
30	IgG1-IgG2-IgG1.1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV

[0851]

	(IgG1-IgG2(S EQ#8)-IgG1(A 330S/P331S)-IgG1)	TVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVERKCC VECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG
31	IgG2-IgG1.1 (IgG2-IgG2(S EQ#8)-IgG1(A 330S/P331S)-IgG1)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSNFGTQTYTCNVNHNKPSNTKVDKTVERKCC VECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
32	IgG1-IgG2CS-IgG1 (IgG1-IgG2(C 219S)-IgG1-IgG1)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVERKSC VECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG
33	IgG1-IgG2CS-IgG12 (IgG1-IgG2(C 219S)-IgG1-IgG1)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVERKSC VECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG
34	IgG2CS-IgG1 (IgG2-IgG2(C 219S)-IgG1-IgG1)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSNFGTQTYTCNVNHNKPSNTKVDKTVERKSC VECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG
35	IgG2CS-IgG12 (IgG2-IgG2(C 219S)-IgG1-IgG1)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSNFGTQTYTCNVNHNKPSNTKVDKTVERKSC VECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT

[0852]

		CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG
36	IgG1-IgG2CS- IgG1.1 (IgG1-IgG2(C 219S)-IgG1(A 330S/P331S)-I gG1)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVERKSC <u>VECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT</u> CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG
37	IgG2CS-IgG1. 1 (IgG2-IgG2(C 219S)-IgG1(A 330S/P331S)-I gG1)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSC <u>VECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT</u> CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG
38	Ab 11F11 VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCATSGFTFSNYGM HWVRQAPGKGLEWVAVILYDGSNKYYPDSVKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGG SSWYPDSFDIWGQGTMTVSS
39	Ab 4C3 VH	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAM HWVRQAPGKGLEWVSGISWKSIGYADSVKGR FTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCVKGY YVILTGLDYWGQGLTVTVSS
40	Ab CD73.10 VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYG MHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYDESNKYYPDSVK GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG GSSWYPDSFDIWGQGTMTVSS
41	Ab CD73.3 VH (4C3 / V94A)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAM HWVRQAPGKGLEWVSGISWKSIGYADSVKGR FTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCVKGY YVILTGLDYWGQGLTVTVSS
42	Ab 6E11 VH	EVQLVESGGALVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAM HWVRQAPGKGLEWVSGITWNSGGIGYADSVKGR FTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDR YYSSWLLFDN WGQGLTVTVSS
43	Ab CD73.4 VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYG MHWVRQAPGKGLEWVAVILYDGSNKYYPDSVK GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG GSSWYPDSFDIWGQGTMTVSS
44	Ab 11F11全长 HC	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCATSGFTFSNYGM HWVRQAPGKGLEWVAVILYDGSNKYYPDSVKG

[0853]

		RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGG SSWYPDSFDIWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAP CSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYT CNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPCPAPPVAG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS LTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISK KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
45	Ab 4C3 全长 HC	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAM HWVRQAPGKGLEWVSGISWKSIGYADSVKGR FTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCVKGY YVILTGLDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVL DSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
46	Ab 6E11 全长 HC	EVQLVESGGALVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAM HWVRQAPGKGLEWVSGITWNSGGIGYADSVKGR FTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDR YYSSWLLFDNWGQILTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVS LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVL DSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
47	Ab CD73.10-IgG2 -C219S 全长 HC	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYG MHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDESNKYYPDSVK GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG GSSWYPDSFDIWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTY TCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPCPAPPVA GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISK TKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFL

[0854]

		YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPG
48	Ab CD73.10-IgG2 -C219S-IgG1.1 全长HC	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYG MHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDESNKYYPDSVK GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG GSSWYPDSFDIWGQGMVTVSSASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTY TCNVDHKPSNTKVDKTV ERKSCV ECPPCPAPPVA GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFLL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPG
49	Ab CD73.10-IgG1 .1全长HC  (IgG1.1 – IgG1.1(L234A/ L235E/G237A )-IgG1.1(A330 S/P331S)-IgG1 .1)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYG MHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDESNKYYPDSVK GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG GSSWYPDSFDIWGQGMVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE AEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHY TQKSLSLSPG
50	Ab CD73.4-IgG2- C219S全长HC	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYG MHWVRQAPGKGLEWVAVILYDGSNKYYPDSVK GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG GSSWYPDSFDIWGQGMVTVSSASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTY TCNVDHKPSNTKVDKTV ERKSCV ECPPCPAPPVA GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISK TKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFLL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPG
51	Ab CD73.3-IgG1. 1全长HC  (IgG1.1 – IgG1.1(L234A/ L235E/G237A )-IgG1.1(A330	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAM HWVRQAPGKGLEWVSGISWKSIGYADSVKGR FTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTVLYYCVKGY YVILTGLDYGWQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAE GAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED

[0855]

	S/P331S)-IgG1 .1)	PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG
52	全长重链恒定区 IgG2-IgG2-IgG2-IgG2	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKCC VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
53	全长重链恒定区 IgG1-IgG1-IgG1-IgG1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
54	全长重链恒定区 IgG1-IgG1.1(L234A/L235E/G237A)-IgG1.1 (A330S/P331S)-IgG1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
55	全长重链恒定区 IgG2-IgG2/IgG1 杂合体 -IgG1-IgG1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKCC VECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
56	全长重链恒定区 IgG2-IgG2-IgG1.1(A330/P331S)-IgG1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKCC VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN

[0856]

		KALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG
57	表2 - 铰链结 构域	VDKRV
58	表2 - 铰链结 构域	VDKTV
59	表2 - 铰链结 构域	EPKSCDKTHT
60	表2 - 铰链结 构域	ERK
61	表2 - 铰链结 构域	ELKTPLGDTTHT
62	表2 - 铰链结 构域	EPKS
63	表2 - 铰链结 构域	ESKYGPP
64	表2 - 铰链结 构域	CPPCP
65	表2 - 铰链结 构域	CCVECPCP
66	表2 - 铰链结 构域	CPRCP
67	表2 - 铰链结 构域	EPKSCDTPPPCPRCP
68	表2 - 铰链结 构域	CDTPPPCPRCP
69	表2 - 铰链结 构域	CPSCP
70	表2 - 铰链结 构域	APELLGG
71	表2 - 铰链结 构域	APPVAG
72	轻链11F11	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISSWLAW YQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGKVE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
73	轻链4C3	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTD FTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSPLTFGGGKVE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC

74	轻链6D11	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGT DFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGSSFTFGPGTKVD IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
75	抗GITR AbVH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGM HWVRQAPGKGLEWVAVIWYEGSNKYYADSVKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGG SMVRGDYYYGMDVWVGQGTTVTVSS
76	抗 GITR Ab VL	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGISSALAW YQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQFNSYPYTFGQGTKLEI K
77	抗 GITR Ab LC	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGISSALAW YQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQFNSYPYTFGQGTKLEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
78	IgG1f	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN YKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
79	IgG2.3	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTVERKSC VECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVVS VLVVHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
80	IgG2.3G1-AY	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTVERKSC VECPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0857]

[0858]

81	IgG2.3G1-KH	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKSC VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
82	IgG2.5	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKCC VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
83	IgG1.1f	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
84	IgG2.3G1.1f-K H	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKSC VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
85	IgG1- $\delta$ THT	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
86	IgG2.3- $\kappa$ THT	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV

[0859]

		TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSC VETHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT EVTCTVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
87	IgG2.3- GGG 加	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSC VEGGGCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCK KVSNGGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
88	IgG2.5G1.1f-K H	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCC VECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS HEALHNHYTQKSLSLSPGK
89	IgG2.5G1-AY	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCC VECPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
90	IgG2.5G1-KH	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCC VECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS HEALHNHYTQKSLSLSPGK
91	IgG2.5-加THT	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCC VETHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT

[0860]

		EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPMLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
92	IgG1-G2.3G1-AY	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVERKSC VECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
93	IgG1-G2.3G1-KH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVERKSC VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS HEALHNHYTQKSLSLSPGK
94	G2-G1-G1-G1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTVR KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSREEMTKNQVSLT LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
95	G2.5-G1-G1-G1	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTVR KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSREEMTKNQVSLT LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0861]

<p>96</p>	<p>G1-G2.3-G2-G 2</p>	<p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGV HTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEP KSCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLT PSREEMTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>97</p>	<p>G1-KRGEGSS NLF</p>	<p>ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGV HTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLT PSREEMTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>98</p>	<p>G1-KRGEES</p>	<p>ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGV HTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLT PSREEMTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>99</p>	<p>G1-SNLF</p>	<p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGV HTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLT PSREEMTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>

[0862]

100	IgG1-ITNDRT PR	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGV HTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTVR KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVDVDS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLTLP PSREEMTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
101	G1-SNLFPR	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGV HTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVR KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVDVDS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLTLP PSREEMTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
102	G2-RKEGSG NSFL	ASTKGPSVFPLAPCSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGV HTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTVR KSCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTLP EVTVCVVDVDS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLTLP PSREEMTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
103	G2-RKEGSG	ASTKGPSVFPLAPCSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGV HTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTVR KSCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTLP EVTVCVVDVDS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLTLP PSREEMTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0863]

104	G2-NSFL	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTVR KSCVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTP EVTCVVVDVS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVY TLP PSREEMTKNQVSLT C LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPM L DSD GSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
105	IgG2-TIDNTR RP	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEP KSCVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTP EVTCVVVDVS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVY TLP PSREEMTKNQVSLT C LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPM L DSD GSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
106	G2-NSFLRP	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTVR KSCVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTP EVTCVVVDVS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVY TLP PSREEMTKNQVSLT C LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPM L DSD GSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
107	G1-G1-G2-G1- AY	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVY TLP PSREEMTKNQVSLT C LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPV L DSD GSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0864]

108	G1-G1-G2-G1-KH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGV HTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL P PSREEMTKNQVSLT C LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
109	G2-G2.3-G1-G2-KH	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGV HTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTV ER KSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT P EVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL P PSREEMTKNQVSLT C LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
110	G2.5-G2.3-G1-G2-KH	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGV HTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTV ER KSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT P EVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL P PSREEMTKNQVSLT C LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
111	G2-G2.3-G1-G2-AY	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGV HTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTV ER KSCVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL P PSREEMTKNQVSLT C LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0865]

112	G2.5-G2.3-G1-G2-AY	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGV HTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTVR KSCVECPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLTLP PSREEMTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
113	G1-G2.3-G1-G1-KH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGV HTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEP KSCVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT EVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLTLP PSREEMTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
114	G2-G1-G2-G2-AY	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGV HTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTVR KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLTLP PSREEMTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
115	G2.5-G1-G2-G2-AY	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGV HTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTVR KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLTLP PSREEMTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0866]

116	G1-G2-G1-G1-AY	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV N HKPSNTKVDKRVEP KSCVECPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL P PSREEMTKNQVSLT C LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
117	G2-G1-G2-G2-KH	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNV D HKPSNTKVDKTV ER KSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL P PSREEMTKNQVSLT C LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
118	G2.5-G1-G2-G2-KH	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNV D HKPSNTKVDKTV ER KSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL P PSREEMTKNQVSLT C LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
119	IgG1- $\delta$ 铰链	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV N HKPSNTKVDKRVEP KCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL P PSREEMTKNQVSLT C LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0867]

120	IgG2- $\delta$ 铰链	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGV HTFP AVLQSSGLYSLSSV VTPSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTV ER KCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL P PSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
121	IgG2.5- $\delta$ 铰链	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGV HTFP AVLQSSGLYSLSSV VTPSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTV ER KCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL P PSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
122	IgG1- $\delta$ G237	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGV HTFP AVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL P PSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
123	IgG2-加G237	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGV HTFP AVLQSSGLYSLSSV VTPSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTV ER KSCVECPAPPVAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL P PSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0868]

124	IgG2.4	ASTKGP SVFPLAPCSR STSESTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLS SVVTVPSSNF GTQTYTCNVD HKPSNTKVDK TVERKCSVEC PPCPAPPVAG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STFRVVSFLT VVHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPAPIEKTIS KTKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPM LDSGGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
125	IgG2.3/4	ASTKGP SVFPLAPCSR STSESTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLS SVVTVPSSNF GTQTYTCNVD HKPSNTKVDK TVERKSSVEC PPCPAPPVAG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STFRVVSFLT VVHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPAPIEKTIS KTKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPM LDSGGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
126	铰链 IgG2 C220S	ERKCSVECPPCPAPPVAG
127	IgG2/IgG1 杂 合体铰链 C220S	ERKCSVECPPCAPELLGG
128	野生型IgG2铰 链部分	ERKCCVECPCPAP
129	IgG2铰链部分 C219S	ERKSCVECPCPAP
130	IgG2铰链部分 C220S	ERKCSVECPCPAP
131	IgG2铰链部分 C219X	ERKXCVECPCPAP
132	IgG2铰链部分 C220X	ERKCXVECPCPAP
133	IgG2 CH1+IgG2 铰 链(野生型)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCC VECPCPAPPVAG
134	具有 C219X 的 IgG2	ERKXCVECPCPAPPVAG
135	具有 C220X 的 IgG2	ERKCXVECPCPAPPVAG
136	具有 C219X 的	ERKXCVECPPCAPELLGG

[0869]

	IgG2/IgG1 杂合体	
137	具有 C220X 的 IgG2/IgG1 杂合体	ERKCVVECPCPAPPELLGG
138	IgG2/IgG1 杂合体 $\delta$ G	ERKCCVECPCPAPPELLG
139	具有 C219S $\delta$ G 的 IgG2/IgG1 杂合体	ERKSCVECPCPAPPELLG
140	具有 C220S $\delta$ G 的 IgG2/IgG1 杂合体	ERKCSVECPCPAPPELLG
141	具有 C219X $\delta$ G 的 IgG2/IgG1 杂合体	ERKXCVECPCPAPPELLG
142	具有 C220X $\delta$ G 的 IgG2/IgG1 杂合体	ERKCXVECPCPAPPELLG
143	具有 C 末端 X 的野生型 IgG2	ERKCCVECPCPAPPVAGX
144	具有 C219S 和 C 末端 X 的 IgG2	ERKSCVECPCPAPPVAGX
145	具有 C220S 和 C 末端 X 的 IgG2	ERKCSVECPCPAPPVAGX
146	具有 C219X 和 C 末端 X 的 IgG2	ERKXCVECPCPAPPVAGX
147	具有 C220X 和 C 末端 X 的 IgG2	ERKCXVECPCPAPPVAGX
148	IgG2 铰链部分	PVAG
149	IgG1 铰链部分	SCDKTHT
150	IgG1 铰链部分 1	ELLG
151	IgG1 铰链部分 2	ELLGG
152	IgG2.3-V13	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSC VECPCPAPPVAGDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVVS

[0870]

		NKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPMLSDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
153	IgG2.3-V14	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKSC VECPCPAPPVAGDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDGEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN NKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPMLSDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
154	IgG2.3-V15	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKSC VECPCPAPPVAGDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSDEDGEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN NKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPMLSDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
155	IgG2.3-V16	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKSC VECPCPAPPVAGDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDGEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN NKGLPRPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPMLSDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
156	IgG2.3-V17	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKSC VECPCPAPPVAGDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSDEDGEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN NKGLPRPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPMLSDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
157	IgG2.3-V18	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKSC VECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVEHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT

[0871]

		PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
158	IgG2.3-V19	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSC VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVEHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVVSVLTIVHQQDWLNGKEYKCKVSN KGFPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
159	IgG2.3G1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSC VECPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
160	IgG2.3G1-V20	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSC VECPPCPAPPELLGGDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
161	IgG2.3G1-V21	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSC VECPPCPAPPELLGGDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDGEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
162	IgG2.3G1-V22	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSC VECPPCPAPPELLGGDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSDEDGEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0872]

163	IgG2.3G1-V23	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKSC VECPPCPAPELLGGDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVDVSHEDGEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPRPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
164	IgG2.3G1-V24	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKSC VECPPCPAPELLGGDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVDVSDEDGEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPRPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
165	IgG2.3G1-V25	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKSC VECPPCPAPELLGGDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVDVSDEDGEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPRPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
166	IgG2.3G1-V26	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKSC VECPPCPAPDLLGDDSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSDEDGEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPRPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
167	IgG2.3G1-V27	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKSC VECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
168	IgG2.3G1-V28	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV

[0873]

		TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSC VECPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KAFAPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
169	IgG2.3G1-AY- V9-D270E	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSC VECPCPAPELLGDDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEEGEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPRPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
170	IgG2.3G1-AY- V11	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSC VECPCPAPELLGDDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSDEDGEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPRPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
171	IgG2.5G1-AY- V9-D270E	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCC VECPCPAPELLGDDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEEGEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPRPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
172	IgG2.5G1-AY- V11	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCC VECPCPAPELLGDDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSDEDGEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPRPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
173	IgG1f-GASDA LIE	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELLAGPDVFLFPPKPKDTLMISR

[0874]

		TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPLPEEKTKISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
174	IgG1f-G236A	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELLAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
175	IgG2.3G1-AY- G236A	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVNHDHPSNTKVDKTVKSC VECPCPAPPELLAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
176	IgG2.3G1-AY- GASDALIE	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVNHDHPSNTKVDKTVKSC VECPCPAPPELLAGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPLPEEKTKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
177	IgG2.5G1-AY- G236A	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVNHDHPSNTKVDKTVKSC VECPCPAPPELLAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
178	IgG2.5G1-AY- GASDALIE	STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYTCNVNHDHPSNTKVDKTVKSC VECPCPAPPELLAGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS

[0875]

		NKALPLPEEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
179	IgG2.3G1.1f-A Y	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKSC VECPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
180	IgG2.3G1.3f-A Y	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKSC VECPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
181	IgG2.3G1-AY- D265A	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKSC VECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
182	IgG2.3G1-AY- N297A	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKSC VECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
183	IgG2.5G1.1f-A Y	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKCC VECPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT

[0876]

		TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
184	IgG2.5G1.3f-A Y	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKCC VECPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
185	IgG2.5G1-AY- D265A	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKCC VECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
186	IgG2.5G1-AY- N297A	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKCC VECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
187	CT	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTSPPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK KVS NKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
188	CTf	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTSPPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK KVS NKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0877]

189	IgG2.3-CT	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKSC VESPPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
190	IgG2.5-CT	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKCC VESPPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
191	IgG1fa-C226S	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTSPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
192	IgG1fa-C229S	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
193	IgG1fa-C226S, C229S	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTSPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
194	IgG1fa-P238S	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV

[0878]

		TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
195	IgG1fa-C226A	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTAPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
196	IgG1fa-C229A	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPAPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
197	IgG1fa-C226A ,C229A	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTAPPAPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
198	IgG1fa-P238K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGKSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
199	IgG2.3-R133K	ASTKGPSVFPLAPCSKSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKVERKSC VECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT

[0879]

		CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
200	IgG2.3-E137G	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGSTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKSCVECPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
201	IgG2.3-S138G	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSEGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKSCVECPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
202	IgG2.3-E137G-S138G	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKSCVECPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
203	IgG2.3-T214R	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVKSCVECPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
204	IgG2.3-R217P	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKSCVECPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN

[0880]

		KGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
205	IgG2.3-R217S	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVESKSC VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
206	IgG2.3-V224A	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKSC AECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
207	IgG2.3-E225A	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKSC VACPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
208	IgG2.3-R133A	ASTKGPSVFPLAPCSASTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKSC VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
209	IgG2.3-E137D	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSDSTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKSC VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT

[0881]

		PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
210	IgG2.3-E137Q	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSQSTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKSC VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
211	IgG2.3-S138T	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSETTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKSC VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
212	IgG2.3-S138E	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSEETAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKSC VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
213	IgG2.3-E137A -S138I	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSAITAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKSC VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
214	IgG2.3-E137I- S138A	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSIATAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKSC VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0882]

215	IgG2.3-R217G	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVEGKSC VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
216	IgG2.3-R217A	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVEAKSC VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
217	IgG2.3-R217I	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVEIKSC VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
218	IgG2.3-R217E	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVEEKSC VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
219	IgG2.3-R217K	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVEKKSC VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
220	IgG2.3-V224I	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV

[0883]

		<p>TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSC                  IECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT                  CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR                  EEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN                  KGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK                  NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT                  PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV                  MHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
221	IgG2.3-E225D	<p>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE                  PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV                  TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSC                  VDCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT                  CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR                  EEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN                  KGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK                  NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT                  PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV                  MHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
222	IgG2-G4.1-G4-G4	<p>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE                  PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV                  TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKY                  GPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE                  VTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK                  PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV                  SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM                  TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK                  TTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS                  VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
223	IgG4-G2.3-G2-G2	<p>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE                  PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV                  TVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVEKSC                  VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT                  CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR                  EEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN                  KGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK                  NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT                  PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV                  MHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
224	IgG2-G4.1-G2-G2	<p>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE                  PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV                  TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKY                  GPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE                  VTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK                  PREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKV                  SNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEM                  TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK                  TTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS                  VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
225	IgG4-G2.3-G4-G4	<p>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE                  PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV                  TVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVEKSC                  VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT</p>

[0884]

		CVVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK
226	IgG2-G2.3-G4-G4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKSCVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK
227	IgG4-G4.1-G2-G2	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
228	IgG4-G4.1-G1-G1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
229	IgG4.1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK
230	IgG4.1-R214T	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

[0885]

		NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLGK
231	IgG4.1-S217R	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVERKYG PPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVVS NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLGK
232	IgG4.1-S217P	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVEPKYG PPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVVS NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLGK
233	IgG1fa	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN YKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
234	IgG1.3fa	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
235	IgG1fa-P238K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGKSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN

[0886]

		NYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
236	IgG1.3fa-P238 K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPEA <b>EGAK</b> SVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
237	IgG1fa-L235E- P238K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPEL <b>EGGK</b> SVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
238	IgG1fa-L235A -P238K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPEL <b>AGGK</b> SVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
239	IgG1fa-L235E- P238K-K322A	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPEL <b>EGGK</b> SVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
240	IgG2.3	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSC VECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVT CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0887]

241	IgG2.3-P238K	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNV <del>D</del> HKPSNTKVDKTVERKSC VECPCPAPPVAGK <b>K</b> SVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVVS NKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
242	IgG2.3G1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNV <del>D</del> HKPSNTKVDKTVERKSC VECPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
243	IgG2.3G1-P238K	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNV <del>D</del> HKPSNTKVDKTVERKSC VECPCPAPELLGG <b>K</b> SVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
244	IgG2.3G1-L235E-P238K	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNV <del>D</del> HKPSNTKVDKTVERKSC VECPCPAPEL <b>E</b> GGK <b>K</b> SVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
245	IgG2.5G1-P238K	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNV <del>D</del> HKPSNTKVDKTVERKCC VECPCPAPELLGG <b>K</b> SVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
246	hIgG1f	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV

[0888]

		TVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
247	hIgG1f-P238K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGKSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
248	hIgG1.3f	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
249	hIgG1.3f-P238K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAEGAKSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
250	hIgG1f-L235E-P238K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELEGGKSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
251	hIgG1f-L235E-P238K-K322A	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELEGGKSVFLFPPKPKDTLMISR

[0889]

		TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
252	IgG2.3G1.3f	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKSC VECPPCPAPEA <b>AE</b> GAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
253	IgG2.3G1.3f-P 238K	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKSC VECPPCPAPEA <b>AE</b> G <b>A</b> KSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
244	IgG2.3G1-L23 5E-P238K	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKSC VECPPCPAPEL <b>EGG</b> KSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
254	IgG2.3G1-L23 5E-P238K-K3 22A	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKSC VECPPCPAPEL <b>EGG</b> KSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
255	IgG2.5	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCC VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN

[0890]

		KGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPMLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
256	IgG2.5-P238K	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKCC VECPPCPAPPVAGKSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVVS NKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPMLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
257	IgG2.5G1	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKCC VECPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
258	IgG2.5G1-P238K	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKCC VECPPCPAPPELLGGKSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
259	IgG2.5G1.3f	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKCC VECPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
260	IgG2.5G1.3f-P238K	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKCC VECPPCPAPEAEGAKSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK

[0891]

		TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
261	IgG2.5G1-L23 5E-P238K	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKCC VECPPCPAPELEGGKSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
262	IgG2.5G1-L23 5E-P238K-K3 22A	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKCC VECPPCPAPELEGGKSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
263	3h56-269-IgG4 .1 OR BMS-986090	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRDYEM</u> <u>WVVRQAPGKGLERVSA</u> <u>INPQGTRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN</u> <u>SLRAEDTAVYYCAKLP</u> <u>FRFSDRGQGLTVTVSSASTESKYGPCCPPCPAPEF</u> LGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSLGGK
264	3h56-269-CT	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRDYEM</u> <u>WVVRQAPGKGLERVSA</u> <u>INPQGTRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN</u> <u>SLRAEDTAVYYCAKLP</u> <u>FRFSDRGQGLTVTVSSASTE</u> PKSSDKTHTSPSPAP ELGGSSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPP VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
265	3h56-269-IgG1 .1f	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRDYEM</u> <u>WVVRQAPGKGLERVSA</u> INPQGTRTYYADSVKGR

[0892]

		<u>FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLPF</u> <u>RFSDRGQGTLVTVSSASTEPKSCDKTHTCPPCPAP</u> EAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
266	3h56-269-IgG1 .3f	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRDYEM</u> <u>WVVRQAPGKGLERVSAINPQGTRTYADSVKGR</u> <u>FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLPF</u> <u>RFSDRGQGTLVTVSSASTEPKSCDKTHTCPPCPAP</u> EAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
267	3h56-269-IgG1 -D265A	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRDYEM</u> <u>WVVRQAPGKGLERVSAINPQGTRTYADSVKGR</u> <u>FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLPF</u> <u>RFSDRGQGTLVTVSSASTEPKSCDKTHTCPPCPAP</u> ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
268	1F4重链可变 区和CH1	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYAMS</u> <u>WVRQAPGKGLEWVSAISDSGGRTYFADSVRGRF</u> <u>TISRDNSKNTLSLQMNSLRAEDTAVYYCAKVDYS</u> <u>NYLFFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK</u> STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRV
269	1F4轻链可变 区和CL	<u>EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSISSSYLAW</u> <u>YQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTD</u> <u>FTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPYTFGQGTKLE</u> <u>IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP</u> REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
270	1F4-IgG1f重 链	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYAMS</u> <u>WVRQAPGKGLEWVSAISDSGGRTYFADSVRGRF</u> <u>TISRDNSKNTLSLQMNSLRAEDTAVYYCAKVDYS</u> <u>NYLFFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK</u> STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRV <u>EPKSCDKTHTCPPCPAP</u> <u>ELLG</u>

[0893]

		GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
271	1F4-IgG4.1重 链	<u>EVQLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYAMS</u> <u>WVRQAPGKGLEWVSAISDSGGRTYFADSVRGRF</u> <u>TISRDNSKNTLSLQMNSLRAEDTAVYYCAKVDYS</u> <u>NYLFFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR</u> <u>STSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV</u> <u>HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTQTYTCNV</u> <u>DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPS</u> VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQ FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSR LTVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL LSLG
272	1F4-IgG1.1f重 链	<u>EVQLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYAMS</u> <u>WVRQAPGKGLEWVSAISDSGGRTYFADSVRGRF</u> <u>TISRDNSKNTLSLQMNSLRAEDTAVYYCAKVDYS</u> <u>NYLFFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK</u> <u>STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV</u> <u>HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV</u> <u>NHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEG</u> APSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG
273	1F4-IgG1.3f重 链	<u>EVQLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYAMS</u> <u>WVRQAPGKGLEWVSAISDSGGRTYFADSVRGRF</u> <u>TISRDNSKNTLSLQMNSLRAEDTAVYYCAKVDYS</u> <u>NYLFFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK</u> <u>STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV</u> <u>HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV</u> <u>NHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEG</u> APSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG
274	1F4-D265A重 链	<u>EVQLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYAMS</u> <u>WVRQAGKGLEWVSAISDSGGRTYFADSVRGRFTI</u> <u>SRDNSKNTLSLQMNSLRAEDTAVYYCAKVDYSN</u>

		<p><u>YLFFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST</u>  <u>SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVH</u>  <u>TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN</u>  <u>HKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG</u>  <u>PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVVAVSHEDPE</u>  <u>VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVVS</u>  <u>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK</u>  <u>AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF</u>  <u>YPSDIVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYS</u>  <u>KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL</u>  <u>SLSPGK</u></p>
<p>[0894]</p>	<p>275</p> <p>1F4-CT重链</p>	<p><u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYAMS</u>  <u>WVRQAPGKGLEWVSAISDSGGRTYFADSVRGRF</u>  <u>TISRDNSKNTLSLQMNSLRAEDTAVYYCAKVDYS</u>  <u>NYLFFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK</u>  <u>STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQV</u>  <u>HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV</u>  <u>NHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTSPSPPELLG</u>  <u>GSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVVDVSHEDP</u>  <u>EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVVS</u>  <u>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK</u>  <u>AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF</u>  <u>YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFL</u>  <u>YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ</u>  <u>KSLSLSPGK</u></p>

[0895] 本领域的技术人员仅使用常规实验就将认识到或能够确定本文描述的具体实施方案的许多等同方案。此类等同物旨在被以下权利要求涵盖。

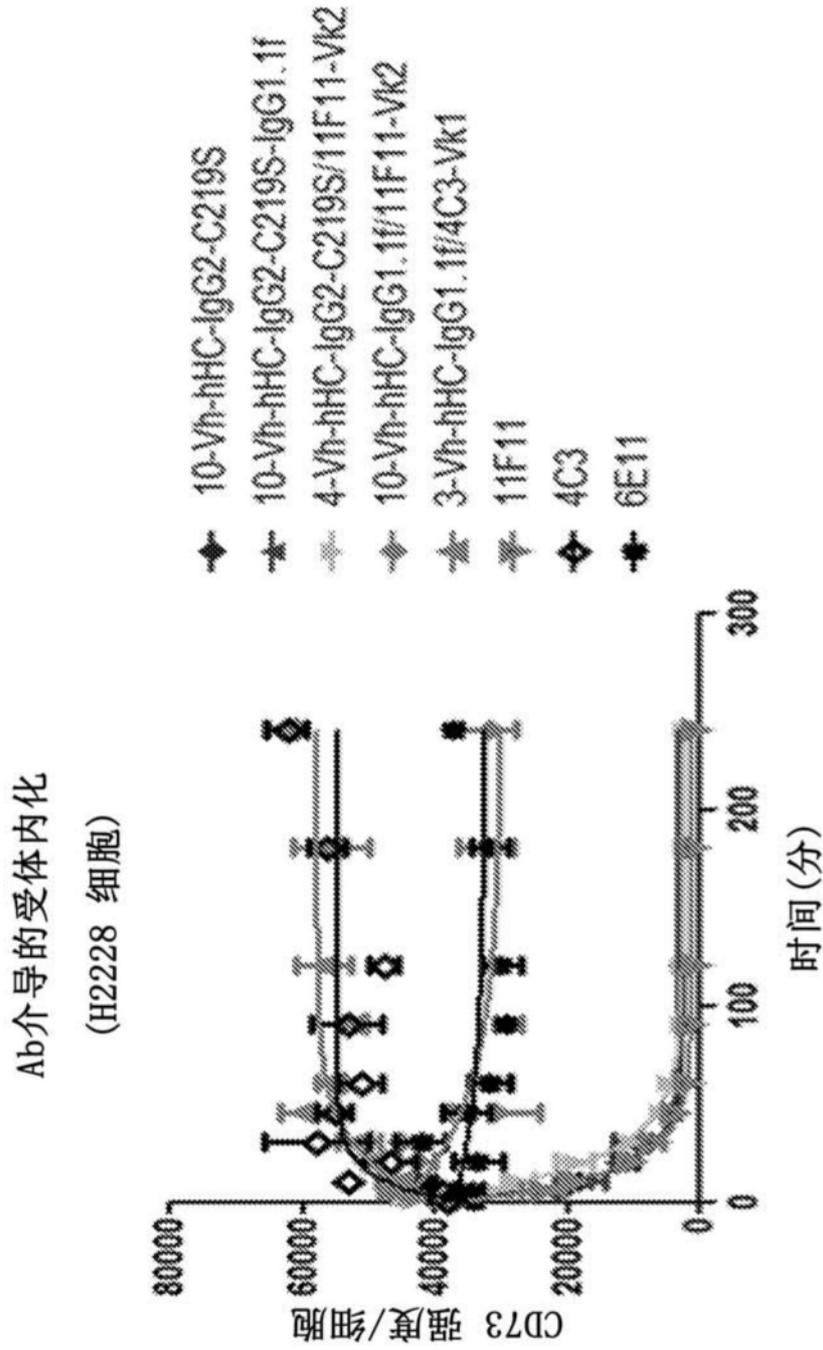


图1A

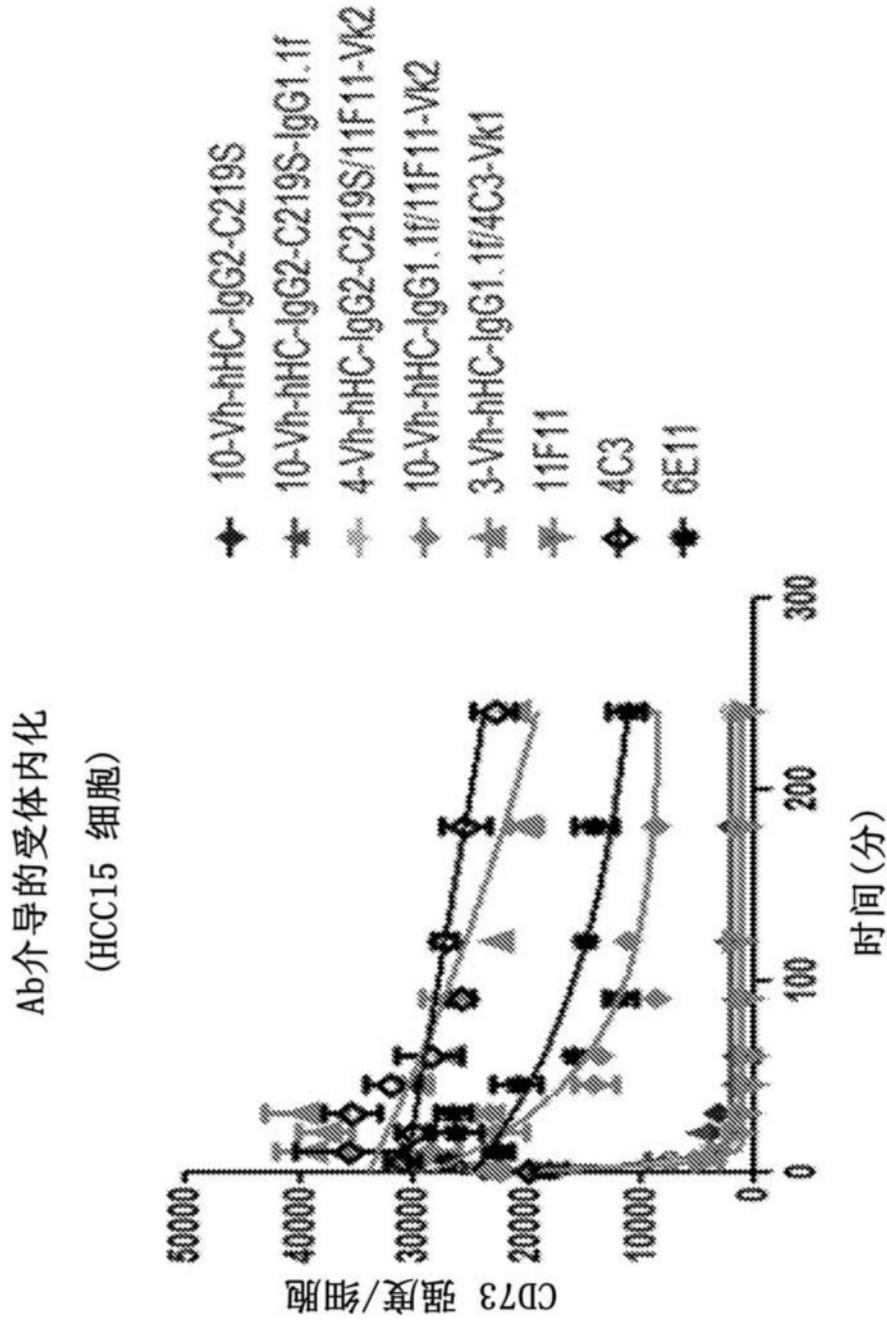


图1B

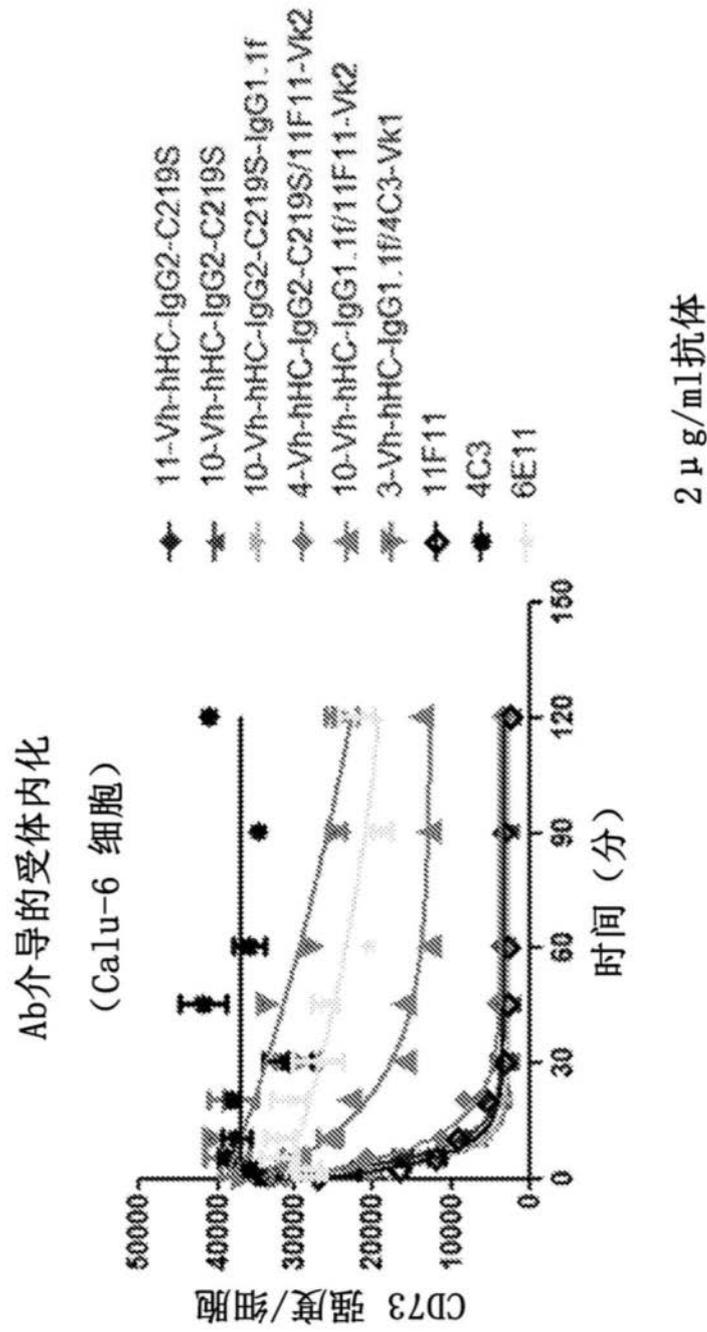


图1C

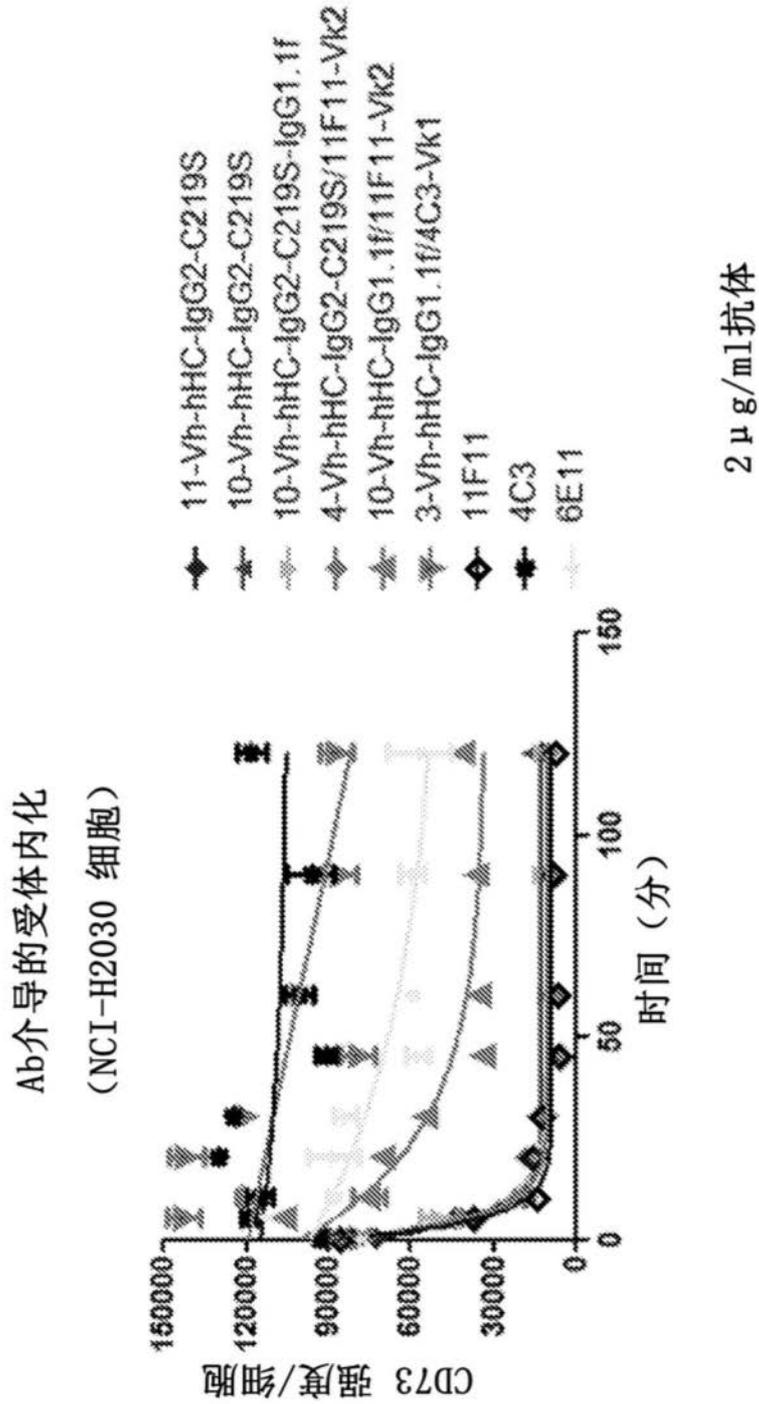


图1D

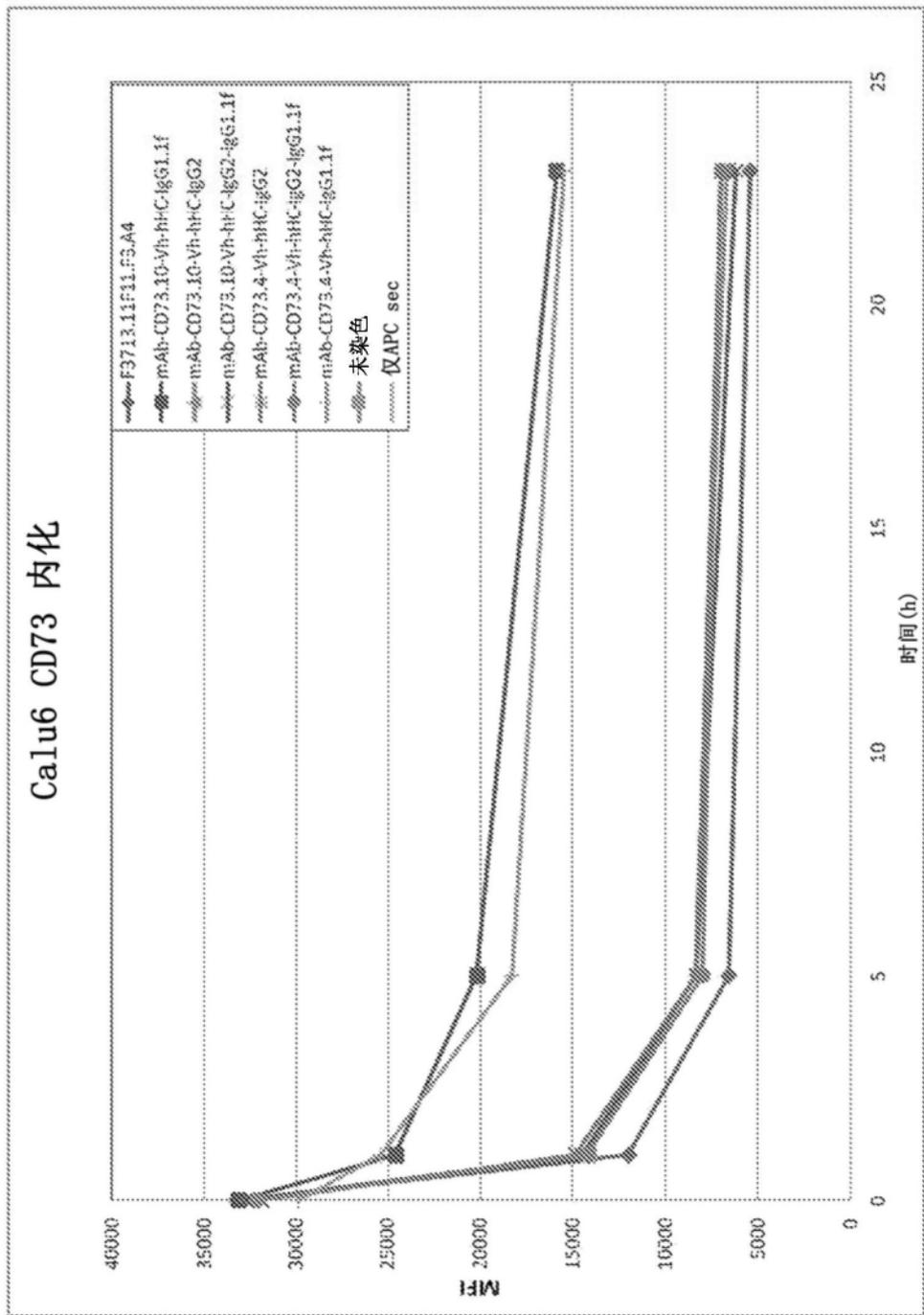


图1E

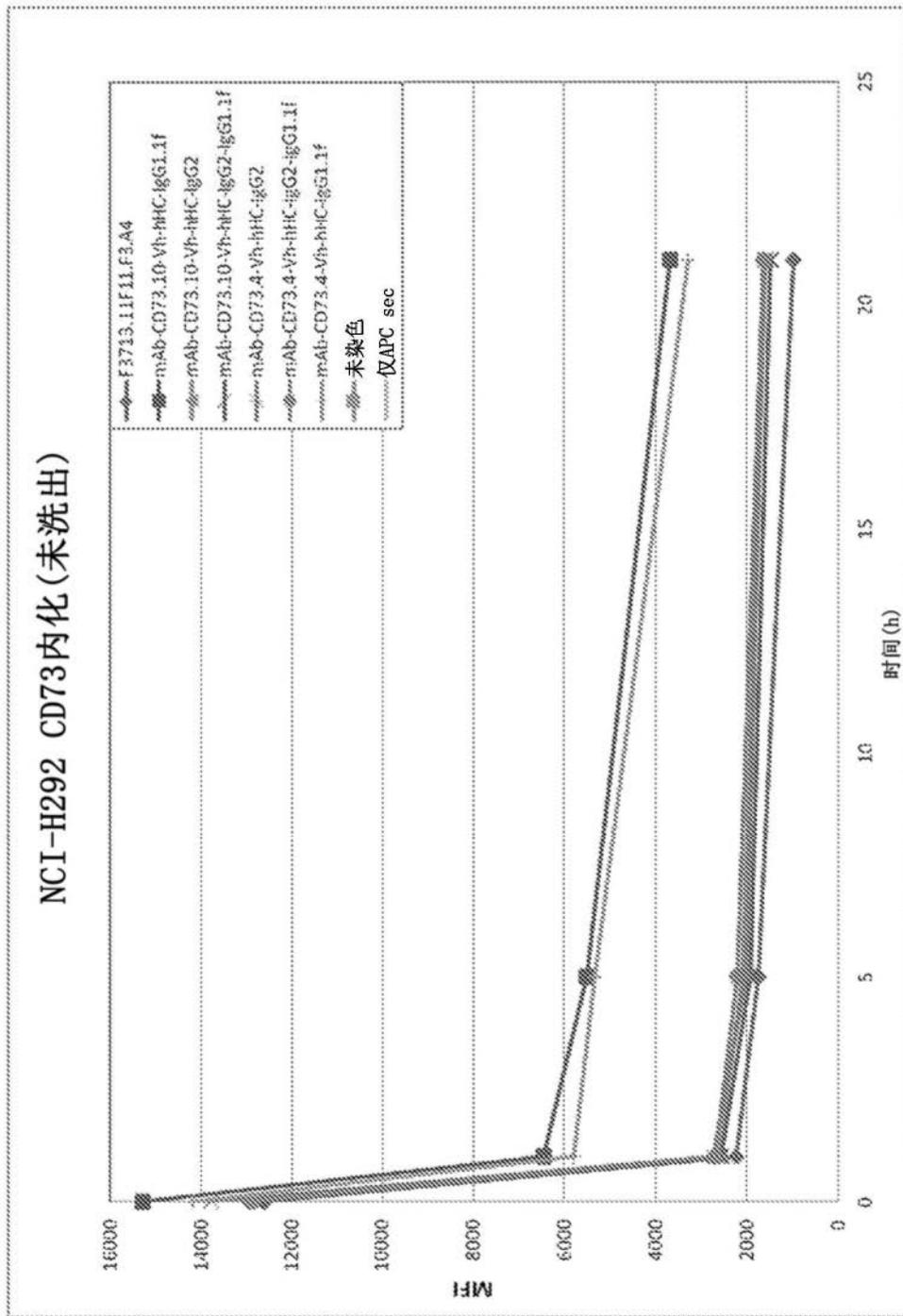


图1F

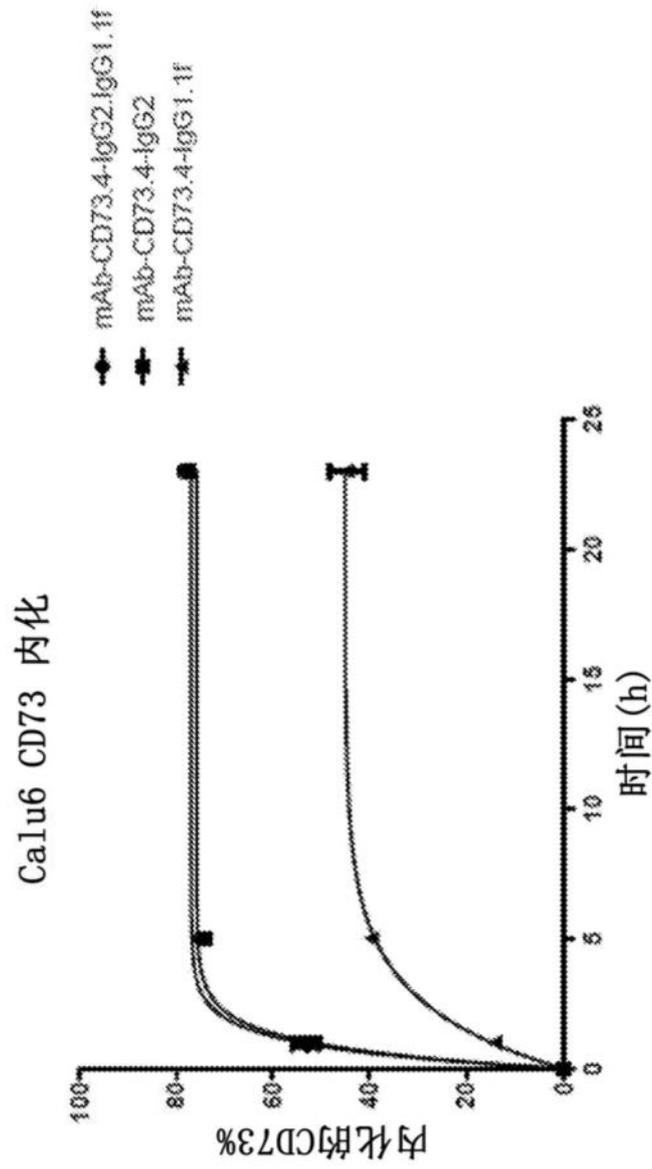


图1G

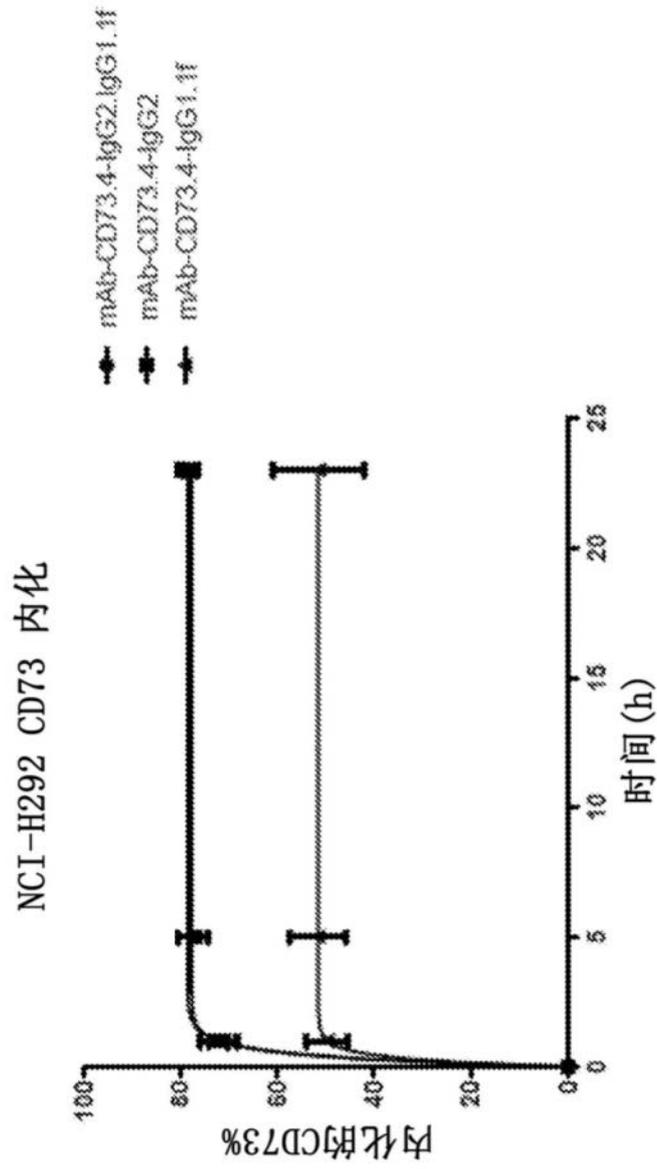


图1H

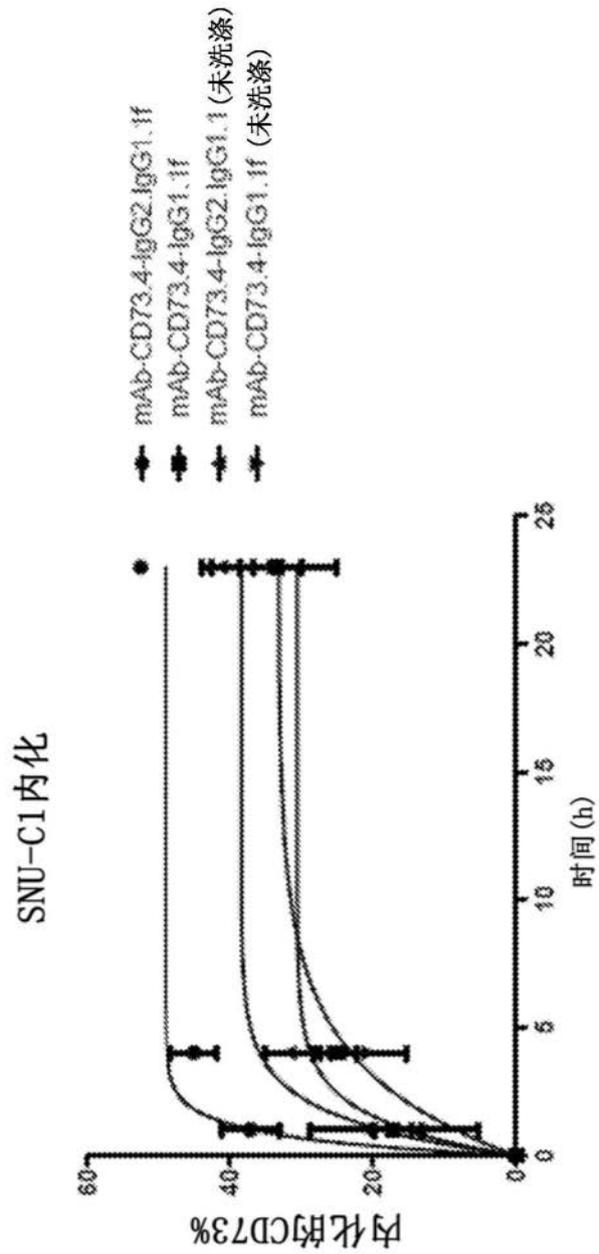


图11

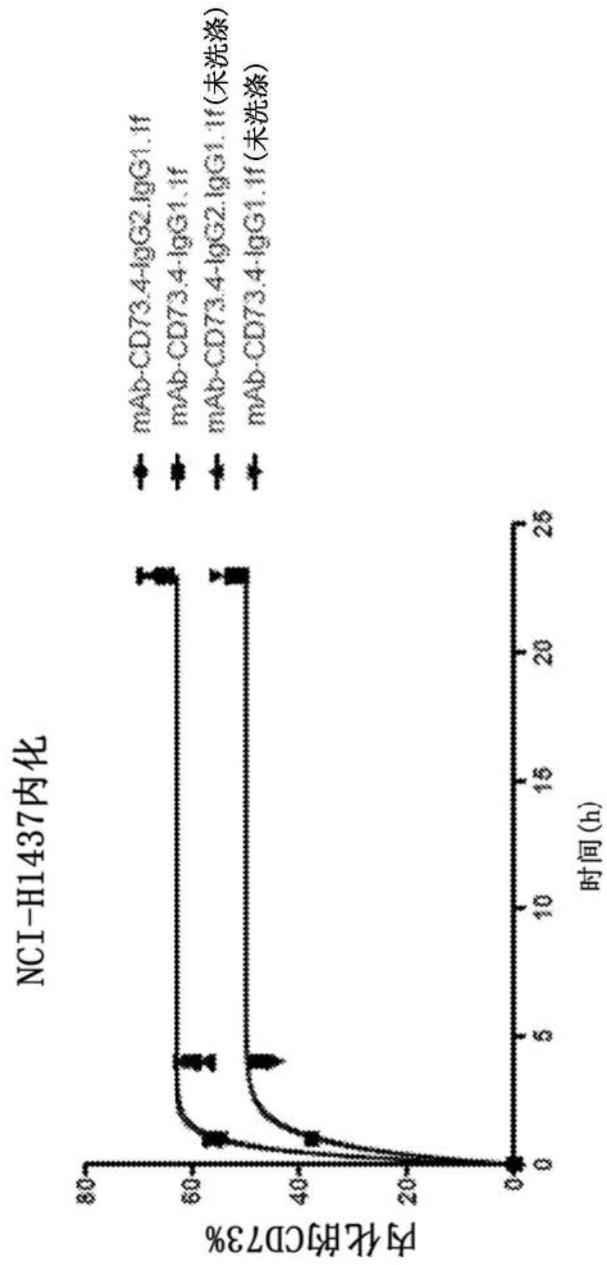


图1J

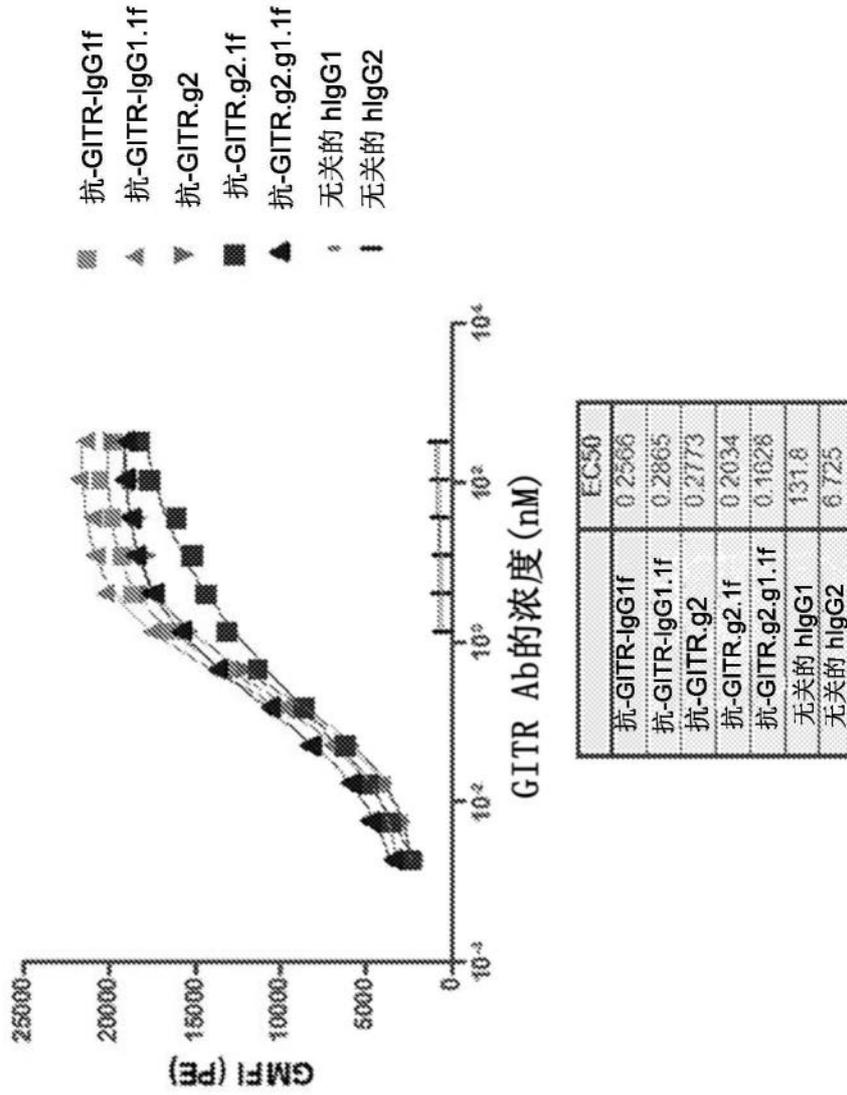


图2

GITR Ab与用表达OKT3的CHO细胞刺激的CD4 T细胞

(供体2号) 的IFN-g分泌之间的关系

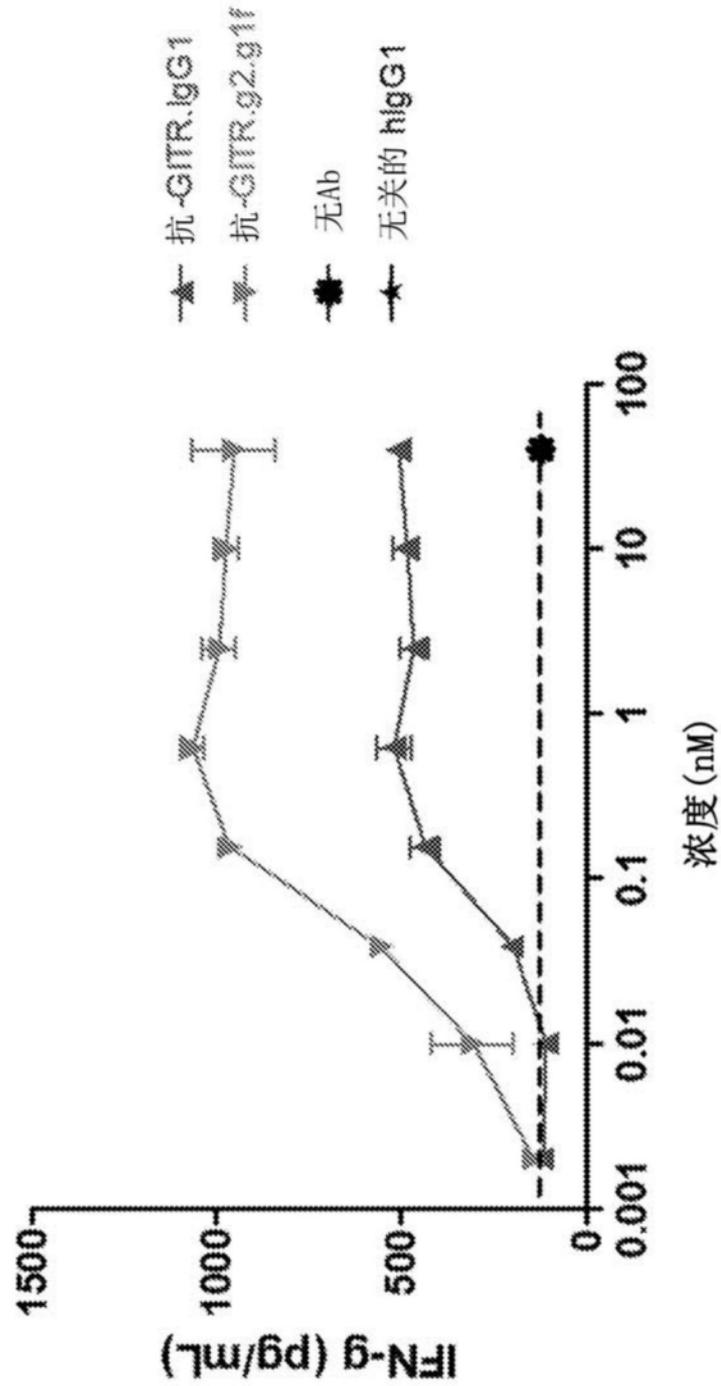


图3A

GITR Ab与用表达OKT3的CHO细胞刺激的CD4 T细胞-供体3号的IL-2

分泌之间的关系

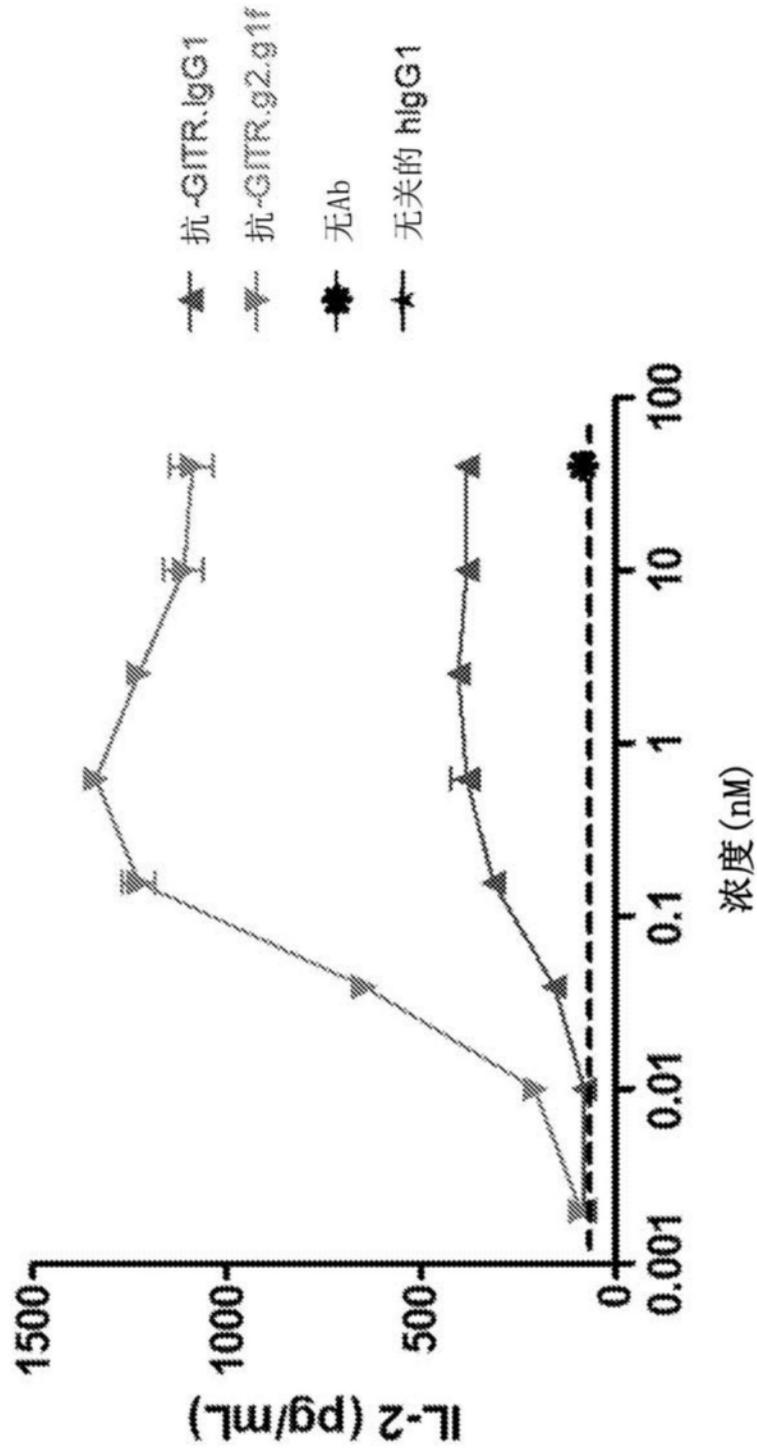


图3B

GITR Ab与用表达OKT3的CHO细胞刺激的CD4 T细胞-供体3号的IL-2

分泌之间的关系

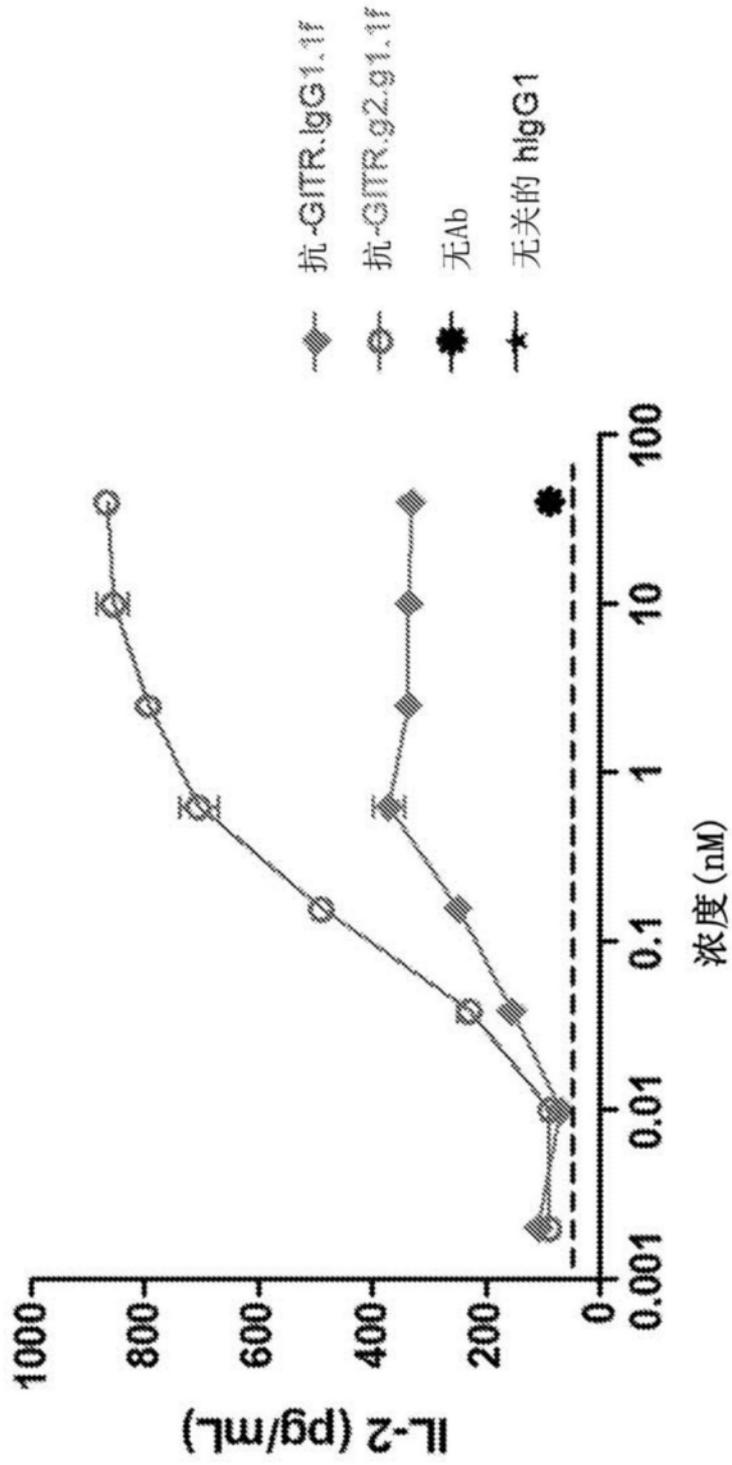


图3C

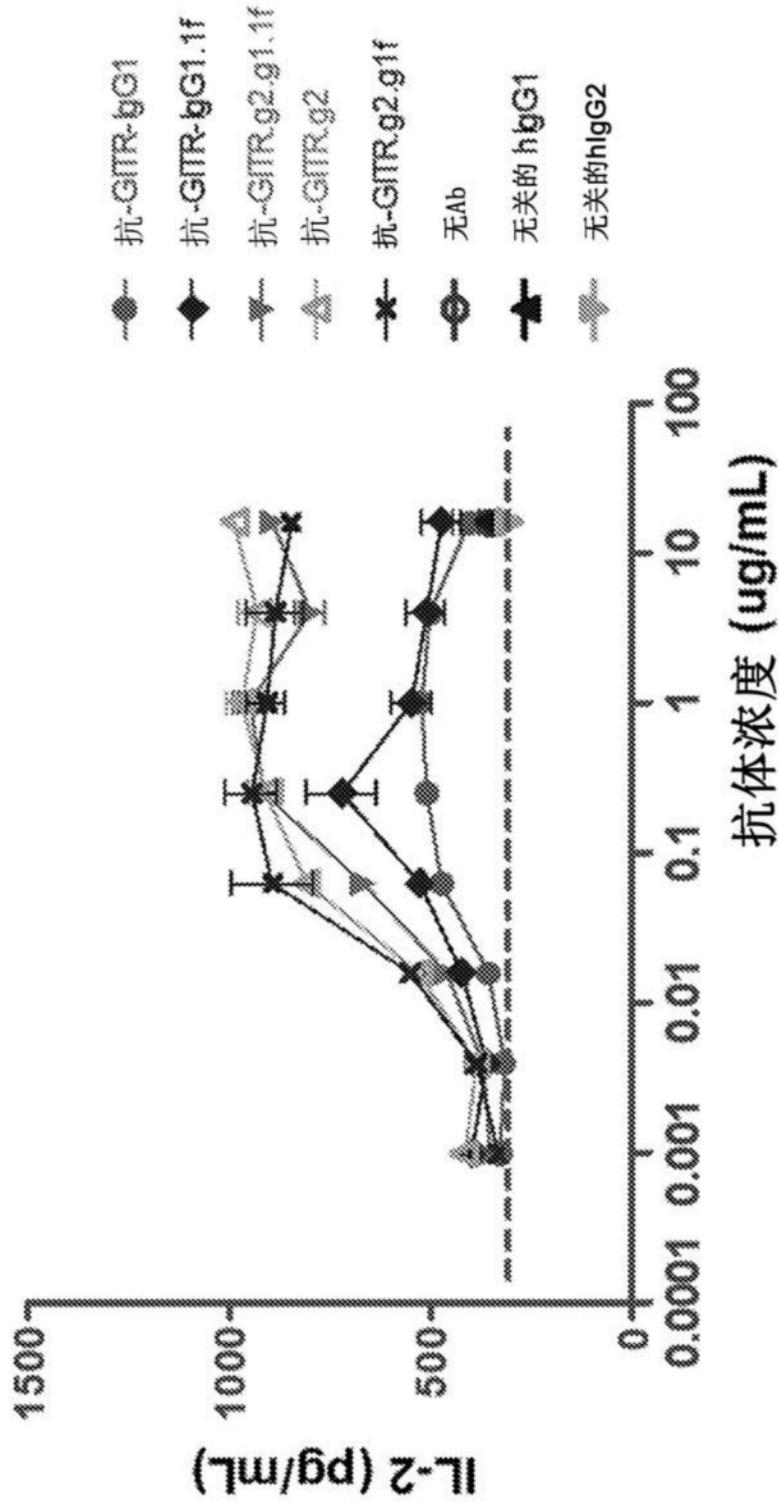


图4

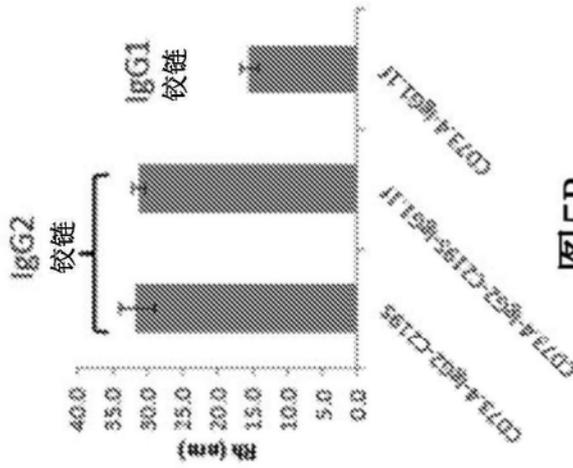


图5B

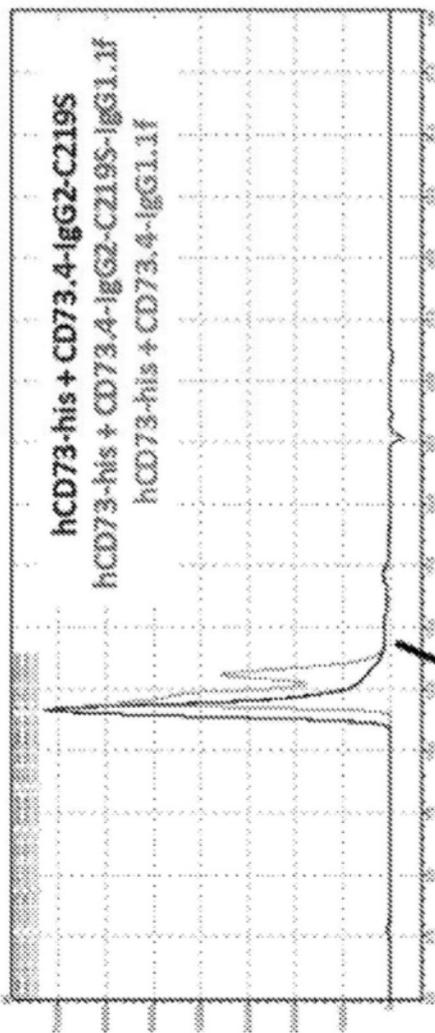


图5A

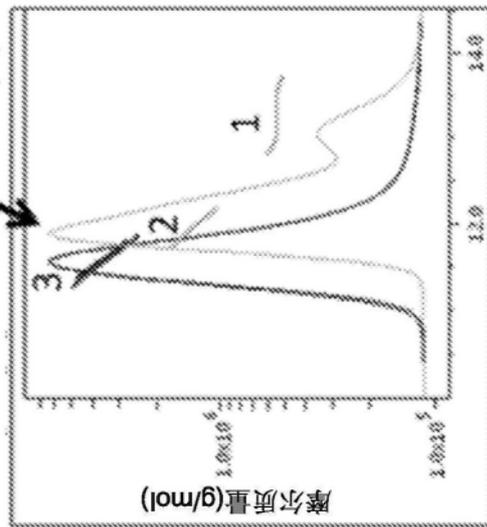


图5C

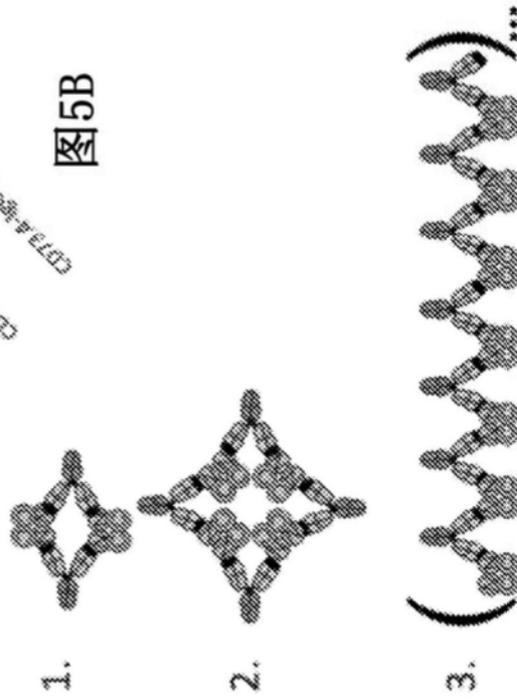


图5D

CD73/mAb复合物的SEC-MALS数据

载体	mAb	摩尔比	[蛋白] (uM)	[mAb] (uM)	UV检测时间 (min)				以统计的SEC UV积分				MW (kDa)			
					峰1	峰2	峰3	峰4	峰1	峰2	峰3	峰4	峰1	峰2	峰3	峰4
mAb	CD73-10- <i>gG1.1F</i>	0.1	-2.0	4	-2.0	-14.0	-17.3		0.3	0.3	99.4		73	150	140	
	CD73-10- <i>gG2-C219S</i>	0.1	-2.0	4	-2.0	-17.5		0.1	99.5			130				
	CD73-3- <i>gG1.1F</i>	0.1	-16.3	4	-16.3			320.0								
	11F11- <i>gG6</i>	0.1	-2.0	5	-2.0	-17.7	-20.2		0.8	0.6	98.7		0.2	1.9	4.7	
mAbCD73-his	CD73-10- <i>gG1.1F</i>	1.0	-17.1	8	-17.1	-18.4		2.8	97.2			280	120			
	CD73-10- <i>gG2-C219S</i>	1.0	-19.3	8	-19.3			300.0				38				
	CD73-3- <i>gG1.1F</i>	1.1	-11.7	4	-11.7	-16.9		34.2	57.2	3.0		1100	540	180		
	CD73-10- <i>gG2-C219S</i>	1.1	-10.3	4	-10.3	-11.1		6.4	93.3			11000	3400			
mAbCD73-his	CD73-3- <i>gG1.1F</i>	1.1	-11.0	4	-11.0	-14.8		17.5	78.3	4.0		960	530	250		
	11F11- <i>gG6</i>	1.2	-11.6	8	-11.6	-16.8		0.9	90.7	0.8		7.7	300	910	85	
	CD73-10- <i>gG1.1F</i>	2.1	-14.5	4	-14.5	-17.1		86.5	13.5			0.0	140			
	CD73-10- <i>gG2-C219S</i>	2.1	-14.7	4	-14.7	-17.3		87.3	12.9			2.0	150			
mAbCD73-his	CD73-3- <i>gG1.1F</i>	2.1	-14.3	8	-14.3	-19.3		6.4	68.7	24.9		170	160	4.2		
	11F11- <i>gG6</i>	1.1	-17.4	8	-17.4	-20.0		95.9	4.7			54	44			
	CD73-4- <i>gG1.1F</i>	1.0	-16.9	0	-16.9			100.0				120				
	CD73-4- <i>gG2-C219S</i>	1.0	-11.8	2.5	-11.8	-13.4		42.0	21.6	36.4		1200	520	120		
mAbCD73	CD73-4- <i>gG1.1F</i>	1.0	-11.7	2.5	-11.7	-13.4		11.9	15.8	13.4		1900	540	130		
	CD73-4- <i>gG2-C219S</i>	1.1	-11.5	2.5	-11.5	-13.4		95.3	1.9	2.8		3300	1000	530		
	CD73-4- <i>gG1.1F</i>	1.2	-11.7	5	-11.7	-13.4		52.5	17.7	0.6		29.3	1700	500	210	
	CD73-4- <i>gG2-C219S</i>	1.4	-11.7	10	-11.7	-13.4		24.1	16.2	1.2		58.6	1300	530	230	
mAbCD73	CD73-4- <i>gG1.1F</i>	1.0	-15.9	0	-15.9	-18.2		97.6	2.4			120	73			
	CD73-4- <i>gG2-C219S</i>	1.0	-11.3	2.5	-11.3	-13.1		11.8	49.5	38.6		830	530	120		
	CD73-4- <i>gG1.1F</i>	1.0	-11.3	2.5	-11.3	-13.1		31.1	54.8	9.3		890	540	120		
	CD73-4- <i>gG2-C219S</i>	1.1	-11.1	2.5	-11.1	-12.3		55.2	44.5	2.1		1100	560	280		
mAbCD73	CD73-4- <i>gG1.1F</i>	1.2	-11.3	5	-11.3	-13.1		22.3	44.1	2.8		30.7	910	530	210	
	CD73-4- <i>gG2-C219S</i>	1.4	-11.3	10	-11.3	-13.1		9.1	31.0	2.4		57.4	810	510	200	
	CD73-4- <i>gG1.1F</i>	1.1	-11.3	5	-11.3	-13.1		0.7	88.3	8.1		390	210	180		
	CD73-4- <i>gG2-C219S</i>	1.1	-11.4	5	-11.4	-14.7		1.7	98.3			360	210			
mAbCD73	CD73-4- <i>gG1.1F</i>	0.1	-15.9	5	-15.9	-16.9		0.4	99.6			140				
	CD73-4- <i>gG2-C219S</i>	0.1	-14.2	5	-14.2	-15.9		0.6	1.2	98.2		81	120	140		
	CD73-4- <i>gG1.1F</i>	1.1	-11.5	2.5	-11.5	-13.4		95.0	2.1	2.8		3400	970	480		
	CD73-4- <i>gG2-C219S</i>	1.1	-11.5	2.5	-11.5	-13.4		94.7	2.3	3.0		3600	1100	580		
mAbCD73	CD73-10- <i>gG2-C219S</i>	1.1	-11.7	2.5	-11.7	-13.0		60.0	35.3	2.3		2.5	1300	550	270	
	CD73-10- <i>gG1.1F</i>	1.1	-11.8	2.5	-11.8	-16.9		96.2	3.2			2800	310			
	CD73-10- <i>gG2-C219S</i>	1.1	-11.8	2.5	-11.8	-16.9		96.6	2.5	0.9		2000	320	390		
	CD73-10- <i>gG1.1F</i>	1.1	-11.3	2.5	-11.3	-16.5		85.1	82.1	2.7		1800	530	170		
mAbCD73	CD73-10- <i>gG2-C219S</i>	1.0	-17.3	0	-17.3	-18.4		97.3	2.8			120	60			
	CD73-10- <i>gG1.1F</i>	1.1	-11.5	5	-11.5	-13.4		99.9	2.6	5.5		4800	1300	740		
	CD73-4- <i>gG2-C219S</i>	1.1	-11.5	1	-11.5	-13.4		84.4	7.6	2.5		2900	660	460		
	CD73-4- <i>gG1.1F</i>	1.1	-11.5	1	-11.5	-13.4										

\* 摩尔浓度定义为N-CD73单体、11F11-Fab单体、CD73-his二聚体和(二价)mAb

图6

CD73/mAb复合物的DLS数据

靶标	mAb	摩尔比	[靶标] (uM)	[mAb] (uM)	Rh	Rh SD	%Pd	DLS		
								%Pd	%质量	%质量SD
hCD73-his	CD73.10-rgS1.1f	0:1	4	4	5.0	0.6	11.0	6.0	100.0	0.0
	CD73.10-rgS2-C2195	0:1	4	4	5.1	0.1	11.9	7.3	100.0	0.0
hCD73-his	CD73.3-rgS1.1f	0:1	4	4	5.1	0.5	11.6	6.9	100.0	0.0
	11F11-Fab	0:1	4	4	5.4	0.1	22.0	5.3	100.0	0.1
hCD73-his	CD73.10-rgS1.1f	1:0	4	4	4.3	0.3	10.6	5.1	99.5	0.2
	CD73.10-rgS1.1f	1:0	8	8	2.3	0.2	19.3	12.3	99.9	0.2
hCD73-his	CD73.10-rgS1.1f	1:1	4	4	12.8	0.7	32.4	6.7	100.0	0.0
	CD73.10-rgS2-C2195	1:1	4	4	2.9	1.5	7.5	0.8	73.9	11.5
hCD73-his	CD73.3-rgS1.1f	1:1	4	4	10.8	0.1	28.2	0.6	100.0	0.0
	11F11-Fab	1:2	4	4	6.4	0.1	15.1	4.3	100.0	0.0
hCD73-his	CD73.10-rgS1.1f	2:1	8	4	6.6	0.3	15.3	6.5	100.0	0.0
	CD73.10-rgS2-C2195	2:1	8	4	6.5	0.2	15.7	5.7	100.0	0.1
hCD73-his	CD73.3-rgS1.1f	2:1	8	4	5.8	0.3	12.8	5.3	100.0	0.0
	11F11-Fab	1:1	8	8	4.2	0.1	17.6	4.7	100.0	0.0
hCD73	CD73.4-rgS1.1f	1:0	2.5	0	4.5	0.1	12.5	4.3	99.9	0.1
	CD73.4-rgS1.1f	1:0.25	2.5	0.625	13.2	1.7	46.5	5.9	99.9	0.1
hCD73	CD73.4-rgS1.1f	1:0.5	2.5	1.25	17.5	3.0	31.7	8.8	92.6	25.8
	CD73.4-rgS1.1f	1:1	2.5	2.5	29.9	1.0	25.1	1.1	23.3	4.9
hCD73	CD73.4-rgS1.1f	1:2	2.5	5	13.4	0.1	31.3	5.3	98.7	25.5
	CD73.4-rgS1.1f	1:4	2.5	10	14.4	0.9	47.9	3.5	90.2	17.5
hCD73	CD73.4-rgS1.1f	1:0	2.5	0	4.7	0.1	18.6	3.3	99.8	0.1
	CD73.4-rgS1.1f	1:0.25	2.5	0.625	10.4	1.5	32.6	15.9	51.3	37.1
hCD73	CD73.4-rgS1.1f	1:0.5	2.5	1.25	12.9	0.6	35.5	5.4	88.3	23.2
	CD73.4-rgS1.1f	1:1	2.5	2.5	14.7	0.5	34.3	3.9	100.0	0.0
hCD73	CD73.4-rgS1.1f	1:2	2.5	5	11.6	0.4	24.9	8.5	85.0	32.5
	CD73.4-rgS1.1f	1:4	2.5	10	8.1	4.0	33.0	16.9	34.2	31.7
hCD73	CD73.4-rgS1.1f	1:1	5	2.5	6.7	0.3	13.9	7.0	100.0	0.0
	CD73.4-rgS1.1f	1:1	5	2.5	6.5	0.1	7.4	3.2	100.0	0.0
hCD73	CD73.4-rgS1.1f	0:1	0	5	5.4	0.2	15.7	5.7	98.9	0.1
	CD73.4-rgS1.1f	0:1	0	5	5.3	0.4	13.6	7.9	100.0	0.0
hCD73	CD73.4-rgS2-C2195	1:1	2.5	2.5	31.7	2.4	31.6	11.4	19.3	12.2
	CD73.4-rgS2-C2195-rgS1.1f	1:1	2.5	2.5	3.2	0.9	30.8	3.8	17.5	11.4
hCD73	CD73.4-rgS1.1f	1:1	2.5	2.5	15.6	1.2	27.7	8.0	100.0	0.0
	CD73.10-rgS2-C2195	1:1	2.5	2.5	23.9	1.2	26.7	4.4	35.3	5.3
hCD73	CD73.10-rgS1.1f	1:1	2.5	2.5	25.6	2.3	30.1	8.5	35.9	9.1
	CD73.10-rgS1.1f	1:1	2.5	2.5	13.5	1.2	31.6	12.0	33.2	31.5
hCD73	CD73.10-rgS1.1f	1:0	2.5	0	4.2	0.8	24.4	12.5	99.1	0.7
	CD73.4-rgS2-C2195-rgS1.1f	1:1	5	5	35.3	3.8	35.2	13.9	6.7	4.4
hCD73	CD73.4-rgS2-C2195-rgS1.1f	1:1	1	1	24.5	3.2	32.9	2.9	60.7	27.5

\* 摩尔浓度定义为N-hCD73单体、11F11-Fab单体、hCD73-his二聚体和(二价) mAb

图7

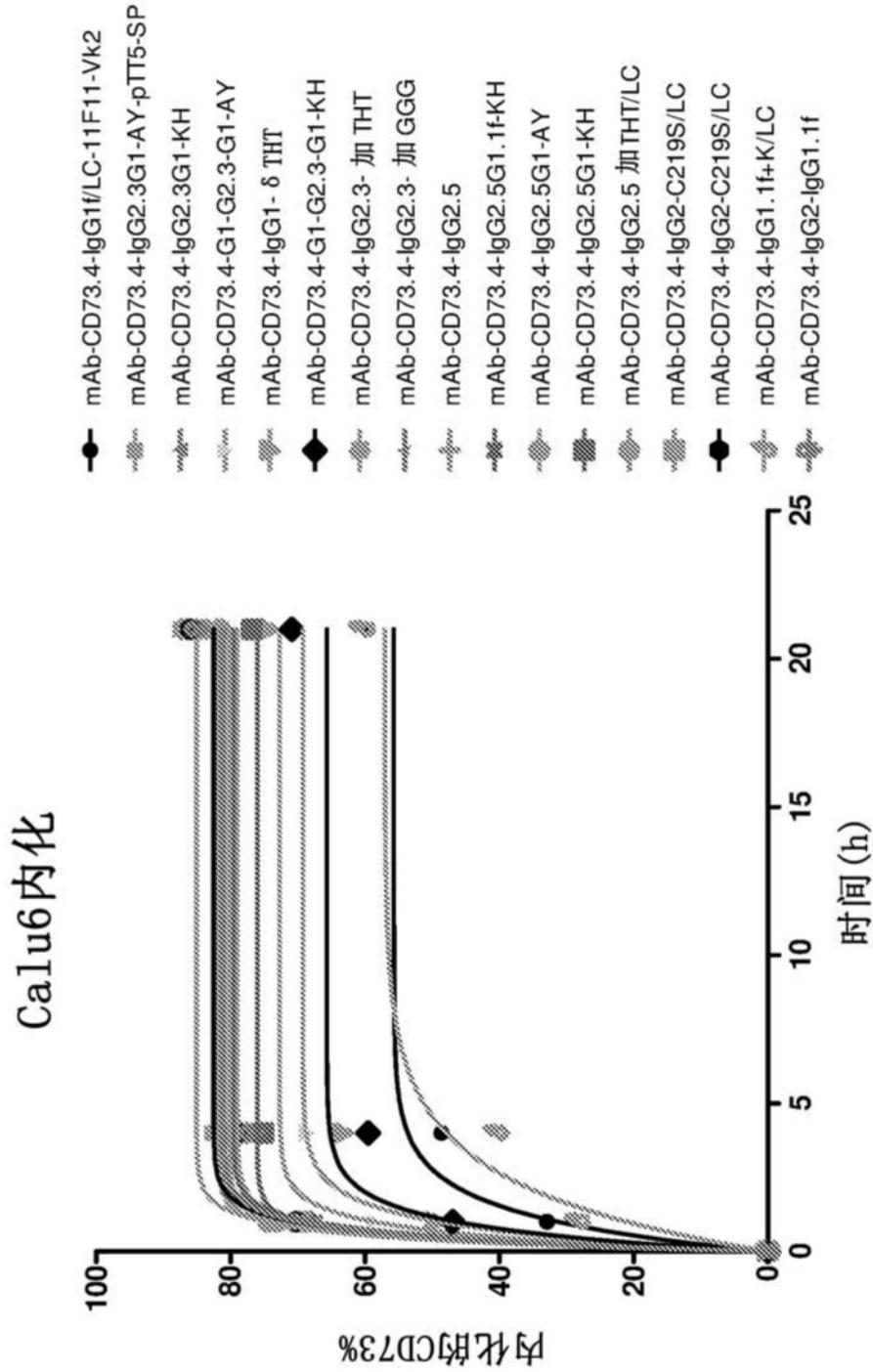


图8A

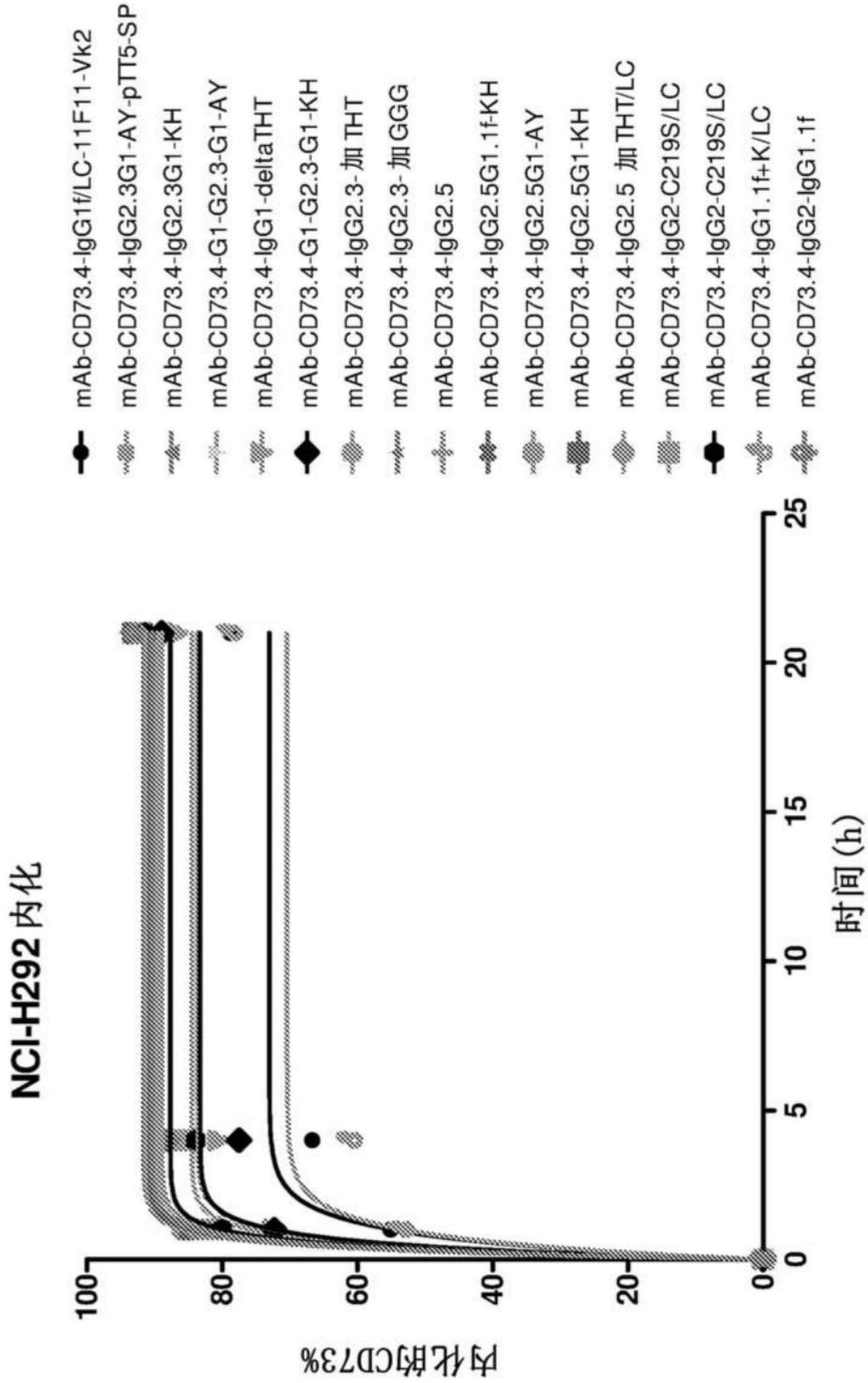


图8B



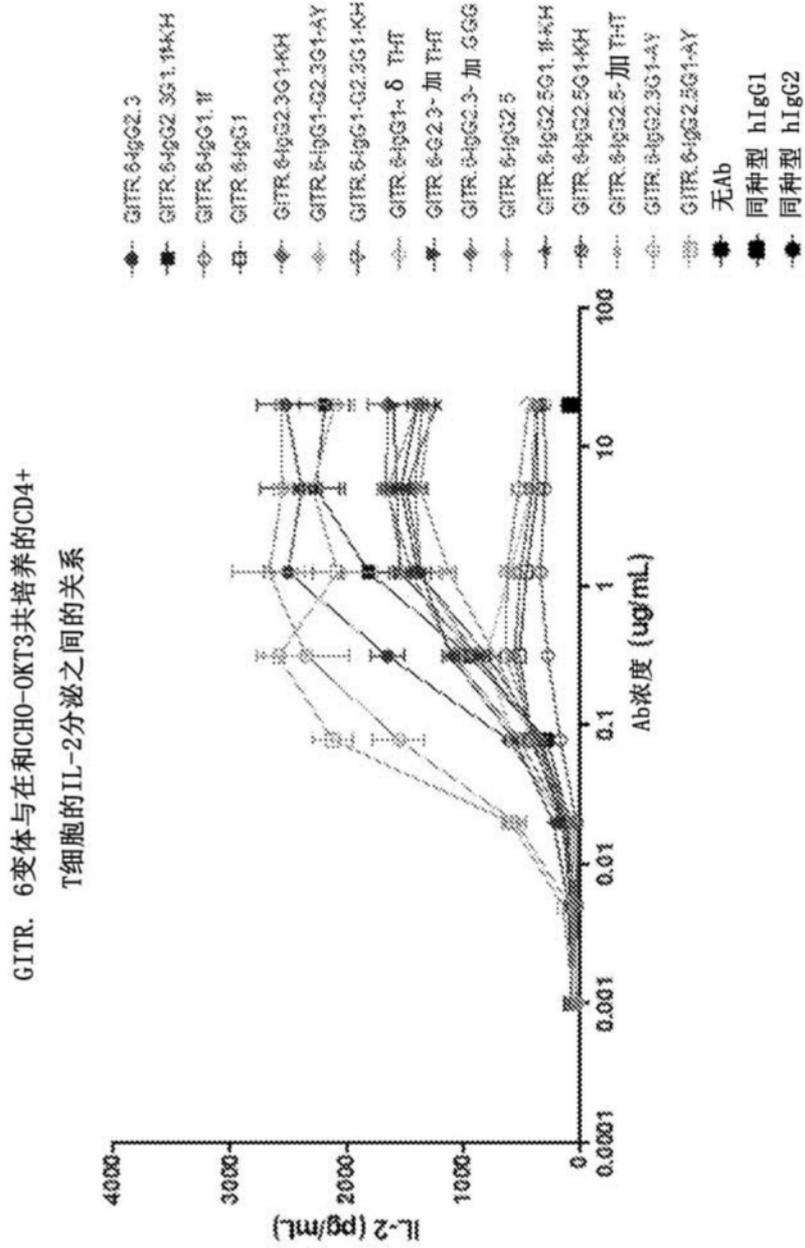


图9



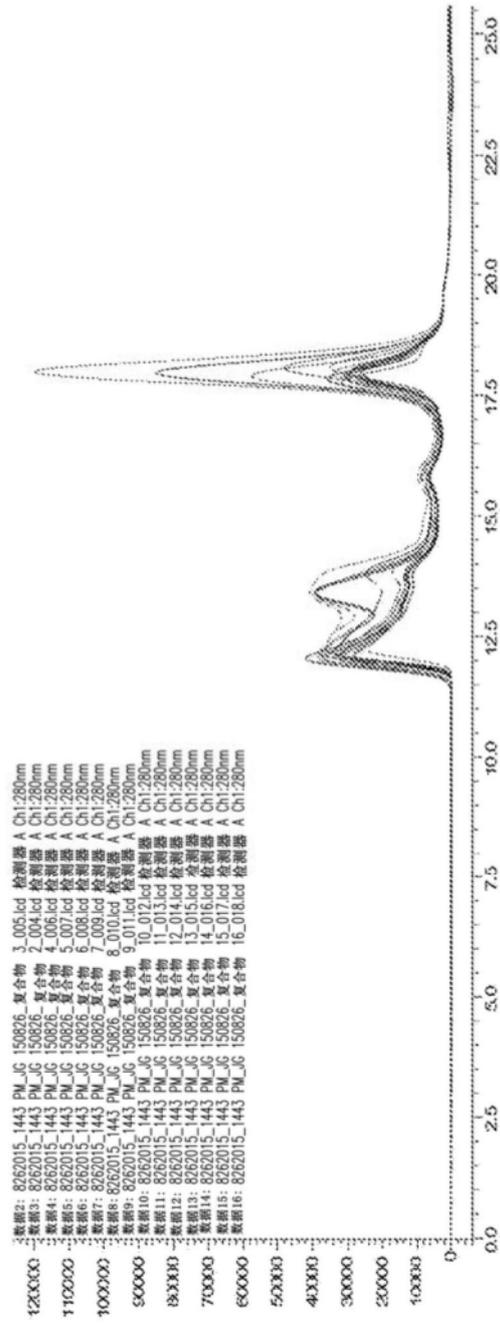


图11A

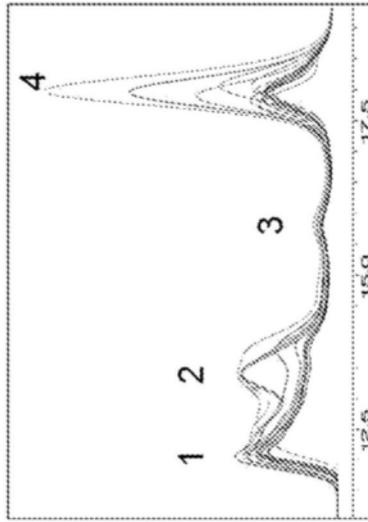


图11B

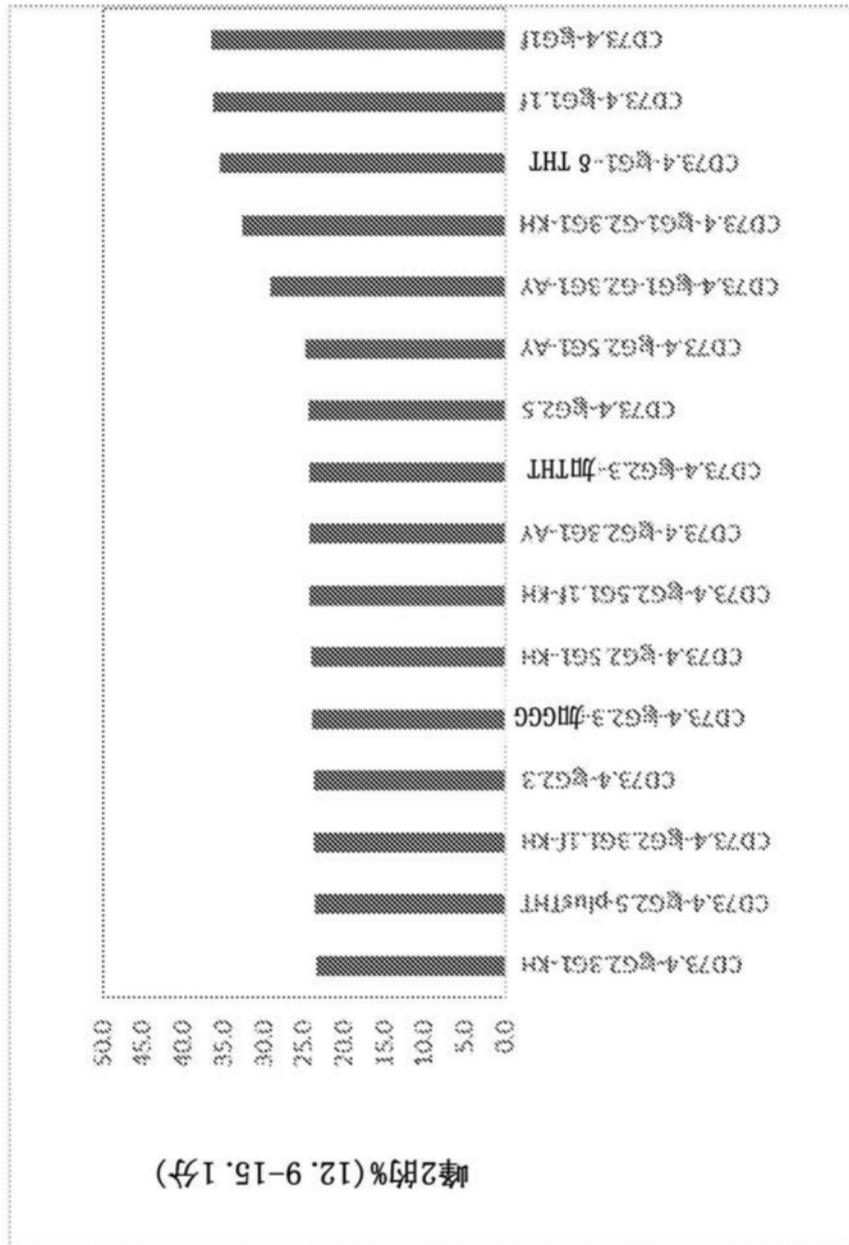


图11C

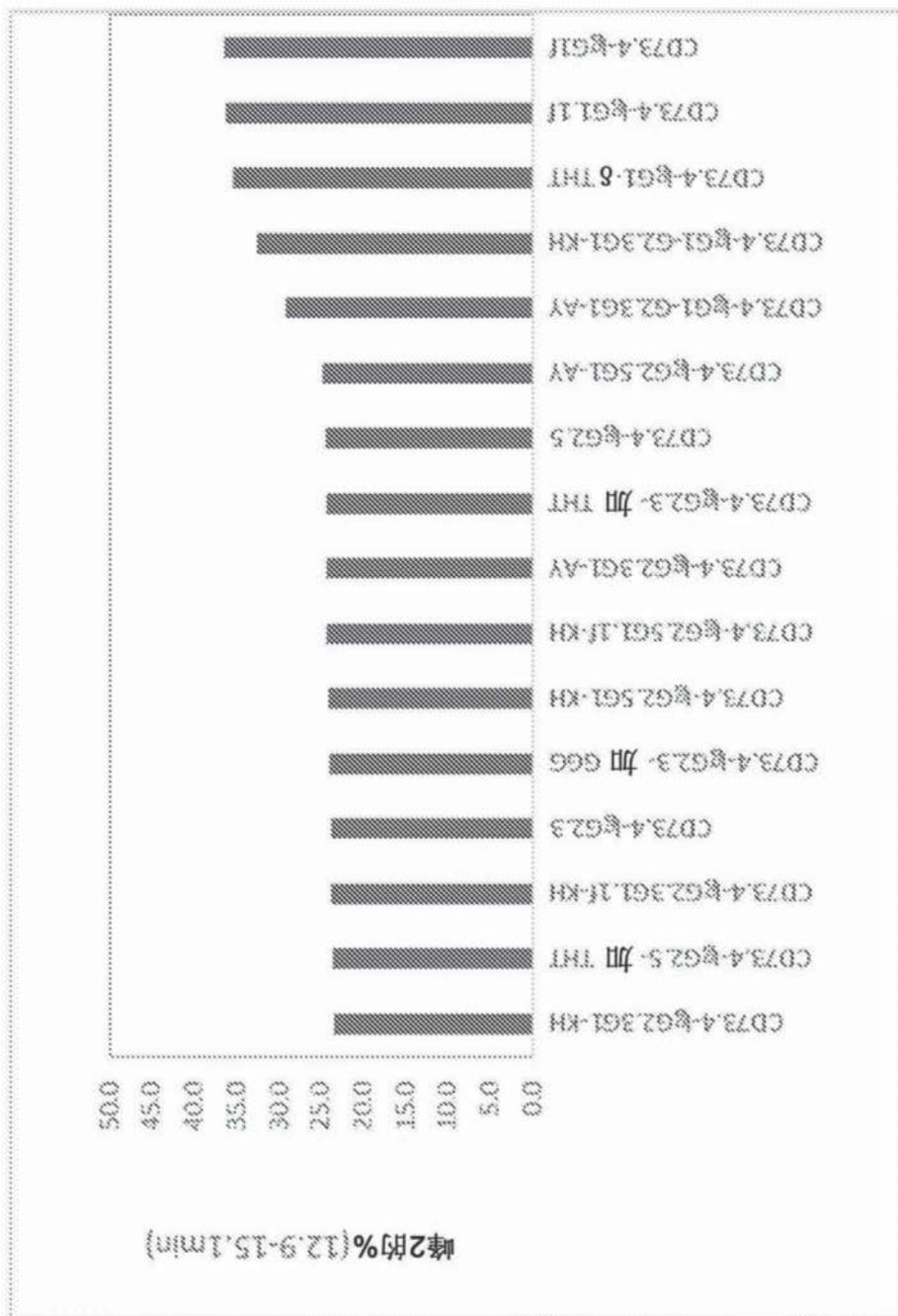


图12







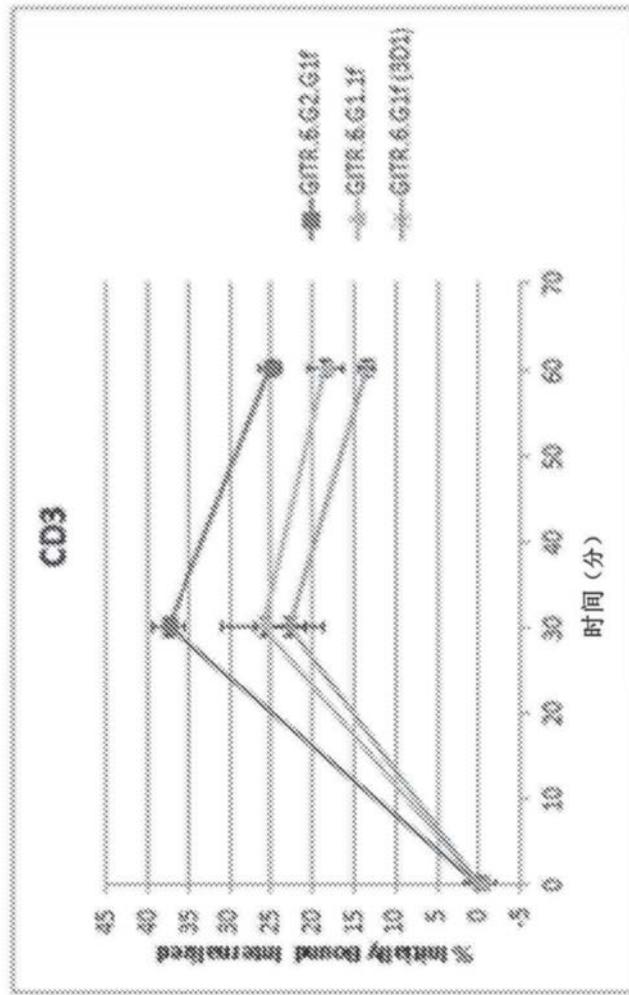


图15

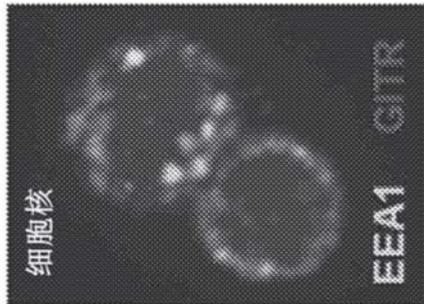


图16A

30分



120分



图16B

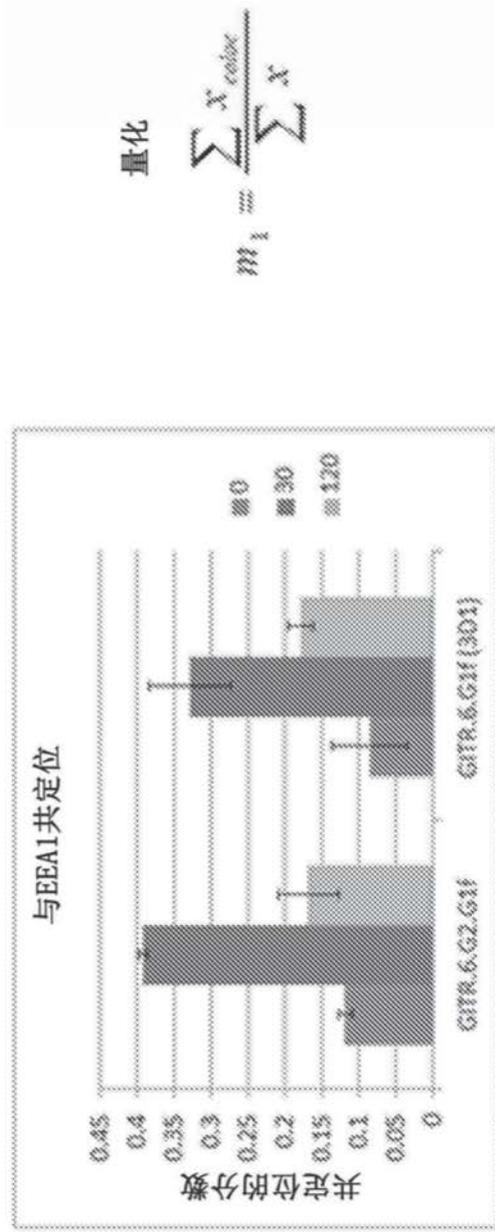


图16C

激活的CD8+细胞中的NFκB信号传导

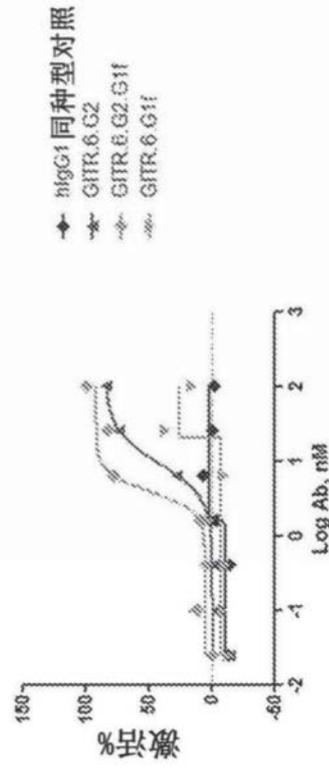


图17A

激活的CD4+细胞中的NFκB信号传导

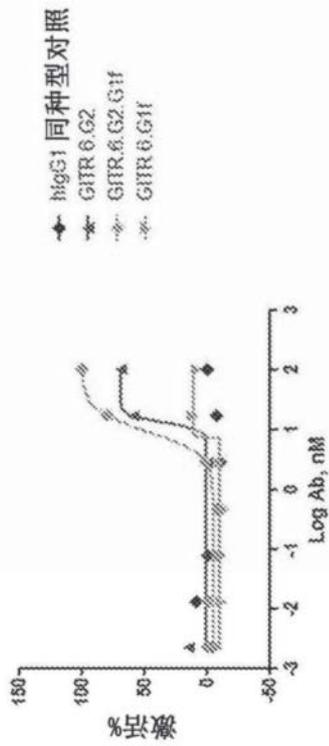


图17B

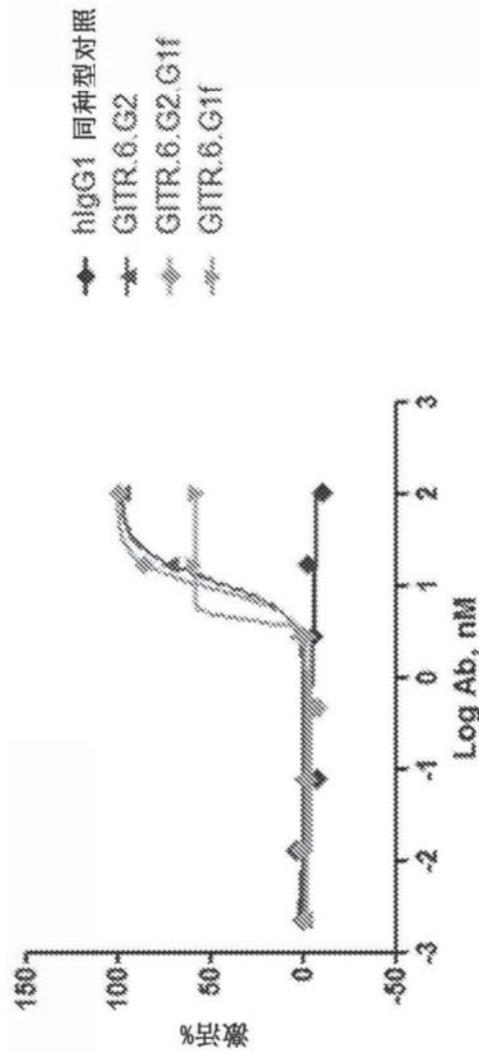


图18

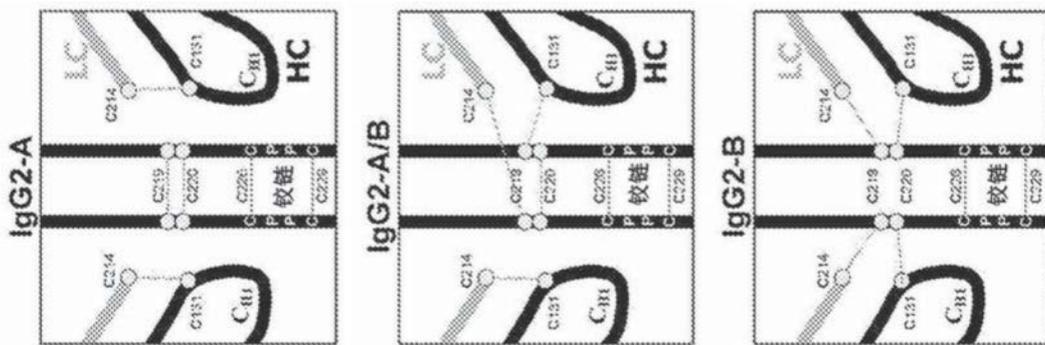


图19

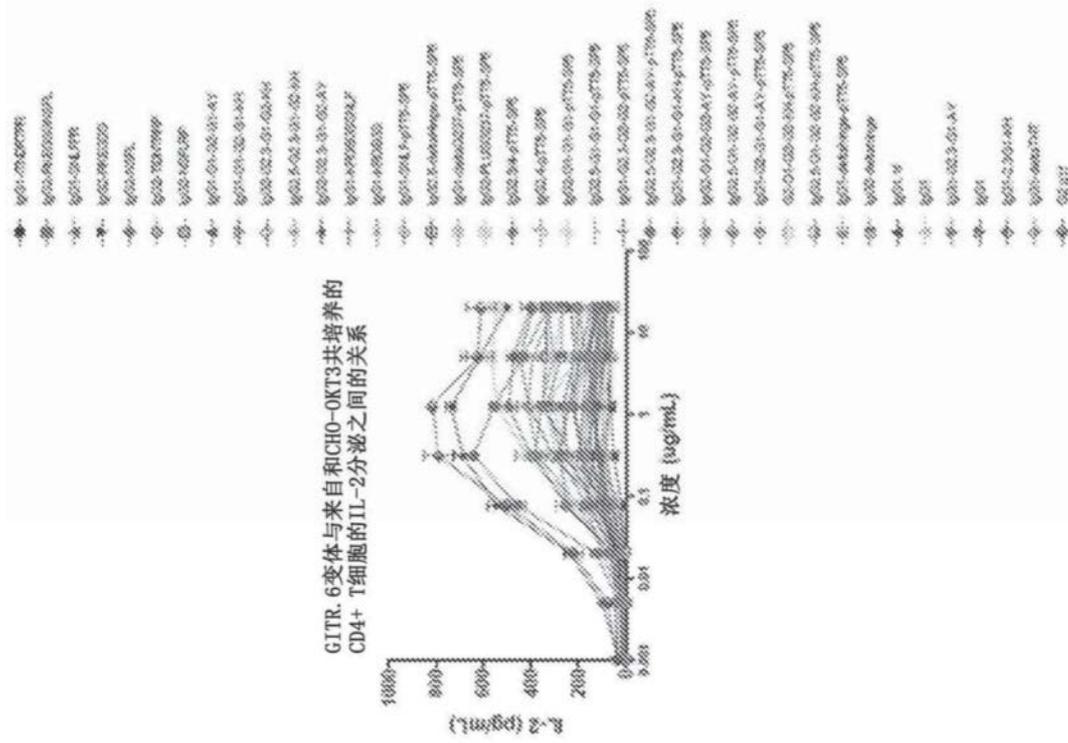


图20A



G1TR. 6变体与来自和CHO-OKT3共培养的CD4+ T细胞的IL-2分泌 (在1.25 ug/mL下刺激) 之间的关系

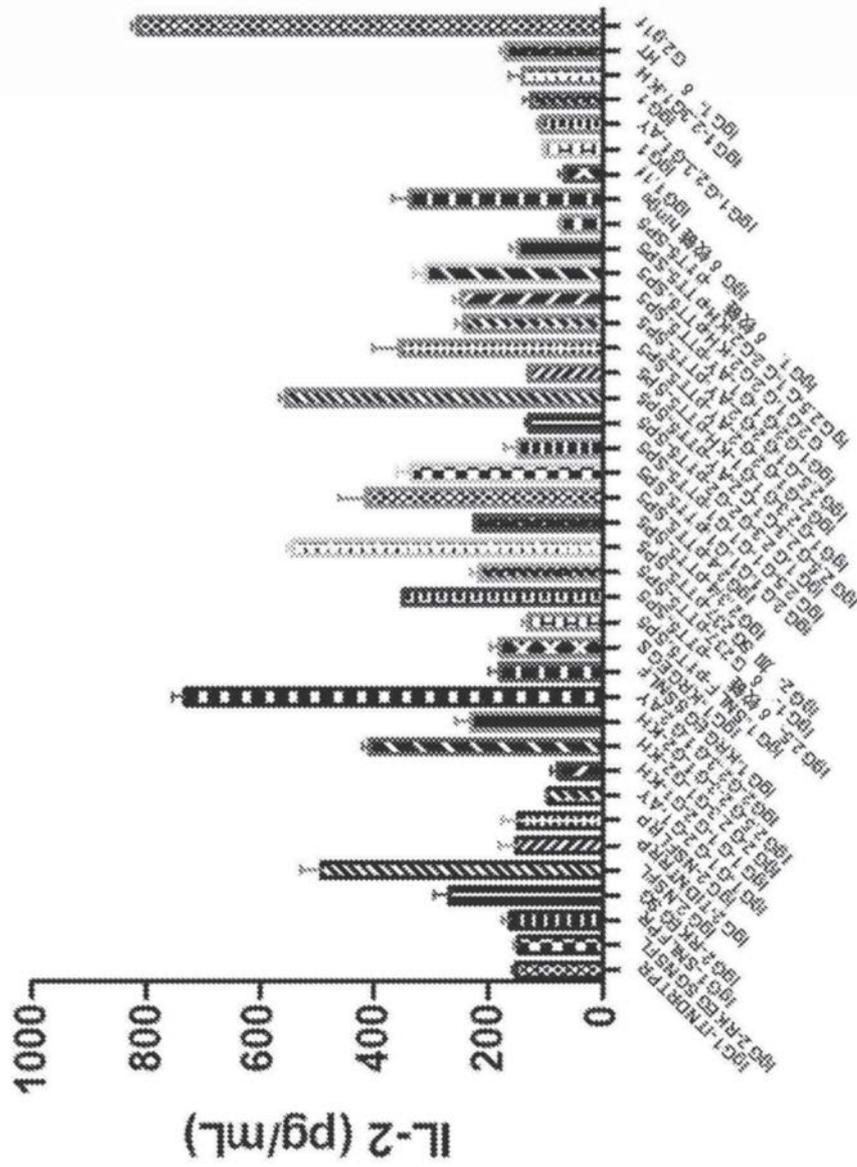


图20C



**hIgG1f**  
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKNDTLMIERTPEVTCVVVCSHEDEPEVFKWYVDGVEPRNAKTKPREEQYNSIYRVSIVLTVLHQDWLNQNEKYCKVSNKALPAPIEK  
ISKAKGQPREPQVYTLPPSRHEMTKNQVSLTCLVNGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPTLDSGSSPFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHRYHTQKSLSLSPQK

hIgG1f      ...CPPCPAPELLGGPSVFL..... YKCKVSNKALPAPIEK...  
hIgG1.1f    ...CPPCPAPEAEGAPSVFL..... YKCKVSNKALPSSIEK...  
hIgG1.3f    ...CPPCPAPEAEGAPSVFL..... YKCKVSNKALPAPIEK...  
hIgG1-P238K ...CPPCPAPELLGGKSVFL..... YKCKVSNKALPAPIEK...

1234 / 1235 / G237 / P238 / K322 / A330 / P331

图21

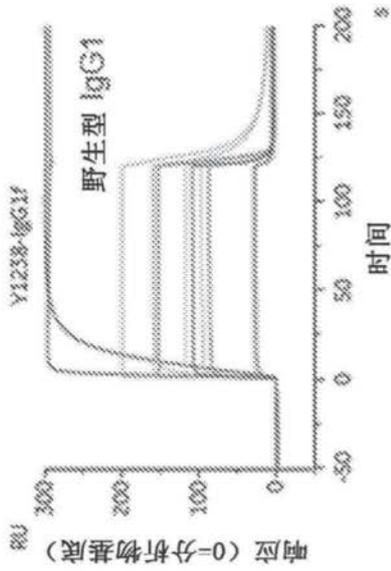


图22A

传感图数据显示1 uM/100 nM的 hCD64和10 uM/1 uM的所有其他Fc γ R

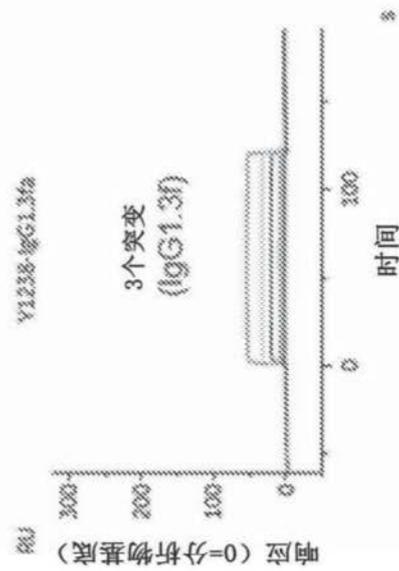
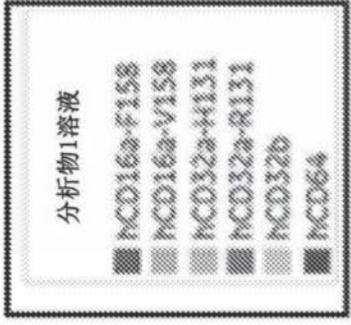


图22B

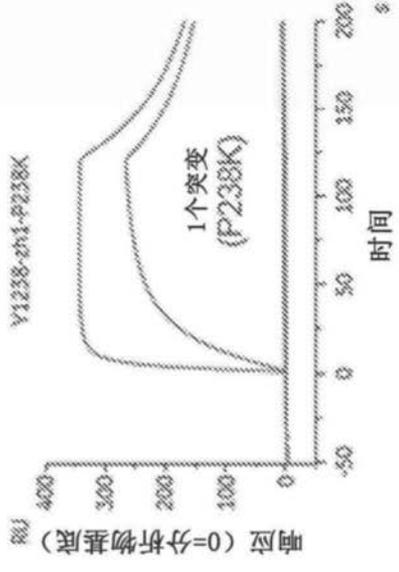


图22C

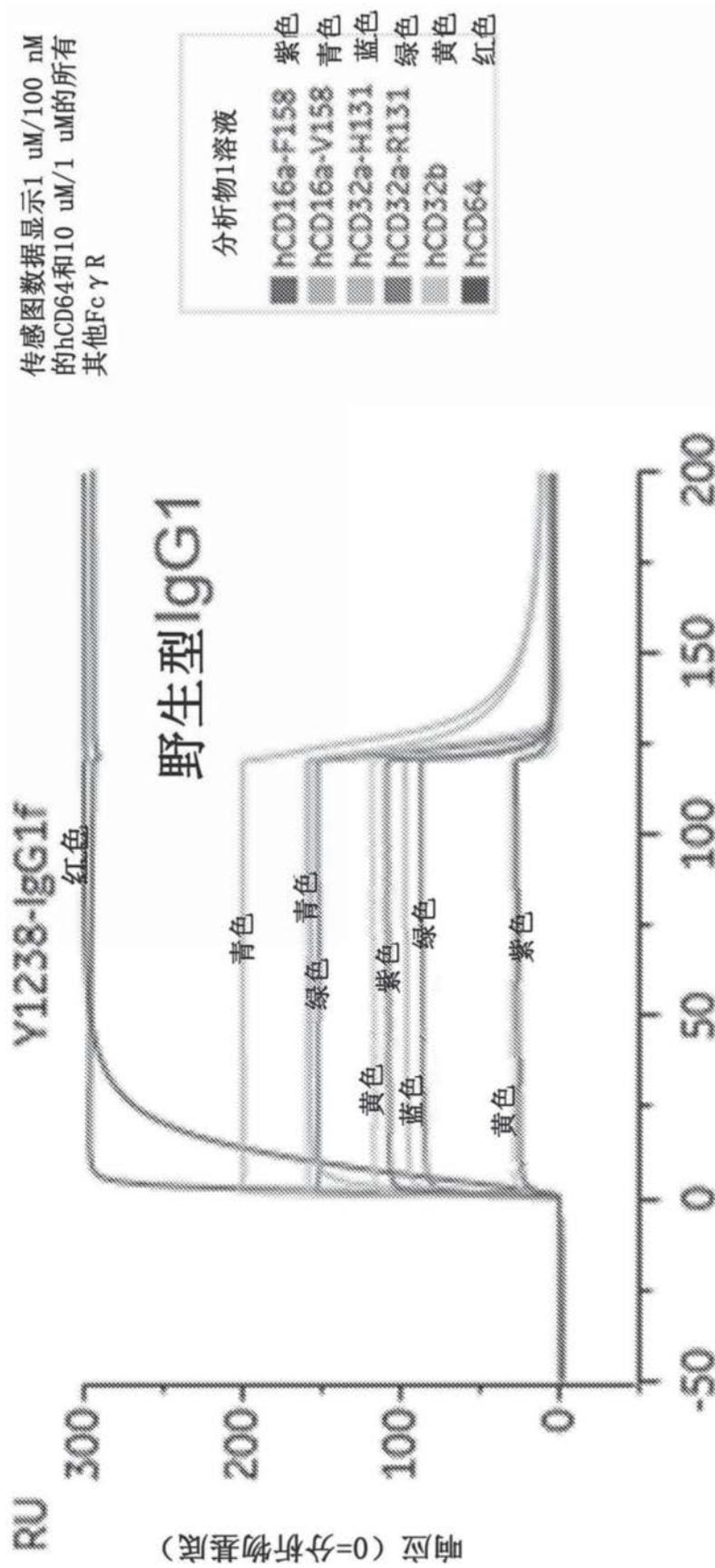


图22D

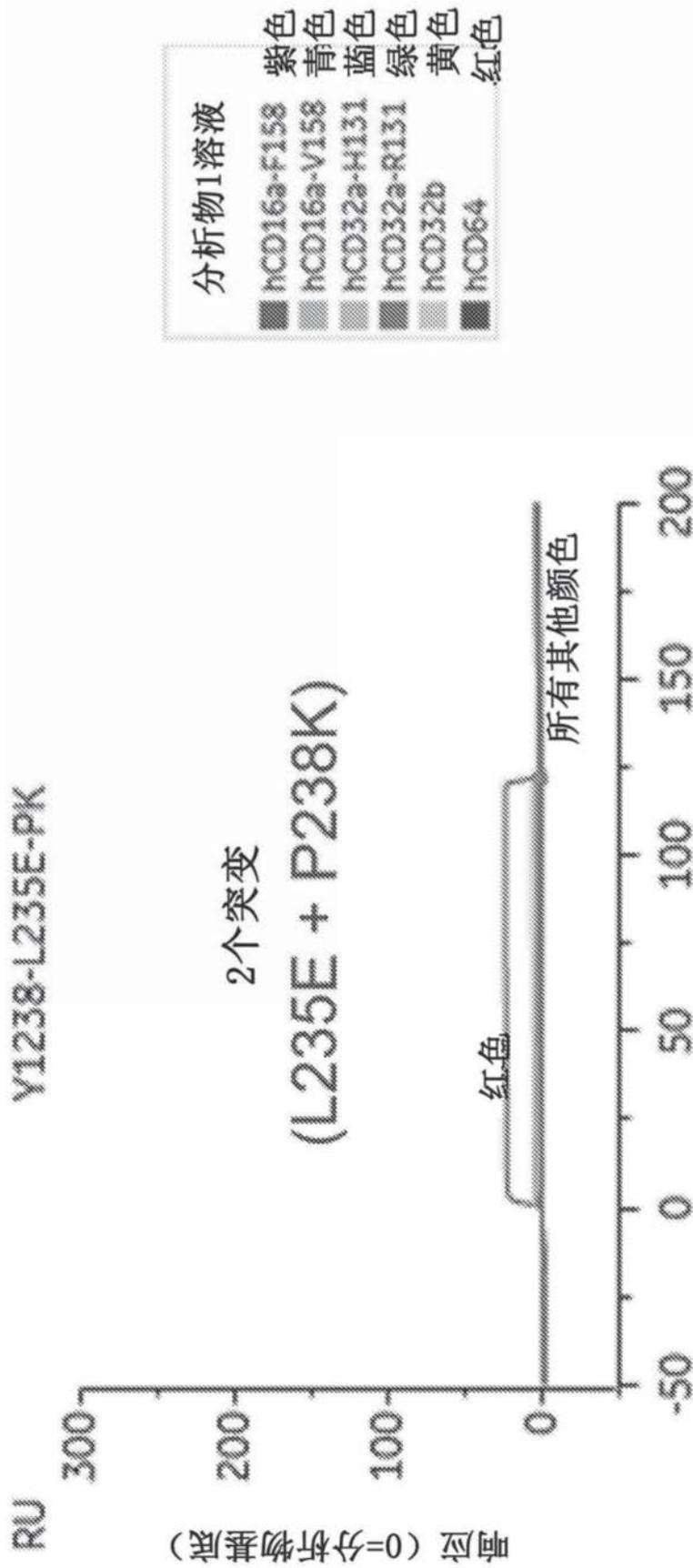


图22E

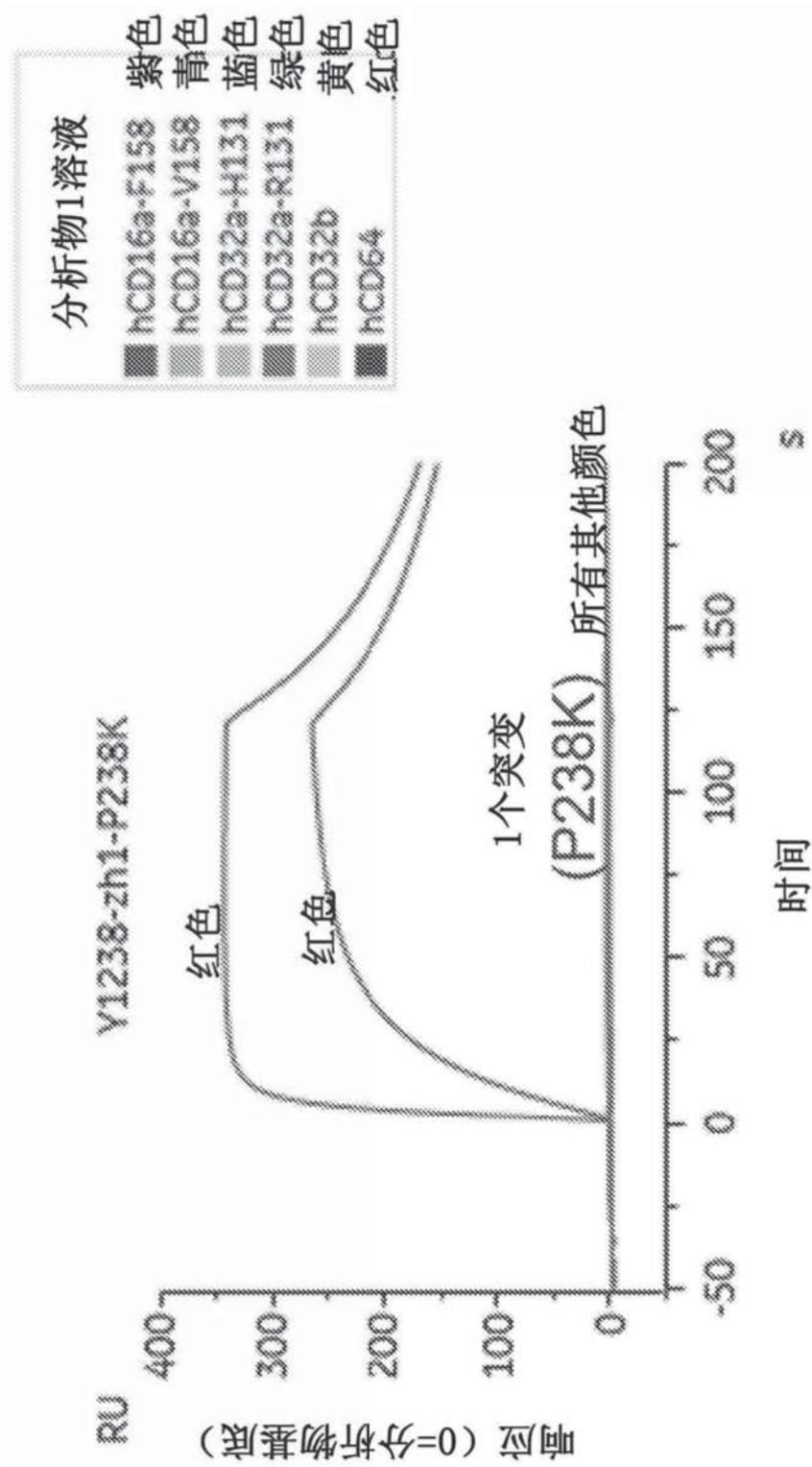


图22F

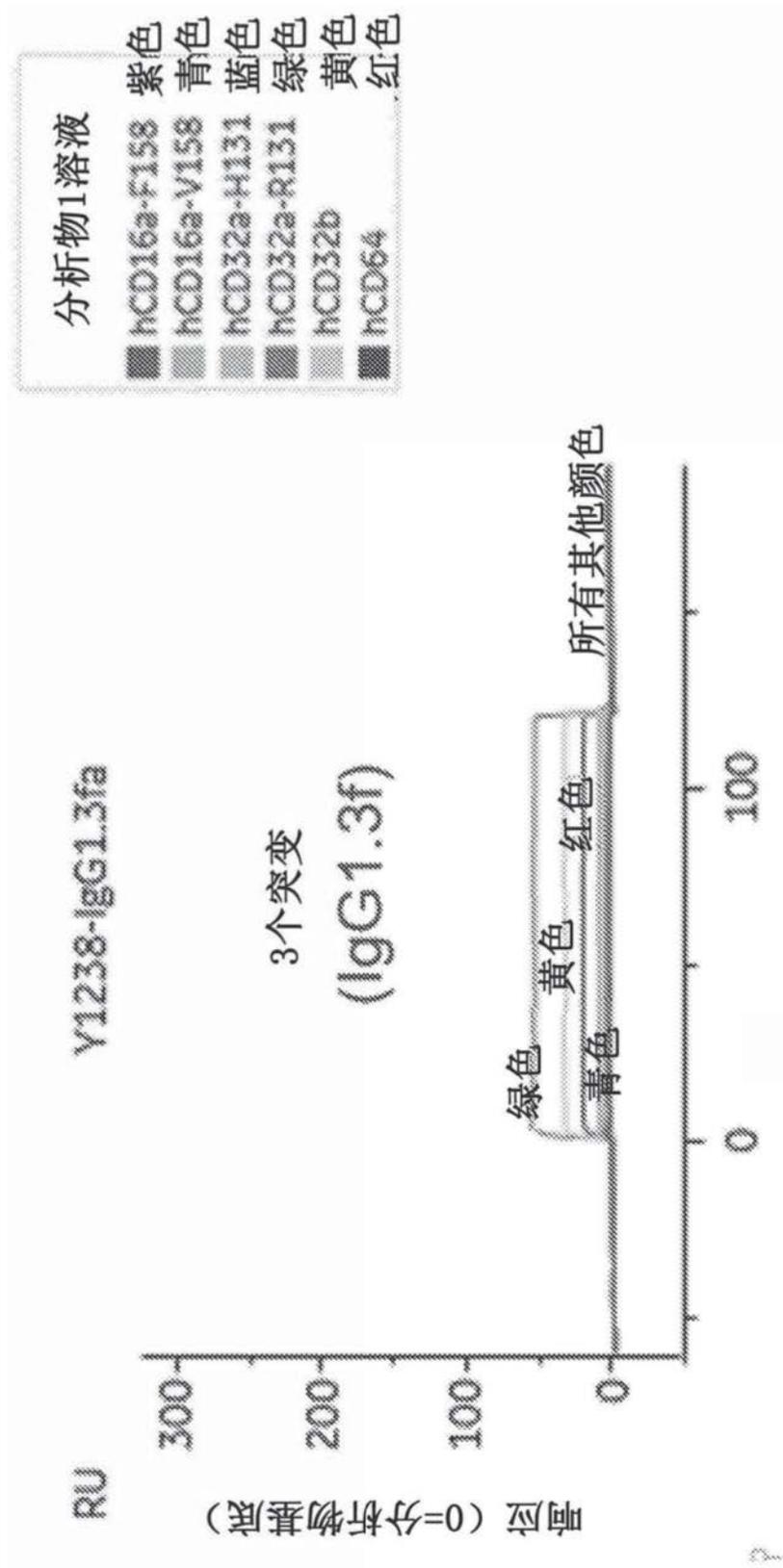


图22G

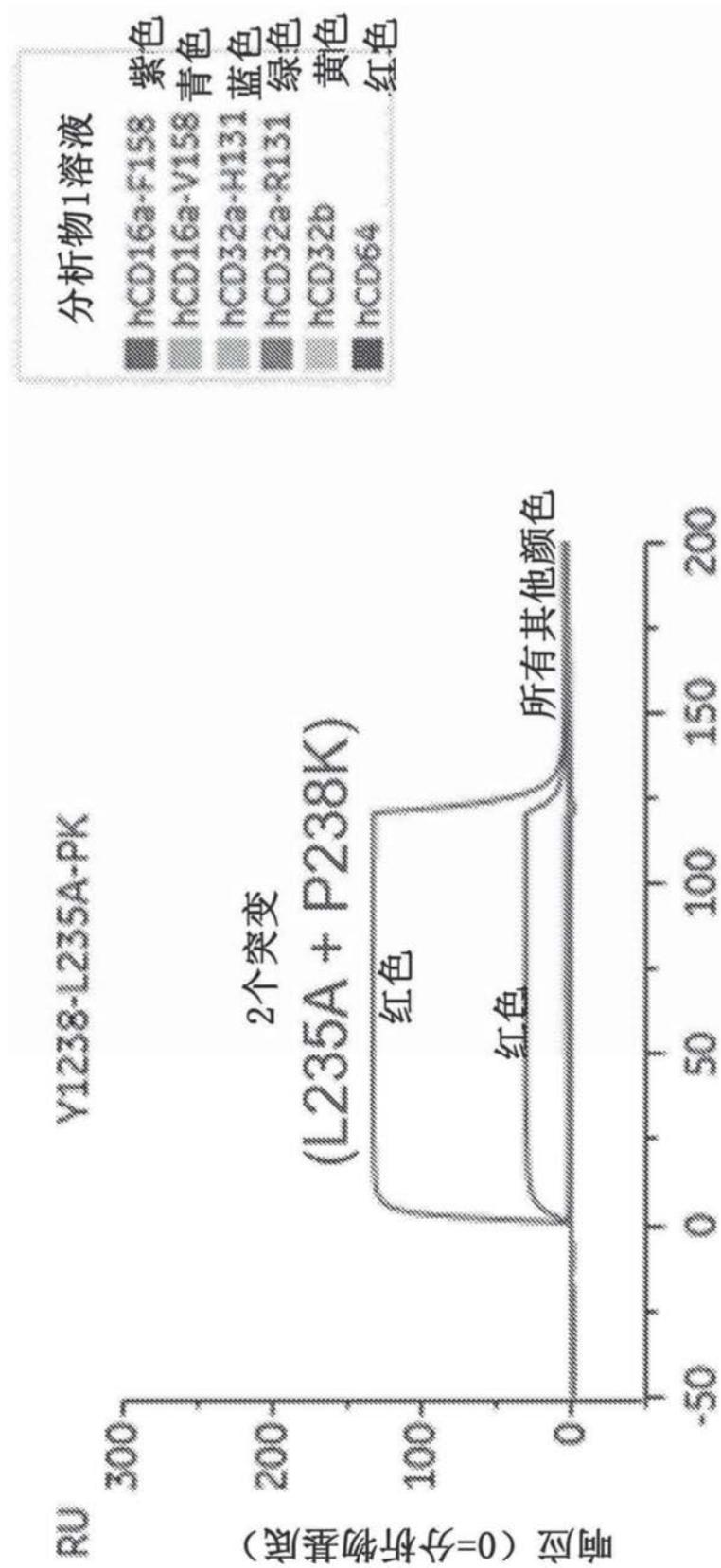


图22H

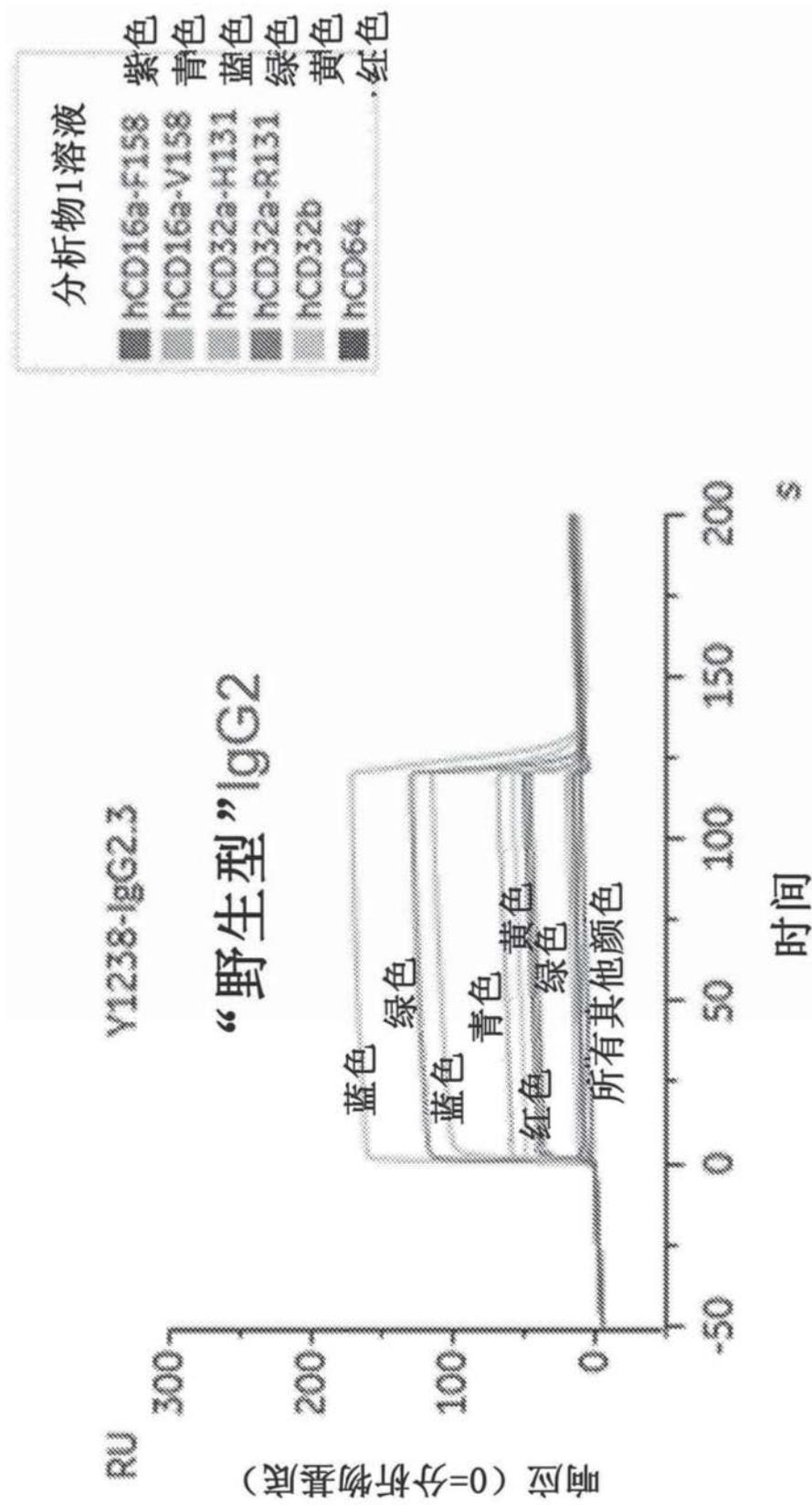


图22I

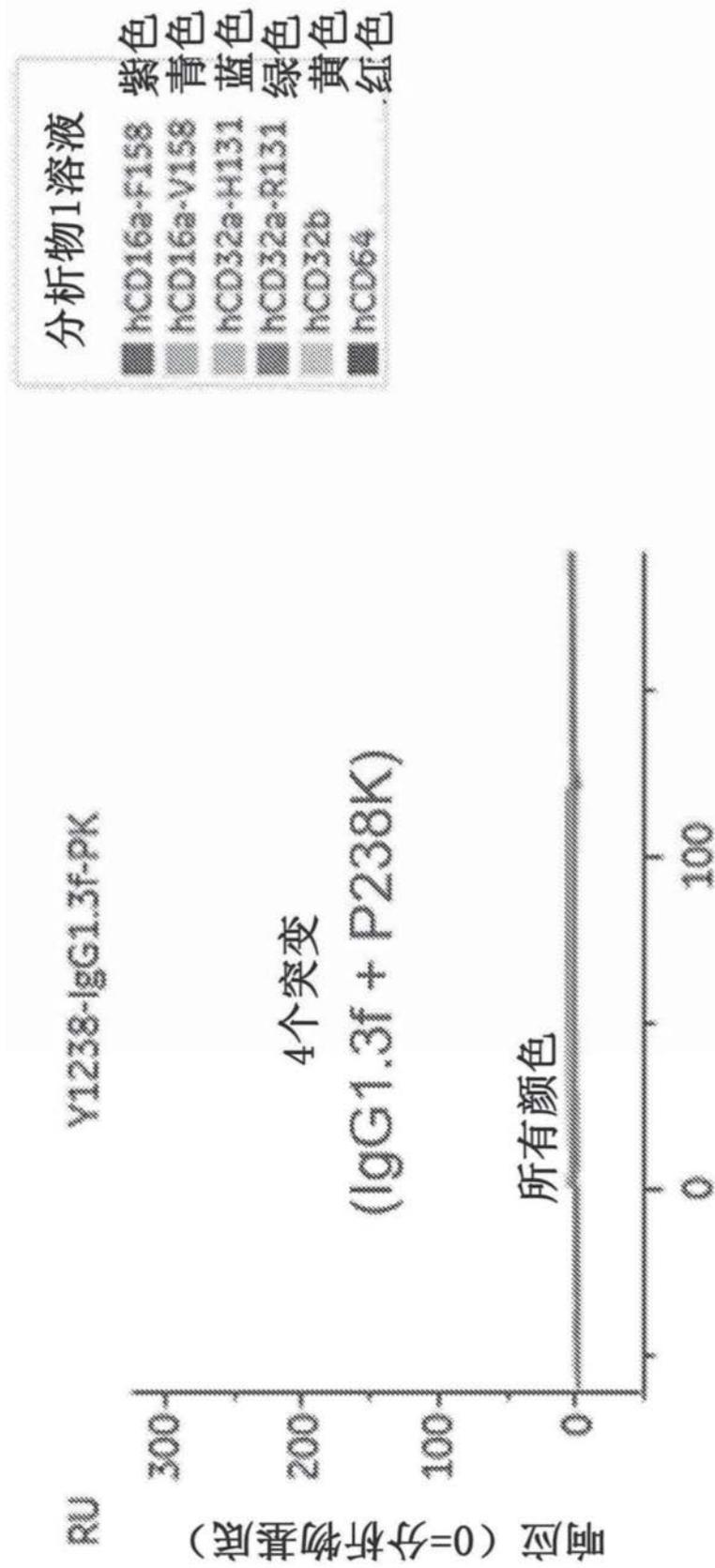


图22J

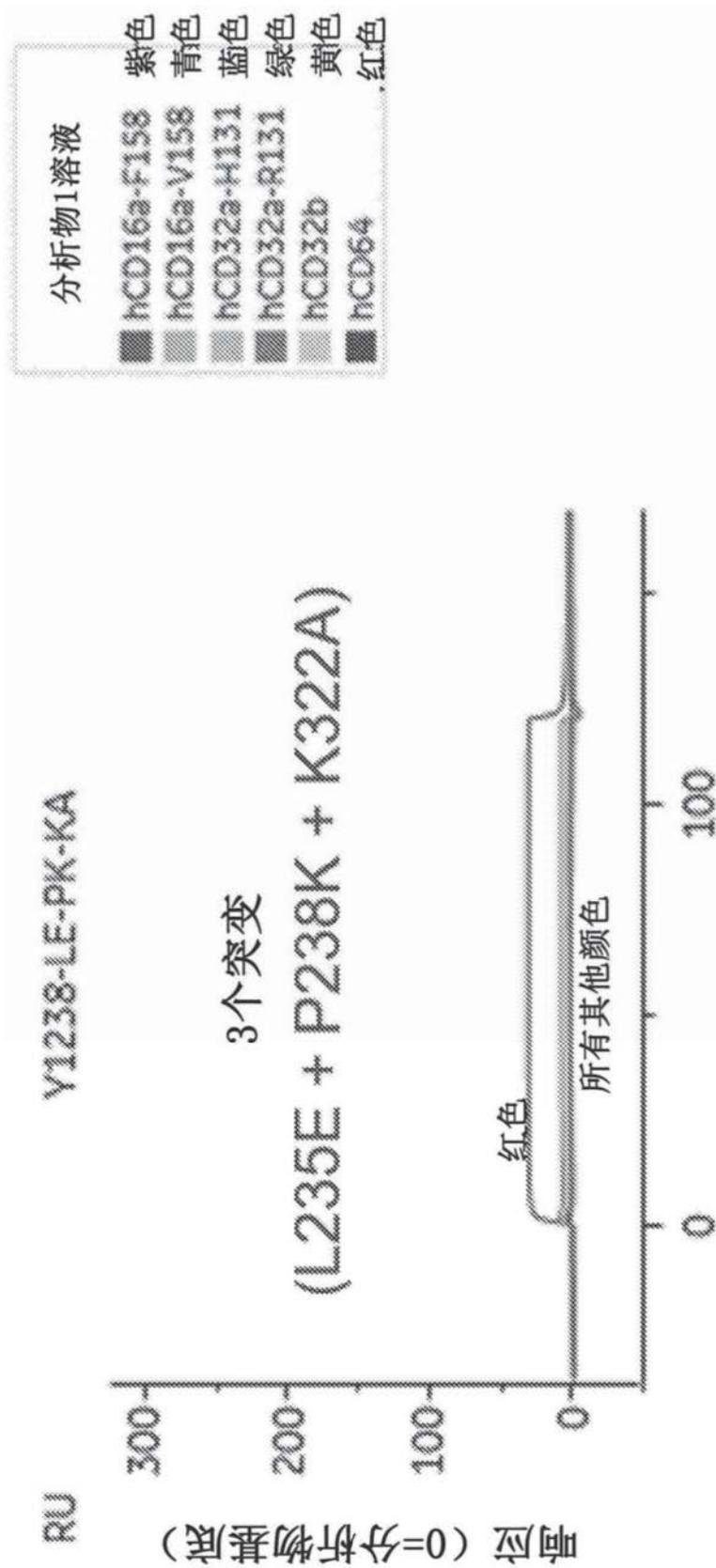


图22K

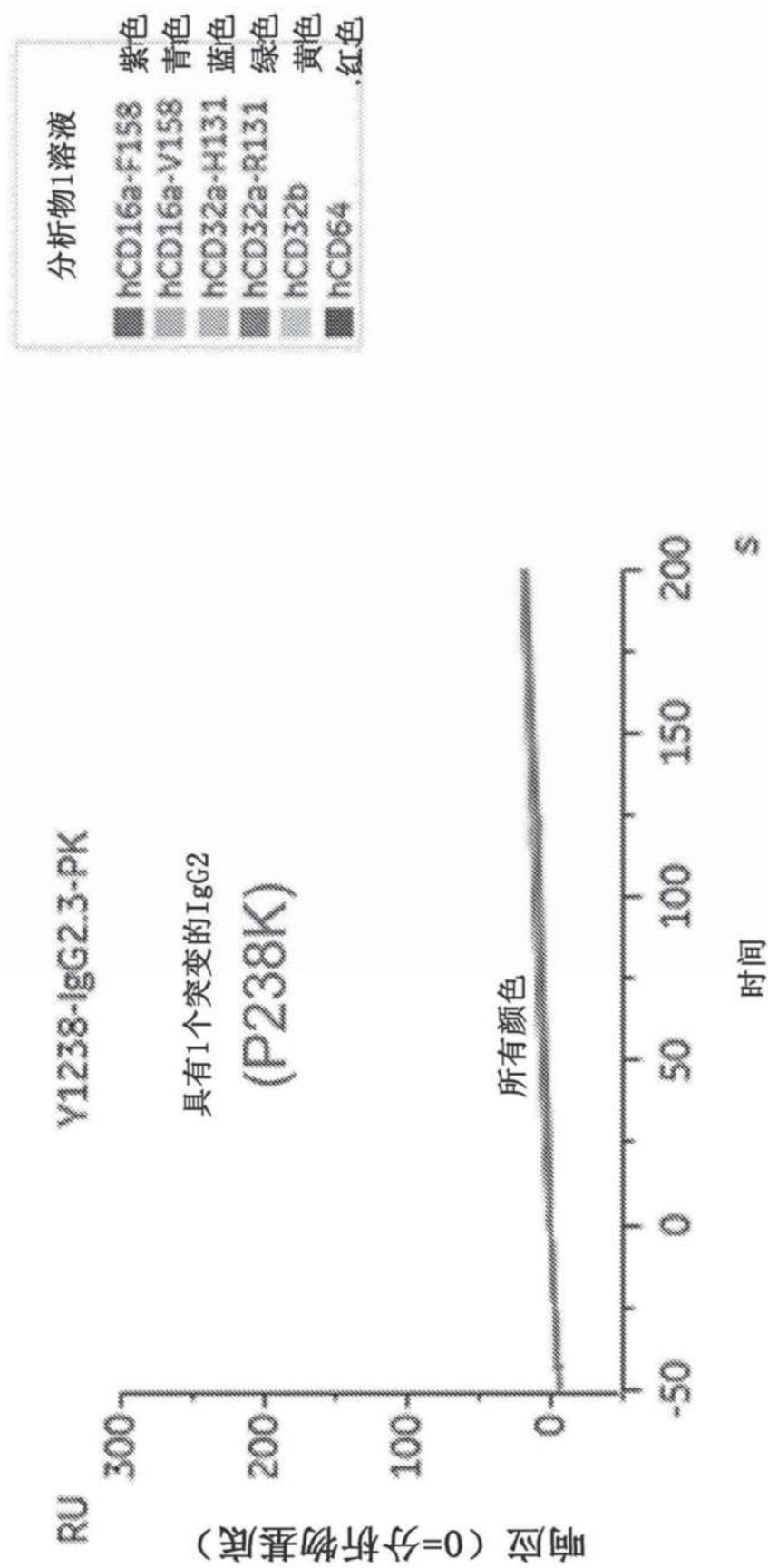


图22L



图23A

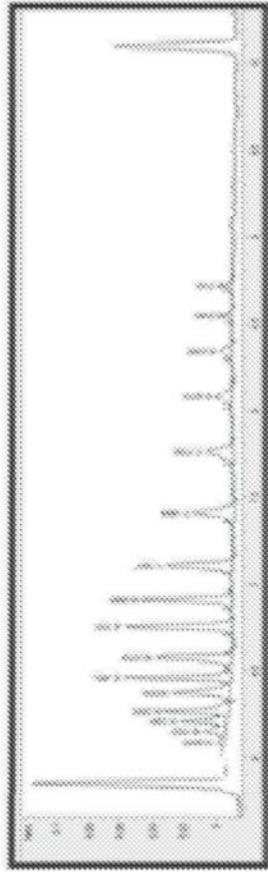


图23B

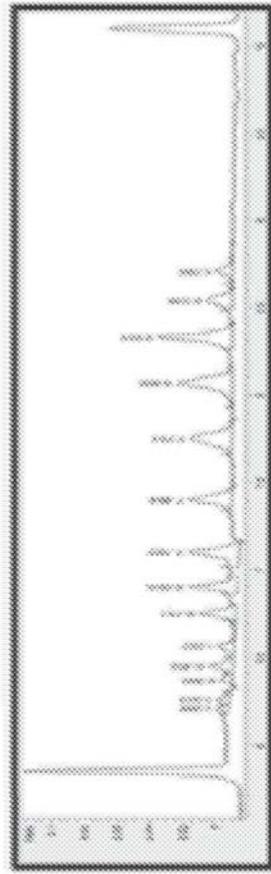


图23C



图23D

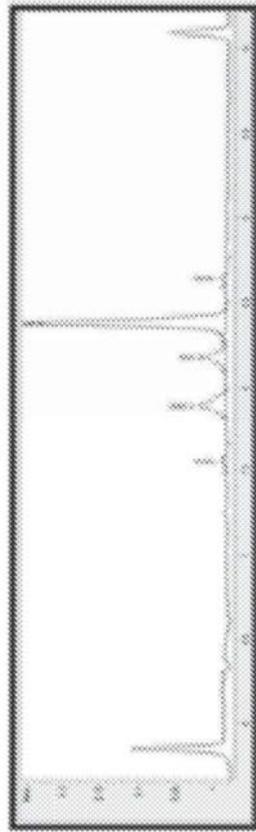


图23E



图23F