



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102851338 A

(43) 申请公布日 2013.01.02

(21) 申请号 201210258592.8

(22) 申请日 2012.07.25

(71) 申请人 苏州康宁杰瑞生物科技有限公司

地址 215000 江苏省苏州市工业园区星湖街
218 号生物纳米园 C23

(72) 发明人 徐霆 须涛 汪晶晶 孙兴鲁
范英 曾燕

(51) Int. Cl.

C12P 21/00 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 9 页
序列表 9 页 附图 3 页

(54) 发明名称

利用电荷排斥作用制备同二聚体蛋白混合物的方法

(57) 摘要

本发明公开了利用电荷排斥作用制备同二聚体蛋白混合物的方法。实验证明,在序列表序列 4 所示的 ScFv-Fc 蛋白上引入三个突变位点 K435D/K452D/D442K 时,与同一宿主细胞中同时表达 Fc 蛋白后,经非还原条件下 SDS-PAGE 电泳检测,蛋白是以 ScFv-Fc/ScFv-Fc 和 Fc/Fc 同二聚体蛋白混合物的形式存在。本发明所提供的方法可在增加同二聚体含量的同时降低其他不需要的产物如异源二聚体的含量。同二聚体蛋白混合物可以同时作用于同一靶标的不同表位,也可以通过不同形式的抗体结合不同来源的抗体同时抑制多个抗原的作用等,为肿瘤的免疫诊断及免疫治疗方面提供新的方法和途径。

1. 一种用于在单一重组宿主细胞中生成包含两种或多种同二聚体蛋白或抗体混合物的方法,包括在所述宿主细胞中表达至少两种编码具有不同 CH3 区的多肽的核酸构建体,所述具有不同 CH3 区的多肽之间不含有形成二硫键或共价或稳定非共价多肽链间键的氨基酸残基;具有相同 CH3 区的所述多肽通过稳定非共价多肽链间键形成所述同二聚体蛋白;所述稳定非共价多肽链间键包括离子键。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于:所述多肽的 CH3 区均来源于人免疫球蛋白 Fc 段的 CH3 区,且其中最多有一种所述多肽的 CH3 区未经改造,其余所述多肽的 CH3 区均经过改造。

3. 根据权利要求 2 所述的方法,其特征在于:所述改造按照包括如下步骤的方法进行:

1) 获得所述人免疫球蛋白 Fc 段 CH3 区第一链和第二链的界面氨基酸;

2) 从步骤 1) 获得的所述界面氨基酸中选择正负电荷配对的带电氨基酸;

3) 从步骤 2) 获得的所述正负电荷配对的带电氨基酸中任选一对、两对、三对或三对以上,将具有同一种 CH3 区的所述多肽上所选中的所述正负电荷配对的带电氨基酸替换为带相反电荷的带电氨基酸;所述带电氨基酸为 Lys(K)、Arg(R)、Asp(D) 和 Glu(E)。

4. 根据权利要求 3 所述的方法,其特征在于:所述人免疫球蛋白的类型为 IgG1。

5. 根据权利要求 4 所述的方法,其特征在于:所述人免疫球蛋白 Fc 段的 CH3 区的所述正负电荷配对的带电氨基酸为如下 a)-h) 的 8 对氨基酸:

a) 第一链的第 356 位 Glu(E) 与第二链的第 439 位 Lys(K);

b) 第一链的第 357 位 Glu(E) 与第二链的第 370 位 Lys(K);

c) 第一链的第 370 位 Lys(K) 与第二链的第 357 位 Glu(E);

d) 第一链的第 392 位 Lys(K) 与第二链的第 399 位 Asp(D);

e) 第一链的第 399 位 Asp(D) 与第二链的第 392 位 Lys(K);

f) 第一链的第 399 位 Asp(D) 与第二链的第 409 位 Lys(K);

g) 第一链的第 409 位 Lys(K) 与第二链的第 399 位 Asp(D);

h) 第一链的第 439 位 Lys(K) 与第二链的第 356 位 Glu(E);

上述 8 对氨基酸的位置是根据抗体 Fc 的保守位置编号所命名的。

6. 根据权利要求 4 或 5 述的方法,其特征在于:所述具有不同 CH3 区的多肽为序列列表序列 2 所示的多肽和序列列表序列 4 中的第 435 位 Lys(K) 替换为 Asp(D)、第 452 位 Lys(K) 替换为 Asp(D) 和第 442 位 Asp(D) 替换为 Lys(K) 的多肽。

7. 利要求 1-6 任一所述方法获得的同二聚体蛋白或抗体混合物。

利用电荷排斥作用制备同二聚体蛋白混合物的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种利用电荷排斥作用制备同二聚体蛋白混合物的方法。

背景技术

[0002] 单克隆抗体药物在近十五年内增长迅速,成为制药行业的成长点。自 1996 年起,一共有 30 个左右单抗药物被批准上市。其中有九个单抗药物年销售超过十亿美元。2010 年单抗药物总销售超过 300 亿美元,并且年增长率超过 10%。由于单克隆抗体的靶标特异性强,只能抑制单一靶点。而在肿瘤、自体免疫等多种疾病中,需要抑制多重信号通路来避免代偿效应。对于病毒感染疾病,由于病毒的高突变率,往往需要抑制多抗原位点来防止逃逸。因此,有以下几种备选方案可以解决此类问题。一种备选方案是使用多克隆抗体,或通过改造抗体 Fc 段获得异二聚体如双特异抗体。还有一种方案是使用抗体混合物来治疗,抗体混合物可包含两种或更多种针对同一靶物上不同表位的抗体,或针对不同靶物的抗体的混合物。

[0003] US7262028 记载了一种通过表达一种轻链和不同重链从单一宿主细胞克隆生成二价抗体或者二价抗体混合物的方法。US7262028 中披露的发明提供了一种用于生成抗体组合的方法,可以对该抗体组合筛选在多种应用中的有用性。

[0004] WO/2010/084197 则描述了一种从单一宿主细胞克隆生产包含两种或者更多种不同抗体混合物的方法。其中一个实施方案中,为不同单价抗体的混合物。另外一种实施方案中,则为单价和二价抗体的混合物。

[0005] US5789208 和 US6335163 曾描述过一种表达多克隆抗体文库的方法,用噬菌体展示载体表达抗体 Fab 片段的多克隆文库,然后选择对抗原的反应性。所选择的轻链和重链可变区基因组合被以链接配对的方式大量转移至提供恒定区基因的真核表达载体,以获得完整多克隆抗体的子文库。这一子文库转染入骨髓瘤细胞后,稳定克隆便可以产生能被混合以获得单克隆抗体混合物的多克隆抗体。尽管使用这一方法通过培养转染细胞的混合群在理论上有可能直接从一个重组生产过程中获得多克隆抗体,但在混合细胞群的稳定性以及因此带来的所产生的多克隆抗体的一致性方面可能存在潜在的问题。在药理学上可接受的大规模(工业)的方法中对整群不同细胞进行控制是一项艰巨的任务。例如,细胞生长速率和抗体产生速率等特性对非克隆群中所有单个克隆来说应保持稳定,才能使多克隆抗体混合物中的抗体比率多少保持恒定。因此,尽管在本领域可能已经认识到混合抗体的需求,但还不存在可接受的解决方案以用药学可接受的方式经济地制造抗体混合物。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种用于在单一重组宿主细胞中生成包含两种或多种同二聚体蛋白或抗体混合物的方法,包括在所述宿主细胞中表达至少两种编码具有不同 CH3 区的多肽的核酸构建体;所述具有不同 CH3 区的多肽之间不含有形成二硫键或共价或稳定非共价多肽链间键的氨基酸残基;具有相同 CH3 区的所述多肽通过稳定非共价多肽链间键形

成所述同二聚体蛋白或抗体；所述稳定非共价多肽链间键包括离子键。

[0007] 在上述方法中，所述多肽的 CH3 区均来源于人免疫球蛋白 Fc 段的 CH3 区，且其中最多有一种所述多肽的 CH3 区未经改造，其余所述多肽的 CH3 区均经过改造。

[0008] 在上述方法中，所述改造按照包括如下步骤的方法进行：

[0009] 1) 获得所述人免疫球蛋白 Fc 段 CH3 区第一链和 / 或第二链的界面氨基酸；

[0010] 2) 从步骤 1) 获得的所述界面氨基酸中选择正负电荷配对的带电氨基酸；

[0011] 3) 从步骤 2) 获得的所述正负电荷配对的带电氨基酸中任选一对、两对、三对或三对以上，将具有同一种 CH3 区的所述多肽上所选中的所述正负电荷配对的带电氨基酸替换为带相反电荷的带电氨基酸；所述带电氨基酸为 Lys (K)、Arg (R)、Asp (D) 或 Glu (E)。

[0012] 在上述方法中，所述人免疫球蛋白的类型为 IgG1。

[0013] 在上述方法中，所述人免疫球蛋白 Fc 段的 CH3 区的所述正负电荷配对的带电氨基酸为如下 a)-h) 的 8 对氨基酸：

[0014] a) 第一链的第 356 位 Glu (E) 与第二链的第 439 位 Lys (K)；

[0015] b) 第一链的第 357 位 Glu (E) 与第二链的第 370 位 Lys (K)；

[0016] c) 第一链的第 370 位 Lys (K) 与第二链的第 357 位 Glu (E)；

[0017] d) 第一链的第 392 位 Lys (K) 与第二链的第 399 位 Asp (D)；

[0018] e) 第一链的第 399 位 Asp (D) 与第二链的第 392 位 Lys (K)；

[0019] f) 第一链的第 399 位 Asp (D) 与第二链的第 409 位 Lys (K)；

[0020] g) 第一链的第 409 位 Lys (K) 与第二链的第 399 位 Asp (D)；

[0021] h) 第一链的第 439 位 Lys (K) 与第二链的第 356 位 Glu (E)；

[0022] 上述 8 对氨基酸的位置是根据抗体 Fc 的 KABAT 编号所命名的。

[0023] 在上述方法中，所述人免疫球蛋白 Fc 段的 CH3 区的所述正负电荷配对的带电氨基酸在序列表序列 2 中的位置为如下 a1)-h1) 的 8 对氨基酸：

[0024] a1) 第一链的第 161 位 Asp (D) 与第二链的第 244 位 Lys (K)；

[0025] b1) 第一链的第 162 位 Asp (D) 与第二链的第 175 位 Lys (K)；

[0026] c1) 第一链的第 175 位 Lys (K) 与第二链的第 163 位 Glu (E)；

[0027] d1) 第一链的第 197 位 Lys (K) 与第二链的第 204 位 Asp (D)；

[0028] e1) 第一链的第 204 位 Asp (D) 与第二链的第 197 位 Lys (K)；

[0029] f1) 第一链的第 204 位 Asp (D) 与第二链的第 214 位 Lys (K)；

[0030] g1) 第一链的第 214 位 Lys (K) 与第二链的第 204 位 Asp (D)；

[0031] h1) 第一链的第 244 位 Lys (K) 与第二链的第 161 位 Glu (E)。

[0032] 在上述方法中，所述人免疫球蛋白 Fc 段的 CH3 区的所述正负电荷配对的带电氨基酸在序列表序列 4 中的位置为如下 a2)-h2) 的 8 对氨基酸：

[0033] a2) 第一链的第 482 位 Lys (K) 与第二链的第 399 位 Asp (D)；

[0034] b2) 第一链的第 413 位 Lys (K) 与第二链的第 400 位 Asp (D)；

[0035] c2) 第一链的第 400 位 Glu (E) 与第二链的第 413 位 Lys (K)；

[0036] d2) 第一链的第 442 位 Asp (D) 与第二链的第 435 位 Lys (K)；

[0037] e2) 第一链的第 435 位 Lys (K) 与第二链的第 442 位 Asp (D)；

[0038] f2) 第一链的第 452 位 Lys (K) 与第二链的第 442 位 Asp (D)；

[0039] g2) 第一链的第 442 位 Asp(D) 与第二链的第 452 位 Lys(K) ;

[0040] h2) 第一链的第 399 位 Glu(E) 与第二链的第 482 位 Lys(K) 。

[0041] 在上述方法中,所述具有不同 CH3 区的多肽具体可为序列表序列 2 所示的多肽和序列表序列 4 中的第 435 位 Lys(K) 替换为 Asp(D)、第 452 位 Lys(K) 替换为 Asp(D) 和第 442 位 Asp(D) 替换为 Lys(K) 的多肽。

[0042] 本发明保护利用上述任一所述方法获得的同二聚体蛋白或抗体混合物。

[0043] 所述的同二聚体 FC 包括人免疫球蛋白 FC。

[0044] 同二聚体蛋白分子可以用标准的实验手段从宿主细胞中纯化。例如,当同二聚体蛋白包含了 FC,蛋白则可以用蛋白 A 来纯化。纯化方法包括但不限于色谱技术如体积排阻、离子交换、亲和色谱法及超滤法。本发明的同二聚体混合物的分离纯化方法也包括上述各种方法的适当组合。

[0045] 所述的同二聚体蛋白包括 FC,优选人免疫球蛋白 FC。在一般情况下,人免疫球蛋白 FC 区域的 CH3 区域多肽来源于野生型的人免疫球蛋白 FC 区域。野生型的人免疫球蛋白 FC 指发生在人群中的氨基酸序列,当然 FC 序列在个体中会有一些细微的差异。本发明中人免疫球蛋白 FC 也包括对于野生型人免疫球蛋白 FC 序列的氨基酸个别的改变,比如,FC 区域局部某些氨基酸的改变,如包括某些在糖基化位点突变的氨基酸,或者其他无义的突变 ;

[0046] 术语“人免疫球蛋白 FC”指的是人免疫球蛋白链恒定区,特别是免疫球蛋白重链恒定区的羧基端或其中的一部分。例如,免疫球蛋白 FC 区可包括重链 CH1、CH2、CH3、CH4 的两个或更多结构域与免疫球蛋白铰链区的组合。根据重链恒定区的氨基酸序列,免疫球蛋白可以分为不同的种类,主要有 5 类免疫球蛋白 :IgA, IgD, IgE, IgG 和 IgM,其中一些还可进一步分成亚类(同种型),如 IgG-1, IgG-2, IgG-3, IgG-4, IgA-1 和 IgA-2。从特定的免疫球蛋白类别和亚类中选择特定的免疫球蛋白 FC 区在本领域技术人员所掌握的范围之内。

[0047] 在具体实施方式中,本发明所用的人免疫球蛋白 FC 包括至少一个免疫球蛋白铰链区,一个 CH2 结构域和一个 CH3 结构域,具体为人 IgG1 FC(图 1)。

[0048] 本发明涉及的宿主细胞为人上皮细胞系如 293H,也可为中国仓鼠卵巢细胞系(DHO)、骨髓瘤细胞、酵母细胞或原核细胞如 E. Coli。

[0049] 本发明所述的用于生成同二聚体蛋白混合物的抗体原型,不仅仅是双特异性抗体,也可以是双特异性多肽抗体,双特异性多肽等(见图 2)。

[0050] 本发明还涉及按照上述方法突变产生的同二聚体蛋白混合物,以及组成同二聚体抗体 FC 的单独的多肽。

[0051] 本发明还进一步涉及编码这些多肽的核酸序列。

[0052] 本发明更进一步涉及包含突变产生的组成同二聚体 FC 抗体混合物的单独的多肽的药物组合物。

[0053] 实验证明,在序列表序列 4 所示的 ScFv-Fc 蛋白上引入三个突变位点 K435D/K452D/D442K 时,与同一宿主细胞中同时表达 Fc 蛋白后,经非还原条件下 SDS-PAGE 电泳检测,蛋白是以 ScFv-Fc/ScFv-Fc 和 Fc/Fc 同二聚体蛋白混合物的形式存在。本发明所提供的方法可在增加同二聚体含量的同时降低其他不需要的产物如异源二聚体的含量。同二聚体蛋白混合物可以同时作用于同一靶标的不同表位,也可以通过不同形式的抗体结合不同来源的抗体同时抑制多个抗原的作用等,为肿瘤的免疫诊断及免疫治疗方面提供新的方法

和途径。

附图说明

- [0054] 图 1. IgG1 抗体结构及不同区域示意图。
 [0055] 图 2. 包含 FC 单链的不同异二聚体蛋白组合现象。
 [0056] 图 3 为重组载体 pcDNA3. 1-SP-Fc 的结构示意图。
 [0057] 图 4 为重组载体 pcDNA3. 1-ScFv-Fc 的结构示意图。
 [0058] 图 5 为电泳检测同二聚体 (ScFv-Fc/ScFv-Fc, Fc/Fc) 和异二聚体 ((ScFv-Fc/Fc) 的结果。其中,泳道 M 为分子量标准 (最上面的 3 个片段从上到下依次为 104KD、78KD、50KD),泳道 WT 为表 5 中的组合 1 (未经突变),泳道 1-5 分别为表 5 中组合 2-6。

具体实施方式

- [0059] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。
 [0060] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。
 [0061] 实施例 1、抗体 Fc 段上 CH3 区域突变氨基酸的选择
 [0062] 1、序列及结构获得
 [0063] 从蛋白质数据库 (PDB, www.pdb.org) 中共获得 48 个包含 Fc 区域的人 IgG1 抗体晶体结构,通过结构相似性搜索算法 (参考文献:Yuzhen Ye and Adam Godzik. FATCAT : a web server for flexible structure comparison and structure similarity searching. Nucleic Acids Res., 2004, 32 (Web Server issue) : W582-585.), 得出这 48 个抗体的 Fc 段的来自 1DN2 (PDB 编号)。
 [0064] 2、界面氨基酸获取
 [0065] 用蛋白质接触氨基酸识别软件 CMA (网址为: <http://ligin.weizmann.ac.il/cma/>), 根据氨基酸作用的距离筛选并识别抗体 (PDB 编号: 1DN2) 中 CH3-CH3 之间的氨基酸接触。根据氨基酸接触规则,界面氨基酸指侧链重原子与另外一条链的任何一个氨基酸的重原子之间的距离小于一个阈值的一些氨基酸。本实施例的阈值选择为 4.5 Å, 也可以选择 5.5 Å (如文献: B. Erman, I. Bahar and R. L. Jernigan. Equilibrium states of rigid bodies with multiple interactions sites. Application to protein helices. J. Chem. Phys. 1997, 107 : 2046-2059.)。表 1 为通过氨基酸接触筛选 (即氨基酸距离小于 4.5 Å) 的抗体 1DN2 的 34 个界面氨基酸, 其中, 链 A 和链 B 分别代表抗体 1DN2 的第一链和第二链。以下氨基酸位置是根据抗体 Fc 的 KABAT 编号所命名的。
 [0066] 表 1. 抗体 1DN2 的 CH3-CH3 界面氨基酸列表
 [0067]

链 A 中的接触氨基酸	链 B 中的接触氨基酸
Gln347A	Lys360B
Val348A	Glu356B

Tyr349A	Ser354B, Glu356B, Glu357B, Lys360B
Thr350A	Ser354B, Glu356B
Leu351A	Leu351B, Pro352B, Pro353B, Ser354B, Thr366B
Pro352A	Leu351B, Pro352B
Pro353A	Leu351B
Ser354A	Tyr349B, Thr350B, Leu351B
Glu356A	Val348B, Tyr349B, Thr350B, Lys439B
Glu357A	Tyr349B, Leu368B, Lys370B
Lys360A	Gln347B, Tyr349B, Lys370B
Gln362A	Lys370B
Val363A	Lys370B
Ser364A	Leu368B, Lys370B, Tyr407B
Leu365A	Tyr407B
Thr366A	Leu351B, Leu368B, Tyr407B
Leu368A	Glu357B, Ser364B, Thr366B, Lys409B
Lys370A	Glu357B, Lys360B, Gln362B, Ser364B, Lys409B, Thr411B
Asn390A	Ser400B
Lys392A	Val397B, Leu398B, Asp399B, Ser400B, Phe405B
Thr393A	Val397B
Thr394A	Thr394B, Val397B, Phe405B, Tyr407B
Pro395A	Pro395B, Val 397B
Val397A	Lys392B, Thr393B, Thr394B, Pro395B
Leu398A	Lys392B

Asp399A	Lys392B, Lys409B, Thr411B
Ser400A	Asn390B, Lys392B
Phe405A	Lys392B, Thr394B, Tyr407B, Lys409B
Leu406A	Thr394B
Tyr407A	Thr366B, Thr394B, Phe405B, Tyr407B, Lys409B
Ser408A	Tyr407B
Lys409A	Leu368B, Lys370B, Asp399B, Phe405B, Tyr407B
Thr411A	Lys370B, Asp399B
Lys439A	Glu356B

[0068]

[0069] 3、寻找电荷氨基酸配对

[0070] 在表 1 所列出的 CH3-CH3 界面氨基酸的基础上,根据氨基酸的电性,寻找电荷氨基酸配对,配对结果见表 2,共有 8 对电荷氨基酸配对。

[0071] 表 2、抗体 1DN2 的电荷氨基酸配对

[0072]

链 A 中的接触氨基酸	链 B 中的接触氨基酸
Glu356A	Lys439B
Glu357A	Lys370B
Lys370A	Glu357B
Lys392A	Asp399B
Asp399A	Lys392B
Asp399A	Lys409B
Lys409A	Asp399B
Lys439A	Glu356B

[0073] 4、突变电荷氨基酸

[0074] 根据表 2 的结果,由于抗体 1DN2 的 Fc 两链为对称的两链,突变任一链的配对氨基酸在同一链上相同位置的氨基酸为相反电荷氨基酸,如配对氨基酸 Glu356A-Lys439B,突变的两种类型为:

[0075] 1) 将 Glu356A 突变为 Lys356A 或 Arg356A, 和 / 或将 Lys439A 突变为 Glu439A 或 Asp439A ;

[0076] 2) 将 Glu356B 突变为 Lys356B 或 Arg356B, 和 / 或将 Lys439B 突变为 Glu439B 或 Asp439B。

[0077] 其中, 相反电荷是指将正电氨基酸 (赖氨酸 (Lys, K) 或精氨酸 (Arg, R)) 突变为负电氨基酸 (天冬氨酸 (Asp, D) 或谷氨酸 (Glu, E)) 或者将负电氨基酸 (天冬氨酸或谷氨酸) 突变为正电氨基酸 (赖氨酸或精氨酸) 。详细突变位置如表 3 和表 4 所示。

[0078] 表 3. A 链中的突变氨基酸

[0079]

链 A 中的氨基酸	突变的氨基酸电性	链 A 中的氨基酸	突变的氨基酸电性
Glu356A	+	Lys439A	
Glu357A	+	Lys370A	
Lys392A		Asp399A	+
Asp399A	+	Lys409A	

[0080] 注 :+ 代表正电荷, - 代表负电荷。

[0081] 表 4. B 链中的突变氨基酸

[0082]

链 B 中的氨基酸	突变的氨基酸电性	链 B 中的氨基酸	突变的氨基酸电性
Glu356B	+	Lys439B	
Glu357B	+	Lys370B	
Lys392B		Asp399B	+
Asp399B	+	Lys409B	

[0083] 注 :+ 代表正电荷, - 代表负电荷。

[0084] 此外, 在更为复杂的情况下, 可以根据本发明的方法, 也可以是根据上述描述的配对氨基酸的不同突变种类的组合。根据本发明方案对制备 FC 混合物的 FC 进行改造, 并制备抗体混合物的方法, 并不局限于上文所述的单链双点配对氨基酸突变或者各种突变的组合。

[0085] 实施例 2、改造抗体 Fc 段上 CH3 区域的氨基酸获得同二聚体蛋白混合物

[0086] 1、构建表达人 IgG1 的 Fc 片段的重组载体 pcMV β -SP-Fc

[0087] 根据基因库中搜索到的人 IgG1 的 Fc 片段 (hing-CH2-CH3) 基因序列, 人工合成获得序列表序列 1 所示的两端含有 Hind III 和 EcoRI 的识别序列及保护碱基的人的 Fc 基因 (全长 780bp, 名称为 SP-Fc), 用 EcoRI 和 Hind III 双酶切, 与经 EcoR I 和 HindIII 双酶切的哺乳动物细胞表达载体 pcMV β (Invitrogen) 的载体骨架连接, 获得重组载体

pcMV β -SP-Fc (其结构示意图如图 5 所示), 并经测序证实该重组载体 pcMV β -Fc 为载体 pcMV β 的 EcoR I 和 Hind III 位点间插入了序列列表序列 1 中第 16 位至第 771 位核苷酸序列所示的 DNA 片段。

[0088] 序列列表序列 1 中第 16 位至第 771 位核苷酸序列编码的 Fc 蛋白氨基酸序列如下 (如序列列表序列 2 所示):

[0089] METDTLLLWVLLLWVPGSTGGSGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYsKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK。

[0090] 2、构建表达 ScFv-Fc 融合蛋白的重组载体 pcDNA3.1-ScFv-Fc

[0091] 人工合成获得序列列表序列 3 所示的两端含有 Hind III 和 EcoR I 的识别序列及保护碱基的 ScFv-Fc 融合蛋白编码基因, 用 EcoRI 和 Hind III 双酶切, 与经 EcoRI 和 HindIII 双酶切的哺乳动物细胞表达载体 pcDNA3.1-zeo (Invitrogen) 的载体骨架连接, 获得重组载体 pcDNA3.1-zeo-ScFv-Fc (其结构示意图如图 4 所示), 并经测序证实该重组载体 pcDNA3.1-zeo-ScFv-Fc 为载体 pcDNA3.1-zeo 的 EcoRI 和 Hind III 位点间插入了序列列表序列 3 中第 16 位至第 1488 位核苷酸序列所示的 DNA 片段。

[0092] 序列列表序列 3 中第 16 位至第 1488 位核苷酸序列编码的 ScFv-Fc 融合蛋白氨基酸序列如下 (如序列列表序列 4 所示):

[0093] MGWSLILLFLVAVATRVLSEVQLLESGGGVVQGRSLRLSCIASGFTFSSYPMTWVRQAPGKGLEWVAS
ISYDGSYKYKADSMKGRLTISRDNKNTLYLEMNSLTAEDTAVYYCARTAFFNAYDFWGQGLTVTVSSASTKGPSVG
GGGSGGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVRSNLAWYQQKPGQAPRLLIYAASSTRATGIPARFSGSGS
TEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNEWFRFTSGGQTKVEIKRDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYsKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK。

[0094] 序列列表序列 2 和序列列表序列 4 中划线部分的氨基酸序列相同。

[0095] 3、选择氨基酸的突变位点获得改造的重组载体

[0096] 从实施例 1 的表 3 和表 4 中选择在本实施例中融合蛋白 ScFv-Fc 的相应氨基酸突变位点 (如表 5 中的突变组合 2-6 所示), 利用重叠 PCR 法对编码突变氨基酸的序列列表序列 3 中的核苷酸进行突变, 分别获得 5 种经过改造的重组载体 pcDNA3.1-zeo-ScFv-Fc ;SP-Fc 蛋白的氨基酸不进行任何突变, 载体为未经改造的 pcMV β -SP-Fc。

[0097] 表 5. 突变体的具体突变位点及其位置

[0098]

突变组合	ScFv-Fc 蛋白上的突	突变氨基酸在序列列表序列 4 中的位置	Fc 蛋白
	变氨基酸		
1	WT		WT

2	D356K/K439E	D399K/K482E	NA
3	E357K/K370E	E400K/K413E	NA
4	K392D/D399K	K435D/D442K	NA
5	K409D/D399K	K452D/D442K	NA
6	K392D/K409D/D399K	K435D/K452D/D442K	NA

[0099]

[0100] 注:WT 表示未进行突变的野生型,NA 表示在配对氨基酸位点未进行任何突变,“/”表示“和”的关系,“D356K”中 356 表示突变氨基酸的位置,356 前的字母 D 表示突变前的氨基酸为 D,356 后的字母 K 表示突变后的氨基酸为 K,其它同理。

[0101] 4、转染细胞及抗体混合物的检测

[0102] 将步骤 3 的 6 种突变组合相应的表达载体分别转染至悬浮培养的 293H 细胞(ATCC CRL-1573),培养 3-4 天后,收集细胞上清。与 proteinA 琼脂糖树脂进行免疫沉淀反应,通过非还原条件下 SDS-PAGE 电泳检测同二聚体蛋白或抗体 (ScFv-Fc/ScFv-Fc, Fc/Fc) 和异二聚体蛋白或抗体 ((ScFv-Fc/Fc) 的组成情况,电泳检测结果如图 5 所示,当在 ScFv-Fc 上引入 D356K/K439E 或 E375K/K370E 或 K392D/D399K 或 K409D/D399K 突变位点后,ScFv-Fc/ScFv-Fc, Fc/Fc 同二聚体的比例有大幅度的上升,而异二聚体 (ScFv-Fc/Fc) 比例则大幅度下降;当在 ScFv-Fc 上引入三个突变位点 K392D/K409D/D399K 时候,表达后蛋白是以 ScFv-Fc/ScFv-Fc 和 Fc/Fc 同二聚体的形式存在,进一步证明电荷排斥作用对于增强同二聚体和抑制异二聚体的形成至关重要。

[0103] 蛋白或抗体混合物组成的检测原理:融合蛋白 ScFv-Fc 比 Fc 具有更大的分子量,那么在 ScFv-Fc 和 Fc 混合过程中,同二聚体 (ScFv-Fc/ScFv-Fc 和 Fc/Fc) 和异二聚体 (ScFv-Fc/Fc) 在 SDS-PAGE 则具有不同的条带位置,通过这个原理就可以检测同二聚体与异二聚体的比例情况,ScFv-Fc 和 Fc 的表达载体共转染,最终会同时出现同二聚体 (ScFv-Fc/ScFv-Fc, Fc/Fc) 和异二聚体 (ScFv-Fc/Fc),在野生型的情况下是 ScFv-Fc/ScFv-Fc、ScFv-Fc/Fc 和 Fc/Fc 的理论值比例接近 1 : 2 : 1。

[0001]

序 列 表

- <110> 苏州康宁杰瑞生物科技有限公司
 <120> 利用电荷排斥作用制备同二聚体蛋白混合物的方法
 <130> KN-Patent-20120724
 <160> 4

<170> PatentIn version 3.5

- <210> 1
 <211> 780
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 1

```

aagcttgccg ccaccatgga gaccgacacc ctgctgctgt gggtgctgct gctgtgggtg      60
cccggcagca ccggcggcag cggcggcggc gacaagaccc acacctgccc cccctgcccc      120
gcccccgagc tgctgggcgg ccccagegtg ttccgtgtcc cccccaagcc caaggacacc      180
ctgatgatca gcaggacccc cgaggtgacc tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaggac      240
cccgaggtga agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcacaacgc caagaccaag      300
cccagggagg agcagtacaa cagcacctac aggggtggtga gcgtgctgac cgtgctgcac      360
caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag tgcaaggtga gcaacaagge cctgccccgc      420
cccatcgaga agaccatcag caaggccaag ggccagccca gggagcccca ggtgtacacc      480
ctgcccccca gcagggacga gctgaccaag aaccaggtga gcctgacctg cctggtgaag      540
ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca acggccagcc cgagaacaac      600
tacaagacca cccccccgt gctggacagc gacggcagct tcttctgta cagcaagctg      660
accgtggaca agagcaggtg gcagcagggc aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgag      720
gccctgcaca accactacac ccagaagagc ctgagcctga gccccggcaa gtaagaattc      780

```

<210> 2

<211> 252

[0002]

序 列 表

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 2

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Gly Ser Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 20 25 30

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 35 40 45

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 50 55 60

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 65 70 75 80

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 85 90 95

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr

[0003]

序 列 表

100	105	110
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val		
115	120	125
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala		
130	135	140
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg		
145	150	155
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly		
165	170	175
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro		
180	185	190
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser		
195	200	205
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln		
210	215	220
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His		
225	230	235
240		

[0004]

序 列 表

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

245

250

<210> 3

<211> 1494

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 3

```

aagcttgccg ccaccatggg ctggagcctg atcctgctgt tectggtggc cgtggccacc      60
aggggtgctga gcgaggtgca gctgctggag agcggcggcg gcgtggtgca gcccggcagg      120
agcctgaggc tgagctgcat cgccagcggc ttcacctca gcagctacc catgacctgg      180
gtgaggcagg cccccgcaa gggcctggag tgggtggcca gcatcagcta cgacggcagc      240
tacaagtaca aggccgacag catgaagggc aggctgacca tcagcaggga caacagcaag      300
aacaccctgt acctggagat gaacagcctg accgccgagg acaccgccgt gtactactgc      360
gccaggaccg ctttctcaa cgcctacgac ttctggggcc agggcaccct ggtgaccgtg      420
agcagcggca gcaccaaggg ccccagcgtg ggcggcggcg gcagcggcgg cggcggcagc      480
gagatcgtga tgaccagag ccccgccacc ctgagcgtga gccccggcga gagggccacc      540
ctgagctgca gggccagcca gagcgtgagg agcaacctgg cctggtacca gcagaagccc      600
ggccaggccc ccaggtgct gatctacgcc gccagcacca ggcccaccgg catccccgcc      660
aggttcagcg gcagcggcag cggcaccgag ttcaccctga ccatcagcag cctgcagagc      720
gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag tacaacgagt gggttcaggac cagcggccag      780
ggcaccaagg tggagatcaa gagggacaag acccacacct gccccccctg ccccgcccc      840
gagctgctgg gcggccccag cgtgttctgt ttcccccca agcccaagga caccctgatg      900
atcagcagga ccccagagt gacctgcgtg gtggtggacg tgagccacga ggaccccag      960
gtgaagtcca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcaca acgccaagac caagcccagg      1020
gaggagcagt acaacagcac ctacagggtg gtgagcgtgc tgaccgtgct gcaccaggac      1080

```

[0005]

序 列 表

tggctgaacg gcaaggagta caagtgcaag gtgagcaaca aggcctgcc cgccccatc 1140
 gagaagacca tcagcaaggc caagggccag cccagggagc cccaggtgta caccctgcc 1200
 cccagcaggg acgagctgac caagaaccag gtgagcctga cctgcctggt gaagggttc 1260
 taccaccagc acatcgccgt ggagtgggag agcaacggcc agcccagaaa caactacaag 1320
 accaccccc cctgtctgga cagcgacggc agctttcttc tgtacagcaa gctgaccgtg 1380
 gacaagagca ggtggcagca gggcaacgtg ttcagctgca gcgtgatgca cgaggccctg 1440
 cacaaccact acaccagaaa gagcctgagc ctgagccccg gcaagtaaga attc 1494

<210> 4

<211> 490

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 4

Met Gly Trp Ser Leu Ile Leu Leu Phe Leu Val Ala Val Ala Thr Arg
 1 5 10 15

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ile Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Ser Tyr Pro Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

[0006]

序 列 表

Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr
 195 200 205

Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 210 215 220

Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val
 225 230 235 240

Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Glu Trp Phe Arg Thr Ser Gly Gln Gly
 245 250 255

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 260 265 270

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 275 280 285

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 290 295 300

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 305 310 315 320

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

[0008]

序 列 表

	325		330		335
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu					
	340		345		350
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn					
	355		360		365
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly					
	370		375		380
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu					
	385		390		395
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr					
	405		410		415
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn					
	420		425		430
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe					
	435		440		445
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn					
	450		455		460

[0009]

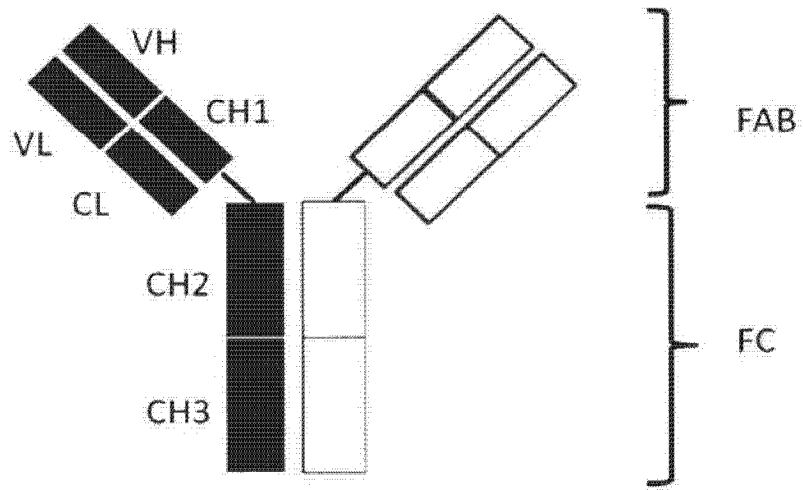


图 1

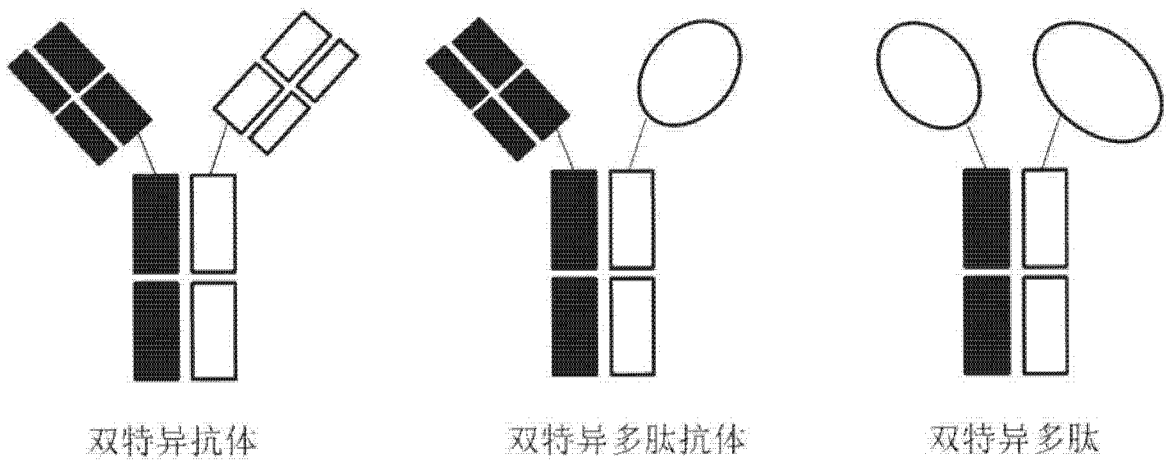


图 2

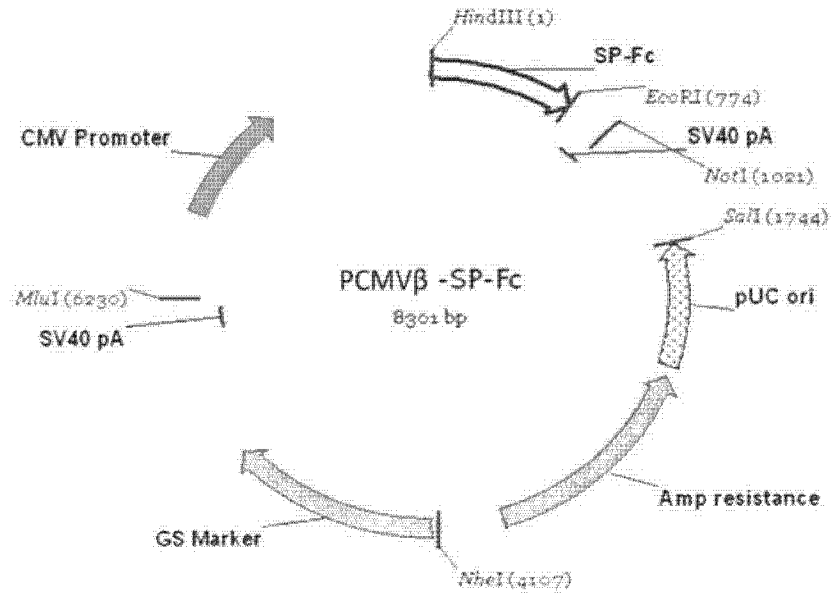


图 3

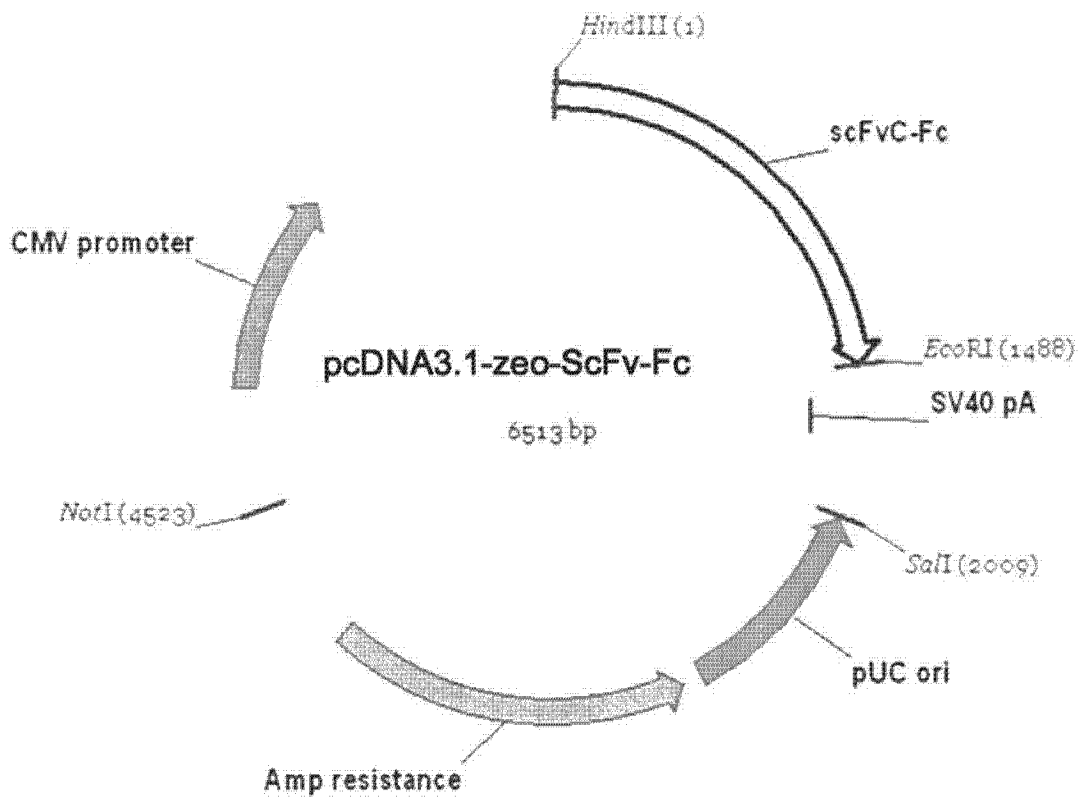


图 4

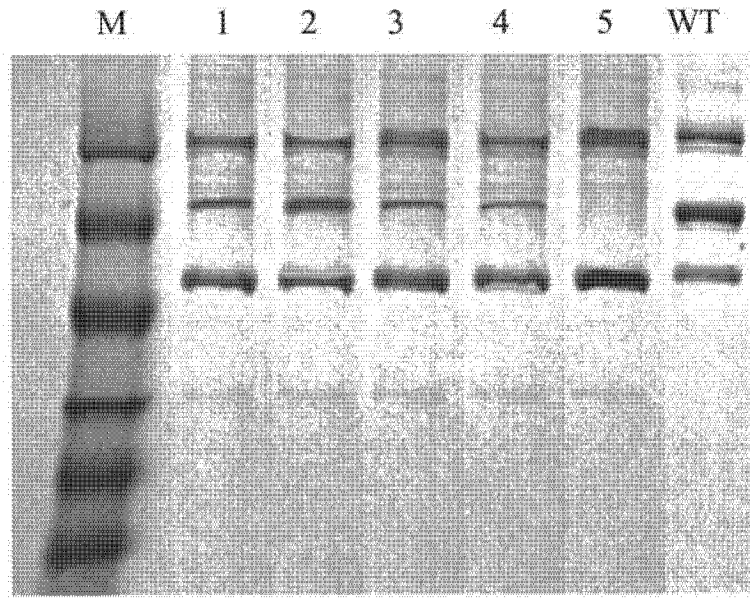


图 5