202306584

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202306584 A

(43)公開日： 中華民國 112 (2023) 年 02 月 16 日

(21)申請案號：111119900 (22)申請日： 中華民國 111 (2022) 年 05 月 27 日

(51)Int. Cl.： *A61K39/395 (2006.01)* *C07K16/18 (2006.01)*
C07K16/46 (2006.01) *C12N15/13 (2006.01)*
C12N15/63 (2006.01) *C12N15/64 (2006.01)*

(30)優先權：2021/05/27 美國 63/193,665
2021/07/15 歐洲專利局 21315127.7

(71)申請人：法商賽諾菲公司 (法國) SANOFI (FR)
法國

(72)發明人：朴 晟惠 PARK, SUNGHAE (US)；沙格 卡瑟莉亞 SAGAR, KATHURIA (US)；卡麥隆 碧翠斯 CAMERON, BEATRICE (FR)；瑪西羅 艾勒山度 MASIERO, ALESSANDRO (IT)

(74)代理人：何愛文；王仁君

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：139 項 圖式數：20 共 151 頁

(54)名稱

具有對 Fc 受體之增強親和力及改良熱穩定性的 Fc 變體

(57)摘要

本揭露提供了 Fc 結構域變體，包括效應子勝任 Fc 結構域變體。本揭露還提供了編碼 Fc 結構域變體的核酸和用於製造 Fc 結構域變體的宿主細胞。還提供了用於增加 Fc 結構域變體的產量的方法，和使用 Fc 結構域變體來治療疾病的方法。

The present disclosure provides Fc domain variants, including effector-competent Fc domain variants. The present disclosure also provides nucleic acids encoding Fc domain variants and host cells for making Fc domain variants. Methods for increasing the yield of Fc domain variants, and methods of using Fc domain variants to treat disease, are also provided.

指定代表圖：

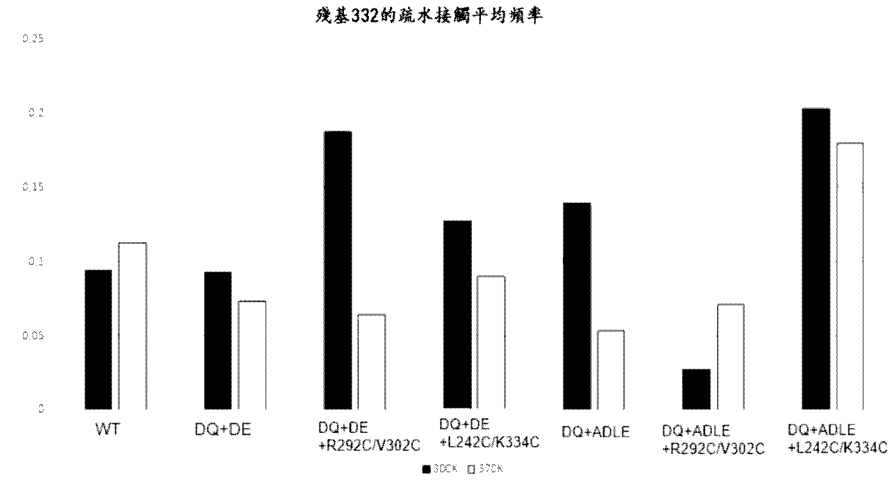

殘基332的疏水接觸平均頻率
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
WT
DQ+DE
DQ+DE +R292C/V302C
DQ+DE +L242C/K334C
DQ+ADLE
DQ+ADLE +R292C/V302C
DQ+ADLE +L242C/K334C
30CK
37CK

圖1A

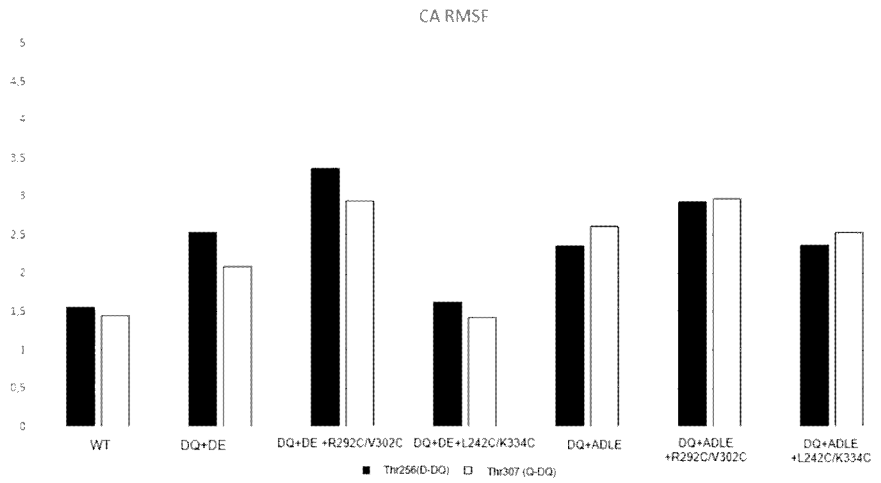

CA RMSF
5
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
WT
DQ+DE
DQ+DE +R292C/V302C
DQ+DE+L242C/K334C
DQ+ADLE
DQ+ADLE +R292C/V302C
DQ+ADLE +L242C/K334C
Thr256(D-DQ)
Thr307 (Q-DQ)

圖1B

【發明摘要】

【中文發明名稱】具有對Fc受體之增強親和力及改良熱穩定性的Fc變體

【英文發明名稱】Fc VARIANT WITH ENHANCED AFFINITY TO Fc RECEPTORS AND IMPROVED THERMAL STABILITY

【中文】

本揭露提供了Fc結構域變體，包括效應子勝任Fc結構域變體。本揭露還提供了編碼Fc結構域變體的核酸和用於製造Fc結構域變體的宿主細胞。還提供了用於增加Fc結構域變體的產量的方法，和使用Fc結構域變體來治療疾病的方法。

【英文】

The present disclosure provides Fc domain variants, including effector-competent Fc domain variants. The present disclosure also provides nucleic acids encoding Fc domain variants and host cells for making Fc domain variants. Methods for increasing the yield of Fc domain variants, and methods of using Fc domain variants to treat disease, are also provided.

【指定代表圖】圖1

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】具有對Fc受體之增強親和力及改良熱穩定性的Fc變體

【英文發明名稱】Fc VARIANT WITH ENHANCED AFFINITY TO Fc RECEPTORS AND IMPROVED THERMAL STABILITY

【技術領域】

【0001】 本揭露提供了Fc結構域變體，包括效應子勝任Fc結構域變體。本揭露還提供了編碼Fc結構域變體的核酸和用於製造Fc結構域變體的宿主細胞。還提供了用於增加Fc結構域變體的產量的方法，和使用Fc結構域變體來治療疾病的方法。

【先前技術】

【0002】 抗體的片段可結晶（Fc）區與Fcγ受體（FcγR）之間的特異性接合是效應子功能（如抗體依賴性細胞介導的細胞毒性（ADCC））的初始步驟（Arnold等人, 2007）。在人類中，啟動FcγRIIIa是在自然殺傷細胞的表面上表現的。FcγRIIIa是一種低親和力受體，並且細胞的啟動是由於這些表面受體在抗體-抗原免疫複合物中聚集的Fc區接合後交聯而產生的。Fc區也與新生Fc受體（FcRn）相互作用。已經顯示這種相互作用藉由減少內皮細胞中的溶酶體降解來延長IgG的半衰期。

【0003】 Fc工程化已經被廣泛採用，以鑒定增強對Fc受體的親和力並且從而增強ADCC活性和/或血清半衰期的Fc結構域變體。需要新型Fc結構域變體。

【發明內容】

【0004】 本揭露部分地涉及這樣的發現：與野生型Fc結構域相比，具有改變的效應子功能的Fc結構域變體具有降低的熱穩定性。因此，本揭露進一步部分地涉及具有增加的熱穩定性和出乎意料地增加的體內穩定性的新型Fc結構域變體的發現。

【0005】 在一態樣，提供了一種分離的效應子勝任多肽，包含含有第一重鏈和第二重鏈的糖基化Fc結構域，其中至少一條重鏈包含由一對半胱胺酸（C）介導的工程化的鏈內二硫鍵，所述半胱胺酸取代：(i) 胺基酸位置242處的白胺酸（L）和胺基酸位置334處的離胺酸（K）；(ii) 胺基酸位置287處的丙胺酸（A）和胺基酸位置306處的白胺酸（L）；或 (iii) 胺基酸位置292處的精胺酸（R）和胺基酸位置302處的纈胺酸（V）；其中所述胺基酸位置根據EU編號；其中所述糖基化Fc結構域能夠與抗體效應子分子相互作用；並且其中與具有不包含所述工程化的鏈內二硫鍵的能夠與抗體效應子分子相互作用的糖基化Fc結構域的效應子勝任多肽相比，所述效應子勝任多肽具有增強的熱穩定性。

【0006】 在某些例示性實施例中，所述糖基化Fc結構域包含胺基酸位置297處的天然聚糖，根據EU編號。

【0007】 在某些例示性實施例中，所述糖基化Fc結構域包含胺基酸位置297處的工程化或非天然聚糖。在某些例示性實施例中，所述工程化或非天然聚糖是經修飾的聚糖。

【0008】 在某些例示性實施例中，所述分離的效應子勝任多肽是N-糖基化的。

【0009】在某些例示性實施例中，所述糖基化Fc結構域包含與治療性分子接合的經修飾的聚糖。

【0010】在某些例示性實施例中，所述第一重鏈包含所述半胱胺酸對。在某些例示性實施例中，所述第一重鏈和所述第二重鏈各自包含所述半胱胺酸對。

【0011】在某些例示性實施例中，所述Fc結構域是IgG1 Fc結構域。在某些例示性實施例中，其中所述IgG1 Fc結構域是人類IgG1 Fc結構域。

【0012】在某些例示性實施例中，所述抗體效應子分子是FcRn。在某些例示性實施例中，與野生型Fc結構域相比，所述分離的效應子勝任多肽具有與所述FcRn的增強的結合親和力。

【0013】在某些例示性實施例中，所述抗體效應子分子是FcγRIIIa。在某些例示性實施例中，與包含野生型Fc結構域的多肽相比，所述分離的效應子勝任多肽具有與FcγRIIIa的增強的結合親和力。

【0014】在某些例示性實施例中，與野生型Fc結構域相比，所述分離的效應子勝任多肽具有改變的血清半衰期。在某些例示性實施例中，與野生型Fc結構域相比，所述分離的效應子勝任多肽具有增強的血清半衰期。在某些例示性實施例中，與野生型Fc結構域相比，所述分離的效應子勝任多肽具有改善的體內穩定性。

【0015】在某些例示性實施例中，所述Fc結構域進一步包含胺基酸位置332處的取代，根據EU編號。在某些例示性實施例中，所述胺基酸位置332處的取代是麩胺酸（E）。在某些例示性實施例中，所述Fc結構域進一步包含胺基酸位置236、239或330處的一個或多個取代，根據EU編號。在某些例示性實施例中，所述胺基酸位置236處的取代是丙胺酸（A）。在某些例示性實施例中，所述胺

基酸位置239處的取代是天門冬胺酸（D）。在某些例示性實施例中，所述胺基酸位置330處的取代是白胺酸（L）。

【0016】 在某些例示性實施例中，所述Fc結構域進一步包含胺基酸位置239處的天門冬胺酸（D）和胺基酸位置332處的麩胺酸（E），根據EU編號。

【0017】 在某些例示性實施例中，所述Fc結構域進一步包含胺基酸位置236處的丙胺酸（A）、胺基酸位置239處的天門冬胺酸（D）和胺基酸位置332處的麩胺酸（E），根據EU編號。

【0018】 在某些例示性實施例中，所述Fc結構域進一步包含胺基酸位置236處的丙胺酸（A）、胺基酸位置239處的天門冬胺酸（D）、胺基酸位置330處的白胺酸（L）和胺基酸位置332處的麩胺酸（E），根據EU編號。

【0019】 在某些例示性實施例中，其中所述Fc結構域進一步包含胺基酸位置256和/或307處的取代，根據EU編號。

【0020】 在某些例示性實施例中，所述胺基酸位置256處的取代是天門冬胺酸（D）。在某些例示性實施例中，所述胺基酸位置307處的取代是麩醯胺酸（Q）。

【0021】 在某些例示性實施例中，所述Fc結構域進一步包含胺基酸位置256處的天門冬胺酸（D）和胺基酸位置307處的麩醯胺酸（Q），根據EU編號。

【0022】 在某些例示性實施例中，所述Fc結構域進一步包含胺基酸位置239處的天門冬胺酸（D）、胺基酸位置332處的麩胺酸（E）、胺基酸位置256處的天門冬胺酸（D）和胺基酸位置307處的麩醯胺酸（Q），根據EU編號。

【0023】 在某些例示性實施例中，所述Fc結構域進一步包含胺基酸位置236處的丙胺酸（A）、胺基酸位置239處的天門冬胺酸（D）、和胺基酸位置332

處的麩胺酸（E）、胺基酸位置256處的天門冬胺酸（D）和胺基酸位置307處的麩醯胺酸（Q），根據EU編號。

【0024】在某些例示性實施例中，所述Fc結構域進一步包含胺基酸位置236處的丙胺酸（A）、胺基酸位置239處的天門冬胺酸（D）、胺基酸位置330處的白胺酸（L）、胺基酸位置332處的麩胺酸（E）、胺基酸位置256處的天門冬胺酸（D）和胺基酸位置307處的麩醯胺酸（Q），根據EU編號。

【0025】在另一態樣，提供了一種分離的效應子勝任多肽，包含：含有第一重鏈和第二重鏈的糖基化Fc結構域，其中至少一條重鏈包含由一對半胱胺酸（C）介導的工程化的鏈內二硫鍵，所述半胱胺酸取代：(i) 胺基酸位置242處的白胺酸（L）和胺基酸位置334處的離胺酸（K）；(ii) 胺基酸位置287處的丙胺酸（A）和胺基酸位置306處的白胺酸（L）；或(iii) 胺基酸位置292處的精胺酸（R）和胺基酸位置302處的纈胺酸（V）；其中所述糖基化Fc結構域能夠與抗體效應子分子相互作用並且包含胺基酸位置332處的麩胺酸（E）；其中與具有不包含所述工程化的鏈內二硫鍵的能夠與抗體效應子分子相互作用並且包含胺基酸位置332處的麩胺酸（E）的糖基化Fc結構域的效應子勝任多肽相比，所述效應子勝任多肽具有增強的熱穩定性；並且其中所述胺基酸位置根據EU編號。

【0026】在某些例示性實施例中，所述糖基化Fc結構域包含胺基酸位置297處的天然聚糖，根據EU編號。

【0027】在某些例示性實施例中，所述糖基化Fc結構域包含胺基酸位置297處的天然聚糖，根據EU編號。在某些例示性實施例中，所述工程化或非天然聚糖是經修飾的聚糖。

【0028】在某些例示性實施例中，所述分離的效應子勝任多肽是N-糖基化的。在某些例示性實施例中，所述經修飾的聚糖與治療性分子接合。

【0029】在某些例示性實施例中，所述第一重鏈包含所述半胱胺酸對。在某些例示性實施例中，所述第一重鏈和所述第二重鏈各自包含所述半胱胺酸對。

【0030】在某些例示性實施例中，所述經修飾的Fc結構域是經修飾的人類Fc結構域。在某些例示性實施例中，所述經修飾的Fc結構域是經修飾的人類IgG1 Fc結構域。

【0031】在某些例示性實施例中，所述抗體效應子分子是FcRn。在某些例示性實施例中，與野生型Fc結構域相比，所述分離的效應子勝任多肽具有與所述FcRn的增強的結合親和力。

【0032】在某些例示性實施例中，所述抗體效應子分子是FcγRIIIa。在某些例示性實施例中，與包含野生型Fc結構域的多肽相比，所述分離的效應子勝任多肽具有與FcγRIIIa的增強的結合親和力。

【0033】在某些例示性實施例中，與野生型Fc結構域相比，所述分離的效應子勝任多肽具有改變的血清半衰期。在某些例示性實施例中，與野生型Fc結構域相比，所述分離的效應子勝任多肽具有增強的血清半衰期。在某些例示性實施例中，與野生型Fc結構域相比，所述分離的效應子勝任多肽具有改善的體內穩定性。

【0034】在某些例示性實施例中，所述分離的效應子勝任多肽進一步包含：胺基酸位置239處的天門冬胺酸（D）；胺基酸位置236處的丙胺酸（A）；胺基酸位置330處的白胺酸（L）；胺基酸位置256處的天門冬胺酸（D）；和/或胺基酸位置30處的麩醯胺酸（Q）。

【0035】在某些例示性實施例中，所述Fc結構域進一步包含胺基酸位置239處的天門冬胺酸（D）和胺基酸位置332處的麩胺酸（E），根據EU編號。

【0036】在某些例示性實施例中，所述Fc結構域進一步包含胺基酸位置236處的丙胺酸（A）、胺基酸位置239處的天門冬胺酸（D）和胺基酸位置332處的麩胺酸（E），根據EU編號。

【0037】在某些例示性實施例中，所述Fc結構域進一步包含胺基酸位置236處的丙胺酸（A）、胺基酸位置239處的天門冬胺酸（D）、胺基酸位置330處的白胺酸（L）和胺基酸位置332處的麩胺酸（E），根據EU編號。

【0038】在某些例示性實施例中，所述Fc結構域進一步包含胺基酸位置256處的天門冬胺酸（D）和胺基酸位置307處的麩醯胺酸（Q），根據EU編號。

【0039】在某些例示性實施例中，所述一個或多個取代與所述工程化二硫鍵位於相同重鏈上。

【0040】在某些例示性實施例中，所述一個或多個取代與所述工程化二硫鍵位於不同重鏈上。

【0041】在某些例示性實施例中，所述分離的效應子勝任多肽進一步包含結合結構域。在某些例示性實施例中，所述結合結構域包含一個或多個抗原結合結構域。在某些例示性實施例中，所述一個或多個抗原結合結構域與腫瘤抗原特異性結合。在某些例示性實施例中，所述一個或多個抗原結合結構域與免疫細胞上的抗原特異性結合。在某些例示性實施例中，所述結合多肽包含治療性多肽。在某些例示性實施例中，所述治療性多肽可以是受體、配體或酶。

【0042】在某些例示性實施例中，所述多肽是抗體。在某些例示性實施例中，所述多肽是單株抗體。在某些例示性實施例中，所述抗體是嵌合抗體、人源化抗體或人類抗體。在某些例示性實施例中，所述抗體是全長抗體。

【0043】在某些例示性實施例中，所述多肽是單結構域抗體。在某些例示性實施例中，所述單結構域抗體是VHH抗體。

【0044】在某些例示性實施例中，所述抗體是多特異性抗體。在某些例示性實施例中，所述多特異性抗體具有選自以下的形式：DVD-Ig、基於CODV的形式如CODV-Ig、CrossMab、CrossMab-Fab和Tandem Fab。基於CROSSODILES® CODV平臺的多特異性抗體特別描述於WO 2012135345、WO 2016116626、WO 2017180913中。CROSSODILES®是Sanofi的注冊商標。在某些例示性實施例中，所述多特異性抗體是T細胞接合體（engager）。在某些例示性實施例中，所述多特異性抗體是NK細胞接合體。

【0045】在某些例示性實施例中，所述結合多肽與所述Fc結構域的N末端和/或C末端連接。

【0046】在某些例示性實施例中，所述分離的效應子勝任多肽能夠藉由抗體依賴性細胞毒性（ADCC）和/或補體依賴性細胞毒性（CDC）耗盡靶細胞。

【0047】在某些例示性實施例中，所述靶細胞是癌細胞。

【0048】在某些例示性實施例中，所述靶細胞是免疫細胞。

【0049】在某些例示性實施例中，所述多肽是Fc融合多肽。

【0050】在另一態樣，提供了一種分離的核酸分子，包含編碼上文所述的分離的效應子勝任多肽的核酸。

【0051】在某些例示性實施例中，載體包含所述分離的核酸分子。在某些例示性實施例中，所述載體是表現載體。

【0052】在另一態樣，提供了包含所述載體的宿主細胞。

【0053】在某些例示性實施例中，所述宿主細胞是真核或原核起源的。在某些例示性實施例中，所述宿主細胞是哺乳動物起源的。在某些例示性實施例中，所述宿主細胞是細菌起源的。

【0054】在另一態樣，提供了一種醫藥組合物，所述醫藥組合物包含上文所述的分離的效應子勝任多肽。

【0055】在一態樣，提供了一種增加分離的效應子勝任多肽的產量的方法，包括：表現包含第一重鏈和第二重鏈的糖基化Fc結構域，其中至少一條重鏈包含由一對半胱胺酸（C）介導的工程化的鏈內二硫鍵，所述半胱胺酸取代：(i) 胺基酸位置242處的白胺酸（L）和胺基酸位置334處的離胺酸（K）；(ii) 胺基酸位置287處的丙胺酸（A）和胺基酸位置306處的白胺酸（L）；或 (iii) 胺基酸位置292處的精胺酸（R）和胺基酸位置302處的纈胺酸（V）；其中所述胺基酸位置根據EU編號；其中所述糖基化Fc結構域能夠與抗體效應子分子相互作用；並且其中與具有不包含所述工程化的鏈內二硫鍵的能夠與抗體效應子分子相互作用的糖基化Fc結構域的效應子勝任多肽相比，所述效應子勝任多肽具有增強的熱穩定性；以及純化所述效應子勝任多肽，其中與包含野生型糖基化Fc結構域的多肽相比，所述多肽的產量增加。

【0056】在某些例示性實施例中，所述糖基化Fc結構域包含胺基酸位置297處的天然聚糖，根據EU編號。在某些例示性實施例中，所述糖基化Fc結構域包含胺基酸位置297處的工程化或非天然聚糖，即任選地經修飾的聚糖。在某些

例示性實施例中，所述分離的效應子勝任多肽是N-糖基化的。在某些例示性實施例中，所述經修飾的聚糖可以與治療性分子接合。

【0057】 在某些例示性實施例中，所述第一重鏈包含所述半胱胺酸對。

【0058】 在某些例示性實施例中，所述第一重鏈和所述第二重鏈各自包含所述半胱胺酸對。

【0059】 在某些例示性實施例中，所述Fc結構域是人類Fc結構域。在某些例示性實施例中，所述Fc結構域是IgG1 Fc結構域。

【0060】 在某些例示性實施例中，所述抗體效應子分子是FcRn。在某些例示性實施例中，與野生型Fc結構域相比，所述分離的效應子勝任多肽具有與所述FcRn的增強的結合親和力。

【0061】 在某些例示性實施例中，所述抗體效應子分子是FcγRIIIa。在某些例示性實施例中，與包含野生型Fc結構域的多肽相比，所述分離的效應子勝任多肽具有與FcγRIIIa的增強的結合親和力。

【0062】 在某些例示性實施例中，與野生型Fc結構域相比，所述分離的效應子勝任多肽具有改變的血清半衰期。在某些例示性實施例中，與野生型Fc結構域相比，所述分離的效應子勝任多肽具有增強的血清半衰期。

【0063】 在某些例示性實施例中，所述分離的多肽進一步包含一個或多個增強效應子功能的胺基酸取代，任選地胺基酸位置332處的取代，根據EU編號。在某些例示性實施例中，所述胺基酸位置332處的取代是麩胺酸（E）。在某些例示性實施例中，所述Fc結構域進一步包含胺基酸位置236、239或330處的一個或多個取代，根據EU編號。在某些例示性實施例中，所述胺基酸位置236處的取代是丙胺酸（A）。在某些例示性實施例中，所述胺基酸位置239處的取代是天

門冬胺酸（D）。在某些例示性實施例中，所述胺基酸位置330處的取代是白胺酸（L）。

【0064】在某些例示性實施例中，所述Fc結構域進一步包含胺基酸位置239處的天門冬胺酸（D）和胺基酸位置332處的麩胺酸（E），根據EU編號。

【0065】在某些例示性實施例中，所述Fc結構域進一步包含胺基酸位置236處的丙胺酸（A）、胺基酸位置239處的天門冬胺酸（D）和胺基酸位置332處的麩胺酸（E），根據EU編號。

【0066】在某些例示性實施例中，所述Fc結構域進一步包含胺基酸位置236處的丙胺酸（A）、胺基酸位置239處的天門冬胺酸（D）、胺基酸位置330處的白胺酸（L）和胺基酸位置332處的麩胺酸（E），根據EU編號。

【0067】在某些例示性實施例中，所述分離的效應子勝任多肽進一步包含胺基酸位置256和/或307處的取代，根據EU編號。在某些例示性實施例中，所述胺基酸位置256處的取代是天門冬胺酸（D）。在某些例示性實施例中，所述胺基酸位置307處的取代是麩醯胺酸（Q）。

【0068】在某些例示性實施例中，所述Fc結構域進一步包含胺基酸位置256處的天門冬胺酸（D）和胺基酸位置307處的麩醯胺酸（Q），根據EU編號。

【0069】在某些例示性實施例中，所述Fc結構域進一步包含胺基酸位置239處的天門冬胺酸（D）、胺基酸位置332處的麩胺酸（E）、胺基酸位置256處的天門冬胺酸（D）和胺基酸位置307處的麩醯胺酸（Q），根據EU編號。

【0070】在某些例示性實施例中，所述Fc結構域進一步包含胺基酸位置236處的丙胺酸（A）、胺基酸位置239處的天門冬胺酸（D）、和胺基酸位置332

處的麩胺酸（E）、胺基酸位置256處的天門冬胺酸（D）和胺基酸位置307處的麩醯胺酸（Q），根據EU編號。

【0071】在某些例示性實施例中，所述Fc結構域進一步包含胺基酸位置236處的丙胺酸（A）、胺基酸位置239處的天門冬胺酸（D）、胺基酸位置330處的白胺酸（L）、胺基酸位置332處的麩胺酸（E）、胺基酸位置256處的天門冬胺酸（D）和胺基酸位置307處的麩醯胺酸（Q），根據EU編號。在某些例示性實施例中，所述一個或多個取代與所述工程化二硫鍵位於相同重鏈上。在某些例示性實施例中，所述一個或多個取代與所述工程化二硫鍵位於不同重鏈上。

【0072】在某些例示性實施例中，所述分離的效應子勝任多肽進一步包含結合多肽。在某些例示性實施例中，所述結合多肽包含一個或多個抗原結合結構域。在某些例示性實施例中，所述一個或多個抗原結合結構域特異性結合腫瘤抗原。在某些例示性實施例中，所述一個或多個抗原結合結構域與免疫細胞上的抗原特異性結合。

【0073】在某些例示性實施例中，所述分離的效應子勝任多肽是抗體。在某些例示性實施例中，所述分離的效應子勝任多肽是單株抗體。在某些例示性實施例中，所述抗體是嵌合抗體、人源化抗體或人類抗體。在某些例示性實施例中，所述抗體是全長抗體。

【0074】在某些例示性實施例中，所述分離的效應子勝任多肽是單結構域抗體。在某些例示性實施例中，所述單結構域抗體是VHH抗體。在某些例示性實施例中，所述抗體是多特異性抗體。在某些例示性實施例中，所述多特異性抗體具有選自以下的形式：DVD-Ig、基於CODV的形式如CODV-Ig、CrossMab、

CrossMab-Fb和Tandem Fab。在某些例示性實施例中，所述多特異性抗體是T細胞接合體。在某些例示性實施例中，所述多特異性抗體是NK細胞接合體。

【0075】 在某些例示性實施例中，所述結合多肽包含治療性多肽。在某些例示性實施例中，所述治療性多肽可以是受體、配體或酶。

【0076】 在某些例示性實施例中，所述結合多肽與所述Fc結構域的N末端和/或C末端連接。

【0077】 在某些例示性實施例中，所述分離的效應子勝任多肽能夠藉由抗體依賴性細胞毒性（ADCC）和/或補體依賴性細胞毒性（CDC）耗盡靶細胞。在某些例示性實施例中，所述靶細胞是癌細胞。在某些例示性實施例中，所述靶細胞是免疫細胞。

【0078】 在某些例示性實施例中，所述分離的效應子勝任多肽是Fc融合多肽。

【0079】 在另一態樣，提供了一種治療有需要的個體的疾病或病症的方法，所述方法包括向所述個體投予有效量的上述效應子勝任多肽。

【0080】 在某些例示性實施例中，所述疾病或病症是癌症。在某些例示性實施例中，所述疾病或病症是發炎疾病。在某些例示性實施例中，所述疾病或病症是自身免疫性疾病。

【圖式簡單說明】

【0081】 根據以下說明性實施例的詳細描述結合附圖，將更充分地理解本發明的前述和其他特徵和優點。

【0082】 **圖1A - 圖1B**描繪了300 K和370 K處的疏水性接觸頻率的平均值。**圖1A**描繪了胺基酸位置332處的麩胺酸（E）殘基的疏水性接觸的平均頻率。**圖1B**描繪了300 K處α碳的均方根波動（以埃為單位）。

【0083】 **圖2**描繪了在具有結構上緊密靠近的I332E（綠色CPK繪製）和L242C + K334C工程化二硫鍵（橙色CPK繪製）的Fc CH2結構域結構域（呈線-帶）上的DSB移植的實例。

【0084】 **圖3**描繪了I332（左小圖，疏水接觸以虛線突出顯示）和I332E（右小圖，靜電接觸以虛線突出顯示）的非共價鍵網路的實例。

【0085】 **圖4**描繪了針對DSB突變選擇的位置的例子。在左小圖上，L242+K334（在圓內的棒）。在右小圖上，R292和V302（在圓內的棒）。

【0086】 **圖5**描繪了被選擇為陰性對照的A287和L306（下部黃色棒）位置。這兩個殘基接近FcRn結合表面，並且位於IgG CH2結構域的邊界，其預測的結構影響低於兩個先前的DSB方案。

【0087】 **圖6**描繪了具有mAb1 ADLE和DSB突變型的二硫鍵的提取離子層析圖（XIC）肽定量曲線。對於ADLE，除218LC-223HC（在死體積中洗脫）外，檢測到八個二硫橋。對於ADLE_DQ_R292C_V302C，除218LC-223HC（在死體積中洗脫）外，檢測到九個二硫橋。對於ADLE_DQ_L242C_K334C，除218LC-223HC（在死體積中洗脫）外，檢測到八個二硫橋，並且具有一個共同的肽（突變和鉸鏈相同）。

【0088】 **圖7A - 圖7B**描繪了具有mAb1 DE和DSB突變型（**圖7A**）和mAb1 ADE和DSB突變型（**圖7B**）的二硫鍵的XIC肽定量曲線。對於DE，除218LC-223HC（在死體積中洗脫）外，檢測到八個二硫橋。對於DE_DQ_R292C_V302C，除

218LC-223HC（在死體積中洗脫）外，檢測到九個二硫橋。對於DE_DQ_L242C_K334C，除218LC-223HC（在死體積中洗脫）外，檢測到九個二硫橋，並且具有一個共同的肽（突變和鉸鏈相同）。

【0089】 **圖8**描繪了如藉由奈米差示掃描螢光測定法（nanoDSF）確定的mAb1 ADLE變體的二硫化物穩定化的熱穩定性作用。

【0090】 **圖9A - 圖9B**描繪了如藉由nanoDSF確定的mAb1 DE變體（**圖9A**）和ADE變體（**圖9B**）的二硫化物穩定化的熱穩定性作用。

【0091】 **圖10**描繪了如藉由奈米差示掃描螢光測定法（nanoDSF）確定的mAb3和mAb4的DE、ADE、DE + DSB（R292C-V302C）和ADE + DSB（R292C-V302C）變體的二硫化物穩定化的熱穩定性作用。左小圖描繪mAb3變體，並且右小圖描繪了mAb4變體，使用以下顏色代碼：綠色DE、紅色ADE、DE+ DSB紫色、ADE DSB藍色、WT黑色。

【0092】 **圖11**描繪了對於mAb1 +/- ADLE、DE或ADE +/- DSB（L242C_K334C或R292C_V302C），與IgG1野生型相比，ADLE變體、DE變體和ADE變體的CDC活性。

【0093】 **圖12**描繪了對於mAb1 +/- ADLE、DE或ADE -/+ DQ +/- R292C_V302C，與IgG1野生型相比，ADLE變體、DE變體和ADE變體的CDC活性。

【0094】 **圖13**描繪了對於mAb1 + ADLE、DE或ADE -/+ DQ +/- L242C_K334C，與IgG1野生型相比，ADLE變體、DE變體和ADE變體的CDC活性。

【0095】 **圖14**描繪了對於mAb1 +/-ADLE、DE或ADE +/- L242C_K334C或R294C_V304C，與IgG1野生型相比，ADLE變體、DE變體和ADE變體的ADCC活性。

【0096】 **圖15**描繪了對於mAb1 +/- ADLE、DE或ADE -/+ DQ +/- R292C_V302C，與IgG1野生型相比，ADLE變體、DE變體和ADE變體的ADCC活性。

【0097】 **圖16**描繪了對於mAb1 +/- ADLE、DE或ADE -/+ DQ +/- DSB L242C_K334C，與IgG1野生型相比，ADLE變體、DE變體和ADE變體的ADCC活性。

【0098】 **圖17**描繪了具有或不具有R292C-V302C DSB取代的ADE變體和DE變體的細胞毒性活性。特異性裂解百分比在y軸上，並且mAb3濃度（nM）在x軸上。

【0099】 **圖18**描繪了Tg32小鼠中mAb1抗體的平均PK曲線（對數標度）。

【0100】 **圖19**描繪了Tg32小鼠中另外的mAb1抗體的平均PK曲線（對數標度）。

【0101】 **圖20**描繪了Tg32小鼠中mAb3抗體的平均PK曲線（對數標度）。

【實施方式】

【0102】 相關申請的交叉引用

【0103】 本申請要求2021年5月27日提交的美國臨時專利申請序號63/193,665和2021年7月15日提交的歐洲申請號21315127.7的優先權，將其公開內容藉由引用以其整體特此併入。

【0104】 序列表

【0105】 本申請含有已經以ASCII格式電子提交並且藉由引用以其整體特此併入的序列表。2022年6月30日創建的所述ASCII副本被命名為728057_SA9-308PC_SL.txt並且大小為56,148位元組。

【0106】 本揭露提供了具有改善的熱穩定性的新型Fc結構域變體（例如，包含Fc結構域變體的新型結合多肽）。本揭露還提供了具有改善的與Fc受體的結合的新型Fc結構域變體（例如，包含Fc結構域變體的新型結合多肽）。本揭露進一步提供了包含糖基化Fc結構域的新型Fc結構域變體（例如，包含Fc結構域變體的結合多肽），與野生型（例如，未經修飾的）Fc結構域相比，所述糖基化Fc結構域增強與抗體效應分子的相互作用。本揭露還提供了編碼Fc結構域變體（例如，包含Fc結構域變體的新型結合多肽）的核酸、用於製造Fc結構域變體（例如，包含Fc結構域變體的新型結合多肽）的重組表現載體和宿主細胞，以及包含分離的Fc結構域變體（例如，包含Fc結構域變體的新型結合多肽）的醫藥組合物。還提供了使用本揭露的Fc結構域變體（例如，包含Fc結構域變體的新型結合多肽）治療一種或多種疾病或病症的方法。

【0107】 應理解，本揭露中描述的方法不限於本文公開的特定方法和實驗條件，因為此類方法和條件可以變化。還應當理解，本文使用的術語是僅僅出於描述具體實施例的目的，而不意圖限制。

【0108】 此外，除非另外指示，否則本文所述的實驗使用本領域技術範圍內的常規分子和細胞生物學和免疫學技術。此類技術是熟練工作者所熟知的，並且在文獻中已充分解釋。參見例如，Ausubel等人, 編輯, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., 紐約, 紐約州(1987-2008)，包括所有增

補本，Molecular Cloning: A Laboratory Manual（第四版）MR Green和J. Sambrook，以及Harlow等人, Antibodies: A Laboratory Manual, 第14章, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor（2013，第2版）。

【0109】除非另外定義，否則本文使用的科學和技術術語具有本領域普通技術人員通常所理解的含義。在任何潛在歧義的情況下，本文所提供的定義優先於任何字典或非固有定義。除非上下文另外要求，否則單數術語應包括複數，並且複數術語應包括單數。除非另外說明，否則“或”的使用意指“和/或”。術語“包括（including）”以及其他形式如“包括”（“includes”和“included”）的使用不是限制性的。

【0110】通常，本文所述的結合細胞和組織培養、分子生物學、免疫學、微生物學、遺傳學以及蛋白質和核酸化學和雜交使用的術語是本領域公知且常用的。除非另外指示，否則本文所提供的方法和技術通常是根據本領域熟知並且如本說明書通篇引用和討論的各個通用和更具體參考文獻中所述的常規方法來進行的。根據製造商的說明書如本領域通常所實現的或如本文所述的那樣進行酶促反應和純化技術。關於本文所述的分析化學、合成有機化學以及醫學和藥物化學使用的術語以及本文所述的分析化學、合成有機化學以及醫學和藥物化學的實驗室程序和技術是本領域熟知且常用的那些。將常規技術用於化學合成、化學分析、藥物製備、配製和遞送以及患者的治療。

【0111】為了可以更容易地理解本揭露，下面定義了選擇的術語。

【0112】除非上下文另外矛盾，否則術語“多肽”是指胺基酸的任何聚合體鏈，並且涵蓋天然或人工蛋白質、蛋白質序列的多肽類似物或變體或其片段。

多肽可以是單體或聚合體的。例如，多肽片段包含至少約5個連續胺基酸、至少約10個連續胺基酸、至少約15個連續胺基酸或至少約20個連續胺基酸。

【0113】術語“分離的蛋白質”或“分離的多肽”是指這樣的蛋白質或多肽，由於其起源或衍生源不與其天然狀態下伴隨它的天然締合組分締合；基本上不含來自相同物種的其他蛋白質；由來自不同物種的細胞表現；或者在自然界中不存在。因此，化學合成的或在與其天然起源的細胞不同的細胞系統中合成的蛋白質或多肽將是與其天然締合組分“分離的”。藉由使用本領域熟知的蛋白質純化技術分離，也可以使蛋白質或多肽基本上不含天然締合組分。

【0114】如本文所用，術語“結合蛋白”或“結合多肽”應當指代含有至少一個結合位點的蛋白質或多肽（例如，抗體或免疫粘附素），所述結合位點負責與目的靶抗原（例如，人類靶抗原）選擇性地結合。例示性結合位點包括抗體可變結構域、受體的配體結合位點或配體的受體結合位點。在某些態樣，結合蛋白或結合多肽包含多個（例如，兩個、三個、四個或更多個）結合位點。在某些態樣，結合蛋白或結合多肽是治療性酶。

【0115】術語“配體”是指能夠結合或被結合至另一種物質的任何物質。類似地，術語“抗原”是指可以產生針對其的抗體的任何物質。儘管“抗原”通常關於抗體結合基質使用，並且“配體”通常在提及受體結合基質時使用，但這些術語彼此沒有區別，並且涵蓋範圍廣泛的重疊化學實體。為免生疑問，抗原和配體貫穿本文可互換地使用。抗原/配體可以是肽、多肽、蛋白質、適配體、多糖、糖分子、碳水化合物、脂質、寡核苷酸、多核苷酸、合成分子、無機分子、有機分子及其任何組合。

【0116】結合蛋白的解離常數（K_D）可以例如藉由表面等離子體共振來確定。通常，表面等離子體共振分析藉由表面等離子體共振（SPR）使用BIAcore系統（Pharmacia Biosensor；皮斯卡塔韋，新澤西州）測量配體（生物感測器基質上的靶抗原）與分析物（溶液中的結合蛋白）之間的即時結合相互作用。表面等離子體分析還可以藉由固定分析物（生物感測器基質上的結合蛋白）並呈遞配體（靶抗原）來進行。如本文所用術語“K_D”是指特定結合蛋白與靶抗原之間的相互作用的解離常數。

【0117】如本文所用，術語“特異性結合”是指抗體或免疫粘附素以至多約1 x 10^{-6} M、約1 x 10^{-7} M、約1 x 10^{-8} M、約1 x 10^{-9} M、約1 x 10^{-10} M、約1 x 10^{-11} M、約1 x 10^{-12} M或更低的解離常數（K_D）與靶標（例如，抗原）結合，和/或以其對非特異性抗原的親和力至少約兩倍的親和力與抗原結合的能力。抗體的特異性結合可以是藉由CDR序列與靶抗原特異性結合。抗體也可以藉由Fc區與FcR（如FcRn或FcγRIIIa）特異性結合。

【0118】如本文所用，術語“抗體”是指這樣的組裝體（例如，完整抗體分子、免疫粘附素或其變體），其對目的抗原（例如腫瘤相關抗原）具有顯著已知的特異性免疫反應活性。抗體和免疫球蛋白包含輕鏈和重鏈，其間具有或不具有鏈間共價連接。已相對充分地理解脊椎動物系統中的基礎免疫球蛋白結構。

【0119】如下面將更詳細討論的，通用術語“抗體”包括可以在生物化學上區分的五種不同類別的抗體。雖然所有五個抗體類別顯然均在本揭露的範圍內，但以下討論將總體上涉及免疫球蛋白分子的IgG類別。關於IgG，免疫球蛋白包含分子量為大約23,000道爾頓的兩條相同的輕鏈和分子量為53,000-70,000

的兩條相同的重鏈。四條鏈以“Y”組態藉由二硫鍵接合，其中輕鏈從“Y”的口部開始包圍重鏈並持續至可變區。

【0120】 免疫球蛋白的輕鏈被分類為卡帕（κ）或拉姆達（λ）。每種重鏈類別均可以與κ或λ輕鏈結合。通常，輕鏈和重鏈彼此共價鍵合，並且當免疫球蛋白由雜交瘤、B細胞或基因工程化的宿主細胞產生時，兩條重鏈的“尾”部分藉由共價二硫連接或非共價連接彼此鍵合。在重鏈中，胺基酸序列從Y組態的分叉末端的N末端延伸至每條鏈底部的C末端。本領域技術人員將理解，重鏈被分類為伽馬（γ）、繆（μ）、阿耳法（α）、德耳塔（δ）或伊普西隆（ε），在它們之中具有一些亞類（例如，γl-γ4）。此鏈的性質可將抗體的“類別”分別確定為IgG、IgM、IgA、IgG或IgE。已充分地表徵免疫球蛋白同種型亞類（例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1等），並且已知它們賦予功能特化。鑒於本揭露，這些類別和同種型中的每一種的修飾形式對於熟練技術人員來說均是容易辨別的，因此，它們在本揭露的範圍內。

【0121】 輕鏈和重鏈二者均被分成具有結構和功能同源性的區域。術語“區域”是指免疫球蛋白或抗體鏈的一部分（part或portion），並且包括恒定區或可變區以及所述區域的更離散的部位或部分。例如，輕鏈可變區包括如本文所定義的散佈在“架構區”或“FR”之間的“互補決定區”或“CDR”。

【0122】 免疫球蛋白重鏈或輕鏈的區域可以被定義為“恒定”（C）區或“可變”（V）區，在“恒定區”的情況下是基於各個類別成員的區域內序列變化的相對缺乏，或在“可變區”的情況下是基於各個類別成員的區域內的顯著變化。術語“恒定區”和“可變區”也可以關於功能使用。在這方面，將理解，免疫球蛋白或抗體的可變區確定抗原識別和特異性。相反，免疫球蛋白或抗體的恒定區賦予重

要的效應子功能，如分泌、經胎盤移動、Fc受體結合、補體結合等。各種免疫球蛋白類別的恒定區的亞基結構和三維組態是熟知的。

【0123】 免疫球蛋白重鏈和輕鏈的恒定區和可變區被折疊成結構域。術語“結構域”是指重鏈或輕鏈的球狀區，其包含例如藉由β折疊片和/或鏈內二硫鍵穩定的肽環（例如，包含3至4個肽環）。免疫球蛋白輕鏈上的恒定區結構域可互換地稱為“輕鏈恒定區結構域”、“CL區”或“CL結構域”。重鏈上的恒定結構域（例如，鉸鏈、CH1、CH2或CH3結構域）可互換地稱為“重鏈恒定區結構域”、“CH”區結構域或“CH結構域”。輕鏈上的可變結構域可互換地稱為“輕鏈可變區結構域”、“VL區結構域”或“VL結構域”。重鏈上的可變結構域可互換地稱為“重鏈可變區結構域”、“VH區結構域”或“VH結構域”。

【0124】 按照慣例，可變恒定區結構域的胺基酸的編號隨著它們離免疫球蛋白或抗體的抗原結合位點或胺基末端越來越遠而增加。免疫球蛋白的每條重鏈和輕鏈的N末端是可變區，並且C末端是恒定區。CH3和CL結構域分別包含重鏈和輕鏈的羧基末端。因此，輕鏈免疫球蛋白的結構域以VL-CL取向排列，而重鏈的結構域以VH-CH1-鉸鏈-CH2-CH3取向排列。

【0125】 每個可變區結構域的胺基酸分配是按照Kabat的定義，Sequences of Proteins of Immunological Interest（National Institutes of Health, 貝塞斯達, 馬里蘭州, 1987和1991）。Kabat還提供了廣泛使用的編號慣例（Kabat編號），其中不同重鏈可變區之間或不同輕鏈可變區之間的相應殘基被分配相同的編號。VL結構域的CDR 1、2和3在本文中也分別稱為CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。VH結構域的CDR 1、2和3在本文中也分別稱為CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3。如果這樣指出，則CDR的分配可以按照IMGT®（Lefranc等人, Developmental &

Comparative Immunology 27:55-77; 2003），而非Kabat。重鏈恒定區的編號是經由如Kabat（Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, 貝塞斯達, 馬里蘭州, 1987和1991）中所述的EU索引。

【0126】 如本文所用，術語“VH結構域”包括免疫球蛋白重鏈的胺基末端可變結構域，並且術語“VL結構域”包括免疫球蛋白輕鏈的胺基末端可變結構域。

【0127】 如本文所用，術語“CH1結構域”包括免疫球蛋白重鏈的第一（最胺基末端）恒定區結構域，其例如按Kabat編號系統從大致位置114延伸至位置223（EU位置118-215）。CH1結構域與VH結構域和免疫球蛋白重鏈分子的鉸鏈區的胺基末端相鄰，並且不構成免疫球蛋白重鏈的Fc區的一部分。

【0128】 如本文所用，術語“鉸鏈區”包括重鏈分子的將CH1結構域與CH2結構域接合的部分。鉸鏈區包含大約25個殘基並且是柔性的，因此允許兩個N末端抗原結合區獨立地移動。鉸鏈區可以細分為三個不同的結構域：上部、中部和下部鉸鏈結構域（Roux等人 J. Immunol. 1998, 161 :4083）。

【0129】 如本文所用，術語“CH2結構域”包括重鏈免疫球蛋白分子的這樣的部分，其例如按Kabat編號系統從大致位置244延伸至位置360（EU位置231-340）。CH2結構域是獨特的，因為它不與另一個結構域緊密配對。而是兩條N連接的支鏈碳水化合物鏈插入完整天然IgG分子的兩個CH2結構域之間。在一個實施例中，本揭露的結合多肽包含源自IgG1分子（例如人類IgG1分子）的CH2結構域。

【0130】 如本文所用，術語“CH3結構域”包括重鏈免疫球蛋白分子的這樣的部分，其從CH2結構域的N末端延伸大約110個殘基，例如按Kabat編號系統從大致位置361延伸至位置476（EU位置341-445）。CH3結構域通常形成抗體的C

末端部分。然而，在一些免疫球蛋白中，另外的結構域可以從CH3結構域延伸以形成分子的C末端部分（例如，IgM的μ鏈和IgE的e鏈中的CH4結構域）。在一個實施例中，本揭露的結合多肽包含源自IgG1分子（例如，人類IgG1分子）的CH3結構域。

【0131】 如本文所用，術語“CL結構域”包括免疫球蛋白輕鏈的恒定區結構域，其例如從大致Kabat位置107A延伸至大致Kabat位置216。CL結構域與VL結構域相鄰。在一個實施例中，本揭露的結合多肽包含源自κ輕鏈（例如，人κ輕鏈）的CL結構域。

【0132】 抗體的可變區允許其選擇性地識別並特異性地結合抗原上的表位。也就是說，抗體的VL結構域和VH結構域組合以形成限定三維抗原結合位點的可變區（Fv）。此四元抗體結構形成存在於“Y”組態的每條臂的末端的抗原結合位點。更具體地，抗原結合位點由每個重鏈和輕鏈可變區上的三個互補決定區（CDR）限定。如本文所用，術語“抗原結合位點”包括特異性結合抗原（例如，細胞表面或可溶性抗原）的位點。抗原結合位點包括免疫球蛋白重鏈和輕鏈可變區，並且由這些可變區形成的結合位點決定抗體的特異性。抗原結合位點由可變區形成，所述可變區在抗體之間有所不同。本揭露的經改變的抗體包含至少一個抗原結合位點。

【0133】 在某些實施例中，本揭露的結合多肽包含提供結合多肽與選擇的抗原的締合的至少兩個抗原結合結構域。抗原結合結構域不必源自相同的免疫球蛋白分子。在這方面，可變區可能源自或源自任何類型的動物，其可以被誘導產生體液反應並產生針對所需抗原的免疫球蛋白。因此，結合多肽的可變區可以是例如哺乳動物起源的，例如可以是人、鼠、大鼠、山羊、綿羊、非人靈

長類動物（如食蟹猴、獼猴等）、狼或駱駝科動物（例如，來自駱駝、美洲駝和相關物種）。

【0134】在天然存在的抗體中，存在於每個單體抗體上的六個CDR是短的非連續的胺基酸序列，其特異性定位以形成抗原結合位點，因為假定抗體在水性環境中呈現其三維組態。其餘的重和輕可變結構域在胺基酸序列中顯示出較小的分子間變異性，並且被稱為架構區。架構區主要採用β片層構型，並且CDR形成環，其連接β片層結構，並且在一些情況下形成β片層結構的一部分。因此，這些架構區起到形成支架的作用，所述支架提供六個CDR藉由鏈間非共價相互作用在正確取向上的定位。由定位的CDR形成的抗原結合結構域限定了與免疫反應性抗原上的表位互補的表面。此互補表面促進抗體與免疫反應性抗原表位的非共價結合。

【0135】例示性結合多肽包括抗體變體。如本文所用，術語“抗體變體”包括抗體的合成和工程化形式，所述抗體被改變使得它們不是天然存在的，例如包含至少兩個重鏈部分但不是兩條完整重鏈的抗體（如結構域缺失的抗體或微型抗體）；多特異性形式的（例如，雙特異性、三特異性等）抗體，其被改變以與兩種或更多種不同的抗原或與單一抗原上的不同表位結合；與scFv分子接合的重鏈分子等。此外，術語“抗體變體”包括多價形式的抗體（例如，結合相同抗原的三個、四個或更多個拷貝的三價、四價等抗體）。

【0136】如本文所用，術語“價態”是指多肽中潛在的靶結合位點的數目。每個靶結合位點特異性結合一種靶分子或靶分子上的特異性位點。當多肽包含多於一個靶結合位點時，每個靶結合位點可以特異性結合相同或不同的分子（例如，可以與不同的配體或不同的抗原或者相同抗原上的不同表位結合）。主題

結合多肽通常具有對人類抗原分子具有特異性的至少一個結合位點。例如，典型的IgG1單株抗體對一種靶抗原具有特異性。二價抗體是包含靶向兩種不同抗原的抗原結合結構域或靶向一種抗原的兩個抗原結合結構域的抗體。類似地，三價抗體可以是具有針對單個抗原的三個靶向結構域的單特異性抗體。如果三價抗體結合具有兩個結合結構域的第一抗原和具有另一個結合結構域的第二抗原，則所述三價抗體可以是雙特異性的。三價抗體可能是三特異性的，並且與三個不同的靶標結合。

【0137】術語“特異性”是指特異性結合（例如，與……免疫反應）給定靶抗原（例如，人類靶抗原）的能力。結合多肽可以是單特異性的並且含有特異性結合靶標的一個或多個結合位點，或者多肽可以是多特異性的並且含有特異性結合相同或不同靶標的兩個或更多個結合位點。在某些實施例中，結合多肽對相同靶標的兩個不同（例如，非重疊）部分具有特異性。在某些實施例中，結合多肽對多於一種靶標具有特異性。例示性結合多肽（例如，抗體）是本領域已知的，所述多肽包含結合腫瘤細胞上表現的抗原的抗原結合位點，並且來自此類抗體的一個或多個CDR可以包括在如本文所述的抗體中。

【0138】如本文所用，術語“抗原”或“靶抗原”是指能夠被結合多肽的結合位點結合的分子或分子的一部分。靶抗原可具有一個或多個表位。

【0139】術語“約”或“大約”意指在給定值或範圍的約20%內，如在約10%內、在約5%內或在約1%內或更少。

【0140】如本文所用，“投予（administer）”或“投予（administration）”是指將存在於體外的物質（例如，本文所提供的分離的結合多肽）注射或以其他方式物理遞送至患者的行為，如藉由但不限於肺部（例如，吸入）、粘膜（例

如，鼻內）、皮內、靜脈內、肌內遞送和/或本文所述或本領域已知的任何其他物理遞送方法。當要管理或治療疾病或其症狀時，物質的投予通常在疾病或其症狀發作之後進行。當要預防疾病或其症狀時，物質的投予通常在疾病或其症狀發作之前進行，並且可以長期持續以延遲或減少疾病相關症狀的出現或程度。

【0141】如本文所用，術語“組合物”旨在涵蓋含有任選的指定量的指定成分（例如，本文所提供的分離的結合多肽）的產品，以及直接或間接由任選的指定的量的指定成分的組合產生的任何產品。

【0142】“有效量”意指活性藥劑（例如，本揭露的分離的結合多肽）的足以在需要藥劑的個體中實現所需生理學結局的量。根據待治療個體的健康和身體狀況、待治療個體的分類組、組合物的配製、個體醫療狀況的評估和其他相關因素，有效量可以在個體之間有所不同。

【0143】如本文所用，術語“個體”和“患者”可互換地使用。如本文所用，個體可以是哺乳動物，如非靈長類動物（例如，牛、豬、馬、貓、狗、大鼠等）或靈長類動物（例如，猴和人）。在某些實施例中，如本文所用，術語“個體”是指脊椎動物，如哺乳動物。哺乳動物包括但不限於人類、非人靈長類動物、野生動物、未馴服的動物、農場動物、運動動物和寵物。

【0144】如本文所用，術語“療法”是指可以用於預防、管理、治療和/或改善疾病或與其相關的症狀的任何方案、方法和/或藥劑。在一些實施例中，術語“療法”是指可以用於調節個體對感染的免疫反應或與其相關的症狀的任何方案、方法和/或藥劑。在一些實施例中，術語“療法（therapies）”和“療法（therapy）”是指本領域技術人員（如醫務人員）已知的可用於預防、管理、治療和/或改善疾病或與其相關的症狀的生物療法、支持療法和/或其他療法。在其他實施例中，

術語“療法（therapies）”和“療法（therapy）”是指本領域技術人員（如醫務人員）已知的可用於調節個體對感染的免疫反應或與其相關的症狀的生物療法、支持療法和/或其他療法。

【0145】 如本文所用，術語“治療（treat）”、“治療（treatment）”和“治療（treating）”是指由一種或多種療法的投予（包括但不限於一種或多種預防或治療劑（如本文所提供的分離的結合多肽）的投予）引起的疾病或與其相關的症狀的進展、嚴重程度和/或持續時間的降低或改善。如本文所用，術語“治療”還可以指代改變被治療個體的病程。治療的治療效果包括但不限於預防疾病的發生或復發、緩和一種或多種症狀、減少疾病的直接或間接病理後果、降低疾病進展的速度、改善或減緩疾病狀態以及緩解或改善預後。

【0146】 **Fc結構域**

【0147】 在本揭露的某些態樣，提供了Fc結構域，例如Fc結構域變體。如本文所用，術語“Fc區”或“Fc結構域”是指重鏈恒定區的這樣的部分，其始於恰在木瓜蛋白酶切割位點（即，IgG中的殘基216，將重鏈恒定區的第一個殘基取為114）上游的鉸鏈區並在抗體的C末端結束。因此，完整的Fc區至少包含鉸鏈結構域、CH2結構域和CH3結構域。

【0148】 抗體的Fc區參與非抗原結合，並且可以藉由與Fc受體結合來介導效應子功能。存在幾種不同類型的Fc受體，所述Fc受體基於它們識別的抗體類型進行分類。例如，Fcγ受體（FcγR）與IgG類抗體結合，Fcα受體（FcαR）與IgA類抗體結合，並且Fcε受體（FcεR）與IgE類抗體結合。新生Fc受體（FcRn）與抗體的Fc區相互作用以藉由挽救正常的溶酶體降解促進抗體循環。FcγR屬於包括幾個成員（例如，FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIa和FcγRIIIb）的家族。

【0149】如本文所用，術語“天然Fc”或“野生型Fc”是指對應於由抗體消化產生或藉由其他手段產生的非抗原結合片段的序列的分子，無論呈單體還是多聚體形式，並且可以含有鉸鏈區。天然Fc的原始免疫球蛋白來源通常是人類來源，並且可以是任何免疫球蛋白，如IgG1和IgG2。天然Fc分子由可以藉由共價（即，二硫鍵）和非共價締合連接成二聚或多聚形式的單體多肽構成。天然Fc分子的單體亞基之間的分子間二硫鍵的數目範圍為1至4，這取決於類（例如，IgG、IgA和IgE）或亞類（例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgA1和IgGA2）。天然Fc的一個例子是由IgG的木瓜蛋白酶消化得到的二硫鍵鍵合的二聚體。如本文所用，術語“天然Fc”對於單體、二聚體和多聚體形式是通用的。

【0150】如本文所用，術語“Fc結構域變體”、“Fc變體”或“經修飾的Fc”是指從天然/野生型Fc修飾而來但仍包含FcR的結合位點的分子或序列。因此，術語“Fc變體”可以包括從非人天然Fc人源化的分子或序列。此外，天然Fc包含可以去除的區域，因為它們提供了本文所述的抗體樣結合多肽不需要的結構特徵或生物活性。因此，術語“Fc變體”包括這樣的分子或序列，其缺少一個或多個天然Fc位點或殘基，或者在其中一個或多個Fc位點或殘基已經被修飾，所述位點或殘基影響或參與：(1) 二硫鍵形成，(2) 與選擇的宿主細胞的不相容性，(3) 在選擇的宿主細胞中表現時的N末端異質性，(4) 糖基化，(5) 與補體的相互作用，(6) 與除了補救受體之外的Fc受體結合，或 (7) 抗體依賴性細胞毒性（ADCC）。

【0151】如本文所用，“效應子勝任Fc變體”或“效應子勝任多肽”是指具有一種或多種如本文進一步描述的Fc效應子功能的Fc結構域。

【0152】在某些例示性實施例中，與野生型Fc相比，本文特定的Fc變體具有增加的血清半衰期、增強的FcRn結合親和力、在酸性pH下增強的FcRn結合親和力、增強的FcγRIIIa結合親和力和/或類似的熱穩定性中的一種或多種。

【0153】FcγRIIIa V158、或人類CD16a-V受體、或$CD16a^{V}$是指包含CD16人類受體的片段的多肽構築體，所述片段與天然抗體的Fc區結合，介導抗體依賴性細胞毒性，並在位置158上帶有纈胺酸（V），其在文獻中也被報導為同種異型CD16a V158。

【0154】FcγRIIIa F158、或人類CD16a-F受體、或$CD16a^{F}$是指包含CD16人類受體的片段的多肽構築體，與天然抗體的Fc區結合，介導抗體依賴性細胞毒性，並在位置158上帶有苯丙胺酸（F），其在文獻中也被報導為同種異型CD16a F158。

【0155】如本文所用的術語“Fc結構域”涵蓋如本文所定義的天然/野生型Fc以及Fc變體和序列。與Fc變體和天然Fc分子一樣，術語“Fc結構域”包括單體或多聚體形式的分子，無論是從完整抗體消化而來還是藉由其他手段產生。

【0156】在某些例示性實施例中，如本文所述的Fc結構域是熱穩定的。

【0157】在某些例示性實施例中，如本文所述的Fc結構域是糖基化的（例如，經由N連接的糖基化）。在某些例示性實施例中，Fc結構域包含N連接的糖基化，例如在含有胺基酸序列NXT或NXS（X是除脯胺酸以外的任何胺基酸殘基）的N連接的糖基化基序處。在某些例示性實施例中，Fc結構域在胺基酸位置297處糖基化，根據EU編號。

【0158】在某些例示性實施例中，如本文所述的Fc結構域是效應子勝任的。

【0159】在某些例示性實施例中，如本文所述的Fc結構域是熱穩定的、糖基化的和效應子勝任的任何組合。

【0160】熱穩定的Fc結構域變體

【0161】恒定抗體結構域的結構類似於由用環和短螺旋連接的β鏈組成的可變結構域的結構。與其他結構域中展現的廣泛的鏈間相互作用相反，重恒定區的CH2結構域展現出弱的碳水化合物介導的鏈間蛋白質-蛋白質相互作用。分離的小鼠CH2結構域在生理溫度下相對不穩定（Feige等人, 2004, *J. Mol. Biol.* 344:107-118），但是先前的成果表明CH2結構域的熱穩定性可以用添加鏈內二硫鍵增強，並且這些鏈內二硫鍵可以用作結合劑的支架（Gong等人, 2009, *J. Biol. Chem.* 284:14203-210）。

【0162】相對於野生型Fc結構域，展現出增加的熱不穩定性（即，降低的熱穩定性）的效應子增強Fc結構域變體是已知的。例如，S239D/I332E和S239D/I332E/A330L變體導致CH2結構域的穩定性降低，如藉由差示掃描量熱法（DSC）分析中的熔化溫度（Tm）的降低所指示的。G236A/S239D/A330L/I332E具有與野生型相比時降低的蛋白質熱位移測量值，以及在hFcγR轉基因小鼠中顯著縮短的半衰期。（綜述參見Liu等人(2014) J. Biol.Chem.289(6): 3571，和Liu等人(2020) Antibodies 9(4): 64。）

【0163】如與野生型相比具有改善的FcγR結合的效應子增強Fc結構域變體是已知的，其中穩定性沒有顯著降低。（參見例如，Igawa等人, EP 2 940 135，例如，實例10。）

【0164】已經進一步發現，可以藉由在Fc結構域中引入一個或多個二硫鍵來產生熱穩定的Fc結構域變體。因此，在一態樣，本揭露提供了一種Fc結構域

變體，其包含一個或多個工程化（例如，非天然）二硫鍵，例如由例如一對或多對半胱胺酸介導的鏈內二硫鍵。

【0165】 在某些例示性實施例中，二硫鍵是Fc結構域的兩個CH2區之間的鏈內二硫鍵。在某些例示性實施例中，二硫鍵是Fc結構域的兩個CH3區之間的鏈內二硫鍵。在某些例示性實施例中，在Fc結構域的兩個CH2區之間和/或Fc結構域的兩個CH2區之間存在兩個或更多個鏈內二硫鍵。

【0166】 Fc結構域（例如，具有或不具有結合多肽的Fc結構域）的熱穩定性或解折疊的傾向可以使用本領域已知的各種方法來確定。例如，解折疊或變性溫度可以藉由奈米形式差示掃描量熱法（nanoDSC）或奈米形式差示掃描螢光分析法（nanoDSF）來測量（Wen等人, 2020 *Anal.Biochem.*593:113581）。蛋白質開始解折疊時的可檢測溫度是T起始。如本文所用，術語“Tm”是指分子的熔化溫度。如本文所用，術語“Tm1”是指本揭露的Fc結構域的解折疊溫度，特別是CH2結構域的解折疊溫度。

【0167】 在某些例示性實施例中，相對於未熱穩定的Fc結構域變體，熱穩定的Fc結構域變體（例如，具有一個或多個工程化的二硫鍵）的T起始增加。在某些例示性實施例中，相對於未熱穩定的Fc結構域變體，熱穩定的Fc結構域變體的T起始增加約1.0℃、約1.5℃、約2.0℃、約2.5℃、約3.0℃、約3.5℃、約4.0℃、約4.5℃、約5.0℃、約5.5℃、約6.0℃、約6.5℃、約7.0℃、約7.5℃、約8.0℃、約8.5℃、約9.0℃、約9.5℃、約10.0℃、約10.5℃、約11.0℃、約11.5℃、約12.0℃、約12.5℃、約13.0℃、約13.5℃、約14.0℃、約14.5℃、約15.0℃、約15.5℃、約16.0℃、約16.5℃、約17.0℃、約17.5℃、約18.0℃、約18.5℃、約19.0℃、約19.5℃、

約20.0℃、約20.5℃、約21.0℃、約21.5℃、約22.0℃、約22.5℃、約23.0℃、約23.5℃、約24.0℃、約24.5℃或約25.0℃。

【0168】在某些例示性實施例中，熱穩定的Fc結構域變體具有選自以下位置處的半胱胺酸取代的一個或多個胺基酸取代對：胺基酸位置242和334；胺基酸位置240和334；胺基酸位置287和306；胺基酸位置292和302；胺基酸位置323和332；胺基酸位置259和306；胺基酸位置350和441；胺基酸位置343和431；胺基酸位置375和404；胺基酸位置375和396；和胺基酸位置348和439，根據EU編號。（綜述參見Wozniak-Knopp等人, 2012, *PLoS One* 7: e30083；Jacobsen等人, 2017 *J. Biol.Chem.*202:1865-75；WO 2014153063。）

【0169】在某些例示性實施例中，熱穩定的Fc結構域變體包含由一對半胱胺酸介導的工程化（例如，非天然）鏈內二硫鍵，所述半胱胺酸取代 (i) 胺基酸位置242處的白胺酸（L）和胺基酸位置334處的離胺酸（K）；(ii) 胺基酸位置287處的丙胺酸（A）和胺基酸位置306處的白胺酸（L）；或 (iii) 胺基酸位置292處的精胺酸（R）和胺基酸位置302處的纈胺酸（V），根據EU編號。

【0170】在某些例示性實施例中，熱穩定的Fc結構域變體包含由一對半胱胺酸介導的工程化（例如，非天然）鏈內二硫鍵，所述半胱胺酸取代胺基酸位置242處的白胺酸（L）和胺基酸位置334處的離胺酸（K）。在某些例示性實施例中，熱穩定的Fc結構域變體包含由一對半胱胺酸介導的工程化（例如，非天然）鏈內二硫鍵，所述半胱胺酸取代胺基酸位置287處的丙胺酸（A）和胺基酸位置306處的白胺酸（L）。在某些例示性實施例中，熱穩定的Fc結構域變體包含由一對半胱胺酸介導的工程化（例如，非天然）鏈內二硫鍵，所述半胱胺酸取代胺基酸位置292處的精胺酸（R）和胺基酸位置302處的纈胺酸（V）。在某

些例示性實施例中，熱穩定的Fc結構域變體可以包含至少一個工程化的鏈內二硫鍵。在某些例示性實施例中，熱穩定的Fc結構域變體可以包含多於一個的工程化的鏈內二硫鍵。

【0171】 效應子增強Fc結構域變體

【0172】 在一態樣，本揭露提供了包含效應子增強胺基酸取代的Fc結構域變體。

【0173】 在一個實施例中，具有改變的FcγRIIIa結合的Fc結構域變體包含一個或多個如本文所公開的胺基酸取代。在一個實施例中，具有增強的FcγRIIIa結合親和力的Fc結構域變體具有一個或多個如本文公開的胺基酸取代。在一個實施例中，具有增強的FcγRIIIa結合親和力的Fc結構域變體包含兩個或更多個如本文公開的胺基酸取代。在一個實施例中，具有增強的FcγRIIIa結合親和力的Fc結構域變體包含三個或更多個如本文公開的胺基酸取代。在一個實施例中，具有增強的FcγRIIIa結合親和力的Fc結構域變體包含四個或更多個如本文所公開的胺基酸取代。

【0174】 在一個實施例中，具有改變的FcRn結合的Fc結構域變體包含具有一個或多個如本文公開的胺基酸取代的Fc結構域。在一個實施例中，具有增強的FcRn結合親和力的Fc結構域變體包含具有一個或多個如本文公開的胺基酸取代的Fc結構域。在一個實施例中，具有增強的FcRn結合親和力的Fc結構域變體包含具有兩個或更多個如本文公開的胺基酸取代的Fc結構域。在一個實施例中，具有增強的FcRn結合親和力的Fc結構域變體包含具有三個或更多個如本文公開的胺基酸取代的Fc結構域。

【0175】在一些實施例中，Fc結構域變體可以展現出物種特異性FcRn結合親和力。在一個實施例中，Fc結構域變體可以展現出人類FcRn結合親和力。在一個實施例中，Fc結構域變體可以展現出食蟹猴FcRn結合親和力。在一些實施例中，Fc結構域變體可以展現出跨物種的FcRn結合親和力。這種Fc結構域變體被認為在一種或多種不同物種之間具有交叉反應性。在一個實施例中，Fc結構域變體可以展現出人和食蟹猴FcRn結合親和力兩者。

【0176】新生Fc受體（FcRn）與抗體的Fc區相互作用以藉由挽救正常的溶酶體降解促進循環。這一過程是pH依賴性過程，其發生在酸性pH下（例如，pH小於6.5）的胞內體中，但不發生在血流的生理pH條件下（例如，非酸性pH）。在一些實施例中，與野生型Fc結構域相比，Fc結構域變體具有在酸性pH下增強的FcRn結合親和力。在一些實施例中，與野生型Fc結構域相比，Fc結構域變體在小於7的pH下，例如在約pH 6.5、約pH 6.0、約pH 5.5、約pH 5.0下，具有增強的FcRn結合親和力。在一些實施例中，與野生型Fc結構域在升高的非酸性pH下的FcRn結合親和力相比，Fc結構域變體在小於7的pH下，例如在約pH 6.5、約pH 6.0、約pH 5.5、約pH 5.0下，具有增強的FcRn結合親和力。升高的非酸性pH可以是例如大於7的pH、約pH 7、約pH 7.4、約pH 7.6、約pH 7.8、約pH 8.0、約pH 8.5、約pH 9.0。

【0177】在某些實施例中，可能需要Fc結構域變體在非酸性pH下展現出與野生型Fc結構域大致相同的FcRn結合親和力。在一些實施例中，可能需要Fc結構域變體在非酸性pH下展現出比包含具有雙重胺基酸取代M428L/N434S（根據EU編號）的經修飾的Fc結構域的結合多肽更小的FcRn結合親和力（參見USPN

8,088,376）。因此，可能需要Fc結構域變體展現出對pH依賴性FcRn結合的最小擾動。

【0178】在一些實施例中，與野生型Fc結構域相比，具有在酸性pH下增強的FcRn結合親和力的Fc結構域變體具有降低的（即，更慢的）FcRn解離速率。在一些實施例中，與野生型Fc結構域在升高的非酸性pH下的FcRn解離速率相比，與所述結合多肽在升高的非酸性pH下的FcRn結合親和力相比具有在酸性pH下增強的FcRn結合親和力的Fc結構域變體具有在酸性pH下更慢的FcRn解離速率。

【0179】某些實施例包括這樣的Fc結構域變體，其中一個或多個恒定區結構域中的至少一個胺基酸已經缺失或以其他方式改變以提供所需的生物化學特徵，如當與具有大致相同的免疫原性的完整的未改變的抗體相比時，降低或增強的效應子功能、非共價二聚化的能力、增強的定位於腫瘤部位的能力、縮短的血清半衰期、或增加的血清半衰期。

【0180】在某些其他實施例中，Fc結構域變體包含源自不同抗體同種型的恒定區（例如，來自人類IgG1、IgG2、IgG3或IgG4中的兩種或更多種的恒定區）。在其他實施例中，Fc結構域變體包含嵌合鉸鏈（即，包含源自不同抗體同種型的鉸鏈結構域的鉸鏈部分的鉸鏈，例如來自IgG4分子的上部鉸鏈結構域和IgG1中部鉸鏈結構域）。在某些實施例中，可以使用本領域已知的技術使Fc結構域突變以增加或減少效應子功能。

【0181】在一些實施例中，Fc結構域變體具有與Fc受體的改變的結合親和力。存在幾種不同類型的Fc受體，所述Fc受體基於它們識別的抗體類型進行分類。例如，Fcγ受體（FcγR）與IgG類抗體結合，Fcα受體（FcαR）與IgA類抗體

結合，並且Fcε受體（FcεR）與IgE類抗體結合。FcγR屬於包括幾個成員（例如，FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIa和FcγRIIIb）的家族。在一些實施例中，與野生型Fc結構域相比，Fc結構域變體具有改變的FcγRIIIa結合親和力。在一些實施例中，與野生型Fc結構域相比，Fc結構域變體具有降低的FcγRIIIa結合親和力。在一些實施例中，與野生型Fc結構域相比，Fc結構域變體具有增強的FcγRIIIa結合親和力。在一些實施例中，與野生型Fc結構域相比，Fc結構域變體經修飾的Fc結構域可以大致相同的FcγRIIIa結合親和力。

【0182】在某些實施例中，Fc結構域變體包含介導一種或多種效應子功能的抗體恒定區（例如，IgG恒定區，例如人類IgG恒定區，例如人類IgG1恒定區）。例如，C1複合物與抗體恒定區的結合可以啟動補體系統。補體系統的啟動在調理作用和細胞病原體的裂解中是重要的。補體系統的啟動還刺激發炎反應，並且還可能參與自身免疫性超敏反應。此外，抗體經由Fc結構域與多種細胞上的受體結合（抗體Fc區上的Fc受體結合位點與細胞上的Fc受體（FcR）結合）。存在許多Fc受體，其對不同類別的抗體（包括IgG（γ受體）、IgE（ε受體）、IgA（α受體）和IgM（μ受體））具有特異性。抗體與細胞表面上的Fc受體的結合引發許多重要且多樣的生物反應，包括抗體包被顆粒的吞噬和破壞、免疫複合物的清除、殺傷細胞裂解抗體包被的靶細胞（稱為抗體依賴性細胞介導的細胞毒性或ADCC）、發炎介質的釋放、胎盤轉移和免疫球蛋白產生的控制。在一些實施例中，Fc結構域變體，例如結合多肽（例如，抗體或免疫粘附素）與Fc-γ受體結合。在可替代實施例中，Fc結構域變體包含沒有一種或多種效應子功能（例如，ADCC活性）和/或不能結合Fcγ受體的恒定區。

【0183】在某些例示性實施例中，效應子增強Fc結構域變體具有一個或多個選自以下的胺基酸取代：胺基酸位置221處的天門冬胺酸（D）；胺基酸位置222處的半胱胺酸（C）；胺基酸位置234處的酪胺酸（Y）；胺基酸位置236處的丙胺酸（A）；胺基酸位置236處的色胺酸（W）；胺基酸位置239處的天門冬胺酸（D）；胺基酸位置243處的白胺酸（L）；胺基酸位置267處的麩胺酸（E）；胺基酸位置268處的苯丙胺酸（F）；胺基酸位置292處的脯胺酸（P）；胺基酸位置298處的丙胺酸（A）；胺基酸位置300處的白胺酸（L）；胺基酸位置305處的異白胺酸（I）；胺基酸位置324處的蘇胺酸（T）；胺基酸位置326處的色胺酸（W）；胺基酸位置326處的丙胺酸（A）；胺基酸位置330處的白胺酸（L）；胺基酸位置332處的麩胺酸（E）；胺基酸位置333處的丙胺酸（A）；胺基酸位置333處的絲胺酸（S）；胺基酸位置334處的丙胺酸（A）；胺基酸位置336處的丙胺酸（A）；胺基酸位置345處的精胺酸（R）；以及胺基酸位置396處的白胺酸（L），根據EU編號。（綜述參見Saunders, 2009, *Front.Immunol.*doi: 10.3389/fimmu.2019.01296。）

【0184】在一些實施例中，Fc結構域變體可以包含在選自以下位置處的胺基酸取代：胺基酸位置236、239、330和332，根據EU編號。在一些實施例中，所述取代可以包含胺基酸位置236處的丙胺酸（A）、胺基酸239處的天門冬胺酸（D）、胺基酸位置330處的白胺酸（L）、和胺基酸位置332處的麩胺酸（E），根據EU編號。在一些實施例中，Fc結構域變體可以包含在選自以下的任兩個胺基酸位置處的雙重胺基酸取代：胺基酸位置236處的丙胺酸（A）、胺基酸239處的天門冬胺酸（D）、胺基酸位置330處的白胺酸（L）和胺基酸位置332處的麩胺酸（E）。在一些實施例中，Fc結構域變體可以包含在選自以下的任三個胺

基酸位置處的三重胺基酸取代：胺基酸位置236處的丙胺酸（A）、胺基酸239處的天門冬胺酸（D）、胺基酸位置330處的白胺酸（L）和胺基酸位置332處的麩胺酸（E）。在一些實施例中，Fc結構域變體可以包含在選自以下的任四個胺基酸位置處的四重胺基酸取代：胺基酸位置236處的丙胺酸（A）、胺基酸239處的天門冬胺酸（D）、胺基酸位置330處的白胺酸（L）和胺基酸位置332處的麩胺酸（E）。在一些實施例中，Fc結構域變體可以包含含有胺基酸239處的天門冬胺酸（D）和胺基酸位置332處的麩胺酸（E）的胺基酸取代的組合。在一些實施例中，Fc結構域變體可以包含含有胺基酸位置236處的丙胺酸（A）、胺基酸位置處的天門冬胺酸（D）和位置332處的麩胺酸的胺基酸取代的組合。

【0185】 在一些實施例中，Fc結構域變體可以進一步包含胺基酸位置256和/或307處的胺基酸取代，根據EU編號。在一些實施例中，Fc結構域變體可以包含含有胺基酸位置256處的天門冬胺酸（D）和胺基酸位置307處的麩醯胺酸（Q）的胺基酸取代的組合（參見Mackness等人, 2019 *MAbs* 11:1276-88；WO 2019147973A1，藉由引用以其整體併入本文）。

【0186】 糖基化Fc結構域變體

【0187】 在某些例示性實施例中，Fc結構域變體是糖基化的。已知抗體在其恒定區的保守位置處的糖基化對抗體功能具有深遠的影響，特別是效應子功能，如上述那些，參見例如Boyd等人（Mol.Immunol, 32: 1311-1318, 1996）。考慮了本發明的Fc結構域變體的糖基化，其中添加、取代、缺失或修飾了一個或多個碳水化合物部分。在一些實施例中，Fc結構域的糖基化是N連接的糖基化。天門冬醯胺酸-X-絲胺酸或天門冬醯胺酸-X-蘇胺酸基序的引入產生碳水化合物部分的酶促附接的潛在位點，並且因此可用於操縱Fc結構域變體的糖基化。在

Raju等人（Biochemistry 40: 8868-8876, 2001）中，藉由使用β-1,4-半乳糖基轉移酶和/或α, 2,3唾液酸轉移酶的再半乳糖基化和/或再唾液酸化的過程來增加TNFR-IgG免疫粘附素的末端唾液酸化。增加末端唾液酸化被認為會增加免疫球蛋白的半衰期。

【0188】 與大多數糖蛋白相同，抗體通常作為糖形混合物而產生。當在真核細胞，特別是哺乳動物細胞中產生抗體時，這種混合物尤為明顯。已經開發了多種方法來製造定義的糖形（參見Zhang等人2004, Science 303: 371；Sears等人, 2001, Science 291: 2344；Wacker等人, 2002, Science 298: 1790；Davis等人2002, Chem.Rev. 102: 579；Hang等人, 2001, Acc. Chem.Res.34: 727）。在一些實施例中，所述糖基化Fc結構域包含胺基酸位置297處的天然聚糖，根據EU編號。已知IgG1的CH2結構域中胺基酸位置297處的天門冬醯胺酸的糖基化有助於Fc結構域與FcγR之間的相互作用。此糖基化位點的消除消除了效應子功能（Leabman等人, 2013, *MAbs* 5:896-903）。在具體例示性實施例中，Fc結構域在胺基酸位置297處包含野生型水準或接近野生型水準的糖基化，根據EU編號。

【0189】 在一些實施例中，所述糖基化Fc結構域變體包含工程化或非天然聚糖。在一些實施例中，所述工程化或非天然聚糖是可以與治療性分子接合的經修飾的聚糖（例如，抗體-藥物接合物）。

【0190】 具有增強的體內穩定性的Fc結構域變體

【0191】 在一態樣，本揭露提供了一種包含增強的體內穩定性（例如，延長的血清半衰期或降低的清除率）的分離的Fc結構域變體。如本文所用，術語“體內穩定性”是指本發明公開的效應子勝任多肽用於以下的穩定性：保持完整（例如，有限的降解和/或解折疊）、功能性（例如，保持結合活性）、以及保持血

清中的足夠高濃度以引發可測量的活性（例如，靶腫瘤細胞殺傷）。在某些實施例中，與野生型Fc結構域相比，所述分離的效應子勝任多肽具有改善的體內穩定性。在某些實施例中，與野生型Fc結構域相比，所述分離的效應子勝任多肽具有降低的體內清除率。

【0192】 如本文所用，術語“血清半衰期”是指物質（例如，分離的Fc結構域變體）從最大血清濃度到所述最大血清濃度的一半所用時間。血清半衰期可以部分藉由增強的與FcRn的結合親和力而增強。在某些例示性實施例中，與野生型Fc結構域相比，所述分離的效應子勝任多肽具有與所述FcRn的增強的結合親和力。

【0193】 體內穩定性、血清半衰期和清除率可以藉由本領域已知的任何方法確定（參見Valente等人, 2020 MAbs 12:13 https://doi.org/10.1080/19420862.2020.1829337）。舉例來說，可以採用實例7中所述的用於進行藥代動力學（PK）分析的方法。

【0194】 含Fc的結合多肽

【0195】 在一態樣，本揭露提供了一種分離的Fc結構域變體，其包含或複合有（例如，融合至）至少一個結合結構域（例如，至少一個結合多肽）。在某些實施例中，所述結合結構域包含一個或多個抗原結合結構域。抗原結合結構域不需要與親本Fc結構域源自相同的分子。在某些實施例中，所述Fc結構域變體存在於抗體中。

【0196】 在一個實施例中，Fc結構域變體存在於抗體中或與抗體複合。來自任何來源或物種的任何抗體均可以與本文所公開的Fc結構域變體一起使用。

合適的抗體包括但不限於嵌合抗體、人源化抗體或人類抗體。合適的抗體包括但不限於全長抗體、單株抗體、多株抗體或單結構域抗體，如VHH抗體。

【0197】在某些例示性實施例中，Fc結構域變體可以與抗體的抗原結合片段結合或複合。術語“抗原結合片段”是指免疫球蛋白或抗體的多肽片段，其結合抗原或與完整抗體（即，與它們所來源的完整抗體）競爭抗原結合（即，特異性結合）。抗原結合片段可以藉由本領域熟知的重組或生物化學方法產生。例示性抗原結合片段包括Fv、Fab、Fab'和(Fab')2。在某些例示性實施例中，本揭露的結合多肽包含至少一個抗原結合片段和Fc結構域變體。

【0198】在一些實施例中，結合多肽包含單鏈可變區序列（ScFv）。單鏈可變區序列包含具有一個或多個抗原結合位點的單一多肽，例如藉由柔性連接子與VH結構域連接的VL結構域。ScFv分子可以以VH-連接子-VL取向或VL-連接子-VH取向構築。連接VL和VH結構域構成抗原結合位點的柔性鉸鏈包括約10至約50個胺基酸殘基。連接肽是本領域已知的。結合多肽可以包含至少一個scFv和/或至少一個恒定區。在一個實施例中，本揭露的結合多肽可以包含與Fc結構域變體連接或融合的至少一個scFv。

【0199】在一些實施例中，本揭露的結合多肽是多價（例如，四價）抗體，其藉由將編碼抗體的DNA序列與ScFv分子（例如，經改變的ScFv分子）融合而產生。例如，在一個實施例中，組合這些序列使得ScFv分子（例如，改變的ScFv分子）在其N末端或C末端經由柔性連接子（例如，gly/ser連接子）與Fc結構域變體連接。在另一個實施例中，本揭露的四價抗體可以藉由將ScFv分子與連接肽融合來製備，所述連接肽與Fc結構域變體融合以構築ScFv-Fab四價分子。

【0200】在另一個實施例中，本揭露的結合多肽是經改變的微型抗體。本揭露的改變的微型抗體是由兩條多肽鏈組成的二聚體分子，每條多肽鏈包含經由連接肽與Fc結構域變體融合的ScFv分子。可以藉由使用本領域描述的方法（參見例如美國專利5,837,821或WO 94/09817A1）構築ScFv組分和連接肽組分來製備微型抗體。在另一個實施例中，可以構築四價微型抗體。可以以與微型抗體相同的方式構築四價微型抗體，不同的是使用柔性連接子連接兩個ScFv分子。然後將連接的scFv-scFv構築體與Fc結構域變體接合。

【0201】在另一個實施例中，本揭露的結合多肽包括雙抗體。雙抗體是二聚體四價分子，其各自具有與scFv分子類似的多肽，但是通常具有連接兩個可變結構域的短（少於10個，例如約1至約5個）胺基酸殘基連接子，使得在同一多肽鏈上的VL和VH結構域不能相互作用。相反，一條多肽鏈的VL和VH結構域（分別）與第二多肽鏈上的VH和VL結構域相互作用（參見例如，WO 02/02781）。本揭露的雙抗體包含與Fc結構域變體融合的scFv樣分子。

【0202】在另一個實施例中，本揭露的結合多肽包含單結構域抗體（sdAb），也稱為VHH或nanobody。Nanobody®是Ablynx的注冊商標。VHH包含沒有輕鏈的可變重鏈結構域。與常規VH結構域類似，VHH含有四個FR和三個CDR。VHH具有優於常規抗體的優勢。因為它們比IgG分子小約十倍，正確折疊的功能VHH可以藉由體外表現產生，同時實現高產量。此外，VHH非常穩定並且對蛋白酶的作用具有抗性。VHH的特性和產生已經綜述於Harmsen和De Haard H J（Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007年11月; 77(1):13-22）中。

【0203】在某些例示性實施例中，Fc結構域與一個或多個VHH融合。

【0204】在其他實施例中，結合多肽包含多特異性或多價抗體，所述多特異性或多價抗體在同一多肽鏈上串聯地包含一個或多個可變結構域，例如串聯的可變結構域（TVD）多肽。例示性TVD多肽包括美國專利號5,989,830中描述的“雙頭”或“雙Fv”組態。在雙Fv組態中，兩種不同抗體的可變結構域在兩條單獨的鏈（一條重鏈和一條輕鏈）上以串聯取向表示，其中一條多肽鏈具有被肽連接子隔開的串聯的兩個VH結構域（VH1-連接子-VH2），並且另一條多肽鏈由藉由肽連接子串聯連接的互補VL結構域組成（VL1-連接子-VL2）。在交叉雙頭組態中，兩種不同抗體的可變結構域在兩條單獨的多肽鏈（一條重鏈和一條輕鏈）上以串聯取向表示，其中一條多肽鏈具有被肽連接子隔開的串聯的兩個VH結構域（VH1-連接子-VH2），並且另一條多肽鏈由藉由肽連接子以相反取向串聯連接的互補VL結構域組成（VL2-連接子-VL1）。基於“雙Fv”形式的另外的抗體變體包括雙可變結構域IgG（DVD-IgG）雙特異性抗體（參見美國專利號7,612,181）和TBTI形式（參見US 2010/0226923 A1）。在一些實施例中，結合多肽包括多特異性或多價抗體，其包含在與Fc結構域變體融合的同一多肽鏈上串聯的一個或多個可變結構域。

【0205】在另一個實施例中，結合多肽包含基於“雙頭”組態的交叉雙可變結構域IgG（CODV-IgG）雙特異性抗體（參見US20120251541 A1，其藉由引用以其整體併入本文）。

【0206】在其他實施例中，結合多肽包含CrossMab或CrossMab-Fab多特異性形式（參見WO 2009080253和Schaefer等人, PNAS (2011), 108: 11187--1191）。基於CrossMab形式的抗體變體在雙特異性IgG抗體的一個臂內具有抗體結構域的交叉，從而能夠實現正確的鏈關聯。

【0207】在其他實施例中，糖基化的效應子勝任多肽包含呈T細胞接合體形式的多特異性抗體。“T細胞接合體”是指標對宿主的免疫系統（更具體地針對T細胞的細胞毒性活性）以及針對腫瘤靶蛋白的結合蛋白。在一些實施例中，分離的效應子勝任多肽包含呈NK細胞接合體形式的多特異性抗體。“NK細胞接合體”是指包含靶向啟動NK細胞受體的單株抗體片段、抗原特異性靶向區和Fc區的結合蛋白（Gauthier等人 Cell (2019), 177: 1701-13）。

【0208】包含本文所述的Fc結構域變體的本揭露的結合多肽可以包括已知“親本”抗體的CDR序列或可變結構域序列。在一些實施例中，除了對本文公開的Fc結構域的修飾之外，親本抗體和本揭露的抗體可以共有類似或相同的序列。

【0209】在另一個實施例中，所述結合多肽包含治療性多肽。在一些實施例中，所述治療性多肽可以是受體、配體或酶。在一些實施例中，所述治療性多肽可以是凝血因子。在一些實施例中，所述凝血因子選自FI、FII、FIII、FIV、FV、FVI、FVII、FVIII、FIX、FX、FXI、FXII、FXIII、VWF、前激肽釋放酶、高分子量激肽原、纖連蛋白、抗凝血酶III、肝素輔因子II、蛋白質C、蛋白質S、蛋白質Z、蛋白質Z相關蛋白酶抑制劑（ZPI）、纖溶酶原、α2-抗纖維蛋白溶酶、組織纖溶酶原啟動物（tPA）、尿激酶、纖溶酶原啟動物抑制劑-1（PAI-1）、纖溶酶原啟動物抑制劑-2（PAI2）、其任何酶原、其任何活性形式及其任何組合。在一些實施例中，所述治療性多肽可以是生長因子。生長因子可以選自本領域中已知的任何生長因子。在一些實施例中，所述生長因子是激素，在其他實施例中，所述生長因子是細胞介素。在一些實施例中，所述生長因子是趨化介素。

在一些實施例中，所述結合多肽包含與本發明的Fc結構域的N末端和/或C末端連接的治療性分子或治療性多肽。在一些實施例中，所述多肽是Fc融合多肽。

【0210】 核酸和載體

【0211】 在一態樣，提供了編碼本文公開的Fc結構域變體和/或結合多肽的多核苷酸。還提供了製造Fc結構域變體和/或結合多肽的方法，所述方法包括表現這些多核苷酸。

【0212】 通常將編碼本文公開的Fc結構域變體和/或結合多肽的多核苷酸插入表現載體中以引入宿主細胞中，所述宿主細胞可以用於產生所需量的要求保護的抗體、治療性多肽和Fc融合蛋白。因此，在某些態樣，本發明提供了包含本文公開的多核苷酸的表現載體以及包含這些載體和多核苷酸的宿主細胞。

【0213】 出於說明書和申請專利範圍的目的，在本文中使用術語“載體”或“表現載體”來意指用於在細胞中引入和表現所需基因的載體。如本領域技術人員所知，此類載體可以容易地選自質體、噬菌體、病毒和反轉錄病毒。通常，載體將包含選擇標記、適當的限制性位點以促進所需基因的選殖、以及進入真核或原核細胞和/或在其中複製的能力。

【0214】 可以採用許多表現載體系統。例如，一類載體利用來源於動物病毒如牛乳頭瘤病毒、多瘤病毒、腺病毒、牛痘病毒、杆狀病毒、反轉錄病毒（RSV、MMTV或MOMLV）或SV40病毒的DNA元件。其他載體類涉及使用具有內部核糖體結合位點的多順反子系統。另外，可以藉由引入一種或多種標記來選擇已將DNA整合至其染色體中的細胞，其允許選擇轉染的宿主細胞。標記可以針對營養缺陷型宿主的原營養、殺生物劑（例如抗生素）抗性或對重金屬如銅的抗性來提供。可選擇標記基因可以與待表現的DNA序列直接連接，或藉由共轉化

引入同一細胞中。還可能需要另外的元件來最佳地合成mRNA。這些元件可包括信號序列、剪接信號以及轉錄啟動子、增強子和終止信號。在一些實施例中，將選殖的可變區基因與如上所述合成的重鏈和輕鏈恒定區基因（如人基因）一起插入表現載體中。

【0215】 在其他實施例中，如本文所述的糖基化的效應子勝任多肽可以使用多順反子構築體來表現。在此類表現系統中，可以從單一多順反子構築體產生多種目的基因產物，如抗體的重鏈和輕鏈。這些系統有利地使用內部核糖體進入位點（IRES）以在真核宿主細胞中提供相對高水準的多肽。相容的IRES序列在美國專利號6,193,980中披露，所述專利藉由引用併入本文。本領域技術人員將理解，此類表現系統可用於有效產生本申請中公開的全系列多肽。

【0216】 更一般地，一旦已經製備了編碼本揭露的Fc結構域變體和/或結合多肽的載體或DNA序列，便可以將表現載體引入適當的宿主細胞中。也就是說，可以轉化宿主細胞。可以藉由本領域技術人員公知的各種技術來實現將質體引入宿主細胞中。這些技術包括但不限於轉染（包括電泳和電穿孔）、原生質體融合、磷酸鈣沈澱、與包膜DNA的細胞融合、顯微注射和用完整病毒感染。參見例如，Ridgway, A. A. G. "Mammalian Expression Vectors" 第24.2章, 第470-472頁 Vectors, Rodriguez和Denhardt編輯（Butterworths，波士頓，麻塞諸塞州1988）。使轉化的細胞在適合於產生輕鏈和重鏈的條件下生長，並測定重鏈和/或輕鏈蛋白質合成。例示性測定技術包括酶聯免疫吸附測定（ELISA）、放射免疫測定（RIA）或螢光啟動細胞分選儀分析（FACS）、免疫組織化學等。

【0217】 如本文所用，術語“轉化”應在廣義上使用，是指將DNA引入受體宿主細胞中，從而改變基因型並因此導致受體細胞的變化。

【0218】沿著相同的思路，“宿主細胞”是指已經用載體轉化的細胞，所述載體是使用重組DNA技術構築的並且編碼至少一種異源基因。在從重組宿主分離多肽的過程的描述中，術語“細胞”和“細胞培養物”可互換使用，以表示抗體來源，除非另外明確指定。換言之，從“細胞”中回收多肽可以意指從離心沈澱的全細胞，或從含有培養基和懸浮細胞二者的細胞培養物中回收。

【0219】在一個實施例中，用於表現Fc結構域變體和/或結合多肽的宿主細胞系是真核或原核起源的。在一個實施例中，用於表現Fc結構域變體和/或結合多肽的宿主細胞系是細菌起源的。在一個實施例中，用於表現Fc結構域變體和/或結合多肽的宿主細胞系是哺乳動物起源的。本領域技術人員可以確定最適合在其中表現所希望的基因產物的特定宿主細胞系。例示性宿主細胞系包括但不限於DG44和DUXB11（中國倉鼠卵巢系，DHFR-）、HELA（人宮頸癌）、CVI（猴腎系）、COS（具有SV40 T抗原的CVI的衍生物）、R1610（中國倉鼠成纖維細胞）、BALBC/3T3（小鼠成纖維細胞）、HAK（倉鼠腎系）、SP2/O（小鼠骨髓瘤）、BFA-1c1BPT（牛內皮細胞）、RAJI（人淋巴細胞）、293（人腎）。在一個實施例中，細胞系提供由其表現的抗體的改變的糖基化，例如非岩藻糖基化（例如，PER.C6.RTM.（Crucell）或FUT8剃除CHO細胞系（POTELLIGENTTM細胞）（Biowa，普林斯頓，新澤西州））。在一個實施例中，可以使用NS0細胞。宿主細胞系通常可從商業服務機構、美國組織培養物保藏中心（American Tissue Culture Collection）或從公開的文獻獲得。

【0220】體外產生允許按比例放大以得到大量的所需Fc結構域變體和/或結合多肽。用於在組織培養條件下進行哺乳動物細胞培育的技術是本領域已知的，並且包括均質懸浮培養（例如在氣升式反應器中或在連續攪拌反應器中），

或者固定化或截留式細胞培養（例如在中空纖維、微膠囊中，在瓊脂糖微珠或陶瓷盒上）。如果必要和/或需要的話，可以藉由常規層析方法（例如凝膠過濾、離子交換層析、在DEAE-纖維素上的層析和/或（免疫）親和層析）純化多肽的溶液。

【0221】 編碼糖基化Fc結構域變體和/或結合多肽的一種或多種基因也可以在非哺乳動物細胞（如細菌或酵母或植物細胞）中進行表現。在這一方面，應當理解，也可以轉化多種單細胞非哺乳動物微生物如細菌，即能夠在培養或發酵中生長的那些微生物。易於轉化的細菌包括以下的成員：腸桿菌科，如大腸桿菌（Escherichia coli）或沙門氏菌屬（Salmonella）的菌株；芽孢桿菌科，如枯草芽孢桿菌（Bacillus subtilis）；肺炎球菌屬（Pneumococcus）；鏈球菌屬（Streptococcus）和流感嗜血桿菌（Haemophilus influenzae）。還應理解，當在細菌中表現時，Fc結構域變體和/或結合多肽可以成為包涵體的一部分。必須將Fc結構域變體和/或結合多肽分離，純化，然後組裝成功能性分子。

【0222】 除原核生物外，還可以使用真核微生物。釀酒酵母（Saccharomyces cerevisiae）或普通麵包酵母是真核微生物中最常用的，儘管許多其他菌株是通常可獲得的。對於在酵母屬（Saccharomyces）中的表現，通常使用例如質體YRp7（Stinchcomb等人, Nature, 282:39 (1979)；Kingsman等人, Gene, 7:141 (1979)；Tschemper等人, Gene, 10:157 (1980)）。此質體已經含有TRP1基因，所述基因提供針對缺乏在色胺酸中生長的能力的酵母突變型菌株的選擇標記，例如ATCC號44076或PEP4-1（Jones, Genetics, 85:12 (1977)）。然後，作為酵母宿主細胞基因組的特徵的trpl損傷的存在提供藉由在沒有色胺酸的情況下生長來檢測轉化的有效環境。

【0223】 使用/治療方法

【0224】 在一態樣，本發明提供了治療有需要的個體的疾病或病症的方法，所述方法包括向所述個體投予有效量的本文公開的Fc結構域變體。在某些實施例中，本揭露提供了用於治療需要這種治療的哺乳動物個體的疾病和病症（例如癌症）的套組和方法。

【0225】 本揭露的Fc結構域變體可用於許多不同的應用。例如，在一個實施例中，主題Fc結構域變體可用於減少或消除帶有被所述Fc結構域變體的結合結構域識別的表位的細胞。在另一個實施例中，所述主題Fc結構域變體在降低循環中的可溶性抗原的濃度或消除所述可溶性抗原方面是有效的。在另一個實施例中，主題Fc結構域變體作為T細胞接合體是有效的。在一個實施例中，Fc結構域變體可以減小腫瘤大小、抑制腫瘤生長和/或延長荷瘤動物的存活時間。因此，本揭露還涉及藉由向人或動物投予有效無毒量的Fc結構域變體來治療這種人或其他動物中的腫瘤的方法。

【0226】 在另一個實施例中，主題Fc結構域變體可用於治療其他病症，包括但不限於傳染病、自身免疫病症、發炎病症、肺病、神經元或神經變性疾病、肝病、脊柱疾病、子宮疾病、抑鬱症等。傳染病的非限制性例子包括由RNA病毒（例如，正粘病毒（例如，流感）、副粘病毒（例如，呼吸道合胞體病毒、副流感病毒、偏肺病毒）、彈狀病毒（例如，狂犬病病病毒）、冠狀病毒（例如，SARS-CoV）、甲病毒（例如，基孔肯雅病毒）、慢病毒（例如，HIV）等）或DNA病毒引起的那些傳染病。傳染病的例子還包括但不限於由例如金黃色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、腸球菌屬、鏈球菌屬、大腸桿菌引起的細菌性傳染病和其他傳染病，包括例如由白色念珠菌引起的那些傳染病。其他傳染病包括但

不限於瘧疾、SARS、黃熱病、萊姆病、利什曼病、炭疽和腦膜炎。例示性自身免疫性病症包括但不限於銀屑病和狼瘡。因此，本揭露涉及治療各種病症的方法，所述病症將受益於使用具有例如增加的半衰期的主題效應子勝任多肽。

【0227】 藉由常規實驗，本領域技術人員將能夠確定Fc結構域變體可用於治療惡性腫瘤的目的的有效無毒量。例如，本揭露的Fc結構域變體的治療活性量可以根據諸如以下的因素而變化：個體的疾病階段（例如，階段I與階段IV）、年齡、性別、醫療併發症（例如，免疫抑制的病症或疾病）和體重，以及經修飾的抗體在所述個體中引發所需反應的能力。可以調整劑量方案以提供最佳的治療反應。例如，可以每天投予幾個分開的劑量，或者可以如治療情況的緊急性所示按比例減少劑量。

【0228】 一般而言，本揭露中提供的組合物可用於預防性或治療性地治療包含抗原標記的任何腫瘤，所述抗原標記允許所述Fc結構域變體靶向癌細胞。

【0229】 **醫藥組合物及其投予**

【0230】 製備並向個體投予本揭露的Fc結構域變體的方法是本領域技術人員所熟知的或容易確定的。本揭露的結合多肽的投予途徑可以是口服的、腸胃外的、藉由吸入或局部的。如本文所用的術語腸胃外包括靜脈內、動脈內、腹膜內、肌肉內、皮下、直腸或陰道投予。雖然所有這些投予形式被認為明顯在本揭露的範圍內，但投予形式將是用於注射、特別是用於靜脈內或動脈內注射或滴注的溶液。通常，用於注射的合適的醫藥組合物可以包含緩衝液（例如乙酸鹽、磷酸鹽或檸檬酸鹽緩衝液）、表面活性劑（例如聚山梨醇酯）、任選穩定劑（例如人類白蛋白）等。在一些實施例中，Fc結構域變體可以直接遞送至不良細胞群的部位，從而增強患病組織對治療劑的暴露。

【0231】用於腸胃外投予的製劑包括無菌的水性或非水性的溶液、懸浮液和乳液。水性載劑包括水、醇/水溶液、乳液或懸浮液，包括鹽水和緩衝介質。在本揭露的組合物和方法中，醫藥上可接受的載劑包括但不限於0.01-0.1 M（例如，0.05 M）磷酸鹽緩衝液或0.8%鹽水。其他常見的腸胃外媒劑包括磷酸鈉溶液、林格氏右旋糖、右旋糖和氯化鈉、乳酸林格氏液或固定油。靜脈內媒劑包括流體和營養補充劑、電解質補充劑（如基於林格氏右旋糖的那些）等。也可以存在防腐劑和其他添加劑，例如像抗微生物劑、抗氧化劑、螯合劑和惰性氣體等。更具體地，適合於注射使用的醫藥組合物包括無菌水溶液（在水溶的情況下）或分散液，以及用於臨時製備無菌可注射溶液或分散液的無菌粉末。在此類情況下，組合物必須是無菌的並且流動性應達到存在可注射性的程度。它應該在製造和儲存條件下穩定，並且通常可以抵抗微生物如細菌和真菌的污染作用而保存。載劑可以是溶劑或分散介質，其含有例如水、乙醇、多元醇（例如，甘油、丙二醇和液體聚乙二醇等）及其合適的混合物。例如，可以藉由使用包衣如卵磷脂，藉由在分散液的情況下維持所需的顆粒尺寸以及藉由使用表面活性劑來保持適當的流動性。

【0232】在許多情況下，將在組合物中包含等滲劑，例如糖、多元醇（如甘露糖醇、山梨糖醇）或氯化鈉。藉由在組合物中包含延遲吸收的藥劑例如單硬脂酸鋁和明膠，可以實現可注射組合物的延長吸收。

【0233】在任何情況下，可以藉由將活性化合物（例如，Fc結構域變體自身或與其他活性劑組合）以所需的量摻入適當的溶劑中，隨後過濾滅菌來製備無菌可注射溶液，所述溶劑根據需要具有本文列舉的一種成分或多種成分的組合。通常，藉由將活性化合物併入無菌媒劑中來製備分散體，所述無菌媒劑含

有基礎分散介質和來自以上列舉的那些的所需其他成分。在用於製備無菌可注射溶液的無菌粉末的情況下，例示性製備方法包括真空乾燥和冷凍乾燥，從而從活性成分加任何另外的所需成分的先前無菌過濾的溶液產生其粉末。將注射用製劑加工，填充至容器如安瓿、袋子、瓶子、注射器或小瓶中，並根據本領域已知的方法在無菌條件下密封。此外，所述製劑可以套組的形式包裝和出售。此類製品通常將具有標籤或包裝說明書，其表明相關組合物可用於治療患有或易患自身免疫或腫瘤病症的個體。

【0234】 用於治療上述病症的本揭露組合物的有效劑量根據許多不同因素而變化，所述因素包括投予方式、靶部位、患者的生理狀態、患者是人還是動物、所投予的其他藥物以及治療是預防性的還是治療性的。通常，患者是人，但也可以治療包括轉基因哺乳動物在內的非人哺乳動物。治療劑量可以使用本領域技術人員已知的常規方法逐步增加，以優化安全性和功效。

【0235】 可以在多個時機投予本揭露的Fc結構域變體。單劑量之間的間隔可以是每週、每月或每年。如藉由測量Fc結構域變體或抗原在患者體內的血液水準所指示，間隔也可以是不規律的。在一些方法中，調整劑量以實現血漿經修飾的結合多肽濃度為約1-1000 μg/ml，並且在一些方法中為約25-300 μg/ml。可替代地，Fc結構域變體可以作為持續釋放配製品投予，在這種情況下需要較不頻繁的投予。對於抗體，劑量和頻率根據抗體在患者中的半衰期而變化。通常，人源化抗體顯示出最長的半衰期，其次是嵌合抗體和非人類抗體。

【0236】 投予的劑量和頻率可以根據治療是預防性的還是治療性的而變化。在預防性應用中，向尚未處於疾病狀態的患者投予含有本發明多肽或其混合物的組合物，以增強患者的抵抗力。這樣的量被定義為“預防有效劑量”。在此

用途中，精確量還取決於患者的健康狀態和總體免疫性，但是通常範圍從約0.1至約25 mg/劑，尤其是從約0.5至約2.5 mg/劑。在很長一段時間內以相對較不頻繁的間隔投予相對較低的劑量。一些患者在其餘生中繼續接受治療。在治療性應用中，有時需要以相對短的間隔給予相對高的劑量（例如，每劑量約1至400 mg/kg抗體，其中約5至25 mg的劑量更常用於放射免疫接合物，並且更高劑量用於經細胞毒素-藥物修飾的抗體），直到疾病進展減少或終止，或直到患者顯示疾病症狀的部分或完全改善。此後，可以向患者投予預防性方案。

【0237】 本揭露的Fc結構域變體可任選地與有效治療需要治療（例如，預防性或治療性）的病症或病症的其他藥劑組合投予。本揭露的^{90}Y標記的經修飾抗體的有效單次治療劑量（即治療有效量）範圍在約5與約75 mCi之間，如在約10與約40 mCi之間。^{131}I修飾的抗體的有效單次治療非骨髓消融劑量的範圍在約5與約70 mCi之間，或在約5與約40 mCi之間。^{131}I標記的抗體的有效單次治療消融劑量（即，可能需要自體骨髓移植）的範圍在約30與約600 mCi之間，如在約50與小於約500 mCi之間。與嵌合抗體一起，由於與鼠抗體相比更長的循環半衰期，碘-131標記的嵌合抗體的有效單次治療非骨髓消融劑量的範圍在約5與約40 mCi之間，如小於約30 mCi。例如，^{111}In標記的成像標準通常小於約5 mCi。

【0238】 儘管可以如上文剛剛所述投予Fc結構域變體，但必須強調的是，在其他實施例中，所述多肽可以作為一線療法投予至其他方面健康的患者。在此類實施例中，可以將Fc結構域變體投予至具有正常或平均紅骨髓儲備的患者和/或投予至尚未經歷治療和不是正在經歷治療的患者。如本文所用，所述多肽與輔助療法結合或組合的投予意指依序、同時、同延、並行、伴隨或同期投予

或施加所述療法和所公開的抗體。本領域技術人員將理解，可以定時投予或施加組合的治療性方案的各種組分以增強治療的總體有效性。

【0239】 如前所述，本揭露的Fc結構域變體、抗體、治療性多肽或其Fc結構域變體融合多肽可以以用於哺乳動物病症的體內治療的醫藥有效量投予。在這一方面，應當理解，所公開的Fc結構域變體將被配製成有利於投予且促進活性劑的穩定性。

【0240】 根據本揭露的醫藥組合物可以包含醫藥上可接受的無毒無菌載劑，如生理鹽水、無毒緩衝液、防腐劑等。出於本申請的目的，與治療劑接合或未接合的Fc結構域變體的醫藥有效量應保持意指足以實現與抗原的有效結合且足以獲得益處（例如，足以改善疾病或病症的症狀或檢測物質或細胞）的量。在腫瘤細胞的情況下，所述多肽可以與腫瘤細胞或免疫反應細胞上選擇的抗原相互作用，並提供這些細胞死亡的增加。當然，本揭露的醫藥組合物可以以單劑量或多劑量投予，以提供醫藥有效量的經修飾的結合多肽。

【0241】 與本揭露的範圍一致，可以將本揭露的Fc結構域變體按照上述治療方法以足以產生治療或預防效果的量投予至人或其他動物。可以將本揭露的Fc結構域變體以常規劑型投予至這種人或其他動物，其藉由根據已知的技術將本揭露的抗體與常規的醫藥上可接受的載劑或稀釋劑組合來製備的。本領域技術人員將認識到，醫藥上可接受的載劑或稀釋劑的形式和特徵取決於與其組合的活性成分的量，投予的途徑和其他公知的變數。本領域技術人員將進一步理解，包含本揭露所述的一個或多個種類的結合多肽的混合物可以證明是特別有效的。

【0242】本文提及或引用的文章、專利和專利申請的內容以及所有其他檔和電子可用資訊藉由引用以其整體特此併入，其程度如同每個單獨的出版物被具體且單獨地指出藉由引用併入。申請人保有將來自任何此類文章、專利、專利申請或其他物理和電子檔的任何和所有材料和信息實際納入本申請的權利。

【0243】雖然已經參考本發明的具體實施例描述了本發明，但本領域技術人員應當理解，在不背離本發明的真實精神和範圍的情況下，可以進行各種改變並且可以替換等效方案。本領域技術人員將易於明瞭，在不背離本文公開的實施例的範圍的情況下，可以使用合適的等效方案對本文所述的方法進行其他合適的修改和改編。另外，可以進行許多修改以適應特定的情況、材料、物質組成、過程、過程步驟或步驟，以達到本發明的目的、精神和範圍。所有此類修改均旨在在所附申請專利範圍的範圍內。雖然現已詳細描述某些實施例，但參照以下實例將更清楚地理解所述實施例，所述實例僅出於說明目的而被包括，並且不打算具有限制性。

【0244】**實例**

【0245】藉由以下實例進一步說明本發明，所述實例不應當被解釋為進一步限制。

【0246】**實例1：用於增加穩定性的二硫鍵的電腦模型和鑒定**

【0247】為了表徵在Fc結構域的CH2區中的工程化二硫鍵的潛在穩定化作用，對取自PDB結構1HZH的Fc結構域進行了分子動力學（MD）模擬。在300 K和370 K下類比所有系統，以估計熱休克對所述結構域的影響並且確定對所述結構域的潛在弱相互作用。對以下Fc變體進行模擬：WT IgG1 Fc結構域、DE+DQ、ADLE+DQ、DE+DQ+ L242C/K334C、DE+DQ+R292C/V302C、

ADLE+DQ+L242C/K334C和ADLE+DQ+R292C/V302C。結果被報告為在300 K或370 K的溫度下，殘基I332E的疏水接觸的平均頻率（**圖1A**）以及由相應碳α的均方根波動（RMSF）指數表示的含有所述突變的區域的平均靈活性（**圖1B**）。

【0248】 結果

【0249】 在CH2結構域中引入負電荷(I332E)會導致疏水接觸平均頻率(例如，DQ+DE和DQ+ADLE系統 - 圖1A）的損失，並且潛在地破壞所述結構域的疏水核。R292C+V302C或L242C+K334C突變的引入部分恢復或改善了這些接觸。

【0250】 已針對所有系統監測DQ突變的靈活性指數（RMSF - **圖1B**），以估計對所有變體的半衰期延長的潛在影響。在DQ突變的情況下包含I332E突變的系統似乎在位置256和307處相對於WT顯示出更高的靈活性。DSB穩定化的引入似乎部分地改善了針對WT行為的靈活性指數（例如，DQ DE L242C+K334C - **圖1B**）。

【0251】 **圖2**描繪了具有結構上緊密靠近的I332E(綠色CPK繪製)和L242C + K334C工程化二硫鍵（橙色CPK繪製）的Fc CH2結構域結構域（呈線-帶）上的DSB移植的例子。

【0252】 **圖3**描繪了I332(左小圖，疏水接觸以虛線突出顯示)和I332E(右小圖，靜電接觸以虛線突出顯示）的非共價鍵網路的例子。

【0253】 **圖3**中的兩個圖像之間的結構比較指出，I332E突變在CH2結構域的疏水核內引入了負電荷。這種突變導致疏水核內疏水性接觸的損失，並且因此已經被確定為關於較差熱穩定性的潛在驅動現象。

【0254】 電腦研究的原理是找到二硫化物穩定化的可能位置，以創建新的共價硫-硫接觸，以恢復由於疏水性網路破壞而導致的焓損失，從而挽救在正常N-糖基化的CH2結構域折疊的基礎的疏水性網路。先前已經測試了幾個二硫鍵來穩定非糖基化的IgG1（參見，Gong等人2009.J. Biol.Chem.284, 14203-14210；Jacobsen等人2017.J. Biol.Chem.292, 1865-1875）。其中，兩個二硫化物方案符合上述假設，並且位置和突變是L242C + K334C和R292C + V302C（參見**圖4**）。

【0255】 作為陰性對照，選擇遠離位置332的兩個殘基以引入二硫橋，位置和突變為A287C + L306C。此二硫化物穩定化側接疏水核並且位於作為IgG CH2結構域的特徵的β折疊的邊界處（參見**圖5**）。即使引入共價硫-硫鍵可以穩定非糖基化的IgG1支架，但是與I332E突變的距離應使這種二硫化物穩定化被認為在含有I332E突變的增強的效應子功能支架內是無效的。

【0256】 **圖4**描繪了針對DSB突變選擇的位置的例子。在左小圖上，L242+K334（在圓內的棒）。在右小圖上，R292和V302（在圓內的棒）。

【0257】 **圖5**描繪了被選擇為陰性對照的A287和L306（下部黃色棒）位置。這兩個殘基接近FcRn結合表面，並且位於IgG CH2結構域的邊界，其預測的結構影響低於兩個先前的DSB方案。

【0258】 二硫鍵的電腦模型以及其對與C1q、FcγRIIIa、FcγRIIa和FcRn結合的影響

【0259】 使用電腦模型確定二硫鍵對與C1q、FcγRIIIa、FcγRIIa和FcRn的結合的影響。

【0260】 材料與方法

【0261】已經對可用的晶體結構進行了此分析，PDB ID：6FCZ - C1q、與GASDALIE Fc複合的5D6D - FcγRIIIa、3RY6 - FcγRIIa和4N0U - FcRn。必須考慮兩個結構的低解析度（6FCZ - 基於與C1q複合的Fc的低溫EM結構的模型，以及3RY6 - 與FcγRIIa複合的Fc的解析度為3.80 Å的X射線結構），並且結論可能由於解析度差而有偏差。已經藉由選擇所有距受體5 Å內的Fc殘基來確定相互作用殘基，並且用增強效應子功能突變和DSB突變進行交叉檢查。由於選擇的相互作用距離高於上述兩個晶體結構的解析度（分別為5 Å和3.80 Å），這應該會減少偏差，這應當僅在確定殘基-殘基直接相互作用評價的情況下才是決定因素，而在確定整個相互作用表面的情況（即當前情況）下不是決定因素。

【0262】與C1q的接觸殘基

【0263】此分析表明，對於Fc鏈1和鏈2，在兩個CH2結構域中發現的最接近的殘基分別是以下。

【0264】Fc鏈1：E233、L234、L235、G236、G237、K322、S324、N325、K326、A327、L328、P329、A330、P331、E333。殘基G236和A330分別在ADLE和ADE方案中帶有突變G236A和A330L。A330（在ADLE中的L）與C1q受體直接接觸，並且當突變為白胺酸時可能對結合有直接影響。此外，P331與C1q直接接觸，並且位於I332前（ADE/DE/ADLE中的E）。

【0265】Fc鏈2：H268、E269、E294、S298、Y300。這些位置不包含任何工程化突變，既不增強效應子功能也不穩定。

【0266】基於此分析，DE、ADE和ADLE突變可能會影響與C1q的結合，這是由於與C1q受體接觸或接近的殘基所致。在最接近C1q的殘基內未發現DSB

位置，並且不應影響與C1q的結合。T256D和T307Q突變遠離相互作用表面，並且因此不應影響與C1q的結合。

【0267】 與FcγRIIIa的接觸殘基

【0268】 此分析表明，對於Fc鏈1和鏈2，在兩個CH2結構域中發現的最接近的殘基分別是以下：

Fc鏈1：A236、G237、P238、D239、D265、V266、S267、H268、D270、Y296、N297、S298、T299和A327。

Fc鏈2：G236、G237、P238、S239、K326、A327、L328、P329、A330、I332。

【0269】 以粗體顯示的殘基屬於DE、ADE和ADLE增強效應子功能突變。它解釋並且報導了增加與FcγRIIIa的結合。鑒於上述位置均不包含DSB突變，這不應影響與FcγRIIIa的結合。T256D和T307Q突變遠離相互作用表面，並且因此不應影響與FcγRIIIa的結合。

【0270】 與FcγRIIa的接觸殘基

【0271】 此分析表明，對於Fc鏈1和鏈2，在兩個CH2結構域中發現的最接近的殘基分別是以下：

Fc鏈1：L235、G236、G237、P238、K326、A327、L328、P329。殘基G236在ADLE和ADE方案中帶有突變G236A。

Fc鏈2：L234、L235、G236、G237、P238、S239、V264、D265、V266、S267、N297、S298、T299。

【0272】 殘基G236和S239分別在ADLE、ADE和DE方案中帶有突變G236A和S239D。基於此分析，ADLE突變可能會影響與FcγRIIa的結合。然而在最接近

FcγRIIa的殘基內未發現DSB位置，並且不應影響與FcγRIIa的結合。T256D和T307Q突變遠離相互作用表面，並且因此不應影響與FcγRIIa的結合。

【0273】 與FcRn的接觸殘基

【0274】 基於結構分析，DSB位置不應對FcRn結合表面產生影響。DSB突變的位置不是FcRn結合表面的一部分，並且也不靠近包含所述結合表面的CH2 - CH3彎部（elbow）。

【0275】 對DSB的突起空隙結構（KIH）和RF突變的影響

【0276】 基於結構分析，DSB不應對RF或KIH方案產生任何影響，因為它們屬於Fc鏈的不同IgG結構域（對於DSB，屬於CH2結構域，並且對於KIH和RF突變，屬於CH3結構域）。

【0277】 **實例2：穩定的變體的構築和表徵**

【0278】 單株抗體（mAb）藉由引入點突變，用增強的效應子勝任Fc骨架格式化（Lazar等人, PNAS, 103:4005-10 (2006)）。引入Fc結構域中的突變是：1) 胺基酸位置239處的天門冬胺酸（D）和胺基酸位置332處的麩胺酸（E）（“DE”變體）；2) 胺基酸位置236處的丙胺酸（A）、胺基酸位置239處的天門冬胺酸（D）和胺基酸位置332處的麩胺酸（E）（“ADE”變體）或3) 胺基酸位置236處的丙胺酸（A）、胺基酸位置239處的天門冬胺酸（D）、胺基酸位置330處的白胺酸（L）和胺基酸位置332處的麩胺酸（E）（“ADLE”變體）（參見Smith等人, PNAS, 109:6181-86 (2012)）。引入了另外的突變以增加帶有Fc的多肽的半衰期。在胺基酸位置256處引入天門冬胺酸（D）並且在胺基酸位置307處引入麩醯胺酸（Q）。胺基酸位置編號基於EU編號。

【0279】 為了產生具有更高熱穩定性的DE、ADE和ADLE變體，引入了半胱胺酸取代以工程化鏈內二硫鍵。用半胱胺酸對取代以下位置處的胺基酸：1) 胺基酸位置242處的白胺酸（L）和胺基酸位置334處的離胺酸（K）；和2) 胺基酸位置292處的精胺酸（R）和胺基酸位置302處的纈胺酸（V）。胺基酸位置編號基於EU編號。

【0280】 將點突變引入編碼人類IgG1 Fc結構域的核酸序列中。然後將這些核酸序列與mAb1（針對存在於免疫細胞表面的蛋白質抗原的IgG1抗體）的可變結構域的編碼序列融合，並且選殖到含有巨細胞病毒（CMV）增強子/啟動子和SV40多聚A信號的哺乳動物表現質體中。根據製造商的說明，將所得質體轉染到HEK293細胞中。

【0281】 mAb1變體的人類IgG1重恒定結構域的胺基酸序列

mAb1

mAb1（wt）（IgG1）

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 1)

mAb1- DE（殘基D239和E332加底線）

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGP**D**VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAP**E**EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 2)

mAb1-DE-DQ（殘基D239、E332、D256、Q307加底線）

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGP**D**VFLFPPKPKDTLMISR**D**PEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL**Q**VLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAP**E**EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 3)

mAb1-DE-DQ-L242C-K334C（殘基D239、E332、D256、Q307、C242和C334加底線）

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGP**D**VF**C**FPPKPKDTLMISR**D**PEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL**Q**VLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAP**E**E**C**TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP

SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS

VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 4)

mAb1-DE-DQ-R292C-V302C（殘基D239、E332、D256、Q307、C292和C302加底線）

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG

VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS

CDKTHTCPPCPAPELLGGP**D**VFLFPPKPKDTLMISR**D**PEVTCVVVDVSHEDPE

VKFNWYVDGVEVHNAKTKP**C**EEQYNSTYR**C**VSVL**Q**VLHQDWLNGKEYKC

KVSNKALPAP**E**EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP

SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS

VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 5)

mAb1-DE-R292C-V302C（殘基D239、E332、C292和C302加底線）

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG

VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS

CDKTHTCPPCPAPELLGGP**D**VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE

VKFNWYVDGVEVHNAKTKP**C**EEQYNSTYR**C**VSVLTVLHQDWLNGKEYKC

KVSNKALPAP**E**EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP

SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS

VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 6)

mAb1-DE-L242C-K334C（殘基D239、E332、C242和C334加底線）

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG

VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS

CDKTHTCPPCPAPELLGGP**D**VF**C**FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE

VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPAP**E**E**C**TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 7)

mAb1-ADE（殘基A236、D239和E332加底線）

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHTCPPCPAPELL**A**GP**D**VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPAP**E**EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 8)

mAb1-ADE-DQ（殘基A236、D239、E332、D256和Q307加底線）

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHTCPPCPAPELL**A**GP**D**VFLFPPKPKDTLMISR**D**PEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL**Q**VLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPAP**E**EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW (SEQ ID NO:
9)

mAb1-ADE-DQ-R292C-V302C（殘基A236、D239、E332、D256、Q307、C292和C302加底線）

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELL**A**GP**D**VFLFPPKPKDTLMISR**D**PEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKP**C**EEQYNSTYR**C**VSVL**Q**VLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAP**E**EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 10)

mAb1-ADE-DQ-L242C-K334C（殘基A236、D239、E332、D256、Q307、C242和C334加底線）

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELL**A**GP**D**VF**C**FPPKPKDTLMISR**D**PEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL**Q**VLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAP**E**E**C**TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW (SEQ ID NO: 11)

mAb1-ADE-R292C-V302C（殘基A236、D239、E332、C292和C302加底線）

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELL**A**GP**D**VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKP**C**EEQYNSTYR**C**VSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAP**E**EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP

SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS

VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 12)

mAb1-ADE-L242C-K334C（殘基A236、D239、E332、C242和C334加底線）

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG

VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS

CDKTHTCPPCPAPELL**A**GP**D**VF**C**FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE

VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC

KVSNKALPAP**E**E**C**TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP

SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS

VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 13)

mAb1-ADLE（殘基A236、D239、L330、E332加底線）

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG

VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS

CDKTHTCPPCPAPELL**A**GP**D**VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE

VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC

KVSNKALP**L**P**E**EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP

SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS

VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 14)

mAb1-ADLE-DQ（殘基A236、D239、L330、E332 D256、Q307加底線）

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG

VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS

CDKTHTCPPCPAPELL**A**GP**D**VFLFPPKPKDTLMISR**D**PEVTCVVVDVSHEDPE

VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL**Q**VLHQDWLNGKEYKC

KVSNKALP**L**P**E**EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 15)

mAb1-ADLE-DQ-L242C-K334C（殘基A236、D239、L330、E332、D256、Q307、C242和C334加底線）

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHTCPPCPAPELL**A**GP**D**VF**C**FPPKPKDTLMISR**D**PEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL**Q**VLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALP**L**P**E**E**C**TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 16)

mAb1-ADLE-DQ-R292C-V302C（殘基A236、D239、L330、E332、D256、Q307、C292和C302加底線）

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHTCPPCPAPELL**A**GP**D**VFLFPPKPKDTLMISR**D**PEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKP**C**EEQYNSTYR**C**VSVL**Q**VLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALP**L**P**E**EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 17)

mAb1-ADLE-R292C-V302C（殘基A236、D239、L330、E332、C292和C302加底線）

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHTCPPCPAPELL**A**GP**D**VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKP**C**EEQYNSTYR**C**VSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALP**L**P**E**EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 18)

mAb1-ADLE-L242C-K334C（殘基A236、D239、L330、E332、C242和C334加底線）

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHTCPPCPAPELL**A**GP**D**VF**C**FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALP**L**P**E**E**C**TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 19)

【0282】 mAb1變體以1.5升規模產生並且藉由兩步法純化，所述兩步法包括用PBS平衡的蛋白A親和層析法（HI Screen MAbSelect Sure蛋白A，Cytiva）和尺寸排阻層析法（HI Load 26/600 superdex 200 pg，Cytiva）。藉由使用至多10 mg/mL的Sartorius Vivaspin 10 KDa濃縮級分合併物（pool）。然後將樣品過濾滅菌，並且在4℃下儲存直至使用。藉由UV、在還原和非還原條件下的LabChip GXII touch HT protein、SEC-HPLC和LC-MS分析多個批次的定量、純度和身份。在用Lys-C、胰蛋白酶或胰蛋白酶 + Glu-C絲胺酸蛋白酶混合物進行酶消化後，經由

包含LC_MS（Q-Tof）的提取離子層析法（XIC）分析工程化二硫鍵，以進行肽作圖。

【0283】結果

【0284】**表1.抗體產生**

批次	描述	樣品產量(mg/L) 1.5 L規模的系列1	樣品產量(mg/L) 0.6 L規模的系列2
VA2-21-262-1	MAb1-ADE-DQ-R292C_V302C		87
VA2-21-261-1	MAb1-ADE-DQ-L242C_K334C		68
VA2-21-266-1	MAb1-ADE-DQ		36
VA2-21-260-1	MAb1-ADE-R292C_V302C		76
VA2-21-259-1	MAb1-ADE-L242C_K334C		66
VA2-21-264-1	MAb1-ADE-A287C_L306C		6
VA2-19-943-1	MAb1-ADE	55	
VA2-20-953-1	MAb1-ADLE-DQ-R292C_V302C	47	
VA2-20-954-1	MAb1-ADLE-DQ-L242C_K334C	28	
VA2-20-952-1	MAb1-ADLE-DQ	27	
VA2-21-268-1	MAb1-ADLE-R292C_V302C		88
VA2-21-267-1	MAb1-ADLE-L242C_K334C		38
VA2-21-265-1	MAb1-ADLE-A287C_L306C		4
VA2-20-949-1	MAb1-ADLE	40	
VA2-20-956-1	MAb1-DE-DQ-R292C_V302C	46	
VA2-20-957-1	MAb1-DE-DQ-L242C_K334C	36	
VA2-20-955-1	MAb1-DE-DQ	37	
VA2-21-270-1	MAb1-DE-R292C_V302C		83
VA2-21-269-1	MAb1-DE-L242C_K334C		61
VA2-21-263-1	MAb1-DE-A287C_L306C		9
VA2-20-951-1	MAb1-DE	59	
VA2-20-950-1	Mab1-WT	40	

【0285】產生多個批次，並且用預期的曲線進行表徵。與任何其他構築體相比，A287C+L306C構築體的樣品產量非常低。藉由XIC確定二硫鍵，並且如預期的那樣存在另外的二硫鍵，如**圖6**（具有mAb1 ADLE DQ和DSB突變型的二硫鍵的XIC曲線）以及**圖7A**和**圖7B**（具有mAb1_DE和DSB突變型和mAb1_ADE & DSB突變型的二硫鍵的XIC曲線）所示。

[0286] 為了測試具有Fc變體的mAb的熱穩定性，將mAb以10 mg/mL稀釋於PBS中。藉由奈米格式的差示掃描螢光測定法（nanoDSF）和Prometheus NT48使用標準毛細管來確定熱穩定性，並且以1℃/分鐘的加熱速率從20℃至95℃施加線性溫度梯度。

[0287] NanoDSF使用蛋白質固有螢光的變化來監測隨溫度升高而變化的蛋白質解折疊。使用266 nm波長的光源激發蛋白質溶液，以及在330 nm和350 nm下酪胺酸和色胺酸殘基的螢光發射。酪胺酸和色胺酸殘基的發射最大值和強度高度依賴於它們的直接環境，並且可以在熱變性期間隨著蛋白質解折疊而變化。監測330 nm和350 nm下的螢光強度比率隨溫度的變化產生S形曲線，所述曲線表示蛋白質的解折疊轉變。S形曲線的中點表示熔化溫度（Tm）。蛋白質開始解折疊時的可檢測溫度是起始。存在兩個曲折點（inflexion points，IP），兩個對應於Fc結構域的CH2和CH3，並且第二個曲折點對應於Fab結構域。Tagg是蛋白質展現出聚集趨勢時的溫度。

[0288] ADE、DE和ADLE變體的熱穩定性的評估的結果可在表2和圖8和圖9A－圖9B中找到。NanoDSF使用蛋白質固有螢光的變化來監測隨溫度升高而變化的蛋白質解折疊。監測330 nm和350 nm下的螢光強度比率隨溫度的變化產生S形曲線，所述曲線表示蛋白質的解折疊轉變。S形曲線的中點表示熔化溫度（Tm）。蛋白質開始解折疊時的可檢測溫度是起始。記錄了兩個曲折點（IP）：兩個對應於Fc結構域的CH2和CH3，並且第二個曲折點對應於Fab結構域。Tagg是蛋白質開始聚集時的溫度。

[0289] 表2.具有野生型IgG1或具有增強的Fc結構域的mAb1的熱穩定性

	mAb1							
ADE +/-	IgG1 A	IgG1 ADE	IgG1 ADE	IgG1 ADE	IgG1 ADE	IgG1 ADE	IgG1 ADE	IgG1

DQ +/-	DE DQ	DQ	DQ	..	..	..	..	..
DSB	R292C V302C	L242C K334C	..	R292C V302C	L242C K334C	A287C L306C	..	..
批次	VA2 21 262 1	VA2 21 261 1	VA2 21 266 1	VA2 21 260 1	VA2 21 259 1	VA2 21 264 1	VA2 19 943 1	VA2 20 950 1
T起始	56	55	44	61	58	42	46	65
IP Fc	65 (74)	64 (75)	50 (73)	69	66 (75)	51 (73)	51 (66)	71
IP Fab	82	83	82	83	83	82	83	82
Tagg	73	72	75	73	73	74	72	73

	mAb1							
ADLE +/-	IgG1 ADLE	IgG1 ADLE	IgG1 ADLE	IgG1 ADLE	IgG1 ADLE	IgG1 ADLE	IgG1 ADLE	IgG1
DQ +/-	DQ	DQ	DQ	..	..	..	..	..
DSB	R292C V302C	L242C K334C	..	R292C V302C	L242C K334C	A287C L306C	..	..
批次	VA2 20 953 1	VA2 20 954 1	VA2 20 952 1	VA2 21 268 1	VA2 21 267 1	VA2 21 265 1	VA2 20 949 1	VA2 20 950 1
T起始 C	58	54	39	60	57	41	45	65
IP Fc	64	62	47 (66)	67	64 (75)	50 (73)	50 (65)	71
IP Fab	82	83	82	82	83	82	83	82
Tagg	74	73	74	73	72	75	72	73

	mAb1							
DE +/-	IgG1 DE	IgG1 DE	IgG1 DE	IgG1 DE	IgG1 DE	IgG1 DE	IgG1 DE	IgG1
DQ +/-	DQ	DQ	DQ	..	..	..	..	..
DSB	R292C V302C	L242C K334C	..	R292C V302C	L242C K334C	A287C L306C	..	..
批次	VA2 20 956 1	VA2 20 957 1	VA2 20 955 1	VA2 21 270 1	VA2 21 269 1	VA2 21 263 1	VA2 20 951 1	VA2 20 950 1
T起始 C	59	55	42	58	59	41	47	65
IP Fc	66	65	49 (65)	69	67	52 (74)	53 (66)	71
IP Fab	82	83	82	82	83	82	82	82
Tagg	73	73	73	73	73	75	74	73

所有Fab都非常穩定，Tm在82°C與83°C之間。

[0290] WT IgG1（mAb1）的T起始是65°C，並且對於具有或不具有DQ突變的mAb1 ADLE、ADE和DE的T起始低於50°C。另一方面，當引入R292C V302C或L242C K334C DSB時，T起始遠高於50°C，像野生型IgG1分子。對於含有R292C V302C或L242C K334C DSB的分子，IP Fc高於60°C，像野生型IgG1。在具有或不具有DQ增強的半衰期突變的ADCC增強的Fc ADLE、ADE或DE的情況下，R292C V302C或L242C K334C DSB的引入恢復了熱穩定性。

【0291】 在沒有DQ增強的半衰期突變的ADCC增強的Fc ADLE、ADE或DE中，A287C_L306C DSB沒有恢復熱穩定性。

【0292】 **mAb2**

【0293】 基於mAb2（針對免疫細胞表面的G偶聯蛋白受體（GCPR）的IgG1單株抗體）製備以下其他Fc變體：mAb2（wt）（野生型IgG1 Fc）、mAb2-DE（對應於具有另外的取代S239D和I332E的mAb2）、mAb2-DE-R292C/V302C（對應於具有另外的取代R292C和V302C的mAb2-DE）和mAb2-R292C/V302C（對應於具有取代R292C和V302C的mAb2 wt）。

【0294】 使用與上文針對mAb1所述相同的方法測試mAb2wt、mAb2-DE、mAb2-DE-R292C/V302C和mAb2-R292C/V302C的熱穩定性，並且結果提供在**表3**中。

【0295】 **表3 具有或沒有二硫鍵的具有野生型IgG1或具有增強的Fc結構域的mAb2的熱穩定性**

殖株	TM1(ºC)
mAb2-R292C/V302C	73.0
mAb2 wt(對照)	71.9
mAb2-DE-R292C/V302C	67.9
mAb2-DE	51.0

【0296】 這些結果表明，mAb2中的DE突變導致較低的熱穩定性（mAb2 wt的Tm為71.9ºC，而mAb2-DE的Tm為51.0ºC），並且二硫鍵的引入恢復了熱穩定性（Tm 67.9ºC）。

【0297】 **mAb3**

【0298】 基於mAb3（針對免疫細胞表面存在的蛋白質抗原和癌細胞表面存在的蛋白質抗原的IgG1單株二價雙特異性CODV-OL1抗體）製備了以下其他Fc變體：mAb3（wt）（野生型IgG1 Fc）、mAb3-DE（對應於具有另外的取代

S239D和I332E的mAb3）、mAb3-DE-R292C/V302C（對應於具有另外的取代R292C和V302C的mAb3-DE）、mAb3-ADE（對應於具有另外的取代G236A、S239D和I332E的mAb3）和mAb3-ADE-R292C/V302C（對應於具有另外的取代R292C和V302C的mAb3-ADE）。

【0299】 如下產生mAb3抗體：

【0300】 使編碼相應構築體不同鏈的表現質體在大腸桿菌（E.coli）DH5a中繁殖。使用EndoFree Plasmid Mega套組（Qiagen）從大腸桿菌中製備用於轉染的質體。使用聚乙烯亞胺轉染試劑用所指示的質體轉染在F17無血清懸浮培養（Invitrogen）中生長的HEK 293-FS細胞。在37ºC與8% CO2下培育6天之後，藉由離心去除細胞，並且使上清液藉由0.22 μm過濾器以去除顆粒。在MabSelect SuRe（Cytiva）上捕獲蛋白質，並且用0.1 M檸檬酸鹽緩衝液pH 3.0洗脫，並且用1 M Tris pH 9中和。在藉由使用Superdex200 26/60（Cytiva）的尺寸排阻層析法（SEC）和0.22 μm過濾精製蛋白質並進行UV280濃度確定之後，將蛋白質用於進一步表徵。產量報告在下**表4**中。

【0301】 表4 具有或沒有二硫鍵的具有野生型IgG1或具有增強的Fc結構域的mAb3的產量

殖株	樣品產量(mg/L)
mAb3-WT	>20
mAb3-DE	<10
mAb3-ADE	<10
mAb3-DE-R292C/V302C	>20
mAb3-ADE-R292C/V302C	>20

【0302】 具有正常IgG1 Fc骨架的抗體顯示大於20 mg/L的樣品產量，而Fc骨架中具有ADE或DE突變的抗體顯示樣品產量的低於10 mg/L的降低。含有具有ADE或DE突變並且具有二硫鍵的IgG1 Fc的抗體顯示出與WT相似的樣品產量和

樣品產量的4至6倍的增加，其中mAb3-DE-R292C/V302C和mAb3-ADE-R292C/V302C示出了大於20 mg/L的樣品產量。

【0303】 用與上文針對mAb1所述相同的方法測試mAb3抗體的熱穩定性，並且結果提供在**表5**中。

【0304】 **表5 具有或沒有二硫鍵的具有野生型IgG1或具有增強的Fc結構域的mAb3的熱穩定性**

殖株	T起始	Tm1
mAb3-WT	58.5	64.3
mAb3-DE	40.4	47.5
mAb3-ADE	41.2	46.8
mAb3-DE-R292C/V302C	57.8	65.9
mAb3-ADE-R292C/V302C	57.5	65.9

【0305】 具有正常IgG1 Fc骨架的mAb3是穩定的，Tm1為64.3ºC且T起始為58.5ºC。在IgG1 Fc中具有ADE或DE突變的mAb3分子顯示低於50ºC的Tm1和T起始。含有具有ADE或DE突變且具有二硫鍵的IgG1 Fc的分子示出了熱穩定性的提高。mAb3-DE-DSB分子顯示65.9ºC的Tm1和57.8ºC的T起始，並且mAb3-ADE-DSB顯示65.9ºC的Tm1和57.5ºC的T起始。

【0306】 mAb3內二硫鍵R292C/V302C的化學完整性

【0307】 Fc CH2結構域上的二硫鍵（DSB）的工程化提高了穩定性。為了確保mAb3內的工程化DSB R292C_V302C和ADE突變（G236A/S239D/I332E）不會異常地影響DSB還原行為，藉由DTT和隨後的胰蛋白酶肽作圖來測量還原速率。

【0308】 材料和方法

【0309】 還原敏感性測定

【0310】 進行DTT在PBS-E中的連續稀釋（測定中的最終DTT濃度：20、10、5、2、1、0.5、0.2和0.1 mM）。使用旋轉脫鹽柱將蛋白質批次FF-20-819-1、FF-20-821-1和FF-21-170-5透析到PBS-E緩衝液中，以確保在還原期間獲得pH 7.2。將蛋白質樣品歸一化為在PBS-E中的1.5 mg/mL。將兩份歸一化的樣品與一份每種DTT稀釋液添加到PCR板中，並且在添加後混合。在一分鐘內從最低濃度到最高濃度的DTT濃度進行此步驟。藉由在Thermostat C Thermoblock上在25ºC下培育10分鐘進行還原。藉由向所有孔中添加3份NEM儲備溶液來使反應淬滅。為了確保測定的一致性，在一分鐘內從最低至最高DTT濃度進行NEM添加，並且在添加後混合。將製備的板在室溫下保存，直到藉由毛細管凝膠電泳（cGE）和質譜法（肽作圖）進行測量。

【0311】 下**表6A**和**表6B**分別含有還原敏感性測定和毛細管凝膠電泳的試劑和材料列表。

【0312】 **表6A** - 還原敏感性測定的試劑和材料列表

試劑/材料	**製造商**	**目錄號**	**儲液濃度**
PBS緩衝液pH7.2	Gibco/Thermo-Fisher	20012043	1x
二硫蘇糖醇(DTT)	Pierce/Thermo-Fisher	A39255	固體，在PBS-E中分解至100 mM
N-乙基馬來醯亞胺(NEM)	Pierce/Thermo-Fisher	23030	固體，在PBS-E中分解至200 mM
Invitrogen EDTA，pH8.0	Thermo-Fisher	AM9260G	0.5 M
Hard-shell 96孔板	Bio-Rad	HSP9601	/
旋轉脫鹽柱，7K MWCO	ZEBA	89883	/
儀器	**製造商**	**目錄號**	
Thermostat C Thermoblock	Eppendorf	5383000027	
測定緩衝液	**組成**		
PBS-E	Gibco 1X PBS緩衝液pH7.2 + 1 mM EDTA		

【0313】 **表6B** - 毛細管凝膠電泳（cGE）的試劑和材料列表

試劑/材料	**製造商**	**目錄號**	**儲液濃度**
水，MS級	Thermo	#51140	/
碘乙醯胺(IAM)	Thermo-Fisher	#A39271	固體，在水中分解至

			250 mM
Hard-shell 96孔板	Bio-Rad	#HSP9601	/
Protein Clear HR測定套組	PerkinElmer	#CLS960014	/
Protein Clear HR晶片	PerkinElmer	#CLS148695	/
儀器	**製造商**	**目錄號**	
LabChip GXII Touch	PerkinElmer	CLS138160	
Thermostat C Thermoblock	Eppendorf	5383000027	
測定緩衝液	**組成/濃度**		
非還原樣品緩衝液	蛋白質表現樣品緩衝液 + 8.75 mM IAM		

【0314】 進行還原敏感性測定後，根據製造商的說明，藉由使用Protein Clear HR測定的非還原方案測量樣品。

【0315】 為了製備晶片，允許所有測定組分平衡至室溫。根據製造商的說明，將Protein Clear HR凝膠基質與Protein Clear HR染料溶液混合並且過濾，然後將其添加到沖洗的晶片孔中。

【0316】 根據製造商的說明，將所提供的測定對照VeriMAb-標準物稀釋於非還原性樣品緩衝液中，在70ºC下變性10分鐘，並且與水混合，並且將其放置在LabChip GXII Touch儀器中進行測定校準。在水中1：10稀釋Protein Clear HR梯後，將所指示體積的梯溶液和Protein Clear HR洗滌緩衝液轉移到相應的管中，並且放入LabChip GXII Touch儀器中。在測量樣品之前，校準過程已經成功完成。

【0317】 為了製備樣品，將來自還原敏感性測定的5 µL的每個樣品添加到PCR板中的18 µL的非還原樣品緩衝液中，將板密封，並且使樣品在Thermostat C Thermoblock上在70ºC下變性10 min。變性後，將樣品用35 µL水稀釋。將製備的測定板在室溫下儲存，直到用LabChip GXII Touch儀器對其進行測量。

【0318】 測量後，使用LabChip Reviewer軟體分析資料。將相對峰面積≥0.85%的所有峰積分。將剩餘完整分子的相對峰面積 [%] 針對DTT濃度作圖，並且藉由4參數邏輯斯諦模型/S型劑量 - 反應模型（XLfit，Dose Response One

Site，模型205）擬合曲線。使用不添加DTT的樣品的面積進行標準化，並且將其設置為100%。使用剩餘50%完整分子的每個樣品的DTT濃度作為EC50值，以評價分子對還原的敏感性。

【0319】 胰蛋白酶肽作圖實驗的還原測定後的抗體樣品製備

【0320】 進行還原敏感性測定後，使樣品經歷消化程序。藉由用0.5 mL Zeba旋轉脫鹽柱（Thermo Fisher Scientific，目錄號89883）進行的緩衝液交換，使用0.2 mol/L組胺酸氯化物，5.6 mmol/L鹽酸胍pH 6，使100 μg的每個抗體樣品變性。重複一次緩衝液交換，以確保完全去除NEM。然後，藉由添加10 mmol/L TCEP（三(2-羧乙基)膦，Thermo Fisher Scientific，目錄號T2556）使樣品在37ºC下還原1 h。隨後，用0.5 mL Zeba旋轉脫鹽柱（Thermo Fisher Scientific，目錄號89883）將緩衝液交換為20 mmol/L組胺酸氯化物，0.5 mmol/L TCEP，pH 6。將抗體以1 : 20的酶與基質比率在37ºC下用胰蛋白酶中消化過夜。藉由添加7 μL的10%甲酸溶液來停止消化，並且將樣品在-80ºC下冷凍直至進一步分析。

【0321】 藉由液相層析法串聯質譜法檢測經修飾的肽

【0322】 使用與配備有EASY-ETD離子源的orbitrap FUSION™ LUMOS™ TRIBRID™質譜儀（Thermo Fisher Scientific，聖約瑟，加利福尼亞州，美國）偶聯的VANQUUISH™ Flex UHPLC系統來分析肽。

【0323】 對於肽分離，使用二元溶劑系統：(A) 0.1%甲酸和 (B) 90%乙腈，0.1%甲酸。將2 μg的胰蛋白酶消化的樣品在HYPERSIL GOLD™ C18 LC柱（150 mm x 2.1 mm，1.9 μm細微性，Thermo Fisher Scientific，目錄號25003-152130-V）上用以下的1 h梯度分離：線性漸增濃度的溶劑B持續50 min，隨後在95% B下洗滌5 min，並且在5%溶劑B中再平衡5 min。藉由以下關鍵設置檢測在所述柱上分

離的肽：以120,000的解析度（以200 m/z定義）獲得完整的MS譜，質量範圍設置為375-2000，自動增益控制（AGC）目標為4.0e5，最大注射時間為50 ms和1 μscan。在200 ms的注射時間內累積5.0e4 AGC目標之後，使用15,000的解析度（以200 m/z定義）以前5種資料依賴性模式獲得資料依賴性（MS/MS）光譜。將離子在1.6 Th分離窗處分離，並且以30%歸一化碰撞能量使用HCD、EThcD或ETciD片段化。將動態排除設置為10 s。

【0324】 資料處理

【0325】 將獲得的MS資料使用Expressionist軟體（GeneData 13.5版）處理並且手動檢查以確保正確的分配和相對定量準確性。針對樣品分子的胺基酸序列搜索質譜。關鍵設置是MS和MS/MS譜的質量公差，分別設置為10 ppm。使用來自Expressionist的IgG N-聚糖庫，認為在搜索參數內的轉譯後修飾是對半胱胺酸的NEM修飾和常見的N末端糖基化。

【0326】 結果

【0327】 如下**表6C**所示，從劑量反應曲線計算EC50值。藉由毛細管電泳（cGE）測量的藉由DTT對未還原樣品的主峰的還原對於mAb3 wt、mAb3ADE和mAb3 ADE-DSB是相同的，表明ADE突變和CH2結構域中工程化的二硫鍵都對蛋白質的還原敏感性沒有影響。

【0328】 藉由肽作圖分析的來自還原敏感性測定的蛋白質mAb3 wt、mAb3 ADE和mAb3 ADE-DSB展現出還原敏感的分子間二硫鍵（DSB）的類似還原行為。基於劑量反應曲線，估計三種蛋白質的EC50值在1.2-1.5 mM DTT的範圍內，表明工程化DSB與典型的分子間DSB是類似地還原穩定的。

【0329】 **表6C** - 從藉由毛細管電泳（cGE）測量的DTT對未還原樣品的主峰的還原的劑量反應曲線計算的EC50值

蛋白質樣品	EC50 [mM DTT]
Adapt_標準物(mAb對照)	0.8
mAb3 wt	1.2
mAb3 ADE	1.2
mAb3 ADE-DSB	1.2

【0330】 **mAb4**

【0331】 基於mAb4（針對免疫細胞表面存在的蛋白質抗原和癌細胞表面存在的蛋白質抗原的IgG1單株四價雙特異性CODV抗體）製備以下其他Fc變體：mAb4（wt）（野生型IgG1 Fc）、mAb4-DE（對應於具有另外的S239D和I332E取代的mAb4）、mAb4-DE-R292C/V302C（對應於具有另外的取代R292C和V302C的mAb4-DE）、mAb4-R292C/V302C（對應於具有R292C和V302C取代的mAb4 wt）、mAb4-ADE（對應於具有另外的取代G236A、S239D和I332E的mAb4）和mAb4-ADE-R292C/V302C（對應於具有另外的取代R292C和V302C的mAb4-ADE）。

【0332】 如下產生mAb4抗體：

【0333】 使編碼相應構築體不同鏈的表現質體在大腸桿菌DH5a中繁殖。使用EndoFree Plasmid Mega套組（Qiagen）從大腸桿菌中製備用於轉染的質體。使用聚乙烯亞胺轉染試劑用所指示的質體轉染在F17無血清懸浮培養（Invitrogen）中生長的HEK 293-FS細胞。在37ºC與8% CO2下培育6天之後，藉由離心去除細胞，並且使上清液藉由0.22 μm過濾器以去除顆粒。在MabSelect SuRe（Cytiva）上捕獲蛋白質，並且用0.1 M檸檬酸鹽緩衝液pH 3.0洗脫，並且用1 M Tris pH 9中和。在藉由使用Superdex200 26/60（Cytiva）的尺寸排阻層析法（SEC）和0.22

μm過濾精製蛋白質並進行UV280濃度確定之後，將蛋白質用於進一步表徵。產量報告在下**表7**中。

【0334】 表7 具有或沒有二硫鍵的具有野生型IgG1或具有增強的Fc結構域的mAb4的產量

殖株	樣品產量(mg/L)
mAb4-WT	30.6
mAb4-DE	2.7
mAb4-ADE	4.7
mAb4-DE-R292C/V302C	17.9
mAb4-ADE-R292C/V302C	19.4

【0335】 具有正常IgG1 Fc的mAb4分子顯示出30.6 mg/L的樣品產量，而在Fc部分中具有ADE或DE突變的mAb4分子顯示出樣品產量顯著降低，其值低於5 mg/L。含有具有ADE或DE突變且具有二硫鍵的IgG1 Fc的mAb4分子顯示出樣品產量的提高。mAb4-DE- R292C/V302C顯示出17.9 mg/L的樣品產量，並且mAb4-ADE- R292C/V302C顯示19.4 mg/L的樣品產量。

【0336】 使用與上文針對mAb1所述相同的方法測試mAb4抗體的熱穩定性，並且結果提供於**表8**中。

【0337】 表8 具有或沒有二硫鍵的具有野生型IgG1或具有增強的Fc結構域的mAb4的熱穩定性

殖株	T起始	Tm1
mAb4-WT	59.0	66.4
mAb4-DE	45.3	50.3
mAb4-ADE	44.6	49.9
mAb4-DE-R292C/V302C	59.4	67.2
mAb4-ADE-R292C/V302C	58.2	66.6

【0338】 具有正常IgG1 Fc的mAb4分子是穩定的，Tm1為66.4ºC且T起始為59ºC。在IgG1 Fc中具有ADE或DE突變的mAb4分子顯示出50ºC或低於50ºC的Tm1和T起始。含有具有ADE或DE突變且具有二硫鍵的IgG1 Fc的mAb4分子示出

了熱穩定性的提高。mAb4-DE-R292C/V302C分子顯示67.2ºC的Tm和59.4ºC的T起始，並且mAb4-ADE-R292C/V302C顯示66.6ºC的Tm和58.2ºC的T起始。

【0339】 **圖10**描繪了如藉由奈米差示掃描螢光測定法（nanoDSF）所確定，對於DE、ADE、DE + DSB和ADE + DSB，二硫化物穩定化的熱穩定性作用。左小圖描繪了mAb3並且右小圖描繪了mAb4。使用R292C/V302C的穩定化導致熱穩定性增益約10ºC。

【0340】 **實例3：穩定的mAb1變體的結合參數**

【0341】 方法和材料

【0342】 使用流式細胞術確定mAb1與表現靶抗原的幾種重組細胞系的二價EC50結合：人類preB-300.19細胞、食蟹猴preB-300.19細胞、HEK293T-FcγRIIIa F158、FcγRIIIa V158和CHO-人類FcRn表現細胞（GenScript；M00603）。將細胞在96孔板中培養直到達到40,000個細胞/孔的密度。在4ºC下添加mAb（100 μL/孔）持續45 min。培育後，將孔用PBS+1% BSA洗滌三次。在4ºC下添加山羊抗人類IgG-Alexa488抗體持續45 min，並且用PBS+1% BSA洗滌三次。在細胞的離心和藉由添加200 μL/孔的PBS+1% BSA重懸後評價抗體結合，並且使用Guava easyCyte 8HT流式細胞術系統評價結合。分別使用BIOST@T-BINDING和BIOST@T-SPEED軟體估計表觀KD和EC50值。

【0343】 在HBS-EP+緩衝液（10 mM HEPES，150 mM NaCl，3 mM EDTA和0.05% v/v表面活性劑P20，pH 7.4）中在25ºC下在Biacore T200儀器上藉由表面等離子體共振（SPR）測定來測量與huFcγRIIIa蛋白的抗體結合動力學。人類FcγRIIIa_His蛋白（huFcγRIIIa_V158；huFcγRIIIa_F158）以0.05 μg/mL被捕獲在抗His表面（用抗His抗體固定的CM5感測器晶片）上。注射從2.5 μM開始的一系

列抗體濃度持續1 min，並且監測解離3.5 min（30 μL/min）。用10 mM甘胺酸-HCl pH 1.5的1 min脈衝（10 μL/min）使抗His表面再生。

[0344] 在PBST緩衝液（1.5mM KH2PO4，2.7 mM Na2HPO4-7H2O，300 mM NaCl，0.05% Tween-20，pH 6.0）中在25°下在Biacore T200儀器上藉由SPR來測量與人類FcRn（huFcRn）蛋白的抗體結合動力學。huFcRn在感測器晶片CAP-鏈黴親和素上被捕獲。然後注射從2 μM開始的一系列抗體濃度持續1 min並且監測解離1.5 min（30 μL/min）。用6 M鹽酸胍、0.25 M NaOH的一次2 min脈衝（10 μL/min）使所述表面再生。

[0345] 抗原結合（FACS）

[0346] mAb1變體與人類和食蟹猴靶抗原二者結合的結果可在表9中找到。與引入Fc結構域中的突變無關，與靶抗原的結合是相似的。對於人類靶抗原，EC50值在0.65與0.85 nM之間，並且對於食蟹猴靶抗原，EC50值在1.36與1.78之間。引入工程化二硫鍵沒有影響與靶抗原的結合。

[0347] 表9：如藉由FACS測量的與靶抗原的結合

ADE+/-DQ+/-DSB	mAb1+/-ADE+/-DQ+/-DSB						
	IgG1_ADE_DQ	IgG1_ADE_DQ	IgG1_ADE_DQ	IgG1_ADE_.._..	IgG1_ADE_.._..	IgG1_ADE_.._..	IgG1_.._..
DSB	R292C_V302C	L242C_K334C	..	R292C_V302C	L242C_K334C	..	..
批次	VA2-21-262-1	VA2-21-261-1	VA2-21-266-1	VA2-21-260-1	VA2-21-259-1	VA2-19-943-1	VA2-20-950-1
藉由FACS測量的結合，EC50(Nm)，測定1，n=3							
人類抗原	0.62±0.05	0.59±0.07	0.61±0.04	0.60±0.14	0.60±0.12	0.55±0.09	0.63±0.11
食蟹猴抗原	1.52±0.22	1.45±0.24	1.52±0.20	1.47±0.19	1.51±0.16	1.38±0.10	1.49±0.13

ADLE+/-	mAb1+/-ADLE+/-DQ+/-DSB					
	IgG1_ADLE	IgG1_ADLE	IgG1_ADLE	IgG1_ADLE	IgG1_ADLE	IgG1

DQ-/-DSB批次	DQ R292C_V302C VA2.20.953-1	DQ L242C_K334C VA2.20.954-1	.. R292C_V302C VA2.21.268-1	.. L242C_K334C VA2.21.267-1	.. .. VA2.20.949-1	.. .. VA2.20.950-1
藉由FACS測量的與抗原的結合，EC50(Nm)，測定1，n=3						
人類抗原			0.62±0.06	0.62±0.07	0.60±0.14	0.63±0.11
食蟹猴抗原			1.54±0.16	1.50±0.20	1.48±0.21	1.49±0.13
藉由FACS測量的與抗原的結合，EC50(nM)，測定2，n=1						
人類抗原	0.84	0.85			0.65	0.72
食蟹猴抗原	1.70	1.67			1.36	1.39

DE-/-DQ-/-DSB批次	mAb1-/-DE-/-DQ-/-DSB IgG1_DE DQ R292C_V302C VA2.20.956-1	IgG1_DE DQ L242C_K334C VA2.20.957-1	IgG1_DE .. R292C_V302C VA2.21.270-1	IgG1_DE .. L242C_K334C VA2.21.269-1	IgG1_DE VA2.20.951-1	IgG1 .. .. VA2.20.950-1
藉由FACS測量的與抗原的結合，EC50(Nm)，測定1，n=3						
人類抗原			0.64±0.09	0.62±0.06	0.63±0.11	0.63±0.11
食蟹猴抗原			1.55±0.28	1.49±0.19	1.50±0.19	1.49±0.13
藉由FACS測量的與抗原的結合，EC50(nM)，測定2，n=1						
人類抗原	0.86	0.75			0.79	0.72
食蟹猴抗原	1.78	1.62			1.45	1.39

〔0348〕 huFcγRIIIa V/F158動力學和FACS

〔0349〕 藉由SPR和FACS測量mAb與人類FcγRIIIa蛋白的結合。結果可以在表10中找到。對於具有包含DE、ADE和ADLE突變的Fc結構域的所有變體，相比於具有WT IgG1的抗體與FcγRIIIa V158或F158的結合，與FcγRIIIa V158或F158的結合顯著改善，如藉由FACS和SPR測量的。對於FcγRIIIA V158（分別地，FcγRIIIA F158），如藉由FACS所測量改善10至100倍，並且藉由SPR所測量改善

6至20倍（分別地，18至29倍）。工程化二硫鍵（L242C/K334C或R292C/V302C）的引入沒有影響mAb1與FcγRIIIa V158或F158的結合。

[0350] 表10：如藉由FACS和SPR測量的與FcγRIIIa V158和F158的結合

	mAb1 +/- ADE +/- DQ +/- DSB						
ADE +/-	IgG1 ADE	IgG1 ADE	IgG1 ADE	IgG1 ADE	IgG1 ADE	IgG1 ADE	IgG1
DQ +/-	DQ	DQ	DQ	..	..	..	..
DSB	R292C V302C	L242C K334C	..	R292C V302C	L242C K334C	..	..
批次	VA2 21-262-1	VA2 21-261-1	VA2 21-266-1	VA2 21-260-1	VA2 21-259-1	VA2 19-943-1	VA2 20-950-1
藉由FACS測量的與FcγRIIIA的結合(EC50 nM)，測定1，n = 3							
V158	10 ± 3	7 ± 4	4 ± 1	12 ± 4	5 ± 2	3 ± 1	186 ± 70
F158	17 ± 1	19 ± 3	13 ± 4	19 ± 1	18 ± 4	9 ± 1	1064 ± 70
藉由SPR測量的與FcγRIIIA的結合(KD nM)，測定1，n = 3							
V158	214 ± 25	191 ± 18	155 ± 5	172 ± 18	162 ± 4	107 ± 4	1623 ± 153
F158	202 ± 71	211 ± 47	183 ± 14	211 ± 16	193 ± 14	150 ± 6	3870 ± 397

	mAb1 +/- ADLE +/- DQ +/- DSB						
ADLE +/-	IgG1 ADLE	IgG1 ADLE	IgG1 ADLE	IgG1 ADLE	IgG1 ADLE	IgG1 ADLE	IgG1
DQ +/-	DQ	DQ	DQ	..	..	..	..
DSB	R292C V302C	L242C K334C	..	R292C V302C	L242C K334C	..	..
批次	VA2 20-953-1	VA2 20-954-1	VA2 20-952-1	VA2 21-268-1	VA2 21-267-1	VA2 20-949-1	VA2 20-950-1
藉由FACS測量的與FcγRIIIA的結合(EC50 nM)，測定1，n = 3							
V158				12 ± 3	5 ± 2	3 ± 1 (2.71 ± 0.42)	186 ± 70
F158				25 ± 3	11 ± 4	4 ± 1 (4.37 ± 0.53)	1064 ± 70
藉由FACS測量的與FcγRIIIA的結合(EC50 nM)，測定2，n = 1							
V158	26	9				5	244
F158	52	13				7	744
藉由SPR測量的與FcγRIIIA的結合(KD nM)，測定1，n = 3							
V158			88 ± 4	258 ± 5	161 ± 21	77 ± 4	1623 ± 153
F158			105 ± 7	296 ± 16	148 ± 23	94 ± 3	3870 ± 397
藉由SPR測量的與FcγRIIIA的結合(KD nM)，測定2，n = 3							
V158	56 ± 4	33 ± 1	28 ± 4			22 ± 2	386 ± 29
F158	70 ± 18	49 ± 2	38 ± 2			46 ± 27	1331 ± 111

	mAb1 +/- DE +/- DQ +/- DSB						
DE	IgG1 DE	IgG1 DE	IgG1 DE	IgG1 DE	IgG1 DE	IgG1 DE	IgG1

ADE +/-							
DQ +/-	DQ	DQ	DQ	-	-	-	-
DSB	R292C V302C	L242C K334C	-	R292C V302C	L242C K334C	-	-
批次	VA2.20.956.1	VA2.20.957.1	VA2.20.955.1	VA2.21.270.1	VA2.21.269.1	VA2.20.951.1	VA2.20.950.1
藉由FACS測量的與FcγRIIIA的結合(EC50 nM)，測定1，n = 3							
V158				4 ± 1	2 ± 1	2 ± 1	186 ± 70
F158				11 ± 1	24 ± 12	11 ± 3	1064 ± 70
藉由FACS測量的與FcγRIIIA的結合(EC50 nM)，測定2，n = 1							
V158	7	3				4	244
F158	20	27				18	744
藉由SPR測量的與FcγRIIIA的結合(KD nM)，測定1，n = 3							
V158			60 ± 5	101 ± 26	109 ± 27	57 ± 5	1623 ± 153
F158			142 ± 11	88 ± 27	297 ± 43	141 ± 8	3870 ± 397
藉由SPR測量的與FcγRIIIA的結合(KD nM)，測定2，n = 3							
V158	29 ± 2	18 ± 1	19 ± 1			17 ± 1	386 ± 29
F158	50 ± 1	72 ± 6	58 ± 4			48 ± 11	1331 ± 111

[0351] huFcγRIIa H/R131動力學和FACS

[0352] 藉由SPR和FACS測量mAb與人類FcγRIIa蛋白的結合。結果可以在表11中找到。當在存在或不存在DQ突變的情況下引入DSB R292C V302C或L242C K334C突變時，與IgG1相比，與具IgG1 ADE形式的FcγRIIA的改善的親和力消失了。在IgG1 ADLE或DE形式中，在有和沒有DSB突變的情況下，對FcγRIIA的親和力保持較低。

[0353] 表11：如藉由FACS和SPR測量的與FcγRIIa H131和R131的結合

	mAb1 +/- ADE +/- DQ +/- DSB						
ADE +/-	IgG1 ADE	IgG1 ADE	IgG1 ADE	IgG1 ADE	IgG1 ADE	IgG1 ADE	IgG1
DQ +/-	DQ	DQ	DQ	-	-	-	-
DSB	R292C V302C	L242C K334C	-	R292C V302C	L242C K334C	-	-
批次	VA2.21.262.1	VA2.21.261.1	VA2.21.266.1	VA2.21.260.1	VA2.21.259.1	VA2.19.943.1	VA2.20.950.1
藉由FACS測量的與FcγRIIA的結合(EC50 nM)，測定1，n = 3							
H131	101 ± 33	68 ± 27	14 ± 2	92 ± 12	102 ± 34	20 ± 2	341 ± 64
R131	45 ± 21	152 ± 56	18 ± 5	43 ± 12	142 ± 19	20 ± 1	303 ± 27

	mAb1 +/- ADLE +/- DQ +/- DSB			
ADLE +/-	IgG1 ADLE	IgG1 ADLE	IgG1 ADLE	IgG1
DQ +/-	-	-	-	-
DSB	R292C V302C	L242C K334C	-	-

批次	VA2.21.268.1	VA2.21.267.1	VA2.20.949.1	VA2.20.950.1
	藉由FACS測量的與FcγRIIA的結合(EC50 nM)，測定1，n = 3			
H131	155 ± 28	145 ± 85	70 ± 12	341 ± 64
R131	144 ± 19	428 ± 170	85 ± 14	303 ± 27

	mAb1+/- DE+/- DQ+/- DSB			
DE+/-	IgG1 DE	IgG1 DE	IgG1 DE	IgG1
DQ+/-	--	--	--	--
DSB	R292C V302C	L242C K334C	--	--
批次	VA2.21.270.1	VA2.21.269.1	VA2.20.951.1	VA2.20.950.1
FcγRIIA	藉由FACS測量的與FcγRIIA的結合(EC50 nM)，測定1，n = 3			
H131	337 ± 142	319 ± 55	106 ± 29	341 ± 64
R131	254 ± 6	319 ± 8	198 ± 44	303 ± 27

[0354] huFcRn動力學和FACS

[0355] huFcRn結合研究的結果可以在表12中找到。對於含有具有DQ突變的Fc變體的所有mAb，與不具有DQ突變的Fc相比，與huFcRn的結合得到改善。當Fc含有 DQ突變時，DSB的引入維持這種改善。

[0356] 表12：如藉由FACS和SPR測量的與huFcRn的結合

	mAb1+/- ADE+/- DQ+/- DSB						
ADE +/-	IgG1 ADE	IgG1 ADE	IgG1 ADE	IgG1 ADE	IgG1 ADE	IgG1 ADE	IgG1
DQ +/-	DQ	DQ	DQ	--	--	--	--
DSB	R292C V302C	L242C K334C	--	R292C V302C	L242C K334C	--	--
批次	VA2.21.262.1	VA2.21.261.1	VA2.21.266.1	VA2.21.260.1	VA2.21.259.1	VA2.19.943.1	VA2.20.950.1
	藉由SPR測量的與huFcRn的結合(KD nM)，測定1，n = 3						
	198 ± 3	161 ± 19	217 ± 2	1310 ± 221	829 ± 129	1040 ± 155	1210 ± 81

	mAb1+/- ADLE+/- DQ+/- DSB						
ADLE +/-	IgG1 ADLE	IgG1 ADLE	IgG1 ADLE	IgG1 ADLE	IgG1 ADLE	IgG1 ADLE	IgG1
DQ +/-	DQ	DQ	DQ	--	--	--	--
DSB	R292C V302C	L242C K334C	--	R292C V302C	L242C K334C	--	--
批次	VA2.20.953.1	VA2.20.954.1	VA2.20.952.1	VA2.21.268.1	VA2.21.267.1	VA2.20.949.1	VA2.20.950.1
	藉由SPR測量的與huFcRn的結合(KD nM)，測定1，n = 3						
			193 ± 15	1130 ± 111	965 ± 126	993 ± 153	1210 ± 81
	藉由SPR測量的與huFcRn的結合(KD nM)，測定2，n = 3						
	184 ± 11	156 ± 20	196 ± 27			811 ± 28	941 ± 130

	mAb1+/-DE+/-DQ+/-DSB						
DE+/-DQ+/-DSB	IgG1_DE_DQ_R292C_V302C	IgG1_DE_DQ_L242C_K334C	IgG1_DE_DQ_..	IgG1_DE_.._R292C_V302C	IgG1_DE_.._L242C_K334C	IgG1_DE_.._..	IgG1_.._..
批次	VA2-20-956-1	VA2-20-957-1	VA2-20-955-1	VA2-21-270-1	VA2-21-269-1	VA2-20-951-1	VA2-20-950-1
藉由SPR測量的與huFcRn的結合(KD nM)，測定1，n=3			199±6	864±271	798±88	996±104	1210±81
藉由SPR測量的與huFcRn的結合(KD nM)，測定2，n=3	234±41	169±15	249±41			761±89	941±130

[0357] 實例4：穩定的mAb2變體的結合參數

[0358] 方法和材料：

[0359] 表面等離子體共振測定

[0360] 使用表面等離子體共振（SPR）的Fcγ受體結合

[0361] 使用抗His捕獲在Biacore T200儀器上進行與重組人類FcγRIIIa-V158的抗體結合的分析。將抗-6His（Qiagen）緩衝液交換到PBS pH 7.2（Gibco）中，在10 mM乙酸鈉pH 4.0中稀釋至25 μg/mL，並且使用GE Healthcare提供的胺偶聯套組將其直接固定到系列S CM5晶片上，表面密度為約10,000 RU。將His標記的重組人類FcγRIIIa-V158（內部產生）在HBS-EP+（10 mM HEPES pH 7.4，150 mM NaCl，3 mM EDTA，0.05%表面活性劑P20）中稀釋至0.5和1 μg/mL，並且以10 μL/min的流速注射30 sec，以獲得6和14 RU的捕獲水平。在運行緩衝液中將mAb2-wt抗體從3000至37 nM連續稀釋3倍，並且將mAb2-DE抗體稀釋至111、37、12和4 nM，並且一式兩份在捕獲的受體上注射2 min，然後在緩衝液中解離2 min。用10 mM甘胺酸pH 1.5使表面再生30 sec。使用BiaEvaluation軟體（GE Healthcare）處理傳感圖，並且擬合到1：1結合模型以獲得動力學常數。報告的KD是從兩個捕獲水準取平均值。

[0362] 使用表面等離子體共振（SPR）的FcRn結合

【0363】使用抗Fab捕獲方法在Carterra LSA儀器上進行與重組人類、食蟹猴（cyno）和小鼠FcRn的抗體結合的分析。將山羊抗人類IgG（F(ab')2特異性）（Jackson Labs）在10 mM乙酸鈉pH 4.5中稀釋至20 μg/mL並且在25 mM MES pH 6.0、0.05% Tween-20運行緩衝液中使用由Carterra提供的胺偶聯試劑直接固定在HC200M晶片上，表面密度為約9,000 RU。將mAb2抗體二重複在單獨的象限中在PBSP+ pH 6.0（20 mM NaPi，2.7 mM KCl，137 mM NaCl，0.05%表面活性劑P20）中以6和15 μg/mL以捕獲陣列格式印刷至抗Fab表面上。將每個種類的FcRn（內部產生）在PBSP + pH 6.0中連續稀釋2倍，並且在捕獲的mAb2上注射用於2或3 min締合，然後解離5 min，以測量在pH 6.0下的親和力。每個濃度系列含有總共10個FcRn濃度，其中最高濃度具有FcRn物種特異性：4000 nM、2000 nM食蟹猴和500 nM小鼠FcRn。緩衝液注射在受體注射之間均勻分佈，以減去適當的空白。為了測量在pH 7.4下的FcRn結合，如上所述捕獲mAb2抗體，同時在PBSP+ pH 7.4中將人和食蟹猴FcRn稀釋至1000 nM，並且將小鼠FcRn稀釋至500 nM，並且在捕獲的mAb2上注射用於2分鐘締合，然後解離2 min。用Carterra K.I.T. Inspection Tool處理傳感圖並且擬合至1 : 1結合模型，以獲得pH 6.0下的動力學常數，或締合階段結束時在pH 7.4下計算穩態反應。報告的結合親和力是從來自人類FcRn的兩個單獨測定運行以及食蟹猴和小鼠FcRn的單個測定運行的所有mAb2印刷取平均值。

【0364】結果：

【0365】**表13：與huFcgRIIIa-V158的結合親和力**

mAb2變體	WT對照	WT R292C_V302C	_DE	_DE R292C_V302C
測定				
與huFcgRIIIa-V158的結合(SPR)，KD(M)	3.97E-07	5.24E-07	1.33E-08	1.83E-08

【0366】 與huFcgRIIIa-V158的結合的SPR結果示出了對mAb2-wt、mAb2-R292C/V302C的可比較的親和力。mAb2-DE和mAb2-DE-R292C/V302C示出了比WT或WT變體高22-39倍的與huFcgRIIIa-V158的結合親和力，並且對彼此具有可比較的親和力。

【0367】 表14：在pH 6.0下與FcRn的結合親和力

mAb2(IgG1)	WT對照	WT R292C_V302C	_DE	_DE R292C_V302C
測定				
與huFcRn的結合(SPR)KD(nM)	103.23 ± 530.64	111.58 ± 551.15	83.83 ± 506.15	50.61 ± 509.15
與cyFcRn的結合(SPR)KD(nM)	313.41 ± 35.52	324.54 ± 120.97	349.73 ± 70.81	325.91 ± 39.44
與moFcRn的結合(SPR)KD(nM)	146.64 ± 21.77	147.51 ± 59.87	142.08 ± 40.41	142.09 ± 21.06

【0368】 結果表明，在mAb2-wt上或在mAb2-DE上添加R292_V302C突變對與人類、食蟹猴或小鼠FcRn的結合親和力沒有顯著影響。所有分子與每個物種的親和力係相當的。

【0369】 表15：在pH 7.4下對FcRn的穩態結合反應

mAb2(IgG1)	WT對照	WT R292C_V302C	_DE	_DE R292C_V302C
批次				
與huFcRn的結合(SPR)穩態反應(RU)	0.06 ± 0.83	-0.03 ± 0.95	0.28 ± 0.18	0.08 ± 1.06
與cyFcRn的結合(SPR)穩態反應(RU)	0.32 ± 0.68	0.20 ± 0.77	0.36 ± 0.74	0.20 ± 0.83
與moFcRn的結合(SPR)穩態反應(RU)	0.87 ± 0.95	0.66 ± 1.14	0.54 ± 0.91	0.58 ± 0.19

【0370】 結果表明，在測試的條件下，在中性pH下，沒有mAb2分子與人類、食蟹猴或小鼠FcRn結合。

【0371】 實例5：穩定的mAb3變體與人類CD16a的結合參數

【0372】 mAb3和mAb4兩者均具有能夠結合CD16a的Fc結構域。測量與CD16a的結合以證明DSB取代（R292C/V302C）不消除CD16a結合。如**表16**所示，與單獨的DE或ADE變體相比，所有DSB變體都具有相等或更大的與兩種CD16a變體（V158或F158）的結合。

【0373】 **表16：mAb3和mAb4與人類CD16a的結合參數**

抗體	與huCD16a(V158)的結合KD [nM]	與 huCD16a(F158) 的結合KD [nM]
mAb3 WT	705 ± 214	1265 ± 287
mAb3-DE	66 ± 25	67.2 ± 11
mAb3-ADE	113 ± 40	87.5 ± 6
mAb3-DE-DSB (R292C/V302C)	110	113
mAb3-ADE-DSB (R292C/V302C)	165	121
mAb4	618 ± 59	1376 ± 456
mAb4-DE	87 ± 48	63.5
mAb4-ADE	116 ± 37	86.9
mAb4-DE-DSB (R292C/V302C)	87	80.4 ± 9
mAb4-ADE-DSB (R292C/V302C)	155	114

【0374】 **實例6：二硫鍵穩定的變體的體外表徵**

【0375】 **mAb1**

【0376】 A - 評估變體在體外誘導補體依賴性細胞毒性（CDC）的能力。

【0377】 材料和方法：

【0378】 使用表現靶標的DND41細胞系（T-ALL，T細胞急性成淋巴細胞性白血病細胞，Leukemia 8:425-434(1994)）評價mAb1的CDC能力。將細胞以3.106懸浮於RHBP培養基（不含酚紅的RPMI 1640，0.1% BSA，2 mM HEPES，2 mM麩醯胺酸）中。

【0379】 將細胞以1.5 x 10^5個細胞/孔鋪板在96孔板中，並且在4ºC下與25 µl的抗體變體一起預培育30分鐘，所述抗體變體具有從167.5 nM開始至0.08 nM的連續稀釋濃度，稀釋因子為2。

【0380】 在第二步驟中，每孔添加25 µL的人類補體（Sigma，Ref：S1764-1mL，重懸於1 mL H2O + 4 mL RHBP中），並且將板在37ºC與5.5%的CO_2下培育2小時。添加WST-1溶液（Roche，Ref 11 644 807 001；10 µL/孔），並且將板在37ºC與5.5% CO_2下再次培育2小時。

【0381】 根據製造商的方案，在SpectraMax Plus分光光度計（Molecular Devices）上在440 nm處測量吸光度。每個點三重複進行。

【0382】 如下計算活力%：

活力% = ((OD_樣品-OD培養基) x 100) / (OD_不含抗體的細胞-OD培養基)。

OD：光密度

【0383】 資料是三個獨立實驗的總結。

【0384】 報告的結果是IC50值的幾何平均值、CV和死亡率的δ（**表17至表19**），以及ADE形式、ADLE形式和DE形式的CDC活性的代表性例子（**圖11、圖12和圖13**）。使用Biost@t-SPEED v2.4計算值。

【0385】 結果：

【0386】 **表17：mAb1 +/- ADLE、DE或ADE +/- DSB（L242C_K334C或R292C_V302C）的CDC活性IC50值**

可變區	mAb1									
IgG1	iso ADLE	ADLE L242C_K334C	ADLE R292C_V302C	iso DE	DE R292C_V302C	DE L242C_K334C	iso ADE	ADE R292C_V302C	ADE L242C_K334C	WT 對照
批次	VA2-20-034.2	VA2-21-267-1	VA2-21-268-1	VA2-20-1117-1	VA2-21-270-1	VA2-21-269-1	VA2-19-943-1	VA2-21-260-1	VA2-21-259-2	VA2-20-950-1
IC50 (nM)	NA	NA	NA	3,03	1,89	3,11	3,49	3,33	4,13	2,10
IC50 [95%CI]	NA	NA	NA	[2,63 ; 3,49]	[1,75 ; 2,04]	[2,56 ; 3,77]	[3,12 ; 3,92]	[3,06 ; 3,61]	[3,62 ; 4,71]	[1,88 ; 2,34]
IC50 CV %	NA	NA	NA	6,59	3,66	8,94	5,43	4,07	6,25	5,08
δ(頂部-底部)%	NA	NA	NA	79,56	88,63	72,93	68,29	70,16	59,99	87,19

NA：未獲得擬合

【0387】使用ADLE形式和包含ADLE形式的所有另外的突變沒有檢測到CDC活性，**表17**和**圖11**。而CDC活性是用DE或ADE形式測量的，並且不會隨著在DE或ADE形式中引入的另外的二硫鍵突變而改變。

【0388】表18：mAb1 +/- ADLE、DE或ADE -/+ DQ +/- R292C_V302C的CDC活性IC50值

可變區	mAb1									
IgG1	iso ADLE	ADLE	ADLE	iso DE	DE	DE	iso ADE	ADE	ADE	WT 對照
		DQ	DQ_R292C_V302C		DQ	DQ_R292C_V302C		DQ	DQ_R292C_V302C	
批次	VA2-20-034.2	VA2-20-952-1	VA2-20-953-1	VA2-20-1117-1	VA2-20-955-1*	VA2-20-956-1**	VA2-19-943-1	VA2-21-266-1	VA2-21-262-1	VA2-20-950-1
IC50 (nM)	NA	NA	NA	3,12	2,84	3,87	3,17	NA	NA	2,01
IC50 [95%CI]	NA	NA	NA	[2,72 ; 3,58]	[2,31 ; 3,49]	[2,93 ; 5,12]	[2,82 ; 3,57]	NA	NA	[1,78 ; 2,27]
IC50 CV %	NA	NA	NA	6,38	10,17	13,56	5,58	NA	NA	5,85
δ(頂部-底部)%	NA	NA	NA	87,47	87,60	44,51	80,22	NA	NA	88,32

*僅在3個測定中的1個中獲得擬合

**在3個測定中的2個中獲得擬合

【0389】使用ADLE形式以及使用另外的DQ和R292C_V302C二硫鍵突變未檢測到CDC活性。而CDC活性是用DE形式和ADE形式測量的。當在DE形式中引入另外的DQ和R292C_V302C二硫鍵突變時，活性降低。當在ADE形式中引入另外的DQ和R292C_V302C二硫鍵突變時，CDC活性喪失（**表18**和**圖12**）。

【0390】表19：mAb1 + ADLE、DE或ADE -/+ DQ +/- L242C_K334C的CDC活性IC50值

可變區	mAb1									
IgG1	iso ADLE	ADLE	ADLE	iso DE	DE	DE	iso ADE	ADE	ADE	WT 對照
		DQ	DQ_L242C_K334C		DQ	DQ_L242C_K334C		DQ	DQ_L242C_K334C	

批次	VA2-20-034.2	VA2-20-952-1	VA2-20-954-1	VA2-20-1117-1	VA2-20-955-1*	VA2-20-957-1*	VA2-19-943-1 **	VA2-21-266-1	VA2-21-261-1	VA2-20-950-1
IC50 (nM)	NA	NA	NA	2,65	5,62	5,25	2,46	NA	NA	2,44
IC50 [95%CI]	NA	NA	NA	[2,34 ; 3,01]	[3,18 ; 9,95]	[3,12 ; 8,85]	[2,19 ; 2,76]	NA	NA	[2,14 ; 2,79]
IC50 CV %	NA	NA	NA	5,98	28,57	26,06	5,18	NA	NA	6,46
δ(頂部-底部)%	NA	NA	NA	89,47	29,77	25,36	82,94	NA	NA	76,02

【0391】使用ADLE形式以及使用另外的DQ和L242C_K334C二硫鍵突變未檢測到CDC活性。而CDC活性是用DE形式和ADE形式測量的。當在DE形式中引入另外的DQ和L242C_K334C二硫鍵突變時，活性降低。當在ADE形式中引入另外的DQ和L242C_K334C二硫鍵突變時，CDC活性喪失（**表19**和**圖13**）。

【0392】B - 評估變體在體外誘導抗體依賴性細胞毒性（ADCC）的能力。

【0393】材料和方法：

【0394】使用表現由mAb1識別的抗原的LP1細胞系（MM，人多發性骨髓瘤細胞，Blood. 1989年3月; 73(4):1020-7）作為靶細胞以及自然殺傷細胞系NK92 FCGR3A 158V（Conkwest）作為效應細胞來評價ADCC能力。

【0395】將靶細胞用鈣黃綠素-乙醯氧基甲基（2 mM；Invitrogen，Ref C3100MP）標記，並且以2 x10^5重懸於測定培養基（不含酚紅的RPMI 1640，1% SVF，0.77 mg/mL丙磺舒，Invitrogen，P36400）中。

【0396】將靶細胞（T）以2 x 10^4個細胞/孔接種在96孔板中，並且在37ºC與5%的CO_2下和50 µl的抗體變體一起預培育30分鐘，所述抗體變體具有連續稀釋濃度，對於IgG1野生型從2.3 nM開始，稀釋因子為3，並且對於ADLE、ADE和DE變體從1.25nM開始，稀釋因子為7。

【0397】 作為最大鈣黃綠素釋放水準的陽性對照，將靶細胞與0.5% Triton一起培育。

【0398】 將效應細胞（E）以6 x 10^5重懸於測定培養基中，並且將100 µL或6 x 10^4個效應細胞添加到每孔的靶細胞（1 : 3的T : E比率）。在5% CO_2下在37ºC下培育3小時後，將100 µl的培養上清液轉移到黑色96孔板中，並且在492 nm激發和515 nm發射下在EnVision 2104板讀取器（PerkinElmer）上藉由螢光測量鈣黃綠素的釋放。每個點三重複進行。

【0399】 如下計算細胞毒性%：

細胞毒性% = ((RLU_樣品 - RLU 培養基) x100)/ (RLU_陽性對照Triton-RLU 培養基)。

RLU：相對光單位

【0400】 資料是至少三個獨立實驗的總結。對於每個變體和每個實驗，計算IC50值和死亡率百分比的δ。報告的結果是IC50值的幾何平均值、CV和死亡率的δ（**表20**），以及ADLE形式、ADE形式和DE形式的ADCC活性的代表性例子（**圖14-圖16**）。使用Biost@t-SPEED v2.4計算值。

【0401】 結果：

【0402】 表20：mAb1 +/- ADLE、DE或ADE +/- DSB（L242C_K334C或R292C_V302C）的ADCC活性IC50值

可變區	mAb1									
IgG1	iso ADLE	ADLE L242C_K334C	ADLE R292C_V302C	iso DE	DE R292C_V302C	DE L242C_K334C	iso ADE	ADE R292C_V302C	ADE L242C_K334C	WT 對照
批次	VA2-20-034.2	VA2-21-267-1	VA2-21-268-1	VA2-20-1117-1	VA2-21-270-1	VA2-21-269-1	VA2-19-943-1	VA2-21-260-1	VA2-21-259-2	VA2-20-950-1
IC50	2,51E-	4,08E-0	4,86E-0	4,51E-0	3,56E-0	4,01E-0	1,67E-	5,41E-0	5,45E-0	1,76E-

(nM)	04	4	4	4	4	4	04	4	4	02
IC50 [95%CI]	[1,65E-04; 3,84E-04]	[2,66E-04; 6,27E-04]	[2,92E-04; 8,07E-04]	[2,59E-04; 7,86E-04]	[2,41E-04; 5,27E-04]	[2,65E-04; 6,07E-04]	[1,09E-04; 2,56E-04]	[2,77E-04; 1,06E-03]	[3,51E-04; 8,48E-04]	[1,19E-02; 2,60E-002]
IC50 CV %	20,91	19,91	24,01	25,10	19,01	19,61	20,58	30,43	21,72	19,16
δ(頂部-底部)%	48,18	43,52	47,05	53,71	45,51	48,73	44,70	45,26	47,63	51,23

NA：未獲得擬合。

【0403】 當在ADLE形式中引入DSB突變L242C_K334C或R292C_V302C時，用這種形式測量的ADCC活性維持在相同範圍內。類似地，當在DE和ADE形式中引入這些DSB突變時，保持用這些形式測量的ADCC活性（**表20**和**圖14**）。

【0404】 表21：mAb1 +/- ADLE、DE或ADE -/+ DQ +/- R292C_V302C的ADCC活性IC50值

可變區	mAb1									
IgG1	iso ADLE	ADLE DQ	ADLE R292C_V302C	iso DE	DE DQ	DE R292C_V302C	iso ADE	ADE DQ	ADE R292C_V302C	WT對照
批次	VA2-20-034.2	VA2-20-952-1	VA2-20-953-1	VA2-20-1117-1	VA2-20-955-1	VA2-20-956-1	VA2-19-943-1	VA2-21-266-1	VA2-21-262-1	VA2-20-950-1
IC50 (nM)	8,11E-05	1,03E-04	1,71E-04	1,08E-04	9,01E-05	1,16E-04	1,13E-04	1,44E-04	2,97E-04	1,60E-02
IC50 [95% CI]	[4,83-05; 1,36E-04]	[6,58E-05 ; 1,63E-04]	[1,06E-04 ; 2,75E-04]	[6,54E-05 ; 1,79E-04]	[6,52E-05 ; 1,25E-04]	[7,21E-05 ; 1,86E-04]	[8,21E-05; 1,54E-04]	[9,12E-05 ; 2,28E-04]	[2,11E-04 ; 4,17E-04]	[9,58E-03 ; 2,67E-02]
IC50 CV %	25,05	21,98	23,54	24,30	15,94	23,37	15,54	19,86	16,74	24,61
δ(頂部-底部)%	46,26	43,43	42,02	43,22	45,12	41,80	42,15	42,10	39,71	46,07

【0405】 當在ADLE形式中引入具有或不具有R292C_V302C的另外的DQ突變時，用這種形式測量的ADCC活性維持在相同範圍內。類似地，當在DE和ADE形式中引入具有或不具有R292C_V302C的另外的DQ突變時，維持用這些形式測量的ADCC活性（**表21**和**圖15**）。

【0406】 **表22：mAb1 +/- ADLE、DE或ADE -/+ DQ +/- DSB L242C_K334C的ADCC活性IC50值**

可變區	mAb1									
IgG1	iso ADLE	ADLE DQ	ADLE L242C_K334C	iso DE	DE DQ	DE L242C_K334C	iso ADE	ADE DQ	ADE L242C_K334C	WT 對照
批次	VA2-20-034.2	VA2-20-952-1	VA2-20-954-1	VA2-20-1117-1	VA2-20-955-1	VA2-20-957-1	VA2-19-943-1	VA2-21-266-1	VA2-21-261-1	VA2-20-950-1
IC50 (nM)	8,11E-05	1,03E-04	1,54E-04	1,08E-04	9,01E-05	1,54E-04	1,13E-04	1,44E-04	1,62E-04	1,60E-02
IC50 [95% CI]	[4,83-05; 1,36E-04]	[6,58E-05 ; 1,63E-04]	[1,00E-04 ; 2,37E-04]	[6,54E-05 ; 1,79E-04]	[6,52E-05 ; 1,25E-04]	[1,08E-04 ; 2,20E-04]	[8,21E-05; 1,54E-04]	[9,12E-05 ; 2,28E-04]	[1,07E-04 ; 2,46E-04]	[9,58E-03 ; 2,67E-02]
IC50 CV %	25,05	21,98	20,60	24,30	15,94	17,45	15,54	19,86	19,53	24,61
δ(頂部-底部)%	46,26	43,43	46,62	43,22	45,12	44,93	42,15	42,10	39,20	46,07

【0407】 當在ADLE形式中引入具有或不具有L242C_K334C的另外的DQ突變時，用這種形式測量的ADCC活性維持在相同範圍內。類似地，當在DE和ADE形式中引入具有或不具有L242C_K334C的另外的DQ突變時，維持用這些形式測量的ADCC活性（**表22**和**圖16**）。

【0408】 **mAb3**

【0409】 為了證明具有DSB取代與ADE或DE取代組合的抗體的效力沒有喪失，用mAb3進行細胞毒性測定。

【0410】 如**圖17**所示，在ADE或DE背景中，包括DSB取代（R292C_V302C）沒有影響mAb3的活性。

【0411】 **實例7：二硫鍵穩定的變體的PK分析**

【0412】 此實例描述了DSB穩定的變體對PK曲線的影響

【0413】 **mAb1**

【0414】材料和方法：

【0415】小鼠實驗是在源自C57BL/6小鼠並且購自傑克遜實驗室（巴爾港，緬因州）的純合轉基因Tg32（B6.Cg-Fcgrttm1Dcr Tg(FCGRT)32Dcr/DcrJ）小鼠中進行的。FcRn-/- hFcRn（32系）Tg小鼠攜帶小鼠基因的無效突變和在其天然人啟動子控制下表現hFcRn α鏈轉基因的轉基因。

【0416】在研究開始時，所有小鼠均為8週齡與12週齡之間的首次進行治療的雌性。對於給藥，將抗體在DPBS 1X配製緩衝液中製備，並且以1 mg/kg的單次靜脈內劑量以10 mL/kg的劑量體積投予至尾靜脈中。在28天的研究持續時間內，對於每種抗體使用連續採樣方法（0.08、4、24、72、168、240、336、504和672小時）評價總共3隻動物重複。按採樣時間收集血液樣品（約20 µL）。將血液樣品在4ºC下以1500 g離心10分鐘，並且將6 µL的血漿樣品在60 µL的DPBS 1X中稀釋，然後在-80ºC下儲存直至分析。

【0417】對於mAb1 WT抗體，使用以下通用方法藉由自底向上LC-MS/MS測定來確定每個時間點的每種抗體的濃度。在血漿等分試樣沈澱後，使血漿沈澱物經歷蛋白質變性、還原、烷基化、胰蛋白酶消化和固相提取，然後分析替代肽。根據其選擇性和反應因子，為每種抗體選擇對應於屬於mAb1輕鏈的17個胺基酸殘基序列的替代肽用於定量。藉由將抗體以1、2、5、10、20、50、100、200和400 µg/mL摻入血漿中來製備校準標準物。在Waters Acquity UPLC系統上採用反相XBridge BEH C18柱（2.1x150 mm，3.5 µM，300Å，Waters）以300 µL/min流速以在水中的0.1%甲酸和在乙腈中的0.1%甲酸的分級式梯度進行肽分離。對於檢測，以陽離子模式使用Sciex API6500+質譜儀，其中源溫度為700ºC，離子噴霧電壓為5500 V，氣簾氣和霧化氣體為40並且碰撞氣在中間。駐留時間為30

ms，並且每次轉化的入口電位為10 V。去簇電壓為90 V，並且碰撞能量為26 V。使用來自Analyst軟體的MQIII積分演算法的峰面積，相對於標準物和對照，將抗體的獨特替代肽的多重反應監測轉化（626.0 à 807.4 m/z）用於濃度確定。

【0418】 對於mAb1變體（ADE、DE、ADLE、DE-DQ和ADLE-DQ變體），使用Gyrolab平臺（Gyros）藉由通用免疫測定方法確定每個時間點的每種抗體的濃度，其呈分級三明治形式。將樣品（標準物、質量對照和研究樣品）在緩衝液中稀釋100倍，並且分配到96孔微量滴定板中。將捕獲和檢測試劑分配到第二個96孔微量滴定板中。然後將96孔微量滴定板和bioaffy CD（CD200 - 含有112個微結構化區段）裝載到Gyrolab平臺上。以下步驟由Gyrolab平臺自動觸發：在Gyrolab Bioaffy圓盤（CD200）內的鏈黴親和素珠柱上添加生物素化的驢抗hu-IgG（捕獲），然後分配標準物、質量對照和研究樣品，然後添加AlexaFluor-山羊抗hu-IgG（檢測）。使用設置在1%的光電倍增管在每個微結構化區段中進行柱上螢光測量（λ激發633 nm，λ發射650 nm）。所有分析二重複進行，並且定量範圍為100至200 000 ng/mL。

【0419】 PK參數由單個動物資料確定，使用Phoenix WinNonlin 8.1版（Certara L.P.）中的非隔室分析。

【0420】 從PK計算中排除了來自一隻投予mAb1-ADLE_DQ_L242C_K334C的動物的PK曲線，所述曲線示出了濃度急劇下降（ADA干擾特有的）。由於給藥問題，一隻投予mAb1-DE_DQ_R292C_V302C的動物也被排除在PK分析之外。

【0421】 結果：

【0422】 **表23：Tg32小鼠中測試的不同抗體的PK參數的總結（平均值（CV%））**

mAb1化合物	C0	AUC	CL	Vss	t1/2z
	(μg/mL)	(天*μg/mL)	(mL/天/kg)	(mL/kg)	(天)
ADLE-DQ	22.9	42.6	23.5	97.3	3
ADLE-DQ-L242C/K334C	19.0	219	4.59	119	19
ADLE-DQ-R292C/V302C	18.1	244	4.49	136	23
DE-DQ	15.5	60.3	16.9	180	9
DE-DQ-L242C/K334C	13.5	150	6.89	152	16
DE-DQ-R292C/V302C	14.7	157	6.51	145	16
WT	19.7	127	7.88	163	16

【0423】 用DE_DQ和ADLE_DQ的兩個DSB位置（L242C-K334C和R292C-V302C）觀察到相似的PK曲線和參數。DSB位置改善了DE_DQ和ADLE_DQ突變的構築體的PK特性，其消除半衰期增加3至9倍，並且清除率降低4至10倍。ADLE_DQ_DSB的消除半衰期略長於WT，而DE_DQ_DSB的t1/2z與WT相似（**圖18**）。

【0424】 也生成了沒有DQ取代的mAb1變體的PK曲線。結果描繪於**表24**和**圖19**中。

【0425】 不論突變如何（ADE、DE或ADLE），使用兩個DSB位置（L242C-K334C和R292C-V302C）觀察到相似的PK曲線和參數。與DE和ADLE突變的構築體相比，DSB位置明顯改善了DE和ADLE突變的構築體的PK特性，其消除半衰期增加2.5-3倍，並且清除率降低了2.5-3倍。對於ADE突變的構築體，藉由添加DSB對PK特性的改善不太明顯。然而，具有DSB的所有突變的構築體的PK參數與WT構築體相似，DSB在體內穩定突變的構築體。

【0426】 **表24：Tg32小鼠中測試的不同抗體的PK參數的總結（平均值（CV%））**

mAb1化合物	C0	AUC	CL	Vss	t1/2z

	(μg/mL)	(天*μg/mL)	(mL/天/kg)	(mL/kg)	(天)
ADE	20.9	98.8	10.5	135	10
ADE_L242C_K334C	17.5	125	8.86	180	15
ADE_R292C_V302C	14.3	129	7.82	156	14
ADLE	17.9	51.9	19.3	137	6
ADLE_L242C_K334C	14.2	127	7.89	157	14
ADLE_R292C_V302C	18.1	186	5.39	114	15
DE	16.7	53.5	18.7	132	6
DE_L242C_K334C	13.2	108	9.29	243	19
DE_R292C_V302C	14.2	95.9	10.5	188	13
WT	19.7	127	7.88	163	16

【0427】 **mAb3**

【0428】 材料和方法：

【0429】 對於mAb3 ADE和ADE-DSB（R292C/V302C）變體，使用以下通用方法藉由自底向上的LC-MS/MS測定來確定每個時間點的濃度：血漿等分試樣沈澱後，使血漿沈澱物經歷蛋白質變性、還原、烷基化、胰蛋白酶消化和固相萃取，然後分析替代肽。根據其選擇性和反應因子，為每種抗體選擇對應于屬於Fab區（輕鏈）的替代肽VYACEVTHQGLSSPVTK（SEQ ID NO: 20）用於定量。藉由將抗體以1、2.8、7、14、40、80和100 μg/mL摻入血漿中來製備校準標準物。在Shimadzu UHPLC系統上採用反相XBridge BEH C18柱（2.1x150 mm，3.5 μM，300Å，Waters）以600 μL/min流速以在水中的0.1%甲酸和在乙腈中的0.1%甲酸的分級式梯度進行肽分離。對於檢測，以陽性產物離子模式使用Sciex API6600 TripleTOF質譜儀，其中源溫度為500ºC，離子噴霧電壓為5500 V，氣簾氣為35並且霧化氣體為50。每個實驗的駐留時間為15 ms。去簇電壓為90 V，並且碰撞能量為26 V。使用來自MultiQuant軟體的MQ4積分演算法的峰面積，相對於標準物和對照，將抗體的獨特替代肽的626.0 m/z親本離子的807.4098 m/z片段用於濃度確定。

【0430】 對於mAb3 WT抗體，使用Gyrolab平臺（Gyros）藉由通用免疫測定方法來確定每個時間點的濃度，其呈分級三明治形式。將樣品（標準物、質量對照和研究樣品）在緩衝液中稀釋100倍，並且分配到96孔微量滴定板中。將捕獲和檢測試劑分配到第二個96孔微量滴定板中。然後將96孔微量滴定板和bioaffy CD（CD200 - 含有112個微結構化區段）裝載到Gyrolab平臺上。以下步驟由Gyrolab平臺自動觸發：在Gyrolab Bioaffy圓盤（CD200）內的鏈黴親和素珠柱上添加生物素化的驢抗hu-IgG（捕獲），然後分配標準物、質量對照和研究樣品，然後添加AlexaFluor-山羊抗hu-IgG（檢測）。使用設置在1%的光電倍增管在每個微結構化區段中進行柱上螢光測量（λ激發633 nm，λ發射650 nm）。所有分析二重複進行，並且定量範圍為100至200 000 ng/mL。

【0431】 使用mAb3進行了類似的PK研究。如**表25**和**圖20**所示，與mAb3 WT相比，mAb3上的ADE突變導致更高的CL和更短的消除半衰期。在mAb3-ADE構築體上添加DSB（R292C/V302C）明顯改善了化合物的PK特性。mAb3 WT和mAb3-ADE-DSB構築體展現出相似的清除率和消除半衰期。

【0432】 表25：Tg32小鼠中測試的不同mAb3抗體的PK參數的總結（平均值（CV%））

抗體	C0 (ug/mL)	AUC (天*ug/mL)	CL (mL/天/kg)	Vss (mL/kg)	t1/2z (天)
mAb3	66.8	491	5.15	99.9	14.1
mAb3-ADE	72.0 (18)	181 (15)	14.0 (17)	85.3 (18)	4.8
mAb3-ADE-DSB(R292C/V302C)	59.0 (4)	392 (8)	6.41 (9)	121 (8)	13.7

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種分離的效應子勝任多肽，其包含：

含有第一重鏈和第二重鏈的糖基化Fc結構域，其中至少一條重鏈包含由一對半胱胺酸（C）介導的工程化的鏈內二硫鍵，所述半胱胺酸取代：

(i) 胺基酸位置242處的白胺酸（L）和胺基酸位置334處的離胺酸（K）；

或

(iii) 胺基酸位置292處的精胺酸（R）和胺基酸位置302處的纈胺酸（V）；

其中所述胺基酸位置根據EU編號；

其中所述糖基化Fc結構域能夠與抗體效應子分子相互作用；並且

其中與具有不包含所述工程化的鏈內二硫鍵的能夠與抗體效應子分子相互作用的糖基化Fc結構域的效應子勝任多肽相比，所述效應子勝任多肽具有增強的熱穩定性。

【請求項2】 如請求項1所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述糖基化Fc結構域包含根據EU編號胺基酸位置297處的天然聚糖。

【請求項3】 如請求項1所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述糖基化Fc結構域包含工程化或非天然聚糖。

【請求項4】 如請求項3所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述工程化或非天然聚糖是可以與治療性分子接合的經修飾的聚糖。

【請求項5】 如請求項1所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述分離的效應子勝任多肽是N-糖基化的。

【請求項6】 如請求項1-4中任一項所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述第一重鏈包含所述半胱胺酸對。

【請求項7】 如請求項1-4中任一項所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述第一重鏈和所述第二重鏈各自包含所述半胱胺酸對。

【請求項8】 如請求項1-7中任一項所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述Fc結構域是IgG1 Fc結構域。

【請求項9】 如請求項8所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述IgG1 Fc結構域是人類IgG1 Fc結構域。

【請求項10】 如請求項1-9中任一項所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述抗體效應子分子是FcRn。

【請求項11】 如請求項10所述的分離的效應子勝任多肽，其中與野生型Fc結構域相比，所述分離的效應子勝任多肽具有增強的與所述FcRn的結合親和力。

【請求項12】 如請求項1-9中任一項所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述抗體效應子分子是FcγRIIIa。

【請求項13】 如請求項12所述的分離的效應子勝任多肽，其中與包含野生型Fc結構域的多肽相比，所述分離的效應子勝任多肽具有增強的與FcγRIIIa的結合親和力。

【請求項14】 如請求項1-13中任一項所述的分離的效應子勝任多肽，其中與野生型Fc結構域相比，所述分離的效應子勝任多肽具有改變的血清半衰期。

【請求項15】 如請求項14所述的分離的效應子勝任多肽，其中與野生型Fc結構域相比，所述分離的效應子勝任多肽具有增強的血清半衰期。

【請求項16】 如請求項1-15中任一項所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述Fc結構域進一步包含根據EU編號胺基酸位置332處的取代。

【請求項17】 如請求項16所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述胺基酸位置332處的取代是麩胺酸（E）。

【請求項18】 如請求項16或17所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述Fc結構域進一步包含根據EU編號胺基酸位置236、239或330處的一個或多個取代。

【請求項19】 如請求項18所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述胺基酸位置236處的取代是丙胺酸（A）。

【請求項20】 如請求項18所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述胺基酸位置239處的取代是天門冬胺酸（D）。

【請求項21】 如請求項18所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述胺基酸位置330處的取代是白胺酸（L）。

【請求項22】 如請求項1-21中任一項所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述Fc結構域進一步包含根據EU編號胺基酸位置239處的天門冬胺酸（D）和胺基酸位置332處的麩胺酸（E）。

【請求項23】 如請求項1-21中任一項所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述Fc結構域進一步包含根據EU編號胺基酸位置236處的丙胺酸（A）、胺基酸位置239處的天門冬胺酸（D）和胺基酸位置332處的麩胺酸（E）。

【請求項24】 如請求項1-21中任一項所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述Fc結構域進一步包含根據EU編號胺基酸位置236處的丙胺酸（A）、胺基酸位置239處的天門冬胺酸（D）、胺基酸位置330處的白胺酸（L）和胺基酸位置332處的麩胺酸（E）。

【請求項25】 如請求項1-24中任一項所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述Fc結構域進一步包含根據EU編號胺基酸位置256和/或307處的取代。

【請求項26】 如請求項25所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述胺基酸位置256處的取代是天門冬胺酸（D）。

【請求項27】 如請求項25所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述胺基酸位置307處的取代是麩醯胺酸（Q）。

【請求項28】 如請求項1-27中任一項所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述Fc結構域進一步包含根據EU編號胺基酸位置256處的天門冬胺酸（D）和胺基酸位置307處的麩醯胺酸（Q）。

【請求項29】 如請求項1-21中任一項所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述Fc結構域進一步包含根據EU編號胺基酸位置239處的天門冬胺酸（D）、胺基酸位置332處的麩胺酸（E）、胺基酸位置256處的天門冬胺酸（D）和胺基酸位置307處的麩醯胺酸（Q）。

【請求項30】 如請求項1-21中任一項所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述Fc結構域進一步包含根據EU編號胺基酸位置236處的丙胺酸（A）、胺基酸位置239處的天門冬胺酸（D）、和胺基酸位置332處的麩胺酸（E）、胺基酸位置256處的天門冬胺酸（D）和胺基酸位置307處的麩醯胺酸（Q）。

【請求項31】 如請求項1-21中任一項所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述Fc結構域進一步包含根據EU編號胺基酸位置236處的丙胺酸（A）、胺基酸位置239處的天門冬胺酸（D）、胺基酸位置330處的白胺酸（L）、胺基酸位置332處的麩胺酸（E）、胺基酸位置256處的天門冬胺酸（D）和胺基酸位置307處的麩醯胺酸（Q）。

【請求項32】 一種分離的效應子勝任多肽，其包含：

含有第一重鏈和第二重鏈的糖基化Fc結構域，其中至少一條重鏈包含由一對半胱胺酸（C）介導的工程化的鏈內二硫鍵，所述半胱胺酸取代：

(i) 胺基酸位置242處的白胺酸（L）和胺基酸位置334處的離胺酸（K）；

或

(iii) 胺基酸位置292處的精胺酸（R）和胺基酸位置302處的纈胺酸（V）；

其中所述糖基化Fc結構域能夠與抗體效應子分子相互作用並且包含胺基酸位置332處的麩胺酸（E）；

其中與具有不包含所述工程化的鏈內二硫鍵的能夠與抗體效應子分子相互作用並且包含胺基酸位置332處的麩胺酸（E）的糖基化Fc結構域的效應子勝任多肽相比，所述效應子勝任多肽具有增強的熱穩定性；並且

其中所述胺基酸位置根據EU編號。

【請求項33】 如請求項32所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述糖基化Fc結構域包含根據EU編號胺基酸位置297處的天然聚糖。

【請求項34】 如請求項32或33所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述糖基化Fc結構域包含工程化或非天然聚糖。

【請求項35】 如請求項34所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述工程化或非天然聚糖是可以與治療性分子接合的經修飾的聚糖。

【請求項36】 如請求項32所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述分離的效應子勝任多肽是N-糖基化的。

【請求項37】 如請求項32-36中任一項所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述第一重鏈包含所述半胱胺酸對。

【請求項38】 如請求項32-36中任一項所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述第一重鏈和所述第二重鏈各自包含所述半胱胺酸對。

【請求項39】 如請求項32-38中任一項所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述經修飾的Fc結構域是經修飾的人類Fc結構域。

【請求項40】 如請求項39所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述經修飾的Fc結構域是經修飾的人類IgG1 Fc結構域。

【請求項41】 如請求項32-40中任一項所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述抗體效應子分子是FcRn。

【請求項42】 如請求項41所述的分離的效應子勝任多肽，其中與野生型Fc結構域相比，所述分離的效應子勝任多肽具有與所述FcRn的增強的結合親和力。

【請求項43】 如請求項32-40中任一項所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述抗體效應子分子是FcγRIIIa。

【請求項44】 如請求項43所述的分離的效應子勝任多肽，其中與包含野生型Fc結構域的多肽相比，所述分離的效應子勝任多肽具有與FcγRIIIa的增強的結合親和力。

【請求項45】 如請求項32-44中任一項所述的分離的效應子勝任多肽，其中與野生型Fc結構域相比，所述分離的效應子勝任多肽具有改變的血清半衰期。

【請求項46】 如請求項45所述的分離的效應子勝任多肽，其中與野生型Fc結構域相比，所述分離的效應子勝任多肽具有增強的血清半衰期。

【請求項47】 如請求項32-46中任一項所述的分離的效應子勝任多肽，所述分離的效應子勝任多肽進一步包含：

(i) 胺基酸位置239處的天門冬胺酸（D）；

(ii) 胺基酸位置236處的丙胺酸（A）；

(iii) 胺基酸位置330處的白胺酸（L）；

(iv) 胺基酸位置256處的天門冬胺酸（D）；和/或

(v) 胺基酸位置307處的麩醯胺酸（Q）。

【請求項48】 如請求項47所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述Fc結構域進一步包含根據EU編號胺基酸位置239處的天門冬胺酸（D）和胺基酸位置332處的麩胺酸（E）。

【請求項49】 如請求項47所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述Fc結構域進一步包含根據EU編號胺基酸位置236處的丙胺酸（A）、胺基酸位置239處的天門冬胺酸（D）和胺基酸位置332處的麩胺酸（E）。

【請求項50】 如請求項47中任一項所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述Fc結構域進一步包含根據EU編號胺基酸位置236處的丙胺酸（A）、胺基酸位置239處的天門冬胺酸（D）、胺基酸位置330處的白胺酸（L）和胺基酸位置332處的麩胺酸（E）。

【請求項51】 如請求項47-50中任一項所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述Fc結構域進一步包含根據EU編號胺基酸位置256處的天門冬胺酸（D）和胺基酸位置307處的麩醯胺酸（Q）。

【請求項52】 如請求項47-51中任一項所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述一個或多個取代與所述工程化二硫鍵位於相同重鏈上。

【請求項53】 如請求項47-51中任一項所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述一個或多個取代與所述工程化二硫鍵位於不同重鏈上。

【請求項54】 如請求項32-53中任一項所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述分離的效應子勝任多肽進一步包含結合結構域。

【請求項55】 如請求項54所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述結合結構域包含一個或多個抗原結合結構域。

【請求項56】 如請求項55所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述一個或多個抗原結合結構域與腫瘤抗原特異性結合。

【請求項57】 如請求項55所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述一個或多個抗原結合結構域與免疫細胞上的抗原特異性結合。

【請求項58】 如請求項32-57中任一項所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述多肽是抗體。

【請求項59】 如請求項58所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述多肽是單株抗體。

【請求項60】 如請求項58或59所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述抗體是嵌合抗體、人源化抗體或人類抗體。

【請求項61】 如請求項58-60中任一項所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述抗體是全長抗體。

【請求項62】 如請求項32-57中任一項所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述多肽是單結構域抗體。

【請求項63】 如請求項62所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述單結構域抗體是VHH抗體。

【請求項64】 如請求項32-57中任一項所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述抗體是多特異性抗體。

【請求項65】 如請求項64所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述多特異性抗體具有選自以下的形式：DVD-Ig、基於CODV的形式即CODV-Ig、CrossMab、CrossMab-Fab或Tandem Fab。

【請求項66】 如請求項64或65所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述多特異性抗體是T細胞接合體。

【請求項67】 如請求項64或65所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述多特異性抗體是NK細胞接合體。

【請求項68】 如請求項54所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述結合多肽包含治療性多肽。

【請求項69】 如請求項68所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述治療性多肽可以是受體、配體或酶。

【請求項70】 如請求項54-59中任一項所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述結合多肽與所述Fc結構域的N末端和/或C末端連接。

【請求項71】 如請求項32-70中任一項所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述分離的效應子勝任多肽能夠藉由抗體依賴性細胞毒性（ADCC）和/或補體依賴性細胞毒性（CDC）耗盡靶細胞。

【請求項72】 如請求項71所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述靶細胞是癌細胞。

【請求項73】 如請求項71所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述靶細胞是免疫細胞。

【請求項74】 如請求項32-57中任一項所述的分離的效應子勝任多肽，其中所述多肽是Fc融合多肽。

【請求項75】 一種分離的核酸分子，其包含編碼如請求項1-74中任一項所述的分離的效應子勝任多肽的核酸。

【請求項76】 一種載體，其包含如請求項75所述的分離的核酸分子。

【請求項77】 如請求項76所述的載體，其中所述載體是表現載體。

【請求項78】 一種宿主細胞，其包含如請求項76或77所述的載體。

【請求項79】 如請求項78所述的宿主細胞，其中所述宿主細胞是真核或原核起源的。

【請求項80】 如請求項78或79所述的宿主細胞，其中所述宿主細胞是哺乳動物起源的。

【請求項81】 如請求項78或79所述的宿主細胞，其中所述宿主細胞是細菌起源的。

【請求項82】 一種醫藥組合物，其包含如請求項1-74中任一項所述的分離的效應子勝任多肽。

【請求項83】 一種增加分離的效應子勝任多肽的產量的方法，其包括表現包含第一重鏈和第二重鏈的糖基化Fc結構域，其中至少一條重鏈包含由一對半胱胺酸（C）介導的工程化的鏈內二硫鍵，所述半胱胺酸取代：

(i) 胺基酸位置242處的白胺酸（L）和胺基酸位置334處的離胺酸（K）；

或

(iii) 胺基酸位置292處的精胺酸（R）和胺基酸位置302處的纈胺酸（V）；

其中所述胺基酸位置根據EU編號；

其中所述糖基化Fc結構域能夠與抗體效應子分子相互作用；並且

其中與具有不包含所述工程化的鏈內二硫鍵的能夠與抗體效應子分子相互作用的糖基化Fc結構域的效應子勝任多肽相比，所述效應子勝任多肽具有增強的熱穩定性；以及

純化所述效應子勝任多肽，其中與包含野生型糖基化Fc結構域的多肽相比，所述多肽的產量增加。

【請求項84】 如請求項83所述的方法，其中所述糖基化Fc結構域包含根據EU編號胺基酸位置297處的天然聚糖。

【請求項85】 如請求項83所述的方法，其中所述糖基化Fc結構域包含工程化或非天然聚糖，即可以與治療性分子接合的任選地經修飾的聚糖。

【請求項86】 如請求項83所述的方法，其中所述分離的效應子勝任多肽是N-糖基化的。

【請求項87】 如請求項83-86中任一項所述的方法，其中所述第一重鏈包含所述半胱胺酸對。

【請求項88】 如請求項83-86中任一項所述的方法，其中所述第一重鏈和所述第二重鏈各自包含所述半胱胺酸對。

【請求項89】 如請求項83-88中任一項所述的方法，其中所述Fc結構域是人類Fc結構域。

【請求項90】 如請求項89所述的方法，其中所述Fc結構域是IgG1 Fc結構域。

【請求項91】 如請求項83-90中任一項所述的方法，其中所述抗體效應子分子是FcRn。

【請求項92】 如請求項91所述的方法，其中與野生型Fc結構域相比，所述分離的效應子勝任多肽具有與所述FcRn的增強的結合親和力。

【請求項93】 如請求項83-90中任一項所述的方法，其中所述抗體效應子分子是FcγRIIIa。

【請求項94】 如請求項93所述的方法，其中與包含野生型Fc結構域的多肽相比，所述分離的效應子勝任多肽具有與FcγRIIIa的增強的結合親和力。

【請求項95】 如請求項83-94中任一項所述的方法，其中與野生型Fc結構域相比，所述分離的效應子勝任多肽具有改變的血清半衰期。

【請求項96】 如請求項95所述的方法，其中與野生型Fc結構域相比，所述分離的效應子勝任多肽具有增強的血清半衰期。

【請求項97】 如請求項83-96中任一項所述的方法，其中所述分離的多肽進一步包含一個或多個增強效應子功能的胺基酸取代，任選地根據EU編號胺基酸位置332處的取代。

【請求項98】 如請求項97所述的方法，其中所述胺基酸位置332處的取代是麩胺酸（E）。

【請求項99】 如請求項98所述的方法，其中所述Fc結構域進一步包含根據EU編號胺基酸位置236、239或330處的一個或多個取代。

【請求項100】 如請求項99所述的方法，其中所述胺基酸位置236處的取代是丙胺酸（A）。

【請求項101】 如請求項99所述的方法，其中所述胺基酸位置239處的取代是天門冬胺酸（D）。

【請求項102】 如請求項99所述的方法，其中所述胺基酸位置330處的取代是白胺酸（L）。

【請求項103】 如請求項83-102中任一項所述的方法，其中所述Fc結構域進一步包含根據EU編號胺基酸位置239處的天門冬胺酸（D）和胺基酸位置332處的麩胺酸（E）。

【請求項104】 如請求項83-102中任一項所述的方法，其中所述Fc結構域進一步包含根據EU編號胺基酸位置236處的丙胺酸（A）、胺基酸位置239處的天門冬胺酸（D）和胺基酸位置332處的麩胺酸（E）。

【請求項105】 如請求項83-102中任一項所述的方法，其中所述Fc結構域進一步包含根據EU編號胺基酸位置236處的丙胺酸（A）、胺基酸位置239處的天門冬胺酸（D）、胺基酸位置330處的白胺酸（L）和胺基酸位置332處的麩胺酸（E）。

【請求項106】 如請求項83-102中任一項所述的方法，其中所述分離的效應子勝任多肽進一步包含根據EU編號胺基酸位置256和/或307處的取代。

【請求項107】 如請求項106所述的方法，其中所述胺基酸位置256處的取代是天門冬胺酸（D）。

【請求項108】 如請求項106所述的方法，其中所述胺基酸位置307處的取代是麩醯胺酸（Q）。

【請求項109】 如請求項83-108中任一項所述的方法，其中所述Fc結構域進一步包含根據EU編號胺基酸位置256處的天門冬胺酸（D）和胺基酸位置307處的麩醯胺酸（Q）。

【請求項110】 如請求項83-102中任一項所述的方法，其中所述Fc結構域進一步包含根據EU編號胺基酸位置239處的天門冬胺酸（D）、胺基酸位置332處

的麩胺酸（E）、胺基酸位置256處的天門冬胺酸（D）和胺基酸位置307處的麩醯胺酸（Q）。

【請求項111】如請求項83-102中任一項所述的方法，其中所述Fc結構域進一步包含根據EU編號胺基酸位置236處的丙胺酸（A）、胺基酸位置239處的天門冬胺酸（D）、和胺基酸位置332處的麩胺酸（E）、胺基酸位置256處的天門冬胺酸（D）和胺基酸位置307處的麩醯胺酸（Q）。

【請求項112】如請求項83-102中任一項所述的方法，其中所述Fc結構域進一步包含根據EU編號胺基酸位置236處的丙胺酸（A）、胺基酸位置239處的天門冬胺酸（D）、胺基酸位置330處的白胺酸（L）、胺基酸位置332處的麩胺酸（E）、胺基酸位置256處的天門冬胺酸（D）和胺基酸位置307處的麩醯胺酸（Q）。

【請求項113】如請求項97-112中任一項所述的方法，其中所述一個或多個取代與所述工程化二硫鍵位於相同重鏈上。

【請求項114】如請求項97-112中任一項所述的方法，其中所述一個或多個取代與所述工程化二硫鍵位於不同重鏈上。

【請求項115】如請求項83-114中任一項所述的方法，其中所述分離的效應子勝任多肽進一步包含結合多肽。

【請求項116】如請求項115所述的方法，其中所述結合多肽包含一個或多個抗原結合結構域。

【請求項117】如請求項116所述的方法，其中所述一個或多個抗原結合結構域特異性結合腫瘤抗原。

【請求項118】如請求項117所述的方法，其中所述一個或多個抗原結合結構域與免疫細胞上的抗原特異性結合。

【請求項119】 如請求項83-118中任一項所述的方法，其中所述分離的效應子勝任多肽是抗體。

【請求項120】 如請求項119所述的方法，其中所述分離的效應子勝任多肽是單株抗體。

【請求項121】 如請求項119或120所述的方法，其中所述抗體是嵌合抗體、人源化抗體或人類抗體。

【請求項122】 如請求項119-121中任一項所述的方法，其中所述抗體是全長抗體。

【請求項123】 如請求項83-118中任一項所述的方法，其中所述分離的效應子勝任多肽是單結構域抗體。

【請求項124】 如請求項123所述的方法，其中所述單結構域抗體是VHH抗體。

【請求項125】 如請求項119-124中任一項所述的方法，其中所述抗體是多特異性抗體。

【請求項126】 如請求項125所述的方法，其中所述多特異性抗體具有選自以下的形式：DVD-Ig、基於CODV的形式即任選地CODV-Ig、CrossMab、CrossMab-Fb或Tandem Fab。

【請求項127】 如請求項125或126所述的方法，其中所述多特異性抗體是T細胞接合體。

【請求項128】 如請求項125或126所述的方法，其中所述多特異性抗體是NK細胞接合體。

【請求項129】 如請求項115所述的方法，其中所述結合多肽包含治療性多肽。

【請求項130】 如請求項129所述的方法，其中所述治療性多肽可以是受體、配體或酶。

【請求項131】 如請求項115-130中任一項所述的方法，其中所述結合多肽與所述Fc結構域的N末端和/或C末端連接。

【請求項132】 如請求項83-131中任一項所述的方法，其中所述分離的效應子勝任多肽能夠藉由抗體依賴性細胞毒性（ADCC）和/或補體依賴性細胞毒性（CDC）耗盡靶細胞。

【請求項133】 如請求項132所述的方法，其中所述靶細胞是癌細胞。

【請求項134】 如請求項132所述的方法，其中所述靶細胞是免疫細胞。

【請求項135】 如請求項83-118中任一項所述的方法，其中所述分離的效應子勝任多肽是Fc融合多肽。

【請求項136】 一種治療有需要的個體的疾病或病症的方法，所述方法包括向所述個體投予有效量的如請求項1-74中任一項所述的效應子勝任多肽。

【請求項137】 如請求項136所述的方法，其中所述疾病或病症是癌症。

【請求項138】 如請求項136所述的方法，其中所述疾病或病症是發炎疾病。

【請求項139】 如請求項136所述的方法，其中所述疾病或病症是自身免疫性疾病。

(發明圖式)



