



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 109705211 B

(45)授权公告日 2020.08.18

(21)申请号 201711014953.3 *A61P 37/02*(2006.01)

(22)申请日 2017.10.26 *A61P 29/00*(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号 *A61P 25/28*(2006.01)

申请公布号 CN 109705211 A *A61P 25/00*(2006.01)

(43)申请公布日 2019.05.03 *A61P 35/00*(2006.01)

(73)专利权人 苏州复融生物技术有限公司 *A61P 31/00*(2006.01)

地址 215000 江苏省苏州市高新区城际路
21号2幢2101室-109 审查员 陈晋

(72)发明人 应天雷 王春雨

(74)专利代理机构 北京卓唐知识产权代理有限公司 11541

代理人 唐海力

(51)Int.Cl.

C07K 16/00(2006.01)

C40B 40/10(2006.01)

权利要求书1页 说明书12页
序列表3页 附图2页

(54)发明名称

一种IgG1 Fc单体及其应用

(57)摘要

本发明属于生物技术领域,具体涉及一种IgG1Fc单体、其制备方法、及其应用。本发明针对抗体IgG1恒定区改造后的新型IgG1Fc单体序列,通过抗体工程技术对人抗体IgG1恒定区Fc的改造,使其Fc二聚体变为Fc单体,且维持FcRn结合功能,具有极低的无关蛋白非特异性结合特性,所述Fc单体的主要特征是在抗体恒定区的CH3区的T366,L368,P395,K409位置存在突变,并在原核细胞中高效表达,可用一种pH依赖的特殊结合模式结合FcRn,以及具有极低的非特异性结合特性。利用此新型Fc单体,可与各种针对不同靶点的蛋白、多肽、小分子、核酸等进行融合或偶联,使被融合或偶联的分子具有可pH依赖结合FcRn的特性。

1. 一种IgG1Fc单体多肽,包含CH2和CH3结构域,其特征在于,肽链含有SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。
2. 一种融合蛋白,其包含权利要求1所述的IgG1Fc单体多肽和异源蛋白质。
3. 根据权利要求2中所述的融合蛋白,其中所述的异源蛋白质包含重链可变区和轻链可变区,且可以特异性结合抗原。
4. 根据权利要求3中所述的融合蛋白,其中所述的抗原是来源于病原体的抗原。
5. 根据权利要求4中所述的融合蛋白,其中所述的病原体是病毒或细菌。
6. 根据权利要求5中所述的融合蛋白,其中所述的病毒是人类免疫缺陷病毒(HIV)。
7. 根据权利要求2中所述的融合蛋白,其中所述的异源蛋白质是肿瘤抗原。
8. 根据权利要求7中所述的融合蛋白,其中所述的肿瘤是白血病,淋巴瘤,多发性骨髓瘤,恶性黑色素瘤,乳腺癌,肺癌,肝癌,胰腺癌,前列腺癌,结肠癌或者肾细胞癌。
9. 根据权利要求2中所述的融合蛋白,其中所述的异源蛋白质是自身免疫性或炎症性疾病抗原。
10. 根据权利要求2所述的融合蛋白,其中所述的融合蛋白包含毒素。
11. 根据权利要求2所述的融合蛋白,其中所述的异源蛋白质是细胞因子,可溶性受体或生长因子。
12. 根据权利要求2中所述的融合蛋白,其中所述的异源蛋白质是人干扰素,红细胞生成素,可溶性肿瘤坏死因子受体,CTLA-4,可溶性IL-4受体或因子IX。
13. 一种核酸分子,其编码权利要求1中所述的IgG1Fc单体多肽,或权利要求2-12中任一项所述的融合蛋白。
14. 一种质粒,含有权利要求13所述的核酸分子。
15. 一种宿主细胞,含有权利要求14所述的质粒。
16. 一种药用组合物,含有有效预防/治疗剂量的权利要求2-12任一项所述的融合蛋白,和一种药学可接受载体。
17. 一种药用组合物,含有有效预防/治疗剂量的权利要求14所述的质粒,和一种药学可接受载体。
18. 一种药用组合物,含有有效预防/治疗剂量的权利要求2-12任一项所述的融合蛋白,所述融合蛋白与荧光标记、放射性标记、亲和素、生物素或酶偶联。
19. 用于制备治疗自身免疫性疾病、炎症性疾病、神经退行性疾病、癌症或病原体感染的药物的用途,包括使用权利要求2-12任一项所述的融合蛋白,权利要求13所述的核酸分子,或权利要求14所述的质粒。
20. 根据权利要求19所述的用途,其中融合蛋白特异性结合病原体。
21. 根据权利要求20所述的用途,其中病原体是病毒。
22. 根据权利要求21所述的用途,其中病毒是免疫缺陷病毒。

一种IgG1 Fc单体及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种IgG1 Fc单体、其制备方法、及其应用。

背景技术

[0002] 研究公开了目前蛋白质药物的长效化技术主要有三种:PEG(聚乙二醇)修饰技术、HSA(人血清白蛋白)融合技术、Fc(人抗体Fc区)融合技术。该三种技术均存在各自的弱点,其中,共有的关键缺点是存在明显增加被融合或修饰的蛋白药物的分子量,且往往会显著降低被融合蛋白药物的产率和临床功效;如,人抗体恒定区Fc为同源二聚体,其本身分子量已经有60kDa,且被融合蛋白只能是二聚形式,这使得融合蛋白的分子量往往会增加数倍,同时二聚的药物分子之间可能会互相干扰导致影响药效。长期以来有关研究人员人们在探索用具有更小分子量、可在原核细胞中可溶表达的“抗体片段”(antibody fragment)作为生产成本低、组织渗透能力强的新一代抗体药物,包括Fab、单链抗体(scFv)、纳米抗体(nanobody)等,然而,这些抗体片段为了减小分子量,均需舍弃IgG的Fc区,使得它们不能结合FcRn,从而在体内半衰期极短(两小时以内)使得目前的小分子量抗体片段很难作为药物真正应用于疾病临床治疗。

[0003] 现有技术公开了人IgG的Fc区为同源二聚体。在本发明的前期研究中,利用一种多重功能筛选的新方法对人IgG1 Fc区进行改造,对10亿(10^9)个不同的Fc突变体分子进行成药性、FcRn结合活性等筛选,构建出了Fc单体分子(mFc),其分子量仅为IgG1 Fc区的一半,完全保留了抗体Fc区的FcRn结合性能、Protein A/G结合性能,并具有可以在大肠杆菌中高度可溶表达的优良特性,在动物体内半衰期可长达两天左右;继而,在研究过程中发现其具有非常强的非特异结合性质,此性质可能使得mFc在体内使用时非特异性结合无关蛋白,大大限制其临床使用空间。因此,本发明在前期研究的基础上,改变了突变位点以及优化了筛选步骤(如图1所示),获得了新型的IgG1 Fc单体,sFc(small-sized Fc),其不仅维持了之前单体Fc的优异特性,并且非特异性结合方面得到显著改善。

[0004] 与本发明相关的现有技术有:

[0005] [1]HOLLIGER P,HUDSON P J.Engineered antibody fragments and the rise of single domains[J].Nat Biotechnol,2005,23(9):1126-1136.

[0006] [2]SAERENS D,GHASSABEH G H,MUYLDERMANS S.Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics[J].Curr Opin Pharmacol,2008,8(5):600-608.

[0007] [3]YING T,FENG Y,WANG Y,et al.Monomeric IgG1 Fc molecules displaying unique Fc receptor interactions that are exploitable to treat inflammation-mediated diseases[J].MAbs,2014,6(5):1201-1210.

[0008] [4]YING T,CHEN W,GONG R,et al.Soluble monomeric IgG1 Fc[J].J Biol Chem,2012,287(23):19399-19408.。

发明内容

[0009] 本发明的目的是基于现有技术的基础,提供抗体工程改造的新型非特异性低的IgG1 Fc单体,具体涉及一种IgG1 Fc单体及其应用;

[0010] 具体的,本发明公开了编码IgG1 Fc单体的核酸;在一些实施方案中公开了包含这些核酸的载体,及包含这些载体的宿主细胞。

[0011] 基于IgG1恒定区Fc是一个同源二聚体,其可用一种pH依赖的特殊结合模式结合FcRn(neonatal Fc receptor,新生Fc受体),使得IgG1在体内具有较长的半衰期;本发明针对抗体IgG1恒定区改造后的新型IgG1 Fc单体序列;通过抗体工程技术对人抗体IgG1恒定区Fc的改造,使其Fc二聚体变为Fc单体,且维持FcRn结合功能,具有极低的无关蛋白非特异性结合特性,Fc单体的主要特征是在抗体恒定区的CH3区的T366,L368,P395,K409位置存在突变,并在原核细胞中高效表达,本发明中用一种pH依赖的特殊结合模式结合FcRn,以及具有极低的非特异性结合特性。

[0012] 利用本发明制得的新型Fc单体,可与各种针对不同靶点的蛋白、多肽、小分子、核酸等进行融合或偶联,使被融合或偶联的分子具有可pH依赖结合FcRn的特性。

[0013] 本发明的目的通过下述技术方案实现:

[0014] 1,新型IgG1 Fc单体(sFc)筛选及判断(如图1所示),本发明中在IgG1恒定区进行突变,其中与单体形成有关的包括四个定点突变位点和一个随机突变位点(Leu-351,Thr-366,Leu-368,Pro-395,Lys-409),与FcRn结合有关的包括两个随机突变位点(Met-428,Asn-434),基于此构建出库容量为 1.28×10^5 的IgG1 Fc突变抗体库;

[0015] 针对生物素标记的可溶性FcRn蛋白筛选新型IgG1 Fc单体,将生物素标记的可溶性的FcRn固定在链霉亲和素包被的磁珠上,10¹²个噬菌体展示的Fc在常温下于1,2轮与protein G孵育;3,4,5轮分别与5,4,2微克FcRn抗原孵育两小时,每轮的筛选所用的噬菌体均为10¹²个,用多克隆噬菌体ELISA检测抗体的富集,第3,4,5轮的噬菌体与包被的蛋白孵育,用抗噬菌体的HRP耦合抗体检测噬菌体与蛋白的结合;根据多克隆噬菌体ELISA结果,在第4,5轮筛选后得到了非常显著的富集;

[0016] 本发明选用这两轮筛选获得的噬菌体,感染TG1细胞并随机挑选克隆进行单克隆噬菌体ELISA,进一步进行测序鉴定富集的IgG1 Fc,利用SEC进行单体判断,结果显示(如图1所示),sFc,及筛选到的另一个蛋白1-B10-9(比sFc多了M428L突变)均为单体。

[0017] 2,新型IgG1 Fc单体(sFc)稳定性检测

[0018] 本发明中将sFc,1-B10-9,mFc和Fc均稀释浓度为0.25mg/ml,利用仪器Jasco J-815spectropolarimeter(Jasco International)在216nm处检测蛋白的稳定性,图2显示了结果:sFc,1-B10-9,mFc和Fc的T_m值分别为:62.4±0.1℃、64.0±0.1℃、58.4±0.2℃、80.6±0.3℃。

[0019] 3,利用表面等离子体共振(SPR)检测新型IgG1 Fc单体(sFc)与FcRn的结合能力

[0020] 本发明中利用SA(生物素亲和素)芯片检测新型IgG1 Fc单体与FcRn的结合能力,其中新型IgG1 Fc单体的可溶性表达制备基本按文献进行,检测过程中,蛋白按照2倍倍稀释(IgG1 Fc 200nM到6.25nM稀释,IgG1 Fc单体从400nM到12.5nM稀释),在pH 6.0条件下检测结合与解离获得亲和常数;图3显示了结果:与Fc、mFc比较,新型IgG1 Fc单体sFc及1-B10-9与FcRn的结合能力基本保持一致。

[0021] 4、新型IgG1 Fc单体 (sFc) 非特异性结合检测

[0022] 本发明中将Fc进行真核表达,mFc及新型IgG1 Fc单体sFc进行原核表达,通过Protein G纯化,用病毒和癌症相关的蛋白(gp140,mesothelin,ZIKV EDII,ZIKV EDIII,5T4,PD-L1,OX40,TIM-3)每孔100ng包板(#3690)4℃过夜,每孔加入100μl 3%MPBS(PBS+3% milk)在37℃封闭1h,然后用0.05%PBST(PBS+0.05%Tween 20)清洗,Fc,mFc,新型IgG1Fc单体sFc与1-B10-9起始2μM三倍倍比稀释,37℃与抗原孵育1.5h,经0.05%PBST清洗后加入1:1000anti-FLAG-HRP 37℃孵育45min后加入ABTS在吸光值为405nm处显色,比较三者之间的非特异性结合,新型IgG1 Fc单体明显优于mFc,图4显示的ELISA结果为:新型IgG1 Fc单体sFc和1-B10-9的非特异性结合很低。

[0023] 本发明中,所述的IgG1 Fc单体肽链包含CH2和CH3结构域,包含:肽链的氨基酸序列含有SEQ ID NO:1,其中X1是R/T;X2是L/H;X3是P/K;X4是K/T,其中Fc是单体且可以结合新生儿Fc受体(FcRn);

[0024] 所述的IgG1 Fc单体肽链,包含:肽链的氨基酸序列含有SEQ ID NO:2,其中X1是R;X2是H;X3是K;X4是T;

[0025] 本发明中,所述的CH3结构域,包含:

[0026] (a) SEQ ID NO:1所列出的氨基酸序列中第341-447位氨基酸;

[0027] (b) SEQ ID NO:2所列出的氨基酸序列中第341-447位氨基酸;

[0028] 其中,所采用的氨基酸编码系统为EU numbering system。

[0029] 本发明提供了一种融合蛋白,其包含上述的IgG1 Fc单体多肽,或者所述的CH3结构域,和异源蛋白质;

[0030] 所述的异源蛋白质包含重链可变区和轻链可变区,且可以特异性结合感兴趣的抗原;本发明的实施例中所述的异源蛋白质是来源于病原体的抗原;所述的病原体是病毒或细菌,其中所述的病毒选自人类免疫缺陷病毒(HIV);

[0031] 所述的异源蛋白质还选自肿瘤抗原;其中所述的肿瘤是白血病,淋巴瘤,多发性骨髓瘤,恶性黑色素瘤,乳腺癌,肺癌,肝癌,胰腺癌,前列腺癌,结肠癌或者肾细胞癌;

[0032] 所述的异源蛋白质还选自自身免疫性或炎症性疾病抗原;

[0033] 本发明所述的融合蛋白,其包含毒素;

[0034] 本发明所述的融合蛋白,其中的异源蛋白质选自细胞因子,可溶性受体,生长因子或标记物;

[0035] 本发明所述的融合蛋白,其中所述的异源蛋白质还选自人干扰素,红细胞生成素,可溶性肿瘤坏死因子受体,CTLA-4,可溶性IL-4受体或因子IX。

[0036] 本发明还提供了一种核酸分子,其编码权利要求所述的IgG1 Fc单体多肽,所述的CH3结构域,和/或所述的融合蛋白。

[0037] 本发明还提供了一种质粒,含有所述的核酸分子。

[0038] 本发明还提供了一种宿主细胞,含有所述的质粒。

[0039] 本发明还提供了一种药用组合物,含有有效预防/治疗剂量的所述的IgG1Fc单体多肽,所述的CH3结构域,或所述的融合蛋白,和一种药学可接受载体。

[0040] 本发明还提供了一种药用组合物,含有有效预防/治疗剂量的所述的核酸分子,或者所述的质粒,和一种药学可接受载体。

[0041] 本发明还提供了一种药用组合物,含有有效预防/治疗剂量的所述的IgG1Fc单体Fc多肽,所述的CH3结构域,和/或所述的融合蛋白,与一种可检测标记物偶联;其中的可检测标记物是荧光标记,放射性标记,亲和素,生物素,或酶。

[0042] 本发明还提供了一种治疗自身免疫性疾病,炎症性疾病,神经退行性疾病,癌症或病原体感染的方法,包括向所述受试者施用有效治疗量的所述的融合蛋白,所述的核酸分子,或所述的质粒;其中受试者已经感染了病原体,其中融合蛋白可以特异性结合病原体,并且其中所述方法治疗感染受试者中的病原体,其中病原体是病毒,所述病毒尤其是免疫缺陷病毒。

[0043] 本发明还提供了一种构建重组单体Fc文库的方法,包含:

[0044] (a) 将突变引入所述IgG1 Fc单体多肽CH2或CH3结构域的一个或多个 β 链中;或者

[0045] (b) 利用从异源免疫球蛋白可变区中保留有特异性结合抗原的互补决定区(CDR)或功能片段代替部分CH2结构域或CH3结构域;或者

[0046] (c) 二者都有;

[0047] 利用上述方法建库。

[0048] 本发明按照上述方法构建重组单体Fc文库;重组单体Fc文库包含CH2和CH3结构域,文库中的每一个IgG1 Fc单体多肽

[0049] (a) 是单体形式;

[0050] (b) 分子量小于30KD;

[0051] (c) 可以结合新生儿Fc受体(FcRn);

[0052] (d) 包含的氨基酸序列与SEQ ID NO:1具有至少95%的相同性。

[0053] 本发明中,核酸分子编码单体Fc多肽文库包含CH2和CH3结构域,文库中编码的每一个Fc多肽:

[0054] (a) 是单体;

[0055] (b) 分子量小于30KD;

[0056] (c) 可以结合FcRn;

[0057] (d) 包含的氨基酸序列与SEQ ID NO:1具有至少95%的相同性。

[0058] 本发明提供的的新型IgG1 Fc单体(sFc)可作为小分子量长效单体模块,与抗体片段进行融合构建新型基因工程抗体,为突破抗体药物的发展瓶颈提供重要的理论依据和解决方案;或与各种针对不同靶点的蛋白、多肽、小分子、核酸等进行融合或偶联,使被融合或偶联的分子具有可pH依赖结合FcRn的特性,从而具有潜在的更好成药性及更长的体内半衰期。

附图说明

[0059] 图1,利用SEC检测新型IgG1 Fc单体(sFc)与之前单体Fc(mFc)及IgG1 Fc进行比较。

[0060] 图2,本.新型IgG1 Fc单体稳定性检测。

[0061] 图3,利用表面等离子体共振(SPR)检测新型IgG1 Fc单体(sFc)与FcRn的结合能力。

[0062] 图4,本.新型IgG1 Fc单体(sFc)非特异性检测,并与之前单体Fc(mFc)及IgG1 Fc

进行比较。

具体实施方式

[0063] 实施例1筛选及判断型IgG1 Fc单体 (sFc)

[0064] 在IgG1恒定区进行突变,其中与单体形成有关的包括四个定点突变位点和一个随机突变位点 (Leu-351, Thr-366, Leu-368, Pro-395, Lys-409), 与FcRn结合有关的包括两个随机突变位点 (Met-428, Asn-434), 基于此构建出库容量为 1.28×10^5 的IgG1 Fc突变抗体库。针对生物素标记的可溶性FcRn蛋白筛选新型IgG1 Fc单体;将生物素标记的可溶性的FcRn固定在链霉亲和素包被的磁珠上,10¹²个噬菌体展示的Fc在常温下于1,2轮与proteinG孵育;3,4,5轮分别与5,4,2微克FcRn抗原孵育两小时,每轮的筛选所用的噬菌体均为10¹²个,用多克隆噬菌体ELISA检测抗体的富集。第3,4,5轮的噬菌体与包被的蛋白孵育,用抗噬菌体的HRP耦合抗体检测噬菌体与蛋白的结合,根据多克隆噬菌体ELISA结果,在第4,5轮筛选后得到显著的富集,因此,选用这两轮筛选获得的噬菌体,感染TG1细胞并随机挑选克隆进行单克隆噬菌体ELISA,进一步进行测序鉴定富集的IgG1 Fc,利用SEC进行单体判断,结果显示(如图1所示),sFc,及筛选到的另一个蛋白1-B10-9(比sFc多了M428L突变)均为单体;

[0065] 稳定性检测:将sFc,1-B10-9,mFc和Fc均稀释浓度为0.25mg/ml,利用仪器JascoJ-815spectropolarimeter (Jasco International)在216nm处检测蛋白的稳定性,图2显示了结果,sFc,1-B10-9,mFc和Fc的T_m值分别为:62.4±0.1°C、64.0±0.1°C、58.4±0.2°C、80.6±0.3°C;

[0066] 利用表面等离子体共振 (SPR) 检测新型IgG1 Fc单体 (sFc) 与FcRn的结合能力:利用SA(生物素亲和素)芯片检测新型IgG1 Fc单体与FcRn的结合能力。其中IgG1 Fc单体的可溶性表达制备基本按文献进行,检测过程中,蛋白按照2倍倍比稀释(IgG1 Fc 200nM到6.25nM稀释,IgG1 Fc单体从400nM到12.5nM稀释),在pH 6.0条件下检测结合与解离获得亲和常数,结果显示(如图3所示),与Fc、mFc比较,新型IgG1 Fc单体sFc及1-B10-9与FcRn的结合能力基本保持一致;

[0067] 非特异性结合检测IgG1 Fc单体 (sFc):将Fc进行真核表达,mFc及所述IgG1 Fc单体sFc进行原核表达,通过Protein G纯化,用病毒和癌症相关的蛋白(gp140,mesothelin,ZIKV EDII,ZIKV EDIII,5T4,PD-L1,OX40,TIM-3)每孔100ng包板(#3690)4°C过夜,每孔加入100μl 3%MPBS (PBS+3% milk)在37°C封闭1h,然后用0.05%PBST (PBS+0.05% Tween 20)清洗,Fc,mFc,所述IgG1 Fc单体sFc与1-B10-9起始2μM三倍倍比稀释,37°C与抗原孵育1.5h,经0.05%PBST清洗后加入1:1000anti-FLAG-HRP 37°C孵育45min后加入ABTS在吸光值为405nm处显色,比较三者之间的非特异性结合,所述IgG1 Fc单体明显优于mFc。图4显示的ELISA结果为:所述的IgG1 Fc单体sFc和1-B10-9的非特异性结合很低。

[0068] SEQUENCE LISTING

[0069] SEQ ID NO:1是mutated Fc的氨基酸序列

[0070] >mutated Fc (SEQ ID NO:1):

[0071] APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLXICX2VKGF

YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTX3PVLDSGDSFFLYSX4LTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0072] SEQ ID NO:2是sFc的氨基酸序列

[0073] >sFc (SEQ ID NO:2)

[0074] APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLRCHVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTKPVLDSDGDSFFLYSTLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK。

SEQUENCE LISTING

<110> 复旦大学

<120> 一种 IgG1 Fc 单体及其应用

<130> 20171025

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 217

<212> PRT

<213> mutated Fc

<220>

[0075]

<221> MUTAGEN

<222> (136).. (136)

<223> Xaa=Arg 或 Thr

<220>

<221> MUTAGEN

<222> (138).. (138)

<223> Xaa=Leu 或 His

<220>

<221> MUTAGEN

<222> (165).. (165)

<223> Xaa=Pro 或 Lys

<220>

<221> MUTAGEN

<222> (179).. (179)

<223> Xaa=Lys 或 Thr

<400> 1

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

[0076]

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 Gly
 Gln
 100 105 110
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 Leu
 115 120 125
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Xaa Cys Xaa Val Lys Gly Phe Tyr
 [0077] Pro
 130 135 140
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 Asn
 145 150 155
 160
 Tyr Lys Thr Thr Xaa Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 Leu
 165 170
 175
 Tyr Ser Xaa Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

Val

180

185

190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

Gln

195

200

205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

210

215

<210> 2

<211> 217

<212> PRT

<213> sFc

[0078]

<400> 2

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
 [0079] Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 Gln
 100 105 110
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 Leu
 115 120 125
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Arg Cys His Val Lys Gly Phe Tyr
 Pro
 130 135 140
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 Asn

145

150

155

160

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

Leu

165

170

175

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

[0080]

Val

180

185

190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

Gln

195

200

205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

210

215

[0001] SEQUENCE LISTING
 [0002] <110> 复旦大学
 [0003] <120> 一种IgG1 Fc单体及其应用
 [0004] <130> 20171025
 [0005] <160> 2
 [0006] <170> PatentIn version 3.3
 [0007] <210> 1
 [0008] <211> 217
 [0009] <212> PRT
 [0010] <213> mutated Fc
 [0011] <220>
 [0012] <221> MUTAGEN
 [0013] <222> (136) .. (136)
 [0014] <223> Xaa=Arg或Thr
 [0015] <220>
 [0016] <221> MUTAGEN
 [0017] <222> (138) .. (138)
 [0018] <223> Xaa=Leu或His
 [0019] <220>
 [0020] <221> MUTAGEN
 [0021] <222> (165) .. (165)
 [0022] <223> Xaa=Pro或Lys
 [0023] <220>
 [0024] <221> MUTAGEN
 [0025] <222> (179) .. (179)
 [0026] <223> Xaa=Lys或Thr
 [0027] <400> 1
 [0028] Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 [0029] 1 5 10 15
 [0030] Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 [0031] 20 25 30
 [0032] Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 [0033] 35 40 45
 [0034] Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 [0035] 50 55 60
 [0036] Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 [0037] 65 70 75 80
 [0038] Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

[0039]		85		90		95										
[0040]	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln
[0041]			100						105					110		
[0042]	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu
[0043]			115						120					125		
[0044]	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Xaa	Cys	Xaa	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro
[0045]			130						135					140		
[0046]	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn
[0047]	145					150						155			160	
[0048]	Tyr	Lys	Thr	Thr	Xaa	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu
[0049]					165					170					175	
[0050]	Tyr	Ser	Xaa	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val
[0051]				180						185				190		
[0052]	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln
[0053]			195							200				205		
[0054]	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys							
[0055]			210							215						
[0056]	<210>	2														
[0057]	<211>	217														
[0058]	<212>	PRT														
[0059]	<213>	sFc														
[0060]	<400>	2														
[0061]	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys
[0062]	1			5						10				15		
[0063]	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val
[0064]				20						25				30		
[0065]	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr
[0066]				35						40				45		
[0067]	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu
[0068]				50						55				60		
[0069]	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His
[0070]	65					70						75			80	
[0071]	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys
[0072]					85							90			95	
[0073]	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln
[0074]				100								105			110	
[0075]	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu
[0076]				115								120			125	
[0077]	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Arg	Cys	His	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro

[0078]	130	135	140
[0079]	Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn		
[0080]	145	150	155 160
[0081]	Tyr Lys Thr Thr Lys Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu		
[0082]		165	170 175
[0083]	Tyr Ser Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val		
[0084]		180	185 190
[0085]	Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln		
[0086]		195	200 205
[0087]	Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
[0088]	210	215	

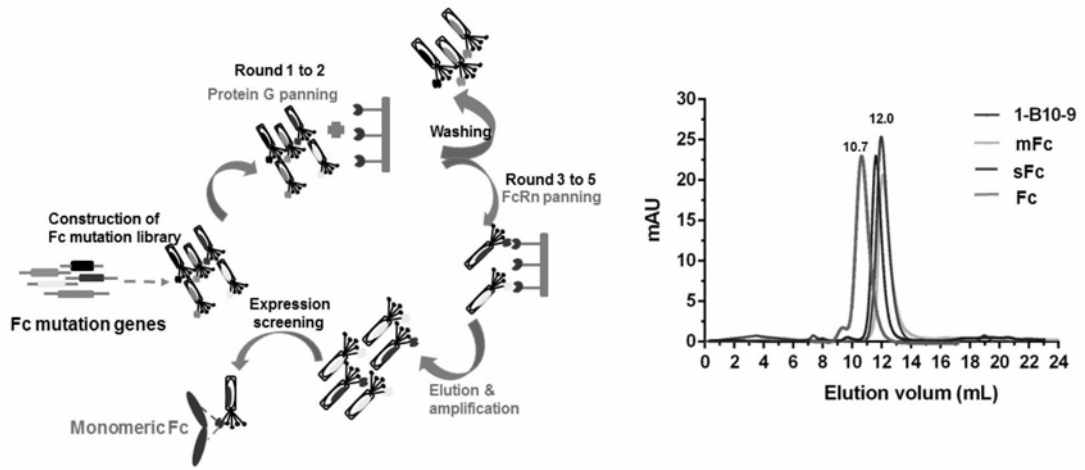


图1

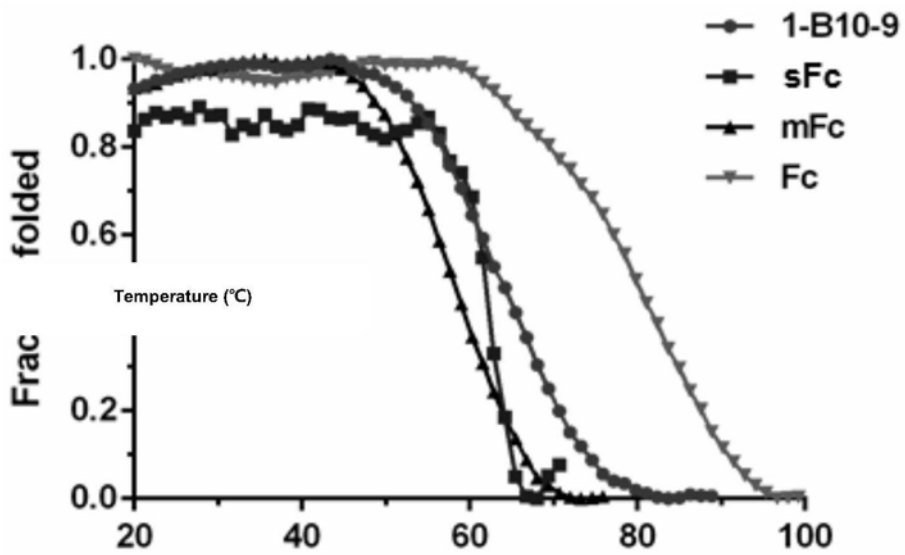


图2

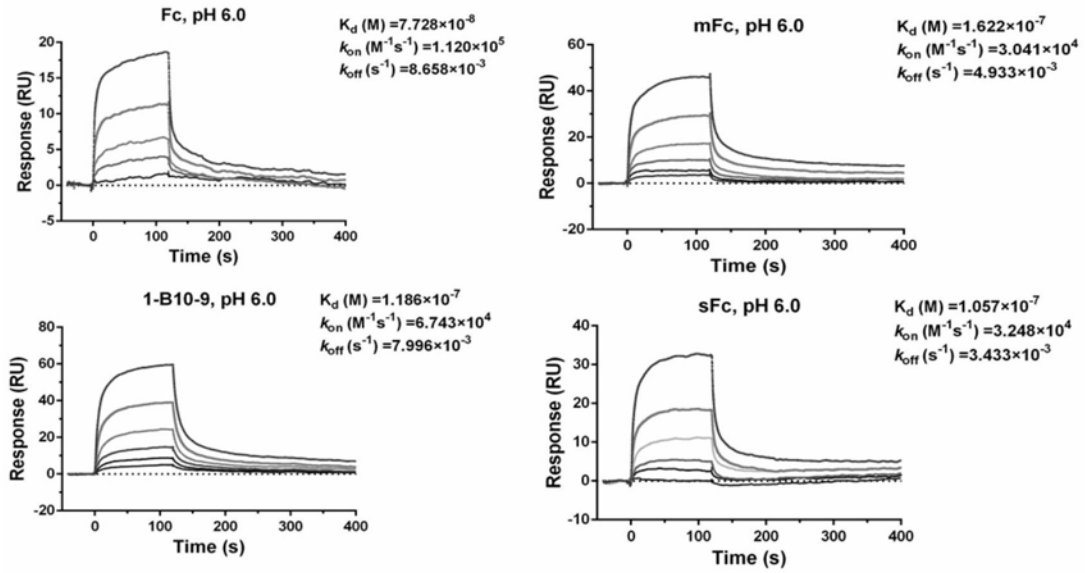


图3

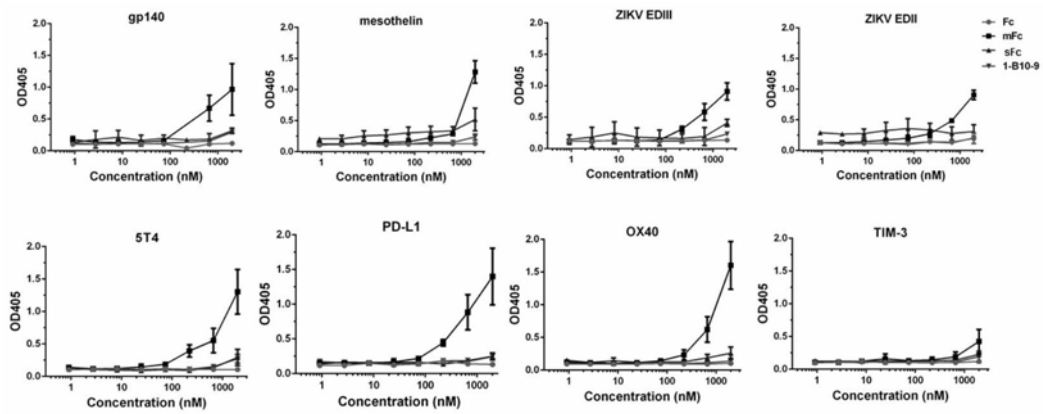


图4