



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 116234814 A

(43) 申请公布日 2023.06.06

(21) 申请号 202180050556.X

(72) 发明人 周松涛 刘洵

(22) 申请日 2021.08.27

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

(66) 本国优先权数据

202010882873.5 2020.08.28 CN

202110958128.9 2021.08.20 CN

专利代理师 程伟

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.02.16

(51) Int.Cl.

C07K 14/00 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2021/114911 2021.08.27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/042673 ZH 2022.03.03

(71) 申请人 江苏恒瑞医药股份有限公司

地址 222047 江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路7号

申请人 上海恒瑞医药有限公司

(54) 发明名称

用于降低异源多肽末端异质性的信号肽

(57) 摘要

涉及用于降低异源多肽末端异质性的信号肽。具体地,涉及用于蛋白表达的信号肽,还涉及重组多肽、其制备方法及含有重组多肽的组合物。

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2022年3月3日 (03.03.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/042673 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/00 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01) *C12P 21/08* (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/114911

(22) 国际申请日: 2021年8月27日 (27.08.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202010882873.5 2020年8月28日 (28.08.2020) CN
202110958128.9 2021年8月20日 (20.08.2021) CN

(71) 申请人: 江苏恒瑞医药股份有限公司 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路7号, Jiangsu 222047 (CN)。上海恒瑞医药有限公司 (SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。

(72) 发明人: 周松涛 (ZHOU, Songtao); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。刘洵 (LIU, Xun); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。

(74) 代理人: 北京戈程知识产权代理有限公司 (GE CHENG & CO., LTD); 中国北京市东城区东长安街1号东方广场东三办公楼19层程伟 (DavidW.Cheng), Beijing 100738 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第21条 (3))。
- 包括说明书序列表部分 (细则5.2 (a))。

(54) Title: SIGNAL PEPTIDE FOR REDUCING END HETEROGENEITY OF HETEROLOGOUS POLYPEPTIDE

(54) 发明名称: 用于降低异源多肽末端异质性的信号肽

(57) Abstract: The present invention relates to a signal peptide for reducing the end heterogeneity of a heterologous polypeptide. Specifically, the present invention relates to a signal peptide for protein expression. The present invention further relates to a recombinant polypeptide, a preparation method therefor, and a composition containing a recombinant polypeptide.

(57) 摘要: 涉及用于降低异源多肽末端异质性的信号肽。具体地, 涉及用于蛋白表达的信号肽, 还涉及重组多肽、其制备方法及含有重组多肽的组合物。



WO 2022/042673 A1

用于降低异源多肽末端异质性的信号肽

技术领域

5 本披露涉及分子生物学和蛋白质工程领域，具体涉及降低异源多肽末端异质性的方法。

背景技术

这里的陈述仅提供与本披露有关的背景信息，而不必然地构成现有技术。

10 信号肽是引导新合成的蛋白质向分泌通路转移的短肽链。信号肽位于分泌蛋白质的 N 末端。一般由 15~30 个氨基酸组成。通常包括了三个区：一个带正电的 N 末端，称为碱性氨基末端；一个中间疏水序列，以中性氨基酸为主，能够形成一段 α 螺旋结构，它是信号肽的主要功能区；一个较长的带负电荷的 C 末端，含小分子氨基酸，是信号序列切割位点，也称加工区。当信号肽序列合成后，被信号识别颗粒(SRP)所识别，蛋白质合成暂停或减缓，信号识别颗粒将核糖体携带至
15 内质网上，蛋白质合成重新开始。在信号肽的引导下，新合成的蛋白质进入内质网腔，而信号肽序列则在信号肽酶的作用下被切除。

通常信号肽的高效切割，可以确保抗体轻、重链多肽均可被准确切割，这对于哺乳动物细胞介导的抗体表达非常重要。但是，在信号肽切割过程中，切割位点可能会发生变化，导致了重组抗体轻、重氨基酸链的延长或截短。截短或延长的抗体，其结构的变化会导致其亲和性发生变化，从而影响抗体活性；因此在抗体生产过程中需要避免氨基酸链延长或截短的发生。此外，部分的产物截短或延长，使得生产过程中不同批次产品产生差异，需要进行额外的质检，且从工艺上很难解决此类问题。因此，生产出具有 N 末端同质性的轻、重链抗体是目前工业
20 界的普遍共识。
25

发明内容

本披露涉及信号肽及其用途，其中所述信号肽用于降低异源多肽的末端异质性。

30 本披露提供一种降低抗体的重链和/或抗体的轻链的 N 末端异质性的方法，其包括

培养宿主细胞，其中所述宿主细胞包含：(1) 第一多核苷酸，其编码抗体的重链及与该重链的 N 端有效连接的第一信号肽；其中，所述第一信号肽包含 SEQ ID NO: 55 或 SEQ ID NO: 56 的氨基酸序列；和/或

35 (2) 第二多核苷酸，其编码抗体的轻链及与该轻链的 N 端有效连接的第二信号肽；其中，所述第二信号肽包含 SEQ ID NO: 55 或 SEQ ID NO: 56 的氨基酸序列；

表达所述抗体的重链和/或抗体的轻链；

其中，SEQ ID NO: 55 如 MEWSWVFLFFLSLTGX₁HX₂ 所示，其中，X₁ 是 V、A、S、T、G、C、L 或 I，X₂ 是 A、G、S、C、T 或 Q；

5 SEQ ID NO: 56 如 MSVPTQVLGLLLLWLTDX₃RX₄ 所示，其中，X₃ 是 V、A、S、T、G、C、L 或 I；X₄ 是 A、G、S、C、T 或 Q，并且当 X₃ 选自 A 时，X₄ 不是 C。

10 在一些实施方案中，如前所述的降低抗体的重链和/或抗体的轻链的 N 末端异质性的方法，其中，表达得到的所述抗体的重链具有低于 3%、2.5%、2%、1.5% 或 1% 的末端延伸比率和/或抗体的轻链具有低于 3%、2.5%、2%、1.5% 或 1% 的末端延伸比率；在一些实施方案中，表达得到的所述抗体重链具有低于 1% 的末端延伸比率和/或抗体的轻链具有低于 1% 的末端延伸比率。在一些实施方案中，该末端延伸比率是基于肽图检测方法测算的。在一些实施方案中，表达得到的所述抗体重链基本上没有末端残基的残留和/或抗体的轻链基本上没有末端残基的残留；在
15 一些实施方案中，表达得到的所述抗体重链具有 0% 的末端延伸比率和/或抗体的轻链具有 0% 的末端延伸比率。

在一些实施方案中，如前所述的降低抗体的重链和/或抗体的轻链的 N 末端异质性的方法，其中，所述第一信号肽或第二信号肽各自独立的包含选自如下的肽：

SEQ ID NO 57: MEWSWVFLFFLSLTGVHA;
 SEQ ID NO 58: MEWSWVFLFFLSLTGVHG;
 20 SEQ ID NO 59: MEWSWVFLFFLSLTGVHS;
 SEQ ID NO 60: MEWSWVFLFFLSLTGVHC;
 SEQ ID NO 61: MEWSWVFLFFLSLTGVHT;
 SEQ ID NO 62: MEWSWVFLFFLSLTGVHQ;
 SEQ ID NO 63: MEWSWVFLFFLSLTGAHA;
 25 SEQ ID NO 64: MEWSWVFLFFLSLTGAHG;
 SEQ ID NO 65: MEWSWVFLFFLSLTGAHS;
 SEQ ID NO 66: MEWSWVFLFFLSLTGAHC;
 SEQ ID NO 67: MEWSWVFLFFLSLTGAHT;
 SEQ ID NO 68: MEWSWVFLFFLSLTGAHQ;
 30 SEQ ID NO 69: MEWSWVFLFFLSLTGSHA;
 SEQ ID NO 70: MEWSWVFLFFLSLTGSHG;
 SEQ ID NO 71: MEWSWVFLFFLSLTGSHS;
 SEQ ID NO 72: MEWSWVFLFFLSLTGSHC;
 SEQ ID NO 73: MEWSWVFLFFLSLTGSHT;
 35 SEQ ID NO 74: MEWSWVFLFFLSLTGSHQ;
 SEQ ID NO 75: MEWSWVFLFFLSLTGTHA;
 SEQ ID NO 76: MEWSWVFLFFLSLTGTHG;
 SEQ ID NO 77: MEWSWVFLFFLSLTGTHS;
 SEQ ID NO 78: MEWSWVFLFFLSLTGTHC;

SEQ ID NO 79: MEWSWVFLFFLSLTGTHT;
SEQ ID NO 80: MEWSWVFLFFLSLTGTHQ;
SEQ ID NO 81: MEWSWVFLFFLSLTGGHA;
SEQ ID NO 82: MEWSWVFLFFLSLTGGHG;
5 SEQ ID NO 83: MEWSWVFLFFLSLTGGHS;
SEQ ID NO 84: MEWSWVFLFFLSLTGGHC;
SEQ ID NO 85: MEWSWVFLFFLSLTGGHT;
SEQ ID NO 86: MEWSWVFLFFLSLTGGHQ;
SEQ ID NO 87: MEWSWVFLFFLSLTGCHA;
10 SEQ ID NO 88: MEWSWVFLFFLSLTGCHG;
SEQ ID NO 89: MEWSWVFLFFLSLTGCHS;
SEQ ID NO 90: MEWSWVFLFFLSLTGCHC;
SEQ ID NO 91: MEWSWVFLFFLSLTGCHT;
SEQ ID NO 92: MEWSWVFLFFLSLTGCHQ;
15 SEQ ID NO 93: MEWSWVFLFFLSLTGLHA;
SEQ ID NO 94: MEWSWVFLFFLSLTGLHG;
SEQ ID NO 95: MEWSWVFLFFLSLTGLHS;
SEQ ID NO 96: MEWSWVFLFFLSLTGLHC;
SEQ ID NO 97: MEWSWVFLFFLSLTGLHT;
20 SEQ ID NO 98: MEWSWVFLFFLSLTGLHQ;
SEQ ID NO 99: MEWSWVFLFFLSLTGIHA;
SEQ ID NO 100: MEWSWVFLFFLSLTGIHG;
SEQ ID NO 101: MEWSWVFLFFLSLTGIHS;
SEQ ID NO 102: MEWSWVFLFFLSLTGIHC;
25 SEQ ID NO 103: MEWSWVFLFFLSLTGIHT;
SEQ ID NO 104: MEWSWVFLFFLSLTGIHQ;
SEQ ID NO 105: MSVPTQVLGLLLLWLTDVRA;
SEQ ID NO 106: MSVPTQVLGLLLLWLTDVRG;
SEQ ID NO 107: MSVPTQVLGLLLLWLTDVRS;
30 SEQ ID NO 108: MSVPTQVLGLLLLWLTDVRC;
SEQ ID NO 109: MSVPTQVLGLLLLWLTDVRT;
SEQ ID NO 110: MSVPTQVLGLLLLWLTDVRQ;
SEQ ID NO 111: MSVPTQVLGLLLLWLTDARA;
SEQ ID NO 112: MSVPTQVLGLLLLWLTDARG;
35 SEQ ID NO 113: MSVPTQVLGLLLLWLTDARS;
SEQ ID NO 114: MSVPTQVLGLLLLWLTDART;
SEQ ID NO 115: MSVPTQVLGLLLLWLTDARQ;
SEQ ID NO 116: MSVPTQVLGLLLLWLTDSRA;
SEQ ID NO 117: MSVPTQVLGLLLLWLTDSRG;
40 SEQ ID NO 118: MSVPTQVLGLLLLWLTDSRS;
SEQ ID NO 119: MSVPTQVLGLLLLWLTDSRC;

SEQ ID NO 120: MSVPTQVLGLLLLWLTD SRT;
 SEQ ID NO 121: MSVPTQVLGLLLLWLTD SRQ;
 SEQ ID NO 122: MSVPTQVLGLLLLWLTD TRA;
 SEQ ID NO 123: MSVPTQVLGLLLLWLTD TRG;
 5 SEQ ID NO 124: MSVPTQVLGLLLLWLTD TRS;
 SEQ ID NO 125: MSVPTQVLGLLLLWLTD TRC;
 SEQ ID NO 126: MSVPTQVLGLLLLWLTD TRT;
 SEQ ID NO 127: MSVPTQVLGLLLLWLTD TRQ;
 SEQ ID NO 128: MSVPTQVLGLLLLWLTD GRA;
 10 SEQ ID NO 129: MSVPTQVLGLLLLWLTD GRG;
 SEQ ID NO 130: MSVPTQVLGLLLLWLTD GRS;
 SEQ ID NO 131: MSVPTQVLGLLLLWLTD GRC;
 SEQ ID NO 132: MSVPTQVLGLLLLWLTD GRT;
 SEQ ID NO 133: MSVPTQVLGLLLLWLTD GRQ;
 15 SEQ ID NO 134: MSVPTQVLGLLLLWLTD CRA;
 SEQ ID NO 135: MSVPTQVLGLLLLWLTD CRG;
 SEQ ID NO 136: MSVPTQVLGLLLLWLTD CRS;
 SEQ ID NO 137: MSVPTQVLGLLLLWLTD CRC;
 SEQ ID NO 138: MSVPTQVLGLLLLWLTD CRT;
 20 SEQ ID NO 139: MSVPTQVLGLLLLWLTD CRQ;
 SEQ ID NO 140: MSVPTQVLGLLLLWLTD LRA;
 SEQ ID NO 141: MSVPTQVLGLLLLWLTD LRG;
 SEQ ID NO 142: MSVPTQVLGLLLLWLTD LRS;
 SEQ ID NO 143: MSVPTQVLGLLLLWLTD LRC;
 25 SEQ ID NO 144: MSVPTQVLGLLLLWLTD LRT;
 SEQ ID NO 145: MSVPTQVLGLLLLWLTD LRQ;
 SEQ ID NO 146: MSVPTQVLGLLLLWLTD LRA;
 SEQ ID NO 147: MSVPTQVLGLLLLWLTD LRG;
 SEQ ID NO 148: MSVPTQVLGLLLLWLTD LRS;
 30 SEQ ID NO 149: MSVPTQVLGLLLLWLTD LRC;
 SEQ ID NO 150: MSVPTQVLGLLLLWLTD LRT; 和
 SEQ ID NO 151: MSVPTQVLGLLLLWLTD LRQ。

在一些实施方案中，如前所述的降低抗体的重链和/或抗体的轻链的 N 末端异质性的方法，其中，所述第一信号肽或第二信号肽各自独立的包含 SEQ ID NO: 57、
 35 SEQ ID NO: 58、SEQ ID NO: 59、SEQ ID NO: 93、SEQ ID NO: 94、SEQ ID NO: 95、SEQ ID NO: 99、SEQ ID NO: 100、SEQ ID NO: 101、SEQ ID NO: 105、SEQ ID NO: 106、SEQ ID NO: 107、SEQ ID NO: 140、SEQ ID NO: 141、SEQ ID NO: 142、SEQ ID NO: 146、SEQ ID NO: 147 或 SEQ ID NO: 148 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，如前所述的降低抗体的重链和/或抗体的轻链的 N 末端异

质性的方法，其中第一信号肽包含 SEQ ID NO: 57 或 SEQ ID NO: 105 的氨基酸序列，和/或第二信号肽包含 SEQ ID NO: 57 或 SEQ ID NO: 105 的氨基酸序列。

5 在一些实施方案中，如前所述的降低抗体的重链和/或抗体的轻链的 N 末端异质性的方法，其中，第一信号肽包含 SEQ ID NO: 57 的氨基酸序列，和/或第二信号肽包含 SEQ ID NO: 57 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，如前所述的降低抗体的重链和/或抗体的轻链的 N 末端异质性的方法，其中，第一信号肽包含 SEQ ID NO: 57 的氨基酸序列，和/或第二信号肽包含 SEQ ID NO: 105 的氨基酸序列。

10 在一些实施方案中，如前所述的降低抗体的重链和/或抗体的轻链的 N 末端异质性的方法，其中，第一信号肽包含 SEQ ID NO: 105 的氨基酸序列，和/或第二信号肽包含 SEQ ID NO: 57 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，如前所述的降低抗体的重链和/或抗体的轻链的 N 末端异质性的方法，其中，第一信号肽包含 SEQ ID NO: 105 的氨基酸序列，和/或第二信号肽包含 SEQ ID NO: 105 的氨基酸序列。

15 在一些实施方案中，如前所述的降低抗体的重链和/或抗体的轻链的 N 末端异质性的方法，其中，所述第一多核苷酸或第二多核苷酸各自独立的编码多肽，所述多肽包含选自 SEQ ID NO: 157、SEQ ID NO: 158、SEQ ID NO: 159、SEQ ID NO: 160、SEQ ID NO: 163、SEQ ID NO: 164、SEQ ID NO: 165、SEQ ID NO: 166、SEQ ID NO: 171 和 SEQ ID NO: 172 的氨基酸序列。

20 在一些实施方案中，如前所述的降低抗体的重链和/或抗体的轻链的 N 末端异质性的方法，其中，所述宿主细胞是真核宿主细胞；在一些实施方案中，所述真核宿主细胞是 CHO 细胞或酵母。

25 在一些实施方案中，如前所述的降低抗体的重链和/或抗体的轻链的 N 末端异质性的方法，其中，所述的抗体是鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、亲和力成熟抗体或多特异性抗体。

30 在一些实施方案中，如前所述的降低抗体的重链和/或抗体的轻链的 N 末端异质性的方法，其中，所述的抗体选自抗 TLR7 抗体、抗 HER2(ErbB2)抗体、抗 Claudin18.2 抗体、抗 EGFR 抗体、抗 B7H3 抗体、抗 c-Met 抗体、抗 HER3(ErbB3)抗体、抗 HER4(ErbB4)抗体、抗 CD3 抗体、抗 CD20 抗体、抗 CD22 抗体、抗 CD30 抗体、抗 CD33 抗体、抗 CD38 抗体、抗 CD44 抗体、抗 CD47 抗体、抗 CD56 抗体、抗 CD70 抗体、抗 CD73 抗体、抗 CD105 抗体、抗 CEA 抗体、抗 A33 抗体、抗 Cripto 抗体、抗 SOST 抗体、抗 EphA2 抗体、抗 G250 抗体、抗 MUC1 抗体、抗 Lewis Y 抗体、抗 VEGFR 抗体、抗 GPNMB 抗体、抗凝血酶抗体、抗 A β 抗体、抗 Integrin 抗体、抗 ANGPTL3 抗体、抗 PSMA 抗体、抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体、抗 LAG3 抗体、抗 IL-5 抗体、抗 IL-15 抗体、抗 IL-4R 抗体、抗 IL-6R 抗体、抗 TIGHT 抗体、抗 Tenascin-C 抗体、抗 SLC44A4 抗体、抗 PCSK9 抗体、抗 EpCAM

抗体、抗 CTGF 抗体、抗 TSLP 抗体、抗 CEA 抗体、抗 Mesothelin 抗体和抗 FcRn 抗体。

5 在一些实施方案中，如前所述的降低抗体的重链和/或抗体的轻链的 N 末端异质性的方法，其中，所述的抗体选自 Trastuzumab、Pertuzumab、Nimotuzumab、Enoblituzumab、Emibetuzumab、Inotuzumab、Pinatuzumab、Brentuximab、Gemtuzumab、Bivatuzumab、Lorvotuzumab、cBR96、Glematumamab、抗 Claudin18.2 抗体和抗 FcRn 抗体，其中所述抗 Claudin18.2 抗体的重链包含 SEQ ID NO: 49 的氨基酸序列、轻链包含 SEQ ID NO: 47 的氨基酸序列；所述抗 FcRn 抗体的重链包含 SEQ ID NO: 167 的氨基酸序列，轻链包含 SEQ ID NO: 168 的氨基酸序列。

10 在一些实施方案中，如前所述的降低抗体的重链和/或抗体的轻链的 N 末端异质性的方法，所述方法包括将轻链质粒克隆至重链质粒中构建全长抗体质粒。在一些实施方案中，所述方法通过电转化将质粒导入宿主细胞。

本披露还提供一种信号肽，其包含 SEQ ID NO: 55 或 SEQ ID NO: 56 的氨基酸序列，或由其组成。在一些实施方案中，所述的多肽是信号肽，其氨基酸序列如
15 SEQ ID NO: 55 至 SEQ ID NO: 151 任一所示。

一种多肽，其包含信号肽，所述信号肽包含 SEQ ID NO: 55 或 SEQ ID NO: 56 的氨基酸序列。

20 在一些实施方案中，如前所述的多肽，其中，所述多肽还包含与所述信号肽有效连接的异源多肽；在一些实施方案中，所述异源多肽是抗体的重链或抗体的轻链；在一些实施方案中，所述信号肽与抗体的重链或抗体的轻链的 N 端有效连接。

在一些实施方案中，如前所述的多肽，其中，所述信号肽包含选自 SEQ ID NO 57 至 SEQ ID NO: 151 组成的组的氨基酸序列。

25 在一些实施方案中，如前所述的多肽，其中，所述信号肽包含 SEQ ID NO: 57、SEQ ID NO: 58、SEQ ID NO: 59、SEQ ID NO: 93、SEQ ID NO: 94、SEQ ID NO: 95、SEQ ID NO: 99、SEQ ID NO: 100、SEQ ID NO: 101、SEQ ID NO: 105、SEQ ID NO: 106、SEQ ID NO: 107、SEQ ID NO: 140、SEQ ID NO: 141、SEQ ID NO: 142、SEQ ID NO: 146、SEQ ID NO: 147 或 SEQ ID NO: 148 的氨基酸序列。

30 在一些实施方案中，如前所述的多肽，其中，所述信号肽包含选自如 SEQ ID NO: 57 和 SEQ ID NO: 105 所示的氨基酸序列。

在一些实施方案中，如前所述的多肽，其中，多肽包含选自 SEQ ID NO: 157、SEQ ID NO: 158、SEQ ID NO: 159、SEQ ID NO: 160、SEQ ID NO: 163、SEQ ID NO: 164、SEQ ID NO: 165、SEQ ID NO: 166、SEQ ID NO: 169、SEQ ID NO: 170、SEQ ID NO: 171 和 SEQ ID NO: 172 组成的组的氨基酸序列。

35 本披露还提供一种核酸分子，其编码如前一项所述的多肽。

本披露还提供一种宿主细胞，其包含如前所述的核酸分子。

在一些实施方案中，如前所述的宿主细胞，其中，所述宿主细胞是真核宿主细胞；在一些实施方案中，所述真核宿主细胞是 CHO 细胞或酵母。

本披露还提供一种组合物，其含有异源多肽，所述异源多肽具有低于 3%、2.5%、2%、1.5%或 1%的末端延伸比率；在一些实施方案中，表达得到的所述异源多肽具有低于 1%的末端延伸比率；在一些实施方案中，表达得到的所述异源多肽具有低于 1%的末端延伸比率，并且该末端延伸比率是基于肽图检测方法测算的；在一些实施方案中，表达得到的所述异源多肽基本上没有末端残基的残留；在一些实施方案中，表达得到的所述异源多肽具有 0%的末端延伸比率。

在一些实施方案中，如前所述的组合物，其中，所述的异源多肽是抗体的重链和/或抗体的轻链；在一些实施方案中，所述抗体选自 Trastuzumab、Pertuzumab、抗 Claudin18.2 抗体和抗 FcRn 抗体，其中所述抗 Claudin18.2 抗体的重链包含 SEQ ID NO: 49 的氨基酸序列，轻链包含 SEQ ID NO: 47 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述抗体选自抗 FcRn 抗体，其中所述抗 FcRn 抗体的重链包含 SEQ ID NO: 167 的氨基酸序列，轻链包含 SEQ ID NO: 168 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，如前所述的降低抗体的重链和/或抗体的轻链的 N 末端异质性的方法，其中，表达得到的所述抗体的重链和/或抗体的轻链具有低于 3%、2.5%、2%、1.5%或 1%的末端延伸比率；在一些实施方案中，表达得到的所述抗体重链和/或抗体的轻链具有低于 1%的末端延伸比率；在一些实施方案中，表达得到的所述抗体重链和/或抗体的轻链具有低于 1%的末端延伸比率，并且该末端延伸比率是基于肽图检测方法测算的；在一些实施方案中，表达得到的所述抗体重链和/或抗体的轻链基本上没有末端残基的残留；在一些实施方案中，表达得到的所述抗体重链和/或抗体的轻链具有 0%的末端延伸比率。

在一些实施方案中，如前所述的组合物，其是由如前一项所述的方法制备得到的。

本披露提供的信号肽具有稳定的降低异源多肽末端异质性的效果，适用于大规模表达异源多肽。

附图说明

图 1：在细胞水平上，人源化抗体与人 Claudin18.2 结合的 FACS 检测结果。

图 2：人源化抗体的 NUGC4 细胞内吞实验。

图 3A 至图 3C：在不同 Claudin18.2 表达程度的 NUGC4 细胞中，抗体的 ADCC 效应检测；图 3A 为抗体在野生型 NUGC4 细胞（Claudin18.2 低表达）中的 ADCC 效应检测；图 3B 为抗体在 Claudin18.2 中等表达 NUGC4 细胞中的 ADCC 效应检测；图 3C 为抗体在 Claudin18.2 高表达 NUGC4 细胞中的 ADCC 效应检测。

图 4A 至图 4D：图 4A 为 Pertuzumab-1 抗体轻链去糖还原分子量质谱图；图 4B 为 Pertuzumab-3 抗体轻链去糖还原分子量质谱图；图 4C 为 Pertuzumab-1 抗体

重链链去糖还原分子量质谱图；图 4D 为 Pertuzumab-3 抗体重链去糖还原分子量质谱图。

图 5A 至图 5D：图 5A 为 Pertuzumab-2 抗体轻链去糖还原分子量质谱图；图 5B 为 Pertuzumab-4 抗体轻链去糖还原分子量质谱图；图 5C 为 Pertuzumab-2 抗体重链链去糖还原分子量质谱图；图 5D 为 Pertuzumab-4 抗体重链去糖还原分子量质谱图。

图 6A 至图 6D：图 6A 为 h1902-5-1 抗体轻链去糖还原分子量质谱图；图 6B 为 h1902-5-2 抗体轻链去糖还原分子量质谱图；图 6C 为 h1902-5-1 抗体重链链去糖还原分子量质谱图；图 6D 为 h1902-5-2 抗体重链去糖还原分子量质谱图。

图 7A 至图 7D：图 7A 为 FcRn-1 抗体轻链去糖还原分子量质谱图；图 7B 为 FcRn-2 抗体轻链去糖还原分子量质谱图；图 7C 为 FcRn-1 抗体重链链去糖还原分子量质谱图；图 7D 为 FcRn-2 抗体重链去糖还原分子量质谱图。

具体实施方式

15 发明详述

术语

为了更容易理解本披露，以下具体定义了某些技术和科学术语。除非在本文中另有明确定义，本文使用的所有其它技术和科学术语都具有本披露所属领域的一般技术人员通常理解的含义。

20 本披露所用氨基酸三字母代码和单字母代码如 *J.biol.chem*, 243, p3558(1968) 中所述。

本披露所述的“抗体”在本文中以最广意义使用，并且包括不同的抗体结构，包括，但不限于，单克隆抗体，多克隆抗体，鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、多特异性抗体(例如，双特异性抗体)和抗体片段，只要它们显示所需的抗原结合活性和特异性即可。

术语“抗体片段”是指不同于完整抗体的分子，其包含完整抗体的部分，所述部分与完整抗体特异性结合的抗原特异性结合。抗体片段的实例包括但不限于 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, 双抗体，线性抗体，单链抗体分子(例如 scFv 或 scFab)，单域抗体(dAbs)，和由抗体片段形成的多特异性抗体。

30 本披露所述的“嵌合抗体(chimeric antibody)”，是将鼠源性抗体的可变区与人抗体的恒定区融合而成的抗体，可以减轻鼠源性抗体诱发的免疫应答反应。

本披露所述的“人源化抗体(humanized antibody)”，也称为 CDR 移植抗体(CDR-grafted antibody)，是指将鼠的 CDR 序列移植到人的抗体可变区框架，即不同类型的人种系抗体框架序列中产生的抗体。可以克服嵌合抗体由于携带大量鼠蛋白成分，从而诱导的异源性反应。为避免免疫原性下降的同时，引起的活性下降，可对所述的人抗体可变区框架序列进行最少反向突变或回复突变，以保持

或增强活性。本披露的人源化抗体也包括进一步由酵母菌展示对 CDR 进行亲和力成熟突变后的人源化抗体。

本披露中“人抗体 (HuMAb)”、“人源抗体”、“全人抗体”、“完全人抗体”可以互换使用，其氨基酸序列对应于由人或人细胞产生的抗体的氨基酸序列、或衍生自利用人抗体组库或其它人抗体编码序列的非人来源的氨基酸序列。该人抗体的定义明确排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

本披露所述的“抗体片段”是指不同于完整抗体的分子，其包含完整抗体的部分，所述部分与完整抗体特异性结合的抗原特异性结合。抗体片段的实例包括但不限于 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, 双抗体, 线性抗体, 单链抗体分子(例如 scFv 或 scFab), 单域抗体(dAbs), 和由抗体片段形成的多特异性抗体。本披露的“抗体”包含“完整抗体”及其“抗体片段”。相应的，本披露所述的抗体的重链或抗体的轻链包含完整的重链或完整的轻链，也包含抗体片段中的重链片段或轻链片段。

术语“框架”或“FR”指除了互补决定区(CDR)残基以外的可变域残基。可变域的 FR 一般由四个 FR 域组成：FR1、FR2、FR3 和 FR4。因而，CDR 和 FR 序列一般以下面的次序在 VH (或 VL) 中出现：

FR1-HCDR1(LCDR1)-FR2-HCDR2(LCDR2)-FR3-HCDR3(LCDR3)-FR4。

术语“互补决定区”、“CDR”或“高变区”是指抗体的可变结构域内主要促成抗原结合的 6 个高变区之一。通常，每个重链可变区中存在三个 CDR(HCDR1、HCDR2、HCDR3)，每个轻链可变区中存在三个 CDR(LCDR1、LCDR2、LCDR3)。可以使用各种公知方案中的任何一种来确定 CDR 的氨基酸序列边界，包括“Kabat”编号规则(参见 Kabat 等(1991)，“Sequences of Proteins of Immunological Interest”，第 5 版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD)、“Chothia”编号规则(参见 Al-Lazikani 等人，(1997) JMB 273: 927-948)和 ImMunoGenTics (IMGT) 编号规则(Lefranc M.P., Immunologist, 7, 132-136 (1999)；Lefranc, M.P.等, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003) 等。例如，对于经典格式，遵循 Kabat 规则，所述重链可变域(VH)中的 CDR 氨基酸残基编号为 31-35(HCDR1)、50-65 (HCDR2) 和 95-102 (HCDR3)；轻链可变域 (VL) 中的 CDR 氨基酸残基编号为 24-34 (LCDR1)、50-56 (LCDR2) 和 89-97 (LCDR3)。遵循 Chothia 规则，VH 中的 CDR 氨基酸编号为 26-32 (HCDR1)、52-56 (HCDR2) 和 95-102 (HCDR3)；并且 VL 中的氨基酸残基编号为 26-32 (LCDR1)、50-52 (LCDR2) 和 91-96 (LCDR3)。通过组合 Kabat 和 Chothia 两者的 CDR 定义，CDR 由人 VH 中的氨基酸残基 26-35 (HCDR1)、50-65 (HCDR2) 和 95-102 (HCDR3) 和人 VL 中的氨基酸残基 24-34 (LCDR1)、50-56 (LCDR2) 和 89-97 (LCDR3) 构成。遵循 IMGT 规则，VH 中的 CDR 氨基酸残基编号大致为 26-35 (CDR1)、51-57 (CDR2) 和 93-102 (CDR3)，VL 中的 CDR 氨基酸残基编号大致为 27-32 (CDR1)、

50-52 (CDR2) 和 89-97 (CDR3)。遵循 IMGT 规则, 抗体的 CDR 区可以使用程序 IMGT/DomainGap Align 确定。除非另有说明, 本披露实施例涉及的抗体可变区和 CDR 序列均适用“Kabat”编号规则。

术语“特异性结合”、“选择性结合”、“选择性地结合”和“特异性地结合”是指抗体对预先确定的抗原上的表位的结合。通常, 抗体以大约小于 10^{-8}M , 例如大约小于 10^{-9}M 、 10^{-10}M 、 10^{-11}M 、 10^{-12}M 或更小的亲和力 (KD) 结合。

术语“KD”是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数。通常, 本披露的抗体以小于大约 10^{-7}M , 例如小于大约 10^{-8}M 或 10^{-9}M 的解离平衡常数 (KD) 结合抗原, 例如, 在本披露中抗体与细胞表面抗原的亲和力采用 FACS 法测定 KD 值。

本披露中可互换使用的“多核苷酸”或“核酸分子”指任意长度的核苷酸聚合物, 且包括 DNA 和 RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、修饰的核苷酸或碱基、和/或其类似物, 或可以通过 DNA 或 RNA 聚合酶或通过合成反应掺入聚合物的任意底物。多核苷酸可以包含修饰的核苷酸, 如甲基化的核苷酸及其类似物。如果存在, 则对核苷酸结构的修饰可以在组装聚合物之前或之后进行。核苷酸的序列可以由非核苷酸成分中断。

本披露中所述的“有效连接的”指两种或多种成分的并列, 其中所述成分处于允许它们以其预期方式发挥作用的关系中。例如, 如果启动子顺式作用来控制或调节所连接的序列的转录, 则它与编码序列有效连接。通常, 但并非必然, “有效连接的”DNA 序列是相邻的, 且在有必要连接两个蛋白质编码区时或在分泌前导序列的情况下是相邻和符合可读框的。但是, 虽然有效连接的启动子通常位于编码序列的上游, 但它并非必然与它相邻。有效连接的增强子可以位于编码序列上游、编码序列内或编码序列下游, 且距启动子相当的距离。通过本领域已知重组方法来实现连接, 例如, 使用 PCR 方法, 通过退火, 或通过方便的限制位点处连接。如果不存在方便的限制位点, 则按照常规实施使用合成的寡核苷酸衔接子或接头。本披露中, 信号肽与异源多肽的一种连接方式是直接连接。

本披露中所述的“宿主细胞”指已进行遗传改变或能够通过引入外源多核苷酸(如重组质粒或载体)进行遗传改变的细胞。应理解, 这类术语旨在不仅指具体个体细胞, 还指这种细胞的后代。由于连续世代中可发生由突变或环境影响引起的某些修饰, 这种后代实际上可以与亲本细胞不同, 但仍包括在本披露所用的术语“宿主细胞”的范围内。宿主细胞可以微生物(如真核微生物)或动物细胞, 适当的微生物包括酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和毕赤酵母(*Pichia pastoris*); 适当的动物宿主细胞系包括 CHO(中国仓鼠卵巢细胞系)、293 细胞和 NS0 细胞。

本披露中所述的“多肽”泛指来自任意细胞来源的具有超过约 10 个氨基酸的肽和蛋白质。“异源”多肽是对所利用的宿主细胞而言为外来的那些多肽, 如通过宿主细胞产生的人蛋白质。异源多肽可以是原核的或真核的, 如哺乳动物的或人的。异源多肽可以是重组产生的多肽或重组多肽。

5 示例性异源多肽包括跨膜分子（例如受体，如受体酪氨酸激酶）或配体，如生长因子。示例性异源多肽包括诸如以下的分子：肾素；生长激素，包括人生长激素和牛生长激素；生长激素释放因子；甲状旁腺激素；促甲状旁腺激素；脂蛋白； α 1-抗胰蛋白酶；胰岛素 A 链；胰岛素 B 链；胰岛素原；促卵泡激素；降钙素；

10 黄体生成素；胰高血糖素；凝血因子，如因子 VIIIc、因子 IX、组织因子(TF)和 von Willebrands 因子；抗凝血因子，如蛋白 C；心房钠尿肽；肺表面活性剂；纤溶酶原激活物，如尿激酶或人尿或组织型纤溶酶原激活物(t-PA)；铃蟾肽；凝血酶；造血生长因子；肿瘤坏死因子- α 和- β ；脑啡肽酶；RANTES(regulated onactivation normally T-cell expressed and secreted)；人巨噬细胞炎症蛋白(MIP-1- α)；血清白蛋白，如人血清白蛋白；Muellerian 抑制物质；松弛素 A 链；松弛素 B 链；松弛素原；小鼠促性腺激素相关肽；微生物蛋白质，如 β -内酰胺酶；DNA 酶；IgE；细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原(CTLA)，如 CTLA-4；抑制素；激活蛋白；血管内皮生长因子(VEGF)；激素或生长因子的受体；蛋白 A 或 D；类风湿因子；神经营养因子，如骨衍生神经营养因子(BDNF)，神经营养蛋白-3、-4、-5 或-6(NT-3、NT-4、

15 NT-5 或 NT-6)，或神经生长因子如 NGF β ；血小板衍生生长因子(PDGF)；成纤维细胞生长因子，如 aFGF 和 bFGF；表皮生长因子(EGF)；转化生长因子(TGF)，如 TGF- α 和 TGF- β ，包括 TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4 或 TGF- β 5；胰岛素样生长因子-I 和-II(IGF-I 和 IGF-II)；des(1-3)-IGF-I(脑 IGF-I)，胰岛素样生长因子结合蛋白；CD 蛋白，如 CD3、CD4、CD8、CD19、CD20 和 CD40；促红细胞生成素；骨诱导因子；免疫毒素；骨形态发生蛋白(BMP)；干扰素，如干扰素- α 、- β 和- γ ；集落刺激因子(CSF)，例如 M-CSF、GM-CSF 和 G-CSF；白介素(IL)，例如 IL-1 至 IL-10；超氧化物歧化酶；T-细胞受体；表面膜蛋白；衰变加速因子；病毒抗原，例如 AIDS 被膜的部分；转运蛋白；归巢受体；地址素；调节蛋白；整联蛋白，如 CD11a、CD11b、CD11c、CD18、ICAM、VLA-4 和 VCAM；肿瘤相关抗原，如 HER2、HER3 或 HER4 受体；及任意上列多肽的片段。

25

异源多肽也可以是抗体，示例性的，所述抗体的靶标包括但不限于 A33、BMPI、BMP2、BMP3B(GDFIO)、BMP4、BMP6、BMP8、CSFI(M-CSF)、CSF2(GM-CSF)、CSF3(G-CSF)、EPO、FGFI(aFGF)、FGF2(bFGF)、FGF3(int-2)、FGF4(HST)、FGF5、FGF6(HST-2)、FGF7(KGF)、FGF9、FGF10、FGF11、FGF12、FGF12B、FGF14、

30 FGF16、FGF17、FGF19、FGF20、FGF21、FGF23、IGF1、IGF2、IFNA1、IFNA2、IFNA4、IFNA5、IFNA6、IFNA7、IFNBI、IFNG、IFNWI、FELI、FELI(EPSELON)、FELI(ZETA)、IL1A、IL1B、IL2、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL8、IL9、IL10、IL11、IL12A、IL12B、IL13、IL14、IL15、IL16、IL17、IL17B、IL18、IL19、IL20、IL22、IL23、IL24、IL25、IL26、IL27、IL28A、IL28B、IL29、IL30、PDGFA、

35 PDGFB、TGFA、TGFB1、TGFB2、TGFB3、LTA(TNF-b)、LTB、TNF(TNF-a)、TNFSF4(OX40 配体)、TNFSF5(CD40 配体)、TNFSF6(FasL)、TNFSF7(CD27 配体)、

TNFSF8(CD30 配体)、TNFSF9(4-1BB 配体)、TNFSF10(TRAIL)、TNFSF11(TRANCE)、
 TNFSF12(AP03L) 、 TNFSF13(April) 、 TNFSF13B 、 TNFSF14(HVEM-L) 、
 TNFSF15(VEGI)、TNFSF18、HGF(VEGFD)、VEGF、VEGFB、VEGFC、IL1R1、
 5 IL1R2、IL1RL1、IL1RL2、IL2RA、IL2RB、IL2RG、IL3RA、IL4R、IL5RA、IL6R、
 IL7R、IL8RA、IL8RB、IL9R、IL10RA、IL10RB、IL11RA、IL12RB1、IL12RB2、
 IL13RA1、IL13RA2、IL15RA、IL17R、IL18R1、IL20RA、IL21R、IL22R、IL1HY1、
 IL1RAP、IL1RAPL1、IL1RAPL2、IL1RN、IL6ST、IL18BP、IL18RAP、IL22RA2、
 AIFI、HGF、LEP(瘦蛋白)、PTN、THPO、CCL1(I-309)、CCL2(MCP-1/MCAF)、
 CCL3(MIP-1a)、CCL4(MIP-1b)、CCL5(RANTES)、CCL7(MCP-3)、CCL8(mcp-2)、
 10 CCLH(eotaxin)、CCL13(MCP-4)、CCL15(MIP-1d)、CCL16(HCC-4)、CCL17(TARC)、
 CCL18(PARC) 、 CCL19(MDP-3b) 、 CCL20(MIP-3a) 、 CCL21(SLC/exodus-2) 、
 CCL22(MDC/STC-I)、CCL23(MPIF-I)、CCL24(MPIF-2/eotaxin-2)、CCL25(TECK)、
 CCL26(eotaxin-3)、CCL27(CTACK/ILC)、CCL28、CXCL1(GRO1)、CXCL2(GR02)、
 CXCL3(GR03)、CXCL5(ENA-78)、CXCL6(GCP-2)、CXCL9(MIG)、CXCL10(IP 10)、
 15 CXCL11(I-TAC)、CXCL12(SDF1)、CXCL13、CXCL14、CXCL16、PF4(CXCL4)、
 PPBP(CXCL7)、CX3CL1(SCYDI)、SCYE1、XCL1(lymphotactin)、XCL2(SCM-1b)、
 BLRI(MDR15)、CCBP2(D6/JAB61)、CCR1(CKR1/HM145)、CCR2(mcp-IRB/RA)、
 CCR3(CKR3/CMKBR3) 、 CCR4 、 CCR5(CMKBR5/ChemR13) 、
 CCR6(CMKBR6/CKR-L3/STRL22/DRY6) 、 CCR7(CKR7/EBI2) 、
 20 CCR8(CMKBR8/TER1/CKR-L1)、CCR9(GPR-9-6)、CCRL1(VSHKI)、CCRL2(L-CCR)、
 XCRI(GPR5/CCXCR1)、CMKLR1、CMKOR1(RDC1)、CX3CR1(V28)、CXCR4、
 GPR2(CCR10) 、 GPR31 、 GPR81(FKSG80) 、 CXCR3(GPR9/CKR-L2) 、
 CXCR6(TYMSTR/STRL33/Bonzo) 、 HM74 、 IL8RA(IL8Ra) 、 IL8RB(IL8Rb) 、
 LTB4R(GPR16)、TCPIO、CKLFSF2、CKLFSF3、CKLFSF4、CKLFSF5、CKLFSF6、
 25 CKLFSF7、CKLFSF8、BDNF、C5R1、CSF3、GRCCIO(CIO)、EPO、FY(DARC)、
 GDF5、HDFIA、DL8、PRL、RGS3、RGS13、SDF2、SLIT2、TLR2、TLR4、TREMI、
 TREM2、VHL、ABCF1、ACVRI、ACVR1B、ACVR2、ACVR2B、ACVRLI、ADORA2A、
 Aggrecan、AGR2、AICDA、AIFI、AIGI、AKAPI、AKAP2、AMH、AMHR2、
 ANGPT1、ANGPT2、ANGPTL3、ANGPTL4、ANPEP、APC、APOCI、AR、AZGPI(锌
 30 -a-糖蛋白)、A β 、B7.1、B7.2、B7H3、BAD、BAFF(BLys)、BAGI、BAH、BCL2、
 BCL6、BDNF、BLNK、BLRI(MDR15)、BMPI、BMP2、BMP3B(GDF10)、BMP4、
 BMP6、BMP8、BMPRI1、BMPRI2、BMPRI3、BMPRI4、BMPRI5、BMPRI6、BMPRI7、
 BMPRI8、BMPRI9、BMPRI10、BMPRI11、BMPRI12、BMPRI13、BMPRI14、BMPRI15、
 BMPRI16、BMPRI17、BMPRI18、BMPRI19、BMPRI20、BMPRI21、BMPRI22、BMPRI23、
 BMPRI24、BMPRI25、BMPRI26、BMPRI27、BMPRI28、BMPRI29、BMPRI30、BMPRI31、
 BMPRI32、BMPRI33、BMPRI34、BMPRI35、BMPRI36、BMPRI37、BMPRI38、BMPRI39、
 BMPRI40、BMPRI41、BMPRI42、BMPRI43、BMPRI44、BMPRI45、BMPRI46、BMPRI47、
 BMPRI48、BMPRI49、BMPRI50、BMPRI51、BMPRI52、BMPRI53、BMPRI54、BMPRI55、
 BMPRI56、BMPRI57、BMPRI58、BMPRI59、BMPRI60、BMPRI61、BMPRI62、BMPRI63、
 BMPRI64、BMPRI65、BMPRI66、BMPRI67、BMPRI68、BMPRI69、BMPRI70、BMPRI71、
 BMPRI72、BMPRI73、BMPRI74、BMPRI75、BMPRI76、BMPRI77、BMPRI78、BMPRI79、
 BMPRI80、BMPRI81、BMPRI82、BMPRI83、BMPRI84、BMPRI85、BMPRI86、BMPRI87、
 BMPRI88、BMPRI89、BMPRI90、BMPRI91、BMPRI92、BMPRI93、BMPRI94、BMPRI95、
 BMPRI96、BMPRI97、BMPRI98、BMPRI99、BMPRI100、BMPRI101、BMPRI102、
 BMPRI103、BMPRI104、BMPRI105、BMPRI106、BMPRI107、BMPRI108、BMPRI109、
 BMPRI110、BMPRI111、BMPRI112、BMPRI113、BMPRI114、BMPRI115、BMPRI116、
 BMPRI117、BMPRI118、BMPRI119、BMPRI120、BMPRI121、BMPRI122、BMPRI123、
 BMPRI124、BMPRI125、BMPRI126、BMPRI127、BMPRI128、BMPRI129、BMPRI130、
 BMPRI131、BMPRI132、BMPRI133、BMPRI134、BMPRI135、BMPRI136、BMPRI137、
 BMPRI138、BMPRI139、BMPRI140、BMPRI141、BMPRI142、BMPRI143、BMPRI144、
 BMPRI145、BMPRI146、BMPRI147、BMPRI148、BMPRI149、BMPRI150、BMPRI151、
 BMPRI152、BMPRI153、BMPRI154、BMPRI155、BMPRI156、BMPRI157、BMPRI158、
 BMPRI159、BMPRI160、BMPRI161、BMPRI162、BMPRI163、BMPRI164、BMPRI165、
 BMPRI166、BMPRI167、BMPRI168、BMPRI169、BMPRI170、BMPRI171、BMPRI172、
 BMPRI173、BMPRI174、BMPRI175、BMPRI176、BMPRI177、BMPRI178、BMPRI179、
 BMPRI180、BMPRI181、BMPRI182、BMPRI183、BMPRI184、BMPRI185、BMPRI186、
 BMPRI187、BMPRI188、BMPRI189、BMPRI190、BMPRI191、BMPRI192、BMPRI193、
 BMPRI194、BMPRI195、BMPRI196、BMPRI197、BMPRI198、BMPRI199、BMPRI200、
 BMPRI201、BMPRI202、BMPRI203、BMPRI204、BMPRI205、BMPRI206、BMPRI207、
 BMPRI208、BMPRI209、BMPRI210、BMPRI211、BMPRI212、BMPRI213、BMPRI214、
 BMPRI215、BMPRI216、BMPRI217、BMPRI218、BMPRI219、BMPRI220、BMPRI221、
 BMPRI222、BMPRI223、BMPRI224、BMPRI225、BMPRI226、BMPRI227、BMPRI228、
 BMPRI229、BMPRI230、BMPRI231、BMPRI232、BMPRI233、BMPRI234、BMPRI235、
 BMPRI236、BMPRI237、BMPRI238、BMPRI239、BMPRI240、BMPRI241、BMPRI242、
 BMPRI243、BMPRI244、BMPRI245、BMPRI246、BMPRI247、BMPRI248、BMPRI249、
 BMPRI250、BMPRI251、BMPRI252、BMPRI253、BMPRI254、BMPRI255、BMPRI256、
 BMPRI257、BMPRI258、BMPRI259、BMPRI260、BMPRI261、BMPRI262、BMPRI263、
 BMPRI264、BMPRI265、BMPRI266、BMPRI267、BMPRI268、BMPRI269、BMPRI270、
 BMPRI271、BMPRI272、BMPRI273、BMPRI274、BMPRI275、BMPRI276、BMPRI277、
 BMPRI278、BMPRI279、BMPRI280、BMPRI281、BMPRI282、BMPRI283、BMPRI284、
 BMPRI285、BMPRI286、BMPRI287、BMPRI288、BMPRI289、BMPRI290、BMPRI291、
 BMPRI292、BMPRI293、BMPRI294、BMPRI295、BMPRI296、BMPRI297、BMPRI298、
 BMPRI299、BMPRI300、BMPRI301、BMPRI302、BMPRI303、BMPRI304、BMPRI305、
 BMPRI306、BMPRI307、BMPRI308、BMPRI309、BMPRI310、BMPRI311、BMPRI312、
 BMPRI313、BMPRI314、BMPRI315、BMPRI316、BMPRI317、BMPRI318、BMPRI319、
 BMPRI320、BMPRI321、BMPRI322、BMPRI323、BMPRI324、BMPRI325、BMPRI326、
 BMPRI327、BMPRI328、BMPRI329、BMPRI330、BMPRI331、BMPRI332、BMPRI333、
 BMPRI334、BMPRI335、BMPRI336、BMPRI337、BMPRI338、BMPRI339、BMPRI340、
 BMPRI341、BMPRI342、BMPRI343、BMPRI344、BMPRI345、BMPRI346、BMPRI347、
 BMPRI348、BMPRI349、BMPRI350、BMPRI351、BMPRI352、BMPRI353、BMPRI354、
 BMPRI355、BMPRI356、BMPRI357、BMPRI358、BMPRI359、BMPRI360、BMPRI361、
 BMPRI362、BMPRI363、BMPRI364、BMPRI365、BMPRI366、BMPRI367、BMPRI368、
 BMPRI369、BMPRI370、BMPRI371、BMPRI372、BMPRI373、BMPRI374、BMPRI375、
 BMPRI376、BMPRI377、BMPRI378、BMPRI379、BMPRI380、BMPRI381、BMPRI382、
 BMPRI383、BMPRI384、BMPRI385、BMPRI386、BMPRI387、BMPRI388、BMPRI389、
 BMPRI390、BMPRI391、BMPRI392、BMPRI393、BMPRI394、BMPRI395、BMPRI396、
 BMPRI397、BMPRI398、BMPRI399、BMPRI400、BMPRI401、BMPRI402、BMPRI403、
 BMPRI404、BMPRI405、BMPRI406、BMPRI407、BMPRI408、BMPRI409、BMPRI410、
 BMPRI411、BMPRI412、BMPRI413、BMPRI414、BMPRI415、BMPRI416、BMPRI417、
 BMPRI418、BMPRI419、BMPRI420、BMPRI421、BMPRI422、BMPRI423、BMPRI424、
 BMPRI425、BMPRI426、BMPRI427、BMPRI428、BMPRI429、BMPRI430、BMPRI431、
 BMPRI432、BMPRI433、BMPRI434、BMPRI435、BMPRI436、BMPRI437、BMPRI438、
 BMPRI439、BMPRI440、BMPRI441、BMPRI442、BMPRI443、BMPRI444、BMPRI445、
 BMPRI446、BMPRI447、BMPRI448、BMPRI449、BMPRI450、BMPRI451、BMPRI452、
 BMPRI453、BMPRI454、BMPRI455、BMPRI456、BMPRI457、BMPRI458、BMPRI459、
 BMPRI460、BMPRI461、BMPRI462、BMPRI463、BMPRI464、BMPRI465、BMPRI466、
 BMPRI467、BMPRI468、BMPRI469、BMPRI470、BMPRI471、BMPRI472、BMPRI473、
 BMPRI474、BMPRI475、BMPRI476、BMPRI477、BMPRI478、BMPRI479、BMPRI480、
 BMPRI481、BMPRI482、BMPRI483、BMPRI484、BMPRI485、BMPRI486、BMPRI487、
 BMPRI488、BMPRI489、BMPRI490、BMPRI491、BMPRI492、BMPRI493、BMPRI494、
 BMPRI495、BMPRI496、BMPRI497、BMPRI498、BMPRI499、BMPRI500、BMPRI501、
 BMPRI502、BMPRI503、BMPRI504、BMPRI505、BMPRI506、BMPRI507、BMPRI508、
 BMPRI509、BMPRI510、BMPRI511、BMPRI512、BMPRI513、BMPRI514、BMPRI515、
 BMPRI516、BMPRI517、BMPRI518、BMPRI519、BMPRI520、BMPRI521、BMPRI522、
 BMPRI523、BMPRI524、BMPRI525、BMPRI526、BMPRI527、BMPRI528、BMPRI529、
 BMPRI530、BMPRI531、BMPRI532、BMPRI533、BMPRI534、BMPRI535、BMPRI536、
 BMPRI537、BMPRI538、BMPRI539、BMPRI540、BMPRI541、BMPRI542、BMPRI543、
 BMPRI544、BMPRI545、BMPRI546、BMPRI547、BMPRI548、BMPRI549、BMPRI550、
 BMPRI551、BMPRI552、BMPRI553、BMPRI554、BMPRI555、BMPRI556、BMPRI557、
 BMPRI558、BMPRI559、BMPRI560、BMPRI561、BMPRI562、BMPRI563、BMPRI564、
 BMPRI565、BMPRI566、BMPRI567、BMPRI568、BMPRI569、BMPRI570、BMPRI571、
 BMPRI572、BMPRI573、BMPRI574、BMPRI575、BMPRI576、BMPRI577、BMPRI578、
 BMPRI579、BMPRI580、BMPRI581、BMPRI582、BMPRI583、BMPRI584、BMPRI585、
 BMPRI586、BMPRI587、BMPRI588、BMPRI589、BMPRI590、BMPRI591、BMPRI592、
 BMPRI593、BMPRI594、BMPRI595、BMPRI596、BMPRI597、BMPRI598、BMPRI599、
 BMPRI600、BMPRI601、BMPRI602、BMPRI603、BMPRI604、BMPRI605、BMPRI606、
 BMPRI607、BMPRI608、BMPRI609、BMPRI610、BMPRI611、BMPRI612、BMPRI613、
 BMPRI614、BMPRI615、BMPRI616、BMPRI617、BMPRI618、BMPRI619、BMPRI620、
 BMPRI621、BMPRI622、BMPRI623、BMPRI624、BMPRI625、BMPRI626、BMPRI627、
 BMPRI628、BMPRI629、BMPRI630、BMPRI631、BMPRI632、BMPRI633、BMPRI634、
 BMPRI635、BMPRI636、BMPRI637、BMPRI638、BMPRI639、BMPRI640、BMPRI641、
 BMPRI642、BMPRI643、BMPRI644、BMPRI645、BMPRI646、BMPRI647、BMPRI648、
 BMPRI649、BMPRI650、BMPRI651、BMPRI652、BMPRI653、BMPRI654、BMPRI655、
 BMPRI656、BMPRI657、BMPRI658、BMPRI659、BMPRI660、BMPRI661、BMPRI662、
 BMPRI663、BMPRI664、BMPRI665、BMPRI666、BMPRI667、BMPRI668、BMPRI669、
 BMPRI670、BMPRI671、BMPRI672、BMPRI673、BMPRI674、BMPRI675、BMPRI676、
 BMPRI677、BMPRI678、BMPRI679、BMPRI680、BMPRI681、BMPRI682、BMPRI683、
 BMPRI684、BMPRI685、BMPRI686、BMPRI687、BMPRI688、BMPRI689、BMPRI690、
 BMPRI691、BMPRI692、BMPRI693、BMPRI694、BMPRI695、BMPRI696、BMPRI697、
 BMPRI698、BMPRI699、BMPRI700、BMPRI701、BMPRI702、BMPRI703、BMPRI704、
 BMPRI705、BMPRI706、BMPRI707、BMPRI708、BMPRI709、BMPRI710、BMPRI711、
 BMPRI712、BMPRI713、BMPRI714、BMPRI715、BMPRI716、BMPRI717、BMPRI718、
 BMPRI719、BMPRI720、BMPRI721、BMPRI722、BMPRI723、BMPRI724、BMPRI725、
 BMPRI726、BMPRI727、BMPRI728、BMPRI729、BMPRI730、BMPRI731、BMPRI732、
 BMPRI733、BMPRI734、BMPRI735、BMPRI736、BMPRI737、BMPRI738、BMPRI739、
 BMPRI740、BMPRI741、BMPRI742、BMPRI743、BMPRI744、BMPRI745、BMPRI746、
 BMPRI747、BMPRI748、BMPRI749、BMPRI750、BMPRI751、BMPRI752、BMPRI753、
 BMPRI754、BMPRI755、BMPRI756、BMPRI757、BMPRI758、BMPRI759、BMPRI760、
 BMPRI761、BMPRI762、BMPRI763、BMPRI764、BMPRI765、BMPRI766、BMPRI767、
 BMPRI768、BMPRI769、BMPRI770、BMPRI771、BMPRI772、BMPRI773、BMPRI774、
 BMPRI775、BMPRI776、BMPRI777、BMPRI778、BMPRI779、BMPRI780、BMPRI781、
 BMPRI782、BMPRI783、BMPRI784、BMPRI785、BMPRI786、BMPRI787、BMPRI788、
 BMPRI789、BMPRI790、BMPRI791、BMPRI792、BMPRI793、BMPRI794、BMPRI795、
 BMPRI796、BMPRI797、BMPRI798、BMPRI799、BMPRI800、BMPRI801、BMPRI802、
 BMPRI803、BMPRI804、BMPRI805、BMPRI806、BMPRI807、BMPRI808、BMPRI809、
 BMPRI810、BMPRI811、BMPRI812、BMPRI813、BMPRI814、BMPRI815、BMPRI816、
 BMPRI817、BMPRI818、BMPRI819、BMPRI820、BMPRI821、BMPRI822、BMPRI823、
 BMPRI824、BMPRI825、BMPRI826、BMPRI827、BMPRI828、BMPRI829、BMPRI830、
 BMPRI831、BMPRI832、BMPRI833、BMPRI834、BMPRI835、BMPRI836、BMPRI837、
 BMPRI838、BMPRI839、BMPRI840、BMPRI841、BMPRI842、BMPRI843、BMPRI844、
 BMPRI845、BMPRI846、BMPRI847、BMPRI848、BMPRI849、BMPRI850、BMPRI851、
 BMPRI852、BMPRI853、BMPRI854、BMPRI855、BMPRI856、BMPRI857、BMPRI858、
 BMPRI859、BMPRI860、BMPRI861、BMPRI862、BMPRI863、BMPRI864、BMPRI865、
 BMPRI866、BMPRI867、BMPRI868、BMPRI869、BMPRI870、BMPRI871、BMPRI872、
 BMPRI873、BMPRI874、BMPRI875、BMPRI876、BMPRI877、BMPRI878、BMPRI879、
 BMPRI880、BMPRI881、BMPRI882、BMPRI883、BMPRI884、BMPRI885、BMPRI886、
 BMPRI887、BMPRI888、BMPRI889、BMPRI890、BMPRI891、BMPRI892、BMPRI893、
 BMPRI894、BMPRI895、BMPRI896、BMPRI897、BMPRI898、BMPRI899、BMPRI900、
 BMPRI901、BMPRI902、BMPRI903、BMPRI904、BMPRI905、BMPRI906、BMPRI907、
 BMPRI908、BMPRI909、BMPRI910、BMPRI911、BMPRI912、BMPRI913、BMPRI914、
 BMPRI915、BMPRI916、BMPRI917、BMPRI918、BMPRI919、BMPRI920、BMPRI921、
 BMPRI922、BMPRI923、BMPRI924、BMPRI925、BMPRI926、BMPRI927、BMPRI928、
 BMPRI929、BMPRI930、BMPRI931、BMPRI932、BMPRI933、BMPRI934、BMPRI935、
 BMPRI936、BMPRI937、BMPRI938、BMPRI939、BMPRI940、BMPRI941、BMPRI942、
 BMPRI943、BMPRI944、BMPRI945、BMPRI946、BMPRI947、BMPRI948、BMPRI949、
 BMPRI950、BMPRI951、BMPRI952、BMPRI953、BMPRI954、BMPRI955、BMPRI956、
 BMPRI957、BMPRI958、BMPRI959、BMPRI960、BMPRI961、BMPRI962、BMPRI963、
 BMPRI964、BMPRI965、BMPRI966、BMPRI967、BMPRI968、BMPRI969、BMPRI970、
 BMPRI971、BMPRI972、BMPRI973、BMPRI974、BMPRI975、BMPRI976、BMPRI977、
 BMPRI978、BMPRI979、BMPRI980、BMPRI981、BMPRI982、BMPRI983、BMPRI984、
 BMPRI985、BMPRI986、BMPRI987、BMPRI988、BMPRI989、BMPRI990、BMPRI991、
 BMPRI992、BMPRI993、BMPRI994、BMPRI995、BMPRI996、BMPRI997、BMPRI998、
 BMPRI999、BMPRI1000、BMPRI1001、BMPRI1002、BMPRI1003、BMPRI1004、BMPRI1005、
 BMPRI1006、BMPRI1007、BMPRI1008、BMPRI1009、BMPRI1010、BMPRI1011、
 BMPRI1012、BMPRI1013、BMPRI1014、BMPRI1015、BMPRI1016、BMPRI1017、
 BMPRI1018、BMPRI1019、BMPRI1020、BMPRI1021、BMPRI1022、BMPRI1023、
 BMPRI1024、BMPRI1025、BMPRI1026、BMPRI1027、BMPRI1028、BMPRI1029、
 BMPRI1030、BMPRI1031、BMPRI1032、BMPRI1033、BMPRI1034、BMPRI1035、
 BMPRI1036、BMPRI1037、BMPRI1038、BMPRI1039、BMPRI1040、BMPRI1041、
 BMPRI1042、BMPRI1043、BMPRI1044、BMPRI1045、BMPRI1046、BMPRI1047、
 BMPRI1048、BMPRI1049、BMPRI1050、BMPRI1051、BMPRI1052、BMPRI1053、
 BMPRI1054、BMPRI1055、BMPRI1056、BMPRI1057、BMPRI1058、BMPRI1059、
 BMPRI1060、BMPRI1061、BMPRI1062、BMPRI1063、BMPRI1064、BMPRI1065、
 BMPRI1066、BMPRI1067、BMPRI1068、BMPRI1069、BMPRI1070、BMPRI1071、
 BMPRI1072、BMPRI1073、BMPRI1074、BMPRI1075、BMPRI1076、BMPRI1077、
 BMPRI1078、BMPRI1079、BMPRI1080、BMPRI1081、BMPRI1082、BMPRI1083、
 BMPRI1084、BMPRI1085、BMPRI1086、BMPRI1087、BMPRI1088、BMPRI1089、
 BMPRI1090、BMPRI1091、BMPRI1092、BMPRI1093、BMPRI1094、BMPRI1095、
 BMPRI1096、BMPRI1097、BMPRI1098、BMPRI1099、BMPRI1100、BMPRI1101、
 BMPRI1102、BMPRI1103、BMPRI1104、BMPRI1105、BMPRI1106、BMPRI1107、
 BMPRI1108、BMPRI1109、BMPRI1110、BMPRI1111、BMPRI1112、BMPRI1113、
 BMPRI1114、BMPRI1115、BMPRI1116、BMPRI1117、BMPRI1118、BMPRI1119、
 BMPRI1120、BMPRI1121、BMPRI1122、BMPRI1123、BMPRI1124、BMPRI1125、
 BMPRI1126、BMPRI1127、BMPRI1128、BMPRI1129、BMPRI1130、BMPRI1131、
 BMPRI1132、BMPRI1133、BMPRI1134、BMPRI1135、BMPRI1136、BMPRI1137、
 BMPRI1138、BMPRI1139、BMPRI1140、BMPRI1141、BMPRI1142、BMPRI1143、
 BMPRI1144、BMPRI1145、BMPRI1146、BMPRI1147、BMPRI1148、BMPRI1149、
 BMPRI1150、BMPRI1151、BMPRI1152、BMPRI1153、BMPRI1154、BMPRI1155、
 BMPRI1156、BMPRI1157、BMPRI1158、BMPRI1159、BMPRI1160、BMPRI1161、
 BMPRI1162、BMPRI1163、BMPRI1164、BMPRI1165、BMPRI1166、BMPRI1167、
 BMPRI1168、BMPRI1169、BMPRI1170、BMPRI1171、BMPRI1172、BMPRI1173、
 BMPRI1174、BMPRI1175、BMPRI1176、BMPRI1177、BMPRI1178、BMPRI1179、
 BMPRI1180、BMPRI1181、BMPRI1182、BMPRI1183、BMPRI1184、BMPRI1185、
 BMPRI1186、BMPRI1187、BMPRI1188、BMPRI1189、BMPRI1190、BMPRI1191、
 BMPRI1192、BMPRI1193、BMPRI1194、BMPRI1195、BMPRI1196、BMPRI1197、
 BMPRI1198、BMPRI1199、BMPRI1200、BMPRI1201、BMPRI1202、BMPRI1203、
 BMPRI1204、BMPRI1205、BMPRI1206、BMPRI1207、BMPRI1208、BMPRI1209、
 BMPRI1210、BMPRI1211、BMPRI1212、BMPRI1213、BMPRI1214、BMPRI1215、
 BMPRI1216、BMPRI1217、BMPRI1218、BMPRI1219、BMPRI1220、BMPRI1221、
 BMPRI1222、BMPRI1223、BMPRI1224、BMPRI1225、BMPRI1226、BMPRI1227、
 BMPRI1228、BMPRI1229、BMPRI1230、BMPRI1231、BMPRI1232、BMPRI1233、
 BMPRI1234、BMPRI1235、BMPRI1236、BMPRI1237、BMPRI1238、BMPRI1239、
 BMPRI1240、BMPRI1241、BMPRI1242、BMPRI1243、BMPRI1244、BMPRI1245、
 BMPRI1246、BMPRI1247、BMPRI1248、BMPRI1249、BMPRI1250、BMPRI1251、
 BMPRI1252、BMPRI1253、BMPRI1254、BMPRI1255、BMPRI1256、BMPRI1257、
 BMPRI1258、BMPRI1259、BMPRI1260、BMPRI1261、BMPRI1262、BMPRI1263、
 BMPRI1264、BMPRI1265、BMPRI1266、BMPRI1267、BMPRI1268、BMPRI1269、
 BMPRI1270、BMPRI1271、BMPRI1272、BMPRI1273、BMPRI1274、BMPRI1275、
 BMPRI1276、BMPRI1277、BMPRI1278、BMPRI1279、BMPRI1280、BMPRI1281、
 BMPRI1282、BMPRI1283、BMPRI1284、BMPRI1285、BMPRI1286、BMPRI1287、
 BMPRI1288、BMPRI1289、BMPRI1290、BMPRI1291、BMPRI1292、BMPRI1293、
 BMPRI1294、BMPRI1295、BMPRI1296、BMPRI1297、BMPRI1298、BMPRI1299、
 BMPRI1300、BMPRI1301、BMPRI1302、BMPRI1303、BMPRI1304、BMPRI1305、
 BMPRI1306、BMPRI1307、BMPRI1308、BMPRI1309、BMPRI1310、BMPRI1311、
 BMPRI1312、BMPRI1313、BMPRI1314、BMPRI1315、BMPRI1316、BMPRI1317、
 BMPRI1318、BMPRI1319、BMPRI1320、BMPRI1321、BMPRI1322、BMPRI1323、
 BMPRI1324、BMPRI1325、BMPRI1326、BMPRI1327、BMPRI1328、BMPRI1329、
 BMPRI1330、BMPRI1331、BMPRI1332、BMPRI1333、BMPRI1334、BMPRI1335、
 BMPRI1336、BMPRI1337、BMPRI1338、BMPRI1339、BMPRI1340、BMPRI1341、
 BMPRI1342、BMPRI1343、BMPRI1344、BMPRI1345、BMPRI1346、BMPRI1347、
 BMPRI1348、BMPRI1349、BMPRI1350、BMPRI1351、BMPRI1352、BMPRI1353、
 BMPRI1354、BMPRI1355、BMPRI1356、BMPRI1357、BMPRI1358、BMPRI1359、
 BMPRI1360、BMPRI1361、BMPRI1362、BMPRI1363、BMPRI1364、BMPRI1365、
 BMPRI1366、BMPRI1367、BMPRI1368、BMPRI1369、BMPRI1370、BMPRI1371、
 BMPRI1372、BMPRI1373、BMPRI1374、BMPRI1375、BMPRI1376、BMPRI1377、
 BMPRI1378、BMPRI1379、BMPRI1380、BMPRI1381、BMPRI1382、BMPRI1383、
 BMPRI1384、BMPRI1385、BMPRI1386、BMPRI1387、BMPRI1388、BMPRI1389、
 BMPRI1390、BMPRI1391、BMPRI1392、BMP

CCL23(MPIF-1)、CCL24(MPIF-2/eotaxin-2)、CCL25(TECK)、CCL26(eotaxin-3)、
 CCL27(CTACK/ILC)、CCL28、CCL3(MTP-1a)、CCL4(MDP-1b)、CCL5(RANTES)、
 CCL7(MCP-3)、CCL8(mcp-2)、CCNAI、CCNA2、CCNDI、CCNEI、CCNE2、
 CCRI(CKRI/HM145)、CCR2(mcp-IRB/RA)；CCR3(CKR3/CMKBR3)、CCR4、
 5 CCR5(CMKBR5/ChemR13)、CCR6(CMKBR6/CKR-L3/STRL22/DRY6)、
 CCR7(CKR7/EBII)、CCR8(CMKBR8/TERI/CKR-LI)、CCR9(GPR-9-6)、
 CCRLI(VSHKI)、CCRL2(L-CCR)、CD164、CD19、CD105、CDIC、CD20、CD200、
 CD22、CD24、CD28、CD3、CD33、CD37、CD38、CD3E、CD3G、CD3Z、CD4、
 CD40、CD40L、CD44、CD47、CD45RB、CD52、CD56、CD69、CD70、CD72、
 10 CD73、CD74、CD79A、CD79B、CD8、CD80、CD81、CD83、CD86、CDHI(E-
 钙黏着蛋白)、CDH10、CDH12、CDH13、CDH18、CDH19、CDH20、CDH5、CDH7、
 CDH8、CDH9、CDK2、CDK3、CDK4、CDK5、CDK6、CDK7、CDK9、
 CDKNIA(p21Wapl/Cipl)、CDKNIB(p27Kipl)、CDKNIC、CDKN2A(P16INK4a)、
 CDKN2B、CDKN2C、CDKN3、CEA、CEBPB、CERI、CHGA、CHGB、几丁质
 15 酶、CHST10、CKLFSF2、CKLFSF3、CKLFSF4、CKLFSF5、CKLFSF6、CKLFSF7、
 CKLFSF8、CLDN3、CLDN7、Claudin18.2、CLN3、CLU(簇蛋白)、c-Met、CMKLRI、
 CMKORI(RDCI)、CNRI、COL18A1、COLIAI、COL4A3、COL6A1、CR2、Cripto、
 CRP、CSFI(M-CSF)、CSF2(GM-CSF)、CSF3(GCSF)、CTGF、CTLA4、CTNNBI(b-
 联蛋白)、CTSB(组织蛋白酶B)、CX3CL1(SCYDI)、CX3CR1(V28)、CXCLI(GROI)、
 20 CXCL10(IP-10)、CXCLII(l-TAC/IP-9)、CXCL12(SDFI)、CXCL13、CXCL14、CXCL16、
 CXCL2、(GR02)、CXCL3(GR03)、CXCL5(ENA-78/LIX)、CXCL6(GCP-2)、
 CXCL9(MIG)、CXCR3(GPR9/CKR-L2)、CXCR4、CXCR6(TYMSTR/STRL33/Bonzo)、
 CYB5、CYCI、CYSLTRI、DAB2IP、DES、DKFZp451J01 18、DNCLI、DPP4、
 E2F1、ECGFI、EDGI、EFNAI、EFNA3、EFNB2、EGF、EGFR、ELAC2、ENG、
 25 EN01、EN02、EN03、EpCAM、EPHB4、EPO、ERBB2(Her-2)、ERBB3(Her-3)、
 ERBB4(Her-4)、EREG、ERK8、ESRI、ESR2、F3(TF)、FADD、FasL、FASN、
 FCERIA、FCER2、FCGR3A、FGF、FGFI(aFGF)、FGF10、FGF11、FGF12、FGF12B、
 FGF13、FGF14、FGF16、FGF17、FGF18、FGF19、FGF2(bFGF)、FGF20、FGF21、
 FGF22、FGF23、FGF3(int-2)、FGF4(HST)、FGF5、FGF6(HST-2)、FGF7(KGF)、
 30 FGF8、FGF9、FGFR3、FIGF(VEGFD)、FELI(EPSILON)、FILI(ZETA)、FLJ12584、
 FLJ25530、FLRTI(纤连蛋白)、FLTI、FOS、FOSLI(FRA-I)、FY(DARC)、G250、
 GABRP(GABAa)、GAGEBI、GAGECI、GALNAC4S-6ST、GATA3、GDF5、GFI
 1、GGT1、GM-CSF、GNASI、GNRHI、GPR2(CCRIO)、GPR31、GPR44、
 GPR81(FKSG80)、GRCCIO(CIO)、GRP、GPNMB、GSN(绒毛蛋白)、GSTPI、HAVCR2、
 35 HDAC4、HDAC5、HDAC7A、HDAC9、HGF、HIFIA、HDPI、组胺和组胺受体、
 HLA-A、HLA-DRA、HM74、HMOXI、HUMCYT2A、ICEBERG、ICOSL、ID2、

IFN-a, IFNA1, IFNA2, IFNA4, IFNA5, IFNA6, IFNA7, IFNB1, IFN γ , DFNWI, IGBPI, IGF1, IGFIR, IGF2, IGFBP2, IGFBP3, IGFBP6, IL-1, IL10, MORA, IL10RB, IL11, IL11RA, IL-12, IL12A, IL12B, IL12RB1, IL12RB2, IL13, IL13RA1, IL13RA2, IL14, IL15, IL15RA, IL16, IL17, IL17B, IL17C, IL17R,

5 IL18, IL18BP, IL18R1, IL18RAP, IL19, IL1A, IL1B, IL1F10, IL1F5, IL1F6, IL1F7, IL1F8, IL1F9, IL1HY1, IL1R1, IL1R2, IL1RAP, IL1RAPL1, IL1RAPL2, IL1RL1, IL1RL2, ILIRN, IL2, IL20, IL20RA, IL21R, IL22, IL22R, IL22RA2, IL23, IL24, IL25, IL26, IL27, IL28A, IL28B, IL29, IL2RA, IL2RB, IL2RG, IL3, IL30, IL3RA, IL4, IL4R, IL5, IL5RA, IL6, IL6R, IL6ST(糖蛋白 130),

10 EL7, EL7R, EL8, EphA2, IL8RA, DL8RB, IL8RB, DL9, DL9R, DLK, INHA, INHBA; INSL3, INSL4, IRAKI, Integrin, ERAK2, ITGAI, ITGA2, ITGA3, ITGA6(a6 整联蛋白), ITGAV, ITGB3, ITGB4(b4 整联蛋白), JAG1, JAK1, JAK3, JUN, K6HF, KAN, KDR, KITLG, KLF5(GC Box BP), KLF6, KLK10, KLK12, KLK13, KLK14, KLK15, KLK3, KLK4, KLK5, KLK6, KLK9, KRT1, KRT19(角

15 蛋白19), KRT2A, KHTHB6(毛发特异性 H 型角蛋白), LAG3, LAMAS, LEP(瘦蛋白), Lewis Y, Lingo-p75, Lingo-Troy, LPS, LTA(TNF-b), LTB, LTB4R(GPR16), LTB4R2, LTBR, MACMARCKS, MAG 或 Omgp, MAP2K7(c-Jun), MDK, Mesothelin, MIB1, MUC1, 中期因子, MEF, MIP-2, MKI67, (Ki-67), MMP2, MMP9, MS4A1, MSMB, MT3(metallothionein-III), MTSSI, MUCI(黏蛋白), MYC, MYD88, NCK2,

20 neurocan, NFKB1, NFKB2, NGFB(NGF), NGFR, NgR-Lingo, NgR-Nogo66(Nogo), NgR-p75, NgR-Troy, NMEI(NM23A), N0X5, NPPB, NROBI, NR0B2, NRIDI, NR1D2, NR1H2, NR1H3, NR1H4, NR1I2, NR1I3, NR2C1, NR2C2, NR2E1, NR2E3, NR2F1, NR2F2, NR2F6, NR3C1, NR3C2, NR4A1, NR4A2, NR4A3, NR5A1, NR5A2, NR6A1, NRPI, NRP2, NT5E, NTN4, ODZI, OPRDI, P2RX7,

25 PAP, PARTI, PATE, PAWR, PCA3, PCNA, PCSK9, PD-1, PD-L1, PDGFA, PDGFB, PECAMI, PF4(CXCL4), PGF, PGR, phosphacan, PIAS2, PIK3CG, PLAU(uPA), PLG, PLXDCI, PPBP(CXCL7), PPID, PRI, PRKCQ, PRKDI, PRL, PROC, PROK2, PSAP, PSCA, PSMA, PTAFR, PTEN, PTGS2(COX-2), PTN, RAC2(p21Rac2), RARB, RGS1, RGS13, RGS3, RNFIIO(ZNF144), ROB02, S100A2,

30 SCGB1D2(亲脂素 B), SCGB2A1(mammaglobin2), SCGB2A2(mammaglobin 1), SCYEI(内皮单核细胞激活细胞因子), SDF2, SERPINA1, SERPINA3, SERP1NB5(乳腺丝抑蛋白), SERPINEI(PAI-1), SERPDMF1, SHBG, SLA2, SLC2A2, SLC33A1, SLC43A1, SLC44A4, SLIT2, SOST, SPPI, SPRRIB(Spr1), ST6GAL1, STABI, STAT6, STEAP, STEAP2, TB4R2, TBX21, TCPIO, TDGFI, TEK, TGFA,

35 TGFBI, TGFBIII, TGFBI, TGFBI, TGFBI, TGFBR1, TGFBR2, TGFBR3, THIL, THBSI(血小板反应蛋白-1), THBS2, THBS4, THPO, TIE(Tie-1), TIGHT, Tenascin-C,

TMP3、组织因子、TLR10、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TNF、TNF- α 、TNFAIP2(B94)、TNFAIP3、TNFRSF1A、TNFRSF1B、TNFRSF21、TNFRSF5、TNFRSF6(Fas)、TNFRSF7、TNFRSF8、TNFRSF9、TNFSF10(TRAIL)、TNFSF11(TRANCE)、TNFSF12(AP03L)、TNFSF13(April)、TNFSF13B、TNFSF14(HVEM-L)、TNFSF15(VEGI)、TNFSF18、TNFSF4(OX40配体)、TNFSF5(CD40配体)、TNFSF6(FasL)、TNFSF7(CD27配体)、TNFSF8(CD30配体)、TNFSF9(4-1BB配体)、TOLLIP、Toll样受体、TOP2A(拓扑异构酶Ea)、TP53、TPMI、TPM2、TRADD、TRAF1、TRAF2、TRAF3、TRAF4、TRAF5、TRAF6、TREM1、TREM2、TRPC6、TSLP、TWEAK、VEGF、VEGFB、VEGFC、VEGFR、多能聚糖、VHL C5、VLA-4、XCL1(lymphotactin)、XCL2(SCM-1b)、XCRI(GPR5/CCXCR1)、YY1、ZFPM2和凝血酶。

示例性的是，抗体选自 Trastuzumab、Pertuzumab、Nimotuzumab、Enoblituzumab、Emibetuzumab、Inotuzumab、Pinatuzumab、Brentuximab、Gemtuzumab、Bivatuzumab、Lorvotuzumab、cBR96、Glematumamab和抗 Claudin18.2 抗体，其中所述抗 Claudin18.2 抗体的重链如 SEQ ID NO: 49 所示，轻链如 SEQ ID NO: 47 所示。

“保守修饰”或“保守置换或取代”是指具有类似特征（例如电荷、侧链大小、疏水性/亲水性、主链构象和刚性等）的其它氨基酸置换蛋白中的氨基酸，使得可频繁进行改变而不改变蛋白的生物学活性。本领域技术人员知晓，一般而言，多肽的非必需区域中的单个氨基酸置换基本上不改变生物学活性（参见例如 Watson 等（1987）Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub.Co., 第 224 页，（第 4 版））。另外，结构或功能类似的氨基酸的置换不大可能破坏生物学活性。示例性保守取代于下方陈述。

表 1. 氨基酸保守取代

原始残基	保守取代
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys; His
Asn (N)	Gln; His; Asp
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala; Val
Gln (Q)	Asn; Glu
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; His
Met (M)	Leu; Ile; Tyr

Phe (F)	Tyr; Met; Leu
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

本披露中所述的“末端延伸比率”是指表达产物群体中，具有末端延伸序列的表达产物所占的比率。具有末端延伸序列的表达产物是目标表达产物的变体，其除具有所期望的目标序列外，还连接有其他氨基酸残基。示例性的，抗体轻链表达产物中，1%的轻链序列变体的N末端还连接有其他氨基酸残基，则该表达产物的末端延伸比率为1%。当表达产物群体中含有具有末端延伸序列的表达产物时，即表示该表达产物群体具有末端异质性。示例性地，本披露中的末端延伸序列来源于信号肽氨基酸的残留。

本披露中的组合物包含所期望的目标表达产物及具有末端延伸序列的表达产物。组合物中氨基末端延伸的存在可通过多种分析技术来检测，包括但不限于N-末端序列分析、电荷异质性的测定法(例如阳离子交换层析或毛细管区带电泳)、质谱、肽图检测等。组合物中抗体变体的量通常在如下范围内，从构成用于检测变体的任何测定法(例如阳离子交换分析)的检测下限的量至少于主要种类抗体量的量。组合物中约3%或更少(例如约3%、2.5%、2%、1.5%、1%、0.5%、0%)的抗体轻链或抗体重链包含氨基末端延伸。这样的百分比量可以通过质谱、肽图检测法来测定。当样品内含有末端延伸的异源多肽比例超过总量1%时，可以基于肽图检测法有效的将其鉴定出，并同时还原分子量质谱检测峰图中对应的峰进行定量标识。

在以上说明书中提出了本披露一种或多种实施方式的细节。虽然可使用与本文所述类似或相同的任何方法和材料来实施或测试本披露，但是以下描述的方法和材料。通过说明书和权利要求书，本披露的其他特点、目的和优点将是显而易见的。在说明书和权利要求书中，除非上下文中有清楚的另外指明，单数形式包括复数指代物的情况。除非另有定义，本文使用的所有技术和科学术语都具有本披露所属领域普通技术人员所理解的一般含义。说明书中引用的所有专利和出版物都通过引用纳入。提出以下实施例是为了更全面地说明本披露的可选实施方式。这些实施例不应以任何方式理解为限制本披露的范围，本披露的范围由权利要求书限定。

实施例

以下结合实施例进一步描述本披露，但这些实施例并非限制着本披露的范围。

本披露实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，如冷泉港的抗体技术实验手册，分子克隆手册；或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。未注明具体来源的试剂，为市场购买的常规试剂。

5 实施例 1: 抗 claudin18.2 抗体的制备

实施例 1-1: 构建高表达 Claudin18.2 的细胞株

用 Lipofectamine 3000 转染试剂，将 pCDH-hClaudin18.2 慢病毒表达载体质粒与 pVSV-G, pCMV-dR8.91 慢病毒系统包装载体转染至病毒包装细胞 293T 中；收集含有病毒的培养基上清，过滤并进行超高速离心；使用浓缩后的病毒感染人胃印戒细胞癌细胞株 NUGC4，经嘌呤霉素筛选两至三周，再进行 FACS 单细胞分选。

根据肿瘤 IHC 评分来区分 Claudin18.2 表达程度。与肿瘤 IHC 评分为 3 分的肿瘤 Claudin18.2 表达水平相当的细胞为高表达细胞，与肿瘤 IHC 评分为 2 分的肿瘤 Claudin18.2 表达水平相当的细胞为中等表达细胞。根据通过 FACS 检测慢病毒感染的 NUGC4 细胞表面的 Claudin18.2 表达，挑选出 Claudin18.2 表达量高的 NUGC4/hClaudin18.2 单克隆细胞株。同时通过 FACS 检测野生型 NUGC4 细胞表面的 Claudin18.2 表达，挑选出 Claudin18.2 表达量中等的 NUGC4 克隆细胞株，野生型 NUGC4 为 Claudin18.2 低表达量细胞。

将挑选出的单克隆细胞株扩大培养，冻存备库以便后续实验。

Claudin18.2 序列 Genbank: NP_001002026: (SEQ ID NO: 1)

20 MAVTACQGLGFVVSLLIGIAGIIAATCMDQWSTQDLYNNPVTAVFNYQGLWRSC
VRESSGFTECRGYFTLLGLPAMLQAVRALMIVGIVLGAIGLLVSIFALKCIRIGS
MEDSAKANMTLTSGIMFIVSGLCAIAGVSVFANMLVTNFWMSTANMYTGMGG
MVQTVQTRYTFGAALFVGWVAGGLTLIGGVMMCIACRGLAPEETNYKAVSYH
ASGHSVAYKPGGFKASTGFGSNTKNKKIYDGGARTEDEVQSYPSKHDYV。

25 Claudin18.2 DNA 序列: (SEQ ID NO: 2)

1 AGAATTGCGC TGTCCACTTG TCGTGTGGCT CTGTGTCGAC ACTGTGCGCC ACCATGGCCC
61 TGACTGCCTG TCAGGGCTTG GGGTTCGTGG TTCACTGAT TGGGATTGCG GGCATCATTG
121 CTGCCACCTG CATGGACCAG TGGAGCACCC AAGACTTGTA CAACAACCCC GTAACAGCTG
181 TTTTCAACTA CCAGGGGCTG TGGCGCTCCT GTGTCCGAGA GAGCTCTGGC TTCACCGAGT
30 241 GCCGGGGCTA CTTACCCTG CTGGGGCTGC CAGCCATGCT GCAGGCAGTG CGAGCCCTGA
301 TGATCGTAGG CATCGTCCTG GGTGCCATTG GCCTCCTGGT ATCCATCTTT GCCCTGAAAT
361 GCATCCGCAT TGGCAGCATG GAGGACTCTG CCAAAGCCAA CATGACACTG ACCTCCGGGA
421 TCATGTTTCA TGTCTCAGGT CTTTGTGCAA TTGCTGGAGT GTCTGTGTTT GCCAACATGC
481 TGGTGACTAA CTTCTGGATG TCCACAGCTA ACATGTACAC CGGCATGGGT GGGATGGTGC
35 541 AGACTGTTCA GACCAGGTAC ACATTTGGTG CGGCTCTGTT CGTGGGCTGG TCGCTGGAG
601 GCCTCACACT AATTGGGGGT GTGATGATGT GCATCGCCTG CCGGGGCTG GCACCAGAAG
661 AAACCAACTA CAAAGCCGTT TCTTATCATG CCTCAGGCCA CAGTGTGTC TACAAGCCTG
721 GAGGCTTCAA GGCCAGCACT GGCTTTGGGT CCAACACCAA AAACAAGAAG ATATACGATG
781 GAGGTGCCCG CACAGAGGAC GAGGTACAAT CTTATCCTTC CAAGCACGAC TATGTGTAAT
40 841 GCTCTAAGAC CTCTCAGAC GGGCGGAAGA AACTCCCGGA GAGCTCACCC AAAAAACAAG
901 GAGATCCCAT CTAGATTTCT TCTTGCTTTT GACTCACAGC TGGAGTTAG AAAAACTCG
961 ATTTTCATTT TGGAGAGGCC AAATGGTCTT AGCCTCAGTC TCTGTCTTA AATATTCCAC
1021 CATAAAACAG CTGAGTTATT TATGAATTAG AGGCTATAGC TCACATTTTC AATCCTCTAT
1081 TTCTTTTTTT AAATATAACT TTCTACTCTG ATGAGAGAAT GTGGTTTTAA TCTCTCTCTC
45 1141 ACATTTTGAT GATTTAGACA GACTCCCCCT CTTCTCCTA GTCAATAAAC CCATTGATGA
1201 TCTATTTCCC AGCTTATCCC CAAGAAAAC TTTGAAAGGA AAGAGTAGAC CCAAAGATGT
1261 TATTTTCTGC TGTTTGAATT TTGCTCCCC ACCCCCAACT TGGCTAGTAA TAAACACTTA

1321 CTGAAGAAGA AGCAATAAGA GAAAGATATT TGTAATCTCT CCAGCCCATG ATCTCGGTTT
 1381 TCTTACACTG TGATCTTAAA AGTTACCAA CCAAAGTCAT TTTCAGTTTG AGGCAACCAA
 1441 ACCTTTCTAC TGCTGTTGAC ATCTTCTTAT TACAGCAACA CCATTCTAGG AGTTTCCTGA
 1501 GCTCTCCACT GGAGTCCTCT TTCTGTGCG GGTGAGAAAT TGTCCCTAGA TGAATGAGAA
 5 1561 AATTATTTTT TTTAATTTAA GTCCTAAATA TAGTTAAAAT AAATAATGTT TTAGTAAAAT
 1621 GATACACTAT CTCTGTGAAA TAGCCTCACC CCTACATGTG GATAGAAGGA AATGAAAAAA
 1681 TAATTGCTTT GACATTGTCT ATATGGTACT TTGTAAAGTC ATGCTTAAGT ACAAATTCCA
 1741 TGAAAAGCTC ACTGATCCTA ATTCTTTCCC TTTGAGGTCT CTATGGCTCT GATTGTACAT
 1801 GATAGTAAAGT GTAAGCCATG TAAAAAGTAA ATAATGTCTG GGCACAGTGG CTCACGCCTG
 10 1861 TAATCCTAGC ACTTTGGGAG GCTGAGGAGG AAGGATCACT TGAGCCCAGA AGTTCGAGAC
 1921 TAGCCTGGGC AACATGGAGA AGCCCTGTCT CTACAAAATA CAGAGAGAAA AAATCAGCCA
 1981 GTCATGGTGG CCTACACCTG TAGTCCCAGC ATTCCGGGAG GCTGAGGTGG GAGGATCACT
 2041 TGAGCCCAGG GAGGTTGGGG CTGCAGTGAG CCATGATCAC ACCACTGCAC TCCAGCCAGG
 2101 TGACATAGCG AGATCCTGTC TAAAAAATA AAAAAATAAT AATGGAACAC AGCAAGTCTC
 15 2161 AGGAAGTAGG TAAAAACTAA TTCTTTAAAA AAAAAAAAAA GTTGAGCCTG AATTAATGT
 2221 AATGTTTCCA AGTGACAGGT ATCCACATTT GCATGGTTAC AAGCCACTGC CAGTTAGCAG
 2281 TAGCACTTTC CTGGCACTGT GGTCCGTTTT GTTTTGTTTT GCTTTGTTTA GAGACGGGGT
 2341 CTCACTTTCC AGGCTGGCCT CAACTCCTG CACTCAAGCA ATTCTTCTAC CTTGGCCTCC
 2401 CAAGTAGCTG GAATTACAGG TGTGCGCCAT CACAACCTAG TGGTGGTCAG TTTTGTACT
 20 2461 CTGAGAGCTG TTCACTTCTC TGAATTCACC TAGAGTGGTT GGACCATCAG ATGTTTGGGC
 2521 AAAACTGAAA GCTCTTTGCA ACCACACACC TTCCCTGAGC TTACATCACT GCCCTTTTGA
 2581 GCAGAAAGTC TAAATTCCTT CCAAGACAGT AGAATTCCAT CCCAGTACCA AAGCCAGATA
 2641 GGCCCCCTAG GAAACTGAGG TAAGAGCAGT CTCTAAAAAC TACCCACAGC AGCATTGGTG
 2701 CAGGGGAAGT TGGCCATTAG GTTATTATT GAGAGGAAAG TCCTCACATC AATAGTACAT
 25 2761 ATGAAAGTGA CCTCCAAGGG GATTGGTGAA TACTCATAAG GATCTCAGC CTGAACAGAC
 2821 TATGTCTGGG GAAAGAACGG ATTATGCCCC ATTAATAAC AAGTTGTGTT CAAGAGTCAG
 2881 AGCAGTGAGC TCAGAGGCC TTCTCACTGA GACAGCAACA TTTAAACCAA ACCAGAGGAA
 2941 GTATTTGTGG AACTCACTGC CTCAGTTTGG GTAAAGGATG AGCAGACAAG TCAACTAAAG
 3001 AAAAAAGAAA AGCAAGGAGG AGGGTTGAGC AATCTAGAGC ATGGAGTTTG TTAAGTGCTC
 30 3061 TCTGGATTTG AGTTGAAGAG CATCCATTTG AGTTGAAGGC CACAGGGCAC AATGAGCTCT
 3121 CCCTTCTACC ACCAGAAAGT CCCTGGTCAG GTCTCAGGTA GTGCGGTGTG GCTCAGCTGG
 3181 GTTTTAAATT AGCGCATTCT CTATCCAACA TTTAATTGTT TGAAAGCCTC CATATAGTTA
 3241 GATTGTGCTT TGTAATTTTG TTGTTGTTGC TCTATCTTAT TGATATGCA TTGAGTATTA
 3301 ACCTGAATGT TTTGTTACTT AAATATTTAAA AACACTGTTA TCCTACAGTT

实施例 1-2: 抗人 claudin18.2 单克隆抗体产生

1 免疫

通过免疫小鼠产生抗人 Claudin18.2 单克隆抗体。

40 实验用 SJL 白小鼠，雌性，6-8 周龄（北京维通利华实验动物技术有限公司，动物生产许可证号：SCXK（京）2012-0001）。饲养环境：SPF 级。小鼠购进后，实验室环境饲养 1 周，12/12 小时光/暗周期调节，温度 20-25 °C；湿度 40-60%。将已适应环境的小鼠按以下方案免疫。免疫抗原为 huClaudin18.2-HEK293 细胞（转染人 Claudin18.2 质粒的 HEK-293 稳转细胞株）。

45 免疫方案：首次免疫细胞前，用 TiterMax® Gold Adjuvant（Sigma Cat No. T2684）0.1ml/只注射小鼠腹膜内（IP）；半小时后每只小鼠腹膜内（IP）注射 0.1ml 生理盐水稀释至 1×10^8 /ml 浓度的细胞液。细胞吹散均匀后进行接种，时间为第 0、14、28、42、56 天。于第 21，35，49，63 天取血，用 ELISA 方法确定小鼠血清中的抗体滴度。在第 4-5 次免疫以后，选择血清中抗体滴度高并且滴度趋于平台的小鼠
50 进行脾细胞融合。在进行脾细胞融合前 3 天加强免疫，腹膜内（IP）注射 1×10^7 细胞。

2 脾细胞融合

采用 PEG 介导的融合步骤将脾淋巴细胞与骨髓瘤细胞 Sp2/0 细胞 (ATCC® CRL-8287™) 进行融合得到杂交瘤细胞。杂交瘤细胞以 $0.5-1 \times 10^6/\text{ml}$ 的密度用完全培养基 (含 20% FBS、1×HAT、1×OPI 的 IMDM 培养基) 重悬, 100 μl /孔种于 96 孔板中, 37°C, 5%CO₂ 孵育 3-4 天后, 补充 HAT 完全培养基 100 μl /孔, 继续培养 3-4 天至形成克隆。去除上清, 加入 200 μl /孔的 HT 完全培养基 (含 20%FBS、1×HT 和 1×OPI 的 IMDM 培养基), 37°C, 5%CO₂ 培养 3 天后进行 ELISA 检测。

3 杂交瘤细胞筛选

根据杂交瘤细胞生长密度, 用结合 ELISA 方法检测培养上清。选择与 huClaudin18.2-HEK293 细胞结合能力强, 同时与 HEK293 细胞没有结合的细胞, 及时进行扩增冻存; 经过二到三次亚克隆直至获得单细胞克隆。

每次亚克隆细胞均需进行细胞结合实验。通过以上实验筛选得到杂交瘤克隆, 用无血清细胞培养法进一步制备抗体, 纯化抗体, 供在检测例中使用。

实施例 1-3: 鼠源抗体的人源化

挑选出体外活性高的单克隆杂交瘤细胞株 mAb1901, mAb1902; 克隆其中的单克隆抗体序列, 再进行人源化、重组表达和活性评价。

从杂交瘤中克隆序列的过程如下。收集对数生长期杂交瘤细胞, 用 Trizol (Invitrogen, 15596-018) 提取 RNA (按照试剂盒说明书步骤) 并进行反转录 (PrimeScript™ Reverse Transcriptase, Takara, cat # 2680A)。将反转录得到的 cDNA 采用 mouse Ig-Primer Set (Novagen, TB326 Rev.B 0503) 进行 PCR 扩增, 送测序公司测序。得到的 DNA 序列对应的氨基酸序列 SEQ ID NO: 3-6 所示:

mAb1901 鼠源重链可变区 (SEQ ID NO: 3)

EVQLMESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSDYGIHWVRQAPEMGLEWIA
YISRGSSSTIYYADTVKGRFTMSRDNAKNTLFLQMTSLRSED
TAMYYCARGGYDT
RNAMDYWGQGTSVTVSS。

mAb1901 鼠源轻链可变区 (SEQ ID NO: 4)

DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMSCKSSQSLNSGNQKNYLA
WYQQKPGQPP
KLLIYGASTRASGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAIYHCQNDL
YYPLTFG
AGTKLELK。

mAb1902 鼠源重链可变区 (SEQ ID NO: 5)

EVQLQESGAELVKPGASVKLSCKASGYIFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIG
MIHPNSGSTNYNEKFKGKATLTLDKSSSTAYMQLSSLPS
EDSAVYYCARLKTG
NSFDYWGQGTTTLTVSS。

mAb1902 鼠源轻链可变区 (SEQ ID NO: 6)

DIVLTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPP
KLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAIYYCQNA
YTYPTFG
SGTKLEIK。

上述鼠源重链可变区和轻链可变区，分别与下述人 IgG1 抗体的重链恒定区和人源 κ 轻链恒定区连接，形成嵌合抗体 ch1901 和 ch1902。

恒定区选自以下序列：

人 IgG1 抗体的重链恒定区：（SEQ ID NO: 7）

5 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDKKVEPKSCDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTKAKAGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
10 NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK。

人源 κ 轻链恒定区：（SEQ ID NO: 8）

15 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GEC。

如本领域许多文献公示的方法，对鼠源单克隆抗体进行人源化。简言之，使用人恒定结构域替代亲本（鼠源抗体）恒定结构域，根据鼠源抗体和人抗体的同源性选择人种系抗体序列，进行 CDR 移植。本披露选择活性好的候选分子进行人源化，结果如下。

20 1. 鼠源抗体的 CDR 区

表 2 中 VH/VL CDR 的氨基酸残基由 Kabat 编号系统确定并注释。

鼠源抗体的 CDR 序列如表 2 所述：

表 2. 鼠源抗体的 CDR 序列

抗体	mAb1901
HCDR1	DYGIH (SEQ ID NO: 9)
HCDR2	YISRGSSTIYYADTVKG (SEQ ID NO: 10)
HCDR3	GGYDTRNAMDY (SEQ ID NO: 11)
LCDR1	KSSQSLNLSGNQKNYLA (SEQ ID NO: 12)
LCDR2	GASTRAS (SEQ ID NO: 13)
LCDR3	QNDLYYPLT (SEQ ID NO: 14)
抗体	mAb1902
HCDR1	SYWMH (SEQ ID NO: 15)
HCDR2	MIHPNSGSTNYNEKFKGR (SEQ ID NO: 16)
HCDR3	LKTGNSFDY (SEQ ID NO: 17)
LCDR1	KSSQSLNLSGNQKNYLT (SEQ ID NO: 18)
LCDR2	WASTRES (SEQ ID NO: 19)
LCDR3	QNAYTYPFT (SEQ ID NO: 20)

25 2. 选择人种系 FR 区序列

在所获得的鼠源抗体 VH/VLCDR 典型结构的基础上，将重、轻链可变区序列与抗体 Germline 数据库比较，获得同源性高的人种系模板。其中人类种系轻链框

架区来自人 κ 轻链基因。

2.1 mAb1901 的人源化改造和回复突变设计

选择适当的人抗体种系，对 mAb1901 鼠源抗体进行人源化改造，将鼠源抗体 mAb1901 的 CDR 区移植到选择的人源化模板上，得到人源化可变区，其人源化重链可变区序列为 SEQ ID NO: 24 和轻链可变区序列为 SEQ ID NO: 21；再与 IgG 恒定区重组，形成完整抗体。同时，对人源化抗体的 V 区中 FR 区进行回复突变，示例性回复突变方式及组合如下：

表 3. mAb1901 人源化抗体及回复突变*

mAb1901 人源化抗体轻链可变区		mAb1901 人源化抗体重链可变区	
VL1	无	VH1	无
VL2	N22S	VH2	N82T
VL3	N22S, V85I, Y87H	VH3	V48I, N82T
		VH4	I69M, N82T

*表格中所有氨基酸位置编号为 Kabat 编号规则的编号，重链可变区的 N82T 中，82 为 Kabat 规则的第 82A 位。

表 4. mAb1901 人源化抗体轻链可变区和重链可变区序列

可变区名称 (SEQ ID NO:)	序列
VL1 (SEQ ID NO: 21)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRASGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQNDLYYPLTFGQGTKLEIK
VL2 (SEQ ID NO: 22)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLNLSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRASGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQNDLYYPLTFGQGTKLEIK
VL3 (SEQ ID NO: 23)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLNLSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRASGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAIYHCQNDLYYPLTFGQGTKLEIK
VH1 (SEQ ID NO: 24)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYGIHWVRQAPGKGLEWVAYISRGSSSTIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGYDTRNAMDYWGQGTTVTVSS
VH2 (SEQ ID NO: 25)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYGIHWVRQAPGKGLEWVAYISRGSSSTIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMTSLRAEDTAVYYCARGGYDTRNAMDYWGQGTTVTVSS
VH3 (SEQ ID NO: 26)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYGIHWVRQAPGKGLEWVAYISRGSSSTIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMTSLRAEDTAVYYCARGGYDTRNAMDYWGQGTTVTVSS
VH4 (SEQ ID NO: 27)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYGIHWVRQAPGKGLEWVAYISRGSSSTIYYADTVKGRFTMSRDNKNSLYLQMTSLRAEDTAVYYCARGGYDTRNAMDYWGQGTTVTVSS

上表中对应重链可变区可与 SEQ ID NO: 7 所示的人 IgG1 重链恒定区连接形成全长抗体的重链，轻链可变区与 SEQ ID NO: 8 所示的人 κ 轻链恒定区连接形成全长抗体的轻链。在其他实施方案中，重链可变区和轻链可变区也可与其他重链恒定区和轻链恒定区分别连接形成全长抗体。

2.2 mAb1902 的人源化改造和回复突变设计

选择适当的人抗体种系，对 mAb1902 鼠源抗体进行人源化改造，将鼠源抗体

mAb1902 的 CDR 区移植到选择的人源化模板上，得到人源化可变区，其人源化重链可变区序列为 SEQ ID NO: 31 和轻链可变区序列为 SEQ ID NO: 28；再与 IgG 恒定区重组，形成完整抗体。同时，对人源化抗体的 V 区中 FR 区进行回复突变，示例性回复突变方式及组合如下：

5 表 5. mAb1902 人源化抗体及其回复突变设计*

mAb1902 人源化抗体轻链可变区		mAb1902 人源化抗体重链可变区	
VL11	无	VH11	无
VL12	M4L	VH12	I69L, R71L, T73K
VL13	M4L, N22S	VH13	M48I, R66K, V67A, I69L, R71L, T73K
		VH14	R38K, A40R, M48I, R66K, V67A, I69L, R71L, T73K

*表格中所有氨基酸位置编号为 Kabat 编号规则的编号。

表 6. mAb1902 人源化抗体轻链可变区和重链可变区序列

可变区名称 (SEQ ID NO:)	序列
VL11 (SEQ ID NO: 28)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQNAYTYPFTFGQGTKLEIK
VL12 (SEQ ID NO: 29)	DIVL <u>T</u> QSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQNAYTYPFTFGQGTKLEIK
VL13 (SEQ ID NO: 30)	DIVL <u>T</u> QSPDSLAVSLGERATIS <u>C</u> CKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQNAYTYPFTFGQGTKLEIK
VH11 (SEQ ID NO: 31)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQRLEWGMGIHPNSGSTNYNEKFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARLKTGNSFDYWGQGTITVTVSS
VH12 (SEQ ID NO: 32)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQRLEWGMGIHPNSGSTNYNEKFKGRVT <u>L</u> LDKSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARLKTGNSFDYWGQGTITVTVSS
VH13 (SEQ ID NO: 33)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQRLEW <u>I</u> GMIHPNSGSTNYNEKFKGKATLTLDKSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARLKTGNSFDYWGQGTITVTVSS
VH14 (SEQ ID NO: 34)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWV <u>K</u> QRPGRLEWIGMIHPNSGSTNYNEKFKGKATLTLDKSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARLKTGNSFDYWGQGTITVTVSS

10 上表中对应重链可变区与 SEQ ID NO: 7 所示的人 IgG1 重链恒定区连接形成全长抗体的重链，轻链可变区与 SEQ ID NO: 8 所示的人 κ 轻链恒定区连接形成全长抗体的轻链。

示例性的，抗体全长序列如下：

嵌合抗体 ch1901：

15 ch1901 重链： (SEQ ID NO: 35)

EVQLMESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSDYGIHWVRQAPEMGLEWIAYSRGSSTIYYADTVKGRFTMSRDNAKNTLFLQMTSLRSEDVAVYYCARGGYDTRNAMDYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP

VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPS
 NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCV
 VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
 LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC
 5 LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
 NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK。

ch1901 轻链 (SEQ ID NO: 36)

DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLAWYQQKPGQPP
 KLLIYGASTRASGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAIYHCQNDLYYPLTFG
 10 AGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN
 ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
 KSFNRGEC。

嵌合抗体 ch1902:

ch1902 重链 (SEQ ID NO: 37)

EVQLQESGAELVKPGASVKLSCKASGYIFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIG
 MIHPNSGSTNYNEKFKGKATLTLDKSSSTAYMQLSSLPSEDSAVYYCARLKTG
 NSFDYWGGQTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
 VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNT
 KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVV
 20 DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
 GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV
 KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
 FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK。

ch1902 轻链 (SEQ ID NO: 38)

DIVLTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPP
 KLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAIYYCQNAAYTYPFTFG
 25 SGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
 LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
 SFNRGEC。

表 7. mAb1901 人源化抗体

重链 轻链	H1	H2	H3	H4
L1	h1901-1	h1901-2	h1901-3	h1901-4
L2	h1901-5	h1901-6	h1901-7	h1901-8
L3	h1901-9	h1901-10	h1901-11	h1901-12

全长抗体轻重链序列如下所示:

表 8. mAb1901 人源化抗体轻链和重链序列

轻链/重链名称 (SEQ ID NO:)	序列
L1 (SEQ ID NO: 39)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRASGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQNDLYYPLTFGQGTKLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
L2 (SEQ ID NO: 40)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLNSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRASGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQNDLYYPLTFGQGTKLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
L3 (SEQ ID NO: 41)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLNSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRASGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAIYHCQNDLYYPLTFGQGTKLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
H1 (SEQ ID NO: 42)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGIHWVRQAPGKGLWVAYISRGSSSTIYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARGGYDTRNAMDYWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
H2 (SEQ ID NO: 43)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGIHWVRQAPGKGLWVAYISRGSSSTIYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMTSLRAEDTAVYYCARGGYDTRNAMDYWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
H3 (SEQ ID NO: 44)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGIHWVRQAPGKGLWVAYISRGSSSTIYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMTSLRAEDTAVYYCARGGYDTRNAMDYWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
H4 (SEQ ID NO: 45)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGIHWVRQAPGKGLWVAYISRGSSSTIYADTVKGRFTMSRDNKNSLYLQMTSLRAEDTAVYYCARGGYDTRNAMDYWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP

CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

表 9. mAb1902 人源化抗体

重链 轻链	H11	H12	H13	H14
L11	h1902-1	h1902-2	h1902-3	h1902-4
L12	h1902-5	h1902-6	h1902-7	h1902-8
L13	h1902-9	h1902-10	h1902-11	h1902-12

全长抗体轻重链序列如下所示：

5

表 10. mAb1902 人源化抗体轻链和重链序列

轻链/重链名称 (SEQ ID NO:)	序列
L11 (SEQ ID NO: 46)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPG QPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFLTISLQAEDVAVYYCQN AYTYPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN FYYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
L12 (SEQ ID NO: 47)	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQ PKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFLTISLQAEDVAVYYCQNA YYPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN FYYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
L13 (SEQ ID NO: 48)	DIVLTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQ PKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFLTISLQAEDVAVYYCQNA YYPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN FYYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
H11 (SEQ ID NO: 49)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQRL EWMGMHPNSGSTNYNEKFKGRVTITRDTASTAYMELSSLRSED TAVYYCARLKTGNSFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
H12 (SEQ ID NO: 50)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQRL EWMGMHPNSGSTNYNEKFKGRVTITRDTASTAYMELSSLRSED TAVYYCARLKTGNSFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS

	<p>DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>H13 (SEQ ID NO: 51)</p>	<p>EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQRL EWIGMIHPNSGSTNYNEKFKGKATLTLDKSASTAYMELSSLRSED TAVYYCARLKTGNSFDYWGGQTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>H14 (SEQ ID NO: 52)</p>	<p>EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQRL EWIGMIHPNSGSTNYNEKFKGKATLTLDKSASTAYMELSSLRSED TAVYYCARLKTGNSFDYWGGQTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>

本披露阳性对照抗体为 IMAB-362 (来自 WO2016166122) :

IMAB-362 重链 (SEQ ID NO: 53)

1 QVQLQPGAE LVRPGASVKL SCKASGYTFT SYWINWVKQR PGQGLEWIGN
5 51 IYPSDSYTNYNQKFKDKATL TVDKSSSTAY MQLSSPTSED SAVYYCTRSW
101 RGNSFDYWGQ GTTLTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY
151 FPEPVTVSWN SGALTSKVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI
201 CNVNHKPSNT KVDKRVPEKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKD
251 TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST
10 301 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY
351 TLPPSRDEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVL
401 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSPGK。

IMAB-362 轻链 (SEQ ID NO: 54)

15 1 DIVMTQSPSSLTVTAGEKVT MSCKSSQSL NSGNQKNYLT WYQQKPGQPP
51 KLLIYWASTR ESGVPDRFTG SGSGLTDFLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSY
101 PFTFGSGTKLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQ LKSGTASVVC LLNFPYPREA
151 KVQWKVDNAL QSGNSQESVT EQDSKSTYS LSSTLTLSKA DYEKHKVYAC
201 EVTHQGLSSP VTKSFNRGEC。

20 用常规的基因克隆、重组表达的方法分别克隆、表达、纯化上述抗体。

测试例 1: 抗 claudin18.2 抗体的体外活性生物学评价

测试例 1-1: Cell 水平 ELISA 结合实验

25 基于细胞的 ELISA 实验被用来检测 Claudin18.2 抗体的结合特性。将稳转表达 Claudin18.2 的 NUGC4 细胞培养于 96 孔细胞板 (Corning, 3599) 中, 待生长至 90% 密度时加入 4% 多聚甲醛固定细胞 1 小时, 用 PBST 缓冲液 (pH 7.4 PBS 含 0.05%

Tween-20)洗板3次后,加入用PBS稀释的5%脱脂牛奶(光明脱脂奶粉)封闭液200 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C孵育箱孵育2.5小时或4 $^{\circ}$ C放置过夜(16-18小时)进行封闭。封闭结束后,弃去封闭液,并用PBST缓冲液洗板3次后,加入50 μ l/孔用样品稀释液(pH7.4 PBS含1%脱脂乳)稀释的不同浓度待测抗体,放于37 $^{\circ}$ C孵育箱孵育2
5 小时。孵育结束后用PBST洗板5次,加入100 μ l/孔用样品稀释液稀释的HRP标记的羊抗人二抗(Jackson Immuno Research,109-035-003),37 $^{\circ}$ C孵育1小时。用PBST洗板6次后,加入50 μ l/孔TMB显色底物(KPL,52-00-03),于室温孵育10-15min,加入50 μ l/孔1M H₂SO₄终止反应,用MD Versa Max TM酶标仪在450nm处读取吸收值,计算Claudin18.2抗体对Claudin18.2的结合EC50值(结果见下表)。

10

表 11 抗体的结合活性

抗体	IMAB362	ch1901	ch1902
E _{max}	1.175	1.399	1.272
EC50 (nM)	0.108	0.098	0.074

表 12-1. mAb1901 人源化抗体的结合活性

抗体	E _{max}	EC50 (nM)
IMAB362	1.115	0.086
h1901-2	1.039	0.076
h1901-3	1.1055	0.22
h1901-4	0.986	0.201
h1901-6	0.937	0.091
h1901-7	0.921	0.166
h1901-8	1.047	0.091
h1901-11	1.44	0.076
h1901-12	1.22	0.116

表 12-2. mAb1902 人源化抗体的结合活性

抗体	E _{max}	EC50 (nM)
IMAB362	0.88	0.187
h1902-1	0.87	0.113
h1902-2	0.88	0.107
h1902-3	0.84	0.175
h1902-4	0.82	0.087
h1902-5	0.9	0.098
h1902-6	0.78	0.141
h1902-7	0.75	0.121
h1902-8	0.89	0.132
h1902-9	0.75	0.137
h1902-10	0.89	0.133

15

测试例 1-2: 抗体细胞水平结合实验

将稳转表达Claudin18.2的NUGC4细胞用FACS缓冲液(2%胎牛血清(Gibco, 10099141) pH7.4 PBS (Sigma, P4417-100TAB))制备成 1×10^6 /ml的细胞悬液,100 μ l/孔加入96孔圆底板(Corning, 3795)中。离心去除上清后加入50 μ l/孔用

FACS 缓冲液稀释的不同浓度待测 Claudin18.2 抗体，放于 4℃冰箱中避光孵育 1 小时。以 FACS 缓冲液 300g 离心洗涤 3 次后，加入工作浓度的 Alexa Fluor 488 包被的抗人 IgG (H+L) (invitrogen, A-11013)，放于 4℃冰箱中避光孵育 40 分钟。以 FACS 缓冲液 300g 离心洗涤 3 次后，在 BD FACS CantoII 流式细胞仪上检测几何平均数荧光强度，计算 Claudin18.2 抗体对稳转表达 Claudin18.2 的 NUGC4 细胞的结合 EC50 值，结果见图 1。

测试例 1-3: 抗体内吞实验

将预标记了 DyLight 488 NHS Ester (thermofisher, 46403) 的待测 Claudin18.2 抗体，以 5 μg/ml 终浓度加入 1×10⁶/ml 稳转表达 Claudin18.2 的 NUGC4 细胞中，放于冰上避光孵育 1 小时，以预冷的 FACS 缓冲液 (pH7.4 PBS, 2%胎牛血清) 离心洗涤 3 次，去上清后加入预热的完全培养基，放入 37℃ 5% CO₂ 细胞培养箱。分别在 0、0.5、1、2、4 小时后取出细胞，放置于冰上避光保存。待样品全部收集后，300g 低温离心去除上清，加入洗脱缓冲液 (pH1.7 0.05M 甘氨酸, 0.1M 氯化钠) 后，室温孵育 7 分钟，以 FACS 缓冲液 300g 离心洗涤 1 次，在 BD FACS CantoII 流式细胞仪上检测几何平均数荧光强度，计算 Claudin18.2 抗体对稳转表达 Claudin18.2 的 NUGC4 细胞的内吞效率。结果显示 (见图 2)，人源化抗体具有良好的细胞内吞效率。

测试例 1-4: 基于流式细胞技术测定抗体亲和力

实验当天收集 HEK293/hClaudin18.2 细胞于 U 底 96 孔板中，每孔 1×10⁵ 至 2×10⁵ 个细胞。加入起始浓度 5μg/ml，2×梯度稀释 (12 个浓度点) 的 Claudin18.2 抗体，4℃孵育 1 小时，阳性对照为 IMAB362，同时设置不加抗体的阴性对照。离心去除抗体，再加入 100μl/孔 FITC 抗人 IgG Fc 抗体 (200×)，4℃避光孵育 30 分钟，用 PBS+2%FBS 清洗两遍后准备进行流式细胞检测。启动 BD FACS CantoII，预热完成后打开 BD FACSDiva 软件，建立一个新的实验，检测 HEK293/hClaudin18.2 阴性对照样品，调节 FSC 及 SSC 电压至适当的数值并保存。根据 Quantum™ FITC-5 MESF Kit 说明书，分别检测空白样品 B 及标准曲线 1，调节 FITC 电压至适当的数值并保存。在保存的电压下检测 U 底 96 孔板中的样品，记录数据。使用 Flowjo 软件分析实验数据得到 Geo Mean 数值，根据 Quantum™ FITC-5 MESF Kit 说明书拟合 MESF-Geo Mean 标准曲线，根据 FITC 抗人 IgG Fc 抗体的浓度荧光值计算出与 HEK293/hClaudin18.2 细胞结合的 Claudin18.2 抗体的摩尔浓度及游离抗体浓度，利用 Scatchard 作图法计算抗体的 B_{max} 和解离常数 KD。结果见表 13。

表 13. 人源化抗体细胞水平亲和力

抗体	IMAB362	h1901-11	h1902-5
KD (nM)	10.2	6.8	1.64

测试例 1-5: 抗体的 ADCC 效应评价

消化各种 NUGC4 细胞（高中低表达 Claudin18.2），1000rpm 离心后，重悬计数。将细胞以 3×10^5 细胞/ml 的密度重悬在添加 10% FBS（新西兰超低 IgG 胎牛血清，Gibco, 1921005PJ）的无酚红 RPMI 1640 中（Gibco, 11835-030）。在 96 孔板（Corning, 3903）中，每孔加入 25 μ l 细胞（7500 个/孔）。将抗体稀释在上述无酚红培养基中，配制成 3 \times 的抗体稀释液，向细胞板中加入 25 μ l/孔的抗体。在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中孵育 0.5 小时。

收集效应细胞（FcrR3A-V158-NFAT-RE-Jurkat 细胞），1000rpm 离心后，重悬计数。将细胞以 3×10^6 细胞/ml 的密度重悬在添加 10%FBS（新西兰超低 IgG 胎牛血清）的无酚红 RPMI 1640 中，在实验板中每孔加入 25 μ l 细胞（ 7.5×10^4 个细胞/孔）。在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中孵育 6 小时。

向实验板的每个孔中加入 75 μ l/孔的 Bright-Glo（Promega, E2610），用酶标仪（PerkinElmer, VITOR3）检测化学发光（luminescence）。

结果显示（见表 14 和图 3A-图 3C），在低中高不同程度 Claudin18.2 表达的 NUGC4 细胞中，抗体 h1901-11 和 h1902-5 均显示出很强的 ADCC 活性。

表 14. 抗体在 Claudin18.2 不同表达程度的 NUGC4 细胞中的 ADCC 效应

NUGC4 中 Claudin18.2 表达程度		h1901-11	h1902-5	IMAB362
低表达	IC50 (ng/ml)	22.42	35.46	183.4
中等表达	IC50 (ng/ml)	15.35	30.00	210.4
高表达	IC50 (ng/ml)	26.17	32.16	132.6

实施例 2: 信号肽的设计与应用**实施例 2-1: 融合不同信号肽的 Pertuzumab 的设计与表达**

设计融合如下信号肽的抗体，其信号肽序列组合如下：

1. MEWSWVFLFFLSVTTGVHS (SEQ ID NO: 152) 与 MSVPTQVLGLLLLWLTDARC (SEQ ID NO: 153)
2. MEWSWVFLFFLSVTTGVHS (SEQ ID NO: 152) 与 MEWSWVFLFFLSVTTGVHS (SEQ ID NO: 152)
3. MEWSWVFLFFLSLTGVHA (SEQ ID NO: 57) 与 MSVPTQVLGLLLLWLTDVRA (SEQ ID NO: 105)
4. MEWSWVFLFFLSLTGVHA (SEQ ID NO: 57) 与 MEWSWVFLFFLSLTGVHA (SEQ ID NO: 57)
5. MSVPTQVLGLLLLWLTDVRA (SEQ ID NO: 105) 与 MEWSWVFLFFLSLTGVHA (SEQ ID NO: 57)

将上述信号肽组合，分别置于 Pertuzumab 抗体重、轻链氨基酸 N 端，并设计相应的新的重、轻链序列。所设计的序列如下：

Pertuzumab-1 含信号肽的抗体重链氨基酸序列 (SEQ ID NO: 154)

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTD
 YTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQM
 NSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST
 5 SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
 SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
 PKPDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
 PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
 10 YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Pertuzumab-1 含信号肽的抗体轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO: 155)

MSVPTQVLGLLLLWLT DARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQD VSI
 GVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVP SRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATY
 YCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP
 15 REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSSTLTL SKADYEKHKVYAC
 EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Pertuzumab-2 含信号肽的抗体重链氨基酸序列 (SEQ ID NO: 154)

Pertuzumab-2 含信号肽的抗体轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO: 156)

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIG
 VAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVP SRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATY
 20 CQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP
 EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSSTLTL SKADYEKHKVYACE
 VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Pertuzumab-3 含信号肽的抗体重链氨基酸序列 (SEQ ID NO: 157)

MEWSWVFLFFLSLTGVHAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDY
 TMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMN
 SLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS
 GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
 SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
 30 PKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
 SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS
 KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Pertuzumab-3 含信号肽的抗体轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO: 158)

MSVPTQVLGLLLLWLT DVRADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQD VSI
 GVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVP SRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATY
 YCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP
 35 REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSSTLTL SKADYEKHKVYAC
 EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

40 Pertuzumab-4 含信号肽的抗体重链氨基酸序列 (SEQ ID NO: 157)

Pertuzumab-4 含信号肽的抗体轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO: 159)

MEWSWVFLFFLSLTGVHADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGV
AWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSPRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC
QQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
5 AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC

Pertuzumab-5 含信号肽的抗体重链氨基酸序列 (SEQ ID NO: 160)

MSVPTQVLGLLLLWLTDVRAEVLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTD
YTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQM
10 NSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST
SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKAGQPREPQVYTL
15 PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Pertuzumab-5 含信号肽的抗体轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO: 159)

(备注: 下划线为信号肽。)

基于上述 Pertuzumab-1 至 Pertuzumab-4 的序列合成各重链和轻链的基因片段,
20 将重链基因克隆到 PXC18.4 形成重链质粒, 轻链基因克隆到 PXC17.4 形成轻链质
粒。通过质粒中的相同酶切位点, 将轻链质粒克隆至重链质粒中, 并构建出全长
抗体质粒。将全长抗体质粒直接电转 CHO 细胞, 经筛选后获得了包含该质粒的稳
转细胞。培养稳转细胞, 将培养后的上清用 Protein A 亲和柱进行纯化, 获得表达
产物。

25

实施例2-2: 融合不同信号肽的h1902-5的设计与表达

设计融合如下信号肽的抗体, 其信号肽序列组合如下:

1. MEWSWVFLFFLSVTTGVHS (SEQ ID NO: 152) 与
MEWSWVFLFFLSVTTGVHS (SEQ ID NO: 152)
- 30 2. MEWSWVFLFFLSLTGVHA (SEQ ID NO: 57) 与
MSVPTQVLGLLLLWLTDVRA (SEQ ID NO: 105)
3. MSVPTQVLGLLLLWLTDVRA (SEQ ID NO: 105) 与
MEWSWVFLFFLSLTGVHA (SEQ ID NO: 57) 与

将上述信号肽组合, 分别置于 h1902-5 抗体重链、轻链 N 端, 并设计相
35 应的新的重、轻链序列。所设计的序列如下:

h1902-5-1 含信号肽的抗体重链氨基酸序列 (SEQ ID NO: 161)

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSEVLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS
YWMHWVRQAPGQRLEWMGMHPNSGSTNYNEKFKGRVTITRDTASASTAYMEL

SSLRSEDVAVYYCARLKTGNSFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS
 GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS
 SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
 PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
 5 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
 SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
 KLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

h1902-5-1 含信号肽的抗体轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO: 162)

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSG
 10 NQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAE
 DVAVYYCQNAYTYPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
 NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKH
 KVVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

h1902-5-2 含信号肽的抗体重链氨基酸序列 (SEQ ID NO: 163)

MEWSWVFLFFLSLTGVHAEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSY
 15 WMHWVRQAPGQRLEWMGMIHPNSGSTNYNEKFKGRVTITRDTASASTAYMELS
 SLRSEDVAVYYCARLKTGNSFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
 GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
 LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
 20 KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
 SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
 KLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

h1902-5-2 含信号肽的抗体轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO: 164)

MSVPTQVLGLLLLWLTDVRAEIVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
 25 GNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQA
 EDVAVYYCQNAYTYPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL
 LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEK
 HKVVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

h1902-5-3 含信号肽的抗体重链氨基酸序列 (SEQ ID NO: 165)

MSVPTQVLGLLLLWLTDVRAEIVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
 30 SYWMHWVRQAPGQRLEWMGMIHPNSGSTNYNEKFKGRVTITRDTASASTAYME
 LSSLRSEDVAVYYCARLKTGNSFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS
 GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS
 35 SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
 PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
 SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
 KLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

h1902-5-3 含信号肽的抗体轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO: 166)

MEWSWVFLFFLSLTGVHADIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGN
 QKNYLTYWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFLTITSSSLQAEDV
 AVYYCQNAYTYPFTFGQGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
 FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV
 5 YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(备注：下划线为信号肽。)

基于上述的 h1902-5-1 或 h1902-5-2 的序列合成各重链和轻链的基因片段，将其构建到表达载体上获得全长抗体质粒。将全长抗体质粒直接电转 CHO 细胞，经筛选后获得了包含该质粒的稳转细胞。培养稳转细胞，将培养后的上清用 Protein A
 10 亲和柱进行纯化，获得表达产物。

实施例2-3：融合不同信号肽的FcRn的设计与表达

抗 FcRn 抗体重、轻链氨基酸序列如下：

重链 (SEQ ID NO: 167)

15 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYNFNKHYYIAWVRQMPGKGLEWMG
 IYPDNSNTIYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYICARFGGPTFA
 QWYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV
 TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNT
 KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
 20 QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
 KCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP
 SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM
 HEALHNHYTQKLSLSLGK

轻链 (SEQ ID NO: 168)

25 NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTGSSGSIASNYVQWYQQRPGSSPTTVIYED
 NQRASGVPDRFSGSIDSSNSASLTISGLKTEDEADYICQSYDSSSHNWVFGGG
 TKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPV
 KAGVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSQCQVTHEGSTVEKTVAPT
 ECS

30 设计融合如下信号肽的抗体，其信号肽序列组合如下：

1. MEWSWVFLFFLSVTTGVHS (SEQ ID NO: 152) 与

MEWSWVFLFFLSVTTGVHS (SEQ ID NO: 152)

2. MEWSWVFLFFLSLTGVHA (SEQ ID NO: 57) 与

MEWSWVFLFFLSLTGVHA (SEQ ID NO: 57)

35 所设计的序列如下：

FcRn-1 含信号肽的抗体重链氨基酸序列 (SEQ ID NO: 169)

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYNFNK
 HYIAWVRQMPGKGLEWMGIIYPDNSNTIYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSL
 KASDTAMYICARFGGPTFAQWYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRS

TSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
 SSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKP
 KDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY
 RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
 5 QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
 RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

FcRn-1 含信号肽的抗体轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO: 170)

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSNFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTGSSGSIASNY
 VQWYQQRPGSSPTTVIYEDNQRASGVPDFRSGSIDSSNSASLTISGLKTEDEAD
 10 YYCQSYDSSSHNWVFGGGTKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLI
 SDFYPGAFTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKKAASSYLSLTPEQWKS
 SYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

FcRn-2 含信号肽的抗体重链氨基酸序列 (SEQ ID NO: 171)

MEWSWVFLFFLSLTGVHAEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYNFNKH
 15 YIAWVRQMPGKGLEWMGIYPDNSNTIYSPSFQGVTVISADKSIATAYLQWSSLK
 ASDTAMYYCARFGGPTFAQWYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRST
 SESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
 SSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKP
 DTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR
 20 VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ
 EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRL
 TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

FcRn-2 含信号肽的抗体轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO: 172)

MEWSWVFLFFLSLTGVHANFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTGSSGSIASNYV
 25 QWYQQRPGSSPTTVIYEDNQRASGVPDFRSGSIDSSNSASLTISGLKTEDEADY
 YCQSYDSSSHNWVFGGGTKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS
 DFYPGAFTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKKAASSYLSLTPEQWKS
 YSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

30 基于 FcRn-1 和 FcRn-2 的序列合成各重链和轻链的基因片段，将其构建到表
 达载体上获得全长抗体质粒。将全长抗体质粒直接电转 CHO 细胞，经筛选后获得
 了包含该质粒的稳转细胞池。培养稳转细胞池，将培养后的上清用 Protein A 亲和
 柱进行纯化，获得表达产物。

测试例2：采用不同信号肽的表达产物的末端异质性

35 **测试例2-1：**融合不同信号肽的Pertuzumab去糖还原分子量及氨基酸序列检测
 通过 PNGase F 糖苷酶 (NEB, P0708) 切除 Pertuzumab-1、Pertuzumab-2、
 Pertuzumab-3, Pertuzumab-4 样品所携带的 N-糖基，再经 DTT (Sigma, 43815)
 还原成轻、重链，最后由 LC-MS (Waters, ACQUITY UPLC H-Class/XeVo G2-XS
 QTOF) 对样品的去糖还原分子量进行检测，并通过 UNIFI 软件进行数据处理及

分析。

Pertuzumab-1 及 Pertuzumab-3 的检测结果如图 4A 至图 4D 所示: Pertuzumab-1 样品中检测到轻链中含有 4.7% 信号肽氨基酸 (RC) 残留; 而 Pertuzumab-3 样品中轻链无信号肽氨基酸残留。Pertuzumab-1 及 Pertuzumab-3 的重链均未检测到信号肽氨基酸残留, 仅有少量糖化修饰。

Pertuzumab-1 经尿素变性处理后, 加入 DTT 还原成轻、重链, 之后加入 Glu C 酶 (Promega, V1651) 进行酶切, 所得样品经 LC-MS 采集分子量数据, 所获得的数据通过 UNIFI 软件进行分析, 得到样品的氨基酸序列信息。

结果显示 Pertuzumab-1 中在去糖还原分子量检测中所出现的异常峰, 经肽图分析验证, 确认为 RC 氨基酸残留。具体结果如表 15 所示。

表 15. Pertuzumab-1 轻链 N 端信号肽肽图检测数据

样品	末端延伸残基	强度	理论分子量 (Da)	实测分子量 (Da)	保留时间 (min)
Pertuzumab-1	无	205984816	1878.8862	1878.8917	30.41
	C	20145608	2038.9168	2038.9145	30.17

注: 本测试例采用 Glu C 酶进行酶切使序列 RC 中的氨基酸 R 被切割, 该残留氨基酸 C 指征 RC 氨基酸残留。

Pertuzumab-2 及 Pertuzumab-4 的检测结果如图 5A 至图 5D 所示: Pertuzumab-2 样品中检测到轻链中含有 5.8% 信号肽氨基酸 (VHS) 残留; 而 Pertuzumab-4 样品中轻链无信号肽氨基酸残留。两种抗体重链均未检测到信号肽氨基酸残留, 仅有少量糖化修饰。

Pertuzumab-2 经尿素变性处理后, 加入 DTT 还原成轻、重链, 之后加入 Glu C 酶进行酶切, 所得样品经 LC-MS 采集分子量数据, 所获得的数据通过 UNIFI 软件进行分析, 得到样品的氨基酸序列信息。

结果显示, Pertuzumab-2 中在去糖还原分子量检测中所出现的异常峰, 经肽图分析验证, 确认为 VHS 氨基酸残留。具体结果如表 16 显示。

表 16. Pertuzumab-1 轻链 N 端信号肽肽图检测数据

样品	末端延伸残基	强度	理论分子量 (Da)	实测分子量 (Da)	保留时间 (min)
Pertuzumab-2	无	177359008	1878.8883	1878.8862	30.4
	VHS	15853681	2202.0450	2202.0455	28.4

25

测试例 2-2: 融合不同信号肽的 h1902-5 去糖还原分子量及氨基酸序列检测

通过 PNGase F 糖苷酶 (NEB, P0708) 切除 h1902-5-1、h1902-5-2 样品所携带的 N-糖基, 再经 DTT (Sigma, 43815) 还原成轻、重链, 最后由 LC-MS (Waters, ACQUITY UPLC H-Class/XeVo G2-XS QTOF) 对样品的去糖还原分子量进行检测, 并通过 UNIFI 软件进行数据处理及分析。

30

结果如图 6A 至图 6D 所示, h1902-5-1 样品中检测到重链中含有 3.1% 信号肽氨基酸 (VHS) 残留; 而 h1902-5-2 样品中重链无信号肽氨基酸残留。两种抗体轻链均未检测到信号肽氨基酸残留, 仅有少量糖化修饰。

h1902-5-1 经尿素变性处理后, 加入 DTT 还原成轻、重链, 之后加入 Glu C 酶进行酶切, 所得样品经 LC-MS 采集分子量数据, 所获得的数据通过 UNIFI 软件进行分析, 得到样品的氨基酸序列信息。

结果显示, h1902-5-1 中于去糖还原分子量检测中所出现的异常峰, 经肽图分析验证, 确认为 VHS 氨基酸残留。具体结果如下表 17 显示。

表 17. h1902-5-1 重链 N 端信号肽肽图检测数据

样品	末端延伸残基	强度	理论分子量 (Da)	实测分子量 (Da)	保留时间 (min)
h1902-5-1	无	150012880	1286.6952	1286.6951	25.53
	VHS	6470631	1609.8517	1609.8544	25.11

10

测试例2-3: 融合不同信号肽的抗FcRn抗体去糖还原分子量及氨基酸序列检测

通过 PNGase F 糖苷酶 (NEB, P0708) 切除 FcRn-1、FcRn-2 样品所携带的 N-糖基, 再经 DTT (Sigma, 43815) 还原成轻、重链, 最后由 LC-MS (Waters, ACQUITY UPLC H-Class/XeVo G2-XS QTOF) 对样品的去糖还原分子量进行检测, 并通过 UNIFI 软件进行数据处理及分析。

15

结果如图 7A 至图 7D 所示, FcRn-1 样品中检测到重链中含有 3.4% 信号肽氨基酸 (VHS) 残留; 而 FcRn-2 样品中重链无信号肽氨基酸残留。两种抗体轻链均未检测到信号肽氨基酸残留, 仅有少量糖化修饰。

FcRn-1 经尿素变性处理后, 加入 DTT 还原成轻、重链, 之后加入 Glu C 酶进行酶切, 所得样品经 LC-MS 采集分子量数据, 所获得的数据通过 UNIFI 软件进行分析, 得到样品的氨基酸序列信息。

20

结果显示, FcRn-1 中于去糖还原分子量检测中所出现的异常峰, 经肽图分析验证, 确认为 VHS 氨基酸残留。具体结果如下表显示。

表 18. FcRn 重链 N 端信号肽肽图检测数据

样品	末端延伸残基	强度	理论分子量 (Da)	实测分子量 (Da)	保留时间(min)
FcRn-1	无	409437184	1286.695	1286.69506	25.69
	VHS	36230248	1609.8521	1609.85441	25.3

25

虽然为了清楚的理解, 已经借助于附图和实例详细描述了上述发明, 但是描述和实例不应当解释为限制本披露的范围。本文中引用的所有专利和科学文献的公开内容通过引用完整地清楚结合。

权利要求书:

1. 降低抗体的重链和/或抗体的轻链的 N 末端异质性的方法, 其包括培养宿主细胞, 其中所述宿主细胞包含

5 (1) 第一多核苷酸, 其编码抗体的重链及与该重链的 N 端有效连接的第一信号肽; 其中, 所述第一信号肽包含 SEQ ID NO: 55 或 SEQ ID NO: 56 的氨基酸序列; 和/或

(2) 第二多核苷酸, 其编码抗体的轻链及与该轻链的 N 端有效连接的第二信号肽; 其中, 所述第二信号肽包含 SEQ ID NO: 55 或 SEQ ID NO: 56 的氨基酸序列;
10 表达所述抗体的重链和/或抗体的轻链。

2. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中, 表达得到的所述抗体的重链和/或抗体的轻链具有低于 3% 的末端延伸比率; 优选地, 表达得到的所述抗体的重链和/或抗体的轻链具有低于 1% 的末端延伸比率。

15

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中所述第一信号肽或所述第二信号肽各自独立的包含 SEQ ID NO: 57、SEQ ID NO: 58、SEQ ID NO: 59、SEQ ID NO: 93、SEQ ID NO: 94、SEQ ID NO: 95、SEQ ID NO: 99、SEQ ID NO: 100、SEQ ID NO: 101、SEQ ID NO: 105、SEQ ID NO: 106、SEQ ID NO: 107、SEQ ID NO: 140、SEQ ID NO:
20 141、SEQ ID NO: 142、SEQ ID NO: 146、SEQ ID NO: 147 或 SEQ ID NO: 148 的氨基酸序列;

优选地, 所述第一信号肽包含 SEQ ID NO: 57 或 SEQ ID NO: 105 的氨基酸序列, 和/或所述第二信号肽包含 SEQ ID NO: 57 或 SEQ ID NO: 105 的氨基酸序列。

25

4. 根据权利要求 1 至 3 任一项所述的方法, 其中所述的抗体是鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、亲和力成熟抗体或多特异性抗体。

30

5. 根据权利要求 1 至 4 任一项所述的方法, 其中所述的抗体选自抗 TLR7 抗体、抗 HER2(ErbB2)抗体、抗 Claudin18.2 抗体、抗 EGFR 抗体、抗 B7H3 抗体、
30 抗 c-Met 抗体、抗 HER3(ErbB3)抗体、抗 HER4(ErbB4)抗体、抗 CD3 抗体、抗 CD20 抗体、抗 CD22 抗体、抗 CD30 抗体、抗 CD33 抗体、抗 CD38 抗体、抗 CD44 抗体、抗 CD47 抗体、抗 CD56 抗体、抗 CD70 抗体、抗 CD73 抗体、抗 CD105 抗体、抗 CEA 抗体、抗 A33 抗体、抗 Cripto 抗体、抗 SOST 抗体、抗 EphA2 抗体、
35 抗 G250 抗体、抗 MUC1 抗体、抗 Lewis Y 抗体、抗 VEGFR 抗体、抗 GPNMB 抗体、抗凝血酶抗体、抗 A β 抗体、抗 Integrin 抗体、抗 ANGPTL3 抗体、抗 PSMA 抗体、抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体、抗 LAG3 抗体、抗 IL-5 抗体、抗 IL-15 抗体、抗 IL-4R 抗体、抗 IL-6R 抗体、抗 TIGHT 抗体、抗 Tenascin-C 抗体、抗 SLC44A4

抗体、抗 PCSK9 抗体、抗 EpCAM 抗体、抗 CTGF 抗体、抗 TSLP 抗体、抗 CEA 抗体、抗 Mesothelin 抗体和抗 FcRn 抗体；

5 优选地，所述的抗体选自 Trastuzumab、Pertuzumab、Nimotuzumab、Enoblituzumab、Emibetuzumab、Inotuzumab、Pinatuzumab、Brentuximab、Gemtuzumab、Bivatuzumab、Lorvotuzumab、cBR96、Gleमतुमामab、抗 Claudin18.2 抗体和抗 FcRn 抗体，其中所述抗 Claudin18.2 抗体的重链包含 SEQ ID NO: 49 的氨基酸序列、轻链包含 SEQ ID NO: 47 的氨基酸序列；所述抗 FcRn 抗体的重链包含 SEQ ID NO: 167 的氨基酸序列，轻链包含 SEQ ID NO: 168 的氨基酸序列。

10 6. 一种多肽，其包含信号肽，所述信号肽包含 SEQ ID NO: 55 或 SEQ ID NO: 56 的氨基酸序列。

7. 根据权利要求 6 所述的多肽，其中，所述多肽还包含与所述信号肽有效连接的异源多肽；

15 优选地，所述异源多肽是抗体的重链或抗体的轻链；

更优选地，所述信号肽与抗体的重链或抗体的轻链的 N 端有效连接。

8. 根据权利要求 6 或 7 所述的多肽，其中所述信号肽包含 SEQ ID NO: 57、SEQ ID NO: 58、SEQ ID NO: 59、SEQ ID NO: 93、SEQ ID NO: 94、SEQ ID NO: 95、20 SEQ ID NO: 99、SEQ ID NO: 100、SEQ ID NO: 101、SEQ ID NO: 105、SEQ ID NO: 106、SEQ ID NO: 107、SEQ ID NO: 140、SEQ ID NO: 141、SEQ ID NO: 142、SEQ ID NO: 146、SEQ ID NO: 147 或 SEQ ID NO: 148 的氨基酸序列；

优选地，所述信号肽包含 SEQ ID NO: 57 或 SEQ ID NO: 105 的氨基酸序列。

25 9. 根据权利要求 6 至 8 任一项所述的多肽，其中所述多肽包含选自由 SEQ ID NO: 157、SEQ ID NO: 158、SEQ ID NO: 159、SEQ ID NO: 160、SEQ ID NO: 163、SEQ ID NO: 164、SEQ ID NO: 165、SEQ ID NO: 166、SEQ ID NO: 171 和 SEQ ID NO: 172 组成的组的氨基酸序列。

30 10. 一种核酸分子，其编码权利要求 6 至 9 任一项所述的多肽。

11. 一种宿主细胞，其包含如权利要求 10 所述的核酸分子。

12. 根据权利要求 11 所述的宿主细胞，所述宿主细胞是真核宿主细胞；优选地，所述真核宿主细胞是 CHO 细胞或酵母。

13. 一种组合物，其含有抗 Claudin18.2 抗体，所述抗 Claudin18.2 抗体的重链

包含 SEQ ID NO: 49 的氨基酸序列, 轻链包含 SEQ ID NO: 47 的氨基酸序列; 该组合物中的抗 Claudin18.2 抗体存在末端异质性, 并且所述抗 Claudin18.2 抗体的重链和/或轻链具有低于 3% 的末端延伸比率;

优选地, 所述抗 Claudin18.2 抗体的重链具有低于 1% 的末端延伸比率。

5

14. 一种组合物, 其含有抗 FcRn 抗体, 所述抗 FcRn 抗体的重链包含 SEQ ID NO: 167 的氨基酸序列, 轻链包含 SEQ ID NO: 168 的氨基酸序列; 该组合物中的抗 FcRn 抗体存在末端异质性, 并且所述抗 FcRn 抗体的重链和/或轻链具有低于 3% 的末端延伸比率;

10

优选地, 所述抗 FcRn 抗体的重链具有低于 1% 的末端延伸比率。

15. 根据权利要求 13 或 14 所述的组合物, 其是由权利要求 1 至 3 任一项所述的方法制备得到的。

说明书附图

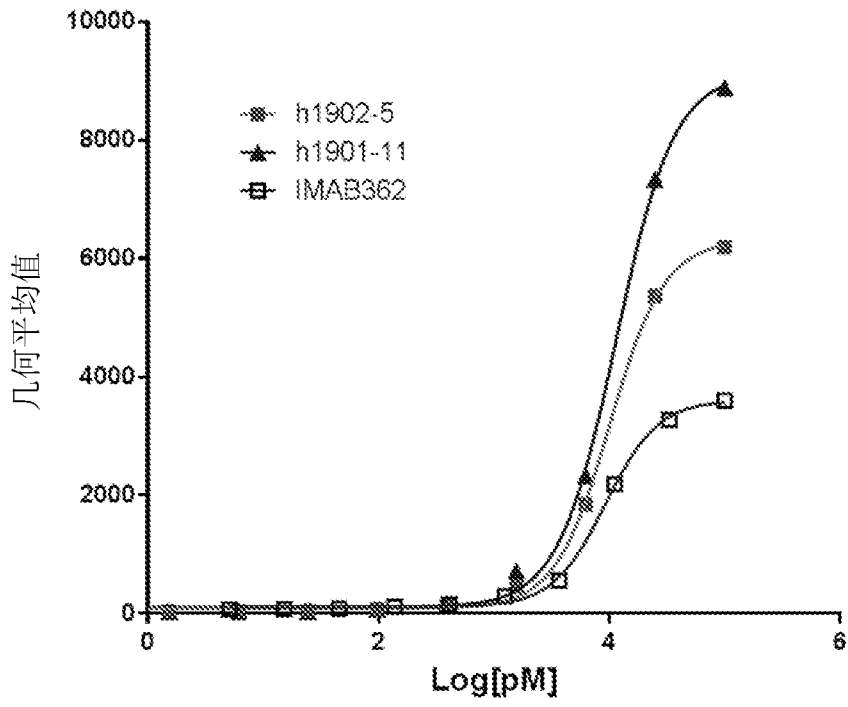


图 1

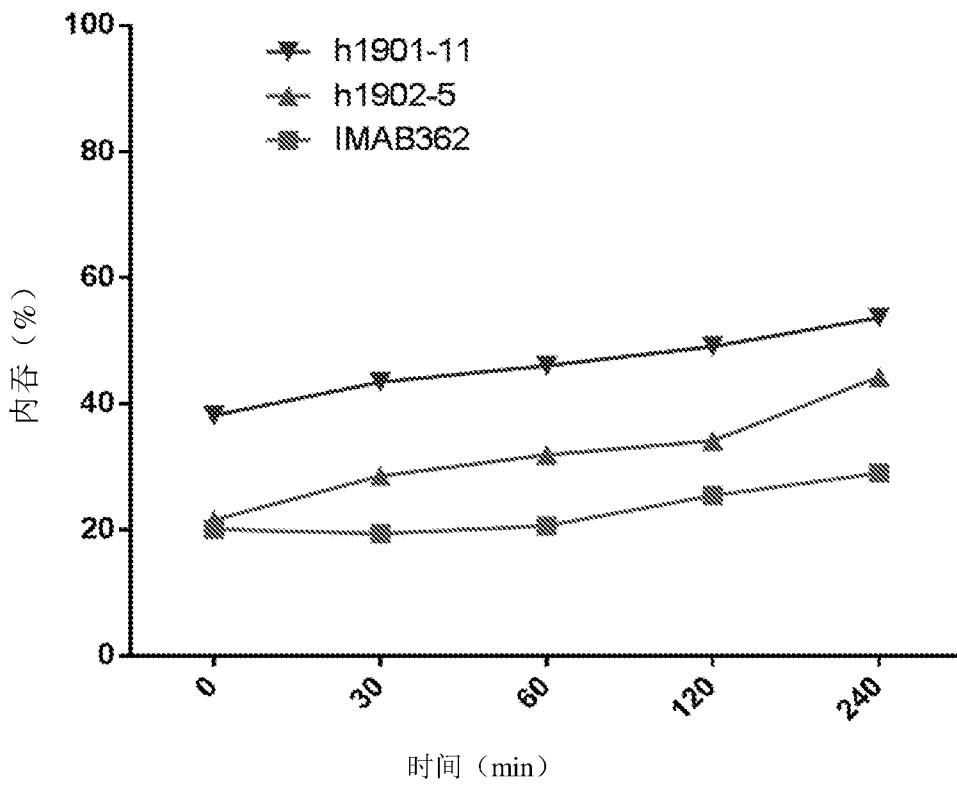


图 2

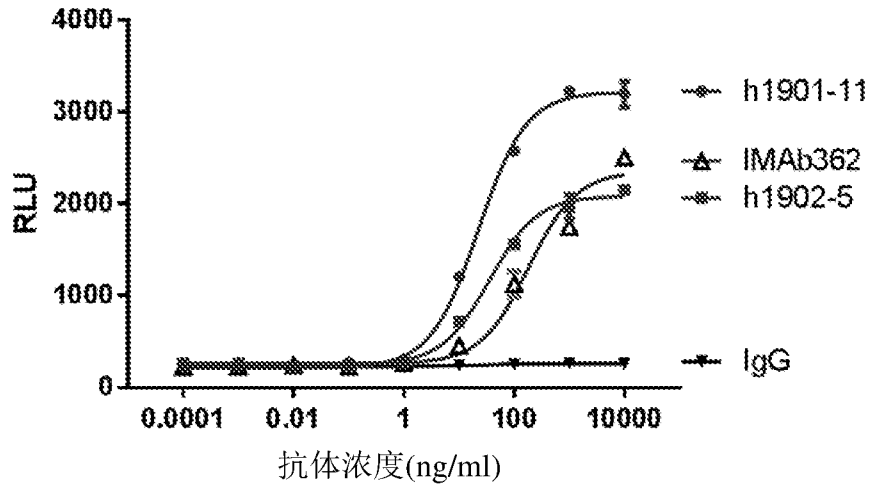


图 3A

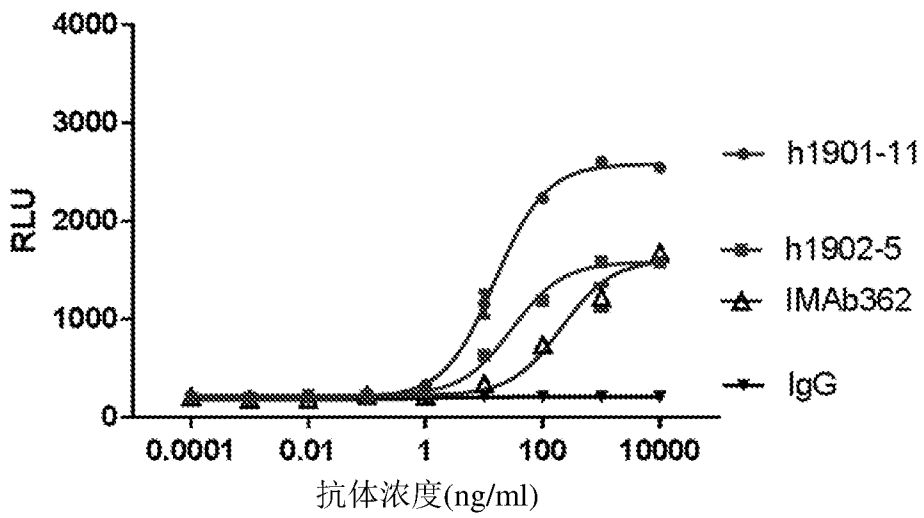


图 3B

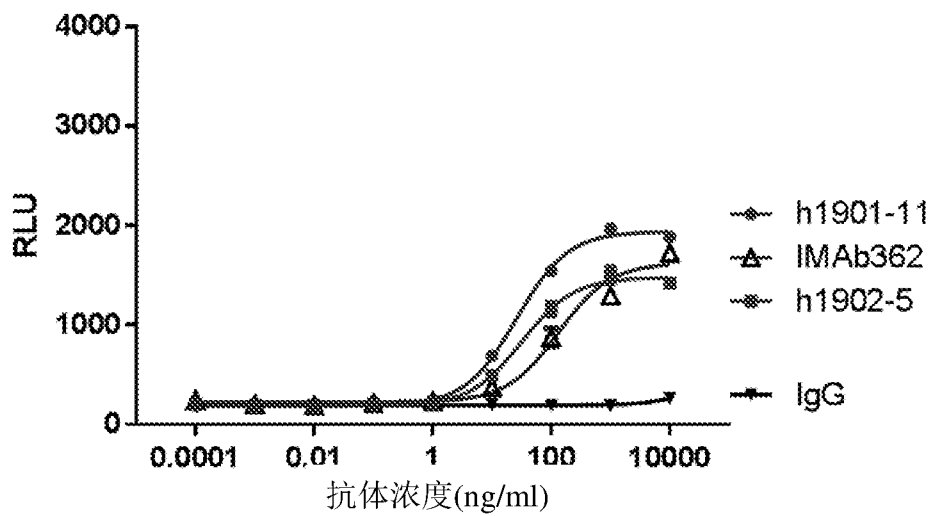


图 3C

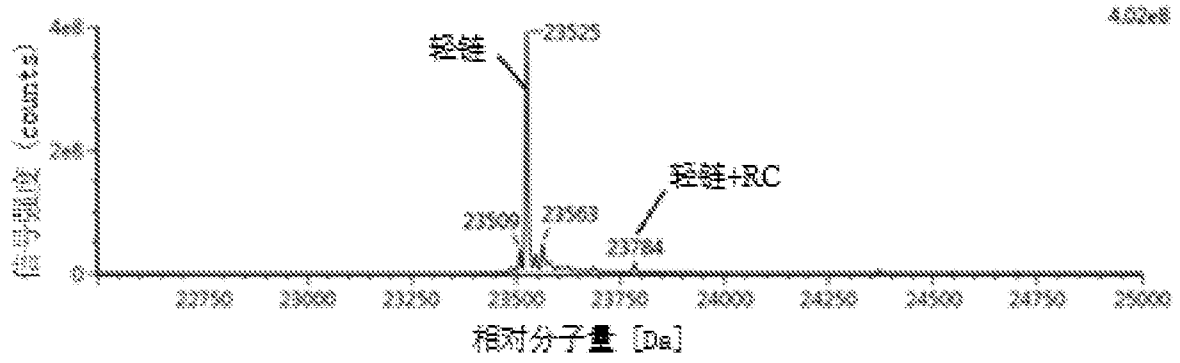


图 4A

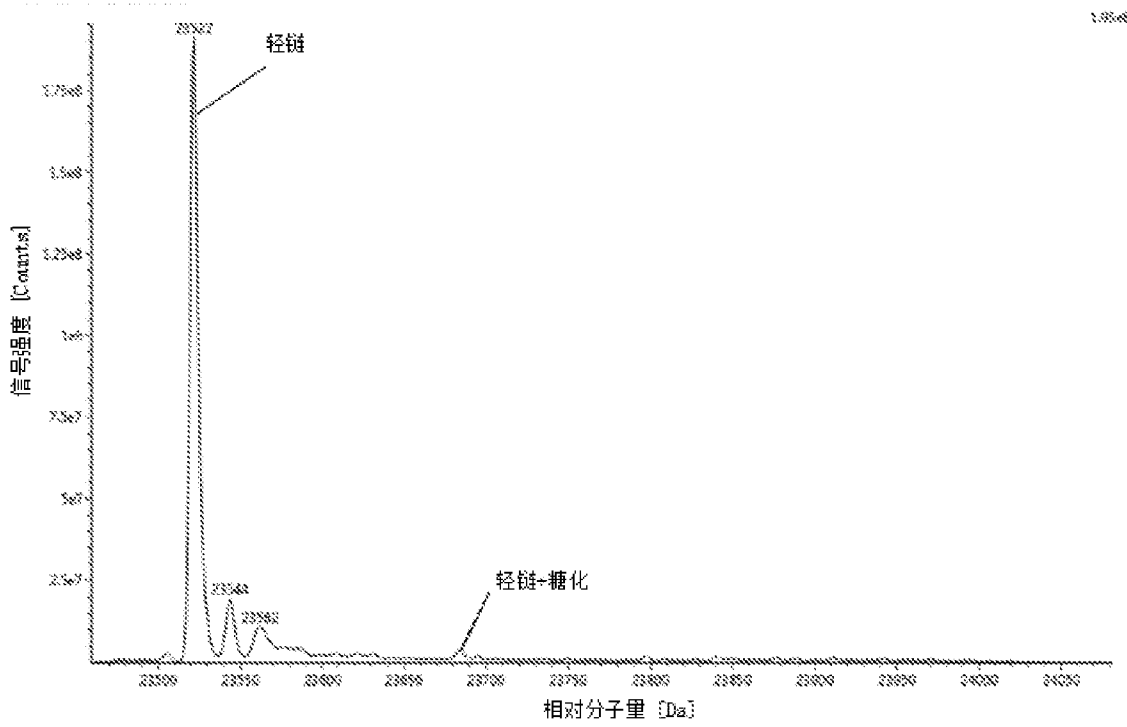


图 4B

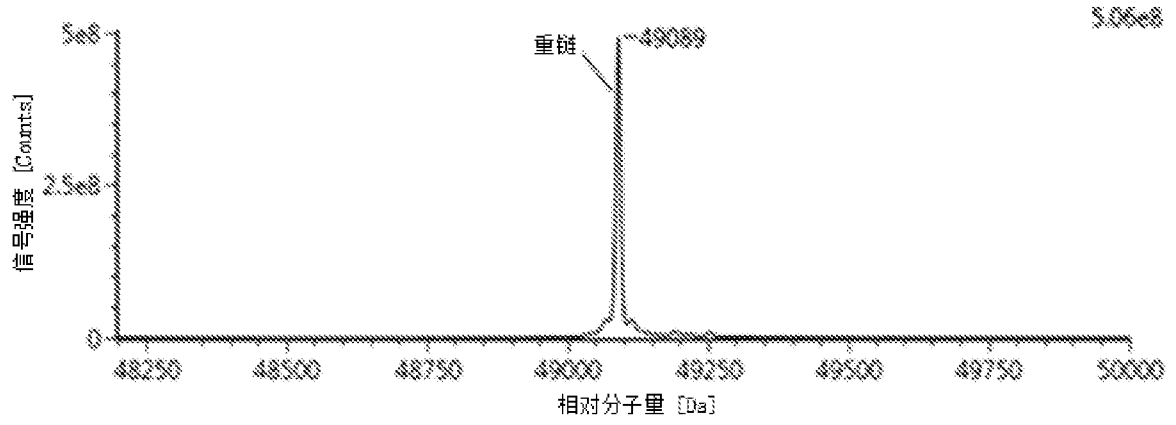


图 4C

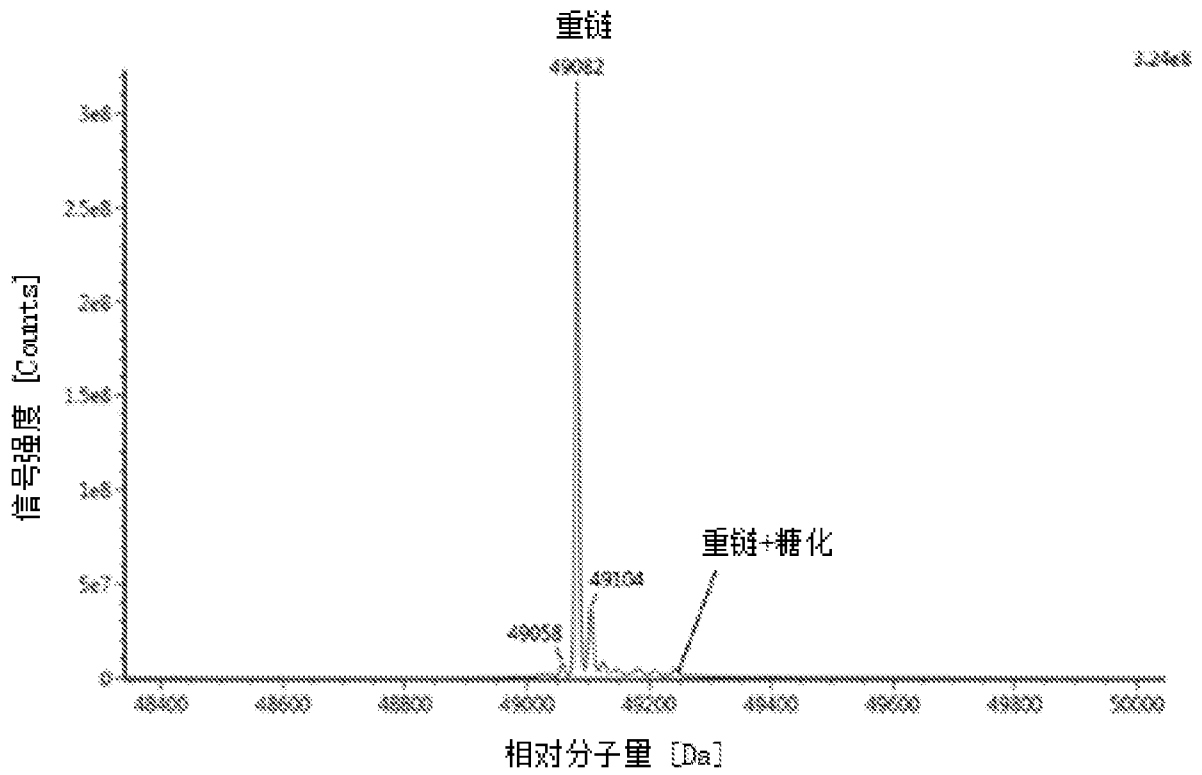


图 4D

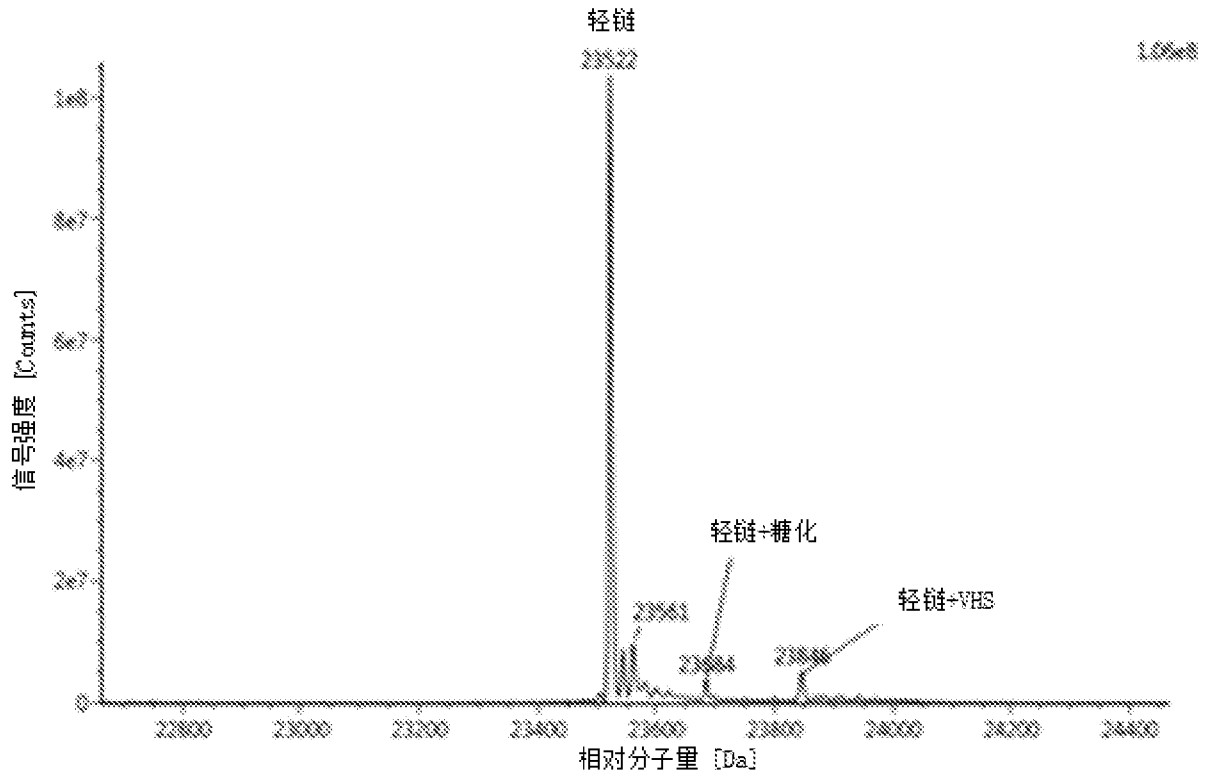


图 5A

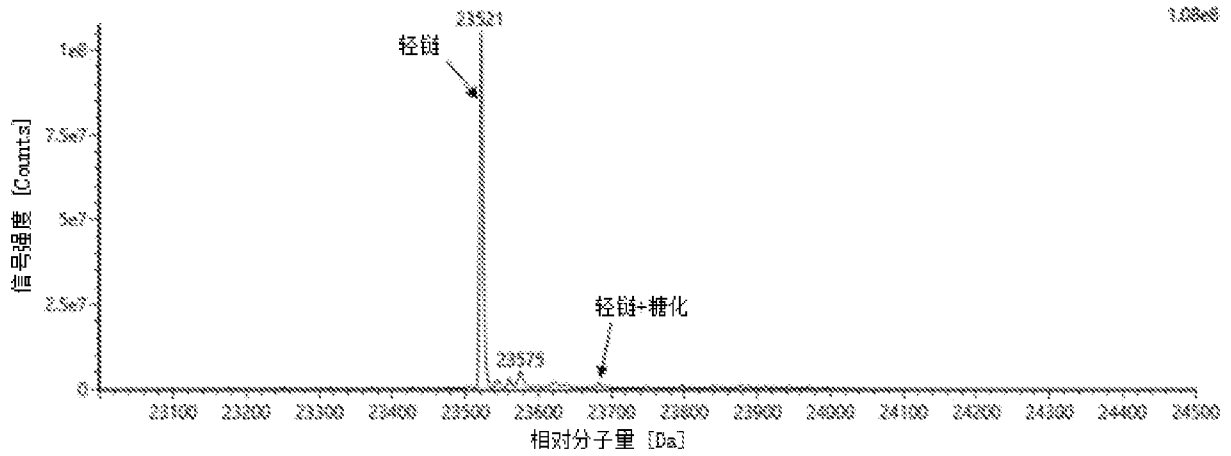


图 5B

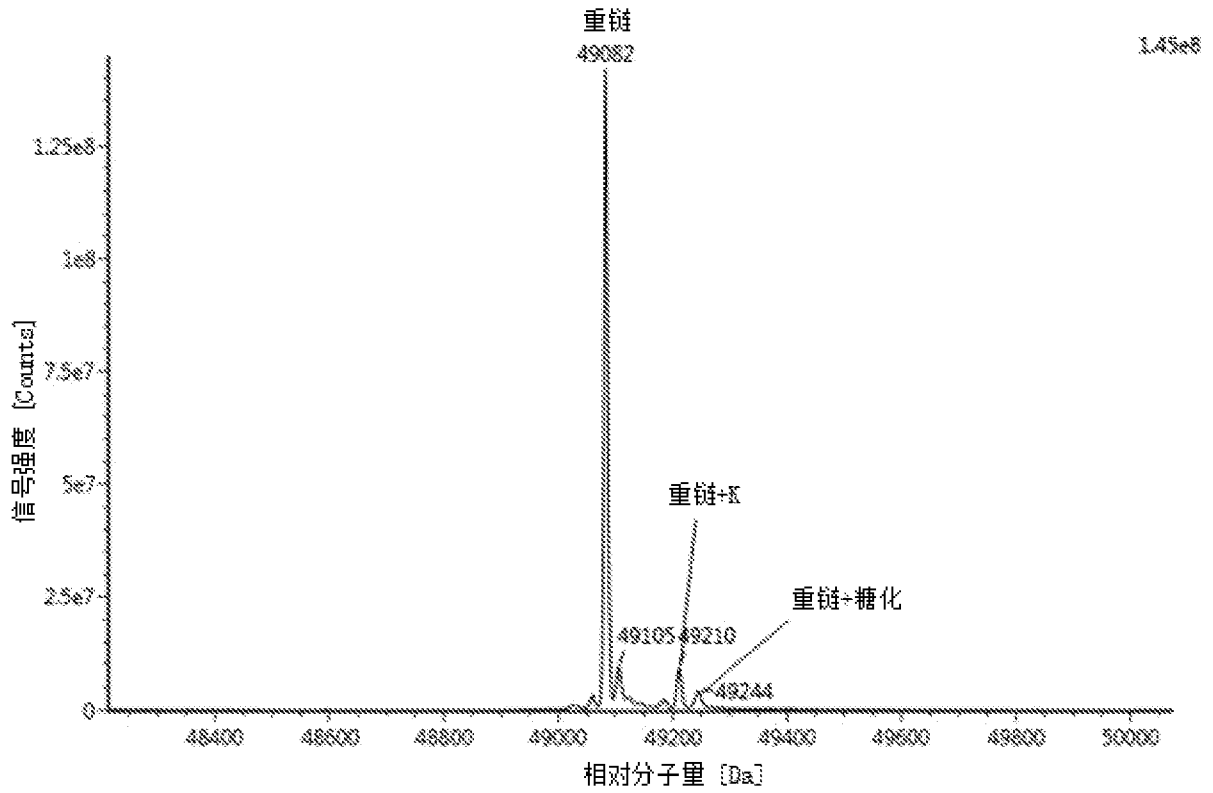


图 5C

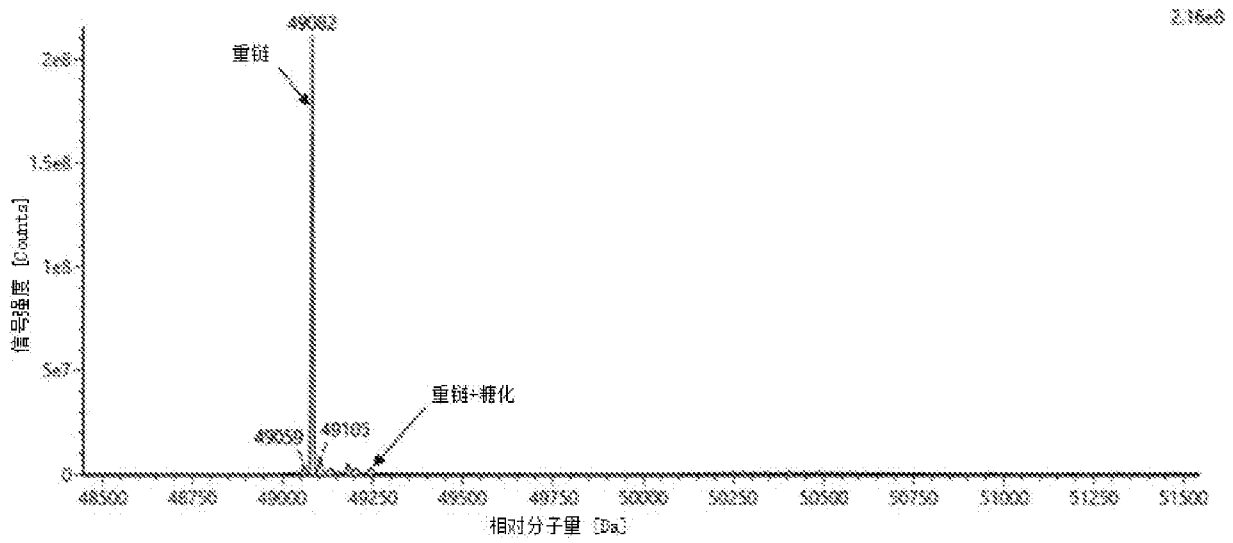


图 5D

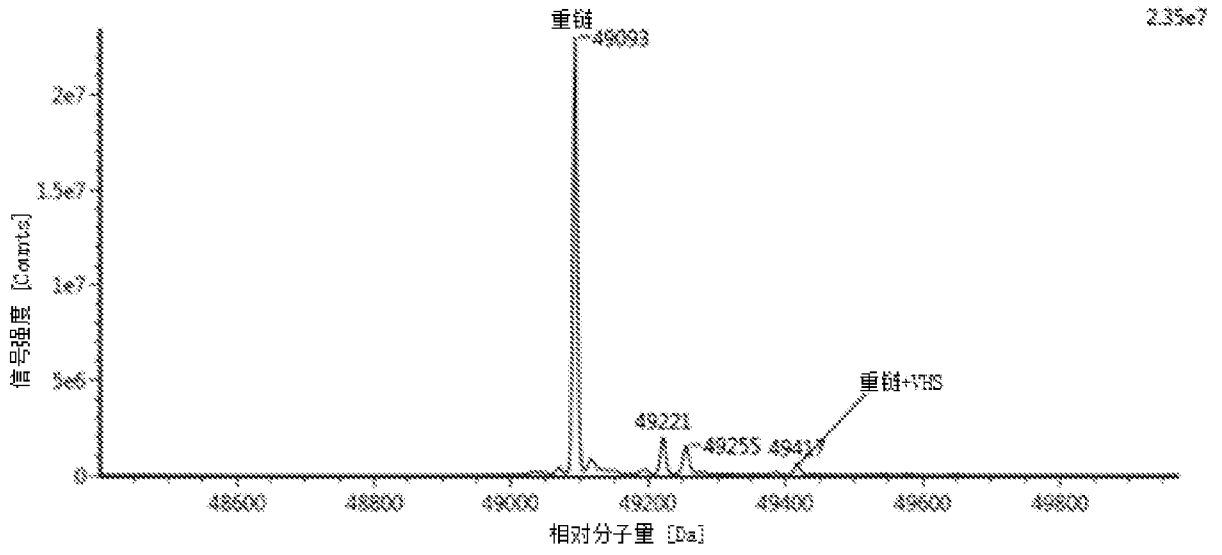


图 6A

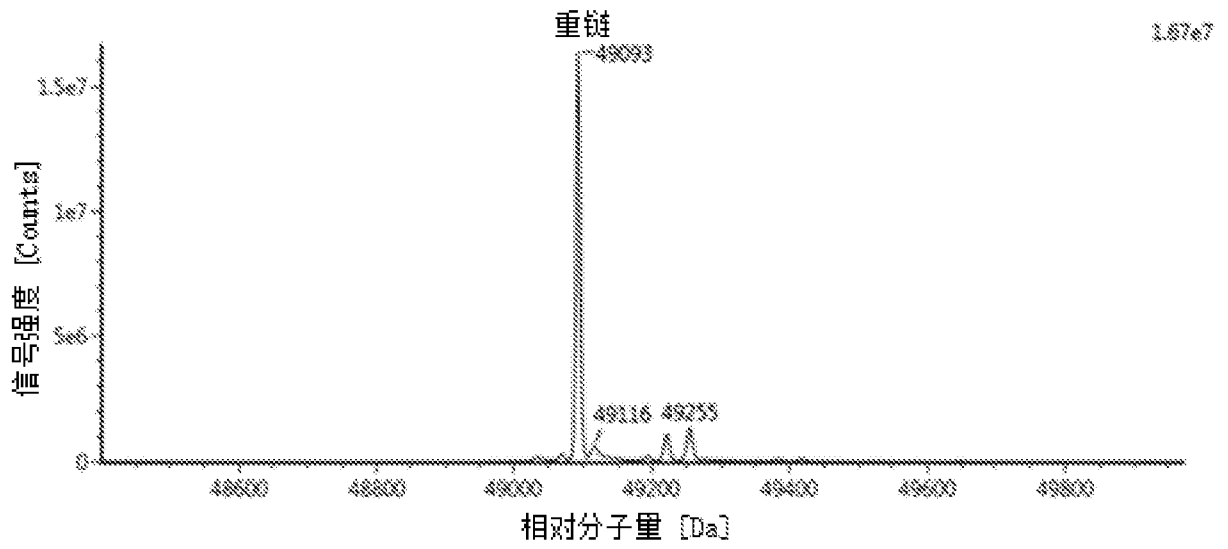


图 6B

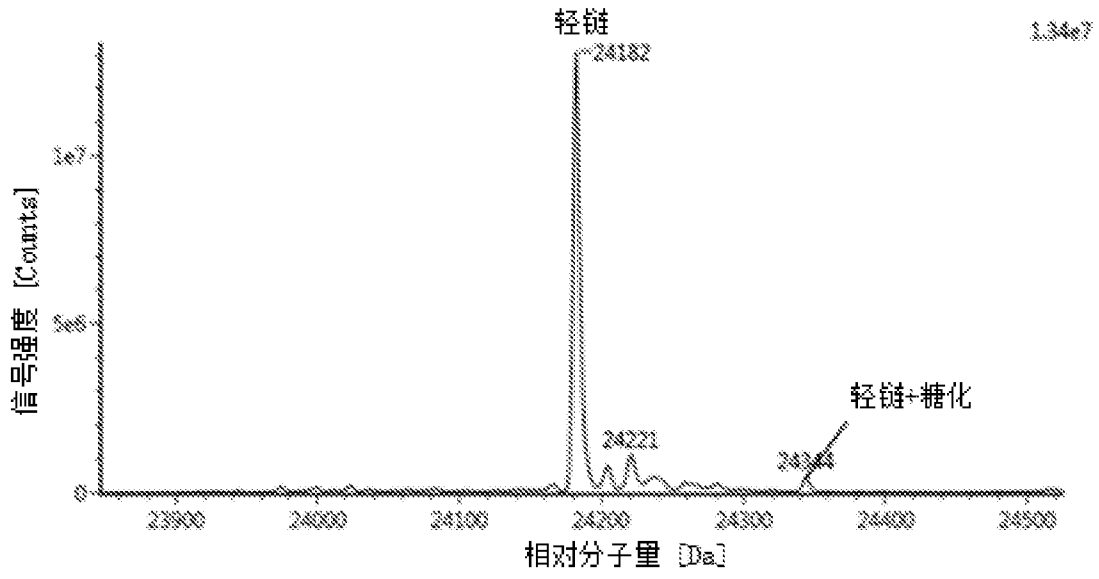


图 6C

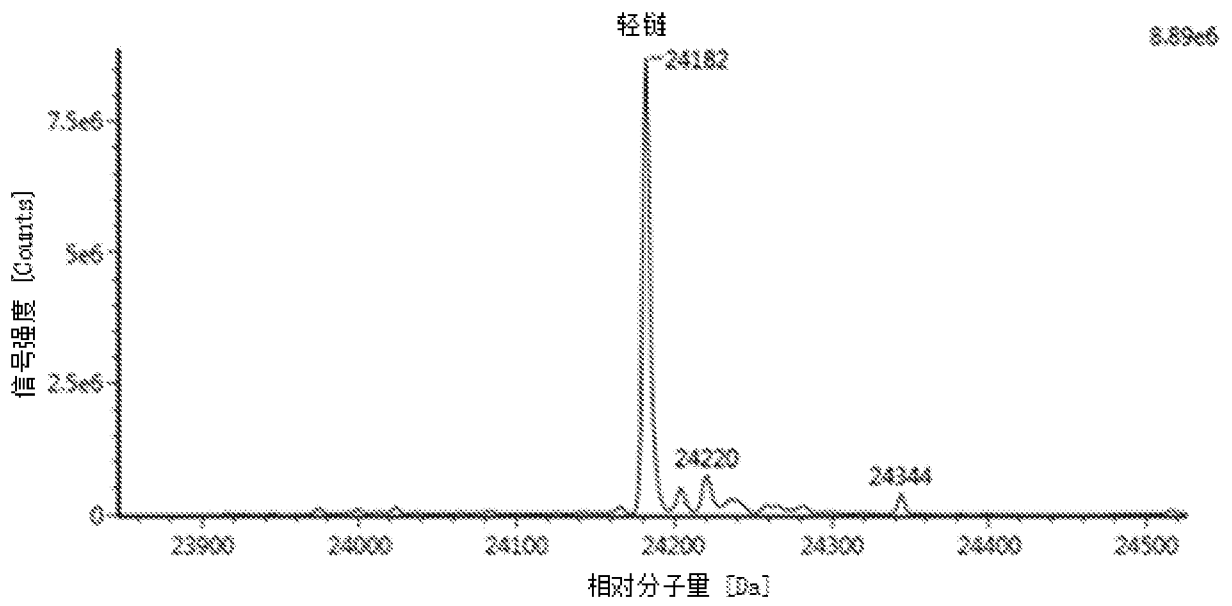


图 6D

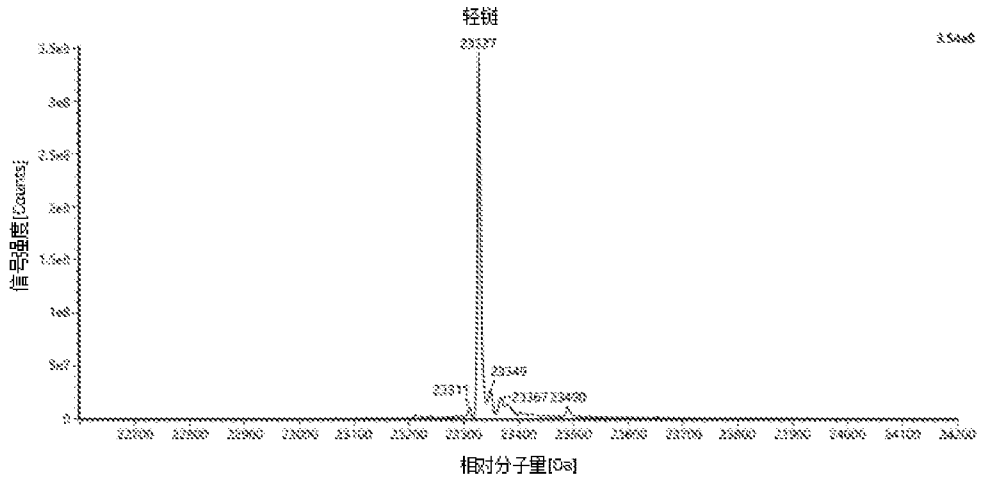


图 7A

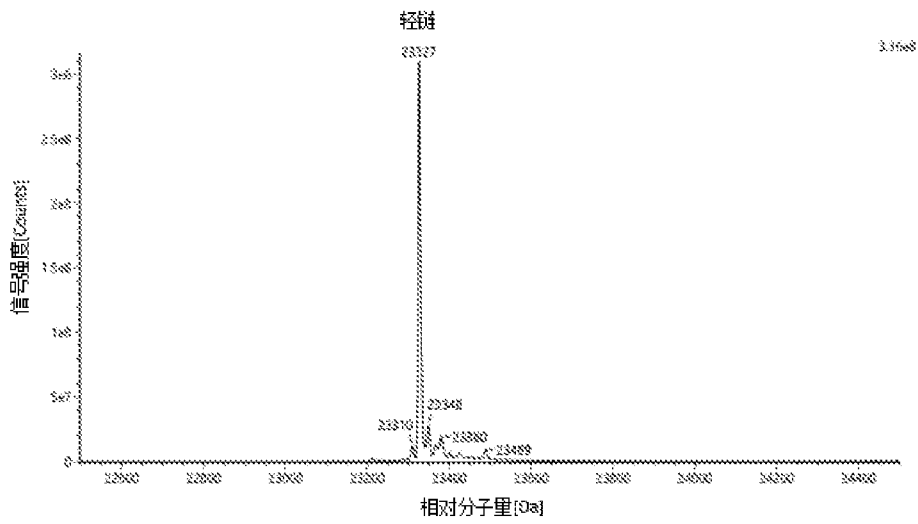


图 7B

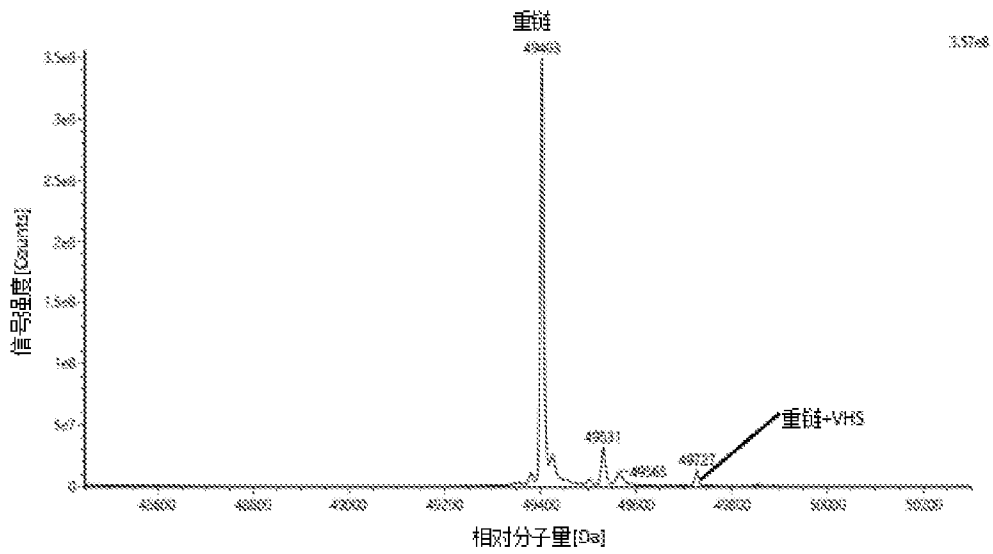


图 7C

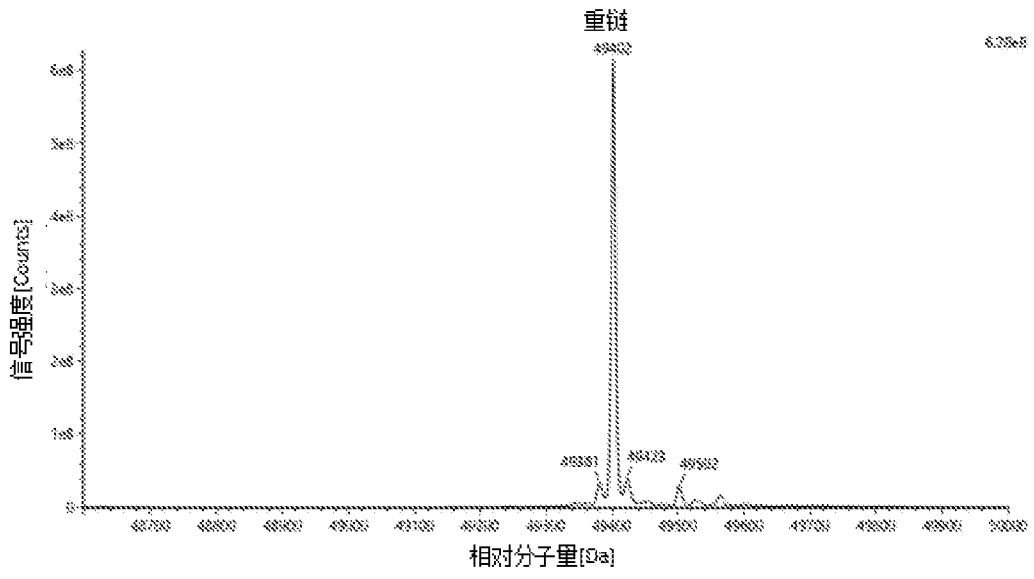


图 7D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/114911

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 16/00(2006.01)i; C07K 14/00(2006.01)i; C12N 15/00(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i; C12P 21/08(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K;C12N;A61K;C12P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNTXT; CJFD; ENTXTC; STN; PubMed; GenBank: 信号肽, 抗体, 异质性, 同质性, SEQ ID NO.: 55-151, Signal peptide, antibod+, heterogeneity, homogeneity		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2015225482 A1 (AGENCY FOR SCIENCE, TECHNOLOGY AND RESEARCH) 13 August 2015 (2015-08-13) description paragraphs 8-13, 50, claims 36-40	1-15
Y	CN 101460520 A (AVEO PHARMACEUTICALS INC. et al.) 17 June 2009 (2009-06-17) claims 1-16, figure 2, figure 4, embodiment 3	1-15
A	WO 2005070962 A1 (NOVOZYMES A/S) 04 August 2005 (2005-08-04) entire document	1-15
A	US 6403769 B1 (THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 11 June 2002 (2002-06-11) entire document	1-15
A	US 2004115775 A1 (APPLIED RESEARCH SYSTEMS) 17 June 2004 (2004-06-17) entire document	1-15
A	陈英等 (CHEN, Ying et al.). "不同信号肽对GLP-1-Fc融合蛋白表达的影响 (Effects of Various Signal Peptides on Expression of GLP-1-Fc Fusion Protein)" <i>中国生物制品学杂志 (Chinese Journal of Biologicals)</i> , Vol. 31, No. 12, 20 December 2018 (2018-12-20), pp. 1326-1332	1-15
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 11 November 2021		Date of mailing of the international search report 26 November 2021
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer Telephone No.

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/114911

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2015225482	A1	13 August 2015	EP	2906599	A1	19 August 2015
				EP	2906599	A4	27 April 2016
				EP	2906599	B1	17 July 2019
				WO	2014058389	A1	17 April 2014
				CN	104854133	A	19 August 2015
				SG	11201502816 Y	A	28 May 2015
				US	10066019	B2	04 September 2018
CN	101460520	A	17 June 2009	ZA	200809484	B	25 November 2009
				CN	101460521	A	17 June 2009
				SI	2027156	T1	31 May 2011
				CN	101460520	B	26 December 2012
				ZA	200809483	B	25 November 2009
WO	2005070962	A1	04 August 2005	JP	2007535913	A	13 December 2007
				TW	200540185	A	16 December 2005
				AR	047440	A1	18 January 2006
				EP	1711529	A1	18 October 2006
				AU	2005206251	A1	04 August 2005
				CA	2553731	A1	04 August 2005
				JP	H09509054	A	16 September 1997
US	6403769	B1	11 June 2002	AT	203274	T	15 August 2001
				AU	1690295	A	21 August 1995
				AU	689214	B2	26 March 1998
				CA	2182498	A1	10 August 1995
				DE	69521789	D1	23 August 2001
				DE	69521789	T2	25 April 2002
				EP	0742830	A1	20 November 1996
				EP	0742830	B1	18 July 2001
				WO	9521258	A1	10 August 1995
				DK	1339855	T3	30 August 2010
				DE	60142446	D1	05 August 2010
				US	2006234352	A1	19 October 2006
				US	7282352	B2	16 October 2007
				EP	1339855	A2	03 September 2003
EP	1339855	B1	23 June 2010				
ES	2346956	T3	22 October 2010				
AU	2245402	A	18 June 2002				
JP	2004516830	A	10 June 2004				
WO	0246430	A2	13 June 2002				
WO	0246430	A3	03 January 2003				
PT	1339855	E	07 July 2010				
SI	1339855	T1	31 August 2010				
AU	2002222454	B2	05 April 2007				
CY	1110670	T1	10 June 2015				
AT	471986	T	15 July 2010				
IL	140110	D0	10 February 2002				

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/114911

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07K 16/00(2006.01)i; C07K 14/00(2006.01)i; C12N 15/00(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i; C12P 21/08(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																							
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07K;C12N;A61K;C12P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNXTX;CJFD;ENTXTC; STN;PubMed;GenBank:信号肽, 抗体, 异质性, 同质性, SEQ ID NO.:55-151,Signal peptide, antibody+, heterogeneity, homogeneity</p>																							
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>US 2015225482 A1 (AGENCY FOR SCIENCE TECHNOLOGY AND RESEARCH) 2015年 8月 13日 (2015 - 08 - 13) 说明书第8-13、50段, 权利要求36-40</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 101460520 A (AVE0制药公司等) 2009年 6月 17日 (2009 - 06 - 17) 权利要求1-16, 图2, 图4, 实施例3</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2005070962 A1 (NOVOZYMES A/S) 2005年 8月 4日 (2005 - 08 - 04) 全文</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 6403769 B1 (THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 2002年 6月 11日 (2002 - 06 - 11) 全文</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2004115775 A1 (APPLIED RESEARCH SYSTEMS) 2004年 6月 17日 (2004 - 06 - 17) 全文</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>陈英等. “不同信号肽对GLP-1-Fc融合蛋白表达的影响” 中国生物制品学杂志, 第31卷, 第12期, 2018年 12月 20日 (2018 - 12 - 20), 第1326-1332页</td> <td>1-15</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	Y	US 2015225482 A1 (AGENCY FOR SCIENCE TECHNOLOGY AND RESEARCH) 2015年 8月 13日 (2015 - 08 - 13) 说明书第8-13、50段, 权利要求36-40	1-15	Y	CN 101460520 A (AVE0制药公司等) 2009年 6月 17日 (2009 - 06 - 17) 权利要求1-16, 图2, 图4, 实施例3	1-15	A	WO 2005070962 A1 (NOVOZYMES A/S) 2005年 8月 4日 (2005 - 08 - 04) 全文	1-15	A	US 6403769 B1 (THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 2002年 6月 11日 (2002 - 06 - 11) 全文	1-15	A	US 2004115775 A1 (APPLIED RESEARCH SYSTEMS) 2004年 6月 17日 (2004 - 06 - 17) 全文	1-15	A	陈英等. “不同信号肽对GLP-1-Fc融合蛋白表达的影响” 中国生物制品学杂志, 第31卷, 第12期, 2018年 12月 20日 (2018 - 12 - 20), 第1326-1332页	1-15
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																					
Y	US 2015225482 A1 (AGENCY FOR SCIENCE TECHNOLOGY AND RESEARCH) 2015年 8月 13日 (2015 - 08 - 13) 说明书第8-13、50段, 权利要求36-40	1-15																					
Y	CN 101460520 A (AVE0制药公司等) 2009年 6月 17日 (2009 - 06 - 17) 权利要求1-16, 图2, 图4, 实施例3	1-15																					
A	WO 2005070962 A1 (NOVOZYMES A/S) 2005年 8月 4日 (2005 - 08 - 04) 全文	1-15																					
A	US 6403769 B1 (THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 2002年 6月 11日 (2002 - 06 - 11) 全文	1-15																					
A	US 2004115775 A1 (APPLIED RESEARCH SYSTEMS) 2004年 6月 17日 (2004 - 06 - 17) 全文	1-15																					
A	陈英等. “不同信号肽对GLP-1-Fc融合蛋白表达的影响” 中国生物制品学杂志, 第31卷, 第12期, 2018年 12月 20日 (2018 - 12 - 20), 第1326-1332页	1-15																					
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																							
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>																							
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2021年 11月 11日</p>	<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2021年 11月 26日</p>																						
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>	<p>授权官员</p> <p>吕小蒙</p> <p>电话号码 86-(10)-53962044</p>																						

第1栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:
- a. 作为国际申请的一部分提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式
 - 纸件或图形文件形式
- b. 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
- c. 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))
 - 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)
2. 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。
3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/114911

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)				
US	2015225482	A1	2015年 8月 13日	EP	2906599	A1	2015年 8月 19日				
				EP	2906599	A4	2016年 4月 27日				
				EP	2906599	B1	2019年 7月 17日				
				WO	2014058389	A1	2014年 4月 17日				
				CN	104854133	A	2015年 8月 19日				
				SG	11201502816Y	A	2015年 5月 28日				
				US	10066019	B2	2018年 9月 4日				
CN	101460520	A	2009年 6月 17日	ZA	200809484	B	2009年 11月 25日				
				CN	101460521	A	2009年 6月 17日				
				SI	2027156	T1	2011年 5月 31日				
				CN	101460520	B	2012年 12月 26日				
				ZA	200809483	B	2009年 11月 25日				
WO	2005070962	A1	2005年 8月 4日	JP	2007535913	A	2007年 12月 13日				
				TW	200540185	A	2005年 12月 16日				
				AR	047440	A1	2006年 1月 18日				
				EP	1711529	A1	2006年 10月 18日				
				AU	2005206251	A1	2005年 8月 4日				
				CA	2553731	A1	2005年 8月 4日				
US	6403769	B1	2002年 6月 11日	JP	H09509054	A	1997年 9月 16日				
				AT	203274	T	2001年 8月 15日				
				AU	1690295	A	1995年 8月 21日				
				AU	689214	B2	1998年 3月 26日				
				CA	2182498	A1	1995年 8月 10日				
				DE	69521789	D1	2001年 8月 23日				
				DE	69521789	T2	2002年 4月 25日				
				EP	0742830	A1	1996年 11月 20日				
				EP	0742830	B1	2001年 7月 18日				
				WO	9521258	A1	1995年 8月 10日				
				US	2004115775	A1	2004年 6月 17日	DK	1339855	T3	2010年 8月 30日
								DE	60142446	D1	2010年 8月 5日
								US	2006234352	A1	2006年 10月 19日
US	7282352	B2	2007年 10月 16日								
EP	1339855	A2	2003年 9月 3日								
EP	1339855	B1	2010年 6月 23日								
ES	2346956	T3	2010年 10月 22日								
AU	2245402	A	2002年 6月 18日								
JP	2004516830	A	2004年 6月 10日								
WO	0246430	A2	2002年 6月 13日								
WO	0246430	A3	2003年 1月 3日								
PT	1339855	E	2010年 7月 7日								
SI	1339855	T1	2010年 8月 31日								
AU	2002222454	B2	2007年 4月 5日								
CY	1110670	T1	2015年 6月 10日								
AT	471986	T	2010年 7月 15日								
IL	140110	D0	2002年 2月 10日								