



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118085091 A

(43) 申请公布日 2024. 05. 28

(21) 申请号 202410254572.6

(22) 申请日 2017.08.02

(30) 优先权数据

62/370,201 2016.08.02 US

62/485,671 2017.04.14 US

(62) 分案原申请数据

201780059776.2 2017.08.02

(71) 申请人 威特拉公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 K·维斯瓦纳森 B·兰马克里斯南

B·布思 K·纳拉扬

A·M·沃拉科特

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

专利代理师 杨昀

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

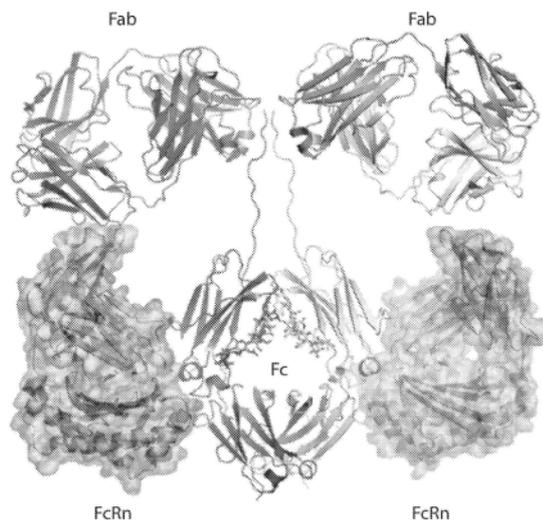
权利要求书6页 说明书77页  
序列表(电子公布) 附图29页

(54) 发明名称

工程化多肽及其应用

(57) 摘要

公开了工程化多肽及其应用,具体涉及包含Fc区的多肽,如抗体分子和融合蛋白,所述Fc区包含突变。所述多肽可用于治疗、预防和/或诊断病症。具体而言,公开了包含一个或多个突变的Fc区,所述突变选自表1所公开的具体突变。某些所述突变使得对新生儿Fc受体(FcRn)的亲合力提高,且某些所述突变使得工程化抗体的半衰期增强,且还对效应功能有影响。具体公开的突变为:M252Y、S254T、T256E、L309N、T250Q、M428L、N434S、N434A、T307A、E380A、N434A、M252Y、S254T、T256E或其组合,例如T256D/Q311V/A378V、H285N/T307Q/N315D、H285D/T307Q/A378V、T307Q/Q311V/A378V、T256D/N286D/T307R/Q311V/A378V或T256D/T307R/Q311。



1. 一种包含Fc区的多肽,其中,所述Fc区包含突变,其中,所述多肽具有如下性质中的3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13项或全部:

- a) 与参比多肽相比,在pH6.0~6.5时,对新生儿Fc受体(FcRn)的结合亲和力提高;
- b) 与在pH 7.0~7.4下对FcRn的结合亲和力相比,在pH 6.0~6.5下的结合亲和力更高;
- c) 在pH 6.0~6.5下以300nM或更低的解离常数( $K_d$ )结合FcRn;
- d) 在pH 7.0~7.4下,以50nM或更高的 $K_d$ 结合FcRn;
- e) 与参比多肽相比,对Fc $\gamma$ 受体的结合亲和力相同、基本上相同或提高;
- f) 与参比多肽相比,热稳定性相同或基本上相同;
- g) 与参比多肽相比,对C1q的结合亲和力相同、基本上相同或提高;
- h) 与参比多肽相比,对TRIM21的结合亲和力相同、基本上相同或提高;
- i) 与参比多肽相比,效应功能相同、基本上相同或提高;
- j) 与参比多肽相比,体内半衰期延长;
- k) 与参比多肽相比,体外、离体或体内生物功能相同、基本上相同或提高;
- l) 与参比多肽相比,可开发性特征相同、基本上相同或提高;
- m) 与参比多肽相比,对表位的结合亲和力、特异性或这两者相同、基本上相同或提高;
- n) 与参比多肽相比,黏膜摄取提高;

其中,所述多肽至少具有性质a)、b),以及性质e)、f)、g)、h)或i)中的一项、两项、三项、四项或全部。

2. 如权利要求1所述的多肽,其至少具有性质a)、b)、c)、d),以及性质e)、f)、g)、h)或i)中的一项、两项、三项、四项或全部。

3. 如权利要求1或2所述的多肽,其至少具有特征a)、b),特征e)、f)、g)、h)或i)中的一项、两项、三项、四项或全部,以及特征c)、d)、j)、k)、l)、m)或n)中的一项、两项、三项、四项、五项、六项或全部。

4. 如权利要求1~3中任一项所述的多肽,通过基于Octet的测试或基于细胞的测试测定,所述多肽与参比多肽相比,在pH6.0下对FcRn的结合亲和力至少提高1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40或50倍。

5. 如权利要求1~4中任一项所述的多肽,通过基于Octet的测试或基于细胞的测试测定,所述多肽在pH6.0下对FcRn的结合亲和力相比pH7.4下的结合亲和力至少高1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20或50倍。

6. 如权利要求1~5中任一项所述的多肽,通过基于Octet的测试或基于细胞的测试测定,所述多肽在pH 6.0时结合FcRn的解离常数( $K_d$ )为250nM或更低、200nM或更低、150nM或更低、100nM或更低、50nM或更低、25nM或更低、10nM或更低、5nM或更低、2nM或更低、1nM或更低、0.5nM或更低、0.2nM或更低、0.1nM或更低、0.05nM或更低、0.02nM或更低、0.01nM或更低、25nM~0.1nM、20nM~0.5nM、15nM~1nM、10nM~5nM或20nM~10nM。

7. 如权利要求1~6中任一项所述的多肽,通过基于Octet的测试或基于细胞的测试测定,所述多肽在pH 7.4时结合FcRn的 $K_d$ 为60nM或更高、80nM或更高、100nM或更高、150nM或更高、200nM或更高、500nM或更高、50nM~500nM或100nM~250nM。

8. 如权利要求1~7中任一项所述的多肽,通过基于Octet的测试或基于细胞的测试测

定,所述多肽与参比多肽相比,对Fc  $\gamma$  RI、Fc  $\gamma$  RIIa/b或Fc  $\gamma$  RIII中之一、之二或全部的结合亲和力降低不超过10%、20%、30%、40%或50%,或者对Fc  $\gamma$  RI、Fc  $\gamma$  RIIa/b或Fc  $\gamma$  RIII中之一、之二或全部的结合亲和力提高至少1.5、2、3、4或5倍。

9. 如权利要求1~8中任一项所述的多肽,通过宝石橙染色测试测定,所述多肽与参比多肽相比,解链温度提高或降低不超过1°C、2°C、3°C、4°C、5°C、6°C、7°C、8°C、9°C或10°C。

10. 如权利要求1~9中任一项所述的多肽,通过ELISA测定,所述多肽与参比多肽相比,对C1q结合亲和力降低不超过10%、20%、30%、40%或50%,或者对C1q的结合亲和力提高至少1.5、2、3、4或5倍。

11. 如权利要求1~10中任一项所述的多肽,通过ELISA测定,所述多肽与参比多肽相比,对TRIM21的结合亲和力降低不超过10%、20%、30%、40%或50%,或者对TRIM21的结合亲和力提高至少1.5、2、3、4或5倍。

12. 如权利要求1~11中任一项所述的多肽,与参比多肽相比,所述多肽的补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)或抗体依赖性细胞内中和作用作用(ADIN)中的一项、两项、三项或全部降低不超过10%、20%、30%、40%或50%,或者所述多肽的补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)或抗体依赖性细胞内中和作用作用(ADIN)中的一项、两项、三项或全部提高至少1.5、2、3、4或5倍。

13. 如权利要求1~12中任一项所述的多肽,通过在动物模型中的测定,与参比多肽相比,所述多肽的体内半衰期延长至少1.5、2、3、4、5、6、7、8、9或10倍。

14. 如权利要求1~13中任一项所述的多肽,与参比多肽相比,所述多肽的体外、离体或体内生物功能降低不超过10%、20%、30%、40%或50%,或者所述多肽的体外、离体或体内生物功能提高至少1.5、2、3、4或5倍。

15. 如权利要求1~14中任一项所述的多肽,与参比多肽相比,所述多肽稳定性、可溶性、聚集或表达水平中一项、两项、三项或全部的改变不超过10%、20%、30%、40%或50%。

16. 如权利要求1~15中任一项所述的多肽,与参比多肽相比,所述多肽的结合亲和力、特异性或这两者降低不超过10%、20%、30%、40%或50%,或者所述多肽的结合亲和力、特异性或这两者提高至少1.5、2、3、4或5倍。

17. 如权利要求1~16中任一项所述的多肽,通过转胞吞测试测定,与参比多肽相比,所述多肽的黏膜摄入提高至少1.5、2、3、4、5、6、7、8、9或10倍。

18. 如权利要求1~4或8-17中任一项所述的多肽,其中所述参比多肽包含野生型Fc区,包含如下序列的Fc区:SEQ ID NO:1的氨基酸序列,或与其具有至少约85%、90%、95%、99%或更高相同性的氨基酸序列,或区别不超过1、2、5、10或15个氨基酸残基。

19. 如权利要求1~18中任一项所述的多肽,其中突变在CH2结构域中的残基中。

20. 如权利要求1~18中任一项所述的多肽,其中突变在CH3结构域中的残基中。

21. 如权利要求1~20中任一项所述的多肽,其包含至少一个CH2结构域中残基中的突变以及至少一个CH3结构域中残基中的突变。

22. 如权利要求1~21中任一项所述的多肽,其还包含除CH2结构域和/或CH3结构域之外区域内残基中的突变。

23. 如权利要求1~22中任一项所述的多肽,其中突变不改变或不实质性改变CH2结构

域和CH3结构域间的接头区构象。

24. 如权利要求1~23中任一项所述的多肽,其中突变不在表面区上引入3、4、5、6、7、8、9、10或更多个连续疏水或芳族残基。

25. 如权利要求1~24中任一项所述的多肽,其包括抗体分子。

26. 如权利要求1~25中任一项所述的多肽,其包含IgG。

27. 如权利要求1~26中任一项所述的多肽,其包括IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

28. 如权利要求1~27中任一项所述的多肽,其包括重链免疫球蛋白可变区、轻链免疫球蛋白可变区、或这两者。

29. 如权利要求1~28中任一项所述的多肽,其包含两个重链免疫球蛋白可变区和两个轻链免疫球蛋白可变区的四聚体。

30. 如权利要求1~29中任一项所述的多肽,其包括全长抗体分子。

31. 如权利要求1~30中任一项所述的多肽,其包括抗体分子的片段。

32. 如权利要求1~31中任一项所述的多肽,其包括嵌合抗体分子或鼠抗体分子。

33. 如权利要求1~32中任一项所述的多肽,其包括人抗体分子或人源化抗体分子。

34. 如权利要求1~24中任一项所述的多肽,其包括融合蛋白。

35. 如权利要求1~34中任一项所述的多肽,其包括以下1、2、3、4项或全部:

(i) 与FcRn相互作用的表面区中残基中的突变;

(ii) 沿Fc-FcRn界面的外围残基中的残基突变;

(iii) Fc-FcRn结合中非接触残基中的残基突变;

(iv) 增强螺旋构象动力学表现的螺旋接触残基中的残基突变,所述螺旋包含P247、K248、D249、T250、L251或M252中的1、2、3、4、5个或全部;或

(v) 调节组氨酸pK和/或沿Fc-FcRn界面引入组氨酸的突变。

36. 如权利要求1~35中任一项所述的多肽,其包含与FcRn相互作用的表面区中残基的突变。

37. 如权利要求36所述的多肽,其中,所述突变位于选自下组的残基中:L251、I253、R255、P257、H285、N286、K288、T307、V308、L309、Q311、L314、H310、H433、N434、H435或Y436。

38. 如权利要求1~37中任一项所述的多肽,其包含选自下组残基中2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16个或全部残基中的多个突变:L251、I253、R255、P257、H285、N286、K288、T307、V308、L309、Q311、L314、H310、H433、N434、H435或Y436。

39. 如权利要求1~38中任一项所述的多肽,其包含沿Fc-FcRn界面的外围残基中的突变。

40. 如权利要求39所述的多肽,其中,所述突变发生在选自M252、T256、T307、L309、Q311、H433、N434、Y436、N286或K288的残基中。

41. 如权利要求1~40中任一项所述的多肽,其包含选自下组残基中2、3、4、5、6、7、8、9个或全部残基中的多个突变:M252、T256、T307、L309、Q311、H433、N434、Y436、N286或K288。

42. 如权利要求1~41中任一项所述的多肽,其包含位于Fc-FcRn结合非接触残基中的突变。

43. 如权利要求42所述的多肽,其中,所述突变发生在选自A287、V308、N315、L314、L432、H429、E430或A431的残基中。

44. 如权利要求1~43中任一项所述的多肽,其包含选自下组残基中2、3、4、5、6、7个或全部残基中的多个突变:A287、V308、N315、L314、L432、H429、E430或A431。

45. 如权利要求1~44中任一项所述的多肽,其包含增强螺旋构象动力学表现的螺旋接触残基中的残基突变,所述螺旋包含P247、K248、D249、T250、L251或M252中的1、2、3、4、5个或全部。

46. 如权利要求45所述的多肽,其中,所述突变发生在选自下组的残基中:P244、P245、T250、L251、P247、E380、M428、A378、D376、P257、V308、A287、L306或H427。

47. 如权利要求1~46中任一项所述的多肽,其包含选自下组残基中2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13个或全部残基中的多个突变:P244、P245、T250、L251、P247、E380、M428、A378、D376、P257、V308、A287、L306或H427。

48. 如权利要求1~47中任一项所述的多肽,其包含沿Fc-FcRn导入组氨酸的突变。

49. 如权利要求1~48中任一项所述的多肽,其包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个表1中的突变或一种或多种表1中突变的组合。

50. 如权利要求1~49中任一项所述的多肽,其中,所述突变不是M252Y、S254T、T256E、L309N、T250Q、M428L、N434S、N434A、T307A、E380A、N434A、M252Y、S254T、T256E或其组合。

51. 如权利要求1~50中任一项所述的多肽,其中,所述突变不是如下残基的突变:M252Y、S254T、T256E、L309N、T250、M428、N434、N434、T307、E380、N434、M252、S254、T256或其组合。

52. 如权利要求1~51中任一项所述的多肽,其不具有1、2、3、4、5、6、7、8、9种或全部以下单突变或多突变:

(i) M252Y、S254T和T256E;

(ii) L309N;

(iii) T250Q和M428L;

(iv) M428L和N434A;

(v) N434A;

(vi) T307A、E380A和N434A;

(vii) M252W;

(viii) V308F;

(ix) V308F和N434Y;或

(x) H435A。

53. 如权利要求1~52中任一项所述的多肽,其包含选自下组的第一突变:M252Y、S254T、T256E、L309N、T250Q、M428L、N434S、N434A、T307A、E380A、N434A、M252Y、S254T或T256E,以及选自表1中的第二突变,所述第二突变不是M252Y、S254T、T256E、L309N、T250Q、M428L、N434S、N434A、T307A、E380A、N434A、M252Y、S254T和T256E。

54. 如权利要求1~53中任一项所述的多肽,其还在Fc区中包含提高效率功能的突变。

55. 如权利要求54所述的多肽,其中,所述突变发生在选自S239、A330、I332、F243、G236或其组合的残基中。

56. 如权利要求1~55中任一项所述的多肽,其还在Fc区中包含降低效应功能的突变。

57. 如权利要求56所述的多肽,其中,所述突变发生在选自K322、L234、L235、P331、N297

或其组合的残基中。

58. 如权利要求1~57中任一项所述的多肽,其中,所述Fc区包含:

(a) 选自下组突变组合中的1、2、3、4、5种或全部:T256D/Q311V/A378V、H285N/T307Q/N315D、H285D/T307Q/A378V、T307Q/Q311V/A378V、T256D/N286D/T307R/Q311V/A378V或T256D/T307R/Q311V;

(b) 能够干扰Fc效应功能的突变或突变组合,或者

(c) (a) 和 (b)。

59. 如权利要求1~59中任一项所述的多肽,其包含选自下组残基中的突变:

(i) T256、Q311和A378;

(ii) H285、T307和N315;

(iii) H285、T307和A378;

(iv) T307、Q311和A378;

(v) T256、N286、T307、Q311和A378;或

(vi) T256、H285、T307、Q311和A378。

60. 如权利要求1~59中任一项所述的多肽,其包含选自下组的突变:

(i) T256D、Q311V和A378V;

(ii) H285N、T307Q和N315D;

(iii) H285D、T307Q和A378V;

(iv) T307Q、Q311V和A378V;

(v) T256D、N286D、T307R、Q311V和A378V;或

(vi) T256D、H285D、T307R、Q311V和A378V。

61. 如权利要求1~60中任一项所述的多肽,其还包含Fc区之外区域中的突变。

62. 如权利要求1~61中任一项所述的多肽,其包含多个突变,其中至少一个突变是补偿性或有益突变。

63. 如权利要求1~62中任一项所述的多肽,其为分离的多肽。

64. 如权利要求1~62中任一项所述的多肽,其为合成多肽。

65. 一种组合物,其包含权利要求1~64中任一项所述的多肽。

66. 如权利要求65所述的组合物,其还包含药学上可接受的载剂。

67. 一种核酸分子,其编码权利要求1~64中任一项所述的多肽。

68. 一种包含权利要求67所述核酸分子的载体。

69. 一种细胞,其包含如权利要求67所述的核酸分子或如权利要求68所述的载体。

70. 一种试剂盒,其包含如权利要求1~64中任一项所述的多肽以及使用该多肽的说明。

71. 一种组合物,其包含权利要求1~64中任一项所述的多肽。

72. 一种生产多肽的方法,所述方法包括:在允许产生抗体分子的条件下培养权利要求69所述的细胞,从而生产所述多肽。

73. 如权利要求72所述的方法,其还包括分离或纯化所述多肽。

74. 一种治疗病症的方法,所述方法包括给予有此需要的对象有效量的如权利要求1~64中任一项所述的多肽或者如权利要求65或66所述的组合物,由此治疗所述病症。

75. 如权利要求1~64中任一项所述的多肽或如权利要求65或66所述的组合物,其用于治疗对象中的病症。

76. 如权利要求1~64中任一项所述的多肽或如权利要求65或66所述的组合物在制备用于治疗对象中的病症的药物中的用途。

77. 一种检测分子的方法,所述方法包括使来自对象的细胞或样品接触如权利要求1~64中任一项所述的多肽,从而检测所述分子。

## 工程化多肽及其应用

### 技术领域

[0001] 本申请属于工程化多肽领域以及疾病治疗、预防和/或诊断领域。本公开的至少部分内容提供了包含免疫球蛋白Fc区的以及包含本文所公开一种或多种结构或功能特征的多肽(例如抗体分子或融合蛋白)。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2016年8月2日提交的美国临时申请号62/370,201以及2017年4月14日提交的美国临时申请号62/485,671的权益。上述申请的内容通过引用的方式全文纳入本文。

### 背景技术

[0004] 单克隆抗体疗法是一类涉及单克隆抗体(mAb)的免疫疗法,所述mAb能够与疾病相关生物分子特异性相互作用。近年来,能用治疗性抗体靶向的疾病范围已显著扩大,许多单克隆抗体和抗体衍生产品已在美国和许多其他国家获批用于治疗。目前,单克隆抗体疗法被用于各种疾病或病症的治疗或研究,这些疾病或病症包括例如感染性疾病、癌症、免疫性疾病、器官移植、心血管疾病和代谢疾病。

[0005] 单克隆抗体的效力可通过多种作用机理实现(Suzuki等,J Toxicol Pathol.2015;28(3):133-139)。许多治疗性抗体中和其目标分子或细胞的病理生理功能。近年来,已将阻断免疫哨点的单克隆抗体用于提高癌症患者的抗肿瘤免疫,它们具有产生持久临床反应的潜能。某些单克隆抗体能够触发抗体依赖性细胞介导的细胞毒(ADCC)活性或补体依赖性细胞毒(CDC)活性。还可将单克隆抗体用作药物递送载体,例如当其与放射性同位素、毒素或其他治疗剂或诊断剂偶联时。

[0006] 由于单克隆抗体和抗体衍生产品在调节各种生物功能中的能力,需要开发用于产生适于治疗、预防和诊断病症的多肽(例如抗体分子或融合蛋白)的新途径。

### 发明内容

[0007] 本公开的至少部分内容提供了包含免疫球蛋白Fc区的以及包含本文所公开一种或多种结构或功能特征的多肽(例如抗体分子或融合蛋白)。在一个实施方式中,还提供了编码所述多肽的核酸分子、表达载体、宿主细胞、组合物(例如药物组合物)、试剂盒、容器以及制备所述多肽(例如抗体分子或融合蛋白)的方法。本文所述的多肽(例如抗体分子或融合蛋白)可用于(单独或与其他试剂或治疗模式组合)治疗、预防和/或诊断病症,例如本文所公开的病症和状况。

[0008] 一个方面中,本公开特征之一在于包含Fc区的多肽(例如抗体分子或融合蛋白),其中所述Fc区包含突变,且其中所述多肽具有如下特征中的一个或多个(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13个或全部):

[0009] a) 与参比多肽相比,对新生儿Fc受体(FcRn)的结合亲和力提高,例如在pH6.0~6.5(例如pH 6.0)下,例如至少提高1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40或50倍,例如通

过基于Octet的测试或基于细胞的测试测定；

[0010] b) 与在pH 7.0~7.4下(例如在pH 7.4下)对FcRn的结合亲和力相比,在pH 6.0~6.5下(例如pH 6.0下)对FcRn的结合亲和力更高(例如更低的解离常数( $K_d$ )),例如至少高出1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20或50倍,例如通过基于Octet的测试或基于细胞的测试测定；

[0011] c) 以高亲和力结合FcRn,例如在pH 6.0~6.5下(例如在pH 6.0下),例如以300nM或更低的解离常数( $K_d$ ),例如250nM或更低、200nM或更低、150nM或更低、100nM或更低、50nM或更低、例如25nM或更低、10nM或更低、5nM或更低、2nM或更低、1nM或更低、0.5nM或更低、0.2nM或更低、0.1nM或更低、0.05nM或更低、0.02nM或更低、或者0.01nM或更低、例如25nM~0.1nM、20nM~0.5nM、15nM~1nM、10nM~5nM或20nM~10nM,例如通过基于Octet的测试或基于细胞的测试测定；

[0012] d) 在例如pH 7.0~7.4下(例如pH 7.4下),以低亲和力结合FcRn,例如以50nM或更高的 $K_d$ ,例如60nM或更高、80nM或更高、100nM或更高、150nM或更高、200nM或更高、500nM或更高,例如50nM~500nM或100nM~250nM,例如通过基于Octet的测试或基于细胞的测试测定；

[0013] e) 与参比多肽相比,结合亲和力相同、结合亲和力基本上未改变(例如降低或提高不超过10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%)、或结合亲和力提高(例如提高至少1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20或50倍),例如通过基于Octet的测试或基于细胞的测试测定；

[0014] f) 与参比多肽相比,热稳定性相同或热稳定性基本上未改变(例如解链温度的提高或降低不超过1°C、2°C、3°C、4°C、5°C、6°C、7°C、8°C、9°C或10°C),例如通过宝石橙染色(sypro orange)测试测定；

[0015] g) 与参比多肽相比,对C1q的结合亲和力相同、结合亲和力基本上未改变(例如降低或提高不超过10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%)、或结合亲和力提高(例如提高至少1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20或50倍),例如通过ELISA测定；

[0016] h) 与参比多肽相比,对TRIM21具有相同的结合亲和力、基本上未改变(例如降低或提高不超过10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%)的结合亲和力、或提高的结合亲和力(例如提高至少1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20或50倍),例如通过ELISA测定；

[0017] i) 与参比多肽相比,具有相同的效应功能、或基本上未改变(例如降低或提高超过10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%)的效应功能、或提高的效应功能(例如提高至少1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20或50倍),例如如下效应功能中的一种或多种(例如2种、3种或全部):补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)或抗体依赖性细胞内中和作用作用(ADIN)；

[0018] j) 与参比多肽相比,具有延长的体内半衰期,例如延长至少1.5、2、3、4、5、6、7、8、9或10倍,例如通过在动物模型中测定；

[0019] k) 与参比多肽相比,在体外、离体或体内具有相同的生物功能、基本上未改变(例如降低或提高不超过10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%)的生物功能、或提高的生物功能(例如提高至少1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20或50倍)；

[0020] 1) 与参比多肽相比,具有相同的可开发性特点(developability characteristic)、基本上未改变(例如降低或提高不超过10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%)的可开发性特点、或提高的可开发性特点(例如提高至少1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20或50倍),例如如下特点中的一种或多种(例如2种、3种或全部):稳定性、可溶性、聚集或表达水平;

[0021] m) 与参比多肽相比,对表位具有相同的结合亲和力、特异性或两者,或者基本上未改变(例如降低或提高不超过10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%)的结合亲和力、特异性或两者,或者提高的结合亲和力、特异性或两者(例如提高至少1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20或50倍);或者

[0022] n) 与参比多肽相比,黏膜摄入提高,例如提高至少1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40或50倍,例如通过转胞吞测试测定。

[0023] 在一个实施方式中,与参比多肽相比,所述多肽对新生儿Fc受体(FcRn)具有提高的结合亲和力(例如降低的解离常数( $K_d$ )),例如在pH 6.0~6.5(例如pH 6.0),例如至少提高1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40或50倍,例如通过基于Octet的测试或基于细胞的测试测定;

[0024] 在一个实施方式中,与在pH 7.0~7.4下(例如在pH 7.4下)的结合亲和力相比,所述多肽在pH 6.0~6.5下(例如pH 6.0下)对FcRn具有更高的结合亲和力(例如更低的解离常数( $K_d$ )),例如至少高出1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20或50倍,例如通过基于Octet的测试或基于细胞的测试测定。

[0025] 在一个实施方式中,所述多肽以高亲和力结合FcRn,例如在pH 6.0~6.5下(例如在pH 6.0下),例如以50nM或更低的解离常数( $K_d$ ),例如25nM或更低、10nM或更低、5nM或更低、2nM或更低、1nM或更低、0.5nM或更低、0.2nM或更低、0.1nM或更低、0.05nM或更低、0.02nM或更低、或者0.01nM或更低,例如25nM~0.1nM、20nM~0.5nM、15nM~1nM、10nM~5nM或20nM~10nM,例如通过基于Octet的测试或基于细胞的测试测定。

[0026] 在一个实施方式中,所述多肽以低亲和力结合FcRn,例如在pH 7.0~7.4下(例如pH 7.4下),例如以50nM或更高的 $K_d$ ,例如60nM或更高、80nM或更高、100nM或更高、150nM或更高、200nM或更高、500nM或更高,例如50nM~500nM或100nM~250nM,例如通过基于Octet的测试或基于细胞的测试测定。

[0027] 在一个实施方式中,与参比多肽相比,所述多肽对Fc $\gamma$ 受体(例如Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RIIa/b或Fc $\gamma$ RIII中之一、之二或全部)具有相同的结合亲和力、基本上未改变(例如降低或提高不超过10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%)的结合亲和力、或提高的结合亲和力(例如提高至少1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20或50倍),例如通过基于Octet的测试或基于细胞的测试测定。

[0028] 在一个实施方式中,与参比多肽相比,所述多肽具有相同的热稳定性、或基本上未改变(例如解链温度的提高或降低不超过1°C、2°C、3°C、4°C、5°C、6°C、7°C、8°C、9°C或10°C)的热稳定性,例如通过宝石橙染色测试测定;

[0029] 在一个实施方式中,与参比多肽相比,所述多肽对C1q具有相同的结合亲和力、基本上未改变(例如降低或提高不超过10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%)的结合亲和力、或提高的结合亲和力(例如提高至少1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20或50

倍),例如通过ELISA测定。

[0030] 在一个实施方式中,与参比多肽相比,所述多肽对TRIM21具有相同的结合亲和力、基本上未改变(例如降低或提高不超过10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%)的结合亲和力、或提高的结合亲和力(例如提高至少1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20或50倍),例如通过ELISA测定。

[0031] 在一个实施方式中,与参比多肽相比,所述多肽具有相同的效应功能、或基本上未改变(例如降低或提高超过10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%)的效应功能、或提高的效应功能(例如提高至少1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20或50倍),例如如下效应功能中的一种或多种(例如2种、3种或全部):补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)或抗体依赖性细胞内中和作用作用(ADIN)。

[0032] 在一个实施方式中,与参比多肽相比,所述多肽具有延长的体内半衰期,例如延长至少1.5、2、3、4、5、6、7、8、9或10倍,例如通过在动物模型中测定。

[0033] 在一个实施方式中,与参比多肽相比,所述多肽在体外、离体或体内具有相同的生物功能、基本上未改变(例如降低或提高不超过10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%)的生物功能、或提高的生物功能(例如提高至少1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20或50倍)。在一个实施方式中,所述生物功能包括抑制(例如中和)活性。在一个实施方式中,所述生物功能包括抑制(例如中和)病原体,例如病毒、细菌或真菌。在一个实施方式中,所述生物功能包括抗肿瘤活性。在一个实施方式中,所述生物功能包括抑制免疫应答。在一个实施方式中,所述生物功能包括拮抗活性。在一个实施方式中,所述生物功能包括活化或重建免疫应答。

[0034] 在一个实施方式中,与参比多肽相比,所述多肽具有相同的可开发性特点(developability characteristic)、基本上未改变(例如降低或提高不超过10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%)的可开发性特点、或提高的可开发性特点(例如提高至少1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20或50倍),例如如下特点中的一种或多种(例如2种、3种或全部):稳定性、可溶性、聚集或表达水平。

[0035] 在一个实施方式中,与参比多肽相比,所述多肽对表位具有相同的结合亲和力、特异性或两者,或者基本上未改变(例如降低或提高不超过10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%)的结合亲和力、特异性或两者,或者提高的结合亲和力、特异性或两者(例如提高至少1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20或50倍)。

[0036] 在一个实施方式中,与参比多肽相比,所述多肽的黏膜摄入提高,例如提高至少1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40或50倍,例如通过转胞吞测试测定。

[0037] 在一个实施方式中,所述多肽具有如上所述的特征a)或b)。在一个实施方式中,所述多肽具有如上所述的特征a)和b)。在一个实施方式中,所述多肽具有如上所述特征a)或b)中的一者或两者,以及如上所述特征c)或d)中的一者或两者。在一个实施方式中,所述多肽具有如上所述特征a)或b)中的一者或两者,以及如上所述特征e)、f)、g)、h)或i)中的1、2、3、4个或全部。在一个实施方式中,所述多肽具有如上所述特征a)或b)中的一者或两者,以及如上所述特征c)或d)中的一者或两者。在一个实施方式中,所述多肽具有如上所述特征a)或b)中的一者或两者,以及如上所述特征c)、d)、j)、k)、l)、m)或n)中的1、2、3、4、5、6个

或全部。在一个实施方式中,所述多肽具有如上所述的特征a)或b)中的一者或两者,如上所述特征e)、f)、g)、h)或i)中的1、2、3、4个或全部,以及如上所述特征c)、d)、j)、k)、l)、m)或n)中的1、2、3、4、5、6个或全部。在一个实施方式中,所述多肽具有如上所述的特征a)、b)、c)或d)中的1、2、3个或全部,如上所述特征e)、f)、g)、h)或i)中的1、2、3、4个或全部,以及如上所述特征j)、k)、l)、m)或n)中的1、2、3、4个或全部。在一个实施方式中,所述多肽具有如上所述特征a)或c)中的一者或两者,如上所述特征b)或d)中的一者或两者,如上所述特征e)、f)、g)、h)或i)中的1、2、3、4个或全部,以及如上所述特征j)、k)、l)、m)或n)中的1、2、3、4个或全部。

[0038] 在一个实施方式中,参比多肽是不含突变则相同的多肽,例如包含野生型Fc区,例如具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列或与其具有至少约85%、90%、95%、99%或更高相同性的氨基酸序列,或区别不超过1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或15个氨基酸残基。

[0039] 在一个实施方式中,突变发生在CH2结构域中的残基中。在另一个实施方式中,突变发生在CH3结构域中的残基中。在一个实施方式中,多肽包含CH2结构域残基中的至少一个突变以及CH3结构域残基中的至少一个突变。在一个实施方式中,多肽还包含CH2结构域和/或CH3结构域之外结构域残基中的突变。

[0040] 在一个实施方式中,突变不改变或不实质性改变CH2和CH3结构域间的接头区构象。在一个实施方式中,突变不在例如表面区(例如,定义为溶剂可及面积超过20%的氨基酸残基所覆盖的区域)上引入疏水或芳族残基簇(例如3、4、5、6、7、8、9、10或更多个连续残基)。

[0041] 在一个实施方式中,多肽是抗体分子,例如本文中所述的抗体分子。

[0042] 在一个实施方式中,多肽是IgG,例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。在一个实施方式中,多肽是IgG1。在一个实施方式中,多肽是IgG4。

[0043] 在一个实施方式中,多肽包含重链免疫球蛋白可变区、轻链免疫球蛋白可变区、或这两者。在一个实施方式中,多肽包含两个重链免疫球蛋白可变区和两个轻链免疫球蛋白可变区的四聚体。在一个实施方式中,多肽包含全长抗体分子。在一个实施方式中,多肽包含抗体分子片段(例如抗原结合片段)。

[0044] 在一个实施方式中,多肽包含嵌合抗体分子。在一个实施方式中,多肽包含人源化抗体分子。在一个实施方式中,多肽包含人抗体分子。在一个实施方式中,多肽包含鼠抗体分子。在一个实施方式中,多肽包含双特异性或多特异性抗体分子。

[0045] 在另一实施方式中,多肽是融合蛋白,例如如本文所述的融合蛋白。在一个实施方式中,多肽包含融合蛋白片段(例如功能性片段)。

[0046] 在一个实施方式中,多肽包含以下一项或多项(例如2、3、4项或全部):

[0047] (i) 与FcRn相互作用的表面区(例如定义为被溶剂可及面积高于20%的氨基酸残基所覆盖的区域)中的残基(例如FcRn接触残基)中的突变;

[0048] (ii) 沿Fc-FcRn界面的外围残基(例如位于Fc区表面上且与Fc-FcRn复合物中的FcRn距离小于7埃的任何氨基酸残基)中的突变;

[0049] (iii) Fc-FcRn结合中非接触残基中的突变;

[0050] (iv) 增强250-螺旋构象动力学表现的螺旋接触残基中的残基突变,所述250-螺旋为例如包含P247、K248、D249、T250、L251或M252中之一或多个(例如2、3、4、5或全部)的螺

旋;或

[0051] (v) 调节组氨酸pK和/或沿Fc-FcRn界面引入组氨酸(例如位于Fc区表面上且与Fc-FcRn复合物中的FcRn距离小于7埃的任何氨基酸残基)的突变;

[0052] 在一个实施方式中,多肽包含如上所述的特征(i)和(ii)。在一个实施方式中,多肽包含如上所述的特征(i)和(iii)。在一个实施方式中,多肽包含如上所述的特征(i)和(iv)。在一个实施方式中,多肽包含如上所述的特征(i)和(v)。在一个实施方式中,多肽包含如上所述的特征(ii)和(iii)。在一个实施方式中,多肽包含如上所述的特征(ii)和(iv)。在一个实施方式中,多肽包含如上所述的特征(ii)和(v)。在一个实施方式中,多肽包含如上所述的特征(iii)和(iv)。在一个实施方式中,多肽包含如上所述的特征(iii)和(v)。在一个实施方式中,多肽包含如上所述的特征(iv)和(v)。

[0053] 在一个实施方式中,多肽包含如上所述的特征(i)、(ii)和(iii)。在一个实施方式中,多肽包含如上所述的特征(i)、(ii)和(iv)。在一个实施方式中,多肽包含如上所述的特征(i)、(ii)和(v)。在一个实施方式中,多肽包含如上所述的特征(i)、(iii)和(iv)。在一个实施方式中,多肽包含如上所述的特征(i)、(iii)和(v)。在一个实施方式中,多肽包含如上所述的特征(i)、(iv)和(v)。在一个实施方式中,多肽包含如上所述的特征(ii)、(iii)和(iv)。在一个实施方式中,多肽包含如上所述的特征(ii)、(iii)和(v)。在一个实施方式中,多肽包含如上所述的特征(ii)、(iv)和(v)。在一个实施方式中,多肽包含如上所述的特征(iii)、(iv)和(v)。

[0054] 在一个实施方式中,多肽包含如上所述的特征(i)、(ii)、(iii)和(iv)。在一个实施方式中,多肽包含如上所述的特征(i)、(ii)、(iii)和(v)。在一个实施方式中,多肽包含如上所述的特征(i)、(ii)、(iv)和(v)。在一个实施方式中,多肽包含如上所述的特征(i)、(iii)、(iv)和(v)。在一个实施方式中,多肽包含如上所述的特征(ii)、(iii)、(iv)和(v)。

[0055] 在一个实施方式中,多肽包含如上所述的特征(i)、(ii)、(iii)、(iv)和(v)。

[0056] 在一个实施方式中,多肽包含如下突变:与FcRn相互作用的表面区(例如定义为被溶剂可及面积高于20%的氨基酸残基所覆盖的区域)中的残基(例如FcRn接触残基)中的突变。

[0057] 在一个实施方式中,所述突变是选自下组残基中的突变:L251、I253、R255、P257、H285、N286、K288、T307、V308、L309、Q311、L314、H310、H433、N434、H435或Y436。在一个实施方式中,多肽包含选自下组残基中两个或多个(例如3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16或全部)的多个突变:L251、I253、R255、P257、H285、N286、K288、T307、V308、L309、Q311、L314、H310、H433、N434、H435或Y436。

[0058] 在一个实施方式中,多肽包含如下残基中的突变:沿Fc-FcRn界面的外围残基(例如位于Fc区表面上且与Fc-FcRn复合物中的FcRn距离小于7埃的任何氨基酸残基)中的突变。

[0059] 在一个实施方式中,突变发生在选自下组残基中的一个或多个(例如2、3、4、5、6或全部)中:T256、H285、N286、T307、Q311、N315或A378。在一个实施方式中,多肽包含选自下组残基中两个或多个(例如2、3、4、5、6或全部)中的多个突变:T256、H285、N286、T307、Q311、N315或A378。在一个实施方式中,多肽包含选自下组中一个或多个(例如2、3、4、5、6或全部)突变:T256D、H285N、N286D、T307Q、Q311V、N315D或A378V。

[0060] 在一个实施方式中,突变发生在选自T256、Q311或A378的残基中。在一个实施方式中,多肽包含位于选自T256、Q311或A378残基中两处或全部的多个突变。在一个实施方式中,多肽包含选自T256D、Q311V或A378V中的1个、2个或全部突变。

[0061] 在一个实施方式中,突变发生在选自T256、Q311或A378的残基中。在一个实施方式中,多肽包含在选自H285、T307或N315的2个或全部残基中的多个突变。在一个实施方式中,多肽包含选自H285N、T307Q或N315D的1个、2个或全部突变。

[0062] 在一个实施方式中,突变发生在选自H285、T307或A378的残基中。在一个实施方式中,多肽包含在选自H285、T307或A378的2个或全部残基中的多个突变。在一个实施方式中,多肽包含选自H285D、T307Q或A378V的1个、2个或全部突变。

[0063] 在一个实施方式中,突变发生在选自T307、Q311或A378的残基中。在一个实施方式中,多肽包含在选自T307、Q311或A378中2个或全部残基中的多个突变。在一个实施方式中,多肽包含选自T307Q、Q311V或A378V中的1个、2个或全部突变。

[0064] 在一个实施方式中,突变发生在选自T256、N286、T307、Q311或A378的残基中。在一个实施方式中,多肽包含在选自T256、N286、T307、Q311或A378中2、3、4个或全部残基中的多个突变。在一个实施方式中,多肽包含选自T256D、N286D、T307R、Q311V或A378V中的1、2、3、4个或全部突变。

[0065] 在一个实施方式中,突变发生在选自T256、H285、T307、Q311或A378的残基中。在一个实施方式中,多肽包含在选自T256、H285、T307、Q311或A378中2、3、4个或全部残基中的多个突变。在一个实施方式中,多肽包含选自T256D、H285D、T307R、Q311V或A378V的1、2、3、4个或全部突变。

[0066] 在一个实施方式中,突变发生在选自M252、T256、T307、L309、Q311、H433、N434、Y436、N286或K288的残基中。在一个实施方式中,多肽包含选自下组残基中两个或多个(例如3、4、5、6、7、8、9或全部)中的多个突变:M252、T256、T307、L309、Q311、H433、N434、Y436、N286或K288。

[0067] 在一个实施方式中,多肽包含Fc-FcRn结合中非接触残基中的突变。

[0068] 在一个实施方式中,突变发生在选自A287、V308、N315、L314、L432、H429、E430或A431的残基中。在一个实施方式中,多肽包含选自下组残基中两个或多个(例如3、4、5、6、7或全部)中的多个突变:A287、V308、N315、L314、L432、H429、E430或A431。

[0069] 在一个实施方式中,多肽包含增强250-螺旋(例如包含P247、K248、D249、T250、L251或M252中之一或多个(例如2、3、4、5或全部)的螺旋)构象动力学表现的螺旋接触位置残基中的突变,所述构象动力学表现包括例如250-螺旋所展示的构象柔性或侧向移位(例如,如在pH 5.0(PDB ID:4J12)下和pH 6.5(PDB ID:4Q7D)下结晶的Fc结构域的晶体结构比较所示)。

[0070] 在一个实施方式中,突变发生在选自下组的残基中:P244、P245、T250、L251、P247、E380、M428、A378、D376、P257、V308、A287、L306或H427。在一个实施方式中,多肽包含选自下组残基中两个或多个(例如3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或全部)中的多个突变:P244、P245、T250、L251、P247、E380、M428、A378、D376、P257、V308、A287、L306或H427。

[0071] 在一个实施方式中,多肽包含如下突变:沿Fc-FcRn界面(例如位于Fc区表面上且与Fc-FcRn复合物中的FcRn距离小于7埃的任何氨基酸残基)引入组氨酸的突变。

[0072] 在一个实施方式中,突变引入极性氨基酸残基。在另一个实施方式中,突变引入非极性氨基酸残基。在一个实施方式中,突变引入带电荷的氨基酸残基。在另一个实施方式中,突变引入不带电荷的氨基酸残基。在一个实施方式中,突变引入带正电荷(或碱性)的氨基酸残基。在一个实施方式中,突变引入带负电荷(或酸性)的氨基酸残基。在一个实施方式中,突变引入疏水性氨基酸残基。在另一个实施方式中,突变引入亲水性氨基酸残基。

[0073] 在一个实施方式中,多肽包含至少一个(例如2、3、4、5或更多个)FcRn接触残基中的突变。在一个实施方式中,多肽包含T256、T307或N286中一个或多个(例如2个或全部)残基中的突变。在一个实施方式中,多肽包含残基T256和T307中的突变,可任选地,还包含残基N286中的突变。在一个实施方式中,发生在残基T256的突变为极性残基,例如选自T256D、T256E或T256R。在一个实施方式中,残基T256中的突变是T256D。在一个实施方式中,残基T307中的突变为极性残基,例如选自T307D、T307E或T307R。在一个实施方式中,残基T307中的突变是T307R。在一个实施方式中,残基N286中的突变是N286I。在一个实施方式中,多肽包含突变T256D和T307R。在一个实施方式中,多肽包含突变T256D、T307R和N286I。

[0074] 在一个实施方式中,多肽包含至少一个(例如2、3、4、5或更多个)FcRn接触残基中的突变。在一个实施方式中,多肽包含L309、D312或N315中一个或多个(例如2个或全部)残基中的突变。在一个实施方式中,多肽包含残基L309中的突变,可任选地,还包含残基D312和N315中的突变。在一个实施方式中,残基L309中的突变是L309N。在一个实施方式中,残基D312中的突变是D312A。在一个实施方式中,残基N315中的突变是N315D。在一个实施方式中,多肽包含突变L309N。在一个实施方式中,多肽包含突变L309N、D312A和N315D。

[0075] 在一个实施方式中,多肽包含至少一个(例如1、2、3、4、5或更多个)FcRn非接触残基中的突变。在一个实施方式中,多肽包含L209R、D312或Q311中一个或多个(例如2个或全部)残基中的突变。在一个实施方式中,多肽包含残基L309和D312中的突变,可任选地,还包含残基Q311中的突变。在一个实施方式中,多肽包含残基Q311中的突变。在一个实施方式中,残基L309中的突变是L309R。在一个实施方式中,残基D312中的突变是D312E。在一个实施方式中,残基Q311中的突变是Q311P。在一个实施方式中,多肽包含突变L309R和D312E。在一个实施方式中,多肽包含突变L309R、D312E和Q311P。在一个实施方式中,多肽包含突变Q311P。

[0076] 在一个实施方式中,多肽包含至少一个(例如2、3、4、5或更多个)FcRn接触残基中的突变。在一个实施方式中,多肽包含选自I253、S254、M252或R255中一个或多个(例如2个、3个或4个)残基中的突变。在一个实施方式中,多肽包含残基I253中的突变。在一个实施方式中,残基I253中的突变是I253M。在一个实施方式中,多肽包含残基S254中的突变。在一个实施方式中,残基S254中的突变是S254H或S254M。在一个实施方式中,多肽包含残基M252和S254中的突变。在一个实施方式中,残基M252中的突变是M252E。在一个实施方式中,残基S254中的突变是S254R。在一个实施方式中,多肽包含残基M252、S254和R255中的突变。在一个实施方式中,残基M252中的突变是M252E。在一个实施方式中,残基S254中的突变是S254R。在一个实施方式中,残基R255中的突变是R255Y。

[0077] 在一个实施方式中,多肽包含至少一个(例如2、3、4、5或更多个)FcRn非接触残基中的突变。在一个实施方式中,多肽包含与T250Q和M34L相当的突变。在一个实施方式中,多肽包含选自D376、K248、E380、M428或A328中一个或多个(例如2个、3个、4个或全部)残基中

的突变。在一个实施方式中,多肽包含残基D376中的突变以及选自K248、E380、M428或A328的残基中的突变。在一个实施方式中,多肽包含残基D376中的突变以及残基K248中的突变。在一个实施方式中,多肽包含残基D376中的突变以及残基E380中的突变。在一个实施方式中,多肽包含残基D376中的突变以及残基M428中的突变。在一个实施方式中,多肽包含残基D376中的突变以及残基A328中的突变。在一个实施方式中,残基D376中的突变是D376Q或D376N。在一个实施方式中,残基K248中的突变是K248S。在一个实施方式中,残基E380中的突变是E380A。在一个实施方式中,残基D376中的突变是D376Q。在一个实施方式中,残基M428中的突变是M428L。在一个实施方式中,残基A328中的突变是A328I。在一个实施方式中,多肽包含突变D376Q或D376N以及突变K248S。在一个实施方式中,多肽包含突变D376Q或D376N以及突变E380A。在一个实施方式中,多肽包含突变D376Q和M428L。在一个实施方式中,多肽包含突变D376Q和A328I。

[0078] 在一个实施方式中,多肽包含至少一个(例如2、3、4、5或更多个)FcRn非接触残基中的突变。在一个实施方式中,多肽包含选自K246、P247或D376中一个或多个(例如2个或全部)残基中的突变。在一个实施方式中,多肽包含残基K246中的突变以及残基P247中的突变,可任选地,还包括残基D376中的突变。在一个实施方式中,残基K246中的突变是K246N。在一个实施方式中,残基P247中的突变是P247A。在一个实施方式中,残基D376中的突变是D376N。在一个实施方式中,多肽包含突变K246N和P247A,可任选地,还包括突变D376N。

[0079] 在一个实施方式中,多肽包含选自下组中一个或多个(例如2、3、4、5、6或全部)残基中的突变:T256、T307、N286、A287、P257、Q311或P247。在一个实施方式中,多肽包含残基T256、T307、N286和A287中的突变。在一个实施方式中,多肽包含残基T256、T307和P257中的突变。在一个实施方式中,多肽包含残基T256、T307和Q311中的突变。在一个实施方式中,多肽包含残基T256、T307和P247中的突变。在一个实施方式中,残基T256中的突变是T256D。在一个实施方式中,残基T307中的突变是T307R。在一个实施方式中,残基N286中的突变是N286I。在一个实施方式中,残基A287中的突变是A287S。在一个实施方式中,残基P257中的突变是P257L。在一个实施方式中,残基Q311中的突变是Q311V或Q311L。在一个实施方式中,残基P247中的突变是P247D。在一个实施方式中,多肽包含突变T256D、T307R、N286D和A287S。在一个实施方式中,多肽包含突变T256D、T307R和P257L。在一个实施方式中,多肽包含突变T256D、T307R和Q311V或Q311L。在一个实施方式中,多肽包含突变T256D、T307R和P247D。

[0080] 在一个实施方式中,多肽包含选自下组中一个或多个(例如2、3、4、5、6、7个或全部)残基中的突变:N286、A287、P247、Q311、V308、P257、N315或V279。在一个实施方式中,多肽包含残基N286、A287、P247和Q311中的突变。在一个实施方式中,残基N286中的突变是N286D。在一个实施方式中,残基A287中的突变是A287S。在一个实施方式中,残基P247中的突变是P247D。在一个实施方式中,残基Q311中的突变是Q311V。在一个实施方式中,多肽包含残基V308和P257中的突变。在一个实施方式中,残基V308中的突变是V308N。在一个实施方式中,残基P257中的突变是P257M。在一个实施方式中,多肽包含残基Q311、N315和V279中的突变。在一个实施方式中,残基Q311中的突变是Q311L。在一个实施方式中,残基N315中的突变是N315T。在一个实施方式中,残基V279中的突变是V279I。

[0081] 在一个实施方式中,多肽包含选自G433或H433、P434或G434、G434a、或H435中一个

或多个(例如2个、3个或全部)残基中的突变。在一个实施方式中,多肽包含残基G433、P434和H435中的突变。在一个实施方式中,多肽包含残基G433、P434、G434a和H435中的突变。在一个实施方式中,多肽包含残基H433、G434、P434a和H435中的突变。

[0082] 在一个实施方式中,多肽包含如表1中所述的一个或多个(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多)突变或一种或多种突变组合。例如,突变组合可包括FcMutX名下所列的一个或多个突变以及FcMutY名下所列的一个或多个突变,其中X和Y是如表1所示的三位数字,且X不等于Y。

[0083] 在一个实施方式中,多肽包含突变I253M。在一个实施方式中,多肽包含突变L309H、D312A和N315D。在一个实施方式中,多肽包含突变L309N。在一个实施方式中,多肽包含突变M252E和S254R。在一个实施方式中,多肽包含突变M252E、S254R和S255Y。在一个实施方式中,多肽包含突变S254H。在一个实施方式中,多肽包含突变S254M。在一个实施方式中,多肽包含突变T256D和T307R。在一个实施方式中,多肽包含突变T256L、N286I和T307I。在一个实施方式中,多肽包含突变T256I、N286I和T307I。在一个实施方式中,多肽包含突变K248S和D376Q。在一个实施方式中,多肽包含突变K248S和D376N。在一个实施方式中,多肽包含突变D376Q和E380A。在一个实施方式中,多肽包含突变D376N和E380A。在一个实施方式中,多肽包含突变D376Q和M428L。在一个实施方式中,多肽包含突变K248S和A378I。在一个实施方式中,多肽包含突变L314K。在一个实施方式中,多肽包含突变M252W。在一个实施方式中,多肽包含突变V308F。在一个实施方式中,多肽包含突变V308F和N434Y。在一个实施方式中,多肽包含突变T256D、T307R和D376N。在一个实施方式中,多肽包含突变L309R和D312E。在一个实施方式中,多肽包含突变L309R、Q311P和D312E。在一个实施方式中,多肽包含突变K246N和P247A。在一个实施方式中,多肽包含突变K246N、P247A和D376N。在一个实施方式中,多肽包含突变T256E和T307R。在一个实施方式中,多肽包含突变T256R和T307D。在一个实施方式中,多肽包含突变T256R和T307E。在一个实施方式中,多肽包含突变Q311P。在一个实施方式中,多肽包含突变D376Q。在一个实施方式中,多肽包含突变T256D、N286D、A287S和T307R。在一个实施方式中,多肽包含突变T256D、P257L和T307R。在一个实施方式中,多肽包含突变T256D、T307R和Q311V。在一个实施方式中,多肽包含突变P247D、T256D和T307R。在一个实施方式中,多肽包含突变P247D、N286D、A287S和Q311V。在一个实施方式中,多肽包含突变P257M和V308N。在一个实施方式中,多肽包含突变V279I、Q311L和N315T。在一个实施方式中,多肽包含突变H433G和N434P。在一个实施方式中,多肽包含突变T256D、N286D和T307R。在一个实施方式中,多肽包含突变T256D、N286E和T307R。在一个实施方式中,多肽包含突变T256D、N286Q和T307R。在一个实施方式中,多肽包含突变T256D、P257T和T307R。在一个实施方式中,多肽包含突变T256D、P257V和T307R。在一个实施方式中,多肽包含突变T256D、T307R和Q311I。在一个实施方式中,多肽包含突变T256D、T307R和Q311L。在一个实施方式中,多肽包含突变T256D、T307R和Q311M。在一个实施方式中,多肽包含突变T256D、P257L、N286D、T307R和Q311V。在一个实施方式中,多肽包含突变T256D、T307R和M428L。

[0084] 在一个实施方式中,突变不是M252Y、S254T、T256E、L309N、T250Q、M428L、N434S、N434A、T307A、E380A、N434A、M252Y、S254T、T256E或其组合。在一个实施方式中,突变不在如下残基中:M252、S254、T256、L309、T250、M428、N434、N434、T307、E380、N434、M252、S254、

T256或其组合。在一个实施方式中,多肽不具有如下的一项或多项(例如2、3、4、5、6、7、8、9种或全部)突变:(i)M252Y、S254T和T256E;(ii)L309N;(iii)T250Q和M428L;(iv)M428L和N434A;(v)N434A;(vi)T307A、E380A和N434A;(vii)M252W;(viii)V308F;(ix)V308F和N434Y;或(x)H435A

[0085] 在一个实施方式中,多肽包含选自下组的第一突变:M252Y、S254T、T256E、L309N、T250Q、M428L、N434S、N434A、T307A、E380A、N434A、M252Y、S254T或T256E,以及选自表1中的第二突变,所述第二突变不是M252Y、S254T、T256E、L309N、T250Q、M428L、N434S、N434A、T307A、E380A、N434A、M252Y、S254T和T256E。

[0086] 在一个实施方式中,多肽包含选自下组突变的组合:M252Y、S254T、T256E、L309N、T250Q、M428L、N434S、N434A、T307A、E380A、N434A、M252Y、S254T或T256E,其中该组合不是:(i)M252Y、S254T和T256E;(ii)L309N;(iii)T250Q和M428L;(iv)M428L和N434A;(v)N434A;(vi)T307A、E380A和N434A;(vii)M252W;(viii)V308F;(ix)V308F和N434Y;或(x)H435A。

[0087] 在一个实施方式中,多肽还在Fc区中包含提高效应功能的突变。在一个实施方式中,在选自下组的残基中发生突变以例如提高效应功能:S239(例如S239D)、A330(例如A330L)、I332(例如I332E)、F243(例如F243L)、G236(例如G236A)或其组合。

[0088] 在一个实施方式中,多肽还在Fc区中包含降低效应功能的突变。在一个实施方式中,在选自下组的残基中发生突变以例如降低效应功能:K322(例如K322A)、L234(例如L234A或L234F)、L235(例如L235A或L235E)、P331(例如P331S)、N297或其组合。

[0089] 在一个实施方式中,多肽还在非Fc区中(例如在Fab区中)包含突变。

[0090] 在一个实施方式中,多肽还包含多个突变,其中至少一个突变是补偿性突变,例如本文中所述的补偿性突变。

[0091] 在一个实施方式中,多肽是分离的多肽。在一个实施方式中,多肽是合成的多肽。

[0092] 在一个方面中,本公开特征之一在于一种组合物,例如药物组合物,其包含本文所述的多肽。在一个实施方式中,组合物还包含药学上可接受的载剂。

[0093] 在一个方面中,本公开特征之一在于一种核酸分子,其编码本文所述的多肽。在一个方面中,本公开特征之一在于一种载体,其包含本文所述的核酸分子。在一个方面中,本公开特征之一在于一种细胞,例如分离的细胞,其包含本文所述的核酸分子或本文所述的载体。在一个方面中,本公开特征之一在于一种试剂盒,其包含本文所述的多肽和指导所述多肽的使用说明。在一个方面中,本公开特征之一在于一种容器,其包含本文所述的多肽。

[0094] 在一个方面中,本公开特征之一在于一种产生本文所述多肽的方法,所述方法包括在允许产生抗体分子的条件培养本文所述的细胞,从而生产所述多肽。在一个实施方式中,所述方法还包括分离或纯化多肽。

[0095] 在一个方面中,本公开特征之一在于一种治疗病症(例如本文所述病症)的方法,所述方法包括给予有此需要的对象有效量的本文所述的多肽或本文所述的组合物,从而治疗所述病症。

[0096] 在一个方面中,本公开特征之一在于用于病症(例如本文所述病症)治疗方法中的本文所述的多肽。在另一个方面中,本公开特征之一在于本文所述多肽在制备用于治疗病症(例如本文所述病症)的药物中的应用。

[0097] 在一个方面中,本公开特征之一在于一种检测分子的方法,所述方法包括使获自

对象的细胞或样品接触本文所述的多肽,从而对所述分子进行检测。

[0098] 本公开包涵任何一个或多个前述方面和/或实施方式的所有组合,以及与详细描述和实施例中所提供的任何一个或多个实施方式的组合。

[0099] 通过说明书和附图以及权利要求书不难了解本文组合物和方法的其它特征、目的和优点。

### 附图说明

[0100] 图1.显示FcRn和IgG1之间的结合。

[0101] 图2.显示Fc区中的各种结合位点。

[0102] 图3显示FcRn的pH特异性接合(engagement)的结构基础。

[0103] 图4显示Fc-FcRn相互作用界面的作图。指示了CH2和CH3结构域,并采用不同灰度阴影显示。

[0104] 图5显示Fc-FcRn接合的网路图。

[0105] 图6显示FcRn与抗CH1固定化抗体的结合以及pH特异性增强。

[0106] 图7显示基于细胞的FcRn结合竞争测试结果。

[0107] 图8显示示例性抗体分子与Fc  $\gamma$  RI和Fc  $\gamma$  RIIIa的结合。

[0108] 图9显示示例性抗体分子的热稳定性。

[0109] 图10显示示例性抗体分子在Tg32小鼠中的半衰期。

[0110] 图11A显示示例性Fc工程化改造抗体的 $K_d$ 、 $k_{on}$ 和 $k_{off}$ 。数值代表与含WT Fc的IgG相比的倍数变化。

[0111] 图11B显示代表性Fc工程化改造抗体在pH 6.0时与FcRn的结合改善以及在pH7.4时与FcRn的结合不良。

[0112] 图11C显示抗体Fc的CH2结构域与FcRn分子的相互作用。

[0113] 图12显示Fc工程化改造变体的生物物理学特性。

[0114] 图13A显示3种莫维珠单抗Fc变体与野生型莫维珠单抗(Mota-WT)相比的体内半衰期改善。

[0115] 图13B显示2种莫维珠单抗Fc变体和野生型莫维珠单抗的药代动力学特性。

[0116] 图14A显示与5mg/kg给予野生型莫维珠单抗(Mota-WT)相比后期(later stage)莫维珠单抗Fc变体的体内半衰期改善。

[0117] 图14B显示5mg/kg给予后期莫维珠单抗Fc变体和野生型莫维珠单抗(Mota-WT)的药代动力学特性。

[0118] 图14C显示与2mg/kg给予野生型莫维珠单抗(Mota-WT)相比后期莫维珠单抗Fc变体的体内半衰期改善。

[0119] 图14D显示2mg/kg给予后期莫维珠单抗Fc变体和野生型莫维珠单抗(Mota-WT)的药代动力学特性。

[0120] 图15显示ZVB Zika抗体的更长体内半衰期。

[0121] 图16显示ZKB-LS(具有LS Fc突变的ZVB抗体)与ZKB-156(具有Visterra 156Fc突变的ZVB抗体)具有相似的半衰期。这些抗体的半衰期均比亲本ZVB抗体(ZKB)和野生型莫维珠单抗长。

- [0122] 图17A显示示例性Fc变体与Fc  $\gamma$  RI、Fc  $\gamma$  RIIA、Fc  $\gamma$  RIIB、Fc  $\gamma$  RIIIA和C1q的结合。
- [0123] 图17B显示与野生型相比的FcMut213与Fc  $\gamma$  RIIIA的结合。
- [0124] 图17C显示与野生型相比的FcMut213与Fc  $\gamma$  RIIA的结合。
- [0125] 图17D显示与野生型相比的FcMut213与C1q的结合。
- [0126] 图18显示示例性Fc变体(利妥昔单抗Fab)的CDC活性。计算是基于获得50%裂解的浓度,而不是四参数拟合的中点。
- [0127] 图19A-19B显示示例性Fc变体(利妥昔单抗Fab)的ADCC活性。
- [0128] 图20A显示IgG Fc结构以及Fc-FcRn相互作用。
- [0129] 图20B显示在两种不同pH下的Fc结构。
- [0130] 图21A显示具有介导Fc-FcRn相互作用潜能的残基类型。
- [0131] 图21B显示示例性工程化改造Fc变体关键残基的分子相互作用。
- [0132] 图22显示示例性Octet感应图。
- [0133] 图23显示示例性Fc变体的SEC谱以及T<sub>m</sub>。
- [0134] 图24显示Fc变体与Fc  $\gamma$  RIIIA的结合(ADCC活性)以及与C1q的结合(CDC活性)。
- [0135] 图25A显示具有Fc变体的IgG的药代动力学特征。曲线显示IgG浓度随时间的变化。
- [0136] 图25B显示示例性Fc变体的PK特征鉴定。
- [0137] 图26显示带有Fc变体的莫维珠单抗Fab与TRIM21的结合。
- [0138] 图27A显示FcRn-Fc复合物、蛋白A-Fc复合物、Trim21-Fc复合物以及Fc-Fc六聚体复合物的结构。
- [0139] 图27B显示的Fc区晶体结构叠加突显Fc结构域动力学表现。

## 具体实施方式

[0140] 本文公开了以高亲和力和特异性结合目标分子或细胞(例如人蛋白质或细胞)的多肽(例如抗体分子或融合蛋白)。本文所描述的数种多肽(例如抗体分子或融合蛋白)其优点在于具有一种或多种改善的或符合需求的药代动力学特性,例如循环半衰期。不希望受理论约束,据信多肽在人体内可具有一定范围的循环半衰期,且循环半衰期可影响例如与血清和细胞组分的相互作用、流体相的胞饮速率、与FcRn的相互作用、受体介导的内吞作用、药物剂量以及抗药性抗体的产生。还提供了编码多肽(例如抗体分子或融合蛋白)的核酸分子、表达载体、宿主细胞、组合物(例如药物组合物)、试剂盒、容器以及制备多肽(例如抗体分子或融合蛋白)的方法。本文的多肽(例如抗体分子或融合蛋白)以及药物组合物可用于(单独或与其他试剂或治疗形式组合)治疗、预防和/或诊断病症和状况,例如与目标分子(例如蛋白质)或细胞相关的病症和状况,例如本文所述的病症和状况。

[0141] 不希望受理论约束,据信在某些实施方式中,IgG的循环半衰期长是因为它们能够通过的新生儿Fc受体(FcRn)结合而使得它们在内涵体内的降解最小化。FcRn在IgG分子从母体胎盘转移到胎盘以及血清IgG体内平衡中起到重要作用(Leach等,J Immunol, 1996.157(8):3317-22;Simister等,Eur J Immunol, 1996.26(7):1527-31;Kristoffersen,APMIS增刊,1996.64:5-36;Roopenian等,J Immunol, 2003.170(7):3528-33;Junghans和Anderson,Proc Natl Acad Sci U S A, 1996.93(11):5512-6)。早期内涵体的酸性环境使得IgG和白蛋白能够结合FcRn,这保护了IgG免受降解并有助于IgG转运回胞

外环境,这些分子接触生理pH后即被释放回到循环中。IgG和白蛋白的长血清半衰期很大程度上归因于该途径(Junghans和Anderson,Proc Natl Acad Sci U S A,1996.93(11):5512-6;Chaudhury等,J Exp Med,2003.197(3):315-22)。

[0142] 抗体的Fc结构域主要负责结合FcRn以促进抗体再循环。在一些实施方式中,具有相同Fc区的抗体可具有不同的循环半衰期,这至少部分归因于许多因素(如热稳定性、与血清和细胞组分的相互作用、抗药性抗体的存在、高剂量、受体介导的内吞作用以及流体相的胞饮作用)都会促进抗体降解并对其半衰期产生不良影响。IgG与FcRn的相互作用能起到保护抗体免受内体降解并延长抗体半衰期的作用。Fc的修饰可用于促进抗体的FcRn相互作用并由此延长抗体半衰期(Ghetie等,Nat Biotechnol,1997.15(7):p.637-40;Dall'Acqua等,J Biol Chem,2006.281(33):23514-24;Hinton等,J Biol Chem,2004.279(8):6213-6;Vaccaro等,Nat Biotechnol,2005.23(10):1283-8;Zalevsky等,Nat Biotechnol,2010.28(2):157-9;Dall'Acqua等,J Immunol,2002.169(9):5171-80;Monnet等,MAbs,2014.6(2):422-36;Monnet等,Front Immunol,2015.6:39;Shields等,J Biol Chem,2001.276(9):6591-604;Robbie等,Antimicrob Agents Chemother,2013.57(12):6147-53)。

[0143] IgG的Fc也可结合各种其他受体,如Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RIIa、Fc $\gamma$ RIIb、Fc $\gamma$ RIII、C1q和TRIM21,而这些相互作用介导了各种效应功能,如抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)以及抗体依赖性胞内中和(ADIN)。鉴定Fc变体的常规方法很大程度上依赖于随机诱变和展示形式,且常常不利于抗体的某些重要属性,如其效应功能或生物物理学稳定性。

[0144] 不希望受到理论限制,据信在某些实施方式中,如本文所述针对FcRn结合或延长半衰期对Fc的工程化改造包括对各种由Fc介导的效应功能的考量。例如,可采用基于结构和网络的框架体系(framework)来研究Fc与FcRn在中性和酸性pH下的相互作用。采用该体系可鉴别出用于改善FcRn结合(例如降低相互作用的 $K_{off}$ )的不同途径。可对突变的相互作用网络进行作图,可对突变进行组合并针对与FcRn以及其他Fc受体的结合对其进行评估。例如,可鉴别出能改善半衰期和保留且在某些情况下增强效应功能(如ADCC和CDC)的Fc变体。随着抗体和融合蛋白作为治疗剂用于预防和治疗不同疾病日益增多,对于开发出具有长半衰期抗体和融合蛋白(例如以治疗或预防慢性病)的需求日益增长。

[0145] 定义

[0146] 本文使用冠词“一个”和“一种”表示一个/种或一个/种以上的(即至少一个/种)该冠词语法上的宾语。

[0147] 除非上下文明确作出不同指示,本文所用术语“或/或者”是指“和/或”,并可与其互换使用。

[0148] “约”和“近似”应通常表示在考虑测量的性质或精度的情况下测得量的可接受的误差度。示例性误差度在给定值或数值范围的20%以内,通常在10%以内,更通常在5%以内。

[0149] 本文所述的组合物和方法包括具有指定序列的多肽和核酸,或具有与指定序列基本相同或与其相似(例如与指定序列至少85%、90%、95%或更高相同性)的序列的多肽和核酸。

[0150] 在描述氨基酸序列的情况下,用于本文的术语“基本相同”是指第一氨基酸含有足

够或最少数量的如下氨基酸残基:i)与第二氨基酸序列中的比对氨基酸残基相同,或ii)第二氨基酸序列中的比对氨基酸残基的保守取代,从而第一和第二氨基酸序列可具有共有的结构域和/或共同的功能活性。例如,包含与参比序列(例如本文所提供的序列)具有至少约85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同性的共有结构域的氨基酸序列。

[0151] 在描述核苷酸序列的情况下,本文所用术语“基本相同”是指第一核酸序列包含足够或最少数量的与第二核酸序列中的比对核苷酸相同的核苷酸,从而第一和第二核苷酸序列编码具有相同功能活性的多肽、或编码相同结构多肽结构域或相同功能性多肽活性。例如,包含与参比序列(例如本文所提供的序列)具有至少约85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同性的核苷酸序列。

[0152] 术语“功能性变体”是指与天然序列具有基本相同氨基酸序列或由基本相同的核苷酸序列编码、且能够具有天然序列一种或多种活性的多肽。

[0153] 序列间的同源性或序列相同性(这些术语在本文中可互换使用)的计算如下进行。

[0154] 为了确定两条氨基酸序列或两条核酸序列的百分比相同性,可以为了最佳比较目的而对序列进行比对(例如,可以在第一和第二氨基酸或核酸序列的之一或两条中引入缺口以达到最佳对齐,并且出于比较目的可以不考虑非同源序列)。在一个典型的实施方式中,用于比较目的比对的参比序列长度为该参比序列长度的至少30%,例如至少40%、50%、60%,例如至少70%、80%、90%、100%。然后比较相应氨基酸位置或核苷酸位置的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中某位置上占据的氨基酸残基或核苷酸与第二序列中相应位置上的相同时,则这些分子在该位置是相同的。

[0155] 考虑到用于两个序列的最佳比对而需要引入的缺口数和每个缺口的长度,两条序列之间的百分比相同性与序列共有相同位置的数目相关。

[0156] 可采用数学算法进行两条序列间的序列比较以及确定其百分比相同性。在一些实施方式中,两条氨基酸序列之间的百分比相同性可以使用Needleman和Wunsch(J.Mol.Biol.(48):444-453(1970))算法确定,该算法已经结合到GCG软件包中的GAP程序中(可从<http://www.gcg.com>获得),使用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵,缺口权重为16、14、12、10、8、6或4,长度权重为1、2、3、4、5或6。在某些实施方式中,两条核苷酸序列之间的相同性百分比使用GCG软件包中的GAP程序(可从<http://www.gcg.com>获得),采用NWSgapdna.CMP矩阵和缺口权重40、50、60、70或80,长度权重1、2、3、4、5或6进行计算。一组合适的参数(以及除非另有说明而应采用的参数组)为Blossum 62评分矩阵,其缺口罚分为12,缺口延伸罚分为4,译码缺口罚分为5。

[0157] 两条氨基酸或核苷酸序列之间的相同性百分比也可以使用E.Meyers和W.Miller(CABIOS,4:11-17(1989))的算法确定,该算法已被并入ALIGN程序(版本2.0),使用PAM120权重残基表,缺口长度罚分为12,缺口罚分为4。

[0158] 本文公开的核酸和蛋白质序列还可以用作“查询序列”来对公共数据库进行搜索,以例如鉴定其他家族成员或相关序列。这类搜索可使用Altschul等,1990,J.Mol.Biol.,215:403-10的NBLAST和XBLAST程序(2.0版本)来运行。可以使用NBLAST程序进行BLAST核苷酸搜索,评分=100,字长=12,以获得与本文所述核酸同源的核苷酸序列。可利用XBLAST程序进行BLAST蛋白质搜索,评分=50,字长=3,以获得与本文所述蛋白质分子同源的氨基酸

序列。为了获得出于比较目的的缺口比对结果,可如Altschul等,1997,Nucleic Acids Res.,25:3389-3402所述利用缺口BLAST。利用BLAST和缺口BLAST程序时,可使用各程序(例如XBLAST和NBLAST)的默认参数。参见www.ncbi.nlm.nih.gov。

[0159] 如本文所用,术语“在低严谨性、中等严谨性、高严谨性或极高严谨性条件下杂交”是指杂交和洗涤的条件。进行杂交反应的指导可见于Current Protocols in Molecular Biology(《新编分子生物学实验指南》,John Wiley&Sons公司,N.Y.(1989),6.3.1-6.3.6),纳入本文作为参考。该参考文献中描述了水性和非水性方法,可采用这两种方法中的任一种。本文涉及的特定杂交条件如下:1)低严谨性杂交条件为在约45°C的6×氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中杂交,然后在0.2×SSC、0.1% SDS中于至少50°C下洗涤2次(对于低严谨性条件,洗涤温度可提高至55°C);2)中等严谨性杂交条件为在约45°C的6×SSC中杂交,然后在0.2×SSC、0.1% SDS中于60°C洗涤一次或多次;3)高严谨性杂交条件为在约45°C的6×SSC中杂交,然后在0.2×SSC、0.1% SDS中于65°C洗涤一次或多次;以及优选地,4)极高严谨性杂交条件为在65°C的0.5M磷酸钠、7% SDS中杂交,然后在0.2×SSC、1% SDS中于65°C洗涤一次或多次。极高严谨性条件4)是合适的条件,且为应采用的条件(除非另有说明)。

[0160] 应理解,本文所述分子可具有额外的保守或非必需的氨基酸取代,其不对分子功能产生实质性影响。

[0161] 术语“氨基酸”涵盖了包含氨基官能团和酸官能团且能够被包含于天然存在氨基酸形成的聚合物的所有分子,不论其为天然或合成分子。示例性氨基酸包括天然存在的氨基酸;其类似物、衍生物及同类物;具有变体侧链的氨基酸类似物;以及前述中任意的所有立体异构体。如本文所用,术语“氨基酸”包括D-和L-镜像异构体和模拟肽。

[0162] “保守性氨基酸取代”是其中一个氨基酸残基被具有相似侧链的另一个氨基酸残基替代的情况。本领域已定义具有带相似侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括:具有碱性侧链的氨基酸(如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(如天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电极性侧链的氨基酸(如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、具有β-分支侧链的氨基酸(如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和具有芳族侧链的氨基酸(如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。

[0163] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”(若为单链)在本文中可互换使用,指任何长度的氨基酸的聚合物。所述聚合物可以是线形或分支聚合物,可以包含经修饰的氨基酸,可间插有非氨基酸。该术语也包括修饰的氨基酸聚合物;例如,二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化或任何其它操作,如与标记组分偶联。多肽可从天然来源分离,可采用重组技术由原核或真核宿主产生,或者可为合成方法的产品。在一个实施方式中,多肽是抗体分子。在另一个实施方式中,多肽是融合蛋白。

[0164] 术语“核酸”、“核酸序列”、“核苷酸序列”和“多核苷酸”在本文中可互换使用。它们是指任何长度的核苷酸聚合形式,不论是脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸或它们的类似物。多核苷酸可以是单链或双链,并且如果是单链,可以是编码链或非编码(反义)链。多核苷酸可包括修饰的核苷酸,如甲基化的核苷酸和核苷酸类似物。核苷酸序列可间插有非核苷酸组分。多核苷酸聚合后可以被进一步修饰,如通过与标记组分结合。核酸可为重组多核苷酸,或为基因组、cDNA、半合成或合成来源多核苷酸(非天然存在或以非天然排列方式与另

—多核苷酸相连)。

[0165] 本文所用术语“分离的”指,某一物质是从其原生或天然环境(例如,若其是天然产生的,则从天然环境)脱离。例如,活体动物中存在的天然多核苷酸或多肽不是分离的,但与天然系统中的某些或所有共存物质分离的该多核苷酸或多肽则是分离的。此类多核苷酸可为载体的组成部分和/或此类多核苷酸或多肽可为组合物的组成部分,但其仍为分离的,这是因为该载体或组合物不是该多核苷酸或多肽天然存在环境的一部分。

[0166] 如本文所用,术语“治疗”例如本文所述的“治疗”病症是指实施方式之一中,与未被给予抗体分子相比,被给予该抗体分子的患有病症(例如本文所述的病症)和/或经受病症(例如本文所述的病症)症状的对象(例如人)其症状严重度较轻和/或恢复更快。治疗可为例如部分或完全减轻、改善、缓解、抑制或降低病症的严重性和/或减少发病率,以及可任选地延迟病症的一种或多种后果或症状、特征和/或病因的显现或发作。在一个实施方式中,治疗针对未显示病症某些迹象的对象进行和/或仅显示病症初期迹象的对象进行。在一个实施方式中,治疗针对具有一种或多种已确定病症迹象的对象进行。在一个实施方式中,治疗针对被诊断为罹患某种病症的对象进行。

[0167] 如本文所用,术语“预防/防止”病症是指如果对象(例如人)接受了多肽(例如抗体分子),该对象不易罹患该病症。

[0168] 下文中进一步详细描述了本文所述组合物和方法的各个方面。在整个说明书中提供了其他定义。

[0169] 抗体分子

[0170] 本文公开了抗体分子,例如包含Fc区的抗体分子,例如,所述Fc区具有本文所述一个或多个突变,和/或具有一个或多个本文所述结构或功能特性。

[0171] 在一个实施方式中,抗体分子为经工程化改造的含Fc区抗体分子(例如亲本抗体分子)或衍生自含Fc区抗体分子(例如亲本抗体分子)。例如,经工程化改造的抗体分子或抗体分子衍生物可具有不同于亲本抗体分子的Fc区。在另一个实施方式中,抗体分子自不含Fc区的抗体分子(例如亲本抗体分子)工程化改造或衍生而得。例如,工程化抗体分子或抗体分子衍生物可具有与亲本抗体分子或其功能片段直接或间接融合的Fc区。

[0172] 如本文所用术语“抗体分子”是指包含至少一种免疫球蛋白可变结构域序列的蛋白质,例如免疫球蛋白链或其片段。术语“抗体分子”包括例如全长、成熟抗体以及抗体的抗原结合片段。例如,抗体分子可包含重(H)链可变区序列(本文中缩写为VH)和轻(L)链可变区序列(本文中缩写为VL)。在另一个实例中,抗体分子包两条重(H)链可变结构域序列和两条轻(L)链可变结构域序列,从而形成两个抗原结合位点,如Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fc、Fd、Fd'、Fv、单链抗体(如scFv)、单可变结构域抗体、双抗体(Dab)(二价且双特异性)以及嵌合(如人源化)抗体,且可通过修饰完整抗体或采用重组DNA技术从头合成的那些产生。这些功能性抗体片段保留了选择性结合其相应抗原或受体的能力。抗体和抗体片段可来自任何抗体类型(包括但不限于IgG、IgA、IgM、IgD和IgE),并来自任何抗体亚型(例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)。抗体分子可以是单克隆或多克隆的。抗体分子还可为人、人源化、CDR移植或体外产生的抗体。抗体分子可具有选自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的重链恒定区。抗体分子还可具有选自κ或λ的轻链。术语“免疫球蛋白(Ig)”与本文中的术语“抗体”可互换使用。

[0173] 抗原结合片段的例子包括:(i) Fab片段,由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片

段; (ii) F(ab')<sub>2</sub>片段, 包含在铰链区通过二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段; (iii) Fd片段, 其由VH和CH1结构域组成; (iv) Fv片段, 其由抗体单臂的VL和VH结构域组成; (v) 双抗体(diabody, dAb)片段, 其由VH结构域组成; (vi) 骆驼或骆驼源化可变结构域; (vii) 单链Fv(scFv), 参见例如Bird等, (1988) Science 242:423-426; 以及Huston等, (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; (viii) 单域抗体。这些抗体片段可通过任何合适的方法(包括本领域普通技术人员所知的多种常规技术)获得, 并且筛选与完整抗体具有相同应用的片段。

[0174] 术语“抗体”包括完整分子及其功能性片段。可改变(例如突变)抗体恒定区以修饰该抗体的性能, 例如增加或提高或减少或降低如下一项或多项: Fc受体结合、抗体糖基化、半胱氨酸残基数、效应细胞功能或补体功能。

[0175] 抗体分子可为单链抗体。可对单链抗体(scFv)进行工程化改造(参见例如Colcher, D.等, (1999) Ann N Y Acad Sci 880:263-80; 以及Reiter, Y. (1996) Clin Cancer Res 2:245-52)。单链抗体可二聚化或多聚化以产生对相同目标蛋白上不同表位具有特异性的多价抗体。

[0176] 本文所述的抗体分子还可为单域抗体。单域抗体可包括其互补决定区为单域多肽一部分的抗体。实例包括但不限于: 重链抗体、天然缺失轻链的抗体、衍生自常规4链抗体的单域抗体、工程化抗体和非衍生自抗体的单结构域骨架。单域抗体可为本领域中任何单域抗体或任何未来的单域抗体。单域抗体可衍生自任何物种, 包括但不限于: 小鼠、人、骆驼、大羊驼、鱼、鲨鱼、羊、兔和牛。根据有些方面, 单域抗体是已知为缺失轻链的重链抗体的天然存在单域抗体。此类单域抗体公开于例如W094/04678。清楚起见, 衍生自天然缺失轻链的重链抗体的该可变结构域在本文中称为VHH或纳米抗体以区别于四链免疫球蛋白的常规VH。该VHH分子可衍生自骆驼科(Camelidae)物种的抗体, 例如衍生自骆驼、大羊驼、单峰驼、羊驼和驮马。除了骆驼科, 其他物种也可产生天然缺失轻链的重链抗体; 本文也包括了这些VHH。

[0177] VH和VL区可进一步细分为超变区, 称为“互补决定区(CDR)”, 其间间插更保守的被称为“框架区(FR或FW)”的区。本文所用术语“互补决定区”和“CDR”是指抗体可变区内赋予抗原特异性和结合亲和性的氨基酸序列。本文所用术语“框架”、“FW”和“FR”可以互换使用。

[0178] 已采用多种方法精确来划定框架区和CDR的范围(参见Kabat, E.A., 等, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest(《热门免疫学蛋白质序列》, 第5版, 美国公共卫生署, 国立卫生研究院, 公开号91-3242; Chothia, C.等, (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; 以及采用牛津分子AbM抗体造模软件(Oxford Molecular's AbM antibody modeling software)所用的AbM定义)。总体上参见例如《抗体工程化改造实验室手册》(“Antibody Engineering Lab Manual”, Duebel, S.和Kontermann, R.编, Springer-Verlag公司, 海德堡)中的“抗体可变结构域的蛋白质序列和结构分析”(“Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains”)。在一个实施方式中, 使用以下定义: 重链可变结构域CDR1的AbM定义以及对其他CDR的Kabat定义。在一个实施方式中, 将Kabat定义用于所有CDR。此外, 用Kabat或AbM CDR描述的实施方式也可采用Chothia超变环来实施。每一VH和VL通常包括三个CDR和四个FR, 其从氨基端到羧基端按照以下顺序排列: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。

[0179] 如本文所用,“免疫球蛋白可变结构域序列”是指能形成免疫球蛋白可变结构域结构的氨基酸序列。例如,该序列可包括天然存在可变结构域氨基酸序列的全部或部分。例如,该序列可包含或不包含一个、两个或更多给N-或C-末端氨基酸,或可包含与蛋白质结构形成相容的其他改变。

[0180] 术语“抗原结合区”是指包含形成与抗原或其表位结合界面的决定簇的抗体分子部分。就蛋白质(或蛋白质模拟物)而言,抗原结合区通常包含形成抗原结合界面的一个或多个环(例如至少4个氨基酸或氨基酸模拟物的环)。通常,抗体分子的抗原结合区包含至少一个或两个CDR和/或超变环,或更通常为至少三个、四个、五个或六个CDR和/或超变环。

[0181] 术语“竞争”或“交叉竞争”在本文中可互换使用,是指抗体分子干扰另一抗体分子与目标结合的能力。对结合的干扰可以是直接的或间接的(例如通过抗体分子或目标的变构调控)。抗体分子干扰其他抗体分子与目标结合的程度且由此其是否能被称为竞争,可采用竞争性结合测试(例如FACS测试、ELISA或BIACORE测试)确定。在一个实施方式中,竞争性结合测试是定量竞争性测试。在一个实施方式中,在竞争性结合测试(例如本文所述的竞争性测试)中,第一抗体分子与目标的结合有如下减少时,认为该第一抗体分子与第二抗体分子竞争性结合所述目标:减少10%或更多,例如20%或更多,30%或更多,40%或更多,50%或更多,55%或更多,60%或更多,65%或更多,70%或更多,75%或更多,80%或更多,85%或更多,90%或更多,95%或更多,98%或更多,99%或更多。

[0182] 本文所用术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”是指具有单一分子组成的抗体分子制备物。单克隆抗体组合物针对具体表位具有单一的结合特异性和亲和力。单克隆抗体的制备可采用杂交瘤技术或不采用杂交瘤技术的方法(例如重组法)。

[0183] “有效/效果上的人(effectively human)”蛋白是不引发中和性抗体应答(例如人抗鼠抗体(HAMA)应答)的蛋白质。HAMA在许多情况下(例如若抗体分子在例如治疗慢性或复发性疾病症状时被反复施用的情况下)会造成问题。HAMA应答可造成反复给予抗体因血清抗体清除率提高(参见例如Saleh等,Cancer Immunol.Immunother.32:180-190(1990))以及潜在的过敏反应(参见例如LoBuglio等,Hybridoma,5:5117-5123(1986))而可能失去效果。

[0184] 抗体分子可为多克隆或单克隆抗体。在一些实施方式中,可重组产生抗体,例如通过任何合适的噬菌体展示或重组方法来产生。

[0185] 产生抗体的各种噬菌体展示和重组方法是本领域已知的(如以下中所述,例如:Ladner等,美国专利No.5,223,409;Kang等.国际公开号W0 92/18619;Dower等.国际公开号W0 91/17271;Winter等.国际公开W0 92/20791;Markland等.国际公开号W0 92/15679;Breitling等.国际公开W0 93/01288;McCafferty等.国际公开号W0 92/01047;Garrard等.国际公开号W0 92/09690;Ladner等.国际公开号W0 90/02809;Fuchs等.(1991)Bio/Technology 9:1370-1372;Hay等.(1992)Hum Antibod Hybridomas 3:81-85;Huse等.(1989)Science 246:1275-1281;Griffths等.(1993)EMBO J 12:725-734;Hawkins等.(1992)J Mol Biol 226:889-896;Clackson等.(1991)Nature 352:624-628;Gram等.(1992)PNAS 89:3576-3580;Garrard等.(1991)

[0186] 190620F2 1PWCNBio/Technology 9:1373-1377;Hoogenboom等.(1991)Nuc Acid Res 19:4133-4137;以及Barbas等.(1991)PNAS 88:7978-7982,其内容作为参考全文纳入

本文)。

[0187] 在一个实施方式中,抗体分子是完全人抗体(例如由小鼠产生的抗体,该小鼠在已通过基因工程化改造以产生源自人免疫球蛋白序列的抗体)、或非人抗体,例如啮齿类(小鼠或大鼠)、羊、灵长类(例如猴)、骆驼抗体。在一个实施方式中,非人抗体是啮齿类抗体(小鼠或大鼠抗体)。制备啮齿类抗体的方法是本领域已知的。

[0188] 人单克隆抗体可采用携带人免疫球蛋白基因的转基因小鼠而不是小鼠体系产生。来自用感兴趣抗原免疫的这些转基因小鼠的脾细胞被用于产生分泌人mAb的杂交瘤,这些人mAb对来自人蛋白质的表位具有结合特异性(参见例如,Wood等,国际申请号W0 91/00906,Kucherlapati等,PCT公开号W0 91/10741;Lonberg等,国际申请号W0 92/03918;Kay等,国际申请号92/03917;Lonberg等,1994Nature368:856-859;Green,L.L.等,1994Nature Genet.7:13-21;Morrison,S.L.等,1994Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-6855;Bruggeman等,1993Year Immunol 7:33-40;Tuailon等,1993PNAS 90:3720-3724;Bruggeman等,1991Eur J Immunol21:1323-1326)。

[0189] 抗体可为其中的可变区或其部分(例如CDR)在非人生物(例如大鼠或小鼠)中产生的抗体。嵌合、CDR移植以及人源化抗体均包含在本发明中。本发明包括在非人生物(例如大鼠或小鼠)中产生并随后(例如在可变框架或恒定区中)进行修饰以降低人体内抗原性的抗体。

[0190] 可采用任何合适的重组DNA技术产生嵌合抗体。本领域中已知多种方法(参见Robinson等,国际专利公开号PCT/US86/02269;Akira,等,欧洲专利申请184,187;Taniguchi,M.,欧洲专利申请171,496;Morrison等,欧洲专利申请173,494;Neuberger等,国际申请W0 86/01533;Cabilly等,美国专利号4,816,567;Cabilly等,欧洲专利申请125,023;Better等,(1988Science 240:1041-1043);Liu等,(1987)PNAS 84:3439-3443;Liu等,1987,J.Immunol.139:3521-3526;Sun等,(1987)PNAS 84:214-218;Nishimura等,1987,Canc.Res.47:999-1005;Wood等,(1985)Nature314:446-449;and Shaw等,1988,J.Natl Cancer Inst.80:1553-1559)。

[0191] 人源化或CDR移植抗体中(免疫球蛋白重链或轻链的)至少一个或两个但通常为全部三个受者CDR被供者CDR替代。可在抗体中用至少部分非人CDR进行替换,或用非人CDR替换仅部分CDR。仅需要替换人源化抗体结合脂多糖所需的CDR数。在一个实施方式中,供者可为啮齿类抗体,例如大鼠或小鼠抗体,而受者可为人框架或人共有框架。通常,提供CDR的免疫球蛋白被称“供者”,而提供框架区的免疫球蛋白被称作“受者”。在一些实施方式中,供者免疫球蛋白是非人的(例如,啮齿类)。受者框架通常为天然存在(例如人)的框架或共有框架,或与其约85%或更高例如90%、95%、99%或更高相同性的序列。

[0192] 如本文所用,术语“共有序列”是指由相关序列家族中最高频存在氨基酸(或核苷酸)组成的序列(参见例如,Winnaker,From Genes to Clones(“从基因到克隆”Verlagsgesellschaft出版公司,德国威因海姆(Weinheim,Germany),1987)。在某一蛋白家族中,共有序列中的各位置上是该家族中该位置处出现频率最高的氨基酸。如果两种氨基酸出现频率相同,可将其中任一种包含于共有序列中。“共有框架”是指共有免疫球蛋白序列中的框架区。

[0193] 可采用任何合适的方法将抗体人源化,本领域中已知许多此类方法(参见例如,

Morrison, S.L., 1985, Science 229:1202-1207, Oi等, 1986, BioTechniques 4:214, 以及 Queen等, US 5,585,089、US 5,693,761和US 5,693,762, 其全部内容作为参考纳入本文)。

[0194] 可采用CDR移植或CDR取代来产生人源化或CDR移植抗体, 可替换免疫球蛋白链中的一个、两个或全部CDR。参见例如美国专利号5,225,539; Jones等, 1986 Nature 321:552-525; Verhoeyan等, 1988 Science 239:1534; Beidler等, 1988 J. Immunol. 141:4053-4060; Winter US 5,225,539, 其全部内容作为参考纳入本文。Winter描述了可用于制备人源化抗体的CDR移植方法(英国专利申请GB 2188638A, 提交于1987年3月26日; Winter US 5,225,539), 其全部内容作为参考纳入本文。

[0195] 还提供了其中特定氨基酸被取代、缺失或插入的人源化抗体。从供者中选择氨基酸的标准描述于例如US 5,585,089, 例如US 5,585,089的第12-16栏, 其内容通过参考纳入本文。使抗体人源化的其他技术描述于Padlan等EP519596A1(公开于1992年12月23日)。

[0196] 在一个实施方式中, 抗体分子所具有的重链恒定区选自例如: IgG1、IgG2(例如IgG2a)、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD和IgE的重链恒定区; 具体而言, 选自例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的(例如人的)重链恒定区。在另一个实施方式中, 抗体分子所具有的轻链恒定区选自例如 $\kappa$ 或 $\lambda$ (例如人的)轻链恒定区。可改变(例如突变)恒定区以修饰该抗体分子的性能(例如以增加或减少如下一项或多项: Fc受体结合、抗体糖基化、半胱氨酸残基数、效应细胞功能和/或补体功能)。在一个实施方式中, 抗体分子具有效应功能且能够固定补体。在另一个实施方式中, 抗体分子不募集效应细胞或固定补体。在某些实施方式中, 抗体分子结合Fc受体的能力降低或不具备该能力。例如, 抗体可以是不支持与Fc受体结合的同种型或亚型、片段或其他突变体, 例如其具有经诱变的Fc受体结合区或缺失Fc受体结合区。

[0197] 在一个实施方式中, 抗体分子的恒定区被改变。改变抗体恒定区的方法是本领域中已知的。具有改变的功能(例如对效应体配体(如细胞上的FcR)或补体的C1成分的亲和力改变)的抗体分子可通过将该抗体恒定部分中的至少一个氨基酸残基替换为不同的残基来产生(参见例如EP388,151A1、美国专利号5,624,821和美国专利号5,648,260, 其全部内容通过引用纳入本文)。还包括了使抗体结构稳定的氨基酸突变, 例如人IgG4中的S228P(EU命名法, Kabat命名法中的S241P)。可描述相似类型的改变, 其若应用于鼠或其他物种的免疫球蛋白将减弱或消除这些功能。

[0198] 在一个实施方式中, 抗体分子中的氨基酸仅为标准氨基酸。在一个实施方式中, 抗体分子包含天然存在的氨基酸; 其类似物、衍生物及同类物; 具有变体侧链的氨基酸类似物; 和/或前述中任意的所有立体异构体。抗体分子可包含肽模拟物和氨基酸的D-或L-光学异构体。

[0199] 本文所述抗体分子的多肽可为线性或分支型, 其可包含经修饰的氨基酸, 且可间插有非氨基酸。还可修饰抗体分子; 例如, 通过二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化或任何其它操作, 如与标记组分偶联来修饰。多肽可从天然来源分离, 可采用重组技术由原核或真核宿主产生, 或者可为合成方法的产品。

[0200] 本文所述的抗体分子可以非偶联形式单独使用, 或可与某些物质结合, 所述物质为例如毒素或部分(例如治疗药物; 发出辐射的化合物; 植物、真菌或细菌源性分子; 或生物蛋白(例如蛋白毒素)或颗粒(例如重组病毒颗粒(例如通过病毒包被蛋白))。例如, 抗体分子可与放射性同位素(如 $\alpha$ -、 $\beta$ -或 $\gamma$ -放射物或 $\beta$ -和 $\gamma$ -放射物)偶联。

[0201] 抗体分子可衍生化为或连接其他功能性分子(例如另一肽或蛋白质)。如本文所用,“衍生化”抗体分子是已被修饰的抗体分子。衍生化的方法包括但不限于:添加荧光部分、放射性核苷酸、毒素、酶或亲和配体(如生物素)。因此,抗体分子包括本文所述抗体的衍生化和其他修饰形式,包括免疫粘附分子。例如,抗体分子可与一个或多个其他分子实体功能性连接(通过化学偶联、遗传融合、非共价关联或其他),所述其他分子实体为例如另一抗体(例如双特异性抗体或双抗体)、检测剂、毒素、药剂和/或能介导该抗体或抗体部分与其他分子(如链霉亲和素核心区或多聚组氨酸标签)关联的蛋白质或肽。

[0202] 某些类型的衍生化抗体分子可通过交联两个或多个抗体(相同类型或不同类型,例如用以产生双特异性抗体)来产生。合适的交联剂包括具有通过合适间隔子分隔的两个不同反应基团的异双官能性交联剂(例如间-马来酰亚胺苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯)或同双官能性(例如二琥珀酰亚胺基辛二酸酯)交联剂。此类交联剂可获自Pierce化学品公司(伊利诺斯州罗克福德)。

[0203] 可用于衍生化(或标记)抗登革热抗体分子的有用的可检测剂包括荧光化合物、各种酶、辅基、发光材料、生物发光材料、荧光发射金属原子(例如铕(Eu)和其他镧系原子)以及放射性材料(如下文所述)。示例性荧光检测剂包括荧光素、荧光素异硫氰酸酯、罗丹明、5-二甲基胺-1-萘磺酸氯、藻红蛋白等。还可用可检测酶衍生化抗体,所述酶可为例如碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、乙酰胆碱酯酶、葡萄糖氧化酶等。用可检测酶衍生抗体时,可采用加入该酶用来产生可检测反应产物的其他试剂来检测该抗体。例如,当存在检测剂辣根过氧化物酶时,加入过氧化氢和二氨基联苯胺产生可检测的颜色反应产物。也可用辅基(例如链霉亲和素/生物素和亲和素/生物素)来衍生抗体分子。例如,可用生物素衍生抗体,并通过亲和素或链霉亲和素结合的间接测定来检测该抗体。合适荧光材料的例子包括伞形酮、荧光素、荧光素异硫氰酸酯、罗丹明、二氯三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料的例子包括鲁米诺;生物发光材料的例子包括荧光素酶、荧光素和水母发光蛋白。

[0204] 可例如诊断性和/或试验性地应用标记的抗体分子,包括(i)用于通过标准技术(如亲和层析或免疫沉淀)分离预定抗原;(ii)用于检测(例如细胞裂解物或细胞上清液中的)预定抗原以评估蛋白质的表达模式和丰度;(iii)用于监测组织中蛋白水平作为临床试验的一部分来例如用于测定给定治疗方案的效力。

[0205] 抗体分子可与其他分子实体偶联,所述分子实体通常为标记物或治疗剂(例如抗微生物剂(例如抗菌剂或杀菌剂)、免疫调节剂、免疫刺激剂、细胞毒剂或细胞抑制剂)或部分。可将放射性同位素用于检测或治疗应用中。可与抗体分子偶联的放射性同位素包括但不限于 $\alpha$ -、 $\beta$ -或 $\gamma$ -放射体,或者 $\beta$ -和 $\gamma$ -放射体。此类放射性同位素包括但不限于:碘( $^{131}\text{I}$ 或 $^{125}\text{I}$ )、钇( $^{90}\text{Y}$ )、镱( $^{177}\text{Lu}$ )、锕( $^{225}\text{Ac}$ )、镭( $^{211}\text{At}$ )、铼( $^{186}\text{Re}$ )、铋( $^{212}\text{Bi}$ 或 $^{213}\text{Bi}$ )、铟( $^{111}\text{In}$ )、锝( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ )、磷( $^{32}\text{P}$ )、铑( $^{188}\text{Rh}$ )、硫( $^{35}\text{S}$ )、碳( $^{14}\text{C}$ )、氚( $^3\text{H}$ )、铬( $^{51}\text{Cr}$ )、氯( $^{36}\text{Cl}$ )、钴( $^{57}\text{Co}$ 或 $^{58}\text{Co}$ )、铁( $^{59}\text{Fe}$ )、硒( $^{75}\text{Se}$ )或镓( $^{67}\text{Ga}$ )。可用作治疗剂的放射性同位素包括:钇( $^{90}\text{Y}$ )、镱( $^{177}\text{Lu}$ )、锕( $^{225}\text{Ac}$ )、镭( $^{211}\text{At}$ )、铼( $^{186}\text{Re}$ )、铋( $^{212}\text{Bi}$ 或 $^{213}\text{Bi}$ )和铑( $^{188}\text{Rh}$ )。可用作标记物例如用于诊断的放射性同位素包括:碘( $^{131}\text{I}$ 或 $^{125}\text{I}$ )、铟( $^{111}\text{In}$ )、锝( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ )、磷( $^{32}\text{P}$ )、碳( $^{14}\text{C}$ )和氚( $^3\text{H}$ ),或以上所列治疗用同位素中的一种或多种。

[0206] 本公开提供了放射性标记的抗体分子及其标记方法。在一个实施方式中,公开了

标记抗体分子的方法。该方法包括使抗体分子接触螯合剂从而产生偶联抗体。该偶联抗体被放射性同位素(例如<sup>111</sup>铟、<sup>90</sup>钇和<sup>177</sup>镱)放射性标记从而产生标记的抗体分子。

[0207] 在一些方面中,本公开提供了制备本文所公开抗体分子的方法。所述方法包括:提供抗原或其片段;获得特异性结合该抗原的抗体分子;评估该抗体分子在调控该抗原活性和/或生物表达该抗原中的效力。该方法还可进一步包括给予对象(例如人)该抗体分子,包括其衍生物(例如人源化抗体分子)。

[0208] 本公开提供了编码上述抗体分子的分离的核酸分子、及其载体和宿主细胞。核酸分子包括但不限于RNA、基因组DNA和cDNA。

[0209] 融合蛋白

[0210] 本文公开了融合蛋白,例如包含Fc区的融合蛋白,例如,所述Fc区具有本文所述一个或多个突变,和/或具有一个或多个本文所述结构或功能特性。

[0211] 在一个实施方式中,融合蛋白可工程化改造自或衍生自包含Fc区(例如亲本多肽)的多肽(例如融合蛋白)。例如,工程化改造的多肽或衍生物可具有与亲本多肽不同的Fc区。在另一个实施方式中,融合蛋白工程化改造自或衍生自不含Fc区的多肽(例如亲本多肽)。例如,工程化改造抗体分子或抗体分子衍生物可具有与亲本多肽直接或间接融合的Fc区。

[0212] 如本文所用,术语“融合蛋白”是指包含两个或多个蛋白质或肽组件的蛋白质。所述两个或多个蛋白质或肽组件可获自不同来源或由不同基因编码。融合蛋白有时也被称为嵌合蛋白。融合蛋白(也称Fc嵌合融合蛋白、Fc-Ig、基于Ig的嵌合融合蛋白或Fc标签蛋白)可包括与蛋白质或多肽连接(如融合)的免疫球蛋白Fc区(例如本文所述的Fc区)。该Fc区可直接或间接(例如通过接头)连接(例如基因融合)蛋白质或肽。在一个实施方式中,Fc区衍生自IgG(例如人IgG,例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)的Fc区。在一个实施方式中,Fc区衍生自IgG1(例如人IgG1)的Fc区。

[0213] Fc融合的结合伴侣可包括各种蛋白质或肽或其片段。例如,Fc区可与如下物质融合:肽(例如治疗肽)、配体(例如与细胞表面受体结合时被活化的配体)、信号转导分子、受体胞外结构域或诱饵蛋白(例如用于识别结合伴侣例如在蛋白质微阵列中的结合伴侣)。

[0214] 在一个实施方式中,Fc融合蛋白包含受体胞外结构域或可溶性受体、或其配体结合部分。在一个实施方式中,受体是生长因子受体。在一个实施方式中,受体是细胞因子受体。在一个实施方式中,受体是免疫哨点分子。

[0215] 在一个实施方式中,融合蛋白包含来自人VEGF受体1和2胞外结构域的血管内皮生长因子(VEGF)-结合部分,其与人IgG1的Fc区融合。在一个实施方式中,融合蛋白为阿柏西普。在一个实施方式中,融合蛋白(例如阿柏西普)用于治疗本文所述的病症,例如眼部病症(例如湿性年龄相关性黄斑变性)或癌症(例如结直肠癌)。

[0216] 在另一个实施方式中,融合蛋白包含可溶性肿瘤坏死因子(TNF)受体2,其与人IgG1的Fc区融合。在一个实施方式中,融合蛋白为依那西普。在一个实施方式中,Fc融合蛋白(例如依那西普)用于治疗本文所述的病症,例如自身免疫性病症(例如类风湿性关节炎)。

[0217] 在另一个实施方式中,融合蛋白包含人IL-1受体辅助蛋白(IL-1RAcP)和白介素-1受体1(IL-1R1)胞外部分的配体结合结构域,其与人IgG1的Fc区融合。在一个实施方式中,融合蛋白为利纳西普。在一个实施方式中,融合蛋白(例如利纳西普)用于治疗本文所述的

病症,例如冷吡啉(cryopyrin)相关周期性综合征(CAPS),例如家族性冷自身炎症综合征,Muckle-Wells综合征,或新生儿发病的多系统炎性疾病。

[0218] 在另一个实施方式中,融合蛋白包含CTLA-4胞外结构域,其与人IgG1的Fc区融合。在一个实施方式中,融合蛋白为贝拉西普。在一个实施方式中,Fc融合蛋白(例如贝拉西普)用于治疗本文所述的病症,例如器官排异、自身免疫性病症(例如类风湿性关节炎)或癌症。

[0219] 在一个实施方式中,Fc融合蛋白包含肽,例如治疗肽。

[0220] 在一个实施方式中,融合蛋白包含血小板生成素结合肽,其与人IgG1的Fc区融合。在一个实施方式中,融合蛋白为罗米司亭。在一个实施方式中,Fc融合蛋白(例如罗米司亭)用于治疗本文所述的病症,例如慢性先天性(免疫)血小板减少性紫癜(ITP)。

[0221] 在一个实施方式中,融合蛋白包含人白细胞功能抗原-3(LFA-3)的胞外CD2-结合部分,其与人IgG1的Fc区融合。在一个实施方式中,融合蛋白为阿法西普。在一个实施方式中,融合蛋白(例如阿法西普)用于治疗本文所述的病症,例如自身免疫性疾病(例如牛皮癣)或癌症(例如皮肤T细胞淋巴瘤或T-细胞非霍奇金淋巴瘤)。

[0222] 在一个实施方式中,融合蛋白包含凝血因子。

[0223] 在一个实施方式中,融合蛋白包含IX因子,其与人IgG1的Fc区融合。在另一个实施方式中,融合蛋白包含VIII因子,其与人IgG1的Fc区融合。在一个实施方式中,融合蛋白(例如FIX-Fc融合或FVIII-Fc融合)用于治疗本文所述的病症,例如血友病A或血友病B。

[0224] 在一个实施方式中,融合蛋白包含一个或多个糖基化位点或被糖基化。在另一个实施方式中,融合蛋白不含糖基化位点或未被糖基化。

[0225] 在一个实施方式中,融合蛋白中仅有的氨基酸是标准氨基酸。在一个实施方式中,融合蛋白包含天然存在的氨基酸;其类似物、衍生物及同类物;具有变体侧链的氨基酸类似物;和/或前述中任意的所有立体异构体。融合蛋白可包含肽模拟物和氨基酸的D-或L-光学异构体。

[0226] 在一个方面中,本公开提供了制备本文所公开融合蛋白的方法。本文所述融合蛋白可通过任何合适的重组DNA技术生产。在一个实施方式中,该方法包括在允许生产融合蛋白的条件下培养包含融合蛋白编码核酸的细胞。在另一个实施方式中,所述方法还包括分离或纯化融合多肽。在另一个实施方式中,该方法还包括在基于细胞的测试或动物模型中评估融合蛋白的效力。在另一个实施方式中,该方法还包括给予对象(例如人)融合蛋白。

[0227] 本公开提供了编码上述融合蛋白的分离的核酸分子、及其载体和宿主细胞。核酸分子包括但不限于RNA、基因组DNA和cDNA。

[0228] Fc区

[0229] 可结晶片段区或Fc区是指能与Fc受体相互作用的免疫球蛋白区域。在一个实施方式中,Fc区还能与补系统中的蛋白质相互作用。虽然不希望囿于理论,但据信在一个实施方式中,Fc区与Fc受体间的相互作用使免疫系统活化。

[0230] 在IgG、IgA和IgD型抗体中,天然存在的Fc区通常包含两个相同的蛋白质片段,它们来自抗体两条重链的第二和第三恒定结构域。天然IgM和IgE的Fc区通常包含各多肽链中的三个重链恒定结构域(C<sub>H</sub>结构域2-4)。IgG的Fc区可包含高度保守的N-糖基化位点(Stadlmann等,(2008).Proteomics 8(14):2858-2871;Stadlmann(2009)Proteomics 9(17):4143-4153)。虽然不希望囿于理论,但据信在一个实施方式中,Fc区的糖基化位点在

Fc受体介导的活性中起作用(Peipp等, (2008)Blood 112(6):2390-2399)。在一个实施方式中,连接于该位点的N-聚糖主要为复合型的核心岩藻糖基化双天线结构。在另一个实施方式中,少量此类N-聚糖还包含等分GlcNAc和/或 $\alpha$ -2,6连接唾液酸残基。

[0231] 以下示出的是示例性Fc区氨基酸序列。

```

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
[0232] SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 1)

```

[0233] 在SEQ ID NO:1中,该序列中的第一个氨基酸残基在本文中称为第118位。带下划线的三个粗体显示组氨酸分别为第310、433和435位。

[0234] 本文所述的多肽(例如抗体分子或融合蛋白)可包含表1中所记载的一个或多个(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多种)突变或突变组合。

[0235] 表1. 示例性Fc突变

名称	突变
FcMut001	I253M
FcMut002	L309H_D312A_N315D
FcMut003	L309N
FcMut004	M252E_S254R
FcMut005	M252E_S254R_R255Y
FcMut006	S254H
FcMut007	S254M
FcMut008	T256D_T307R
FcMut009	T256L_N286I_T307I
[0236] FcMut010	T256I_N286I_T307I
FcMut011	K248S_D376Q
FcMut012	K248S_D376N
FcMut013	D376Q_E380A
FcMut014	D376N_E380A
FcMut015	D376Q_M428L
FcMut016	K248S_A378I
FcMut017	L314K
FcMut018	T250Q_M428L
FcMut019	M428L_N434A
FcMut020	N434A
FcMut021	T307A_E380A_N434A

[0237]

FcMut022	M252W
FcMut023	V308F
FcMut024	V308F_N434Y
FcMut026	T256D_T307R_D376N
FcMut027	L309R_D312E
FcMut028	L309R_Q311P_D312E
FcMut029	K246N_P247A
FcMut030	K246N_P247A_D376N
FcMut031	T256E_T307R
FcMut032	T256R_T307D
FcMut033	T256R_T307E
FcMut034	Q311P
FcMut035	D376Q
FcMut036	L234A_L235A
FcMut037	L235V_G236A
FcMut038	L234P_L235P
FcMut039	L235P
FcMut040	P329G
FcMut041	P329E
FcMut042	E233K
FcMut043	T256D_N286D_A287S_T307R
FcMut044	T256D_P257L_T307R
FcMut045	T256D_T307R_Q311V
FcMut046	P247D_T256D_T307R
FcMut047	P247D_N286D_A287S_Q311V
FcMut048	P257M_V308N
FcMut049	V279I_Q311L_N315T
FcMut050	M428L_N434S
FcMut051	N434S
FcMut052	H433G_N434P
FcMut053	V259I_V308F_M428L
FcMut067	T256D_N286D_T307R
FcMut068	T256D_N286E_T307R
FcMut069	T256D_N286Q_T307R
FcMut070	T256D_P257T_T307R
FcMut071	T256D_P257V_T307R
FcMut072	T256D_T307R_Q311I
FcMut073	T256D_T307R_Q311L
FcMut074	T256D_T307R_Q311M
FcMut075	T256D_P257L_N286D_T307R_Q311V
FcMut076	T256D_T307R_M428L
FcMut077	M428L
FcMut078	M252Y_S254T_T256Q
FcMut079	M252Y_S254T_T256E_K288E
FcMut080	T256K_K288E
FcMut081	T256D_E258T

[0238]

FcMut082	E283Q H285E
FcMut083	R344D D401R
FcMut084	K248E E380K
FcMut085	K248E E380R
FcMut086	K246H
FcMut087	K248H
FcMut088	T250I
FcMut089	T250V
FcMut090	L251F
FcMut091	L251M
FcMut093	P257V
FcMut094	N276D
FcMut095	H285N
FcMut096	H285D
FcMut097	K288H
FcMut098	K288Q
FcMut099	K288E
FcMut100	T307E
FcMut101	T307Q
FcMut102	V308P
FcMut103	V308I
FcMut104	V308L
FcMut105	L309H
FcMut106	L309M
FcMut107	Q311H
FcMut108	L314F
FcMut109	Y319H
FcMut110	I336T
FcMut111	P343D
FcMut112	P343V
FcMut113	E345Q
FcMut114	P346V
FcMut115	P374T
FcMut116	D376N
FcMut117	A378S
FcMut118	A431T
FcMut119	A431P
FcMut120	A431G
FcMut121	L432V
FcMut122	L432I
FcMut123	L432Q
FcMut124	N434T
FcMut125	H435N
FcMut126	Y436H
FcMut127	K439Q
FcMut128	T256D

[0239]

FcMut129	T307R
FcMut130	A378T
FcMut131	A378D
FcMut132	A378H
FcMut133	A378Y
FcMut134	A378V
FcMut135	D376R
FcMut136	D376F
FcMut137	D376W
FcMut138	L314H
FcMut139	L432E_T437Q
FcMut140	D376Q_A378T
FcMut141	D376Q_I377M_A378T
FcMut142	P244Q_D376Q
FcMut143	P247T_A378T
FcMut144	P247N_A378T
FcMut145	T256D_T307R_L309T
FcMut146	A339T_S375E_F404Y
FcMut147	L235V_G236A_T256D_T307R
FcMut148	L235V_G236A_D376Q_M428L
FcMut149	L314N
FcMut150	N315D
FcMut151	A378T
FcMut152	T437Q
FcMut153	L432E
FcMut154	Y436R
FcMut155	L314M
FcMut156	L234A_L235A_T256D_T307R_Q311V
FcMut157	L234A_L235A_T256D_P257V_T307R
FcMut158	L234A_L235A_T256D_P257L_N286D_T307R_Q311V
FcMut159	L235V_G236A_T256D_T307R_Q311V
FcMut160	L235V_G236A_T256D_P257V_T307R
FcMut161	L235V_G236A_T256D_P257L_N286D_T307R_Q311V
FcMut162	S267T_A327N_A330M
FcMut163	S267T_A327N
FcMut164	L235V_G236A_S267T_A327N_A330M
FcMut165	L235V_G236A_S267T_A327N
FcMut166	M252Y_S254T
FcMut167	T256E
FcMut168	G236A_I332E
FcMut169	S239D_I332E
FcMut170	G236A_S239D_I332E
FcMut171	T256D_N286D_T307R_Q311V
FcMut172	T256D_E258T_T307R
FcMut173	T256D_E258T_T307R_Q311V
FcMut174	T256D_P257V_E258T_T307R

[0240]

FcMut175	T256D_P257L_E258T_N286D_T307R_Q311V
FcMut176	T256D_E258T_N286D_T307R_Q311V
FcMut177	A378V_M428L
FcMut178	A378V_M428I
FcMut179	A378V_M428V
FcMut180	T256D_N286D
FcMut181	T256D_A378V
FcMut182	T256D_Q311V
FcMut183	T256D_Q311V_A378V
FcMut184	T256D_T307R_A378V
FcMut185	T256D_N286D_T307R_A378V
FcMut186	T256D_T307R_Q311V_A378V
FcMut187	H285D_A378V
FcMut188	H285D_Q311V
FcMut189	T256D_H285D
FcMut190	T256D_H285D_Q311V
FcMut191	T256D_H285D_T307R
FcMut192	T256D_H285D_T307R_A378V
FcMut193	H285D_L314M_A378V
FcMut194	T256D_E258T_H285D_Q311H
FcMut195	T256D_E258T_H285D
FcMut196	H285D_N315D
FcMut197	H285N_T307Q_N315D
FcMut198	H285D_L432E_T437Q
FcMut199	T256D_E258T_N315D
FcMut200	P257V_H285N
FcMut201	H285N_L432F
FcMut202	H285N_T437I
FcMut203	T256D_E258T_L314M
FcMut204	T256D_E258T_T307Q
FcMut205	T256D_E258T_A378V
FcMut206	V308P_A378V
FcMut207	P257V_A378T
FcMut208	P257V_V308P_A378V
FcMut209	N315D_A378T
FcMut210	H285N_L314M
FcMut211	L314M_L432E_T437Q
FcMut212	T307Q_N315D
FcMut213	H285D_T307Q_A378V
FcMut214	L314M_N315D
FcMut215	T307Q_Q311V_A378V
FcMut216	H285D_Q311V_A378V
FcMut217	Q311V_N315D_A378V
FcMut218	T256D_E258T_Q311V
FcMut219	T256D_N315D_A378V
FcMut220	T256D_Q311V_N315D

[0241]	FcMut221	T256D T307Q A378V
	FcMut222	T256D T307Q Q311V
	FcMut223	T256D H285D A378V
	FcMut224	T256D H285D T307R Q311V
	FcMut225	T256D H285D N286D T307R
	FcMut226	T256D H285D N286D T307R Q311V
	FcMut227	T256D H285D N286D T307R A378V
	FcMut228	T256D N286D T307R Q311V A378V
	FcMut229	T256D H285D T307R Q311V A378V
	FcMut230	V308P Q311V A378V
	FcMut231	T256D V308P A378V
	FcMut232	T256D V308P Q311V
	FcMut233	T256D E258T V308P
	FcMut234	H285D V308P Q311V
	FcMut242	E258T
	FcMut243	N286D
	FcMut244	Q311V
	YTE	M252Y S254T T256E

[0242] 在一个实施方式中,Fc区包含FcMut001。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut002。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut003。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut004。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut005。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut006。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut007。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut008。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut009。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut010。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut011。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut012。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut013。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut014。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut015。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut016。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut017。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut018。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut019。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut020。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut021。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut022。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut023。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut024。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut026。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut027。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut028。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut029。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut030。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut031。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut032。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut033。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut034。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut035。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut036。在一个实施方式中,

[0243] Fc区包含FcMut037。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut038。在一个实施方式中,

[0244] Fc区包含FcMut039。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut040。在一个实施方式中,

[0245] Fc区包含FcMut041。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut042。在一个实施方式中,

[0246] Fc区包含FcMut043。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut044。在一个实施方式中,

[0247] Fc区包含FcMut045。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut046。在一个实施方式中,

[0248] Fc区包含FcMut047。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut048。在一个实施方式中,

[0249] Fc区包含FcMut049。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut050。在一个实施方式中,

[0250] Fc区包含FcMut051。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut052。在一个实施方式中,





[0329] Fc区包含FcMut223。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut224。在一个实施方式中,  
[0330] Fc区包含FcMut225。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut226。在一个实施方式中,  
[0331] Fc区包含FcMut227。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut228。在一个实施方式中,  
[0332] Fc区包含FcMut229。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut230。在一个实施方式中,  
[0333] Fc区包含FcMut231。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut232。在一个实施方式中,  
[0334] Fc区包含FcMut233。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut234。在一个实施方式中,  
[0335] Fc区包含FcMut242。在一个实施方式中,Fc区包含FcMut243。在一个实施方式中,  
Fc区包含FcMut244。

[0336] 在一个实施方式中,Fc区包含一种或多种(例如2、3、4、5、6、7、8、9或更多种)选自下组的突变或其突变组合:FcMut045、FcMut171、FcMut183、FcMut186、FcMut190、FcMut197、FcMut213、FcMut215、FcMut216、FcMut219、FcMut222、FcMut223、FcMut224、FcMut226、FcMut227、FcMut228或FcMut229。在一个实施方式中,Fc区包含一个或多个(例如2、3、4、5、6个或全部)选自下组的突变或其突变组合:FcMut045、FcMut183、FcMut197、FcMut213、FcMut215、FcMut228或FcMut156。在另一个实施方式中,Fc区包含一个或多个(例如2、3、4、5或全部)选自下组的突变或其突变组合:FcMut183、FcMut197、FcMut213、FcMut215、FcMut228或FcMut229。

[0337] 在一个实施方式中,Fc区不包含一个或多个(例如2、3、4个或全部)选自下组的突变或其突变组合:FcMut018、FcMut021、FcMut050、FcMut102或YTE。在一个实施方式中,Fc区包含一个或多个(例如2、3、4个或全部)选自下组的突变或其突变组合:FcMut018、FcMut021、FcMut050、FcMut102或YTE,以及表1所述一个或多个其他突变或突变组合。

[0338] 在一个实施方式中,Fc区包含一个或多个(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多个)表1所述的突变或突变组合,这些突变或突变组合产生了如本文所述的协同效果(例如结合亲和力或循环半衰期)。

[0339] 在一个实施方式中,Fc区包含发生在选自下组残基中的一个或多个(例如2、3、4、5、6、7种或全部)突变:T256、H285、N286、T307、Q311、N315或A378。在一个实施方式中,Fc区包含选自下组中一个或多个(例如2、3、4、5、6或7个)突变:T256D、H285N、N286D、T307Q、Q311V、N315D或A378V。

[0340] 在一个实施方式中,Fc区包含:改善半衰期的突变、能够干扰Fc效应功能的突变或这两者。在一个实施方式中,Fc区包含如本文所述的一个或多个突变或突变组合,例如选自下组的突变或突变组合:M252W、V308F/N434Y、R255Y、P257L/N434Y、V308F、P257N/M252Y、G385N、P257N/V308Y、N434Y、M252Y/S254T/T256E(“YTE”)、M428L/N434S(“LS”)、或其任何组合。或者或另外,在一个实施方式中,Fc区包含:(a)选自下组的一个或多个(例如2、3、4、5个或全部)突变组合:T256D/Q311V/A378V、H285N/T307Q/N315D、H285D/T307Q/A378V、T307Q/Q311V/A378V、T256D/N286D/T307R/Q311V/A378V或T256D/T307R/Q311V;(b)能够干扰Fc效应功能的突变或突变组合,例如L234A/L235A(也称为“LALA”突变);或(c)(a)和(b)。

[0341] 在一个实施方式中,Fc包含突变T256D/Q311V/A378V以及能够干扰Fc效应功能的突变或突变组合,例如L234A/L235A。在一个实施方式中,Fc包含突变H285N/T307Q/N315D以及能够干扰Fc效应功能的突变或突变组合,例如L234A/L235A。在一个实施方式中,Fc包含突变H285D/T307Q/A378V以及能够干扰Fc效应功能的突变或突变组合,例如L234A/L235A。

在一个实施方式中, Fc包含突变T307Q/Q311V/A378V以及能够干扰Fc效应功能的突变或突变组合, 例如L234A/L235A。在一个实施方式中, Fc包含突变T256D/N286D/T307R/Q311V/A378V以及能够干扰Fc效应功能的突变或突变组合, 例如L234A/L235A。在一个实施方式中, Fc包含突变T256D/T307R/Q311V以及能够干扰Fc效应功能的突变或突变组合, 例如L234A/L235A。

[0342] 参比Fc区氨基酸序列(包括本文所用的编号)如下所示(例如为了确定本文所述的突变位点)。CH2结构域用下划线标注; 铰链区序列为斜体, CH3结构域序列为粗体。

```

118  ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
175  QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCTPPCPA
232  PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
[0343] 287  AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTIISKAKGQP
344  REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
401  DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 1)

```

[0344] 本文所述的任何延长半衰期的突变可与能够增强或干扰Fc效应功能的任何Fc突变进行组合。

[0345] Fc区可结合多种细胞受体(例如Fc受体)以及补体蛋白。Fc区也可介导抗体分子的不同生理效应, 例如检测经调理颗粒; 细胞裂解; 肥大细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞的脱粒; 以及其他过程。

[0346] 存在若干类不同的Fc受体(FcR), 可基于它们所识别的抗体类型对其进行分类。

[0347] Fc $\gamma$ 受体(Fc $\gamma$ R)属于免疫球蛋白超家族, 且涉及例如诱导受调理微生物的吞噬。该家族包括多个成员: Fc $\gamma$ RI(CD64)、Fc $\gamma$ RIIA(CD32)、Fc $\gamma$ RIIB(CD32)、Fc $\gamma$ RIIIA(CD16a)、Fc $\gamma$ RIIIB(CD16b), 由于它们不同的分子结构, 它们的抗体亲和力不同。例如, Fc $\gamma$ RI与IgG的结合强于Fc $\gamma$ R II或Fc $\gamma$ RIII与IgG的结合。Fc $\gamma$ RI还具有包含三个免疫球蛋白(Ig)样结构域的胞外部分, 比Fc $\gamma$ R II或Fc $\gamma$ RIII多一个结构域。该性质使得Fc $\gamma$ RI结合单独的IgG分子(或单体), 但是总体上, Fc $\gamma$ 受体需要以免疫复合物形式结合多个IgG分子从而被活化。

[0348] Fc $\gamma$ 受体对IgG的亲和力不同, 且不同的IgG亚类对各种Fc $\gamma$ 受体具有独特的亲和性。这些相互作用可被IgG某些位点的聚糖(寡糖)进一步调整。例如, 通过产生立体掩蔽, 含有岩藻糖的CH2-84.4聚糖降低了IgG与Fc $\gamma$ RIIIA的亲和力, 而不含半乳糖且末端为GlcNAc部分的G0聚糖则提高对Fc $\gamma$ RIIIA的亲和力(Maverakis等, (2015) Journal of Autoimmunity 57(6):1-13)。

[0349] 新生儿Fc受体(FcRn)在多种细胞类型上表达, 且在结构上与I型MHC相似。该受体也结合IgG, 且参与该抗体的保留(Zhu等, (2001). Journal of Immunology 166(5):3266-76.)。FcRn还参与IgG通过胎盘从母亲转移到胎儿, 或通过母乳从母亲转移到受乳儿。该受体还在IgG血清水平的体内平衡中起作用。

[0350] Fc $\alpha$ RI(或CD89)属于Fc $\alpha$ R亚群。在中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞(包括Kupffer细胞)和树突状细胞表面上存在Fc $\alpha$ RI。其包含两个胞外Ig样结构域, 且是免疫球蛋白超家族和多链免疫识别受体(MIRR)家族成员。其通过与两个Fc $\gamma$ 信号转导链相关而发出信号。

[0351] Fc- $\alpha/\mu$ 受体 (Fc $\alpha/\mu$ R) 是I型跨膜蛋白。其能够结合IgA, 虽然其对IgM的亲合力更高 (Shibuya和Honda (2006) Springer Seminars in Immunopathology 28(4):377-82)。该Fc受体在其胞外部分具有一个Ig样结构域, 由此也是免疫球蛋白超家族成员。

[0352] 有两种已知类型的Fc $\epsilon$ R。高亲和力受体Fc $\epsilon$ RI是免疫球蛋白超家族成员 (其具有两个Ig样结构域)。Fc $\epsilon$ RI存在于表皮朗格汉斯细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞和嗜碱性粒细胞上。该受体可在控制过敏反应中起作用。Fc $\epsilon$ RI也表达于抗体递呈细胞上, 并控制免疫介质 (例如促炎细胞因子) 的产生 (von Bubnoff等, (2003) Clinical and Experimental Dermatology 28(2):184-7)。低亲和力受体Fc $\epsilon$ R II (CD23) 是C型凝集素。Fc $\epsilon$ R II作为膜结合或可溶性受体具有多种功能。其还可控制B细胞生长和分化, 并阻断嗜酸性粒细胞、单核细胞和嗜碱性粒细胞结合IgE (Kikutani等, (1989) Ciba Foundation Symposium 147:23-31)。

[0353] 在一个实施方式中, 可工程化改造Fc区以使其包含抗原结合位点, 从而产生Fcab片段 (Wozniak-Knopp等, (2010) Protein Eng Des 23(4):289-297)。可通过Fc区交换将Fcab片段插入全长免疫球蛋白中, 由此获得双特异性抗体 (包含具有不同结合位点的Fcab区和Fab区)。

[0354] FcRn的结合和循环可如下所阐述。例如, IgG和白蛋白通过胞饮作用被内化到血管内皮细胞中。内涵体的pH为6.0, 有助于与膜结合FcRn关联。可通过如下两种途径中的一种加工内涵体的内容物: 循环回顶端细胞膜, 或者从顶端转胞吞至基底外侧。不与FcRn关联的IgG被溶酶体降解。

[0355] 虽然不希望囿于理论, 但据信Fc介导了FcRn与IgG的相互作用。Fc与FcRn的结合是pH特异性的, 例如在pH 7.4时无明显结合, 而在酸性环境下结合强烈。与IgG1分子复合的FcRn的结构如图1所示。各FcRn分子通常结合Fc单体。在一个实施方式中, Fab结构域也可影响IgG与FcRn的结合, 例如对IgG的FcRn亲和力有不利影响或没有影响。

[0356] 对Fc区进行工程化改造以提高多肽的半衰期时, 存在多方面的考虑。例如, 延长抗体分子或融合蛋白的半衰期以及有效再循环通常需要pH特异性亲和力改善 (例如仅在内涵体的低pH下)。FcRn结合于Fc区CH2和CH3结构域之间的接头区附近。对该接头的修饰可影响Fc与Fc $\gamma$ 受体的接合。Fc区的修饰可影响多肽的热稳定性和聚集性能。

[0357] FcRn结合优化: 减小对其他效应功能的影响

[0358] 在一个实施方式中, 本文所述的多肽 (例如抗体分子或融合蛋白) 具有相同的亲和功能, 或效应功能 (例如如本文所述的效应功能) 基本不变 (例如降低10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%以上)。在一个实施方式中, 效应功能与Fc区和FcRn的结合无关。

[0359] 待突变氨基酸残基的选择可至少部分基于Fc区上一个或多个结合位点的结构或功能性能。这些结合位点包括但不限于: 蛋白A结合位点、C1q结合位点、Fc $\gamma$ RI结合位点、Fc $\gamma$ R IIa结合位点、Fc $\gamma$ R IIIa结合位点或FcRn结合位点, 例如如图2所示。结合位点也可包括TRIM21结合位点, 例如选自IgG环308-316、环252-256或环429-436的一个或多个残基。在一个实施方式中, CH2和CH3结构域之间的接头区可影响CH2结构域的动力学 (其对Fc $\gamma$ R结合有重大影响)。

[0360] FcRn的pH特异性接合的结构基础

[0361] 不希望囿于理论,但据信内涵体的低pH导致CH2和CH3结构域上表面组氨酸质子化。例如,CH2上H310残基和/或CH3上H433残基的质子化对于FcRn接合非常重要,例如在低pH下(例如在pH6.0下)。质子化还可导致该区域构象动力学表现的变化,如与溶剂或配体分子结合有关的、更好地暴露或掩蔽接头区。因此,在一个实施方式中,多肽(例如抗体分子或融合蛋白)包含残基H310中的突变、残基H433中的突变或这两者。也可使与残基H310和/或H433相邻的一个或多个残基突变。多肽还可包含补偿性或有益突变,例如该突变对于前述突变构成补偿或增益从而例如降低突变的不良结果(例如极性之于非极性、带电之于不带电、正电荷(碱性)之于负电荷(酸性)、或疏水性之于亲水性)。例如,P247D可为补偿性或有益突变。

[0362] 在一个实施方式中,组氨酸的质子化可导致额外的构象变化,包括例如接头/CH2/CH3界面残基的移动/替换。已在不同pH下结晶了Fc片段的晶体结构体。如图3所示,对pH6.5(青色)和5.0(绿色)结晶的两种高分辨率Fc片段晶体结构的分析显示了潜在差异。

[0363] Fc-FcRn相互作用界面的作图

[0364] 在一个实施方式中,本文所述的多肽(例如抗体分子或融合蛋白)包含能够改变Fc区与FcRn之间相互作用的突变。在一个实施方式中,突变的选择至少部分基于Fc-FcRn相互作用界面的结构特征。

[0365] 在一个实施方式中,免疫球蛋白单体的Fc区的结构可如图4所示。如图4所示,黑色虚线表示Fc-FcRn相互作用界面。该结构包括FcRn接触残基和FcRn亲和力增强性Fc残基,例如如前所述。分别位于CH2和CH3结构域的残基H310和H435主要负责pH依赖性Fc-FcRn相互作用。在一个实施方式中,FcRn在Fc区的CH2和CH3结构域之间结合Fc区。在另一个实施方式中,Fc-FcRn结合位点跨Fc单体CH2和CH3结构域。

[0366] Fc-FcRn接合网路图提供了对氨基酸共取代的深入理解

[0367] 在一个实施方式中,本文所述的多肽(例如抗体分子或融合蛋白)包含能够改变Fc区与FcRn之间相互作用的多个突变。在一个实施方式中,突变的选择至少部分基于Fc-FcRn相互作用的网路图。

[0368] 不希望囿于理论,据信在一个实施方式中,残基H310在与FcRn的接合中起核心作用,例如通过对Fc-FcRn复合物的网络分析确定。如图5所示,残基H310与多种其他高度网络化的残基高度互联。在一个实施方式中,H310集群及其邻近(相连的结点)的突变能强化H310网络。子网络分析提示了有利于FcRn相互作用的协同突变,其对其他Fc残基的影响减弱或最小。

[0369] 优化FcRn结合的设计考量

[0370] 在一个实施方式中,可设计本文所述的多肽(例如抗体分子或融合蛋白)以优化Fc-FcRn结合。

[0371] 在一个实施方式中,在Fc区中具有突变的多肽与参比多肽(例如不含该突变则相同的多肽)相比,pH特异性亲和力增强。在一个实施方式中,可通过提高范德华相互作用来增强亲和力。在一个实施方式中,亲和力增强不是通过引入氢键和/或静电相互作用实现的。在一个实施方式中,突变不改变CH2和CH3结构域间的接头区构象或对其干扰减弱或最小。在一个实施方式中,多肽包含跨两个结构域(四个象限)的多个突变。在一个实施方式中,多肽不包含表面上的大簇的疏水或芳族残基。

[0372] 在一个实施方式中,多肽包含(例如在酸性pH下)增强Fc区和FcRn之间相互作用或减小对FcRn的解离常数( $K_d$ )的突变。在一个实施方式中,多肽包含(例如在酸性pH下)减小对FcRn的解离速率( $K_{off}$ )的突变。在一个实施方式中,多肽包含(例如在酸性pH下)提高对FcRn的结合速率( $K_{on}$ )的突变。在一个实施方式中,多肽包含(例如在酸性pH下)减小对FcRn的解离速率( $K_{off}$ )并提高对FcRn的结合速率( $K_{on}$ )的突变。在一个实施方式中,多肽包含(例如在酸性pH下)减小对FcRn的解离速率( $K_{off}$ )且并不影响或并不显著影响对FcRn的结合速率( $K_{on}$ )的突变。不希望囿于理论,据信在一个实施方式中,对FcRn解离常数 $K_d$ 的减小主要是由于对FcRn解离速率( $K_{off}$ )的减小,而不是结合速率( $K_{on}$ )的提高。

[0373] 试验评价:从多维通过不同测试平台评估Fc突变

[0374] 可采用多种方法评估本文所述的多肽(例如抗体分子或融合蛋白)。可通过例如基于Octet的测试、竞争性测试(例如流式细胞术)或表面等离子体共振(SPR)等来测定pH特异性Fc-FcRn结合(例如在pH6.0和pH7.4下的结合)。

[0375] 可进行生物物理学表征(例如热稳定性、聚集或表达)。例如,可通过SYPRO Orange来测定热稳定性。例如,可通过SEC或RP-HPLC来测定聚集。

[0376] 可测试例如涉及Fc $\gamma$ RI(例如通过基于Octet的测试)、Fc $\gamma$ RIIIa、Fc $\gamma$ RIIa、Fc $\gamma$ RIIb(例如通过ELISA)、C1q、ADCC或CDC的效应功能。

[0377] 可测试含三分基序蛋白21(Tripartite Motif-Containing Protein, TRIM21)的结合。TRIM21是结合IgG的Fc的胞质受体。TRIM21在介导Fc结合病原体(如病毒、细菌和真菌)胞内识别和中和中起作用。例如,TRIM21在非包膜病毒的中和中起到重要作用(McEwan等.Nat Immunol.2013;14(4):327-36)。其作用还进一步包括引导免疫复合物进行降解(McEwan等.Proc Natl Acad Sci U S A.2017;114(3):574-579)。TRIM21结合抗体Fc区的CH2:CH3界面,该界面与FcRn结合位点重叠。提高FcRn亲和力的某些Fc突变会降低TRIM21亲和力(Foss等.J Immunol.2016;196(8):3452-3459)。关键接触残基包括例如第253、433、434和435位。LS变体(M428L/N434S)在第434位包含突变,已显示N434S突变使得TRIM21结合降低10倍。TRIM21介导的中和作用被称为抗体依赖性胞内中和作用(ADIN)。

[0378] 可测试黏膜摄入。FcRn将IgG输送通过不同的细胞屏障,如衬在小肠和胚泡表面内的黏膜上皮。改变FcRn结合提供了增强黏膜区域化反应由此赋予免疫保护的黏膜的途径。

[0379] 可例如采用转基因小鼠(例如获自Jackson实验室的Tg32和Tg276小鼠)或在灵长类动物(例如食蟹猴)中测定多肽的半衰期。

[0380] 以下更详细描述了示例性测试方法:

[0381] 1.FcRn结合测试

[0382] a.采用固定化于NiNTA生物传感器的FcRn的Octet测试

[0383] 采用6 $\times$ 组氨酸标签(SEQ ID NO:2)将FcRn固定于NiNTA生物传感器,以便后续在酸性条件(pH6.0)和生理条件(pH7.4)考察与IgG分子的结合。该策略此前已有记载(1),且该方法详述了对所引用方案的调整。简而言之,将5 $\mu$ g/mL的重组人FcRn加载到NiNTA生物传感器上180秒。在1 $\times$ PBS pH 6.0中进行60秒的基线步骤,然后使加载有FcRn的尖端(tip)接触浓度为250nM的IgG(37.5 $\mu$ g/mL)60秒,随后在PBS pH 6.0中解离60秒,并在PBS pH 7.4中再解离30秒。测试完成后,使用ForteBio Octet软件对pH6.0的亲合常数( $K_D$ )进行定量评估,并通过绘制随时间的响应速率进行定性评估,由此显示pH6.0下IgG与FcRn的结合以及

随后在pH 6.0和pH 7.4下的解离。

[0384] b. 采用固定化于抗CH1生物传感器的IgG的Octet测试

[0385] 将IgG固定于抗CH1生物传感器以便后续在酸性条件 (pH6.0) 和生理条件 (pH7.4) 下考察与FcRn分子的结合。之前已描述了该策略此前已有记载(2), 且该方法详述了对所引用方案的调整。简而言之, 将5 $\mu$ g/mL纯化的IgG加载到抗CH1生物传感器上180秒。在1 $\times$ PBS pH 6.0中进行60秒的基线步骤, 然后使加载有IgG的尖端 (tip) 接触浓度为50 $\mu$ g/mL的FcRn 60秒, 随后在PBS pH 6.0中解离60秒, 并在PBS pH7.4中再解离30秒。测试完成后, 使用ForteBio Octet软件对pH6.0的亲合常数 ( $K_D$ ) 进行定量评估, 并通过绘制随时间的响应速率进行定性评估, 由此显示pH6.0下IgG与FcRn的结合以及随后在pH 6.0和pH 7.4下的结合。

[0386] c. 基于细胞的试验

[0387] 基于细胞的测试也用于分析FcRn和IgG的相互作用(参考:PMID:23384837)。细胞表面上膜锚定FcRn的表达密切表示FcRn的生理学呈递, 其中质膜和分子取向影响FcRn和IgG的相互作用。本文所用的该测试是竞争性试验, 其中测试目标IgG与荧光标记的高亲和力Fc竞争剂 (Fc-A488) 竞争性结合细胞的能力。将表达全长膜结合FcRn异二聚体的Expi293细胞与以下混合物一起孵育, 所述混合物为浓度不变的Fc-A488 (0.5 $\mu$ g/ml) 与多种浓度目标IgG (0.001-10 $\mu$ M) 的混合物。通过流式细胞术检测细胞结合荧光。FcRn结合性能改善的IgG能以更低的IgG浓度竞争替下Fc竞争物。该测试有效、线性和特异, 且能用于显示IgG/Fc变体与FcRn相应结合的差异。

[0388] 2. 热稳定性测试

[0389] 通过差示扫描荧光法 (DSF) 评估IgG变体的稳定性, 使用SYPRO® Orange染料监测热应激下的蛋白质解折叠。SYPRO® Orange是一种非特异性结合疏水表面的荧光染料, 其荧光在水性环境中被猝灭。随着温度升高, 蛋白质开始失去其二级结构并解折叠, 由此暴露出其疏水核心残基, 从而使染料发出荧光。在完全解折叠时获得最大荧光信号, 其后蛋白质开始聚集, 减少疏水残基的暴露, 由此减小荧光信号。在蛋白质天然状态和完全解折叠的中点处是蛋白质的转化温度或解链温度 ( $T_m$ ), 该温度可用于直接比较蛋白质结构或形成条件的相对稳定性。

[0390] 在一个实施方式中, 除了FcRn结合以外的其他因素也会影响所观察到的多肽 (例如抗体分子或融合蛋白) 半衰期。这些因素可包括例如聚集倾向、非特异性结合、稳定性或Fab组成。

[0391] 在一个实施方式中, 引入非Fc区突变, 以例如在次优模板架构内 (in the context of) 提供显著改善的半衰期。例如具有较低起始半衰期的多肽 (例如抗体分子或融合蛋白) 可指示存在次优性质。工程化改造的尝试也可集中在减轻半衰期较低的根本原因, 例如, 维持必要的结合特征 (例如, 亲和力和/或特异性), 或获得合适的可开发性特征 (例如, 稳定性、溶解度、表达水平或聚集)。在一个实施方式中, 对具有次优生物物理学性质的多肽 (例如抗体分子或融合蛋白) 进行额外的工程化改造以实现半衰期延长最大化。

[0392] 药代动力学

[0393] 本文所述的多肽 (例如抗体分子或融合蛋白) 可具有一种或多种按需药代动力学特性, 例如一种或多种 (例如2、3、4、5或更多种) 本文所述的药代动力学特性。

[0394] 药代动力学(PK)可用于确定物质给予活体后的命运。PK研究可用于分析药物代谢和鉴定药物从其给予之时起到其完全从体内清除之时的命运。药代动力学描述了例如:机体如何通过吸收和分布来作用于给药后的特定药物,物质在体内的化学变化(例如通过代谢酶,如细胞色素P450或葡萄糖醛酸转移酶),或者药物代谢物的效果和排泄途径。药物的药代动力学特性可被诸如给药位点和给药剂量等会影响吸收速率的因素影响。可结合药效学(例如对药物生物化学和生理学效果的研究)分析药代动力学。

[0395] 已开发了用于药代动力学的许多不同的模型。例如,可通过非房室或房室法来进行药代动力学建模。

[0396] 非房室法通过评估浓度-时间图的曲线下面积来评估药物暴露(exposure)。非房室PK分析高度依赖于对总药物暴露的评估。总药物暴露常通过曲线下面积(AUC)法进行评估,最常用的方法为梯形法则(数值积分)。由于对梯形法则中“x”长度的依赖性,面积估值高度依赖于血液/血浆取样时间安排。即,时间点越接近,梯形所反映的更接近于浓度-时间曲线的真实形状。

[0397] 房室法采用动力学模型评估浓度-时间图。房室PK分析采用动力学模型来描述和预测浓度-时间曲线。PK房室模型常与用于其他学科的动力学模型(如化学动力学和热力学)相似。房室分析相对于某些非房室分析的优点在于在任何时间预测浓度的能力。基于曲线剥离的无房室建模不受该限制影响。最简单的PK房室模型是用于静脉推注给药和一级清除的一房室PK模型。更复杂的PK模型(例如PBPK模型)依赖于采用生理学信息来简化开发和验证。

[0398] 在单房室模型中,多种相关因素(例如剂量、血浆浓度或清除)之间的关系图给出了直线或直线逼近(即线性药代动力学)。药物若要有效,其必须能够从血浆中快速移动到其他体液和组织。

[0399] 在多房室模型中,多种因素间的非线性关系图由曲线来表示,然后可通过计算不同曲线下面积的大小来发现因素之间的关系。用于非线性药代动力学的模型很大程度上基于米氏动力学(Michaelis-Menten kinetics)。

[0400] 模型被分为多个房室通常被称为ADME方案(如果包括释放且作为吸收之外的单独步骤,则也称为LADME):释放(例如,从药制剂中释放药物的过程);吸收(例如,物质进入血液循环的过程);分布(例如,遍及体内液体和器官的物质分散或散布);代谢(或生物转化或失活)(例如,机体识别外来物质的存在以及将亲本化合物不可逆地转化为子代谢物);以及排泄(例如,从体内除去该物质)。在很少情况下,某些药物不可逆地积聚于身体组织。也可将代谢和排泄这两个阶段合称为清除。

[0401] 所有这些参数均可通过具有相应图形代表的数学公式来表示。采用这些模型能够理解分子的特征,以及在考虑到涉及特定药物某些基本特征(如其在机体中的酸解离常数(pKa)、生物利用度和溶解性、吸收能力和分布)时该特定药物将如何表现。

[0402] 关于药物的模型输出可用于工业中(例如,在设计仿制药时计算生物等效性)或药代动力学概念的临床应用中。临床药代动力学为人类健康专家以及在兽医学中提供了有效且高效用药的众多性能指引。

[0403] 示例性的药代动力学性能包括但不限于:剂量(例如,给药量)、给药间隔(例如,按剂量给药之间的时间)、 $C_{\max}$ (例如,给药后的血浆浓度峰)、 $t_{\max}$ (例如,达到 $C_{\max}$ 的时间)、 $C_{\min}$

(例如,给予下一剂前药物所达到的最低浓度)、分布容积(例如,药物分布的表观容积,例如,它将药物浓度与体内药物量关联)、浓度(例如,给定体积血浆中的药物量)、半衰期或清除半衰期(例如,药物浓度达到其原值一半所需的时间)、清除速率常数(例如,药物从体内移除的速率)、输注速率(例如,与消除平衡所需的输注速率)、曲线下面积(例如,浓度-时间曲线的积分(例如,单剂后或稳态中)、廓清率(例如,每单位时间中清除了药物的血浆体积)、生物利用度(例如,药物的系统性利用分数)、或波动(例如,稳态时一个剂量间期内的峰谷波动)。

[0404] 药代动力学特征可用各种方法来测定。例如,可用生物分析法来构建浓度-时间谱。可用化学技术来测定生物基质(例如血浆)中的药物浓度。合适的生物分析法应具有选择性和敏感性。例如,可用小规模热泳来量化生物基质/液体如何影响药物与其靶标的亲和力(Baaske等(2010). *Angew. Chem. Int. Ed.* 49(12):1-5; Wienken等.(2010). *Nature Communications* 1(7):100)。

[0405] 也可采用质谱法研究药代动力学特征(例如在需要以高灵敏度观察低剂量和长时程后的浓度的情况下)。用于该应用的常规仪器是采用三重四极杆质谱仪的LC-MS。可用串联质谱法来提高特异性。可用标准曲线和内标来定量样品中的药物。样本代表了药物被给予、然后代谢或从体内清除的不同时间点。将给药前采集的空白样本用于确定背景以及确保此类复杂样本矩阵的数据完整性。标准曲线可为线性,或用更复杂的函数(如二次方程式)进行曲线拟合,这是由于大部分质谱仪在大浓度范围内的响应都不完全线性(Hsieh和Korfmaier(2006) *Current Drug Metabolism* 7(5):479-89; Covey等.(1986) *Anal. Chem.* 58(12):2453-60; Covey等.(1985). *Anal. Chem.* 57(2):474-81)。

[0406] 示例性抗体分子

[0407] 本文所述的方法可用于工程化改造各种抗体分子,例如包含Fc区的任何抗体分子。

[0408] 在一个实施方式中,抗体分子是嵌合抗体分子、人源化抗体分子或人抗体分子。

[0409] 在一个实施方式中,抗体分子是完整单克隆抗体。在另一个实施方式中,抗体分子是不含Fc区的抗体分子(例如如本文所述的抗原结合片段)的含Fc区衍生物。示例性抗原结合片段包括但不限于:Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、scFv、二-scFv或sdAb。在另一实施方式中,抗体分子是双特异性单克隆抗体,例如三功能抗体(3funct)或双特异性T细胞接合物(BiTE)。

[0410] 在一个实施方式中,抗体分子靶向与感染性疾病(例如病毒感染、细菌感染或真菌感染)相关的分子(例如蛋白质)。在另一个实施方式中,抗体分子靶向与癌症相关的分子(例如蛋白质)或细胞。在另一个实施方式中,抗体分子靶向与免疫病症相关的分子(例如蛋白质)或细胞。在另一个实施方式中,抗体分子靶向与心血管病症相关的分子(例如蛋白质)或细胞。在另一个实施方式中,抗体分子靶向与代谢病症相关的分子(例如蛋白质)或细胞。在另一个实施方式中,抗体分子靶向与神经病症相关的分子(例如蛋白质)或细胞。

[0411] 示例性的抗体分子包括但不限于靶向如下所述分子或细胞中的一种或多种(例如两种)的抗体分子: $\beta$ -淀粉体、4-1BB、5AC、5T4、ACF9、ACFIX、激活素受体样激酶1、ACVR2B、腺癌抗原、AGS-22M6、甲胎蛋白、血管生成素2、血管生成素3、炭疽毒素的保护性抗原、AOC3(VAP-1)、B7-H3、炭疽病炭疽杆菌(*Bacillus anthracis anthrax*)、BAFF、B-淋巴细胞、C242抗原、C5、CA-125(人造)、降钙素、犬(*canis lupus familiaris*) IL31、碳酸酐酶9(CA-IX)、

心肌肌球蛋白、CCL11 (嗜酸性粒细胞趋化因子-1)、CCR2、CCR4、CCR5、CD11、CD18、CD125、CD140a、CD147 (基础免疫球蛋白)、CD15、CD152、CD154 (CD40L)、CD19、CD2、CD20、CD200、CD22、CD221、CD23 (IgE受体)、CD25 (IL-2受体的 $\alpha$ 链)、CD27、CD274、CD276、CD28、CD3、CD3 $\epsilon$ 、CD30 (TNFRSF8)、CD33、CD37、CD38 (循环ADP核糖水解酶)、CD4、CD40、CD40配体、CD41 (整合素 $\alpha$ -IIb)、CD44 v6、CD5、CD51、CD52、CD56、CD6、CD70、CD74、CD79B、CD80、CEA、CEA相关抗原、CFD、CGRP、ch4D5、CLDN18.2、艰难梭菌 (*Clostridium difficile*)、凝集因子A、凝血因子III、CSF1R、CSF2、CTGF、CTLA-4、4型C-X-C趋化因子受体、巨细胞病毒、巨细胞病毒糖蛋白B、达比加群 (dabigatran)、DLL3、DLL4、DPP4、DR5、1型大肠杆菌 (*E. coli*) 志贺毒素、2型大肠杆菌 (*E. coli*) 志贺毒素、EGFL7、EGFR、内皮素、内毒素、EpCAM、肝配蛋白受体A3、上皮唾液粘蛋白 (episialin)、ERBB3、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、呼吸道合胞病毒F蛋白、FAP、纤维蛋白fibrin II $\beta$ 链、纤连蛋白外结构域-B、叶酸水解酶、叶酸受体1、叶酸受体 $\alpha$ 、卷曲受体、神经节苷脂GD2、GCGR、GD2、GD3神经节苷脂、GDF-8、磷脂酰肌醇聚糖3、GMCSF受体 $\alpha$ -链、GPNMB、生长分化因子8、GUCY2C、血凝素、乙肝表面抗原、乙肝病毒、HER1、HER2/neu、HER3、HGF、HHGFR、组蛋白复合物、HIV-1、HLA-DR、HNGF、Hsp90、人分散因子受体激酶、人TNF、人 $\beta$ 淀粉酶、ICAM-1 (CD54)、ICOSL、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IgE、IgE Fc区、IGF-1受体、IGF-I、IGHE、IL 20、IL-1、IL-12、IL-13、IL-17、IL-17A、IL-17F、IL-1 $\beta$ 、IL2、IL-22、IL-23、IL23A、IL31RA、IL-4、IL-4、IL-5、IL6、IL-6受体 (IL6R)、IL-9、ILGF2、甲流病毒血凝素 (HA)、胰岛素样生长因子I受体、整合素 $\alpha$ 4、整合素 $\alpha$ 4 $\beta$ 7、整合素 $\alpha$ 5 $\beta$ 1、整合素 $\alpha$ 7 $\beta$ 7、整合素 $\alpha$ IIb $\beta$ 3、整合素 $\alpha$ v $\beta$ 3、干扰素受体、干扰素 $\alpha$ / $\beta$ 受体、干扰素 $\gamma$ 诱导蛋白、ITGA2、ITGB2 (CD18)、血管舒缓素、KIR2D、KLRC1、路易斯Y抗原 (Lewis-Y antigen)、LFA-1 (CD11a)、LFA-1 (CD11a)、LINGO-1、脂磷壁酸、LOXL2、L-选择素 (CD62L)、LTA、MCP-1、间皮素、MIF、MS4A1、MSLN、MUC1、粘蛋白CanAg、髓磷脂相关糖蛋白、肌骨素、NCA-90 (粒细胞抗原)、NCA-90 (粒细胞抗原)、神经凋亡调节蛋白酶1 (neural apoptosis-regulated proteinase 1)、神经凋亡调节蛋白酶1、NGF、NGF、N-乙醇酰基神经氨酸 (N-glycolylneuraminic acid)、NOG0-A、Notch 1、Notch受体、NRP1、兔 (*Oryctolagus cuniculus*)、OX-40、oxLDL、PCSK9、PD-1、PD-1、PDCD1、PDGF-R $\alpha$ 、磷酸-钠共转运体、磷脂酰丝氨酸、血小板衍生生长因子受体 $\beta$ 、前列腺癌细胞、绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、III型绿脓假单胞菌分泌系统、狂犬病病毒糖蛋白、狂犬病病毒糖蛋白、RANKL、呼吸道合胞病毒、呼吸道合胞病毒、RHD、猕猴因子 (Rhesus factor)、猕猴因子、RON、RTN4、硬化蛋白、SDC1、选择素P、SLAMF7、SOST、鞘氨醇-1-磷酸、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、STEAP1、TAG-72、T细胞受体、TEM1、腱生蛋白C、TFPI、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2、TGF- $\beta$ 、TNFR超家族成员4、TNF- $\alpha$ 、TRAIL-R1、TRAIL-R2、TSLP、肿瘤抗原CTAA16.88、MUC1肿瘤特异性糖基化、肿瘤相关钙信号转导蛋白2、TWEAK受体、TYRP1 (糖蛋白75)、VEGFA、VEGFR-1、VEGFR2、波形蛋白或VWF。

[0412] 示例性的抗体分子包括但不限于靶向如下病原体 (例如细菌、病毒或真菌) 中一种或多种 (例如两种) 的抗体分子: 戈氏放线菌 (*Actinomyces gerencseriae*)、以色列放线菌 (*Actinomyces israelii*)、放线菌瘤属物种 (*Actinomycetoma species*)、甲病毒 (Alphavirus)、吞噬细胞无形体 (*Anaplasma phagocytophilum*)、无形体种 (*Anaplasma species*)、巴西钩虫 (*Ancylostoma braziliense*)、十二指肠钩虫 (*Ancylostoma duodenale*)、管圆线虫 (*Angiostrongylus*)、异尖线虫 (*Anisakis*)、溶血隐秘杆菌

(*Arcanobacterium haemolyticum*)、蛔虫 (*Ascaris lumbricoides*)、曲霉属物种 (*Aspergillus species*)、星状病毒科 (*Astroviridae family*)、巴贝西虫属物种 (*Babesia species*)、炭疽芽孢杆菌 (*Bacillus anthracis*)、蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、细菌性阴道炎微生物群 (*bacterial vaginosis microbiota*)、拟杆菌属物种 (*Bacteroides species*)、结肠小袋绦虫 (*Balantidium coli*)、巴尔通氏体 (*Bartonella*)、杆菌样巴尔通体 (*Bartonella bacilliformis*)、汉氏巴尔通体 (*Bartonella henselae*)、蛙壶菌 (*Batrachochytrium dendrobatidis*)、蛔虫属物种 (*Baylisascaris species*)、BK病毒 (*BK virus*)、芽囊原虫属物种 (*Blastocystis species*)、皮炎芽生菌 (*Blastomyces dermatitidis*)、百日咳包特菌 (*Bordetella pertussis*)、阿氏疏螺旋体 (*Borrelia afzelii*)、博氏疏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi*)、嘎氏疏螺旋体 (*Borrelia garinii*)、西北美回归热螺旋体 (*Borrelia hermsii*)、回归热螺旋体 (*Borrelia recurrentis*)、螺旋体物种 (*Borrelia species*)、布鲁斯菌物种 (*Brucella species*)、马来丝虫 (*Brugia malayi*)、本雅病毒科 (*Bunyaviridae family*)、洋葱伯克霍德菌 (*Burkholderia cepacia*)、鼻疽伯克霍德菌 (*Burkholderia mallei*)、假鼻疽伯克霍德菌 (*Burkholderia pseudomallei*)、伯克霍德菌属物种 (*Burkholderia species*)、杯状病毒科 (*Caliciviridae family*)、弯曲菌属物种 (*Campylobacter species*)、白色念珠菌 (*Candida albicans*)、念珠菌属物种 (*Candida species*)、嗜气毛细线虫 (*Capillaria aerophila*)、肝毛细线虫 (*Capillaria hepatica*)、菲律宾毛细线虫 (*Capillaria philippinensis*)、沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*)、沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*)、沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*)、肺炎衣原体 (*Chlamydophila pneumoniae*)、鸚鵡热衣原体 (*Chlamydophila psittaci*)、华支睾吸虫 (*Clonorchis sinensis*)、肉毒杆菌 (*Clostridium botulinum*)、艰难梭菌 (*Clostridium difficile*)、产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*)、产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*)、破伤风梭菌 (*Clostridium tetani*)、梭菌属物种 (*Clostridium species*)、粗球孢子菌 (*Coccidioides immitis*)、粗球孢子菌 (*Coccidioides immitis*)、波萨达斯球孢子菌 (*Coccidioides posadasii*)、波萨达斯球孢子菌 (*Coccidioides posadasii.*)、科罗拉多壁虱热病毒 (*Colorado tick fever virus (CTFV)*)、冠状病毒 (*coronaviruses*)、白喉棒状病毒 (*Corynebacterium diphtheriae*)、贝纳氏立克次体 (*Coxiella burnetii*)、A型柯萨奇病毒和肠病毒 (*Coxsackie A virus and Enterovirus71 (EV71)*)、克里米亚-刚果出血热 (*Crimean-Congo hemorrhagic fever virus*)、新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*)、隐孢子虫物种 (*Cryptosporidium species*)、环孢子虫 (*Cyclospora cayetanensis*)、巨细胞病毒 (*Cytomegalovirus*)、登革热病毒 (*Dengue viruses (DEN-1, DEN-2, DEN-3或DEN-4)*)、脆弱双核阿米巴变形虫 (*Dientamoeba fragilis*)、裂头绦虫 (*Diphyllobothrium*)、麦地那龙线虫 (*Dracunculus medinensis*)、埃博拉病毒 (*Ebolavirus (EBOV)*)、棘球绦虫 (*Echinococcus species*)、查菲埃立克体 (*Ehrlichia chaffeensis*)、尤温埃立克体 (*Ehrlichia ewingii*)、埃立克体属物种 (*Ehrlichia species*)、溶组织内阿米巴变形虫 (*Entamoeba histolytica*)、肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae family*)、蠕形住肠线虫 (*Enterobius vermicularis*)、肠球菌属物种 (*Enterococcus species*)、肠病毒属物种 (*Enterovirus species*)、肠道病毒 (*Enteroviruses*)、虫霉目 (*Entomophthorales order*) (虫霉病,

Entomophthoramyces)、絮状表皮癣菌(*Epidermophyton floccosum*)、EB病毒(Epstein-Barr Virus (EBV))、大肠杆菌0157:H7(*Escherichia coli* 0157:H7)、足分枝菌属物种(*Eumycetoma* species)、肝吸虫和巨大肝吸虫(*Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*)、布氏姜片虫(*Fasciolopsis buski*)、丝虫总科(*Filarioidea* superfamily)、黄病毒(*Flavivirus*)、裴氏着色霉(*Fonsecaea pedrosoi*)、土伦病法兰西斯氏菌(*Francisella tularensis*)、梭杆菌属物种(*Fusobacterium* species)、白地霉(*Geotrichum candidum*)、蓝氏贾第鞭毛虫(*Giardia lamblia*)、刚棘颚口线虫(*Gnathostoma hispidum*)、有棘颚口线虫(*Gnathostoma spinigerum*)、绿藻被甲栅藻(*Green algae Desmodesmus armatus*)、A群链球菌(Group A *Streptococcus*)、瓜纳里多病毒(*Guanarito virus*)、杜克雷嗜血杆菌(*Haemophilus ducreyi*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)、腹地病毒(*Heartland virus*)、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)、甲肝病毒(*Hepatitis A virus*)、乙肝病毒(*Hepatitis B virus*)、丙肝病毒(*Hepatitis C virus*)、丁肝病毒(*Hepatitis D Virus*)、戊肝病毒(*Hepatitis E virus*)、单纯疱疹病毒1和2(*Herpes simplex virus* 1 and 2 (HSV-1和HSV-2))、荚膜组织胞浆菌(*Histoplasma capsulatum*)、HIV(人免疫缺陷病毒, *Human immunodeficiency virus*)、黑酵母(*Hortaea werneckii*)、人博卡病毒(*Human bocavirus (HBoV)*)、人疱疹病毒6和7(*Human herpesvirus 6 (HHV-6)* and *Human herpesvirus 7 (HHV-7)*)、人偏肺病毒(*Human metapneumovirus (hMPV)*)、人乳头瘤病毒(*Human papillomavirus (HPV)*)、人副流感病毒(*Human parainfluenza viruses (HPIV)*)、缩小膜壳绦虫(*Hymenolepis diminuta*)、短膜壳绦虫(*Hymenolepis nana*)、贝氏等孢子球虫(*Isospora belli*)、JC病毒(*JC virus*)、胡宁病毒(*Junin virus*)、金格金氏杆菌(*Kingella kingae*)、肉芽肿克雷伯菌(*Klebsiella granulomatis*)、拉沙病毒(*Lassa virus*)、嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)、利什曼虫属物种(*Leishmania* species)、钩端螺旋体属物种(*Leptospira* species)、产单核李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(*Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV)*)、马秋波病毒(*Machupo virus*)、马拉色霉菌属物种(*Malassezia* species)、马尔堡病毒(*Marburg virus*)、麻疹病毒(*Measles virus*)、麻疹病毒(*Measles virus*)、横川后殖吸虫(*Metagonimus yokagawai*)、微孢子虫门(*Microsporidia* phylum)、中东呼吸综合症冠状病毒(*Middle East respiratory syndrome coronavirus*)、传染性软疣病毒(*Molluscum contagiosum virus (MCV)*)、猴痘病毒(*Monkeypox virus*)、毛霉菌目(*Mucorales* order (毛霉菌属, *Mucormycosis*))、腮腺炎病毒(*Mumps virus*)、麻风分枝杆菌(*Mycobacterium leprae*)、弥漫型麻风分枝杆菌(*Mycobacterium lepromatosis*)、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、溃疡分枝杆菌(*Mycobacterium ulcerans*)、肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*)、福氏内格里虫(*Naegleria fowleri*)、美洲板口线虫(*Necator americanus*)、淋病奈瑟氏菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、淋病奈瑟氏菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitidis*)、星形诺卡氏菌(*Nocardia asteroides*)、诺卡氏菌属物种(*Nocardia* species)、0111和0104:H4、蟠尾丝虫(*Onchocerca volvulus*)、猫肝吸虫(*Opisthorchis felinus*)、泰国肝吸虫(*Opisthorchis viverrini*)、正粘病毒科(*Orthomyxoviridae* family)、巴西副球孢子菌(*Paracoccidioides brasiliensis*)、卫氏并殖吸虫

(*Paragonimus westermani*)、并殖吸虫属物种(*Paragonimus species*)、寄生性二翅蝇幼虫(parasitic dipterous fly larvae)、细小病毒B19(Parvovirus B19)、巴斯德菌属物种(*Pasteurella species*)、头虱(*Pediculus humanus capitis*)、体虱(*Pediculus humanus corporis*)、阴虱(*Phthirus pubis*)、霍塔氏毛孢子菌(*Piedraia hortae*)、疟原虫属物种(*Plasmodium species*)、耶氏肺孢子菌(*Pneumocystis jirovecii*)、脊髓灰质炎病毒(Poliiovirus)、普氏菌属物种(*Prevotella species*)、PRNP、丙酸杆菌(*Propionibacterium propionicus*)、狂犬病毒(Rabies virus)、呼吸道合胞病毒(Respiratory syncytial virus (RSV))、希伯鼻孢子菌(*Rhinosporidium seeberi*)、鼻病毒(Rhinovirus)、鼻病毒(rhinoviruses)、立克次氏体(*Rickettsia*)、阿氏立克次氏体(*Rickettsia akari*)、普氏立克次氏体(*Rickettsia prowazekii*)、立氏立克次氏体(*Rickettsia rickettsii*)、伤寒立克次氏体(*Rickettsia typhi*)、立克次氏体属物种(*Rickettsia species*)、裂谷热病毒(Rift Valley fever virus)、轮状病毒(Rotavirus)、风疹病毒(Rubella virus)、萨比亚病毒(*Sabia*)、肠道沙门氏菌肠道亚种(*Salmonella enterica subsp. enterica*)、沙门氏菌属物种(*Salmonella species*)、疥癣螨(*Sarcoptes scabiei*)、SARS冠状病毒(SARS coronavirus)、血吸虫属物种(*Schistosoma species*)、伤寒型沙门氏菌(serovar typhi)、志贺氏菌属物种(*Shigella species*)、辛诺柏病毒(Sin Nombre virus)、申克氏孢子丝菌(*Sporothrix schenckii*)、葡萄球菌(*Staphylococcus*)、葡萄球菌属物种(*Staphylococcus species*)、葡萄球菌属物种(*Staphylococcus species*)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、粪小杆线虫(*Strongyloides stercoralis*)、猪肉绦虫(*Taenia solium*)、绦虫属物种(*Taenia species*)、犬弓蛔虫(*Toxocara canis*)、猫弓蛔虫(*Toxocara cati*)、鼠弓形虫(*Toxoplasma gondii*)、苍白密螺旋体(*Treponema pallidum*)、旋毛虫(*Trichinella spiralis*)、阴道毛滴虫(*Trichomonas vaginalis*)、须癣毛癣菌(*Trichophyton mentagrophytes*)、红色毛癣菌(*Trichophyton rubrum*)、红色毛癣菌(*Trichophyton rubrum*)、断发毛癣菌(*Trichophyton tonsurans*)、毛癣菌属物种(*Trichophyton species*)、白吉利毛孢子菌(*Trichosporon beigeli*)、鞭虫(*Trichuris trichiura*)、布氏锥虫(*Trypanosoma brucei*)、克鲁兹锥虫(*Trypanosoma cruzi*)、解脲脲原体(*Ureaplasma urealyticum*)、水痘带状疱疹病毒(*Varicella zoster virus (VZV)*)、主天花病毒(*Variola major*)、次天花病毒(*Variola minor*)、委内瑞拉马脑炎病毒(*Venezuelan equine encephalitis virus*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)、西尼罗病毒(West Nile virus)、班氏吴策线虫(*Wuchereria bancrofti*)、黄热病毒(Yellow fever virus)、小肠结肠耶氏菌(*Yersinia enterocolitica*)、鼠疫杆菌(*Yersinia pestis*)、假性结核耶氏菌(*Yersinia pseudotuberculosis*)、或寨卡病毒(Zika virus)。

[0413] 示例性的抗体分子包括但不限于：3f8、8h9、阿巴伏单抗(abagovomab)、阿昔单抗(abciximab)、阿比珠单抗(abituzumab)、阿普利单抗(abrilumab)、阿西妥单抗(actoxumab)、阿达木单抗(adalimumab)、阿德木单抗(adecatumumab)、阿杜卡单抗(aducanumab)、阿伐斯单抗(afasevikumab)、阿非莫单抗(afelimomab)、阿夫土珠单抗(afutuzumab)、PEG化阿拉西单抗(alacizumab pegol)、ald518、阿仑单抗(alemtuzumab)、

阿利若单抗(alirocumab)、喷替酸阿仑单抗(alemtuzumab pentetate)、阿马妥昔单抗(amatuximab)、安那妥莫单抗(anatumomab mafenatox)、安妥单抗(anetumab ravtansine)、阿尼弗洛单抗(anifrolumab)、安鲁金珠单抗(anrukinzumab, ima-638)、阿波立珠单抗(apolizumab)、阿西莫单抗(arcitumomab)、阿斯万卡单抗(ascrivacumab)、阿赛珠单抗(aselizumab)、阿特殊单抗(atezolizumab)、阿丁努单抗(atinumab)、阿替丽珠单抗(atlizumab) (托珠单抗, tocilizumab)、阿托若单抗(atorolimumab)、阿维鲁单抗(avelumab)、巴平纽珠单抗(bapineuzumab)、巴斯利昔单抗(basiliximab)、巴维妥昔单抗(bavituximab)、贝妥莫单抗(bectumomab)、贝格罗单抗(begelomab)、贝利木单抗(belimumab)、本瑞珠单抗(benralizumab)、柏替木单抗(bertilimumab)、贝索单抗(besilesomab)、贝伐单抗(bevacizumab)、贝兹罗妥单抗(bezlotoxumab)、比西单抗(biciromab)、比马古单抗(bimagrumab)、比麦克珠单抗(bimekizumab)、比伐妥珠单抗(bivatuzumab mertansine)、博莱斯鲁单抗(bleseelumab)、博纳吐单抗(blinatumomab)、布朗土维单抗(blontuvetmab)、布罗索珠单抗(blosozumab)、泊库昔珠单抗(bococizumab)、布拉兹库单抗(brazikumab)、本妥昔单抗凡多汀(brentuximab vedotin)、布利埃克单抗(briakinumab)、布罗达鲁单抗(brodalumab)、布罗路西珠单抗(brolucizumab)、波替妥珠单抗(brontictuzumab)、卡比拉珠单抗(cabiralizumab)、卡纳单抗(canakinumab)、坎妥珠单抗美登素(cantuzumab mertansine)、坎妥珠单抗(cantuzumab ravansine)、卡波拉西珠单抗(caplacizumab)、卡波米单抗喷地肽(capromab pendetide)、卡路单抗(carlumab)、卡鲁图昔单抗(carotuximab)、卡妥索单抗(catumaxomab)、cBR96-多柔比星免疫偶联物、赛德丽珠单抗(cedelizumab)、色古土珠单抗阿木纳白细胞素(cergutuzumab amunaleukin)、PEG化赛托珠单抗(certolizumab pegol)、西昔妥单抗(cixutumumab)、Ch.14.18.、西他妥珠单抗(citatumumab bogatox)、西昔妥单抗(cixutumumab)、卡拉扎齐珠单抗(clazakizumab)、克立昔单抗(clenoliximab)、替坦司可利妥珠单抗(clivatuzumab tetraxetan)、可瑞妥单抗(codrituzumab)、库特妥单抗(coltuximab ravtansine)、可那妥木单抗(conatumumab)、康昔珠单抗(concizumab)、克里尼珠单抗(crenezumab)、克罗特度单抗(crotedumab)、cr6261、达昔妥珠单抗(dacetuzumab)、达克珠单抗(daclizumab)、达鲁妥珠单抗(dalotuzumab)、PEG化达匹立珠单抗(dapirolizumab pegol)、达瑞妥木单抗(daratumumab)、德克特立克单抗(dectrekumab)、德姆茨单抗(demcizumab)、狄宁妥珠单抗(denintuzumab mafodotin)、狄诺塞单抗(denosumab)、德尔罗妥单抗生物素(derlotuximab biotin)、地莫单抗(detumomab)、定妥昔单抗(dinutuximab)、迪利达伏单抗(diridavumab)、多马格罗珠单抗(domagrozumab)、阿托度单抗(dorlimomab aritox)、杜兹妥单抗(drozitumab)、度立格土单抗(duligotumab)、度匹鲁单抗(dupilumab)、多伏罗单抗(durvalumab)、多斯替妥单抗(dusigitumab)、艾克麦昔单抗(ecromeximab)、伊库丽单抗(eculizumab)、埃巴单抗(edobacomab)、依决洛单抗(edrecolomab)、依法珠单抗(efalizumab)、伊芬古单抗(efungumab)、埃德鲁单抗(eldelumab)、依戈妥单抗(elgemtumab)、依罗妥珠单抗(elotuzumab)、伊斯立莫单抗(elsilimomab)、尹玛克妥珠单抗(emactuzumab)、尹贝妥珠单抗(emibetuzumab)、伊米昔珠单抗(emicizumab)、依瓦妥珠单抗(enavatuzumab)、恩伏妥单抗凡多汀(enfortumab vedotin)、PEG化恩莫单抗(enlimomab pegol)、恩波妥珠单抗(enoblituzumab)、恩其珠单抗(enokizumab)、恩替肯单

抗(enoticumab)、恩昔妥昔单抗(ensituximab)、伊匹土莫单抗(epitumomab cituxetan)、依帕珠单抗(epratuzumab)、厄仑努单抗(erenumab)、厄丽珠单抗(erlizumab)、厄妥索单抗(ertumaxomab)、依塔珠单抗(etaracizumab)、埃托里珠单抗(etrolizumab)、埃维那库单抗(evinacumab)、埃佛罗库单抗(evolocumab)、艾韦单抗(exbivirumab)、凡诺来索单抗(fanolesomab)、伐拉立莫单抗(faralimomab)、伐尔妥珠单抗(farletuzumab)、伐司努单抗(fasinumab)、fbta05、凡维珠单抗(felvizumab)、凡扎金努单抗(fezakinumab)、菲巴士珠单抗(fibatuzumab)、菲克妥珠单抗(ficlatuzumab)、弗吉妥姆单抗(figuremab)、菲瑞伏单抗(firivumab)、弗兰伏单抗(flanvotumab)、福来替库单抗(fletikumab)、芬托丽珠单抗(fontolizumab)、佛拉鲁单抗(foralumab)、佛拉韦单抗(foravirumab)、弗莱索立木单抗(fresolimumab)、弗尔兰努单抗(fulranumab)、弗土昔单抗(futuximab)、格尔坎珠单抗(galcanezumab)、加利昔单抗(galiximab)、加尼单抗(ganitumab)、加滕那鲁单抗(gantenerumab)、加维立莫单抗(gavilimomab)、吉妥珠单抗奥佐米星(gemtuzumab ozogamicin)、吉沃克珠单抗(gevokizumab)、吉瑞妥昔单抗(girentuximab)、戈姆妥姆单抗凡多汀(glembatumumab vedotin)、高利单抗(golimumab)、高米立昔单抗(gomiliximab)、古赛尔库单抗(guselkumab)、伊巴丽珠单抗(ibalizumab)、替坦异贝莫单抗(ibritumomab tiuxetan)、伊库克单抗(icrucumab)、伊达鲁昔珠单抗(idarucizumab)、伊戈伏单抗(igovomab)、imab362、尹马鲁单抗(imalumab)、英西单抗(imciromab)、尹戈妥珠单抗(imgatuzumab)、英卡拉库单抗(inclacumab)、英达妥昔单抗拉弗坦新(indatuximab ravtansine)、英杜斯妥单抗凡多汀(indusatumab vedotin)、英比立珠单抗(inebilizumab)、英利昔单抗(infliximab)、英特妥姆单抗(intetumumab)、伊诺莫单抗(inolimomab)、奥英妥珠单抗(inotuzumab ozogamicin)、伊匹单抗(ipilimumab)、伊瑞妥姆单抗(iratumumab)、伊萨土昔单抗(isatuximab)、伊托立珠单抗(itolizumab)、伊赛克珠单抗(ixekizumab)、克立新单抗(keliximab)、拉贝珠单抗(labetuzumab)、兰波单抗(lambrolizumab)、兰帕丽珠单抗(lampalizumab)、兰纳德鲁单抗(lanadelumab)、兰多格柔珠单抗(landogrozumab)、拉普立土昔单抗美坦新偶联物(laprituximab emtansine)、勒布立克珠单抗(lebrikizumab)、勒梅尔索单抗(lemalesomab)、兰达丽珠单抗(lendalizumab)、兰兹鲁单抗(lenzilumab)、勒德立木单抗(lerdelimumab)、来沙木单抗(lexatumumab)、利比韦单抗(libivirumab)、立法妥珠单抗凡多汀(lifastuzumab vedotin)、力格立珠单抗(ligelizumab)、立罗妥单抗赛塔坦(lilotomab satetraxetan)、林妥珠单抗(lintuzumab)、利鲁单抗(lirilumab)、罗德昔珠单抗(lodelcizumab)、洛吉维特单抗(lokiivetmab)、罗沃妥珠单抗(lorvotuzumab mertansine)、鲁卡妥姆单抗(lucatumumab)、PEG化鲁立珠单抗(lulizumab pegol)、鲁米昔单抗(lumiliximab)、鲁姆妥珠单抗(lumretuzumab)、马帕木单抗(mapatumumab)、马戈妥昔单抗(margetuximab)、马司莫单抗(maslimomab)、马弗瑞立木单抗(mavrilimumab)、马妥珠单抗(matuzumab)、麦泊丽珠单抗(mepolizumab)、麦特丽珠单抗(metelimumab)、米拉妥珠单抗(milatuzumab)、米恩瑞士莫单抗(minretumomab)、米维妥昔单抗(mirvetuximab soravtansine)、米妥莫单抗(mitumomab)、莫加木珠单抗(mogamulizumab)、莫纳丽珠单抗(monalizumab)、莫罗立木单抗(morolimumab)、莫维珠单抗(motavizumab)、莫昔妥木单抗(moxetumomab pasudotox)、莫罗单抗-CD3(muromonab-cd3)、纳考洛单抗(nacolomab tafenatox)、那米鲁单抗

(namilumab)、纳布妥木单抗(naptumomab estafenatox)、那拉土昔单抗美坦新偶联物(naratuximab emtansine)、纳鲁特单抗(narnatumab)、那他珠单抗(natalizumab)、那维西珠单抗(navicixizumab)、那维单抗(navivumab)、奈巴库单抗(nebacumab)、奈昔木单抗(necitumumab)、奈莫丽珠单抗(nemolizumab)、奈瑞利莫单抗(nerelimomab)、奈维克单抗(nesvacumab)、尼妥珠单抗(nimotuzumab)、尼韦单抗(nivolumab)、诺非特姆单抗莫喷坦(nofetumomab merpentan)、欧比托昔单抗(obiltoxaximab)、欧滨妥珠单抗(obinutuzumab)、欧卡妥珠单抗(ocaratuzumab)、欧克里珠单抗(ocrelizumab)、奥度莫单抗(odulimomab)、奥法木单抗(ofatumumab)、欧妥单抗(olaratumab)、欧罗克珠单抗(olokizumab)、奥马珠单抗(omalizumab)、阿尔昔珠单抗(onartuzumab)、安妥昔珠单抗(ontuxizumab)、欧匹昔努单抗(opicinumab)、莫奥珠单抗(oportuzumab monatox)、欧瑞格木单抗(oregovomab)、奥替库单抗(orticumab)、奥特里希珠单抗(otelixizumab)、奥特托珠单抗(otlertuzumab)、欧克赛鲁单抗(oxelumab)、欧赞尼珠单抗(ozanezumab)、欧宙拉里珠单抗(ozoralizumab)、帕吉昔单抗(pagibaximab)、帕利珠单抗(palivizumab)、帕姆鲁鲁单抗(pamrevlumab)、帕尼单抗(panitumumab)、潘可单抗(pankomab)、潘诺巴库单抗(panobacumab)、帕色妥珠单抗(parsatuzumab)、帕斯卡丽珠单抗(pascalizumab)、帕束妥昔珠单抗(pasotuxizumab)、帕特克丽珠单抗(pateclizumab)、帕特妥单抗(patritumab)、派姆单抗(pembrolizumab)、排姆妥姆单抗(pemtumomab)、派拉克珠单抗(perakizumab)、帕妥珠单抗(pertuzumab)、培克珠单抗(pexelizumab)、匹狄立珠单抗(pidilizumab)、匹伐珠单抗凡多汀(pinatuzumab vedotin)、并妥木单抗(pintumomab)、普拉库鲁单抗(placulumab)、普罗扎立珠单抗(plozalizumab)、泊咖丽珠单抗(pogalizumab)、波拉妥珠单抗凡多汀(polatuzumab vedotin)、泊尼珠单抗(ponezumab)、普利扎丽珠单抗(prezalizumab)、普立昔单抗(priliximab)、普利托昔单抗(pritoxaximab)、普托木单抗(pritumumab)、pro 140、奎丽珠单抗(quilizumab)、雷克妥木单抗(racotumomab)、雷德妥单抗(radretumab)、瑞非韦鲁单抗(rafivirumab)、拉潘西珠单抗(ralpencizumab)、雷莫芦单抗(ramucirumab)、兰尼单抗(ranibizumab)、瑞西巴库单抗(raxibacumab)、来凡尼珠单抗(refanezumab)、瑞加韦单抗(regavirumab)、莱斯利珠单抗(reslizumab)、利妥木单抗(rilotumumab)、利努库单抗(rinucumab)、利散珠单抗(risankizumab)、利妥昔单抗(rituximab)、PEG化利伐巴珠单抗(rivabazumab pegol)、罗妥木单抗(robatumumab)、罗莱度单抗(roledumab)、罗莫素珠单抗(romosozumab)、荣塔立珠单抗(rontalizumab)、罗伐匹珠单抗特斯林(rovalpituzumab tesirine)、罗伐丽珠单抗(rovelizumab)、鲁匹丽珠单抗(ruplizumab)、沙斯妥珠单抗格维特堪(sacituzumab govitecan)、萨摩利珠单抗(samalizumab)、萨佩丽珠单抗(sapelizumab)、萨立鲁单抗(sarilumab)、沙妥莫单抗喷地肽(satumomab pendetide)、苏金单抗(secukinumab)、色瑞班妥单抗(seribantumab)、色托新西单抗(setoxaximab)、司韦单抗(sevirumab)、西罗妥珠单抗(sibrotuzumab)、sgn-cd19a、sgn-cd33a、司伐立木单抗(sifalimumab)、斯妥昔单抗(siltuximab)、辛土珠单抗(simtuzumab)、西普丽珠单抗(siplizumab)、司鲁库单抗(sirukumab)、索非妥珠单抗凡多汀(sofituzumab vedotin)、茄尼醇单抗(solanezumab)、索立托单抗(solitomab)、索尼普兹珠单抗(sonpcizumab)、索土珠单抗(sontuzumab)、司他莫鲁单抗(stamulumab)、硫索单抗(sulesomab)、苏维珠单抗(suvizumab)、它布鲁单抗(tabalumab)、它卡斯珠单抗替赛坦

(tacatuzumab tetraxetan)、他度珠单抗(tadocizumab)、他利珠单抗(talizumab)、塔姆士维单抗(tamtuvetmab)、他尼珠单抗(tanezumab)、它普立妥单抗佩普托克斯(taplutumomab paptox)、它瑞妥单抗(tarextumab)、特非巴珠单抗(tefibazumab)、阿替莫单抗(telimomab aritox)、特纳妥单抗(tenatumomab)、替奈昔单抗(teneliximab)、特普丽珠单抗(teplizumab)、特普妥单抗(teprotumumab)、特西度鲁单抗(tesidolumab)、特士罗单抗(tetulomab)、特泽佩鲁单抗(tezepelumab)、tgn1412、替西木单抗(ticilimumab、特姆单抗(tremelimumab))、替尔达珠单抗(tildrakizumab)、替卡妥珠(tigatuzumab)、替莫鲁单抗(timolumab)、替索土单抗凡多汀(tisotumab vedotin)、tnx-650、托珠单抗(tocilizumab,阿替丽珠单抗(atlizumab))、托罗丽珠单抗(toralizumab)、托萨妥昔单抗(tosatouxumab)、托西莫单抗(tositumomab)、托韦妥单抗(tovetumab)、曲罗金努单抗(tralokinumab)、曲妥珠单抗(trastuzumab)、曲妥珠单抗-美坦新偶联物(trastuzumab emtansine)、trbs07、特咖丽珠单抗(tregalizumab)、特姆单抗(tremelimumab)、特弗格鲁单抗(trevogrumab)、图库斯珠单抗西莫白介素(tucotuzumab celmoleukin)、妥韦单抗(tuvirumab)、乌立妥昔单抗(ublrituximab)、乌克普鲁单抗(ulocuplumab)、乌鲁单抗(urelumab)、乌妥萨珠单抗(urtoxazumab)、优特克单抗(ustekinumab)、乌托米鲁单抗(utomilumab)、凡达西单抗塔立林(vadastuximab talirine)、万多妥珠单抗凡多汀(vandortuzumab vedotin)、万替克单抗(vantictumab)、万古珠单抗(vanucizumab)、伐利昔单抗(vapaliximab)、伐立鲁单抗(varlilumab)、伐特丽珠单抗(vatelizumab)、维多丽珠单抗(vedolizumab)、维妥珠单抗(veltuzumab)、维帕莫单抗(vepalimomab)、维森库单抗(vesencumab)、卫斯理珠单抗(visilizumab)、沃巴丽珠单抗(vobarilizumab)、沃罗斯昔单抗(volociximab)、沃斯妥珠单抗马佛多汀(vorsetuzumab mafodotin)、伏妥莫单抗(votumumab)、赛士珠单抗(xentuzumab)、扎鲁土木单抗(zalutumumab)、扎木单抗(zanolimumab)、扎土昔单抗(zatuximab)、兹拉立木单抗(ziralimumab)、阿佐莫单抗(zolimomab aritox)或其衍生物。

[0414] 在一个实施方式中,抗体分子包含本文所述抗体分子VH区的一个、两个或三个CDR(采用Kabat或Chothia的CDR定义)。在一个实施方式中,采用Kabat或Chothia的CDR定义,抗体分子包含本文所述抗体分子VL区的一个、两个或三个CDR。在一个实施方式中,采用Kabat或Chothia的CDR定义,抗体分子包含本文所述抗体分子VH区的一个或多个(例如两个或三个)CDR和/或VL区的一个或多个(例如两个或三个)CDR。

[0415] 在一个实施方式中,抗体分子包含本文所述抗体分子VH区的一个、两个、三个或四个框架区。在一个实施方式中,抗体分子包含本文所述抗体分子VL区的一个、两个、三个或四个框架区。在一个实施方式中,抗体分子包含本文所述抗体分子VH区的一个或多个(例如两个、三个或四个)框架区和/或VL区的一个或多个(例如两个、三个或四个)框架区。

[0416] 在一个实施方式中,抗体分子包含本文所述抗体分子的重链可变区,或具有与之基本上相同氨基酸序列的重链可变区(例如与其至少约85%、90%、95%、99%或更相同的氨基酸序列,或差异不超过1、2、5、10或15个氨基酸残基的序列)。在一个实施方式中,抗体分子包含本文所述抗体分子的轻链可变区,或具有与之基本上相同氨基酸序列的轻链可变区(例如与其至少约85%、90%、95%、99%或更相同的氨基酸序列,或差异不超过1、2、5、10或15个氨基酸残基的序列)。在一个实施方式中,抗体分子包含:本文所述抗体分子的重链

可变区,或具有与之基本上相同氨基酸序列的重链可变区(例如与其至少约85%、90%、95%、99%或更相同的氨基酸序列,或差异不超过1、2、5、10或15个氨基酸残基的序列);以及,本文所述抗体分子的轻链可变区,或具有与之基本上相同氨基酸序列的轻链可变区(例如与其至少约85%、90%、95%、99%或更相同的氨基酸序列,或差异不超过1、2、5、10或15个氨基酸残基的序列)。

[0417] 在一个实施方式中,抗体分子还包含重链恒定区,例如本文所述抗体分子的重链恒定区,或具有与之基本上相同氨基酸序列的重链恒定区(例如与其至少约85%、90%、95%、99%或更相同的氨基酸序列,或差异不超过1、2、5、10或15个氨基酸残基的序列)。在一个实施方式中,抗体分子还包含轻链恒定区,例如本文所述抗体分子的轻链恒定区,或具有与之基本上相同氨基酸序列的轻链恒定区(例如与其至少约85%、90%、95%、99%或更相同的氨基酸序列,或差异不超过1、2、5、10或15个氨基酸残基的序列)。在一个实施方式中,抗体分子还包含:本文所述抗体分子的重链恒定区,或具有与之基本上相同氨基酸序列的重链恒定区(例如与其至少约85%、90%、95%、99%或更相同的氨基酸序列,或差异不超过1、2、5、10或15个氨基酸残基的序列);以及,本文所述抗体分子的轻链恒定区,或具有与之基本上相同氨基酸序列的轻链恒定区(例如与其至少约85%、90%、95%、99%或更相同的氨基酸序列,或差异不超过1、2、5、10或15个氨基酸残基的序列)。在一个实施方式中,抗体分子包含本文所述抗体分子的重链和轻链可变区,以及重链恒定区、轻链恒定区。

[0418] 本文所述的抗体分子可具有多种有益性能,包括但不限于所需的(例如提高的)半衰期。例如,抗体分子可用于有效治疗、预防或诊断本文所述的病症。

[0419] 在一个实施方式中,抗体分子能够结合目标分子或细胞。例如,与亲本抗体分子相比,工程化抗体分子能够以相同或基本上相同的结合特异性和/或亲和力结合目标分子或细胞。在一个实施方式中,抗体分子以高亲和力结合目标分子或细胞,例如以小于约100nM,通常约10nM,更通常约10-0.01nM、约5-0.01nM、约3-0.05nM、约1-0.1nM,或更强,例如小于约80、70、60、50、40、30、20、10、8、6、4、3、2、1、0.5、0.2、0.1、0.05或0.01nM的解离常数( $K_d$ )结合。在一个实施方式中,抗体分子结合目标分子或细胞的 $K_{off}$ 慢于 $1 \times 10^{-4}$ 、 $5 \times 10^{-5}$ 、或 $1 \times 10^{-5} s^{-1}$ 。在一个实施方式中,抗体分子结合目标分子或细胞的 $K_{on}$ 快于 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 或 $5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 。

[0420] 在一个实施方式中,抗体分子能够抑制或活化目标分子或细胞的生物功能。例如,与亲本抗体分子相比,工程化抗体分子能够以相同或基本上相同的效力水平抑制或活化目标分子或细胞的生物功能(例如通过 $IC_{50}$ 、 $EC_{50}$ 或 $LD_{50}$ 确定)。

[0421] 在一个实施方式中,抗体分子能够结合目标分子或细胞上的表位。例如,工程化抗体分子能够与亲本抗体分子一样结合目标分子或细胞上相同或基本上相同的表位。

[0422] 示例性融合蛋白

[0423] 本文所述的方法可用于工程化改造各种融合蛋白,例如包含Fc区的任何Fc融合蛋白。

[0424] 示例性Fc融合蛋白包括但不限于:CTLA-4Fc融合蛋白(例如,贝拉西普或阿巴西普)、血管内皮生长因子受体(VEGFR)Fc融合蛋白(例如,VEGFR1/VEGFR2 Fc融合蛋白,例如,阿柏西普或KH902)、IL-1R Fc融合蛋白(例如,利纳西普(rilonacept)、促血小板生成素结合蛋白Fc融合蛋白(例如,罗米司亭)、LFA-3Fc融合蛋白(例如,阿法西普)、抗CD40L Fc融合

蛋白(例如,包含连接于IgG1 Fc片段的靶向CD40配体(CD40L或CD154)的结构域抗体(dAb)C末端的二聚融合蛋白,例如,BMS-986004或莱妥珠单抗(letolizumab))、TNF受体(TNFR)Fc融合蛋白(例如,与IgG1 Fc区融合的重组TNF受体2(TNFR2),例如,OPRX-106或依那西普)、凝集因子VIII-Fc融合蛋白(例如,BIIB031、efraloctocog- $\alpha$ 或rFVIIIIFc)、凝集因子IX-Fc融合蛋白(例如,BIIB029或eftrenonacog- $\alpha$ )、因子IX Fc融合蛋白(例如,rFIXFc)、粒细胞集落刺激因子Fc融合蛋白(例如,F-627)、卵泡刺激素(FSH)Fc融合蛋白(例如,KN015)、2B型激活素受体Fc融合蛋白(例如,STM 434)、激活素受体样激酶1(ALK-1)抑制受体Fc融合蛋白(例如,达兰特西普(dalantercept))、RNA酶Fc融合蛋白(例如,RSLV-132)、抗血管生成素肽体(例如,与Fc区融合的具有血管生成素结合特性的肽,例如,AMG 386)、组织非特异性碱性磷酸酶(TNSALP)Fc融合蛋白(例如,阿斯福塔酶 $\alpha$ (asfotase alfa)或ENB-0040)、CD24 Fc融合蛋白、BAFF-Fc融合蛋白(例如,布利昔莫德(blisibimod))、GLP1肽类似物Fc融合蛋白(例如,杜拉糖肽或LY2189265)、红细胞生成素模拟肽Fc融合蛋白(例如,红细胞生成素模拟肽-IgG1 Fc模拟体(mimetibody,例如,CNT0 528)、或红细胞生成素模拟肽-IgG4 Fc融合蛋白模拟体(例如,CNT0 530))、或者CD95 Fc融合蛋白(例如,APG 101或阿波西普(apocept))。

#### [0425] 动物模型

[0426] 可在体内(例如采用各种动物模型)评估本文所述的多肽(例如抗体分子或融合蛋白)。例如,动物模型可用于测试本文所述多肽在调控目标分子或细胞生物功能中的效力。作为另一个实例,动物模型还可用于测试本文所述多肽在治疗、预防或诊断本文所述病症中的效力。动物模型还可用于,例如研究副作用、原位测定抗体分子浓度、证明目标分子或细胞与本文所述病症间的相关性。

[0427] 用于本文所述其他病症的示例性动物模型在本领域中也是已知的。可用于评估本文所述抗体分子的示例性动物类型包括但不限于:小鼠、大鼠、兔、豚鼠以及猴。通常将非人灵长类动物和表达人FcRn的转基因小鼠用作PK分析的模型选择(Avery等.MAbs.2016;8(6):1064-78;Fan等.MAbs.2016;8(5):848-53;Tam等.MAbs.2013;5(3):397-405)。

[0428] 例如,可基于C57BL/6J依序建立人源化FcRn小鼠,其包括创建小鼠FcRn基因缺失的小鼠品系,然后导入人FcRn基因。示例性的小鼠系包括例如Tg276和Tg32(杰克逊实验室(The Jackson Laboratory)库存号004919和014565)。通过进一步回交和后续改变,可产生其他株系。可用于评估本文所述多肽的示例性小鼠模型包括但不限于:无FcRn小鼠、人源化Tg276 FcRn小鼠(例如,B6.Cg-Fcgrt<tm1Dcr>Tg(CAG-FCGRT)276Dcr/DcrJ,其杰克逊实验室库存号为004919)、人源化Tg32 FcRn小鼠(例如,B6.Cg-Fcgrt<tm1Dcr>Tg(FCGRT)32Dcr/DcrJ,其杰克逊实验室库存号为014565)、免疫缺陷型hFcRn小鼠(例如,B6.Cg-Fcgrt<tm1Dcr>Prkdc<scid>Tg(CAG-FCGRT)276Dcr/DcrJ,其杰克逊实验室库存号为021146)、B6.Cg-Fcgrt<tm1Dcr>Prkdc<scid>Tg(FCGRT)32Dcr/DcrJ,其杰克逊实验室库存号为018441,以及B6.Cg-Rag1<tm>Mom<Fcgrt>tm1Dcr[Tg(CAG-FCGRT)276Dcr/DcrJ,其杰克逊实验室库存号为16919),例如如Proetzel等.BioDrugs.2014;28(2):171-180所述。

#### [0429] 药物组合物和试剂盒

[0430] 在一些方面中,本公开提供了组合物,例如药学上可接受的组合物,其包含本文所述的多肽(例如抗体分子或融合蛋白),所述多肽与药学上可接受的载剂配制在一起。

[0431] 如本文所用,“药学上可接受的载剂”包括生理上相容的任何和所有溶剂、分散介

质、等渗剂和吸收延迟剂等等。优选地,载剂适于静脉内、肌肉内、皮下、肠胃外、直肠、脊柱或表皮给予(例如,通过注射或输注)。在某些实施方式中,药物组合物中少于约5% (例如少于约4%、3%、2%或1%)的抗体分子以聚集物形式存在。在另一些实施方式中,药物组合物中至少约95% (例如至少约96%、97%、98%、98.5%、99%、99.5%、99.8%或更多)的抗体分子以单体形式存在。在一些实施方式中,聚集物或单体水平通过色谱法(例如高效液相色谱-尺寸排阻色谱(HPLC-SEC))测定。

[0432] 本文所述组合物可为各种形式。这些包括例如,液体、半固体和固体剂型,如液体溶液(例如可注射和可输注溶液)、分散体或悬浮体、脂质体以及栓剂。合适的形式取决于目标给药模式以及治疗应用。通常合适的组合物为可注射或可输注溶液形式。合适的给药模式之一是胃肠道外(例如静脉内、皮下、腹膜内、肌肉内)。在一个实施方式中,通过静脉内输注或注射给予多肽(例如抗体分子或融合蛋白)。在另一个实施方式中,通过肌肉内或皮下注射给予多肽(例如抗体分子或融合蛋白)。

[0433] 本文所用术语“胃肠道外给药”和“经胃肠道外给予”表示除肠道和局部给药外的给药形式,通常通过注射,例如但不限于静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眼内、心脏内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下(subcapsular)、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注给药。

[0434] 在制备和储存条件下,治疗性组合物通常应无菌和稳定。可将组合物配制成溶液、微乳剂、分散体、脂质体或适合高抗体浓度的其他有序结构。可根据需要将在合适溶剂中的所需量活性化合物(即抗体或抗体部分)与上述组分中的一种或组合掺混,然后进行过滤灭菌,从而制备无菌注射液。通常,将活性化合物掺入含有碱性分散介质和上述其它所需成分的无菌载剂中制备分散剂。在制备无菌注射液的无菌粉剂时,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥,由之前无菌过滤的溶液得到活性组分和任何其它所需组分的粉末。可维持溶液的合适流动性,例如通过使用诸如卵磷脂的涂层、在分散剂情况下通过保持所需粒度以及通过使用表面活性剂。组合物中包含延迟吸收的试剂如单硬脂酸盐和明胶可延长可注射组合物的吸收。

[0435] 本文所述多肽(例如抗体分子或融合蛋白)可通过各种方法给药。本领域中已知数种,并且对于许多治疗性、预防性或诊断性应用,适当的给药途径/模式是静脉内注射或输注。例如,抗体分子通过静脉内输注给药的速度可小于10毫克/分钟;优选小于或等于5毫克/分钟来达到约1~100毫克/平方米的剂量,优选约5~50毫克/平方米,约7~25毫克/平方米,更优选约10毫克/平方米。本领域熟练技术人员应当理解,给药的途径和/或方式根据所需结果而有所不同。在某些实施方式中,活性化合物可与载剂一起制备,该载剂将保护该化合物不被迅速释放,如控释制剂,包括植入体、透皮贴片和微包封递送系统。可利用生物可降解的、生物相容的聚合物,例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酞、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。制备此类制剂的许多方法已获得专利或为本领域技术人员熟知。参见例如, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems(《缓控释药物递送系统》), J.R.Robinson编, Marcel Dekker公司, 纽约, 1978。

[0436] 在某些实施方式中,可口服给予(例如与惰性稀释剂或可吸收食用载剂一起)多肽(例如抗体分子或融合蛋白)。抗体分子(以及按需的其他组分)也可容纳在硬或软壳明胶胶囊里、压缩成片剂、或直接掺混入对象的膳食中。对于口服治疗性给药,可将抗体分子与赋

形剂混合,并以可摄取的片剂、口颊含片、锭剂、胶囊、酞剂、悬浮剂、糖浆、薄片等形式使用。为了通过非胃肠道外给药途径的其他形式来给予本发明的化合物,可能需要用材料包覆化合物或将某种材料与该化合物共同给药,以防止该化合物失活。还可采用医疗装置来给予治疗性、预防性或诊断性组合物,本领域中已知数种此类装置。

[0437] 给药方案经调整能提供所需反应(例如治疗、预防或诊断反应)。例如,可以是一次推注,按时间分次给药或根据治疗情况的紧急性成比例地降低或增加剂量。尤其有利的是配制成单位剂型的胃肠道外组合物以便于给药和剂量均一性。本文中单位剂型指作为单个剂量用于待治疗对象的物理上各自独立的单位,每个单位包含预定量的活性化合物与所需药物载体,该预定量经测算能够产生所需治疗效果。本发明中剂量单位形式的规格取决于或直接依赖于(a)抗体的独特特性和待实现的具体治疗、预防或诊断效果,以及(b)此抗体分子配制相关领域关于应对个体敏感性的固有限制。

[0438] 抗体分子的治疗、预防或诊断有效量的示例性非限制性范围为约0.1~50mg/kg,例如,约0.1~30mg/kg,例如,约1~30、1~15、1~10、1~5、5~10或1~3mg/kg,例如约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40或50mg/kg。例如,抗体分子通过静脉内输注给药,速度可小于10毫克/分钟,例如小于或等于5毫克/分钟来达到约1~100毫克/平方米的剂量,例如约5~50毫克/平方米,约7~25毫克/平方米,约10毫克/平方米。需要注意的是,剂量值可能会根据待缓解病症的种类和严重程度而不同。需要理解,对于每个具体对象,应当随着时间根据个体需求以及给予组合物或监管组合物给予的人的专业判断来调节具体剂量方案,本文所列的剂量范围仅仅是示例性的,并不意在对所要求权利的组合物范围或实施方式构成限制。

[0439] 本文的药物组合物可包含“治疗有效量”、“预防有效量”或“诊断有效量”的本文所述多肽(例如抗体分子)。

[0440] “治疗有效量”指按照一定剂量和必要时程能够实现所需治疗效果的量。多肽(例如抗体分子或融合蛋白)的治疗有效量可根据诸如个体的疾病状态、年龄、性别和体重等因素以及抗体或抗体部分在个体中引起所需反应的能力而不同。治疗有效量,抗体分子的治疗有益效果胜过任何毒性或有害效果。相对于未治疗对象,“治疗有效剂量”通常使可测参数被抑制至少约20%,例如至少约40%,至少约60%或至少约80%。可测参数可为例如:血尿、有色尿、起泡尿、疼痛、手部和脚部肿胀(水肿)或高血压。可在能够预测治疗或预防本文所述病症效力的动物模型系统中评估抗体分子抑制可测参数的能力。或者,可通过检测多肽(例如抗体分子或融合蛋白)调控目标分子或细胞生物功能的能力(例如通过体外测试)来评估组合物的该性能。

[0441] “预防有效量”是指按照一定剂量和必要时程能够有效实现所需预防效果的量。一般而言,由于预防剂量在疾病的早期或患病之前用于对象,预防有效量将小于治疗有效量。

[0442] “诊断有效量”指按照一定剂量和必要时程能够实现所需诊断效果的量。通常,诊断有效量是可体外、离体或体内诊断病症(例如本文所述的病症)的量。

[0443] 本公开中还包括试剂盒/药盒,其包含本文所述的多肽(例如抗体分子或融合蛋白)。该试剂盒/药盒可包括一种或多种其他部分,包括:使用说明;其他试剂,例如标记物、治疗剂、可用于将抗体分子螯合或偶联于标记物或治疗剂的试剂、辐射防护组合物/组分;用于制备用于给药的多肽(例如抗体分子或融合蛋白)的装置或其他材料;药学上可接受的

载剂;以及用于向对象给药的装置或其他材料。

[0444] 核酸

[0445] 本公开还描述了包含核苷酸序列的核酸,所述序列编码多肽(例如抗体分子或融合蛋白),例如本文所述多肽的Fc区。

[0446] 例如,本公开描述了一种编码本文所述Fc区(例如包含本文所述一个或多个突变的Fc区)的核酸。可从本文中所述已有多肽(例如抗体分子或融合蛋白)的Fc区工程化改造获得Fc区。核酸可包含编码本文所述多肽(例如抗体分子或融合蛋白)的Fc区氨基酸序列的核苷酸序列,或者与其基本相同的核苷酸序列(例如与其至少约85%、90%、95%、99%或更为相同的序列,和/或能够在本文所述的严谨条件下杂交的序列)。

[0447] 在一个实施方式中,核酸可进一步包含编码本文所述多肽(例如抗体分子或融合蛋白)的重链可变区的核苷酸序列,或者与其基本同源的核苷酸序列(例如与其至少约85%、90%、95%、99%或更同源的序列,和/或能够在本文所述的严谨条件下杂交的序列)。在另一个实施方式中,核酸可进一步包含编码本文所述多肽(例如抗体分子或融合蛋白)的轻链可变区的核苷酸序列,或者与其基本同源的核苷酸序列(例如与其至少约85%、90%、95%、99%或更同源的序列,和/或能够在本文所述的严谨条件下杂交的序列)。在另一个实施方式中,核酸可进一步包含编码本文所述多肽(例如抗体分子或融合蛋白)的重链可变区和轻链可变区的核苷酸序列,或者与其基本同源的核苷酸序列(例如与其至少约85%、90%、95%、99%或更同源的序列,和/或能够在本文所述的严谨条件下杂交的序列)。

[0448] 在一个实施方式中,核酸可进一步包含编码来自本文所述多肽(例如抗体分子或融合蛋白)重链可变区的至少一个、两个或三个CDR的核苷酸序列,或者与其基本同源的核苷酸序列(例如与其至少约85%、90%、95%、99%或更相同的序列,和/或能够在本文所述的严谨条件下杂交的序列)。在另一个实施方式中,核酸可进一步包含编码来自本文所述多肽(例如抗体分子或融合蛋白)轻链可变区的至少一个、两个或三个CDR的核苷酸序列,或者与其基本同源的核苷酸序列(例如与其至少约85%、90%、95%、99%或更相同的序列,和/或能够在本文所述的严谨条件下杂交的序列)。在另一个实施方式中,核酸可进一步包含编码来自本文所述多肽(例如抗体分子或融合蛋白)重链和轻链可变区的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个CDR的核苷酸序列,或者与其基本同源的核苷酸序列(例如与其至少约85%、90%、95%、99%或更相同的序列,和/或能够在本文所述的严谨条件下杂交的序列)。

[0449] 在一个实施方式中,核酸包含本文所述的核苷酸序列的一部分。该部分可编码例如Fc区、可变区(例如VH或VL);一个、两个或三个或更多个(例如四个、五个或六个)CDR;或一个、两个、三个、四个或更多个框架区。

[0450] 本文所述的核酸包括脱氧核糖核酸或核糖核酸或其类似物。多核苷酸可以是单链或双链,并且如果是单链,可以是编码链或非编码(反义)链。多核苷酸可包括修饰的核苷酸,如甲基化的核苷酸和核苷酸类似物。核苷酸序列可间插有非核苷酸组分。多核苷酸聚合后可以被进一步修饰,如通过与标记组分结合。核酸可为重组多核苷酸、或基因组多核苷酸、cDNA、半合成或合成来源,即非天然存在或以非天然排列方式与另一多核苷酸相连。

[0451] 在某些方面中,本申请的特征包括包含本文所述核酸的宿主细胞和载体。核酸可存在于同一宿主细胞或非同一宿主细胞中的单个载体中或独立的多个载体中,详见下文。

[0452] 载体

[0453] 本公开还描述了包含核苷酸序列的载体,所述序列编码多肽(例如抗体分子或融合蛋白),例如本文所述多肽的Fc区。

[0454] 例如,本公开描述了一种包含编码本文所述Fc区(例如包含本文所述一个或多个突变的Fc区)的核苷酸序列的载体。可从本文中所述已有多肽(例如抗体分子或融合蛋白)的Fc区工程化改造获得Fc区。载体可包含编码本文所述多肽(例如抗体分子或融合蛋白)的Fc区氨基酸序列的核苷酸,或者与其基本相同的核苷酸序列(例如与其至少约85%、90%、95%、99%或更为相同的序列,和/或能够在本文所述的严谨条件下杂交的序列)。

[0455] 载体包括但不限于病毒、质粒、粘粒、 $\lambda$ 噬菌体或酵母人工染色体(YAC)。

[0456] 可采用许多种载体系统。例如,一类载体利用DNA元件,这些元件衍生自动物病毒例如牛乳头瘤病毒、多瘤病毒、腺病毒、痘苗病毒、杆状病毒、逆转录病毒(劳斯氏肉瘤病毒、MMTV或MOMLV)或SV40病毒。另一类载体利用衍生自RNA病毒的RNA元件,所述RNA病毒为例如塞姆利基森林病毒、东部马脑炎病毒和黄病毒。

[0457] 此外,通过引入能够选择已转染宿主细胞的一种或多种标记物,可选择已将DNA稳定整合入其染色体中的细胞。该标记物可向营养缺陷型宿主提供例如原养型、杀生物剂(如抗生素)抗性或对重金属如铜等的抗性。选择性标记基因可直接连接于待表达的DNA序列,或者通过共同转化引入同一细胞内。mRNA的优化合成也可能需要其它元件。这些元件可以包括剪接信号,以及转录启动子、增强子和终止信号。

[0458] 一旦制得用于表达的含构建体表达载体或DNA序列,可将表达载体转染或导入合适的宿主细胞。可用各种技术实现之,例如原生质体融合、磷酸钙沉淀、电致孔、逆转录病毒转导、病毒转染、基因枪、脂质转染或其他常规技术。在原生质体融合的情形下,可在培养基中使细胞生长,并筛选适当的活性。

[0459] 培养所得转染细胞以及回收所产生多肽(例如抗体分子)的方法和条件是本领域技术人员已知的,且可基于本文的描述,根据所用的特定表达载体和哺乳动物宿主细胞进行改变或优化。

[0460] 细胞

[0461] 本公开还提供了包含本文所述多肽(例如抗体分子或融合蛋白)编码核酸的宿主细胞。可根据本文所述的方法工程化改造多肽(例如抗体分子或融合蛋白)。例如,宿主细胞可包含编码本文所述多肽(例如抗体分子或融合蛋白)的核苷酸序列的核酸,或者与其基本同源的核苷酸序列(例如与其至少约85%、90%、95%、99%或更相同的序列,和/或能够在本文所述的严谨条件下杂交的序列),或所述核酸之一的一部分。

[0462] 在一些实施方式中,宿主细胞经遗传工程化改造而包含本文所述多肽(例如抗体分子或融合蛋白)的编码核酸。

[0463] 在某些实施方式中,采用表达盒对宿主细胞进行遗传工程化改造。术语“表达盒”是指能够影响与此类序列相容的宿主中基因表达的核苷酸序列。此类表达盒可包括启动子、含或不内含子的开放阅读框、以及终止信号。还可以采用实现表达所必需或有帮助的其他因子,例如诱导型启动子。

[0464] 本公开还提供了包含本文所述载体的宿主细胞。

[0465] 细胞可为但不限于:真核细胞、细菌细胞、昆虫细胞或人细胞。合适的真核细胞包括但不限于:Vero细胞、HeLa细胞、COS细胞、CHO细胞、HEK293细胞、BHK细胞和MDCKII细胞。

合适的昆虫细胞包括但不限于:Sf9细胞。

[0466] 多肽的应用

[0467] 本文所述的多肽(例如抗体分子或融合蛋白)以及本文所述的药物组合物具有体外、离体和体内治疗、预防和/或诊断用途。

[0468] 在一个实施方式中,本文所述的多肽(例如抗体分子或融合蛋白)调控(例如降低(例如抑制、阻断或中和)或提高(例如活化、引发或增强))目标分子(例如蛋白质)或细胞的一种或多种生物活性。例如,可将这些多肽(例如抗体分子或融合蛋白)给予培养中的体外或离体细胞、或给予对象,例如人对象(例如体内),从而调控目标分子或细胞的一种或多种生物活性。因此,在一方面中,本公开提供了治疗、预防或诊断对象中病症(例如本文所述病症)的方法,所述方法包括给予该对象本文所述的多肽(例如抗体分子或融合蛋白),所述病症由此得以治疗、预防或诊断。例如,本公开提供了一种方法,其包括:使本文所述的多肽(例如抗体分子或融合蛋白)接触培养中的细胞(例如体外或离体),或将本文所述的多肽(例如抗体分子或融合蛋白)给予对象(例如体内),以治疗、预防或诊断病症,例如与目标分子或细胞相关的病症(例如本文所述的病症)。

[0469] 本文所用术语“对象”旨在包括人和非人动物。在一些实施方式中,对象是人对象,例如患有本文所述病症或有罹患本文所述病症风险的人类患者。术语“非人动物”包括哺乳动物和非哺乳动物,例如非人灵长类动物。在一个实施方式中,对象是人。本文所述方法和组合物适于治疗人类患者的本文所述病症。患有本文所述病症的患者包括:已发生本文所述病症但(至少暂时)无症状,表现出本文所述病症症状的患者,或患有涉及本文所述病症或与之相关的病症的患者。

[0470] 治疗或预防病症的方法

[0471] 本文所述的多肽(例如抗体分子或融合蛋白)可用于治疗或预防病症或状况。在一个实施方式中,多肽具有优化或改善的半衰期,这对于治疗或预防病症或状况来说是有利的。虽然不希望囿于理论,但据信在一个实施方式中,本文所述的多肽(例如具有优化或改善半衰期的多肽)可提供优于具有相同或相似结合亲和力和/或特异性的其他多肽(例如未经工程化改造以具有优化或改善半衰期的多肽)的一种或多种益处。这些益处可包括但不限于:提高的治疗或预防效力、降低或减少的剂量方案、或改善的药代动力学特性。在一个实施方式中,多肽包括如本文所述的突变Fc区。

[0472] 可用本文所述多肽治疗或预防的示例性病症或状况包括但不限于:癌症(例如实体肿瘤或血液癌症)、感染性疾病(例如细菌感染或病毒感染)、免疫病症(例如自身免疫性病症)、炎性病症、代谢病症(例如糖尿病)、心血管病症、器官移植排异。在一个实施方式中,病症是慢性病症。

[0473] 可用本文所述多肽治疗或预防的示例性癌症包括但不限于:极性成淋巴细胞性白血病(ALL)、极性髓性白血病(AML)、肾上腺皮质癌、卡波西肉瘤、AIDS相关淋巴瘤、原发性中枢神经系统(CNS)淋巴瘤、肛门癌、阑尾癌、星形细胞瘤、非典型畸胎瘤/横纹肌样瘤、基底细胞癌、胆管癌、膀胱癌、骨癌(如尤文肉瘤或骨肉瘤和恶性纤维组织细胞瘤)、脑肿瘤(如星形细胞瘤、脑干胶质瘤、中枢神经系统非典型畸胎瘤/横纹肌样瘤、中枢神经系统胚胎肿瘤、中枢神经系统生殖细胞肿瘤、颅咽管瘤或室管膜瘤)、乳腺癌、支气管肿瘤、伯基特淋巴瘤、类癌(例如、胃肠道类癌、心脏(心脏)肿瘤、胚胎肿瘤、生殖细胞肿瘤、淋巴瘤、宫颈癌、胆管癌、

脊索瘤、慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、慢性粒细胞白血病 (CML)、慢性骨髓增生性肿瘤、结肠癌、结直肠癌、颅咽管瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、原位导管癌 (DCIS)、子宫内膜癌、室管膜瘤、食道癌、嗅神经母细胞瘤、尤文肉瘤、颅外生殖细胞肿瘤、性腺外生殖细胞肿瘤、眼癌 (如眼内黑色素瘤或视网膜母细胞瘤)、输卵管癌、骨纤维组织细胞瘤、骨肉瘤、胆囊癌、胃癌 (胃部癌)、胃肠道类癌、胃肠道间质瘤 (GIST)、生殖细胞肿瘤 (如中枢神经系统肿瘤、颅外肿瘤、性腺外肿瘤、卵巢癌或睾丸癌)、妊娠滋养细胞疾病、胶质瘤、毛细胞白血病、头颈部癌症、肝细胞癌 (肝癌)、霍奇金淋巴瘤、下咽癌、眼内黑色素瘤、胰岛细胞瘤、胰腺神经内分泌肿瘤、卡波西肉瘤、肾癌 (如肾细胞癌或肾母细胞瘤)、朗格汉斯细胞组织细胞增生症 (LCH)、喉癌、白血病 (如急性淋巴细胞白血病 (ALL))、急性髓性白血病 (AML)、慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、慢性粒细胞白血病 (CML) 或毛细胞白血病、唇癌和口腔癌、肝癌、肺癌 (如非小细胞肺癌 (NSCLC) 或小细胞肺癌)、淋巴瘤 (如艾滋病相关、伯基特淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、或原发性中枢神经系统 (CNS) 淋巴瘤)、**Waldenström** 巨球蛋白血症、男性乳腺癌、骨恶性纤维组织细胞瘤和骨肉瘤、黑色素瘤 (如眼内 (眼) 黑色素瘤)、Merkel 细胞癌、间皮瘤、转移性鳞状细胞颈癌、中线癌、口腔癌、多发性内分泌肿瘤综合征、多发性骨髓瘤/浆细胞肿瘤、蕈样真菌病、骨髓增生异常综合征、骨髓增生异常/骨髓增生性肿瘤、慢性骨髓增生性肿瘤、鼻腔和鼻窦癌、鼻咽癌、神经母细胞瘤、口腔癌、唇癌和口腔癌、口咽癌、骨肉瘤和骨恶性纤维组织细胞瘤、卵巢癌 (如上皮性卵巢癌或生殖细胞卵巢肿瘤)、胰腺癌、胰腺神经内分泌肿瘤 (胰岛细胞瘤)、乳头瘤病、副神经节瘤、鼻窦和鼻腔癌、甲状旁腺癌、阴茎癌、咽癌、嗜铬细胞瘤、垂体瘤、胸膜肺母细胞瘤、腹膜癌、前列腺癌、直肠癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、肉瘤 (如尤文肉瘤、卡波西肉瘤、骨肉瘤、横纹肌肉瘤、软组织肉瘤或子宫肉瘤)、塞沙瑞综合征、皮肤癌 (例如、黑色素瘤、默克尔 (Merkel) 细胞癌或非黑色素瘤皮肤癌)、小肠癌、鳞状细胞癌、睾丸癌、咽喉癌、胸腺瘤和胸腺癌、甲状腺癌、肾盂和输尿管移行细胞癌、尿道癌、子宫内膜癌、阴道癌、外阴癌或其转移性病变。

[0474] 可用本文所述多肽治疗或预防的示例性感染性疾病包括但不限于: 不动杆菌感染 (Acinetobacter infections)、放线菌病 (actinomycosis)、非洲昏睡病 (非洲锥虫病) (African sleeping sickness (African trypanosomiasis))、艾滋病 (获得性免疫缺陷综合征) (AIDS (acquired immunodeficiency syndrome))、阿米巴病 (amebiasis)、无形体病 (anaplasmosis)、血管神经病 (angiostrongyliasis)、绿僵菌病 (anisakiasis)、炭疽病 (anthrax)、溶血性杆菌感染 (arcanobacterium haemolyticum infection)、阿根廷出血热 (argentine hemorrhagic fever)、蛔虫病 (ascariasis)、曲霉菌病 (aspergillosis)、星状病毒感染 (astrovirus infection)、巴贝虫病 (babesiosis)、蜡状芽孢杆菌感染 (bacillus cereus infection)、细菌性肺炎 (bacterial pneumonia)、细菌性阴道病 (bacterial vaginosis)、拟杆菌感染 (bacteroides infection)、小袋虫病 (balantidiasis)、巴尔通体病 (bartonellosis)、蛔虫感染 (baylisascaris infection)、bk 病毒感染 (bk virus infection)、黑色毛孢子菌病 (black piedra)、囊胚菌病 (blastocystosis)、芽生菌病 (blastomycosis)、玻利维亚出血热 (bolivian hemorrhagic fever)、肉毒杆菌中毒 (和婴儿肉毒杆菌中毒) (botulism (and infant botulism))、巴西出血热 (brazilian hemorrhagic fever)、布鲁氏菌病 (brucellosis)、腺鼠疫 (bubonic plague)、伯克霍尔德氏菌感染 (burkholderia infection)、布鲁里溃疡 (buruli ulcer)、杯状病毒感染 (诺如病

毒和沙波病毒) (calicivirus infection(norovirus and sapovirus))、弯曲杆菌病 (campylobacteriosis)、念珠菌病(念珠菌;鹅口疮) (candidiasis(moniliasis;thrush))、毛细血管炎(capillariasis)、腐肉病(carrion's disease)、猫抓病(cat-scratch disease)、蜂窝织炎(cellulitis)、南美锥虫病(美洲锥虫病) (chagas disease(american trypanosomiasis))、软性下疳(chancroid)、水痘(chickenpox)、基孔肯雅病(chikungunya)、衣原体感染(chlamydia)、肺炎衣原体感染(台湾急性呼吸道疾病或twar) (chlamyphila pneumoniae infection(taiwan acute respiratory agent or twar))、霍乱(cholera)、色真菌病(chromoblastomycosis)、壶菌病(chytridiomycosis)、支睾吸虫病(clonorchiasis)、艰难梭菌结肠炎(clostridium difficile colitis)、球孢子菌病(coccidioidomycosis)、科罗拉多蜱热(colorado tick fever(CTF))、普通感冒(急性病毒性鼻咽炎;急性鼻炎) (common cold(Acute viral rhinopharyngitis;Acute coryza))、克雅氏病(Creutzfeldt-Jakob disease(CJD))、克里米亚-刚果出血热(Crimean-Congo hemorrhagic fever(CCHF))、隐球菌病(cryptococcosis)、隐孢子虫病(cryptosporidiosis)、皮肤幼虫迁移(cutaneous larva migrans(CLM))、环孢子虫病(cyclosporiasis)、囊尾蚴病(cysticercosis)、巨细胞病毒感染(cytomegalovirus infection)、登革热(dengue fever)、链带藻感染(desmodesmus infection)、脆弱双核阿米巴病(dientamoebiasis)、白喉(diphtheria)、裂头绦虫病(diphyllobothriasis)、麦地那龙线虫病(dracunculiasis)、埃博拉出血热(ebolavirus hemorrhagic fever)、棘球蚴病(echinococcosis)、埃立克体病(ehrlichiosis)、肠虫病(挠虫感染) (enterobiasis(pinworm infection))、肠球菌感染(enterococcus infection)、肠道病毒感染(enterovirus infection)、流行性斑疹伤寒(epidemic typhus)、感染性红斑(第五疾病) (erythema infectiosum(fifth disease))、幼儿急疹(第六疾病) (exanthem subitum(sixth disease))、片吸虫病(fascioliasis)、姜片虫病(fasciolopsiasis)、致命性家族性失眠症(fatal familial insomnia(FFI))、丝虫病(filariasis)、产气荚膜梭菌引起的食物中毒(food poisoning by clostridium perfringens)、自由生活的阿米巴感染(free-living amebic infection)、梭杆菌感染(fusobacteriuminfection)、气性坏疽(梭菌性肌坏死) (gas gangrene(clostridial myonecrosis))、地缘病(geotrichosis)、Gerstmann-**Sträussler**-Scheinker综合征(gerstmann-**sträussler**-scheinker syndrome(GSS))、贾第虫病(giardiasis)、鼻疽(glanders)、颞口线虫病(gnathostomiasis)、淋病(gonorrhea)、腹股沟肉芽肿(第五性病) (granuloma inguinale(donovanosis))、A组链球菌感染(Group A streptococcal infection)、B组链球菌感染(Group B streptococcal infection)、流感嗜血杆菌感染(haemophilus influenzae infection)、手足口病(HFMD) (Hand,foot and mouth disease(HFMD))、汉坦病毒肺综合征(Hantavirus Pulmonary Syndrome(HPS))、心脏病毒病(heartland virus disease)、幽门螺杆菌感染(helicobacter pyloriinfection)、溶血性尿毒症综合征(hemolytic-uremic syndrome(HUS))、肾综合征出血热(hemorrhagic fever with renal syndrome(HFRS))、甲型肝炎(hepatitis A)、乙型肝炎(hepatitis B)、丙型肝炎(hepatitis C)、丁型肝炎(hepatitis D)、戊型肝炎(hepatitis E)、单纯疱疹(herpes simplex)、组织胞浆菌病(histoplasmosis)、钩虫感染(hookworminfection)、人类博卡病毒感染(human bocavirus infection)、人类伊氏埃立克体病(human ewingii

ehrlichiosis)、人粒细胞无形体病(human granulocytic anaplasmosis(HGA))、人间质肺病毒感染(human metapneumovirus infection)、人单核细胞埃里希体病(Human monocytic ehrlichiosis)、人乳头瘤病毒(HPV)感染(human papillomavirus (HPV) infection)、人副流感病毒感染(Human parainfluenza virus infection)、膜壳绦虫病(Hymenolepiasis)、Epstein-Barr病毒传染性单核细胞增多症(Epstein-Barr Virus Infectious Mononucleosis (Mono))、流感(influenza (flu))、等孢子球虫病(isosporiasis)、川崎病(kawasaki disease)、角膜炎(keratitis)、金氏杆菌感染(kingella kingae infection)、库鲁病(kuru)、拉沙热(lassa fever)、军团病(legionellosis (legionnaires' disease))、军团病(庞蒂亚克热)(legionellosis (pontiac fever))、利什曼病(leishmaniasis)、麻风病(leprosy)、钩端螺旋体病(leptospirosis)、李斯特菌病(listeriosis)、莱姆病(螺旋体病)(lyme disease (lyme borreliosis))、淋巴丝虫病(象皮病)(lymphatic filariasis (Elephantiasis))、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎(Lymphocytic choriomeningitis)、疟疾(Malaria)、马尔堡出血热(Marburg hemorrhagic fever (MHF))、麻疹(Measles)、中东呼吸综合征(Middle East respiratory syndrome (MERS))、类鼻疽病(惠特摩尔病)(melioidosis (Whitmore's disease))、脑膜炎(meningitis)、脑膜炎球菌病(meningococcal disease)、后殖吸虫病(metagonimiasis)、微孢子虫病(microsporidiosis)、传染性软疣(MC) (molluscum contagiosum (MC))、猴痘(Monkeypox)、腮腺炎(Mumps)、鼠伤寒(地方性斑疹伤寒)(Murine typhus (Endemic typhus))、支原体肺炎(Mycoplasma pneumonia) (Mycoplasma pneumonia)、分枝菌病(消歧disambiguation) (Mycetoma (disambiguation))、蝇蛆病(Myiasis)、新生儿结膜炎(新生儿眼炎)(Neonatal conjunctivitis (Ophthalmia neonatorum))、(新)变异克雅氏病(vCJD ((New) Variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD)、nvCJD) (nvCJD))、诺卡氏菌病(nocardiosis)、盘尾丝虫病(河盲症)(onchocerciasis (River blindness))、肝吸虫症(opisthorchiasis)、副球菌病(南美芽生菌病)(paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis))、肺吸虫病(paragonimiasis)、巴斯德氏菌病(pasteurellosis)、头虱(头虱)(pediculosis capitis (head lice))、虱病(体虱)(pediculosis corporis (body lice))、耻骨病(阴虱)(pediculosis pubis (pubic lice)、蟹虱)(crab lice))、盆腔炎(pelvic inflammatory disease (PID))、百日咳(百日咳)(pertussis (Whooping cough))、鼠疫(plague)、肺炎球菌感染(pneumococcal infection)、肺孢子虫肺炎(pneumocystis pneumonia (PCP))、肺炎(pneumonia)、脊髓灰质炎(poliomyelitis)、普氏菌感染(prevotella infection)、原发性阿米巴脑膜脑炎(primary amoebic meningoencephalitis (PAM))、进行性多灶性白质脑病(progressive multifocal leukoencephalopathy)、鹦鹉热(psittacosis)、Q热(Qfever)、狂犬病(rabies)、复发性疾病(relapsing fever)、呼吸道合胞病毒感染(respiratory syncytial virus infection)、鼻孢子虫病(rhinosporidiosis)、鼻病毒感染(rhinovirus infection)、立克次体感染(rickettsial infection)、立克次体痘(rickettsialpox)、裂谷热(Rift Valley fever (RVF))、落基山斑疹热(Rocky Mountain spotted fever (RMSF))、轮状病毒感染(rotavirus infection)、风疹(rubella)、沙门氏菌病(salmonellosis)、SARS (严重急性呼吸系统综合症) (Severe Acute Respiratory

Syndrome)、疥疮(scabies)、血吸虫病(schistosomiasis)、败血症(sepsis)、志贺菌病(细菌性痢疾)(shigellosis(Bacillary dysentery))、带状疱疹(带状疱疹)(shingles(Herpes zoster))、天花(天花)(smallpox(Variola))、孢子菌病(sporotrichosis)、葡萄球菌食物中毒(staphylococcal food poisoning)、葡萄球菌感染(staphylococcal infection)、类圆线虫病(strongyloidiasis)、亚急性硬化性全脑炎(subacute sclerosing panencephalitis)、梅毒(syphilis)、绦虫病(Taeniasis)、破伤风(牙关紧闭症)(Tetanus(Lockjaw))、癣(理发痒)(Tinea barbae(Barber's itch))、头癣(头皮癣)(Tinea capitis(Ringworm of the Scalp))、体癣(体癣)(Tinea corporis(Ringworm of the Body))、股癣(股癣)(Tinea cruris(Jock itch))、手足癣(手癣)(Tinea manum(Ringworm of the Hand))、黑癣(Tinea nigra)、脚癣(运动员足)(Tinea pedis(Athlete's foot))、甲癣(甲癣)(Tinea unguium(Onychomycosis))、花斑癣(花斑糠疹)(Tinea versicolor(Pityriasis versicolor))、弓蛔虫病(眼部幼虫偏头痛)(Toxocariasis(Ocular Larva Migrans(OLM)))、弓蛔虫病(内脏幼虫偏头痛)(Toxocariasis(Visceral Larva Migrans(VLM)))、沙眼(Trachoma)、弓形虫病(Toxoplasmosis)、旋毛虫病(Trichinosis)、毛滴虫病(Trichomoniasis)、鞭虫病(鞭虫感染)(Trichuriasis(Whipworminfection))、肺结核(Tuberculosis)、兔热病(Tularemia)、伤寒(Typhoid fever)、斑疹伤寒(Typhus fever)、解脲支原体感染(Ureaplasma urealyticuminfection)、谷热(Valley fever)、委内瑞拉马脑炎(Venezuelan equine encephalitis)、委内瑞拉出血热(Venezuelan hemorrhagic fever)、创伤弧菌感染(Vibrio vulnificus infection)、副溶血性弧菌性肠炎(Vibrio parahaemolyticus enteritis)、病毒性肺炎(viral pneumonia)、西尼罗热(West Nile Fever)、白色脓疱(白秃疮)(white piedra(Tinea blanca))、耶尔森氏假结核感染(Yersinia pseudotuberculosis infection)、耶尔森氏菌病(yersiniosis)、黄热病(yellow fever)、寨卡热病(Zika fever)或接合菌病(zygomycosis)。

[0475] 可用本文所述多肽治疗或预防的示例性免疫病症或状况包括但不限于:爱迪生氏病(Addison's disease)、血丙种球蛋白缺乏症(agammaglobulinemia)、脱发(alopecia areata)、淀粉样变性(amyloidosis)、强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis)、抗GBM/抗TBM肾炎(anti-GBM/anti-TBM nephritis)、抗磷脂综合症(antiphospholipid syndrome(APS))、自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis)、自身免疫性内耳病(autoimmune inner ear disease(AIED))、轴突&神经元神经病变(axonal&neuronal neuropathy(AMAN))、白赛氏病(Behcet's disease)、大疱性类天疱疮(Bullous pemphigoid)、卡斯尔曼病(Castleman disease(CD))、腹腔病(Celiac disease)、锥虫病(Chagas disease)、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病(chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy(CIDP))、慢性复发性多病灶骨髓炎(chronic recurrent multifocal osteomyelitis(CRMO))、血管炎(Churg-Strauss)、疤痕性类天疱疮/良性黏膜类天疱疮(Cicatricial pemphigoid/benign mucosal pemphigoid)、科干综合症(Cogan's syndrome)、冷凝集素病(Cold agglutinin disease)、先天性心脏传导阻滞(Congenital heart block)、柯萨奇病毒性心肌炎(Coxsackie myocarditis)、CREST综合症(CREST syndrome)、克罗恩病(Crohn's disease)、疱疹性皮炎(dermatitis herpetiformis)、皮肌炎(dermatomyositis)、德维

客病 (Devic's disease (疱疹样皮炎 (neuromyelitis optica))、盘状红斑狼疮 (Discoid lupus)、德雷斯勒综合症 (Dressler's syndrome)、子宫内膜异位 (endometriosis)、嗜酸性食管炎 (eosinophilic esophagitis (EoE))、嗜酸性筋膜炎 (eosinophilic fasciitis)、结节性红斑 (erythema nodosum)、基础混合型球蛋白血症 (essential mixed cryoglobulinemia)、伊娃氏综合症 (Evans syndrome)、纤维肌痛 (fibromyalgia)、纤维化牙槽炎 (fibrosing alveolitis)、巨细胞动脉炎 (giant cell arteritis (暂时性动脉炎 (temporal arteritis)))、巨细胞心肌炎 (giant cell myocarditis)、肾小球肾炎 (Glomerulonephritis)、古德帕斯彻综合症 (Goodpasture's syndrome)、伴多血管炎的肉芽肿病 (Granulomatosis with Polyangiitis)、甲亢 (Graves' disease)、吉兰-巴雷综合症 (Guillain-Barre syndrome)、桥本氏甲状腺炎 (Hashimoto's thyroiditis)、溶血性贫血 (hemolytic anemia)、过敏性紫癜 (Henoch-Schonlein purpura (HSP))、孕期疱疹 (herpes gestationis) 或孕期类天疱疮 (pemphigoid gestationis (PG))、低 $\gamma$ 球蛋白血症 (hypogammaglobulinemia)、IgA肾炎 (IgA nephropathy)、IgG4相关硬化病 (IgG4-related sclerosing disease)、内涵体肌炎 (inclusion body myositis (IBM))、间质性膀胱炎 (interstitial cystitis (IC))、青少年关节炎 (juvenile arthritis)、青少年糖尿病 (juvenile diabetes (1型糖尿病))、青少年肌炎 (juvenile myositis (JM))、川崎病 (Kawasaki disease)、兰伯特-伊顿综合症 (Lambert-Eaton syndrome)、白细胞破裂性血管炎 (leukocytoclastic vasculitis)、扁平苔藓 (Lichen planus)、硬化性苔藓 (Lichen sclerosus)、木样结膜炎 (Ligneous conjunctivitis)、线性IgA病 (linear IgA disease (LAD))、狼疮 (lupus)、慢性莱姆病 (Lyme disease chronic)、梅尼埃病 (Meniere's disease)、显微性多血管病 (microscopic polyangiitis (MPA))、混合性结缔组织病 (mixed connective tissue disease (MCTD))、蚕蚀性角膜溃疡 (Mooren's ulcer)、Mucha-Habermann二氏病 (Mucha-Habermann disease)、多发性硬化 (multiple sclerosis (MS))、重症肌无力 (Myasthenia gravis)、肌肉发炎 (Myositis)、嗜睡症 (Narcolepsy)、视神经脊髓炎 (Neuromyelitis optica)、中性粒细胞减少症 (neutropenia)、眼瘢痕性类天疱疮 (ocular cicatricial pemphigoid)、视神经炎 (optic neuritis)、回文风湿病 (palindromic rheumatism (PR))、PANDAS (链球菌相关性儿童自身免疫性神经精神病 (Pediatric Autoimmune Neuropsychiatric Disorders Associated with Streptococcus))、副肿瘤性小脑变性 (paraneoplastic cerebellar degeneration (PCD))、阵发性睡眠性血红蛋白尿症 (Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH))、帕里博格综合症 (Parry Romberg syndrome)、睫状体平坦部炎 (Pars planitis (葡萄膜炎 (peripheral uveitis)))、Parsonnage-Turner二氏综合症 (Parsonnage-Turner syndrome)、天疱疮 (Pemphigus)、外周神经病 (peripheral neuropathy)、静脉周脑脊髓炎 (Perivenous encephalomyelitis)、恶性贫血 (pernicious anemia (PA))、POEMS综合症 (多神经病, (polyneuropathy)、器官巨大症 (organomegaly)、内分泌病 (endocrinopathy)、单克隆丙种球蛋白病 (monoclonal gammopathy)、皮肤改变 (skin changes)、结节性多动脉炎 (polyarteritis nodosa)、风湿性多肌疼 (polymyalgia rheumatica)、多肌炎 (polymyositis)、心肌梗塞后综合症 (postmyocardial infarction syndrome)、心包切开后综合症 (postpericardiotomy syndrome)、原发性胆汁性硬化 (primary biliary

cirrhosis)、原发性硬化性胆管炎(primary sclerosing cholangitis)、黄体酮皮炎(progesterone dermatitis)、牛皮癣(psoriasis)、牛皮癣性关节炎(psoriatic arthritis)、纯红细胞发育不全(pure red cell aplasia (PRCA))、坏疽性脓皮病(pyoderma gangrenosum)、雷诺氏现象(Raynaud's phenomenon)、反应性关节炎(Reactive Arthritis)、反射交感性营养不良(Reflex sympathetic dystrophy)、赖特综合症(Reiter's syndrome)、复发性软骨炎(relapsing polychondritis)、多动腿综合症(restless legs syndrome (RLS))、腹膜后纤维变性(retroperitoneal fibrosis)、风湿热(rheumatic fever)、类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis (RA))、结节病(sarcoidosis)、施密特综合症(Schmidt syndrome)、巩膜炎(scleritis)、硬皮病(scleroderma)、舒格伦综合症(Sjogren's syndrome)、精子&睾丸自身免疫病(sperm& testicular autoimmunity)、僵人综合症(Stiff person syndrome (SPS))、亚急性细菌性心内膜炎(subacute bacterial endocarditis (SBE))、苏萨克综合症(Susac's syndrome)、交感性眼炎(sympathetic ophthalmia (SO))、高安氏动脉炎(Takayasu's arteritis)、颞动脉炎/巨细胞动脉炎(temporal arteritis/Giant cell arteritis)、血小板减少性紫癜(thrombocytopenic purpura (TTP))、Tolosa-Hunt二氏综合症(Tolosa-Hunt syndrome (THS))、横贯性脊髓炎(transverse myelitis)、I型糖尿病(type 1 diabetes)、溃疡性结肠炎(ulcerative colitis (UC))、未分化结缔组织病(undifferentiated connective tissue disease (UCTD))、葡萄膜炎(uveitis)、血管炎(vasculitis)、白癜风(vitiligo)、或魏格纳肉芽肿(Wegener's granulomatosis (伴多血管炎的肉芽肿病(Granulomatosis with Polyangiitis, GPA)))。

[0476] 本文所述多肽(例如抗体分子或融合蛋白)通常以在患者系统中保持治疗有效水平的频度给药直至患者康复。例如,多肽的给药频度可实现足以使至少约1、2、5、10、20、30或40个/种多肽结合各自目标分子或细胞的血清浓度。在一个实施方式中,每1、2、3、4、5、6或7天,每1、2、3、4、5或6周,或者每1、2、3、4、5或6个月给予多肽。

[0477] 给予各种多肽(例如抗体分子或融合蛋白)的方法是本领域中已知的,或如下所述。所用多肽的适宜剂量将取决于对象的年龄和体重以及所用的具体药物。

[0478] 可单独使用多肽或将其与第二药剂偶联,所述第二药剂为例如菌类药剂(bacterial agent)、毒素或蛋白质(例如第二多肽)。该方法包括:给予需要该治疗的对象单独的多肽或与第二试剂偶联的多肽。可用多种治疗剂(例如毒素或其混合物)递送多肽。

[0479] 联合治疗

[0480] 多肽(例如抗体分子或融合蛋白)可与其他治疗联用。例如,联合治疗可包括将多肽与一种或多种其他治疗剂(例如一种或多种本文所述的其他治疗剂)共同配制和/或共同给药。在其他实施方式中,联合给予多肽和其他治疗性处理模式(例如本文所述的其他治疗性处理模式)。此类联合治疗可有利地利用较低剂量的所给治疗剂,由此避免了与各种单独治疗相关的可能毒性或并发症。

[0481] 如本文所用,“联合”给予是指在对象罹患病症之前或期间,将两种(或更多种)不同处理/治疗递送给该对象。在一个实施方式中,两种或更多种处理是预防性递送的,例如在对象罹患病症前或被诊断患有该病症前递送。在另一个实施方式中,两种或更多种处理是在对象已患有病症或已被诊断患有该病症后递送。在一些实施方式中,在第二处理开始

递送时,第一处理的递送仍在持续,由此存在重叠。有时称此为“同时”或“共同递送”。在其他实施方式中,在第一处理的递送终止后,再开始递送其他处理。在任一种这两种情况的实施方式中,处理因联合给予而更有效。例如,与若只给予第二处理而不给予第一处理所能观察到的相比,第二处理更有效(例如采用更少的第二处理观察到同样的效果,或者第二处理更大程度地减轻或减少症状),或者第一处理亦然。在一些实施方式中,与递送一种处理而不递送另一种所能观察到的相比,递送更大程度地减轻或减少或降低症状或病症相关的其他参数。两种处理的效果可部分加合、完全加合或大于加合。递送可使递送第一处理的效果在递送第二处理时仍可被检测到。

[0482] 在一个实施方式中,将多肽与第二治疗(例如其他试剂)联合给予以治疗或预防本文所述的病症。在一个实施方式中,其他试剂是第二多肽(例如抗体分子),例如不同于第一多肽(例如抗体分子)的多肽(例如抗体分子)。可联合使用的示例性多肽(例如抗体分子)包括但不限于本文所述多肽(例如抗体分子)的任何组合。在另一个实施方式中,其他试剂不是多肽(例如抗体分子)。例如,其他试剂可为小分子或核酸分子。在另一个实施方式中,第二治疗可选自手术、放疗、细胞疗法(例如干细胞疗法)或者组织或器官移植。

[0483] 在一个实施方式中,第二治疗包括选自下组的一种或多种治疗/疗法:雄激素替代疗法、抗激素疗法、抗血清疗法、自身免疫增强性疗法、生物疗法、血液辐射疗法、多支(brachy)疗法、心脏再同步疗法、细胞疗法、细胞转移疗法、螯合疗法、化疗、金疗法、钴疗法、冷压疗法、冷疗法、电休克疗法、电磁疗法、电子疗法、电疗法、酶替代疗法、表观遗传疗法、雌激素替代疗法、体外冲击波疗法、快中子疗法、氟化物疗法、基因疗法、热疗、驱虫治疗、激素疗法、激素替代疗法、宿主调节性疗法、高压氧疗法、过热疗法、免疫抑制疗法、免疫疗法、术中电子辐射疗法、术中辐射疗法、逆转疗法、激光疗法、光疗、锂疗、弱激光疗法、磁疗、磁共振疗法、医用气体疗法、营养医学疗法、分子伴侣疗法、分子疗法、单抗疗法、空气阴离子化疗法、中子捕获疗法、中子疗法、口服补液治疗、渗透疗法、氧疗、臭氧疗法、姑息治疗、局部疗法、阶段治疗、音位神经低铬疗法(phonemic neurological hypochromium therapy)、光动力疗法、光疗、光热疗法、物理疗法、增生疗法、蛋白质疗法、质子疗法、脉冲电磁场疗法、PUVA疗法、放疗、水化治疗、吸入疗法、挽救疗法、血清疗法、干细胞疗法、立体定向放射治疗、靶向治疗、热疗法、TK细胞疗法、耐受原疗法、经皮连续氧疗法、紫外线治疗或病毒疗法。

[0484] 可与本文所述多肽或组合物联合使用以治疗或预防其他病症的示例性治疗/疗法也描述于本文“治疗或预防病症的方法”部分中。

[0485] 诊断方法

[0486] 在一些方面中,本公开提供了用于体外检测(例如生物样品中,如活检样品或体液(例如血液、尿液或脑脊液)样品)或体内检测(例如对象的体内成像)目标分子(例如蛋白质)或细胞存在的诊断方法。所述方法包括:(i)使样品接触本文所述的多肽(例如本文所述的抗体分子),或将多肽(例如抗体分子)给予对象;(可任选地)(ii)使参比样品(例如对照样品(例如对照生物样品,如活检或体液(例如血液、尿液或脑脊液)样品))或对照对象接触本文所述的多肽(例如本文所述的抗体分子);以及(iii)检测该多肽(例如抗体分子)与样品或对象中目标分子或细胞或者与对照样品或对象之间的复合物的形成,其中样品或对象中复合物的形成相对于对照样品或对象发生变化(例如统计学显著的变化)指示了样品中

目标分子或细胞的存在。多肽(例如抗体分子)可直接或间接用可检测物质标记,以有助于检测结合或未结合的多肽(例如抗体分子)。合适的可检测物质包括如本文所述的各种酶、辅基、荧光材料、发光材料、和放射性材料。

[0487] 术语“样品”在涉及用于检测细菌的样品时包括但不限于:细胞,细胞裂解物,细胞的蛋白质或膜提取物,体液(如血液、尿液或CSF)或组织样品(如活检样品)。

[0488] 可如下检测多肽(例如抗体分子)和目标分子或细胞之间复合物的形成:测定结合目标分子或细胞的多肽(例如多肽分子)或未结合的多肽(例如抗体分子),或者使其可视化。任何合适的检测方法均可使用,常规检测方法包括酶联免疫测试(ELISA)、放射免疫测试(RIA)或组织免疫组化法。作为标记多肽的替代,样品中目标分子和细胞的存在还可通过采用以可检测物质标记的标准物质和无标记多肽的竞争性免疫测试法来测定。在该测试中,合并生物样品、有标记标准物质和多肽,并测定与无标记结合分子结合的有标记标准物质的量。样品中目标分子或细胞的量与结合于多肽(例如抗体分子)的有标记标准物质的量成反比。

[0489] 本文所述的多肽(例如抗体分子)可用于病症的诊断,所述病症可用本文所述的多肽治疗或预防。本文所述的检测或诊断方法可与本文所述的其他方法联合以治疗或预防本文所述的病症。

[0490] 本公开还包括如下编号段落中的任意内容:

[0491] 1.一种包含Fc区的多肽,其中,所述Fc区包含突变,其中,所述多肽具有如下特征中的3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13项或全部:

- [0492] a) 与参比多肽相比,在pH6.0~6.5时,对新生儿Fc受体(FcRn)的结合亲和力提高;
- [0493] b) 与在pH 7.0~7.4时对FcRn的结合亲和力相比,在pH 6.0~6.5时的结合亲和力更高;
- [0494] c) 在pH 6.0~6.5时以300nM或更低的解离常数( $K_d$ )结合FcRn;
- [0495] d) 在pH 7.0~7.4时,以50nM或更高的 $K_d$ 结合FcRn;
- [0496] e) 与参比多肽相比,对Fc  $\gamma$  受体的结合亲和力相同、基本上相同或提高;
- [0497] f) 与参比多肽相比,热稳定性相同或基本上相同;
- [0498] g) 与参比多肽相比,对C1q的结合亲和力相同、基本上相同或提高;
- [0499] h) 与参比多肽相比,对TRIM21的结合亲和力相同、基本上相同或提高;
- [0500] i) 与参比多肽相比,效应功能相同、基本上相同或提高;
- [0501] j) 与参比多肽相比,体内半衰期延长;
- [0502] k) 与参比多肽相比,体外、离体或体内生物功能相同、基本上相同或提高;
- [0503] l) 与参比多肽相比,可开发性特征相同、基本上相同或提高;
- [0504] m) 与参比多肽相比,对表位的结合亲和力、特异性或这两者相同、基本上相同或提高;
- [0505] n) 与参比多肽相比,黏膜摄取提高;

[0506] 其中,所述多肽至少具有特征a)、b)以及特征e)、f)、g)、h)或i)中的一项、两项、三项、四项或全部。

[0507] 2.如段落1所述的多肽,其至少具有特征a)、b)、c)、d)以及特征e)、f)、g)、h)或i)中的一项、两项、三项、四项或全部。

[0508] 3. 如段落1或2所述的多肽,其至少具有特征a)、b)、特征e)、f)、g)、h)或i)中的一项、两项、三项、四项或全部,以及特征c)、d)、j)、k)、l)、m)或n)中的一项、两项、三项、四项、五项、六项或全部。

[0509] 4. 如段落1~3中任一段所述的多肽,通过基于Octet的测试或基于细胞的测试测定,所述多肽与参比多肽相比,在pH 6.0时对FcRn的结合亲和力至少提高1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40或50倍。

[0510] 5. 如段落1~4中任一段所述的多肽,通过基于Octet的测试或基于细胞的测试测定,所述多肽在pH 6.0时对FcRn的结合亲和力相比pH7.4下的结合亲和力至少高1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20或50倍。

[0511] 6. 如段落1~5中任一段所述的多肽,通过基于Octet的测试或基于细胞的测试测定,所述多肽在pH 6.0时结合FcRn的解离常数( $K_d$ )为250nM或更低、200nM或更低、150nM或更低、100nM或更低、50nM或更低、25nM或更低、10nM或更低、5nM或更低、2nM或更低、1nM或更低、0.5nM或更低、0.2nM或更低、0.1nM或更低、0.05nM或更低、0.02nM或更低、0.01nM或更低、25nM~0.1nM、20nM~0.5nM、15nM~1nM、10nM~5nM或20nM~10nM。

[0512] 7. 如段落1~6中任一段所述的多肽,通过基于Octet的测试或基于细胞的测试测定,所述多肽在pH 7.4时结合FcRn的 $K_d$ 为60nM或更高、80nM或更高、100nM或更高、150nM或更高、200nM或更高、500nM或更高、50nM~500nM或100nM~250nM。

[0513] 8. 如段落1~7中任一段所述的多肽,通过基于Octet的测试或基于细胞的测试测定,所述多肽与参比多肽相比,对Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RIIa/b或Fc $\gamma$ RIII中之一、之二或全部的结合亲和力降低不超过10%、20%、30%、40%或50%,或者对Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RIIa/b或Fc $\gamma$ RIII中之一、之二或全部的结合亲和力提高至少1.5、2、3、4或5倍。

[0514] 9. 如段落1~8中任一段所述的多肽,通过宝石橙染色测试测定,所述多肽与参比多肽相比,解链温度的提高或降低不超过1°C、2°C、3°C、4°C、5°C、6°C、7°C、8°C、9°C或10°C。

[0515] 10. 如段落1~9中任一段所述的多肽,通过ELISA测定,所述多肽与参比多肽相比,对C1q的结合亲和力降低不超过10%、20%、30%、40%或50%,或者对C1q的结合亲和力提高至少1.5、2、3、4或5倍。

[0516] 11. 如段落1~10中任一段所述的多肽,通过ELISA测定,所述多肽与参比多肽相比,对TRIM21的结合亲和力降低不超过10%、20%、30%、40%或50%,或者对TRIM21的结合亲和力提高至少1.5、2、3、4或5倍。

[0517] 12. 如段落1~11中任一段所述的多肽,与参比多肽相比,所述多肽使补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)或抗体依赖性细胞内中和作用作用(ADIN)中的一项、两项、三项或全部降低超过10%、20%、30%、40%或50%,或者所述多肽使补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)或抗体依赖性细胞内中和作用作用(ADIN)中的一项、两项、三项或全部提高至少1.5、2、3、4或5倍。

[0518] 13. 如段落1~12中任一段所述的多肽,通过在动物模型中的测定,与参比多肽相比,所述多肽的体内半衰期延长至少1.5、2、3、4、5、6、7、8、9或10倍。

[0519] 14. 如段落1~13中任一段所述的多肽,与参比多肽相比,所述多肽的体外、离体或体内生物功能降低不超过10%、20%、30%、40%或50%,或者所述多肽的体外、离体或体内

生物功能提高至少1.5、2、3、4或5倍。

[0520] 15. 如段落1~14中任一段所述的多肽,与参比多肽相比,所述多肽稳定性、可溶性、聚集或表达水平中一项、两项、三项或全部的改变不超过10%、20%、30%、40%或50%。

[0521] 16. 如段落1~15中任一段所述的多肽,与参比多肽相比,所述多肽的结合亲和力、特异性或这两者降低不超过10%、20%、30%、40%或50%,或者所述多肽的结合亲和力、特异性或这两者提高至少1.5、2、3、4或5倍。

[0522] 17. 如段落1~16中任一段所述的多肽,通过转胞吞测试测定,与参比多肽相比,所述多肽的黏膜摄入提高至少1.5、2、3、4、5、6、7、8、9或10倍。

[0523] 18. 如段落1~4或8-17中任一段所述的多肽,其中参比多肽包含野生型Fc区,包含如下序列的Fc区:SEQ ID NO:1的氨基酸序列,或与其具有至少约85%、90%、95%、99%或更高相同性的氨基酸序列,或区别不超过1、2、5、10或15个氨基酸残基。

[0524] 19. 如段落1~18中任一段所述的多肽,其中突变在CH2结构域中的残基中。

[0525] 20. 如段落1~18中任一段所述的多肽,其中突变在CH3结构域中的残基中。

[0526] 21. 如段落1~20中任一段所述的多肽,其包含至少一个CH2结构域中残基中的突变以及至少一个CH3结构域中残基中的突变。

[0527] 22. 如段落1~21中任一段所述的多肽,其还包含除CH2结构域和/或CH3结构域之外结构域残基中的突变。

[0528] 23. 如段落1~22中任一段所述的多肽,其中突变不改变或不实质性改变CH2结构域和CH3结构域间的接头区构象。

[0529] 24. 如段落1~23中任一段所述的多肽,其中突变不在表面区上引入3、4、5、6、7、8、9、10或更多个连续疏水或芳族残基。

[0530] 25. 如段落1~24中任一段所述的多肽,其包括抗体分子。

[0531] 26. 如段落1~25中任一段所述的多肽,其包括IgG。

[0532] 27. 如段落1~26中任一段所述的多肽,其包括IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

[0533] 28. 如段落1~27中任一段所述的多肽,其包括重链免疫球蛋白可变区、轻链免疫球蛋白可变区、或这两者。

[0534] 29. 如段落1~28中任一段所述的多肽,其包含两个重链免疫球蛋白可变区和两个轻链免疫球蛋白可变区的四聚体。

[0535] 30. 如段落1~29中任一段所述的多肽,其包括全长抗体分子。

[0536] 31. 如段落1~30中任一段所述的多肽,其包括抗体分子的片段。

[0537] 32. 如段落1~31中任一段所述的多肽,其包括嵌合抗体分子或鼠抗体分子。

[0538] 33. 如段落1~32中任一段所述的多肽,其包括人抗体分子或人源化抗体分子。

[0539] 34. 如段落1~24中任一段所述的多肽,其包括融合蛋白。

[0540] 35. 如段落1~34中任一段所述的多肽,其包括以下1、2、3、4项或全部:

[0541] (i) 与FcRn相互作用的表面区中的残基突变;

[0542] (ii) 沿Fc-FcRn界面的外围残基中的残基突变;

[0543] (iii) Fc-FcRn结合中非接触残基中的残基突变;

[0544] (iv) 增强螺旋构象动力学表现的螺旋接触残基中的残基突变,所述螺旋包含P247、K248、D249、T250、L251或M252中的1、2、3、4、5个或全部;或

- [0545] (v) 调节组氨酸pK和/或沿Fc-FcRn界面引入组氨酸的突变。
- [0546] 36. 如段落1~35中任一段所述的多肽,其包含与FcRn相互作用的表面区中残基的突变。
- [0547] 37. 如段落36所述的多肽,其中,所述突变位于选自下组的残基中:L251、I253、R255、P257、H285、N286、K288、T307、V308、L309、Q311、L314、H310、H433、N434、H435或Y436。
- [0548] 38. 如段落1~37中任一段所述的多肽,其包含选自下组残基中2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16个或全部残基中的多个突变:L251、I253、R255、P257、H285、N286、K288、T307、V308、L309、Q311、L314、H310、H433、N434、H435或Y436。
- [0549] 39. 如段落1~38中任一段所述的多肽,其包含沿Fc-FcRn界面的外围残基中的突变。
- [0550] 40. 如段落39所述的多肽,其中,所述突变发生在选自M252、T256、T307、L309、Q311、H433、N434、Y436、N286或K288的残基中。
- [0551] 41. 如段落1~40中任一段所述的多肽,其包含选自下组残基中2、3、4、5、6、7、8、9个或全部残基中的多个突变:M252、T256、T307、L309、Q311、H433、N434、Y436、N286或K288。
- [0552] 42. 如段落1~40中任一段所述的多肽,其包含位于Fc-FcRn结合非接触残基中的突变。
- [0553] 43. 如段落42所述的多肽,其中,所述突变发生在选自A287、V308、N315、L314、L432、H429、E430或A431的残基中。
- [0554] 44. 如段落1~43中任一段所述的多肽,其包含选自下组残基中2、3、4、5、6、7个或全部残基的多个突变:A287、V308、N315、L314、L432、H429、E430或A431。
- [0555] 45. 如段落1~44中任一段所述的多肽,其包含增强螺旋构象动力学表现的螺旋接触残基中的残基突变,所述螺旋包含P247、K248、D249、T250、L251或M252中的1、2、3、4、5个或全部。
- [0556] 46. 如段落45所述的多肽,其中,所述突变发生在选自下组的残基中:P244、P245、T250、L251、P247、E380、M428、A378、D376、P257、V308、A287、L306或H427。
- [0557] 47. 如段落1~46中任一段所述的多肽,其包含选自下组残基中2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13个或全部残基中的多个突变:P244、P245、T250、L251、P247、E380、M428、A378、D376、P257、V308、A287、L306或H427。
- [0558] 48. 如段落1~47中任一段所述的多肽,其包含沿Fc-FcRn导入组氨酸的突变。
- [0559] 49. 如段落1~48中任一段所述的多肽,其包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个表1中的突变或一个或多个表1中突变的组合。
- [0560] 50. 如段落1~49中任一段所述的多肽,其中,所述突变不是M252Y、S254T、T256E、L309N、T250Q、M428L、N434S、N434A、T307A、E380A、N434A、M252Y、S254T、T256E或其组合。
- [0561] 51. 如段落1~50中任一段所述的多肽,其中,所述突变不是如下残基的突变:M252Y、S254T、T256E、L309N、T250、M428、N434、N434、T307、E380、N434、M252、S254、T256或其组合。
- [0562] 52. 如段落1~51中任一段所述的多肽,其不具有1、2、3、4、5、6、7、8、9种或全部以下单突变或多突变:(i)M252Y、S254T和T256E;(ii)L309N;(iii)T250Q和M428L;(iv)M428L和N434A;(v)N434A;(vi)T307A、E380A和N434A;(vii)M252W;(viii)V308F;(ix)V308F和

N434Y;或(x)H435A。

[0563] 53.如段落1~52中任一段所述的多肽,其包含选自下组的第一突变:M252Y、S254T、T256E、L309N、T250Q、M428L、N434S、N434A、T307A、E380A、N434A、M252Y、S254T或T256E,以及选自表1中的第二突变,所述第二突变不是M252Y、S254T、T256E、L309N、T250Q、M428L、N434S、N434A、T307A、E380A、N434A、M252Y、S254T和T256E。

[0564] 54.如段落1~53中任一段所述的多肽,其还在Fc区中包含提高效应功能的突变。

[0565] 55.如段落54所述的多肽,其中,所述突变发生在选自S239、A330、I332、F243、G236或其组合的残基中。

[0566] 56.如段落1~55中任一段所述的多肽,其还在Fc区中包含降低效应功能的突变。

[0567] 57.如段落56所述的多肽,其中,所述突变发生在选自K322、L234、L235、P331、N297或其组合的残基中。

[0568] 58.如段落1~57中任一段所述的多肽,其中,所述Fc区包含:

[0569] (a)选自下组突变组合中的1、2、3、4、5种或全部:T256D/Q311V/A378V、H285N/T307Q/N315D、H285D/T307Q/A378V、T307Q/Q311V/A378V、T256D/N286D/T307R/Q311V/A378V或T256D/T307R/Q311V;

[0570] (b)能够干扰Fc效应功能的突变或突变组合,或者

[0571] (c) (a)和(b)。

[0572] 59.如段落1~58中任一段所述的多肽,其包含选自下组的残基中的突变:(i) T256、Q311和A378;(ii) H285、T307和N315;(iii) H285、T307和A378;(iv) T307、Q311和A378;(v) T256、N286、T307、Q311和A378;或(vi) T256、H285、T307、Q311和A378。

[0573] 60.如段落1~59中任一段所述的多肽,其包含选自下组的突变:(i) T256D、Q311V和A378V;(ii) H285N、T307Q和N315D;(iii) H285D、T307Q和A378V;(iv) T307Q、Q311V和A378V;(v) T256D、N286D、T307R、Q311V和A378V;或(vi) T256D、H285D、T307R、Q311V和A378V。

[0574] 61.如段落1~60中任一段所述的多肽,其还包含Fc区之外区域中的突变。

[0575] 62.如段落1~61中任一段所述的多肽,其包含多个突变,其中至少一个突变是补偿性或有益突变。

[0576] 63.如段落1~62中任一段所述的多肽,其为分离的多肽。

[0577] 64.如段落1~62中任一段所述的多肽,其为合成多肽。

[0578] 65.一种组合物,其包含段落1~64中任一段所述的多肽。

[0579] 66.如段落65所述的组合物,其还包含药学上可接受的载剂。

[0580] 67.一种核酸分子,其编码段落1~64中任一段所述的多肽。

[0581] 68.一种载体,其包含段落67所述的核酸分子。

[0582] 69.一种细胞,其包含如段落67所述的核酸分子或如段落68所述的载体。

[0583] 70.一种试剂盒,其包含如段落1~64中任一段所述的多肽以及该多肽的使用说明。

[0584] 71.一种容器,其包含段落1~64中任一段所述的多肽。

[0585] 72.一种生产多肽的方法,所述方法包括:在允许产生抗体分子的条件下培养段落69所述的细胞,从而生产所述多肽。

[0586] 73.如段落72所述的方法,其还包括分离或纯化所述多肽。

[0587] 74.一种治疗病症的方法,所述方法包括给予有此需要的对象有效量的如段落1~64中任一段所述的多肽或者如段落65或66所述的组合物,由此治疗所述病症。

[0588] 75.如段落1~64中任一段所述的多肽或如段落65或66所述的组合物,其用于治疗对象中的病症。

[0589] 76.如段落1~64中任一段所述的多肽或如段落65或66所述的组合物在制备用于治疗对象中的病症的药物中的用途。

[0590] 77.一种检测分子的方法,所述方法包括使来自对象的细胞或样品接触如段落1~64中任一段所述的多肽,从而检测所述分子。

[0591] 实施例

[0592] 开发了基于结构和网络的框架以研究IgG与多种Fc受体(例如,FcRn、C1q、TRIM21、Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RIIa/b和Fc $\gamma$ RIIIa)的接合。采用该框架,鉴定了控制Fc-FcRn相互作用的特征以及增强以pH特异性方式结合FcRn的多种不同途径。网络分子为研究FcRn优化突变对远端Fc $\gamma$ R接合的别构影响提供了一系列工具。应用这些原理,工程化改造了一系列不同的Fc变体,它们具有很强的生物物理性能来增强FcRn结合,并增强野生型样的结合,由此活化受体。已显示包含这些Fc变体的对照多肽的半衰期改善了9倍以上,并具有强的效应功能,例如由TRIM21介导的ADIN、ADCC、ADCP和CDC。

[0593] 实施例1:Fc-FcRn相互作用结构表征和分子特征

[0594] 最近报道了人FcRn蛋白与人IgG1的Fc区和人血清白蛋白复合的共结晶结构(Oganesyan等.,J Biol Chem,2014.289(11):7812-2)。结构检视(图20A)显示FcRn分子的 $\alpha$ 和 $\beta$ 亚基均参与和Fc区的结合,与Fc区的CH2和CH3结构域均接触。初级相互作用由FcRn侧的 $\alpha$ 亚基和Fc侧的CH2结构域介导。结合的pH特异性性质缘于第310位和第435位(Kabat编号)的组氨酸残基,这些组氨酸残基在酸性pH下质子化并与FcRn第115位的谷氨酸和第130位的天冬氨酸发生关键性的接触。这两个组氨酸残基中任一个的突变都会显著降低Fc与FcRn的结合亲和力(Oganesyan等.,J Biol Chem,2014.289(43):29874-80;Raghavan等.,Biochemistry,1995.34(45):14649-57)。在H310和H435之外,许多其他Fc残基(L251、I253、R255、P257、H285、N286、K288、T307、V308、L309、Q311、L314、H433、N434和Y436)也参与与FcRn的分子接触。

[0595] 已解析了Fc在不同pH时的结构(Crispin等,Proc Natl Acad Sci U S A,2013.110(38):E3544-6;Ahmed等.,J Mol Biol,2014.426(18):3166-79;Chen等,ACS Chem Biol,2016.11(7):1852-61)。将Fc在pH 4.0(pdb id 4BYH)和在6.5(pdb id 4Q7D)时的晶体结构重叠显示出许多细微的变化,包括250-螺旋的侧向移位以及CH2相对取向的差异(图20B)。由于FcRn结合氨基酸残基例如M252和I253位于250-螺旋上,所观察到的该螺旋移位预期将影响FcRn结合(Oganesyan等.,J Biol Chem,2014.289(11):7812-2)。此外,CH2相对于CH3的相对取向差异突显了CH2结构域的构象柔性(图20B)(Frank等.,J Mol Biol,2014.426(8):1799-811)。由于发现FcRn-Fc界面包括Fc的CH2/CH3两结构域,CH2结构域的构象动力学也预期会影响FcRn结合。在酸性和中性pH、存在或不存在FcRn的条件下对Fc残基的氘代替换研究显示:FcRn结合Fc分子为其结合Fc残基提供保护;但是,在不存在FcRn分子的情况下,250-螺旋残基在酸性pH时显示增强的氘代替换,这表面pH变化诱导了该区域的构象变化(Walters等.,J Biol Chem,2016.291(4):1817-25;Jensen等.,Mol Cell

Proteomics, 2017.16 (3) :451-456)。

[0596] Fc与FcRn在酸性pH时的接合强度分析揭示了人FcRn与人Fc区以弱亲和力结合( $> 600\text{nM}$ )。动力学参数还显示:虽然Fc-FcRn相互作用的结合速率( $k_{\text{on}} \sim 10^5\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )与典型的抗体-抗原相互作用类似,但其较低的亲和力主要是缘于Fc-FcRn相互作用的快解离速率( $k_{\text{off}} \sim 0.1\text{s}^{-1}$ ) (Suzuki等, *J Immunol*, 2010.184(4) :1968-76)。CH2亚结构域的构象柔性被认为与FcRn结合的 $k_{\text{off}}$ 不佳有关。改善Fc-FcRn相互作用的解离速率可成为改善半衰期的重要方面(Datta-Mannan等, *J Biol Chem*, 2007.282(3) :1709-17)。

[0597] 以此为目标,鉴别了四组Fc残基,对其进行突变能干预FcRn相互作用和解离速率( $k_{\text{off}}$ ) (图21A)。这包括与FcRn直接接触的残基、具有改变相互作用界面潜力的外围和非表面暴露残基、以及具有影响250-螺旋动力学潜力的残基。实际上,先前已对这些位置中的一些进行了研究,半衰期增强性突变体,如M252Y/S254T/T256E (YTE)、M428L/N434S (LS)、T307A/E380A/N434A (AAA)、T250Q/M428L (QL)、V308P包含所列位点的突变组合。

[0598] 在该分析中,先以计算机模拟研究了各残基的作用,然后鉴定了残基介导的相互作用网络(图21B)。设计了突变的特定组以增强Fc-FcRn界面中的疏水相互作用以及增强Fc-FcRn界面周围的极性和静电相互作用。靠近界面的非接触残基的突变可增强静电互补并通过降低 $k_{\text{off}}$ 速率增强亲和力(Lee and Tidor, *Protein Sci*, 2001.10(2) :362-77; Whitehead等, *Nat Biotechnol*, 2012.30(6) :543-8)。Fc上的FcRn结合位点与胞内受体TRIM21、用于抗体纯化的蛋白A以及CDC活性中IgG六聚化过程中形成的Fc-Fc相互作用界面的结合位点有重叠。评估了各位置处的取代对与TRIM21、蛋白A和Fc的这些结合的影响。选择多于30个不同位置做取代。基于如下指导原则设计了单独突变的组合:(a) 避免引入大量电荷或疏水性以尽可能减少与溶剂离子结合而影响IgG的热稳定性;以及(b) 引入相互作用类型的多样性,而不仅仅是静电或疏水相互作用; (c) 包括跨CH2和CH3结构域的突变。基于这些考量,设计了超过150种独特的突变组合,并进行了试验性评估。

[0599] 重组表达在埃克托单抗(actoxumab)或莫维珠单抗(motavizumab) Fab上纳入设计的Fc变体的IgG1,并通过生物层干扰量度法采用如下这两种不同的方案来评价其与人FcRn的结合:FcRn位于NiNTA生物传感器上,以IgG为分析物;以及IgG位于抗CH1生物传感器上,以FcRn为分析物。用这些测试来量化pH 6.0时的结合,然后是pH 6.0和pH 7.4解离,以及pH 7.4时的结合和解离(图11A)。在P257和V308掺入突变的Fc变体在pH 6.0时具有高亲和力,但在pH 7.4时的解离速率显著更慢,因此不考虑对它们进行进一步分析。与具有野生型Fc的IgG相比,超过10种不同变体的 $K_d$ 降低了5倍以上。并且,这些变体使 $k_{\text{off}}$ 降低超过2.5倍(图22)。

[0600] 从复合物晶体结构可确定,Fc结构域上的FcRn结合位点与蛋白A和Trim21的结合位点重叠程度很高(图27A)。Fc结构域还结合C1q以介导CDC,但是C1q结合位点与Fc上的FcRn结合位点不重叠。C1q天然以六聚体存在,预期Fc结构域的同六聚体组合与C1q结合更佳且CDC更佳。用于形成同六聚体的Fc-Fc界面与FcRn结合位点重叠(图27A)。将Fc结构域晶体结构重叠显示:这些结构中的CH2结构域相对于CH3结构域的取向变化证明了CH2结构域的构象柔性(图27B)。由于FcRn结合位点位于同时跨CH2和CH3结构域的界面上,该构象柔性对其结合可能是重要的。

[0601] 实施例2:Fc区突变对pH特异性Fc-FcRn结合的作用

[0602] 通过Octet评估了Fc变体FcMut008和FcMut015的FcRn结合亲和力。用抗CH1抗体将抗体固定在Octet尖端上,FcRn在溶液中。如图6所示,FcMut008和FcMut015对FcRn的亲和力提高。该结合是pH特异性的,在pH 6.0观察到结合提高。

[0603] 实施例3:基于细胞的FcRn结合竞争试验

[0604] 基于细胞的竞争试验提供了稳健特异性线性试验来显示Fc变体相对结合中的差异。通过瞬时转染FcRn $\alpha$ 和 $\beta$ 2m来获得FcRn表达细胞。在pH 6.0用IgG稀释物以及固定浓度的荧光标记Fc (Fc-A488) 孵育细胞。通过FACS读取细胞结合荧光。结果如图7所示。FcMut008和FcMut015在pH 6.0显示FcRn结合改善。

[0605] 实施例4:Fc区突变对Fc  $\gamma$  R接合的作用

[0606] 测定了示例性突变抗体分子与Fc  $\gamma$  RI和Fc  $\gamma$  RIIIa的结合。如图8所示,FcMut008和FcMut015保持并在某些情况下增强了Fc  $\gamma$  R接合。

[0607] 实施例5:Fc区突变对热稳定性的作用以及Fc变体的生物物理表征

[0608] 测定了示例性突变抗体分子的热稳定性。用SYPRO橙测定热稳定性。如图9所示,FcMut008和FcMut015保留了高的解链温度。

[0609] 试验性评估了掺入示例性Fc变体对生物物理属性的影响。在SE-HPLC上测试了在莫维珠单抗Fab上纳入Fc变体的IgG。所有样品按与野生型Fc相似的保留时间洗脱,并显示净单体谱,未检测到聚集体(图23)。还采用差示扫描荧光分析法(DSF)评估了IgG的CH2和CH3结构域热稳定性。如差示扫描量热法所测,野生型人CH2和CH3结构域的解链温度( $T_m$ )分别约为70°C和81.5°C (Ionescu等, J Pharm Sci, 2008. 97 (4) : 1414-26)。本实施例中DSF试验结果获得相似的结果,CH2和CH3的 $T_m$ 分别为68.8°C和80.8°C。有报导称长半衰期延Fc变体YTE可使CH2结构域的 $T_m$ 降低6.7°C (Majumdar等, MAbs, 2015. 7 (1) : p. 84-95.)。在本实施例中所描述的试验中,YTE的CH2结构域的 $T_m$ 比野生型低7.2°C。此外,第247、257和308位的突变显著影响CH2的 $T_m$ 。示例性Fc变体 (FcMut183、FcMut197、FcMut213、FcMut215、FcMut228、FcMut229) 是热稳定的,其CH2结构域的 $T_m$ >64°C (图23)。

[0610] 实施例6:在转基因小鼠模型中评估Fc变体

[0611] Tg32小鼠为纯合体、8周龄雄性。每个测试项目组有4只小鼠。测试项目包括CDA1-WT、CDA1-FcMut008和CDA1-FcMut015。小鼠的IV给药剂量为10mg/Kg。在13个时间点(1h、8h、1d、2d、3d、4d、6d、8d、10d、13d、16d、19d和22d) 采集数据。通过ELISA采用抗hIgG多克隆抗体来定量人IgG。

[0612] Tg32是人FcRn转基因小鼠模型,其可用于药物开发的早期评估以及单克隆抗体的人体药代动力学预测。Tg32纯合小鼠中单克隆抗体清除与人体中单克隆抗体的清除最相关 (Avery等. MAbs. 2016; 8 (6) : 1064-78)。

[0613] 已知CDA1 (埃克托单抗) 在人体中的半衰期>25天。采用其他mAb在Tg32模型中进行了体内评估。也可在Tg276小鼠上评估不同构建体,据报道IgG变体之间于此具有更大的半衰期差异。结果示于表2和图10。FcMut015增加CDA1在Tg32小鼠中的半衰期。

[0614] 表2. 示例性抗体分子在Tg32纯合小鼠中的半衰期

分组	t <sub>1/2</sub> (小时)	C <sub>最大</sub> (ug/ml)	C <sub>最终</sub> (ug/ml)	AUC <sub>无穷大</sub> (h*ug/ml)	Rsq
[0615] WT	<b>261.17</b>	116.03	15.40	24108.03	0.99
FcMut008	<b>231.92</b>	131.33	15.74	25687.39	0.99
FCMut015	<b>436.69</b>	151.82	27.69	42735.9	0.93

[0616] 实施例7: 示例性抗体的Fc工程化改造

[0617] 据信Fc介导了FcRn相互作用。通常Fc与FcRn的结合是pH特异性的(通常在pH7.4时结合很少或没有结合,而在酸性环境下结合强烈)。已知FcRn与IgG1的Fc区复合的结构,且各FcRn分子结合Fc单体。Fab结构域也可影响IgG与FcRn的结合。

[0618] Fc-FcRn复合物的网络分析突显了H310在与FcRn接合中的核心地位。H310与多种其他高度网络化的残基高度互联。H310群组以及近邻(相连结点)中的突变可强化H310网络。子网络分析提示了引入有利于FcRn相互作用的协同突变,其对其他Fc残基的影响最小。

[0619] 为鉴别在pH 6.0对FcRn结合改善的Fc变体,在IgG1莫维珠单抗(野生型)中工程化构造各种Fc突变。用生物层干扰量度法评估所有抗体与FcRn的结合。简而言之,用各种感兴趣的抗体加载抗CH1生物传感器(ForteBio公司)。使负载的生物传感器与重组FcRn蛋白在pH 6.0下接触,以检测结合。饱和后,使生物传感器仅接触pH 6.0的缓冲液以测定FcRn从各抗体的解离。结果为代表抗体结合(“on”)速率和解离(“off”)速率的应答曲线。用ForteBio软件计算这些速率,并与野生型莫维珠单抗的速率进行比较。表中示出了与野生型相比的结合速率提高倍速和解离速率降低倍数。多种抗体突变分别显著提高和降低了结合和解离速率(图11A)。还显示了代表性Fc变体与FcRn在pH 6.0~7.4范围内的结合。重要的是Fc突变抗体对FcRn的亲合力在pH 6.0时有所改善,而在较高pH(如pH 7.4)时未显著增强。图11B证明了该代表性抗体在pH 7.4时仍显示与FcRn结合不佳,这是一个理想的特征。

[0620] 图11C显示了抗体Fc的CH2结构域与FcRn分子的相互作用。本文所述的工程化改造尝试改善形状互补性(SC)、静电电荷互补性(CC)和疏水互补性(HC)。注意到Fc上对于相互作用重要的一些位置。还注意到了250螺旋。该螺旋是动态的,且根据环境pH而移动。这对于Fc区在pH 6.0而不是pH 7.4时结合FcRn是重要的。

[0621] 测试了示例性Fc变体的可开发性特征,其结果总结于图12中。进行了包括Sypro橙、SDS PAGE和SEC-HPLC的试验。对于表达测定,用ExpiFectamine按照生产商所述将构建体转染入96孔培养板中的Expi293细胞中。5~7天后,用配备有抗人CH1生物传感器的生物层干扰量度法(Octet),用莫维珠单抗标准曲线对上清液进行定量。对于蛋白A结合测评,如下进行:用ExpiFectamine按照生产商所述将构建体转染入30mL培养物中的Expi293细胞中。5~7天后,收集上清液并纯化抗体。采用生物层干扰量度法以蛋白A生物传感器测定Fc修饰抗体对蛋白A的亲合力,并与含野生型Fc结构域的抗体相比。

[0622] 在还原和非还原条件下,以SDS-PAGE分离表达的所有莫维珠单抗架构内(in the context of)的Fc变体。简而言之,将5μL水中的2μg抗体与5μL Laemmli样品缓冲液(BioRad目录号#161-0737),与β-巯基乙醇(BioRad目录号#161-0710)混合。将样品煮沸到95°C 10分钟,然后短时离心。然后,在4-12% Bis-Tris NuPAGE凝胶(Thermo Scientific# NP0321BOX)上以1×MES跑胶缓冲液在XCell SureLock凝胶电泳仪(Novex目录号#090403-

839) 中与SeeBlue Plus2分子量标准 (Invitrogen目录号#LC5925) 一起跑样。在200V跑样35分钟。用SimplyBlue SafeStain (Novex#LC6065) 根据生产商方案染胶,并在BioRad ChemiDoc MP成像系统上成像。

[0623] HPLC尺寸排阻色谱 (HPLC-SEC) 作为分析工具用于测定蛋白质表观尺寸、单体纯度以及蛋白质和二氧化硅类尺寸树脂之间非特异性柱吸附的表观水平。在Phenomenex Biosep 3000s柱上评估Fc突变对IgG洗脱特征的影响。简而言之,将具有不同Fc变体的IgG在PBS pH 7.4中稀释为1mg/ml,取20 $\mu$ L注入柱中。记录洗脱时间和纯度百分比。

[0624] 用差示扫描荧光分析法 (DSF) 测定mAb的热稳定性。DSF检测热应力升高作用下蛋白质的构象稳定性。染料SYPRO ORANGE<sup>®</sup>在疏水环境 (如在热引发的蛋白质解折叠或变性时露出疏水核心残基) 下发荧光。通过监测荧光信号,可监测CH<sub>2</sub>、CH<sub>3</sub>和Fab的解折叠。在SYPRO橙试验中评估了带有莫维珠单抗Fab的各种Fc变体。简而言之,将15 $\mu$ L约0.5mg/mL的IgG与15 $\mu$ L 1:500稀释的SYPRO橙染料混合,采用具有荧光读数能力的热循环仪以1 $^{\circ}$ C的速度逐步从40 $^{\circ}$ C升温至99 $^{\circ}$ C来进行评估。将天然状态和第一解折叠事件的中点记录为转变温度或解链温度(T<sub>m</sub>)。

[0625] 将所有Fc突变导入IgG1 (m3同种型) 重链基因中,并克隆入pcDNA3.1 (C)。将轻链基因克隆入pcDNA3.1 (A)。在所有情况下,用骨粘连蛋白信号肽 (GenBank登录号#AAA60993) 替代天然信号肽。重链和轻载体的共表达如下进行:用Expi293转染试剂盒 (Thermo Fisher 目录号#A14524) 根据生产商的方案,瞬时转染入Expi293细胞。以1:2的比例共转染重链和轻链载体。在转染后5~7天收获细胞培养上清液,在AKTA 10FPLC系统 (GE公司) 上采用HiTrap MabSelect SuRe蛋白A柱 (GE公司) 根据生产商说明书进行纯化。

[0626] 采用填充有mAb select sure蛋白A树脂 (GE目录号#17543801) 的1mL柱,以AKTA purifier 10FPLC系统从细胞培养上清液中纯化所有抗体。简而言之,将无菌过滤的细胞培养上清液以2mL/分钟的流速加载到柱上。用10倍柱体积的PBSN (含0.05%叠氮钠的1 $\times$ PBS) 洗柱。用10倍柱体积的洗脱缓冲液 (100mM甘氨酸,pH 2.5) 洗脱抗体,并加入17.5%v/v中和缓冲液 (1M Tris,1M NaCl,pH 8.0) 进行中和,收集每份1mL部分的级份。用280nm的吸光度色谱图鉴定含有抗体的洗脱级份。然后用10,000道尔顿分子量截留盒 (Thermo Fisher目录号#66380) 将所有抗体透析入1 $\times$ PBS。

[0627] 所有抗体根据其能用蛋白A柱FPLC纯化的能力来功能性测定蛋白A结合。纯化后,采用Octet QK<sup>e</sup>系统和蛋白A生物传感器 (Pa11目录号#18-5012) 根据Octet数据获取软件提供的标准定量方案定量已知量的抗体来进一步评估蛋白A结合。

[0628] 用C末端具有6 $\times$ 组氨酸标签的人 $\alpha$ -FcRn编码质粒和人 $\beta$ 2M编码质粒共转染Expi293细胞。转染后4天,收集细胞培养上清液。用AKTA pure FPLC系统和HisTrap HP柱 (GE目录号#17-5247-01) 从细胞培养上清液中纯化FcRn。纯化后,将蛋白质透析入1 $\times$ PBS pH 6.0。

[0629] 采用Octet QK<sup>e</sup>系统上的抗CH1 Fab生物传感器进行筛选测试。简而言之,将10 $\mu$ g/mL纯化的IgG加载到抗CH1生物传感器上180秒。在1 $\times$ PBS pH 6.0中进行60秒的基线步骤,然后使加载有IgG的尖端 (tip) 接触浓度为50 $\mu$ g/mL的FcRn 60秒,随后在PBS pH 6.0中解离60秒,并在PBS pH 7.4中再解离30秒。此外,采用NiNTA生物传感器进行FcRn结合。简而言之,将5 $\mu$ g/mL的重组人FcRn加载到NiNTA生物传感器上180秒。1 $\times$ PBS pH 6.0中进行60秒的

基线步骤,然后使加载有FcRn的尖端(tip)接触浓度为250nM的IgG(37.5 $\mu$ g/mL)60秒,随后在PBS pH 6.0中解离60秒,并在PBS pH 7.4中再解离30秒。各测试完成后,使用ForteBio Octet软件对pH6.0的亲合常数( $K_D$ )进行定量评估,并通过绘制随时间的响应速率进行定性评估,由此显示pH6.0下IgG与FcRn的结合以及随后在pH 6.0和pH 7.4下的解离。

[0630] 如图12所示,在所有这些试验中,所有Fc变体的性能堪比野生型抗体。

[0631] 实施例8:工程化改造抗体的半衰期和药代动力学体内评估

[0632] 在工程化抗体半衰期体内评述中,比较莫维珠单抗野生型与含三种Fc工程化突变的莫维珠单抗。将抗体(2~5mg/kg)给予人FcRn转基因小鼠,并获取每日的小鼠血清样品(第0天~第4天)。对血清进行ELISA以量化血清中莫维珠单抗的量。

[0633] 采用人IgG定量ELISA试剂盒(Bethyl Labs目录号#E80-104)根据生产商的方案测定小鼠血清中存在的人IgG量。所有血清样品进行两倍系列稀释滴定,起点稀释度为1:50、终点为1:6400。各ELISA板包含随试剂盒自带人参比标准曲线,一式两份或一式三份。标准曲线包含如下浓度:500.0、250.0、125.0、62.5、31.3、15.6、7.8和3.9ng/mL。检测下限被认为是参比标准上倒数第二点的A450 nm值,其为7.8ng/mL。由于血清的起始稀释度为1:50,这使得该试验的检测水平为约0.4 $\mu$ g/mL(7.812ng/mL $\times$ 50倍稀释)。按照以下过程计算IgG水平:(1)在标准曲线上进行四参数逻辑回归(4PL);(2)将最大可接受A450 nm信号设定为标准曲线上的第三滴定点的读数;(3)将最小可接受A450 nm信号设定为标准曲线上的第七滴定点的读数;(4)屏蔽所有高于最高可接受信号和低于最小可接受信号的样品滴定点;(5)用参比标准4PL曲线拟合来计算具有可接受A450信号的各滴定点的浓度,并将该值乘以该滴定点的稀释因子;(6)对各样品滴定,计算全滴定系列计算浓度的平均值。

[0634] 以第0天时间点为100%,将ELISA结果转换成剩余抗体百分比。如图13A-13B所示,在这个用于抗体半衰期研究的成熟小鼠模型中,所有三种抗体变体均显示半衰期延长。莫维珠单抗野生型的半衰期为32小时。建立在FcMut008上的FcMut043和FcMut045突变体显示显著改善的半衰期。FcMut045突变体使半衰期延长了5.2倍(约166小时的半衰期)。用Winonlin软件计算图13B中的半衰期以及其他参数。

[0635] 对莫维珠单抗架构内的后期Fc变体进行类似的试验。当莫维珠变体以5mg/kg剂量给药时,证明了下一代变体(FcMut171、FcMut183、FcMut186和FcMut197)的半衰期进一步延长,FcMut213观察到了超过9倍的半衰期提高(图14A-14B)。纳入早期的变体之一(FcMut045)来证明与早期设计相比,后期设计具有更好的半衰期。当莫维珠变体以2mg/kg剂量给药时,观察到了类似的结果(图14C-14D)。

[0636] 为了评估Fc变体与人FcRn的结合增强是否进而提高血清持久性和延长循环半衰期,在Tg276转基因小鼠中进行了含不同Fc变体的IgG的药代动力学研究。Jackson实验室公司(JAX)已开发了表达人FcRn的转基因小鼠模型来研究含人Fc生物治疗药物的PK。Tg276小鼠没有小鼠FcRn $\alpha$ 链而在组成型启动子(肌动蛋白)的控制下表达人FcRn $\alpha$ 转基因并采用小鼠 $\beta$ 2微球蛋白。Tg276纯合或杂合小鼠已被广泛用于鉴别抗体变体的半衰期。

[0637] 对于体内研究,静脉内给药Tg276半FcRn转基因小鼠2或5mg/kg的mAb。各mAb组包含4只小鼠/组。在1小时~21天间的若干时间点采集血液,用定量ELISA如本文所述测定IgG滴度。对各组小鼠采用非房室模型和Phoenix WinNonlin 7.0版(Certera公司)来确定PK参数。

[0638] 结果示于图14A-14D。

[0639] 实施例9:工程化抗体的半衰期体内评估

[0640] 以2~5mg/kg的剂量将两种寨卡抗体(ZVA和ZVB)以及野生型莫维珠单抗(MVZ)给予人FcRn转基因小鼠,获取每日的小鼠血清样品(第0天~第4天)。在血清上进行ELISA以量化莫维珠单抗的量。以第0天时间点为100%,将ELISA结果转换成剩余抗体百分比。ZVA抗体代表了A系列抗体A-3/2。ZVB抗体代表了含亲和力增强性轻链修饰S92Y的A系列抗体A-5/1。如图15所示,ZVB的半衰期显著长于莫维珠单抗或ZVA(ZVA和ZVB的半衰期均长于莫维珠单抗)。这些抗体含野生型Fc区,由此ZVB抗体延长的半衰期是抗体本身的性质,而不是任何Fc工程化改造。

[0641] 在下个试验中,测试比较莫维珠单抗野生型(MVZ WT)和ZVB抗体(ZB-1/4,图中的ZKB)和含Fc修饰156的ZVB抗体(L234A/L235A(“LALA”)和T256D/T307R/Q311V(半衰期延长),图中的ZKB-156)以及“LS”长半衰期Fc突变(ZKB-LS)。与野生型ZVB相比,LS和Fc修饰156都显著延长半衰期(图16)。这些数据证明了Visterra突变与文献来源的LS突变相似,且还证明了本文所述的Fc工程化改造能延长已具有极长半衰期的抗体在转基因小鼠模型中的半衰期。“ZVB”在图16中示为“ZKB”。

[0642] 实施例10:与Fc受体的结合以及对效应功能的影响

[0643] 在针对Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RIIA(调理吞噬介导体)、Fc $\gamma$ RIIB、Fc $\gamma$ RIIIA(ADCC介导体)和C1q(CDC介导体)的多项试验中评估了示例性Fc变体。

[0644] 用ELISA测定了与Fc $\gamma$ 受体I、IIa、IIb、IIIa和IIIa V176F(R&D Systems目录号#1257-FC-050、1330-CD-050、1875-CD-050、4325-FC-050和8894-FC-050)的结合。所有Fc变体在莫维珠单抗、利妥昔单抗或埃克托单抗架构内接受测试。简而言之,用1 $\mu$ g/mL(0.1 $\mu$ g/孔)的PBS溶液将Fc受体涂在ELISA板上(VWR目录号#62409-002),并在4 $^{\circ}$ C储存过夜。用PBST(1 $\times$ PBS 0.05% Tween20)洗板三次。以BST-BSA中100 $\mu$ g/mL~0.05 $\mu$ g/mL三倍稀释来滴定抗体,在ELISA板的各孔中加样100 $\mu$ L并在室温下孵育1小时。用PBST洗板三次。在PBST-BSA中1:5000稀释山羊抗人Fc(Jackson目录号#109-035-098),并将100 $\mu$ L加入各孔,在4 $^{\circ}$ C孵育1小时。用PBST洗板六次。用TMB微孔过氧化物酶底物试剂盒(VWR目录号#95059-156)板上显色。10分钟后通过加入1N硫酸终止反应,测定450nm的吸光度。将抗体浓度值(x轴)和450nm的吸光度值(y轴)拟合到四参数逻辑回归(4PL)曲线。然后用曲线拟合来确定各Fc变体的EC50(4PL的中点)。

[0645] 采用生物层干扰量度法以Octet QKe系统测定与Fc $\gamma$ 受体IIa和IIb的结合。简而言之,在PBS中将Fc $\gamma$ IIa和Fc $\gamma$ IIb(R&D Systems目录号#1330-CD-050和1875-CD-050)稀释到5 $\mu$ g/mL。通过C末端6 $\times$ 组氨酸标签(SEQ ID NO:2)将受体固定化于Ni-NTA生物传感器(Pa11目录号#18-5101)180秒,然后在PBS中进行60秒的基线步骤。然后使生物传感器与PBS中浓度为50 $\mu$ g/mL的各种Fc变体接触120秒,然后在PBS中再进行另120秒的解离步骤。记录各变体在结合步骤期间的最大结合反应,并与野生型Fc反应比较。

[0646] 通过ELISA测定与C1q的结合。所有Fc变体在莫维珠单抗抗体架构内接受测试。简而言之,用25 $\mu$ g/mL(2.5 $\mu$ g/孔)的PBS溶液将受体涂在ELISA板上(VWR目录号#62409-002),并在4 $^{\circ}$ C储存过夜。用PBST(1 $\times$ PBS 0.05% Tween20)洗板三次。以PBST-BSA(1 $\times$ PBS 0.05% Tween20 1% BSA)中12.5 $\mu$ g/mL~0.02 $\mu$ g/mL三倍稀释来滴定纯化的C1q(Quidel

Corporation目录号#A400),并在室温下孵育90分钟。从孔中吸出液体,在PBST-BSA中稀释多克隆兔抗人C1q(Agilent目录号#A013602-1)至 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 的终浓度,在各孔中加样 $100\mu\text{L}$ ,并在室温下孵育1小时。用PBST洗板三次。在PBST-BSA中稀释多克隆猪抗兔HRP(Agilent目录号#P021702-2)至 $0.5\mu\text{g}/\text{mL}$ ,在各孔中加样 $100\mu\text{L}$ ,并在室温下孵育1小时。用PBST洗板六次。用TMB微孔过氧化物酶底物试剂盒(VWR目录号#95059-156)板上显色。10分钟后通过加入1N硫酸终止反应,测定450nm的吸光度。将抗体浓度值(x轴)和450nm的吸光度值(y轴)拟合到四参数逻辑回归(4PL)曲线。然后用曲线拟合来确定各Fc变体的EC50(4PL的中点)。

[0647] 结果示于图17A-17D。

[0648] 实施例11:工程化抗体的CDC活性

[0649] 检测了示例性Fc变体(利妥昔单抗Fab)的补体依赖性细胞毒性(CDC)活性。

[0650] 采用CD20+Raji细胞和低毒豚鼠补体(Cedarlane Laboratories产品号#CL4051)进行CDC测试。采用获自Promega公司(目录号#G1780)的CYTOTOX96®非放射性细胞毒性测试根据生产商的方案测定补体诱导的细胞裂解。所有Fc变体在抗CD20抗体利妥昔单抗架构内接受测试。简而言之,以 $20\mu\text{g}/\text{mL} \sim 0.005\mu\text{g}/\text{mL}$ 四倍稀释来滴定抗体浓度,并在 $37^\circ\text{C}$ 与20,000个目标细胞/孔一起孵育30分钟。然后将补体加入细胞,并在 $37^\circ\text{C}$ 再孵育2小时。此外,将CYTOTOX试剂盒自带细胞裂解缓冲液加入对照孔中以测定最大细胞裂解。用阴性对照抗体莫维珠单抗来测定非相关抗体背景信号。用背景信号和最大裂解信号来计算各Fc变体的细胞裂解百分比。将抗体浓度值(x轴)和裂解百分比值(y轴)拟合到四参数逻辑回归曲线。然后用曲线拟合来确定各Fc变体的EC50(获得50%裂解所需的浓度)和最大裂解。

[0651] 结果如图18所示。

[0652] 实施例12:工程化抗体的ADCC活性

[0653] 检测了示例性Fc变体(利妥昔单抗Fab)的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)活性。

[0654] 采用购自Promega公司(目录号#G7014)的带有CD20<sup>+</sup>WIL2-S目标细胞的ADCC报告生物测试(ADCC Reporter Bioassay),根据生产商的方案进行ADCC测试。所有Fc变体在抗CD20抗体利妥昔单抗架构内接受测试。以 $5\mu\text{g}/\text{mL} \sim 0.0016\mu\text{g}/\text{mL}$ 5倍稀释滴定抗体浓度。将抗体浓度值(x轴)和发光报告基因的诱导倍数值(y轴)拟合到四参数逻辑回归(4PL)曲线。然后用曲线拟合来确定各Fc变体的EC50(4PL的中点)和最大诱导。

[0655] 结果显示在图19A-19B中。示例性Fc变体保留并在有些情况下增强ADCC活性。

[0656] 实施例13:工程化抗体的ADIN活性

[0657] TRIM21是结合IgG的Fc的胞质受体。TRIM21在介导对Fc结合病毒的胞内识别与中和中发挥作用。TRIM21介导的中和作用被称为抗体依赖性胞内中和作用(ADIN)。

[0658] 通过ELISA测定与TRIM21的结合。所有Fc变体在莫维珠单抗或埃克托单抗抗体架构内接受测试。简而言之,用 $25\mu\text{g}/\text{mL}$ ( $2.5\mu\text{g}/\text{孔}$ )的PBS溶液将受体涂在ELISA板上(VWR目录号#62409-002),并在 $4^\circ\text{C}$ 储存过夜。用PBST( $1 \times \text{PBS}$  0.05% Tween20)洗板三次。在PBST-BSA( $1 \times \text{PBS}$  0.05% Tween20 1% BSA)中 $12.5\mu\text{g}/\text{mL} \sim 0.02\mu\text{g}/\text{mL}$ 三倍稀释滴定TRIM21-GST(Antibodies Online目录号#ABIN1323621),并在室温下孵育90分钟。从孔中吸出液体,将两种兔抗TRIM21抗体(AbCam目录号#ab91423和lab96800)在PBST-BSA中混合,各自终浓度为 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ ,在各孔中加样 $100\mu\text{L}$ ,并在室温下孵育1小时。用PBST洗板三次。在PBST-BSA中稀释多克隆猪抗兔HRP(Agilent目录号#P021702-2)至 $0.5\mu\text{g}/\text{mL}$ ,在各孔中加样 $100\mu\text{L}$ ,并在室温

下孵育1小时。用PBST洗板六次。用TMB微孔过氧化物酶底物试剂盒(VWR目录号#95059-156)板上显色。10分钟后通过加入1N硫酸终止反应,测定450nm的吸光度。将抗体浓度值(x轴)和450nm的吸光度值(y轴)拟合到四参数逻辑回归(4PL)曲线。然后用曲线拟合来确定各Fc变体的EC50(4PL的中点)。

[0659] 进行TRIM21结合ELISA来评估Fc变体是否影响与TRIM21的结合。结果如图26所示。Fc变体FcMut045、FcMut183、FcMut197、FcMut213、FcMut215、FcMut228的TRIM21结合EC50为野生型EC50的1.5倍以内。

#### [0660] 实施例14:Fc突变增强黏膜摄取

[0661] FcRn将IgG输送通过不同的细胞屏障,如衬在小肠和胚泡表面内的黏膜上皮。改变FcRn结合提供了增强黏膜区域化反应由此赋予免疫保护的途径。预期示例性Fc突变体可以类似方式增强黏膜摄取。

#### [0662] 实施例15:FcRn亲和力增强性突变对Fc受体结合以及效应功能的影响

[0663] 试验性评估了FcRn亲和力增强性突变对Fc与其他受体结合的影响。IgG的Fc区能够结合许多不同的Fc受体,且许多治疗性抗体的作用机理有赖于与Fc受体的接合。突变(即便位于远离Fc受体结合位点的突变)能够影响Fc与受体(如Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RIIa/b、Fc $\gamma$ RIIIa、C1q、TRIM21)的接合。虽然Fc受体TRIM21结合CH2-CH3上与FcRn结合位点重叠的位点,诸如Fc $\gamma$ 受体和C1q等其他受体接合于由二聚化CH2形成的界面。由此,应评估为了增强半衰期而引入的任何突变对结合其他受体的影响。为了增强半衰期而引入的突变。将Fc变体(FcMut183、FcMut197、FcMut213、FcMut215、FcMut228、FcMut229、YTE、LS)纳入利妥昔单抗Fab并与野生型利妥昔单抗一起评估它们与Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RIIa、Fc $\gamma$ RIIb、Fc $\gamma$ RIIIa、C1q和TRIM21的结合。如图24所示,导入Fc变体FcMut183、FcMut197、FcMut213、FcMut215、FcMut228和FcMut229并不显著影响与测试Fc受体的接合。

[0664] 虽然与Fc受体结合是活性(如ADCC(Fc $\gamma$ RIIIa)、CDC(C1q)和ADIN(TRIM21))所必需的,其可并不足以介导这些活性。例如,需要Fc的六聚化组装来激发CDC活性。Fc六聚体组装涉及Fc-Fc界面的形成,形成该界面所涉及的残基与FcRn结合位点部分重叠。由此,评估Fc突变对结合Fc受体的影响以及对活性(如CDC和ADCC)的影响均很重要。根据方法部分中所述,评估了带有不同Fc变体(FcMut183、FcMut197、FcMut213、FcMut215、FcMut228、FcMut229、YTE、LS、WT)的利妥昔单抗的ADCC和CDC活性。结果确认了Fc变体FcMut183、FcMut197、FcMut213、FcMut215、FcMut228和FcMut229并未对ADCC活性产生不良影响,且事实上显示了对CDC活性略有增强。含YTE的利妥昔单抗没有检测到CDC活性,且显著降低ADCC活性。同样,另一种突变体FcMut197的ADCC和CDC活性降低。考察这些突变的网络地图提供了对丧失ADCC和CDC活性可能原因的深入了解。

#### [0665] 实施例16:Fc变体在转基因小鼠血清中的优化持久性

[0666] 为了评估Fc变体与人FcRn的结合增强是否进而提高血清持久性和延长循环半衰期,在Tg276转基因小鼠中对含不同Fc变体的IgG进行了药代动力学研究。将表达人FcRn的转基因小鼠模型用于研究含人Fc生物治疗药物的PK(Roopenian等,Methods Mol Biol,2010.602:93-104;Petkova等,Int Immunol,2006.18(12):1759-69)。Tg276小鼠没有小鼠FcRn $\alpha$ 链而在组成型启动子(肌动蛋白)的控制下表达人FcRn $\alpha$ 转基因并采用小鼠 $\beta$ 2微球蛋白。可用Tg276纯合或杂合小鼠鉴别抗体变体的半衰期。对于PK研究,静脉内给予Tg276

hemi FcRn转基因小鼠5mg/kg IgG(带有野生型或修饰Fc的莫维珠单抗Fab)。在若干时间点进行眼球后穿刺血液采集,用定量ELISA测定IgG滴度。与野生型莫维珠单抗相比,含工程化Fc变体的IgG在血清中的维持时间要长得多(图25A)。获自非房室分析的药代动力学参数表明带有Fc变体的莫维珠单抗的清除速率慢了两倍以上,且显著提高了 $\beta$ 相清除半衰期和曲线下面积(AUC)测定值(图25B)。

[0667] 通过参考纳入

[0668] 本文提到的所有出版物、专利和登记号在此通过引用全文纳入本文,如同每个单独的出版物或专利被明确单独指明通过引用纳入。

[0669] 等同形式

[0670] 尽管讨论了本发明的具体实施方式,但以上说明书仅为说明性而非限制性的。本领域的技术人员阅读了本说明书和下面权利要求后将清楚了解本发明的许多变化。本发明的全部范围应该通过参考所附权利要求书连同其等同物的全部范围,以及说明书连同此类变化来确定。

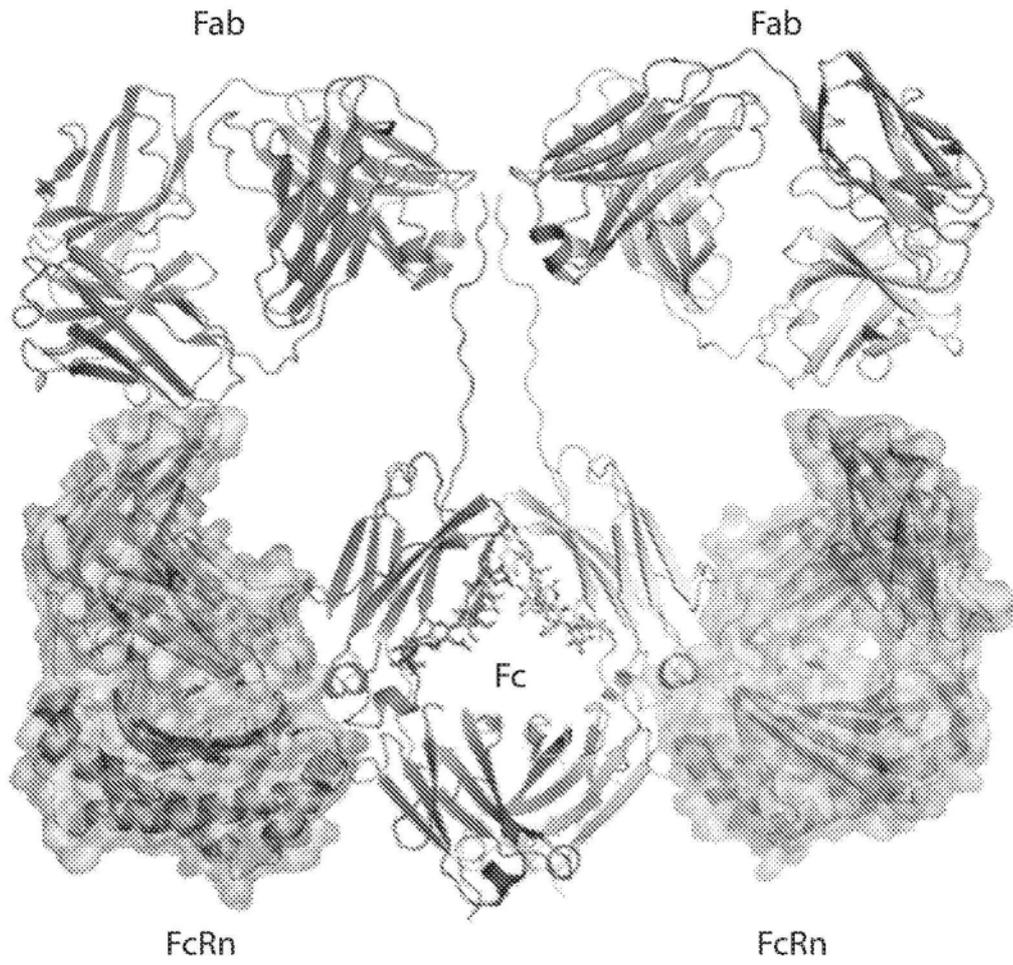


图1

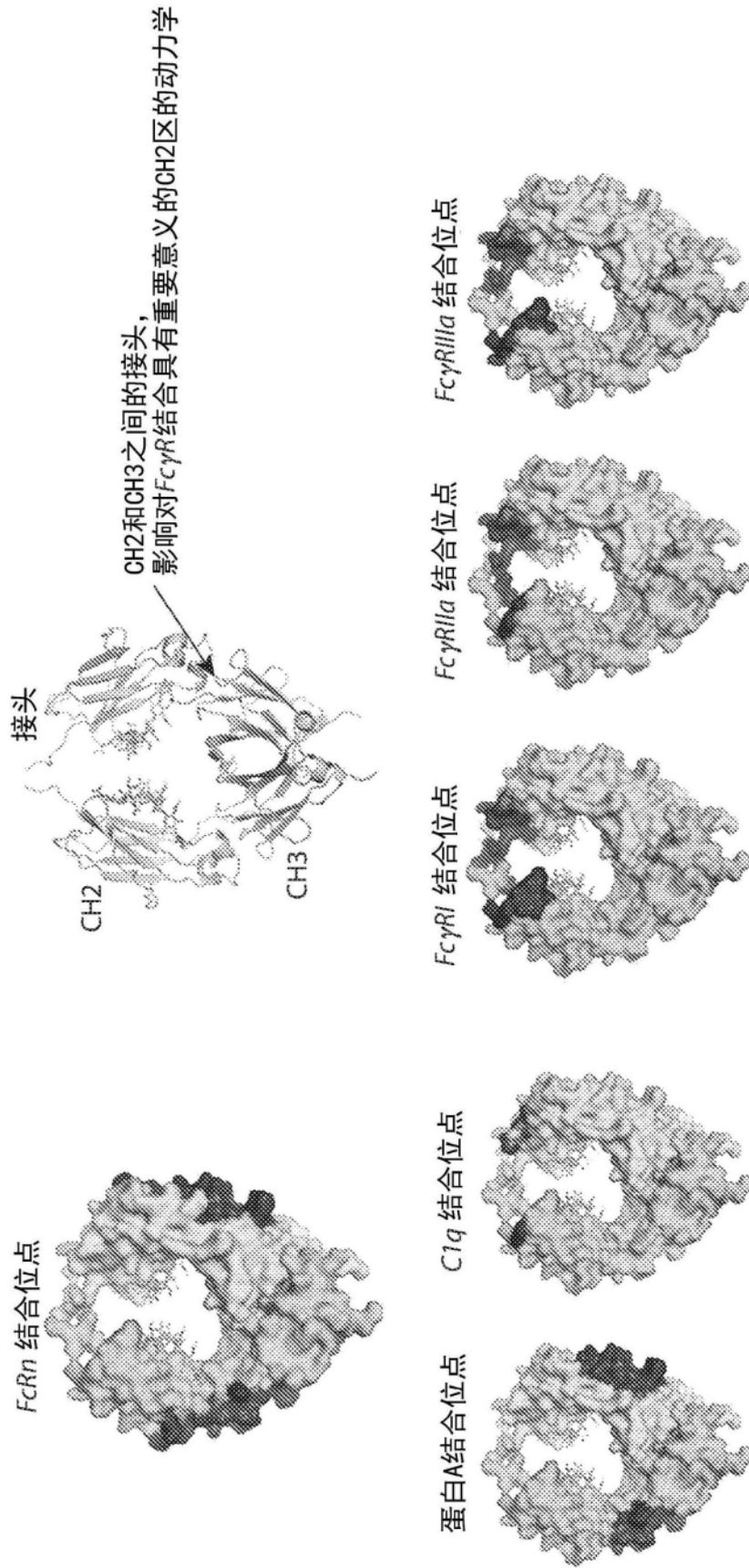


图2

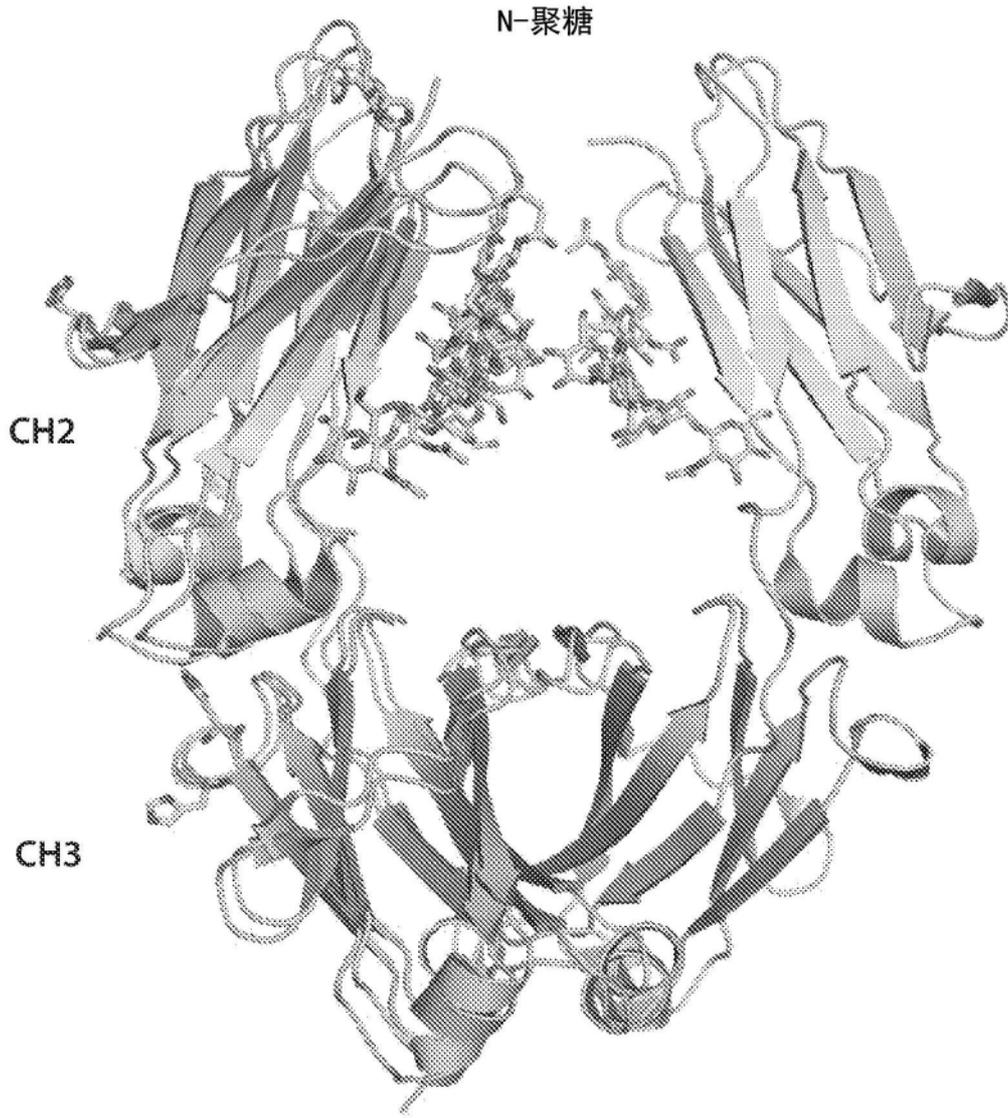


图3

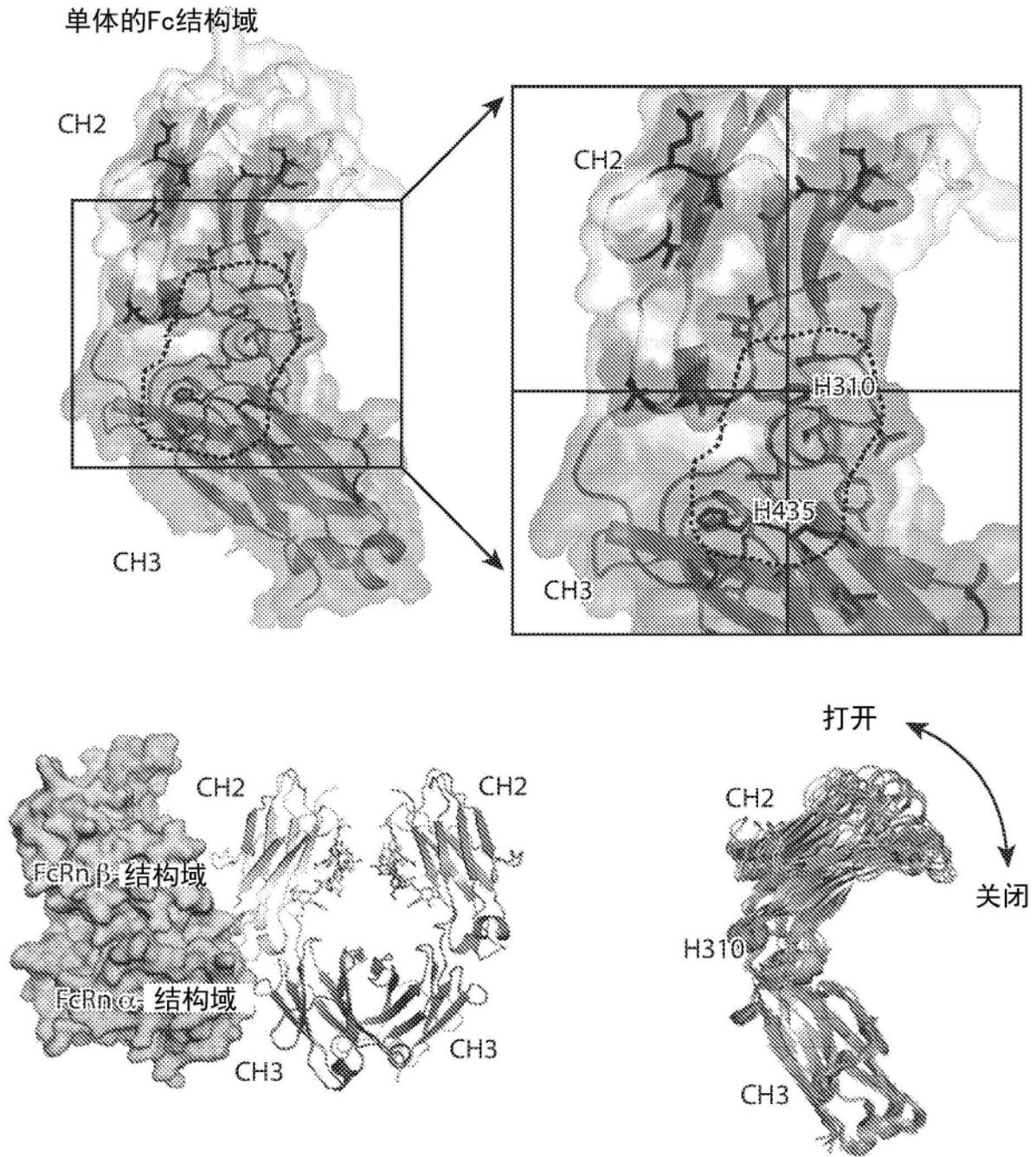
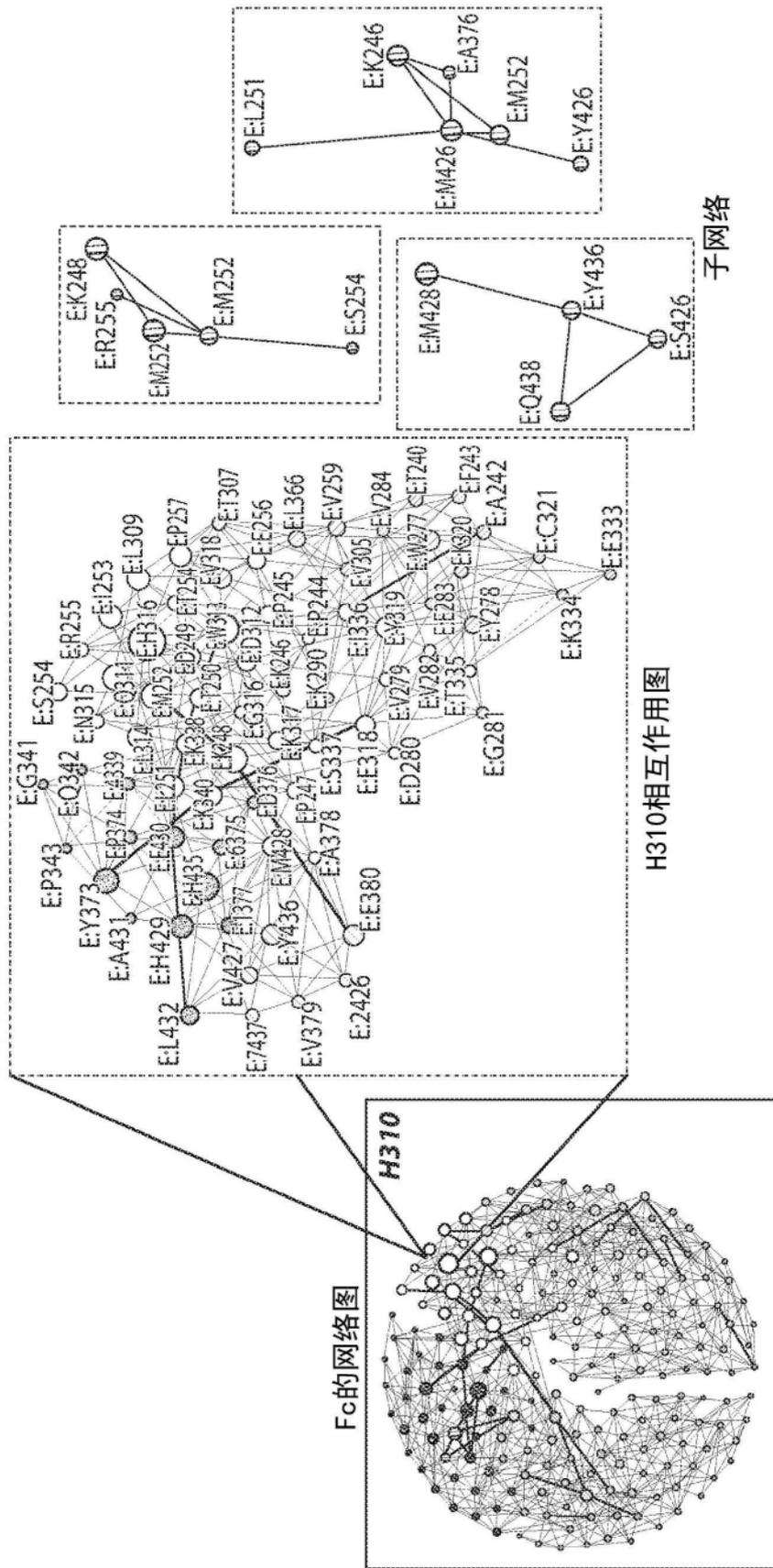


图4



各节点代表一个氨基酸  
 基于氨基酸所属网络社区对氨基酸着色

图5

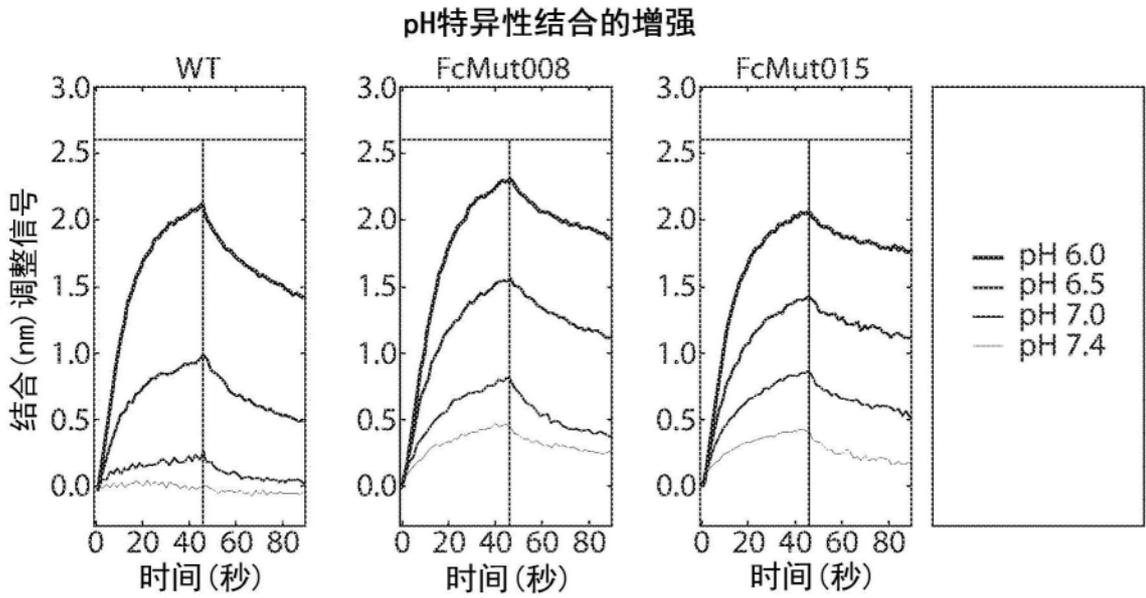
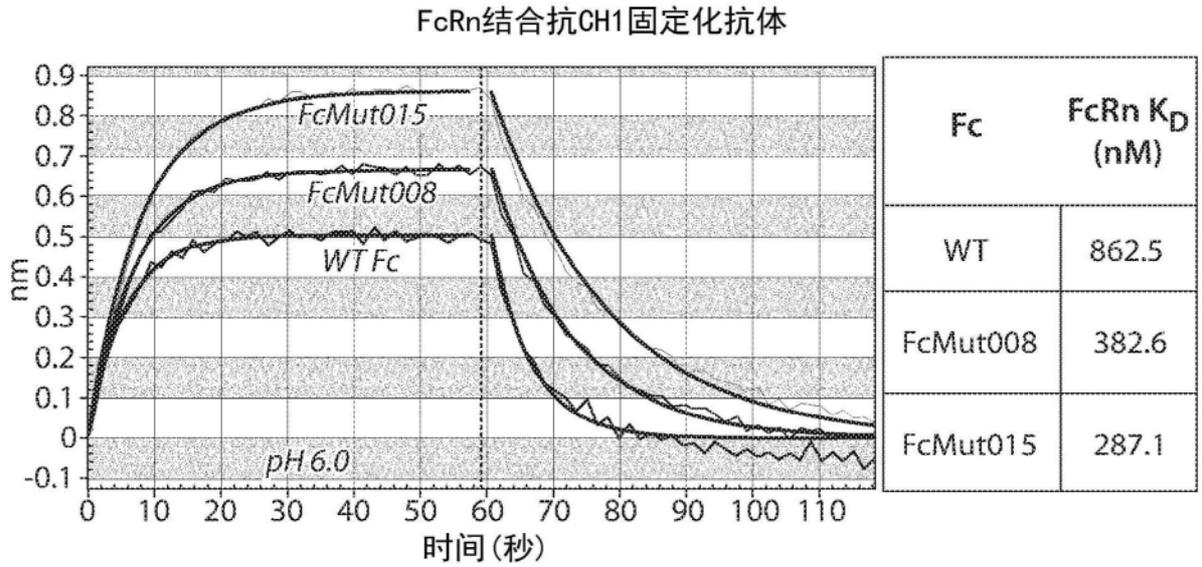


图6

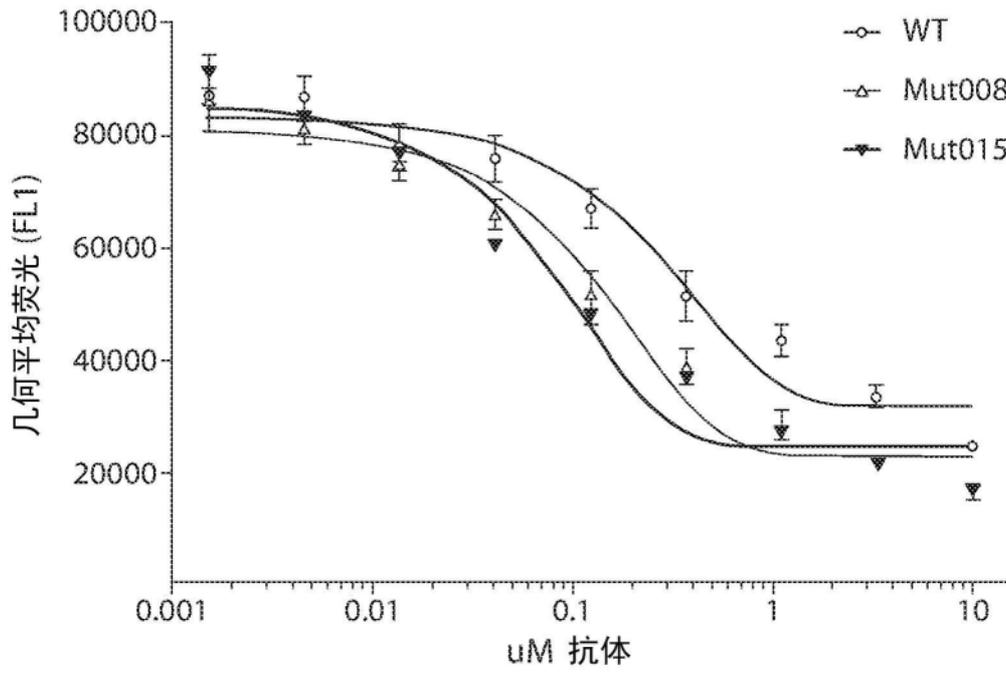


图7

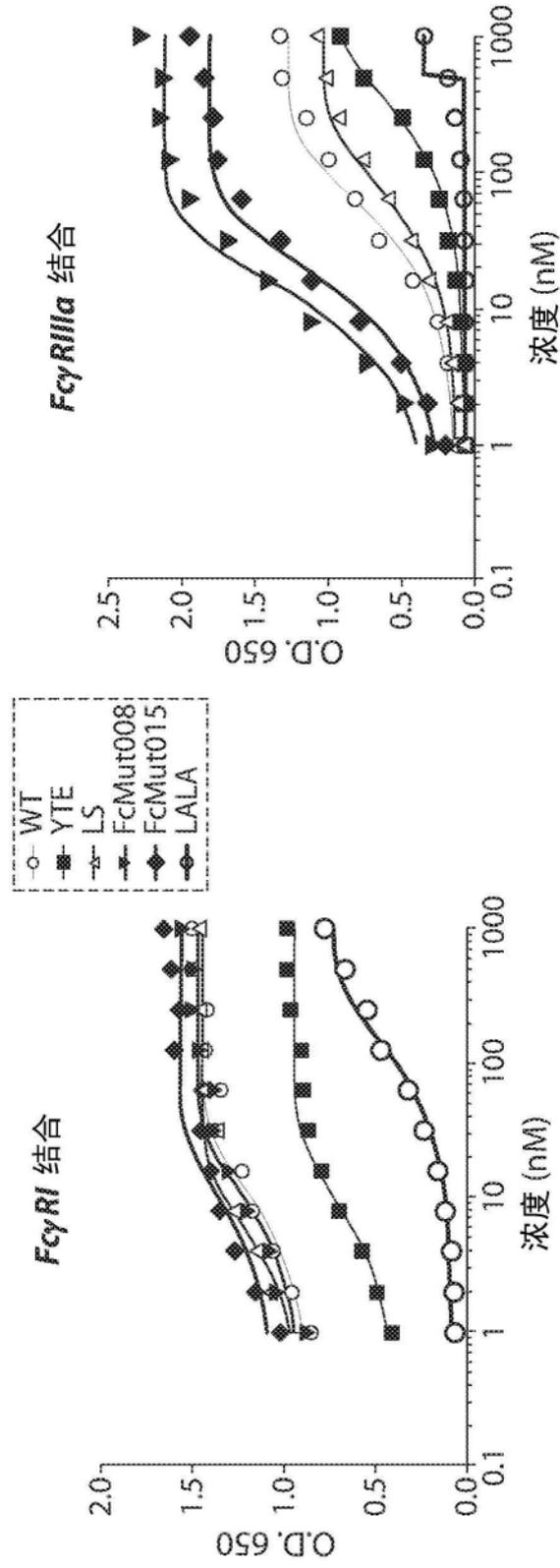


图8

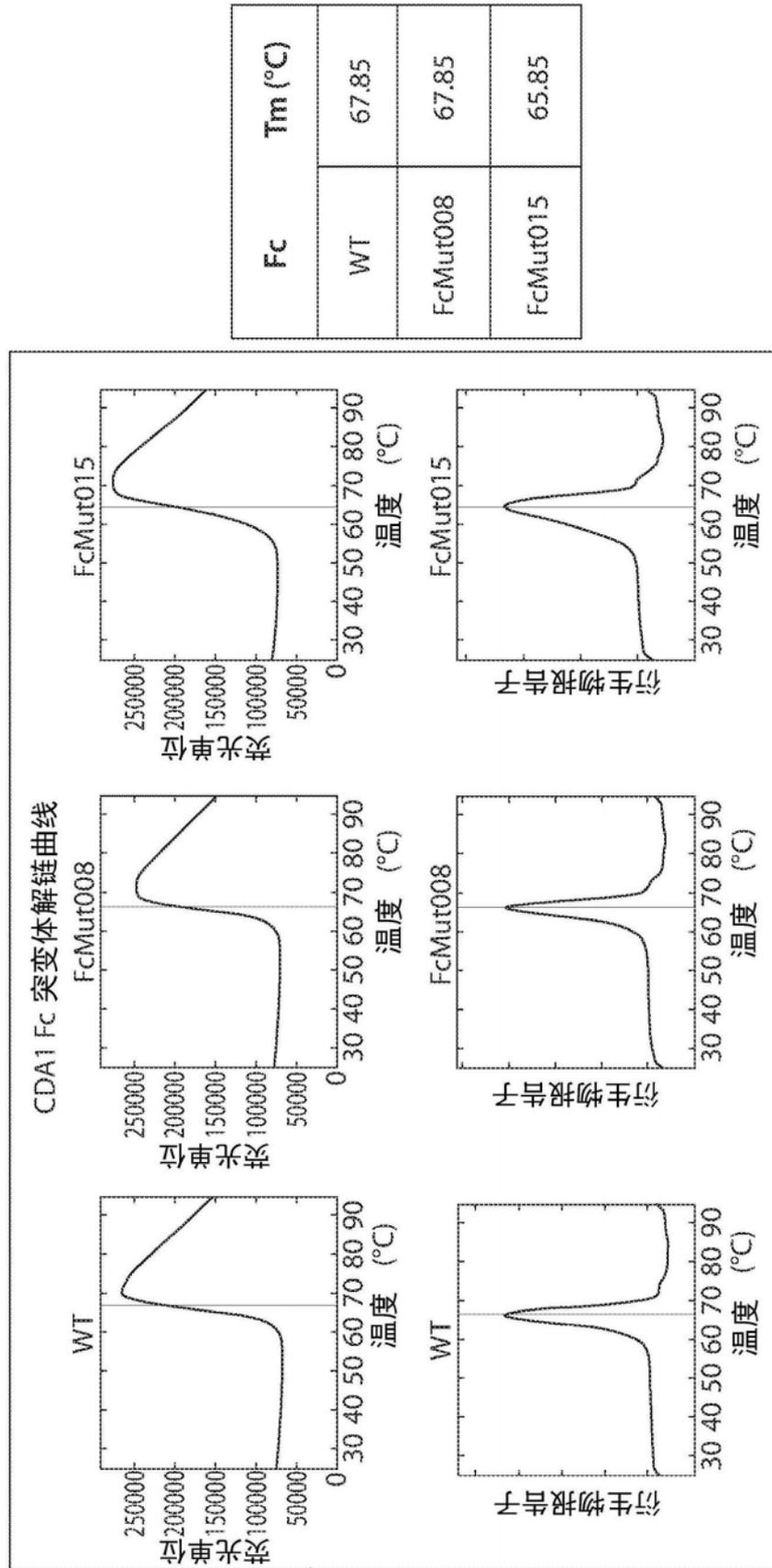


图9

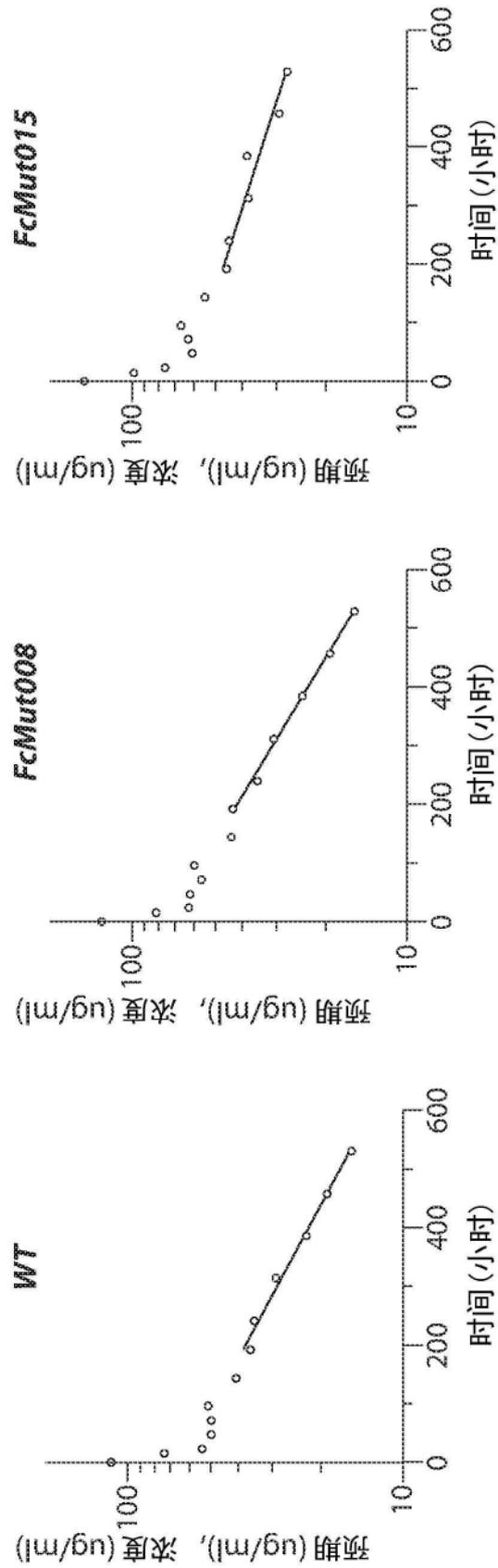


图10

名称	突变	$k_d$ (降低倍数*)	$k_{on}$ (提高倍数*)	$k_{off}$ (降低倍数*)
FcMut229	T256D_H285D_T307R_Q311V_A378V	14.0	3.7	3.7
FcMut213	H285D_T307Q_A378V	13.2	3.8	3.3
FcMut215	T307Q_Q311V_A378V	12.4	3.4	3.7
FcMut228	T256D_N286D_T307R_Q311V_A378V	12.4	3.2	4.0
FcMut227	T256D_H285D_N286D_T307R_A378V	11.6	3.6	3.2
FcMut183	T256D_Q311V_A378V	11.0	3.2	3.2
FcMut223	T256D_H285D_A378V	10.3	3.7	2.7
FcMut216	H285D_Q311V_A378V	9.6	3.4	2.8
FcMut186	T256D_T307R_Q311V_A378V	9.5	2.9	3.1
FcMut197	H285N_T307Q_N315D	9.1	2.9	3.0
FcMut171	T256D_N286D_T307R_Q311V	8.5	2.5	3.1
FcMut219	T256D_N315D_A378V	7.9	2.8	2.8
FcMut045	T256D_T307R_Q311V	5.9	2.3	2.6
WT	无	1.0	1.0	1.0
YTE(Medimmune公司)	M252Y_S254T_T256E	8.5	2.3	3.6
LS(Xencor公司)	M428L_N434S	9.2	2.6	3.6

图11A

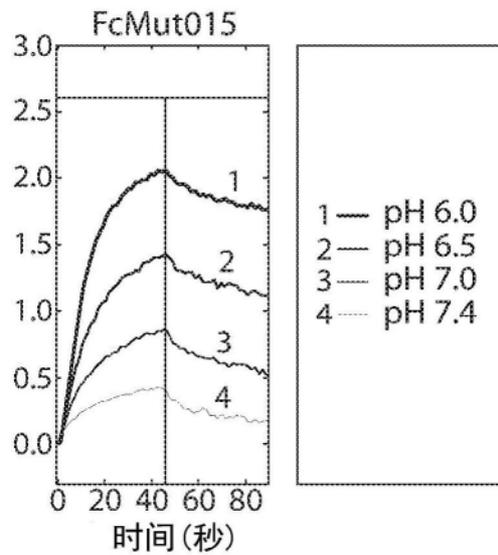


图11B

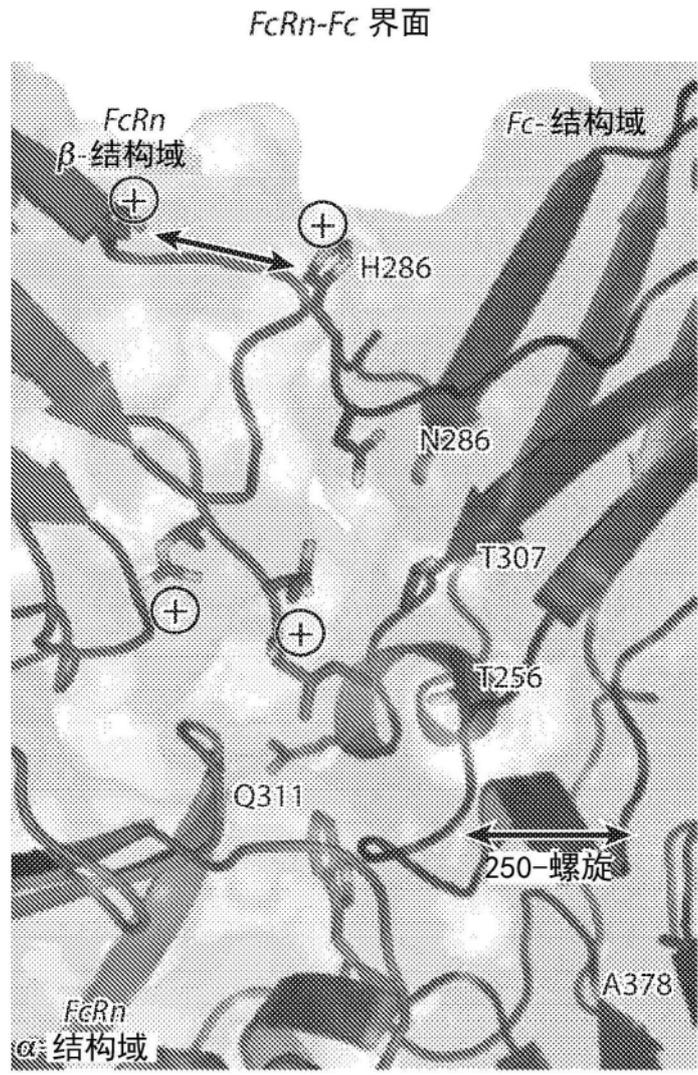


图11C

突变体	TM (宝石橙染色)	SEC洗脱 时间(分钟)	Expi293 表达 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	SDS-PAGE	蛋白A
WT	68.9	8.5	>80	✓	++
YTE	61.7	8.5	>80	✓	++
LS	68.0	8.5	>80	✓	++
FcMut045	64.8	8.5	>80	✓	++
FcMut171	64.8	8.5	>80	✓	++
FcMut183	64.0	8.5	>80	✓	++
FcMut186	63.7	8.5	>80	✓	++
FcMut197	68.4	8.5	>80	✓	++
FcMut213	70.2	8.5	>80	✓	++
FcMut215	69.2	8.5	>80	✓	++
FcMut216	65.8	8.5	>80	✓	++
FcMut219	66.7	8.5	>80	✓	++
FcMut223	64.3	8.4	>80	✓	++
FcMut227	66.6	8.4	>80	✓	++
FcMut228	66.7	8.5	>80	✓	++
FcMut229	64.6	8.5	>80	✓	++

图12

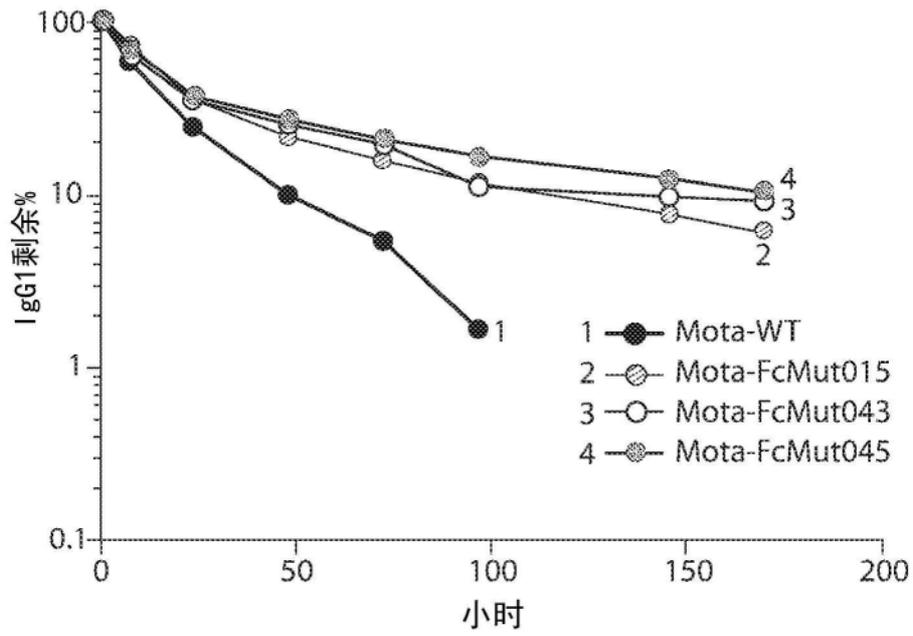


图13A

分组	半衰期 (小时)	提高倍数	C <sub>最大</sub> (μg/ml)	AUC <sub>无穷大</sub> (h*μg/ml)	清除速率 (ml/h/kg)
WT	32		24.4	514.71	3.89
FcMut015	123	3.9	24.7	1168.46	1.71
FcMut045	166	5.2	23.9	1540.65	1.30

图13B

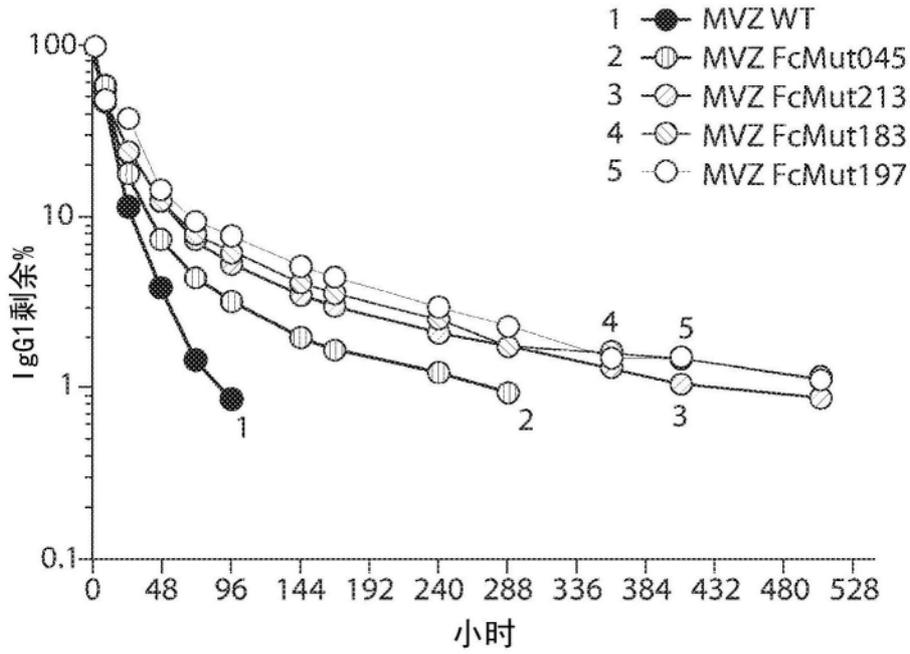


图14A

分组	半衰期 (小时)	提高倍数	C <sub>最大</sub> (μg/ml)	AUC <sub>无穷大</sub> (h*μg/ml)	清除速率 (ml/h/kg)
WT	19		101.5	1343.13	3.72
FcMut045	135	7.0	112.3	2374.28	2.11
FcMut183	192	9.9	95.4	3216.24	1.55
FcMut197	165	8.6	81.7	3074.29	1.63
FcMut213	182	9.4	107.2	3408.52	1.47

图14B

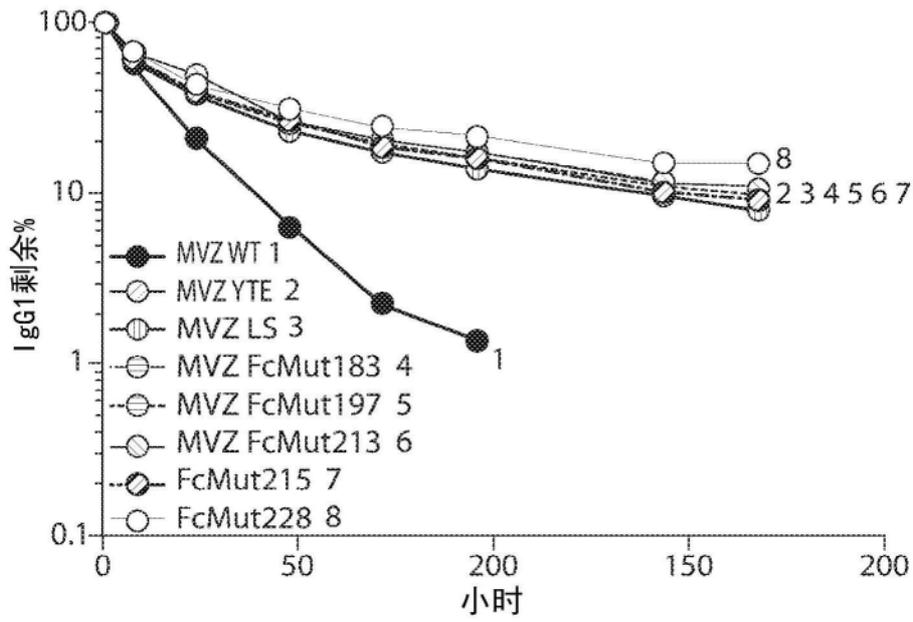


图14C

分组	半衰期 (小时)	提高倍数	C <sub>最大</sub> (μg/ml)	AUC <sub>无穷大</sub> (h*μg/ml)	清除速率 (ml/h/kg)
WT	22		29.3	513.87	<b>3.89</b>
YTE	86	3.9	26.3	1302.33	<b>1.54</b>
LS	87	4.0	30.6	1482.35	<b>1.35</b>
FcMut183	90	4.1	24.9	1384.34	<b>1.44</b>
FcMut197	94	4.3	22.0	1191.66	<b>1.68</b>
FcMut213	96	4.4	21.4	1286.27	<b>1.55</b>
FcMut215	87	4.0	27.3	1395.92	<b>1.43</b>
FcMut228	123	5.6	20.1	1509.50	<b>1.32</b>

图14D

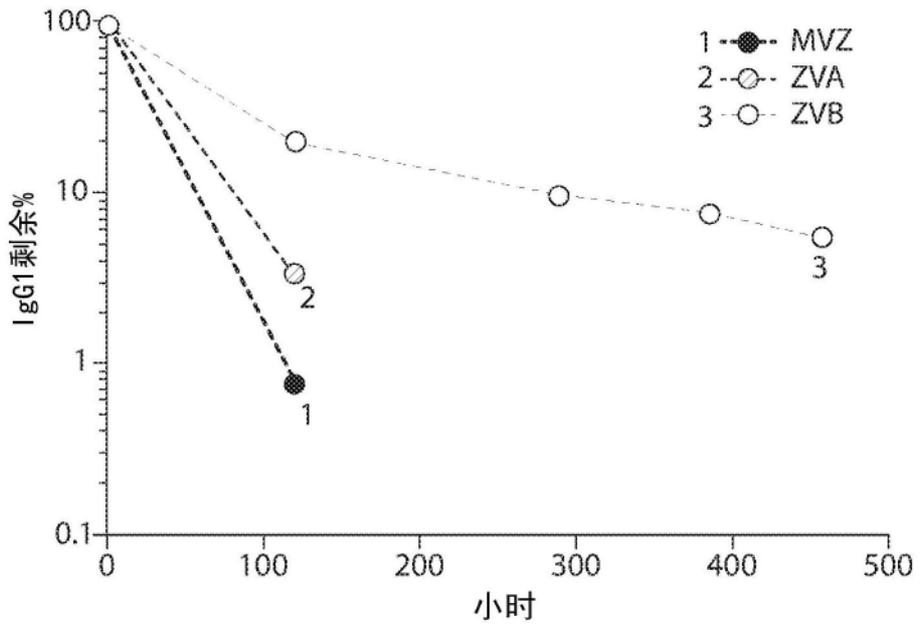


图15

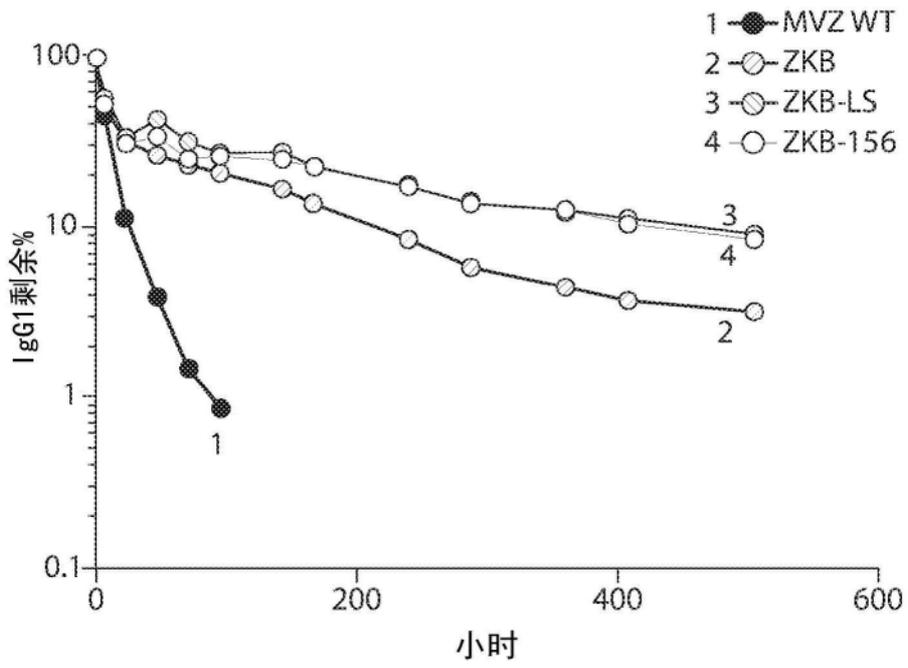


图16

突变体	FcγRI (ELISA)	FcγRIIA (octet)	FcγRIIB (octet)	FcγRIIA (ELISA)	C1q (ELISA)
WT	++	++	++	++	++
YTE	+	+	+	+	++
LS	++	++	++	++	++
FcMut045	++	++	++	++	++
FcMut171	+	++	++	++	++
FcMut183	++	++	+++	+++	++
FcMut186	+++	+++	+++	+++	++
FcMut197	++	++	++	+++	+
FcMut213	++	+++	+++	++	++
FcMut215	++	+++	+++	+++	++
FcMut216	++	+++	+++	++	++
FcMut219	++	+++	+++	+++	++
FcMut223	+	+++	+++	++	++
FcMut227	+	+++	+++	++	+
FcMut228	+	+	++	++	++
FcMut229	++	+++	+++	++	++

图17A

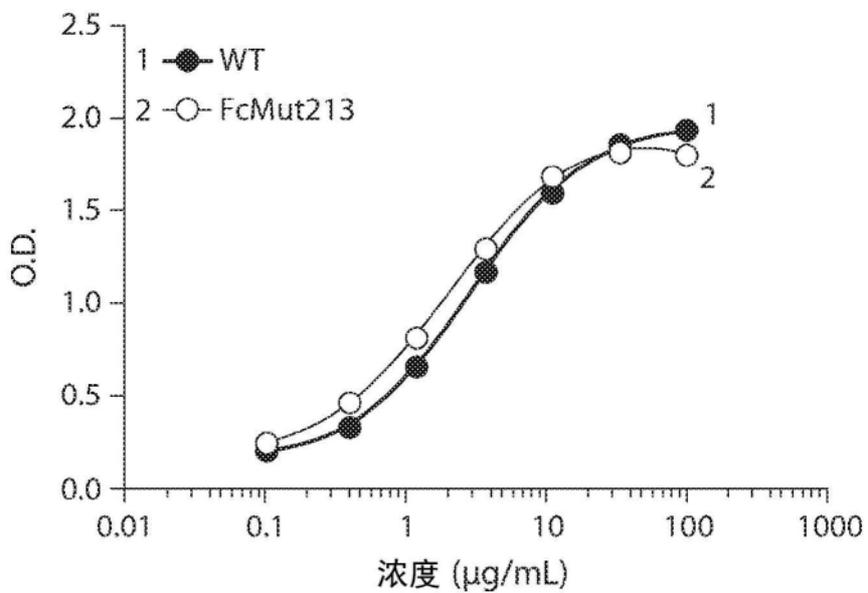


图17B

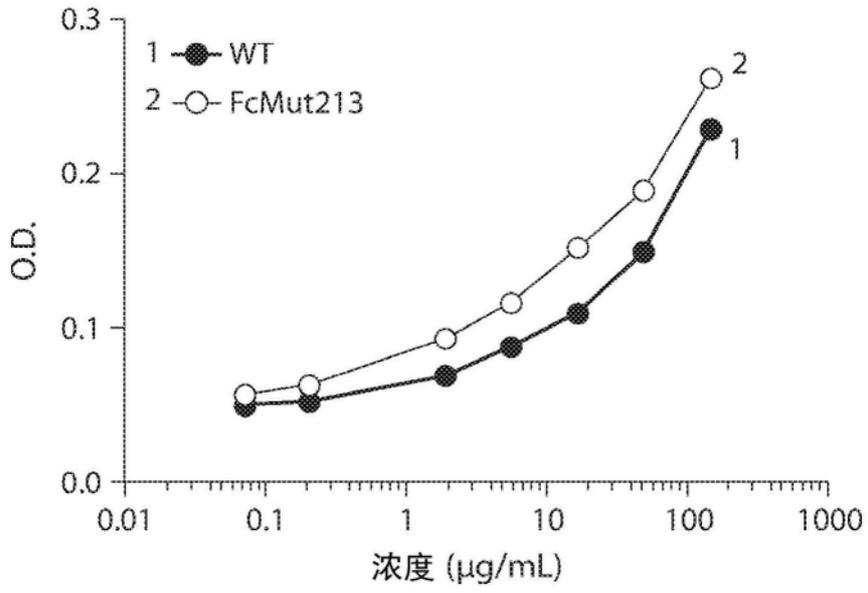


图17C

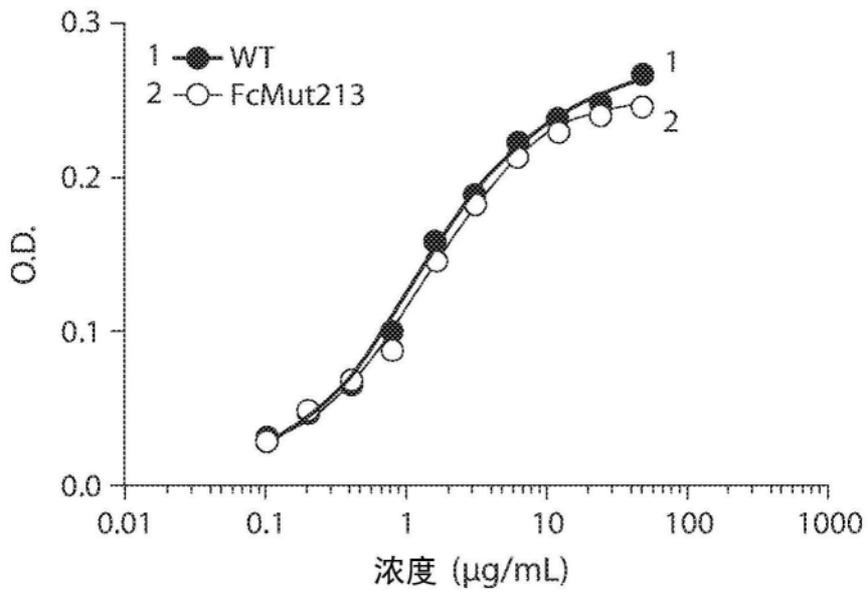


图17D

抗体	突变	CDC EC50 (ug/mL)*	C1q 结合
RTX WT	无	0.715	0.87
RTX YTE	M252Y_S254T_T256E	> 20	1.05
RTX LS	M428L_N434S	0.352	1.05
RTX FcMut045	T256D_T307R_Q311V	0.353	0.87
RTX FcMut183	T256D_Q311V_A378V	0.103	1.36
RTX FcMut186	T256D_T307R_Q311V_A378V	0.158	0.51
RTX FcMut197	H285N_T307Q_N315D	2.543	0.49
RTX FcMut213	H285D_T307Q_A378V	0.267	1.09
RTX FcMut215	T307Q_Q311V_A378V	0.141	1.03
RTX FcMut222	T256D_T307Q_Q311V	0.577	0.94
RTX FcMut224	T256D_H285D_T307R_Q311V	0.576	0.82
RTX FcMut226	T256D_H285D_N286D_T307ER_Q311V	0.745	0.79
RTX FcMut227	T256D_H285D_N286D_T307R_A378V	0.228	0.99
RTX FcMut228	T256D_N286D_T307R_Q311V_A378V	0.220	0.89
RTX FcMut229	T256D_H286D_T307R_Q311V_A378V	0.140	1.29
RTX LALA	L234A_L235A	> 20	NA
RTX FcMut037	L235V_G236A	> 20	NA

图18

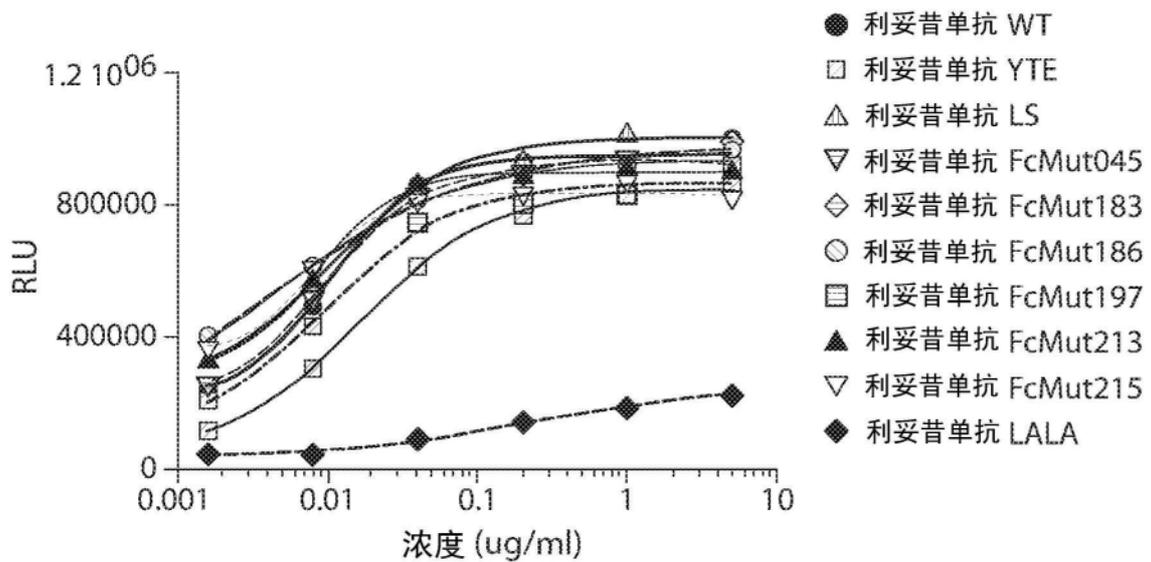


图19A

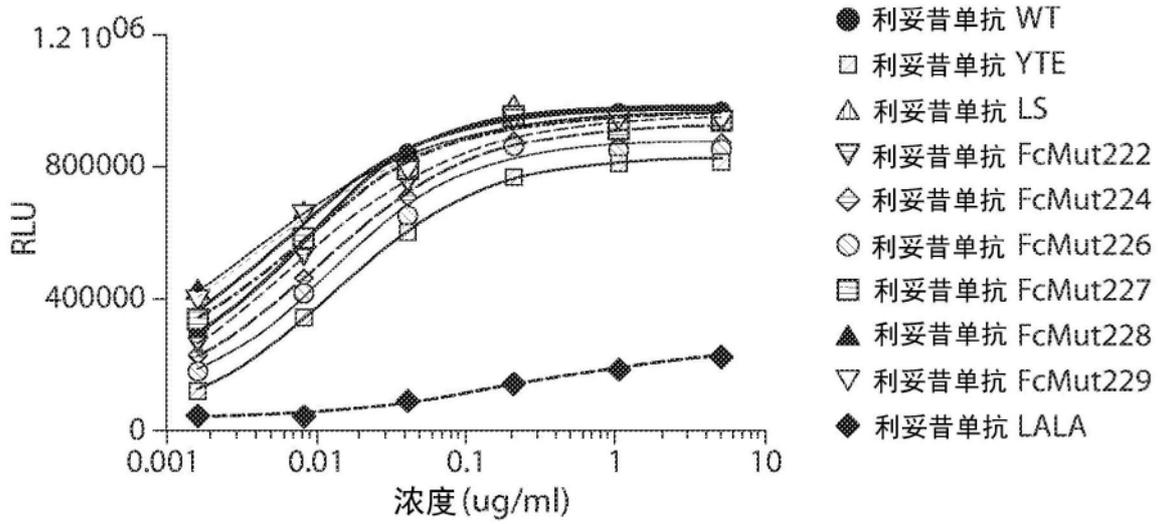


图19B

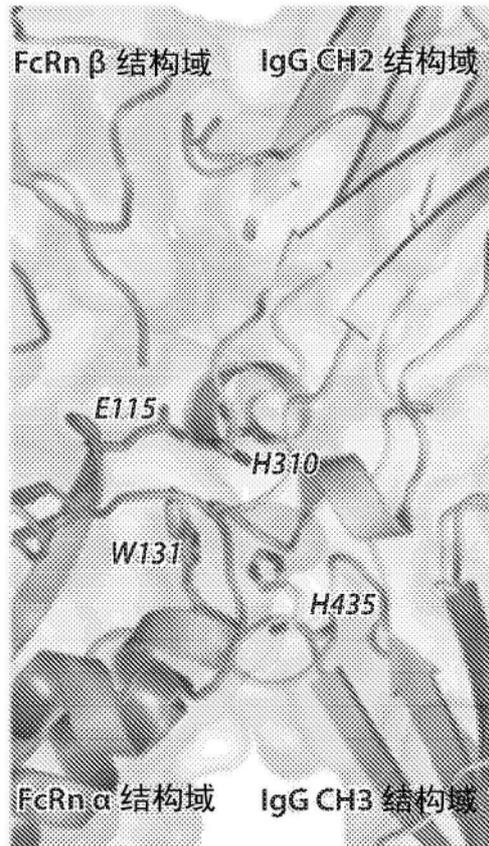


图20A

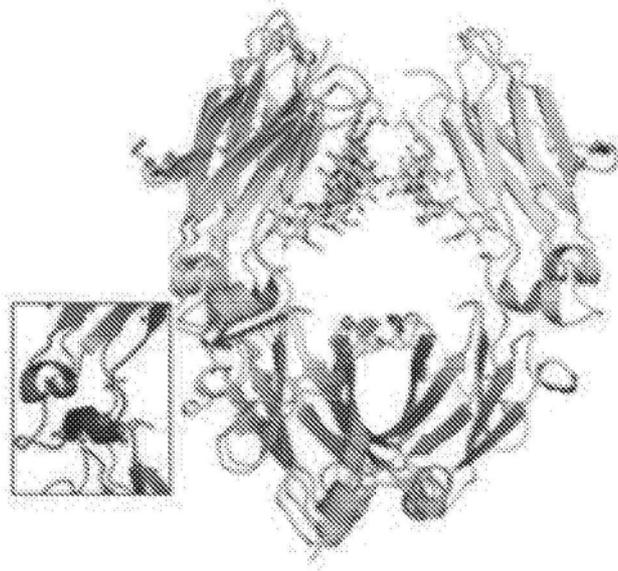


图20B

类别	氨基酸
接触残基	L251, I253, R255, P257, H285, N286, K288, T307, V308, L309, Q311, L314, H310, H433, N434, H435, Y436
外围残基	M252, T256, T307, L309, Q311, H433, N434, Y436, N286, K288
非接触残基	A287, V308, N315, L314, L432, H429, E430, A431
具有调控250-螺旋动力学 潜能的残基	P244, P245, T250, L251, P247, E380, M428, A378, D376, P257, V308, A287, L306, H427

图21A

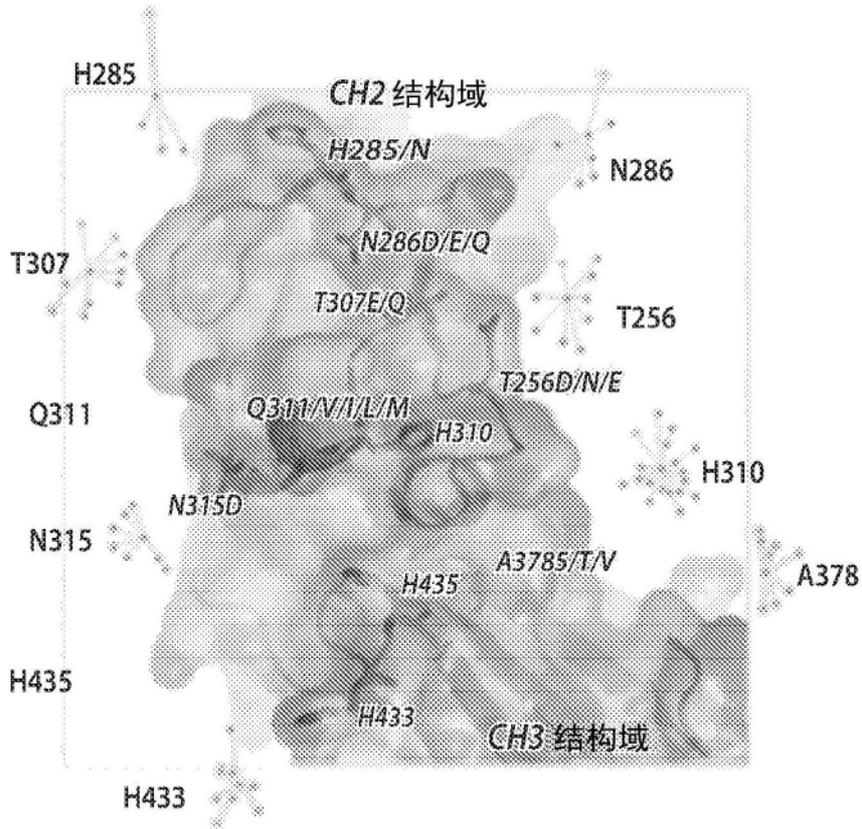


图21B

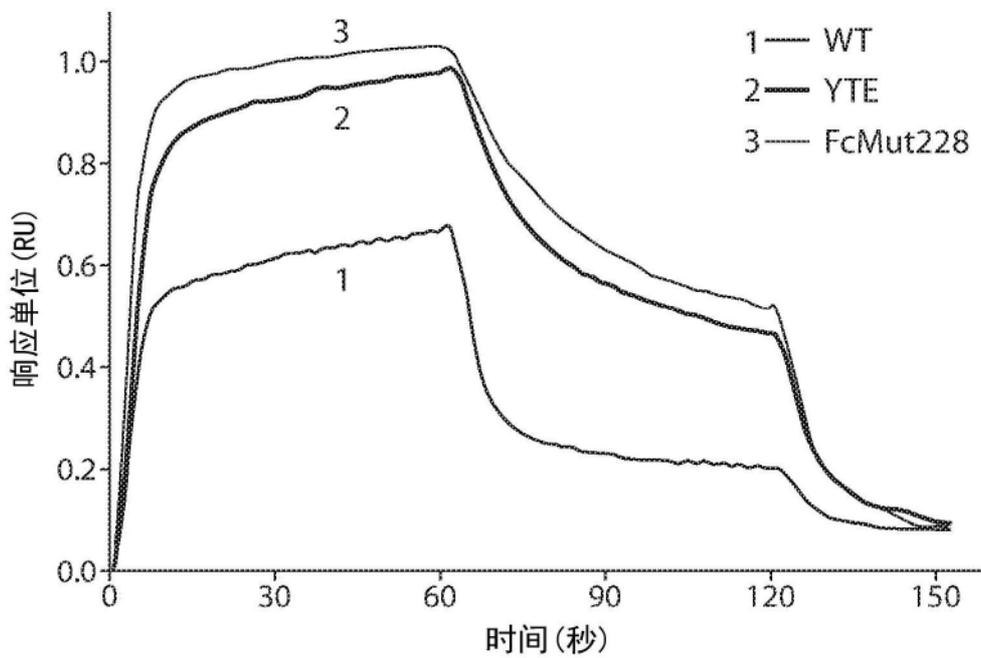


图22

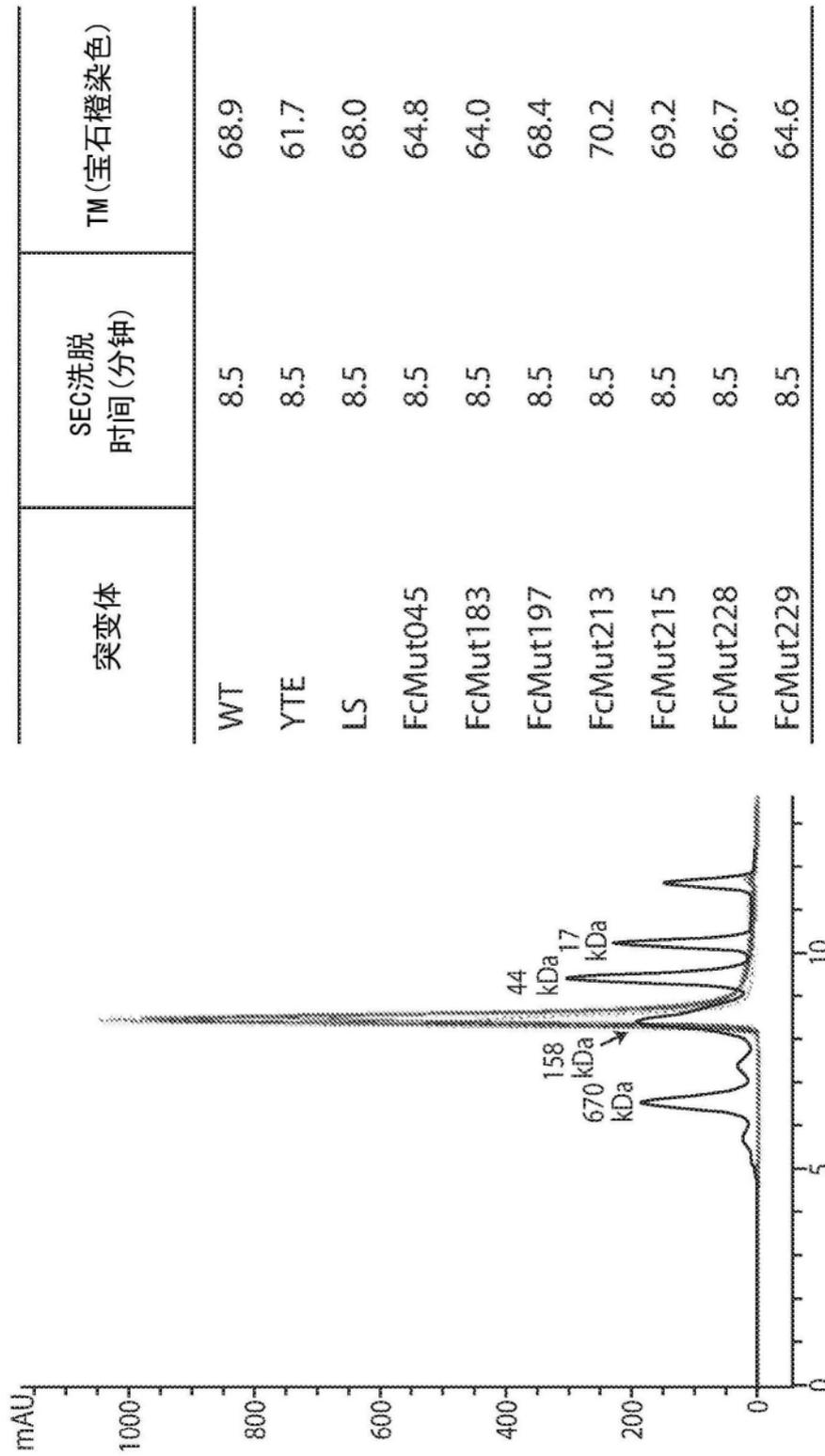
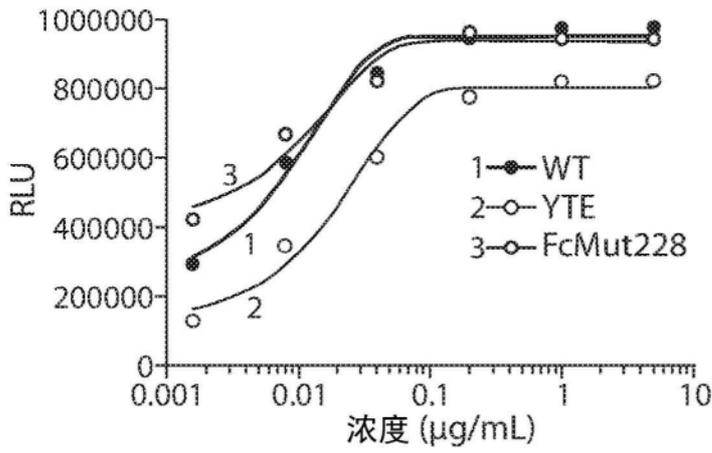
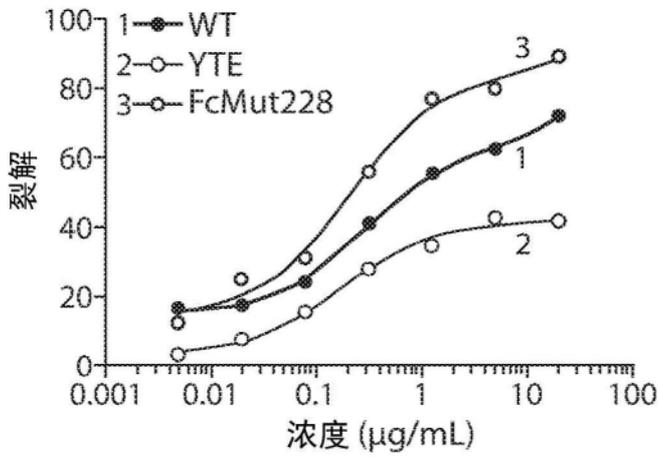


图23



突变体	ADCC EC <sub>50</sub> (ng/mL)*
WT	6.14
YTE	14.98
LS	4.78
FcMut045	6.55
FcMut183	3.92
FcMut197	8.30
FcMut213	4.01
FcMut215	2.73
FcMut228	2.66
FcMut229	3.07



突变体	CDC EC <sub>50</sub> (ng/mL)*
WT	0.715
YTE	> 20
LS	0.352
FcMut045	0.353
FcMut183	0.103
FcMut197	2.543
FcMut213	0.267
FcMut215	0.141
FcMut228	0.220
FcMut229	0.140

图24

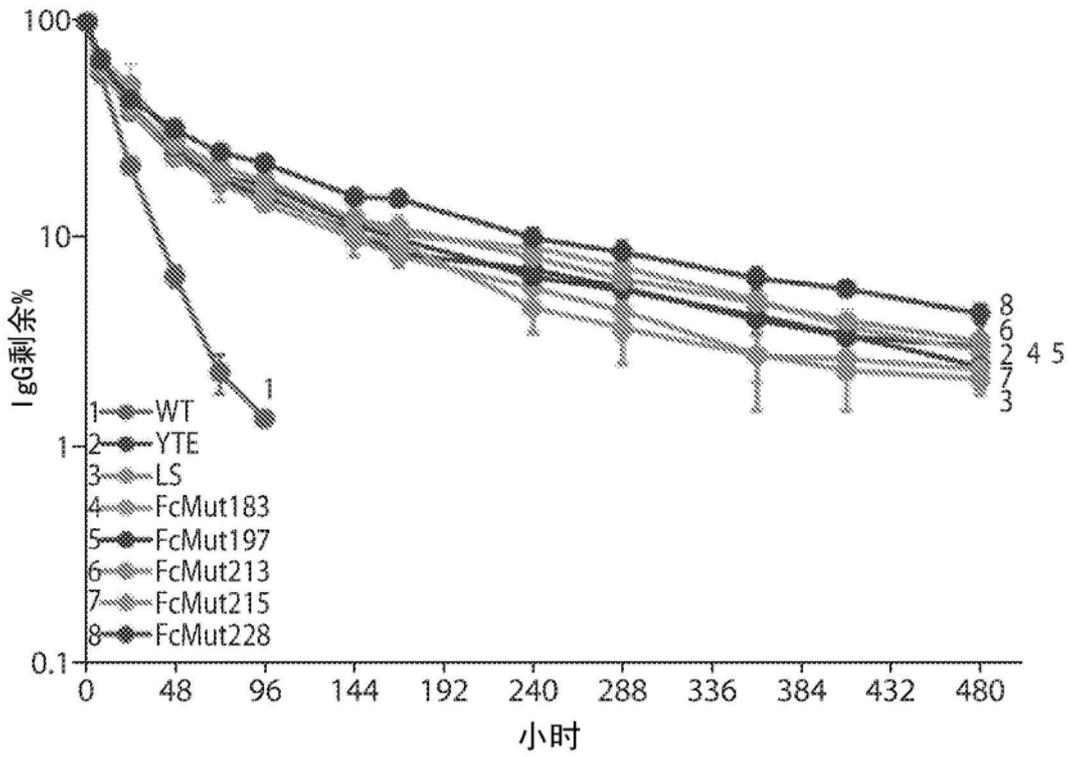


图25A

分组	半衰期 (小时)	提高倍数	C <sub>最大</sub> (μg/ml)	AUC <sub>无穷大</sub> (h*μg/ml)	清除速率 (ml/h/kg)
WT	22		29.3	513.87	3.89
YTE	193	8.8	26.3	1682.46	1.19
LS	167	7.6	30.6	1731.27	1.16
FcMut183	145	6.6	24.9	1689.29	1.18
FcMut197	170	7.8	22.0	1385.48	1.44
FCMut213	184	8.4	21.4	1546.14	1.29
FcMut215	220	10.1	27.3	1587.99	1.26
FcMut228	207	9.5	20.1	1741.26	1.15

图25B

Fab	Fc	突变	EC <sub>50</sub> (ug/mL)
莫维珠单抗	WT	无	8.50
莫维珠单抗	YTE	M252Y_S254T_T256E	10.09
莫维珠单抗	LS	M428L_N434S	14.49
莫维珠单抗	FcMut045	T256D_T307R_Q311V	7.73
莫维珠单抗	FcMut183	T256D_Q311V_A378V	7.41
莫维珠单抗	FcMut197	H285N_T307Q_N315D	12.32
莫维珠单抗	FcMut213	H285D_T307Q_A378V	10.54
莫维珠单抗	FcMut215	T307Q_Q311V_A378V	7.80
莫维珠单抗	FcMut228	T256D_N286D_T307R_Q311V_A378V	10.45

图26

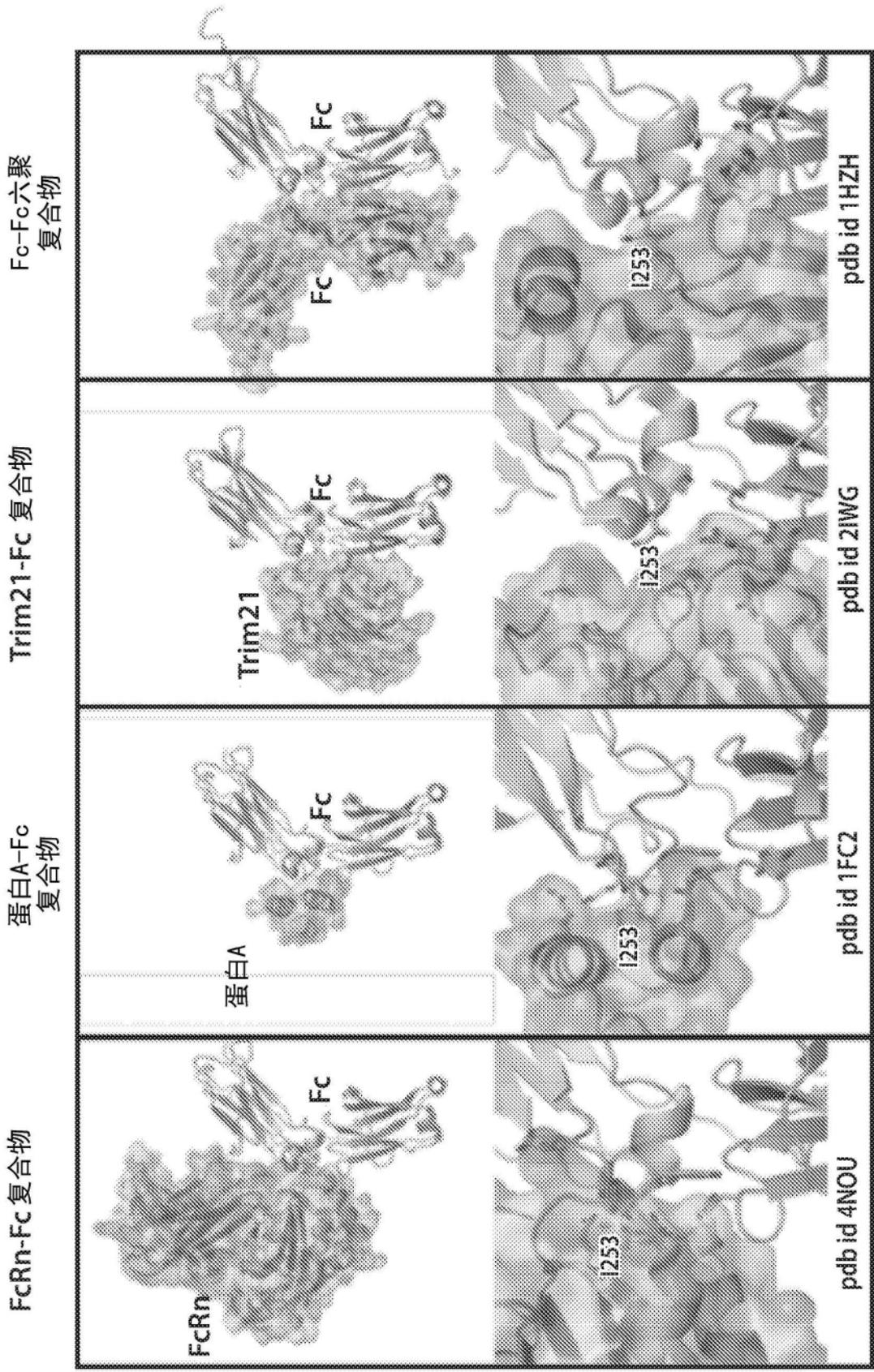


图27A

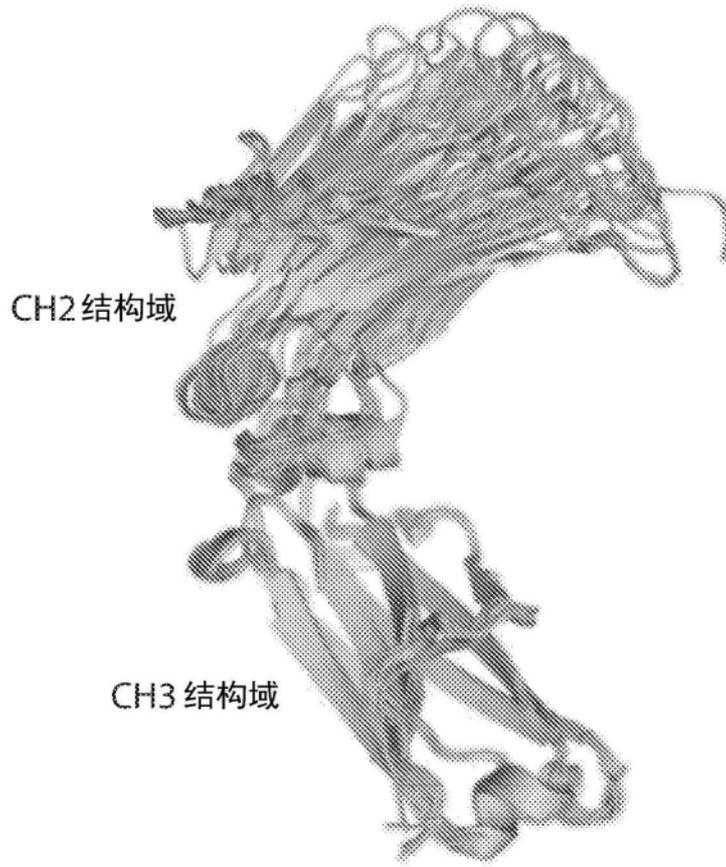


图27B