



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 114702587 A

(43) 申请公布日 2022. 07. 05

(21) 申请号 202210393772.0

(22) 申请日 2020.05.08

(30) 优先权数据

19173633.9 2019.05.09 EP

(62) 分案原申请数据

202080048983.X 2020.05.08

(71) 申请人 美勒斯公司

地址 荷兰乌特勒支

(72) 发明人 科内利斯·阿德里安·德克吕夫

彼得·布莱恩·西尔弗曼

理查德·博诺

(74) 专利代理机构 北京派特恩知识产权代理有

限公司 11270

专利代理师 王子晔 李维凤

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/36 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 1/18 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

权利要求书7页 说明书72页

序列表50页 附图36页

(54) 发明名称

用于使蛋白质多聚化的变体结构域及其分离

(57) 摘要

本发明涉及用于产生且分离包括第免疫球蛋白多肽和第二免疫球蛋白多肽的免疫球蛋白蛋白质的手段和方法,尤其关于用于产生且分离包括所述第免疫球蛋白多肽和第二免疫球蛋白多肽的蛋白质的手段和方法。通过包括来自产生所需免疫球蛋白蛋白质的细胞的氨基酸变体及变体分离结构域,可将如所产生的所需免疫球蛋白蛋白质与免疫球蛋白蛋白质混合物分离。

1. 一种免疫球蛋白CH1、CH2、CH3区或所述区的组合,所述区包括在免疫球蛋白中未经表面暴露的氨基酸的变体,其中所述变体选自

- 中性氨基酸变带负电氨基酸;
- 带正电氨基酸变中性氨基酸;
- 带正电氨基酸变带负电氨基酸;
- 中性氨基酸变带正电氨基酸;
- 带负电氨基酸变中性氨基酸;以及
- 带负电氨基酸变带正电氨基酸。

2. 根据权利要求1所述的免疫球蛋白区,其包括在免疫球蛋白中未经表面暴露的氨基酸的两个或更多个变体。

3. 根据权利要求1或权利要求2所述的免疫球蛋白区,其中所述氨基酸的变体不处于CH1/CL、CH2/CH2结构域或CH3/CH3结构域界面中。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的免疫球蛋白区,其为IgG区,优选为IgG1区。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的免疫球蛋白区,其中所述未经表面暴露的氨基酸为内埋式的。

6. 一种免疫球蛋白CH1区,其包括选自以下的氨基酸的变体:N159、N201、T120、K147、D148、Y149、V154、A172、Q175、S190以及K213(EU编号)。

7. 根据权利要求5所述的免疫球蛋白CH1区,其包括选自以下的氨基酸的变体:D148、Y149、V154、N159、A172、S190以及N201。

8. 根据权利要求6或权利要求7所述的免疫球蛋白CH1区,其包括选自N159和/或N201的氨基酸的变体。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的免疫球蛋白CH1区,其包括所述氨基酸的两个或更多个变体。

10. 根据权利要求9所述的免疫球蛋白CH1区,其中所述两个或更多个变体包括以下中的两者或更多者:

- 中性氨基酸变带负电氨基酸;
 - 带正电氨基酸变中性氨基酸;
 - 带正电氨基酸变带负电氨基酸;
- 或以下中的两者或更多者:
- 中性氨基酸变带正电氨基酸;
 - 带负电氨基酸变中性氨基酸;以及
 - 带负电氨基酸变带正电氨基酸。

11. 根据权利要求9或权利要求10所述的免疫球蛋白CH1区,其包括选自以下的组的氨基酸的变体:A172/S190/N201、T197/K213、D148/Q175、N159/Q213、K147/Q175、Y149/V154/A172/S190、N201/K213、T120/N201、N201/N159、T120/N159、T120/N201/N159以及N201/K213/N159。

12. 一种免疫球蛋白CH2区,其包括氨基酸V303的变体。

13. 一种免疫球蛋白CH3区,其包括选自以下的氨基酸的变体:K370、E382以及E388,优选E388。

14. 根据权利要求6至13所述的免疫球蛋白区,其中所述变体选自
- 中性氨基酸变带负电氨基酸;
 - 带正电氨基酸变中性氨基酸;
 - 带正电氨基酸变带负电氨基酸;
 - 中性氨基酸变带正电氨基酸;
 - 带负电氨基酸变中性氨基酸;以及
 - 带负电氨基酸变带正电氨基酸。
15. 根据权利要求1至5所述的免疫球蛋白区,其包括根据权利要求6至14所述的免疫球蛋白区。
16. 一种免疫球蛋白CH1/CL结构域、CH2结构域或CH3结构域,其包括根据权利要求1至15所述的免疫球蛋白区。
17. 根据权利要求16所述的免疫球蛋白CH2结构域,其进一步包括Fc沉默突变。
18. 根据权利要求16所述的免疫球蛋白CH3结构域,其进一步包括CH3异源二聚化结构域,其优选包括于一个CH3区中的CH3变体L351D和L368E以及于另一CH3区上的CH3变体T366K和L351K。
19. 一种蛋白质,其包括根据权利要求16至18所述的免疫球蛋白结构域。
20. 一种抗体,优选地多特异性抗体,其包括根据权利要求16至19所述的免疫球蛋白结构域。
21. 根据权利要求20所述的多特异性抗体,其包括不同重链。
22. 根据权利要求20或21所述的抗体,其包括有包括选自以下的一个或多个变体的第一重链:
- 中性氨基酸变带负电氨基酸;
 - 带正电氨基酸变中性氨基酸;
 - 带正电氨基酸变带负电氨基酸;以及
- 不同于所述第一重链的包括选自以下的一个或多个变体的第二重链:
- 中性氨基酸变带正电氨基酸;
 - 带负电氨基酸变中性氨基酸;以及
 - 带负电氨基酸变带正电氨基酸。
23. 根据权利要求20至22所述的多特异性抗体,其中所述重链包括可相容异源二聚化区。
24. 根据权利要求23所述的多特异性抗体,其包括可相容CH3异源二聚化区。
25. 根据权利要求21至24所述的多特异性抗体,其中所述重链中的一者包括CH3变体L351D和L368E,并且所述重链中的另一者包括CH3变体T366K和L351K。
26. 根据权利要求20至25中任一项所述的抗体,其包括第一重链和不同的第二重链,并且其中所述第一重链包括选自以下的一个或多个变体:
- 中性氨基酸变带负电氨基酸;
 - 带正电氨基酸变中性氨基酸;以及
 - 带正电氨基酸变带负电氨基酸;并且
- 其中所述第一重链进一步包括CH3变体L351D和L368E;并且所述第二重链包括CH3变体

T366K和L351K。

27. 根据权利要求20至26中任一项所述的抗体,其包括第一重链和不同的第二重链,并且其中所述第二重链包括选自以下的一个或多个变体:

- 中性氨基酸变带正电氨基酸;
- 带负电氨基酸变中性氨基酸;以及
- 带负电氨基酸变带正电氨基酸;并且

其中所述第一重链进一步包括CH3变体L351D和L368E;并且所述第二重链包括CH3变体T366K和L351K。

28. 根据1至19所述的免疫球蛋白区或结构域、根据权利要求20所述的蛋白质或根据权利要求21至27所述的抗体,其包括表14部分B的CH1区序列、CH2区序列和/或CH3区序列。

29. 根据1至18所述的免疫球蛋白区或结构域、根据权利要求19所述的蛋白质或根据权利要求20至27所述的抗体或根据权利要求28所述的免疫球蛋白区或结构域、蛋白质或抗体,其包括人类免疫球蛋白区,优选IgG区,优选IgG1区。

30. 根据权利要求20至29中任一项所述的抗体,其为IgG1抗体。

31. 根据权利要求20至30中任一项所述的抗体,其包括一个或多个抗体轻链。

32. 一种组合物,其包括根据1至31所述的免疫球蛋白区、免疫球蛋白结构域、蛋白质或抗体。

33. 一种药物组合物,其包括根据1至32所述的免疫球蛋白区、免疫球蛋白结构域、蛋白质或抗体且优选包括药学上可接受的赋形剂。

34. 一种核酸,其编码根据1至33所述的免疫球蛋白区、免疫球蛋白结构域、蛋白质或抗体。

35. 一种核酸,其编码根据权利要求20至31所述的抗体。

36. 一种重组宿主细胞,其包括根据权利要求34或权利要求35所述的核酸。

37. 一种产生根据权利要求20至31中任一项所述的抗体的方法,其中所述方法包括以下步骤:

提供编码具有根据权利要求1至15中任一项所述的CH1、CH2、CH3区或其组合或根据权利要求16至18所述的结构域的第一重链的核酸;

提供编码第二重链的核酸,其中所述第一重链和所述第二重链可为相同或不同的;

提供编码轻链的核酸;

将所述核酸引入宿主细胞中且培养所述宿主细胞以表达所述核酸;以及通过执行以下步骤中的至少一个来产生所述抗体:

自宿主细胞培养物收集所述抗体,

执行收获物澄清,

执行蛋白质捕获,

执行阴离子交换层析,以及

执行阳离子交换层析以将所述抗体与另一抗体或抗体片段分离。

38. 一种产生根据权利要求20至31中任一项所述的抗体的方法,其中所述方法包括以下步骤:

提供编码具有根据权利要求1至15中任一项所述的CH1、CH2、CH3区或其组合或根据权

利要求16至20所述的结构域的第一重链的核酸；

提供编码第二重链的核酸，其中所述第一重链和所述第二重链可为相同或不同的；

提供编码轻链的核酸；

将所述核酸引入宿主细胞中且培养所述宿主细胞以表达所述核酸；以及

自所述宿主细胞培养物收集所述抗体，以及

在分离步骤中通过在凝胶上进行等电聚焦来将所述抗体与其他抗体或抗体片段分离。

39. 根据权利要求37或38所述的方法，其中所述第一重链和所述第二重链包括可相容异源二聚化区，优选可相容CH3异源二聚化区。

40. 一种用于产生多特异性抗体的方法，所述多特异性抗体包括等电点不同的第一重链和第二重链，其中所述方法包括以下步骤：

提供编码所述第一重链的CH1、CH2、CH3区或其组合的核酸及编码所述第二重链的CH1、CH2、CH3区或其组合的核酸，使得第一经编码重链的等电点与第二经编码重链的等电点不同，其中所述CH1区中的至少一者包括在选自N159、N201、T120、K147、D148、Y149、V154、A172、Q175、S190以及K213 (EU编号) 的位置处的氨基酸变体或在位置V303 (EU编号) 处的CH2区氨基酸变体或在选自K370、E382以及E388 (EU编号) 的位置处的CH3区氨基酸变体或所述CH区氨基酸变体的组合，以及

培养宿主细胞以表达所述核酸；以及

利用等电点差异自宿主细胞培养物收集所述多特异性抗体，其进一步包括以下步骤：

自所述宿主细胞培养物收集所述抗体，

执行收获物澄清，

执行蛋白质捕获，

执行阴离子交换层析，以及

执行阳离子交换层析以将所述抗体与另一抗体或抗体片段分离。

41. 一种用于纯化多特异性抗体的方法，所述多特异性抗体包括等电点不同的第一重链和第二重链，其中所述方法包括以下步骤：

提供编码所述第一重链的CH1、CH2、CH3区或其组合的核酸及编码所述第二重链的CH1、CH2、CH3区或其组合的核酸中的二者或任一者，使得第一经编码重链与第二经编码重链的等电点不同，其中所述区中的至少一者包括在选自N159、N201、T120、K147、D148、Y149、V154、A172、Q175、S190以及K213 (EU编号) 的位置处的CH1区氨基酸变体或在位置V303 (EU编号) 处的CH2区氨基酸变体或在选自K370、E382以及E388 (EU编号) 的位置处的CH3区氨基酸变体或所述CH区氨基酸变体的组合，以及

培养宿主细胞以表达所述核酸；以及

通过进行等电聚焦自所述宿主细胞培养物纯化所述多特异性抗体且将所述多特异性抗体与另外抗体或抗体片段分离。

42. 根据权利要求40或权利要求41所述的方法，其中编码所述第一重链的同源多聚体的核酸、编码所述第二重链的同源多聚体的核酸以及编码所述第一重链和所述第二重链的异源多聚体的核酸表达为具有不同等电点的蛋白质且在离子交换层析中产生不同滞留时间。

43. 根据权利要求40至42中任一项所述的方法，其中所述一个或多个氨基酸变体的位

置选自

- 中性氨基酸变带负电氨基酸；
- 带正电氨基酸变中性氨基酸；
- 带正电氨基酸变带负电氨基酸；
- 中性氨基酸变带正电氨基酸；
- 带负电氨基酸变中性氨基酸；以及
- 带负电氨基酸变带正电氨基酸。

44. 根据权利要求40至43中任一项所述的方法，其中所述第一重链和所述第二重链包括可相容CH3异源二聚化区。

45. 根据权利要求40至44中任一项所述的方法，其中所述第一重链包括选自以下的一个或多个变体：

- 中性氨基酸变带负电氨基酸；
- 带正电氨基酸变中性氨基酸；
- 带正电氨基酸变带负电氨基酸；并且

不同于所述第一重链的所述第二重链包括选自以下的一个或多个变体：

- 中性氨基酸变带正电氨基酸；
- 带负电氨基酸变中性氨基酸；以及
- 带负电氨基酸变带正电氨基酸。

46. 根据权利要求44或45所述的方法，其中所述可相容CH3异源二聚化区中的一者包括L351D和L368E变体并且另一者包括T366K和L351K变体。

47. 根据权利要求44至46中任一项所述的方法，其中所述第一重链包括CH3变体L351D和L368E并且所述第二重链包括CH3变体T366K和L351K。

48. 一种含CH1免疫球蛋白多肽，其包括在位置159、位置201、位置120、位置147、位置148、位置149、位置154、位置172、位置175、位置190或位置213处的第一带电氨基酸残基。

49. 根据权利要求48所述的含CH1免疫球蛋白多肽，其除所述带电残基以外，还包括在选自位置159、位置201、位置120、位置147、位置148、位置149、位置154、位置172、位置175、位置190或位置213的不同位置处的第二带电氨基酸残基。

50. 一种含CH1免疫球蛋白多肽，其包括在位置197和/或位置213处的中性氨基酸残基或带负电氨基酸残基。

51. 一种含CH1免疫球蛋白多肽，其包括在位置159处的中性氨基酸残基或带正电氨基酸残基以及在铰链位置216处的带正电氨基酸残基。

52. 一种免疫球蛋白蛋白质，其包括第一含CH1免疫球蛋白多肽和第二含CH1免疫球蛋白多肽，其中所述第一含CH1免疫球蛋白多肽和/或所述第二含CH1免疫球蛋白多肽包括选自在CH1区内未经表面暴露的氨基酸的一个或多个氨基酸的一个或多个变体，使得包括所述第一含CH1免疫球蛋白多肽和所述第二含CH1免疫球蛋白多肽的所述免疫球蛋白蛋白质的等电点不同于仅含有第一CH1-免疫球蛋白多肽的免疫球蛋白蛋白质或仅含有第二CH1-免疫球蛋白多肽的蛋白质的等电点。

53. 根据权利要求52所述的免疫球蛋白蛋白质，其中所述选自在所述CH1区内的氨基酸的一个或多个氨基酸的一个或多个变体为内埋式的。

54. 一种组合物,其包括根据权利要求1至31中任一项所述的免疫球蛋白区、免疫球蛋白结构域或抗体,所述免疫球蛋白区、免疫球蛋白结构域或抗体进一步包括在选自T197的氨基酸处及在铰链位置E216处的变体。

55. 一种免疫球蛋白蛋白质,其包括第一含CH1区免疫球蛋白多肽和第二含CH1区免疫球蛋白多肽,其中一个CH1区包括未经表面暴露的氨基酸的一个或多个变体,其中所述氨基酸的一个或多个变体来自:

- 中性氨基酸变带负电氨基酸;
- 带正电氨基酸变中性氨基酸;以及
- 带正电氨基酸变带负电氨基酸;或者
- 中性氨基酸变带正电氨基酸;
- 带负电氨基酸变中性氨基酸;以及
- 带负电氨基酸变带正电氨基酸。

56. 一种免疫球蛋白蛋白质,其包括第一含CH1区免疫球蛋白多肽和第二含CH1区免疫球蛋白多肽,其中一个CH1区包括未经表面暴露的氨基酸的一个或多个变体,其中所述氨基酸的一个或多个变体来自:

- 中性氨基酸变带负电氨基酸;
- 带正电氨基酸变中性氨基酸;以及
- 带正电氨基酸变带负电氨基酸;

并且另一CH1区包括未经表面暴露的氨基酸的一个或多个变体,其中所述氨基酸的一个或多个变体来自:

- 中性氨基酸变带正电氨基酸;
- 带负电氨基酸变中性氨基酸;以及
- 带负电氨基酸变带正电氨基酸。

57. 一种免疫球蛋白蛋白质,其包括第一含CH1区免疫球蛋白多肽和第二含CH1区免疫球蛋白多肽,其中所述第一含CH1区免疫球蛋白多肽和/或所述第二含CH1区免疫球蛋白多肽包括选自在所述CH1区内未经表面暴露的氨基酸的一个或多个氨基酸的一个或多个变体,使得包括所述第一含CH1区免疫球蛋白多肽和所述第二含CH1区免疫球蛋白多肽的所述免疫球蛋白蛋白质的等电点不同于仅含有第一CH1区免疫球蛋白多肽的免疫球蛋白蛋白质的等电点并且不同于仅含有第二CH1区免疫球蛋白多肽的免疫球蛋白蛋白质的等电点。

58. 根据权利要求55至57中任一项所述的免疫球蛋白蛋白质,其包括人类CH1区。

59. 根据权利要求55至58中任一项所述的免疫球蛋白蛋白质,其为IgG。

60. 根据权利要求55至59中任一项所述的免疫球蛋白蛋白质,其中所述未经表面暴露的氨基酸为内埋式的。

61. 根据权利要求55至60中任一项所述的免疫球蛋白蛋白质,其包括在具有选自T120、K147、D148、Y149、V154、N159、A172、Q175、S190、N201以及K213的氨基酸的CH1区中的氨基酸的变体。

62. 根据权利要求61所述的免疫球蛋白蛋白质,其包括选自D148、Y149、V154、N159、A172、S190以及N201的氨基酸的变体。

63. 根据权利要求62所述的免疫球蛋白蛋白质,其包括N159和/或N201的氨基酸的变

体。

64. 根据权利要求55至63中任一项所述的免疫球蛋白蛋白质,其中所述第一含CH1区免疫球蛋白多肽和所述第二含CH1区免疫球蛋白多肽为重链。

65. 根据权利要求55至64中任一项所述的免疫球蛋白蛋白质,其为抗体。

66. 根据权利要求65所述的抗体,其为多特异性抗体。

67. 根据权利要求65或权利要求66所述的抗体,其为双特异性抗体。

68. 根据权利要求55至67中任一项所述的免疫球蛋白蛋白质,其进一步包括在选自T197的氨基酸处及在铰链位置E216处的变体。

69. 一种组合物,其包括根据权利要求1至8中任一项所述的免疫球蛋白区或根据权利要求9至31中任一项所述的抗体,所述免疫球蛋白区或所述抗体进一步包括以下变体中的一者或多者:G122P、I199V、N203I、S207T以及V211I。

70. 一种含CH2免疫球蛋白多肽,其包括在位置303处的带电氨基酸残基。

71. 一种含CH3免疫球蛋白多肽,其包括在选自位置370、位置382或位置388的位置处的不带电氨基酸残基。

72. 根据权利要求70或权利要求71所述的含CH2免疫球蛋白多肽和/或含CH3免疫球蛋白多肽,其包括选自在位置303处的带电氨基酸残基或在位置370、位置382或位置388处的不带电氨基酸残基的氨基酸变体中的两个或更多个。

73. 根据权利要求70至72所述的含CH2免疫球蛋白多肽和/或含CH3免疫球蛋白多肽,其为抗体,优选为多特异性抗体。

74. 根据权利要求73所述的抗体,其包括在铰链位置216处的带正电氨基酸残基。

75. 根据权利要求20至31中任一项所述的抗体,其进一步包括在选自T197的氨基酸处及在铰链位置E216处的变体。

76. 一种组合物,其包括根据权利要求1至15中任一项所述的免疫球蛋白区、根据权利要求16至18中任一项所述的免疫球蛋白结构域、或根据权利要求20至31、73至75中任一项所述的抗体,其进一步包括以下变体中的一者或多者:G122P、I199V、N203I、S207T以及V211I。

用于使蛋白质多聚化的变体结构域及其分离

[0001] 本申请是申请日为2020年05月08日的PCT国际专利申请PCT/NL2020/050298进入中国国家阶段的中国专利申请号202080048983.X、发明名称为“用于使蛋白质多聚化的变体结构域及其分离”的分案申请。

[0002] 引言

[0003] 过去数十年的一类重要治疗性分子已为单株抗体类。单株抗体已成功地治疗包括癌症的各种疾病。在过去十年间,已发现靶向超过一个抗原决定基,例如肿瘤细胞上的超过一个抗原决定基也可为有效的。可给予患者单独地研发的单株抗体的组合以及来自一个细胞的单株抗体的组合。此类细胞可产生形成出于靶向一或多种细胞类型上的超过一个目标的目的而研发的抗体混合物的一部分的具有二种或更多种不同特异性的抗体。当两个抗体在一个细胞中表现时,可产生包括包括双特异性抗体及单特异性抗体的各种抗体组合。

[0004] 用于调适各种免疫球蛋白链的缔合的技术为可用的。已研发出各种二聚化结构域以有利于如此产生的细胞中的特定重链缔合。可使用共同轻链以避免同源重链及轻链的误配。在某些应用中,双特异性抗体可置换两个抗体的组合的使用。双特异性抗体也可用于使个体中例如肿瘤细胞及免疫细胞(例如T细胞)的两个细胞合在一起。其实施例为癌细胞上所存在的CD3及抗原决定基的组合靶向。类似地,已出现能够结合相同或不同抗原或抗原决定基中的三个或更多个的多价多聚体或多特异性抗体。两个抗体的组合表示结合至相同或不同目标上的不同抗原决定基的两个不同免疫球蛋白的混合物,但在双特异性抗体中此系经由单个免疫球蛋白达成。在多特异性多聚体或多特异性抗体中,可靶向相同或不同抗原上的三个或更多个不同抗原决定基。

[0005] 通过结合至相同或不同目标上的两个抗原决定基,双特异性抗体可具有相较于结合至相同抗原决定基的两个抗体的组合而言类似或优良的作用。此种情况还应用于能够结合三个或更多个目标的多特异性多聚体。双特异性或多特异性免疫球蛋白蛋白质可集结细胞上的两个或更多个表面蛋白或可使免疫效应细胞接近异常细胞,在任一情况下均造成细胞凋亡。此外,组合单个分子中两个不同结合区的经分离双特异性抗体还展示相对于靶向同两个不同目标的两个抗体的混合物而言的有利作用。自技术及监管视角看,单个双特异性抗体或多特异性多聚体或抗体的研发可不太复杂,此系因为制造、临床前及临床测试涉及单个分子。因此,基于双特异性抗体或多特异性多聚体/抗体的疗法可通过不太复杂且具成本效益、同时附随地具有提供更有效疗法的潜能的药物研发方法来促进。

[0006] 诸如基于IgG格式的双特异性抗体的双特异性抗体已通过各种方法产生。例如,双特异性抗体可通过使用重组DNA技术在单个细胞中表现具有两个抗体的组分来产生。在一些实施方案中,如本文先前所陈述,这些方法可产生多个抗体物种,例如其中两个不同重链及两个不同轻链系由细胞产生。除非经特定地调适,否则重链通常可与由细胞产生的任何轻链配对,如果此类对不为正确同源对,则通常产生非功能性结合位点。在以上实施例中,一个该重链可能与任一轻链配对。

[0007] 除非经特定地调适,否则重链通常可与由细胞产生的任何其他重链配对。在未经调适环境中,至多十个不同免疫球蛋白分子可由细胞产生。抗体混合物的复杂度及非功能

性重链及轻链组合的存在可通过选择共享共同轻链的重链-轻链组合来解决。此还应用于多特异性多聚体或抗体的产生及使用重组DNA技术将三个或更多个可变结构域并入单个抗体中的情形。

[0008] 当使用共同轻链以及表现两个或更多个含有通过单个生产细胞驱动不同重链的特定异源二聚化的修饰的重链时,仍可产生具有同一结合结构域的成对重链的一些同源二聚体,从而产生单特异性抗体及双特异性抗体的混合物。此种情况还适用于使用共同轻链以及表现两个或更多个重链,且此类重链中的一者或多者含有两个或更多个重链可变区,以使得单个生产细胞可产生多特异性多聚体或抗体及附加同源二聚体时。在需要特定同源二聚体的情况下,可产生一些异源二聚体。因此,在产生蛋白质的混合物的各情况下,可能需要将一个或多个所需二聚体与所得混合物分离。因此,在此项技术中需要用于产生且分离单特异性抗体或双特异性抗体或多价抗体或多聚体的改良技术和/或替代性技术。

[0009] 利用抗体或其片段的电荷和/或等电点(pI)或利用经由电荷层析法产生的所需蛋白质物种的等电聚焦或所得独特峰的各种分离方法为可用的。本文揭露促进与混合物的分离的新型产物以及用于分离此类产物的新型方法。

[0010] 实施方案

[0011] 在本文提及带电氨基酸的情况下,其是指在生理学相关pH下,包括例如在活体内条件下的电荷。

[0012] 在一个实施方案中,本发明提供免疫球蛋白区,优选地相较于原始免疫球蛋白区(优选地原始CH1区且更优选地人类野生型CH1区)而言包括氨基酸的变体的CH1区,其中原始氨基酸在原始免疫球蛋白区中未经表面暴露,其中变体选自

[0013] -中性氨基酸变带负电氨基酸;

[0014] -带正电氨基酸变中性氨基酸;

[0015] -带正电氨基酸变带负电氨基酸;

[0016] -中性氨基酸变带正电氨基酸;

[0017] -带负电氨基酸变中性氨基酸;以及

[0018] -带负电氨基酸变带正电氨基酸。

[0019] 在一个实施方案中,本发明提供免疫球蛋白区,优选地相较于原始该免疫球蛋白区(优选地原始CH1区、CH2区或CH3区且更优选地人类野生型CH1区、CH2区或CH3区)而言包括在免疫球蛋白中未经表面暴露的氨基酸的变体的免疫球蛋白CH1区、CH2区、CH3区或此类区的组合,其中变体选自

[0020] -中性氨基酸变带负电氨基酸;

[0021] -带正电氨基酸变中性氨基酸;

[0022] -带正电氨基酸变带负电氨基酸;

[0023] -中性氨基酸变带正电氨基酸;

[0024] -带负电氨基酸变中性氨基酸;以及

[0025] -带负电氨基酸变带正电氨基酸。

[0026] 相较于人类野生型CH1区而言,本发明的免疫球蛋白CH1区优选包括一个或多个未经表面暴露的氨基酸或优选地内埋式氨基酸的一个或多个变体,该一个或多个变体选自由以下组成的群:

[0027] -中性氨基酸变带负电氨基酸的变体;

[0028] -带正电氨基酸变中性氨基酸的变体;

[0029] -中性氨基酸变带正电氨基酸的变体;以及

[0030] -带负电氨基酸变中性氨基酸的变体。

[0031] 本发明还提供相较于人类野生型CH1区而言包括在选自N159、N201、T120、K147、D148、Y149、V154、A172、Q175、S190以及K213的位置(EU编号)处的氨基酸的变体的免疫球蛋白CH1区。氨基酸的变体优选处于来自D148、Y149、V154、N159、A172、S190以及N201的位置处。在一个优选实施方案中,变体系处于选自N159和/或N201的氨基酸的位置处。CH1区可包括此类氨基酸的两个或更多个变体。该两个或更多个变体优选包括以下中的两者或更多者:

[0032] -中性氨基酸变带负电氨基酸;

[0033] -带正电氨基酸变中性氨基酸;

[0034] -带正电氨基酸变带负电氨基酸;

[0035] 或以下中的两者或更多者:

[0036] -中性氨基酸变带正电氨基酸;

[0037] -带负电氨基酸变中性氨基酸;以及

[0038] -带负电氨基酸变带正电氨基酸。

[0039] CH1区中的两个或更多个变体的合适组合包括选自以下的群的氨基酸的变体: A172/S190/N201、T197/K213、D148/Q175、N159/Q213、K147/Q175、Y149/V154/A172/S190、N201/K213、T120/N201、N201/N159、T120/N159、T120/N201/N159以及N201/K213/N159。

[0040] 本发明还提供相较于人类野生型CH2区而言包括在位置(EU编号)V303处的氨基酸的变体的免疫球蛋白CH2区。在一个实施方案中,免疫球蛋白CH2区为优选包括L235G及G236R氨基酸变体的Fc沉默CH2区。

[0041] 本发明还提供相较于人类野生型CH3区而言包括在位置(EU编号)K370、E382和/或E388处的一个或多个氨基酸的变体的免疫球蛋白CH3区。在一个实施方案中,免疫球蛋白CH3区包括用于促进优选包括L351D及L368E变体或可替代地包括T366K及L351K变体的CH3/CH3界面处的异源二聚化的残基变体。

[0042] 在一个实施方案中,免疫球蛋白CH1区、CH2区、CH3区或其组合包括其中至少一变体为在免疫球蛋白中未经表面暴露的氨基酸的变体的氨基酸的两个或更多个变体。在一个实施方案中,免疫球蛋白CH1区、CH2区、CH3区或其组合包括在免疫球蛋白中未经表面暴露的氨基酸的两个或更多个变体。变体优选选自

[0043] -中性氨基酸变带负电氨基酸;

[0044] -带正电氨基酸变中性氨基酸;

[0045] -带正电氨基酸变带负电氨基酸;

[0046] -中性氨基酸变带正电氨基酸;

[0047] -带负电氨基酸变中性氨基酸;以及

[0048] -带负电氨基酸变带正电氨基酸。一个或多个变体优选包括选自由以下组成的群的一个或多个未经表面暴露的氨基酸或优选地内埋式氨基酸的一个或多个变体:

[0049] -中性氨基酸变带负电氨基酸的变体;

[0050] -带正电氨基酸变中性氨基酸的变体;

[0051] -中性氨基酸变带正电氨基酸的变体;以及

[0052] -带负电氨基酸变中性氨基酸的变体。至少一变体为优选为内埋式氨基酸的氨基酸的变体。

[0053] 据称包括中性氨基酸变带负电氨基酸、带正电氨基酸变中性氨基酸和/或带正电氨基酸变带负电氨基酸的变体的CH区为具有相对于原始CH区而言,优选地相较于人类野生型CH区而言的负电荷差异的CH区。据称变体本身向CH区提供负电荷差异。据称具有中性氨基酸变带正电氨基酸、带负电氨基酸变中性氨基酸和/或带负电氨基酸变带正电氨基酸的变体的CH区为具有相对于原始CH区而言,优选地相较于人类野生型CH区而言的正电荷差异的CH区。如果CH区具有如本文所描述的氨基酸残基的两个变体,则优选地,两个变体均以同样的方式向CH区提供相同电荷差异。如果CH区具有如本文所描述的氨基酸残基的三个或更多个变体,则优选地,变体的净结果向CH区提供电荷差异。免疫球蛋白区优选为人类免疫球蛋白区。在一些实施方案中,免疫球蛋白区为IgG区,优选地IgG1区。上文所揭露的免疫球蛋白区可例如有利地用作需要与抗体的混合物分离的抗体的一部分。

[0054] 本发明进一步提供包括有包括如本文所描述的免疫球蛋白CH区的重链及轻链的抗体。例如,当此类抗体作为混合物的一部分而产生时,向CH区提供的电荷变化可促进该抗体与该混合物的分离。在一个优选实施方案中,抗体包括不同重链。在一个优选实施方案中,抗体为诸如双特异性抗体或三特异性抗体的多特异性抗体。在此情况下,向CH区提供的电荷变化可促进该双特异性抗体或三特异性抗体与该混合物的分离。不同重链优选包括可相容异源二聚化区,优选地可相容异源二聚化CH3区。在一个实施方案中,重链中的一者包括CH3变体L351D及L368E,且此类重链中的另一者包括CH3变体T366K及L351K。抗体优选为IgG抗体,优选地IgG1抗体。在一些实施方案中,抗体包括各自包括如本文所描述的免疫球蛋白CH区中的一者或多者的第一重链及第二重链。优选地,包括CH3变体L351D及L368E的重链包括如本文所描述的一个CH区,且包括CH3变体T366K及L351K的重链包括如本文所描述的另一CH区。在此类情况下,优选地,一个CH区及另一CH区包括具有不同电荷的CH区。在此类情况下,混合物中所得抗体的等电点差异应被进一步间隔,由此促进该抗体与该混合物中其他免疫球蛋白分子或其部分的分离。换句话讲,如果一个CH区为具有相对于原始CH区而言的负电荷差异的CH区,则另一CH区优选为具有相对于原始CH区而言的正电荷差异的CH区。类似地,如果一个CH区为具有相对于原始CH区而言的正电荷差异的CH区,则另一CH区优选为具有相对于原始CH区而言的负电荷差异的CH区。

[0055] 具有可相容异源二聚化区(诸如具有如本文所描述的CH区的如本文所描述的可相容CH3异源二聚化区)的抗体通常在利用抗体或其片段的电荷和/或等电点(pI)的分离步骤中更好地与具有相同重链的相应抗体和/或半抗体(如果存在)分离。抗体优选包括一个或多个轻链。其优选包括同一轻链。轻链优选为如本文所描述的共同抗体轻链。共同轻链优选包括图13,例如图13B或图13D的轻链可变区。在一个实施方案中,轻链具有如图13C中所描绘的轻链恒定区。在一个优选实施方案中,轻链具有图13A或图13E中所描绘的轻链的氨基酸序列。在一个优选实施方案中,轻链具有图13A中所描绘的轻链的氨基酸序列。共同轻链优选为具有如图13F中所描绘的CDR的轻链。

[0056] 如本文所描述的抗体、CH区或CH结构域优选为人类抗体或人类免疫球蛋白CH区或

结构域。其优选为包括具有在野生型人类CH区内未经表面暴露且优选地内埋式氨基酸位置处的变体的CH区的人类抗体、CH结构域或CH区。

[0057] 包括如本文所描述的未经表面暴露的氨基酸的变体的免疫球蛋白区(优选地CH区)或抗体优选具有选自在CH1/CL界面处不存在、在CH2/CH2界面处不存在且/或在CH3/CH3界面处不存在的氨基酸的变体。根据Traxlmayer等人(2012;J Mol Biol.10月26日;423(3):397-412.论述及图3),CH3/CH3界面氨基酸列举于图22中。

[0058] 包括如本文所描述的未经表面暴露的氨基酸的变体的免疫球蛋白区(优选地CH1区、CH2区或CH3区)或抗体并不会实质上不利地影响包括任何重链及轻链界面的所得CH1/CL结构域、CH2结构域或CH3结构域或抗体的稳定性。包括如本文所描述的未经表面暴露的氨基酸的变体的免疫球蛋白区(优选地CH1区、CH2区或CH3区)或抗体可包括支持产生电荷差异的一个或多个变体的稳定性的一个或多个附加变体。包括如本文所描述的未经表面暴露的氨基酸的变体的免疫球蛋白区(优选地CH1区、CH2区或CH3区)或抗体可包括产生电荷差异的一个或多个附加变体。

[0059] 本发明还提供包括如本文所描述的免疫球蛋白区的免疫球蛋白CH1/CL结构域、CH2结构域或CH3结构域。CH2结构域可进一步包括有优选地包括在235和/或236处的CH3变体的Fc沉默突变。CH3结构域可进一步包括优选地包括于一个CH3区中的CH3变体L351D及L368E以及于另一CH3区上的CH3变体T366K及L351K的CH3异源二聚化结构域。

[0060] 本发明进一步提供包括如本文所描述的一个或多个CH1区、CH2区、CH3区或其组合的蛋白质。还提供包括如本文所描述的一个或多个CH1/CL结构域、CH2结构域、CH3结构域或其组合的蛋白质。

[0061] 本发明进一步提供包括如本文所描述的一个或多个CH1/CL结构域、CH2结构域、CH3结构域或其组合的抗体,优选地诸如双特异性抗体的多特异性抗体。

[0062] 免疫球蛋白、多肽或蛋白质的一个链中的CH1区、CH2区、CH3区或其组合中的两个或更多个变体优选全部包括在相同方向引导电荷,即全部朝向一个或多个CH区或其组合的更加正的电荷或全部朝向一个或多个CH区或其组合的更加负的电荷的变体。

[0063] 本发明进一步提供包括如本文所描述的免疫球蛋白区或抗体及医药载剂或医药赋形剂的组合物。进一步提供包括如本文所描述的免疫球蛋白区或抗体的药物组合物。药物组合物优选包括医药载剂或医药赋形剂。

[0064] 进一步提供编码如本文所描述的免疫球蛋白区或抗体的核酸。进一步提供一起编码并有如本文所描述的免疫球蛋白区的抗体或多聚体蛋白的核酸的组合。核酸可或可不以物理方式连接。

[0065] 还提供包括核酸或核酸组合的重组宿主细胞。

[0066] 本发明进一步提供产生根据权利要求的抗体的方法,其中该方法包括以下步骤:

[0067] 提供编码具有如本文所描述的CH1区、CH2区、CH3区或其组合的第一重链的核酸;

[0068] 提供编码第二重链的核酸,其中该第一重链及该第二重链可为相同或不同的;

[0069] 提供编码轻链的核酸;

[0070] 将该核酸引入宿主细胞中且培养此类宿主细胞以表现该或此类核酸;以及

[0071] 自宿主细胞培养物收集该抗体,该方法进一步包括在基于其他抗体和/或抗体片段的电荷的分离步骤中将该抗体与此类其他抗体或抗体片段分离。在一个实施方案中,该

第一重链及该第二重链包括可相容异源二聚化区,优选地可相容CH3异源二聚化区。

[0072] 本发明进一步提供产生根据权利要求的抗体的方法,其中该方法包括以下步骤:

[0073] 提供编码具有如本文所描述的CH1区、CH2区、CH3区或其组合的第一重链的核酸;

[0074] 提供编码第二重链的核酸,其中该第一重链及该第二重链可为相同或不同的;

[0075] 提供编码轻链的核酸;

[0076] 将该核酸引入宿主细胞中且培养此类宿主细胞以表现该或此类核酸;以及

[0077] 自宿主细胞培养物收集该抗体,该方法进一步包括执行收获物澄清,

[0078] 执行蛋白质捕获,

[0079] 执行阴离子交换层析,以及

[0080] 执行阳离子交换层析以将该抗体与其他抗体或抗体片段分离。在一个实施方案中,该第一重链及该第二重链包括可相容异源二聚化区,优选地可相容CH3异源二聚化区。

[0081] 本发明进一步提供产生根据权利要求的抗体的方法,其中该方法包括以下步骤:

[0082] 提供编码具有如本文所描述的CH1区、CH2区、CH3区或其组合的第一重链的核酸;

[0083] 提供编码第二重链的核酸,其中该第一重链及该第二重链可为相同或不同的;

[0084] 提供编码轻链的核酸;

[0085] 将该核酸引入宿主细胞中且培养此类宿主细胞以表现该或此类核酸;以及

[0086] 自宿主细胞培养物收集该抗体,该方法进一步包括在包括于凝胶上的等电聚焦的分离步骤中将该抗体与其他抗体或抗体片段分离。

[0087] 进一步提供用于产生多特异性抗体的方法,该多特异性抗体包括等电点不同的第一重链及第二重链,其中该方法包括以下步骤:

[0088] (a) 表现编码第一重链的核酸及编码第二重链的核酸,以使得经编码第一重链的等电点与经编码第二重链的等电点不同,其中该核酸编码在选自包括第一重链和/或第二重链的经编码免疫球蛋白区的未经表面暴露的位置的一个或多个氨基酸位置处的一个或多个变体,优选地CH1区,更优选地T120、K147、D148、Y149、V154、N159、A172、Q175、S190、N201以及K213;且/或优选地CH2区,优选地V303;且/或优选地CH3区,优选地K370、E382、E388 (EU编号),以及

[0089] (b) 培养宿主细胞以表现该核酸;以及

[0090] (c) 使用等电点差异自宿主细胞培养物收集该多特异性抗体。

[0091] 还提供用于分离多特异性抗体的方法,该多特异性抗体包括等电点不同的第一重链及第二重链,其中该方法包括以下步骤:

[0092] (a) 表现编码第一重链的氨基酸残基的核酸及编码第二重链的氨基酸残基的核酸中的二者或任一者,以使得经编码第一重链的等电点与经编码第二重链的等电点不同,其中该核酸的一个或多个位置为不同于在一个或多个未经表面暴露的残基处的经编码CH1区、CH2区、CH3区或其组合的一个或多个位置,优选地选自T120、K147、D148、Y149、V154、N159、A172、Q175、S190、N201以及K213的一个或多个氨基酸变体;且/或优选地CH2区,优选地V303;且/或优选地CH3区,优选地K370、E382、E388 (EU编号),以及

[0093] (b) 培养宿主细胞以表现该核酸;以及

[0094] (c) 通过层析法将该多特异性抗体与宿主细胞培养物分离。

[0095] 在一个优选实施方案中,核酸编码第一重链及第二重链,以使得第一重链、第一重

链的同源多聚体、第二重链、第二重链的同源多聚体以及第一重链及第二重链的异源多聚体在经表现且于离子交换层析步骤中经分离时的滞留时间不同。

[0096] 在由该核酸编码的一个或多个位置处的变异氨基酸优选选自在人类野生型CH1区、CH2区、CH3区或其组合中未经表面暴露的氨基酸且选自

[0097] -中性氨基酸变带负电氨基酸；

[0098] -带正电氨基酸变中性氨基酸；

[0099] -带正电氨基酸变带负电氨基酸；

[0100] -中性氨基酸变带正电氨基酸；

[0101] -带负电氨基酸变中性氨基酸；以及

[0102] -带负电氨基酸变带正电氨基酸。

[0103] 还提供用于产生多特异性抗体的方法，该多特异性抗体包括等电点不同的第一重链及第二重链，其中该方法包括以下步骤：

[0104] 提供编码第一重链的CH1区、CH2区、CH3区或其组合的核酸及编码第二重链的CH1区、CH2区、CH3区或其组合的核酸，以使得第一经编码重链的等电点与第二经编码重链的等电点不同，其中此类CH区中的至少一者包括在选自T120、K147、D148、Y149、V154、N159、A172、Q175、S190、N201、K213、V303、K370、E382以及E388 (EU编号) 的位置处的氨基酸变体，以及

[0105] 培养宿主细胞以表现该核酸；以及

[0106] 使用等电点差异自宿主细胞培养物收集该多特异性抗体，此举进一步包括以下步骤：

[0107] 自该宿主细胞培养物收集该抗体，

[0108] 执行收获物澄清，

[0109] 执行蛋白质捕获，

[0110] 执行阴离子交换层析，以及

[0111] 执行阳离子交换层析以将该抗体与另一抗体或抗体片段分离。

[0112] 进一步提供用于纯化多特异性抗体的方法，该多特异性抗体包括等电点不同的第一重链及第二重链，其中该方法包括以下步骤：

[0113] 提供编码第一重链的CH1区、CH2区、CH3区或其组合的核酸及编码第二重链的CH1区、CH2区、CH3区或其组合的核酸中的二者或任一者，以使得第一经编码重链与第二经编码重链的等电点不同，其中此类CH区中的至少一者包括在选自T120、K147、D148、Y149、V154、N159、A172、Q175、S190、N201、K213、V303、K370、E382以及E388 (EU编号) 的位置处的氨基酸变体，以及

[0114] 培养宿主细胞以表现该核酸；以及

[0115] 通过进行等电聚焦自宿主细胞培养物纯化该多特异性抗体且将该多特异性抗体与另外抗体或抗体片段分离。

[0116] 编码第一重链的同源多聚体的一个或多个核酸、编码第二重链的同源多聚体的一个或多个核酸以及编码第一重链及第二重链的异源多聚体的一个或多个核酸表达为具有不同等电点的蛋白质且在离子交换层析中产生不同滞留时间。

[0117] CH区的该一个或多个氨基酸变体的一个或多个位置优选在多特异性抗体中未经

表面暴露且优选选自

[0118] -中性氨基酸变带负电氨基酸;

[0119] -带正电氨基酸变中性氨基酸;

[0120] -带正电氨基酸变带负电氨基酸;

[0121] -中性氨基酸变带正电氨基酸;

[0122] -带负电氨基酸变中性氨基酸;以及

[0123] -带负电氨基酸变带正电氨基酸。

[0124] 在变异位置处的氨基酸优选包括一个或多个未经表面暴露的氨基酸或优选地内埋式氨基酸的一个或多个变体,该一个或多个变体选自由以下组成的群:

[0125] -中性氨基酸变带负电氨基酸;

[0126] -带正电氨基酸变中性氨基酸;

[0127] -中性氨基酸变带正电氨基酸;以及

[0128] -带负电氨基酸变中性氨基酸。第一重链及第二重链优选包括CH3区,且此类CH3区优选包括可相容CH3异源二聚化区。此类可相容CH3异源二聚化区中的一者优选包括L351D及L368E且另一者优选包括T366K及L351K。

[0129] 在由该核酸编码的一个或多个位置处的一个或多个变异氨基酸优选选自T120、K147、D148、Y149、V154、N159、A172、Q175、S190、N201、K213、V303、K370、E382以及E388。

[0130] 进一步提供包括在人类野生型CH1中的未经表面暴露的位置处,优选地在位置120、位置147、位置148、位置149、位置154、位置159、位置172、位置175、位置190、位置201或位置213处的第一带电氨基酸残基的含CH1区或CH1免疫球蛋白多肽。除该带电残基以外,含CH1区或CH1免疫球蛋白多肽优选还包括在选自人类野生型CH1中的未经表面暴露的位置,优选地位置120、位置147、位置148、位置149、位置154、位置159、位置172、位置175、位置190、位置201或位置213的不同位置处的第二带电氨基酸残基,该第二带电氨基酸具有与第一带电氨基酸相同的电荷。含CH1区或CH1免疫球蛋白多肽优选包括在位置147和/或位置213处的中性或带负电氨基酸残基。含CH1区或CH1免疫球蛋白多肽优选包括在位置148处和/或在位置216处的铰链处的中性或带正电氨基酸残基。进一步提供包括在人类野生型CH2中的未经表面暴露的位置处,优选地在位置303处的带电氨基酸残基的含CH2区或CH2免疫球蛋白多肽。进一步提供包括在人类野生型CH3中的未经表面暴露的位置处,优选地在位置370、位置382或位置388处的第一中性氨基酸残基的含CH3区或CH3免疫球蛋白多肽。除中性残基以外,含CH3区或CH3免疫球蛋白多肽优选还包括在不同于第一中性氨基酸的位置的选自人类野生型CH3中的未经表面暴露的位置,优选地位置370、位置382或位置388的不同位置处的第二中性氨基酸残基。可替代地,提供包括在人类野生型CH3中的未经表面暴露的位置处,优选地在位置370处的第一负氨基酸残基及在位置382或位置388处的正氨基酸的含CH3区或CH3免疫球蛋白多肽。

[0131] 在CH1区的位置T120处的变体优选为中性氨基酸变带电氨基酸的变体。实施例为T120R、T120K、T120D以及T120E变体。变体优选包括T120D或T120K变体。

[0132] 在CH1区的位置K147处的变体优选为带正电氨基酸变中性氨基酸或负氨基酸的变体。实施例为K147Q、K147T、K147S、K147D以及K147E变体。变体优选为K147E变体。

[0133] 在CH1区的位置D148处的变体优选为中性氨基酸变带电氨基酸的变体。实施例为

D148R、D148K、D148D以及D148E变体。变体优选包括D148K变体。

[0134] 在CH1区的位置N159处的变体优选为中性氨基酸变带电氨基酸的变体。实施例为N159R、N159K、N159D以及N159E变体。变体优选包括N159K或N159D变体。

[0135] 在CH1区的位置Q175处的变体优选为中性氨基酸变带电氨基酸的变体。实施例为Q175R、Q175K、Q175D以及Q175E变体。变体优选包括Q175K或Q175E变体。

[0136] 在CH1区的位置N201处的变体优选为中性氨基酸变带电氨基酸的变体。实施例为N201R、N201K、N201D以及N201E变体。变体优选包括N201K或N201D变体。

[0137] 在CH1区的位置K213处的变体优选为带正电氨基酸变中性氨基酸或负氨基酸的变体。实施例为K213Q、K213T、K213S、K213D以及K213E变体。变体优选包括K213Q变体。

[0138] 在CH2区的位置V303处的变体优选为中性氨基酸变带电氨基酸的变体。实施例为V303K、V303R、V303D以及V303E变体。变体优选包括V303D或V303E变体。

[0139] 进一步提供包括在位置303处的带电氨基酸残基的含CH2免疫球蛋白多肽。

[0140] 还提供包括在选自位置370、位置382或位置388的位置处的不带电氨基酸残基的含CH3免疫球蛋白多肽。

[0141] 如本文所描述的含CH2免疫球蛋白多肽和/或含CH3免疫球蛋白多肽可包括选自在位置303处的带电氨基酸残基或在位置370、位置382或位置388处的不带电氨基酸残基的氨基酸变体中的两者或更多者。

[0142] 如本文所指示的CH2区变体优选为在位置V303处的CH2变体。该变体优选为中性氨基酸变带电氨基酸的变体。实施例为V303R、V303K、V303D或V303E变体。优选变体为如实施例中所描述的V303K变体或V303E变体。

[0143] 如本文所指示的CH3区变体优选为在位置K370、E382、E388或其组合处的CH3变体。在位置K370处的变体优选为带电氨基酸变中性氨基酸的变体。实施例为K370Q、K370N、K370H、K370S、K370T或K370Y变体。优选变体为如实施例中所描述的K370S或K370T变体。在位置E382处的变体优选为带电氨基酸变中性氨基酸的变体。实施例为E382Q、E382N、E382H、E382S、E382T或E382Y变体。优选变体为如实施例中所描述的E382Q或E382T变体。在位置E388处的变体优选为带电氨基酸变中性氨基酸的变体。实施例为E388Q、E388N、E388L、E388S、E388T或E388M变体。优选变体为如实施例中所描述的E388L、E388M或E388T变体。

[0144] 如本文所描述的免疫球蛋白多肽优选为抗体，优选地多特异性抗体。

[0145] 该抗体可进一步包括在铰链位置216处的带正电氨基酸残基。

[0146] 该抗体可进一步包括在选自T197的氨基酸处及在铰链位置E216处的变体。

[0147] 还提供包括如本文所描述的免疫球蛋白结构域、免疫球蛋白区多肽、蛋白质或抗体的组合物，该免疫球蛋白结构域、免疫球蛋白区多肽、蛋白质或抗体进一步包括以下中的一者或多者：CH1结构域中的变体G122P、I199V、N203I、S207T以及V211I。

[0148] 本发明可用于提供如本文所描述的抗体或免疫球蛋白蛋白质之间、如本文所描述的双特异性抗体与单特异性抗体之间、如本文所描述的多特异性抗体与其他多特异性及单特异性抗体及半抗体之间的分离。

[0149] 本发明也可用于使由细胞产生的两个或更多个所需抗体的共纯化优化。例如，通过提供可与共同轻链配对的三个或更多个重链且其中此类重链中的一者具有可相容异源二聚化结构域的成员且其他重链具有可相容异源二聚化结构域的另一成员，例如于一个重

链中具有CH3 DE区且于其他重链中具有CH3 KK区,可产生两个或更多个双特异性抗体。在利用电荷和/或pI的分离方法中,调适本发明的重链中的一者或多者的电荷可提供含有共迁移的抗体的异源二聚体重链。电荷可经调适以使得与相应含有抗体和/或半抗体的单体重链相比,含有抗体的共迁移异源二聚体重链在不同位置处迁移。

[0150] 进一步提供包括第一含CH1区或CH1免疫球蛋白多肽和第二含CH1区或CH1免疫球蛋白多肽的免疫球蛋白蛋白质,其中第一含CH1区或CH1免疫球蛋白多肽和/或第二含CH1区或CH1免疫球蛋白多肽包括选自在CH1区内未经表面暴露的氨基酸的一个或多个氨基酸的一个或多个变体,以使得包括第一含CH1区或CH1免疫球蛋白多肽和第二含CH1区或CH1免疫球蛋白多肽的免疫球蛋白蛋白质的等电点不同于仅含有第一CH1区或CH1-免疫球蛋白多肽的免疫球蛋白蛋白质或仅含有第二CH1区或CH1-免疫球蛋白多肽的免疫球蛋白蛋白质的等电点。

[0151] 在一个实施方案中,本发明涉及包括至少两个不同的包括重链结构域的多肽的蛋白质,诸如包括例如至少两个不同重链可变区及一个共同轻链的双特异性抗体或多价多聚体。本发明进一步关于产生且分离此类蛋白质的手段和方法。包括两个不同免疫球蛋白可变区多肽的蛋白质一般在本文中称作双特异性蛋白、双特异性免疫球蛋白或双特异性抗体。基于包括两个不同免疫球蛋白可变区多肽的蛋白质的格式,也可产生包括对超过两个目标/抗原决定基具有特异性的结构域的多特异性多聚体,包括三特异性和/或多特异性格式,参见例如PCT/NL2019/050199。尽管此项技术中存在用于增加所需双特异性或多特异性蛋白或抗体的产量的策略,但无法容易地完全避免包括单特异性蛋白或半抗体的非所需物种的产生。因此,双特异性或多特异性蛋白或抗体与单特异性半抗体或不合需要的副产物蛋白的分离对于分离所需双特异性或多特异性蛋白或抗体为优选的。这些双特异性或多特异性蛋白或抗体的该分离进一步可为临床研发或营销此类蛋白质所需。

[0152] 本发明人现已出乎意料地发现,通过产生具有在恒定区内(优选地CH1、CH2或CH3)未经表面暴露的氨基酸位置处的带电残基(包括在免疫球蛋白多肽内的内埋式残基)的免疫球蛋白区,多特异性或双特异性蛋白及单特异性蛋白在产生时现可容易地通过使用等电聚焦及例如基于非亲和力的层析法(诸如离子交换层析法)的熟知层析法来分离且获得。

[0153] 此类免疫球蛋白区包括向优选地在CH1、CH2、CH3或其组合处的含恒定区免疫球蛋白多肽链中的一者或二者添加、移除或逆转电荷。在本发明之前,一般而言,已避免任何蛋白质,特定言的免疫球蛋白的未经表面暴露的氨基酸或内埋式氨基酸的修饰,如所理解,更改此类残基的电荷对结构及功能具有潜在地有害的影响,包括对免疫球蛋白造成去稳定化影响的潜在性。此外,未预期此类修饰更改层析特性,此系因为这些残基不易于暴露以与层析树脂相互作用。

[0154] 出乎意料地发现,通过产生具有在免疫球蛋白多肽链的未经表面暴露且内埋式胺基位置处(包括在构架区或恒定区内,优选地CH1区、CH2区、CH3区或其组合)的带电氨基酸的免疫球蛋白区,可产生具有差异电荷及不同等电点的单特异性、双特异性及多特异性蛋白(参见例如图1),该差异电荷及此类不同等电点准许分离且分离此类单特异性蛋白与双特异性或多特异性蛋白(或反的还然)或分离所需蛋白质与其他不合需要的蛋白质副产物。此外,可产生包括在未经表面暴露的位置或内埋式位置处的带电残基及其他变体的免疫球蛋白区,相对于野生型区或结构域或仅具有电荷变体的野生型区或结构域而言,其可具有

提高此类免疫球蛋白区的稳定性的潜能。

[0155] 应理解,可应用包括恒定结构域的变异结构域及采用此类结构域的方法以产生多聚化蛋白且以分离此类蛋白质。当不同蛋白质物种以混合物形式产生以使得此类不同物种具有类似等电点(pI),难以进行分离时,可采用本文所阐述的变异结构域及本文所描述的方法用于改善所需物种的分离的用途。

[0156] 本发明揭露用于选择不会有有害地影响分离结构域的结构及功能且在所产生的并由此类结构域的不同多聚化蛋白质物种之间产生差异等电点的变体的方法。本文所描述的发明应用于包括可应用于例如CL区、CH1区、CH2区和/或CH3区及VH/VL区(详言的构架区)的各种免疫球蛋白区的分离结构域的产物。一般而言,本发明可应用于任何多聚体蛋白。只要所产生的多聚体包括可形成不同多聚化蛋白质的至少两个不同蛋白质(例如标示为A及B),例如以使得所产生的多聚体物种可包括AA、AB、BA或BB,本发明即可应用于其。在此类情形下,这些多聚化蛋白可采用针对链A和/或链B的本发明的变异结构域,以使得多聚体物种中的各自可包括具有在未经表面暴露的位置或内埋式位置处的电荷的一个或多个变异结构域,且产生包括差异等电点的多聚体物种,此类差异等电点允许经由一般熟习此项技术者已知的方法,诸如通过等电聚焦和/或在电荷层析法期间基于独特滞留时间进行分离。

[0157] 上文原理也可应用于制造双特异性抗体(当两个不同重链及两个不同轻链经表现时产生至多个物种,或当两个不同重链及一个共同轻链经表现时或当两个不同轻链及一个共同重链经表现时产生三个物种)。上文原理也可应用于高级多聚体。

[0158] 在多聚体可为双特异性抗体的情况下,可采用具有在未经表面或内埋式位置处的一个或多个电荷变化(包括电荷添加、减少或逆转)的变异免疫球蛋白区。例如,可采用带电CH1区(如图1A-C中所例示),或可采用带电CH2区(如图1D中所例示),可采用轻链的带电C1区(图1E),或可采用带电CH3区。

[0159] 此类多聚体也可可为三价或四价的以使得其可包括例如3个由VH及VL组成、包括(如图2A及2B中所例示)例如CH1区或C1区中的变体的可变结构域。

[0160] 应理解,本文对诸如CH1区的免疫球蛋白区或任何其他合适区或结构域的“变体”的提及并不意味着例如多聚体蛋白产物(诸如抗体)经突变,而实际上意味着多聚体蛋白包括例如不同于野生型结构域的具有本文所阐述的分离变体的结构域。即,此类结构域含有在野生型结构域内的未经表面暴露的残基处的差异,由此产生可用于促进与多聚化蛋白混合物的分离的电荷差异。因此,术语变体是指以下事实:诸如包括于双特异性抗体中的免疫球蛋白多肽的氨基酸序列具有不同,例如不同于诸如人类IgG1序列的参考序列的氨基酸序列。

[0161] 应理解,具有在所需位置处的所需残基的氨基酸序列可选自包括例如在CH1区、CH2区、CH3区或其组合中的在相较于参考序列而言的氨基酸序列内的变体的库。因此,术语变体是指独立于获得氨基酸序列的方式,具有在所需位置处的所需氨基酸残基的氨基酸序列。代替提及例如在未经表面的氨基酸,优选地内埋式氨基酸处的氨基酸的如本文所描述的氨基酸变体,我们也可提及“分离氨基酸残基”,此系因为这些变体允许分离所需多聚体物种。

[0162] 蛋白质产物可由编码蛋白质的DNA构建体产生,因此蛋白质产物的变体可具有于编码该蛋白质的DNA构建体中的其起源。本文涵盖生成此项技术中已知的此类变体的任何

合适手段,例如自一开始包括可生成的包括编码此类变体的核酸的构建体,例如经由在不采用原始核酸所必需的任何突变诱发、置换、取代、插入或删除手段的情况下的DNA合成来进行。该产生变体结构域的方式随时可用且能够与例如任何合适的编码任何可变区(或包括于其中的CDR序列的任何组合,应使用经修饰可变区)的核酸组合。此外,可仅仅重新合成编码与具有提供等电点分异的如本文所描述的合适氨基酸变体的经编码恒定区组合的所选可变区的构建体。例如,可提供CH1、CH2、CH3编码序列且与所选VH编码序列组合,此组合可计算机仿真进行(且重新合成)和/或活体外进行(例如使用诸如连接/克隆的分子生物学技术),且生成表现卡匣。通过提供合适可变区(如由核酸序列编码)组合的序列,这些合适可变区组合可易于与编码本发明的变体,例如具有优选地在CH1区内的未经表面的氨基酸,优选地内埋式氨基酸处的变体的本发明的合适恒定区(例如CL或CH1及CH2和/或CH3)组合。

[0163] 我们也可提供具有编码例如多肽的包括多聚体蛋白(诸如一个共同轻链及两个分离重链)的组分的合适表现卡匣的细胞。自一开始,该细胞可具有稳定地整合的编码适用于分离的变异结构域的核酸。其后,此类细胞仅需要与编码所选VL区或VH区或二者的核酸整合(或置换VL区和/或VH区),随后可生成可基于一个或多个变异结构域容易地分离的多聚体蛋白的混合物。因此,此处所阐述的本发明的一个方面包括具有稳定地整合至其基因组中的编码共同轻链的核酸及包括有包括本文所阐述的分离氨基酸残基的一个或多个结构域的恒定区的宿主细胞。优选地,本发明包括编码用于与重链可变区组合的包括负分离氨基酸残基的结构域及用于与第二重链可变区组合的包括正分离氨基酸残基的结构域的核酸。优选地,该两个经编码重链可变区具有不同pI,其中更加正的可变区可连接至包括正分离氨基酸残基的结构域且其中更加负的可变区可连接至包括负分离氨基酸残基的结构域。

[0164] 本发明还揭露多个此类变体或分离氨基酸残基。因为这些变体包括蛋白质的未经表面的残基,故当这些变体可减少不合需要的免疫作用时前述情况还为有利的,因为这些变体可能不会造成在例如多特异性蛋白,详言的多特异性抗体中的用于分离的结构域(诸如CH1区)表面处的潜在性抗原基元的暴露。此外,因为此类变体不处于蛋白质表面处,故一般而言,如本文所揭露的所选变体可有利地应用于任何包括一个包括如本文所揭露的变体的恒定区或构架区及一个包括免疫球蛋白多肽的可相容异源二聚化区(例如CL结构域、CH2结构域或CH3结构域),优选地至少两个恒定结构域,更优选地CH1的双特异性或多特异性蛋白。优选地,本发明的具有可变重链结构域及可变轻链结构域的多特异性蛋白可具有在构架区或恒定区,优选地CH1区内所选的未经表面暴露或内埋式的一个或多个氨基酸变化,对于残基在Fc界面处经修饰的CH1或CH2-CH3/CH2-CH3结构域,该一个或多个氨基酸变化不会有害地影响CH/CL界面。

[0165] 可替代地,本发明的多特异性蛋白可包括诸如不需要与CL配对的CH1区的分离结构域。例如,CH1可能为骆驼CH1或基于骆驼CH1或诸如鲨鱼的缺乏轻链的其他生物体,或可能为缺乏疏水性残基且不与轻链配对的经修饰CH1区,其中结构域包括在未经表面暴露的残基处的变体以产生等电点差异,从而促进多特异性蛋白与其他蛋白质及片段的分离。

[0166] 通过包括CH1区中的此类变体,此类变体有益地不影响通常在CH2-CH3/CH2-CH3界面处的Fc/Fc受体相互作用或肽多聚化(例如异源二聚化或同源二聚化)。优选地,与野生型结构域相比或与仅包括一个或多个分离残基的结构域相比,除另一变体以外,还包括在构架区或恒定区,优选地CH1区内所选的未经表面暴露或内埋式的一个或多个分离残基的本

发明结构域可有益地改善稳定性。

[0167] 因此,在一个实施方案中,提供包括第一含CH1免疫球蛋白多肽和第二含CH1免疫球蛋白多肽的双特异性蛋白,详言的抗体,其中第一含CH1免疫球蛋白多肽和/或第二含CH1免疫球蛋白多肽包括未经表面暴露或内埋式的一个或多个变异分离氨基酸残基,以使得包括第一含CH1免疫球蛋白多肽和第二含CH1免疫球蛋白多肽的免疫球蛋白蛋白质的等电点不同于仅具有第一含CH1免疫球蛋白多肽的蛋白质和/或仅具有第二含CH1免疫球蛋白多肽的蛋白质(例如亲本蛋白)的等电点。

[0168] 在一个实施方案中,含CH1免疫球蛋白的变体延长或缩短该免疫球蛋白在离子交换层析时的滞留时间。

[0169] 此同样应用于包括与包括例如第三含CH1免疫球蛋白多肽的免疫球蛋白多肽二聚化的包括第一CH1区及第二CH1区的免疫球蛋白多肽的多特异性抗体,其中第一含CH1免疫球蛋白多肽和第二含CH1免疫球蛋白多肽包括选自在CH1区内未经表面暴露的氨基酸或内埋式氨基酸的一个或多个氨基酸的一个或多个变异分离残基,以使得包括第一含CH1免疫球蛋白多肽和第二含CH1免疫球蛋白多肽以及第三含CH1免疫球蛋白多肽的免疫球蛋白蛋白质的等电点不同于仅具有第一含CH1免疫球蛋白多肽和第二含CH1免疫球蛋白多肽的蛋白质和/或仅具有第三含CH1免疫球蛋白多肽的蛋白质(例如亲本蛋白)的等电点。参见例如图2B。

[0170] 应理解,包括第一含CH1免疫球蛋白多肽和第二含CH1免疫球蛋白多肽的双特异性蛋白可难以使用诸如离子交换及其类似方法的其中相应蛋白质的等电点类似的熟知层析法与亲本蛋白(例如单特异性二价抗体)分离。如实施例部分中所示,可显现的等电点类似性为所选层析管柱中的类似滞留时间。如实施例中所示,类似性也可使用例如等电聚焦来测定。在产生含有免疫球蛋白结构域的抗体或蛋白质的混合物期间,滞留时间可类似以使得相应蛋白质的峰重迭,难以进行分离。还应理解,如关于第一含CH1免疫球蛋白多肽和第二含CH1免疫球蛋白多肽所提及的术语“第一”及“第二”并不意味着任何次序或偏好且仅仅用于指示这些链不同。

[0171] 应理解,本发明的CH1区的变体将影响双特异性抗体的等电点,包括电荷添加、移除或逆转。对于所产生的各免疫球蛋白多肽,向含CH1多肽或其类似物中的电荷添加可在一个CH1区或一个或多个CH1区中的各自处进行。电荷添加可通过各种手段获得。中性氨基酸可变化(通常以表现构建体中的编码DNA含量)且变成具有负电荷或正电荷的氨基酸,分别引起负电荷及正电荷添加。正氨基酸可变成具有中性电荷或负电荷的氨基酸,引起负电荷添加,其中自正电荷至负电荷的氨基酸变化引起相对较大的变化。相反地,负氨基酸可变成具有中性电荷或正电荷的氨基酸,引起正电荷添加,其中自负电荷至正电荷的氨基酸变化引起相对较大的变化。

[0172] 因此,在另一实施方案中,本发明的免疫球蛋白蛋白质包括选自由以下组成的群的一个或多个未经表面暴露的氨基酸或优选地内埋式氨基酸的一个或多个变体:

[0173] -中性氨基酸变带负电氨基酸;

[0174] -带正电氨基酸变中性氨基酸;

[0175] -带正电氨基酸变带负电氨基酸;

[0176] -中性氨基酸变带正电氨基酸;

[0177] -带负电氨基酸变中性氨基酸;以及

[0178] -带负电氨基酸变带正电氨基酸。

[0179] 具有正电荷的氨基酸为离氨酸(Lys,K)、精氨酸(Arg,R)以及组氨酸(His,H)。优选地,当具有正电荷的氨基酸将包括于链中或在亲本结构域之间变化时,选择离氨酸。具有负电荷的氨基酸为麸氨酸(Glu,E)及天门冬氨酸(Asp,D)。自等电点视角看,剩余氨基酸代表中性氨基酸。优选地,在另一实施方案中,本发明的免疫球蛋白蛋白质包括选自由以下组成的群的一个或多个未经表面暴露的氨基酸或优选地内埋式氨基酸的一个或多个变体:

[0180] -中性氨基酸变带负电氨基酸;

[0181] -带正电氨基酸变中性氨基酸;

[0182] -中性氨基酸变带正电氨基酸;以及

[0183] -带负电氨基酸变中性氨基酸。

[0184] 呈守恒设计更改形式的这些变体可为优选的。

[0185] 如示意性地描绘本发明的单特异性抗体、双特异性抗体及示例性多特异性抗体的图1和图2中所例示,含CH1免疫球蛋白中的任一者或二者可变化。应理解,针对含CH1免疫球蛋白中的一者或其类似物所选的变体优选系同一类型,即当将正电荷添加至一个链中时,选择将正电荷添加至彼链中(以具有相加效应)的一个或多个变体。还应理解,当链中的一者具有新增正电荷且另一链将同样包括一个或多个变体时,优选选择包括负电荷添加的针对另一链所选的一个或多个变体,此系因为对不同的包括第一含CH1免疫球蛋白及第二含CH1免疫球蛋白的成对免疫球蛋白蛋白质的等电点的作用可能通常以其他方式削弱或甚至抵消。

[0186] 因此,在一个实施方案中,提供包括第一含CH1免疫球蛋白多肽和第二含CH1免疫球蛋白多肽的免疫球蛋白蛋白质,其中第一含CH1免疫球蛋白多肽和/或第二含CH1免疫球蛋白多肽包括选自在CH1区内未经表面暴露的氨基酸的一个或多个氨基酸的一个或多个变体,其中第一含CH1免疫球蛋白多肽包括选自以下的变体:

[0187] -中性氨基酸变带负电氨基酸;

[0188] -带正电氨基酸变中性氨基酸;以及

[0189] -带正电氨基酸变带负电氨基酸;

[0190] 且其中第二含CH1免疫球蛋白多肽包括选自以下的变体:

[0191] -中性氨基酸变带正电氨基酸;

[0192] -带负电氨基酸变中性氨基酸;以及

[0193] -带负电氨基酸变带正电氨基酸。

[0194] 在另一实施方案中,提供包括第一含CH1免疫球蛋白多肽和第二含CH1免疫球蛋白多肽的免疫球蛋白蛋白质,其中第一含CH1免疫球蛋白多肽和/或第二含CH1免疫球蛋白多肽包括选自在CH1区内未经表面暴露的氨基酸的一个或多个氨基酸的一个或多个变体,其中第一含CH1免疫球蛋白多肽包括选自以下的变体:

[0195] -中性氨基酸变带负电氨基酸;以及

[0196] -带正电氨基酸变中性氨基酸;

[0197] 且其中第二含CH1免疫球蛋白多肽包括选自以下的变体:

[0198] -中性氨基酸变带正电氨基酸;以及

[0199] -带负电氨基酸变中性氨基酸。

[0200] 在一个实施方案中,第一含CH1免疫球蛋白多肽和第二含CH1免疫球蛋白多肽在相对于CH1区的氨基酸序列比对时优选地具实质一致性且优选地仅在如本文所定义的氨基酸位置方面具差异。优选地,在第一含CH1多肽及第二含CH1多肽的CH1区之间不同的氨基酸位置在未经表面暴露的氨基酸位置方面不同。该含CH1多肽优选为人类IgG1免疫球蛋白CH1区。适用于生成包括如本文所描述的变异残基的分离结构域或与其比较的CH1区的氨基酸序列的实施例描绘于图14A中。

[0201] 在另一实施方案中,本发明的免疫球蛋白蛋白质在第一含CH1免疫球蛋白多肽和/或第二含CH1免疫球蛋白多肽中进一步包括进一步选自在CH1区内的氨基酸的稳定变体。可引入用于增加包括含有本文所描述的分离残基的结构域的多肽和/或双特异性蛋白或多特异性蛋白的稳定性的另外变体。

[0202] 优选地,在免疫球蛋白多肽内的未经表面暴露的分离残基或内埋式分离残基可产生相较于诸如野生型结构域的参考结构域而言相对提高的稳定性。

[0203] 如本文所使用的术语“未经表面暴露”意谓在使用默认参数的程序GETAREA 1.0 β 中50%或更小的“比率(%)”评分,其中大于50%比率(%)在此程序中评分为“向外”或“经表面暴露”。如本文所使用的术语“内埋式”意谓在使用默认参数的程序GETAREA 1.0中20%或更小的比率(%)评分,其在此程序中评分为“向内”。Negi等人,“Solvent Accessible Surface Areas, Atomic Solvation Energies, and Their Gradients for Macromolecules”,最后一次修正时间为2015年4月17日星期三3:00PM。诸如本文实施例中所提供,使用原代氨基酸及含有蛋白结构域的区的结构模型作为输入至GETAREA程序中的输入物以在GETAREA输出档案中获得“比率(%)”。在本文提及内埋式氨基酸的情况下,提及如表1及表20-22中所指示比率(%)评分为20%或更小且优选地15%或更小的氨基酸或其变体。在一些实施方案中,对内埋式氨基酸的提及是指如表1及表20-22中所指示比率(%)评分为10%或更小的氨基酸或其变体。

[0204] 关于CH区的结构信息可自含有数个CH区中的各自的高分辨率结构的蛋白质数据库获得,或经由同源性模型化(例如使用同源性模型化工具以引起含有变体的CH区的结构模型化;<https://swissmodel.expasy.org>)获得。如以pdb格式提供的所选CH1区或其类似物的结构信息系在Getarea程序(蛋白质数据库格式,提供来源于X射线绕射及NMR研究的巨分子结构数据的标准图标)中输入,该Getarea程序登记在提交以进行分析后的比率(%)评分。

[0205] 如本文所使用的“pI”系根据ExPASy, ProtParam工具使用预设参数基于原代氨基酸来加以计算。ProtParam为允许计算储存于Swiss-Prot或TrEMBL中的给定蛋白质或使用者进入蛋白质序列的各种物理及化学参数的工具。所计算的参数包括理论pI。Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A.; Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; (In) John M. Walker (编): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press (2005) 第571-607页。诸如本文实施例中所提供,使用全多肽以测量理论pI。

[0206] 如实施例部分中所示,可例如通过诸如依赖于Rosetta软件(3.1版<<<https://www.rosettacommons.org/software>>>))在不更改经表面暴露的残基的情况下执行未经表

面暴露且内埋式残基的计算机仿真稳定性分析来作出针对沿感兴趣的结构域的各氨基酸位置的另一选择。代替计算机仿真选择,此也可活体外进行。另外,诸如实施例部分中所示,在第一种情况下,选择可计算机仿真进行,随后活体外确认其。

[0207] “抗体”为含有结合抗原上的抗原决定基的一个或多个结构域的属于免疫球蛋白类蛋白质的蛋白质分子,其中此类结构域来源于抗体可变区或与抗体可变区共享序列同源性。抗体结合具有包括特异性及亲和力的不同质量。特异性决定何种抗原或其抗原决定基由结合结构域特异性结合。亲和力为与特定抗原或抗原决定基结合的量值的量度。此处宜注意,抗体的“特异性”是指抗体对特定抗原的选择性,而“亲和力”是指抗体的抗原结合位点与其所结合的抗原决定基之间的相互作用的量值。用于治疗用途的抗体优选尽可能地近似要被治疗的个体的天然抗体(例如人类个体的人类抗体)。本发明的抗体不限于任何特定格式或其产生方法。

[0208] “双特异性抗体”为如本文所描述的抗体,其中抗体的一个结构域结合至第一抗原或抗原决定基,而抗体的第二结构域结合至第二抗原或抗原决定基,其中该第一抗原及该第二抗原不具有有一致性,或第一抗原决定基及第二抗原决定基不具有有一致性。术语“双特异性抗体”还涵盖其中一个重链可变区/轻链可变区(VH/VL)组合结合抗原上的第一抗原决定基且第二VH/VL组合结合第二抗原决定基的抗体。该术语进一步包括其中VH能够特异性识别第一抗原且免疫球蛋白可变区中与VH配对的VL能够特异性识别第二抗原的抗体。所得VH/VL对结合抗原1或抗原2。此类所谓的“二合一抗体”描述于例如W02008/027236、W02010/108127以及Schaefer等人(Cancer Cell 20,472-486,2011年10月)中。本发明的双特异性抗体不限于任何特定双特异性格式或其产生方法。双特异性抗体为多特异性抗体。如本文所提及的多特异性多聚体或抗体涵盖含有结合抗原上的抗原决定基的两个或更多个结构域的属于免疫球蛋白类蛋白质的蛋白质分子,其中此类结构域来源于抗体可变区或与抗体可变区共享序列同源性;且包括结合三个或更多个如此项技术中已知的抗原,包括如先前申请的申请案US62/650,467中所描述的抗原的蛋白质分子。

[0209] 本发明的结构域包括不同于野生型或参考序列的构架结构域或恒定结构域以使得其包括带负电氨基酸,其中野生型或参考序列的对应位置为未经表面暴露的或内埋式的;且含有中性氨基酸。可替代地,本发明的结构域包括不同于野生型或参考序列的构架结构域或恒定结构域以使得其包括带正电氨基酸,其中野生型或参考序列的对应位置为未经表面暴露的或内埋式的;且含有中性氨基酸。可替代地,本发明的结构域包括不同于野生型或参考序列的构架结构域或恒定结构域以使得其包括中性氨基酸,其中野生型或参考序列的对应位置为未经表面暴露的或内埋式的;且含有正氨基酸或负氨基酸。可替代地,本发明的结构域包括上文所描述的实施方案的组合以使得结构域的净pI的不同的处在于相对于野生型或参考序列的一个或多个电荷。

[0210] 如本文所使用的术语“带电氨基酸残基”或“带电残基”意谓具有在生理学相关pH下的带电侧链的氨基酸残基。这些带电侧链可为诸如精氨酸(Arg,R)、组氨酸(His,H)及离氨酸(Lys,K)中所存在的带正电侧链,或可为诸如天门冬氨酸(Asp,D)及麸氨酸(Glu,E)中所存在的带负电侧链。如本文所使用的术语“中性氨基酸残基”或中性残基是指不携带在生理学上相关pH下的带电侧链的全部其他氨基酸。这些中性残基包括丝氨酸(Ser,S)、苏氨酸(Thr,T)、天门冬酰胺(Asn,N)、麸酰胺(Glu,Q)、半胱氨酸(Cys,C)、甘氨酸(Gly,G)、脯

氨酸(Pro,P)、丙氨酸(Ala,A)、缬氨酸(Val,V)、异白氨酸(Ile,I)、白氨酸(Leu,L)、甲硫氨酸(Met,M)、苯丙氨酸(Phe,F)、酪氨酸(Tyr,Y)以及色氨酸(Trp,T)。

[0211] 本发明的一优选实施方案包括如上文所描述的分离结构域和/或包括此类分离结构域的蛋白质。本发明的分离结构域可并入具有免疫球蛋白结构域的抗体或蛋白质中。其可并入任何子类的IgG或单特异性或多特异性T细胞受体结构域或免疫球蛋白中。

[0212] 本发明的另一优选实施方案为包括一个或多个结合结构域的蛋白质且包括有包括N159K、N159H或N159R或N159D或N159E分离残基且更优选地N159K或N159D分离残基的CH1分离结构域。本发明的另一优选实施方案为包括一个或多个结合结构域的蛋白质且包括有包括N201K、N201H或N201R或N201D或N201E分离残基且更优选地N201K或N201D分离残基的CH1分离结构域。

[0213] 如根据本发明所提供的并有本发明的分离结构域的单特异性蛋白、双特异性蛋白或多特异性蛋白可包括经选择为来自人类IgG的CH1区的CH1区,在一个实施方案中该CH1区包括选自包括以下的群的在CH1区内的氨基酸:T120、K147、D148、Y149、V154、N159、A172、Q175、S190、N201以及K213。这些氨基酸位置的编号系根据EU编号。

[0214] 本发明的CH1分离结构域可进一步包括对应于T197D的稳定变体。

[0215] 本发明的CH1分离结构域可进一步包括对应于在E216K处的铰链的稳定变体。

[0216] 本发明的CH1分离结构域可进一步包括对应于G122P、S157T、I199V、N203I、S207T以及V211I的稳定变体。

[0217] 通过例如经由选自包括以下的群的变体残基氨基酸产生且采用包括如本文所揭露的变体的分离结构域:在人类IgG1免疫球蛋白多肽链的CH1区内的T120、K147、D148、Y149、V154、N159、A172、Q175、S190、N201以及K213,可产生具有在调配及分离期间所用的pH下的差异电荷,即不同等电点的单特异性蛋白、双特异性蛋白或多特异性蛋白(参见例如图1),此类不同等电点允许分离且分离单特异性蛋白与双特异性蛋白或多特异性蛋白(或分离且分离双特异性蛋白与三特异性蛋白,诸如此类)。

[0218] 在一个实施方案中,根据本发明产生单特异性蛋白、双特异性蛋白或多特异性蛋白,其中免疫球蛋白多肽的CH1区包括选自由以下组成的群的在CH1区处为未经表面暴露的氨基酸或内埋式氨基酸的分离残基:D148、Y149、V154、N159、A172、S190以及N201。该蛋白质优选为人类蛋白,优选地IgG蛋白,优选地IgG1蛋白。

[0219] 在一个实施方案中,对于其中免疫球蛋白多肽的CH1区经选择为来自人类IgG1的CH1区的本发明的双特异性蛋白,在CH1区内的氨基酸选自由以下组成的群:T120、K147、D148、N159、Q175、N201、K213,此系因为这些氨基酸位置允许具有不同电荷(在中性氨基酸、带正电氨基酸及带负电氨基酸之间变化)的变体。在另一实施方案中,在CH1区内为未经表面暴露的氨基酸的氨基酸选自由为内埋式氨基酸的氨基酸N159及N201组成的群。更优选地,该免疫球蛋白蛋白质为双特异性抗体或多特异性蛋白。最佳地,该第一含CH1免疫球蛋白多肽和该第二含CH1免疫球蛋白多肽各自包括重链可变区,其中该可变区中的各自结合至不同抗原或抗原决定基。

[0220] 在另一实施方案中,根据本发明提供包括第一含CH1免疫球蛋白多肽和第二含CH1免疫球蛋白多肽的双特异性蛋白,该CH1区为人类IgG1 CH1区,其中第一含CH1免疫球蛋白多肽或第二含CH1免疫球蛋白多肽包括选自在CH1区内的氨基酸的氨基酸的一个或多个变

体,此类变体包括选自由K147E、N159D、Q175E、N201D以及K213Q组成的群的一个或多个变体或选自由T120K、D148K、N159K、Q175K、N201K组成的群的一个或多个变体。最佳地,该双特异性蛋白为双特异性抗体。

[0221] 在一个优选实施方案中,本发明提供包括第一含CH1免疫球蛋白多肽和第二含CH1免疫球蛋白多肽的免疫球蛋白蛋白质,该CH1区为人类IgG1 CH1区,其中第一含CH1免疫球蛋白多肽或第二含CH1免疫球蛋白多肽中的一者包括变体N159K及在E216K处的铰链位置处的变体。在另一实施方案中,第一含CH1免疫球蛋白多肽或第二含CH1免疫球蛋白多肽中的另一者不包括变体或包括例如诸如选自T197D及K213Q的一个或多个变体。优选地,本发明的多聚化蛋白由两个多肽构成,其中第一多肽包括结合第一抗原或抗原决定基的第一可变结构域且第二多肽包括结合不同于第一可变结构域的抗原或抗原决定基的第二可变结构域,其中第一可变结构域经由肽键连接至与二聚化结构域(诸如CH3)连接的分离结构域,其中该二聚化结构域与经由肽键连接至该第二可变结构域的第二二聚化结构域(诸如第二CH3结构域)形成界面;且优先连接至具有不同于第一分离结构域的电荷的第二分离结构域,其中该蛋白质优选包括双特异性或多特异性蛋白或抗体。

[0222] 在一个实施方案中,根据本发明产生单特异性蛋白、双特异性蛋白或多特异性蛋白,其中免疫球蛋白多肽的CH1区、CH2区、CH3区或其组合包括选自由以下组成的群的在CH区处为未经表面暴露的氨基酸或内埋式氨基酸的分离残基:T120、K147、D148、Y149、V154、N159、A172、Q175、S190、N201及K213、V303、K370、E382以及E388。该蛋白质优选为人类蛋白,优选地IgG蛋白,优选地IgG1蛋白。

[0223] 在一个实施方案中,对于其中免疫球蛋白多肽的CH区经选择为来自人类IgG1的CH区的本发明的双特异性蛋白,在CH区内的氨基酸选自由以下组成的群:T120、K147、D148、N159、Q175、N201、K213、V303、K370、E382以及E388,此系因为这些氨基酸位置允许具有不同电荷(在中性氨基酸、带正电氨基酸及带负电氨基酸之间变化)的变体。在另一实施方案中,在CH区内为未经表面暴露的氨基酸的氨基酸选自由以下组成的群:为内埋式氨基酸的氨基酸N159及N201(对于CH1)、V303(对于CH2)以及E382及E388(对于CH3)。更优选地,该免疫球蛋白蛋白质为双特异性抗体或多特异性蛋白。最佳地,该第一含CH免疫球蛋白多肽和该第二含CH免疫球蛋白多肽各自包括重链可变区,其中该可变区中的各自结合至不同抗原或抗原决定基。

[0224] 在另一实施方案中,根据本发明提供包括第一含CH免疫球蛋白多肽和第二含CH免疫球蛋白多肽的双特异性蛋白,该CH区为人类IgG1 CH区,其中第一含CH免疫球蛋白多肽或第二含CH免疫球蛋白多肽包括选自在CH1区内的氨基酸的氨基酸的一个或多个变体,此类变体包括选自由K147E、N159D、Q175E、N201D、K213Q以及V303E组成的群的一个或多个变体或选自由T120K、D148K、N159K、Q175K、N201K、V303K、E382Q、E382T、E388L、E388M、E388T组成的群的一个或多个变体。最佳地,该双特异性蛋白为双特异性抗体。

[0225] 此项技术中已知,相对于单特异性抗体(或不合需要的蛋白质副产物),可通过具有一个双特异性抗体或多特异性抗体优先产生双特异性抗体或多特异性抗体,该一个双特异性抗体或多特异性抗体包括有包括含变体L351D及L368E(“DE臂”)的CH3区的第一多肽及包括含变体T366K及L351K(“KK臂”)的第二CH3区的第二多肽(被集体地称作“DEKK”异源二聚体)(EU编号),以使得相对于包括DE/DE同源二聚体或KK/KK同源二聚体的两个多肽,形成

DEKK的两个多肽优先配对。电荷工程改造的其他形式为此项技术中已知用于促进异源二聚化。

[0226] 在本文所描述的实施方案中,在使用诸如CH1区的负分离结构域的情况下,其优先与DE-CH3结构域配对,且在使用诸如CH1区的正分离结构域的情况下,其优先与KK臂或前述物质的任何组合配对(例如一个多肽上的负分离结构域及DE-CH3结构域以及另一多肽上的正分离结构域及KK-CH3结构域以优先形成可更加容易地与双正分离结构域及KK/KK同源二聚体或双负分离结构域及DE/DE同源二聚体分离的异源二聚体)。在采用其他异源二聚化技术的情况下,如一般熟习此项技术者已知,本发明以相同方式通过组合带负电分离结构域应用于带负电异源二聚化结构域且/或通过组合带正电分离结构域应用于带正电异源二聚化结构域,以促进异源二聚体形成及该异源二聚体分离。

[0227] 在另一实施方案中,根据本发明提供包括第一含CH1免疫球蛋白多肽和第二含CH1免疫球蛋白多肽的多聚化蛋白,优选地双特异性蛋白或多特异性蛋白,该CH1区为人类IgG1 CH1区,其中第一含CH1免疫球蛋白多肽包括选自在CH1区内的氨基酸的氨基酸的一个或多个变体,此类变体包括选自由K147E、N159D、Q175E、N201D以及K213Q组成的群的一个或多个变体,且其中第二含CH1免疫球蛋白多肽包括选自在CH1区内的氨基酸的氨基酸的一个或多个变体,此类变体包括选自由T120K、D148K、N159K、Q175K以及N201K组成的群的一个或多个变体。最佳地,该双特异性蛋白为双特异性抗体。

[0228] 在另一实施方案中,根据本发明提供包括第一含CH1免疫球蛋白多肽和第二含CH1免疫球蛋白多肽的多聚化蛋白,优选地双特异性蛋白或多特异性蛋白,该CH1区为人类IgG1 CH1区,其中第一含CH1免疫球蛋白多肽或第二含CH1免疫球蛋白多肽包括选自在CH1区内的氨基酸的氨基酸的一个或多个变体,此类变体选自由以下组成的群:K147E及Q175E;N201D及K213Q;T197D及K213Q;N159D及K213Q;以及K213Q,或此类变体选自由以下组成的群:T120K;N201K;D148K及Q175K;以及N159K及在铰链残基E216K处的氨基酸的变体。最佳地,该蛋白质为双特异性抗体。

[0229] 在又另一实施方案中,根据本发明提供包括第一含CH1免疫球蛋白多肽和第二含CH1免疫球蛋白多肽的多聚化蛋白,优选地双特异性蛋白或多特异性蛋白,该CH1区为人类IgG1 CH1区,其中第一含CH1免疫球蛋白多肽包括选自在CH1区内的氨基酸的氨基酸的一个或多个变体,此类变体选自由以下组成的群:K147E及Q175E;N201D及K213Q;T197D及K213Q;N159D及K213Q;以及K213Q,且其中第二含CH1免疫球蛋白多肽包括选自在CH1区内的氨基酸的氨基酸的一个或多个变体,此类变体选自由以下组成的群:T120K;N201K;D148K及Q175K;以及N159K及在铰链残基E216K处的氨基酸的变体。最佳地,该免疫球蛋白蛋白质为双特异性抗体。

[0230] 在一个实施方案中,根据本发明提供包括具有如表14部分B中所描绘的CH1区、CH2区或CH3区的序列的CH区的多聚化蛋白,优选地双特异性蛋白或多特异性蛋白。多聚化蛋白,优选地双特异性蛋白或多特异性蛋白可具有为表14部分B的两个或三个CH区序列的组合的CH1区、CH2区或CH3区。在其具有如表14部分B中所描绘的两个CH1序列、两个CH2序列或两个CH3序列的情况下,优选地,当与野生型CH区相比时,两个区具有相反电荷差异。因此如果当与野生型CH相比时一个区具有更加正的电荷,则当与野生型CH相比时另一区优选具有更加负的电荷。重链可通过具有例如表14部分B的CH1序列、CH2序列及CH3序列中的两个或

三个而具有表14的两个或三个序列。在此类情况下,当与野生CH相比时,两个或三个重链可具有相同电荷差异。当与野生型相比时,两个或三个重链全部具有更加正的电荷,或两个或三个重链全部具有更加负的电荷。此外,多聚化蛋白,优选地双特异性蛋白或多特异性蛋白可具有此类重链中的两个,在此类情况下,优选地当与野生型重链相比时两个重链具有相反电荷差异。

[0231] 多聚化蛋白,优选地双特异性蛋白或多特异性蛋白优选为多特异性抗体,优选地双特异性抗体。

[0232] 此项技术中描述各种方法以便促进诸如双特异性抗体的感兴趣的多特异性蛋白的形成,由此减少单特异性二价(亲本)蛋白的含量。对于抗体,CH3-CH3相互作用为Fc二聚化的驱动器。可引入在两个CH3区之间的界面处的CH3区的氨基酸变体以促进双特异性物形成且/或破坏单特异性亲体形成(例如经由引入可相容/排斥性电荷或立体(不)兼容性)。此类方法可有利地与如本文所描述的CH1区的变体组合。

[0233] 因此,在另一实施方案中,提供本发明的免疫球蛋白蛋白质,其中第一含CH1免疫球蛋白多肽和第二含CH1免疫球蛋白多肽包括CH3区,且其中第一含CH1免疫球蛋白多肽和第二含CH1免疫球蛋白多肽中的一者包括CH3变体L351D及L368E,且另一者包括CH3变体T366K及L351K(还称作“DEKK”)(EU编号)。

[0234] 应理解,在向第一含CH1免疫球蛋白多肽和/或第二含CH1免疫球蛋白多肽中添加电荷的情况下,这些所谓的DEKK变体对准。此意谓当含CH1免疫球蛋白多肽包括已添加负电荷的变体时,彼链优选地具有L351D及L368E CH3残基,不需要为(但可为)变体CH1区的另一链具有CH3 T366K及L351K残基。相反地,此意谓当含CH1免疫球蛋白多肽包括已添加正电荷的变体时,彼链优选地具有T366K及L351K CH3变体,不需要为变体CH1区的另一链具有L351D及L368E CH3残基。优选地,本发明的该免疫球蛋白蛋白质包括人类免疫球蛋白Fc区,最佳地该人类免疫球蛋白Fc区为IgG1 Fc区。如上文所提及,在可采用其他电荷变体CH3技术以用于异源二聚体形成的情况下,本发明的多聚化蛋白的一优选实施方案包括进一步包括多聚化结构域(诸如具有负电荷的CH3)的具有负电荷的含分离结构域免疫球蛋白多肽和进一步包括多聚化结构域(诸如具有正电荷的CH3)的具有正电荷的含分离结构域免疫球蛋白多肽,以促进该多聚化蛋白的异源二聚化及分离。

[0235] 术语“CH1区”、“CH2区”及“CH3区”在此项技术中众所周知。IgG结构具有四个链,即两个轻链及两个重链;各轻链通常具有两个结构域,即可变轻链结构域及恒定轻链结构域(VL及CL),且各重链通常具有四个结构域,即可变重链(VH)结构域及三个恒定重链结构域(CH1、CH2、CH3)。重链的CH2区及CH3区称为Fc(片段可结晶)部分、Fc片段、Fc骨架或简言的Fc。IgG分子为具有在铰链区处且在CH1与CL之间通过二硫键(-S-S-)结合在一起的两个重链的异源四聚体。重链二聚化包括包括于CH3-CH3结构域界面处的相互作用至在铰链区处的相互作用。合适CH2区、CH3区及铰链区的氨基酸序列的实施例描绘于图14中。

[0236] 在一个实施方案中,本发明的免疫球蛋白蛋白质包括为抗体重链的第一含CH1多肽。在一个实施方案中,本发明的免疫球蛋白蛋白质包括为抗体重链的第二含CH1多肽。在另一优选实施方案中,第一含CH1多肽及第二含CH1多肽二者均为诸如人类IgG1重链的抗体重链。本发明的该免疫球蛋白蛋白质可进一步包括一个或多个抗体轻链。最佳地,该抗体轻链为共同轻链。

[0237] 因此,如本文所使用的术语“共同轻链”是指可具有一致性或具有一些氨基酸序列差异,同时在与重链配对之后仍保留所得抗体的结合特异性的轻链。例如,有可能制备或发现不具有氨基酸序列一致性、但仍具有功能等效性的轻链,此系例如通过引入且测试守恒氨基酸变化和/或不贡献于或仅部分贡献于当与重链配对时的结合特异性的区中的氨基酸变化及其类似氨基酸变化来进行。特定共同轻链及此类功能等效变体的组合涵盖在术语“共同轻链”内。关于共同轻链使用的详细描述,参考W0 2004/009618。优选地,本发明中使用为生殖系样轻链,更优选地生殖系轻链,优选地经重排生殖系人类 κ 轻链,最佳地经重排生殖系人类 κ 轻链IgV κ 1-39/J κ 或IGV κ 3-20/J κ 的共同轻链。涵盖在本发明内的其他轻链包括IgKV3-15/JK1及还在此项技术中已知用于构成共同轻链的替代轻链。

[0238] 作为使用共同轻链及避免不匹配重链及轻链的误配的替代方案,可涵盖诸如描述于W02009/080251、W02009/080252和/或W02009/080253中的用于使重链及轻链配对的手段。共同轻链可变区、共同轻链和/或共同轻链的CDR序列的氨基酸序列的实施例描绘于图13中。优选共同轻链具有如图13A中所描绘的序列。

[0239] 当在CH1区内为如上文所描述的未经表面暴露的氨基酸或优选地内埋式氨基酸的彼等氨基酸当中选择CH1区的变异残基时,此类变体具体地适用于人类双特异性蛋白,此系因为这些变体允许最接近地类似于人类抗体的三级结构的双特异性蛋白。应理解,关于蛋白质描述的术语人类并不意味着第一含CH1多肽及第二含CH1多肽的整体氨基酸序列需要具有人源,也不意味着氨基酸序列需要直接自人类获得。应理解,对人类结构域、蛋白质或抗体的提及是指可包括例如CH2工程改造(针对Fc沉默而包括)、CH3工程改造(针对异源二聚化而包括)和/或Fc工程改造(针对影响Fc受体活动性而包括)的一些氨基酸序列更改及一些针对分离残基包括的更改的蛋白质。如此项技术中已知,用于生成双特异性蛋白或多特异性蛋白的人类结构域可由自具有人类免疫系统的特点的小鼠获得的核酸序列编码,此类核酸序列诸如编码人类可变区基因链段和/或恒定区的重基因座、轻基因座或杂交基因座。W02009/157771。此类蛋白质也可经由识别编码人类免疫球蛋白结构域的核酸来获得,此类人类免疫球蛋白结构域系由噬菌体呈现、酵母呈现及一般熟习此项技术者熟知的其他技术来识别。

[0240] 本发明的多聚化蛋白可为双特异性蛋白或多特异性蛋白,优选地尽管不存在于自然界中、但也可具有呈例如合并至人类双特异性抗体中的两个重链及两个(共同)轻链的序列形式的人类序列的抗体,此类抗体可具有自氨基酸序列视角看少量例如如本文所描述的变体,包括CH1区且/或优选地CH3工程改造及其类似者的变体。

[0241] 在一个实施方案中,进一步包括轻链的本发明的免疫球蛋白蛋白质优选具有在CH1区内未经表面暴露且距CH1/CL界面远的一个或多个氨基酸的一个或多个变体。可避免对包括重链及轻链配对的抗原结合结构域功能具有任何潜在性作用的此方式。优选地,本发明的双特异性蛋白为双特异性抗体。更优选地,该双特异性抗体为人类双特异性抗体。最佳地,为人类双特异性抗体的该双特异性抗体为IgG1抗体。

[0242] 在一个实施方案中,提供编码本发明的分离结构域的核酸,该本发明的分离结构域诸如包括选自在CH1区内未经表面暴露的氨基酸的一个或多个变体的免疫球蛋白含CH1多肽。此外,本发明的另一实施方案为包括编码本发明的分离结构域的核酸的细胞或重组宿主细胞。此外,在另一实施方案中,提供包括编码本发明的第一含CH1免疫球蛋白多肽和

第二含CH1免疫球蛋白多肽的一个或多个核酸的细胞或重组宿主细胞。此类经分离核酸、细胞及重组宿主细胞具体地适用于产生本发明的免疫球蛋白蛋白质且适用于分离此类免疫球蛋白蛋白质的方法。

[0243] 还提供包括编码如本文所揭露的本发明的变体分离结构域的核酸的宿主动物或转殖基因动物。在一个实施方案中,此类宿主动物或转殖基因动物编码包括对应于本发明的野生型免疫球蛋白结构域的未经表面暴露的氨基酸残基的一个或多个分离残基的免疫球蛋白区。优选地,此类转殖基因动物为啮齿动物或鸟,更优选地小鼠、大鼠或鸡,其中该小鼠、大鼠或鸡的抗体组库的至少一部分为人类或经人类化。

[0244] 因此,在一个实施方案中,提供包括如本文所描述的本发明的免疫球蛋白蛋白质的组合物。应理解,此类组合物可为例如粗细胞溶解物和/或经过滤粗溶解物或经半纯化产物的中间产物。当对此类组合物进行进一步加工时,例如包括由于本发明的一个或多个CH1区的变体而允许获得双特异性蛋白的分离步骤。可获得药物组合物,即包括本发明的双特异性蛋白且包括药学上可接受的赋形剂的药物组合物。此类产物可呈液体形式或呈经冷冻干燥的产物形式。可采用任何医药学上可接受的组合物。应理解,此类医药学上可接受的组合物可不必直接投与至患者,但可经受例如将医药产品溶解或混合于适当患者输注用溶液中的另外预备步骤。如通篇进一步所描述,以上步骤进一步应用于包括三特异性蛋白及包括除CH1区以外的分离结构域的其他多特异性蛋白的组合物。

[0245] 如下文所描述的另外实施方案涉及用于产生本发明的免疫球蛋白蛋白质的方法。

[0246] 在一个实施方案中,提供用于产生本发明的变异双特异性蛋白的方法,其包括以下步骤:

[0247] a) 提供编码第一含CH免疫球蛋白多肽的核酸及编码第二含CH免疫球蛋白多肽的核酸,该第一含CH免疫球蛋白多肽和该第二含CH免疫球蛋白多肽编码双特异性蛋白;

[0248] b) 该编码第一含CH免疫球蛋白多肽的核酸包括编码在CH区内未经表面暴露的一个或多个氨基酸的三重峰的一个或多个变体,以使得包括第一含CH免疫球蛋白多肽和第二含CH免疫球蛋白多肽的变异双特异性蛋白的等电点不同于仅含有第一含CH免疫球蛋白多肽的单特异性蛋白或仅含有第二含CH免疫球蛋白多肽的单特异性蛋白的等电点;

[0249] c) 提供具有编码第一含CH免疫球蛋白多肽的核酸及编码第二含CH免疫球蛋白多肽的核酸的细胞且产生变异双特异性蛋白。

[0250] 如上文已经描述,应理解,任何变化可在上文及下文所描述的步骤a)及b)中计算机仿真执行。因此,第一含CH免疫球蛋白多肽和第二含CH免疫球蛋白多肽相较于参考序列而言可完全计算机仿真变化。应理解,该变化也可包括仅提供此类(变异)核序列且接合这些例如合适可变结构域。包括标准分子技术、DNA合成和/或计算机仿真设计的任何构筑方式可根据本发明采用且用于如上文及下文所描述的步骤a)及b)中。还应理解,向细胞提供核酸可包括诸如暂时及稳定转染或其类似方法的任何合适方法。还应理解,提供具有步骤c)的核酸的细胞的步骤也可包括仅提供其部分,只要结果为细胞具备编码第一含CH免疫球蛋白多肽的核酸及编码第二含CH免疫球蛋白多肽的核酸且该细胞能够产生变异双特异性蛋白即可。在另一实施方案中,提供用于产生本发明的变异双特异性蛋白的方法,其中该方法包括以下步骤:

[0251] a) 提供编码第一含CH免疫球蛋白多肽的核酸及编码第二含CH免疫球蛋白多肽的

核酸,该第一含CH免疫球蛋白多肽和该第二含CH免疫球蛋白多肽编码双特异性蛋白;

[0252] b) 其中编码第一含CH免疫球蛋白多肽的核酸及编码第二含CH免疫球蛋白多肽的核酸包括编码在CH区内未经表面暴露的一个或多个氨基酸的三重峰的一个或多个变体,以使得包括第一含CH免疫球蛋白多肽和第二含CH免疫球蛋白多肽的变异双特异性蛋白的等电点不同于仅含有第一含CH免疫球蛋白多肽的亲本蛋白或仅含有第二含CH免疫球蛋白多肽的亲本蛋白的等电点;

[0253] c) 提供具有编码第一含CH免疫球蛋白多肽和经修饰第二含CH免疫球蛋白多肽的核酸的细胞且产生变异免疫球蛋白双特异性蛋白。

[0254] 优选地,包括此类变体中的一者或多者的本发明的此类方法选自:

[0255] -将氨基酸自中性氨基酸改变成带负电氨基酸;

[0256] -将带正电氨基酸改变成中性氨基酸;

[0257] -将带正电氨基酸改变成带负电氨基酸;

[0258] -将氨基酸自中性氨基酸改变成带正电氨基酸;

[0259] -将带负电氨基酸改变成中性氨基酸;以及

[0260] -将带负电氨基酸改变成带正电氨基酸。

[0261] 应理解,优选地含CH免疫球蛋白多肽中的一者具有新增正电荷,或具有新增负电荷。两个含CH免疫球蛋白多肽均可具有新增电荷,其中优选地,一个含CH免疫球蛋白多肽具有新增负电荷且另一含CH免疫球蛋白多肽具有新增正电荷。

[0262] 因此,在另一实施方案中,提供用于产生包括第一含CH免疫球蛋白多肽和第二含CH免疫球蛋白多肽的本发明双特异性蛋白的方法,其中该方法包括以下步骤:

[0263] a) 提供编码第一含CH免疫球蛋白多肽的核酸及编码第二含CH免疫球蛋白多肽的核酸;

[0264] 其中第一含CH免疫球蛋白多肽和/或第二含CH免疫球蛋白多肽包括选自在CH区内未经表面暴露的氨基酸的一个或多个氨基酸的一个或多个变体,其中第一含CH免疫球蛋白多肽包括选自以下的变体:

[0265] -中性氨基酸变带负电氨基酸;

[0266] -带正电氨基酸变中性氨基酸;以及

[0267] -带正电氨基酸变带负电氨基酸;

[0268] 且其中第二含CH免疫球蛋白多肽包括选自以下的变体:

[0269] -中性氨基酸变带正电氨基酸;

[0270] -带负电氨基酸变中性氨基酸;以及

[0271] -带负电氨基酸变带正电氨基酸;

[0272] b) 提供具有编码第一含CH免疫球蛋白多肽和第二含CH免疫球蛋白多肽的核酸的细胞且产生双特异性蛋白。

[0273] 应理解,任何变化步骤可在步骤a)中计算机仿真执行。因此,第一含CH免疫球蛋白多肽和第二含CH免疫球蛋白多肽相较于参考序列而言可完全计算机仿真变化。应理解,该变化也可包括仅提供此类核序列且接合这些例如合适可变结构域。包括标准分子技术、DNA合成和/或计算机仿真设计的任何构筑方式可根据本发明采用且用于步骤a)中。还应理解,向细胞提供可包括诸如暂时及稳定转染或其类似方法的任何合适方法。还应理解,提供

具有步骤b)的核酸的细胞的步骤也可包括仅提供其部分,只要结果为细胞具备编码第一含CH免疫球蛋白多肽的核酸及编码第二含CH免疫球蛋白多肽的核酸且该细胞能够产生变异双特异性蛋白即可。

[0274] 在另一实施方案中,改变含CH免疫球蛋白多肽的氨基酸序列的步骤另外包括在与CH区内的一个或多个氨基酸对应的另外氨基酸位置处引入稳定修饰。

[0275] 以上步骤进一步应用于产生三特异性蛋白及其他多特异性蛋白、编码此类蛋白的核酸及包括且编码除CH区以外具有在未经表面暴露的残基处的变体的分离结构域的核酸的方法。

[0276] 根据本发明,提供包括编码至少第一包括本发明的多肽链的CH结构域及第二包括本发明的多肽链的CH结构域的核酸的细胞。本发明的该细胞可进一步包括编码轻链,优选地共同轻链的核酸。可采用用于制造本发明的免疫球蛋白蛋白质的任何细胞,其包括能够表现重组DNA分子的任何细胞,包括细菌,诸如艾氏菌属 (*Escherichia*) (例如大肠杆菌)、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、沙门氏菌属 (*Salmonella*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、链霉菌属 (*Streptomyces*);酵母,诸如酿酒酵母 (*S.cerevisiae*)、乳酸克鲁维酵母 (*K.lactis*)、巴斯德毕赤酵母 (*P.pastoris*)、假丝酵母 (*Candida*) 或解脂耶氏酵母 (*Yarrowia*);丝状真菌,诸如红霉菌 (*Neurospora*)、米曲菌 (*Aspergillus oryzae*)、小巢状曲菌 (*Aspergillus nidulans*) 及黑曲菌 (*Aspergillus niger*);昆虫细胞,诸如草地黏虫 SF-9或SF-21细胞;且优选地哺乳动物细胞,诸如中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞、BHK细胞、小鼠细胞 (包括SP2/0细胞及NS-0骨髓瘤细胞);灵长类动物细胞,诸如COS及Vero细胞、MDCK细胞、BRL 3A细胞、融合瘤、肿瘤细胞、永生化原代细胞;人类细胞,诸如W138、HepG2、HeLa、HEK293、HT1080或胚胎视网膜细胞 (诸如PER.C6) 及其类似物。

[0277] 所选表现系统常常涉及哺乳动物细胞表现载体及宿主以使得蛋白质经适当地糖基化。可使用人类细胞株以获得具有完全人类糖基化型态 (completely human glycosylation pattern) 的双特异性抗体。一般而言,用于最大化哺乳动物细胞培养物的生产率之原理、方案及实用技术可在Mammalian Cell Biotechnology:a Practical Approach (M.Butler,编,IRL Press,1991) 中找到。细胞及重组宿主细胞中的抗体表现已在此项技术中得到广泛描述。因此,编码本发明的蛋白质的核酸包括允许表现双特异性蛋白的组分 (例如两个重链及一个轻链) 的诸如启动子序列、5'/3'UTR、内含子序列及其类似序列的全部组件。编码本发明的蛋白质的核酸可以染色体外 (稳定地) 经转染复本形式存在且/或稳定地整合至宿主细胞染色体中。后者为优选的。

[0278] 本发明的免疫球蛋白多肽系在宿主细胞中表现且通过熟习此项技术者熟知的方法自细胞或优选地细胞培养基收获。在收获之后,可通过使用此项技术中已知的熟知方法来纯化包括第一含CH免疫球蛋白肽及第二含CH免疫球蛋白肽的免疫球蛋白蛋白质 (或其类似物)。此类方法可包括沉淀、离心、过滤、粒径筛析层析法、亲和力层析法。对于包括IgG多肽的抗体的混合物,可适当地使用蛋白质A或蛋白质G亲和力层析法 (参见例如美国专利4,801,687及5,151,504)。在使用亲和力层析法进行捕获之后,可使用利用适当程序参数的正交抛光 (orthogonal polishing) 步骤以移除诸如HCP及DNA的任何剩余过程相关杂质。一般而言,为获得经纯化双特异性抗体或多价多聚体,进行包括宿主细胞培养、收获物澄清、接着为蛋白质捕获、阴离子交换层析的数个步骤以移除宿主细胞DNA,且进行CIEX以移除宿主

细胞蛋白质 (HCP)、淋溶蛋白质A及潜在性聚集物,接着进行诸如病毒过滤的附加步骤。熟习此项技术者了解此类步骤可经修改或单独步骤经取代的次序。例如,抛光步骤的替代方案包括疏水相互作用层析及混合模式层析。

[0279] 除如上文所描述的加工以外,加工双特异性蛋白或其类似物的此类方法也可进一步包括基于所产生的双特异性蛋白与所产生的单特异性蛋白之间的等电点差异分离所产生的双特异性蛋白与所产生的单特异性蛋白(或分离多特异性蛋白与其他所产生的蛋白质)的分离步骤。可采用任何合适的分离步骤。所选合适的分离步骤可为等电聚焦。可替代地或另外,包括分离所产生的双特异性蛋白与所产生的亲本蛋白的分离步骤的该方法包括离子交换或疏水相互作用。如实施例部分中所示,在CH区内的未经表面暴露的氨基酸,优选地内埋式氨基酸的变体允许关于电荷的分异,且可提供等电点和/或双特异性蛋白与亲本蛋白之间的层析特性的分异。该分异允许使用包括离子交换及疏水相互作用的熟知层析法分离这些蛋白质。优选方法为用于加工诸如抗体的医药生物产物的工业适用分离方法。本发明的范围内包括利用通过使用分离结构域及变体产生的电荷和/或等电点 (pI) 差异的替代性分离方法,包括例如为一般熟习此项技术者已知的技术的毛细管区及毛细管等速电泳以及毛细管等电聚焦。

[0280] 如上所述,尽管就其自身而言如本文所描述的诸如CH区的分离结构域的变体可允许在如本文所描述的方法中充分地分离亲本蛋白与双特异性蛋白,但在于细胞中产生期间双特异性蛋白的形成可例如通过改变如包括于含CH免疫球蛋白多肽中的CH3区来促进。因此,提供本发明的另一方法,其中第一含CH免疫球蛋白多肽和第二含CH免疫球蛋白多肽包括CH3区,且其中此类CH3区包括增强第一含CH免疫球蛋白多肽与第二含CH免疫球蛋白多肽之间的配对的CH3变体。优选地,第一含CH免疫球蛋白多肽和第二含CH免疫球蛋白多肽中的一者包括CH3变体L351D及L368E,且另一者包括CH3变体T366K及L351K。DEKK残基系处于彼此相互作用于促进DE链及KK链的异源二聚化的两个结构域之间的界面处,而两个经KK修饰的CH3结构域具有排斥性。应理解,如上文所描述,DEKK变体优选经选择为对准(即向包括于同一多肽中的CH3区及CH区二者中添加正电荷或负电荷)。异源二聚化技术的其他形式为此项技术中已知的且可利用本文所描述的变化,例如使用杵-臼技术或静电工程改造方法来采用。

[0281] 在如上文所描述的用于产生双特异性蛋白的本发明的方法中,CH区的变体优选为如本文通篇定义为适用于双特异性蛋白的变体,且更优选地该双特异性蛋白优选地可经选择以包括如本文通篇同样描述的另外特点。

[0282] 优选地,在本发明的方法中产生的此类蛋白质为双特异性抗体,更优选地人类双特异性抗体,最佳地人类IgG1双特异性抗体。如在本发明的方法中所产生的此类双特异性蛋白,其中免疫球蛋白多肽的CH区经选择为来自人类IgG1的CH区,且在CH区内的氨基酸包括在选自T120、K147、D148、N159、Q175、N201、K213、V303、K370、E382、E388组成的群的位置处的相对于人类野生型CH区的电荷差异,此系因为如实施例部分中所例示的这些氨基酸位置允许在这些位置处包括不同电荷(在中性氨基酸、带正电氨基酸及带负电氨基酸之间变化)的替代残基。最佳为代表内埋式氨基酸的氨基酸N159及N201。最佳为代表内埋式氨基酸的氨基酸V303、E382、E388。最佳地,该第一含CH免疫球蛋白多肽和该第二含CH免疫球蛋白多肽代表提供不同抗原结合结构域的不同重链,即主要关于重链可变区不同。

[0283] 在另一实施方案中,如根据本发明产生的双特异性蛋白或多特异性蛋白包括第一含CH免疫球蛋白多肽和第二含CH免疫球蛋白多肽,该CH区为人类IgG1 CH区,其中第一含CH免疫球蛋白多肽或第二含CH免疫球蛋白多肽包括选自在CH区内的氨基酸的氨基酸的一个或多个变体,此类变体包括选自由K147E、N159D、Q175E、N201D、K213Q、V303E、K370S、K370T组成的群的一个或多个变体或选自由T120K、D148K、N159K、Q175K、N201K、V303K、E382Q、E382T、E388L、E388M、E388T组成的群的一个或多个变体。优选地,该经分离免疫球蛋白蛋白质为双特异性抗体或多特异性抗体。

[0284] 在另一实施方案中,在本发明的方法中产生包括第一含CH免疫球蛋白多肽和第二含CH免疫球蛋白多肽的双特异性蛋白或多特异性蛋白,该CH区为人类IgG1 CH区,其中第一含CH免疫球蛋白多肽包括选自在CH区内的氨基酸的氨基酸的一个或多个变体,此类变体包括选自由K147E、N159D、Q175E、N201D、K213Q、V303E、K370S、K370T组成的群的一个或多个变体,且其中第二含CH免疫球蛋白多肽包括选自在CH区内的氨基酸的氨基酸的一个或多个变体,此类变体包括选自由T120K、D148K、N159K、Q175K、N201K、V303K、E382Q、E382T、E388L、E388M、E388T组成的群的一个或多个变体。最佳地,该所产生的免疫球蛋白蛋白质为双特异性抗体或多特异性抗体。

[0285] 在另一实施方案中,在本发明的方法中产生包括第一含CH1免疫球蛋白多肽和第二含CH1免疫球蛋白多肽的双特异性蛋白或多特异性蛋白,该CH1区为人类IgG1 CH1区,其中第一含CH1免疫球蛋白多肽或第二含CH1免疫球蛋白多肽包括选自在CH1区内的氨基酸的氨基酸的一个或多个变体,此类变体选自由以下组成的群:K147E及Q175E;N201D及K213Q;T197D及K213Q;N159D及K213Q;以及K213Q,或此类变体选自由以下组成的群:T120K;N201K;D148K及Q175K;以及N159K及在铰链残基E216K处的氨基酸的变体。最佳地,该所产生的双特异性蛋白或多特异性蛋白为双特异性人类抗体或多特异性人类抗体。

[0286] 在又另一实施方案中,在本发明的方法中产生包括第一含CH1免疫球蛋白多肽和第二含CH1免疫球蛋白多肽的双特异性蛋白或多特异性蛋白,该CH1区为人类IgG1 CH1区,其中第一含CH1免疫球蛋白多肽包括选自在CH1区内的氨基酸的氨基酸的一个或多个变体,此类变体选自由以下组成的群:K147E及Q175E;N201D及K213Q;T197D及K213Q;N159D及K213Q;以及K213Q,且其中第二含CH1免疫球蛋白多肽包括选自在CH1区内的氨基酸的氨基酸的一个或多个变体,此类变体选自由以下组成的群:T120K;N201K;D148K及Q175K;以及N159K、在铰链残基E216K处的氨基酸的变体。最佳地,该所产生的蛋白质为双特异性人类抗体或多特异性人类抗体。

[0287] 据称进一步称作包括中性氨基酸变带负电氨基酸、带正电氨基酸变中性氨基酸和/或带正电氨基酸变带负电氨基酸的变体的CH区的CH1区、CH2区或CH3区为具有相对于原始CH区而言,优选地相较于人类野生型CH区而言的负电荷差异的CH区。变体向CH区提供在相关pH下的负电荷差异。据称具有中性氨基酸变带正电氨基酸、带负电氨基酸变中性氨基酸和/或带负电氨基酸变带正电氨基酸的变体的CH区为具有相对于原始CH区而言,优选地相较于人类野生型CH区而言的正电荷差异的CH区。如果CH区具有如本文所描述的氨基酸残基的两个变体,则优选地,两个变体均以同样的方式向CH区提供相同电荷差异。如果CH区具有如本文所描述的氨基酸残基的三个或更多个变体,则优选地,变体的净结果向CH区提供电荷差异。免疫球蛋白区优选为人类免疫球蛋白区。在一些实施方案中,免疫球蛋白区为

IgG区,优选地IgG1区。上文所揭露的免疫球蛋白区可有利地用作需要与抗体的混合物分离的抗体的一部分。

[0288] 本发明进一步提供包括有包括如本文所描述的免疫球蛋白CH区的重链及轻链的抗体。例如,当此类抗体作为混合物的一部分而产生时,向CH区提供的电荷变化可促进该抗体与该混合物的分离。在一个优选实施方案中,抗体包括不同重链。在一个优选实施方案中,抗体为诸如双特异性抗体或三特异性抗体的多特异性抗体。在此情况下,向CH区提供的电荷变化可促进该双特异性抗体或三特异性抗体与该混合物的分离。不同重链优选包括可相容异源二聚化区,优选地可相容异源二聚化CH3区。在一个实施方案中,重链中的一者包括CH3变体L351D及L368E,且此类重链中的另一者包括CH3变体T366K及L351K。抗体优选为IgG抗体,优选地IgG1抗体。在一些实施方案中,抗体包括两个或更多个如本文所描述的免疫球蛋白CH区。优选地,包括CH3变体L351D及L368E的重链包括如本文所描述的一个CH区,且包括CH3变体T366K及L351K的重链包括如本文所描述的另一CH区。在此类情况下,优选地,一个CH区及另一CH区包括具有不同电荷的CH区。在此类情况下,混合物中所得抗体的等电点差异应被进一步间隔,由此促进该抗体与该混合物的分离。换句话讲,如果一个CH区为具有相对于原始CH区而言的负电荷差异的CH区,则另一CH区优选为具有相对于原始CH区而言的正电荷差异的CH区。类似地,如果一个CH区为具有相对于原始CH区而言的正电荷差异的CH区,则另一CH区优选为具有相对于原始CH区而言的负电荷差异的CH区。CH3变体L351D及L368E以及CH3变体T366K及L351K优选匹配CH变体的电荷差异。变体L351D及L368E优选处于包括具有相对于原始CH区或原始或天然CH区中的比较残基而言的负电荷差异的CH区的重链中。变体T366K及L351K优选处于包括具有相对于原始CH区或原始或天然CH区中的比较残基而言的正电荷差异的CH区的重链中。例如,包括CH3变体L351D及L368E的多肽可与以下变体中的一者或多者组合:K147E、N159D、Q175E、N201D、K213Q、V303E、K370S、K370T或增加如本文所阐述的多肽的负电荷的其他变体。类似地,包括CH3变体T366K及L351K的多肽可与以下变体中的一者或多者组合:T120K、D148K、N159K、Q175K、N201K、V303K、E382Q、E382T、E388L、E388M、E388T或增加如本文所阐述的多肽的正电荷的其他变体。

[0289] 具有可相容异源二聚化区(诸如具有此类CH1区的如本文所描述的可相容CH3异源二聚化区)的抗体通常在利用抗体或其片段的电荷和/或等电点(pI)的分离步骤中更好地与具有相同重链的相应抗体和/或半抗体(如果存在)分离。抗体优选包括一个或多个轻链。其优选包括同一轻链。轻链优选为如本文所描述的共同抗体轻链。共同轻链优选包括如图13B或图13D中所描绘的轻链可变区。在一个实施方案中,轻链具有如图13C中所描绘的轻链恒定区。在一个优选实施方案中,轻链具有图13A或图13E中所描绘的轻链的氨基酸序列。共同轻链优选为具有如图13F中所描绘的CDR的轻链。抗体或CH区优选为人类抗体或人类免疫球蛋白CH区,其中人类CH区包括在野生型人类CH区内未经表面暴露且优选地内埋式的一个或多个氨基酸位置处的变体。

[0290] 包括如本文所描述的未经表面暴露且优选地内埋式的氨基酸的变体的免疫球蛋白区,优选地CH1区或抗体优选具有选自不存在于CH1/CL界面处的氨基酸的变体。Q175位置系处于CH1/CL界面中,但仍例外地有效且稳定。

[0291] 包括如本文所描述的未经表面暴露且优选地内埋式的氨基酸的变体的免疫球蛋白区,优选地CH3区或抗体优选具有选自不存在于CH3界面处的氨基酸的变体。K370位置除

外。其处于CH3/CH3中(参见图22)。尽管如此,其为用于引入如本文所指示的变体的良好位置,即使在补偿变体不为诸如DEKK中所存在的相对CH3链的情况下还如此。

[0292] 包括如本文所描述的未经表面暴露的氨基酸的变体的免疫球蛋白区,优选地CH1区、CH2区或CH3区或抗体优选并不会实质上不利地影响包括任何重链及轻链界面的所得CH1区或抗体的稳定性。包括如本文所描述的未经表面暴露的氨基酸的变体的免疫球蛋白区(优选地CH1区、CH2区或CH3区)或抗体可包括支持产生电荷差异的一个或多个变体的稳定性的一个或多个附加变体。包括如本文所描述的未经表面暴露的氨基酸的变体的免疫球蛋白区,优选地CH1区或抗体可包括产生电荷差异的一个或多个附加变体。

[0293] 本发明进一步提供产生以上段落中任一段的抗体的方法,其中该方法包括以下步骤:

[0294] 提供编码具有如本文所描述的CH区的第一重链的核酸;

[0295] 提供编码第二重链的核酸,其中该第一重链及该第二重链可为相同或不同的;

[0296] 提供编码轻链的核酸;

[0297] 将该核酸引入宿主细胞中且培养此类宿主细胞以表现该或此类核酸;以及

[0298] 自宿主细胞培养物收集该抗体,该方法进一步包括在基于其他抗体和/或抗体片段的电荷的分离步骤中将该抗体与此类其他抗体或抗体片段分离。在一个实施方案中,该第一重链及该第二重链包括可相容异源二聚化区,优选地可相容CH3异源二聚化区。

[0299] 本发明进一步提供产生以上段落中任一段的抗体的方法,其中该方法包括以下步骤:

[0300] 提供编码具有如本文所描述的CH区的第一重链的核酸;

[0301] 提供编码第二重链的核酸,其中该第一重链及该第二重链可为相同或不同的;

[0302] 提供编码轻链的核酸;

[0303] 将该核酸引入宿主细胞中且培养此类宿主细胞以表现该或此类核酸;以及

[0304] 自宿主细胞培养物收集该抗体,该方法进一步包括执行收获物澄清,

[0305] 执行蛋白质捕获,

[0306] 执行阴离子交换层析,以及

[0307] 执行阳离子交换层析以将该抗体与其他抗体或抗体片段分离。在一个实施方案中,该第一重链及该第二重链包括可相容异源二聚化区,优选地可相容CH3异源二聚化区。

[0308] 本发明进一步提供产生以上段落中任一段的抗体的方法,其中该方法包括以下步骤:

[0309] 提供编码具有如本文所描述的CH区的第一重链的核酸;

[0310] 提供编码第二重链的核酸,其中该第一重链及该第二重链可为相同或不同的;

[0311] 提供编码轻链的核酸;

[0312] 将该核酸引入宿主细胞中且培养此类宿主细胞以表现该或此类核酸;以及

[0313] 自宿主细胞培养物收集该抗体,该方法进一步包括在包括于凝胶上的等电聚焦的分离步骤中将该抗体与其他抗体或抗体片段分离。

[0314] 进一步提供用于产生多特异性抗体的方法,该多特异性抗体包括等电点不同的第一重链及第二重链,其中该方法包括以下步骤:

[0315] (a) 表现编码第一重链的核酸及编码第二重链的核酸,以使得经编码第一重链的

等电点与经编码第二重链的等电点不同,其中该核酸编码在选自包括第一重链和/或第二重链的经编码免疫球蛋白区的未经表面暴露的位置的一个或多个氨基酸位置处的一个或多个变体(优选地CH1区、CH2区、CH3区,更优选地T120、K147、D148、Y149、V154、N159、A172、Q175、S190、N201、K213、V303、K370、E382以及E388(在CH区中EU编号),以及

[0316] (b) 培养宿主细胞以表现该核酸;以及

[0317] (c) 使用等电点差异自宿主细胞培养物收集该多特异性抗体。

[0318] 还提供用于分离多特异性抗体的方法,该多特异性抗体包括等电点不同的第一重链及第二重链,其中该方法包括以下步骤:

[0319] (a) 表现编码第一重链的氨基酸残基的核酸及编码第二重链的氨基酸残基的核酸中的二者或任一者,以使得经编码第一重链的等电点与经编码第二重链的等电点不同,其中该核酸的一个或多个位置为不同于一个或多个未经表面暴露的残基处的经编码CH区的一个或多个位置,优选地一个或多个氨基酸变体选自T120、K147、D148、Y149、V154、N159、A172、Q175、S190、N201、K213、V303、K370、E382以及E388(在CH区中EU编号),以及

[0320] (b) 培养宿主细胞以表现该核酸;以及

[0321] (c) 通过层析法将该多特异性抗体与宿主细胞培养物分离。

[0322] 在一个优选实施方案中,核酸编码第一重链及第二重链,以使得第一重链、第一重链的同源多聚体、第二重链、第二重链的同源多聚体以及第一重链及第二重链的异源多聚体在经表现且于离子交换层析步骤中经分离时的滞留时间不同。

[0323] 在由该核酸编码的一个或多个位置处的一个或多个变异氨基酸优选选自在人类野生型CH区中未经表面暴露的氨基酸且选自

[0324] -中性氨基酸变带负电氨基酸;

[0325] -带正电氨基酸变中性氨基酸;

[0326] -带正电氨基酸变带负电氨基酸;

[0327] -中性氨基酸变带正电氨基酸;

[0328] -带负电氨基酸变中性氨基酸;以及

[0329] -带负电氨基酸变带正电氨基酸。

[0330] 还提供用于产生多特异性抗体的方法,该多特异性抗体包括等电点不同的第一重链及第二重链,其中该方法包括以下步骤:

[0331] 提供编码第一重链的CH区的核酸及编码第二重链的CH区的核酸,以使得第一经编码重链的等电点与第二经编码重链的等电点不同,其中此类CH区中的至少一者包括在选自T120、K147、D148、Y149、V154、N159、A172、Q175、S190、N201、K213、V303、K370、E382以及E388(EU编号)的位置处CH区中的氨基酸变体,以及

[0332] 培养宿主细胞以表现该核酸;以及

[0333] 使用等电点差异自宿主细胞培养物收集该多特异性抗体,此举进一步包括以下步骤:

[0334] 自该宿主细胞培养物收集该抗体,

[0335] 执行收获物澄清,

[0336] 执行蛋白质捕获,

[0337] 执行阴离子交换层析,以及

[0338] 执行阳离子交换层析以将该抗体与另一抗体或抗体片段分离。

[0339] 进一步提供用于纯化多特异性抗体的方法,该多特异性抗体包括等电点不同的第一重链及第二重链,其中该方法包括以下步骤:

[0340] 提供编码第一重链的CH区的核酸及编码第二重链的CH区的核酸中的二者或任一者,以使得第一经编码重链与第二经编码重链的等电点不同,其中此类CH区中的至少一者包括在选自T120、K147、D148、Y149、V154、N159、A172、Q175、S190、N201、K213、V303、K370、E382以及E388 3 (CH区的EU编号)的位置处的氨基酸变体,以及

[0341] 培养宿主细胞以表现该核酸;以及

[0342] 通过进行等电聚焦自宿主细胞培养物纯化该多特异性抗体且将该多特异性抗体与另外抗体或抗体片段分离。

[0343] 编码第一重链的同源多聚体的一个或多个核酸、编码第二重链的同源多聚体的一个或多个核酸以及编码第一重链及第二重链的异源多聚体的一个或多个核酸表达为具有不同等电点的蛋白质且在离子交换层析中产生不同滞留时间。

[0344] 本发明进一步提供用于产生或纯化诸如如所描述的多特异性抗体的抗体的方法,其中该方法进一步包括测定重链相对于彼此的电荷或pI差异且选择如该第一重链一样具有更加负的电荷/pI的重链及如该第二重链一样具有更加正的电荷/pI的重链。此实施方案另外在诸如CIEX的电荷分离方法中促进多特异性抗体与同源二聚体及半抗体的分离。如本文在上文所指示,该第一重链优选包括一个或多个如本文所描述的向重链提供附加负电荷的CH1区、CH2区或CH3区。类似地,如本文在上文所指示,该第二重链优选包括一个或多个如本文所描述的向重链提供附加正电荷的CH1区、CH2区或CH3区。另外且如本文在上文还提及,第一重链优选包括CH3异源二聚化结构域的DE变体,而该第二重链优选包括CH3异源二聚化结构域的KK变体。

[0345] 在这些实施方案中,重链、本文所描述的CH1区、CH2区和/或CH3区的氨基酸变体之间的天然电荷差异及任择的由如本文所描述的DEKK CH3异源二聚化结构域引入的电荷差异全部一起起作用于改善诸如本文所描述的双特异性抗体及多特异性抗体的抗体的电荷分离。

[0346] 可能引起两个重链的相对电荷差异的因素为可变结构域的氨基酸序列差异。例如,当同一轻链用于两个重链可变区时,该因素为重链可变区的氨基酸序列差异。在此类情况下,视具体情况而定测定可变结构域或重链可变区相对于彼此的电荷或pI差异常常足矣。

[0347] 可使用可变结构域的电荷或pI差异以改善如上文所指示的产生和/或纯化。在一些实施方案中,可变结构域具有不同重链及相同轻链。因此可使用的轻链的实施例描述于本文其他地方且一些轻链例如列举于图13中。在此类方法中可使用的重链可变区通常经选择以与所选轻链良好配对。经选择以与图13A的轻链良好配对的重链可变区描述于实施例中。此类重链可变区的其他实施例描述于W02015/130172、PCT/NL2020/050081、W02019/031965、W02019/009726、W02019/009728以及W02019/009727中,此类案出于此目的以引用的方式附于本文中。如本文所提及且上文参考文献中所描述的重链可变区将视为重链的合适实施例且不视为限制性清单。本发明可应用于各种可变结构域和/或重链轻链组合。此类可变结构域和/或重链轻链组合的一些实施例描绘于图1和图2以及其描述中。重链及轻链

组合的其他实施例例如描述于W02019190327中,该案出于彼目的以引用的方式在本文中提及。

附图说明

[0348] 图1:根据本发明的分离结构域提供双特异性抗体及单特异性抗体的示意性图示。应注意,本发明的其他特点及方面自详细描述结合例如例示本发明实施方案的特点的随附说明书附图显而易见。所提供的说明书附图中的各自为示例性的且不意欲使这些说明书附图限制本发明的范围,该本发明的范围由描述且能够实现本发明的权利要求书及全范围详细揭露内容限定。在图1A)-C)中,第一含CH1免疫球蛋白以黑色描绘,代表第一重链,且第二含CH1免疫球蛋白以灰色描绘,代表第二重链,且在轻链为共同轻链的情境下,轻链以白色描绘。在这些说明书附图中,第一重链包括分离CH1区(图1A),第二重链包括分离CH1区(图1B),且第一重链及第二重链二者均包括具有替代电荷的分离CH1区(图1C)。此外,应理解,本发明不需要使用作本发明实施方案的实施例而描绘的共同轻链。在图1D中,第一含CH2免疫球蛋白以黑色描绘,代表第一重链,且第二含CH2免疫球蛋白以灰色描绘,代表第二重链,且轻链以白色描绘,其中第二重链包括分离CH2结构域。在图1E中,单个重链被使用且以黑色描绘,且两个不同轻链以灰色及白色描绘。变化系由指示相较于未经修饰结构域或参考结构域而言的相对电荷变化的+或-以及用于未经修饰抗体或参考抗体的相应+及-符号的集成指示。在图1A-C中CH1区包括本文所描述的本发明的分离残基,在图1D中轻链的CH2区且在图1E中轻链的CL区为本发明所阐述的变异轻链。A)在此情境下,第一重链具备一个正电荷(在CH1区中由+指示),此引起两个单特异性抗体具有++电荷或中性电荷,其中双特异性抗体具有+电荷。如所指示的电荷表示相较于缺乏分离结构域的抗体而言的电荷变化。B)在此情境下,第二重链具备两个负电荷(在CH1区中由--指示),此引起两个单特异性抗体具有----电荷或中性电荷,其中双特异性抗体具有--电荷。C)在此情境下,第一重链具备一个正电荷(在CH1区中由+指示),第二重链具备一个负电荷(在CH1区中由-指示),此引起两个单特异性抗体具有--电荷或++电荷,其中双特异性抗体具有中性电荷。D)在此情境下,第一重链缺乏分离结构域,且第二重链包括具有-2电荷变化的负分离CH2结构域。此引起两个单特异性抗体具有中性电荷或----电荷,而双特异性抗体具有--电荷。E)在此情境下,采用两个CL结构域,一个CL结构域包括正CL分离结构域且一个不包括分离结构域,缺乏变体。此处所描绘的格式利用共同重链格式。此引起单特异性抗体具有++电荷或中性电荷,而双特异性抗体具有+电荷。

[0349] 图2:根据本发明提供单特异性抗体、三特异性或三价抗体以及四特异性或四价抗体的示意性图示。在A及B中,第一含CH1免疫球蛋白以黑色描绘,代表第一重链,经由连接符另外具有第二CH1-VH结构域(黑色条纹状)。第二重链以灰色描绘。共同轻链以白色描绘。此外,应理解,本发明不需要使用作本发明实施方案的实施例而描绘的共同轻链。变化由指示相较于未经修饰链或未经修饰抗体而言的相对电荷变化的+或-指示。在图2A中,轻链的CL区为分离结构域,且在2B中,第一重链的CH1区为分离结构域。在图2A中,在此情境下,形成具有----电荷的四特异性或四价抗体并具有--电荷的单特异性抗体,而形成具有---电荷的三特异性抗体。在图2B中,形成具有-----电荷的四特异性或四价抗体并具有中性电荷的单特异性抗体,而形成具有----电荷的三特异性或三价抗体。

[0350] 图3:提供阐述与该具有野生型CH1的抗体及包括变体CH1区的抗体相关联的两个峰的单特异性抗体的熔化曲线。

[0351] 图4:提供所产生的具有CH1变体的二价单特异性抗体的等电聚焦,展现基于电荷的带分离。这些数据展示在等电聚焦期间分离结构域增加或减少电荷及对应容量与带状分离包括这些结构域的抗体之间的相关性。

[0352] 图5:DE臂、KK臂及DE与KK臂的CIEX层析。上图展示使用具有野生型CH1序列及重链可变区的DE臂产生的单特异性二价抗体(MF1516)的层析图。下图展示使用具有野生型CH1序列及不同重链可变区的KK臂产生的单特异性二价抗体(MF3462)的层析图。中间图展示使用上文所提及的具有野生型CH1序列的KK臂及上文所提及的具有野生型CH1序列的DE臂产生的双特异性抗体的层析图。在上图中,箭头指示所产生的二价单特异性抗体(DE/DE),且在下图中,箭头指示所产生的单价单特异性“半抗体”(KK)。各抗体的轻链相同。

[0353] 图6:具有分离CH1区的DE臂、KK臂及DE与KK臂的CIEX层析。上图展示使用具有有T197D变体及K213Q变体的CH1序列及重链可变区的DE臂产生的单特异性二价抗体(MF1516)的层析图。下图展示使用具有有N159K变体及铰链残基E216K变体的CH1序列及重链可变区的KK臂产生的单特异性二价抗体(MF3462)的层析图。中间图展示使用组合KK臂及DE臂产生的双特异性抗体(MF1516/MF3462)的层析图及二价DE、T197D、K213Q/KK、N159K、E216K与所形成的其他蛋白质的峰分离。各抗体的轻链相同。

[0354] 图7:双特异性抗体分离-CIEX滞留时间

[0355] 具有野生型CH1的DE臂并具有分离CH1区的KK臂的CIEX层析。上图展示使用具有野生型CH1序列的DE与KK臂产生的抗体的层析图。第二图展示使用具有有T120K的CH1序列的KK臂并具有野生型CH1区的DE臂产生的抗体的层析图。第三图展示使用具有有N201K的CH1序列的KK臂并具有野生型CH1区的DE臂产生的抗体的层析图。底部图展示使用具有有N159K及铰链残基E216K的CH1序列的KK臂并具有野生型CH1区的DE臂产生的抗体的层析图。白色箭头指示所产生的二价单特异性抗体(DE/DE)。黑色箭头指示所产生的二价双特异性抗体(DE/KK)。灰色箭头指示所产生的二价单特异性抗体(KK/KK)。各抗体的轻链相同。

[0356] 图8:双特异性抗体分离-CIEX滞留时间

[0357] 具有分离CH1区的DE臂并具有野生型CH1的KK臂的CIEX层析。上图展示使用具有野生型CH1序列的DE与KK臂产生的抗体的层析图。中间图展示使用具有有T197D及K213Q的CH1序列的DE臂并具有野生型CH1区的KK臂产生的抗体的层析图。底部图展示使用具有有K213Q的CH1序列的DE臂并具有野生型CH1区的KK臂产生的抗体的层析图。白色箭头指示所产生的二价单特异性抗体(DE/DE)。黑色箭头指示所产生的二价双特异性抗体(DE/KK)。灰色箭头指示所产生的二价单特异性抗体(KK/KK)。各抗体的轻链相同。

[0358] 图9:双特异性抗体分离-CIEX滞留时间

[0359] 具有野生型或分离CH1区的DE臂及KK臂的CIEX层析。上图展示使用具有野生型CH1序列的DE与KK臂产生的抗体的层析图。第二图展示使用具有有T120K的CH1序列的KK臂并具有有T197D及K213Q的CH1序列的DE臂产生的抗体的层析图。第三图展示使用具有有N201K的CH1序列的KK臂并具有有T197D及K213Q的CH1序列的DE臂产生的抗体的层析图。底部图展示使用具有有N159K及铰链残基E216K的CH1序列的KK臂并具有有T197D及K213Q的CH1序列的DE臂产生的抗体的层析图。白色箭头指示所产生的二价单特异性抗体(DE/DE)。黑色箭头指

示所产生的二价双特异性抗体 (DE/KK)。灰色箭头指示所产生的二价单特异性抗体 (KK/KK)。各抗体的轻链相同。

[0360] 图10: 双特异性抗体分离-CIEX滞留时间

[0361] 具有野生型或分离CH1区的DE臂及KK臂的CIEX层析。上图展示使用具有野生型CH1序列的DE与KK臂产生的抗体的层析图。第二图展示使用具有有T120K的CH1序列的KK臂并具有有K213Q的CH1序列的DE臂产生的抗体的层析图。第三图展示使用具有有N201K的CH1序列的KK臂并具有有K213Q的CH1序列的DE臂产生的抗体的层析图。底部图展示使用具有有N159K及铰链残基E216K的CH1序列的KK臂并具有有K213Q的CH1序列的DE臂产生的抗体的层析图。白色箭头指示所产生的二价单特异性抗体 (DE/DE)。黑色箭头指示所产生的二价双特异性抗体 (DE/KK)。灰色箭头指示所产生的二价单特异性抗体 (KK/KK)。各抗体的轻链相同。

[0362] 图11:- 单特异性二价抗体 (MF1122/MF1122) 的CIEX滞留时间。

[0363] 具有CH1区中的变体的单特异性抗体的CIEX层析。分别测试各变体, 且说明书附图展示相较于包括两个人类野生型CH1区的单特异性二价抗体而言展现不同滞留时间的各变体的CIEX滞留时间。

[0364] 图12: 用于克隆的构建体的结构

[0365] 用于制备表现具有分离CH1区的抗体的构建体的用于克隆的构建体。CH2结构域及CH3结构域系自MV1708构建体获得。此构建体含有在CH2的N端处的独特BspEI位点。重链可变结构域 (VH) 系自MF1122构建体获得。将CH1区克隆至通过BstEII及BstEI限制位点侧接的最终构建体中。

[0366] 图13

[0367] A) 共同轻链的氨基酸序列;

[0368] B) 共同轻链可变结构域 (IGKV1-39/jk1) 的DNA及氨基酸序列;

[0369] C) 共同轻链恒定区的DNA及氨基酸序列;

[0370] D) 共同轻链可变结构域IGKV1-39/jk5的氨基酸序列;

[0371] E) V区IGKV1-39A的氨基酸序列;

[0372] F) 共同轻链的CDR1、CDR2及CDR3;

[0373] G) 人类共同轻链IGKV3-15/jk1的氨基酸序列;

[0374] H) 人类共同轻链IGKV3-20/jk1的氨基酸序列;

[0375] I) 人类共同轻链IGLV3-21/j13的氨基酸序列;

[0376] J) V区IGKV3-15的氨基酸序列;

[0377] K) V区IGKV3-20的氨基酸序列;

[0378] L) 人类共同轻链IGKV1-39/jk5及κ恒定区的氨基酸序列;

[0379] M) 人类共同轻链IGKV3-15/jk1及κ恒定区的氨基酸序列;

[0380] N) 人类共同轻链IGKV3-20/jk1及κ恒定区的氨基酸序列;

[0381] O) 人类共同轻链IgVλ3-21/IGJλ3及λ恒定区的氨基酸序列;

[0382] P) V区IGLV3-21的氨基酸序列。

[0383] 图14: 用于生成双特异性分子的IgG重链。A) CH1区。B) 铰链区。C) CH2区。D) 含有变体L351K及T366K (KK) 的CH3结构域。E) 含有变体L351D及L368E (DE) 的CH3结构域。

[0384] 图15: 以暗灰色描绘根据EU编号的84位置201且以尖锐线箭头展现其内埋式位置

及蛋白质核内溶剂可接近性缺乏的人类野生型CH1区的三维模型。

[0385] 图16:ELISA结果。具有指定CH1变体的血纤维蛋白原或PD-L1特异性IgG1抗体与血纤维蛋白原及PD-L1的结合。PG1122为具有两个一致重链及轻链的单特异性二价血纤维蛋白原结合抗体。两个可变结构域具有有MF1122及图13a的轻链的氨基酸序列的重链可变区。编号p113、p118等指示抗体的CH1区具有何种氨基酸变体。此信息提供于表16中。PG PD-L1为具有两个一致PD-L1结合可变结构域的单特异性二价抗体。编号p06-p13指示抗体的CH1区具有何种氨基酸变体。此信息提供于表16中。

[0386] 图17:具有IgG1 CH1区、铰链区、CH2区及CH3区的相应氨基酸的EU编号的IMGT表。出于编号氨基酸残基位置的目的而包括在内。

[0387] 图18:双特异性抗体及图19的指定单特异性抗体的ELISA结果概述。全部所测试双特异性抗体均以剂量依赖型方式结合c-MET及破伤风类毒素 (Tetanus Toxoid)。

[0388] 图19:所测试抗体的特征概述。每一列列举一个抗体。PB指示具有两个不同可变结构域的抗体,PG指示具有两个一致可变结构域的抗体。PB后随编号标识两个可变结构域组合,在指示后随有编号的MG的情况下标识该两个可变结构域组合的重链可变区。下一栏中的MG1516...及MG3462...指示一个可变结构域具有MF1516 VH且另一可变结构域具有MF3462 VH。轻链区为图13A的轻链。NA为不适用。不提及NA的MG1栏指示此抗体具有有DE CH3结构域的重链。不提及NA的MG2栏指示此抗体具有有KK CH3结构域的重链。WT IgG1指示这些抗体具有全部野生型IgG1恒定区、图13A的轻链及MF1516或MF3462重链可变区。DEDE指示这些抗体仅具有有DE CH3结构域的重链。KK指示这些抗体仅具有有KK CH3结构域的重链。

[0389] 图20:双特异性抗体及单特异性抗体的CIEX概况。相应抗体的码在相应组之上方或下方指示。左箭头指示DEDE同源二聚体。右箭头指示KK-半抗体。抗体码在图19及表24中被解码。

[0390] 图21:双特异性抗体及单特异性抗体的CIEX概况。相应抗体的码在相应组之上方或下方指示。左箭头指示DEDE同源二聚体。右箭头指示KK-半抗体。抗体码在图19及表24中被解码。

[0391] 图22:根据Traxlmayer等人(2012).J Mol Biol.10月26日;423(3):397-412。(参见论述及图3),被识别为在CH3/CH3同源二聚体的界面处的CH3残基。

实施例

[0392] 实施例1:识别未经表面的残基以进行分离设计

[0393] 根据具有VL结构域的IgG1 CH1序列的结构信息,通过使用默认参数的程序GETAREA 1.0识别在CH1区内经表面暴露的氨基酸残基位置、未经表面暴露的氨基酸残基位置及内埋式氨基酸残基位置。Negi等人,“Solvent Accessible Surface Areas,Atomic Solvation Energies,and Their Gradients for Macromolecules”,最后一次修正时间为2015年4月17日星期三3:00PM。将具有表1及图13C的序列的CH1-CL结构域的模型提交至Swiss-model网站(Arnold K,Bordoli L,Kopp J,Schwede T.The SWISS-MODEL workspace:a web-based environment for protein structure homology modelling.Bioinformatics.2006年1月15日;22(2):195-201)。通过与PDB结构6C6X.pdb(自经疫苗接种的恒河猕猴分离的中东呼吸道症候群冠状病毒中和抗体JC57-14的1.99Å

晶体结构) 比对来获得高质量同源性模型 (具有在CH1区全长上的大于95%一致性)。许多其他PDB中的CH1区可能提供高质量起始结构 (与此处所用的CH1区具有>95%序列一致性及高质量结构)。用GETAREA 1.0 β 加工此结构, 上传所生成的pdb档案以测定所预测的可接近溶剂的各残基表面积百分比。

[0394] 基于GETAREA 1.0 β 的预设参数, 经大于50%表面暴露的氨基酸称作“向外”或表面, 未向外或未经表面暴露的残基介于50%与大于20%之间, 且小于20%可接近处被GETAREA 1.0 β 提及为“向内”或如本文所提及为内埋式氨基酸 (参见表1)。

[0395] 表1a:

[0396] 探针半径:1.600

残基		总计	无极	骨架	侧链	比率 (%)	向内/向外
ALA	1	96.46	36.86	86.27	10.19	15.7	i
SER	2	100.14	63.90	14.57	85.57	100.0	o
THR	3	71.48	25.80	20.58	50.90	47.9	
LYS	4	88.08	83.61	4.27	83.82	51.0	o
GLY	5	15.60	8.43	15.60	0.00	17.9	i
PRO	6	8.38	0.00	8.38	0.00	0.0	i
SER	7	44.54	23.43	10.17	34.38	44.4	
VAL	8	3.70	0.00	3.70	0.00	0.0	i
PHE	9	101.92	101.92	0.00	101.92	56.6	o
PRO	10	63.90	49.02	14.88	49.02	46.6	
LEU	11	72.30	72.23	6.15	66.15	45.2	
ALA	12	61.03	43.83	17.20	43.83	67.5	o
PRO	13	14.19	2.80	11.39	2.80	2.7	i
SER	14	66.46	53.17	14.10	52.36	67.6	o
SER	15	129.87	74.67	44.68	85.18	100.0	o
LYS	16	199.56	132.92	29.10	170.46	100.0	o
SER	17	26.37	12.21	21.94	4.43	5.7	i
THR	18	98.88	65.82	8.23	90.65	85.4	o
SER	19	118.70	62.69	24.19	94.51	100.0	o
GLY	20	75.24	38.21	75.24	0.00	86.3	o
GLY	21	23.73	22.10	23.73	0.00	27.2	
THR	22	90.44	44.60	16.22	74.22	69.9	o
ALA	23	2.96	2.96	2.96	0.00	0.0	i
ALA	24	55.34	49.03	6.31	49.03	75.5	o
LEU	25	2.47	2.47	2.47	0.00	0.0	i
GLY	26	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	i
CYS	27	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	i
LEU	28	50.30	50.30	0.00	50.30	34.4	
VAL	29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	i
LYS	30	72.65	54.33	0.00	72.65	44.2	
ASP	31	27.99	2.43	0.00	27.99	24.8	
TYR	32	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	i
PHE	33	54.61	54.61	0.00	54.61	30.3	
PRO	34	44.56	44.56	0.00	44.56	42.4	
GLU	35	75.13	35.01	10.96	64.17	45.4	
PRO	36	91.37	90.40	0.98	90.40	85.9	o
VAL	37	12.46	0.00	12.38	0.08	0.1	i
THR	38	81.50	74.42	3.81	77.69	73.2	o
VAL	39	19.62	0.00	19.62	0.00	0.0	i
SER	40	43.68	37.75	4.85	38.83	50.2	o
TRP	41	0.05	0.05	0.00	0.05	0.0	i
ASN	42	26.68	16.57	11.74	14.94	13.1	i
SER	43	101.97	52.17	29.16	72.81	94.1	o
GLY	44	40.36	25.94	40.36	0.00	46.3	
ALA	45	92.86	67.14	40.49	52.36	80.7	o
LEU	46	36.55	34.54	2.63	33.92	23.2	
THR	47	101.76	68.88	15.06	86.70	81.6	o
SER	48	99.15	64.33	14.13	85.02	100.0	o
GLY	49	34.74	27.90	34.74	0.00	39.8	
VAL	50	36.27	17.50	18.77	17.50	14.3	i
HIS	51	117.55	88.13	4.51	113.04	73.1	o
THR	52	57.30	32.86	22.85	34.46	32.4	

[0397]

残基	总计	无板	骨架	侧链	比率 (%) 向内/向外	
PHE	53	106.87	106.72	0.99	105.88	58.8 o
PRO	54	123.36	121.33	14.74	108.62	100.0 o
ALA	55	19.73	0.64	19.10	0.63	1.0 i
VAL	56	110.89	110.89	3.68	107.21	87.7 o
LEU	57	102.18	83.44	18.74	83.44	57.1 o
GLN	58	44.42	33.86	10.63	33.79	23.5
SER	59	142.95	77.35	49.58	93.36	100.0 o
SER	60	76.55	53.42	39.24	37.31	48.2
GLY	61	24.28	24.26	24.28	0.00	27.8
LEU	62	26.19	26.19	0.00	26.19	17.9 i
TYR	63	41.62	10.54	0.00	41.62	21.6
SER	64	12.35	9.95	0.65	11.70	15.1 i
LEU	65	14.66	14.66	8.18	6.48	4.4 i
SER	66	26.24	15.50	0.34	25.90	33.5
SER	67	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0 i
VAL	68	31.44	31.44	0.00	31.44	25.7
VAL	69	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0 i
THR	70	62.47	34.59	9.93	52.55	49.5
VAL	71	5.98	5.98	2.71	3.28	2.7 i
PRO	72	81.01	81.01	0.51	80.50	76.5 o
SER	73	17.25	7.69	9.56	7.69	9.9 i
SER	74	81.09	63.02	20.39	60.70	78.4 o
[0398] SER	75	18.99	18.99	1.80	17.19	22.2
LEU	76	48.87	30.22	18.85	30.02	20.5
GLY	77	82.92	48.29	82.92	0.00	95.1 o
THR	78	126.95	88.03	38.10	88.85	83.7 o
GLN	79	80.67	21.24	4.68	75.99	52.9 o
THR	80	80.15	63.59	5.79	74.37	70.0 o
TYR	81	5.72	1.57	0.39	5.33	2.8 i
ILE	82	53.28	53.28	0.00	53.28	36.2
CYS	83	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0 i
ASN	84	13.67	8.31	1.67	12.00	10.5 i
VAL	85	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0 i
ASN	86	24.22	6.17	0.34	23.87	20.9
HIS	87	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0 i
LYS	88	153.55	97.12	9.44	144.11	87.6 o
PRO	89	56.09	36.24	34.61	21.48	20.4
SER	90	33.23	14.05	24.77	8.46	10.9 i
ASN	91	143.48	40.64	29.16	114.32	100.0 o
THR	92	30.70	17.39	5.76	24.94	23.5
LYS	93	148.72	78.74	25.22	123.51	75.1 o
VAL	94	38.30	38.30	5.13	33.17	27.1
ASP	95	82.49	24.32	21.15	61.34	54.3 o
LYS	96	77.53	28.82	0.58	76.96	46.8
ARG	97	122.18	58.53	1.85	120.33	61.6 o
VAL	98	0.28	0.00	0.28	0.00	0.0 i
GLU	99	131.88	49.33	13.14	118.75	84.1 o

[0399] CH1序列及模型化信息。位置由任意编号指示。残基编号1对应于EU编号118,残基编号2对应于EU编号119等。向内/向外栏指示氨基酸视为内埋式(i)或经表面暴露的(o)。开放空间指示未经表面暴露且还非内埋式的氨基酸的值。

[0400] 下文列举根据EU编号模型化的人类CH1区的氨基酸序列,其中加下划线且斜体氨基酸代表未经表面暴露的氨基酸位置,且加粗氨基酸进一步代表内埋式氨基酸。

[0401] 表1b:

118 **A****S**
120 **T****K****G****P****S****V****F****P****L****A**
[0402] 130 **P****S****S****K****S****T****S****G****G****T**
140 **A****A****L****G****C****L****V****K****D****Y**
150 **F****P****E****P****V****T****V****S****W****N**

[0403] 160 S G A L T S G V H T
 170 F P A V L Q S S G L
 180 Y S L S S V V T V P
 190 S S S L G T Q T Y I
 200 C N V N H K P S N T
 210 K V D K R Y

[0404] (在设计模式中)使用Rosetta软件(3.1版<https://www.rosettacommons.org/software>)以模型化未经表面的残基的变体,结合计算机仿真稳定性分析,评估在这些位置处的变体的影响及对蛋白质稳定性的影响。Rosetta设计运行引起以下预测:在起始模型中具有<20%SASA的残基处的以下变体改善稳定性:A172P、S190A、Y149A、V154I。Rosetta还预测以下变体改善稳定性:G122P、S157T、I199V、N203I、S207T以及V211I。在作出相对于第一轮经识别的未经表面的残基的设计变化之后,进行两个附加Rosetta设计:1)其中如果未经表面的残基增加所预测的正电荷,则仅允许其变化(将残基变成正电荷或移除D或E),及2)其中如果残基增加所预测的负电荷,则仅允许其变化(自中性变成D或E,或自K及R变成不带电)。

[0405] 发现内埋式残基N159(N42)及N201(N84)承受正电荷(K)及负电荷(D)残基的变化,同时维持良好稳定性。识别到其他未经表面暴露的残基,其具有支持电荷变化的潜能且不具有显著的所预测CH1稳定性减损且包括根据生物信息分析经预测以改善稳定性的特定变化(其中更加负的数值评分意谓更稳定)。

[0406] 表2-632.956的WT稳定性评分

[0407]	1.	[+1] N84K	[-631.518]
	2.	[-1] N84D	[-633.474]
	3.	[+1] N84K + A55P, S73A	[-637.087]
	4.	[-1] N84D + A55P, S73A	[-634.982]
	5.	[+1] N84K + A55P, S73A + V32A, V37I	[-636.455]
	6.	[-1] N84D + A55P, S73A + V32A, V37I	[-631.827]
	7.	[+1] T3K	[-636.401]
	8.	[-2] T80D, K96Q	[-635.658]
	9.	[+1] T3K + G5P, S40T, I82V, N86I, P89A, S90T, V94I	[-659.697]
	10.	[-2] T80D, K96Q + G5P, S40T, I82V, N86I, P89A, S90T, V94I	[-655.606]
	11.	[+3] D31K, Q58K	[-625.111]
	12.	[+3] N42K, E99K	[-635.678]
	13.	[+3] D31K, Q58K + G5P, S40T, I82V, N86I, P89A, S90T, V94I	[-646.481]
	14.	[+3] N42K, E99K + G5P, S40T, I82V, N86I, P89A, S90T, V94I	[-650.221]
	15.	[-2] K96Q, N42D	[-638.840]
	16.	[-3] K30E, Q58E	[-626.254]
	17.	[-2] K96Q, N42D + G5P, S40T, I82V, N86I, P89A, S90T, V94I	[-654.776]
	18.	[-3] K30E, Q58E + G5P, S40T, I82V, N86I, P89A, S90T, V94I	[-647.184]
	19.	[+7] N84K + D31K, Q58K + N42K, E99K	[-618.189]
	20.	[-3] N84D + K96Q, N42D	[-631.459]
	21.	[-6] N84D + K96Q, N42D + K30E, Q58E	[-632.223]
	22.	[+7] N84K + D31K, Q58K + N42K, E99K + A55P, S73A + V32A, V37I	[-627.807]
	23.	[-3] N84D + K96Q, N42D + A55P, S73A + V32A, V37I	[-639.014]
	24.	[-6] N84D + K96Q, N42D + K30E, Q58E + A55P, S73A + V32A, V37I	[-632.645]

[0408] 实施例1b:构建体设计

[0409] 使CH1中的未经表面的位置及内埋式位置变化以改变并有这些免疫球蛋白区的多聚化蛋白的电荷。产生总计13个示例性变体CH1区且并入单特异性抗体及多特异性抗体中与具有野生型CH1区的单特异性抗体及多特异性抗体进行比较。如下制备用于表现包括这些分离CH1区的这些分子的构建体。

[0410] 编码CH2结构域及CH3结构域的片段系自MV1708构建体获得。选择MV1708,此系因为其含有在CH2的N端处的独特BspEI位点。使用具有于其C端上的BstEII的编码可变重链MF1122的片段。选择MF1122,此系因为其不呈现任何生产、纯化或CIEX问题且具有~13.4min的在8.64的pI (VH) 下的平均CIEX滞留时间。用于克隆的构建体及克隆策略展现于图12中。

[0411] 载体MV1708 (含有CH3中的DE变体) 经修饰以含有WT CH3区。使用SfiI及BstEII-HF限制酶将来自MF1122的VH基因插入该载体中。通过菌落PCR及定序选择恰当菌落。

[0412] 在构建体中,编码CH1区的序列由限制位点BstEII及BspEI侧接。此允许更换CH1编码序列。产生含有野生型或变体CH1区的质体。下文列举对各变体CH1区具有特异性的序列。

[0413] 使用BstEII及BspEI自质体移去CH1编码序列 (363bp) (2 μ g CH1编码构建体中的各自)。同时,使用BstEII及BspEI限制酶自质体移去所制备的载体 (20 μ g载体)。将质体与BspEI (0.25 μ L酶/ μ g DNA) 一起在缓冲液NEBuffer3.1中在37 $^{\circ}$ C下培育至少1h,接着将混合物加热至60 $^{\circ}$ C且添加BstEII。通过凝胶电泳及凝胶提取纯化经消化DNA。消化自骨架 (~10kb) 移除748bp片段且自含CH1结构域及铰链的构建体移除363bp片段。

[0414] 进行载体与CH1编码序列的连接,接着转型成DH5a细胞且涂铺于含有安比西林 (Ampicillin) 的LB琼脂盘上。通过准许识别恰当CH1及恰当CH2-CH3的菌落PCR及定序来识别恰当构建体。通过定序确认最终构建体的一致性。

[0415] 实施例1c:表现且纯化具有CH1变体的抗体

[0416] 使用Versylene (无内毒素且无菌) 水制造全部所用缓冲液。通过与0.1M NaOH一起培育至少16小时来由玻璃制品、Quixstand、Akta-explorer移除内毒素。用无内毒素质体DNA转染Hek293细胞。转染后六天,通过低速离心 (10分钟,1000g)、接着高速离心 (10分钟,4000g) 收获含有重组抗体的条件培养基。将100 μ L样品储存于4 $^{\circ}$ C下。

[0417] 执行MabSelectSureLX (GE healthcare life sciences) 纯化:将抗体分批结合至2ml MabSelectSureLX 4小时。通过离心收获含有经结合抗体的MabSelectSureLX琼脂糖凝胶且转移至重力流管柱中。通过用PBS、含有1M NaCl的PBS及PBS洗涤管柱来移除非特异性结合蛋白。使用100nM柠檬酸盐pH 3.5溶析经结合抗体,且在含有4ml 1M Tris pH 8.0的12ml套管中收集5ml溶离份以中和至pH 7。汇集含有蛋白质的溶离份。使用vivaspin20 10kDa旋转过滤器将MabSelectSureLX池浓缩至2.0-3.0ml。通过离心移除经浓缩池中的聚集物。将经浓缩样品储存于4 $^{\circ}$ C下,之后进行凝胶过滤。

[0418] 凝胶过滤:通过使用superdex 200 16/600管柱进行凝胶过滤来进一步纯化在PBS中经平衡的重组抗体。通过LabChip (PerkinElmer) 分析含有蛋白质的溶离份且汇集含有恰当抗体的溶离份。通过使用0.22 μ m针筒过滤器进行过滤来对池进行灭菌。将产物在4 $^{\circ}$ C下储存于含有1.8ml的等分试样中。通过LabChip毛细管电泳 (PerkinElmer) 及LAL分析 (内毒素分析) 分析产物。

[0419] 在还原及非还原条件下执行LabChip分析。样品的HP-SEC分析仅展示抗体的一个主峰,该主峰指示样品不含有聚集物或半抗体。

[0420] 实施例1d:生成用于产生经CH-1修饰的双特异性抗体的构建体

[0421] 用KK臂更换重链的DE臂

[0422] 产生编码重链的第二载体。由此载体编码的重链包括KK臂以便区分该重链与具有

DE臂的重链。产生2个不同重链允许优先形成双特异性抗体。如下产生编码KK重链的载体。

[0423] 用编码抗体的DE臂的片段更换编码KK臂的片段。使用构建体中的侧接限制位点BspEI及Af1II且使用如上文所描述的克隆技术交换此类臂。

[0424] 随后,将DE重链与重链可变结构域VH区MF1516组合,且将KK重链与重链可变结构域VH区MF3462组合。使用限制酶SfiI及BstEII及如上文所描述的克隆技术执行此克隆步骤。通过定序确认最终构建体的一致性。

[0425] 此克隆程序产生编码具有不同结合特异性的两个重链的载体。当一起经表现时,重链优先形成双特异性抗体。可通过应用如上文所描述的克隆步骤将CH1变体插入2个重链中的各自中。

[0426] 实施例2:展现用于基于CH1分离结构域中的pI分离残基分离一致单特异性抗体的容量。

[0427] 为表现抗体,使用核酸构建体组合。构建体编码共同轻链(图13A)及包括靶向血纤维蛋白原的重链可变区的重链(MF1122)(阐述于下文中)。重链进一步包括具有相较于野生型人类CH1而言的负电荷差异或正电荷差异的CH1分离结构域。构建体表现优先引起单特异性IgG1人类抗体的形成。使用经重排生殖系人类κ轻链IgVκ1-39*01/IGJκ1*01作为共同轻链。

[0428] 表3:轻链序列

cLC 序列	序列
共同轻链可变区 IgVκ1-39*01/IGJκ1 *01 的氨基酸序列	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSSLQPEDFATYY CQQSYSTPPTFGQGTKVEIK
轻链恒定区 (CL) 的氨基酸序列	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
[0429] IgVκ1-39*01/IGJκ1 *01 的 DNA 序列	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATC TGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAG AGCATTAGCAGCTACTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAG GGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTG CAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTG GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGA AGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCC CTCCAACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
轻链恒定区 (CL)	CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATC
[0430] 的 DNA 序列	TGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCC TGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTG GAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAG AGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGC CTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGA AACACAAAGTCTACGCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCT GAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

[0431] 下文列举在这些实验中使用的能够结合血纤维蛋白原的重链可变区(MF1122)的氨基酸序列。CH1区、CH2区及CH3区为人类IgG1(图14)。

[0432] 重链可变结构域的目标为纤维结合蛋白,重链可变结构域的等电点为8.64(pI)且全重链的等电点为8.54(pI)。

[0433] 表4:能够结合血纤维蛋白原的MF1122重链可变区的各种部分的氨基酸序列。进一步描述能够结合PD-L1的重链可变区(VH PD-L1)。可变结构域可并于具有共同轻链的可变结构域中。MF1122重链可变区的pI为8.64。靶向PD-L1的重链可变区的pI为5.73。

[0434]		MF1122 重链可变区氨基酸序列
	FW1	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS
	CDR1	SYGMH
	FW2	WVRQAPGKGLEWVA
	CDR2	VISYDGSNKYYADSVKG
	FW3	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
	CDR3	ALFTTIAMDY
	FW4	WGQGTLVT
	VH	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWV AVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RALFTTIAMDYWGQGTLVTVSS

[0435] 以下所测试CH1变体提供于下,其中残基变体系根据EU编号来加以标识。

[0436] 表5:

[0437]	根据 EU 编号的变体位置	包括两个变体 CH1 区的抗体相对于包括野生型 CH1 的抗体而言的电荷差异
	T197D K213Q	-4
	K213Q N159D	-4
	K147E Q175E	-6
	N201D K213Q	-4
	K213Q	-2
	N201D	-2
	N201D A172P S190A	-2
	wt	0
	Y149A, V154I, A172P S190A	0
	T120K	+2
	N201K	+2
	N201K A172P S190A	+2
	D148K Q175K	+6
	N159K E216K (铰链)	+6

[0438] 产生体积产量介于10-25ml范围内、浓度为约1.7mg/mL的足够且类似量的各抗体。

[0439] 测定各抗体的CIEX滞留时间。

[0440] 使用TSKgel SP-STAT (7 μ m粒度,4.6mm内径 $\times$ 10cm长度,Tosoh 21964)系列的离子交换管柱进行CIEX-HPLC层析。CIEX分析使用装有无孔树脂粒子的基于亲水性聚合物的管柱材料,该管柱材料的表面由具有多层阳离子交换基团(磺酸基团)的开放获取网状物组成,使其成为强阳离子交换剂且因此适用于通过使用NaCl盐梯度来分离单株抗体的电荷异构体。带正电抗体结合至带负电管柱。

[0441] 在 $\sim$ 50巴压力下使用缓冲液A (磷酸钠缓冲液,25mM,pH 6.0)平衡TSKgel SP-STAT (7 μ m粒度,4.6mm内径 $\times$ 10cm长度,Tosoh 21964)至少30min。在此之后,注射对照及样品IgG。全部测试样品及对照(于PBS中)的注射样品质量为10 μ g蛋白质且注射体积为10-100 μ l。通过增加盐浓度且运行缓冲液B梯度(25mM磷酸钠,1mM NaCl,pH 6.0)自管柱排出抗体。流动速率设定为0.5mL/min。针对基于220nm结果观测到的主峰的峰型态、滞留时间及峰面积来对层析图加以分析。

[0442] 在此研究中,滞留时间与相较于野生型而言的总电荷差异相关,即新增正电荷愈多,滞留时间愈长,且新增负电荷愈多,滞留时间愈短。

[0443] 表6:具有CH1变体的单特异性抗体的CIEX滞留时间

变体 (EU)	相对于 wt 的总电荷差异	实验 1 图 11	
		CIEX RT	相对于 WT 的 RT 差异
T197D K213Q	-4	11.7	-1.7
K213Q N159D	-4	12.1	-1.3
K147E Q175E	-6	12.1	-1.3
N201D K213Q	-4	12.2	-1.2
K213Q	-2	12.4	-1
N201D	-2	13.2	-0.2
N201D A172P S190A	-2	13.3	-0.1
WT (无)	0	13.4	0
A172P S190A Y149A V154I	0	13.5	0.1
T120K	2	15.6	2.2
N201K	2	15.7	2.3
N201K A172P S190A	2	15.8	2.4
D148K Q175K	6	17.7	4.3
N159K E216K (铰链)	6	21	7.6

[0445] 全部CH1变体的CIEX滞留时间展现于表6及图11中。这些数据证实以其他方式具有一致pI的抗体—例如包括用于各重链的CH1分离结构域且包括野生型人类CH2结构域及CH3结构域及共同轻链的如上文所描述的 二价单特异性人类IgG抗体—可仅基于使用上文所提供的分离残基被充分分离,以使得通过每个CH1分离结构域并有一个或多个正或负电荷差异残基来生成相对于野生型CH1区而言的0.1至7.6的滞留差异。

[0446] 实施例3:展现合适发展稳定性的并有分离残基的抗体的稳定性分析

[0447] 通过冷冻且解冻于PBS中的二价单特异性抗体来测定此类抗体的稳定性,此指示全部二价单特异性抗体均具有与野生型单株抗体相当的稳定性。

[0448] 在1次冷冻/解冻循环之后用HP-SEC分析样品组成。将样品储存于-80℃下隔夜且第二天在室温下解冻。用HP-SEC分析溶解于PBS中的21μg各抗体。全部抗体溶析为1个主峰,此指示所产生的抗体在一个冷冻-解冻循环之后稳定。因此,样品在储存于-80℃下时维持其组成。

[0449] 此外,通过使用差示扫描量热法(DSC)测定温度熔化曲线来评估并有分离结构域的抗体。为执行DSC,将抗体在PBS中稀释直至0.5mg/mL为止,且在透析缓冲液中透析。随后,经由0.45μm过滤器过滤抗体。在透析之后,将样品稀释至0.25mg/mL的浓度以执行DCS分析且获得各抗体的温度熔化曲线。

[0450] 温度熔化(TM)曲线描绘于图3中。如由温度熔化曲线测定的TM1及TM2列举于下表7中(DSC)。

[0451] 在第二稳定性分析中,如表8中所阐述,使用UNcle(Unchained Labs)测定TM2。结果列于下表中。还提供评级IgG关于TM2的稳定性的排行榜。以0.5℃/min在PBS缓冲液中将样品自25℃加热至95℃,且在7.4pH下进行测试,其中蛋白质样品介于0.2-1mg/ml范围内。随后,由荧光信号计算Tm/Tagg温度,且重复执行三次。

[0452] 使用UNCLE (Unchained Labs) 以通过差示扫描荧光测定法 (DSF) 及静态光散射 (SLS) 执行热稳定性研究。DSF系基于介于250nm与720nm之间的内部氨基酸荧光的检测且用于推断变性后蛋白质去折迭。SLS根据在266nm情况下的雷射的光散射变化检测聚集物含量变化。简言的,分析在50 μ g/mL下的蛋白质且使其经受自25 $^{\circ}$ C至95 $^{\circ}$ C的温度升高(0.3或0.5 $^{\circ}$ C/分钟)。热变性诱导所检测且分析的蛋白质荧光变化(监测到介于250nm与720nm之间)及光散射变化(在266nm情况下的雷射光)。荧光变化展现为随温度变化的BCM(重心平均值:所检测的荧光谱以两个相等面积分配)。使用UNCLE分析软件以计算随温度说明书附图变化的荧光变化差异且识别熔点(TM-发生荧光变化时的温度)及温度诱导的聚集(TAGG-在266nm下的静态光散射信号增加超过基线约10%时的温度)的存在。

[0453] 表7:温度熔化(TM)曲线的DSC分析产生TM1及TM2。温度熔化曲线描绘于图3中。

[0454]	DSC		
	CH1 型式 (EU)	TM1	TM2
	Wt	71.9	84.8
	T197D、K213Q	70.6	84.7
	K213Q、N159D	71.7	82.1
[0455]	K147E、Q175E	70.6	79.0
	N201D、K213Q	70.7	82.0
	K213Q	70.7	84.8
	T120K	71.6	83.6
	N201K	70.6	83.7
	N201K、A172P、S190A	70.6	83.4
	D148K、Q175K	69.2	70.1
	N159K、E216K (铰链)	70.7	81.7

[0456] 表8:使用UNCLE及DSC测量抗体变体的稳定性。Agg是指熔化之前发生的聚集。ND指示无数据(尚未用DSC分析这些样品)。

[0457]	排行榜	CH1变体	UNCLE	DSC
		(EU)	TM2	TM2
	1	wt (无)	85.5	84.8
	2	T197D、K213Q	85.5	84.7
	3	K213Q	85	84.8
	4	T120K	84	83.6
	5	K213Q、N159D	83.9	82.1
	6	N201D、K213Q	83.4	82
	7	N201K	81.8	83.7
	8	N201K、A172P、S190A	81	83.4

9	N201D	80.8	ND
10	N201D、A172P、S190A	80.2	ND
11	N159K、E216K (铰链)	79.4	81.7
12	K147E、Q175E	agg	79
13	D148K、Q175K	agg	70.1
14	A172P S190A Y149A V154I	agg	ND

[0458] 实施例4:等电聚焦

[0459] 当产生时,在还原及非还原条件下在SDS-page凝胶上运行IgG。全部蛋白质尺寸均如所预期且各变体的全部带均处于相同高度。另外,在凝胶上使用等电聚焦运行所产生的IgG,其结果描绘于图4中。凝胶上的带的相对迁移与下文所列举的所计算的pI相关(图4)。

[0460] 表9:SDS-page凝胶上的带的相对迁移与所计算的pI相关

	总电荷	理论值
CH1 变体 (EU)	相对于 wt 的差异	全重链多肽 pI
T197D K213Q	-4	8.36
K213Q N159D	-4	8.36
K147E Q175E	-6	8.19
N201D K213Q	-4	8.36
K213Q	-2	8.49
N201D	-2	8.49
[0461] N201D A172P S190A	-2	8.49
野生型 (无)	0	8.60
A172P S190A Y149A V154I	0	8.60
T120K	2	8.69
N201K	2	8.69
N201K A172P S190A	2	8.69
D148K Q175K	6	8.85
N159K E216K (铰链)	6	8.85

[0462] 实施例5:通过使用CH1分离结构域(包括分离残基)分离双特异性抗体及单特异性抗体。

[0463] 通过一起表现2个不同重链产生双特异性抗体。为形成抗体,将这些重链与如上文所描述的共同轻链配对。

[0464] 用具有DE臂的重链并具有KK臂的重链执行实验。这些构建体的克隆描述于实施例1d中。DE或KK修饰位于重链的CH3结构域中。

[0465] 各重链由CH3结构域、CH2结构域、CH1结构域以及VH结构域组成。CH3结构域允许重链抗体的异源二聚化且含有用于2个不同重链的DE残基或KK残基。CH2结构域为人类CH2结构域。VH决定抗体的特异性,从而DE重链靶向破伤风毒素(TT) (MF1516) 且KK重链靶向cMet (MF3462)。序列提供于下表10及11处。

[0466] 重链的CH1区为产生相对于野生型结构域的电荷差异的如本文所描述的野生型或分离结构域。具有DE臂的重链为用于促进异源二聚化的人类野生型CH3结构域的变体。具有KK臂的重链为用于促进异源二聚化的人类野生型CH3的变体。DE臂连接至具有相较于野生型结构域而言的负电荷差异的分离结构域,且KK臂连接至具有相较于野生型结构域而言的正电荷差异的分离臂。

[0467] 表10:DE重链可变区的各种部分的氨基酸序列。重链靶向破伤风毒素(MF1516)。重链可变区的pI为8.64且全重链的pI为8.54。

[0468]	FW1	EVQLVETGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS
	CDR1	QYAMH
	FW2	WVRQAPGKGLEWVA
	CDR2	IISHDERNKYYVDSGMG
	FW3	RFTISRDN SKNTLFLQMNSLRSEDTAVYYCAR
	CDR3	DMRKGGYYYGFDV
	FW4	WGQGTTVT
	VH	EVQLVETGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSQYAMHWVRQAPGKGLEWVAII SHDERNKYYVDSGMGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRSEDTAVYYCARDMR KGGYYYGFDVWGQGTTVTVSS

[0469] 表11KK重链可变区及轻链可变区的各种部分的氨基酸序列。靶向cMet的重链(MF3462)的pI为8.04且全重链的pI为8.46。

[0470]	FW1	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFS
	CDR1	SYAMS
	FW2	WVRQAPGKGLEWVS
	CDR2	AI SGSGGSTYYADSVKG
	FW3	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
	CDR3	GKSHYSWDAFDY
	FW4	WGQGT LVTVSS
	VH	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFS SYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGS GGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGKSHYSWDA FDYWGQGT LVTVSS

[0471] 靶向经编号标识的破伤风类毒素的抗体的氨基酸序列具有氨基酸序列MF1337

[0472] MF1337:

[0473] EVQLVETGA EVKKPGASVKVSKASDYIFTKYDINWVRQAPGQGLEWMGWMSANTGNTGYAQKFQGRV
TMTTRDTSINTAYMELSSLTSGDTAVYFCARSSLFKTETAPYYHFALDVWGQGT TTVTVSS

[0474] 如下通过将IgG1重链构建体及轻链构建体转染至HEK293细胞中来产生双特异性抗体。在摇动器平线区处在T125烧瓶中培育经悬浮液调适的293细胞直至密度为 3.0×10^6 个细胞/毫升为止。在24深孔盘的各孔中以 $0.3-0.5 \times 10^6$ 个活细胞/毫升的密度接种细胞。根据标准化程序暂时用单独无菌DNA:PEI混合物转染细胞且进一步培育。转染后七天,收获上清液且经由 $0.22\mu\text{m}$ 过滤器将其过滤。将无菌上清液储存于 4°C 下直至通过蛋白质-A亲和层析法纯化抗体为止。随后,通过暂时转染来在HEK293细胞中表现抗体且根据标准程序使用蛋白质-A亲和层析法自培养物上清液将其纯化。

[0475] 用于功能性筛选的IgG纯化

[0476] 使用蛋白质-A亲和层析法小规模($<500\mu\text{g}$)、中等规模($<10\text{mg}$)及大规模($>10\text{mg}$)执行IgG纯化。在24孔过滤盘中在无菌条件下使用过滤执行小规模纯化。首先,将培养基的pH调节至pH 8.0,且随后将含IgG上清液与蛋白质A琼脂糖凝胶CL-4B珠粒(50% v/v)(Pierce)一起在摇动平台上在600rpm下在 25°C 下培育2小时。接下来,通过过滤收获珠粒。用PBS pH 7.4洗涤珠粒二次。随后,在pH 3.0下用0.1M柠檬酸盐缓冲液溶析经结合IgG,且紧接着使用Tris pH 8.0中和溶析液。通过使用多屏幕Ultracel 10多盘(Millipore)进行离心来执行缓冲液交换。最后,在PBS pH 7.4中收获样品。使用Octet (ForteBio)测量IgG浓度。将蛋白质样品储存于 4°C 下。

[0477] 制造以下构建体且用于实验中。在进行实验之前,关于序列验证构建体。产生经编码重链且在还原及非还原条件下使用SDS-page对其进行分析。全部重链均产生具有预期尺寸的双特异性单价抗体及半抗体。

[0478] 表12:具有DE臂或KK臂的重链中的CH1变体。

[0479]

变体 (EU)	DE 或 KK
T197D K213Q	DE
K213Q	DE
T120K	KK
N201K	KK
N159K E216K (铰链)	KK
wt	DE
wt	KK

[0480] 将各种DE重链与各种KK重链组合以便产生双特异性抗体。如实施例2中所描述用CIEX分析产物。对DE/KK抗体组合以及具有DE或KK的单臂产物二者均进行分析。具有DE的单臂产物产生DE/DE同源二聚体,且具有KK的单臂产物产生KK半抗体。未观测到KK/KK同源二聚体产生。

[0481] 下表描述各种抗体物种及单臂产物的滞留时间。双特异性抗体 (DE/KK) 与同源二聚体 (DE/DE) 或KK半抗体之间的相对滞留时间差异指示CIEX谱中的峰之间的距离。较大差异使分离溶离份与双特异性抗体,形成同源二聚体及半抗体更容易。

[0482] 表13:具有CH1分离结构域的双特异性抗体的CIEX滞留时间。滞留时间 (RT), 相对差异 (ΔRT)

[0483]

CH1/DE 臂 (EU)	CH1/KK 臂 (EU)	双特异性 (DEKK)	DEDE 同 源二聚体	KK 半抗体	ΔRT (DEKK- DEDE 同 源二聚体)	ΔRT (DEKK- KK 半抗 体)
wt	wt	15.5	13.9	19.3	1.6	3.8
wt	T120K	15.8	13.8	19.9	2	4.1
wt	N201K	16.2	13.6	20.5	2.6	4.3
wt	N159K E216K (铰 链)	18.7	13.6	23.2	5.1	4.5
T197D K213Q	wt	14.3	12	18.9	2.3	4.6
T197D K213Q	T120K	14.9	12	19.7	2.9	4.8
T197D K213Q	N201K	15.4	12	20.5	3.4	5.1
T197D K213Q	N159K E216K (铰 链)	18	12	23.2	6	5.2
K213Q	wt	14.7	12.7	18.9	2	4.2
K213Q	T120K	15.2	12.7	19.7	2.5	4.5
K213Q	N201K	15.7	12.7	20.5	3	4.8
K213Q	N159K E216K (铰 链)	18.2	12.7	23.2	5.5	5

[0484]

	链)					
wt	-	NA	13.6	NA	NA	NA
T197D K213Q	-	NA	12	NA	NA	NA
K213Q	-	NA	12.7	NA	NA	NA
-	wt	NA	NA	18.9	NA	NA
-	T120K	NA	NA	19.7	NA	NA
-	N201K	NA	NA	20.5	NA	NA
	N159K E216K (铰 链)	NA	NA	23.2		

[0485] 如表13中所描述的各种抗体物种的滞留时间展现于图5-10中。如图5中所示,野生型DE/DE同源二聚体及KK半抗体的CIEX滞留时间为相对接近的。相比的下,用于这些重链的变异CH1分离结构域以及DE及KK CH3异源二聚化结构域的使用更改重链的CIEX滞留时间,从而增加同源二聚体、双特异性异源二聚体及半抗体的滞留时间差异。在图6中,具有变体T197D及K213Q的DE重链的CH1区。具有变体N159K及铰链残基E216K的KK重链的CH1区。因此,如图6中所示,同源二聚体(DEDE)及半抗体(KK)的CIEX滞留时间具有更大滞留时间差异。现进一步将双特异性抗体(DE/KK)与其他物种的滞留时间分离,允许更好地分离不同物种。

[0486] CH1分离结构域中的变体对双特异性抗体的CIEX滞留时间的作用示于图7-10中。

[0487] 表14CH1、CH2及CH3变体分离结构域的序列

[0488] 部分14A

[0489] CH1 WT:

- [0490] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKX₁V
- [0491] 其中X₁=K或R
- [0492] CH2 WT:
- [0493] 231
- [0494] APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK
- [0495] CH2 Fc沉默:
- [0496] 231
- [0497] APELGRGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK
- [0498] CH3 WT:
- [0499] 341
- [0500] GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN
YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSV MHE ALHNHYTQKS
LSLSPG
- [0501] 部分14B
- [0502] CH1 N201K:
- [0503] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICKVNHKPSNTKVDKRV
- [0504] CH1 N201D:
- [0505] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICDVNHKPSNTKVDKRV
- [0506] CH1 A172P S190A N201K:
- [0507] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPPVLQSSGLYSLSSV
VTVPASSLGTQTYICKVNHKPSNTKVDKRV
- [0508] CH1 A172P S190A N201D:
- [0509] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPPVLQSSGLYSLSSV
VTVPASSLGTQTYICDVNHKPSNTKVDKRV
- [0510] CH1 T120K:
- [0511] ASKKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV
- [0512] CH1 T120D:
- [0513] ASDKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV
- [0514] CH1 T197D K213Q:
- [0515] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQDYICNVNHKPSNTKVDQRV
- [0516] CH1 D148K Q175K:

- [0517] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKKYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLKSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV
- [0518] CH1 N159K:
- [0519] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWKSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV
- [0520] CH1 N159D:
- [0521] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWDSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV
- [0522] CH1 N159D K213Q:
- [0523] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWDSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDQRV
- [0524] CH1 K147E Q175E:
- [0525] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLESSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV
- [0526] CH1 Y149A V154I A172P S190A:
- ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDAFPEPITVSWNSGALTSGVHTFPPVLQSSGLYSLSSV
VTVPASSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV
- [0527] CH1 K213Q:
- [0528] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDQRV
- [0529] CH1 N201D K213Q:
- [0530] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDQRV
- [0531] CH1 T120K N201K:
- [0532] ASKKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICKVNHKPSNTKVDKRV
- [0533] CH1 N201K N159K:
- ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWKSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICKVNHKPSNTKVDKRV
- [0534] CH1 T120K N159K:
- ASKKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWKSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV
- [0535] CH1 T120K N201K N159K:
- ASKKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWKSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICKVNHKPSNTKVDKRV
- [0536] CH1 N201D N159D:
- ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWDSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV
- [0537] CH1 N201D K213Q N159D:
- ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWDSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDQRV
- [0538] CH2 V303E:
- [0539] 231

- [0540] APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVESVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK
- [0541] CH2 V303K:
- [0542] 231
- [0543] APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVKSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK
- [0544] CH2 V303E Fc沉默:
- [0545] 231
- [0546] APELGRGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVKSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK
- [0547] CH2 V303K Fc沉默:
- [0548] 231
- [0549] APELGRGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVKSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK
- [0550] CH3 K370S:
- [0551] 341
- [0552] GQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVSGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKS LSLSPG
- [0553] CH3 K370T:
- [0554] 341
- [0555] GQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVTGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKS LSLSPG
- [0556] CH3 E382Q:
- [0557] 341
- [0558] GQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WQSNQGPENNYKTTTPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKS LSLSPG
- [0559] CH3 E382T:
- [0560] 341
- [0561] GQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WTSNGQPENNYKTTTPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKS LSLSPG
- [0562] CH3 E388L:
- [0563] 341
- [0564] GQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPLNNYKTTTPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKS LSLSPG
- [0565] CH3 E388M:
- [0566] 341
- [0567] GQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPMNNYKTTTPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKS LSLSPG

- [0568] CH3 E388T:
[0569] 341
GQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPTNNYKTTTPVLDS
[0570] DGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKS LSLSPG
- [0571] CH3 L351K;T366K;E382Q:
[0572] 341
GQPREPQVYTKPPSREEMTK NQVSLKCLVKGFYPSDIAVE WQSNQGPENNYKTTTPVLDS
[0573] DGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKS LSLSPG
- [0574] CH3 L351K;T366K;E382T:
[0575] 341
GQPREPQVYTKPPSREEMTK NQVSLKCLVKGFYPSDIAVE WTSNGQPENNYKTTTPVLDS
[0576] DGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKS LSLSPG
- [0577] CH3 L351K;T366K;E388L:
[0578] 341
GQPREPQVYTKPPSREEMTK NQVSLKCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPLNNYKTTTPVLDS
[0579] DGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKS LSLSPG
- [0580] CH3 L351K;T366K;E388M:
[0581] 341
GQPREPQVYTKPPSREEMTK NQVSLKCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPMNNYKTTTPVLDS
[0582] DGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKS LSLSPG
- [0583] CH3 L351K;T366K;E388T:
[0584] 341
GQPREPQVYTKPPSREEMTK NQVSLKCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPTNNYKTTTPVLDS
[0585] DGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKS LSLSPG
- [0586] CH3 L351D;L368E;K370S:
[0587] 341
GQPREPQVYTDPPSREEMTK NQVSLTCEVSGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDS
[0588] DGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKS LSLSPG
- [0589] CH3 L351D;L368E;K370T:
[0590] 341
GQPREPQVYTDPPSREEMTK NQVSLTCEVTGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDS
[0591] DGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKS LSLSPG
- [0592] 实施例6:实施例1-5的CH1变体及新型CH1变体的进一步分析。
- [0593] 如实施例1中所指示产生抗体,其限制条件为此实施例中的抗体为具有两个一致重链及两个一致轻链的单特异性二价抗体。因为抗体不为双特异性抗体,故其具有野生型CH3结构域。
- [0594] ELISA用于评估各种CH1变体与经血纤维蛋白原涂布的盘的结合。抗体为具有有所指示CH1变体的IgG1抗体。全部抗体均为具有有MF1122 VH及图13A的共同轻链(指示为PG1122)的可变结构域的二价单特异性抗体。在经相同血纤维蛋白原涂布的盘(参见图16:分别为血纤维蛋白原盘阳性样品集1、血纤维蛋白原盘阳性样品集2及血纤维蛋白原盘阴性

样品集)上测试作为阴性对照的相同但现具有PD-L1抗体VH(指示为PG PD-L1)的抗体。评估相同抗体与经PD-L1涂布的盘的结合(参见图16PD-L1盘阳性样品集及PD-L1盘阴性样品集)。

[0595] 以10 μ g/ml用人类血纤维蛋白原(Sigma Aldrich;目录号F4753)涂布血纤维蛋白原ELISA盘。在以5 μ g/ml浓度起始且以0.005 μ g/ml浓度结束的十倍浓度稀释范围内培育抗体。

[0596] 以2.5 μ g/ml用人类PD-L1-Fc(R&D systems;目录号156-B7)涂布PD-L1 ELISA盘。在以5 μ g/ml浓度起始且以0.005 μ g/ml浓度结束的十倍浓度稀释范围内培育抗体。检测到结合抗体及结合 κ 轻链的基于经1:1000稀释的HRP结合蛋白质L的二级抗体(Pierce,目录号32420)。

[0597] 携带PD-L1结合抗体作为含阴性对照的血纤维蛋白原ELISA,且携带血纤维蛋白原结合抗体作为含阴性对照的PD-L1 ELISA。具有相反结合特异性、但具有相同CH2序列、CH3序列及CH1变体序列的阴性对照作为测试抗体。MF1122 VH可变区的氨基酸序列指示于表4中。相应CH1变体的序列指示于表14中。因此,这些数据证实分离残基不影响结合指定重链可变区的目标抗原。

[0598] ELISA分析的结论为全部所测试抗体均结合至由可变结构域序列规定的目标且重要地不结合至非特异性目标(图16)。换句话说讲,血纤维蛋白原特异性抗体结合至含血纤维蛋白原的血纤维蛋白原ELISA且不结合至含PD-L1的PD-L1 ELISA;且PD-L1特异性抗体结合至含PD-L1的PD-L1 ELISA且不结合至含血纤维蛋白原的血纤维蛋白原ELISA。

[0599] 表15:具有引入相较于WT IgG1 CH1而言的电荷差异的CH1变体的抗体。

[0600]	CH1 变体 (EU 编号)	引入相较于 wt CH1 而言的电荷
	N201K	+1
	T120K	+1
	N159K	+1
	T120K、N201K	+2
	N201K、N159K	+2
	T120K、N159K	+2
	T120K、N201K、N159K	+3
	N201D	-1
	K213Q	-1
	N159D	-1
	N201D、K213Q	-2
	N201D、N159D	-2
	K213Q、N159D	-2
	N201D、K213Q、N159D	-3

[0601] 在WT IgG1背景下分析所指示的变体。还指示CH1变体是否与具有DE臂或KK臂的重链相关联。重链的重链可变区(VH)具有MF1122的序列(参见表4)。已研究增加电荷的CH1变体(图中的前7个条目)及PD-L1重链可变区(RT~11min及FAB Tm~76 $^{\circ}$ C)。

[0602] 将各种CH1变体并于另一wtIgG1中以产生具有有所指示可变结构域及CH1变体的IgG1抗体。抗体为具有一致重链及轻链的单特异性二价抗体。各抗体具有两个一致CH1结构域及两个一致可变结构域。如实施例2中所描述用CIEX分析产物。具有同一可变结构域及

wtCH1 (WT) 的IgG1抗体的相应CIEX滞留时间 (RT) 及相对滞留时间差异指示于表16中。较大差异使分离溶离份与双特异性抗体, 形成同源二聚体及半抗体更容易。

[0603] 表16: 具有CH1分离结构域的二价单特异性抗体的CIEX滞留时间。滞留时间 (RT), 相对差异 (ΔRT)

[0604]	CH1 变体 (EU 编号)	重链可变区 MF	PG	RT	ΔRT (变体 CH1 - WT CH1)
	WT	PD-L1	PG PD-L1p14	9.4	0
	N159K	PD-L1	PG PD-L1p17	12.1	2.7
	T120K	PD-L1	PG PD-L1p15	12.3	2.9
	N201K	PD-L1	PG PD-L1p16	12.8	3.4
	T120K, N159K	PD-L1	PG PD-L1p20	15.1	5.7
	T120K, N201K	PD-L1	PG PD-L1p18	15.9	6.5
	N201K, N159K	PD-L1	PG PD-L1p19	17.3	7.9
	T120K, N201K, N159K	PD-L1	PG PD-L1p21	20.3	10.9
	N201D, K213Q, N159D	1122	PG1122p147	10.2	-1.7
	K213Q, N159D	1122	PG1122p146	10.7	-1.2
	N201D, K213Q	1122	PG1122p134	10.9	-1
	K213Q	1122	PG1122p135	11.1	-0.8
	N201D, N159D	1122	PG1122p145	11.4	-0.5
	N159D	1122	PG1122p144	11.5	-0.4
	WT	1122	PG1122p133	11.9	0
	N201D	1122	PG1122p136	11.9	0
	N159K	1122	PG1122p139	13.9	2
	T120K	1122	PG1122p137	14.2	2.3
	N201K	1122	PG1122p138	14.4	2.5
	T120K, N159K	1122	PG1122p142	16.3	4.4
	T120K, N201K	1122	PG1122p140	17	5.1
	N201K, N159K	1122	PG1122p141	18.3	6.4
	T120K, N159K, N201K	1122	PG1122p143	21	9.1

[0606] 结论为如所预期, 氨基酸变体增加 ΔRT (定义为IgG变体与IgG WT之间的RT差异)。一些变体展现大于其他变体的 ΔRT 。两个所测试VH序列 (VH1122及PD-L1) 均受变体类似程度地影响。

[0607] 并有分离残基的抗体的稳定性分析

[0608] 实施例3描述用Uncle进行的稳定性分析。如下所指示的数据系用Uncle设备使用实施例3中所描述的方法获得。

[0609] 测试表16中所指示的单特异性二价抗体的各种稳定性参数。结果指示于表17中。

[0610] 表17a PD-L1 VH

[0611]

CHI 变体	样品	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)	Tm3 (°C)	Tagg 266 (°C)
N201K	0.05mg/ml	70.3	74.2	78.7	80.2
T120K	0.05mg/ml	70.6	74.5	79.0	80.0
N159K	0.05mg/ml	66.6	70.6	78.0	79.7
WT	0.05mg/ml	70.2	78.0		79.3
N201K、N159K	0.05mg/ml	71.2	78.0		79.0
T120K、N201K	0.05mg/ml	71.0	76.7		78.6
T120K、N159K	0.05mg/ml	70.7			77.7
T120K、N159K、N201K	0.05mg/ml	71.2			76.6

[0612] 表17b MF1122 VH

[0613]

CHI 变体	样品	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)	Tm3 (°C)	Tagg 266 (°C)
WT	0.05mg/ml	70.5	80.0		81.7
K213Q	0.05mg/ml	70.5	79.7		81.0
T120K	0.05mg/ml	71.1	79.0		79.6
N201K	0.05mg/ml	70.5	79.0		79.6
N159D	0.05mg/ml	70.6	78.2		79.6
N201K、N159K	0.05mg/ml	69.7	78.6		79.0
N201D	0.05mg/ml	70.0	78.1		78.9
N201D、K213Q	0.05mg/ml	70.5	77.5		78.7
N159K	0.05mg/ml	70.5	78.5		78.7
K213Q、N159D	0.05mg/ml	70.2	77.6		77.9
T120K、N201K	0.05mg/ml	70.1	75.0		77.6
N201D、N159D	0.05mg/ml	71.0			77.0
T120K、N159K、N201K	0.05mg/ml	71.0			76.3
T120K、N159K	0.05mg/ml	70.5	75.0		75.9
N201D、K213Q、N159D	0.05mg/ml	70.0			75.7

[0614] 在所有情况下,数个变体的组合降低TAGG,然而,降低完全在容限电平内。两个VH的总体热稳定性均受类似程度地影响,且被证明与相关联可变结构域中的特异性VH序列无关。在此分析中,用含有可变结构域的抗PD-L1进行的N159向N159K的修改系与在~66°C下的早期熔化事件相关联。此有可能为测量问题,因为具有含有可变结构域的MF1122的此变体的值不展示此与WT相同的差异。此趋势还见于具有通常不展示与WT相同的差异的N159K的各种组合中。

[0615]

表 18: 当相较于具有 WT CH1 序列的抗体而言时增加具有变体的抗体的电荷或 pI 的全部变体的概述。

CH1 变体	VH PD-L1					VH1122					
	CIEX		热稳定性			CIEX		热稳定性			
	RT	ΔRT (变体-WT)	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)	Tm3 (°C)	Tagg 266 (°C)	RT	ΔRT (变体-WT)	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)	Tagg 266 (°C)
WT	9.4	0	70.2	78.0		79.3	11.9	0	70.5	80.0	81.7
N159K	12.1	2.7	66.6	70.6	78.0	79.7	13.9	2	70.5	78.5	78.7
T120K	12.3	2.9	70.6	74.5	79.0	80.0	14.2	2.3	71.1	79.0	79.6
N201K	12.8	3.4	70.3	74.2	78.7	80.2	14.4	2.5	70.5	79.0	79.6
T120K, N159K	15.1	5.7	70.7			77.7	16.3	4.4	70.5	75.0	75.9
T120K, N201K	15.9	6.5	71.0	76.7		78.6	17.0	5.1	70.1	75.0	77.6
N201K, N159K	17.3	7.9	71.2	78.0		79.0	18.3	6.4	69.7	78.6	79.0
T120K, N159K, N201K	20.3	10.9	71.2			76.6	21.0	9.1	71.0		76.3

当相较于表 18 中所列举的其他 CH1 变体而言时，单氨基酸变体 N201K 似乎引起最强 CIEX 位移(2.5-3.4 分钟)，同时维持高热稳定性(TAGG 降低 0°C-2°C)。此为二个所测试 VH 序列的情况，与其抗原结合特异性及其来源生殖系 V 区无关。其他所列单氨基酸变体还展现良好稳定性且展现有用 CIEX 滞留时间位移。

[0616]

表 19: 当相较于具有 WT CH1 序列的抗体而言时更改具有变体的抗体的电荷或 pI 的全部变体的概述。

pI	CH1 变体	CIEX		热稳定性			ΔTAGG (变体-WT)
		RT	ΔRT (变体-WT)	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)	Tagg 266 (°C)	
较低	N201D、K213Q、N159D	10.2	-1.7	70.0		75.7	-6.0
较低	K213Q、N159D	10.7	-1.2	70.2	77.6	77.9	-3.9
较低	N201D、K213Q	10.9	-1.0	70.5	77.5	78.7	-3.0
较低	K213Q	11.1	-0.8	70.5	79.7	81.0	-0.7
较低	N201D、N159D	11.4	-0.5	71.0		77.0	-4.8
较低	N159D	11.5	-0.4	70.6	78.2	79.6	-2.1
较低	N201D	11.9	0.0	70.0	78.1	78.9	-2.8
	WT	11.9	0.0	70.5	80.0	81.7	0.0
较高	N159K	13.9	2.0	70.5	78.5	78.7	-3.0
较高	T120K	14.2	2.3	71.1	79.0	79.6	-2.1
较高	N201K	14.4	2.5	70.5	79.0	79.6	-2.1
较高	T120K、N159K	16.3	4.4	70.5	75.0	75.9	-5.8
较高	T120K、N201K	17.0	5.1	70.1	75.0	77.6	-4.1
较高	N201K、N159K	18.3	6.4	69.7	78.6	79.0	-2.8
较高	T120K、N159K、N201K	21.0	9.1	71.0		76.3	-5.4

[0617] 所测试变体全部具有类似Tm1值,而Tm2系在合适范围内。单变体K213Q引起强CIEX位移(-0.8分钟),同时维持良好热稳定性(TAGG降低0.7℃)。双变体N201K+N159K提供对CIEX滞留的明显作用,同时具有对热稳定性的有限作用。在此情况下,所测试三变体具有最

大CIEX滞留时间位移。

[0618] 实施例7a:识别未经表面的残基以进行分离设计

[0619] 根据具有另一CH2区表面的IgG1 CH2区的结构信息,通过使用默认参数的程序GETAREA 1.0识别在CH2区内未经表面暴露的氨基酸残基位置及内埋式氨基酸残基位置。Negi等人,“Solvent Accessible Surface Areas,Atomic Solvation Energies,and Their Gradients for Macromolecules”,最后一次修正时间为2015年4月17日星期三3:00PM。将具有表20的序列的CH2区的模型提交至Swiss-model网站(Arnold K,Bordoli L,Kopp J,Schwede T.The SWISS-MODEL workspace:a web-based environment for protein structure homology modelling.Bioinformatics.2006年1月15日;22(2):195-201)。对IgG1 CH3区进行相同过程。

[0620] 高质量CH2及CH3同源性模型系基本上如上文所解释而获得,自Swiss-Model网站服务器使用1.3.0版Swiss-Model。数个适当晶体结构存在(为高质量结构且在许多本文实施方案中具有与用作“原始”序列或模板序列的CH2结构域具有>95%序列一致性的比对)。许多其他PDB中的CH2区可能提供高质量起始结构(与此处所用的CH2区具有>95%序列一致性的高质量结构)。如同实施例1中一样使用常用同源性模型化工具容易地识别许多未经表面暴露的残基。以CH2查询序列的PDB模板5vu0为起始物获得具有在全长上的98.2%序列一致性的CH2结构域的结构模型(注意错配发生在经工程改造区及末端/连接符区中,且模型获得0.99的1.3.0版Swiss-Model GMQE评分)。

[0621] 用GETAREA 1.0B加工此结构,上传由Swiss-Model生成的pdb档案。基于GETAREA 1.0B的预设参数,经大于50%表面暴露的氨基酸称作“向外”或表面,未向外或未经表面暴露的残基介于50%与大于20%之间,且小于20%可接近处被GETAREA 1.0B提及为“向内”或如本文所提及为内埋式氨基酸。

[0622] CH3

[0623] 类似地,本文所体现的“原始”CH3结构域或任何经工程改造CH3结构域可模型化为同源二聚体(两个CH3链相互作用)或使用同源性模型化来模型化为单体。数个适当晶体结构存在(为高质量结构且在许多本文实施方案中具有与用作“原始”序列的DE-CH3结构域或KK-CH3结构域具有>92%序列一致性的比对)。许多其他PDB中的CH3区可能提供高质量起始结构(与此处所用的CH3区具有>92%序列一致性的高质量结构)。如同实施例1中一样使用常用同源性模型化工具容易地识别许多未经表面暴露的残基。例如,吾等以DE-CH3查询序列的PDB模板5w38为起始物产生具有在全长上的93.46%序列一致性的CH3结构域(DE-CH3)的结构模型(注意错配发生在经工程改造区及连接符/结构域-末端区中,且模型获得0.99的1.3.0版Swiss-Model GMQE评分)。用GETAREA 1.0B加工此结构,上传由Swiss-Model生成的pdb档案。基于GETAREA 1.0B的预设参数,经大于50%表面暴露的氨基酸称作“向外”或表面,未向外或未经表面暴露的残基介于50%与大于20%之间,且小于20%可接近处被GETAREA 1.0B提及为“向内”或如本文所提及为内埋式氨基酸(参见表20-22)。

[0624] 经模型化的CH2区为经修饰以在根据EU编号的位置235及236处沉默的人类CH2。经模型化的CH3区为经修饰以包括根据EU编号的表21的L351D及L368E变体以及表22的T366K及L351K变体的人类CH3,由此对CH3链模型化以用于CH3 DEKK异源二聚化结构域。

[0625] 表20:CH2 Fc沉默GetArea评分。

[0626] 探针半径:1.400

探针半径 残基		: 1.400 总计	无极	骨架	侧链	比率 (%)	向内/向外
PRO	1	193.74	162.89	55.64	138.10	100.0	o
ALA	2	103.03	77.89	29.68	73.36	100.0	o
PRO	3	132.81	115.27	28.97	103.84	98.7	o
GLU	4	145.43	55.55	19.06	126.37	89.5	o
LEU	5	135.97	121.61	21.70	114.27	78.2	o
GLY	6	52.91	45.33	52.91	0.00	60.7	o
ARG	7	243.13	121.37	42.24	200.89	100.0	o
GLY	8	24.77	11.96	24.77	0.00	28.4	
PRO	9	6.33	2.66	3.67	2.66	2.5	i
SER	10	43.55	16.19	3.51	40.03	51.7	o
VAL	11	4.68	0.00	4.68	0.00	0.0	i
PHE	12	108.72	108.72	3.15	105.58	58.6	o
LEU	13	21.40	4.52	16.89	4.52	3.1	i
PHE	14	102.35	102.35	0.02	102.34	56.8	o
PRO	15	63.34	56.68	6.66	56.68	53.9	o
PRO	16	9.46	4.14	9.43	0.04	0.0	i
LYS	17	138.82	101.00	0.64	138.18	84.0	o
PRO	18	97.41	97.41	5.82	91.58	87.1	o
LYS	19	120.28	81.58	2.93	117.34	71.3	o
ASP	20	24.23	0.45	0.00	24.23	21.4	
THR	21	5.50	0.92	1.27	4.24	4.0	i
LEU	22	120.34	95.71	26.86	93.48	63.9	o
MET	23	114.40	114.40	3.68	110.71	69.9	o
ILE	24	147.67	140.44	8.78	138.90	94.3	o
SER	25	108.79	61.18	38.59	70.20	90.7	o
ARG	26	99.39	33.11	8.74	90.65	46.4	
THR	27	84.29	45.25	13.94	70.35	66.2	o
PRO	28	2.03	2.03	0.67	1.35	1.3	i
GLU	29	74.03	11.89	2.36	71.67	50.8	o
VAL	30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	i
THR	31	31.24	20.30	0.00	31.24	29.4	
CYS	32	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	i
VAL	33	11.02	11.02	0.00	11.02	9.0	i
VAL	34	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	i
VAL	35	37.54	37.54	0.00	37.54	30.7	
ASP	36	70.47	15.73	9.38	61.09	54.1	o
VAL	37	0.19	0.19	0.12	0.07	0.1	i
SER	38	44.61	40.83	9.52	35.09	45.3	
HIS	39	88.36	62.17	13.44	74.92	48.5	
GLU	40	149.40	73.31	30.26	119.14	84.4	o
ASP	41	28.81	1.73	0.89	27.92	24.7	
PRO	42	25.65	25.04	0.61	25.04	23.8	
GLU	43	117.21	55.73	6.38	110.83	78.5	o
VAL	44	23.94	1.82	23.00	0.94	0.8	i
LYS	45	124.86	98.22	5.73	119.13	72.4	o
PHE	46	24.15	5.11	19.04	5.11	2.8	i

[0627]

[0628]

ASN	47	24.44	4.30	4.30	20.14	17.6	i
TRP	48	4.21	3.88	0.33	3.88	1.7	i
TYR	49	37.06	26.77	0.05	37.01	19.2	i
VAL	50	22.89	21.30	1.59	21.30	17.4	i
ASP	51	75.33	37.74	25.52	49.81	44.1	
GLY	52	60.12	33.43	60.12	0.00	68.9	o
VAL	53	110.66	110.66	4.89	105.77	86.5	o
GLU	54	66.84	18.07	13.03	53.80	38.1	
VAL	55	40.38	36.18	7.70	32.69	26.7	
HIS	56	157.04	105.36	35.49	121.55	78.6	o
ASN	57	89.31	55.03	22.99	66.32	58.0	o
ALA	58	31.86	8.47	23.55	8.32	12.8	i
LYS	59	150.21	106.48	6.84	143.36	87.2	o
THR	60	72.64	36.55	27.94	44.70	42.1	
LYS	61	106.53	65.14	6.32	100.21	60.9	o
PRO	62	121.87	119.66	16.64	105.23	100.0	o
ARG	63	91.66	20.30	14.82	76.84	39.3	
GLU	64	109.22	38.87	6.04	103.18	73.1	o
GLU	65	95.40	25.89	23.90	71.51	50.6	o
GLN	66	58.41	19.49	10.88	47.54	33.1	
TYR	67	237.61	174.37	31.97	205.64	100.0	o
ASN	68	105.09	50.26	26.26	78.83	69.0	o
SER	69	69.30	40.30	3.56	65.74	84.9	o
THR	70	35.84	33.97	0.92	34.92	32.9	
TYR	71	43.46	10.57	0.00	43.46	22.5	
ARG	72	74.94	20.74	1.23	73.72	37.7	
VAL	73	7.91	7.91	0.54	7.36	6.0	i
VAL	74	15.80	15.67	0.12	15.67	12.8	i
SER	75	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	i
VAL	76	12.37	11.48	0.88	11.48	9.4	i
LEU	77	2.50	2.50	0.12	2.38	1.6	i
THR	78	57.73	39.31	7.53	50.20	47.3	
VAL	79	5.26	3.64	5.26	0.00	0.0	i
LEU	80	129.98	129.25	1.46	128.52	87.9	o
HIS	81	26.08	21.14	0.61	25.47	16.5	i
GLN	82	111.49	66.99	0.51	110.98	77.2	o
ASP	83	26.33	0.36	0.48	25.85	22.9	
TRP	84	18.21	10.40	0.05	18.16	8.1	i
LEU	85	53.50	44.95	8.55	44.95	30.7	
ASN	86	103.14	23.60	33.10	70.04	61.3	o
GLY	87	32.76	15.59	32.76	0.00	37.6	
LYS	88	69.15	39.00	2.63	66.52	40.4	
GLU	89	85.88	19.30	0.49	85.39	60.5	o
TYR	90	2.54	2.02	0.00	2.54	1.3	i
LYS	91	59.65	27.60	0.00	59.65	36.3	
CYS	92	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	i
LYS	93	42.70	12.03	0.18	42.52	25.9	
VAL	94	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	i
SER	95	28.95	24.24	1.86	27.09	35.0	
ASN	96	14.37	6.88	13.83	0.54	0.5	i
LYS	97	167.65	121.92	31.24	136.40	82.9	o

[0629]	ALA	98	47.07	36.13	22.90	24.17	37.2	
	LEU	99	15.12	4.67	10.64	4.49	3.1	i
	PRO	100	101.58	73.35	44.85	56.73	53.9	o
	ALA	101	63.20	59.97	6.37	56.84	87.6	o
	PRO	102	69.59	54.52	15.36	54.23	51.5	o
	ILE	103	28.78	28.78	3.94	24.83	16.9	i
	GLU	104	85.12	27.43	18.14	66.98	47.4	
	LYS	105	86.57	44.26	5.34	81.24	49.4	
	THR	106	66.88	35.96	25.68	41.20	38.8	
	ILE	107	35.27	35.27	6.06	29.21	19.8	i
	SER	108	38.47	2.27	15.77	22.70	29.3	
	LYS	109	77.36	45.77	6.40	70.96	43.1	
	ALA	110	94.75	83.95	25.21	69.54	100.0	o
	LYS	111	252.60	132.84	47.34	205.25	100.0	o

[0630] CH2序列及模型化信息。位置由任意编号指示。具有编号2的残基ALA对应于EU编号231,具有编号3的残基PRO对应于EU编号232等,直至具有编号111的残基LYS具有根据EU编号的位置编号340(参见图17中描绘的IMGT表)。

[0631] CH2区的序列包括在位置235及236处的Fc沉默变体(L235G及G236R变体)。向内/向外栏指示氨基酸视为内埋式(i)或经表面暴露的(o)。开放空间指示未经表面暴露且还非内埋式的氨基酸的值。

[0632] 表21:CH3 mut模型DE变体

[0633] 探针半径:1.400

残基		总计	无极	骨架	侧链	比率(%) 向内/向外	
GLY	1	93.09	41.16	93.09	0.00	100.0	o
GLN	2	155.68	61.13	7.43	148.25	100.0	o
PRO	3	73.51	55.46	18.05	55.46	52.7	o
ARG	4	98.09	60.52	6.40	91.69	46.9	
GLU	5	86.26	24.01	5.26	81.00	57.4	o
PRO	6	4.08	0.00	4.08	0.00	0.0	i
GLN	7	73.96	26.14	6.11	67.85	47.2	
VAL	8	5.60	0.45	5.14	0.45	0.4	i
TYR	9	111.59	87.13	4.60	106.99	55.4	o
THR	10	28.41	0.00	17.68	10.74	10.1	i
ASP	11	57.13	21.71	0.01	57.12	50.5	o
PRO	12	80.78	68.74	12.04	68.74	65.3	o
PRO	13	13.72	4.86	13.59	0.13	0.1	i
SER	14	66.96	55.58	17.00	49.96	64.5	o
ARG	15	202.77	95.36	10.47	192.31	98.4	o
GLU	16	155.84	60.11	24.88	130.97	92.8	o
GLU	17	44.56	18.97	3.47	41.09	29.1	
MET	18	41.84	39.31	2.53	39.31	24.8	
THR	19	130.40	93.72	34.74	95.66	90.1	o

[0635]	LYS	20	127.83	81.65	6.71	121.12	73.6	o
	ASN	21	132.13	39.17	14.75	117.38	100.0	o
	GLN	22	71.05	17.44	4.87	66.18	46.1	
	VAL	23	0.40	0.40	0.40	0.00	0.0	i
	SER	24	25.15	14.87	0.85	24.30	31.4	
	LEU	25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	i
	THR	26	31.92	16.70	0.00	31.92	30.1	
	CYS	27	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	i
	GLU	28	36.91	0.13	0.00	36.91	26.1	
	VAL	29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	i
	LYS	30	81.64	38.53	0.00	81.64	49.6	
	GLY	31	9.38	7.19	9.38	0.00	10.8	i
	PHE	32	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	i
	TYR	33	60.64	26.00	0.00	60.64	31.4	
	PRO	34	41.03	41.03	0.00	41.03	39.0	
	SER	35	35.30	7.93	1.45	33.85	43.7	
	ASP	36	117.22	39.01	10.75	106.47	94.2	o
	ILE	37	37.55	12.12	31.56	5.99	4.1	i
	ALA	38	57.19	56.62	8.29	48.90	75.3	o
	VAL	39	17.59	2.52	16.21	1.38	1.1	i
	GLU	40	62.61	13.86	0.00	62.61	44.3	
	TRP	41	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	i
	GLU	42	19.49	11.64	0.00	19.49	13.8	i
	SER	43	11.51	6.66	5.59	5.92	7.7	i
	ASN	44	136.96	45.44	38.58	98.38	86.1	o
	GLY	45	68.61	43.68	68.61	0.00	78.7	o
	GLN	46	125.81	51.62	0.79	125.03	87.0	o
	PRO	47	82.82	69.87	12.95	69.87	66.4	o
	GLU	48	23.57	4.09	9.96	13.60	9.6	i
	ASN	49	154.67	40.12	37.73	116.94	100.0	o
	ASN	50	69.84	23.21	3.31	66.53	58.2	o
	TYR	51	63.47	27.21	16.57	46.90	24.3	
	LYS	52	157.61	112.86	5.40	152.22	92.5	o
	THR	53	48.95	25.39	23.68	25.27	23.8	
	THR	54	63.07	61.04	3.84	59.23	55.8	o
	PRO	55	109.22	109.22	7.42	101.79	96.8	o
	PRO	56	46.68	30.88	15.80	30.88	29.4	
	VAL	57	76.40	76.40	4.59	71.81	58.7	o
	LEU	58	114.86	96.63	18.23	96.63	66.1	o
	ASP	59	48.98	5.83	9.34	39.64	35.1	
	SER	60	123.45	65.29	42.65	80.79	100.0	o
	ASP	61	87.54	53.72	30.83	56.71	50.2	o
	GLY	62	38.91	31.91	38.91	0.00	44.6	
	SER	63	1.29	0.00	0.00	1.29	1.7	i
	PHE	64	36.04	36.04	0.00	36.04	20.0	
	PHE	65	52.00	52.00	0.00	52.00	28.9	
	LEU	66	1.67	1.67	0.00	1.67	1.1	i
	TYR	67	89.25	55.41	0.35	88.91	46.0	

	SER	68	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	i
	LYS	69	95.84	74.80	0.58	95.26	57.9	o
	LEU	70	0.03	0.03	0.00	0.03	0.0	i
	THR	71	25.63	14.52	3.11	22.52	21.2	
	VAL	72	3.92	3.92	3.88	0.04	0.0	i
	ASP	73	68.40	12.10	0.79	67.61	59.8	o
	LYS	74	60.53	31.65	0.27	60.26	36.6	
	SER	75	51.92	36.67	1.04	50.87	65.7	o
	ARG	76	78.71	47.13	0.19	78.52	40.2	
	TRP	77	5.79	3.39	0.00	5.79	2.6	i
	GLN	78	100.97	30.38	15.96	85.01	59.2	o
	GLN	79	132.46	44.70	34.32	98.14	68.3	o
	GLY	80	29.46	15.57	29.46	0.00	33.8	
	ASN	81	54.55	11.80	9.35	45.20	39.5	
	VAL	82	82.61	76.15	6.46	76.15	62.3	o
	PHE	83	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	i
	SER	84	15.68	2.85	0.00	15.68	20.3	
	CYS	85	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	i
	SER	86	4.52	3.63	0.89	3.63	4.7	i
[0636]	VAL	87	0.65	0.65	0.65	0.00	0.0	i
	MET	88	111.58	110.80	0.79	110.80	70.0	o
	HIS	89	8.00	8.00	8.00	0.00	0.0	i
	GLU	90	88.28	32.85	17.49	70.79	50.1	o
	ALA	91	30.88	17.12	24.75	6.13	9.4	i
	LEU	92	13.46	7.12	6.44	7.02	4.8	i
	HIS	93	154.34	126.25	15.36	138.97	89.9	o
	ASN	94	117.74	34.72	27.06	90.68	79.3	o
	HIS	95	107.94	87.80	0.02	107.92	69.8	o
	TYR	96	96.25	70.36	8.92	87.33	45.2	
	THR	97	32.61	17.68	7.29	25.32	23.8	
	GLN	98	83.62	20.27	18.63	64.99	45.2	
	LYS	99	88.44	45.20	4.77	83.67	50.9	o
	SER	100	66.87	30.31	16.66	50.22	64.9	o
	LEU	101	17.62	17.62	5.67	11.95	8.2	i
	SER	102	33.50	1.16	15.46	18.04	23.3	
	LEU	103	77.59	71.45	7.26	70.33	48.1	
	SER	104	89.76	44.75	29.35	60.41	78.0	o
	PRO	105	190.98	114.92	49.18	141.81	100.0	o

[0637] CH3序列及模型化信息。位置由任意编号指示。具有编号1的残基GLY对应于EU编号341,具有编号2的残基GLN对应于EU编号342等,直至具有编号103的残基LEU具有根据EU编号的位置编号443(参见图17中描绘的IMGT表)。

[0638] CH3区的所用序列包括在位置351及368处的DE异源二聚化变体(在上文编号中分别为位置11及位置28的L351D变体及L368E变体)。向内/向外栏指示氨基酸视为内埋式(i)或经表面暴露的(o)。开放空间指示未经表面暴露且还非内埋式的氨基酸的值。

[0639] 表22:CH3 mut模型KK变体

[0640] 探针半径:1.400

残基		总计	无极	骨架	侧链	比率 (%)	向内/向外
GLY	1	93.09	41.02	93.09	0.00	100.0	o
GLN	2	155.60	61.06	7.43	148.16	100.0	o
PRO	3	73.53	55.44	18.09	55.44	52.7	o
ARG	4	98.41	60.63	6.39	92.02	47.1	
GLU	5	85.96	23.95	5.17	80.79	57.2	o
PRO	6	4.18	0.00	4.18	0.00	0.0	i
GLN	7	73.97	26.02	5.89	68.08	47.4	
VAL	8	5.78	0.46	5.32	0.46	0.4	i
TYR	9	115.12	90.27	4.56	110.56	57.3	o
THR	10	31.62	0.00	20.23	11.39	10.7	i
LYS	11	97.36	87.29	0.02	97.34	59.2	o
PRO	12	54.87	51.32	3.55	51.32	48.8	
PRO	13	12.12	3.82	11.88	0.24	0.2	i
SER	14	62.86	50.86	13.37	49.49	63.9	o
ARG	15	202.59	95.58	10.04	192.55	98.5	o
GLU	16	155.43	59.84	25.05	130.38	92.3	o
GLU	17	45.66	17.81	3.71	41.96	29.7	
MET	18	42.26	39.82	2.44	39.82	25.2	
THR	19	130.36	93.70	34.75	95.61	90.0	o
[0641] LYS	20	128.39	82.23	6.69	121.71	74.0	o
ASN	21	132.12	39.02	14.71	117.41	100.0	o
GLN	22	71.88	17.54	5.70	66.18	46.1	
VAL	23	0.55	0.55	0.55	0.00	0.0	i
SER	24	27.04	14.16	3.04	24.01	31.0	
LEU	25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	i
LYS	26	59.33	56.45	0.00	59.33	36.1	
CYS	27	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	i
LEU	28	33.08	33.08	0.00	33.08	22.6	
VAL	29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	i
LYS	30	84.57	40.83	0.00	84.57	51.4	o
GLY	31	9.17	7.06	9.17	0.00	10.5	i
PHE	32	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	i
TYR	33	60.68	25.90	0.00	60.68	31.4	
PRO	34	41.14	41.14	0.00	41.14	39.1	
SER	35	35.36	7.78	1.45	33.92	43.8	
ASP	36	117.07	38.94	10.61	106.45	94.2	o
ILE	37	37.58	12.18	31.59	5.99	4.1	i
ALA	38	57.23	56.66	8.29	48.94	75.4	o
VAL	39	17.62	2.52	16.23	1.38	1.1	i
GLU	40	62.29	13.95	0.00	62.29	44.1	

[0642]	TRP	41	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	i
	GLU	42	19.50	11.41	0.00	19.50	13.8	i
	SER	43	11.50	6.60	5.67	5.83	7.5	i
	ASN	44	136.92	45.31	38.50	98.42	86.1	o
	GLY	45	68.62	43.83	68.62	0.00	78.7	o
	GLN	46	125.98	51.63	0.80	125.18	87.1	o
	PRO	47	82.84	69.88	12.97	69.88	66.4	o
	GLU	48	23.62	4.07	10.01	13.60	9.6	i
	ASN	49	154.66	39.97	37.74	116.92	100.0	o
	ASN	50	69.94	23.32	3.33	66.61	58.3	o
	TYR	51	63.35	27.06	16.51	46.84	24.3	
	LYS	52	157.10	112.33	5.40	151.70	92.2	o
	THR	53	48.93	25.37	23.71	25.22	23.7	
	THR	54	61.62	59.83	3.87	57.75	54.4	o
	PRO	55	109.26	109.26	7.47	101.79	96.8	o
	PRO	56	46.61	30.82	15.79	30.82	29.3	
	VAL	57	76.20	76.20	4.63	71.57	58.5	o
	LEU	58	114.88	96.67	18.21	96.67	66.1	o
	ASP	59	48.22	5.78	9.18	39.04	34.6	
	SER	60	123.72	65.51	43.16	80.56	100.0	o
	ASP	61	87.28	54.01	30.73	56.55	50.0	o
	GLY	62	39.07	32.04	39.07	0.00	44.8	
	SER	63	1.25	0.00	0.00	1.25	1.6	i
	PHE	64	36.09	36.09	0.00	36.09	20.0	
	PHE	65	49.15	49.15	0.00	49.15	27.3	
	LEU	66	1.65	1.65	0.00	1.65	1.1	i
	TYR	67	75.47	46.74	0.29	75.18	38.9	
	SER	68	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	i
	LYS	69	95.90	74.90	0.52	95.38	58.0	o
	LEU	70	0.03	0.03	0.00	0.03	0.0	i
	THR	71	25.40	14.67	3.09	22.31	21.0	
	VAL	72	4.01	4.01	3.97	0.04	0.0	i
	ASP	73	68.35	12.16	0.76	67.59	59.8	o
	LYS	74	60.62	31.68	0.27	60.35	36.7	
	SER	75	52.04	36.69	1.05	50.99	65.9	o
	ARG	76	78.94	47.28	0.18	78.77	40.3	
	TRP	77	5.62	3.18	0.00	5.62	2.5	i
	GLN	78	100.88	30.49	15.98	84.90	59.1	o
	GLN	79	132.35	44.53	34.29	98.06	68.2	o
	GLY	80	29.49	15.52	29.49	0.00	33.8	
	ASN	81	54.67	11.85	9.34	45.33	39.7	
	VAL	82	82.47	76.04	6.43	76.04	62.2	o
	PHE	83	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	i
	SER	84	15.48	2.85	0.00	15.48	20.0	i
	CYS	85	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	i
	SER	86	4.43	3.50	0.94	3.50	4.5	i
	VAL	87	0.65	0.65	0.65	0.00	0.0	i
	MET	88	111.53	110.73	0.80	110.73	69.9	o

	HIS	89	7.99	7.99	7.99	0.00	0.0	i
	GLU	90	88.29	32.90	17.51	70.78	50.1	o
	ALA	91	30.79	17.10	24.66	6.13	9.4	i
	LEU	92	13.43	7.16	6.37	7.06	4.8	i
	HIS	93	154.33	126.31	15.44	138.89	89.8	o
	ASN	94	117.65	34.62	26.99	90.66	79.3	o
	HIS	95	107.74	87.65	0.01	107.72	69.7	o
	TYR	96	95.92	70.08	8.95	86.97	45.0	
[0643]	THR	97	32.60	17.86	7.28	25.32	23.8	
	GLN	98	83.59	20.55	18.53	65.05	45.3	
	LYS	99	88.47	45.23	4.85	83.62	50.8	o
	SER	100	66.59	30.70	16.42	50.17	64.8	o
	LEU	101	17.64	17.64	5.75	11.90	8.1	i
	SER	102	33.57	1.17	15.51	18.06	23.3	
	LEU	103	77.51	71.44	7.19	70.33	48.1	
	SER	104	89.68	44.61	29.48	60.20	77.8	o
	PRO	105	190.73	114.96	49.16	141.57	100.0	o

[0644] CH3序列及模型化信息。位置由任意编号指示。具有编号1的残基GLY对应于EU编号341,具有编号2的残基GLN对应于EU编号342等,直至具有编号103的残基LEU具有根据EU编号的位置编号443(参见图17中描绘的IMGT表)。

[0645] CH3区的所用序列包括在位置351及366处的KK异源二聚化变体(在上文编号中分别为位置11及位置26的L351K变体及T366K变体)。向内/向外栏指示氨基酸视为内埋式(i)或经表面暴露的(o)。开放空间指示未经表面暴露的氨基酸的值。

[0646] 实施例7b:构建体设计

[0647] 使CH2及CH3中的未经表面的位置及内埋式位置变化以改变并有这些免疫球蛋白区的多聚化蛋白的电荷。产生总计9个示例性变异CH2及CH3区且并入单特异性抗体及多特异性抗体中以与具有野生型CH2及CH3区的单特异性抗体及多特异性抗体进行比较。与实施例1中所详述的方法类似来制备用于表现包括这些分离CH2/CH3区的重链分子的构建体。

[0648] 所测试变体的氨基酸变体描绘于表23中。

[0649] 表23:人类IgG1的CH2结构域及CH3结构中的氨基酸变体(EU编号)

	结构域	残基	变体	相较于野生型 CH 区而言的电荷差异
[0650]	CH2	V303	V303E	-1
			V303K	+1
	CH3	K370	K370S	-1
			K370T	-1
		E382	E382Q	+1
			E382T	+1
		E388	E388L	+1
			E388M	+1
			E388T	+1

[0651] 变体全部包括如表20中所指示的CH2区中的Fc沉默变体。变体进一步含有如表21中所描绘用于DE变体且如表22中所描绘用于KK变体的CH3异源二聚化结构域。将提供负电荷增加的变体整合至DE CH3骨架中。对于提供正电荷增加的变体,将其整合至KK CH3骨架

中。

[0652] 产生具有重链可变区的相应重链,其连同图13A的共同轻链一起形成结合破伤风类毒素(TT)或结合c-MET的胞外部分的可变结构域。TT可变结构域具有有MF1516的氨基酸序列的重链可变区。c-MET可变结构域具有有MF3462的氨基酸序列的重链可变区。VH MF1516及MF3462的氨基酸序列指示于上文中。具有可相容异源二聚化区的重链的产生允许双特异性抗体的优先形成。具有VH MF1516的重链含有DE变异CH3结构域,而具有VH3462的重链具有KK变异CH3结构域。

[0653] 通过定序确认最终构建体的一致性。为产生双特异性抗体,一个重链含有MF1516可变区、wtCH1区及铰链区、Fc沉默CH2区以及DE CH3区。另一重链含有MF3462可变区、wtCH1区及铰链区、Fc沉默CH2区以及KK CH3区。如上文所提及,将表23中所指示的提供负电荷增加的变体整合至具有DE CH3区的重链中。将提供正电荷增加的变体整合至具有KK CH3区的重链中。当本文在下文提及WT时,参考具有上文重链及轻链、但不具有表23中所描述的变体中的一者的双特异性抗体。

[0654] 通过组合两个重链产生双特异性抗体。表现抗体且使用基本上描述于实施例1c中的方法对其进行纯化。简言之:将表现两个重链及一个具有图13A的序列的共同轻链的构建体引入Hek293细胞中。转染后六天,收获细胞培养基。随后,用如实施例1中所描述的方法自此培养基纯化抗体。以此方式产生的抗体列于图19中。

[0655] 使用具有不含可相容异源二聚化CH3结构域的CH3结构域的重链产生具有表23的变体的单特异性二价抗体。重链具有有MF1516或MF3462氨基酸序列的VH、wtCH1区及铰链区、Fc沉默CH2区以及WT CH3区。将表23中所指示的氨基酸变体引入Fc沉默CH2区或WT CH3区中。将表23中所指示的提供负电荷增加的变体整合至具有MF1516 VH区的重链中。将提供正电荷增加的变体整合至具有MF3462区的重链中。当本文在下文提及WT时,参考具有上文重链及轻链、但不具有表23中所描述的变体中的一者的抗体。简言之:将表现所指示重链并具有图13A的序列的共同轻链的构建体引入Hek293细胞中。转染后六天,收获细胞培养基。随后,用如实施例1中所描述的方法自此培养基纯化抗体。以此方式产生的抗体列于图19中。

[0656] ELISA

[0657] 用c-MET、破伤风类毒素或甲状腺球蛋白涂布ELISA盘以评估各种抗体的结合(2.5 µg/ml c-MET(R&D systems目录号358-MT/CF)、2µg/ml破伤风类毒素(Statens institute目录号T162-2)及10µg/ml甲状腺球蛋白(Sigma Aldrich目录号T1126-500MG))。以10、1、0.1、0.01µg/mL培育抗体。检测到结合抗体及结合κ轻链的基于经1:2000稀释的HRP结合蛋白质L的二级抗体(Pierce,目录号32420)。

[0658] ELISA结果概述于图18中。

[0659] 抗体PG1337为单特异性二价TT IgG1抗体。抗体PG1025为单特异性二价甲状腺球蛋白IgG1抗体。抗体PG2994为单特异性二价cMET IgG1抗体。得出结论:全部双特异性抗体均以剂量依赖型方式结合c-MET及破伤风类毒素。双特异性抗体不结合至阴性对照抗原(甲状腺球蛋白)。具有WT CH2/CH3区或其变体的抗体之间的结合似乎并不会不同。

[0660] 实施例8:相应双特异性抗体的CIEX概况。

[0661] CIEX实验系如实施例2中所描述执行。相应抗体的结果描绘于图20及21中且概述

于表24中。

[0662] 表24: 具有CH2及CH3分离结构域的双特异性抗体及单特异性抗体的CIEX滞留时间。相应(半)抗体的滞留时间(RT)指示为以下: 对于DEDE异源二聚体, RT DEDE; 对于双特异性抗体, RT PB; 对于KK半抗体, RT KK; 且对于KK异源二聚体, RT KKKK。相对于DEDE分子及KK分子的相对差异(ΔRT)示于最后二栏中。全部所测试变体均影响CIEX RT。位移方向如所预期。对于V303L变体, 观测到最佳位移。

[0663]

DE	KK	PG/PB/Po编号	第1MG	第2MG	RT DEDE	RT PB	RT KK	RT KKKK	ΔRT (PB-DEDE)	ΔRT (PB-KK)
WT	WT	PB27538p43	MG1516C3209	MG3462C3215	12.9	14.3	18.0	19.5	1.4	3.7
WT	WT	PB27538p44	MG1516C3209	MG3462C3215	13.0	14.3	18.0	19.5	1.3	3.7
K370S	WT	PB27538p45	MG1516C3210	MG3462C3215	12.5	14.1	17.9	19.5	1.6	3.9
K370T	WT	PB27538p46	MG1516C3211	MG3462C3215	12.5	14.1	17.9	19.5	1.6	3.9
V303E	WT	PB27538p47	MG1516C3212	MG3462C3215	12.3	13.9	17.9	19.4	1.6	4.0
WT	V303K	PB27538p48	MG1516C3209	MG3462C3216	13.0	15.0	19.2	20.7	2.0	4.2
WT	E382Q	PB27538p49	MG1516C3209	MG3462C3217	13.0	14.7	18.8	20.4	1.7	4.1
WT	E382T	PB27538p50	MG1516C3209	MG3462C3218	13.0	14.7	18.8	20.4	1.7	4.1
WT	E388L	PB27538p51	MG1516C3209	MG3462C3219	13.0	14.7	19.0	20.6	1.7	4.3
WT	E388T	PB27538p52	MG1516C3209	MG3462C3221	12.9	14.8			1.9	
WT		PG1516p27	MG1516C3209		12.9					
K370S		PG1516p28	MG1516C3210		12.4					
K370T		PG1516p29	MG1516C3211		11.7					
V303E		PG1516p30	MG1516C3212		12.3					
	WT	PG3462p29	MG3462C3215				17.7	19.3		
	V303K	PG3462p30	MG3462C3216				19.0	20.5		
	E382Q	PG3462p31	MG3462C3217				18.6	20.2		
	E382T	PG3462p32	MG3462C3218				18.7	20.2		
	E388L	PG3462p33	MG3462C3219				18.8	20.3		
	E388T	PG3462p34	MG3462C3221							

[0664] 实施例9: 相应含有CH2 CH3分离结构域的抗体的熔化温度

[0665] 如实施例6中所解释, 通过UNCLE测定热稳定性。

[0666] 表25: Uncle稳定性

[0667]

DE	KK	孔	样品	Tm1 (°C) - 半IgG ((52.7))	Tm2 (°C) - Fc部分	Tm3 (°C) - Fab	Tagg 266 (°C)
WT	WT	A1	0.21 mg/ml PB27538p33		68.2	79.5	79.1
WT	WT	B1	0.22 mg/ml PB27538p34		67.9	79.0	78.6
K370S	WT	C1	0.21 mg/ml PB27538p35		68.0	79.1	78.7
K370T	WT	D1	0.19 mg/ml PB27538p36		68.5	78.6	78.6
V303E	WT	E1	0.23 mg/ml PB27538p37		66.6	78.2	77.9
WT	V303K	F1	0.21 mg/ml PB27538p38		65.5	78.0	77.6
WT	E382Q	G1	0.2 mg/ml PB27538p39		66.6	78.5	77.9
WT	E382T	H1	0.2 mg/ml PB27538p40		66.5	78.0	78.7
WT	E388L	I1	0.19 mg/ml PB27538p41		66.1	78.5	78.1
WT	E388T	J1	0.18 mg/ml PB27538p42		66.1	78.1	78.2
WT		M1	0.23 mg/ml PG1516p22	55.2		78.5	77.7
K370S		N1	0.23 mg/ml PG1516p23	56.0		78.7	77.9
K370T		A2	0.21 mg/ml PG1516p24	56.0		79.5	78.8
V303E		B2	0.23 mg/ml PG1516p25	55.7		79.5	78.6
	WT	C2	0.17 mg/ml PG3462p22	54.6		?	81.0
	V303K	D2	0.15 mg/ml PG3462p23	53.3			80.2
	E382Q	E2	0.15 mg/ml PG3462p24	54.4			80.7
	E382T	F2	0.18 mg/ml PG3462p25	55.0		81.5	80.7
	E388L	G2	0.14 mg/ml PG3462p26	54.0			80.7
	E388T	H2	0.06 mg/ml PG3462p27	?			83.7?

[0668] 大部分具有分离变体的双特异性抗体仅展现熔化温度的适度降低(约2°C-3°C)。

[0669] TM1: 半IgG

[0670] 在半IgG及一个PB中发现的早期TM有可能归因于彼PB制备中的半IgG。全部半IgG的TM1为类似的(相较于DE半转染而言, KK的TM1较低; V303K的TM1最低)。

[0671] TM2:Fc熔化

[0672] 具有于KK侧上的变体的PB具有经降低的TM2(降低2℃-3℃)。

[0673] V303变体(于DE侧及KK侧二者上)引起PB中的TM2 s降低。

[0674] TM3:Fab熔化

[0675] 如自WT IgG1对照所预期, 在全部PB中检测到约~78-79℃(参见图20及21)。此指示PB的稳定性不受Fc变体严重影响。

[0676] TAGG:在全部PB中均相同, 在KK半IgG中较高

[0677] E388T半IgG具有高TAGG。

[0678] 概述

[0679] 表26

[0680]

PB		CIEX						热稳定性	
DE	KK	RT DEDE	RT PB	RT KK	RT KKKK	ΔRT (PB-DEDE)	ΔRT (PB-KK)	T _m (°C) - Fc	Tagg 266 (°C)
WT	WT	12.9	14.3	18.0	19.5	1.4	3.7	68.2	79.1
WT	WT	13.0	14.3	18.0	19.5	1.3	3.7	67.9	78.6
K370S	WT	12.5	14.1	17.9	19.5	1.6	3.9	68.0	78.7
K370T	WT	12.5	14.1	17.9	19.5	1.6	3.9	68.5	78.6
V303E	WT	12.3	13.9	17.9	19.4	1.6	4.0	66.6	77.9
WT	V303K	13.0	15.0	19.2	20.7	2.0	4.2	65.5	77.6
WT	E382Q	13.0	14.7	18.8	20.4	1.7	4.1	66.6	77.9
WT	E382T	13.0	14.7	18.8	20.4	1.7	4.1	66.5	78.7
WT	E388L	13.0	14.7	19.0	20.6	1.7	4.3	66.1	78.1
WT	E388T	12.9	14.8			1.9		66.1	78.2

[0681] 所测试的CH2变体及CH3变体全部有利地影响双特异性抗体与DEDE分子及KK分子的分离。一些变体具有较高作用。热稳定性仅适度地受分离变体影响。这些相对粗制备物中的半抗体百分比相比于相应分离变体而言还相对恒定且与WT类似, 有效地具有0%半抗体的E388T除外。

[0682] 本发明提供作为本发明的一部分的以下方面。

[0683] 方面

[0684] 方面1:一种免疫球蛋白CH1区, 其包括在免疫球蛋白中未经表面暴露的氨基酸的变体, 其中该变体选自

[0685] -中性氨基酸变带负电氨基酸;

[0686] -带正电氨基酸变中性氨基酸;

[0687] -带正电氨基酸变带负电氨基酸;

[0688] -中性氨基酸变带正电氨基酸;

[0689] -带负电氨基酸变中性氨基酸; 以及

[0690] -带负电氨基酸变带正电氨基酸。

[0691] 方面2:根据方面1的免疫球蛋白区, 其包括在免疫球蛋白中未经表面暴露的氨基酸的两个或更多个变体。

- [0692] 方面3:根据方面1或方面2的免疫球蛋白区,其为人类免疫球蛋白区。
- [0693] 方面4:根据方面1至3中任一方面的免疫球蛋白区,其中该或此类未经表面暴露的氨基酸为内埋式的。
- [0694] 方面5:根据方面1至4中任一方面的免疫球蛋白区,其为IgG区,优选地—IgG1区。
- [0695] 方面6:一种免疫球蛋白CH1区,其包括选自以下的氨基酸的变体:T120、K147、D148、Y149、V154、N159、A172、Q175、S190、N201以及K213(EU编号)。
- [0696] 方面7:根据方面6的免疫球蛋白CH1区,其包括选自以下的氨基酸的变体:D148、Y149、V154、N159、A172、S190以及N201。
- [0697] 方面8:根据方面6或方面7的免疫球蛋白CH1区,其包括选自N159和/或N201的氨基酸的变体。
- [0698] 方面9:一种抗体,其包括根据方面1至8中任一方面的CH1区。
- [0699] 方面10:根据方面9的抗体,其包括两个或更多个根据方面1至8中任一方面的CH1区。
- [0700] 方面11:根据方面9或方面10的抗体,其包括不同重链。
- [0701] 方面12:根据方面11的抗体,其为多特异性抗体。
- [0702] 方面13:根据方面11或12的多特异性抗体,其中此类重链包括可相容异源二聚化区。
- [0703] 方面14:根据方面13的多特异性抗体,其包括可相容异源二聚化CH3区。
- [0704] 方面15:根据方面12至14的多特异性抗体,其中此类重链中的一者包括CH3变体L351D及L368E,且此类重链中的另一者包括CH3变体T366K及L351K。
- [0705] 方面16:根据方面9至15中任一方面的抗体,其为IgG1抗体。
- [0706] 方面17:根据方面9至16中任一方面的抗体,其包括一个或多个抗体轻链。
- [0707] 方面18:根据方面9至17中任一方面的抗体,其包括共同抗体轻链。
- [0708] 方面19:一种组合物,其包括根据方面1至8中任一方面的免疫球蛋白区或根据方面9至18中任一方面的抗体。
- [0709] 方面20:一种药物组合物,其包括根据方面1至8中任一方面的免疫球蛋白区或根据方面9至18中任一方面的抗体。
- [0710] 方面21:一种核酸,其编码根据方面1至8中任一方面的CH1区或根据方面9至18中任一方面的抗体。
- [0711] 方面22:一种核酸,其编码根据方面9至18中任一方面的抗体。
- [0712] 方面23:一种重组宿主细胞,其包括根据方面21或方面22的核酸。
- [0713] 方面24:一种产生根据方面9至18中任一方面的抗体的方法,其中该方法包括以下步骤:
- [0714] 提供编码具有根据方面1至8中任一方面的CH1区的第一重链的核酸;
- [0715] 提供编码第二重链的核酸,其中该第一重链及该第二重链可为相同或不同的;
- [0716] 提供编码轻链的核酸;
- [0717] 将该核酸引入宿主细胞中且培养此类宿主细胞以表现该或此类核酸;以及通过执行以下步骤中的至少一个来产生该抗体:
- [0718] 自宿主细胞培养物收集该抗体,

- [0719] 执行收获物澄清，
- [0720] 执行蛋白质捕获，
- [0721] 执行阴离子交换层析，以及
- [0722] 执行阳离子交换层析以将该抗体与另一抗体或抗体片段分离。
- [0723] 方面25：一种产生根据方面9至18中任一方面的抗体的方法，其中该方法包括以下步骤：
- [0724] 提供编码具有根据方面1至8中任一方面的CH1区的第一重链的核酸；
- [0725] 提供编码第二重链的核酸，其中该第一重链及该第二重链可为相同或不同的；
- [0726] 提供编码轻链的核酸；
- [0727] 将该核酸引入宿主细胞中且培养此类宿主细胞以表现该或此类核酸；以及
- [0728] 自宿主细胞培养物收集该抗体，以及
- [0729] 在分离步骤中通过在凝胶上进行等电聚焦来将该抗体与其他抗体或抗体片段分离。
- [0730] 方面26：根据方面24或25的方法，其中该第一重链及该第二重链包括可相容异源二聚化区，优选地可相容CH3异源二聚化区。
- [0731] 方面27：一种用于产生多特异性抗体的方法，该多特异性抗体包括等电点不同的第一重链及第二重链，其中该方法包括以下步骤：
- [0732] 提供编码该第一重链的CH1区的核酸及编码该第二重链的CH1区的核酸，以使得第一经编码重链的等电点与第二经编码重链的等电点不同，其中此类CH1区中的至少一者包括在选自T120、K147、D148、Y149、V154、N159、A172、Q175、S190、N201以及K213 (EU编号) 的位置处的氨基酸变体，以及
- [0733] 培养宿主细胞以表现该核酸；以及
- [0734] 使用等电点差异自宿主细胞培养物收集该多特异性抗体，此举进一步包括以下步骤：
- [0735] 自该宿主细胞培养物收集该抗体，
- [0736] 执行收获物澄清，
- [0737] 执行蛋白质捕获，
- [0738] 执行阴离子交换层析，以及
- [0739] 执行阳离子交换层析以将该抗体与另一抗体或抗体片段分离。
- [0740] 方面28：一种用于纯化多特异性抗体的方法，该多特异性抗体包括等电点不同的第一重链及第二重链，其中该方法包括以下步骤：
- [0741] 提供编码该第一重链的CH1区的核酸及编码该第二重链的CH1区的核酸中的二者或任一者，以使得第一经编码重链与第二经编码重链的等电点不同，其中此类CH1区中的至少一者包括在选自T120、K147、D148、Y149、V154、N159、A172、Q175、S190、N201以及K213 (EU编号) 的位置处的氨基酸变体，以及
- [0742] 培养宿主细胞以表现该核酸；以及
- [0743] 通过进行等电聚焦自宿主细胞培养物纯化该多特异性抗体且将该多特异性抗体与另外抗体或一抗体片段分离。
- [0744] 方面29：根据方面27或方面28的方法，其中编码该第一重链的一同源多聚体的核

酸、编码该第二重链的同源多聚体的核酸以及编码该第一重链及该第二重链的异源多聚体的核酸表达为具有不同等电点的蛋白质且在离子交换层析中产生不同滞留时间。

[0745] 方面30:根据方面27至29中任一方面的方法,其中该一个或多个氨基酸变体的一个或多个位置选自

[0746] -中性氨基酸变带负电氨基酸;

[0747] -带正电氨基酸变中性氨基酸;

[0748] -带正电氨基酸变带负电氨基酸;

[0749] -中性氨基酸变带正电氨基酸;

[0750] -带负电氨基酸变中性氨基酸;以及

[0751] -带负电氨基酸变带正电氨基酸。

[0752] 方面31:根据方面27至30中任一方面的方法,其中该第一重链及该第二重链包括可相容CH3异源二聚化区。

[0753] 方面32:根据方面31的方法,其中此类可相容CH3异源二聚化区中的一者包括L351D及L368E变体且另一者包括T366K及L351K变体。

[0754] 方面33:一种含CH1免疫球蛋白多肽,其包括在位置120、位置147、位置148、位置149、位置154、位置159、位置172、位置175、位置190、位置201或位置213处的第一带电氨基酸残基。

[0755] 方面34:根据方面33的含CH1免疫球蛋白多肽,除根据方面33的带电残基以外,还包括在选自位置120、位置147、位置148、位置149、位置154、位置159、位置172、位置175、位置190、位置201或位置213的不同位置处的第二带电氨基酸残基。

[0756] 方面35:一种含CH1免疫球蛋白多肽,其包括在位置197和/或位置213处的中性氨基酸残基或带负电氨基酸残基。

[0757] 方面36:一种含CH1免疫球蛋白多肽,其包括在位置159处的中性氨基酸残基或带正电氨基酸残基及在铰链位置216处的带正电氨基酸残基。

[0758] 方面37:一种免疫球蛋白蛋白质,其包括第一含CH1免疫球蛋白多肽和第二含CH1免疫球蛋白多肽,其中该第一含CH1免疫球蛋白多肽和/或该第二含CH1免疫球蛋白多肽包括选自在CH1区内未经表面暴露的氨基酸的一个或多个氨基酸的一个或多个变体,以使得包括该第一含CH1免疫球蛋白多肽和该第二含CH1免疫球蛋白多肽的该免疫球蛋白蛋白质的等电点不同于仅含有第一CH1-免疫球蛋白多肽的免疫球蛋白蛋白质或仅含有第二CH1-免疫球蛋白多肽的蛋白质的等电点。

[0759] 方面38:根据方面37的免疫球蛋白蛋白质,其中该一个或多个氨基酸的一个或多个变体选自在内埋式CH1区内的氨基酸。

[0760] 方面39:一种组合物,其包括根据方面1至18中任一方面的免疫球蛋白区或抗体,该免疫球蛋白区或抗体进一步包括在选自T197的氨基酸处及在铰链位置E216处的变体。

[0761] 方面40:一种免疫球蛋白蛋白质,其包括第一含CH1区免疫球蛋白多肽和第二含CH1区免疫球蛋白多肽,其中一个CH1区包括未经表面暴露的氨基酸的一个或多个变体,其中该氨基酸的一个或多个变体来自:

[0762] -中性氨基酸变带负电氨基酸;

[0763] -带正电氨基酸变中性氨基酸;以及

- [0764] -带正电氨基酸变带负电氨基酸;或来自:
- [0765] -中性氨基酸变带正电氨基酸;
- [0766] -带负电氨基酸变中性氨基酸;以及
- [0767] -带负电氨基酸变带正电氨基酸。
- [0768] 方面41:一种免疫球蛋白蛋白质,其包括第一含CH1区免疫球蛋白多肽和第二含CH1区免疫球蛋白多肽,其中一个CH1区包括未经表面暴露的氨基酸的一个或多个变体,其中该氨基酸的一个或多个变体来自:
- [0769] -中性氨基酸变带负电氨基酸;
- [0770] -带正电氨基酸变中性氨基酸;以及
- [0771] -带正电氨基酸变带负电氨基酸;
- [0772] 且另CH1区包括未经表面暴露的氨基酸的一个或多个变体,其中该氨基酸的一个或多个变体来自:
- [0773] -中性氨基酸变带正电氨基酸;
- [0774] -带负电氨基酸变中性氨基酸;以及
- [0775] -带负电氨基酸变带正电氨基酸。
- [0776] 方面42:一种免疫球蛋白蛋白质,其包括第一含CH1区免疫球蛋白多肽和第二含CH1区免疫球蛋白多肽,其中该第一含CH1区免疫球蛋白多肽和/或该第二含CH1区免疫球蛋白多肽包括选自在该CH1区内未经表面暴露的氨基酸的一个或多个氨基酸的一个或多个变体,以使得包括该第一含CH1区免疫球蛋白多肽和该第二含CH1区免疫球蛋白多肽的该免疫球蛋白蛋白质的等电点不同于仅含有第一CH1区免疫球蛋白多肽的免疫球蛋白蛋白质的等电点并且不同于仅含有第二CH1区免疫球蛋白多肽的免疫球蛋白蛋白质的等电点。
- [0777] 方面43:根据方面40至42中任一方面的免疫球蛋白蛋白质,其包括人类CH1区。
- [0778] 方面44:根据方面40至43中任一方面的免疫球蛋白蛋白质,其为IgG。
- [0779] 方面45:根据方面40至44中任一方面的免疫球蛋白蛋白质,其中该或此类未经表面暴露的氨基酸为内埋式的。
- [0780] 方面46:根据方面40至44中任一方面的免疫球蛋白蛋白质,其包括在具有选自T120、K147、D148、Y149、V154、N159、A172、Q175、S190、N201以及K213的氨基酸的CH1区中的氨基酸的变体氨基酸的变体。
- [0781] 方面47:根据方面46的免疫球蛋白蛋白质,其包括选自D148、Y149、V154、N159、A172、S190以及N201的氨基酸的变体。
- [0782] 方面48:根据方面47的免疫球蛋白蛋白质,其包括N159和/或N201的氨基酸的变体。
- [0783] 方面49:根据方面40至48中任一方面的免疫球蛋白蛋白质,其中该第一含CH1区免疫球蛋白多肽和该第二含CH1区免疫球蛋白多肽为重链。
- [0784] 方面50:根据方面40至49中任一方面的免疫球蛋白蛋白质,其为抗体。
- [0785] 方面51:根据方面50的抗体,其为双特异性抗体。
- [0786] 方面52:根据方面50的抗体,其为多特异性抗体。
- [0787] 方面53:根据方面40至52中任一方面的免疫球蛋白蛋白质,其进一步包括在选自T197的氨基酸处及在一铰链位置E216处的变体。

[0788] 方面54:一种组合物,其包括根据方面1至8中任一方面的免疫球蛋白区或根据方面9至18中任一方面的抗体,该免疫球蛋白区或该抗体进一步包括以下变体中的一者或更多者:G122P、I199V、N203I、S207T以及V211I。

序列表

<110> 美勒斯公司(Merus N.V.)

<120> 用于使蛋白质多聚化的变体结构域及其分离

<130> P123081CN10

<150> EP 19173633.9

<151> 2019-05-09

<160> 100

<170> PatentIn 3.5版本

<210> 1

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 轻链

<400> 1

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
          20           25           30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35           40           45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro
          85           90           95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
          100          105          110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
          115          120          125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
          130          135          140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145          150          155          160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
          165          170          175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

```

180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210
<210> 2
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 共同的轻链可变区
<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (321)
<400> 2
gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att agc agc tac 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
tta aat tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc 192
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
gaa gat ttt gca act tac tac tgt caa cag agt tac agt acc cct cca 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro
85 90 95
acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gag atc aaa 321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105
<210> 3
<211> 107
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 3

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
          20           25           30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35           40           45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro
          85           90           95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105

```

<210> 4

<211> 324

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 轻链恒定区

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (324)

<400> 4

```

cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag 48
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1           5           10           15
cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc 96
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
          20           25           30
tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa 144
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
          35           40           45
tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc 192
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

```

50	55	60	
acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag	240		
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu			
65	70	75	80
aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg	288		
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser			
85	90	95	
ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt tag	324		
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
100	105		

<210> 5

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 5

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu			
1	5	10	15
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe			
20	25	30	
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln			
35	40	45	
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser			
50	55	60	
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu			
65	70	75	80
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser			
85	90	95	
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
100	105		

<210> 6

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 共同的轻链可变区

<400> 6

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1	5	10	15
Asp Arg Val Thr	Ile Thr Cys Arg	Ala Ser Gln Ser	Ile Ser Ser Tyr
20	25	30	
Leu Asn Trp Tyr	Gln Gln Lys Pro	Gly Lys Ala Pro	Lys Leu Leu Ile
35	40	45	
Tyr Ala Ala Ser	Ser Leu Gln Ser	Gly Val Pro Ser	Arg Phe Ser Gly
50	55	60	
Ser Gly Ser Gly	Thr Asp Phe Thr	Leu Thr Ile Ser	Ser Ser Leu Gln Pro
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala	Thr Tyr Tyr Cys	Gln Gln Ser Tyr	Ser Thr Pro Pro
85	90	95	
Ile Thr Phe Gly	Gln Gly Thr Arg	Leu Glu Ile Lys	
100	105		

<210> 7

<211> 95

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 轻链

<400> 7

Asp Ile Gln Met	Thr Gln Ser Pro	Ser Ser Leu Ser	Ala Ser Val Gly
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr	Ile Thr Cys Arg	Ala Ser Gln Ser	Ile Ser Ser Tyr
20	25	30	
Leu Asn Trp Tyr	Gln Gln Lys Pro	Gly Lys Ala Pro	Lys Leu Leu Ile
35	40	45	
Tyr Ala Ala Ser	Ser Leu Gln Ser	Gly Val Pro Ser	Arg Phe Ser Gly
50	55	60	
Ser Gly Ser Gly	Thr Asp Phe Thr	Leu Thr Ile Ser	Ser Ser Leu Gln Pro
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala	Thr Tyr Tyr Cys	Gln Gln Ser Tyr	Ser Thr Pro
85	90	95	

<210> 8

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 共同的轻链CDR1

<400> 8

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

1 5

<210> 9

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 共同的轻链CDR2

<400> 9

Ala Ala Ser

1

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 共同的轻链CDR3

<400> 10

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro

1 5

<210> 11

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> IgVk3-15/IGJk1

<400> 11

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 12

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> IgVk3-20/IGJk1

<400> 12

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95
Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 13

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> IgVk3-21/IGJk3

<400> 13

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Glu
1 5 10 15
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asp Asn Ile Gly Arg Lys Ser Val
20 25 30
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45
Tyr Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly

65	70	75	80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Gly Ser Ser Asp His			
	85	90	95
Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu			
100	105		

<210> 14

<211> 95

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> IgVk3-15

<400> 14

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly			
1	5	10	15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn			
20	25	30	
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile			
35	40	45	
Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly			
50	55	60	
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser			
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro			
85	90	95	

<210> 15

<211> 96

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> IgVk3-20

<400> 15

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
1	5	10	15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser			
20	25	30	
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu			
35	40	45	
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser			
50	55	60	

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95
 <210> 16
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> VK1-39/IGJK5/Ckappa
 <400> 16
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro
 85 90 95
 Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140
 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160
 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 17

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> IgVk3-15/IGJk1/Ckappa

<400> 17

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 18

<211> 215

<212> PRT

<213> 人工序列

1	5	10	15
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asp Asn Ile Gly Arg Lys Ser Val			
20	25	30	
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr			
35	40	45	
Tyr Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser			
50	55	60	
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly			
65	70	75	80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Gly Ser Ser Asp His			
85	90	95	
Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys			
100	105	110	
Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln			
115	120	125	
Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly			
130	135	140	
Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly			
145	150	155	160
Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala			
165	170	175	
Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser			
180	185	190	
Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val			
195	200	205	
Ala Pro Thr Glu Cys Ser			

210

<210> 20

<211> 96

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> IgV13-21

<400> 20

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Glu
1 5 10 15
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asp Asn Ile Gly Arg Lys Ser Val
20 25 30
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr

35	40	45
Tyr Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser		
50	55	60
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly		
65	70	75
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Gly Ser Ser Asp His		
85	90	95

<210> 21
 <211> 294
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CH1区
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (294)
 <400> 21

```

gct agc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag 48
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1           5           10           15
agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac 96
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20           25           30
ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc 144
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35           40           45
ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc 192
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50           55           60
ctc agc agc gtc gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc 240
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65           70           75           80
tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag 288
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85           90           95
aga gtt 294
Arg Val
  
```

<210> 22
 <211> 98

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 22

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
			35				40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
		50				55					60				
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70				75					80	
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85					90					95		

Arg Val

<210> 23

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 铰链区

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (45)

<400> 23

gag	ccc	aaa	tct	tgt	gac	aaa	act	cac	aca	tgc	cca	ccg	tgc	cca	45
Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	
1				5				10					15		

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 24

Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	--

1	5	10	15
<210> 25			
<211> 330			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> CH2			
<220>			
<221> CDS			
<222> (1) .. (330)			
<400> 25			
gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa 48			
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys			
1	5	10	15
ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg 96			
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val			
20	25	30	
gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac 144			
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr			
35	40	45	
gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag 192			
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu			
50	55	60	
cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac 240			
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His			
65	70	75	80
cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa 288			
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys			
85	90	95	
gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa 330			
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys			
100	105	110	
<210> 26			
<211> 110			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成构建体			
<400> 26			

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 100 105 110

<210> 27

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有L351K和T366K的CH3

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (321)

<400> 27

ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc aag ccc cca tcc cgg gag 48
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Lys Pro Pro Ser Arg Glu
 1 5 10 15
 gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg aag tgc ctg gtc aaa ggc ttc 96
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys Cys Leu Val Lys Gly Phe
 20 25 30
 tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag 144
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 35 40 45
 aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc 192
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 50 55 60
 ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg 240
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 65 70 75 80

aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac 288
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 85 90 95

acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt tga 321
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 100 105

<210> 28

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 28

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

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

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

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

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

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

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

<210> 29

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有L351D和L368E的CH3

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (321)

<400> 29

ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc gac ccc cca tcc cgg gag 48
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Asp Pro Pro Ser Arg Glu

1	5	10	15
gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc gag gtc aaa ggc ttc 96			
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Glu Val Lys Gly Phe			
20	25	30	
tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag 144			
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu			
35	40	45	
aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc 192			
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe			
50	55	60	
ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg 240			
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly			
65	70	75	80
aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac 288			
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr			
85	90	95	
acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt tga 321			
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
100	105		

<210> 30

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 30

Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Asp	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu
1		5				10				15					
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Glu Val Lys Gly Phe															
20						25				30					
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu															
35						40				45					
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe															
50						55				60					
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly															
65						70				75					80
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr															
						85				90					95
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly															

100

<210> 31

<211> 98

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5) .. (5)

<223> 也可为 P

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (32) .. (32)

<223> 也可为A

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (37) .. (37)

<223> 也可为 I

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (40) .. (40)

<223> 也可为 T

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (55) .. (55)

<223> 也可为A

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (73) .. (73)

<223> 也可为A

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (82) .. (82)

<223> 也可为 V

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (86) .. (86)

<223> 也可为 I

<220>

<221> MISC_FEATURE

105

<222> (90) .. (90)

<223> 也可为 T

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (94) .. (94)

<223> 也可为 I

<400> 31

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
			35				40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
		50				55						60			
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70				75					80	
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85						90					95	

Arg Val

<210> 32

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> MF1122 FW1

<400> 32

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser		
			20					25					30		

<210> 33

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> MF1122 CDR1

<400> 33

Ser Tyr Gly Met His

1 5
 <210> 34
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> MF1122 FW2
 <400> 34
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 1 5 10
 <210> 35
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> MF1122 CDR2
 <400> 35
 Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 36
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> MF1122 FW3
 <400> 36
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30
 <210> 37
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> MF1122 CDR3
 <400> 37
 Ala Leu Phe Thr Thr Ile Ala Met Asp Tyr

1	5	10
<210> 38		
<211> 8		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> MF1122 FW4		
<400> 38		
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr		
1	5	
<210> 39		
<211> 119		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> MF1122 VH		
<400> 39		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg		
1	5	10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr		
	20	25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
	35	40 45
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
	50	55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
	85	90 95
Ala Arg Ala Leu Phe Thr Thr Ile Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly		
	100	105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
	115	
<210> 40		
<211> 30		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> MF1516 FW1		

<400> 40

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser

20 25 30

<210> 41

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> MF1516 CDR1

<400> 41

Gln Tyr Ala Met His

1 5

<210> 42

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> MF1516 FW2

<400> 42

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala

1 5 10

<210> 43

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> MF1516 CDR2

<400> 43

Ile Ile Ser His Asp Glu Arg Asn Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Gly Met

1 5 10 15

Gly

<210> 44

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> MF1516 FW3

<400> 44

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 45

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> MF1516 CDR3

<400> 45

Asp Met Arg Lys Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Phe Asp Val
1 5 10

<210> 46

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> MF1516 FW4

<400> 46

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
1 5

<210> 47

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> MF1516 VH

<400> 47

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gln Tyr
 20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
Ala Ile Ile Ser His Asp Glu Arg Asn Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Gly
 50 55 60
Met Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe

65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser	Leu Arg Ser Glu Asp Thr	Ala Val Tyr Tyr	Cys
85	90	95	
Ala Arg Asp Met Arg Lys Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Phe Asp Val Trp			
100	105	110	
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser			
115	120		
<210> 48			
<211> 30			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> MF3462 FW1			
<400> 48			
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser			
20	25	30	
<210> 49			
<211> 5			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> MF3462 CDR1			
<400> 49			
Ser Tyr Ala Met Ser			
1	5		
<210> 50			
<211> 14			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> MF3462 FW2			
<400> 50			
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser			
1	5	10	
<210> 51			
<211> 17			
<212> PRT			

<213> 人工序列

<220>

<223> MF3462 CDR2

<400> 51

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 52

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> MF3462 FW3

<400> 52

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln

1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 53

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> MF3462 CDR3

<400> 53

Gly Lys Ser His Tyr Ser Trp Asp Ala Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 54

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> MF3462 FW4

<400> 54

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 55

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> MF3462 VH

<400> 55

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
			35				40					45			
Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
		50				55				60					
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85				90					95	
Ala	Arg	Gly	Lys	Ser	His	Tyr	Ser	Trp	Asp	Ala	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly
			100					105					110		
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
			115					120							

<210> 56

<211> 127

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> MF1337

<400> 56

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Thr	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Asp	Tyr	Ile	Phe	Thr	Lys	Tyr
			20					25					30		
Asp	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
			35				40					45			
Gly	Trp	Met	Ser	Ala	Asn	Thr	Gly	Asn	Thr	Gly	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
		50				55				60					
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ile	Asn	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Gly	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys
					85				90					95	

Ala Arg Ser Ser Leu Phe Lys Thr Glu Thr Ala Pro Tyr Tyr His Phe
 100 105 110

Ala Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 57

<211> 98

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CH1 WT

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (97) .. (97)

<223> X为K或R

<400> 57

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

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

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

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

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

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

Xaa Val

<210> 58

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CH2 WT

<400> 58

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

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

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 100 105 110

<210> 59

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CH2 Fc-沉默

<400> 59

Ala Pro Glu Leu Gly Arg Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 100 105 110

<210> 60

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CH3 WT

<400> 60

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu

1	5	10	15
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe			
20	25	30	
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu			
35	40	45	
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe			
50	55	60	
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly			
65	70	75	80
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr			
85	90	95	
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
100	105		

<210> 61

<211> 98

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CH1 N201K

<400> 61

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys			
1	5	10	15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr			
20	25	30	
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser			
35	40	45	
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser			
50	55	60	
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr			
65	70	75	80
Tyr Ile Cys Lys Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys			
85	90	95	

Arg Val

<210> 62

<211> 98

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CH1 N201D

<400> 62

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
			35				40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
			50				55					60			
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70				75					80	
Tyr	Ile	Cys	Asp	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
				85					90					95	

Arg Val

<210> 63

<211> 98

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CH1 A172P S190A N201K

<400> 63

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
			35				40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Pro	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
			50				55					60			
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ala	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70				75					80	
Tyr	Ile	Cys	Lys	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
				85					90					95	

Arg Val

<210> 64

<211> 98

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CH1 A172P S190A N201D

<400> 64

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
			35				40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Pro	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
		50					55				60				
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ala	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70					75					80
Tyr	Ile	Cys	Asp	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
				85					90					95	

Arg Val

<210> 65

<211> 98

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CH1 T120K

<400> 65

Ala	Ser	Lys	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
			35				40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
		50					55				60				
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70					75					80
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
				85					90					95	

Arg Val

<210> 66

<211> 98

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CH1 T120D

<400> 66

Ala	Ser	Asp	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
			35					40					45		
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
			50				55					60			
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70				75					80	
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
				85					90					95	

Arg Val

<210> 67

<211> 98

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CH1 T197D K213Q

<400> 67

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
			35					40					45		
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
			50				55					60			
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Asp
65					70				75					80	
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Gln
				85					90					95	

Arg Val

<210> 68

<211> 98

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CH1 D148K Q175K

<400> 68

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5				10					15		
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Lys	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
			35					40					45		
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Lys	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
			50					55					60		
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65						70				75					80
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
				85						90					95

Arg Val

<210> 69

<211> 98

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CH1 N159K

<400> 69

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5				10					15		
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Lys	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
			35					40					45		
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
			50					55					60		
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65						70				75					80
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
				85						90					95

Arg Val

<210> 70

<211> 98

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CH1 N159D

<400> 70

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asp	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
			35				40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
			50				55					60			
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70				75					80	
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85						90					95	

Arg Val

<210> 71

<211> 98

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CH1 N159D K213Q

<400> 71

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asp	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
			35				40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
			50				55					60			
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70				75					80	
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Gln
			85						90					95	

Arg Val

<210> 72

<211> 98

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CH1 K147E Q175E

<400> 72

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5				10					15		
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Glu	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
			35					40					45		
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Glu	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
			50					55					60		
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65						70				75					80
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
				85						90					95

Arg Val

<210> 73

<211> 98

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CH1 Y149A V154I A172P S190A

<400> 73

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5				10					15		
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Ala
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Ile	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
			35					40					45		
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Pro	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
			50					55					60		
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ala	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65						70				75					80
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
				85						90					95

Arg Val

<210> 74

<211> 98

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CH1 K213Q

<400> 74

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
			35				40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
		50				55					60				
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70				75					80	
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Gln
			85						90					95	

Arg Val

<210> 75

<211> 98

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CH1 N201D K213Q

<400> 75

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
			35				40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
		50				55					60				
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70				75					80	
Tyr	Ile	Cys	Asp	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Gln
			85						90					95	

Arg Val

<210> 76

<211> 98

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CH1 T120K N201K

<400> 76

Ala Ser Lys Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Lys Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Arg Val

<210> 77

<211> 98

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CH1 N201K N159K

<400> 77

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Lys Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Lys Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

	85	90	95
Arg Val			
<210> 78			
<211> 98			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> CH1 T120K N159K			
<400> 78			
Ala Ser Lys Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys			
1	5	10	15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr			
	20	25	30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Lys Ser Gly Ala Leu Thr Ser			
	35	40	45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser			
	50	55	60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr			
65	70	75	80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys			
	85	90	95
Arg Val			
<210> 79			
<211> 98			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> CH1 T120K N201K N159K			
<400> 79			
Ala Ser Lys Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys			
1	5	10	15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr			
	20	25	30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Lys Ser Gly Ala Leu Thr Ser			
	35	40	45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser			
	50	55	60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr			
65	70	75	80

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

Arg Val

<210> 80

<211> 98

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CH1 N201D N159D

<400> 80

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

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

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

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

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

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

Arg Val

<210> 81

<211> 98

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CH1 N201D K213Q N159D

<400> 81

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

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

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

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65	70	75	80
Tyr Ile Cys Asp Val	Asn His Lys Pro	Ser Asn Thr Lys Val	Asp Gln
	85	90	95

Arg Val

<210> 82

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CH2 V303E

<400> 82

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

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

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

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

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

Gln Asp Trp Leu Asn	Gly Lys Glu Tyr	Lys Cys Lys Val	Ser Asn Lys
85	90	95	

Ala Leu Pro Ala Pro	Ile Glu Lys Thr	Ile Ser Lys Ala	Lys
100	105	110	

<210> 83

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CH2 V303K

<400> 83

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

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

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

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

50	55	60
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Lys Ser Val Leu Thr Val Leu His		
65	70	75
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys		
85	90	95
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys		
100	105	110
<210> 84		
<211> 110		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> CH2 V303E Fc-沉默		
<400> 84		
Ala Pro Glu Leu Gly Arg Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys		
1	5	10
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val		
20	25	30
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr		
35	40	45
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu		
50	55	60
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Glu Ser Val Leu Thr Val Leu His		
65	70	75
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys		
85	90	95
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys		
100	105	110
<210> 85		
<211> 110		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> CH2 V303K Fc-沉默		
<400> 85		
Ala Pro Glu Leu Gly Arg Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys		
1	5	10
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val		
20	25	30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Lys Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 100 105 110

<210> 86

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CH3 K370S

<400> 86

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
 1 5 10 15
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Ser Gly Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 35 40 45
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 50 55 60
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 65 70 75 80
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 85 90 95
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 100 105

<210> 87

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CH3 K370T

<400> 87

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu

1	5	10	15
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Thr Gly Phe			
	20	25	30
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu			
	35	40	45
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe			
	50	55	60
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly			
65	70	75	80
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr			
	85	90	95
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
	100	105	

<210> 88

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CH3 E382Q

<400> 88

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu			
1	5	10	15
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe			
	20	25	30
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln Pro Glu			
	35	40	45
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe			
	50	55	60
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly			
65	70	75	80
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr			
	85	90	95
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
	100	105	

<210> 89

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CH3 E382T

<400> 89

Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu
1				5				10					15		
Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe
			20					25					30		
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Thr	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu
			35					40					45		
Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe
			50					55					60		
Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly
65							70				75				80
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr
				85					90					95	
Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly						
				100					105						

<210> 90

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CH3 E388L

<400> 90

Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu
1				5				10					15		
Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe
			20					25					30		
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Leu
			35					40					45		
Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe
			50					55					60		
Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly
65							70				75				80
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr
				85					90					95	
Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly						
				100					105						

<210> 91

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CH3 E388M

<400> 91

Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu
1				5					10					15	
Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe
			20					25					30		
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Met
			35					40					45		
Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe
			50					55					60		
Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly
65					70				75						80
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr
				85					90					95	
Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly						
				100					105						

<210> 92

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CH3 E388T

<400> 92

Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu
1				5					10					15	
Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe
			20					25					30		
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Thr
			35					40					45		
Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe
			50					55					60		
Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly
65					70				75						80
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr
				85					90					95	
Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly						

<210> 94
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CH3 L351K; T366K; E382T
<400> 94
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Lys Pro Pro Ser Arg Glu
1 5 10 15
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys Cys Leu Val Lys Gly Phe
20 25 30
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Thr Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
50 55 60
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
65 70 75 80

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

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

<210> 95

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CH3 L351K; T366K; E388L

<400> 95

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

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

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

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

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

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

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

<210> 96

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CH3 L351K;T366K;E388M

<400> 96

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

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

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

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe

50	55	60
Phe Leu Tyr Ser Lys	Leu Thr Val Asp Lys Ser	Arg Trp Gln Gln Gly
65	70	75
Asn Val Phe Ser Cys	Ser Val Met His Glu Ala	Leu His Asn His Tyr
85	90	95
Thr Gln Lys Ser Leu	Ser Leu Ser Pro Gly	
100	105	

<210> 97

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CH3 L351K;T366K;E388T

<400> 97

Gly Gln Pro Arg Glu	Pro Gln Val Tyr Thr	Lys Pro Pro Ser Arg Glu
1	5	10
Glu Met Thr Lys Asn	Gln Val Ser Leu Lys	Cys Leu Val Lys Gly Phe
20	25	30
Tyr Pro Ser Asp Ile	Ala Val Glu Trp Glu	Ser Asn Gly Gln Pro Thr
35	40	45
Asn Asn Tyr Lys Thr	Thr Pro Pro Val Leu	Asp Ser Asp Gly Ser Phe
50	55	60
Phe Leu Tyr Ser Lys	Leu Thr Val Asp Lys Ser	Arg Trp Gln Gln Gly
65	70	75
Asn Val Phe Ser Cys	Ser Val Met His Glu Ala	Leu His Asn His Tyr
85	90	95
Thr Gln Lys Ser Leu	Ser Leu Ser Pro Gly	
100	105	

<210> 98

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CH3 L351D;L368E;K370S

<400> 98

Gly Gln Pro Arg Glu	Pro Gln Val Tyr Thr	Asp Pro Pro Ser Arg Glu
1	5	10
Glu Met Thr Lys Asn	Gln Val Ser Leu Thr	Cys Glu Val Ser Gly Phe
20	25	30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
50 55 60
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
65 70 75 80
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
85 90 95
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
100 105

<210> 99

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CH3 L351D;L368E;K370T

<400> 99

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Asp Pro Pro Ser Arg Glu
1 5 10 15
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Glu Val Thr Gly Phe
20 25 30
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
50 55 60
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
65 70 75 80
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
85 90 95
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
100 105

<210> 100

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 异源二聚体

<400> 100

Asp Glu Lys Lys



图1A



图1B



图1C



图1D



图1E

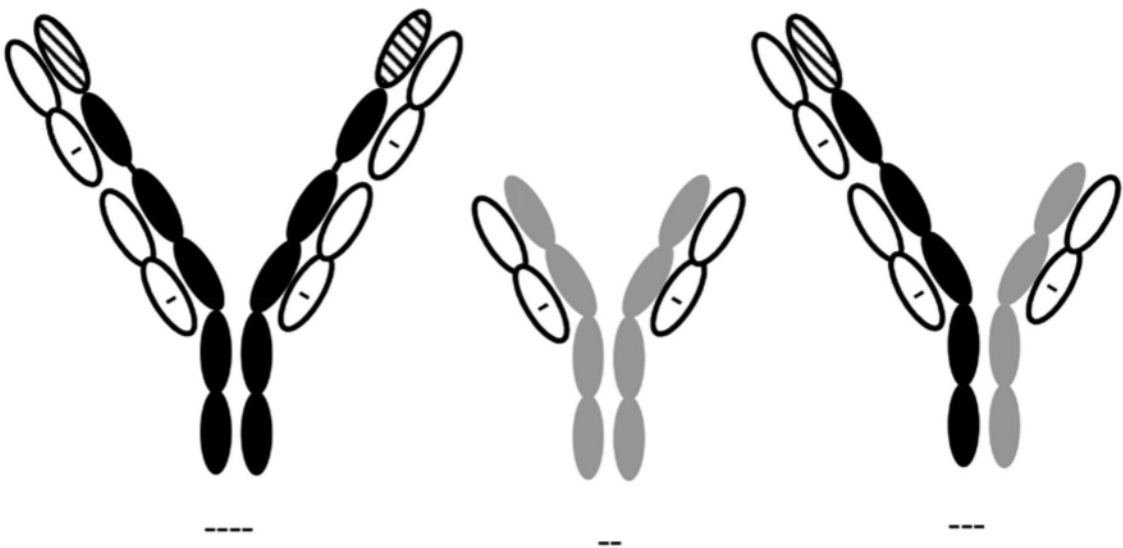


图2A

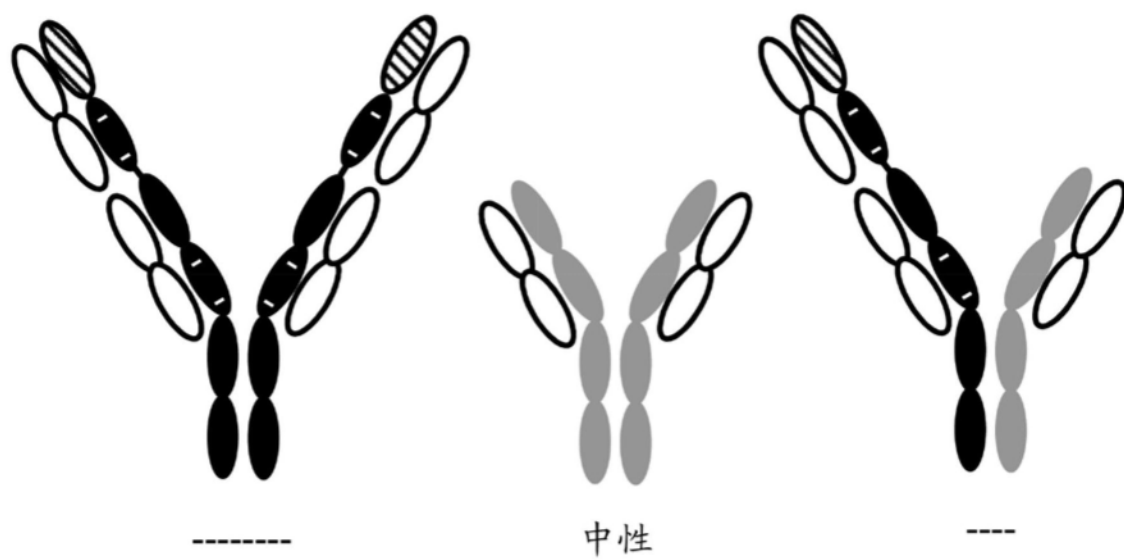


图2B

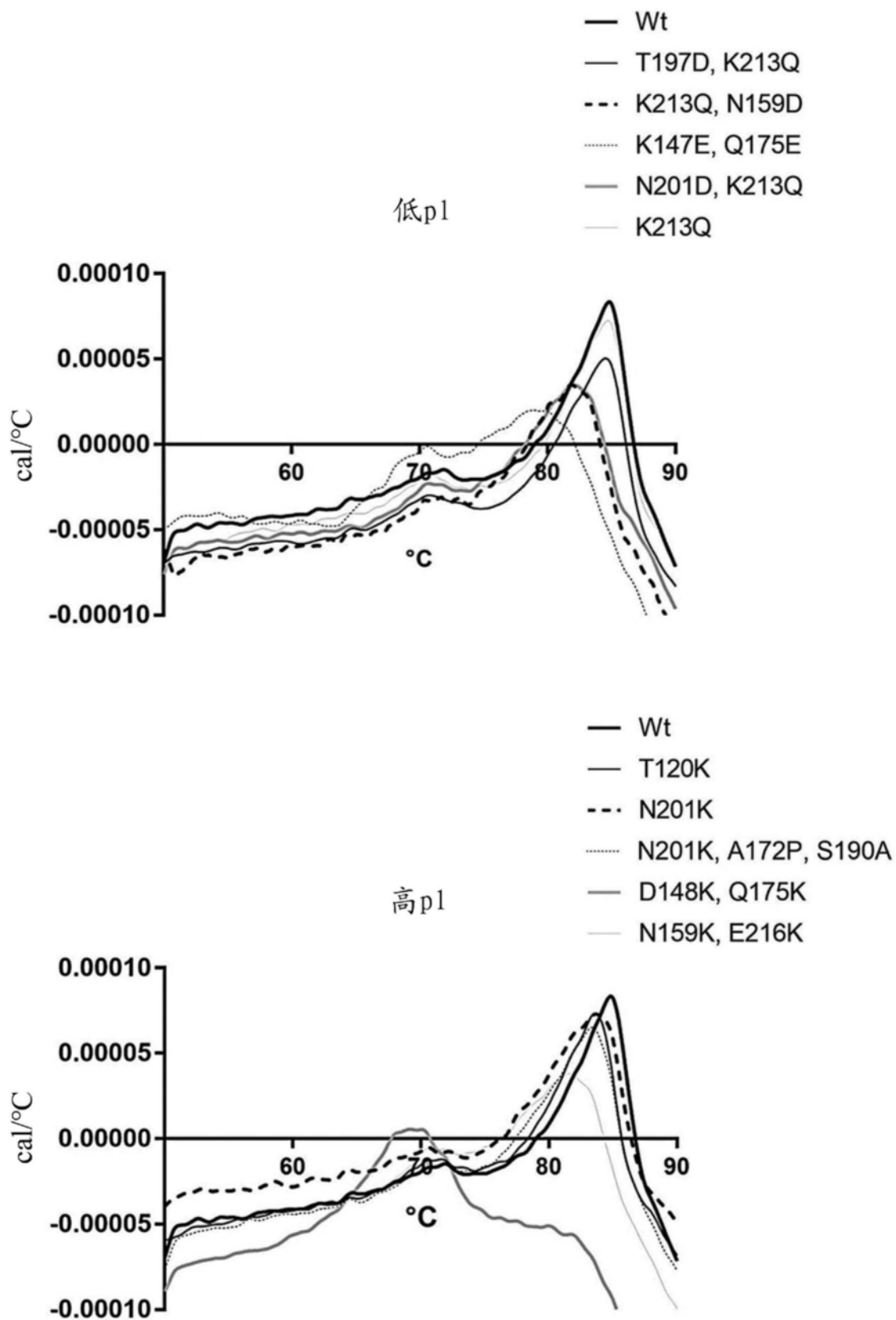


图3

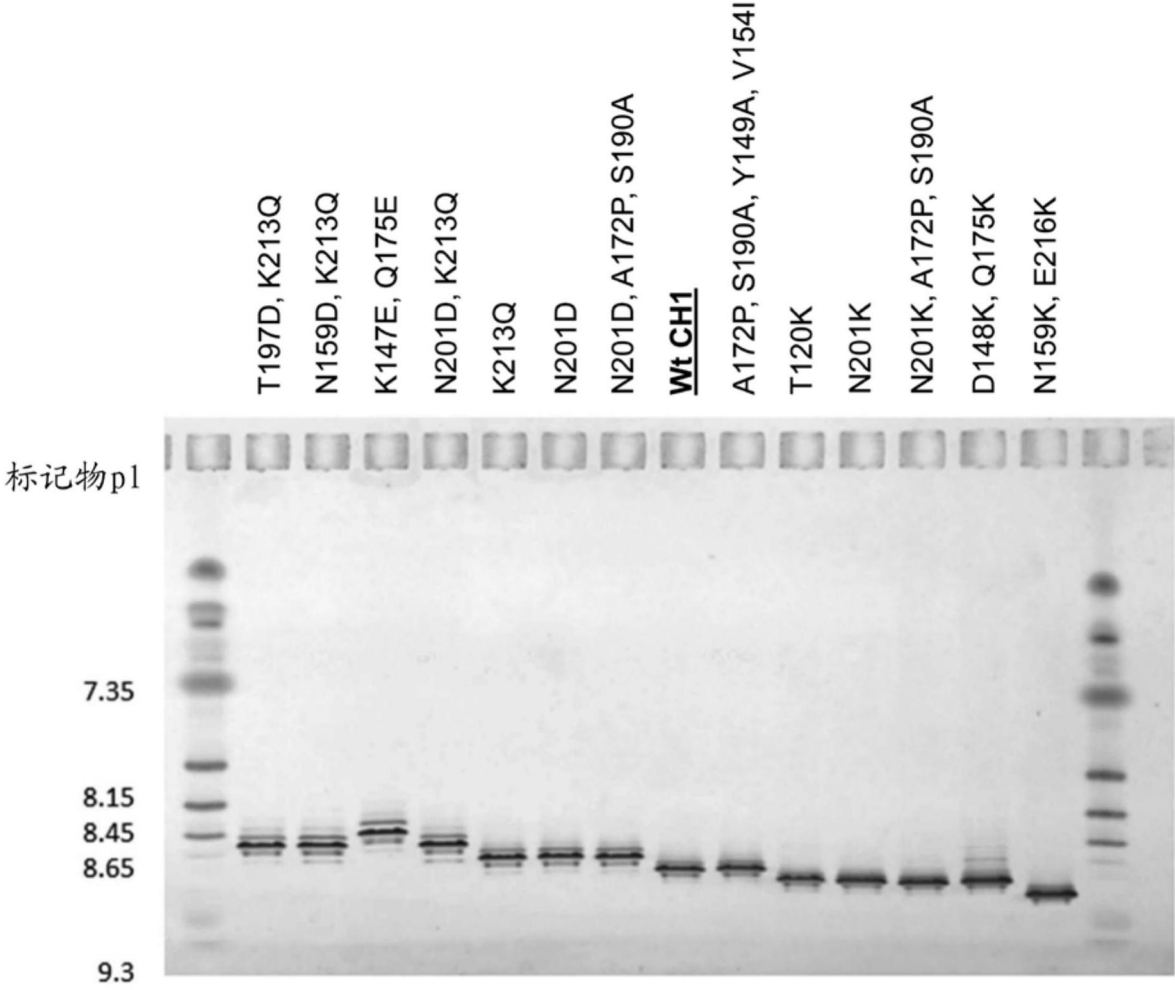


图4

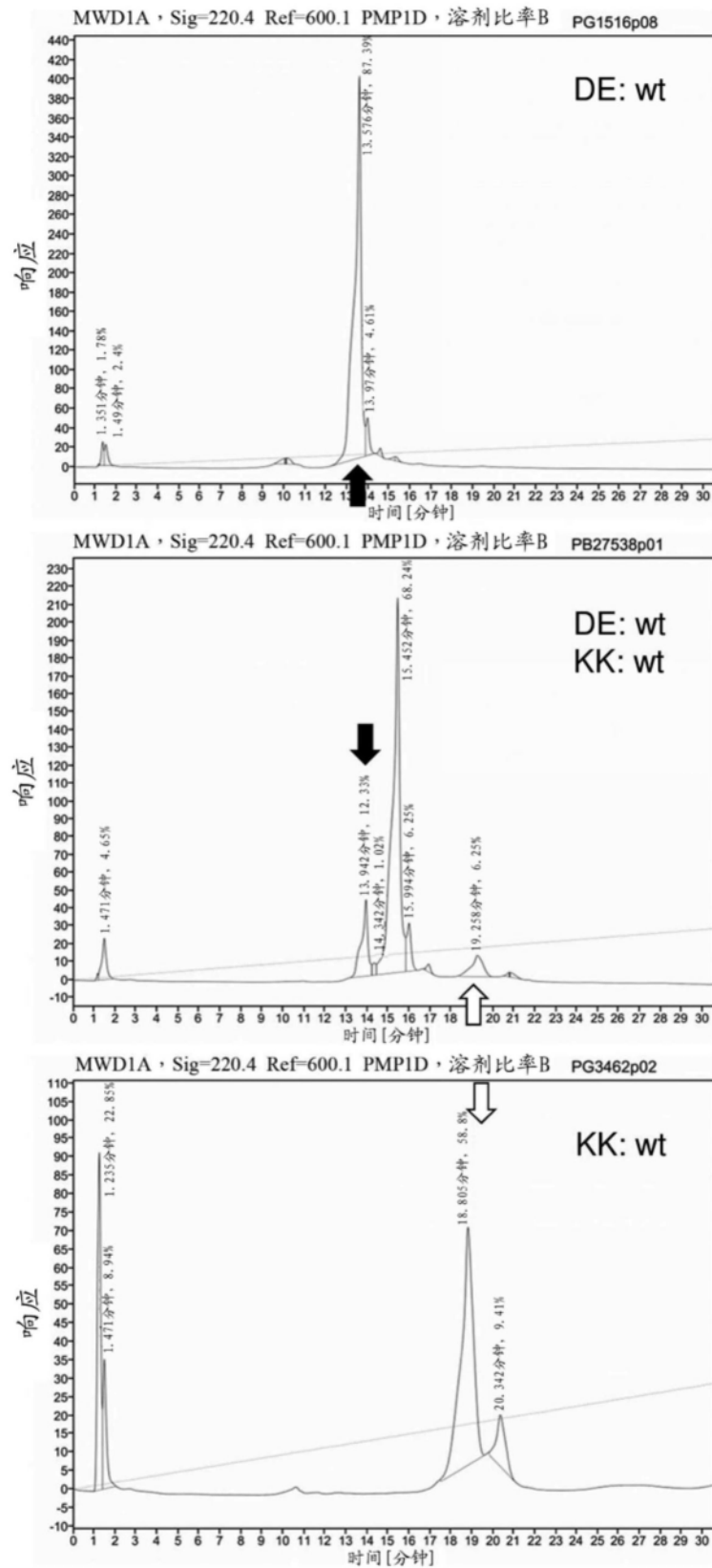


图5

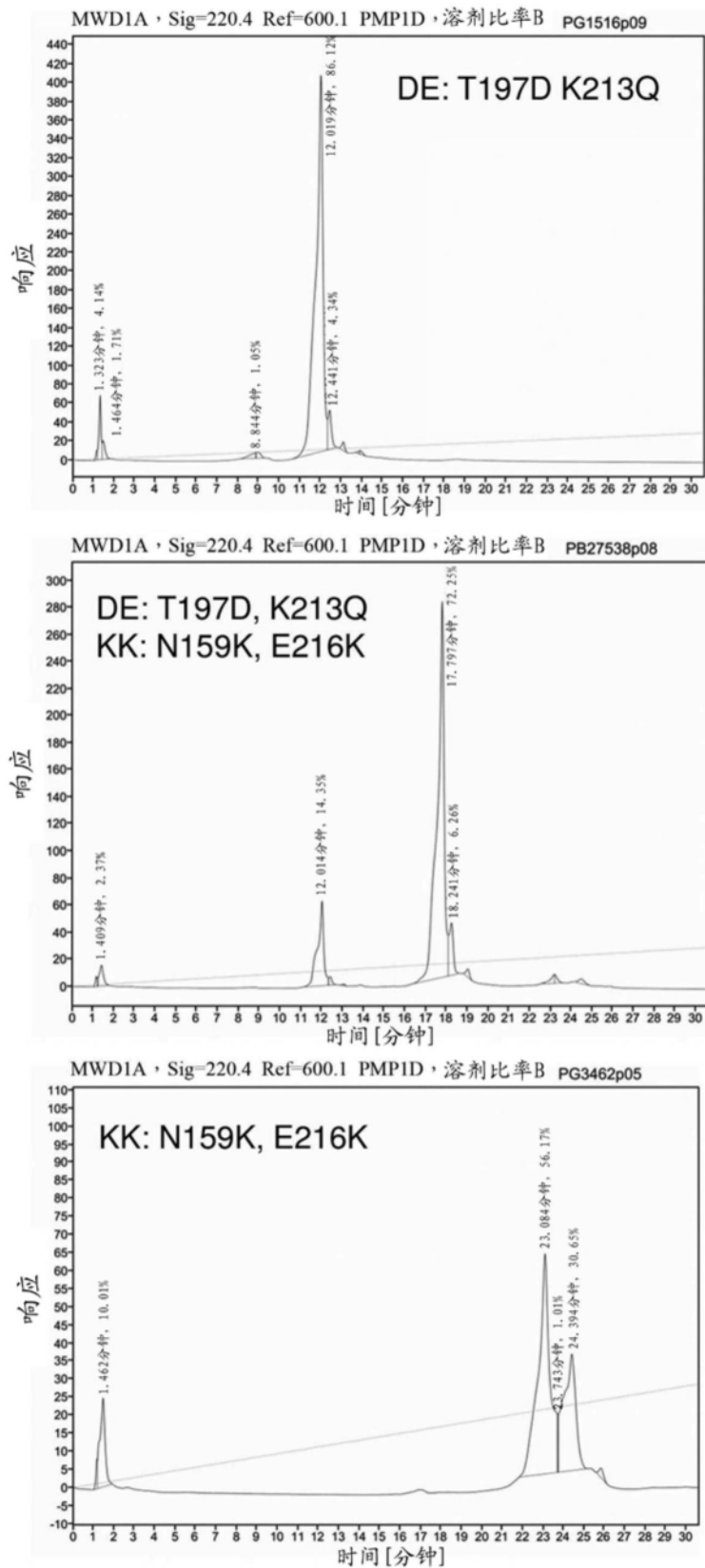


图6

DE臂，具有wt CH1
KK臂，具有变体CH1

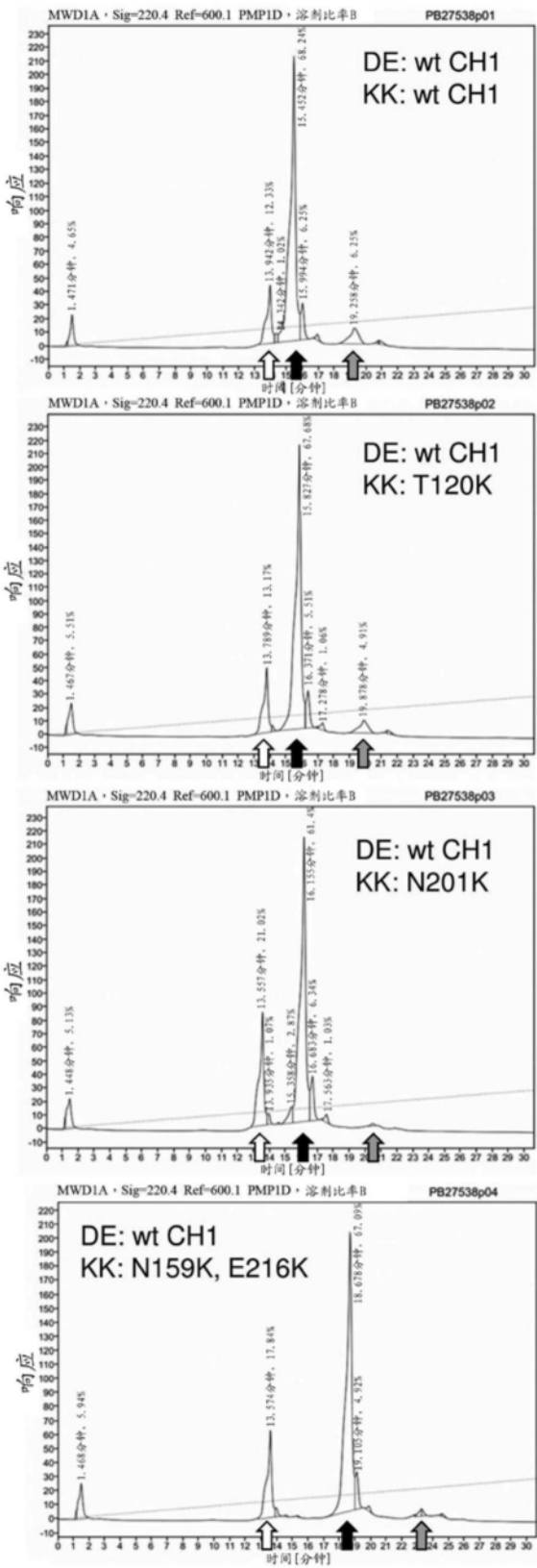
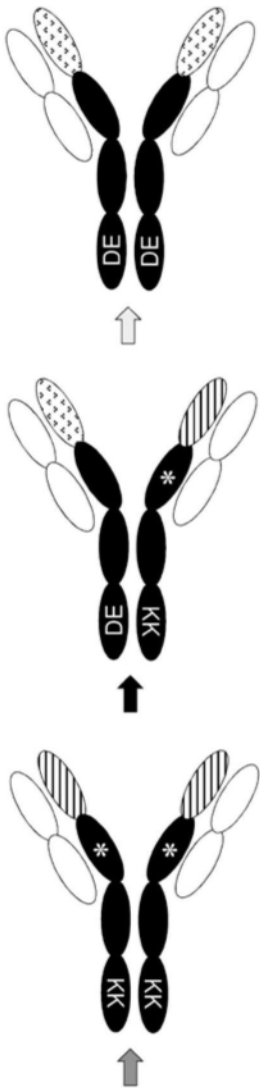


图7

具有变体CH1的DE臂和
具有wt CH1的KK臂

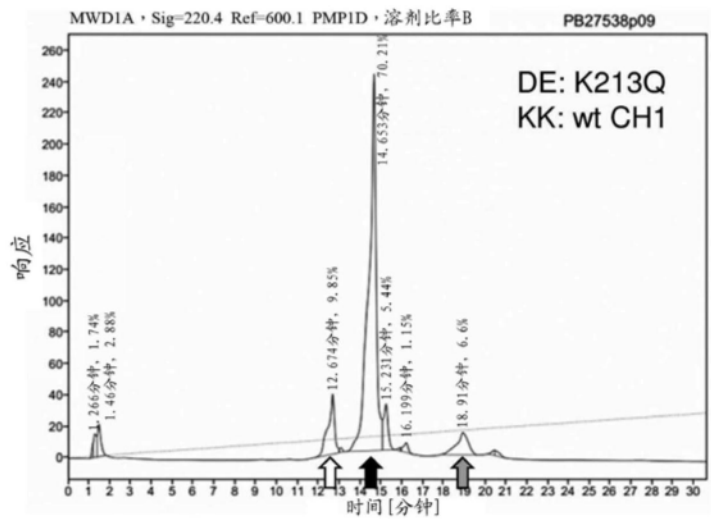
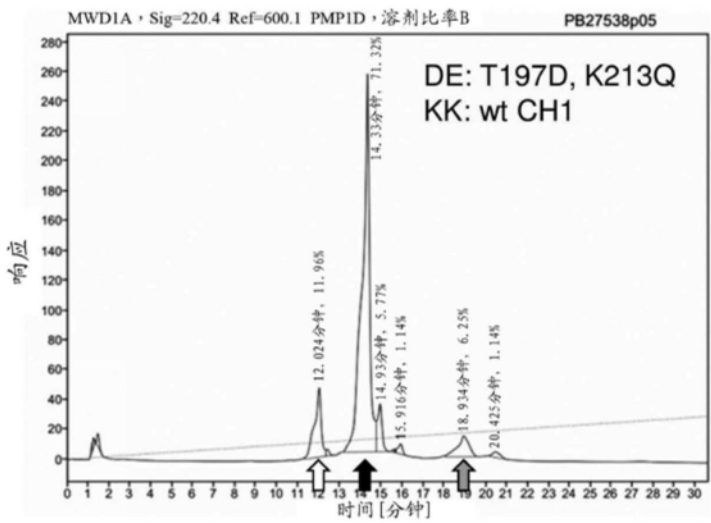
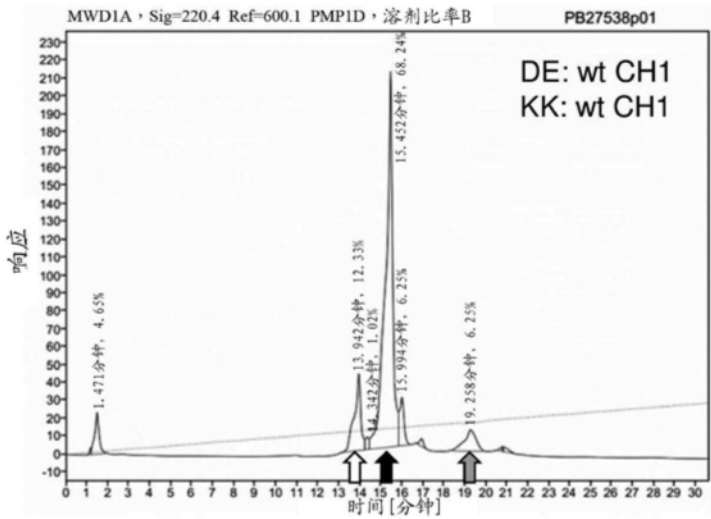


图8

具有T197D、K213Q的DE臂
具有变体CH1的KK臂

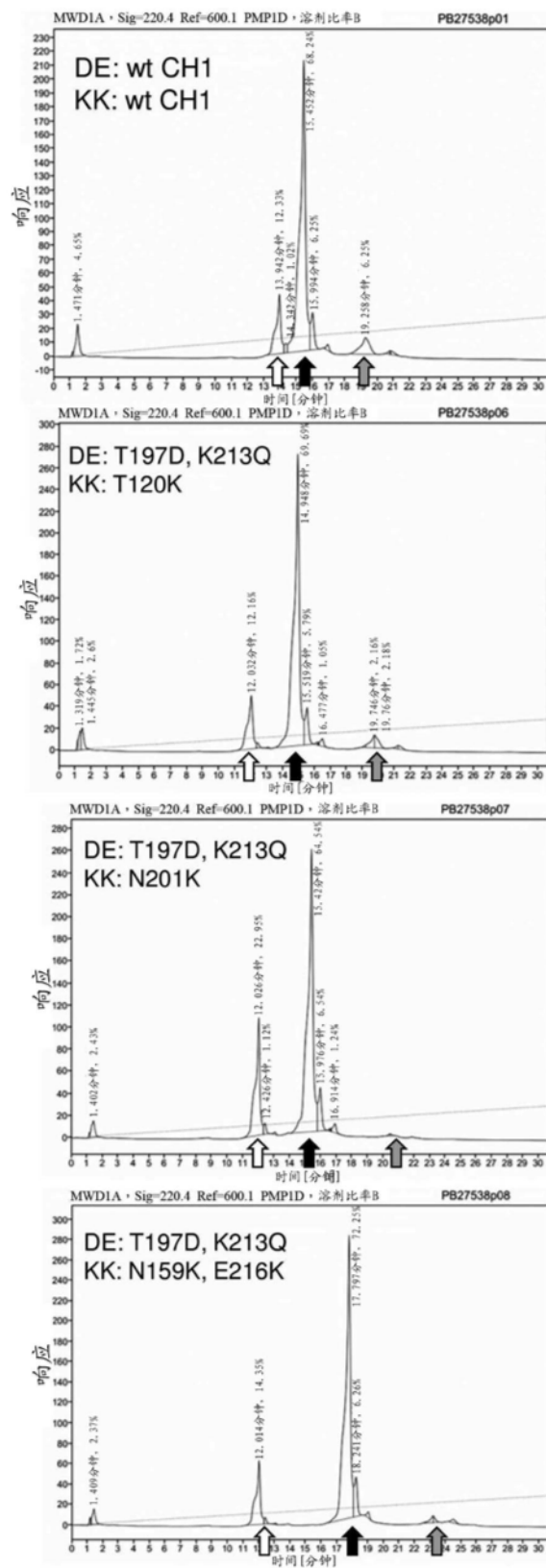
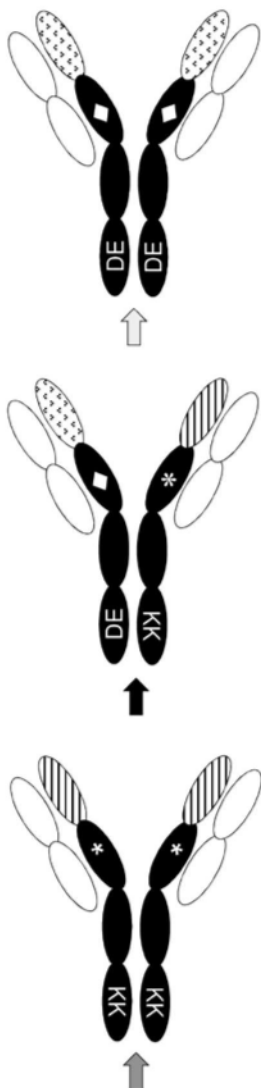


图9

具有K213Q的DE臂
具有变体CH1的KK臂

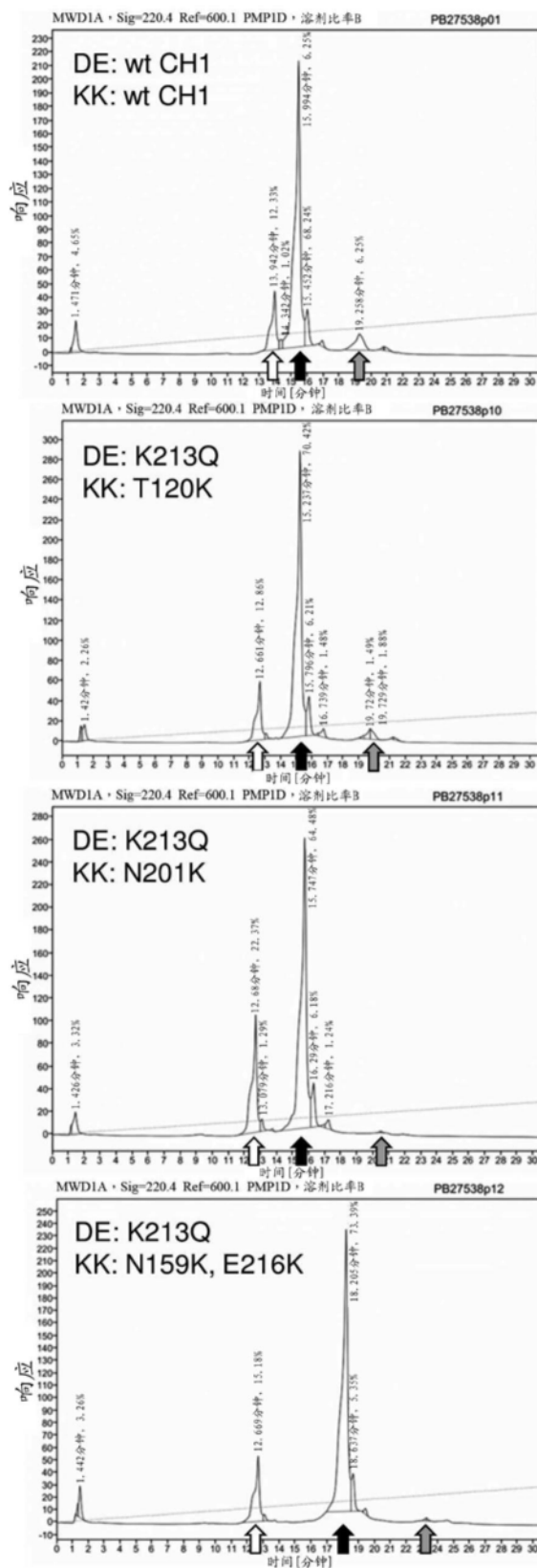
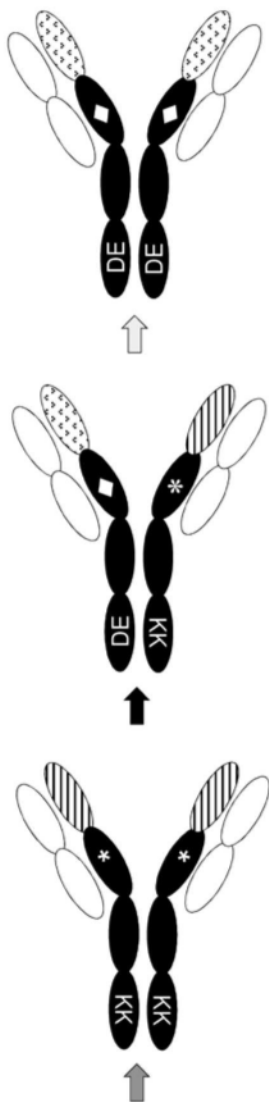


图10

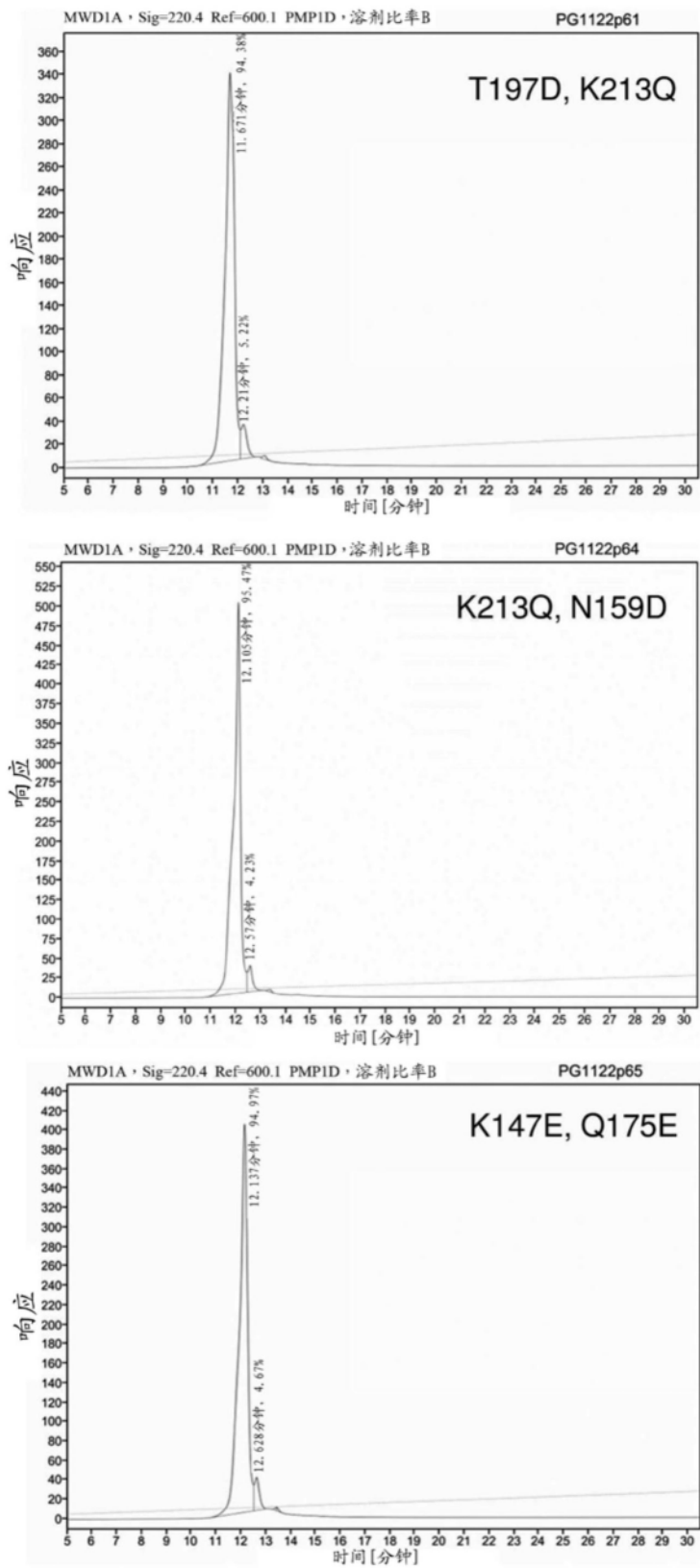


图11 (1-5)

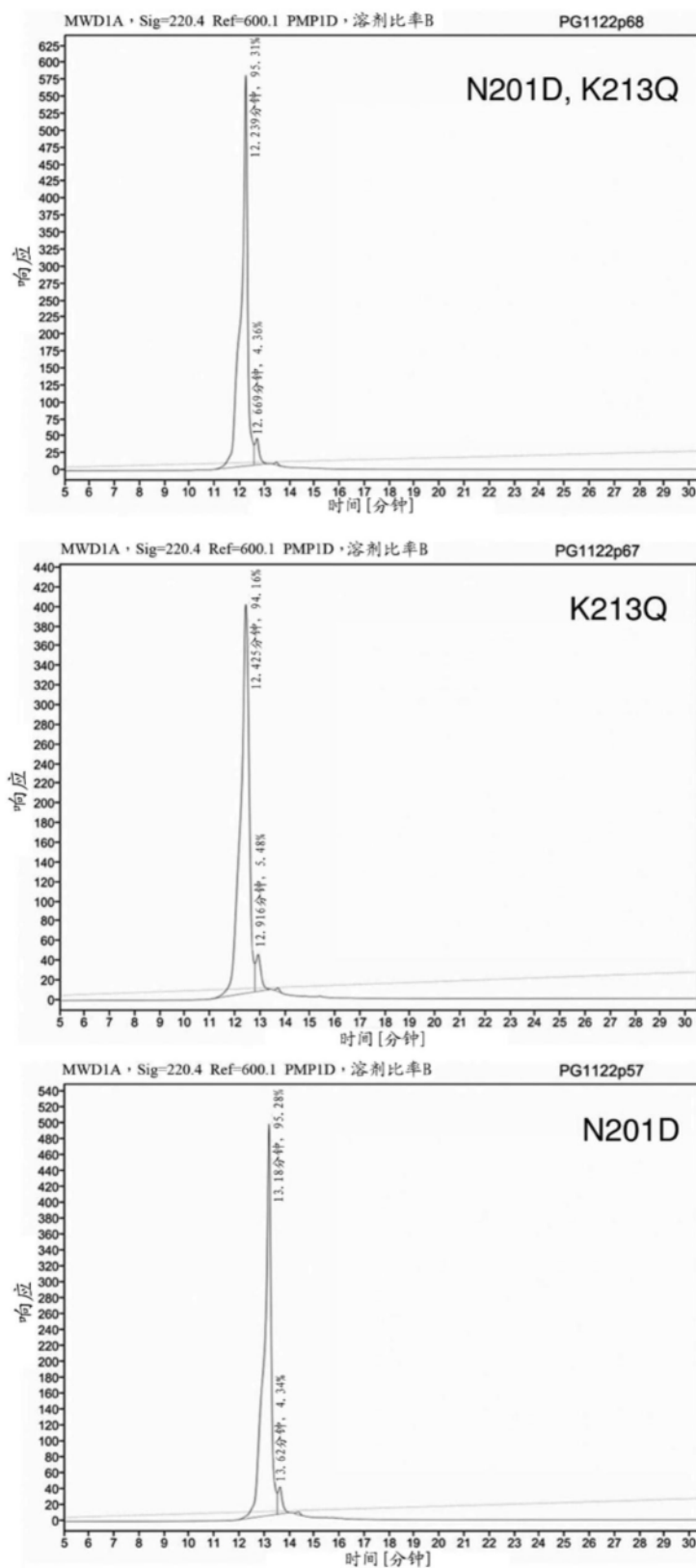


图11 (2-5)

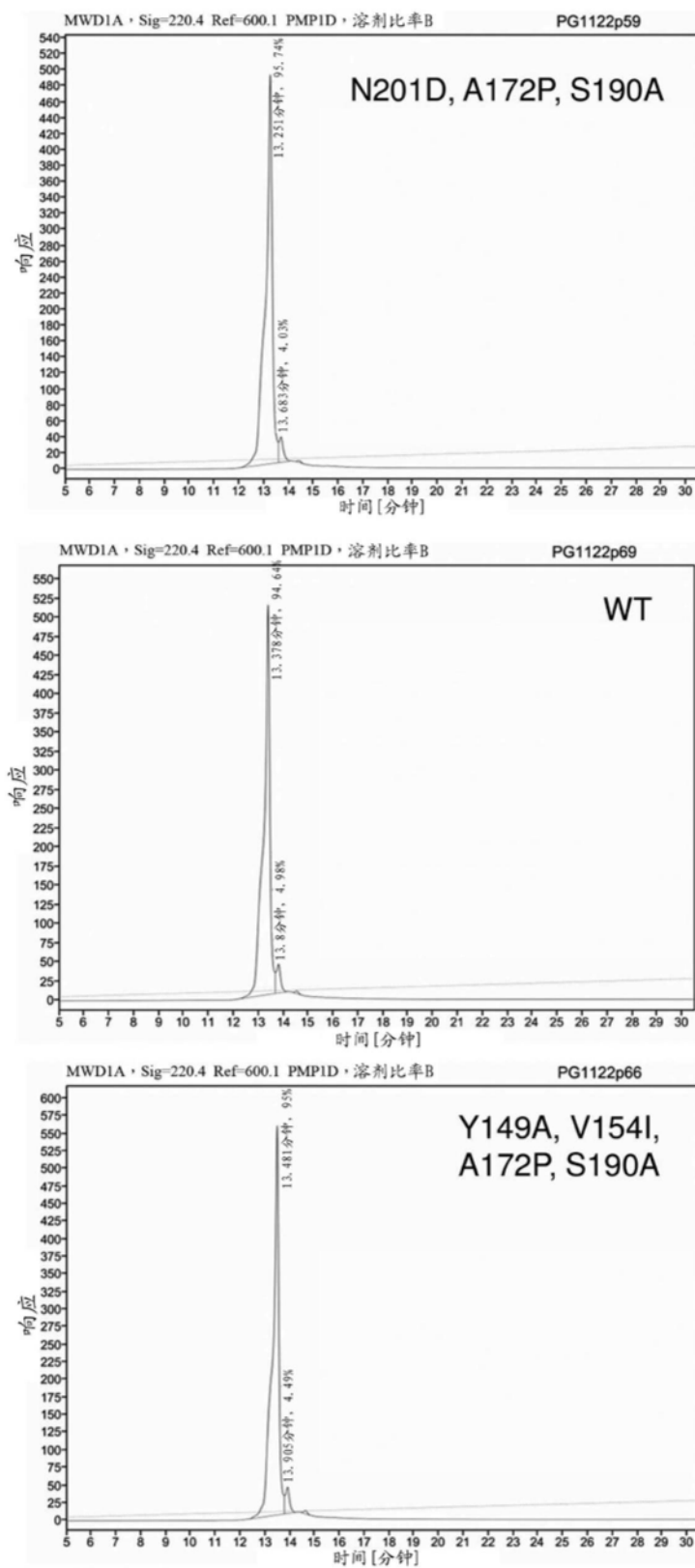


图11 (3-5)

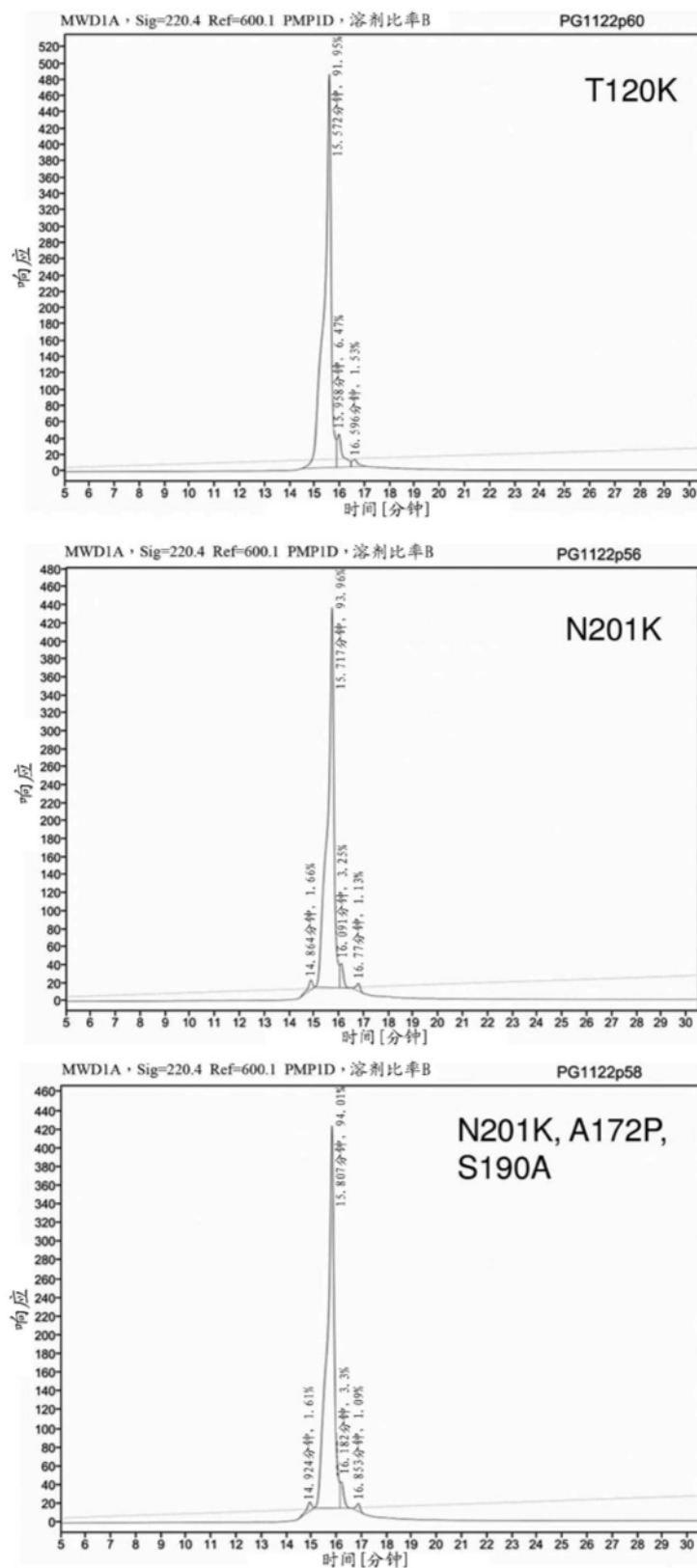


图11 (4-5)

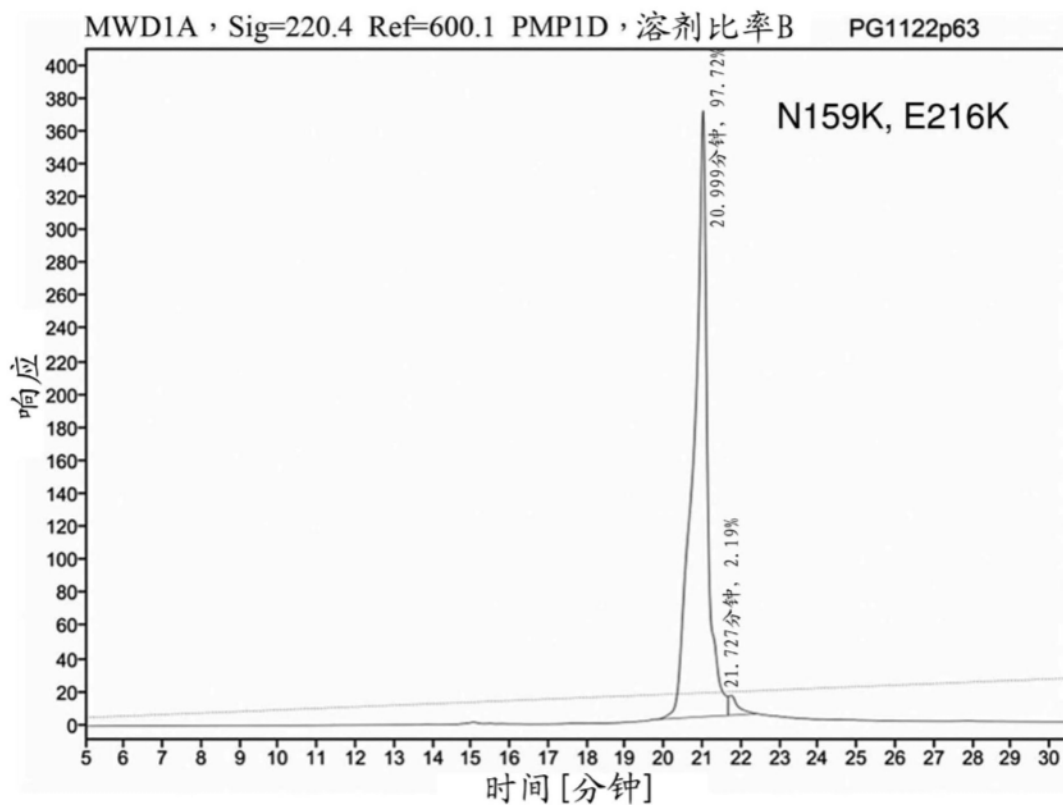
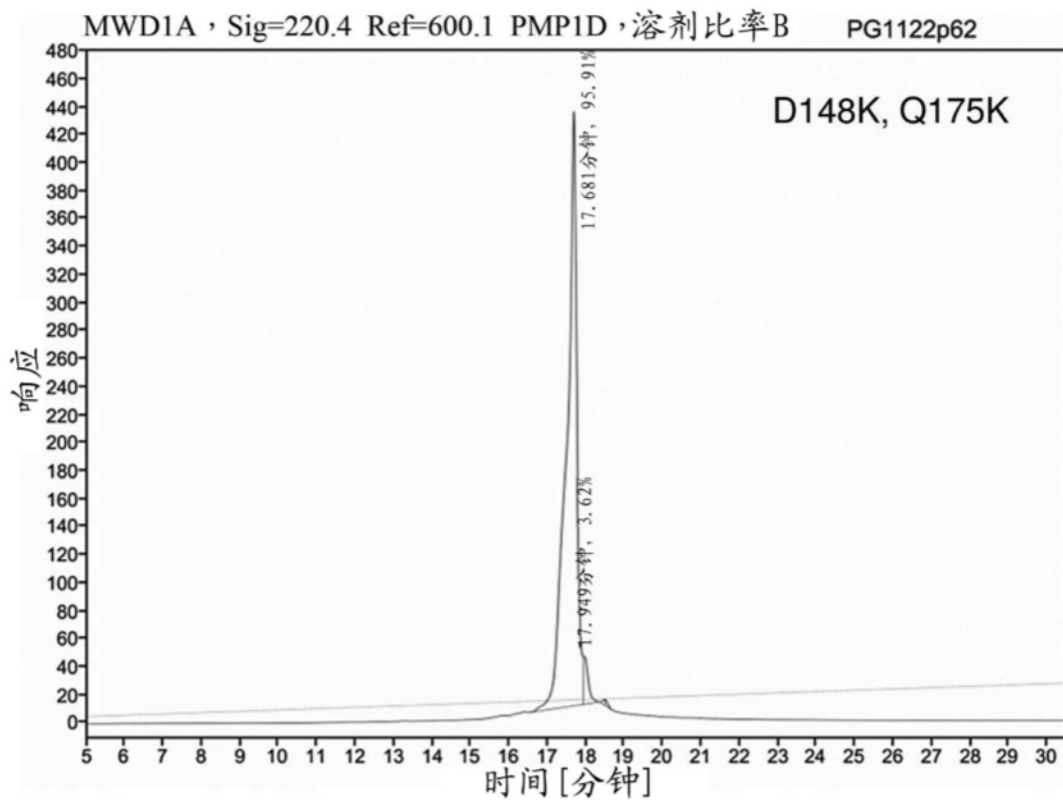


图11 (5-5)

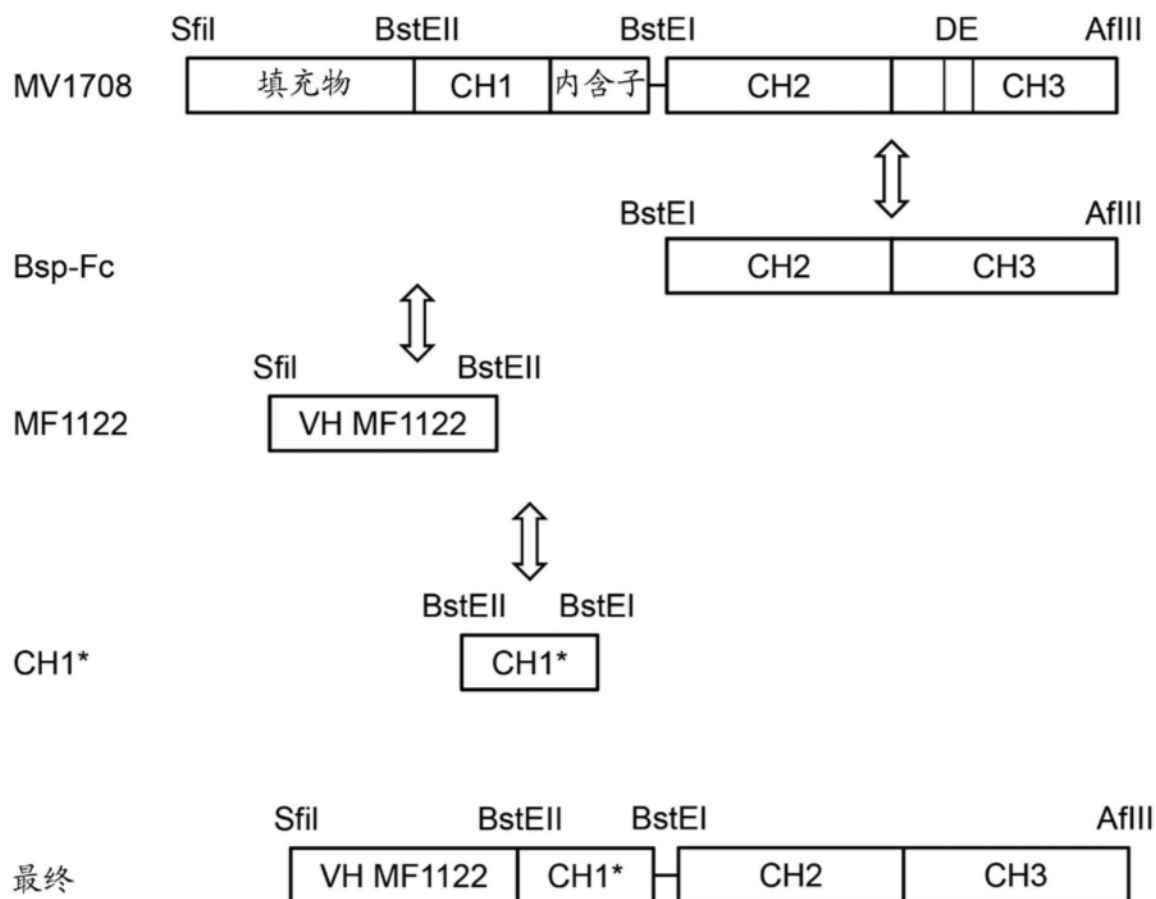


图12

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSG
 SSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIK
 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
 TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

图13A

GACAT CCAGA TGACC CAGTC TCCAT CCTCC CTGTC TGCAT CTGTA GGAGA
 CAGAG TCACC ATCAC TTGCC GGGCA AGTCA GAGCA TTAGC AGCTA CTTAA
 ATTGG TATCA GCAGA AACCA GGGAA AGCCC CTAAG CTCCT GATCT ATGCT
 GCATC CAGTT TGCAA AGTGG GGTCC CATCA AGGTT CAGTG GCAGT GGATC
 TGGGA CAGAT TTCAC TCTCA CCATC AGCAG TCTGC AACCT GAAGA TTTTG
 CAACT TACTA CTGTC AACAG AGTTA CAGTA CCCCT CCAAC GTTCG GCCAA
 GGGAC CAAGG TGGAG ATCAAA

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSG
 SSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIK

图13B

CGAAC TGTGG CTGCA CCATC TGTCT TCATC TTCCC GCCAT CTGAT GAGCA
GTTGA AATCT GGAAC TGCCT CTGTT GTGTG CCTGC TGAAT AACTT CTATC
CCAGA GAGGC CAAAG TACAG TGGAA GGTGG ATAAC GCCCT CCAAT CGGGT
AACTC CCAGG AGAGT GTCAC AGAGC AGGAC AGCAA GGACA GCACC TACAG
CCTCA GCAGC ACCCT GACGC TGAGC AAAGC AGACT ACGAG AAACA CAAAG
TCTAC GCCTG CGAAG TCACC CATCA GGGCC TGAGC TCGCC CGTCA CAAAG
AGCTT CAACA GGGGA GAGTG TTAG

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图13C

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGRLEIK

图13D

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP

图13E

CDR1 - QSISSY,
CDR2 - AAS,
CDR3 - QQSYSTP, 即IGKV1-39的CDR (根据IMGT)。

图13F

IgVκ3-15/IGJκ1

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSG
SGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNNWPWTFGQGTKVEIK

图13G

IgVκ3-20/IGJκ1

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFS
SGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK

图13H

IgVλ3-21/IGJλ3

SYVLTQPPSVSVAPGETARITCGGDNIGRKSVYWYQQKSGQAPVLVIYYDSDRPSGIPERFSGS
NSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDGSSDHWFVGGGTKLTVL

图13I

IgVκ3-15

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSG
SGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQYNNWP

图13J

IgVκ3-20

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFS
SGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYGGSSP

图13K

VK1-39/IGJK5/Cκ

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYSLSSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图13L

IgVκ3-15/IGJκ1/Cκ

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSG
SGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQYNNWPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图13M

IgVκ3-20/IGJκ1/Cκ

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFS
GSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图13N

IgVλ3-21/IGJλ3/Cλ

SYVLTQPPSVSVAPGETARITCGGDNIGRKSVYWYQQKSGQAPVLVIYYDSRPSGIPERFSGS
NSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDGSSDHVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQ
ANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRS
YSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

图13O

IgVλ3-21

SYVLTQPPSVSVAPGETARITCGGDNIGRKSVYWYQQKSGQAPVLVIYYDSRPSGIPERFSGS
NSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDGSSDH

图13P

CH1:

gctagcaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctggg
A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G
ggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcg
G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
tggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctca
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S
ggactctactccctcagcagcgtcgtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacc
G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
tacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagtt
Y I C N V N H K P S N T K V D K R V

图14A

铰链:

gagcccaaactcttgtagacaaaactcacacatgcccaccgtgccca
E P K S C D K T H T C P P C P

图14B

CH2:

gcacctgaactcctggggggaccgtcagtccttccttccccccaaaacccaaggacacc
A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T
ctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtgggtggacgtgagccacgaagac
L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D
cctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcggtggaggtgcataatgccaagacaaag
P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K
ccgcgaggagcagtagacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcac
P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H
caggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcc
Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A
cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaa
P I E K T I S K A K

图14C

CH3: L351K和T366K

gggcagccccgagaaccacaggtgtacaccaagcccccatcccgggaggagatgaccaag
G Q P R E P Q V Y T K P P S R E E M T K
aaccaggtcagcctgaagtgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag
N Q V S L K C L V K G F Y P S D I A V E
tgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactcc
W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S
gacggctccttcttcctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggg
D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G
aacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagc
N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S
ctctccctgtctccgggttga
L S L S P G -

图14D

CH3: L351D和L368E

gggcagccccgagaaccacaggtgtacaccgaccccccatcccgggaggagatgaccaag
G Q P R E P Q V Y T D P P S R E E M T K
aaccaggtcagcctgacctgcgaggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag
N Q V S L T C E V K G F Y P S D I A V E
tgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactcc
W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S
gacggctccttcttcctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggg
D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G
aacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagc
N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S
ctctccctgtctccgggttga
L S L S P G -

图14E

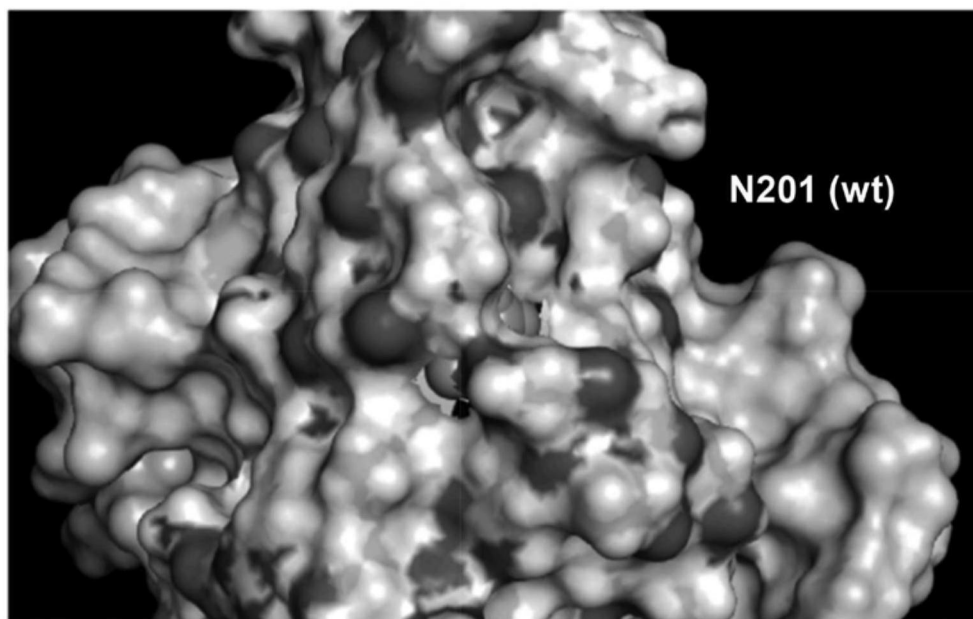
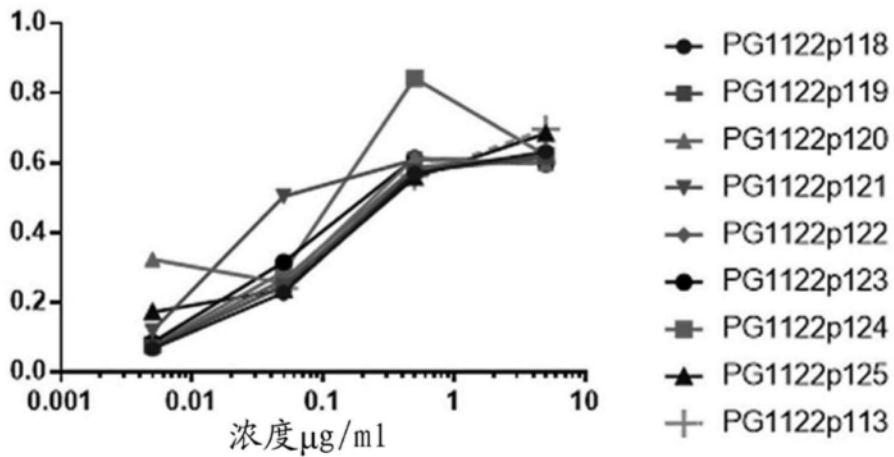
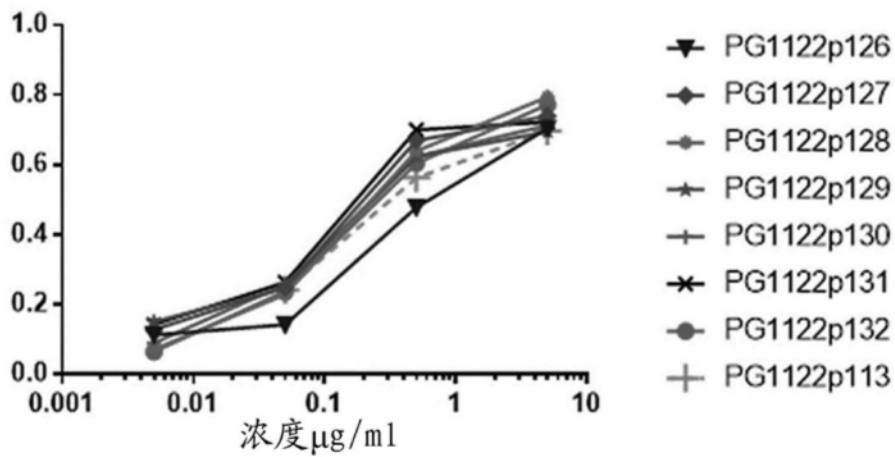


图15

纤维蛋白原板阳性样品组1



纤维蛋白原板阳性样品组2



纤维蛋白原板阳性样品组

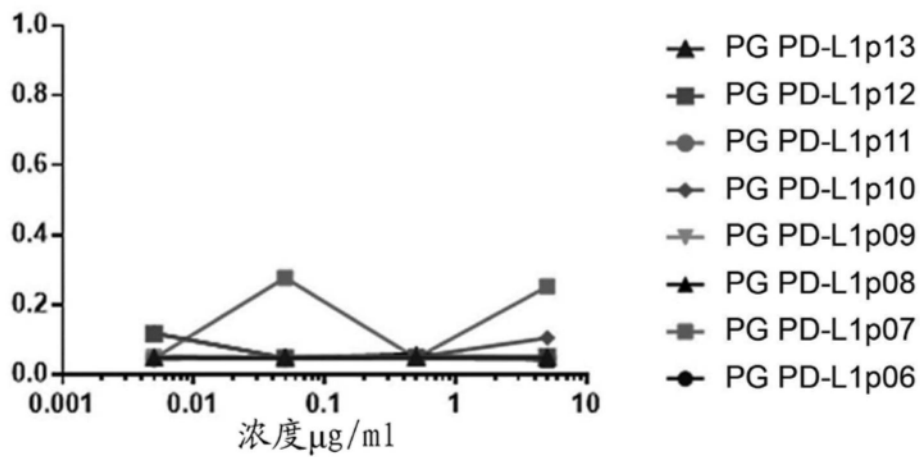


图16

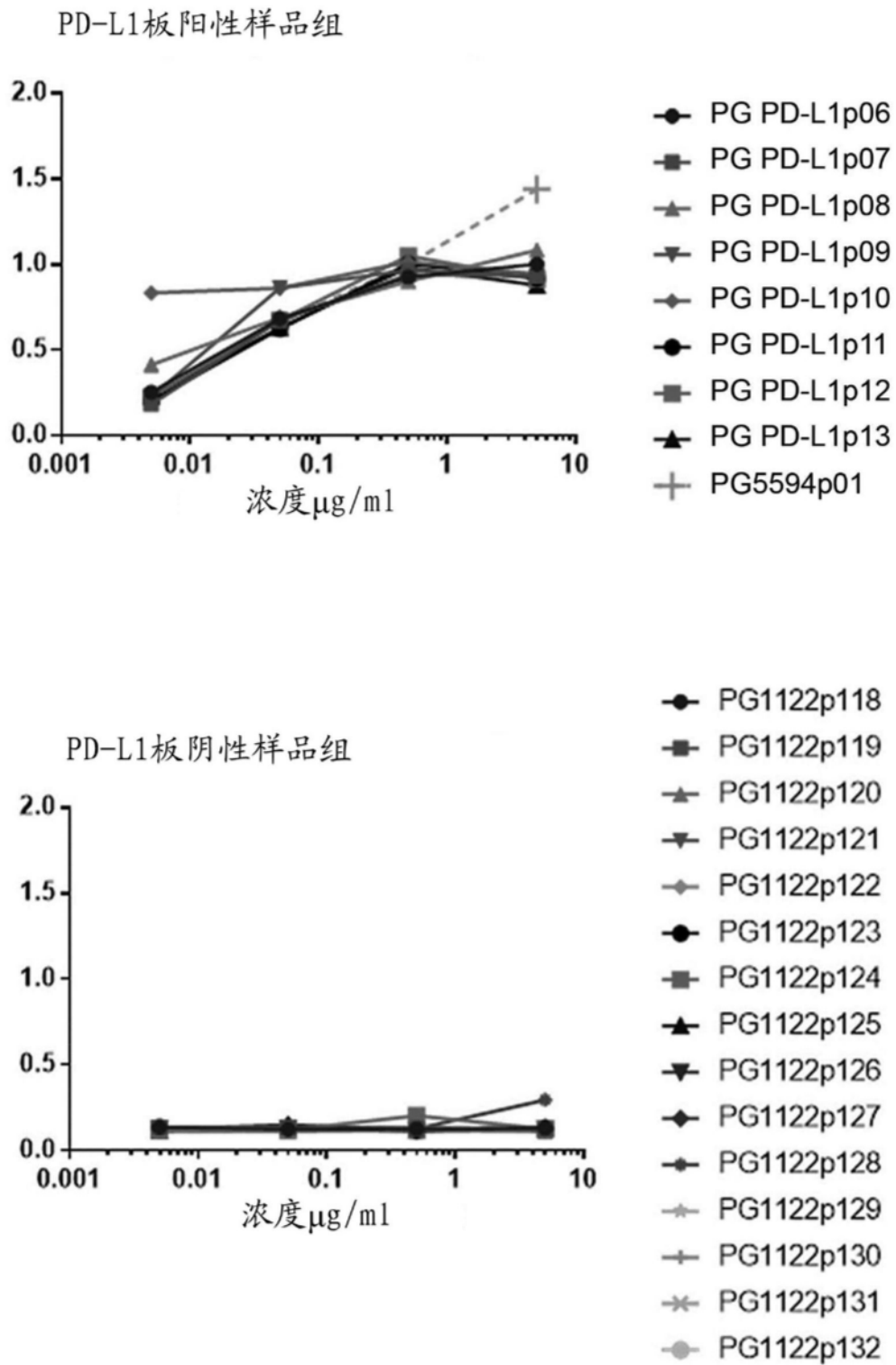


图16续

C-结构域的 链、转弯和 环 (5)	CH1					CH2					CH3						
	C-结构域的 IMGT独 特编号	IGHG1氨基酸 翻译 J00228 (1)	IMGT外 显子编号 1-98	Eu编号 [1] (1) (08 aa) 118-215	Kabat 编号 [2]	C-结构域的 链、转弯和 环 (5)	C-结构域的 IMGT独 特编号	IGHG1氨基酸 翻译 J00228 (1)	IMGT外 显子编号 1-110	Eu编号 [1] (1) (110 aa) [2] 231-340	Kabat 编号 [2]	C-结构域的 链、转弯和 环 (5)	C-结构域的 IMGT独 特编号	IGHG1氨基酸 翻译 J00228 (1)	IMGT外 显子编号 1-107	Eu编号 [1] (1) (107 aa) [2] 341-448	Kabat 编号 [2]
A-链	1.8	-	-	-	-	A-链	1.8	-	-	-	-	A-链	1.8	-	-	-	-
	1.7	-	-	-	-		1.7	-	-	-	-		1.7	-	-	-	-
	1.6	-	-	-	-		1.6	(A)	1	231	244		1.6	-	-	-	-
	1.5	-	-	-	-		1.5	P	2	232	245		1.5	-	-	-	-
	1.4	(A)	1	118	114		1.4	E	3	233	246		1.4	(Q)	1	341	361
	1.3	S	2	119	115		1.3	L	4	234	247		1.3	Q	2	342	363
	1.2	T	3	120	116		1.2	L	5	235	248		1.2	P	3	343	364
	1.1	K	4	121	117		1.1	G	6	236	249		1.1	R	4	344	365
	1	G	5	122	118		1	G	7	237	250		1	E	5	345	366
	2	P	6	123	119		2	P	8	238	251		2	P	6	346	367
	3	S	7	124	120		3	S	9	239	252		3	Q	7	347	368
	4	V	8	125	121		4	V	10	240	253		4	V	8	348	369
	5	F	9	126	122		5	F	11	241	254		5	Y	9	349	370
	6	P	10	127	123		6	L	12	242	255		6	T	10	350	371
	7	L	11	128	124		7	F	13	243	256		7	L	11	351	372
AB-转弯	8	A	12	129	125	A-链	8	P	14	244	257	AB-转弯	8	P	12	352	373
	9	P	13	130	126		9	P	15	245	258		9	P	13	353	374
	10	S	14	131	127		10	K	16	246	259		10	S	14	354	375
	11	S	15	132	128		11	P	17	247	260		11	R	15	355	376
	12	K	16	133	129		12	K	18	248	261		12	D	16	356	377
	13	S	17	134	130		13	D	19	249	262		13	E	17	357	378
	14	T	18	135	133		14	T	20	250	263		14	L	18	358	381
	15	S	19	136	134		15	L	21	251	264		15	T	19	359	382
	15.1	-	-	-	-		15.1	M	22	252	265		15.1	-	-	-	-
	15.2	-	-	-	-		15.2	I	23	253	266		15.2	-	-	-	-
	15.3	-	-	-	-		15.3	-	-	-	-		15.3	-	-	-	-

图17

B-链	16	G	20	137	135	B-链	16	S	24	254	267	B-链	16	K	20	360	383
	17	G	21	138	136		17	R	25	255	268		17	N	21	361	384
	18	T	22	139	137		18	T	26	256	269		18	Q	22	362	385
	19	A	23	140	138		19	P	27	257	270		19	V	23	363	386
	20	A	24	141	139		20	E	28	258	271		20	S	24	364	387
	21	L	25	142	140		21	V	29	259	272		21	L	25	365	388
	22	G	26	143	141		22	T	30	260	273		22	T	26	366	389
	23	C	27	144	142		23	C	31	261	274		23	C	27	367	390
	24	L	28	145	143		24	V	32	262	275		24	L	28	368	391
	25	V	29	146	144		25	V	33	263	276		25	V	29	369	392
BC-环	26	K	30	147	145	BC-环	26	V	34	264	277	BC-环	26	K	30	370	393
	27	D	31	148	146		27	D	35	265	278		27	G	31	371	394
	28	Y	32	149	147		28	V	36	266	279		28	F	32	372	395
	29	F	33	150	148		29	S	37	267	280		29	Y	33	373	396
	30	P	34	151	149		30	H	38	268	281		30	P	34	374	397
	31	-	-	-	-		31	E	39	269	282		31	-	-	-	-
	34	-	-	-	-		34	D	40	270	283		34	-	-	-	-
	35	E	35	152	150		35	P	41	271	284		35	S	35	375	398
	36	P	36	153	151		36	E	42	272	285		36	D	36	376	399
	37	V	37	154	152		37	V	43	273	286		37	I	37	377	400
C-链	38	T	38	155	153	C-链	38	K	44	274	287	C-链	38	A	38	378	401
	39	V	39	156	154		39	F	45	275	288		39	V	39	379	402
	40	S	40	157	156		40	N	46	276	289		40	E	40	380	405
	41	W	41	158	157		41	W	47	277	290		41	W	41	381	406
	42	N	42	159	162		42	Y	48	278	291		42	E	42	382	407
	43	S	43	160	163		43	V	49	279	292		43	S	43	383	408
	44	G	44	161	164		44	D	50	280	295		44	N	44	384	410
	45	A	45	162	165		45	G	51	281	296		45	G	45	385	411
	45.1	L	46	163	166		45.1	V	52	282	299		45.1	Q	46	386	414
	45.2	T	47	164	167		45.2	E	53	283	300		45.2	P	47	387	415
CD-链	45.3	S	48	165	168	CD-链	45.3	V	54	284	301	CD-链	45.3	E	48	388	416
	45.4	-	-	-	-		45.4	H	55	285	302		45.4	N	49	389	417
	45.5	-	-	-	-		45.5	-	-	-	-		45.5	-	-	-	-
	45.6	-	-	-	-		45.6	-	-	-	-		45.6	-	-	-	-
	45.7	-	-	-	-		45.7	-	-	-	-		45.7	-	-	-	-

图17续

D-链	77	G	49	166	169	D-链	77	N	56	286	303	D-链	77	N	50	390	418
	78	V	50	167	171		78	A	57	287	304		78	Y	51	391	419
	79	H	51	168	172		79	K	58	288	305		79	K	52	392	420
	80	T	52	169	173		80	T	59	289	306		80	T	53	393	421
	81	F	53	170	174		81	K	60	290	307		81	T	54	394	422
	82	P	54	171	175		82	P	61	291	308		82	P	55	395	423
	83	A	55	172	176		83	R	62	292	309		83	P	56	396	424
	84	V	56	173	177		84	E	63	293	310		84	V	57	397	425
	84.1	L	57	174	178		84.1	E	64	294	311		84.1	L	58	398	426
	84.2	Q	58	175	179		84.2	Q	65	295	312		84.2	D	59	399	427
DE-转弯	84.3	S	59	176	180	DE-转弯	84.3	S	66	296	313	DE-转弯	84.3	S	60	400	428
	84.4	S	60	177	182		84.4	N	67	297	314		84.4	D	61	401	430
	84.5	-	-	-	-		84.5	-	-	-	-		84.5	-	-	-	-
	84.6	-	-	-	-		84.6	-	-	-	-		84.6	-	-	-	-
	84.7	-	-	-	-		84.7	-	-	-	-		84.7	-	-	-	-
	85.7	-	-	-	-		85.7	-	-	-	-		85.7	-	-	-	-
	85.6	-	-	-	-		85.6	-	-	-	-		85.6	-	-	-	-
	85.5	-	-	-	-		85.5	-	-	-	-		85.5	-	-	-	-
	85.4	G	61	178	183		85.4	S	68	298	317		85.4	G	62	402	433
	85.3	L	62	179	184		85.3	T	69	299	318		85.3	S	63	403	434
E-链	85.2	Y	63	180	185	E-链	85.2	Y	70	300	319	E-链	85.2	F	64	404	435
	85.1	S	64	181	186		85.1	R	71	301	320		85.1	F	65	405	436
	85	L	65	182	187		85	V	72	302	321		85	L	66	406	437
	86	S	66	183	188		86	V	73	303	322		86	Y	67	407	438
	87	S	67	184	189		87	S	74	304	323		87	S	68	408	439
	88	V	68	185	190		88	V	75	305	324		88	K	69	409	440
	89	V	69	186	191		89	L	76	306	325		89	L	70	410	441
	90	T	70	187	192		90	T	77	307	326		90	T	71	411	442
	91	V	71	188	193		91	V	78	308	327		91	V	72	412	443
	92	P	72	189	194		92	L	79	309	328		92	D	73	413	444
EF-转弯	93	S	73	190	195	EF-转弯	93	H	80	310	329	EF-转弯	93	K	74	414	445
	94	S	74	191	196		94	Q	81	311	330		94	S	75	415	446
	95	S	75	192	197		95	D	82	312	331		95	R	76	416	447
	96	L	76	193	198		96	W	83	313	332		96	W	77	417	448
	96.1	-	-	-	-		96.1	-	-	-	-		96.1	-	-	-	-
	96.2	-	-	-	-		96.2	-	-	-	-		96.2	-	-	-	-

图17续

F-链	97	-	-	-	-	-	-	97	F-链	333	314	84	L	97	FG-环	340	327	91	C	104	84	S	103	102	F	101	N	G	79	416	449
	98	Q	77	78	79	80	81	98		334	315	85	N	98		341	322	92	S	105	85	84	104	103	V	100	N	Q	79	419	450
	99	T	78	79	80	81	82	99		335	316	86	G	99		342	323	93	V	106	86	85	105	104	W	101	N	Q	80	420	451
	100	Q	79	80	81	82	83	100		336	317	87	K	100		343	324	94	S	107	87	86	106	105	Y	102	N	N	81	421	452
	101	T	80	81	82	83	84	101		337	318	88	E	101		344	325	95	N	108	88	87	107	106	Y	103	V	N	82	422	453
	102	Y	81	82	83	84	85	102		338	319	89	Y	102		345	326	96	K	109	89	88	108	107	F	104	F	N	83	423	454
	103	I	82	83	84	85	86	103		339	320	90	K	103		346	327	97	A	110	90	89	109	108	S	S	S	N	84	424	455
	104	C	83	84	85	86	87	104		340	321	91	C	104		347	328	98	K	111	91	90	110	109	C	C	C	N	85	425	456
	105	N	84	85	86	87	88	105		341	322	92	K	105		348	329	99	V	112	92	91	111	110	S	S	S	N	86	426	457
	106	V	85	86	87	88	89	106		342	323	93	V	106		349	330	100	W	113	93	92	112	111	Y	V	V	N	87	427	458
FG-环	107	N	86	87	88	89	90	107	FG-环	343	324	94	S	107		350	331	101	N	114	94	93	113	112	H	M	M	N	88	428	459
	108	H	87	88	89	90	91	108		344	325	95	N	108		351	332	102	H	115	95	94	114	113	H	H	H	N	89	429	460
	109	K	88	89	90	91	92	109		345	326	96	K	109		352	333	103	E	116	96	95	115	114	H	H	H	N	90	430	461
	110	P	89	90	91	92	93	110		346	327	97	A	110		353	334	104	A	117	97	96	116	115	Y	Y	Y	N	91	431	462
	111	-	-	-	-	-	-	111		-	-	-	-	111		354	335	105	-	118	98	97	117	116	T	T	T	N	-	-	-
	112	-	-	-	-	-	-	112		-	-	-	-	112		355	336	106	L	119	99	98	118	117	Q	Q	Q	N	92	432	463
	113	S	90	91	92	93	94	113		347	328	98	L	113		356	337	107	H	120	100	99	119	118	K	K	K	N	93	433	464
	114	N	91	92	93	94	95	114		348	329	99	P	114		357	338	108	N	121	101	100	120	119	S	S	S	N	94	434	465
	115	T	92	93	94	95	96	115		349	330	100	A	115		358	339	109	H	122	102	101	121	120	L	L	L	N	95	435	466
	116	K	93	94	95	96	97	116		350	331	101	P	116		359	340	110	Y	123	103	102	122	121	S	S	S	N	96	436	467
G-链	117	V	94	95	96	97	98	117	G-链	351	332	102	I	117		360	341	111	T	124	104	103	123	122	L	L	L	N	97	437	468
	118	D	95	96	97	98	99	118		352	333	103	E	118		361	342	112	Q	125	105	104	124	123	L	L	L	N	98	438	469
	119	K	96	97	98	99	100	119		353	334	104	K	119		362	343	113	K	126	106	105	125	124	S	S	S	N	99	439	470
	120	K	97	98	99	100	101	120		354	335	105	T	120		363	344	114	S	127	107	106	126	125	S	S	S	N	100	440	471
	121	V	98	99	100	101	102	121		355	336	106	I	121		364	345	115	L	128	108	107	127	126	L	L	L	N	101	441	472
	122	-	-	-	-	-	-	122		356	337	107	S	122		365	346	116	S	129	109	108	128	127	S	S	S	N	102	442	473
	123	-	-	-	-	-	-	123		357	338	108	K	123		366	347	117	L	130	110	109	129	128	L	L	L	N	103	443	474
	124	-	-	-	-	-	-	124		358	339	109	A	124		367	348	118	S	131	111	110	130	129	S	S	S	N	104	444	475
	125	-	-	-	-	-	-	125		359	340	110	K	125		368	349	119	P	132	112	111	131	130	P	P	P	N	105	445	476
	126	-	-	-	-	-	-	126		360	341	111	-	126		369	350	120	-	133	113	112	132	131	-	-	-	N	-	-	-
	127	-	-	-	-	-	-	127		361	342	112	-	127		370	351	121	-	134	114	113	133	132	-	-	-	N	-	-	-
	128	-	-	-	-	-	-	128		362	343	113	-	128		371	352	122	-	135	115	114	134	133	-	-	-	N	-	-	-
	129	-	-	-	-	-	-	129		363	344	114	-	129		372	353	123	-	136	116	115	135	134	-	-	-	N	-	-	-
	130	-	-	-	-	-	-	130		364	345	115	-	130		373	354	124	-	137	117	116	136	135	-	-	-	N	-	-	-
	131	-	-	-	-	-	-	131		365	346	116	-	131		374	355	125	-	138	118	117	137	136	-	-	-	N	-	-	-

图17续

铰链的 IMGT编号	IGHG1 氨基酸翻译 J00228	IMGT 外显子 编号	Eu编号 [1] (4)	Kabat 编号 [2] (4)
1	(E)	1	216	226
2	P	2	217	227
3	K	3	218	228
4	S	4	219	232
5	C	5	220	233
6	D	6	221	234
7	K	7	222	235
8	T	8	223	236
9	H	9	224	237
10	T	10	225	238
11	C	11	226	239
12	P	12	227	240
13	P	13	228	241
14	C	14	229	242
15	P	15	230	243

图17续

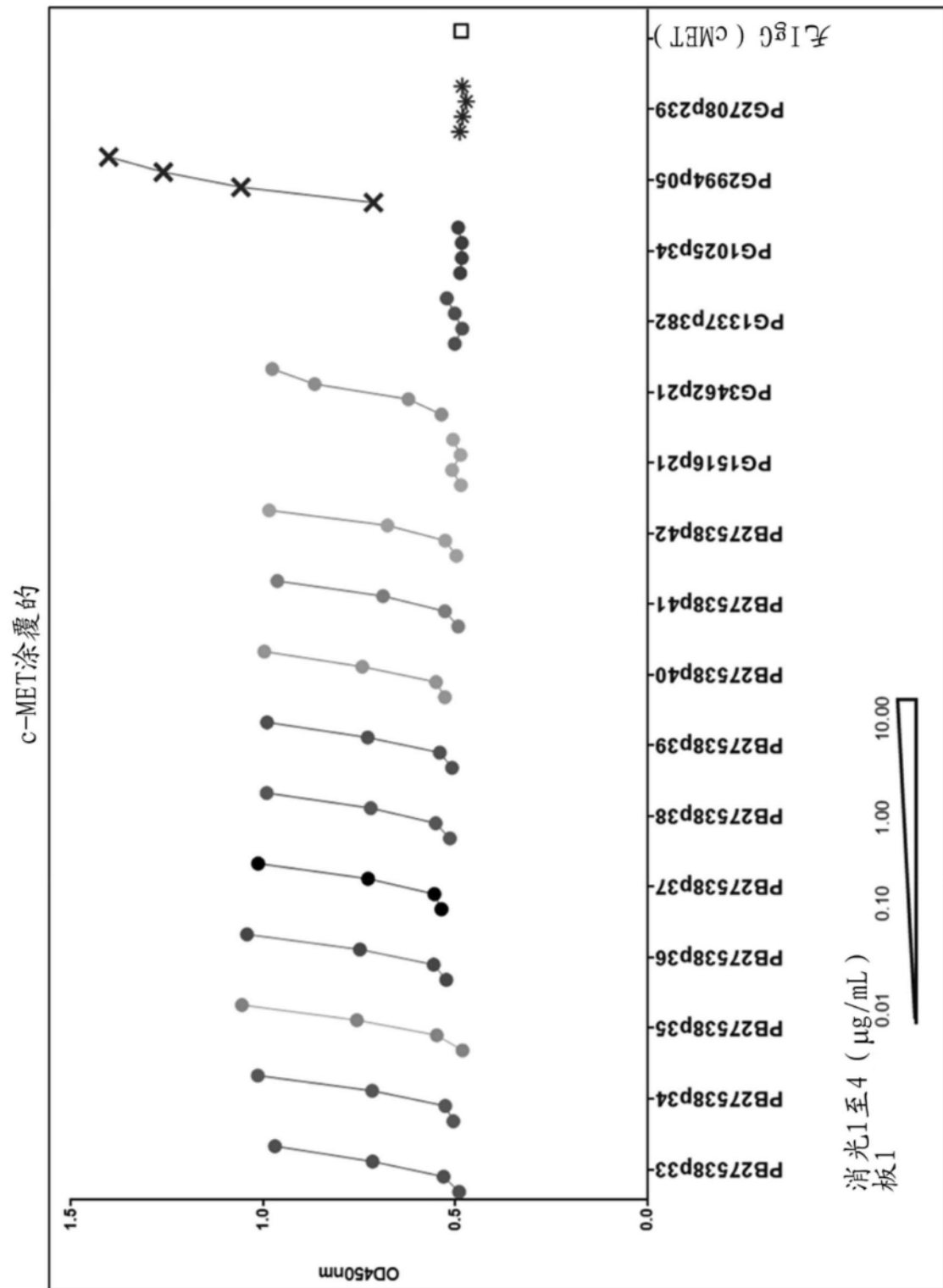


图18

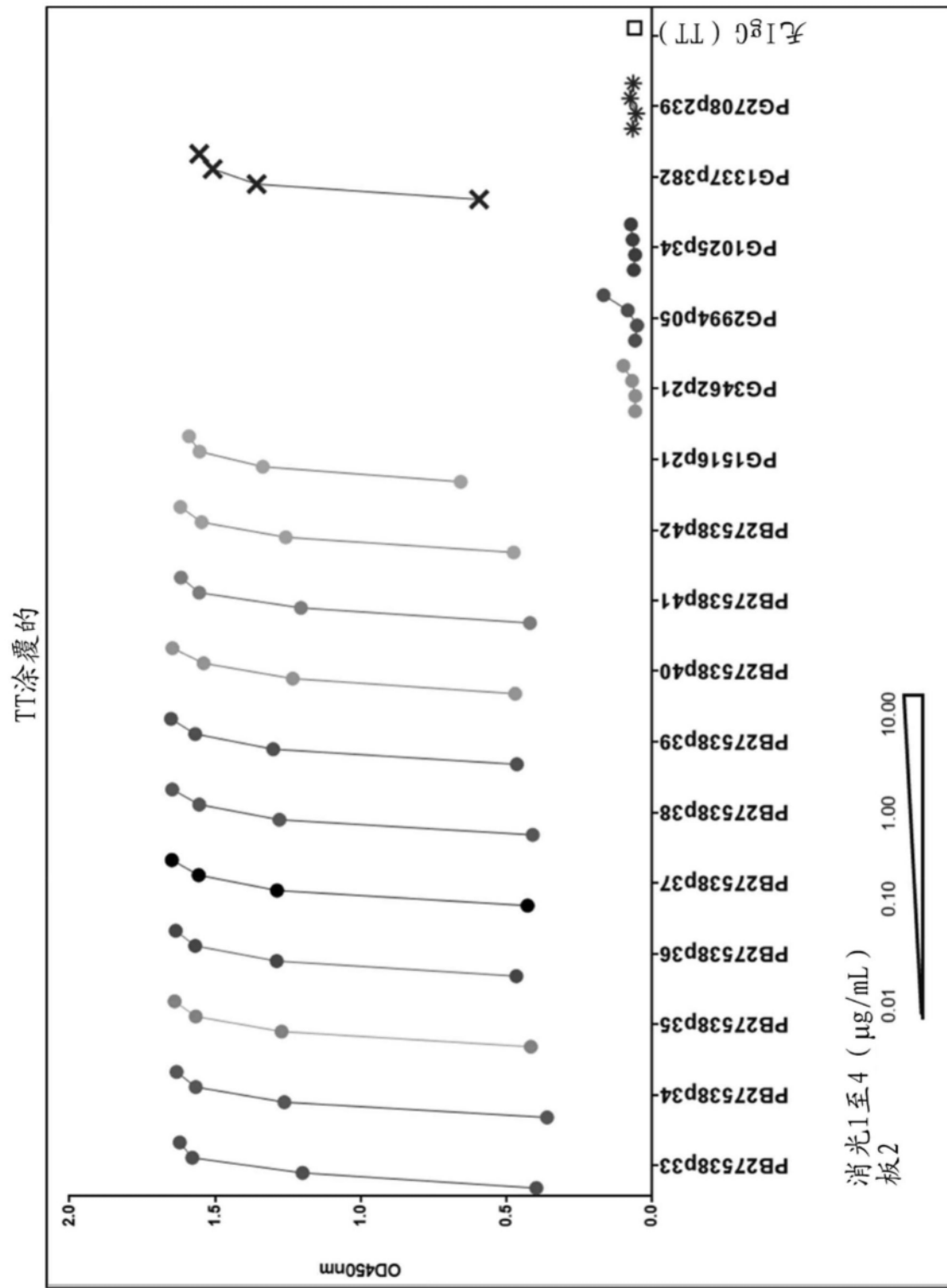


图18续

甲状腺球蛋白涂覆的

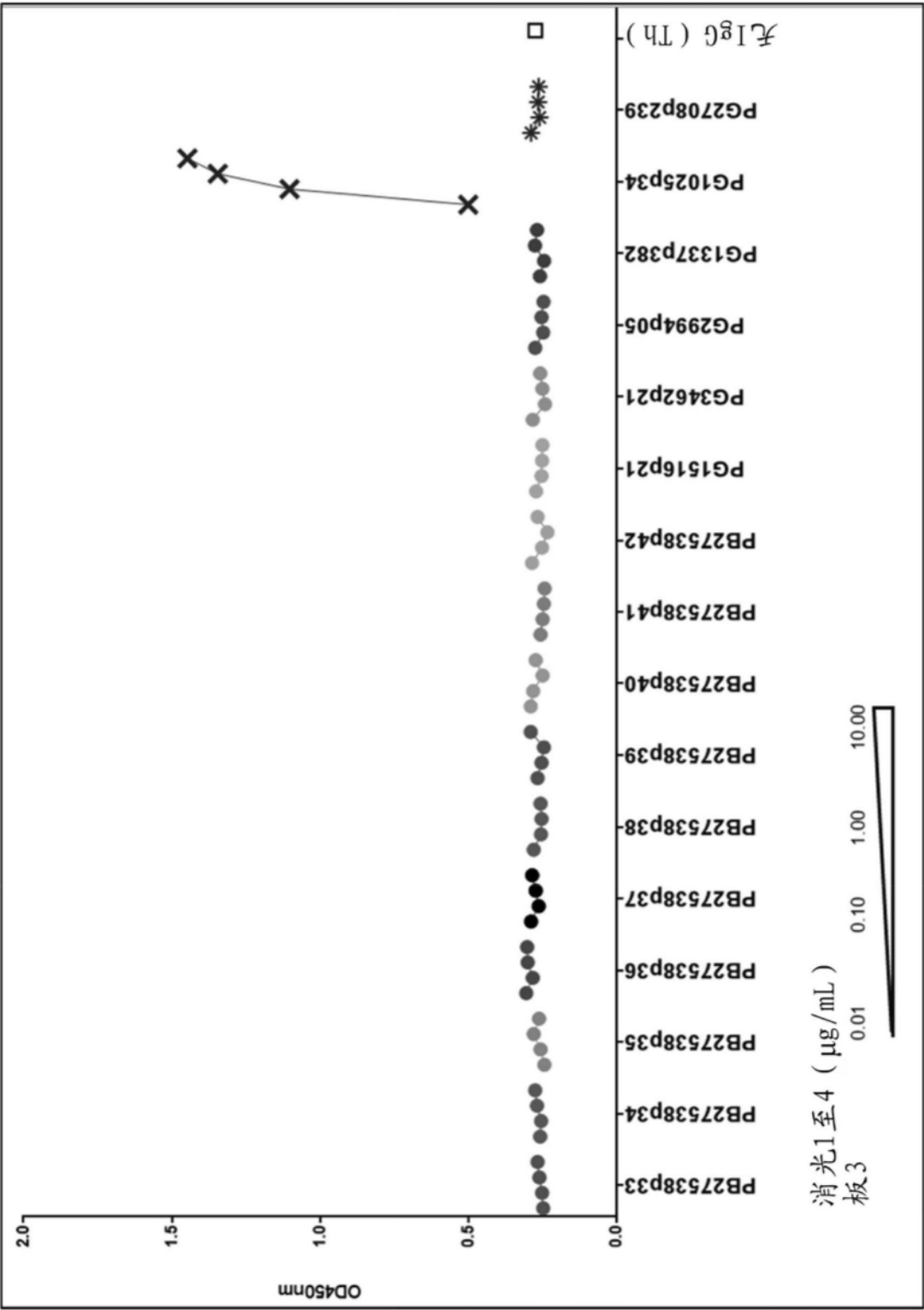


图18续

	孔#	PB	MG1	MG1 变体	MG2	MG2 变体	靶
PB	A1	PB27538p33	MG1516C3209	WT	MG3462C3215	WT	TTxc-MET
	B1	PB27538p34	MG1516C3209	WT	MG3462C3215	WT	TTxc-MET
	C1	PB27538p35	MG1516C3210	K370S	MG3462C3215	WT	TTxc-MET
	D1	PB27538p36	MG1516C3211	K370T	MG3462C3215	WT	TTxc-MET
	E1	PB27538p37	MG1516C3212	V303E	MG3462C3215	WT	TTxc-MET
	F1	PB27538p38	MG1516C3209	WT	MG3462C3216	V303K	TTxc-MET
	G1	PB27538p39	MG1516C3209	WT	MG3462C3217	E382Q	TTxc-MET
	H1	PB27538p40	MG1516C3209	WT	MG3462C3218	E382T	TTxc-MET
	A2	PB27538p41	MG1516C3209	WT	MG3462C3219	E388L	TTxc-MET
	B2	PB27538p42	MG1516C3209	WT	MG3462C3221	E388T	TTxc-MET
WT IgG1	C2	PG1516p21	MG1516C1057	WT	NA	NA	TT
	D2	PG3462p21	MG3462C1057	WT	NA	NA	c-MET
DEDE	E2	PG1516p22	MG1516C3209	WT	NA	NA	TT
	F2	PG1516p23	MG1516C3210	K370S	NA	NA	TT
	A3	PG1516p24	MG1516C3211	K370T	NA	NA	TT
	B3	PG1516p25	MG1516C3212	V303E	NA	NA	TT
KK	C3	PG3462p22	NA	NA	MG3462C3215	WT	c-MET
	D3	PG3462p23	NA	NA	MG3462C3216	V303K	c-MET
	E3	PG3462p24	NA	NA	MG3462C3217	E382Q	c-MET
	F3	PG3462p25	NA	NA	MG3462C3218	E382T	c-MET
	G3	PG3462p26	NA	NA	MG3462C3219	E388L	c-MET
	H3	PG3462p27	NA	NA	MG3462C3221	E388T	c-MET

图19

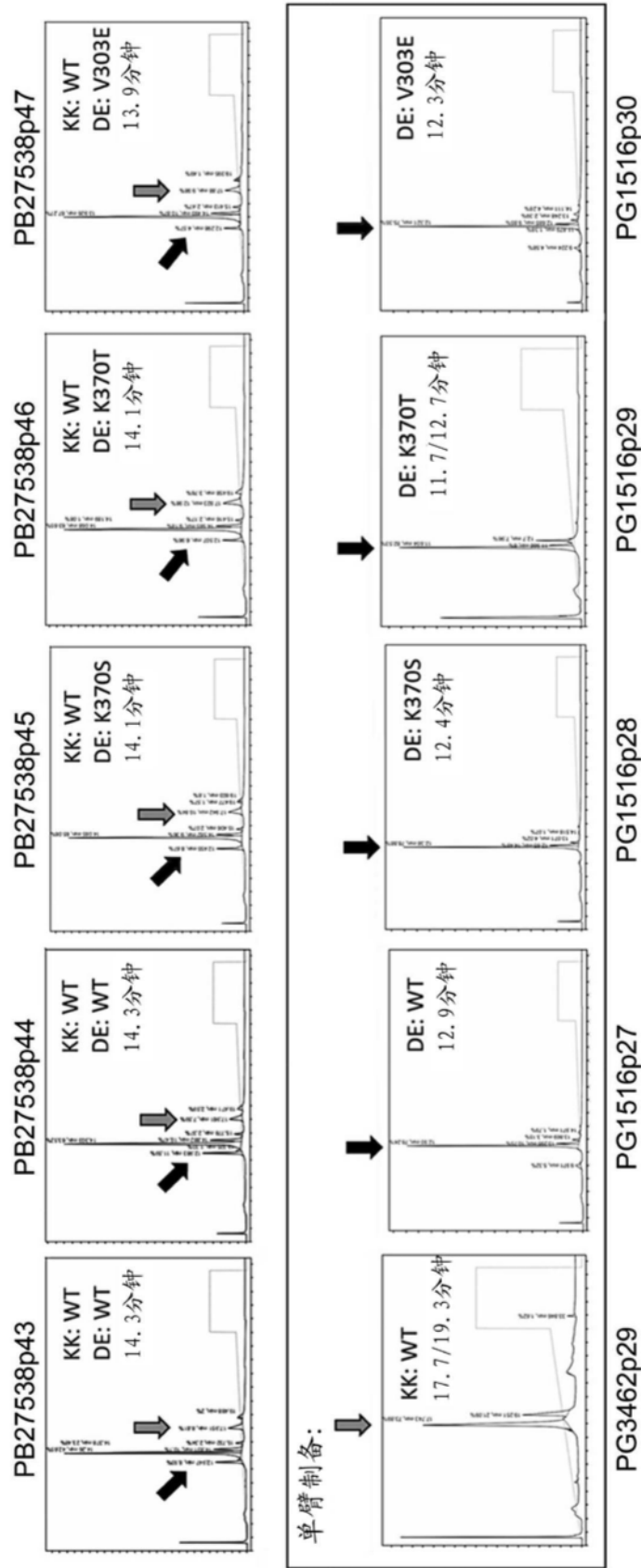


图20

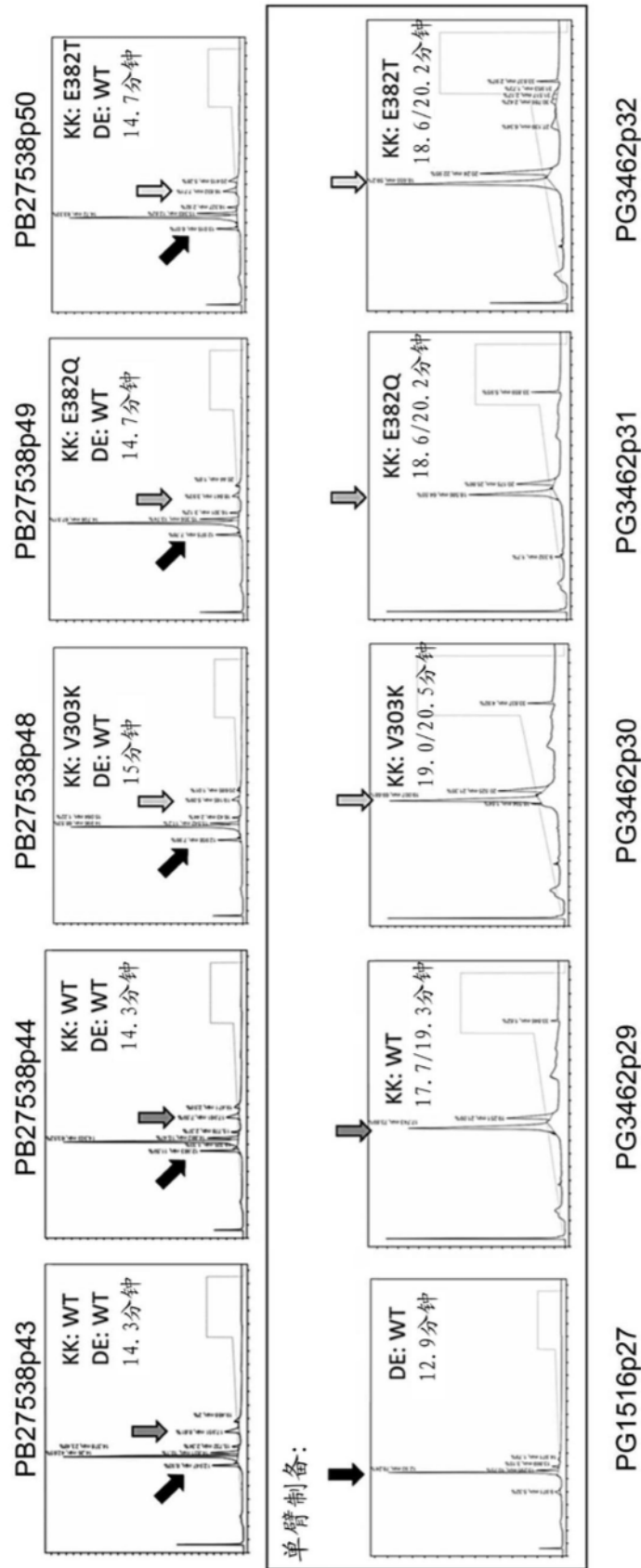


图21

CH3/CH3同源二聚体界面残基列表

Y349
T350
L351
S354
D356
E357
K360
S364
T366
L368
K370
N390
K392
T394
P395
V397
L398
D399
S400
F405
Y407
K409
K439

图22