



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118488971 A

(43) 申请公布日 2024. 08. 13

(21) 申请号 202280066146.9

M·贝尔施密特

(22) 申请日 2022.09.13

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

(30) 优先权数据

11105

63/243,402 2021.09.13 US

专利代理师 秦剑

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int. Cl.

2024.03.29

C07K 19/00 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

A61K 47/64 (2006.01)

PCT/CA2022/051360 2022.09.13

A61P 35/00 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

A61P 37/06 (2006.01)

W02023/035083 EN 2023.03.16

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

(71) 申请人 儿童医院

地址 加拿大安大略省

申请人 锐迪恩特生物治疗股份有限公司

(72) 发明人 J·P·朱利安 E·鲁加斯迭斯

权利要求书4页 说明书27页

J·休姆 P·E·贝利斯 X·何

序列表(电子公布) 附图14页

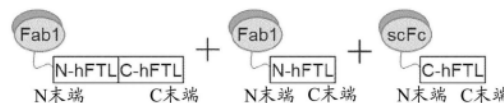
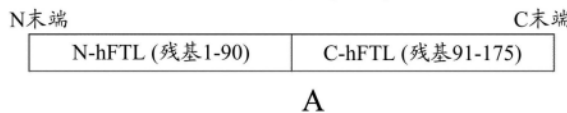
(54) 发明名称

优化的Multabody构建体、组合物和方法

(57) 摘要

优化的自组装多肽复合物,其包含:1) 融合多肽,其包含连接至纳米笼单体或其亚基的Fc多肽,以及2) 融合多肽,其包含抗原结合抗体片段。

人铁蛋白轻链(hFTL)



1. 一种融合多肽,其包含:
  - (1)Fc多肽和
  - (2) 纳米笼单体或其亚基,其中所述Fc多肽包含IgG1 Fc链,其中所述IgG1 Fc链包含根据EU编号的(1) 位置237处的除甘氨酸之外的氨基酸残基和(2) 位置329处的脯氨酸残基。
2. 如权利要求1所述的融合多肽,其中所述纳米笼单体或其亚基是铁蛋白单体或其亚基。
3. 如权利要求2所述的融合多肽,其中所述铁蛋白单体或其亚基是铁蛋白轻链或其亚基。
4. 如权利要求2或3所述的融合多肽,其中所述铁蛋白单体或其亚基是人铁蛋白或其亚基。
5. 如权利要求2-4中任一项所述的融合多肽,其中所述铁蛋白单体或其亚基是铁蛋白单体亚基。
6. 如权利要求5所述的融合多肽,其中所述铁蛋白单体亚基是C-半铁蛋白。
7. 如权利要求6所述的融合多肽,其中所述Fc多肽连接至所述C-半铁蛋白的N末端。
8. 如权利要求9所述的融合多肽,其中所述Fc多肽经由氨基酸接头连接至所述C-半铁蛋白的N末端。
9. 如权利要求8所述的融合多肽,其中所述氨基酸接头包括 $(G_nS)_m$ 接头。
10. 如权利要求9所述的融合多肽,其中所述 $(G_nS)_m$ 接头是 $(GGGGS)_m$  (SEQ ID NO:19) 接头。
11. 如权利要求1-10中任一项所述的融合多肽,其中所述Fc多肽包含单链Fc(scFc),所述单链Fc包含两条Fc链,其中所述两条Fc链经由氨基酸接头连接。
12. 如权利要求11所述的融合多肽,其中连接所述两条Fc链的所述氨基酸接头包括 $(G_nS)_m$ 接头。
13. 如权利要求12所述的融合多肽,其中所述 $(G_nS)_m$ 接头是 $(GGGGS)_m$  (SEQ ID NO:19) 接头。
14. 如权利要求1-13中任一项所述的融合多肽,其中所述Fc多肽包含IgG1 Fc链。
15. 如权利要求14所述的融合多肽,其中所述IgG1 Fc链包含根据EU编号的位置237处的丙氨酸。
16. 如权利要求14或15所述的融合多肽,其中所述IgG1 Fc链包含根据EU编号的位置234处的丙氨酸、位置235处的丙氨酸、位置236处的精氨酸和位置330处的亮氨酸。
17. 一种自组装多肽复合物,其包含:
  - (a) 多个第一融合多肽,每个第一融合多肽是如权利要求1-16中任一项所述的融合多肽,以及
  - (b) 多个第二融合多肽,每个第二融合多肽包含(1) 抗原结合抗体片段和(2) 纳米笼单体或其亚基。
18. 如权利要求17所述的自组装多肽复合物,每个第二融合多肽的所述纳米笼单体或其亚基是铁蛋白单体或其亚基。
19. 如权利要求18所述的自组装多肽复合物,其中所述铁蛋白单体或其亚基是铁蛋白

轻链或其亚基。

20. 如权利要求18或19所述的自组装多肽复合物,其中所述铁蛋白单体或其亚基是人铁蛋白或其亚基。

21. 如权利要求19或20所述的自组装多肽复合物,其不包含任何铁蛋白重链或铁蛋白重链的亚基。

22. 如权利要求17-21中任一项所述的自组装多肽复合物,其中在每个第二融合多肽内,所述抗原结合抗体片段经由氨基酸接头连接至所述纳米笼单体或其亚基。

23. 如权利要求22所述的自组装多肽复合物,其中所述氨基酸接头包括 $(G_nS)_m$ 接头。

24. 如权利要求23所述的自组装多肽复合物,其中所述 $(G_nS)_m$ 接头是 $(GGGGS)_m$  (SEQ ID NO:19)接头。

25. 如权利要求17-24中任一项所述的自组装多肽复合物,其中每个第二融合多肽的所述抗原结合抗体片段连接至纳米笼单体或其亚基的N末端。

26. 如权利要求17-25中任一项所述的自组装多肽复合物,其中每个第二融合多肽的所述抗原结合抗体片段是Fab片段。

27. 如权利要求17-26中任一项所述的自组装多肽复合物,其中每个第二融合多肽不包含任何抗体CH2或CH3结构域。

28. 如权利要求17-27中任一项所述的自组装多肽复合物,其还包含多个第三融合多肽,每个第三融合多肽包含(1)抗原结合抗体片段和(2)纳米笼单体或其亚基,其中所述第三融合多肽与所述第二融合多肽不同。

29. 如权利要求28所述的自组装多肽复合物,其中每个第三融合多肽的所述抗原结合抗体片段是Fab片段。

30. 如权利要求29所述的自组装多肽复合物,其中每个第三融合多肽不包含任何抗体CH2或CH3结构域。

31. 如权利要求17-30中任一项所述的自组装多肽复合物,其中每个第一融合多肽和每个第二融合多肽的所述纳米笼单体或其亚基是铁蛋白单体亚基,并且

a. 每个第一融合多肽包含C-半铁蛋白,并且每个第二融合多肽包含N-半铁蛋白;或者

b. 每个第一融合多肽包含N-半铁蛋白,并且每个第二融合多肽包含C-半铁蛋白。

32. 如权利要求17-31中任一项所述的自组装多肽复合物,其中所述自组装多肽复合物的特征在于第一融合多肽与第二融合多肽的1:1比率。

33. 如权利要求17-32中任一项所述的自组装多肽复合物,其包含总共24至48个融合多肽。

34. 如权利要求17-32中任一项所述的自组装多肽复合物,其包含总共至少24个融合多肽。

35. 如权利要求34所述的自组装多肽复合物,其包含总共至少32个融合多肽。

36. 如权利要求35所述的自组装多肽复合物,其具有总共约32个融合多肽。

37. 如权利要求17-36中任一项所述的自组装多肽复合物,其表现出与至少一种人Fc $\gamma$ 受体不结合,如在体外测定中确定的。

38. 如权利要求37所述的自组装多肽复合物,其表现出与选自由hFc $\gamma$  RI、hFc $\gamma$  RIIa、hFc $\gamma$  RIIb、hFc $\gamma$  RIIIa、hFc $\gamma$  RIIIb及其组合组成的组的一种或多种人Fc $\gamma$ 受体不结合,

如在体外测定中确定的。

39. 如权利要求38所述的自组装多肽复合物,其表现出与hFc  $\gamma$  RI不结合,如在体外测定中确定的。

40. 如权利要求38或39所述的自组装多肽复合物,其表现出与hFc  $\gamma$  RIIa不结合,如在体外测定中确定的。

41. 如权利要求38、39或40所述的自组装多肽复合物,其表现出与hFc  $\gamma$  RIIIa不结合,如在体外测定中确定的。

42. 如权利要求38-41中任一项所述的自组装多肽复合物,其表现出与hFc  $\gamma$  RIIb不结合,如在体外测定中确定的。

43. 如权利要求38-42中任一项所述的自组装多肽复合物,其表现出与hFc  $\gamma$  RIIIb不结合,如在体外测定中确定的。

44. 一种自组装多肽复合物,其包含:

(a) 多个第一融合多肽,每个第一融合多肽包含(1) scFc和(2) 铁蛋白单体或其亚基,以及

(b) 多个第二融合多肽,每个第二融合多肽包含(1) 抗原结合抗体片段,其连接至(2) 铁蛋白单体或其亚基,其中所述scFc包含两条IgG1Fc链,每条IgG1 Fc链包含根据EU编号的位置234处的丙氨酸、位置235处的丙氨酸、位置236处的精氨酸、位置237处的丙氨酸、位置329处的脯氨酸和位置330处的亮氨酸。

45. 如权利要求44所述的自组装多肽复合物,其中:

a. 每个第一融合多肽包含C-半铁蛋白,并且每个第二融合多肽包含N-半铁蛋白;或者

b. 每个第一融合多肽包含N-半铁蛋白,并且每个第二融合多肽包含C-半铁蛋白。

46. 如权利要求45所述的自组装多肽复合物,其中每个第一融合多肽包含连接至所述C-半铁蛋白的N末端的scFc,并且每个第二融合多肽包含连接至所述N-半铁蛋白的N末端的Fab。

47. 如权利要求46所述的自组装多肽复合物,其中(1) 在每个第一融合多肽中,所述scFc经由氨基酸接头连接至所述C-半铁蛋白的N末端,且/或(2) 在每个第二融合多肽中,所述Fab经由氨基酸接头连接至所述N-半铁蛋白的N末端。

48. 如权利要求45-47中任一项所述的自组装多肽复合物,其中所述自组装多肽复合物的特征在于第一融合多肽与第二融合多肽的1:1比率。

49. 如权利要求44-48中任一项所述的自组装多肽复合物,其还包含多个第三融合多肽,每个第三融合多肽包含(1) 抗原结合抗体片段,其连接至(2) 纳米笼单体或其亚基,其中所述第三融合多肽与所述第二融合多肽不同。

50. 如权利要求44-49中任一项所述的自组装多肽复合物,其包含总共24至48个融合多肽。

51. 如权利要求44-50中任一项所述的自组装多肽复合物,其包含总共至少24个融合多肽。

52. 如权利要求51所述的自组装多肽复合物,其包含总共至少32个融合多肽。

53. 如权利要求52所述的自组装多肽复合物,其具有总共约32个融合多肽。

54. 如权利要求17-53中任一项所述的自组装多肽复合物,其中所述抗体结合片段能够

结合肿瘤相关抗原或与自身免疫性病症相关的抗原。

55. 一种方法,其包括向哺乳动物受试者施用包含如权利要求17-54中任一项所述的自组装多肽复合物的组合物。

56. 如权利要求55所述的方法,其中所述受试者是人。

57. 如权利要求55或56所述的方法,其中所述受试者患有癌症或处于发展出癌症的风险中。

58. 如权利要求55或56所述的方法,其中所述受试者患有自身免疫性病症或处于发展出自身免疫性病症的风险中。

59. 如权利要求55-58中任一项所述的方法,其包括通过全身途径施用。

60. 如权利要求59所述的方法,其中所述全身途径包括皮下、静脉内或肌肉注射、吸入或鼻内施用。

61. 包含如权利要求17-54中任一项所述的自组装多肽复合物的组合物的用途,其用于向哺乳动物受试者施用。

62. 如权利要求61所述的用途,其中所述受试者是人。

63. 如权利要求61或62所述的用途,其中所述受试者患有癌症或处于发展出癌症的风险中。

64. 如权利要求61或62所述的用途,其中所述受试者患有自身免疫性病症或处于发展出自身免疫性病症的风险中。

65. 如权利要求61-64中任一项所述的用途,其用于通过全身途径施用。

66. 如权利要求65所述的用途,其中所述全身途径包括皮下、静脉内或肌肉注射、吸入或鼻内施用。

67. 包含如权利要求17-54中任一项所述的自组装多肽复合物的组合物,其用于向哺乳动物受试者施用。

68. 如权利要求67所述的用于使用的组合物,其中所述受试者是人。

69. 如权利要求67或68所述的用于使用的组合物,其中所述受试者患有癌症或处于发展出癌症的风险中。

70. 如权利要求67或68所述的用于使用的组合物,其中所述受试者患有自身免疫性病症或处于发展出自身免疫性病症的风险中。

71. 如权利要求67-70中任一项所述的用于使用的组合物,其用于通过全身途径施用。

72. 如权利要求71所述的用于使用的组合物,其中所述全身途径包括皮下、静脉内或肌肉注射、吸入或鼻内施用。

## 优化的Multabody构建体、组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2021年9月13日提交的美国临时申请号63/243,402的权益和优先权,所述临时申请的全部内容特此出于所有目的通过引用整体并入。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有已经以电子方式以XML格式提交并且特此通过引用整体并入的序列表。所述XML文件创建于2022年9月13日,名称为Sequence Listing Sep-2022 3206-5070\_R,并且大小为24.8千字节。

### 背景技术

[0005] 基于抗体或抗体片段的治疗剂正在被开发用于各种用途,例如用于治疗各种疾病或病状。

[0006] 然而,基于抗体的治疗剂可能需要调整,以使其在施用于受试者后具有期望的特征(例如,期望的生物分布、半衰期等)。一些基于抗体的治疗剂具有不同于天然免疫球蛋白分子的形式。例如,在一些治疗剂中,抗体或抗体片段与另一多肽融合;在一些治疗剂下,抗体或抗体片段处于自然界中未发现的构型或具有自然界中未发现的价态。这些基于抗体的治疗剂可能也需要调整。

[0007] 因此,仍然需要优化的基于抗体的治疗剂。

### 发明内容

[0008] 本发明通过提供自组装多肽复合物解决了这种需要,所述自组装多肽复合物包含:(a)融合多肽,其包含(1)Fc多肽和(2)纳米笼单体或其亚基;以及(b)融合多肽,其包含(1)抗体片段和(2)纳米笼单体或其亚基。在某些实施方案中,Fc多肽包含特定位置处的某些氨基酸残基。

[0009] 在一个方面,提供了融合多肽,其包含:

[0010] (1)Fc多肽和

[0011] (2)纳米笼单体或其亚基,

[0012] 其中所述Fc多肽包含IgG1 Fc链,其中所述IgG1 Fc链包含根据EU编号的(1)位置237处的除甘氨酸之外的氨基酸残基和(2)位置329处的脯氨酸残基。

[0013] 在一些实施方案中,纳米笼单体或其亚基是铁蛋白单体或其亚基。

[0014] 在一些实施方案中,铁蛋白单体或其亚基是铁蛋白轻链或其亚基。

[0015] 在一些实施方案中,铁蛋白单体或其亚基是人铁蛋白或其亚基。

[0016] 在一些实施方案中,铁蛋白单体或其亚基是铁蛋白单体亚基,例如C-半铁蛋白。在一些此类实施方案中,Fc多肽例如经由氨基酸接头连接至C-半铁蛋白的N末端。在一些实施方案中,氨基酸接头包括 $(G_nS)_m$ 接头,例如 $(GGGGS)_m$ (SEQ ID NO:19)接头。

[0017] 在一些实施方案中,Fc多肽包含有包含两条Fc链的单链Fc(scFc),其中两条Fc链经由氨基酸接头,例如 $(G_nS)_m$ 接头,例如 $(GGGGS)_m$ (SEQ ID NO:19)接头连接。

- [0018] 在一些实施方案中,Fc多肽包含IgG1 Fc链。
- [0019] 在一些实施方案中,IgG1 Fc链包含根据EU编号的位置237处的丙氨酸。
- [0020] 在一些实施方案中,IgG1 Fc链包含根据EU编号的位置234处的丙氨酸、位置235处的丙氨酸、位置236处的精氨酸和位置330处的亮氨酸。
- [0021] 在一个方面,提供了自组装多肽复合物,其包含:
- [0022] (a) 多个第一融合多肽,每个第一融合多肽是如权利要求1-16中任一项所述的融合多肽,以及
- [0023] (b) 多个第二融合多肽,每个第二融合多肽包含(1)抗原结合抗体片段和(2)纳米笼单体或其亚基。
- [0024] 在一些实施方案中,每个第二融合多肽的纳米笼单体或其亚基是铁蛋白单体或其亚基。
- [0025] 在一些实施方案中,铁蛋白单体或其亚基是铁蛋白轻链或其亚基。
- [0026] 在一些实施方案中,铁蛋白单体或其亚基是人铁蛋白或其亚基。
- [0027] 在一些实施方案中,自组装多肽复合物不包含任何铁蛋白重链或铁蛋白重链的亚基。
- [0028] 在一些实施方案中,在每个第二融合多肽内,抗原结合抗体片段经由氨基酸接头连接至纳米笼单体或其亚基,所述氨基酸接头例如包括 $(G_nS)_m$ 接头,例如 $(GGGGS)_m$  (SEQ ID NO:19)接头的氨基酸接头。
- [0029] 在一些实施方案中,每个第二融合多肽的抗原结合抗体片段连接至纳米笼单体或其亚基的N末端。
- [0030] 在一些实施方案中,每个第二融合多肽的抗原结合抗体片段是Fab片段。
- [0031] 在一些实施方案中,每个第二融合多肽不包含任何抗体CH2或CH3结构域。
- [0032] 在一些实施方案中,自组装多肽复合物还包含多个第三融合多肽,每个第三融合多肽包含(1)抗原结合抗体片段和(2)纳米笼单体或其亚基,其中第三融合多肽与第二融合多肽不同。在一些实施方案中,每个第三融合多肽的抗原结合抗体片段是Fab片段。在一些实施方案中,每个第三融合多肽不包含任何抗体CH2或CH3结构域。
- [0033] 在一些实施方案中,每个第一融合多肽和每个第二融合多肽的纳米笼单体或其亚基是铁蛋白单体亚基,并且
- [0034] a. 每个第一融合多肽包含C-半铁蛋白,并且每个第二融合多肽包含N-半铁蛋白;或者
- [0035] b. 每个第一融合多肽包含N-半铁蛋白,并且每个第二融合多肽包含C-半铁蛋白。
- [0036] 在一些实施方案中,自组装多肽复合物的特征在于第一融合多肽与第二融合多肽的1:1比率。
- [0037] 在一些实施方案中,自组装多肽复合物包含总共24至48个融合多肽。在一些实施方案中,自组装多肽复合物包含总共至少24个融合多肽。
- [0038] 在一些实施方案中,自组装多肽复合物包含总共至少32个融合多肽。
- [0039] 在一些实施方案中,自组装多肽复合物具有总共约32个融合多肽。
- [0040] 在一些实施方案中,自组装多肽复合物表现出与至少一种人Fc $\gamma$ 受体不结合,如在体外测定中确定的。

[0041] 在一些实施方案中,自组装多肽复合物表现出与选自hFc  $\gamma$  RI、hFc  $\gamma$  RIIa、hFc  $\gamma$  RIIb、hFc  $\gamma$  RIIIa、hFc  $\gamma$  RIIIb及其组合组成的组的一种或多种人Fc  $\gamma$  受体不结合,如在体外测定中确定的。在一些实施方案中,自组装多肽复合物表现出与hFc  $\gamma$  RI不结合,如在体外测定中确定的。在一些实施方案中,自组装多肽复合物表现出与hFc  $\gamma$  RIIa不结合,如在体外测定中确定的。在一些实施方案中,自组装多肽复合物表现出与hFc  $\gamma$  RIIIa不结合,如在体外测定中确定的。在一些实施方案中,自组装多肽复合物表现出与hFc  $\gamma$  RIIb不结合,如在体外测定中确定的。在一些实施方案中,自组装多肽复合物表现出与hFc  $\gamma$  RIIIb不结合,如在体外测定中确定的。

[0042] 在一个方面,提供了自组装多肽复合物,其包含:

[0043] (a) 多个第一融合多肽,每个第一融合多肽包含(1) scFc和(2) 铁蛋白单体或其亚基,以及

[0044] (b) 多个第二融合多肽,每个第二融合多肽包含(1) 抗原结合抗体片段,其连接至(2) 铁蛋白单体或其亚基,其中所述scFc包含两条IgG1 Fc链,每条IgG1 Fc链包含根据EU编号的位置234处的丙氨酸、位置235处的丙氨酸、位置236处的精氨酸、位置237处的丙氨酸、位置329处的脯氨酸和位置330处的亮氨酸。

[0045] 在一些实施方案中,

[0046] a. 每个第一融合多肽包含C-半铁蛋白,并且每个第二融合多肽包含N-半铁蛋白;或者

[0047] b. 每个第一融合多肽包含N-半铁蛋白,并且每个第二融合多肽包含C-半铁蛋白。

[0048] 在一些实施方案中,每个第一融合多肽包含连接至C-半铁蛋白的N末端的scFc,并且每个第二融合多肽包含连接至N-半铁蛋白的N末端的Fab。

[0049] 在一些实施方案中,(1) 在每个第一融合多肽中,scFc经由氨基酸接头连接至C-半铁蛋白的N末端,且/或(2) 在每个第二融合多肽中,Fab经由氨基酸接头连接至N-半铁蛋白的N末端。

[0050] 在一些实施方案中,自组装多肽复合物的特征在于第一融合多肽与第二融合多肽的1:1比率。

[0051] 在一些实施方案中,自组装多肽复合物还包含多个第三融合多肽,每个第三融合多肽包含(1) 抗原结合抗体片段,其连接至(2) 纳米笼单体或其亚基,其中第三融合多肽与第二融合多肽不同。

[0052] 在一些实施方案中,自组装多肽复合物包含总共24至48个融合多肽。

[0053] 在一些实施方案中,自组装多肽复合物包含总共至少24个融合多肽。在一些实施方案中,自组装多肽复合物包含总共至少32个融合多肽。在一些实施方案中,自组装多肽复合物具有总共约32个融合多肽。

[0054] 在一些实施方案中,抗体结合片段能够结合肿瘤相关抗原或与自身免疫性病症相关的抗原。

[0055] 在一个方面,提供了方法,其包括向哺乳动物受试者施用包含如权利要求17-54中任一项所述的自组装多肽复合物的组合物。在一些实施方案中,受试者是人。在一些实施方案中,受试者患有癌症或处于发展出癌症的风险中。在一些实施方案中,受试者患有自身免疫性病症或处于发展出自身免疫性病症的风险中。

- [0056] 在一些实施方案中,方法包括通过全身途径施用。在一些实施方案中,全身途径包括皮下、静脉内或肌内注射、吸入或鼻内施用。
- [0057] 在一个方面,提供了包含本文所述的自组装多肽复合物的组合物的用途,其用于向哺乳动物受试者施用。
- [0058] 在一些实施方案中,受试者是人。
- [0059] 在一些实施方案中,受试者患有癌症或处于发展出癌症的风险中。
- [0060] 在一些实施方案中,受试者患有自身免疫性疾病或处于发展出自身免疫性疾病的风险中。
- [0061] 在一些实施方案中,组合物用于通过全身途径施用。
- [0062] 在一些实施方案中,全身途径包括皮下、静脉内或肌内注射、吸入或鼻内施用。
- [0063] 在一个方面,提供了包含本文所述的自组装多肽复合物的组合物,其用于向哺乳动物受试者施用。
- [0064] 在一些实施方案中,受试者是人。
- [0065] 在一些实施方案中,受试者患有癌症或处于发展出癌症的风险中。
- [0066] 在一些实施方案中,受试者患有自身免疫性疾病或处于发展出自身免疫性疾病的风险中。
- [0067] 在一些实施方案中,组合物用于通过全身途径施用。
- [0068] 在一些实施方案中,全身途径包括皮下、静脉内或肌内注射、吸入或鼻内施用。

#### 附图说明

- [0069] 图1A是人铁蛋白轻链(hFTL)和示例性N-半铁蛋白(N-hFTL)和C-半铁蛋白(C-hFTL)分子的图解示意图。
- [0070] 图1B是一起形成本公开的示例性Multabody的融合多肽的图解示意图。
- [0071] 图2A、图2B、图2C、图2D和图2E分别描绘了DR5靶向Multabody(Cona MB IgG1 LLRAL)与人DR5、人DR4、人骨保护素(OPG)、人诱骗受体1(DcR1)和人DcR2的结合的生物层干涉测量法(BLI)时间响应曲线。
- [0072] 图3描绘了含有各种Fc链的DR5靶向Multabody与人、食蟹猴和小鼠FcRn的结合的示例性BLI时间响应曲线,在pH 6.0下测量缔合并且在pH 7.4下测量解离。
- [0073] 图4说明了Cona MB IgG1 wt、Cona MB IgG1 LLRAL和可那木单抗(Cona)在不同人肿瘤细胞系中对癌细胞的剂量依赖性杀伤作用,其定量并表示为Multabody或抗体处理后相对于媒介物处理的肿瘤细胞的活细胞百分比。
- [0074] 图5A是说明了实施例6中描述的药代动力学研究的设计的示意图。
- [0075] 图5B描绘的图示出了向严重联合免疫缺陷(SCID)小鼠施用单次腹膜内(i.p.)或静脉内(i.v.)剂量后,Cona MB IgG1 wt、Cona MB IgG1 LLRAL或可那木单抗(Cona)的血浆水平。
- [0076] 图5C说明了间隔96小时施用两个腹膜内剂量的SCID小鼠中的Cona MB IgG1 LLRAL或可那木单抗的血浆水平。
- [0077] 图6A是说明了实施例7中描述的并在COLO 205异种移植小鼠模型中进行的体内功效实验的设计的示意图。

[0078] 图6B和图6C示出了携带COLO 205异种移植肿瘤并且用媒介物、可那木单抗或Cona MB IgG1 LLRAL治疗的小鼠在不同时间点(图6B)和第88天(图6C)的肿瘤体积。

[0079] 图6D-图6G示出了用媒介物(图6D)、可那木单抗(图6E)或Cona MB IgG1 LLRAL(图6F和图6G)治疗的携带COLO 205异种移植肿瘤的个体小鼠的肿瘤生长曲线。

[0080] 图6H是时间图,其描绘了在腹膜内施用于携带COLO 205异种移植肿瘤的小鼠后,Cona MB IgG1 LLRAL或可那木单抗的血浆水平。

[0081] 图7A是描绘第一次给药后各组小鼠的肿瘤体积随时间变化的图。“MB”表示Cona MB IgG1 LLRAL组。X轴上的三角形表示治疗时间点。图7B-图7F示出了媒介物组(图7B)以及5mg/kg、1mg/kg、0.25mg/kg和0.1mg/kg Cona MB IgG1 LLRAL治疗组(分别为图7C、图7D、图7E和图7F)内的个体小鼠的肿瘤体积。在图7B-图7F中,“CR”表示完全消退。

[0082] 图7G是描绘施用第一剂量后,在各个时间点收集的血液样品中的可检测的Cona MB IgG1 LLRAL的量的图。在0.1mg/kg、0.25mg/kg、1mg/kg和5mg/kg Cona MB IgG1 LLRAL治疗组中,在测试的所有时间点均可检测到Cona MB IgG1 LLRAL,药代动力学在所有剂量组中均呈线性。

[0083] 图8是示意图,其描绘了DR5靶向Multabody在COLO 205异种移植小鼠模型中的大肿瘤穿透和细胞凋亡诱导的研究的设计。实验在实施例9中描述。

[0084] 图9A-图9D描绘了来自未治疗的小鼠(图9A和图9C)或用DR5靶向Multabody(“MB”)治疗的小鼠(图9B和图9D)的代表性肿瘤切片。用针对切割的半胱天冬酶-3(一种细胞凋亡标志物)的抗体对切片进行染色。实验在实施例9中描述。

## 具体实施方式

### [0085] 定义

[0086] 当在本文中用于提及值时,术语“约”和“大约”可互换使用并且指代与参考值类似的值。一般来讲,熟悉上下文的本领域的技术人员将理解该上下文中“约”或“大约”所涵盖的相关变化程度。例如,在一些实施方案中,术语“约”和“大约”可以涵盖落入所提及的值的25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更小内的值范围。

[0087] 如本文所用,术语“改变”、“改变的”、“减少”、“减少的”、“增加”、“增加的”或“降低”、“降低的”(例如,提及某些结果或效果)具有相对于参考水平的含义。在一些实施方案中,在讨论Fc链或Fc多肽中的突变的上下文中,参考水平是已知的水平或使用在Fc区中不含有参考突变的IgG确定的水平。

[0088] 如本文所用,除非另有说明,否则术语“结合”是指两个或更多个实体之间的非共价缔合。“直接”结合涉及实体或部分之间的物理接触;间接结合涉及通过与一个或多个中间实体的物理接触的方式进行物理相互作用。两个或更多个实体之间的结合通常可以在多种背景中的任一种背景下进行评估,包括相互作用的实体或部分单独研究或者在更复杂的系统背景下研究的背景(例如,当与载体实体共价或以其他方式缔合时和/或在生物系统或细胞中时)。如本文所用,两个实体之间的短语“非结合(non-binding)”或“不结合(no binding)”或类似短语是指1)缺乏可检测的结合,或2)结合低于对应于适当测定(例如,体外结合测定,诸如生物层干涉测量法)中的不结合的设置阈值。例如,在一些实施方案中,在

体外生物层干涉测量测定中,当测试制品以20nM的浓度存在时,180秒后对装载有0.8nm靶标的生物传感器的小于0.1nm的最大缔合结合响应被归类为“非结合”。

[0089] 术语“铁蛋白”和“脱铁铁蛋白”在本文中可互换使用,并且通常指代能够组装成铁蛋白复合物的多肽(例如,铁蛋白链),所述铁蛋白复合物通常包含24个蛋白质亚基。在一些实施方案中,铁蛋白是人铁蛋白,例如人铁蛋白轻链,例如与SEQ ID NO:1或UniProt P02792具有至少85%序列同一性的人铁蛋白轻链。在一些实施方案中,铁蛋白是野生型铁蛋白。例如,铁蛋白可以是野生型人铁蛋白。

[0090] 术语“铁蛋白单体”在本文中用于指代铁蛋白的单链,其在其他铁蛋白链的存在下能够自组装成包含多条铁蛋白链(例如,24条或更多条铁蛋白链)的多肽复合物。

[0091] 如本文所用,术语“接头”用于指代连接两个或更多个元件以形成多元件剂的实体。例如,本领域的普通技术人员理解,其结构包括两个或更多个功能结构域或组织结构域的多肽(例如,融合多肽)通常在此类结构域之间包括将它们彼此连接的一段氨基酸。在一些实施方案中,包含接头元件的多肽具有一般形式S1-L-S2的总体结构,其中S1和S2可以相同或不同并且代表通过接头(L)彼此缔合的两个结构域。在一些实施方案中,接头是“氨基酸接头”,即,其包含氨基酸残基,例如,氨基酸接头可以包含至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100个或更多个氨基酸残基。在一些实施方案中,接头的特征在于其趋于不采用刚性的三维结构,而是为多肽提供柔性。

[0092] 如本文所用,术语“多特异性”是指具有至少两个结合位点的特性,至少两个不同的结合配偶体(例如,抗原或受体(例如,Fc受体))可以在所述结合位点处结合。例如,包含至少两个Fab片段的多肽复合物(其中两个Fab片段中的每一个能够结合不同的抗原)是“多特异性的”。作为另一个实例,包含Fc片段(能够结合Fc受体)和Fab片段(能够结合抗原)的多肽复合物是“多特异性的”。

[0093] 如本文所用,术语“多价”是指具有至少两个结合位点的特性,结合配偶体(例如,抗原或受体(例如,Fc受体))可以在所述结合位点处结合。可以与至少两个结合位点结合的结合配偶体可以相同或不同。

[0094] 如本文所用,术语“纳米笼单体”是指多肽的单链,其能够与其他纳米笼单体自组装以形成包含多个纳米笼单体的自组装多肽复合物。在一些实施方案中,纳米笼单体选自铁蛋白、脱铁铁蛋白、封装蛋白、硫氧化还原酶(SOR)、二氧四氢喋啶合酶、丙酮酸脱氢酶、羧酶体、穹窿蛋白、GroEL、热休克蛋白、E2P外壳蛋白、MS2外壳蛋白的单体、其片段及其变体。

[0095] 如本文所用,术语“多肽”通常具有其本领域认可的至少三个氨基酸的聚合物的含义,例如通过肽键彼此连接。本领域的普通技术人员将理解,术语“多肽”旨在足够通用,以不仅涵盖具有本文所述的完整序列的多肽,还涵盖代表此类完整多肽的功能片段(即,保留至少一种活性的片段)的多肽。此外,本领域的普通技术人员理解蛋白质序列通常耐受一些取代而不破坏活性。因此,保留活性并且与相同类别的另一种多肽共享至少约30-40%整体序列同一性(通常大于约50%、60%、70%或80%,并且通常还包括至少一个同一性更高的区域,通常在一个或多个高度保守的区域中大于90%或甚至95%、96%、97%、98%或99%,所述区域通常涵盖至少3-4个并且通常多达20或更多个氨基酸)的任何多肽涵盖在如本文所用的相关术语“多肽”内。多肽可含有L-氨基酸、D-氨基酸或两者,并且可含有本领域已知

的多种氨基酸修饰或类似物中的任一种。有用的修饰包括例如末端乙酰化、酰胺化、甲基化、糖基化等。在一些实施方案中,蛋白质可包含天然氨基酸、非天然氨基酸、合成氨基酸及其组合。

[0096] 当用于提及大分子复合物(例如,多肽复合物)时,术语“自组装”是指当存在待形成的复合物(例如,融合多肽)的足够成分时,自发形成该复合物。在一些实施方案中,复合物在生理条件下或在对应于生理条件的缓冲液(例如,溶液)中自组装。

[0097] 如本文所用,术语“受试者”是指生物体,通常是哺乳动物(例如,人)。在一些实施方案中,受试者罹患或易患相关疾病、病症或病状。在一些实施方案中,受试者表现出疾病、病症或病状的一种或多种症状或特性。在一些实施方案中,受试者是具有对疾病、病症或病状的易感性或风险的一种或多种特征的人。在一些实施方案中,受试者是患者。在一些实施方案中,受试者是正在施用和/或已经施用诊断和/或疗法的受试者。

[0098] 如本文所用,术语“治疗(treatment)”(以及“治疗(treat)”或“治疗(treating)”)是指部分或完全地减轻、改善、缓解、抑制特定疾病、病症和/或病状的一种或多种症状、特征和/或原因、延迟其发作、降低其严重程度和/或降低其发生率的疗法的任何施用。在一些实施方案中,此类治疗可以针对不表现出相关疾病、病症和/或病状的体证的受试者和/或仅表现出疾病、病症和/或病状的早期体证的受试者。或者或此外,此类治疗可以针对表现出相关疾病、病症和/或病状的一种或多种已确定体证的受试者。在一些实施方案中,治疗可以针对已被诊断为罹患相关疾病、病症和/或病状的受试者。在一些实施方案中,治疗可以针对已知具有一种或多种易感因素的受试者,所述易感因素与相关疾病、病症和/或病状的发展风险增加在统计学上相关。

[0099] 如本文所用,术语“肿瘤相关抗原”或“肿瘤相关抗原”意指以显著高于正常细胞的量存在于肿瘤细胞上的抗原。

#### [0100] A. 融合多肽

[0101] 在许多实施方案中,与本文公开的组合物和方法相容的融合多肽通常包含连接至Fc多肽或抗原结合抗体片段的纳米笼单体或其亚基。在融合多肽内,Fc多肽或抗原结合抗体片段可以在纳米笼单体或其亚基的特定末端(例如,N末端或C末端)连接至纳米笼单体或其亚基。在一些实施方案中,Fc多肽或抗原结合抗体片段经由氨基酸接头(诸如如本文所述的接头)连接。

##### [0102] 1. 纳米笼单体及其亚基

[0103] 在一些实施方案中,纳米笼单体是铁蛋白单体。

[0104] 术语“铁蛋白单体”在本文中用于指代铁蛋白的单链,其在其他铁蛋白链的存在下能够自组装成包含多条铁蛋白链(例如,24条或更多条铁蛋白链)的多肽复合物。在一些实施方案中,铁蛋白单体是铁蛋白轻链。在一些实施方案中,铁蛋白单体不包括铁蛋白重链或能够与铁结合或能够具有亚铁氧化酶活性的其他铁蛋白组分。

[0105] 在一些实施方案中,自组装多肽复合物内的每个融合多肽包含铁蛋白轻链或铁蛋白轻链的亚基。在这些实施方案中,自组装多肽复合物不包含任何铁蛋白重链或铁蛋白重链的亚基。

[0106] 在一些实施方案中,铁蛋白单体是人铁蛋白链,例如,人铁蛋白轻链,例如,具有SEQ ID NO:1的至少残基2-175的序列的人铁蛋白轻链。

[0107] 铁蛋白单体的“亚基”是指铁蛋白单体的一部分,其能够自发地与铁蛋白单体的另一个不同的亚基缔合,使得所述亚基一起形成铁蛋白单体,所述铁蛋白单体进而能够与其他铁蛋白单体自组装以形成多肽复合物。

[0108] 在一些实施方案中,铁蛋白单体亚基包含铁蛋白单体的大约一半。如本文所用,术语“N-半铁蛋白”是指铁蛋白链的大约一半,所述一半包含铁蛋白链的N-末端。如本文所用,术语“C-半铁蛋白”是指铁蛋白链的大约一半,所述一半包含铁蛋白链的C-末端。铁蛋白链可以分开以形成N-半铁蛋白和C-半铁蛋白的确切点可根据实施方案而变化。在基于人铁蛋白轻链的铁蛋白单体亚基的上下文中,例如,这两半可以在对应于SEQ ID NO:1的约位置75至约位置100(或其大部分)之间的位置的点处分开。例如,在一些实施方案中,基于人铁蛋白轻链的N-半铁蛋白具有对应于SEQ ID NO:1的残基1-95(或其大部分,例如SEQ ID NO:1的残基2-95)的氨基酸序列,并且基于人铁蛋白轻链的C-半铁蛋白具有对应于SEQ ID NO:1的残基96-175(或其大部分)的氨基酸序列。

[0109] 在一些实施方案中,这两半在对应于SEQ ID NO:1的约位置85至约位置92之间的位置的点处分开。例如,在一些实施方案中,基于人铁蛋白轻链的N-半铁蛋白具有对应于SEQ ID NO:1的残基1-90(或其大部分,例如SEQ ID NO:1的残基2-90)的氨基酸序列,并且基于人铁蛋白轻链的C-半铁蛋白具有对应于SEQ ID NO:1的残基91-175(或其大部分)的氨基酸序列。

## [0110] 2.Fc多肽

[0111] 在某些实施方案中,片段可结晶(Fc)多肽包含Fc链,所述Fc链相对于相同Ig类别的参考Fc链各自具有一个或多个突变。如下文进一步解释的,参考Fc链可以属于例如IgG1类。

[0112] 除非另有说明,否则整篇本公开中的抗体片段(例如,Fc链)内的残基的编号是根据EU编号。

[0113] 在一些实施方案中,Fc多肽包含一种或多种人IgG1 Fc链,即,除了本文指出的突变之外,Fc多肽包含与野生型人IgG1内的Fc链基本上类似的Fc链。

[0114] 在一些实施方案中,Fc多肽包含一种或多种IgG1 Fc链(例如,人IgG1 Fc链或人Fc链),即,除了具有如本文所指出的某些位置处的特定残基(其可能与对应的野生型Fc链中的残基不同)之外,Fc多肽包含具有与野生型IgG1 Fc内的链基本上类似的氨基酸序列的Fc链。在一些实施方案中,野生型IgG1 Fc是人IgG1 Fc,其中每条Fc链具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

[0115] 例如,Fc多肽可包含Fc链,所述Fc链具有与野生型IgG1 Fc内的Fc链的氨基酸序列具有至少85%、至少87.5%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,Fc多肽包含Fc链,所述Fc链包含针对该Fc链具体描述的某些位置处的特定残基,但具有与野生型Fc链(例如野生型IgG1 Fc链)内的对应Fc链具有100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,Fc多肽包含Fc链,所述Fc链具有与SEQ ID NO:4的序列有至少一个、至少两个、至少三个或至少四个氨基酸残基不同的氨基酸序列。在一些实施方案中,Fc多肽包含Fc链,所述Fc链具有与SEQ ID NO:4的序列有不多于十个、不多于九个、不多于八个、不多于七个、不多于六个、不多于五个或不多于四个氨基酸残基不同的氨基酸序列。

[0116] 在一些实施方案中,Fc多肽是单链Fc(scFc),其包含通过共价接头(例如,经由氨基酸接头)连接在一起的两条Fc链。

[0117] 在某些实施方案中,Fc链包含(1)位置237处的除甘氨酸之外的氨基酸残基;和(2)位置329处的脯氨酸残基。在一些实施方案中,Fc链包含位置237处的丙氨酸。

[0118] 在一些实施方案中,Fc链是IgG1 Fc链并且还包含选自位置234、位置235、位置236、位置330及其组合的一个或多个位置处的突变或突变组。

[0119] 例如,在一些实施方案中,Fc链是IgG1 Fc链,其包含位置234处的丙氨酸、位置235处的丙氨酸、位置236处的精氨酸、位置237处的丙氨酸、位置329处的脯氨酸和位置330处的亮氨酸。

[0120] 在一些实施方案中,Fc链还包含与糖基化相关的位置(例如,位置297)处的突变(例如,通过包含位置297处的谷氨酰胺)。

[0121] 在一些实施方案中,Fc链包含与如本文进一步所述的改变的特性相关的突变或突变组(相对于对应的野生型Fc链)。“与...相关”意指在抗体(诸如IgG抗体)的上下文中,突变或突变组先前已被表征为赋予改变的特性(例如,改变的与FcRn的结合、改变的效应子功能等)。“改变的”意指特性(例如,与Fc受体(例如,Fc $\gamma$ 受体或FcRn)的结合)不同于在没有突变或突变组的情况下观察到的特性。

[0122] 例如,在一些实施方案中,改变的特性包括改变的与Fc受体的结合。

[0123] 在一些实施方案中,改变的特性包括改变的与Fc $\gamma$ 受体(例如,人Fc $\gamma$ R)的结合。在一些实施方案中,Fc $\gamma$ R是选自由hFc $\gamma$ RI、hFc $\gamma$ RIIa、hFc $\gamma$ RIIb、hFc $\gamma$ RIIIa、hFc $\gamma$ RIIIb及其组合组成的组的人Fc $\gamma$ R。

[0124] 在一些实施方案中,在测定(例如,体外测定)中,改变的结合包含不结合或相对于对应的对照(例如,通常在与对应的野生型链相似的情况下观察到的结合水平)的显著降低的结合。

### [0125] 3. 抗体片段

[0126] 在某些实施方案中,抗体片段能够结合肿瘤相关抗原或与自身免疫性病症相关的抗原。

[0127] 在一些实施方案中,抗体片段是Fab。在一些实施方案中,抗体片段是单链Fab(scFab);例如,使用包含Fab的重链和轻链的融合多肽,所述重链和轻链任选地通过接头(例如,如本文所公开的氨基酸接头)连接。

[0128] 在某些实施方案中,抗体片段包含重链可变区(例如,V<sub>H</sub>)。在某些实施方案中,抗体片段包含重链可变结构域(例如,V<sub>H</sub>)和轻链可变结构域(例如,V<sub>L</sub>或V<sub>K</sub>)。在某些实施方案中,抗体片段包含Fab,其包含重链可变结构域(例如,V<sub>H</sub>)和轻链可变结构域(例如,V<sub>L</sub>或V<sub>K</sub>)。

[0129] 在某些实施方案中,抗体片段不包含来自Fc区的任何结构域,例如,不包含任何CH2或CH3结构域。在某些实施方案中,抗体片段是多种抗体中任一种的抗体片段或者衍生自多种抗体中的任一种,包括例如完全人的、人源化的或嵌合的抗体。从其获得或衍生抗体片段的抗体可以是多种抗体类别中的任一种,包括例如IgG1抗体、IgG2抗体、IgG4抗体。在一些实施方案中,抗体片段获得自或衍生自激动性抗体,例如激动性人源化抗体。

[0130] 在使用具有抗体片段的多种类型的融合多肽的实施方案中,各种类型的融合多肽中的抗体片段可以能够结合不同的抗原,能够结合抗原上相同的表位,能够结合抗原上不

同并且不重叠的表位,或者能够结合抗原上不同但重叠的表位。

#### [0131] 4. 接头

[0132] 在某些实施方案中,接头用于融合多肽内和/或单链分子(诸如scFc)内。在一些实施方案中,接头是氨基酸接头。例如,如本文所用的接头可包含约1个至约100个氨基酸残基,例如约1个至约70个、约2个至约70个、约1个至约30个或约2个至约30个氨基酸残基。在一些实施方案中,接头包含至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个或至少10个氨基酸残基。

[0133] 在某些实施方案中,接头包含甘氨酸-丝氨酸序列,例如(G<sub>n</sub>S)<sub>m</sub>序列(例如,GGG、GGGS(SEQ ID NO:18)或GGGGG(SEQ ID NO:19)序列),其存在于接头内的至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个或至少14个拷贝中。

#### [0134] B. 自组装多肽复合物

[0135] 在一个方面,提供了包含多个如本文所公开的融合多肽的自组装多肽复合物。一般来讲,所提供的自组装多肽复合物包含(a)多个第一融合多肽,每个第一融合多肽包含(1)Fc多肽,其连接至(2)纳米笼单体或其亚基,其中Fc多肽包含相对于相同Ig类别的参考Fc链具有一个或多个突变的Fc链,以及(b)多个第二融合多肽,每个第二融合多肽包含(1)抗原结合抗体片段,其连接至(2)纳米笼单体或其亚基。

[0136] 在一些实施方案中,纳米笼单体是铁蛋白单体,并且自组装多肽复合物内的每个融合多肽包含铁蛋白轻链或铁蛋白轻链的亚基。在这些实施方案中,自组装多肽复合物不包含任何铁蛋白重链、铁蛋白重链亚基或能够与铁结合或能够具有亚铁氧化酶活性的其他铁蛋白组分。

[0137] 在一些实施方案中,纳米笼单体或其亚基是铁蛋白单体亚基,并且(a)每个第一融合多肽包含作为C-半铁蛋白的铁蛋白单体亚基,并且每个第二融合多肽包含作为N-半铁蛋白的铁蛋白单体亚基;或者(b)每个第一融合多肽包含作为N-半铁蛋白的铁蛋白单体亚基,并且每个第二融合多肽包含作为C-半铁蛋白的铁蛋白单体亚基。

[0138] 在一些实施方案中,自组装多肽复合物包含总共24个至48个融合多肽。在一些实施方案中,自组装多肽复合物包含总共24个融合多肽。在一些实施方案中,自组装多肽复合物包含总共大于24个融合多肽,例如,至少26个、至少28个、至少30个、至少32个融合多肽、至少34个融合多肽、至少36个融合多肽、至少38个融合多肽、至少40个融合多肽、至少42个融合多肽、至少44个融合多肽、至少46个融合多肽或至少48个融合多肽。在一些实施方案中,自组装多肽复合物包含约32个融合多肽。

[0139] 在一些实施方案中,自组装多肽复合物包含至少4个、至少5个、至少6个、至少7个或至少8个第一融合多肽。

[0140] 在一些实施方案中,自组装多肽复合物包含至少4个、至少5个、至少6个、至少7个或至少8个第二融合多肽。

[0141] 在一些实施方案中,自组装多肽复合物还包含至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14、至少15个或至少16个第三融合多肽。

[0142] 在一些实施方案中,自组装多肽复合物包含比率为大约1:1、11:13、3:5、1:2、7:

17、1:3、2:7、5:19、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:12、1:24的第一融合多肽与所有其他融合多肽。

[0143] 药代动力学特性

[0144] 在某些实施方案中,当施用于有需要的受试者时,所提供的自组装多肽复合物具有与参考IgG分子(例如,其类别与自组装多肽复合物内的第一融合多肽的Fc多肽内的Fc链类别相匹配的IgG分子)类似的一种或多种药代动力学特征。在一些实施方案中,在将自组装多肽复合物施用于人受试者时,获得本文讨论的药代动力学特性(例如,半衰期、AUC和/或 $C_{max}$ )的范围。在一些实施方案中,当自组装多肽复合物经由全身途径施用(例如,经由静脉内或皮下施用)时,获得本文讨论的药代动力学特性的范围。

[0145] 在一些实施方案中,如本文所公开的自组装多肽复合物具有与参考IgG分子类似的半衰期。参考IgG分子可以是例如自组装多肽复合物内的第二融合多肽和/或第三融合多肽内的抗原结合抗体片段所源自的抗体。例如,如果第二融合多肽和/或第三融合多肽内的抗原结合片段包含来自“抗体A”的可变区,则在一些实施方案中,参考IgG分子可以是“抗体A”。

[0146] 在一些实施方案中,在施用于有需要的受试者后,自组装多肽复合物具有约3至35天、约3至约28天、约3至约21天、约3至约14天、约3至约10天、约3至约7天、约3至约5天、约5至约35天、约5至约28天、约5至约21天、约5至约14天、约5至约10天、约5至约7天、约7至约35天、约7至约28天、约7至约21天、约7至约14天、约7至约10天、约10至约35天、约10至约28天、约10至约21天、约10至约14天、约14至约35天、约14至约28天、约14至约21天、约21至约35天或约21至约28天的半衰期。在一些实施方案中,在施用于有需要的受试者后,自组装多肽复合物具有至少3天、至少5天、至少7天、至少10天、至少14天、至少21天或至少28天的半衰期。在一些实施方案中,在施用于有需要的受试者后,自组装多肽复合物在至少3天、至少5天、至少7天、至少10天、至少14天、至少21天或至少28天后能够在血清中检测到。

[0147] 在一些实施方案中,如本文所公开的自组装多肽复合物具有与参考IgG分子(例如,自组装多肽复合物中包含的Fab片段所源自的抗体)类似的生物利用度。例如,在一些实施方案中,在施用于有需要的受试者后,自组装多肽复合物具有约10至约8000天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约10至约7000天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约10至约6000天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约10至约5000天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约10至约4000天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约10至约3000天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约10至约2500天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约10至约1000天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约10至约1500天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约10至约1000天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约10至约750天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约10至约500天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约10至约400天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约10至约300天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约10至约200天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约10至约100天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约10至约50天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约10至约25天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约25至约8000天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约25至约7000天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约25至约6000天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约25至约5000天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约25至约4000天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约25至约3000天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约25至约2500天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约25至约1000天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约25至约1500天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约25至约1000天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约25至约750天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约25至约500天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约25至约400天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约25至约300天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约25至约200天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约25至约100天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约25至约50天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约50至约8000天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约50至约7000天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约50至约6000天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约50至约5000天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约50至约4000天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约50至约3000天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约50至约2500天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约50至约2000天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约50至约1500天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约50至约1000天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约50至约750天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约50至约500天· $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、



mL、至少25天· $\mu\text{g/mL}$ 、至少50天· $\mu\text{g/mL}$ 、至少100天· $\mu\text{g/mL}$ 、至少200天· $\mu\text{g/mL}$ 、至少300天· $\mu\text{g/mL}$ 、至少400天· $\mu\text{g/mL}$ 、至少500天· $\mu\text{g/mL}$ 、至少750天· $\mu\text{g/mL}$ 、至少1000天· $\mu\text{g/mL}$ 、至少1500天· $\mu\text{g/mL}$ 、至少2000天· $\mu\text{g/mL}$ 、至少2500天· $\mu\text{g/mL}$ 、至少3000天· $\mu\text{g/mL}$ 、至少4000天· $\mu\text{g/mL}$ 、至少5000天· $\mu\text{g/mL}$ 、至少6000天· $\mu\text{g/mL}$ 、至少7000天· $\mu\text{g/mL}$ 或至少8000天· $\mu\text{g/mL}$ 的AUC。

[0148] 在一些实施方案中,如本文所公开的自组装多肽复合物具有与参考IgG分子类似的生物利用度。例如,在一些实施方案中,在施用于有需要的受试者后,自组装多肽复合物具有约 $10\mu\text{g/mL}$ 至约 $750\text{mg/mL}$ 、约 $25\mu\text{g/mL}$ 至约 $750\text{mg/mL}$ 、约 $50\mu\text{g/mL}$ 至约 $750\text{mg/mL}$ 、约 $75\mu\text{g/mL}$ 至约 $750\text{mg/mL}$ 、约 $100\mu\text{g/mL}$ 至约 $750\text{mg/mL}$ 、约 $250\mu\text{g/mL}$ 至约 $750\text{mg/mL}$ 、约 $500\mu\text{g/mL}$ 至约 $750\text{mg/mL}$ 、约 $750\mu\text{g/mL}$ 至约 $750\text{mg/mL}$ 、约 $1\text{mg/mL}$ 至约 $750\text{mg/mL}$ 、约 $10\text{mg/mL}$ 至约 $750\text{mg/mL}$ 、约 $25\text{mg/mL}$ 至约 $750\text{mg/mL}$ 、约 $50\text{mg/mL}$ 至约 $750\text{mg/mL}$ 、约 $75\text{mg/mL}$ 至约 $750\text{mg/mL}$ 、约 $100\text{mg/mL}$ 至约 $750\text{mg/mL}$ 、约 $250\text{mg/mL}$ 至约 $750\text{mg/mL}$ 、约 $500\text{mg/mL}$ 至约 $750\text{mg/mL}$ 、约 $10\mu\text{g/mL}$ 至约 $500\text{mg/mL}$ 、约 $25\mu\text{g/mL}$ 至约 $500\text{mg/mL}$ 、约 $50\mu\text{g/mL}$ 至约 $500\text{mg/mL}$ 、约 $75\mu\text{g/mL}$ 至约 $500\text{mg/mL}$ 、约 $100\mu\text{g/mL}$ 至约 $500\text{mg/mL}$ 、约 $250\mu\text{g/mL}$ 至约 $500\text{mg/mL}$ 、约 $500\mu\text{g/mL}$ 至约 $500\text{mg/mL}$ 、约 $750\mu\text{g/mL}$ 至约 $500\text{mg/mL}$ 、约 $1\text{mg/mL}$ 至约 $500\text{mg/mL}$ 、约 $10\text{mg/mL}$ 至约 $500\text{mg/mL}$ 、约 $25\text{mg/mL}$ 至约 $500\text{mg/mL}$ 、约 $50\text{mg/mL}$ 至约 $500\text{mg/mL}$ 、约 $75\text{mg/mL}$ 至约 $500\text{mg/mL}$ 、约 $100\text{mg/mL}$ 至约 $500\text{mg/mL}$ 、约 $250\text{mg/mL}$ 至约 $500\text{mg/mL}$ 、约 $10\mu\text{g/mL}$ 至约 $250\text{mg/mL}$ 、约 $25\mu\text{g/mL}$ 至约 $250\text{mg/mL}$ 、约 $50\mu\text{g/mL}$ 至约 $250\text{mg/mL}$ 、约 $75\mu\text{g/mL}$ 至约 $250\text{mg/mL}$ 、约 $100\mu\text{g/mL}$ 至约 $250\text{mg/mL}$ 、约 $250\mu\text{g/mL}$ 至约 $250\text{mg/mL}$ 、约 $500\mu\text{g/mL}$ 至约 $250\text{mg/mL}$ 、约 $750\mu\text{g/mL}$ 至约 $250\text{mg/mL}$ 、约 $1\text{mg/mL}$ 至约 $250\text{mg/mL}$ 、约 $10\text{mg/mL}$ 至约 $250\text{mg/mL}$ 、约 $25\text{mg/mL}$ 至约 $250\text{mg/mL}$ 、约 $50\text{mg/mL}$ 至约 $250\text{mg/mL}$ 、约 $75\text{mg/mL}$ 至约 $250\text{mg/mL}$ 、约 $100\text{mg/mL}$ 至约 $250\text{mg/mL}$ 、约 $10\mu\text{g/mL}$ 至约 $100\text{mg/mL}$ 、约 $25\mu\text{g/mL}$ 至约 $100\text{mg/mL}$ 、约 $50\mu\text{g/mL}$ 至约 $100\text{mg/mL}$ 、约 $75\mu\text{g/mL}$ 至约 $100\text{mg/mL}$ 、约 $100\mu\text{g/mL}$ 至约 $100\text{mg/mL}$ 、约 $250\mu\text{g/mL}$ 至约 $100\text{mg/mL}$ 、约 $500\mu\text{g/mL}$ 至约 $100\text{mg/mL}$ 、约 $750\mu\text{g/mL}$ 至约 $100\text{mg/mL}$ 、约 $1\text{mg/mL}$ 至约 $100\text{mg/mL}$ 、约 $10\text{mg/mL}$ 至约 $100\text{mg/mL}$ 、约 $25\text{mg/mL}$ 至约 $100\text{mg/mL}$ 、约 $50\text{mg/mL}$ 至约 $100\text{mg/mL}$ 、约 $75\text{mg/mL}$ 至约 $100\text{mg/mL}$ 、约 $10\mu\text{g/mL}$ 至约 $75\text{mg/mL}$ 、约 $25\mu\text{g/mL}$ 至约 $75\text{mg/mL}$ 、约 $50\mu\text{g/mL}$ 至约 $75\text{mg/mL}$ 、约 $75\text{mg/mL}$ 至约 $75\text{mg/mL}$ 、约 $100\mu\text{g/mL}$ 至约 $75\text{mg/mL}$ 、约 $250\mu\text{g/mL}$ 至约 $75\text{mg/mL}$ 、约 $500\mu\text{g/mL}$ 至约 $75\text{mg/mL}$ 、约 $750\mu\text{g/mL}$ 至约 $75\text{mg/mL}$ 、约 $1\text{mg/mL}$ 至约 $75\text{mg/mL}$ 、约 $10\text{mg/mL}$ 至约 $75\text{mg/mL}$ 、约 $25\text{mg/mL}$ 至约 $75\text{mg/mL}$ 、约 $50\text{mg/mL}$ 至约 $75\text{mg/mL}$ 、约 $10\mu\text{g/mL}$ 至约 $50\text{mg/mL}$ 、约 $25\mu\text{g/mL}$ 至约 $50\text{mg/mL}$ 、约 $50\mu\text{g/mL}$ 至约 $50\text{mg/mL}$ 、约 $75\mu\text{g/mL}$ 至约 $50\text{mg/mL}$ 、约 $100\mu\text{g/mL}$ 至约 $50\text{mg/mL}$ 、约 $250\mu\text{g/mL}$ 至约 $50\text{mg/mL}$ 、约 $500\mu\text{g/mL}$ 至约 $50\text{mg/mL}$ 、约 $750\mu\text{g/mL}$ 至约 $50\text{mg/mL}$ 、约 $1\text{mg/mL}$ 至约 $50\text{mg/mL}$ 、约 $10\text{mg/mL}$ 至约 $50\text{mg/mL}$ 、约 $25\text{mg/mL}$ 至约 $50\text{mg/mL}$ 、约 $10\mu\text{g/mL}$ 至约 $25\text{mg/mL}$ 、约 $25\mu\text{g/mL}$ 至约 $25\text{mg/mL}$ 、约 $50\mu\text{g/mL}$ 至约 $25\text{mg/mL}$ 、约 $75\mu\text{g/mL}$ 至约 $25\text{mg/mL}$ 、约 $100\mu\text{g/mL}$ 至约 $25\text{mg/mL}$ 、约 $250\mu\text{g/mL}$ 至约 $25\text{mg/mL}$ 、约 $500\mu\text{g/mL}$ 至约 $25\text{mg/mL}$ 、约 $750\mu\text{g/mL}$ 至约 $25\text{mg/mL}$ 、约 $1\text{mg/mL}$ 至约 $25\text{mg/mL}$ 、约 $10\text{mg/mL}$ 至约 $25\text{mg/mL}$ 、约 $10\mu\text{g/mL}$ 至约 $10\text{mg/mL}$ 、约 $25\mu\text{g/mL}$ 至约 $10\text{mg/mL}$ 、约 $50\mu\text{g/mL}$ 至约 $10\text{mg/mL}$ 、约 $75\mu\text{g/mL}$ 至约 $10\text{mg/mL}$ 、约 $100\mu\text{g/mL}$ 至约 $10\text{mg/mL}$ 、约 $250\mu\text{g/mL}$ 至约 $10\text{mg/mL}$ 、约 $500\mu\text{g/mL}$ 至约 $10\text{mg/mL}$ 、约 $750\mu\text{g/mL}$ 至约 $10\text{mg/mL}$ 、约 $1\text{mg/mL}$ 至约 $10\text{mg/mL}$ 、约 $10\text{mg/mL}$ 至约 $1\text{mg/mL}$ 、约 $25\mu\text{g/mL}$ 至约 $1\text{mg/mL}$ 、约 $50\mu\text{g/mL}$ 至约 $1\text{mg/mL}$ 、约 $75\mu\text{g/mL}$ 至约 $1\text{mg/mL}$ 、约 $100\mu\text{g/mL}$ 至约 $1\text{mg/mL}$ 、约 $250\mu\text{g/mL}$ 至约 $1\text{mg/mL}$ 、约 $500\mu\text{g/mL}$ 至约 $1\text{mg/mL}$ 、约 $750\mu\text{g/mL}$ 至约 $1\text{mg/mL}$ 、约 $10\mu\text{g/mL}$ 至约 $750\mu\text{g/mL}$ 、约 $25\mu\text{g/mL}$ 至约 $750\mu\text{g/mL}$ 、约 $50\mu\text{g/mL}$ 至约 $750\mu\text{g/mL}$ 、约 $75$

$\mu\text{g/mL}$ 至约 $750\mu\text{g/mL}$ 、约 $100\mu\text{g/mL}$ 至约 $750\mu\text{g/mL}$ 、约 $250\mu\text{g/mL}$ 至约 $750\mu\text{g/mL}$ 、约 $500\mu\text{g/mL}$ 至约 $750\mu\text{g/mL}$ 、约 $10\mu\text{g/mL}$ 至约 $500\mu\text{g/mL}$ 、约 $25\mu\text{g/mL}$ 至约 $500\mu\text{g/mL}$ 、约 $50\mu\text{g/mL}$ 至约 $500\mu\text{g/mL}$ 、约 $75\mu\text{g/mL}$ 至约 $500\mu\text{g/mL}$ 、约 $100\mu\text{g/mL}$ 至约 $500\mu\text{g/mL}$ 、约 $250\mu\text{g/mL}$ 至约 $500\mu\text{g/mL}$ 、约 $10\mu\text{g/mL}$ 至约 $250\mu\text{g/mL}$ 、约 $25\mu\text{g/mL}$ 至约 $250\mu\text{g/mL}$ 、约 $50\mu\text{g/mL}$ 至约 $250\mu\text{g/mL}$ 、约 $75\mu\text{g/mL}$ 至约 $250\mu\text{g/mL}$ 、约 $100\mu\text{g/mL}$ 至约 $250\mu\text{g/mL}$ 、约 $10\mu\text{g/mL}$ 至约 $100\mu\text{g/mL}$ 、约 $25\mu\text{g/mL}$ 至约 $100\mu\text{g/mL}$ 、约 $50\mu\text{g/mL}$ 至约 $100\mu\text{g/mL}$ 、约 $75\mu\text{g/mL}$ 至约 $100\mu\text{g/mL}$ 、约 $10\mu\text{g/mL}$ 至约 $75\mu\text{g/mL}$ 、约 $25\mu\text{g/mL}$ 至约 $75\mu\text{g/mL}$ 、约 $50\mu\text{g/mL}$ 至约 $75\mu\text{g/mL}$ 、约 $10\mu\text{g/mL}$ 至约 $50\mu\text{g/mL}$ 、约 $25\mu\text{g/mL}$ 至约 $50\mu\text{g/mL}$ 、或约 $10\mu\text{g/mL}$ 至约 $25\mu\text{g/mL}$ 的最大浓度( $C_{\max}$ )。在一些实施方案中,在施用于有需要的受试者后,自组装多肽复合物具有至少 $10\mu\text{g/mL}$ 、至少 $25\mu\text{g/mL}$ 、至少 $50\mu\text{g/mL}$ 、至少 $100\mu\text{g/mL}$ 、至少 $250\mu\text{g/mL}$ 、至少 $500\mu\text{g/mL}$ 、至少 $750\mu\text{g/mL}$ 、至少 $1\text{mg/mL}$ 、至少 $10\text{mg/mL}$ 、至少 $25\text{mg/mL}$ 、至少 $50\text{mg/mL}$ 、至少 $75\text{mg/mL}$ 、至少 $100\text{mg/mL}$ 、至少 $250\text{mg/mL}$ 、至少 $500\text{mg/mL}$ 或至少 $750\text{mg/mL}$ 的最大浓度( $C_{\max}$ )。

#### [0149] 效果

[0150] 在一些实施方案中,向受试者施用如本文所公开的自组装多肽复合物导致受试者临床结果或指标的改善。例如,在患有肿瘤的受试者中,施用自组装多肽复合物可以抑制或减慢肿瘤的进展,例如引起肿瘤的消退。在一些实施方案中,施用自组装多肽复合物导致肿瘤完全消退。

#### [0151] C. 治疗方法

[0152] 在一个方面,提供了可用于治疗、改善或预防疾病或病状(例如,传染病、癌症或自身免疫性疾病)的方法,其通常包括向受试者施用包含本公开的自组装多肽复合物的组合物的步骤。

[0153] 在一些实施方案中,受试者是哺乳动物,例如人。

[0154] 用于施用于受试者的组合物通常包含如本文所公开的自组装多肽复合物。在一些实施方案中,此类组合物还包含药学上可接受的赋形剂。

[0155] 组合物可配制用于多种施用途径中的任一种的施用,所述施用途径包括全身途径(例如口服、吸入、鼻内、静脉内、腹膜内、皮下或肌内施用)。

[0156] 在一些实施方案中,施用步骤导致受试者的一种或多种临床结果或指标的改善。

[0157] 在一些实施方案中,施用步骤导致减慢或抑制肿瘤的进展,例如肿瘤的消退。在一些实施方案中,施用步骤导致肿瘤完全消退。

#### [0158] 实施例

##### [0159] 实施例1. 代表性DR5靶向Multabody的构建和表达

[0160] 本实施例描述了包含融合蛋白组合的DR5靶向Multabody(MB)的生成,所述融合蛋白包含经由接头(诸如如本文所述的 $(\text{Gly}_n\text{-Ser})_m$ 氨基酸接头)融合的(1)人铁蛋白轻链或其亚基和(2)单链Fab(scFab)或单链Fc二聚体(scFc)。

[0161] 制备基因,所述基因编码融合蛋白(1)抗DR5抗体(在这种情况下,可那木单抗)的scFab,其融合至hFTL的N末端(aDR5-hFTL, SEQ ID NO:9), (2)抗DR5抗体的scFab,其融合至N-半铁蛋白的N末端(aDR5-N\_hFTL, SEQ ID NO:11), 以及(3)scFc,其融合至C-半铁蛋白的N末端(各种scFc-C\_hFTL构建体,如下文进一步描述),以2:1:1的摩尔比混合并且瞬时转染到ExpiCHO-S细胞中以产生和形成DR5靶向MB。参见图1B。

[0162] scFc-铁蛋白融合蛋白包含野生型(WT)或工程化IgG1 Fc链。工程化IgG1 Fc链含

有L234A、L235A、G236R、G237A、P329G和A330L突变的各种组合,如下表1所示。表1中的编号根据EU编号方案。

[0163] 表1.用于Multabody的IgG1 Fc链内的某些位置处的残基和scFc-C\_hFTL构建体的对应SEQ ID NO

[0164] 在对应于工程化Fc链组的行中,仅显示与野生型残基不同的位置处的残基。

氨基酸位置→	234	235	236	237	329	330	对应的scFc-C_hFTL构建体的SEQ ID NO:
WT (野生型)	L	L	G	G	P	A	SEQ ID NO:13
LALA	A	A					SEQ ID NO:14
LALAP	A	A			G		SEQ ID NO:15
LLRAL	A	A	R	A		L	SEQ ID NO:16
LLGRA L	A	A	R	A	G	L	SEQ ID NO:17

[0166] 实施例2.通过生物层干涉测量法确定的Multabody的靶标结合

[0167] 使用Octet RED96仪器通过生物层干涉测量法 (BLI) 确定如实施例1中所述生成的示例性MB对重组人DR5 (hDR5)、食蟹猴DR5 (cDR5)、小鼠DR5 (mDR5) 和大鼠DR5 (rDR5) 的结合动力学和亲和力。确定了(1)可那木单抗(一种与DR5结合的全人单克隆IgG1抗体)和(2)Cona MB IgG1 LLRAL(一种Multabody,其包括有包括scFc(所述scFc具有表1中描述的“LLRAL”突变)的融合多肽,并且还包括包含衍生自可那木单抗的scFab的融合多肽)的结合特性。

[0168] 简而言之,Ni-NTA生物传感器涂有hDR5-His、cDR5-His、mDR5-His或rDR5-His(具有C末端聚组氨酸标签的hDR5、cDR5、mDR5或rDR5的细胞外结构域)以达到0.8nm的信号响应。将涂覆的生物传感器浸入到含有测试MB的系列稀释(20-10<sup>-5</sup>-2.5-1.25-0.63nM)的PBS-0.02%T-0.01%BSA(补充有0.02%(体积/体积)Tween 20和0.01%(重量/体积)BSA的PBS)溶液的孔中,持续180秒(缔合阶段),然后浸入到PBS-0.02%T-0.01%BSA中,持续180秒(解离阶段)。所有测量都在30°C下在PBS-0.02%T-0.01%BSA,pH 7.4中执行,振荡速度1000rpm,并且实时监测。生物传感器通过施加10mM甘氨酸(pH 1.7)5秒在实验之间进行四次再生,然后用10mM NiSO<sub>4</sub>充电1分钟。

[0169] 根据缔合阶段结束时的最大缔合结合响应、解离速率( $k_{off}$ )和/或使用1:1拟合模型计算的平衡解离常数( $K_D$ )来评价靶标结合。当测试MB浓度为20nM时,小于0.1nm的最大缔合结合响应被分类为“非结合”。

[0170] 确定的测试分子的 $k_{on}$ 、 $k_{off}$ 和所得 $K_D$ 的值总结在表2中。Cona MB IgG1 LLRAL以大约皮摩尔或更低的亲和力与人和食蟹猴DR5结合,并且显示与小鼠或大鼠DR5不结合。(仪器的检测限为1皮摩尔。)这些观察结果与可那木单抗(“Cona”)的结合特征一致。

[0171] 表2.通过BLI确定的Multabody对靶标结合的动力学常数和亲和力

测试制品	hDR5			cDR5			mDR5	rDR5
	$k_{on}$ [M <sup>-1</sup> x s <sup>-1</sup> ]	$k_{off}$ [s <sup>-1</sup> ]	$K_D$ [M]	$k_{on}$ [M <sup>-1</sup> x s <sup>-1</sup> ]	$k_{off}$ [s <sup>-1</sup> ]	$K_D$ [M]		
[0172] Cona MB IgG1 LLRAL	$1.4 \times 10^6$	$<1.0 \times 10^{-7}$	$<1.0 \times 10^{-12}$	$1.5 \times 10^6$	$<1.0 \times 10^{-7}$	$<1.0 \times 10^{-12}$	非结合	非结合
Cona	$2.4 \times 10^5$	$2.2 \times 10^{-5}$	$8.9 \times 10^{-11}$	ND	ND	ND		

[0173] 实施例3.通过生物层干涉测量法确定的Multabody的结合特异性

[0174] 采用BLI来评估示例性DR靶向MB与相关肿瘤坏死因子受体超家族(TNFRSF)成员的非特异性结合。

[0175] 实验以类似于实施例2中所述的方式执行,不同之处在于将人DR4、人骨保护素(OPG)、人诱骗受体1(DcR1)的His标记的细胞外结构域、或人DcR2—hDR4-His、hOPG-His、hDcR1-His或hDcR2-His涂覆到Ni-NTA生物传感器上,并且用不同浓度的测试MB进行滴定。

[0176] 图2A、图2B、图2C、图2D和图2E示出了所得传感图的相关片段的代表性实例。Cona MB IgG1 LLRAL以高特异性结合DR5,并且显示与其他测试的TNFRSF成员不结合。

[0177] 实施例4.通过生物层干涉测量法确定Multabody与Fc受体的结合

[0178] 通过BLI确定各种DR5靶向MB(每个包含不同的Fc突变组,并且如实施例1中所述生成)对各种Fc受体的结合动力学和亲和力。

[0179] 本实施例中测试的所有MB都含有包含scFab的多肽,所述scFab衍生自与DR5结合的可那木单抗。这些DR5靶向MB(“Cona MB”)还包括具有scFc的多肽,所述scFc具有野生型Fc链(IgG1 wt)或具有某些突变组合的Fc链(IgG1 LLRAL)。(参见表1)

[0180] 确定了与以下人、食蟹猴和小鼠Fc受体的结合:人Fc gamma受体I型(hFc γ RI)、hFc γ RIIa、hFc γ RIIb、hFc γ RIIIa、hFc γ RIIIb、人新生儿Fc受体(hFcRn)、食蟹猴Fc γ RI(cFc γ RI)、cFc γ RIIa、cFc γ RIIb、cFc γ RIII、cFcRn、小鼠Fc γ RI(mFc γ RI)、mFc γ RIIb、mFc γ RIII、mFc γ RIV和mFcRn。

[0181] 实验以类似于实施例2中所述的方式执行,不同之处在于将His标记的Fc受体涂覆到Ni-NTA生物传感器上并且用不同浓度的测试MB滴定。为了评估MB进行内体再循环的潜力,在pH 6.0下测量与FcRn的结合的缔合,并且在pH 7.4下测量解离。

[0182] 表3总结了确定的与各种Fc γ R结合的MB的 $k_{on}$ 、 $k_{off}$ 和 $K_D$ 值。具有野生型IgG1 Fc(IgG1 WT)的Cona MB与人、食蟹猴和小鼠Fc γ R结合。具有IgG1 LLRAL的Cona MB显示出与人、食蟹猴和小鼠Fc γ R的结合减弱。

[0183] 图3示出了FcRn结合研究的所得传感图的相关片段的代表性实例。所有测试的MB在pH 6.0下与人、食蟹猴和小鼠FcRn结合,并且在pH 7.4下与受体解离。Cona MB IgG1 LLRAL在pH 7.4下以与Cona MB IgG1 WT相当的速率与人或食蟹猴FcRn解离。

[0184] 表3.通过BLI确定的Multabody对Fc γ R的动力学常数和亲和力

		Cona MB IgG1 WT	Cona MB IgG1 LLRAL
hFcγRI	$k_{on}$ [ $M^{-1} \times s^{-1}$ ]	$5.67 \times 10^5$	非结合
	$k_{off}$ [ $s^{-1}$ ]	$<1.0 \times 10^{-7}$	
	$K_D$ [M]	$<1.0 \times 10^{-12}$	
hFcγRIIa	$k_{on}$ [ $M^{-1} \times s^{-1}$ ]	$1.34 \times 10^6$	非结合
	$k_{off}$ [ $s^{-1}$ ]	$<1.0 \times 10^{-7}$	
	$K_D$ [M]	$<1.0 \times 10^{-12}$	
hFcγRIIb	$k_{on}$ [ $M^{-1} \times s^{-1}$ ]	$1.47 \times 10^6$	非结合
	$k_{off}$ [ $s^{-1}$ ]	$<1.0 \times 10^{-7}$	
	$K_D$ [M]	$4.81 \times 10^{-12}$	
hFcγRIIIa	$k_{on}$ [ $M^{-1} \times s^{-1}$ ]	$1.32 \times 10^6$	非结合
	$k_{off}$ [ $s^{-1}$ ]	$<1.0 \times 10^{-7}$	
	$K_D$ [M]	$<1.0 \times 10^{-12}$	
hFcγRIIIb	$k_{on}$ [ $M^{-1} \times s^{-1}$ ]	$1.57 \times 10^6$	非结合
	$k_{off}$ [ $s^{-1}$ ]	$8.44 \times 10^{-5}$	
	$K_D$ [M]	$5.37 \times 10^{-11}$	
cFcγRI	$k_{on}$ [ $M^{-1} \times s^{-1}$ ]	$4.72 \times 10^5$	非结合
	$k_{off}$ [ $s^{-1}$ ]	$<1.0 \times 10^{-7}$	
	$K_D$ [M]	$<1.0 \times 10^{-12}$	
cFcγRIIa	$k_{on}$ [ $M^{-1} \times s^{-1}$ ]	$1.01 \times 10^6$	非结合
	$k_{off}$ [ $s^{-1}$ ]	$2.01 \times 10^{-4}$	
	$K_D$ [M]	$1.99 \times 10^{-10}$	
cFcγRIIb	$k_{on}$ [ $M^{-1} \times s^{-1}$ ]	$1.07 \times 10^6$	非结合
	$k_{off}$ [ $s^{-1}$ ]	$1.79 \times 10^{-4}$	
	$K_D$ [M]	$1.67 \times 10^{-10}$	
cFcγRIII	$k_{on}$ [ $M^{-1} \times s^{-1}$ ]	$3.22 \times 10^5$	非结合
	$k_{off}$ [ $s^{-1}$ ]	$<1.0 \times 10^{-7}$	
	$K_D$ [M]	$<1.0 \times 10^{-12}$	
mFcγRI	$k_{on}$ [ $M^{-1} \times s^{-1}$ ]	$7.46 \times 10^5$	非结合
	$k_{off}$ [ $s^{-1}$ ]	$<1.0 \times 10^{-7}$	
	$K_D$ [M]	$<1.0 \times 10^{-12}$	
mFcγRIIb	$k_{on}$ [ $M^{-1} \times s^{-1}$ ]	$8.89 \times 10^5$	非结合
	$k_{off}$ [ $s^{-1}$ ]	$2.98 \times 10^{-4}$	
	$K_D$ [M]	$3.35 \times 10^{-10}$	
mFcγRIII	$k_{on}$ [ $M^{-1} \times s^{-1}$ ]	$7.04 \times 10^5$	非结合
	$k_{off}$ [ $s^{-1}$ ]	$4.90 \times 10^{-4}$	
	$K_D$ [M]	$6.96 \times 10^{-10}$	
mFcγRIV	$k_{on}$ [ $M^{-1} \times s^{-1}$ ]	$3.56 \times 10^5$	非结合
	$k_{off}$ [ $s^{-1}$ ]	$<1.0 \times 10^{-7}$	
	$K_D$ [M]	$<1.0 \times 10^{-12}$	

[0185]

[0186] 实施例5. 体外肿瘤细胞的细胞毒性的评估

[0187] 使用不同的肿瘤细胞系评价示例性DR5靶向MB(如实施例1中所述生成)的细胞毒性。在COLO 205(人结肠癌)、HCT-15(人结肠癌)、NCI-H2122(人肺癌)、SNU-5(人胃癌)、Capan-1(人胰腺癌)、MDA-MB-231(浸润性导管癌)、BxPC-3(人胰腺癌)和NCI-H2228(人肺癌)细胞系上测试Cona MB IgG1 wt和Cona MB IgG1 LLRAL。

[0188] 将肿瘤细胞系以5000个细胞/孔接种到96孔板中并孵育过夜以促进附着。第二天,用DR5靶向MB或抗DR5(可那木单抗)的系列稀释处理细胞,并且在37°C下孵育24小时。根据制造商的说明,使用CellTiter-Glo发光细胞活力测定(Promega)来测量细胞活力。简而言之,在室温下将测定试剂(100 $\mu$ L)添加到100 $\mu$ L细胞中,使用平板摇床以500rpm混合2分钟,并且在室温下孵育10分钟。使用Synergy Neo2多模式测定微孔板读板器(BioTek Instruments)读取发光信号。

[0189] 图4示出了这些实验的结果。在图4中,将活细胞的百分比(与媒介物处理的肿瘤细胞相比)绘制在y轴上,并且测试分子浓度绘制在x轴上。使用Prism 9.1.2软件(GraphPad)和非线性回归(对数抑制剂与响应、可变斜率、4个参数)对数据进行拟合。表4提供了所得的IC<sub>50</sub>值。两种测试的DR5靶向MB(Cona MB IgG1 wt和Cona MB IgG1LLRAL)均能够诱导人癌细胞系的细胞毒性。在另一个方面,可那木单抗(一种IgG1抗体)不诱导肿瘤细胞毒性,或者诱导效果非常差。

[0190] 表4. 肿瘤细胞的细胞毒性的评估

		Cona	Cona MB IgG1 wt	Cona MB IgG1 LLRAL
[0191]	<b>IC<sub>50</sub> [pM]</b>			
	<b>COLO 205</b>	> 33000	4.06	2.38
	<b>HCT-15</b>	> 33000	13.58	9.53
	<b>NCI-2122</b>	> 33000	4.99	5.86
	<b>SNU-5</b>	> 33000	11.14	9.51
	<b>Capan-1</b>	> 33000	13.73	15.7
	<b>MDA-MB-231</b>	> 33000	34.17	23.96
	<b>BxPC-3</b>	> 33000	54.64	50.2
	<b>NCI-H2228</b>	> 33000	79.67	77.15

[0192] 实施例6. Multabody在小鼠中的药代动力学

[0193] 在8周龄雌性BALB/c SCID小鼠(Jackson Labs)中分析如实施例1中所述生成的示例性DR5靶向MB(Cona MB IgG1 LLRAL和可那木单抗)的药代动力学(PK)。

[0194] 对于单剂量PK研究,小鼠以5mg/kg腹膜内(i.p.)或静脉内(i.v.)单次推注200 $\mu$ L测试分子(N=8只小鼠/组,N=4只小鼠/时间点)。在3小时、24小时、48小时、72小时、5天、7天、15天和21天的时间点收集50-100 $\mu$ L血液样品。

[0195] 对于多剂量PK研究,在第9天以5mg/kg向小鼠注射200 $\mu$ L测试分子,然后在96小时后以5mg/kg第二次注射200 $\mu$ L测试分子。在第一次给药后3小时、24小时、48小时、72小时和96小时以及第二次给药后3小时、24小时、48小时、72小时、5天、7天和14天收集50-100 $\mu$ L血液样品。

[0196] 将血液样品从隐静脉收集到涂有肝素的管中,并进行手指涡旋以确保混合。随后,将样品在4°C下以1500x g离心15分钟,并且收集血浆样品并立即在-80°C下储存,直至用于ELISA测定。

[0197] 为了使用ELISA测量血浆药物水平,在4°C下将PBS中的2 $\mu$ g/mL的重组DR5涂覆到Maxisorp板(Fisher Scientific)上过夜。用PBS-0.05%T(补充有0.05%(体积/体积)Tween-20的PBS)洗涤两次后,将板用3%(重量/体积)BSA的PBS溶液在室温下封闭1小时,并且随后用PBS-0.05%T洗涤两次。将血浆样品稀释在PBS-0.05%T-0.5%BSA(补充有0.05%

(体积/体积) Tween-20和0.5% (重量/体积) BSA的PBS) 中, 添加到孔中, 并且在室温和500rpm的振荡频率下孵育1小时, 然后用PBS-0.05% T进行另一个洗涤步骤。通过与1:10000稀释的山羊多克隆抗人Fc-HRP二抗(Jackson Immunoresearch) 一起孵育来检测结合分子。用PBS-0.05% T进一步洗涤后, 按照制造商的说明使用OptEIA™TMB底物试剂套装(BD Biosciences) 进行检测, 并且使用Synergy Neo2多功能测定微板读板器(BioTek Instruments) 读取450nm处的吸光度。使用测试分子在PBS-0.05% T-0.5% BSA中的稀释液制备校准曲线。

[0198] 图5A是说明这些药代动力学研究的设计的示意图。

[0199] 图5B示出了Cona MB IgG1 wt、Cona MB IgG1 LLRAL和可那木单抗(“Cona”)的单剂量PK研究中的血浆浓度随时间变化的图。表5示出了计算的半衰期的总结。与Cona MB IgG1 wt相比, Cona MB IgG1 LLRAL显示出显著增强的PK性质。在前7天, Cona MB IgG1 LLRAL的血浆浓度与可那木单抗相当。第15天的Cona MB IgG1 LLRAL血浆浓度是在体外细胞毒性测定(参见实施例5)中测定的IC<sub>50</sub>值(约0.04μg/mL)的125倍, 并且在第21天是所述IC<sub>50</sub>值的40倍。

[0200] 图5C示出了Cona MB IgG1 LLRAL和可那木单抗的多剂量PK研究中的血浆浓度随时间变化的图。

[0201] 表5. 单次给药后在小鼠中的半衰期

半衰期[天]	Cona i.v.	Cona MB IgG1 LLRAL i.v.	Cona MB IgG1 wt i.v.
3 h - 24 h	3.5	1.0	0.9
24 h - 5 天	5.7	5.2	1.5
5 天 - 15 天	14.8	3.1	2.2

[0202] 实施例7. DR5靶向Multabody在异种移植小鼠模型中的治疗效果

[0204] 在结肠癌异种移植模型中评价了示例性Multabody的治疗效果。图6A示出了说明体内功效研究的研究设计的示意图。

[0205] 将 $5 \times 10^6$ 个COLO 205细胞皮下注射到BALB/c SCID小鼠的侧腹(n=12只/组)。允许肿瘤生长至200mm<sup>3</sup>的平均大小。将小鼠分入治疗组或对照组, 使得各组的平均肿瘤体积相等(图6B)。小鼠每周一次或两次经由腹膜内(i.p.)注射接受治疗(每个剂量5mg/kg)或对照, 持续两周(图6A)。使用卡尺每周两次测量肿瘤体积。在初次给药后24小时、7天、14天和21天收集血液样品, 并如实施例6中所述测量血浆中的药物水平。

[0206] 图6B-图6G是描绘各组小鼠的肿瘤体积的图。图6B和图6D-图6G中的图示出了肿瘤体积随时间的变化, 并且图6C中的图示出了治疗开始后第88天的肿瘤体积。每周一次或两次Cona MB IgG1 LLRAL治疗显著抑制了已形成的大肿瘤的生长, 这表明Cona MB IgG1 LLRAL能够穿透即使是大小较大的肿瘤。Cona MB IgG1 LLRAL比可那木单抗更能抑制肿瘤生长, 每周一次治疗组和每周两次治疗组分别有9/12和11/12的完全消退。相比之下, 可那木单抗治疗组中只有1/12的完全缓解。

[0207] 图6H是示出血浆中的测试分子浓度(y轴)与第一次给药后的时间(x轴)的关系的图。在COLO205结肠癌小鼠模型中观察到的Cona MB IgG1 LLRAL的药代动力学特征与在实

施例6中描述的多剂量PK研究中观察到的相似。(参见图5B)。这些结果表明肿瘤的存在不影响Multabody的清除。

[0208] 在使用相同研究设计的第二项研究中重复了这些实验,使用媒介物、可那木单抗或Cona MB IgG1 LLRAL,每周一次,持续两周,每个剂量为5mg/kg。第二项研究的结果与第一项研究类似:媒介物组中未观察到肿瘤消退,可那木单抗组中的10只小鼠均未表现出肿瘤完全消退,而Cona MB IgG1 LLRAL组中的所有10只小鼠均表现出肿瘤完全消退(数据未示出)。第二项研究的结果表明,Cona MB IgG1LLRAL每周给药一次的治疗效果具有高度可重复性。

[0209] 实施例8.DR5靶向Multabody在异种移植小鼠模型中的剂量范围功效

[0210] 还在实施例6中使用的相同结肠癌异种移植模型中探索了Cona IgG1 MB LLRAL的剂量范围功效。

[0211] 将 $5 \times 10^6$ 个COLO 205细胞皮下注射到Balb/c SCID小鼠的侧腹。允许肿瘤生长至 $200\text{mm}^3$ 的平均大小。将小鼠分到五组之一中(媒介物或每个剂量0.1mg/kg、0.25mg/kg、1mg/kg或5mg/kg的Cona MB IgG1 LLRAL),使得各组的平均肿瘤体积相等。小鼠每周一次经由腹膜内(i.p.)注射接受治疗或媒介物,持续三周。使用卡尺每周两次测量肿瘤体积。在整个实验过程中获取血液样品。

[0212] 图7A是描绘第一次给药后各组小鼠的肿瘤体积随时间变化的图。“MB”表示Cona MB IgG1 LLRAL组。图7B-图7F示出了媒介物组(图7B)以及5mg/kg、1mg/kg、0.25mg/kg和0.1mg/kg Cona MB IgG1 LLRAL治疗组(分别为图7C、图7D、图7E和图7F)内的个体小鼠的肿瘤体积。如图7A所示,用0.25mg/kg、1mg/kg/和5mg/kg剂量的Cona MB IgG1 LLRAL治疗的小鼠与媒介物组相比显示出显著改善。Cona MB IgG1 LLRAL最初在1mg/kg和5mg/kg剂量下似乎具有类似的功效。然而,与5mg/kg治疗组(其中在12只小鼠的12只中观察到完全消退)相比,1mg/kg治疗组显示出更少的完全消退和更多的再生。

[0213] 图7G是描绘施用第一剂量后,在各个时间点收集的血液样品中的可检测的Cona MB IgG1 LLRAL的量的图。在0.1mg/kg、0.25mg/kg、1mg/kg和5mg/kg Cona MB IgG1 LLRAL治疗组中,在测试的所有时间点血浆中均可检测到Cona MB IgG1 LLRAL,药代动力学在所有剂量组中均呈线性。

[0214] 这些结果证明了Cona MB IgG1 LLRAL在多个测试剂量下表现出治疗功效,包括在比实施例6中测试的剂量水平低五倍的剂量水平下的相当功效。然而,虽然在5mg/kg剂量水平下观察到肿瘤完全消退,但当剂量水平降低至1mg/kg时观察到一些肿瘤再生。

[0215] 实施例9.DR5靶向Multabody的大肿瘤穿透和细胞凋亡诱导

[0216] 评价如实施例1中所述生成的示例性Multabody在结肠异种移植模型中穿透大肿瘤和诱导细胞凋亡的能力。

[0217] 将 $5 \times 10^6$ 个COLO 205细胞皮下注射到Balb/c SCID小鼠的侧腹。允许肿瘤至 $500\text{mm}^3$ 的平均大小。使用卡尺每周两次测量肿瘤体积。将小鼠随机分配至媒介物组或治疗组,使得两个组中的平均肿瘤大小相等,每个组中为约 $500\text{mm}^3$ 。然后通过腹膜内(i.p.)注射向小鼠施用一个剂量媒介物或5mg/kg Cona MB IgG1 LLRAL。在注射媒介物或Cona MB IgG1 LLRAL后24小时收集血液样品,并且收获肿瘤用于随后的组织学分析。图8描绘了这些实验的示意图和时间轴。

[0218] 将肿瘤固定在福尔马林中,包埋在石蜡中,并且切片。针对切割的半胱天冬酶-3 (一种细胞凋亡标志物)对肿瘤切片进行免疫组织化学染色。染色组织切片的代表性图像在图9A和图9C(媒介物治疗的小鼠)和图9B和图9D(Cona MB IgG1 LLRAL治疗的小鼠)中示出。如这些图所示,在媒介物治疗的小鼠的肿瘤切片中检测到很少的凋亡细胞。相比之下,来自 Cona MB IgG1 LLRAL治疗的小鼠的组织切片在整个肿瘤中(包括远离肿瘤边缘的肿瘤核心深处)含有很大比例的凋亡细胞(参见图9B和图9D中的染色细胞)。

[0219] 这些结果证实了Cona MB IgG1 LLRAL在整个肿瘤中诱导肿瘤细胞的凋亡。此外,这些结果证实了Multabody能够穿透到已形成的大肿瘤的核心中。

[0220] 序列表

[0221] 融合序列内的下划线表示接头序列。

[0222] 融合序列内的粗体表示铁蛋白或铁蛋白亚基序列。

[0223] 在可变区序列内,下划线和粗体一起表示互补决定区序列。

[0224] 方框和粗体残基表示相对于参考分子(例如,相对于IgG1 Fc)发生突变的残基。

**SEQ ID NO:1**            **hFTL**

MSSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEEKREG  
YERLLKMQNQRGGRALFQDIKKPAEDEWGKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHALGSARTDP  
HLCDFLETHFLDEEVKLIKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLRHD

[0225]

**SEQ ID NO:2**            **N\_hFTL**

MSSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEEKREG  
YERLLKMQNQRGGRALFQDIKKPAEDEW



LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL  
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMH  
EALHNHYTQKSLSLSPGK

**SEQ ID NO:8 Cona scFab**

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQGISRSYLAWEYQKPGQAPSLLIYGASSRATGIPDR  
FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQFGSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE  
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSLSTLTLSKAD  
YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG  
GSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG  
GGSISSGDYFWSWIRQLPGKGLEWIGHIHNSGTTYINPSLKSRTISVDTSKKQFSLRLSSV  
TAADTAVYYCARDRGGDYGGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC  
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPK  
SNTKVDKDKVEPKSCD

**SEQ ID NO:9 aDR5-hFTL**

[0227]

LEEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQGISRSYLAWEYQKPGQAPSLLIYGASSRATGIP  
DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQFGSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS  
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSLSTLTLSK  
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG  
GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG  
VSGGSISSGDYFWSWIRQLPGKGLEWIGHIHNSGTTYINPSLKSRTISVDTSKKQFSLRLS  
SVTAADTAVYYCARDRGGDYGGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL  
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH  
KPSNTKVDKDKVEPKSCDGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG  
**MSSQIRQNYSTDVEAAVN**  
**SLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEEKREGYERLLKMQNRGGRALFQ**  
**DIKKPAEDEWGKTPDAMKAAMALEKKNQALLDLHALGSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKLI**  
**KKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLRHD**

**SEQ ID NO: 10 aDR5-hFTL, 替代序列**

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQGISRSYLAWEYQKPGQAPSLLIYGASSRATGIPDR  
FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQFGSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE  
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSLSTLTLSKAD

YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG  
GSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG  
 GGSISSGDYFWSWIRQLPGKGLEWIGHIHNSGTTYYNPSLKSRVTISVDTSKKQFSLRLSSV  
 TAADTAVYYCARDRGGDYYYGMDVWGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC  
 LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP  
 SNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG**SSQIRQNYSTDVEAAVNSLV**  
**NLYLQASytyLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEEKREGYERLLKMQNQRGGRALFQDIK**  
**KPAEDEWKTDPAMKAAMALEKKNQALLDLHALGSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKLIKMM**  
**GDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLRHD**

SEQ ID NO:11 aDR5-N\_hFTL

[0228]

EIVLTQSPGTLSSLPGERATLSCRASQGISRSYLAWYQQKPGQAPSLLIYGASSRATGIPDR  
 FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQFGSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE  
 QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKAD  
 YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG  
GSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG  
 GGSISSGDYFWSWIRQLPGKGLEWIGHIHNSGTTYYNPSLKSRVTISVDTSKKQFSLRLSSV  
 TAADTAVYYCARDRGGDYYYGMDVWGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC  
 LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP  
 SNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG**MSSQIRQNYSTDVEAAVNSLV**  
**VNLYLQASytyLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEEKREGYERLLKMQNQRGGRALFQDI**  
**KKPAEDEW**

SEQID NO: 12 aDR5-N\_hFTL, 替代序列

EIVLTQSPGTLSSLPGERATLSCRASQGISRSYLAWYQQKPGQAPSLLIYGASSRATGIPDR  
 FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQFGSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE  
 QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKAD  
 YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG  
GSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG  
 GGSISSGDYFWSWIRQLPGKGLEWIGHIHNSGTTYYNPSLKSRVTISVDTSKKQFSLRLSSV  
 TAADTAVYYCARDRGGDYYYGMDVWGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC  
 LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP  
 SNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG**SSQIRQNYSTDVEAAVNSLV**

NLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEEKREGYERLLKMQNQRGGRALFQDIK  
KPAEDEW

SEQ ID NO:13 scFc-C\_hFTL IgG1 WT

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV  
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR  
EPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFL  
YSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG  
GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPE  
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREE  
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQ  
GNV FSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGKTPDAM  
KAAMALEKKLNQALLDLHALGSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKLIKMGDHLTNLHRLGGPE  
AGLGEYLFERLTLRHD

[0229]

SEQ ID NO:14 scFc-C\_hFTL IgG1 LALA

DKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV  
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR  
EPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFL  
YSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG  
GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPE  
AAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREE  
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQ  
GNV FSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGKTPDAM  
KAAMALEKKLNQALLDLHALGSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKLIKMGDHLTNLHRLGGPE  
AGLGEYLFERLTLRHD

SEQ ID NO:15 scFc-C\_hFTL IgG1 LALAP

DKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV  
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR



[0232] SEQ ID NO:18GS接头序列

[0233] GGGG

[0234] SEQ ID NO:19GS接头序列

[0235] GGGG

[0236] 等效方案/其他实施方案

[0237] 尽管已经结合其具体的实施方案描述本发明,但应当理解能够对本发明进行进一步的修改,并且本申请旨在涵盖大体上符合本发明的原理的、包括虽然不属于本公开的范围但属于本发明所属领域的公知技术或常用的手段并可以应用于上文中阐述的必要特征中的任何变型、用途或者变更。

人铁蛋白轻链(hFTL)

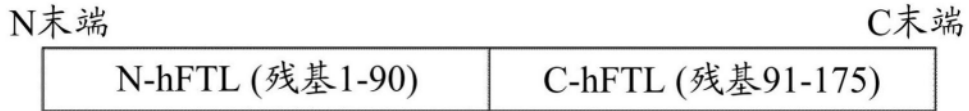


图1A

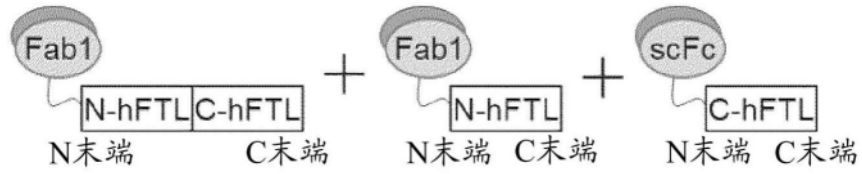


图1B

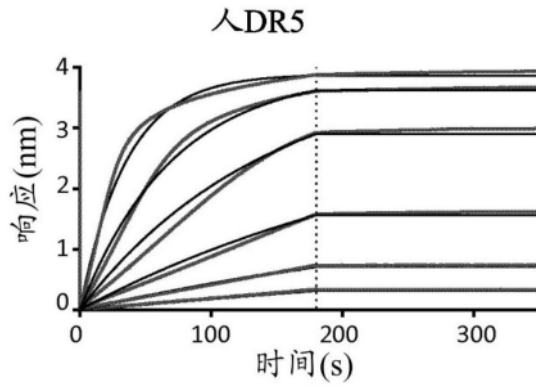


图2A

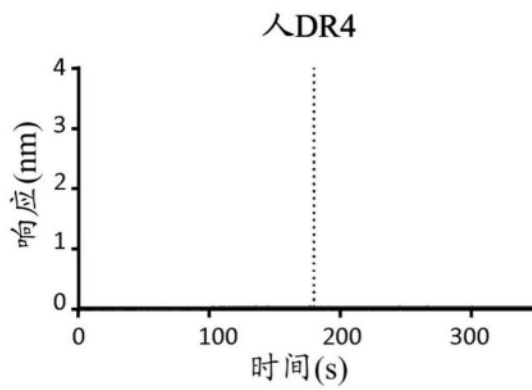


图2B

人OPG

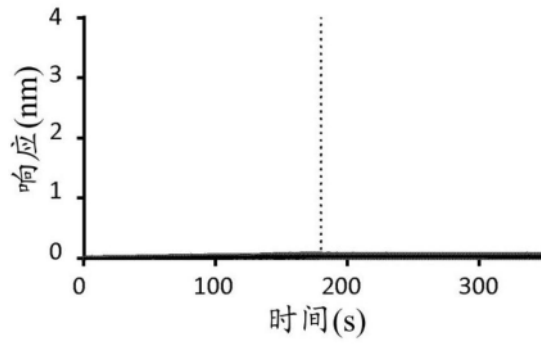


图2C

人DcR1

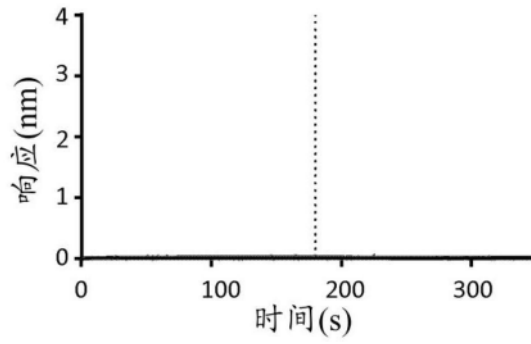


图2D

人DcR2

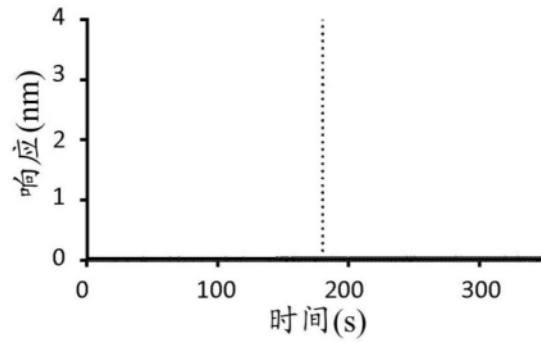


图2E

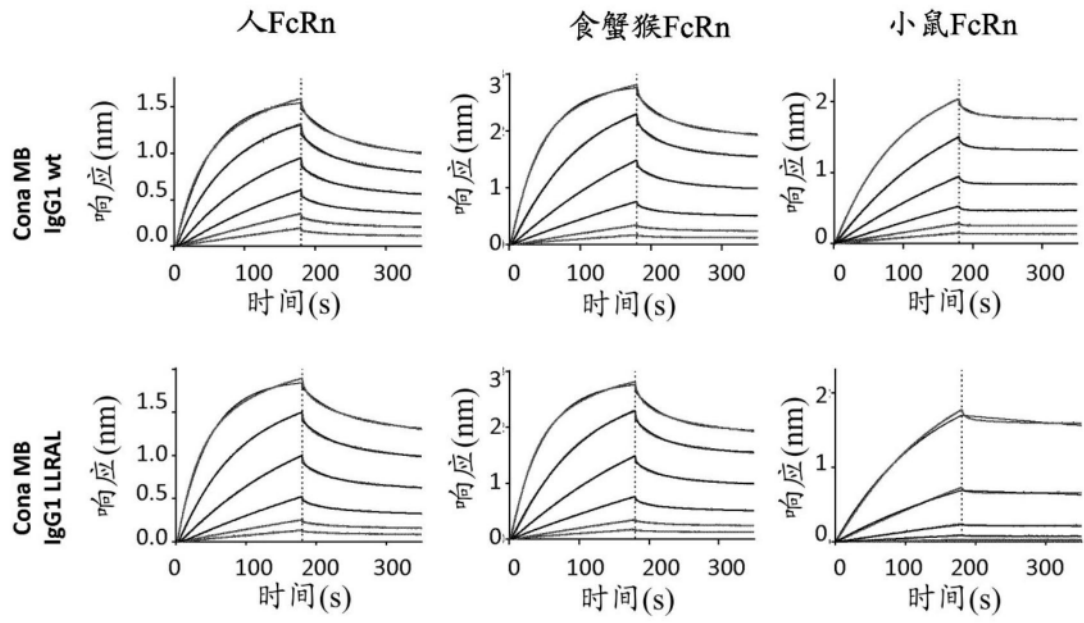


图3

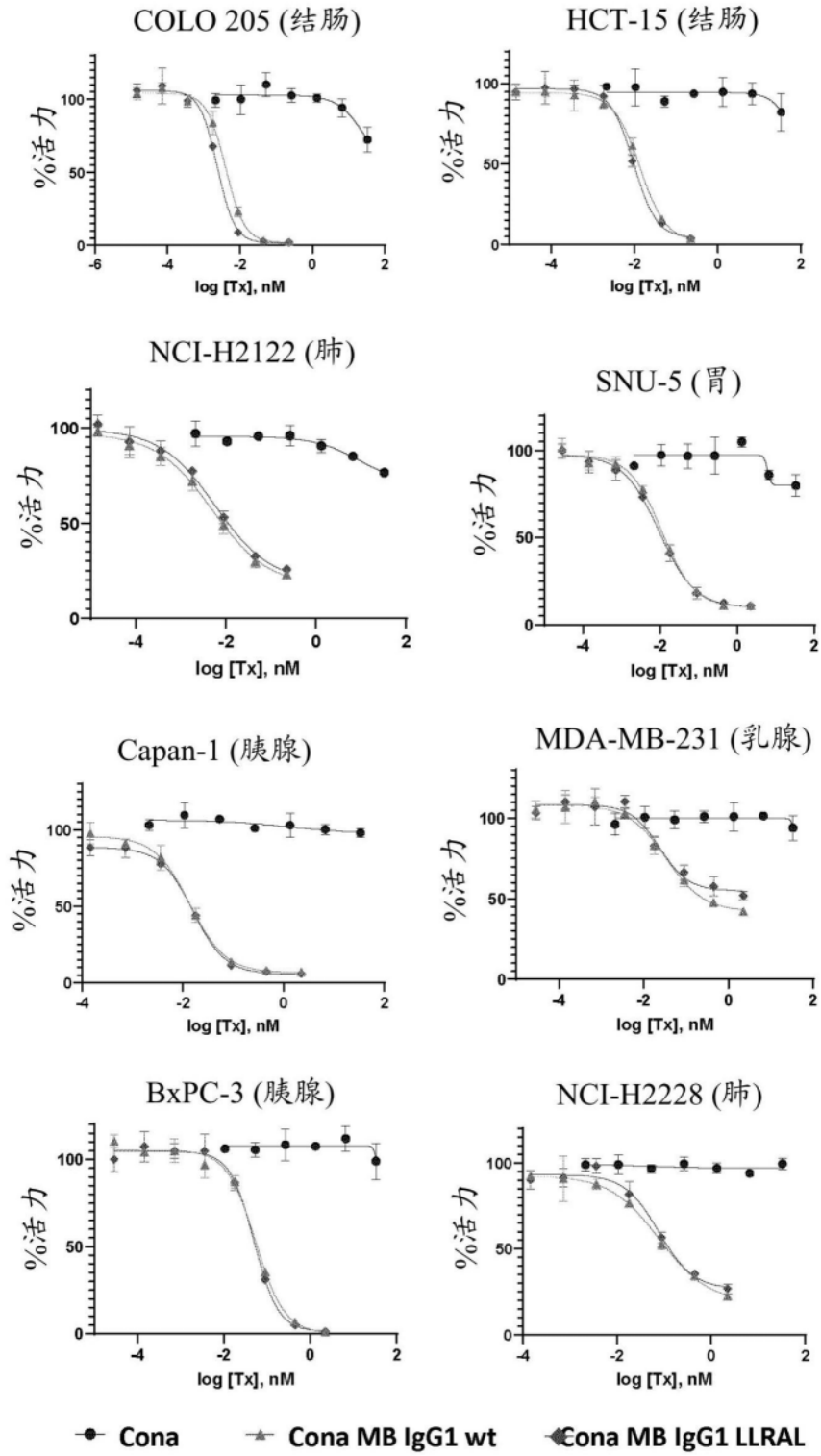
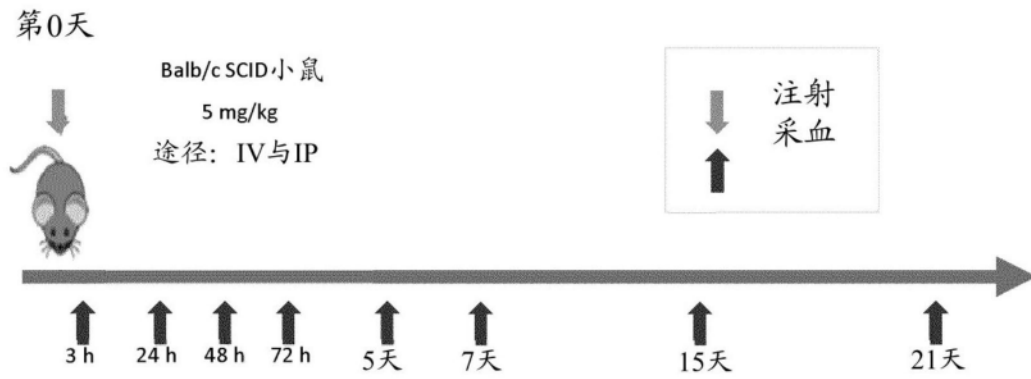


图4

PK研究设计



多剂量PK研究设计

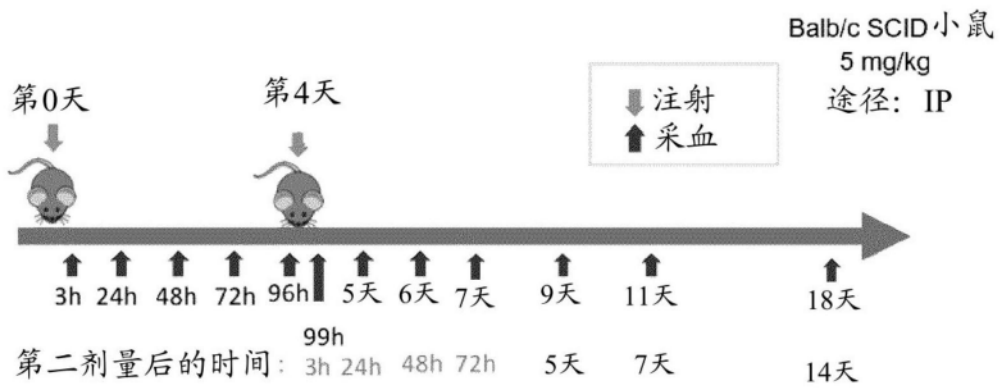


图5A

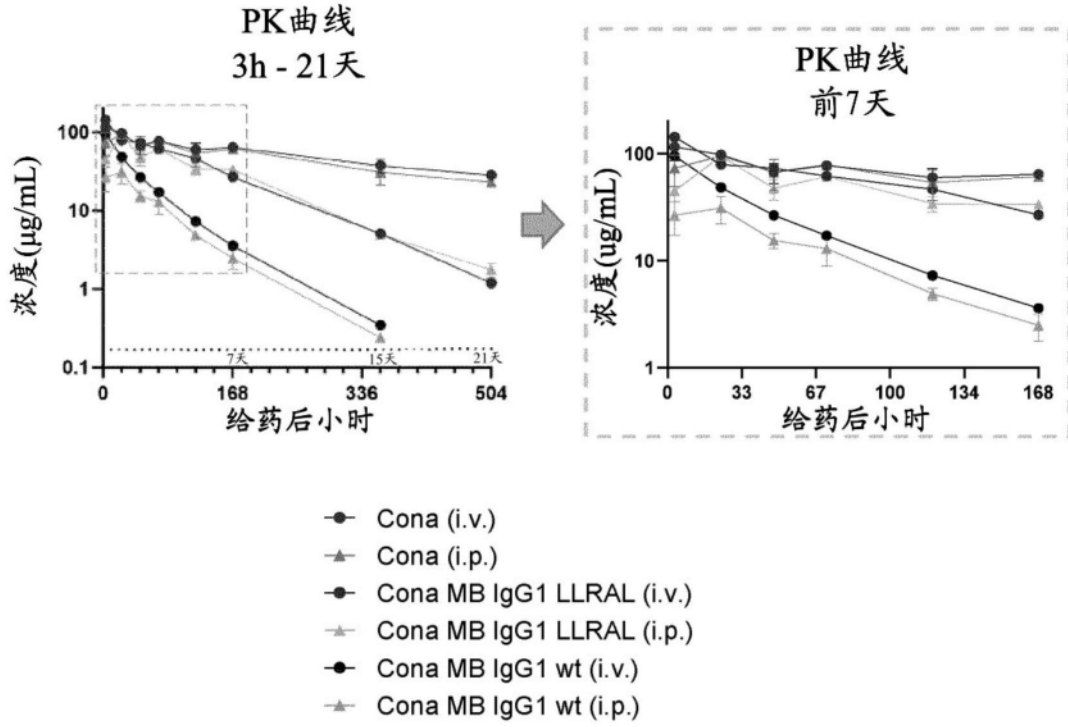


图5B

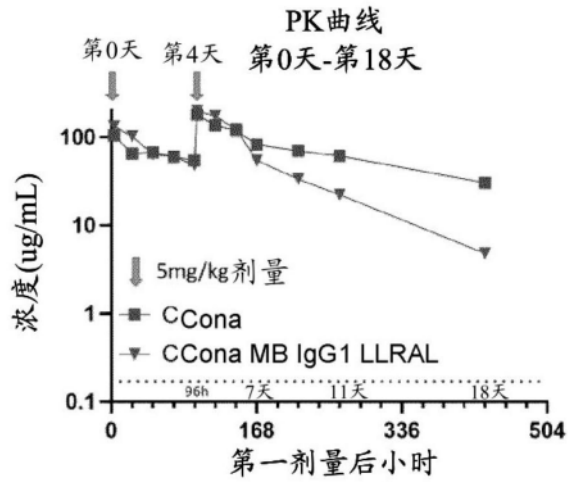


图5C



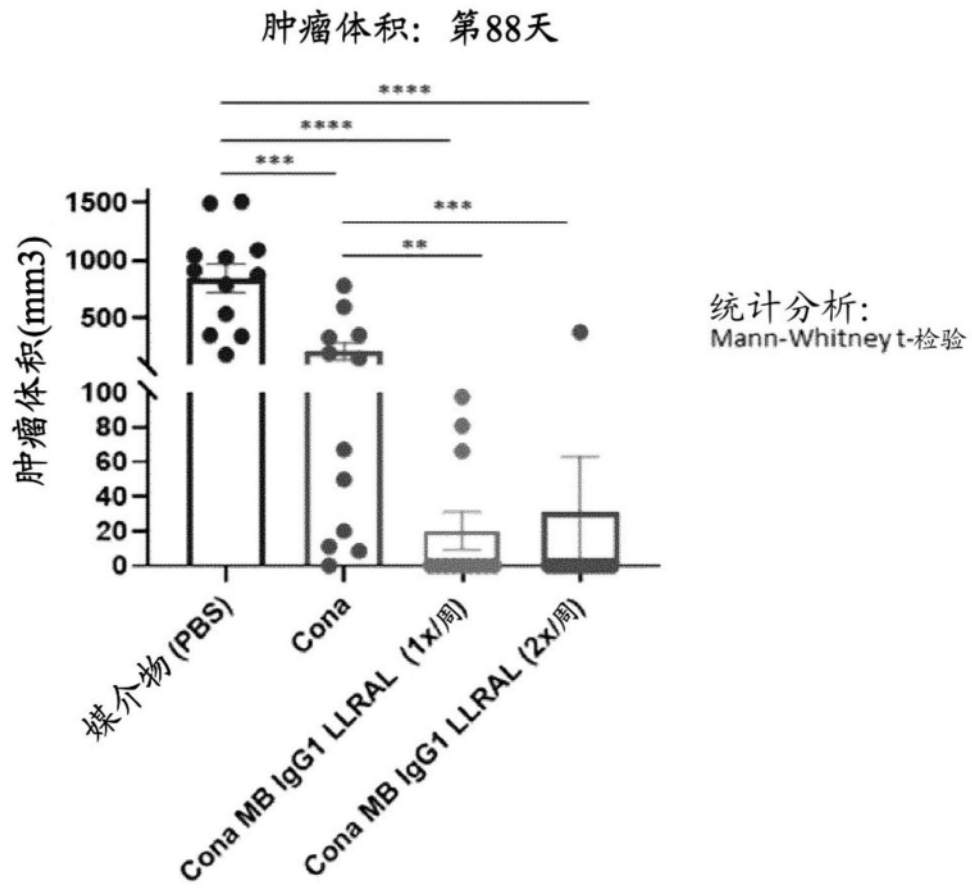


图6C

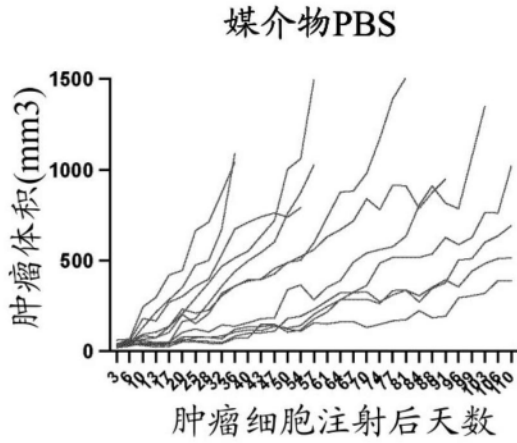


图 6D

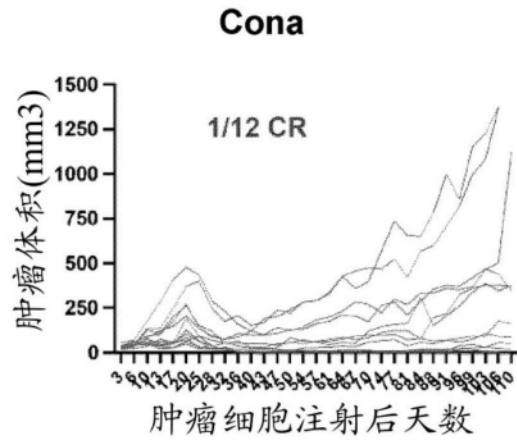


图 6E

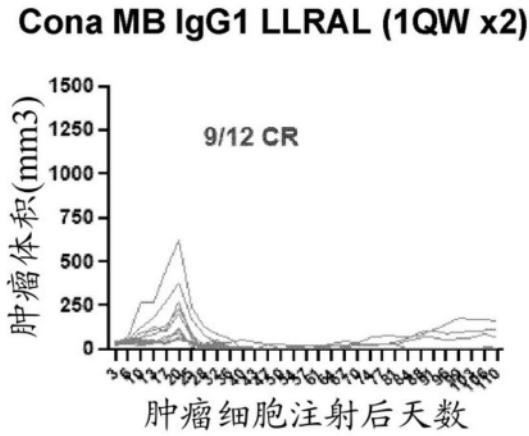


图 6F

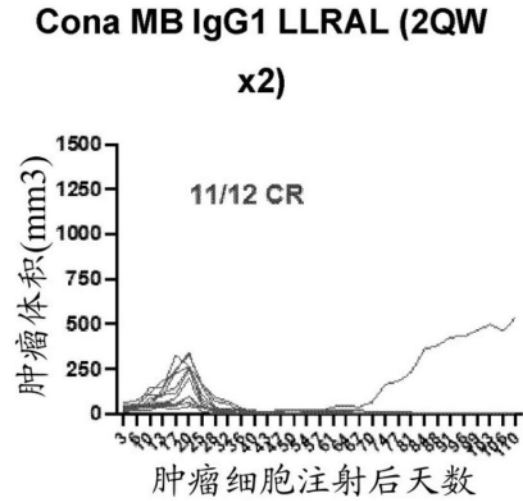


图 6G

CR = 完全响应

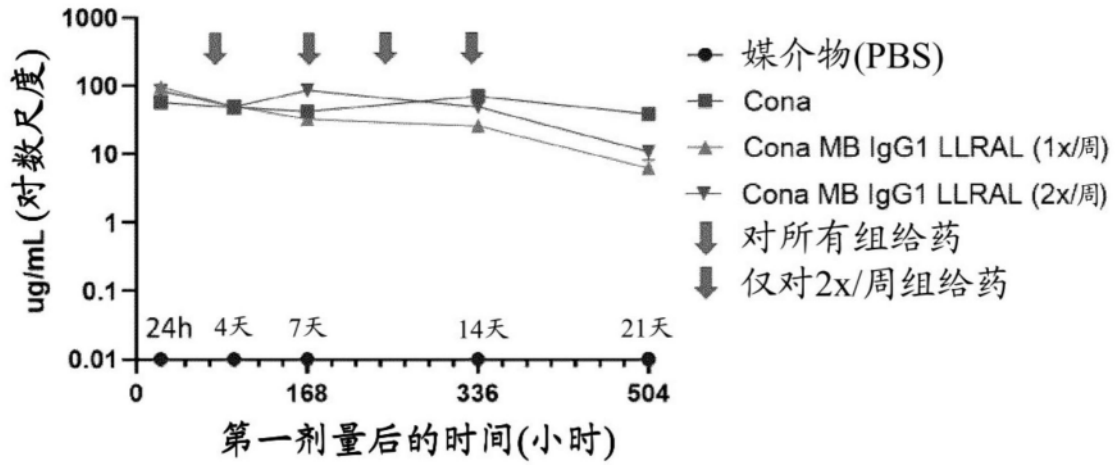


图6H

Colo-205剂量范围功效研究

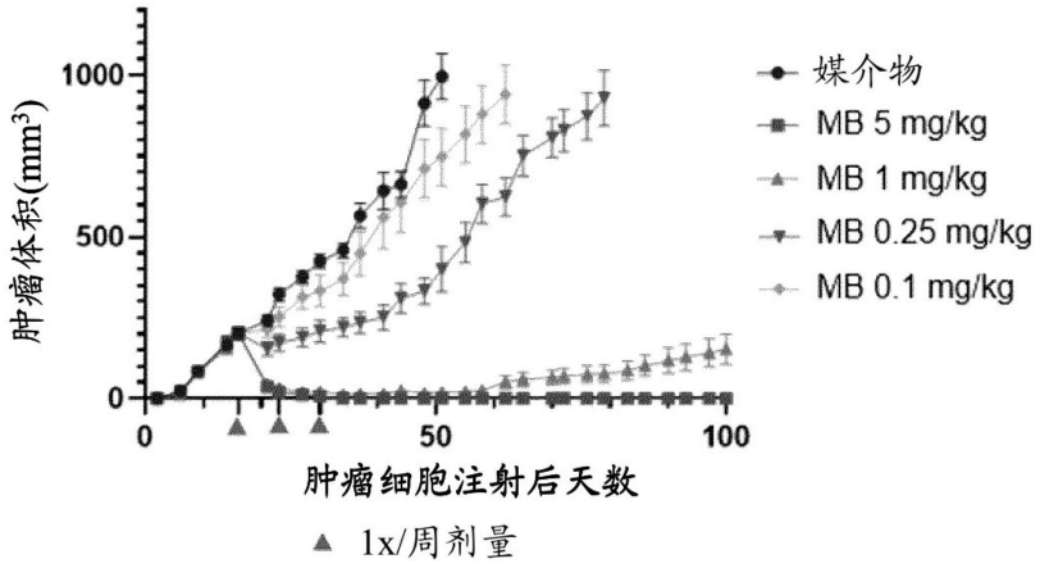


图7A

媒介物

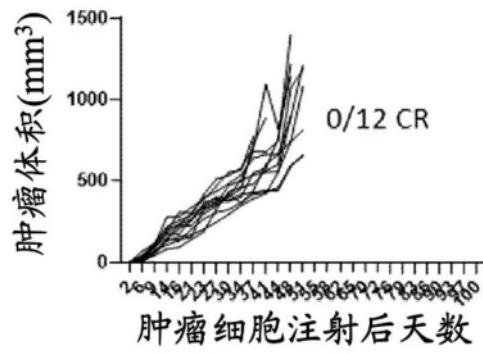


图7B

MB 5 mg/kg

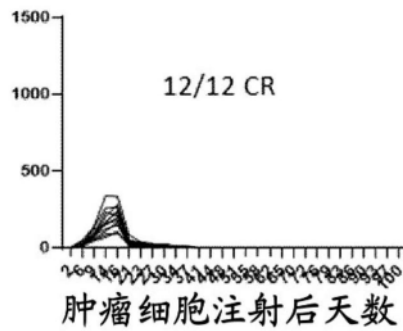


图7C

MB 1 mg/kg

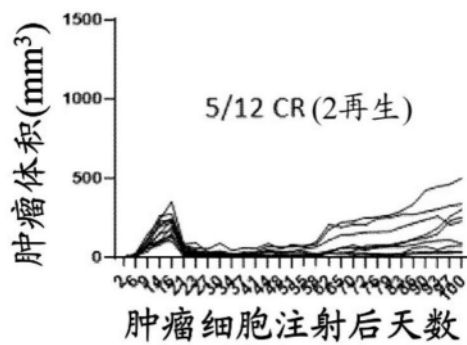


图7D

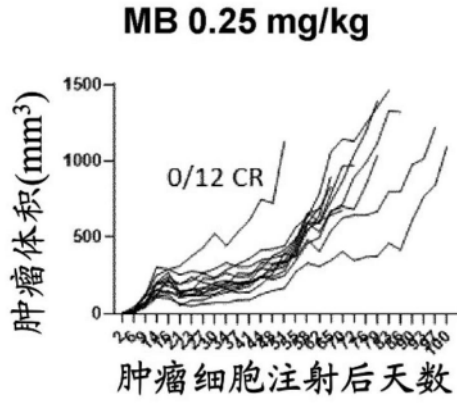


图7E

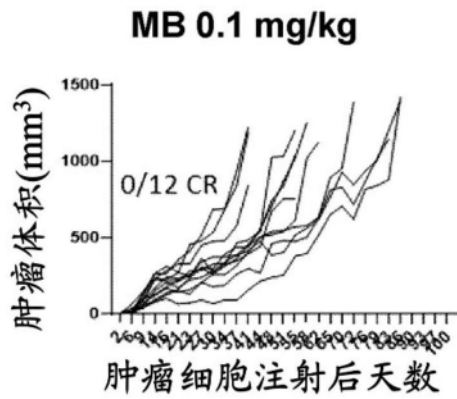


图7F

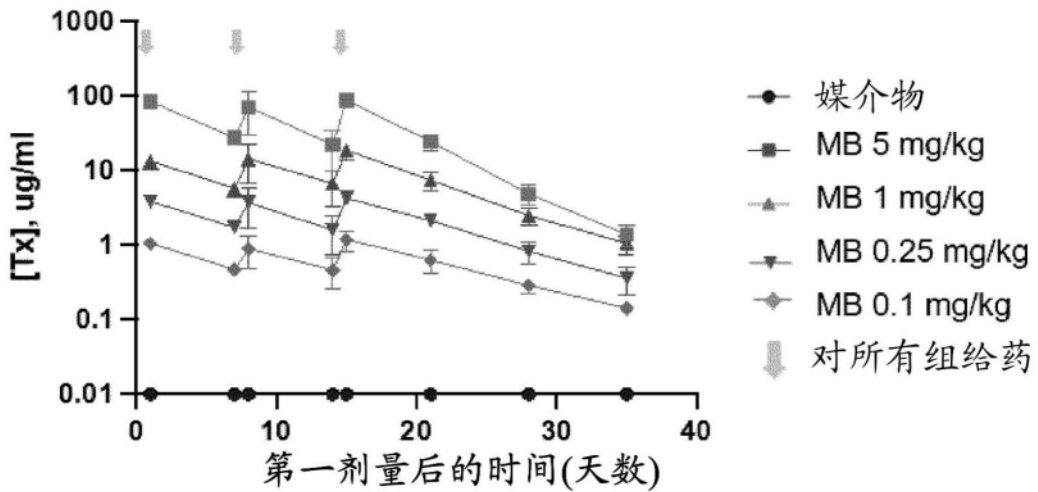


图7G

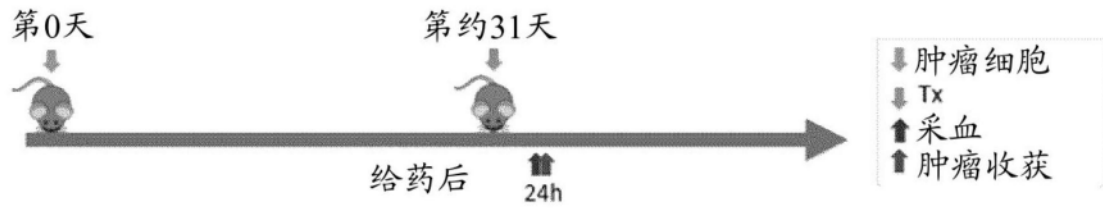


图8

媒介物

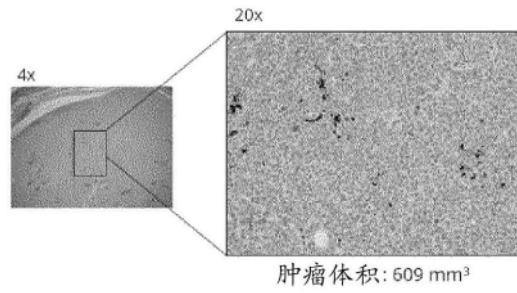


图9A

MB

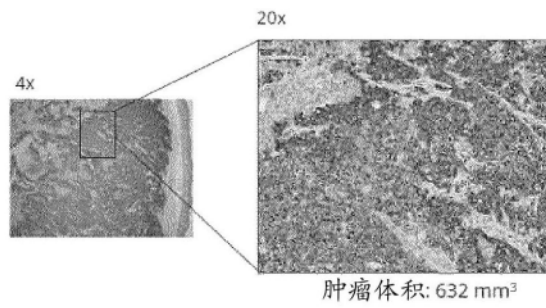


图9B

媒介物

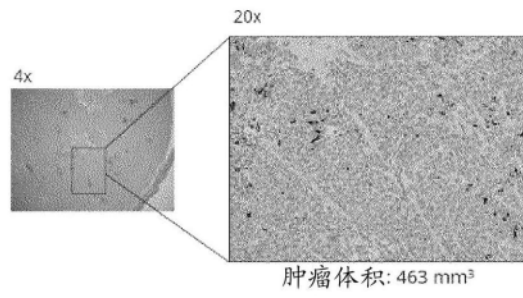


图9C

**MB**

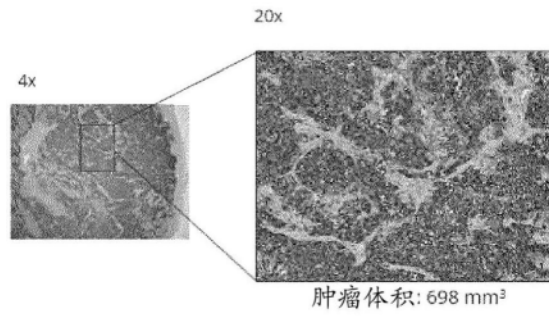


图9D