(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119899259 A
(43)申请公布日 2025.04.29

(21)申请号 202411349658.3

(22)申请日 2021.06.23

(30)优先权数据
63/050,535 2020.07.10 US
63/143,720 2021.01.29 US

(62)分案原申请数据
202180056036.X 2021.06.23

(71)申请人 因外泰克斯公司
地址 美国

(72)发明人 W·布朗迪克 B·谢瓦利埃
J·霍恩 M·纳塔拉扬

(74)专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事务所(普通合伙) 11277
专利代理师 李茂家 闫俊萍

(51)Int.Cl.
C07K 16/00(2006.01)
C07K 19/00(2006.01)
A61K 47/68(2017.01)

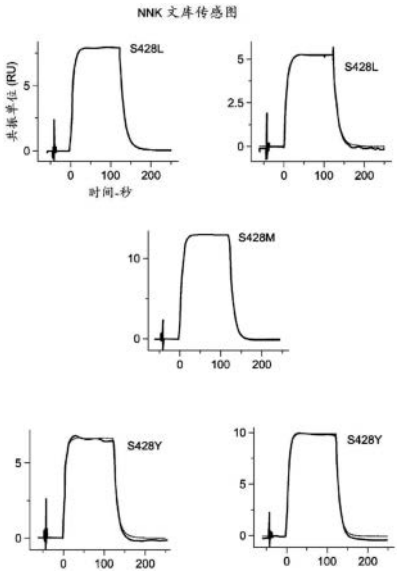
权利要求书2页 说明书41页
序列表（电子公布） 附图105页

(54)发明名称

用于延长治疗剂在猫科动物中的半衰期的组合物和使用方法

(57)摘要

本发明涉及用于延长治疗剂在猫科动物中的半衰期的组合物和使用方法。提供了用于延长一种或多种多肽在猫科动物中的半衰期的组合物以及它们的使用方法。所述组合物涉及变体猫科动物IgG Fc区。



CN 119899259 A

1.一种包含猫科动物IgG Fc区变体的多肽,其中所述多肽包含(i)在与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置428对应的位置处的氨基酸取代,其中所述氨基酸取代为S428Y,和(ii)在选自由以下组成的组的至少一个位置处的氨基酸取代:

(a)与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置286对应的位置;

(b)与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置301对应的位置;

(c)与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置309对应的位置;

(d)与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置311对应的位置;和

(e)与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置377对应的位置;

其中所述氨基酸位置基于EU编号,其中所述多肽包含与选自由SEQ ID NO:1至3组成的组的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列,其中当与所述野生型猫科动物IgG的Fc结构域相比时,所述多肽对猫科动物FcRn的结合亲和力增加,并且其中所述多肽在pH 6.0下以比在pH 7.4下更高的水平结合猫科动物FcRn。

2.如权利要求1所述的多肽,其中所述多肽包含选自由以下组成的组的一个或多个氨基酸取代:

(a)与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置286对应的位置,其中所述氨基酸取代为T286D;

(b)与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置301对应的位置,其中所述氨基酸取代为R301L;

(c)与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置309对应的位置,其中所述氨基酸取代为L309V或L309E;

(d)与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置311对应的位置,其中所述氨基酸取代为Q311L;和

(e)与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置377对应的位置,其中所述氨基酸取代为I377Y。

3.如权利要求2所述的多肽,其中所述多肽包含与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置309对应的位置处的氨基酸取代,其中所述氨基酸取代为L309V。

4.如权利要求1所述的多肽,其中所述野生型猫科动物IgG是包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的Fc结构域的猫科动物IgG1a。

5.如权利要求1所述的多肽,其中所述野生型猫科动物IgG是包含具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的Fc结构域的猫科动物IgG1b。

6.如权利要求1所述的多肽,其中所述野生型猫科动物IgG是包含具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的Fc结构域的猫科动物IgG2。

7.如权利要求1所述的多肽,所述多肽还包含选自由以下组成的组的多肽:EPO、CTLA4、LFA3、VEGFR1/VEGFR3、IL-IR、IL-4R、GLP-1受体激动剂和血小板生成素结合肽。

8.一种药物组合物,所述药物组合物包含(i)如权利要求1所述的多肽,和(ii)药学上可接受的赋形剂。

9.一种或多种核酸,所述一种或多种核酸编码如权利要求1所述的多肽。

10.一种或多种表达载体,所述一种或多种表达载体包含如权利要求9所述的一种或多种核酸。

11.一种宿主细胞,所述宿主细胞包含如权利要求9所述的一种或多种核酸或包含含有所述一种或多种核酸的一种或多种表达载体。

12.一种制备多肽的方法,所述方法包括:

(a)提供如权利要求9所述的一种或多种核酸;

(b)在宿主细胞培养物中表达所述一种或多种核酸,从而产生所述多肽;以及

(c)从所述宿主细胞培养物收集在(b)中产生的多肽。

13.如权利要求1所述的多肽,所述多肽还包含结合结构域,其中所述结合结构域包含猫科动物受体蛋白的配体结合结构域。

14.如权利要求1所述的多肽,所述多肽还包含结合结构域,其中所述结合结构域包含纳米抗体。

15.如权利要求1所述的多肽,所述多肽还包含结合结构域,其中所述结合结构域包含猫科动物受体蛋白的细胞外结构域。

16.一种包含猫科动物IgG Fc区变体的多肽,其中所述多肽包含:

(a)在与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置252对应的位置处的氨基酸取代,其中所述氨基酸取代为S252Y;和

(b)在与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置311对应的位置处的氨基酸取代,其中所述氨基酸取代是Q311V、Q311L、Q311R或Q311K;

其中所述氨基酸位置基于EU编号,其中所述多肽包含与选自由SEQ ID NO:1至3组成的组的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列,其中当与所述野生型猫科动物IgG的Fc结构域相比时,所述多肽对猫科动物FcRn的结合亲和力增加,并且其中所述多肽在pH 6.0下以比在pH 7.4下更高的水平结合猫科动物FcRn。

17.一种包含猫科动物IgG Fc区变体的多肽,其中所述多肽包含:(i)在与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置428对应的位置处的氨基酸取代,其中所述氨基酸取代为S428L;和(ii)在选自由以下组成的组的至少一个位置处的氨基酸取代:

(a)与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置286对应的位置处的氨基酸取代,其中所述氨基酸取代为T286E;

(b)与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置311对应的位置处的氨基酸取代,其中所述氨基酸取代为Q311V或Q311K;

(c)与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置312对应的位置处的氨基酸取代,其中所述氨基酸取代为D312T;

(d)与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置377对应的位置处的氨基酸取代,其中所述氨基酸取代为I377Y;和

(e)与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置383对应的位置处的氨基酸取代,其中所述氨基酸取代为I383L;

其中所述氨基酸位置基于EU编号,其中所述多肽包含与选自由SEQ ID NO:1至3组成的组的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列,其中当与所述野生型猫科动物IgG的Fc结构域相比时,所述多肽对猫科动物FcRn的结合亲和力增加,并且其中所述多肽在pH 6.0下以比在pH 7.4下更高的水平结合猫科动物FcRn。

用于延长治疗剂在猫科动物中的半衰期的组合物和使用方法

[0001] 本申请是国际申请日2021年6月23日、申请号为202180056036.X(国际申请号PCT/US2021/038714)的专利申请“用于延长治疗剂在猫科动物中的半衰期的组合物和使用方法”的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2020年7月10日提交的美国临时申请号63/050,535和2021年1月29日提交的美国临时申请号63/143,720的优先权,这些美国临时申请各自的内容以引用的方式整体并入。

[0004] 序列表

[0005] 本申请含有序列表,所述序列表以ASCII格式以电子方式提交并且通过引用整体并入本文。所述ASCII副本创建于2021年6月23日,命名为“47406-0016WO1_SL.txt”,大小为25KB。

技术领域

[0006] 本公开总体上涉及与它们的野生型对应物相比在猫科动物中具有延长的半衰期的多肽(例如,融合多肽诸如多肽-Fc区融合物;或结合分子(诸如抗体或受体-Fc融合物的配体结合部分))。

背景技术

[0007] 抗体的Fc区起许多功能作用,包括但不限于保护抗体免于通过溶酶体途径降解和介导抗体效应子功能。随着猫科动物抗体作为治疗剂的用途渐增,不仅选择最佳的Fab,而且将其与合适的Fc组合以获得期望的半衰期和效应子功能的关注已经增加。

[0008] 本领域几乎没有关于延长用于猫的多肽治疗剂(例如抗体)的半衰期的指导。本公开通过提供改善多肽(例如抗体)在猫科动物中的血清持久性的Fc区变体来补救该缺失。

发明内容

[0009] 本文提供了可用于治疗性多肽的猫科动物Fc(例如,猫科动物IgG Fc区变体)或其猫科动物FcRn结合片段。本公开的特征在于如下多肽,所述多肽与对照多肽(例如,野生型对应物IgG猫科动物Fc区)相比与猫科动物FcRn的结合增加。在一些情况下,在pH 5.5、pH 6.0和/或pH 6.5下,这些多肽与对照多肽相比与猫科动物FcRn的结合增加。在一些情况下,与在中性pH(例如,pH 7.0、7.1、7.2、7.3、7.4或7.5)下相比,这些多肽可以例如在酸性pH(例如,pH 5.5、pH 6.0或pH 6.5)下以更高的水平结合猫科动物FcRn。在一些情况下,与在pH 7.4下相比,这些多肽在pH 5.5和/或6.0下以更高的水平结合猫科动物FcRn。本公开部分地涉及与其野生型对应物相比在猫科动物中具有延长的半衰期的多肽。例如,提供了结合分子(例如,抗体或受体的配体结合部分),其相对于本文所公开的不与Fc区或其猫科动物FcRn结合区连接的这些结合分子的版本具有延长的半衰期。还提供了酶-Fc区融合物、配体-Fc区融合物、纳米抗体-Fc融合物和肽-Fc区融合物,其中所述融合物与其野生型对应物

相比具有延长的半衰期。除了具有延长半衰期的一个或多个取代(相对于野生型猫科动物Fc区)之外,Fc区还可以包括其他取代,所述其他取代例如增加效应子功能、降低效应子功能、增加与蛋白A的结合和/或降低多肽的异质性(例如,通过去除Fc区中的一个或多个翻译后修饰)。猫科动物Fc区序列可以来自任何猫科动物抗体。在一些情况下,猫科动物Fc区序列来自猫科动物IgG(例如,IgG1a、IgG1b、IgG2)。

[0010] 本公开的特征在于重组蛋白,所述重组蛋白包含(1)特异性结合配体或蛋白质表位的结合结构域或其片段,其中所述结合结构域连接至(2)如本文所公开的包含Fc区(CH2+CH3区)或其猫科动物FcRn结合区的结构域。在一些情况下,结合结构域包含(i)例如猫科动物或人/人源化抗体的六个互补决定区(CDR);(ii)纳米抗体;(iii]结合配体或其配体结合片段的可溶性受体结合结构域,和(iv)猫科动物受体蛋白的细胞外结构域。

[0011] 本公开还提供了组合物,所述组合物包含:(1)包含第一Fc区(例如,CH2区、CH3区、CH2+CH3区)的第一多肽,所述第一Fc区包含本文所述的猫科动物IgG Fc区变体;和(2)包含第二Fc区的第二多肽,所述第二Fc区包含本文所述的猫科动物IgG Fc区变体。所述第一多肽和所述第二多肽可以通过所述第一Fc区和所述第二Fc区缔合。在一些情况下,所述第一Fc区和所述第二Fc区的氨基酸序列是相同的。在其他情况下,所述第一Fc区和所述第二Fc区的氨基酸序列是不同的(例如,有1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个或25个氨基酸不同)。在一些情况下,Fc区变体是猫科动物IgG1a抗体Fc区的变体。在一些情况下,Fc区变体是猫科动物IgG1b抗体Fc区的变体。在一些情况下,Fc区变体是猫科动物IgG2抗体Fc区的变体。

[0012] 还公开了包含本文所公开的猫科动物IgG Fc区变体和多肽的融合分子。在一些情况下,猫科动物IgG Fc区变体与多肽共价连接(例如,通过铰链区或接头)。在一些情况下,所述多肽是猫科动物受体蛋白的配体结合结构域、猫科动物受体蛋白的细胞外结构域或抗原结合结构域。在一些情况下,所述多肽选自猫科动物IL-13Rα1或IL-13Rα2、猫科动物EPO、猫科动物CTLA4、猫科动物LFA3、猫科动物VEGFR1/VEGFR3、猫科动物IL-1R、猫科动物GLP-1受体激动剂和猫科动物血小板生成素结合肽的配体结合结构域或细胞外结构域。在一些情况下,所述多肽是scFv、纳米抗体或单结构域抗体。在一些情况下,IgG Fc区变体是猫科动物IgG1a抗体Fc区的变体。在一些情况下,IgG Fc区变体是猫科动物IgG1b抗体Fc区的变体。在一些情况下,IgG Fc区变体是猫科动物IgG2抗体Fc区的变体。

[0013] 在一些方面,本公开提供了包含猫科动物IgG Fc区变体或其猫科动物FcRn结合区的多肽,其中所述多肽包含在选自由以下组成的组的至少一个位置处的氨基酸取代:

[0014] (i)与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置252对应的位置,其中所述氨基酸取代是S252W;

[0015] (ii)与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置254对应的位置,其中所述氨基酸取代选自由S254R和S254K组成的组;

[0016] (iii)与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置309对应的位置,其中所述氨基酸取代是L309V或L309Y;

[0017] (iv)与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置311对应的位置,其中所述氨基酸取代选自由Q311R、Q311V、Q311L和Q311K组成的组;

[0018] (v)与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置428对应的位置,其中所述氨基酸取代选自由S428M、S428Y、S428H和S428R组成的组;以及

[0019] (vi)与选自由野生型猫科动物IgG的262、286、289、290、293、301、312、326、334、347、355、377、380、383、389c、392、426和437组成的组的氨基酸位置对应的一个或多个位置;

[0020] 其中所述氨基酸位置基于EU编号,并且其中当与所述野生型猫科动物IgG的Fc结构域相比时,所述多肽对猫科动物FcRn的结合亲和力增加。

[0021] 在一些实施方案中,所述多肽包含在与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置252对应的位置处的氨基酸取代。在一些实施方案中,野生型猫科动物IgG的位置252处的氨基酸取代是S252W。

[0022] 在一些实施方案中,所述多肽包含在与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置254对应的位置处的氨基酸取代。在一些实施方案中,野生型猫科动物IgG的位置254处的氨基酸取代是S254R。在一些实施方案中,野生型猫科动物IgG的位置254处的氨基酸取代是S254K。

[0023] 在一些实施方案中,所述多肽包含在与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置309对应的位置处的氨基酸取代。在一些实施方案中,野生型猫科动物IgG的位置309处的氨基酸取代是L309V。在一些实施方案中,野生型猫科动物IgG的位置309处的氨基酸取代是L309Y。

[0024] 在一些实施方案中,所述多肽包含在与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置311对应的位置处的氨基酸取代。在一些实施方案中,野生型猫科动物IgG的位置311处的氨基酸取代是Q311R。在一些实施方案中,野生型猫科动物IgG的位置311处的氨基酸取代是Q311V。在一些实施方案中,野生型猫科动物IgG的位置311处的氨基酸取代是Q311K。在一些实施方案中,野生型猫科动物IgG的位置311处的氨基酸取代是Q311L。

[0025] 在一些实施方案中,所述多肽包含在与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置428对应的位置处的氨基酸取代。在一些实施方案中,野生型猫科动物IgG的位置428处的氨基酸取代是S428M。

[0026] 在一些实施方案中,所述多肽至少包含氨基酸取代S428Y。在一些实施方案中,野生型猫科动物IgG的位置428处的氨基酸取代是S428Y。在一些实施方案中,野生型猫科动物IgG的位置428处的氨基酸取代是S428R。在一些实施方案中,野生型猫科动物IgG的位置428处的氨基酸取代是S428H。

[0027] 在另一个实施方案中,所述多肽包含在与选自由野生型猫科动物IgG的262、286、289、290、293、301、312、326、334、347、355、377、380、383、389c、392、426和437组成的组的氨基酸位置对应的一个或多个位置处的氨基酸取代。在一些实施方案中,所述氨基酸取代选自由以下组成的组:L262Q、L262E、T286E、T286D、T289K、S290V、S290Y、E293D、E293H、E293K、R301L、D312T、K326D、R334D、Q347L、Q355L、I377V、I377Y、E380D、E380V、E380T、I383L、N389c-R、R392E、S426L、S426H和T437L、以及前述任一种的保守氨基酸取代。在一些实施方案中,所述氨基酸取代选自由以下组成的组:L262Q、L262E、T286E、T286D、T289K、S290V、S290Y、E293D、E293H、E293K、R301L、D312T、K326D、R334D、Q347L、Q355L、I377V、I377Y、E380D、E380V、E380T、I383L、N389c-R、R392E、S426L、S426H和T437L。

[0028] 在另一个方面,本公开提供了包含猫科动物IgG Fc区变体或其猫科动物FcRn结合区的多肽,其中所述多肽包含两个或更多个氨基酸取代,其中所述两个或更多个氨基酸取

代选自由以下组成的组：

[0029] (i)在与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置252对应的位置处的氨基酸取代,其中所述氨基酸取代选自由S252W、S252Y、S252F和S252R组成的组；

[0030] (ii)在与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置254对应的位置处的氨基酸取代,其中所述氨基酸取代选自由S254R和S254K组成的组；

[0031] (iii)在与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置309对应的位置处的氨基酸取代,其中所述氨基酸取代选自由L309V、L309Y和L309E组成的组；

[0032] (iv)在与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置311对应的位置处的氨基酸取代,其中所述氨基酸取代选自由Q311R、Q311V、Q311L和Q311K组成的组；

[0033] (v)在与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置428对应的位置处的氨基酸取代,其中所述氨基酸取代选自由S428L、S428M、S428Y、S428H和S428R组成的组；

[0034] (vi)在与选自由野生型猫科动物IgG的262、286、289、290、293、301、312、326、334、347、355、377、380、383、389c、392、426和437组成的组的氨基酸位置对应的一个或多个位置处的氨基酸取代;以及

[0035] (vii)在与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置434对应的位置处的氨基酸取代,其中所述氨基酸取代选自由S434F、S434W、S434H、S434R和S434Y组成的组；

[0036] 其中所述氨基酸位置基于EU编号,其中所述两个或更多个氨基酸取代位于不同的位置,并且其中当与(a)野生型猫科动物IgG的Fc结构域和(b)仅包含所述两个或更多个氨基酸取代之一的多肽相比时,所述多肽对猫科动物FcRn的结合亲和力增加。

[0037] 在一些实施方案中,所述两个或更多个氨基酸取代包括在与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置286对应的位置处的氨基酸取代。在一些实施方案中,所述氨基酸取代选自由T286E和T286D组成的组。

[0038] 在一些实施方案中,所述两个或更多个氨基酸取代包括在与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置289对应的位置处的氨基酸取代。在一些实施方案中,所述氨基酸取代选自由T289K和T289H组成的组。

[0039] 在一些实施方案中,所述两个或更多个氨基酸取代包括在与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置301对应的位置处的氨基酸取代。在一些实施方案中,所述氨基酸取代是R301L。

[0040] 在一些实施方案中,所述两个或更多个氨基酸取代包括在与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置334对应的位置处的氨基酸取代。在一些实施方案中,所述氨基酸取代是R334D。

[0041] 在一些实施方案中,所述两个或更多个氨基酸取代包括在与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置426对应的位置处的氨基酸取代。在一些实施方案中,所述氨基酸取代选自由S426L和S426H组成的组。

[0042] 在一些实施方案中,所述两个或更多个氨基酸取代包括在与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置437对应的位置处的氨基酸取代。在一些实施方案中,所述氨基酸取代是T437L。

[0043] 在一些实施方案中,所述两个或更多个氨基酸取代选自由以下组成的组：

[0044] (i)S252Y与Q311R和/或Q311L的组合；

[0045] (ii)S434Y与S254R、S254K、L262E、T286D、T286E、T289K、E293D、E293K、L309V、L309E、K326D和Q347L中的一个或多个的组合;

[0046] (iii)S434F与E380D的组合;

[0047] (iv)S428L与S252R、T286E、Q311V、Q311K、D312T、I377V、I383L和N389cR中的一个或多个的组合;

[0048] (v)S428L、E380D和S434R;

[0049] (vi)S428L、E380T和S434R;

[0050] (vii)S252R与L262Q的组合;

[0051] (viii)T260E、L309E和Q355L;

[0052] (ix)S290V与R344D的组合;

[0053] (x)R301L、E380V和T437L;

[0054] (xi)T286E与S428H的组合;

[0055] (xii)R334D与S428R、T437L和R301L中的一个或多个的组合;

[0056] (xiii)S426L与T289H和/或S428H的组合;

[0057] (xiv)S428Y与Q311V、S254R、L309V、T286E和E380T中的一个或多个的组合;以及

[0058] (xv)S428H与T289H的组合。

[0059] 在一些实施方案中,所述多肽包含与选自由SEQ ID NO:1至3组成的组的氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列。

[0060] 在一些实施方案中,野生型猫科动物IgG是包含具有与SEQ ID NO:1至少80%(例如,至少85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)相同的氨基酸序列的Fc结构域的猫科动物IgG1a、包含具有与SEQ ID NO:2至少80%(例如,至少85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)相同的氨基酸序列的Fc结构域的猫科动物IgG1b、或包含具有与SEQ ID NO:3至少80%(例如,至少85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)相同的氨基酸序列的Fc结构域的猫科动物IgG2。

[0061] 在其他实施方案中,野生型猫科动物IgG是包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的Fc结构域的猫科动物IgG1a。在其他实施方案中,野生型猫科动物IgG是包含具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的Fc结构域的猫科动物IgG1b。在其他实施方案中,野生型猫科动物IgG是包含具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的Fc结构域的猫科动物IgG2。

[0062] 在一些实施方案中,所述多肽还包含结合结构域。在一些实施方案中,所述结合结构域包含(i)免疫球蛋白分子的六个互补决定区(CDR),(ii)猫科动物受体蛋白的配体结合结构域,(iii)纳米抗体,或(iv)猫科动物受体蛋白的细胞外结构域。在一些实施方案中,结合结构域特异性结合选自由以下组成的组的抗原:NGF、TrKA、ADAMTS、IL-1、IL-2、IL-4、IL-4R、血管紧张素1型(AT1)受体、血管紧张素2型(AT2)受体、IL-5、IL-12、IL-13、IL-31、IL-33、CD3、CD20、CD47、CD52和补体系统复合物。

[0063] 在一些实施方案中,所述多肽还包含选自由以下组成的组的蛋白质:EPO、CTLA4、LFA3、VEGFR1/VEGFR3、IL-1R、IL-4R、GLP-1受体激动剂和血小板生成素结合肽。

[0064] 在一些实施方案中,所述多肽在酸性pH下以比在中性pH下更高的水平结合猫科动物FcRn。在一些实施方案中,所述多肽在pH 5.5下以比在pH 7.4下更高的水平结合猫科动物FcRn。在一些实施方案中,所述多肽在pH 6.0下以比在pH 7.4下更高的水平结合猫科动

物FcRn。

[0065] 在一些实施方案中,所述多肽具有:(1)与一种或多种对照多肽相比在猫中延长的半衰期,其中所述一种或多种对照多肽除了具有相应的野生型猫科动物IgG Fc区代替IgG Fc区变体之外与所述一种或多种多肽相同;和/或(2)与对照多肽相比与猫科动物FcRn的结合增加;并且其中所述氨基酸位置基于EU编号。

[0066] 在一些方面,本公开提供了药物组合物,所述药物组合物包含(i)本文所述的多肽和(ii)药学上可接受的赋形剂。

[0067] 在一些方面,本公开提供了编码本文所述的多肽的一种或多种核酸。

[0068] 在一些方面,本公开提供了包含本文所述的一种或多种核酸的一种或多种表达载体。

[0069] 在一些方面,本公开提供了包含本文所述的一种或多种核酸或本文所述的一种或多种表达载体的宿主细胞。

[0070] 在一些方面,本公开提供了制备一种或多种多肽的方法,所述方法包括:

[0071] (a)提供本文所述的一种或多种核酸;

[0072] (b)在宿主细胞培养物中表达所述一种或多种核酸,从而产生所述多肽;以及

[0073] (c)从所述宿主细胞培养物收集在(b)中产生的多肽。

[0074] 在一些实施方案中,所述方法还包括将所述多肽配制成药物制剂。

[0075] 在一些方面,本公开提供了治疗有需要的猫的猫科动物科疾病或病症的方法,所述方法包括向所述猫施用有效量的包含本文所述的药物组合物的组合物。

[0076] 在一些方面,本公开提供了预防有需要的猫中的猫科动物科疾病或病症的方法,所述方法包括向所述猫施用有效量的包含本文所述的药物组合物的组合物。

[0077] 在一些实施方案中,所述疾病或病症是变应性疾病、慢性疼痛、急性疼痛、炎性疾病、自身免疫性疾病、内分泌疾病、胃肠疾病、心血管疾病、肾病、生育相关病症、感染性疾病或癌症。

[0078] 在一些实施方案中,所述疾病或病症是特应性皮炎、变应性皮炎、骨关节炎性疼痛、关节炎、贫血或肥胖症。

[0079] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语均具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。尽管在本发明的实践或测试中可以使用与本文所述的方法和材料类似或等同的方法和材料,但下文描述了示例性方法和材料。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献以引用的方式整体并入本文。在冲突的情况下,以本申请(包括定义)为准。所述材料、方法和示例仅是说明性的而不是旨在限制。

[0080] 本发明的其他特征和优点将从下面的详细描述和权利要求中显而易见。

附图说明

[0081] 图1描绘了来自NNK文库的S428L、S428M、S428Y、S434F、S434W和S434H猫科动物IgG1a Fc变体的Biacore传感图。每个图中较亮的线代表测量数据,较暗的线代表使用1:1相互作用模型的拟合曲线。Y轴:共振单位(RU);X轴:时间(秒)。

[0082] 图2描绘了来自NNK文库的S252W、S252Y和S252F猫科动物IgG1a Fc变体的Biacore传感图。还描绘了野生型(WT)的Biacore传感图。每个图中较亮的线代表测量数据,较暗的

线代表使用1:1相互作用模型的拟合曲线。Y轴:共振单位(RU);X轴:时间(秒)。

[0083] 图3显示了野生型猫科动物IgG1a Fc区(SEQ ID NO:1)和野生型猫科动物IgG1b Fc区(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列与推定的野生型猫科动物IgG2 Fc区(SEQ ID NO:3)的比对。铰链区位于三角形之间。箭头指示铰链区中的半胱氨酸残基可能涉及两条重链之间的二硫键(来自Strietzel等人,2014,Vet.Immunol.Immunopathol.,158:214-223)。

[0084] 图4显示了基于EU编号的野生型猫科动物IgG1a Fc(SEQ ID NO:1)和人IgG1 Fc区的氨基酸序列的比对。实施例2中描述的噬菌体文库的产生中使用的55个氨基酸位置被突出显示和加下划线。

[0085] 图5A和5B描绘了来自噬菌体展示文库的S252Y猫科动物IgG1aFc变体的Carterra LSA传感图及其在pH6.0和pH7.4下与猫科动物FcRN的相互作用。不规则线代表测量数据,平滑线是使用1:1相互作用模型拟合的曲线。Y轴:共振单位(RU);X轴:时间(秒)。

[0086] 图6A和6B描绘了来自噬菌体展示文库的S252Y+Q311R猫科动物IgG1a Fc变体的Carterra LSA传感图及其在pH6.0和pH7.4下与猫科动物FcRN的相互作用。不规则线代表测量数据,平滑线是使用1:1相互作用模型拟合的曲线。Y轴:共振单位(RU);X轴:时间(秒)。

[0087] 图7A和7B描绘了来自噬菌体展示文库的S252Y+Q311K猫科动物IgG1a Fc变体的Carterra LSA传感图及其在pH6.0和pH7.4下与猫科动物FcRN的相互作用。不规则线代表测量数据,平滑线是使用1:1相互作用模型拟合的曲线。Y轴:共振单位(RU);X轴:时间(秒)。

[0088] 图8A和8B描绘了来自噬菌体展示文库的S252Y+Q311V猫科动物IgG1a Fc变体的Carterra LSA传感图及其在pH6.0和pH7.4下与猫科动物FcRN的相互作用。不规则线代表测量数据,平滑线是使用1:1相互作用模型拟合的曲线。Y轴:共振单位(RU);X轴:时间(秒)。

[0089] 图9A和9B描绘了来自噬菌体展示文库的S252Y+Q311L猫科动物IgG1a Fc变体的Carterra LSA传感图及其在pH6.0和pH7.4下与猫科动物FcRN的相互作用。不规则线代表测量数据,平滑线是使用1:1相互作用模型拟合的曲线。Y轴:共振单位(RU);X轴:时间(秒)。

[0090] 图10A和10B描绘了来自噬菌体展示文库的S434Y猫科动物IgG1a Fc变体的Carterra LSA传感图及其在pH6.0和pH7.4下与猫科动物FcRN的相互作用。不规则线代表测量数据,平滑线是使用1:1相互作用模型拟合的曲线。Y轴:共振单位(RU);X轴:时间(秒)。

[0091] 图11A和11B描绘了来自噬菌体展示文库的S434Y+S254R猫科动物IgG1a Fc变体的Carterra LSA传感图及其在pH6.0和pH7.4下与猫科动物FcRN的相互作用。不规则线代表测量数据,平滑线是使用1:1相互作用模型拟合的曲线。Y轴:共振单位(RU);X轴:时间(秒)。

[0092] 图12A和12B描绘了来自噬菌体展示文库的S434Y+S254K猫科动物IgG1a Fc变体的Carterra LSA传感图及其在pH6.0和pH7.4下与猫科动物FcRN的相互作用。不规则线代表测量数据,平滑线是使用1:1相互作用模型拟合的曲线。Y轴:共振单位(RU);X轴:时间(秒)。

[0093] 图13A和13B描绘了来自噬菌体展示文库的S434Y+L262E猫科动物IgG1a Fc变体的Carterra LSA传感图及其在pH6.0和pH7.4下与猫科动物FcRN的相互作用。不规则线代表测量数据,平滑线是使用1:1相互作用模型拟合的曲线。Y轴:共振单位(RU);X轴:时间(秒)。

[0094] 图14A和14B描绘了来自噬菌体展示文库的S434Y+T286D猫科动物IgG1a Fc变体的Carterra LSA传感图及其在pH6.0和pH7.4下与猫科动物FcRN的相互作用。不规则线代表测量数据,平滑线是使用1:1相互作用模型拟合的曲线。Y轴:共振单位(RU);X轴:时间(秒)。

[0095] 图15A和15B描绘了来自噬菌体展示文库的S434Y+T286E猫科动物IgG1a Fc变体的

Carterra LSA传感图及其在pH6.0和pH7.4下与猫科动物FcRN的相互作用。不规则线代表测量数据,平滑线是使用1:1相互作用模型拟合的曲线。Y轴:共振单位(RU);X轴:时间(秒)。

[0096] 图16A和16B描绘了来自噬菌体展示文库的S434Y+T289K猫科动物IgG1a Fc变体的Carterra LSA传感图及其在pH6.0和pH7.4下与猫科动物FcRN的相互作用。不规则线代表测量数据,平滑线是使用1:1相互作用模型拟合的曲线。Y轴:共振单位(RU);X轴:时间(秒)。

[0097] 图17A和17B描绘了来自噬菌体展示文库的S434Y+E293D猫科动物IgG1a Fc变体的Carterra LSA传感图及其在pH6.0和pH7.4下与猫科动物FcRN的相互作用。不规则线代表测量数据,平滑线是使用1:1相互作用模型拟合的曲线。Y轴:共振单位(RU);X轴:时间(秒)。

[0098] 图18A和18B描绘了来自噬菌体展示文库的S434Y+E293K猫科动物IgG1a Fc变体的Carterra LSA传感图及其在pH6.0和pH7.4下与猫科动物FcRN的相互作用。不规则线代表测量数据,平滑线是使用1:1相互作用模型拟合的曲线。Y轴:共振单位(RU);X轴:时间(秒)。

[0099] 图19A和19B描绘了来自噬菌体展示文库的S434Y+L309V猫科动物IgG1a Fc变体的Carterra LSA传感图及其在pH6.0和pH7.4下与猫科动物FcRN的相互作用。不规则线代表测量数据,平滑线是使用1:1相互作用模型拟合的曲线。Y轴:共振单位(RU);X轴:时间(秒)。

[0100] 图20A和20B描绘了来自噬菌体展示文库的S434Y+L309E猫科动物IgG1a Fc变体的Carterra LSA传感图及其在pH6.0和pH7.4下与猫科动物FcRN的相互作用。不规则线代表测量数据,平滑线是使用1:1相互作用模型拟合的曲线。Y轴:共振单位(RU);X轴:时间(秒)。

[0101] 图21A和21B描绘了来自噬菌体展示文库的S434Y+K326D猫科动物IgG1a Fc变体的Carterra LSA传感图及其在pH6.0和pH7.4下与猫科动物FcRN的相互作用。不规则线代表测量数据,平滑线是使用1:1相互作用模型拟合的曲线。Y轴:共振单位(RU);X轴:时间(秒)。

[0102] 图22A和22B描绘了来自噬菌体展示文库的S434Y+Q347L猫科动物IgG1a Fc变体的Carterra LSA传感图及其在pH6.0和pH7.4下与猫科动物FcRN的相互作用。不规则线代表测量数据,平滑线是使用1:1相互作用模型拟合的曲线。Y轴:共振单位(RU);X轴:时间(秒)。

[0103] 图23A和23B描绘了来自噬菌体展示文库的S434Y+S426L猫科动物IgG1a Fc变体的Carterra LSA传感图及其在pH6.0和pH7.4下与猫科动物FcRN的相互作用。不规则线代表测量数据,平滑线是使用1:1相互作用模型拟合的曲线。Y轴:共振单位(RU);X轴:时间(秒)。

[0104] 图24A和24B描绘了来自噬菌体展示文库的S434F猫科动物IgG1a Fc变体的Carterra LSA传感图及其在pH6.0和pH7.4下与猫科动物FcRN的相互作用。不规则线代表测量数据,平滑线是使用1:1相互作用模型拟合的曲线。Y轴:共振单位(RU);X轴:时间(秒)。

[0105] 图25A和25B描绘了来自噬菌体展示文库的S434F+E380D猫科动物IgG1a Fc变体的Carterra LSA传感图及其在pH6.0和pH7.4下与猫科动物FcRN的相互作用。不规则线代表测量数据,平滑线是使用1:1相互作用模型拟合的曲线。Y轴:共振单位(RU);X轴:时间(秒)。

[0106] 图26A和26B描绘了来自噬菌体展示文库的S428L+T286E猫科动物IgG1a Fc变体的Carterra LSA传感图及其在pH6.0和pH7.4下与猫科动物FcRN的相互作用。不规则线代表测量数据,平滑线是使用1:1相互作用模型拟合的曲线。Y轴:共振单位(RU);X轴:时间(秒)。

[0107] 图27A和27B描绘了来自噬菌体展示文库的S428L+Q311V猫科动物IgG1a Fc变体的Carterra LSA传感图及其在pH6.0和pH7.4下与猫科动物FcRN的相互作用。不规则线代表测量数据,平滑线是使用1:1相互作用模型拟合的曲线。Y轴:共振单位(RU);X轴:时间(秒)。

[0108] 图28A和28B描绘了来自噬菌体展示文库的S428L+Q311K猫科动物IgG1a Fc变体的

Carterra LSA传感图及其在pH6.0和pH7.4下与猫科动物FcRN的相互作用。不规则线代表测量数据,平滑线是使用1:1相互作用模型拟合的曲线。Y轴:共振单位(RU);X轴:时间(秒)。

[0109] 图29A和29B描绘了来自噬菌体展示文库的S428L+D312T猫科动物IgG1a Fc变体的Carterra LSA传感图及其在pH6.0和pH7.4下与猫科动物FcRN的相互作用。不规则线代表测量数据,平滑线是使用1:1相互作用模型拟合的曲线。Y轴:共振单位(RU);X轴:时间(秒)。

[0110] 图30A和30B描绘了来自噬菌体展示文库的S428L+I377V猫科动物IgG1a Fc变体的Carterra LSA传感图及其在pH6.0和pH7.4下与猫科动物FcRN的相互作用。不规则线代表测量数据,平滑线是使用1:1相互作用模型拟合的曲线。Y轴:共振单位(RU);X轴:时间(秒)。

[0111] 图31A和31B描绘了来自噬菌体展示文库的S428L+I383L猫科动物IgG1a Fc变体的Carterra LSA传感图及其在pH6.0和pH7.4下与猫科动物FcRN的相互作用。不规则线代表测量数据,平滑线是使用1:1相互作用模型拟合的曲线。Y轴:共振单位(RU);X轴:时间(秒)。

[0112] 图32A和32B描绘了来自噬菌体展示文库的S428L+N389cR猫科动物IgG1a Fc变体的Carterra LSA传感图及其在pH6.0和pH7.4下与猫科动物FcRN的相互作用。不规则线代表测量数据,平滑线是使用1:1相互作用模型拟合的曲线。Y轴:共振单位(RU);X轴:时间(秒)。

[0113] 图33A和33B描绘了来自噬菌体展示文库的S428L+E380D+S434R猫科动物IgG1a Fc变体的Carterra LSA传感图及其在pH6.0和pH7.4下与猫科动物FcRN的相互作用。不规则线代表测量数据,平滑线是使用1:1相互作用模型拟合的曲线。Y轴:共振单位(RU);X轴:时间(秒)。

[0114] 图34A和34B描绘了来自噬菌体展示文库的S428L+E380T+S434R猫科动物IgG1a Fc变体的Carterra LSA传感图及其在pH6.0和pH7.4下与猫科动物FcRN的相互作用。不规则线代表测量数据,平滑线是使用1:1相互作用模型拟合的曲线。Y轴:共振单位(RU);X轴:时间(秒)。

[0115] 图35A和35B描绘了来自噬菌体展示文库的Q311R猫科动物IgG1a Fc变体的Carterra LSA传感图及其在pH6.0和pH7.4下与猫科动物FcRN的相互作用。不规则线代表测量数据,平滑线是使用1:1相互作用模型拟合的曲线。Y轴:共振单位(RU);X轴:时间(秒)。

[0116] 图36A和36B描绘了来自噬菌体展示文库的R392E猫科动物IgG1a Fc变体的Carterra LSA传感图及其在pH6.0和pH7.4下与猫科动物FcRN的相互作用。不规则线代表测量数据,平滑线是使用1:1相互作用模型拟合的曲线。Y轴:共振单位(RU);X轴:时间(秒)。

[0117] 图37A和37B描绘了来自噬菌体展示文库的S252R+L262Q猫科动物IgG1a Fc变体的Carterra LSA传感图及其在pH6.0和pH7.4下与猫科动物FcRN的相互作用。不规则线代表测量数据,平滑线是使用1:1相互作用模型拟合的曲线。Y轴:共振单位(RU);X轴:时间(秒)。

[0118] 图38A和38B描绘了来自噬菌体展示文库的S252R+A378E猫科动物IgG1a Fc变体的Carterra LSA传感图及其在pH6.0和pH7.4下与猫科动物FcRN的相互作用。不规则线代表测量数据,平滑线是使用1:1相互作用模型拟合的曲线。Y轴:共振单位(RU);X轴:时间(秒)。

[0119] 图39A和39B描绘了来自噬菌体展示文库的T260E+L309E+Q355L猫科动物IgG1a Fc变体的Carterra LSA传感图及其在pH6.0和pH7.4下与猫科动物FcRN的相互作用。不规则线代表测量数据,平滑线是使用1:1相互作用模型拟合的曲线。Y轴:共振单位(RU);X轴:时间(秒)。

[0120] 图40A和40B描绘了来自噬菌体展示文库的T286E+S428R猫科动物IgG1a Fc变体的

Carterra LSA传感图及其在pH6.0和pH7.4下与猫科动物FcRN的相互作用。不规则线代表测量数据,平滑线是使用1:1相互作用模型拟合的曲线。Y轴:共振单位(RU);X轴:时间(秒)。

[0121] 图41A和41B描绘了来自噬菌体展示文库的S290V+R334D猫科动物IgG1a Fc变体的Carterra LSA传感图及其在pH6.0和pH7.4下与猫科动物FcRN的相互作用。不规则线代表测量数据,平滑线是使用1:1相互作用模型拟合的曲线。Y轴:共振单位(RU);X轴:时间(秒)。

[0122] 图42A和42B描绘了来自噬菌体展示文库的R301L+E380V+T437L猫科动物IgG1a Fc变体的Carterra LSA传感图及其在pH6.0和pH7.4下与猫科动物FcRN的相互作用。不规则线代表测量数据,平滑线是使用1:1相互作用模型拟合的曲线。Y轴:共振单位(RU);X轴:时间(秒)。

[0123] 图43A和43B描绘了来自噬菌体展示文库的S428L猫科动物IgG1a Fc变体的Carterra LSA传感图及其在pH6.0和pH7.4下与猫科动物FcRN的相互作用。不规则线代表测量数据,平滑线是使用1:1相互作用模型拟合的曲线。Y轴:共振单位(RU);X轴:时间(秒)。

[0124] 图44A和44B描绘了来自噬菌体展示文库的S428L+S252R猫科动物IgG1a Fc变体的Carterra LSA传感图及其在pH6.0和pH7.4下与猫科动物FcRN的相互作用。不规则线代表测量数据,平滑线是使用1:1相互作用模型拟合的曲线。Y轴:共振单位(RU);X轴:时间(秒)。

[0125] 图45A和45B描绘了野生型猫科动物IgG1a Fc变体(SEQ ID NO:1)的Carterra LSA传感图及其在pH6.0和pH7.4下与猫科动物FcRN的相互作用。不规则线代表测量数据,平滑线是使用1:1相互作用模型拟合的曲线。Y轴:共振单位(RU);X轴:时间(秒)。

[0126] 图46描绘了使用非线性混合效应(NLME)建模的具有线性清除率的二室药代动力学(PK)模型的流程图,所述模型用于描述抗NGF单克隆抗体(mAb)变体的血清浓度。

[0127] 图47描绘了观察到的野生型(WT)抗体以及抗体变体S252W、S428Y、S428Y+L309V、S428Y+Q311V和S428Y+S254R的个体血清浓度(结果来自每个抗体/变体的两只动物)。

[0128] 图48描绘了接受单一IV剂量的2mg/kg抗体/变体的典型2kg猫的野生型(WT)抗体以及抗体变体S252W、S428Y、S428Y+L309V、S428Y+Q311V和S428Y+S254R的预测血清浓度曲线。

[0129] 图49A-49L描绘了显示野生型猫科动物IgG1a和猫科动物IgG1a变体的结合的Biacore传感图。每个图中较亮的线代表测量数据,较暗的线代表拟合曲线。Y轴:共振单位(RU);X轴:时间(秒)。

[0130] 图50描绘了观察到的野生型和Fc变体的个体血清浓度,每个变体有两只动物。

[0131] 图51描绘了携带野生型(WT)IgG1a Fc或IgG1a Fc变体的单克隆抗体的预测血清浓度曲线。

具体实施方式

[0132] 随着多肽(例如,抗体、受体的配体结合结构域、酶、配体、肽)作为用于预防和治疗多种猫科动物科疾病的治疗剂的用途的增加,开发具有延长半衰期的多肽特别是用于预防或治疗其中必须重复施用多肽的慢性疾病很重要。

[0133] 因此,本公开的特征在于猫科动物免疫球蛋白Fc区或其猫科动物FcRn结合区,所述猫科动物免疫球蛋白Fc区或其猫科动物FcRn结合区包含增强含有这些序列的一种或多种多肽的半衰期的突变。还公开了包含这些结构域的多肽以及它们的使用方法。这些肽可

以用于各种治疗和诊断目的。

[0134] 在以范围的形式描述值的情况下,应当理解,所述描述包括在此类范围内的所有可能的子范围的公开内容,以及落入此类范围内的具体数值,而不管具体数值或具体子范围是否被明确地陈述。所有数字指定(例如,pH、温度、时间、浓度和分子量,包括范围)是近似值,其变化(+)或(-)1.0或0.1的增量(视情况而定)或者可替代地变化+/-15%、或者可替代地10%、或者可替代地5%或者可替代地2%。应当理解,尽管并不总是明确指出,但是所有数字指定前面都有术语“约”。还应理解,尽管不总是明确说明,本文所述的试剂仅是示例性的并且此类试剂的等效物是本领域已知的。

[0135] 如本文所用的术语“约”当是指可测量的值诸如量或浓度等时,意指涵盖指定量的20%、10%、5%、1%、0.5%或甚至0.1%的变化。

[0136] 猫科动物抗体

[0137] 猫科动物通常具有三个IgG重链,称为IgG1a、IgG1b和IgG2。这些重链代表猫IgG的三个不同亚类。这些重链的氨基酸和DNA序列可从Strietzel等人,2014,Vet.Immunol.Immunopathol.,158:214-223和GENBANK数据库获得。例如,猫科动物IgG1a重链的氨基酸序列具有GENBANK登录号BAA32229.1,猫科动物IgG1b重链具有GENBANK登录号BAA32230.1,并且猫科动物IgG2重链具有GENBANK登录号KF811175.1。猫科动物抗体还包括两种类型的轻链:κ和λ。这些轻链的DNA和氨基酸序列也可以从GENBANK数据库获得。例如,猫科动物κ轻链氨基酸序列具有登录号AF198257.1,并且猫科动物λ轻链具有登录号E07339.1。

[0138] 猫科动物Fc区的CH2区:

[0139] 猫科动物抗体的CH2区包含猫科动物IgG抗体的氨基酸231至340(根据EU编号)或由其组成。应理解,CH2区可以在其N和/或C末端包括一个至六个(例如,1个、2个、3个、4个、5个、6个)另外的氨基酸或缺失。

[0140] 猫科动物IgG1a的CH2区的氨基酸序列提供如下:PPEMLGGPSIFIFPPKPKDTLSISRTPEVTCLVVDLGPDDSDVQITW FVDNTQVYTAKTSPREEQFNSTYRVVSVLPILHQDWLKGKEFKCKVNSKSLPSPIERTISKAK(SEQ ID NO:4)

[0141] 猫科动物IgG1b的CH2结构域的氨基酸序列提供如下:

[0142] PPEMLGGPSIFIFPPKPKDTLSISRTPEVTCLVVDLGPDDSDVQ ITWFVDNTQVYTAKTSPREEQFNSTYRVVSVLPILHQDWLKGKEF KCKVNSKSLPSPIERTISKDK(SEQ ID NO:5)

[0143] 猫科动物IgG2的CH2结构域的氨基酸序列提供如下:

[0144] VPEIPGAPSVFIFPPKPKDTLSISRTPEVTCLVVDLGPDDSNVQI TWFVDNTEMHTAKTRPREEQFNSTYRVVSVLPILHQDWLKGKEF KCKVNSKSLPSAMERTISKAK(SEQ ID NO:6)

[0145] 猫科动物Fc区的CH3区:

[0146] 猫科动物抗体的CH3区包含猫科动物IgG抗体的氨基酸341至447(根据EU编号)或由其组成。应理解,CH3区可以在其N和/或C末端包括一个至六个(例如,1个、2个、3个、4个、5个、6个)另外的氨基酸或缺失。

[0147] 猫科动物IgG1a的CH3结构域的氨基酸序列提供如下:

[0148] GQPHEPQVYVLPPAQEELSRNKVSVTCLIKSFHPPDIAVEWEI TGQPEPENNYRTTPPQLDSDGTYFVYSKLSVDRSHWQRGNTYTC SVSHEALHSHHTQKSLTQSPGK(SEQ ID NO:7)

[0149] 猫科动物IgG1b的CH3结构域的氨基酸序列提供如下：

[0150] GQPHEPQVYVLPPAQEELSRNKVSVTCLIEGFYPSDIAVEWEI TGQPEPENNYRTTPPQLDSDGTYF LYSRLSVDRSRWQRGNTYTCS VSHEALHSHHTQKSLTQSPGK(SEQ ID NO:8)

[0151] 猫科动物IgG2的CH3结构域的氨基酸序列提供如下：

[0152] GQPHEPQVYVLPPTQEELSENKVSVTCLIKGFHPPDIAVEWEI TGQPEPENNYQTTPPQLDSDGTYF LYSRLSVDRSHWQRGNTYTCS VSHEALHSHHTQKSLTQSPGK(SEQ ID NO:9)

[0153] 猫科动物Fc区的Fc区：

[0154] 猫科动物IgG抗体的Fc区包含猫科动物IgG抗体的氨基酸231至447(根据EU编号)或由其组成。

[0155] 猫科动物IgG1a的Fc结构域的氨基酸序列提供如下：

[0156] PPEMLGGPSIFIFPPKPKDTLSISRTPEVTCLVVDLGPDDSDVQITWFVDNTQVYTAKTSPREEQFNST YRVVSVLPILHQDWLKGKEFKCKVNSKSLPSPIERTISKAKGQPHEPQVYVLPPAQEELSRNKVSVTCLIKSFHPPD IAVEWEITGQPEPENNYRTTPPQLDSDGTYFVYSKLSVDRSHWQRGNTYTCSVSHEALHSHHTQKSLTQSPGK

[0157] (SEQ ID NO:1)

[0158] 猫科动物IgG1b的Fc结构域的氨基酸序列提供如下：

[0159] PPEMLGGPSIFIFPPKPKDTLSISRTPEVTCLVVDLGPDDSDVQITWFVDNTQVYTAKTSPREEQFNST YRVVSVLPILHQDWLKGKEFKCKVNSKSLPSPIERTISKDKGQPHEPQVYVLPPAQEELSRNKVSVTCLIEGFYPSD IAVEWEITGQPEPENNYRTTPPQLDSDGTYFLYSRLSVDRSRWQRGNTYTCSVSHEALHSHHTQKSLTQSPGK

[0160] (SEQ ID NO:2)

[0161] 猫科动物IgG2的Fc结构域的氨基酸序列提供如下：

[0162] VPEIPGAPSVFIFPPKPKDTLSISRTPEVTCLVVDLGPDDSNVQITWFVDNTEMHTAKTRPREEQFNS TYRVVSVLPILHQDWLKGKEFKCKVNSKSLPSAMERTISKAKGQPHEPQVYVLPPTQEELSENKVSVTCLIKGFHP PDIAVEWEITGQPEPENNYQTTPPQLDSDGTYFLYSRLSVDRSHWQRGNTYTCSVSHEALHSHHTQKSLTQSPGK (SEQ ID NO:3)

[0163] 下面表1基于EU编号比较了人IgG1、猫科动物IgG1a、猫科动物IgG1b和猫科动物IgG2的CH2和CH3结构域的氨基酸序列：

[0164] 表1：

[0165]

	CH2 结构域			
EU 编号	人 IgG1	猫科动物 IgG1a	猫科动物 IgG1b	猫科动物 IgG2
231	A	P	P	V
232	P	P	P	P
233	E	E	E	E
234	L	M	M	I
235	L	L	L	P
236	G	G	G	G

[0166]

237	G	G	G	A
238	P	P	P	P
239	S	S	S	S
240	V	I	I	V
241	F	F	F	F
242	L	I	I	I
243	F	F	F	F
244	P	P	P	P
245	P	P	P	P
246	K	K	K	K
247	P	P	P	P
248	K	K	K	K
249	D	D	D	D
250	T	T	T	T
251	L	L	L	L
252	M	S	S	S
253	I	I	I	I
254	S	S	S	S
255	R	R	R	R
256	T	T	T	T
257	P	P	P	P
258	E	E	E	E
259	V	V	V	V
260	T	T	T	T
261	C	C	C	C
262	V	L	L	L
263	V	V	V	V
264	V	V	V	V
265	D	D	D	D
266	V	L	L	L
267	S	G	G	G
268	H	P	P	P
269	E	D	D	D
270	D	D	D	D
271	P	S	S	S
272	E	D	D	N
273	V	V	V	V
274	K	Q	Q	Q
275	F	I	I	I
276	N	T	T	T
277	W	W	W	W
278	Y	F	F	F

[0167]

279	V	V	V	V
280	D	D	D	D
281	G	N	N	N
282	V	T	T	T
283	E	Q	Q	E
284	V	V	V	M
285	H	Y	Y	H
286	N	T	T	T
287	A	A	A	A
288	K	K	K	K
289	T	T	T	T
290	K	S	S	R
291	P	P	P	P
292	R	R	R	R
293	E	E	E	E
294	E	E	E	E
295	Q	Q	Q	Q
296	Y	F	F	F
297	N	N	N	N
298	S	S	S	S
299	T	T	T	T
300	Y	Y	Y	Y
301	R	R	R	R
302	V	V	V	V
303	V	V	V	V
304	S	S	S	S
305	V	V	V	V
306	L	L	L	L
307	T	P	P	P
308	V	I	I	I
309	L	L	L	L
310	H	H	H	H
311	Q	Q	Q	Q
312	D	D	D	D
313	W	W	W	W
314	L	L	L	L
315	N	K	K	K
316	G	G	G	G
317	K	K	K	K
318	E	E	E	E
319	Y	F	F	F
320	K	K	K	K

[0168]

321	C	C	C	C
322	K	K	K	K
323	V	V	V	V
324	S	N	N	N
325	N	S	S	S
326	K	K	K	K
327	A	S	S	S
328	L	L	L	L
329	P	P	P	P
330	A	S	S	S
331	P	P	P	A
332	I	I	I	M
333	E	E	E	E
334	K	R	R	R
335	T	T	T	T
336	I	I	I	I
337	S	S	S	S
338	K	K	K	K
339	A	A	D	A
340	K	K	K	K

[0169]

	CH3 结构域			
EU 编号	人 IgG1	猫科动物 IgG1a	猫科动物 IgG1b	猫科动物 IgG2
341	G	G	G	G
342	Q	Q	Q	Q
343	P	P	P	P
344	R	H	H	H
345	E	E	E	E
346	P	P	P	P
347	Q	Q	Q	Q
348	V	V	V	V
349	Y	Y	Y	Y
350	T	V	V	V
351	L	L	L	L
352	P	P	P	P
353	P	P	P	P
354	S	A	A	T
355	R	Q	Q	Q
356	D	E	E	E
357	E	E	E	E

[0170]

358	L	L	L	L
359	T	S	S	S
360	K	R	R	E
361	N	N	N	N
362	Q	K	K	K
363	V	V	V	V
364	S	S	S	S
365	L	V	V	V
366	T	T	T	T
367	C	C	C	C
368	L	L	L	L
369	V	I	I	I
370	K	K	E	K
371	G	S	G	G
372	F	F	F	F
373	Y	H	Y	H
374	P	P	P	P
375	S	P	S	P
376	D	D	D	D
377	I	I	I	I
378	A	A	A	A
379	V	V	V	V
380	E	E	E	E
381	W	W	W	W
382	E	E	E	E
383	S	I	I	I
384	N	T	T	T
385	G	G	G	G
386	Q	Q	Q	Q
387	P	P	P	P
388	E	E	E	E
389a	N	P	P	P
389b		E	E	E
389c		N	N	N
390	N	N	N	N
391	Y	Y	Y	Y
392	K	R	R	Q
393	T	T	T	T
394	T	T	T	T
395	P	P	P	P
396	P	P	P	P
397	V	Q	Q	Q

[0171]

398	L	L	L	L
399	D	D	D	D
400	S	S	S	S
401	D	D	D	D
402	G	G	G	G
403	S	T	T	T
404	F	Y	Y	Y
405	F	F	F	F
406	L	V	L	L
407	Y	Y	Y	Y
408	S	S	S	S
409	K	K	R	R
410	L	L	L	L
411	T	S	S	S
412	V	V	V	V
413	D	D	D	D
414	K	R	R	R
415	S	S	S	S
416	R	H	R	H
417	W	W	W	W
418	Q	Q	Q	Q
419	Q	R	R	R
420	G	G	G	G
421	N	N	N	N
422	V	T	T	T
423	F	Y	Y	Y
424	S	T	T	T
425	C	C	C	C
426	S	S	S	S
427	V	V	V	V
428	M	S	S	S
429	H	H	H	H
430	E	E	E	E
431	A	A	A	A
432	L	L	L	L
433	H	H	H	H
434	N	S	S	S
435	H	H	H	H
436	Y	H	H	H
437	T	T	T	T

[0172]

438	Q	Q	Q	Q
439	K	K	K	K
440	S	S	S	S
441	L	L	L	L
442	S	T	T	T
443	L	Q	Q	Q
444	S	S	S	S
445	P	P	P	P
446	G	G	G	G
447	K	K	K	K

[0173] 猫科动物IgG Fc中提高半衰期的取代

[0174] 增加的血清持久性是治疗性多肽的有益特性。本公开的特征在于相对于一种或多种对照多肽增加包含这些Fc区的一种或多种多肽在猫中的半衰期的在野生型猫科动物IgG1a、IgG1b和IgG2 Fc区中的取代,其中除了具有相应的野生型猫科动物IgG Fc区代替IgG Fc区变体,所述一种或多种对照多肽与所述一种或多种多肽相同。延长半衰期的取代可以在猫科动物CH2区、猫科动物CH3区或在猫科动物Fc(例如,CH2+CH3)区的上下文中的一个或多个中进行。

[0175] 本公开提供了包含猫科动物IgG Fc区变体或其猫科动物FcRn结合区的多肽,其中所述多肽包含在选自由以下组成的组的至少一个位置处的氨基酸取代:

[0176] (i)与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置252对应的位置,其中所述氨基酸取代是S252W;

[0177] (ii)与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置254对应的位置,其中所述氨基酸取代选自由S254R和S254K组成的组;

[0178] (iii)与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置309对应的位置,其中所述氨基酸取代是L309V或L309Y;

[0179] (iv)与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置311对应的位置,其中所述氨基酸取代选自由Q311R、Q311V、Q311L和Q311K组成的组;

[0180] (v)与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置428对应的位置,其中所述氨基酸取代选自由S428M、S428Y、S428H和S428R组成的组;以及

[0181] (vi)与选自由野生型猫科动物IgG的262、286、289、290、293、301、312、326、334、347、355、377、380、383、389c、392、426和437组成的组的氨基酸位置对应的一个或多个位置;

[0182] 其中所述氨基酸位置基于EU编号,并且其中当与所述野生型猫科动物IgG的Fc结构域相比时,所述多肽对猫科动物FcRn的结合亲和力增加。

[0183] 在一些实施方案中,当与野生型猫科动物IgG的Fc结构域相比时,所述多肽在约5.0至约6.5(例如,约5.5或约6.0)的pH下对猫科动物FcRn的结合亲和力增加。

[0184] 在一些实施方案中,所述多肽包含在与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置252对应

的位置处的氨基酸取代。在一些实施方案中,野生型猫科动物IgG的位置252处的氨基酸取代是S252W。

[0185] 在一些实施方案中,所述多肽包含在与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置254对应的位置处的氨基酸取代。在一些实施方案中,野生型猫科动物IgG的位置254处的氨基酸取代是S254R。在一些实施方案中,野生型猫科动物IgG的位置254处的氨基酸取代是S254K。

[0186] 在一些实施方案中,所述多肽包含氨基酸取代L309V或L309Y。

[0187] 在一些实施方案中,所述多肽包含在与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置311对应的位置处的氨基酸取代。在一些实施方案中,野生型猫科动物IgG的位置311处的氨基酸取代是Q311R。在一些实施方案中,野生型猫科动物IgG的位置311处的氨基酸取代是Q311V。在一些实施方案中,野生型猫科动物IgG的位置311处的氨基酸取代是Q311K。在一些实施方案中,野生型猫科动物IgG的位置311处的氨基酸取代是Q311L。

[0188] 在一些实施方案中,所述多肽包含在与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置428对应的位置处的氨基酸取代。在一些实施方案中,野生型猫科动物IgG的位置428处的氨基酸取代是S428M。

[0189] 在一些实施方案中,所述多肽至少包含氨基酸取代S428Y。在一些实施方案中,野生型猫科动物IgG的位置428处的氨基酸取代是S428Y。在一些实施方案中,野生型猫科动物IgG的位置428处的氨基酸取代是S428R。在一些实施方案中,野生型猫科动物IgG的位置428处的氨基酸取代是S428H。

[0190] 在另一个实施方案中,所述多肽包含在与选自由野生型猫科动物IgG的262、286、289、290、293、301、312、326、334、347、355、377、380、383、389c、392、426和437组成的组的氨基酸位置对应的一个或多个位置处的氨基酸取代。在一些实施方案中,所述氨基酸取代选自由以下组成的组:L262Q、L262E、T286E、T286D、T289K、S290V、S290Y、E293D、E293H、E293K、R301L、D312T、K326D、R334D、Q347L、Q355L、I377V、I377Y、E380D、E380V、E380T、I383L、N389c-R、R392E、S426L、S426H和T437L、以及前述任一种的保守氨基酸取代。在一些实施方案中,所述氨基酸取代选自由以下组成的组:L262Q、L262E、T286E、T286D、T289K、S290V、S290Y、E293D、E293H、E293K、R301L、D312T、K326D、R334D、Q347L、Q355L、I377V、I377Y、E380D、E380V、E380T、I383L、N389c-R、R392E、S426L、S426H和T437L。

[0191] 在另一个方面,本公开提供了包含猫科动物IgG Fc区变体或其猫科动物FcRn结合区的多肽,其中所述多肽包含两个或更多个氨基酸取代,其中所述两个或更多个氨基酸取代选自由以下组成的组:

[0192] (i)在与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置252对应的位置处的氨基酸取代,其中所述氨基酸取代选自由S252W、S252Y、S252F和S252R组成的组;

[0193] (ii)在与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置254对应的位置处的氨基酸取代,其中所述氨基酸取代选自由S254R和S254K组成的组;

[0194] (iii)在与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置309对应的位置处的氨基酸取代,其中所述氨基酸取代选自由L309V、L309Y和L309E组成的组;

[0195] (iv)在与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置311对应的位置处的氨基酸取代,其中所述氨基酸取代选自由Q311R、Q311V、Q311L和Q311K组成的组;

[0196] (v)在与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置428对应的位置处的氨基酸取代,其中

所述氨基酸取代选自由S428L、S428M、S428Y、S428H和S428R组成的组;

[0197] (vi)在与选自由野生型猫科动物IgG的262、286、289、290、293、301、312、326、334、347、355、377、380、383、389c、392、426和437组成的组的氨基酸位置对应的一个或多个位置处的氨基酸取代;以及

[0198] (vii)在与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置434对应的位置处的氨基酸取代,其中所述氨基酸取代选自由S434F、S434W、S434H、S434R和S434Y组成的组;

[0199] 其中所述氨基酸位置基于EU编号,其中所述两个或更多个氨基酸取代位于不同的位置,并且其中当与(a)野生型猫科动物IgG的Fc结构域和(b)仅包含所述两个或更多个氨基酸取代之一的多肽相比时,所述多肽对猫科动物FcRn的结合亲和力增加。

[0200] 在一些实施方案中,所述两个或更多个氨基酸取代包括在与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置286对应的位置处的氨基酸取代,其中所述氨基酸取代选自由T286E和T286D组成的组。

[0201] 在一些实施方案中,所述两个或更多个氨基酸取代包括在与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置289对应的位置处的氨基酸取代,其中所述氨基酸取代选自由T289K和T289H组成的组。

[0202] 在一些实施方案中,所述两个或更多个氨基酸取代包括在与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置301对应的位置处的氨基酸取代,其中所述氨基酸取代是R301L。

[0203] 在一些实施方案中,所述两个或更多个氨基酸取代包括在与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置334对应的位置处的氨基酸取代,其中所述氨基酸取代是R334D。

[0204] 在一些实施方案中,所述两个或更多个氨基酸取代包括在与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置426对应的位置处的氨基酸取代,其中所述氨基酸取代选自由S426L和S426H组成的组。

[0205] 在一些实施方案中,所述两个或更多个氨基酸取代包括在与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置437对应的位置处的氨基酸取代,其中所述氨基酸取代是T437L。

[0206] 在一些实施方案中,所述两个或更多个氨基酸取代选自由以下组成的组:

[0207] (i)S252Y与Q311R和/或Q311L的组合;

[0208] (ii)S434Y与S254R、S254K、L262E、T286D、T286E、T289K、E293D、E293K、L309V、L309E、K326D和Q347L中的一个或多个的组合;

[0209] (iii)S434F和E380D;

[0210] (iv)S428L与S252R、T286E、Q311V、Q311K、D312T、I377V、I383L、N389cR中的一个或多个的组合;

[0211] (v)S428L、E380D和S434R;

[0212] (vi)S428L、E380T和S434R;

[0213] (vii)S252R与L262Q的组合;

[0214] (viii)T260E、L309E和Q355L;

[0215] (ix)S290V和R344D;以及

[0216] (x)R301L、E380V和T437L。

[0217] 在一些实施方案中,所述多肽包含与选自由SEQ ID NO:1至3组成的组的氨基酸序列至少80%(例如,至少85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)相同的氨基

酸序列。

[0218] 在一些情况下,本公开提供了猫科动物IgG CH2区变体,其包含与SEQ ID NO:4至6中任一者所示的氨基酸序列至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列。还提供了猫科动物IgG CH2区变体,其包含与SEQ ID NO:4至6有1个至15个(例如,1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个或15个)氨基酸不同的氨基酸序列。

[0219] 在其他情况下,本公开的特征在于猫科动物IgG CH3区变体,其包含与SEQ ID NO:7至9中任一者所示的氨基酸序列至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%或至少98%或至少99%相同的氨基酸序列。特征还在于猫科动物IgG CH3区变体,其包含与SEQ ID NO:7至9有1个至15个(例如,1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个或15个)氨基酸不同的氨基酸序列。

[0220] 在某些情况下,本公开的特征在于猫科动物IgG Fc区变体,其包含与SEQ ID NO:1至3中任一者所示的氨基酸序列至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列。还公开了猫科动物IgG Fc区变体,其包含与SEQ ID NO:1至3有1个至20个(例如,1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个或20个)氨基酸不同的氨基酸序列。

[0221] 在一些实施方案中,提供了包含猫科动物IgG Fc CH2区变体的一种或多种多肽,所述CH2区变体包含与SEQ ID NO:4至6中任一者所示的氨基酸序列至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列。

[0222] 在一些实施方案中,特征在于包含猫科动物IgG Fc CH3区变体的一种或多种多肽,所述CH3区变体包含与SEQ ID NO:7至9中任一者所示的氨基酸序列至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列。

[0223] 在一些实施方案中,特征在于包含猫科动物IgG Fc区变体的一种或多种多肽,所述Fc区变体包含与SEQ ID NO:1至3中任一者所示的氨基酸序列至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列。

[0224] 如在别处指出的,在一些实施方案中,所述多肽还包含在与野生型猫科动物IgG的氨基酸位置250-256、氨基酸位置285-288、氨基酸位置307-315;氨基酸位置376-380、氨基酸位置383至392;或氨基酸位置428-437对应的区域中的至少一个另外的氨基酸取代,其中所述氨基酸位置基于EU编号,并且其中所述多肽与野生型猫科动物IgG的Fc结构域相比与猫科动物FcRn的结合增加。

[0225] 在一些实施方案中,所述多肽包含选自下面表2中公开的那些的至少一个(例如,1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、或20个)另外的氨基酸取代。

[0226] 表2:增加猫科动物IgG1a Fc变体与猫科动物FcRN结合的氨基酸取代(第1组和第2组)的列表。

[0227]

按EU编号的位置	野生型猫科动物IgG1a Fc	猫科动物IgG1a Fc变体氨基酸取代(第1组)	替代性猫科动物IgG1a Fc变体氨基酸取代(第2组)
252	S	W	FYMRV
254	S	RK	WYHLFVM
262	L	QE	
286	T	ED	
289	T	K	
290	S	VY	
293	E	DKH	
301	R	L	
309	L	VY	E
311	Q	RVKL	AYF
312	D	T	
326	K	D	
334	R	D	
347	Q	L	
355	Q	L	
377	I	VY	
380	E	DVT	
383	I	L	

[0228]

389c	N	R	
392	R	E	
426	S	LH	
428	S	RMYH	WL
434	S	RYFWH	A
437	T	L	

[0229] 可以在CH2结构域、CH3结构域或Fc结构域的一条或两条链上进行氨基酸取代。在一些情况下,在CH2结构域、CH3结构域或Fc结构域的两条链上的取代是相同的。在一些情况下,在CH2结构域、CH3结构域或Fc结构域的两条链上的取代是不相同的。在一些情况下,Fc区包含增加或降低效应子功能和/或改善产物异质性的一个或多个另外的取代。

[0230] 可以与半衰期增强取代组合的其他取代

[0231] 治疗性多肽/蛋白质(例如,单克隆抗体)的开发是复杂的过程,其需要协调一组复杂的活性以产生期望的多肽/蛋白质。这些包括对以下的优化:特异性、亲和力、功能活性、工程化细胞系中的表达水平、长期稳定性、效应子功能的消除或增强以及商业上可行的制造和纯化方法的开发。本公开涵盖促进上述目标中的任何一个或多个的任何另外的取代。

[0232] 在一些实施方案中,引入取代以降低猫科动物Fc区的效应子功能。此类取代对于本领域技术人员而言将是熟悉的,并且可以位于猫科动物IgG的一个或多个(例如,1个、2

个、3个、4个、5个、6个或7个)位置。说明性示例包括WO 2019/035010 A1。

[0233] 在一些实施方案中,将取代引入野生型猫科动物IgG Fc区以增强与蛋白A的结合,从而促进通过蛋白A色谱法的纯化。此类取代对于本领域技术人员而言将是熟悉的,并且可以位于猫科动物IgG的一个或多个(例如,1个、2个、3个、4个、5个、6个或7个)位置。说明性示例包括WO 2019/035010 A1。

[0234] 在一些实施方案中,可以进行另外的氨基酸取代以与亲本多肽或野生型多肽相比改变对FcRn的结合亲和力(例如,以增加或降低与FcRn的结合亲和力)。

[0235] 在一些实施方案中,所述多肽包含猫科动物抗体的铰链区。在一些实施方案中,可以对猫科动物抗体的铰链区进行修饰以延长半衰期。

[0236] 包含猫科动物IgG Fc变体的多肽

[0237] 本公开涵盖可以受益于在猫中半衰期延长的任何多肽。为了延长半衰期,这些多肽被设计成包括上文所公开的Fc区变体(例如,CH2区、CH3区、CH2+CH3区)。

[0238] 示例性多肽包括但不限于全抗体、scFv、纳米抗体、受体的配体结合部分、细胞因子、生长因子、酶和肽。例如,上文所公开的CH3结构域变体可以连接至scFv纳米抗体、受体的配体结合部分(例如,猫科动物IL-13Rα1或IL-13Rα2的配体结合部分)、细胞因子、生长因子、酶或肽。如本文所用,术语“纳米抗体”、“VHH”、“VHH抗体片段”和“单结构域抗体”在本文中可互换使用以表示在骆驼科(Camelidae)中发现的那些类型的抗体(其通常天然地发现缺乏轻链)的单重链的可变结构域。本领域技术人员将熟悉合适的纳米抗体,其说明性示例包括骆驼、单峰驼、美洲驼和羊驼的纳米抗体。可替代地,上文所公开的Fc区变体可以与这些多肽连接。在另一个实施方案中,猫科动物或猫科动物源化抗体被修饰以包括本文所公开的Fc区变体。

[0239] 在一些实施方案中,本公开的多肽包括抗体铰链区。铰链区可以位于多肽的抗原或配体结合结构域和Fc区变体之间。在一些情况下,铰链区连接至细胞因子、生长因子、酶或肽的C末端,并且铰链区连接至Fc区变体的N末端。下面提供了示例性铰链区序列。

[0240] IgG1a:KTDHPPGPKPCDCPKCP(SEQ ID NO:10);

[0241] IgG1b:KTDHPPGPKPCDCPKCP(SEQ ID NO:11);

[0242] IgG2:KTASTIESKTGEGPKCP(SEQ ID NO:12);

[0243] 在本公开的重组蛋白中的铰链区(如果使用的话)包括相对于SEQ ID NO:10-12所示的氨基酸序列的零个至六个(即,0个、1个、2个、3个、4个、5个、或6个)氨基酸取代。在一些情况下,本公开的重组蛋白中使用的铰链区与SEQ ID NO:10-12中任一者所示的氨基酸序列至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同。

[0244] 本公开的一种或多种多肽可以包含结合结构域。结合结构域可以特异性地结合本文所述的所选靶标的蛋白质、亚基、结构域、基序和/或表位。在一些实施方案中,一种或多种多肽(例如,融合多肽)可以包含蛋白质,其中所述蛋白质是本文所述的治疗性蛋白质。在一些实施方案中,靶标(例如,对于结合结构域的靶标)或治疗性蛋白质(例如,对于融合多肽)选自由以下组成的组:17-IA、4-1BB、4Dc、6-酮-PGF1a、8-异-PGF2a、8-氧代-dG、A1腺苷受体、A33、ACE、ACE-2、激活素、激活素A、激活素AB、激活素B、激活素C、激活素RIA、激活素RIA ALK-2、激活素RIB ALK-4、激活素RIIA、激活素RIIB、ADAM、ADAM10、ADAM12、ADAM15、

ADAM17/TACE、ADAMS、ADAM9、ADAMTS、ADAMTS4、ADAMTS5、地址素、aFGF、ALCAM、ALK、ALK-1、ALK-7、α-1-抗胰蛋白酶、α-V/β-1拮抗剂、ANG、Ang、APAF-1、APE、APJ、APP、APRIL、AR、IgE、血管紧张素1型(AT1)受体、血管紧张素2型(AT2)受体、ARC、ART、神经鞘胚素(Artemin)、抗Id、天门冬氨酸(ASPARTIC)、心钠素、av/b3整合素、Axl、b2M、B7-1、B7-2、B7-H、B淋巴细胞刺激剂(BlyS)、BACE、BACE-1、Bad、BAFF、BAFF-R、Bag-1、BAK、Bax、BCA-1、BCAM、Bcl、BCMA、BDNF、b-ECGF、bFGF、BID、Bik、BIM、BLC、BL-CAM、BLK、BMP、BMP-2BMP-2a、BMP-3成骨素、BMP-4BMP-2b、BMP-5、BMP-6Vgr-1、BMP-7(OP-1)、BMP-8(BMP-8a、OP-2)、BMPR、BMPR-IA(ALK-3)、BMPR-IB(ALK-6)、BRK-2、RPK-1、BMPR-II(BRK-3)、BMP、b-NGF、BOK、铃蟾肽、骨衍生神经营养因子、BPDE、BPDE-DNA、BTC、补体因子3(C3)、C3a、C4、C5、C5a、C10、CA125、CAD-8、降钙素、cAMP、癌胚抗原(CEA)、癌相关抗原、组织蛋白酶A、组织蛋白酶B、组织蛋白酶C/DPPI、组织蛋白酶D、组织蛋白酶E、组织蛋白酶H、组织蛋白酶L、组织蛋白酶O、组织蛋白酶S、组织蛋白酶V、组织蛋白酶X/Z/P、CBL、CC1、CCK2、CCL、CCL1、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL2、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27、CCL28、CCL3、CCL4、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9/10、CCR、CCR1、CCR10、CCR10、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CD1、CD2、CD3、CD3E、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8、CD10、CD11a、CD11b、CD11c、CD13、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD27L、CD28、CD29、CD30、CD30L、CD32、CD33(p67蛋白)、CD34、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD47、CD49a、CD52、CD54、CD55、CD56、CD61、CD64、CD66e、CD74、CD80(B7-1)、CD89、CD95、CD123、CD137、CD138、CD140a、CD146、CD147、CD148、CD152、CD164、CEACAM5、CFTR、cGMP、CINC、肉毒梭菌毒素、产气荚膜梭菌毒素、CKb8-1、CLC、CMV、CMV UL、CNTF、CNTN-1、COX、C-Ret、CRG-2、CT-1、CTACK、CTGF、CTLA-4、CX3CL1、CX3CR1、CXCL、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、CXCR、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、细胞角蛋白肿瘤相关抗原、DAN、DCC、DcR3、DC-SIGN、衰变加速因子、des(1-3)-IGF-I(脑IGF-1)、Dhh、地高辛、DNAM-1、Dna酶、Dpp、DPPIV/CD26、Dtk、ECAD、EDA、EDA-A1、EDA-A2、EDAR、EGF、EGFR(ErbB-1)、EMA、细胞外基质金属蛋白酶诱导因子(EMMPRIN)、ENA、内皮缩血管肽受体、脑啡肽酶、eNOS、Eot、嗜酸性粒细胞趋化因子(eotaxin)1、EpCAM、肝配蛋白(Ephrin)B2/EphB4、EPO、ERCC、E-选择素、ET-1、因子IIa、因子VII、因子VIIIc、因子IX、纤维母细胞活化蛋白(FAP)、Fas、FcR1、FEN-1、铁蛋白、FGF、FGF-19、FGF-2、FGF3、FGF-8、FGFR、FGFR-3、纤维蛋白、FL、FLIP、Flt-3、Flt-4、促卵泡激素、分形趋化因子(Fractalkine)、FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、FZD10、G250、Gas 6、GCP-2、GCSF、GD2、GD3、GDF、GDF-1、GDF-3(Vgr-2)、GDF-5(BMP-14、CDMP-1)、GDF-6(BMP-13、CDMP-2)、GDF-7(BMP-12、CDMP-3)、GDF-8(肌肉生长抑制素)、GDF-9、GDF-15(MIC-1)、GDNF、GDNF、GFAP、GFRa-1、GFR-α1、GFR-α2、GFR-α3、GITR、GLP1、GLP2、胰高血糖素、Glut 4、糖蛋白IIb/IIIa(GP IIb/IIIa)、GM-CSF、gp130、gp72、GRO、GnRH、生长激素释放因子、半抗原(NP-cap或NIP-cap)、HB-EGF、HCC、HCMV gB包膜糖蛋白、HCMV)gH包膜糖蛋白、HCMV UL、造血生长因子(HGF)、Hep B gp120、类肝素酶、Her2、Her2/neu(ErbB-2)、Her3(ErbB-3)、Her4(ErbB-4)、单纯疱疹病毒(HSV)gB糖蛋白、HSV gD糖蛋白、HGFA、高分子量黑素瘤相关抗原(HMW-MAA)、HIV gp120、HIVIIIB gp120 V3环、HLA、HLA-DR、HM1.24、HMFG PEM、HRG、Hrk、心肌肌球蛋白、巨细胞病毒(CMV)、生长激素(GH)、HVEM、I-309、IAP、ICAM、

ICAM-1、ICAM-3、ICE、ICOS、IFNg、Ig、IgA受体、IgE、IGF、IGF结合蛋白、IGF-1R、IGFBP、IGF-I、IGF-II、IL、IL-1、IL-1R、IL-2、IL-2R、IL-4、IL-4R、IL-5、IL-5R、IL-6、IL-6R、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17、IL-18、IL-18R、IL-21、IL-22、IL-23、IL-25、IL-31、IL-33、白介素受体(例如,IL-1R、IL-2R、IL-4R、IL-5R、IL-6R、IL-8R、IL-9R、IL-10R、IL-12R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-21R、IL-22R、IL-23R、IL-25R、IL-31R、IL-33R)、干扰素(INF)-α、INF-β、INF-γ、抑制素、iNOS、胰岛素A链、胰岛素B链、胰岛素样生长因子1、整合素α2、整合素α3、整合素α4、整合素α4/β1、整合素α4/β7、整合素α5(αV)、整合素α5/β1、整合素α5/β3、整合素α6、整合素β1、整合素β2、干扰素γ、IP-10、I-TAC、JE、激肽释放酶2、激肽释放酶5、激肽释放酶6、激肽释放酶11、激肽释放酶12、激肽释放酶14、激肽释放酶15、激肽释放酶L1、激肽释放酶L2、激肽释放酶L3、激肽释放酶L4、KC、KDR、角蛋白形成细胞生长因子(KGF)、层粘连蛋白5、LAMP、LAP、LAP(TGF-1)、潜在的TGF-1、潜在的TGF-1bp1、LBP、LDGF、LECT2、Lefty、Lewis-Y抗原、Lewis-Y相关抗原、LFA-1、LFA-3、Lfo、LIF、LIGHT、脂蛋白、LIX、LKN、Lptn、L-选择素、LT-a、LT-b、LTB4、LTBP-1、肺表面活性物质、促黄体激素、淋巴毒素β受体、Mac-1、MAdCAM、MAG、MAP2、MARC、MCAM、MCAM、MCK-2、MCP、M-CSF、MDC、Mer、金属蛋白酶、MGDF受体、MGMT、MHC(HLA-DR)、MIF、MIG、MIP、MIP-1-α、MK、MMAC1、MMP、MMP-1、MMP-10、MMP-11、MMP-12、MMP-13、MMP-14、MMP-15、MMP-2、MMP-24、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9、MPIF、Mpo、MSK、MSP、粘蛋白(Muc1)、MUC18、缪勒管抑制物质、Mug、MuSK、NAIP、NAP、NAV 1.7、NCAD、N-钙粘蛋白、NCA 90、NCAM、NCAM、肾胰岛素残基溶酶(Neprilysin)、神经营养因子-3、-4或-6、Neurturin、神经元生长因子(NGF)、NGFR、NGF-β、nNOS、NO、NOS、Npn、NRG-3、NT、NTN、OB、OGG1、OPG、OPN、OSM、OX40L、OX40R、p150、p95、PADPr、甲状旁腺激素、PARC、PARP、PBR、PBSF、PCAD、P-钙粘蛋白、PCNA、PD1、PDL1,PDGF、PDGF、PDK-1、PECAM、PEM、PF4、PGE、PGF、PGI2、PGJ2、PIN、PLA2、胎盘碱性磷酸酶(PLAP)、P1GF、PLP、PP14、胰岛素原、松弛素原(Prorelaxin)、蛋白C、PS、PSA、PSCA、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、PTEN、PTHrp、Ptk、PTN、R51、RANK、RANKL、RANTES、RANTES、松弛素A链、松弛素B链、肾素、呼吸道合胞病毒(RSV)F、RSV Fgp、Ret、类风湿因子、RLIP76、RPA2、RSK、S100、SCF/KL、SDF-1、SERINE、血清白蛋白、sFRP-3、Shh、SIGIRR、SK-1、SLAM、SLPI、SMAC、SMDF、SMOH、SOD、SPARC、Stat、STEAP、STEAP-II、TACE、TACI、TAG-72(肿瘤相关糖蛋白-72)、TARC、TCA-3、T细胞受体(例如,T细胞受体α/β)、TdT、TECK、TEM1、TEM5、TEM7、TEM8、TERT、睾丸PLAP样碱性磷酸酶、TfR、TGF、TGF-α、TGF-β、TGF-βPan特异性、TGF-βR1(ALK-5)、TGF-βR11、TGF-βRIIb、TGF-βRIII、TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3、TGF-β4、TGF-β5、凝血酶、胸腺Ck-1、促甲状腺激素、Tie、TIMP、TIQ、组织因子、TMEFF2、Tmpo、TMPRSS2、TNF、TNF-α、TNF-αβ、TNF-β2、TNFc、TNF-RI、TNF-RII、TNFRSF10A(TRAIL R1Apo-2、DR4)、TNFRSF10B(TRAIL R2DR5、KILLER、TRICK-2A、TRICK-B)、TNFRSF10C(TRAIL R3DcR1、LIT、TRID)、TNFRSF10D(TRAIL R4 DcR2、TRUNDD)、TNFRSF11A(RANK ODF R、TRANCE R)、TNFRSF11B(OPG OCIF、TR1)、TNFRSF12(TWEAK R FN14)、TNFRSF13B(TACI)、TNFRSF13C(BAFF R)、TNFRSF14(HVEM ATAR、HveA、LIGHT R、TR2)、TNFRSF16(NGFR p75NTR)、TNFRSF17(BCMA)、TNFRSF18(GITR AITR)、TNFRSF19(TROY TAJ、TRADE)、TNFRSF19L(RELT)、TNFRSF1A(TNF R1CD120a、p55-60)、TNFRSF1B(TNF RIICD120b、p75-80)、TNFRSF26(TNFRH3)、TNFRSF3(LTbR TNF RIII、TNFC R)、TNFRSF4(OX40 ACT35、TXGP1 R)、TNFRSF5(CD40 p50)、TNFRSF6(Fas Apo-1、APT1、CD95)、TNFRSF6B(DcR3M68、TR6)、TNFRSF7(CD27)、

TNFRSF8(CD30)、TNFRSF9(4-1BB CD137、ILA)、TNFRSF21(DR6)、TNFRSF22(DCTRAIL R2 TNFRH2)、TNFRST23(DCTRAIL R1TNFRH1)、TNFRSF25(DR3Apo-3、LARD、TR-3、TRAMP、WSL-1)、TNFSF10(TRAIL Apo-2配体、TL2)、TNFSF11(TRANCE/RANK配体ODF、OPG配体)、TNFSF12(TWEAK Apo-3配体、DR3配体)、TNFSF13(APRIL TALL2)、TNFSF13B(BAFF BLYS、TALL1、THANK、TNFSF20)、TNFSF14(LIGHT HVEM配体、LTg)、TNFSF15(TL1A/VEGI)、TNFSF18(GITR配体AITR配体、TL6)、TNFSF1A(TNF-a连接素(Conectin)、DIF、TNFSF2)、TNFSF1B(TNF-b LTa、TNFSF1)、TNFSF3(LTb TNFC、p33)、TNFSF4(OX40配体gp34、TXGP1)、TNFSF5(CD40配体CD154、gp39、HIGM1、IMD3、TRAP)、TNFSF6(Fas配体Apo-1配体、APT1配体)、TNFSF7(CD27配体CD70)、TNFSF8(CD30配体CD153)、TNFSF9(4-1BB配体CD137配体)、TP-1、t-PA、Tpo、TRAIL、TRAIL R、TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRANCE、转移受体、TRF、Trk(例如,TrkA)、TROP-2、TSG、TSLP、肿瘤相关抗原CA 125、肿瘤相关抗原表达Lewis Y相关碳水化合物、TWEAK、TXB2、Ung、UPAR、uPAR-1、尿激酶、VCAM、VCAM-1、VECAD、VE-钙粘蛋白、VE-钙粘蛋白-2、VEFGR-1(fit-1)、VEGF、VEGFR、VEGFR-3(flt-4)、VEGI、VIM、病毒抗原、VLA、VLA-1、VLA-4、VNR整合素、血管性学友病因子、WIF-1、WNT1、WNT2、WNT2B/13、WNT3、WNT3A、WNT4、WNT5A、WNT5B、WNT6、WNT7A、WNT7B、WNT8A、WNT8B、WNT9A、WNT9A、WNT9B、WNT10A、WNT10B、WNT11、WNT16、XCL1、XCL2、XCR1、XCR1、XEDAR、XIAP、XPD、以及激素和生长因子的受体。

[0245] 在一些实施方案中,结合结构域特异性地结合猫科动物中的一种或多种治疗靶标或抗原,诸如但不限于ACE、ACE-2、激活素、激活素A、激活素AB、激活素B、激活素C、激活素RIA、激活素RIA ALK-2、激活素RIB ALK-4、激活素RIIA、激活素RIIB、ADAM、ADAM10、ADAM12、ADAM15、ADAM17/TACE、ADAMS、ADAM9、ADAMTS、ADAMTS4、ADAMTS5、ANG、Ang、1型血管紧张素(AT1)受体、2型血管紧张素(AT2)受体、心钠素、av/b3整合素、b-ECGF、CD19、CD20、CD30、CD34、CD40、CD40L、CD47、COX、CTLA-4、EGFR(ErbB-1)、EPO、促卵泡激素、GDF-8(肌肉生长抑制素)、GLP1、GLP2、GnRH、生长激素释放因子、IgE、IL、IL-1、IL-1R、IL-2、IL-2R、IL-4、IL-4R、IL-5、IL-5R、IL-6、IL-6R、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17、IL-18、IL-18R、IL-21、IL-22、IL-23、IL-25、IL-31、IL-33、白介素受体(例如,IL-1R、IL-2R、IL-4R、IL-5R、IL-6R、IL-8R、IL-9R、IL-10R、IL-12R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-21R、IL-22R、IL-23R、IL-25R、IL-31R、IL-33R)、LAP(TGF-1)、潜在的TGF-1、潜在的TGF-1bp1、LFA-1、神经元生长因子(NGF)、NGFR、NGF-β、OX40L、OX40R、PD1、PDL1、TGF、TGF-α、TGF-β、TGF-βPan特异性、TGF-βR1(ALK-5)、TGF-βR11、TGF-βRIIb、TGF-βRIII、TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3、TGF-β4、TGF-β5、TNF、TNF-α、TNF-αβ、TNF-β2、TNFc、TNF-RI、TNF-RII、TNFRSF16(NGFR p75NTR)、TNFRSF9(4-1BB CD137、ILA)、VEFGR-1(fit-1)、VEGF、VEGFR或VEGFR-3(flt-4)。

[0246] 在一些实施方案中,所述一种或多种多肽可以包含蛋白质,其中所述蛋白质是治疗性蛋白质,例如,EPO、CTLA4、LFA3、VEGFR1/VEGFR3、IL-1R、IL-4R、GLP-1受体激动剂和血小板生成素结合肽。在一些实施方案中,治疗性蛋白质是ACE、ACE-2、激活素、激活素A、激活素AB、激活素B、激活素C、激活素RIA、激活素RIA ALK-2、激活素RIB ALK-4、激活素RIIA、激活素RIIB、ADAM、ADAM10、ADAM12、ADAM15、ADAM17/TACE、ADAMS、ADAM9、ADAMTS、ADAMTS4、ADAMTS5、ANG、Ang、血管紧张素1型(AT1)受体、血管紧张素2型(AT2)受体、心钠素、av/b3整合素、b-ECGF、CD19、CD20、CD30、CD34、CD40、CD40L、CD47、COX、CTLA-4、EGFR(ErbB-1)、EPO、促卵泡激素、GDF-8(肌肉生长抑制素)、GLP1、GLP2、GnRH、生长激素释放因子、IgE、IL、IL-1、

IL-1R、IL-2、IL-2R、IL-4、IL-4R、IL-5、IL-5R、IL-6、IL-6R、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17、IL-18、IL-18R、IL-21、IL-22、IL-23、IL-25、IL-31、IL-33、白介素受体(例如,IL-1R、IL-2R、IL-4R、IL-5R、IL-6R、IL-8R、IL-9R、IL-10R、IL-12R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-21R、IL-22R、IL-23R、IL-25R、IL-31R、IL-33R)、LAP(TGF-1)、潜在的TGF-1、潜在的TGF-1bp1、LFA-1、神经元生长因子(NGF)、NGFR、NGF-β、OX40L、OX40R、PD1、PDL1、TGF、TGF-α、TGF-β、TGF-βPan特异性、TGF-βR1(ALK-5)、TGF-βR11、TGF-βRIIb、TGF-βRIII、TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3、TGF-β4、TGF-β5、TNF、TNF-α、TNF-αβ、TNF-β2、TNFc、TNF-RI、TNF-RII、TNFRSF16(NGFR p75NTR)、TNFRSF9(4-1BB CD137、ILA)、VEFGR-1(fit-1)、VEGF、VEGFR或VEGFR-3(flt-4)。

[0247] 药物组合物

[0248] 为了制备本文所述的一种或多种多肽的药物或无菌组合物,可以将所述一种或多种多肽与药学上可接受的载体或赋形剂混合。(参见例如,Remington's Pharmaceutical Sciences和美国药典:国家处方集(U.S.Pharmacopeia:National Formulary),Mack出版公司,Easton,Pa.(1984))。

[0249] 治疗剂和诊断剂的制剂可以通过与可接受的载体、赋形剂或稳定剂以例如冻干粉末、浆液、水溶液或悬浮液的形式混合来制备(参见例如Hardman等人(2001)Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics,McGraw-Hill,New York,N.Y.;Gennaro(2000)Remington:The Science and Practice of Pharmacy,Lippincott,Williams,and Wilkins,New York,N.Y.;Avis等人(编辑)(1993)Pharmaceutical Dosage Forms:Parenteral Medications,Marcel Dekker,NY;Lieberman等人(编辑)(1990)Pharmaceutical Dosage Forms:Tablets,Marcel Dekker,NY;Lieberman等人(编辑)(1990)Pharmaceutical Dosage Forms:Disperse Systems,Marcel Dekker,NY;Weiner和Kotkoskie(2000)Excipient Toxicity and Safety,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.)。在一个实施方案中,将本发明的一种或多种多肽在pH 5-6的乙酸钠溶液中稀释至合适的浓度,并且添加NaCl或蔗糖以调节张力。可以添加另外的药剂(诸如聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80)以增强稳定性。

[0250] 可以在细胞培养物或实验动物中通过标准药学程序确定单独施用或与另一种药剂组合施用的多肽组合物的毒性和治疗功效,例如用于确定LD_{50}(使群体的50%致死的剂量)和ED_{50}(在群体的50%中治疗有效的剂量)。在毒性和治疗效果之间的剂量比是治疗指数(LD_{50}/ED_{50})。在特定的方面,一种或多种多肽表现出高治疗指数是令人希望的。从这些细胞培养测定和动物研究获得的数据可以用于配制用于猫科动物的剂量范围。此类化合物的剂量优选地在包括ED_{50}的循环浓度范围内,而毒性很小或没有毒性。剂量可以在该范围内变化,这取决于所用的剂型和施用途径。

[0251] 施用模式可以变化。合适的施用途径包括口服、直肠、经粘膜、肠、肠胃外;肌内、皮下、皮内、髓内、鞘内、直接心室内、静脉内、腹膜内、鼻内、眼内、吸入、吹入、局部、皮肤、经皮或动脉内。在一些实施方案中,一种或多种多肽可以通过侵入性途径诸如通过注射施用。在另外的实施方案中,通过静脉内、皮下、肌内、动脉内、肿瘤内或通过吸入、气雾剂递送来施用。

[0252] 还可以通过输注施用本文所公开的药物组合物。用于施用药物组合物的熟知的埋

植剂和模块的示例包括:美国专利号4,487,603,其公开了用于以受控速率分配药物的可植入微量输注泵;美国专利号4,447,233,其公开了用于以精确输注速率递送药物的药物输注泵;美国专利号4,447,224,其公开了用于连续药物递送的可变流量可植入输注装置;美国专利号4,439,196,其公开了具有多室隔室的渗透药物递送系统。许多其他的这种植入物、递送系统和模块为本领域技术人员所熟知。

[0253] 可替代地,人们可以以局部而不是全身的方式施用一种或多种多肽,例如通过将抗体直接注射到关节炎关节或以免疫病理学为特征的病原体诱导的损伤中,通常以储库或持续释放制剂的形式。此外,人们可以在靶向药物递送系统中(例如在包被有组织特异性抗体的脂质体中,靶向例如关节炎关节或以免疫病理学为特征的病原体诱导的病变)施用一种或多种多肽。脂质体将靶向患病组织并被患病组织选择性地吸收。

[0254] 施用方案取决于若干因素,包括但不限于所治疗的猫科动物的年龄、体重和身体状况、治疗性抗体的血清或组织周转率、症状水平、一种或多种治疗性多肽的免疫原性和靶细胞在生物基质中的可及性。在一些实施方式中,施用方案递送足够的一种或多种治疗性多肽以实现靶疾病状态的改善,而同时最小化不期望的副作用。因此,生物递送的量部分取决于特定的治疗性多肽和所治疗病状的严重程度。选择合适剂量的治疗性抗体的指导是可用的(参见例如,Wawrzynczak Antibody Therapy,Bios Scientific Pub.Ltd,Oxfordshire,UK(1996);Milgrom等人New Engl.J.Med.341:1966-1973(1999);Slamon等人New Engl.J.Med.344:783-792(2001);Beniaminovitz等人New Engl.J.Med.342:613-619(2000);Ghosh等人New Engl.J.Med.348:24-32(2003);Lipsky等人New Engl.J.Med.343:1594-1602(2000))。

[0255] 本领域技术人员例如使用本领域已知或怀疑影响治疗的参数或因素来确定一种或多种多肽的合适剂量。通常,剂量以稍微小于最佳剂量的量开始,并且此后以小增量增加,直到相对于任何负面副作用实现期望的或最佳的效果。重要的诊断量度包括例如炎症症状或产生的炎性细胞因子水平的那些量度。

[0256] 核酸、载体、宿主细胞和制备方法

[0257] 本公开还涵盖编码本文所述的一种或多种多肽的一种或多种核酸、包含所述一种或多种核酸的一种或多种载体、以及包含所述一种或多种核酸或所述一种或多种载体的宿主细胞。

[0258] 本文所述的一种或多种多肽可以在细菌或真核细胞中产生。一些多肽(例如Fab的)可以在细菌细胞(例如大肠杆菌细胞)中产生。多肽也可以在真核细胞诸如转化细胞系(例如,CHO、293E、COS、293T、Hela)中产生。此外,多肽(例如,scFv的)可以在酵母细胞诸如毕赤酵母(Pichia)(参见例如,Powers等人,J Immunol Methods.251:123-35(2001));汉逊酵母(Hanseula)或酵母菌(Saccharomyces)中表达。为了产生感兴趣的抗体,构建编码一种或多种多肽的一种或多种多核苷酸,将其引入一种或多种表达载体中,然后在合适的宿主细胞中表达。为了改善表达,可以在不改变(或最小程度地改变-例如去除重链或轻链的C末端残基)氨基酸序列的情况下再编码基因的核苷酸序列。潜在再编码的区域包括与翻译起始、密码子使用和可能的非预期mRNA剪接相关的区域。编码本文所述的Fc区变体的多核苷酸是普通技术人员容易想到的。

[0259] 标准分子生物学技术可以用于制备一种或多种重组表达载体,转染宿主细胞,选

择转化体,培养宿主细胞和回收多肽(例如抗体)。

[0260] 如果所述一种或多种多肽将在细菌细胞(例如,大肠杆菌)中表达,则表达载体应该具有允许所述载体在所述细菌细胞中扩增的特征。此外,在大肠杆菌(诸如JM109,DH5α,HB101或XL1-Blue)用作宿主时,载体必须具有启动子,例如lacZ启动子(Ward等人,341:544-546(1989)、araB启动子(Better等人,Science,240:1041-1043(1988))或可以允许在大肠杆菌中有效表达的T7启动子。此类载体的示例包括例如M13系列载体、pUC系列载体、pBR322、pBluescript、pCR-Script、pGEX-5X-1(Pharmacia)、"QIAexpress系统"(QIAGEN)、pEGFP和pET(当使用这种表达载体时,宿主优选地为表达T7 RNA聚合酶的BL21)。表达载体可以含有用于抗体分泌的信号序列。为了在大肠杆菌的周质中产生,pelB信号序列(Lei等人,J.Bacteriol.,169:4379(1987))可以用作抗体分泌的信号序列。对于细菌表达,可以使用氯化钙方法或电穿孔方法将表达载体引入细菌细胞中。

[0261] 如果所述一种或多种多肽在动物细胞诸如CHO、COS和NIH3T3细胞中表达,则表达载体包括在这些细胞中表达所必需的启动子,例如SV40启动子(Mulligan等人,Nature,277:108(1979))(例如,早期猿猴病毒40启动子)、MMLV-LTR启动子、EF1α启动子(Mizushima等人,Nucleic Acids Res.,18:5322(1990))或CMV启动子(例如,人巨细胞病毒立即早期启动子)。除了编码Fc区变体的核酸序列之外,重组表达载体可以携带另外的序列,诸如调节载体在宿主细胞中复制的序列(例如复制起点)和选择标记基因。选择标记基因有助于选择已引入载体的宿主细胞(参见例如,美国专利号4,399,216、4,634,665和5,179,017)。例如,典型地,选择标记基因赋予引入了载体的宿主细胞对药物诸如G418、潮霉素或甲氨蝶呤的抗性。具有选择标记的载体的示例包括pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV和pOP13。

[0262] 在一些实施方案中,所述一种或多种多肽在哺乳动物细胞中产生。用于表达一种或多种多肽的示例性哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢(CHO细胞)(包括dhfr-CHO细胞(描述于Urlaub和Chasin(1980)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216-4220中),其与例如在以下文献中所描述的DHFR选择标记一起使用:Kaufman和Sharp(1982)Mol.Biol.159:601621)、人胚肾293细胞(例如,293、293E、293T)、COS细胞、NIH3T3细胞、淋巴细胞系(例如,NS0骨髓瘤细胞和SP2细胞)和来自转基因动物(例如,转基因哺乳动物)的细胞。例如,所述细胞是乳腺上皮细胞。

[0263] 在用于抗体表达的示例性系统中,通过磷酸钙介导的转染将编码抗体的抗体重链和抗体轻链两者的重组表达载体引入dhfr-CHO细胞中。在重组表达载体内,抗体重链和轻链基因各自可操作地连接至增强子/启动子调控元件(例如,源自SV40、CMV、腺病毒等,诸如CMV增强子/AdMLP启动子调控元件或SV40增强子/AdMLP启动子调控元件)以驱动基因的高水平转录。重组表达载体还携带DHFR基因,其允许使用甲氨蝶呤选择/扩增来选择已经转染上载体的CHO细胞。培养所选择的转化体宿主细胞以允许抗体重链和轻链的表达,并且从培养基中回收所述抗体。

[0264] 治疗方法

[0265] 本文所公开的一种或多种多肽可以用于治疗或预防有需要的猫的任何疾病或病症。本发明特别有助于治疗需要重复给药的慢性疾患。由于蛋白质治疗剂的半衰期延长,较不频繁的给药和/或降低的剂量水平可能是可以的。

[0266] 在一些实施方案中,所治疗或预防的疾病、病症、疾患或症状是变应性疾病、慢性

疼痛、急性疼痛、炎性疾病、自身免疫性疾病、内分泌疾病、胃肠疾病、骨骼/肌肉骨骼疾病、心血管疾病、神经疾病、肾病、代谢疾病、免疫性疾病、基因/遗传疾病、生育相关病症、感染性疾病或癌症。在某些实施方案中,所治疗或预防的疾病或病症是特应性皮炎、变应性皮炎、食物过敏、骨关节炎性疼痛、围手术期疼痛、牙痛、癌症疼痛、关节炎、贫血、肥胖症或糖尿病。

[0267] 抗体不仅可以用于治疗或预防疾病,而且还可以用于调节正常的生物学功能,例如管理生育力或行为。

[0268] 诊断

[0269] 本文所公开的一种或多种多肽也可以用于各种诊断目的,例如确定猫是否患有任何特定疾病或病症。在一些实施方案中,所述一种或多种多肽可以包含结合结构域。结合结构域可以特异性地结合如本文所述的蛋白质、亚基、结构域、基序和/或表位(例如,癌细胞的标志物)。在一些实施方案中,所述一种或多种多肽还包含标记基团。通常,标记基团根据它们将被检测的测定而分成多种类别:a)同位素标记,其可以是放射性同位素或重同位素;b)磁性标记(例如磁性颗粒);c)氧化还原活性部分;d)光学染料;酶基团(例如,辣根过氧化物酶、β-半乳糖苷酶、荧光素酶、碱性磷酸酶);e)生物素化基团;和f)由第二报告分子识别的预定多肽表位(例如,亮氨酸拉链对序列、第二抗体的结合位点、金属结合结构域、表位标签等)。在一些实施方案中,标记基团通过各种长度的间隔臂与抗体偶联以减少潜在的空间位阻。标记蛋白质的各种方法是本领域已知的,并且可以用于实施本发明。

[0270] 在一些实施方案中,标记基团是探针、染料(例如,荧光染料)或放射性同位素(例如,^{3}H、^{14}C、^{22}Na、^{36}Cl、^{35}S、^{33}P或^{125}I)。

[0271] 特定的标记可以包括光学染料,包括但不限于发色团、磷光体和荧光团,后者在许多情况下是特定的。荧光团可以是“小分子”荧光团或蛋白质性质的荧光团。

[0272] 荧光标记可以是可以通过其固有荧光性质检测到的任何分子。合适的荧光标记包括但不限于荧光素、罗丹明、四甲基罗丹明、曙红、赤藓红、香豆素、甲基香豆素、芘、孔雀绿、芪、萤光黄、级联蓝(Cascade BlueJ)、德克萨斯红(Texas Red)、IAEDANS、EDANS、BODIPY FL、LC Red 640、Cy 5、Cy 5.5、LC Red 705、俄勒冈绿、Alexa-Fluor染料(Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 546、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680)、级联蓝(Cascade Blue)、级联黄和R-藻红蛋白(PE)(Molecular Probes,Eugene,Oreg.)、FITC、罗丹明和德克萨斯红(Pierce,Rockford,Ill.)、Cy5、Cy5.5、Cy7(Amersham Life Science,Pittsburgh,Pa.)。在Richard P.Haugland的Molecular Probes Handbook(其以引用的方式整体并入本文)中描述了合适的光学染料,包括荧光团。

[0273] 合适的蛋白质性质的荧光标记还包括但不限于绿色荧光蛋白(包括海肾(Renilla)、Ptilosarcus或Aequorea物种的GFP(Chalfie等人,1994,Science 263:802-805))、EGFP(Clontech Laboratories,Inc.,Genbank登录号U55762)、蓝色荧光蛋白(BFP,Quantum Biotechnologies,Inc.1801de Maisonneuve Blvd.West,8th Floor,Montreal,Quebec,Canada H3H1J9;Stauber,1998,Biotechniques24:462-471;Heim等人,1996,Curr.Biol.6:178-182)、增强的黄色荧光蛋白(EYFP,Clontech Laboratories,Inc.)、荧光素酶(Ichiki等人,1993,J.Immunol.150:5408-5417)、β半乳糖苷酶(Nolan等人,1988,

Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.85:2603-2607)和海肾(WO92/15673、WO95/07463、WO98/14605、WO98/26277、WO99/49019;美国专利号5,292,658、5,418,155、5,683,888、5,741,668、5,777,079、5,804,387、5,874,304、5,876,995、5,925,558)。本段中所有上述引用的参考文献全部以引用的方式整体明确地并入本文。

[0274] 测定

[0275] Fc_{γ}RI和Fcγ RIII结合:

[0276] 与Fcγ RI和Fcγ RIII的结合是抗体介导ADCC的能力的量度。为了评估抗体的这种性质,可以使用本领域已知的方法进行测量抗体与Fcγ RI和Fcγ RIII的结合的测定。

[0277] C1q结合:

[0278] 与补体第一组分C1q的结合是抗体介导补体依赖性细胞毒性(CDC)的能力的量度。为了评估抗体的这种性质,可以使用本领域已知的方法进行测量抗体与C1q的结合的测定。

[0279] 半衰期:

[0280] 测量抗体半衰期的方法是本领域熟知的。参见例如Booth等人,MAbs,10(7):1098-1110(2018)。作为示例,可以通过将抗体注射到动物模型(例如猫模型)中并且在一定时间段内测量血清中抗体的水平来测量抗体(例如猫科动物抗体)的半衰期。示例性的动物模型包括非人灵长类动物模型和转基因小鼠模型。转基因小鼠模型(例如Tg32或Tg276转基因小鼠)对于小鼠FcRnα链可能是无效的并且表达人FcRnα转基因(例如,在组成型启动子的控制下)。人FcRnα链可以在体内与小鼠β2微球蛋白配对,形成功能性嵌合FcRn异二聚体。

[0281] 实施例

[0282] 实施例1:在选定位置的NNK饱和诱变文库的产生和单个变体的分析

[0283] 合成猫科动物IgG1a的CH2和CH3结构域的野生型(wt)序列(SEQ ID NO:1)并且将其用作NNK诱变的模板。NNK饱和诱变方法是在期望的位置产生所有20种可能氨基酸的有效策略(Hogrefe等人,Biotechniques.33:1158-1165[2002])。产生在位置252、428和434(EU编号)的单个NNK文库。在指定位置的NNK(N=A/C/G/T,K=G/T)引物与QuikChange定点诱变试剂盒(Agilent)一起使用。将PCR产物亚克隆到GenScript FASEBA质粒中,转化到大肠杆菌中,并且测序验证变体的存在。CH3结构域的下游是SASA(针对血清白蛋白的单结构域抗体)标签(Zhang,J.;Wu,S.;Liu,J.Methods and systems for increasing protein stability.专利申请号:US2013/0129727 A1),其对白蛋白具有pM亲和力。SASA抗体能够将Fc捕获到下文所述的传感器芯片表面上。PelB(果胶酸裂合酶B)信号肽位于N末端以促进Fc分泌到培养基中。CH2-CH3蛋白的表达由Lac启动子调控。对于变体使用表面等离子体共振(SPR)分析来自条件培养基的上清液在pH6.0下与猫科动物FcRn(GenBank KF773786[IgG受体FcRn大亚基p51]和欧洲核苷酸档案AY829266.1[猫科动物β2微球蛋白])的结合。

[0284] 如下文所述,使用Biacore方法在pH6.0测定来自每个文库的90个单独转化体的上清液与猫科动物FcRn的结合。

[0285] 对于使用Biacore 8K的SPR分析,将牛血清白蛋白(BSA)固定到CM5传感器芯片上。通过新鲜混合的50mmol/L N-羟基琥珀酰亚胺和200mmol/L 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐来活化流动池1和2的传感器芯片表面,持续420s(10μL/min)。然后,将在10mM乙酸钠(pH 4.5)中稀释的BSA注射到流动池2中以实现缀合,同时将流动池1设定为空白。在胺偶联反应后,用420s注射1mM乙醇胺盐酸盐封闭芯片表面上剩余的活性偶联位

点。用于结合实验的运行缓冲液是HBS-EP(10mM HEPES、500mM NaCl、3mM EDTA、0.05％Tween 20,pH 5.5)并且其在25℃运行。将来自变体的上清液注射到芯片表面上,并且通过SASA标签捕获到固定的BSA上持续60秒。将200nM的猫科动物FcRn注射120秒,并且用运行缓冲液完成解离,持续120秒。BSA的固定相的流速为10μl/min,并且结合和解离相的流速为30μl/min。使用Biacore 8K评价软件1.1版处理所有数据。关于Biacore传感图参见图1和2。

[0286] 当与野生型猫科动物IgG1a Fc(SEQ ID NO:1)相比时,所测试的变体显示在pH 6.0下对猫科动物FcRn的结合亲和力增加。

[0287] 发现在氨基酸位置252、428和434的NNK诱变产生增加在pH6.0下与FcRn结合的突变体。在这3个位置处产生的所有90个克隆的测序指示没有产生以下6个克隆,即S252H、S428E、S428C、S428F、S428W和S434Y。在这些位置处的所有其他氨基酸取代对测试没有产生益处。结果总结在下面表3中。

[0288] 表3:IgG变体与FcRn的结合动力学。

[0289]

变体	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
S252W	2.28E+05	5.38E-03	2.35E-08
S252W	2.34E+05	5.45E-03	2.33E-08
S252Y	2.58E+05	2.63E-02	1.02E-07
S252Y	2.57E+05	2.65E-02	1.03E-07
S252F	2.03E+05	9.57E-02	4.70E-07
S252F	2.05E+05	1.01E-01	4.92E-07
S428L	1.62E+05	7.88E-02	4.85E-07
S428L	1.05E+05	8.03E-02	7.63E-07
S428M	1.66E+05	1.00E-01	6.03E-07
S428Y	1.95E+05	1.03E-01	5.28E-07
S428Y	1.87E+05	1.05E-01	5.65E-07
S434F	3.78E+05	1.58E-02	4.17E-08
S434F	3.71E+05	1.61E-02	4.33E-08
S434W	3.14E+05	1.75E-02	5.56E-08
S434W	4.02E+05	2.02E-02	5.02E-08
S434H	2.41E+05	7.61E-02	3.16E-07
S434H	2.00E+05	8.88E-02	4.44E-07
野生型	3.14E+05	3.74E-01	1.19E-06
野生型	1.19E+05	1.95E-01	1.64E-06

[0290] 实施例2:猫科动物IgG1a Fc的扫描诱变

[0291] 使用噬菌体展示文库方法鉴定增加在pH 6.0下对FcRn的亲和力的猫科动物IgG1a Fc变体。猫科动物IgG1a Fc(Kanai等人,2000.Vet.Immunol.Immunopathol.73:53)由Twist Bioscience合成,其在55个不同位置处具有变体(图4)。在每个突变的位置处,8个可能的氨

基酸被取代。这些氨基酸是精氨酸和赖氨酸(带正电荷的侧链)、天冬氨酸和谷氨酸(带负电荷的侧链)、苏氨酸和谷氨酰胺(极性不带电荷的侧链)、以及亮氨酸和缬氨酸(疏水性侧链)。Fc DNA文库被设计为每个Fc分子具有平均两个变体。使用以下公式,该文库的复杂度为95,040个组合:nCr＝n!/r!*(n-r)!,其中n代表位点的数目,并且r代表每个分子的变体的数目。将具有所需位点特异性突变的Fc变体作为诱变寡核苷酸印刷在Twist基于硅的平台上。

[0292] 然后使用组装PCR来组装寡核苷酸以产生全长Fc基因片段库。然后将组装的Fc基因片段库克隆到来自抗体设计实验室(Antibody Design Labs)的pADL-22c噬菌粒载体中的Sfi切割位点。将克隆的DNA文库转化到电感受态TG1大肠杆菌细胞中以产生8x 10^{10}个变体的实验多样性。然后将噬菌粒转化的大肠杆菌细胞与M13K07辅助噬菌体共转染以产生噬菌体库,所述噬菌体库用于基于蛋白质的淘选。将文库重悬于20mM MES缓冲液(pH 6.0)、0.05％tween 20和3％的乳中。

[0293] 通过挑选96个随机噬菌体克隆并通过Sanger方法测序来确定文库的质量。每个噬菌体的突变体数量显示于下面表4中。

[0294] 表4:每个噬菌体的突变体数量。

[0295]

突变数量	克隆数量
0	5
1	19
2	44
3	19
4	5
5	1
6	2

[0296] 对于第一次噬菌体选择,使用蛋白A捕获步骤来清除失去蛋白A结合的任何Fc变体。对于该选择,将噬菌体文库捕获到蛋白A珠上并用PBS(pH 7.4)洗涤。将噬菌体用pH 2.7的0.1M甘氨酸洗脱,并且pH立即用1M Tris-HCl(pH 7.5)中和。将中和的噬菌体用聚乙二醇/NaCl沉淀并离心。将沉淀的噬菌体重悬于20mM MES(pH 6.0)、0.05％tween 20、3％的乳中。

[0297] 接下来的噬菌体选择基于Borrok等人,2015,J Biol.Chem.,290:4282所描述的方案。简言之,用中性亲和素(Neutravidin)包被Nunc96多孔板,然后将其用5％牛血清白蛋白、PBS(pH 7.4)封闭。将生物素化的猫科动物FcRn(FCN-F82W3,Acrobiosystems)在pH 6.0的PBS中以0.31μg/ml的浓度固定在孔中。将pH 6.0的PBS中的噬菌体文库与固定的猫科动物FcRn一起孵育,然后用PBS(pH 6.0)、0.05％tween 20、0.3M NaCl洗涤。通过在37℃孵育30分钟,用pH 7.4的PBS洗脱噬菌体。洗脱的噬菌体用0.31μg/ml猫科动物FcRn在pH 7.4下耗尽。在TG1细胞中扩增未结合的噬菌体。每轮的确切条件和结果显示于下面表5中。

[0298] 表5:用于噬菌体选择的洗涤条件和耗尽次数。

[0299]

轮	1	2	3	4
用 FcRn (0.3125 ug/mL)包被的孔的数量	8	6	4	4
洗涤次数	10	15	15	10 + 2x30 min
在 pH 7.4 下用 FcRn (0.3125 ug/mL)耗尽的次数	1	2	3	3
输入滴度(噬菌体/mL)	5.0×10^{11}	7.0×10^{12}	1.8×10^{12}	6.4×10^{12}
输出滴度(cfu/总体积)	8.4×10^{6}	6.6×10^{5}	1.87×10^{9}	$1.54\ 10^{9}$

[0300] 从第三轮选择的输出物中分离出总共768个噬菌体克隆,并且从第四轮选择中分离出768个噬菌体克隆。使用Illumina MiSeq通过下一代测序对克隆进行测序。

[0301] 测序结果揭示大量的克隆(参见下面表格)在位置252处含有取代的酪氨酸,在位置434处含有取代的酪氨酸或苯丙氨酸,表明一些取代含有除预期的八个氨基酸取代以外的残基。使用先前由以下所描述的可变结构域将独特的变体重新格式化为IgG:Gearing等人(2016,JVet Intern Med,30:1129)。用ExpiFectamine 293转染试剂将小量制备质粒DNA转染到Expi293细胞中。用蛋白A色谱法从条件培养基中纯化IgG变体,并且将其配制在43mM柠檬酸钠、130mM碳酸氢钠(pH 6.0)中。

[0302] 为了确定IgG变体对猫科动物FcRn的亲和力,使用Carterra仪器确定结合动力学。通过EDC/NHS激活将抗体(约5μg/ml)胺偶联至HC30M传感器芯片,然后用乙醇胺HCl淬灭。

[0303] 将几个浓度(333nM、111nM、37nM、12.3nM、4.1nM、1.37nM、0.45nM)的猫科动物FcRn(FCN-F82W3,Acrobiosystems)流过HBSTE(10mM HEPES、150mM NaCl、3mM EDTA、0.05% Tween-20)、0.5%牛血清白蛋白、pH 6.0中的传感器芯片以确定在pH 6.0下的动力学。除了将HBSTE缓冲液的pH调节至7.4外,使用该相同的策略确定在pH 7.4下对猫科动物FcRn的结合动力学。

[0304] IgG变体的猫科动物FcRn结合动力学显示于下面表6中。

[0305] 表6:IgG Fc变体与FcRn的结合动力学。

[0306]

	pH 6.0			pH 7.4		
变体	k_a (M-1 s-1)	k_d (s-1)	K_D (nM)	k_a (M-1 s-1)	k_d (s-1)	K_D (nM)
野生型	4.72E+05	1.10E-01	232.8	无结合		
S252Y	9.74E+05	9.50E-03	9.8	弱结合		
S252Y , Q311R	9.26E+05	6.40E-03	6.9	弱结合		
S252Y, Q311K	1.39E+06	7.79E-03	5.6	2.39E+06	1.12E-01	46.9
S252Y, Q311V	1.06E+06	4.05E-03	3.8	1.73E+05	5.28E-02	306.0
S252Y, Q311L	7.40E+05	5.16E-03	7.0	弱结合		
S434Y	1.22E+06	6.29E-03	5.2	无结合		
S434Y, S254R	2.75E+06	5.68E-03	2.1	无结合		
S434Y, S254K	1.61E+06	5.04E-03	3.1	弱结合		
S434Y, L262E	1.51E+06	4.98E-03	3.3	弱结合		
S434Y, T286D	1.28E+06	3.71E-03	2.9	无结合		
S434Y, T286E	9.65E+05	3.45E-03	3.6	无结合		
S434Y, T289K	1.53E+06	5.59E-03	3.6	弱结合		
S434Y, E293D	1.57E+06	5.34E-03	3.4	无结合		
S434Y, E293K	1.22E+06	5.01E-03	4.1	弱结合		
S434Y, L309V	2.21E+06	4.00E-03	1.8	弱结合		
S434Y, L309E	1.13E+06	4.58E-03	4.1	弱结合		
S434Y, K326D	1.38E+06	5.49E-03	4.0	无结合		
S434Y, Q347L	1.98E+06	6.67E-03	3.4	无结合		
S434Y, S426L	1.48E+06	4.40E-03	3.0	6.36E+05	1.18E-01	184.9
S434F	1.73E+06	7.18E-03	4.2	弱结合		
S434F, E380D	1.77E+06	5.83E-03	3.3	无结合		
S428L	1.45E+06	2.41E-02	16.7	无结合		
S428L, S252R	9.74E+05	8.73E-03	9.0	无结合		
S428L, T286E	1.15E+06	9.87E-03	8.6	无结合		
S428L, Q311V	9.16E+05	1.07E-02	11.7	无结合		
S428L, Q311K	9.58E+05	1.01E-02	10.5	无结合		
S428L, D312T	1.01E+06	1.13E-02	11.2	弱结合		
S428L, I377V	1.69E+06	1.83E-02	10.8	无结合		
S428L, I383L	1.63E+06	1.62E-02	9.9	无结合		
S428L, N389c-R	1.14E+06	1.09E-02	9.6	无结合		
S428L, E380D, S434R	1.22E+06	9.73E-03	8.0	无结合		
S428L, E380T, S434R	3.17E+06	1.20E-02	3.8	无结合		
Q311R	1.96E+05	1.16E-02	59.2	无结合		
R392E	1.33E+06	3.24E-02	24.5	无结合		
S252R, L262Q	1.63E+06	7.95E-03	4.9	无结合		
S252R, A378E	2.62E+05	9.27E-03	35.3	弱结合		
T260E, L309E, Q355L	9.83E+05	9.77E-03	9.9	无结合		
T286E, S428R	9.39E+05	6.48E-03	6.9	9.17E+06	1.13E-01	12.3
S290V, R334D	9.31E+05	9.97E-03	10.7	无结合		
R301L, E380V, T437L	1.15E+06	1.23E-02	10.7	无结合		

[0307] 实施例3:猫科动物IgG1a Fc的扫描诱变

[0308] 一组另外的抗神经生长因子(NGF)猫科动物IgG1a抗体变体由Twist Bioscience使用先前由以下文献所描述的可变结构域合成:Gearing等人(2016,J Vet Intern Med,30:1129)。下面表8和9中列出了与以下文献所描述的野生型猫科动物IgG1a Fc结构域的参考序列相比对这些抗体Fc区的修饰:Kanai等人(2000,Vet.Immunol.Immunopathol.73:53)。将猫科动物IgG1a构建体亚克隆到哺乳动物表达载体中并且用ExpiFectamine 293转

染试剂转染到Expi293细胞中。用蛋白A色谱法从条件培养基中纯化IgG1a Fc变体,并且将其配制在43mM柠檬酸钠、130mM碳酸氢钠(pH 6.0)中。然后使用Carterra仪器确定IgG Fc变体对猫科动物FcRn的结合亲和力。通过EDC/NHS激活将抗体变体(约5μg/ml)胺偶联至HC30M传感器芯片,然后用乙醇胺HCl淬灭。使333nM、111nM、37nM、12.3nM、4.1nM、1.37nM或0.45nM的猫科动物FcRn(FCN-F82W3,Acrobiosystems)流过在pH6.0的HBSTE(10mM HEPES、150mM NaCl、3mM EDTA、0.05%Tween-20)、0.5%牛血清白蛋白中的传感器芯片以确定在pH 6.0下的动力学。采用该相同的策略确定Fc变体在pH 7.4下对猫科动物FcRn的结合亲和力,其中将HBSTE缓冲液的pH调节至7.4。

[0309] IgG变体的猫科动物FcRn结合动力学显示于下面表7中。

[0310] 表7:IgG Fc变体与FcRn的结合动力学-II

[0311]

	pH 6.0			pH 7.4		
变体	k_a (M-1 s-1)	k_d (s-1)	K_D (nM)	k_a (M-1 s-1)	k_d (s-1)	K_D (nM)
野生型	4.72E+05	1.10E-01	232.8	无结合		
S254K	5.21E+05	5.57E-02	107.1	无结合		
T286D	4.00E+05	3.89E-02	97.4	弱结合		
T286E	4.89E+05	4.57E-02	93.4	无结合		
S290Y	6.61E+05	8.49E-02	128.4	无结合		
E293H	4.55E+05	6.65E-02	146.0	无结合		
R301L	4.57E+05	4.35E-02	95.2	弱结合		
L309V	3.53E+05	4.50E-02	127.4	无结合		
L309E	4.06E+05	4.15E-02	102.1	无结合		
L309Y	6.00E+05	1.18E-01	196.4	无结合		
Q311V	6.29E+05	5.05E-02	80.4	无结合		
Q311L	5.65E+05	4.99E-02	88.2	无结合		
K326D	4.28E+05	5.84E-02	136.4	弱结合		
R334D	4.23E+05	5.61E-02	132.7	弱结合		
Q347L	5.44E+05	8.53E-02	156.8	无结合		
I377Y	8.37E+05	5.14E-02	61.4	无结合		
E380T	5.33E+05	6.20E-02	116.2	弱结合		
N389c-R	5.02E+05	9.44E-02	188.1	无结合		
S426H	3.52E+05	6.02E-02	171.2	无结合		
S428H	3.89E+05	6.18E-02	159.0	弱结合		
S428Y	7.18E+05	1.84E-02	25.6	弱结合		
T286E, S428H	5.98E+05	2.83E-02	47.3	无结合		
R334D, S428R	6.03E+05	4.93E-02	81.7	无结合		
R334D, T437L	4.57E+05	4.37E-02	95.7	弱结合		
R334D, R301L	4.60E+05	4.17E-02	90.7	无结合		
S426L, T289H	5.42E+05	6.22E-02	114.8	无结合		
S426L, S428H	4.45E+05	4.45E-02	100.0	无结合		
S428Y, Q311V	8.93E+05	9.77E-03	10.9	弱结合		
S428Y, S254R	5.52E+05	2.65E-02	48.1	无结合		
S428Y, L309V	8.47E+05	1.12E-02	13.2	弱结合		
S428H, T289H	3.52E+05	5.26E-02	149.3	无结合		

[0312] 下面表8中提供了鉴定为增加猫科动物IgG1a Fc变体与猫科动物FcRN结合的氨基酸取代的列表:

[0313] 表8:显示对猫科动物FcRn的结合亲和力增加的猫科动物IgG1aFc变体的氨基酸取代的概述

[0314]

按 EU 编号的位置	野生型猫科动物 IgG1a Fc	增强变体与猫科动物 FcRN 结合(与野生型相比)的猫科动物 IgG1a Fc 变体氨基酸取代
252	S	FYWR
254	S	RK
262	L	QE
286	T	ED
289	T	KH
290	S	VY
293	E	DKH
301	R	L
309	L	VEY
311	Q	RVKL
312	D	T
326	K	D
334	R	D
347	Q	L
355	Q	L
377	I	VY
380	E	DVT
383	I	L
389c	N	R
392	R	E
426	S	LH
428	S	RLMYH
434	S	RYFWH
437	T	L

[0315]

[0316] 实施例4:FcRn结合增加的猫科动物IgG1a Fc变体和野生型猫科动物IgG1a的药代动力学研究。

[0317] 用12只雄性和雌性猫进行药代动力学(PK)研究。猫科动物IgG1aFc变体(包括携带野生型猫科动物IgG1a Fc结构域的抗体)使用如先前由以下文献所描述的抗NGF可变结构域来制备:Gearing等人(2016,J Vet Intern Med,30:1129)。

[0318] 将动物随机分成六个组,每组有一只雄性和一只雌性。向每只动物施用单次静脉内剂量为2mg/kg的抗体。在以下时间点收集大约0.5ml全血:0小时(给药前)、注射后4小时和1天、2天、4天、6天、10天、14天、18天、22天、30天、34天、38天、42天。从全血中分离血清,并且通过对抗NGF抗体特异的ELISA测定抗体的存在。使用非线性混合效应(NLME)建模用具有线性清除率的二室药代动力学(PK)模型描述了六种抗NGF单克隆抗体(mAb)变体的血清浓

度(图46)。群体参数使用Monolix Suite 2019R1(Monolix版本2019R1.Antony,France:Lixoft SAS,2019)中实施的最大期望值随机逼近(SAEM)算法来估计。将各个参数建模为具有对数正态分布的随机变量。使用mAb-典型系数($\beta_{BW,Cl}=0.75$,$\beta_{BW,V1}=\beta_{BW,V2}=1$,$\beta_{BW,Q}=2/3$),PK参数取决于体重(BW)。单个参数$\varphi_i$的方程式(Dong等人2011.Clin Pharmacokinet,50:131)为:

[0319] $$\varphi_i = \varphi_{pop}\left(\frac{BW_i}{BW_{ref}}\right)^{\beta} e^{\eta}$$

[0320] 其中φ_{pop}是群体典型参数,η是具有平均值0和标准偏差ω的随机变量,BW_i是动物i的体重,并且BW_{ref}是2kg的参考体重。

[0321] 根据以下方程式通过使用关于清除率、房室间交换系数和外周体积的分类协变量来区分抗体变体:

[0322] $$\varphi_i = \varphi_{pop} e^{(\beta \Omega_i)} e^{\eta}$$

[0323] 其中如果单独变体协变量在类别中,则$\Omega_i=1$;否则$\Omega_i=0$。将野生型(WT)mAb变体用作参考。

[0324] 在图47中显示了观察到的变体WT、S252W、S428Y、S428Y+L309V、S428Y+Q311V和S428Y+S254R的个体血清浓度,其中每个变体有两只动物。

[0325] 在下面表9中给出了估计的PK参数。携带野生型(WT)IgG1a Fc或IgG1a Fc变体S252W、S428Y、S428Y+L309V、S428Y+Q311V和S428Y+S254R的单克隆抗体对于接受2mg/kg单一IV剂量的典型2kg猫的预测血清浓度曲线显示于图48中。这些药代动力学研究不仅证实了在两个或更多个氨基酸位置处的取代的益处,而且更重要的是,显示了对猫科动物IgG Fc结构域的赋予增强的体外FcRn结合的氨基酸修饰也足以延长这些IgG Fc变体的体内半衰期。

[0326] 表9:对2kg体重的猫的PK参数估计。

[0327]

变体	Cl (mL/天)	V1 (mL)	Q (mL/天)	V2 (mL)	α-$T_{1/2}$ (小时)	β-$T_{1/2}$ (天)
WT	24.61	77.88	35.49	63.79	14.11	4.648
S428Y+L309V	9.423	77.88	23.32	72.65	24.30	12.22
S428Y+Q311V	11.86	77.88	18.16	71.21	29.05	10.22
S428Y+S254R	15.38	77.88	90.85	89.62	7.263	7.929
S252W	13.37	77.88	25.01	52.75	19.04	7.440
S428Y	13.37	77.88	32.44	48.70	14.40	7.002

[0328] 实施例5:使用C1生物传感器时猫科动物IgG1a变体与猫科动物FcRn的结合动力学

[0329] 在pH 5.9下评价几种猫科动物IgG1a变体(S252W、L309V、Q311V、S428Y、S428Y+

Q311V、S428Y+254R、S428Y+L309V、S428Y+Q311V+T286E、S428Y+Q311V+E380T、S428Y+L309V+T286E和S428Y+L309V+E380T)与猫科动物FcRn(GenBank KF773786[猫科动物FcRn大亚基p51]和欧洲核苷酸档案AY829266.1[猫科动物β2微球蛋白])的结合动力学。EU编号用于鉴定位置(图4)。在本研究中,使用由Gearing DP等人(2016,J Vet Intern Med,30:1129)所描述的可变结构域,将携带单个氨基酸取代或氨基酸取代组合的猫科动物Fc变体合成为猫科动物IgG1a(Kanai等人,2000,Vet.Immunol.Immunopathol.73:53)。将合成的猫科动物IgGa变体DNA亚克隆到哺乳动物表达载体中并瞬时转染到CHO细胞中。使用蛋白A色谱法纯化条件培养基。

[0330] 对于猫科动物FcRn结合实验,在25℃下在Biacore 8K+系统上完成所有测定。在这组实验中,使用标准胺偶联试剂将抗体固定到S系列C1传感器芯片上。将200mmol/L 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)和50mmol/L N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)的混合物注射420秒以活化表面。然后,将抗体在10mM乙酸钠pH 5.0中以0.5至2μg/ml的浓度注射120秒。最后,注射1M乙醇胺420秒。运行缓冲液为调节至pH 5.9的1X PBS-P+(Cytiva,目录号28995084)。

[0331] 为了评价猫科动物IgG1a变体在pH 5.9下对猫科动物FcRn的结合亲和力,选择1.56-2000nM浓度范围的猫科动物FcRn并且以单循环模式注射。对每种变体测试的猫科动物FcRn的浓度显示于下面表10中。

[0332] 表10:用于每种猫科动物IgG1a变体的猫科动物FcRn的浓度

[0333]

变体	FcRn的浓度[nM]
野生型	31.25,125,500,2000
猫科动物IgG1a-S252W	1.56,6.25,25,100
猫科动物IgG1a-L309V	31.25,125,500,2000
猫科动物IgG1a-Q311V	31.25,125,500,2000
猫科动物IgG1a-S428Y	7.81,31.25,125,500
猫科动物IgG1a-S428Y-Q311V	7.81,31.25,125,500
猫科动物IgG1a-S428Y-S254R	7.81,31.25,125,500
猫科动物IgG1a-S428Y-L309V	7.81,31.25,125,500
猫科动物IgG1a-S428Y-Q311V-Y286E	1.56,6.25。25,100
猫科动物IgG1a-S428Y-Q311V-E380T	1.56,6.25,25,100
猫科动物IgG1a-S428Y-1309V-T286E	1.56,6.25,25,100
猫科动物IgG1a-S428Y-1309V-E380T	1.56,6.25,25,100

[0334] 每种抗体四种浓度以5μl/min注射90秒,然后解离180秒。每个浓度系列以该形式注射三次,至少三个仅缓冲液循环用于适当的参考扣除。表面通过两次注射1X PBS-P+(pH 7.4)30秒,随后是60秒等待命令来再生。包括三个启动循环以在分析之前稳定表面。

[0335] 使用Insight Evaluation软件通过拟合至1:1动力学相互作用模型或通过拟合至稳态亲和力来评价数据。使用包括U值和T值的质量度量学来选择接受的参数。对于动力学速率常数,U值小于15被认为是可接受的,而对于动力学速率常数,T值大于100被认为是可接受的。在这些值在所述范围之外的情况下,稳态亲和力参数被认为是可接受的。

[0336] 猫科动物IgG1a变体的动力学数据显示在下面表11中,并且传感图显示于图49A-

49L中。

[0337] 表11:猫科动物IgG1a变体与猫科动物FcRn的结合动力学

[0338]

变体	ka	kd	Ko	拟合数据的方法
野生型			1.06E-06	稳态亲和力
猫科动物IgG1a-S252W	1.06E+06	4.24E-03	4.01E-09	1:1动力学相互作用模型
猫科动物IgG1a-L309V			4.27E-07	稳态亲和力
猫科动物IgG1a-Q311V			3.34E-07	稳态亲和力
猫科动物IgG1a-S428Y	9.02E+05	6.42E-02	7.18E-08	1:1动力学相互作用模型
猫科动物IgG1a-S428Y-Q311V	8.27E+05	2.66E-02	3.22E-08	1:1动力学相互作用模型
猫科动物IgG1a-S428Y-S254R	1.15E+06	9.31E-02	8.12E-08	1:1动力学相互作用模型
猫科动物IgG1a-S428Y-L309V	8.80E+05	3.10E-02	3.53E-08	1:1动力学相互作用模型
猫科动物IgG1a-S428Y-Q311V-T286E	1.27E+06	7.78E-03	5.11E-09	1:1动力学相互作用模型
猫科动物IgG1a-S42BY-Q311V-E380T	1.60E+06	3.22E-02	2.01E-08	1:1动力学相互作用模型
猫科动物IgG1a-S428Y-L309V-T286E	1.34E+06	7.02E-03	5.26E-09	1:1动力学相互作用模型
猫科动物IgG1a-S428Y-L309V-E380T	1.63E+06	3.34E-02	2.06E-08	1:1动力学相互作用模型

[0339] 实施例6:具有两个或三个Fc取代的猫科动物IgG1a Fc变体和野生型猫科动物IgG1a的药代动力学研究

[0340] 用14只雄性和雌性猫进行药代动力学(PK)研究。猫科动物IgG1aFc变体(包括携带野生型猫科动物IgG1a Fc结构域的抗体)使用如先前由以下文献所描述的抗NGF可变结构域来制备:Gearing等人(2016,J Vet Intern Med,30:1129)。本研究中测试的猫科动物IgG1a变体包括:S428Y+L309V、S428Y+Q311V、S428Y+Q311V+T286E、S428Y+L309V+E380T、S428Y+Q311V+E380T、S428Y+L309V+T286E、野生型。

[0341] 将动物随机分成七个组,其中每组中有一只雄性和一只雌性。向每只动物施用单次静脉内剂量为2mg/kg的抗体。在以下时间点收集大约0.5ml全血:0小时(给药前)、注射后4小时和1天、2天、4天、6天、10天、14天、18天、22天、30天、34天、38天、42天。从全血中分离血清,并且通过对猫科动物抗NGF抗体特异的ELISA测定抗体的存在。使用非线性混合效应(NLME)建模用具有线性清除率的二室药代动力学(PK)模型描述了七种抗NGF单克隆抗体(mAb)变体的血清浓度(群体参数使用在Monolix Suite 2019R1(Monolix版本2019R1.Antony,France:Lixoft SAS,2019)中实施的最大期望值随机逼近(SAEM)算法来估计)。如上所述对来自实施例4中所述的PK研究的S428Y+Q311V、S428Y+L309V和野生型的血清浓度建模并包括在这些计算中。将各个参数建模为具有对数正态分布的随机变量。使用mAb-典型系数($\beta_{BW,Cl}=0.75$,$\beta_{BW,V1}=\beta_{BW,V2}=1$,$\beta_{BW,Q}=2/3$),PK参数取决于体重(BW)。单个参数$\varphi_i$的方程式(Dong等人2011.Clin Pharmacokinet,50:131)为:

[0342] $$\varphi_i = \varphi_{pop}\left(\frac{BW_i}{BW_{ref}}\right)^{\beta} e^{\eta}$$

[0343] 其中φ_{pop}是群体典型参数,η是具有平均值0和标准偏差ω的随机变量,BW_i是动物i的体重,并且BW_{ref}是2kg的参考体重。

[0344] 根据以下方程式通过使用关于清除率、房室间交换系数和外周体积的分类协变量来区分抗体变体:

[0345] $\varphi_i = \varphi_{pop} e^{(\beta \Omega_i)} e^{\eta}$

[0346] 其中如果单独变体协变量在类别中,则Ω_i=1;否则Ω_i=0。将野生型(WT)mAb用作参考。

[0347] 在下面表12中给出了估计的PK参数。

[0348] 表12:对2kg体重的猫的PK参数估计。

[0349]

变体	Cl (mL/天)	V1 (mL)	Q (mL/天)	V2 (mL)	α $T_{1/2}$ (小时)	β $T_{1/2}$ (天)
野生型	22.85	76.46	31.85	55.4	14.6	4.597
S428Y+Q311V+T286E	9.383	76.46	31.85	55.4	15.89	10.28
S428Y+L309V+E380T	10.69	76.46	31.85	55.4	15.77	9.102
S428Y+L309V	10.79	76.46	31.85	55.4	15.76	9.017
S428Y+Q311V	11.46	76.46	31.85	55.4	15.69	8.527
S428Y+Q311V+E380T	11.58	76.46	31.85	55.4	15.68	8.448
S428Y+L309V+T286E	13.32	76.46	31.85	55.4	15.51	7.423

[0350] 图50中显示了观察到的野生型和Fc变体S428Y+Q311V、S428Y+Q311V+T286E、S428Y+Q311V+E380T、S428Y+L309V、S428Y+L309V+T286E和S428Y+L309V+E380T的个体血清浓度,其中每个变体有两只动物。

[0351] 携带野生型(WT)IgG1a Fc或IgG1a Fc变体S428Y+Q311V、S428Y+Q311V+T286E、S428Y+Q311V+E380T、S428Y+L309V、S428Y+L309V+T286E和S428Y+L309V+E380T的单克隆抗体对于接受2mg/kg单一IV剂量的典型2kg猫的预测血清浓度曲线显示于图51中。这些药代动力学研究不仅证实了在两个或更多个氨基酸位置处的取代的益处,而且更重要的是,显示了对猫科动物IgG Fc结构域的赋予增强的体外FcRn结合的氨基酸修饰也足以延长这些IgG Fc变体的体内半衰期。

[0352] 其他实施方案

[0353] 虽然已经结合本发明的具体实施方式描述了本发明,但是前面的描述旨在说明而不是限制本发明的范围,本发明的范围由所附权利要求的范围限定。其他方面、优点和修改在以下权利要求的范围内。

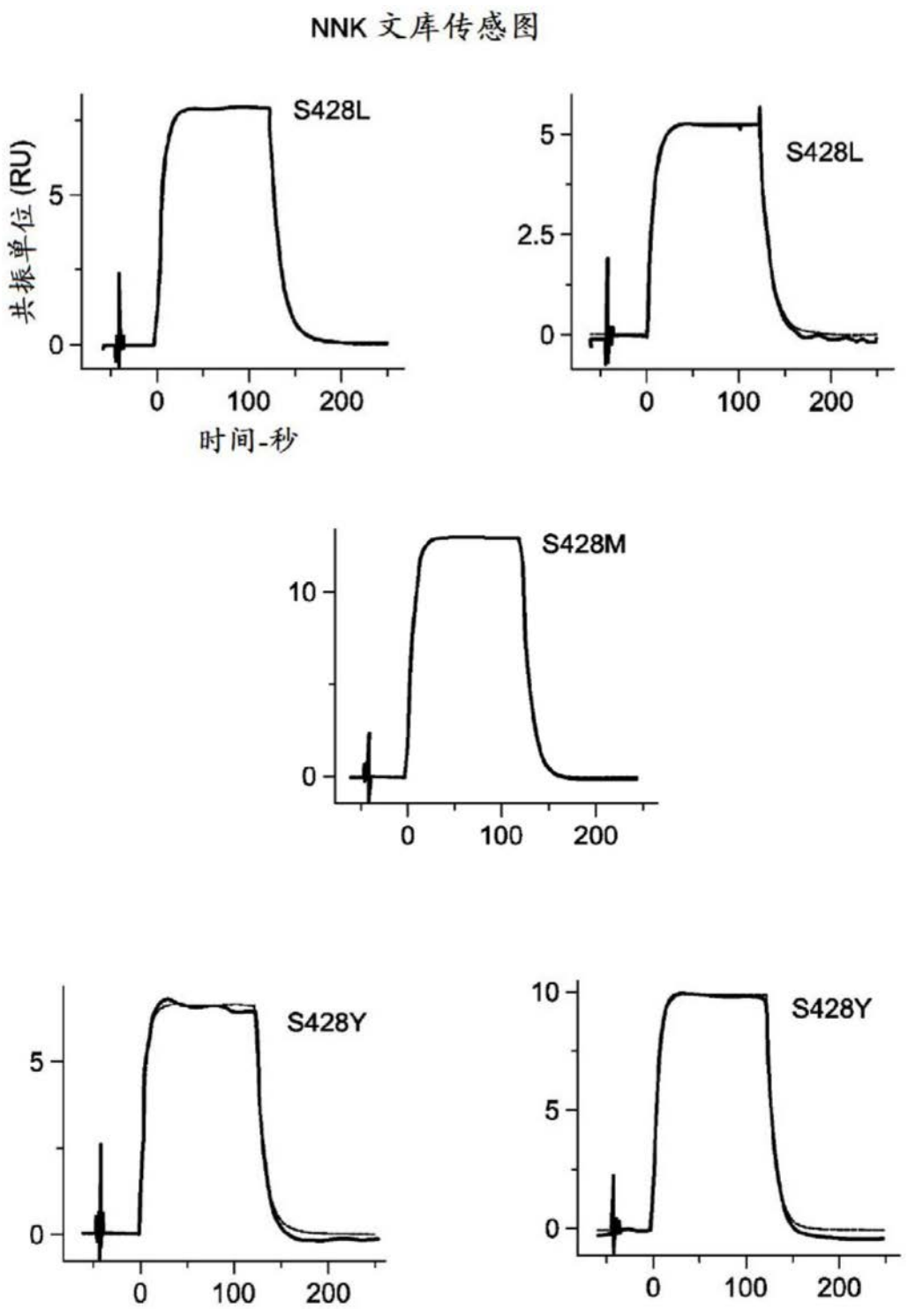

NNK 文库传感图
S428L
共振单位 (RU)
5
0
0
100
200
时间-秒
S428L
5
2.5
0
0
100
200
S428M
10
0
0
100
200
S428Y
5
0
0
100
200
S428Y
10
5
0
0
100
200

图1

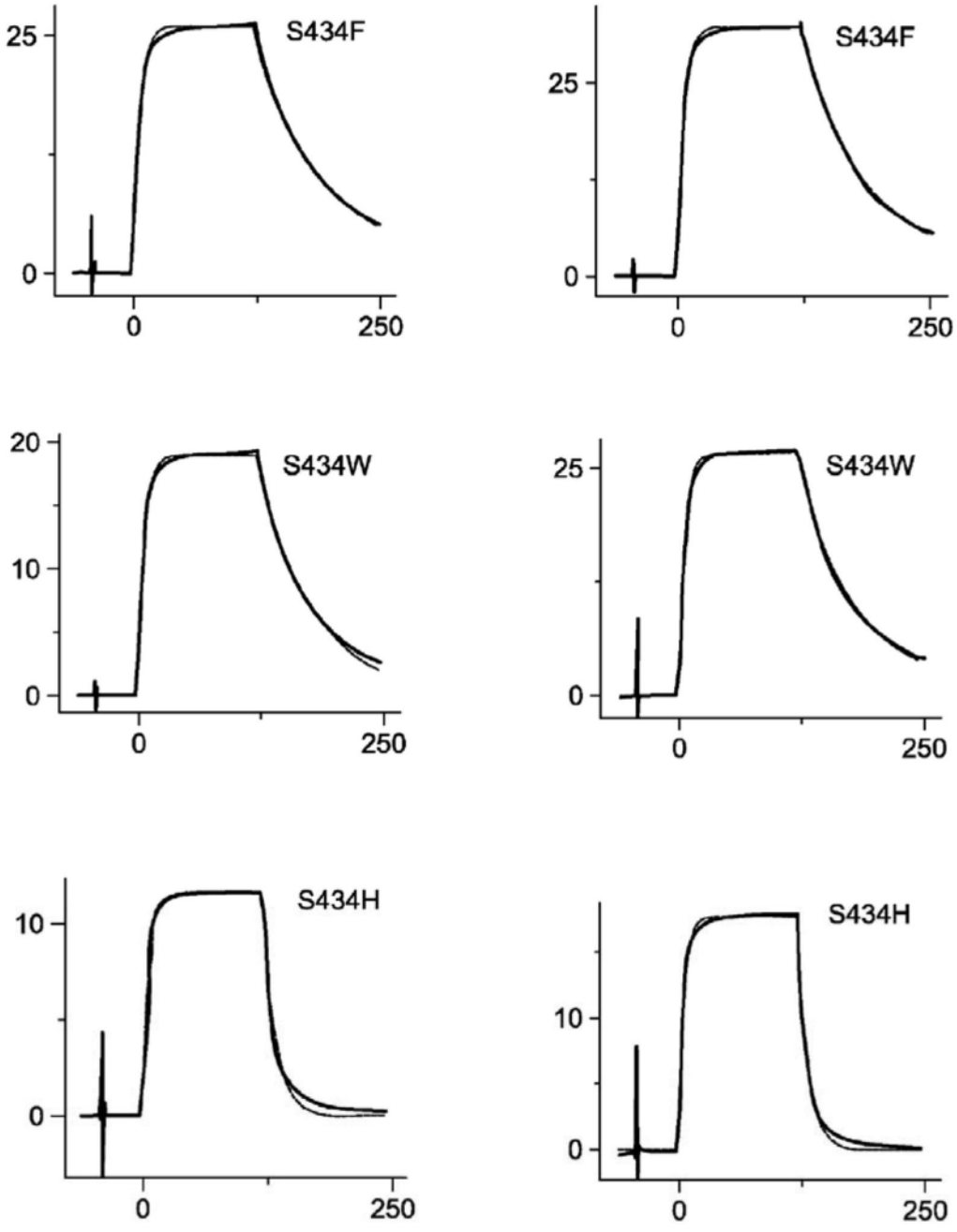

S434F
25
0
0
250
S434F
25
0
0
250
S434W
20
10
0
0
250
S434W
25
0
0
250
S434H
10
0
0
250
S434H
10
0
0
250

图1(续)

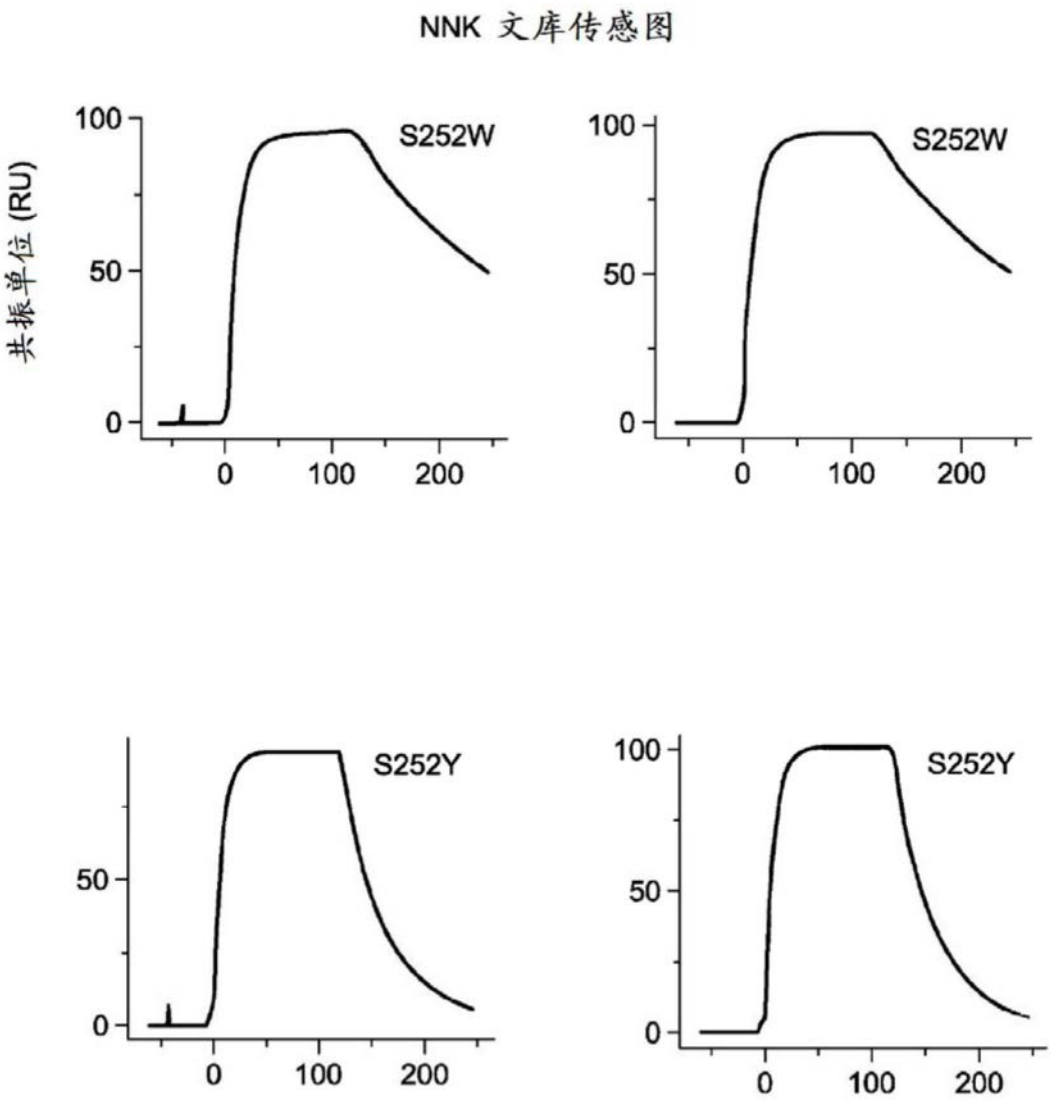


图2

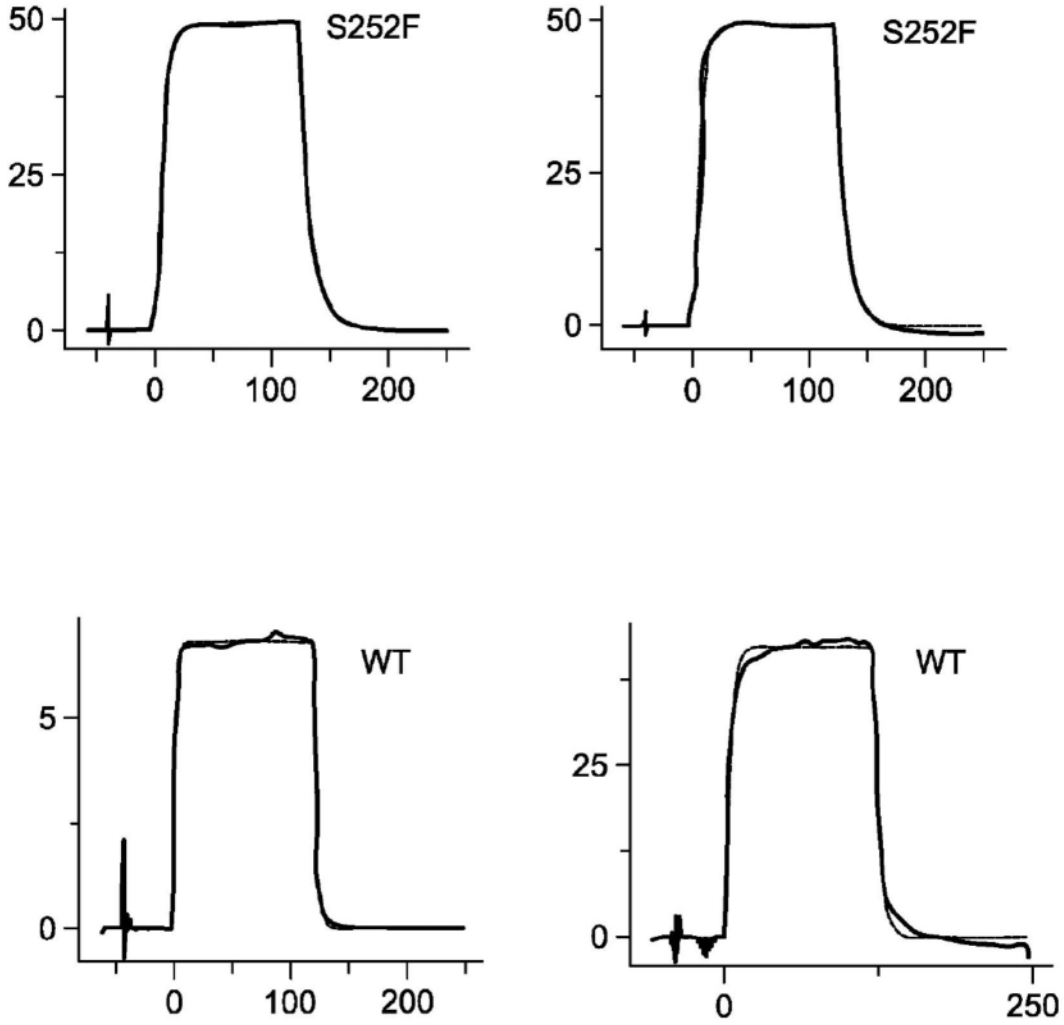

50
25
0
S252F
0
100
200
50
25
0
S252F
0
100
200
5
0
WT
0
100
200
25
0
WT
0
250

图2(续)

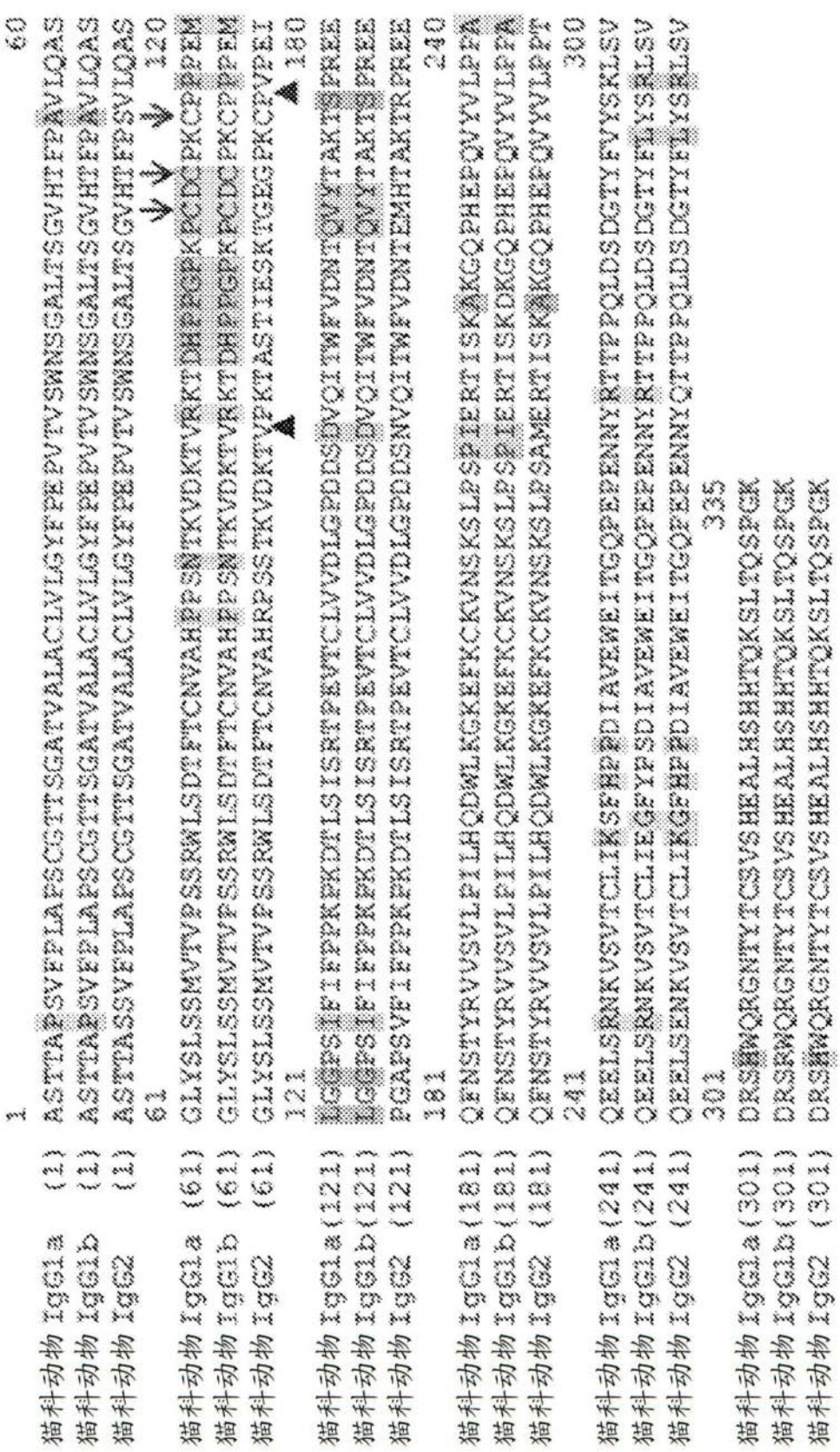


图3

240
260
280
300
猫科动物 IgG1a Fc IFIFPPKPKD TLSISRTPEV TCLVVDLGPD DSDVQITWFV DNTQVYTAKT SPREEQFNST YRVVSVLPIL
人 IgG1 Fc VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL
310
330
350
370
猫科动物 IgG1a Fc HQDWLKGKEF KCKVNSKSLP SPIERTISKA KGQPHEPQVY VLPPAQEELS RNKVSVTCLI KSFHPPDIAV
人 IgG1 Fc HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSD
380
400
420
430
猫科动物 IgG1a Fc EWEITGQPEP ENNYRTTPPQLD SDGTYFVYSK LSVDRSHWQR GNTYTCSVSH EALHSHHT
人 IgG1 Fc EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYT

图4

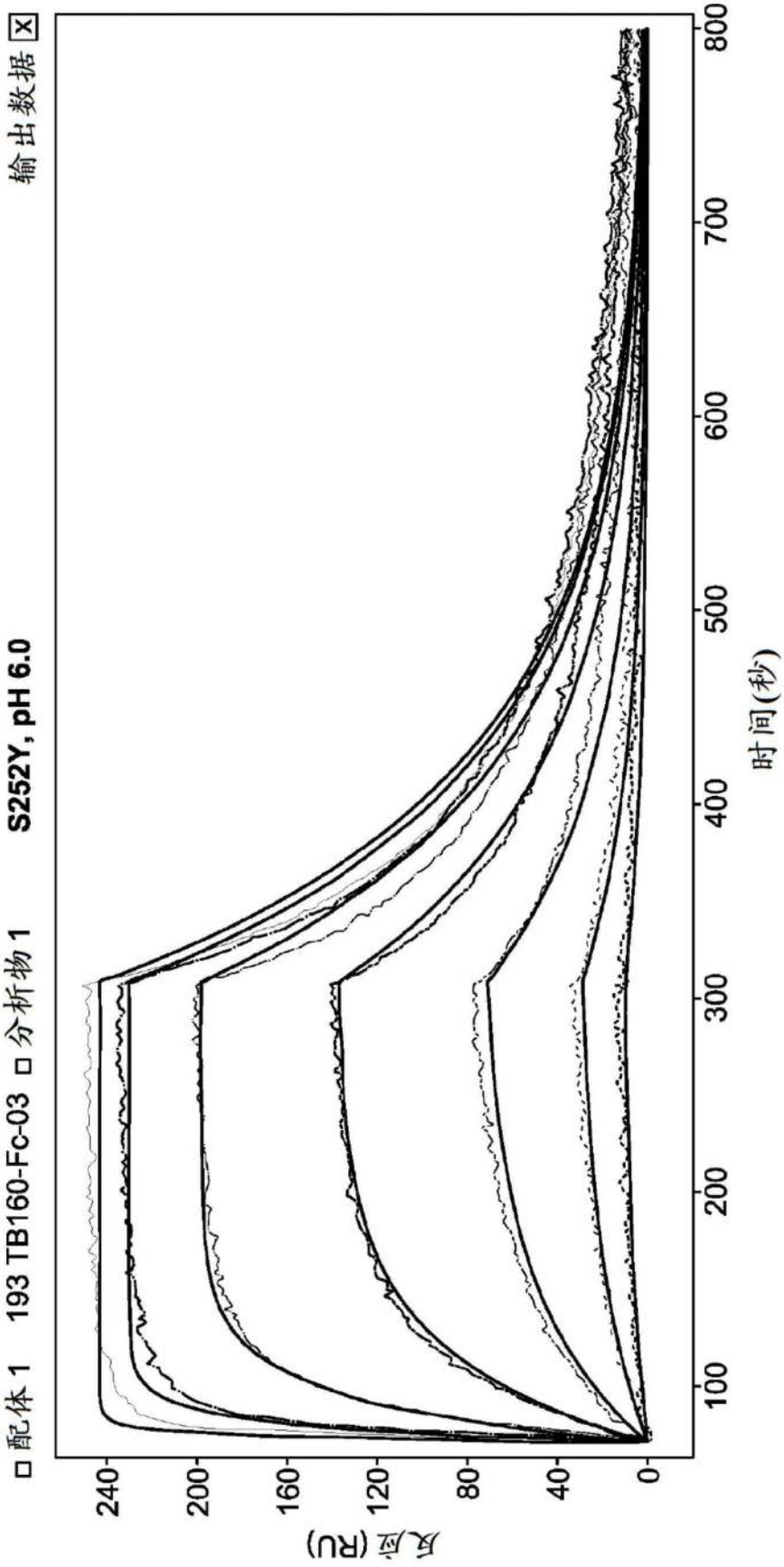

配体 1
193 TB160-Fc-03
分析物 1
S252Y, pH 6.0
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
0
40
80
120
160
200
240
100
200
300
400
500
600
700
800

图5A

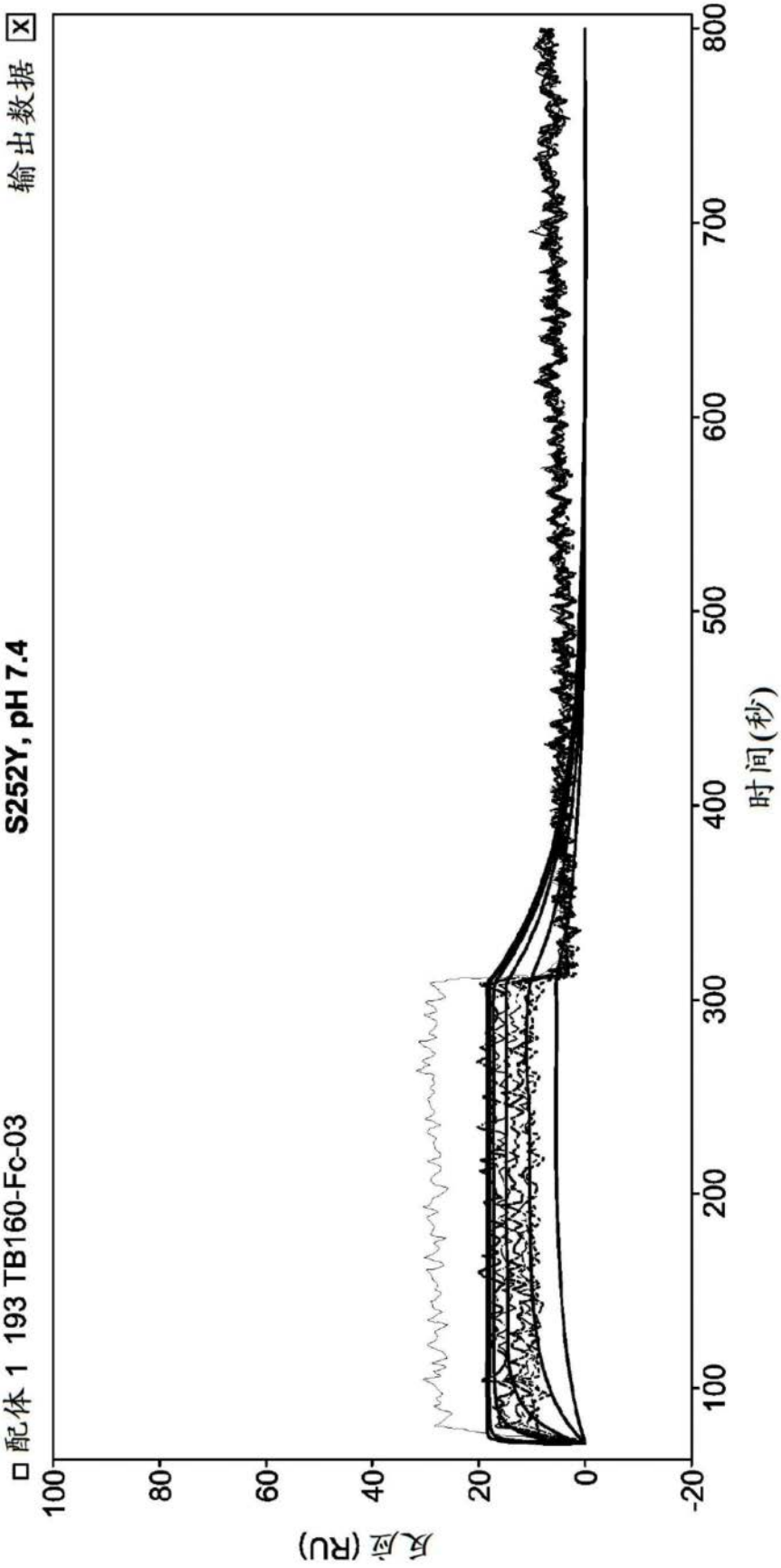

配体 1 193 TB160-Fc-03
S252Y, pH 7.4
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图5B

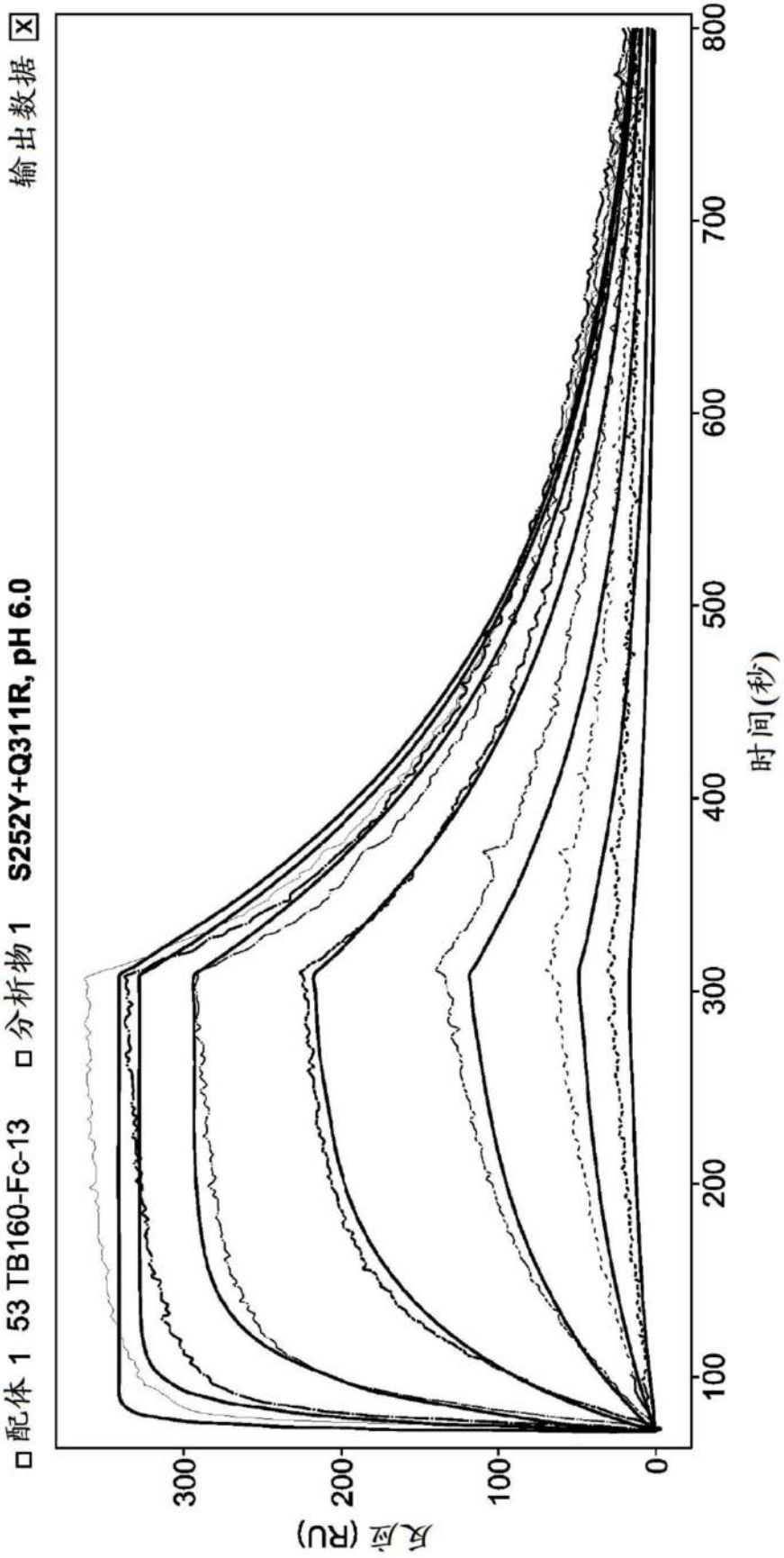

□ 配体 1 53 TB160-Fc-13 □ 分析物 1 S252Y+Q311R, pH 6.0
输出数据
反应 (RU)
0
100
200
300
100
200
300
400
500
600
700
800
时间(秒)

图6A

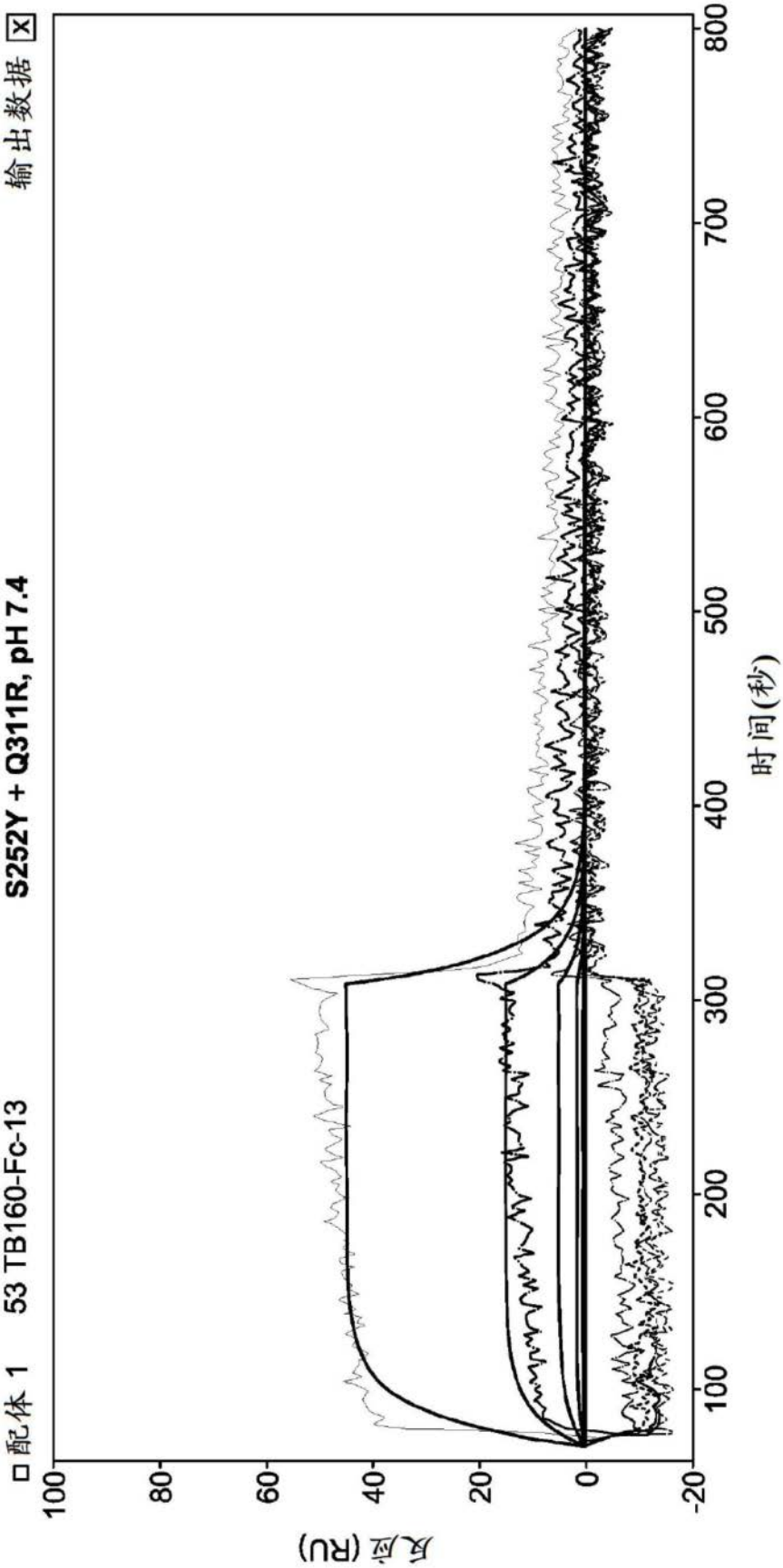

配体 1 53 TB160-Fc-13 S252Y + Q311R, pH 7.4
输出数据
反应 (RU)
时间 (秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图6B

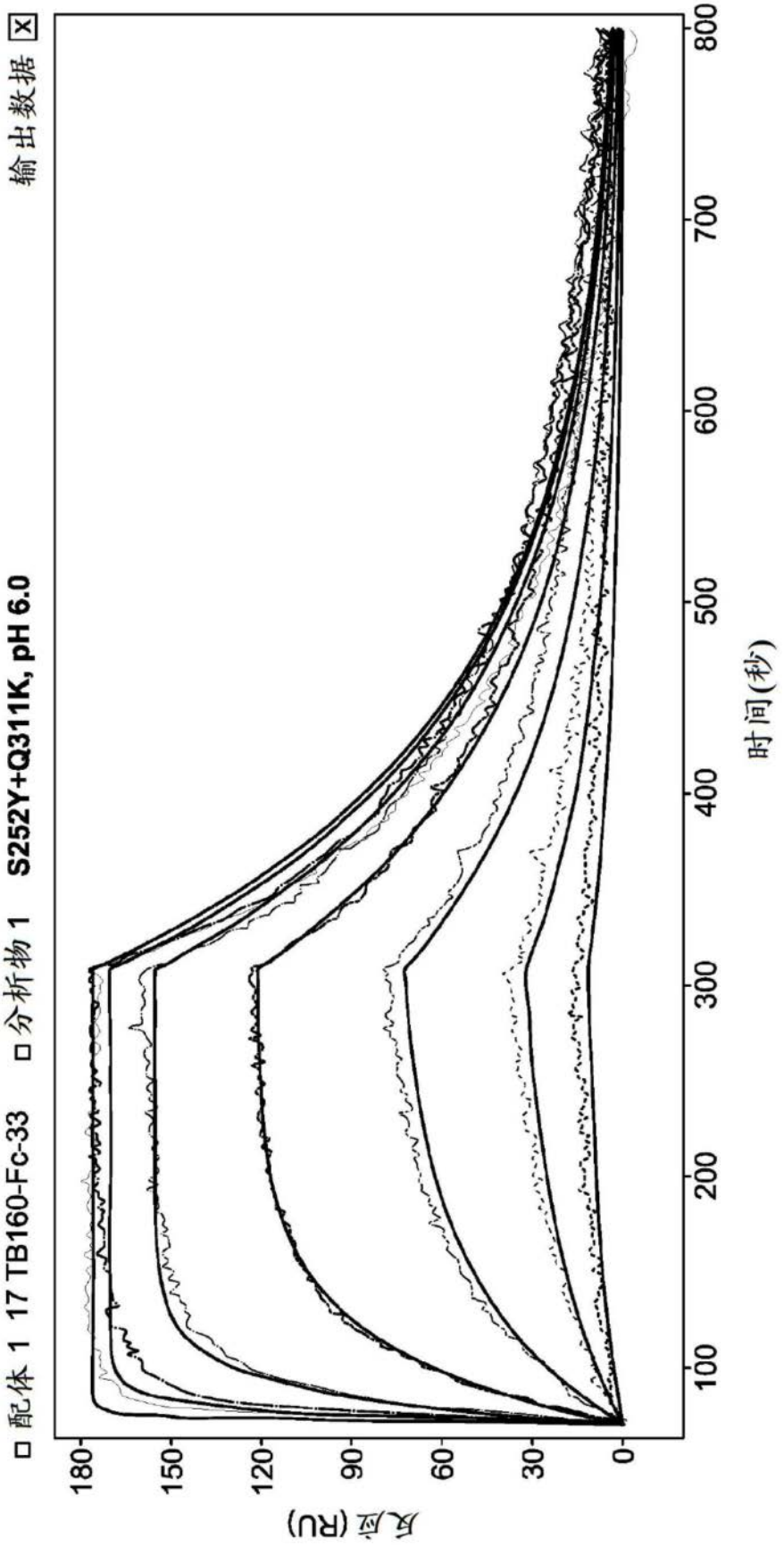

□ 配体 1 17 TB160-Fc-33 □ 分析物 1 S252Y+Q311K, pH 6.0
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
0
30
60
90
120
150
180
100
200
300
400
500
600
700
800

图7A

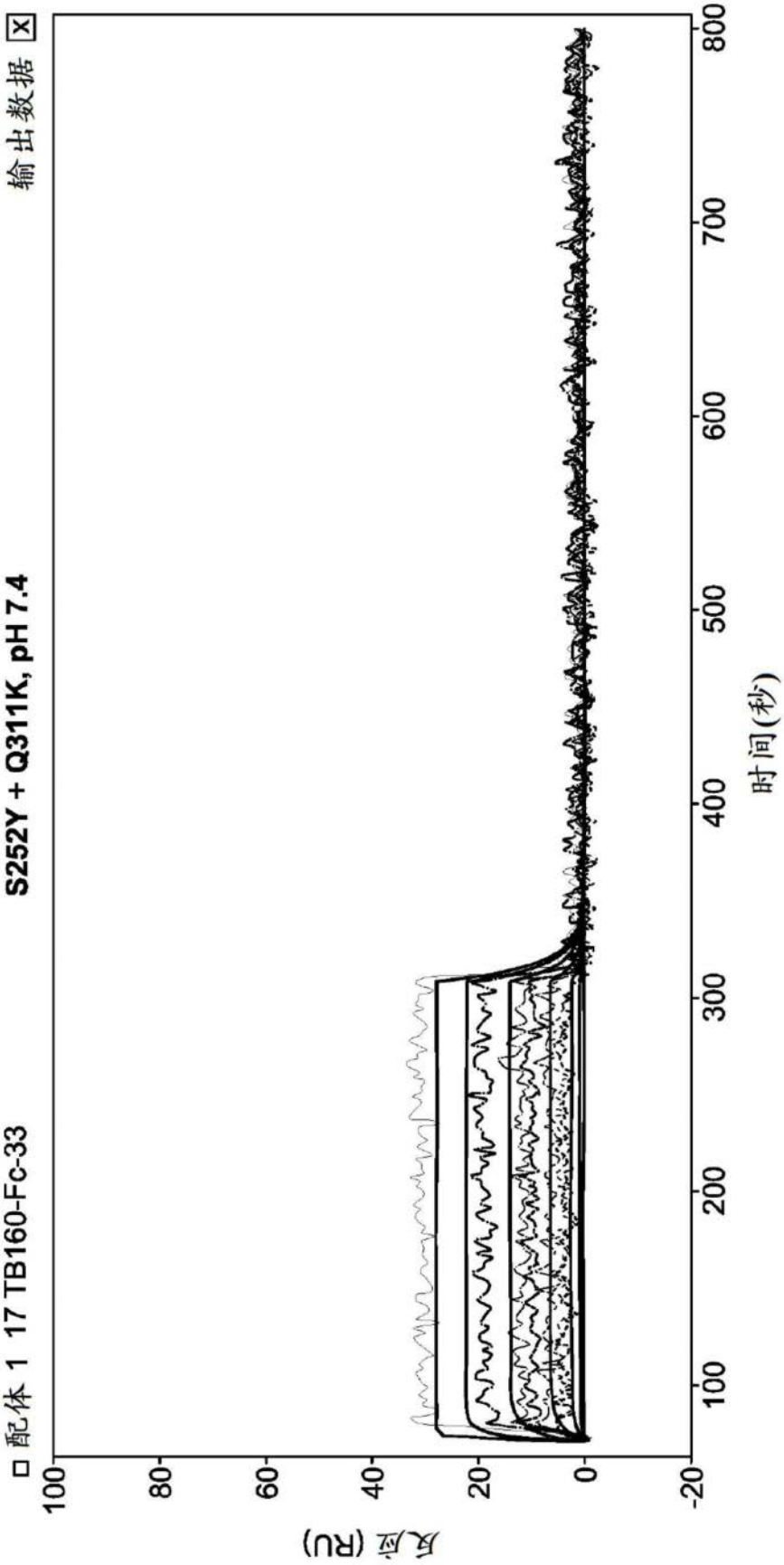

□ 配体 1 17 TB160-Fc-33
S252Y + Q311K, pH 7.4
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图7B

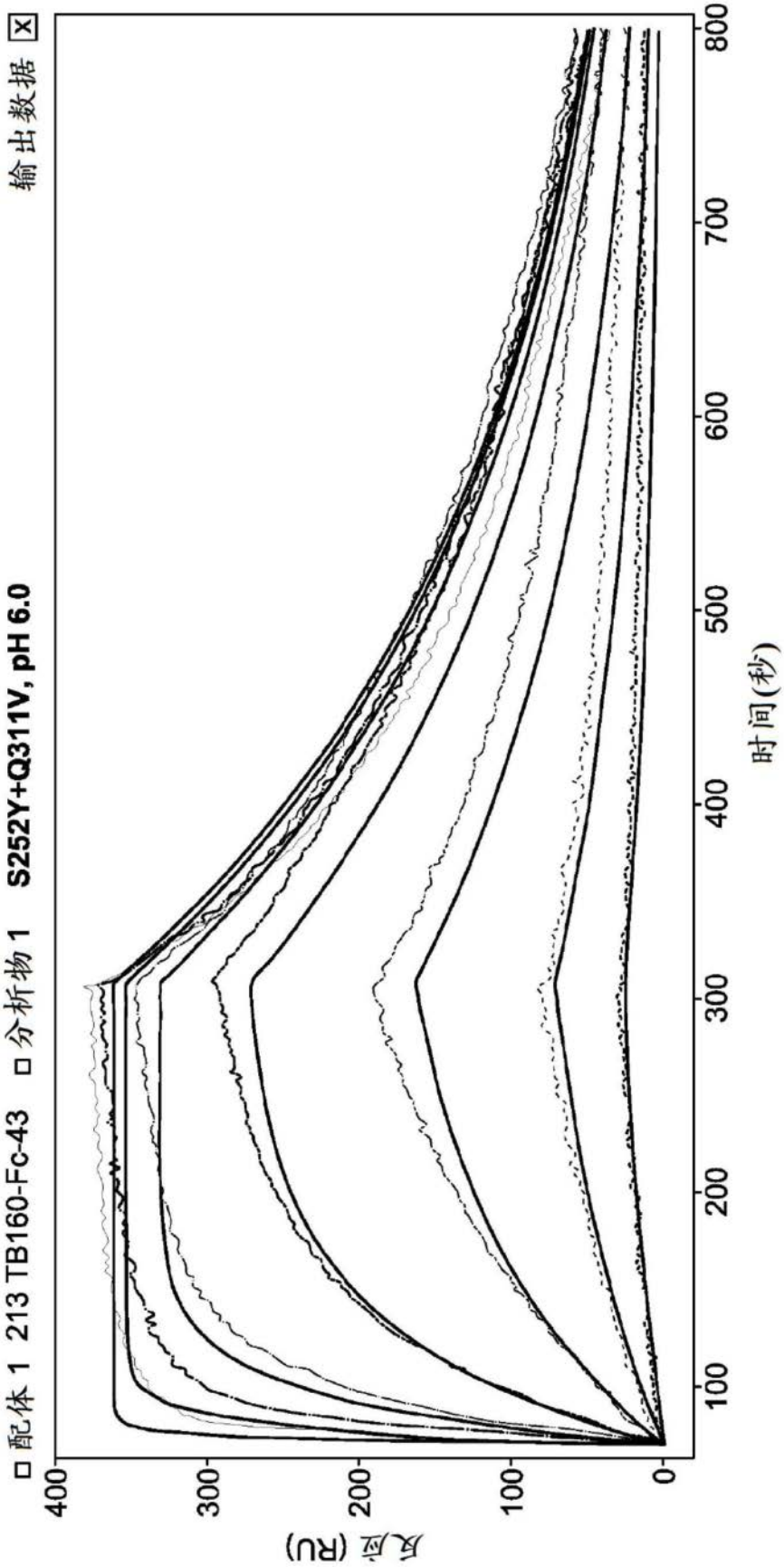

□ 配体 1 213 TB160-Fc-43 □ 分析物 1 S252Y+Q311V, pH 6.0
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
0
100
200
300
400
100
200
300
400
500
600
700
800

图8A

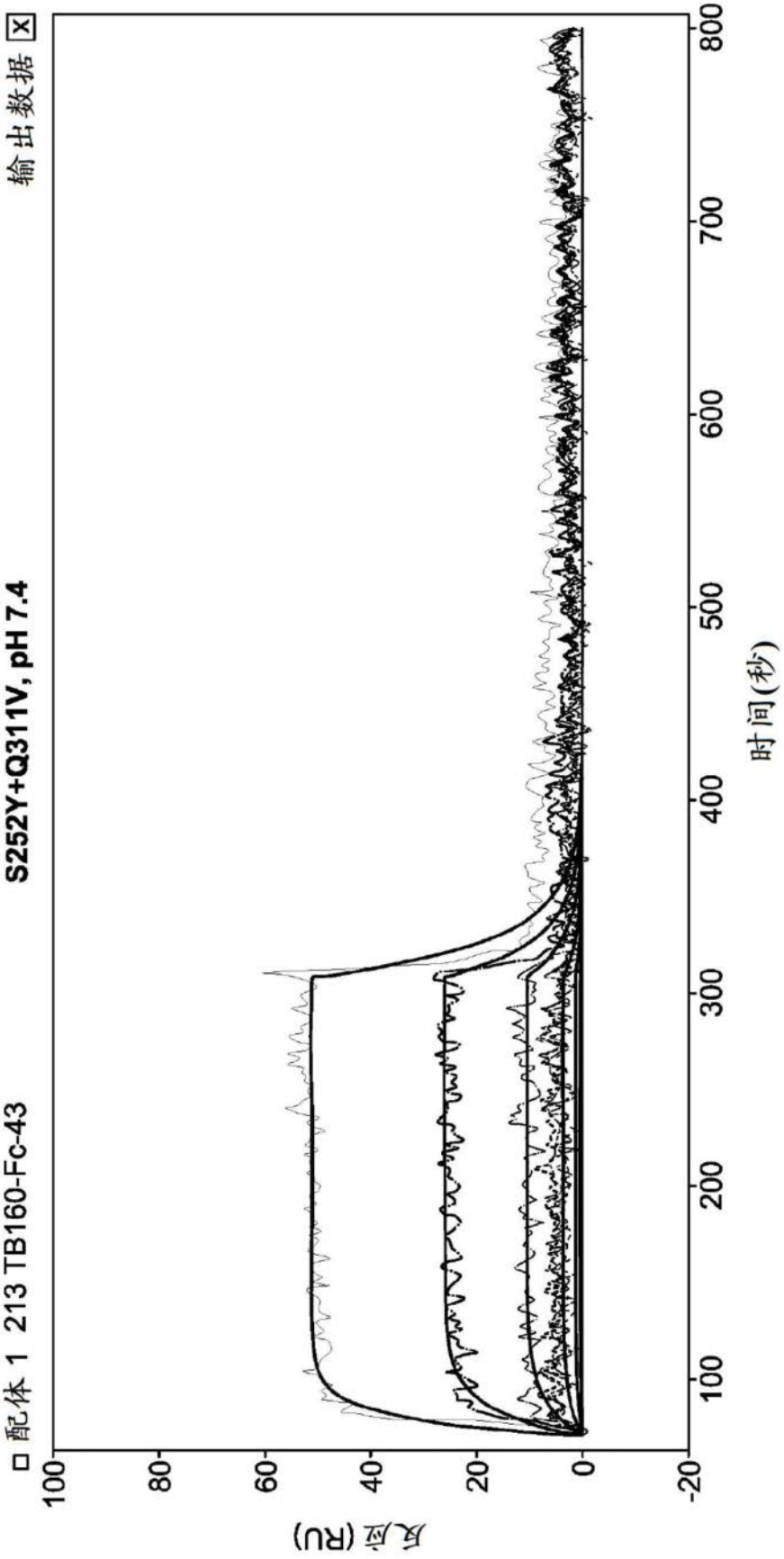

□ 配体 1 213 TB160-Fc-43
S252Y+Q311V, pH 7.4
输出数据 X
反应 (RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图8B

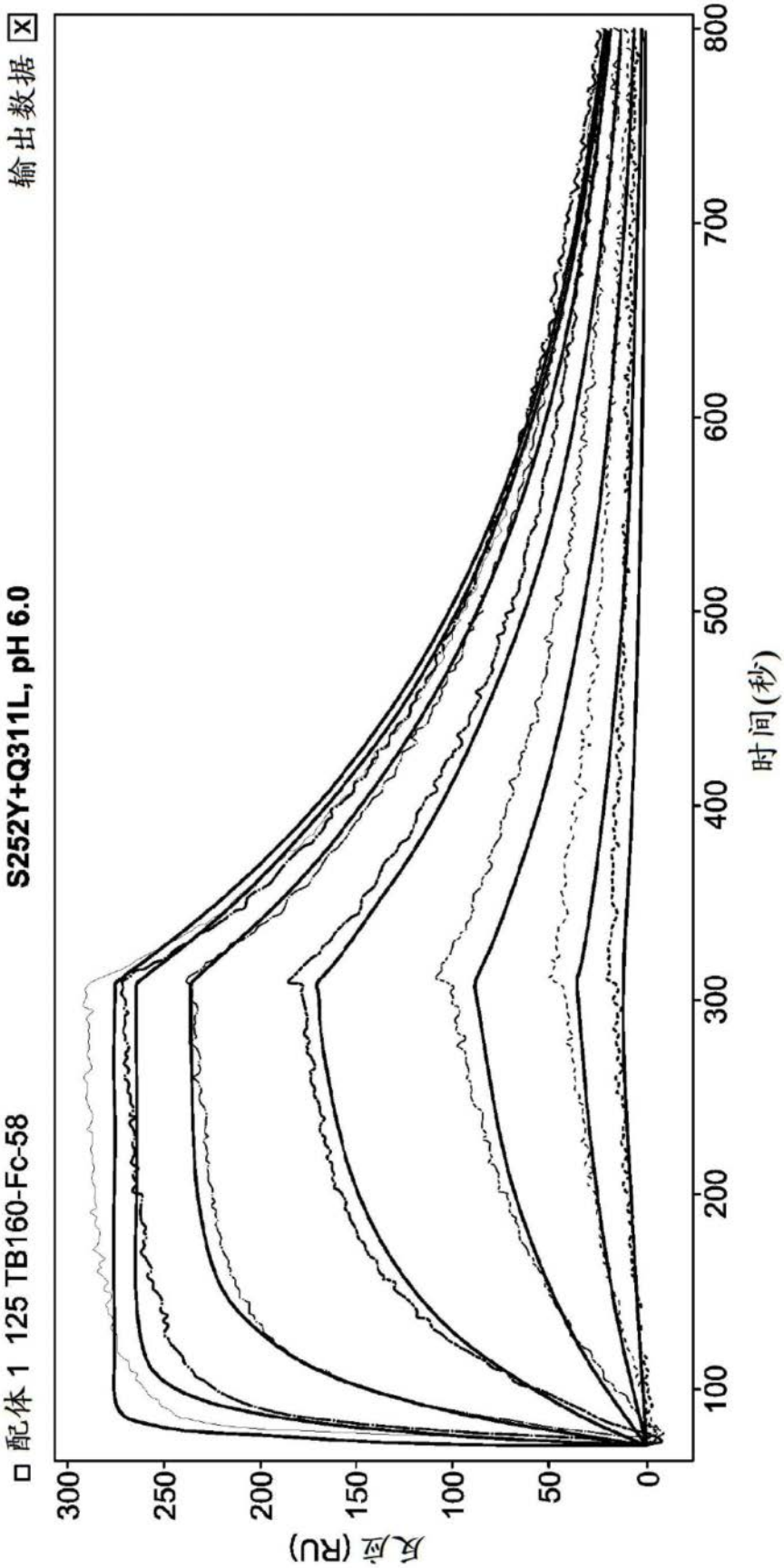

配体 1 125 TB160-Fc-58
S252Y+Q311L, pH 6.0
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
0
50
100
150
200
250
300
100
200
300
400
500
600
700
800

图9A

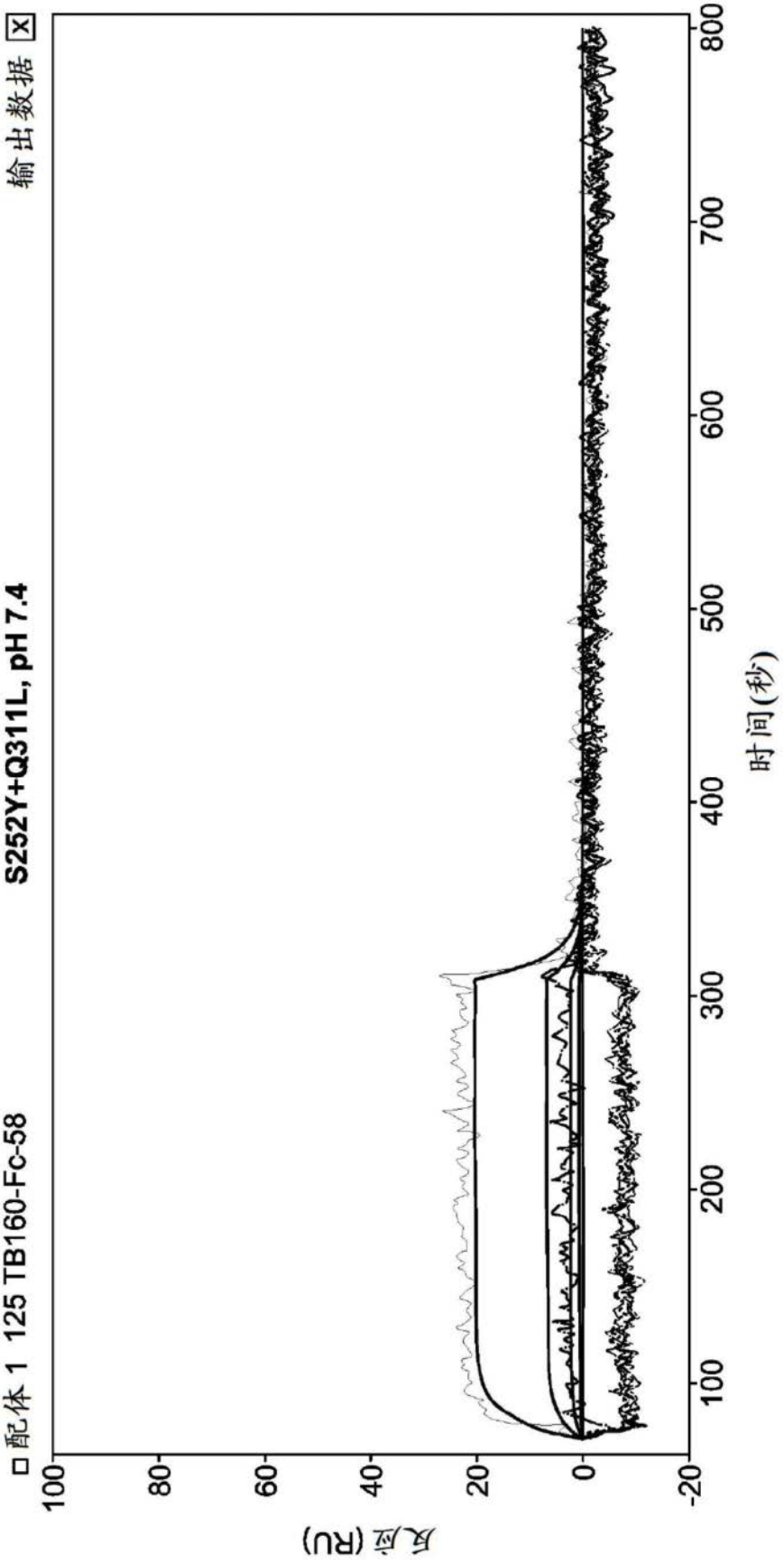

配体 1 125 TB160-Fc-58
S252Y+Q311L, pH 7.4
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图9B

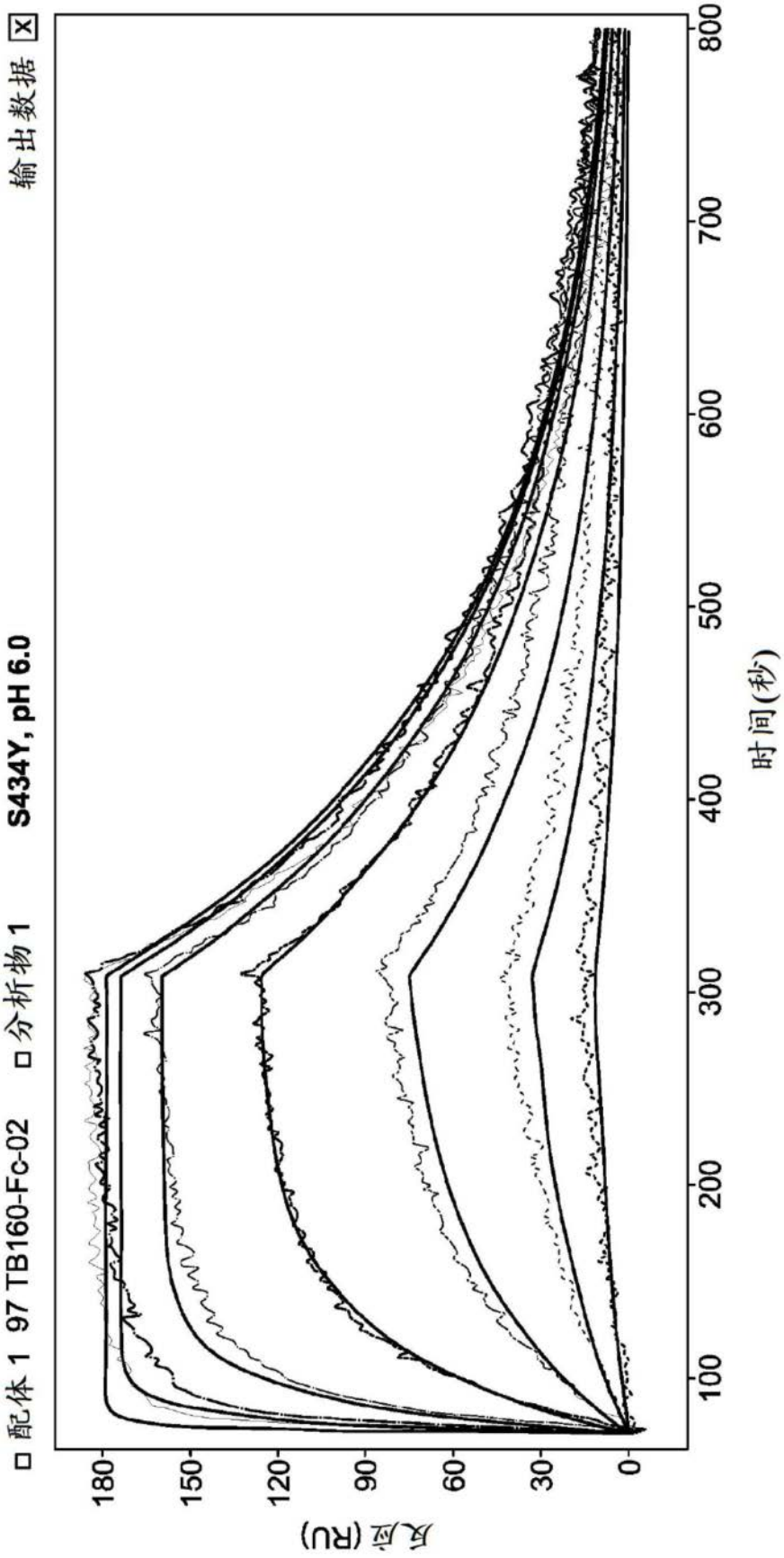

□ 配体 1 97 TB160-Fc-02 □ 分析物 1 S434Y, pH 6.0
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
0
30
60
90
120
150
180
100
200
300
400
500
600
700
800

图10A

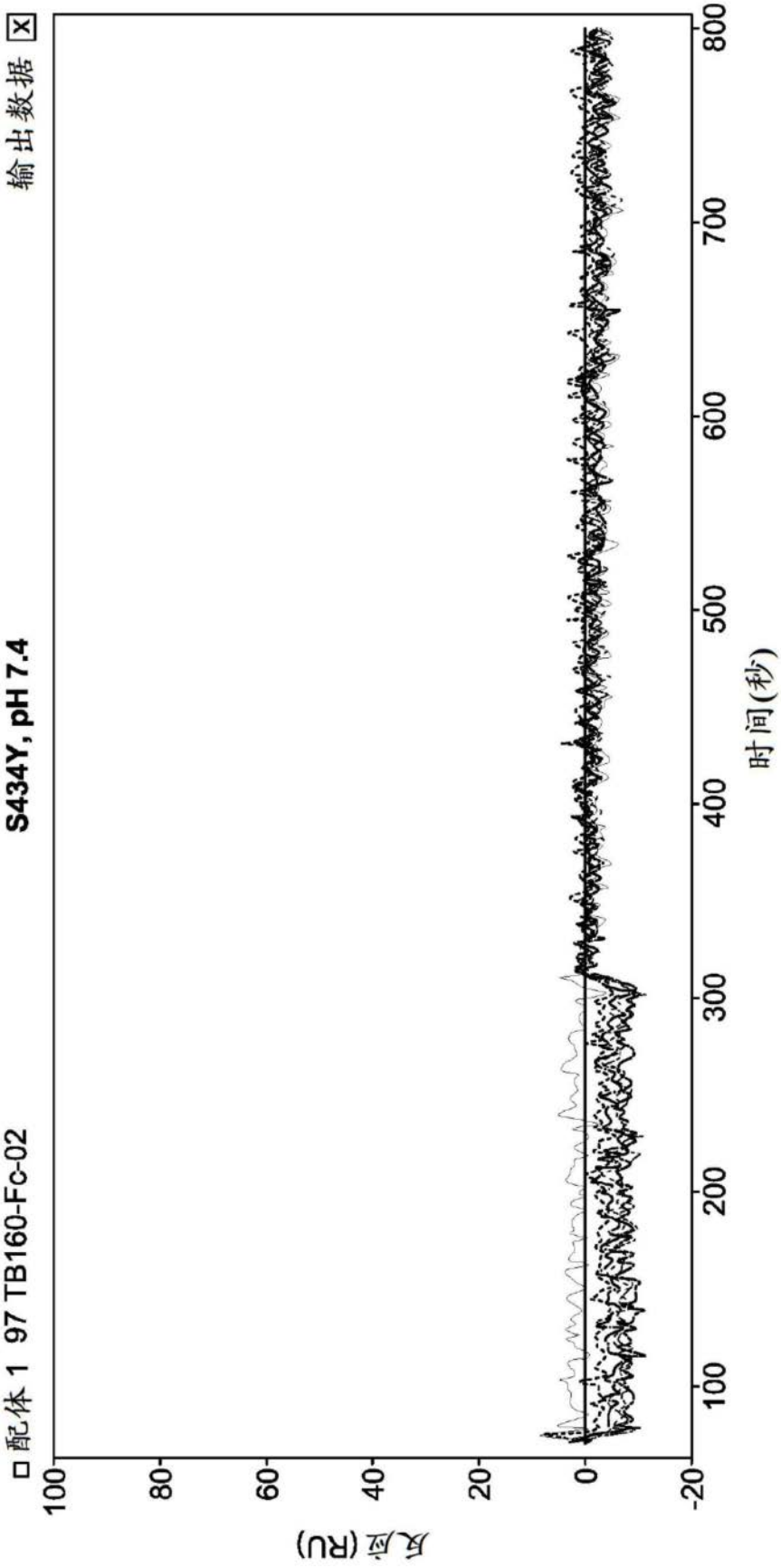

输出数据
配体 1 97 TB160-Fc-02
S434Y, pH 7.4
反应(RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图10B

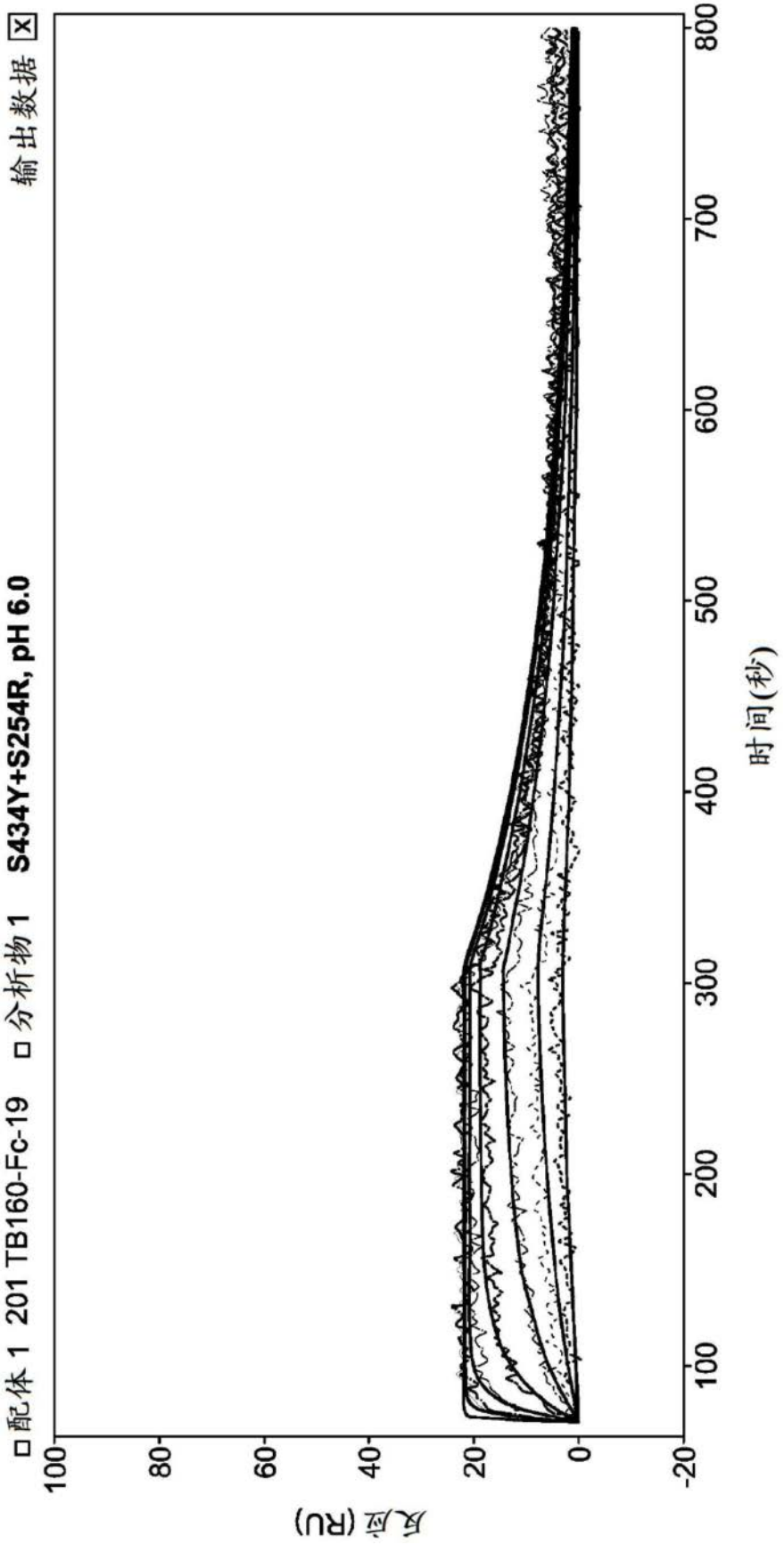

配体 1 201 TB160-Fc-19
分析物 1 S434Y+S254R, pH 6.0
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图11A

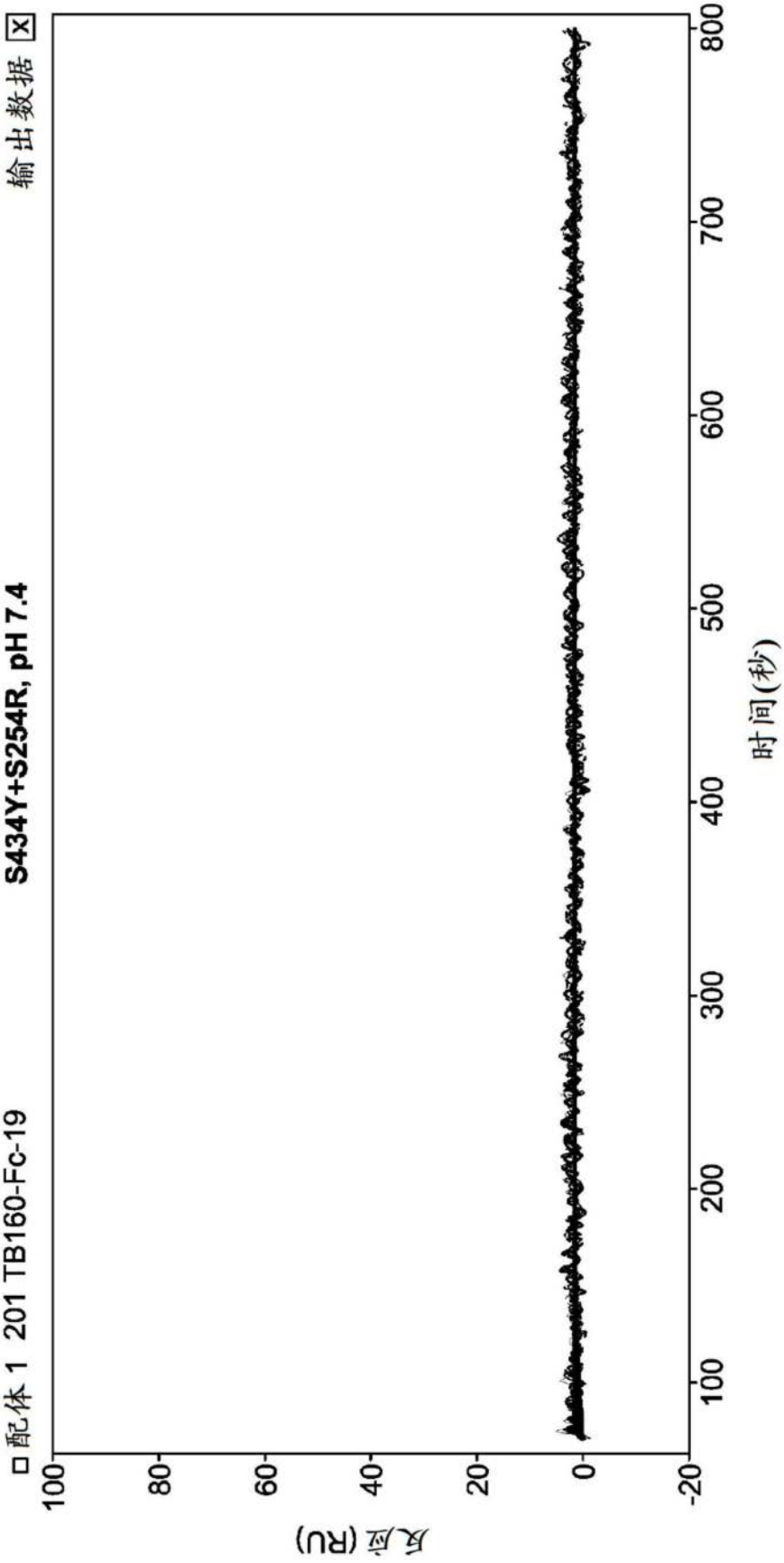

配体 1 201 TB160-Fc-19
S434Y+S254R, pH 7.4
输出数据
反应 (RU)
时间 (秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图11B

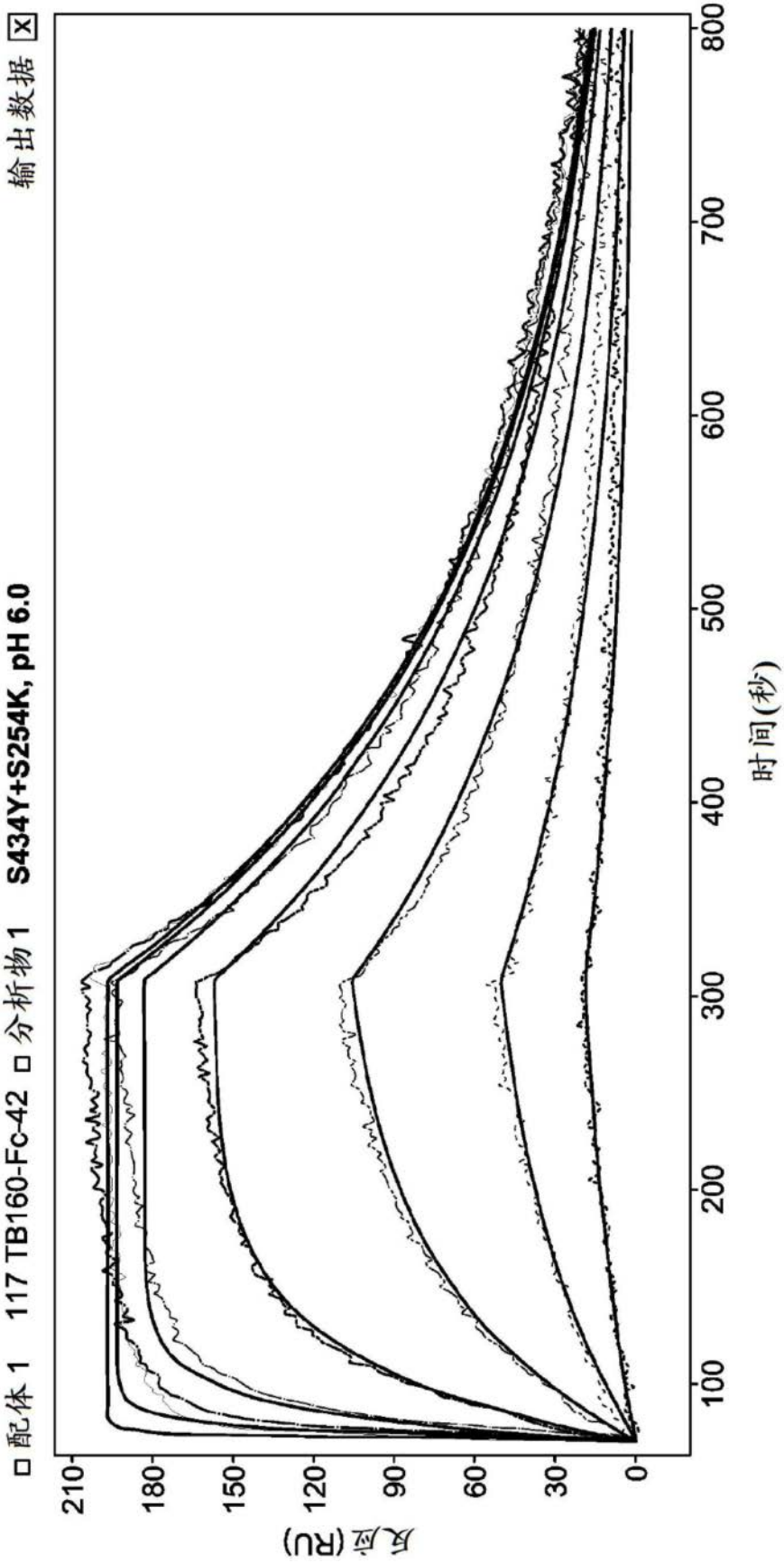

配体 1 117 TB160-Fc-42 分析物 1 S434Y+S254K, pH 6.0
输出数据
反应(RU)
时间(秒)
0
30
60
90
120
150
180
210
100
200
300
400
500
600
700
800

图12A

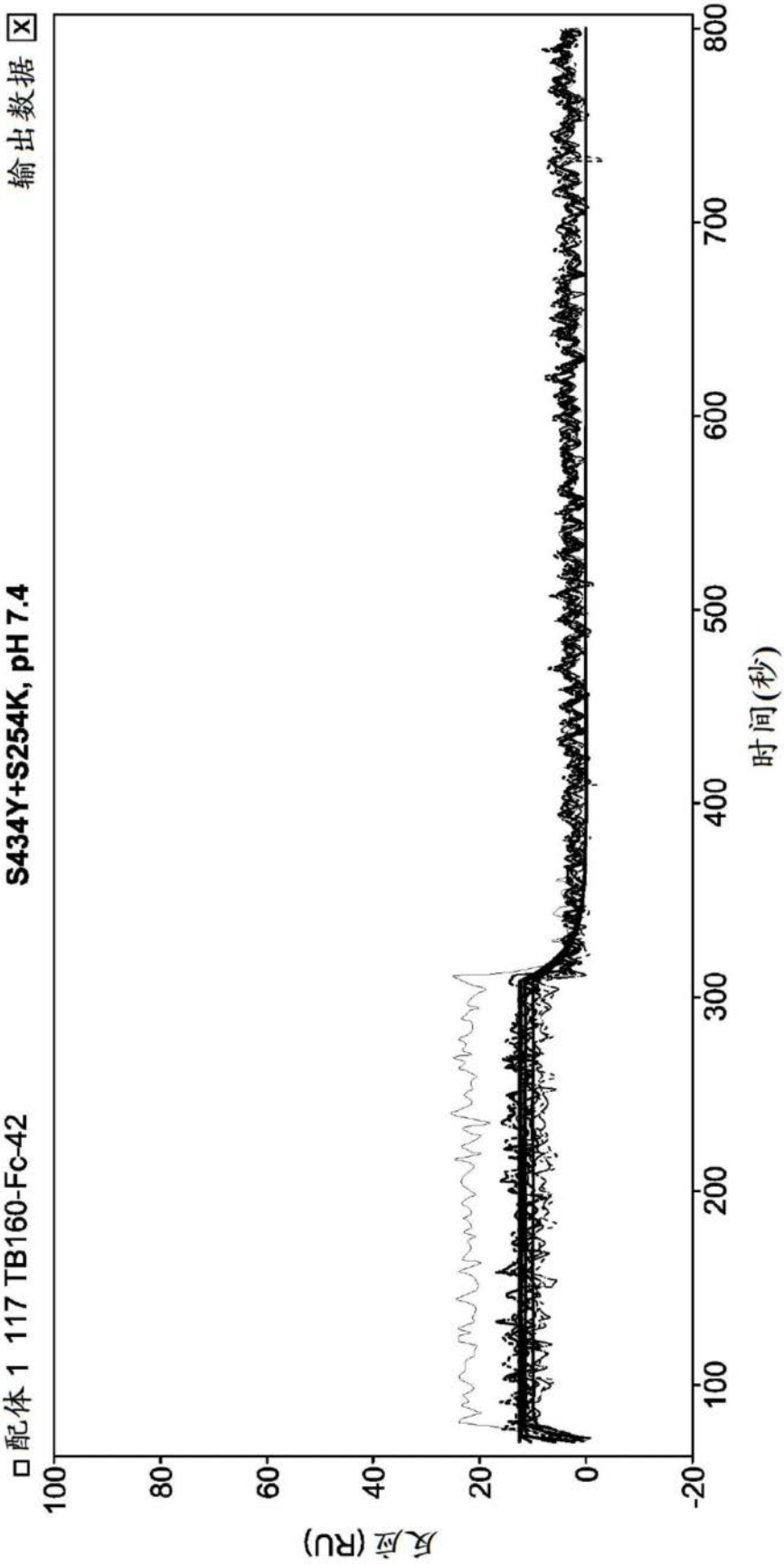

配体 1 117 TB160-Fc-42
S434Y+S254K, pH 7.4
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图12B

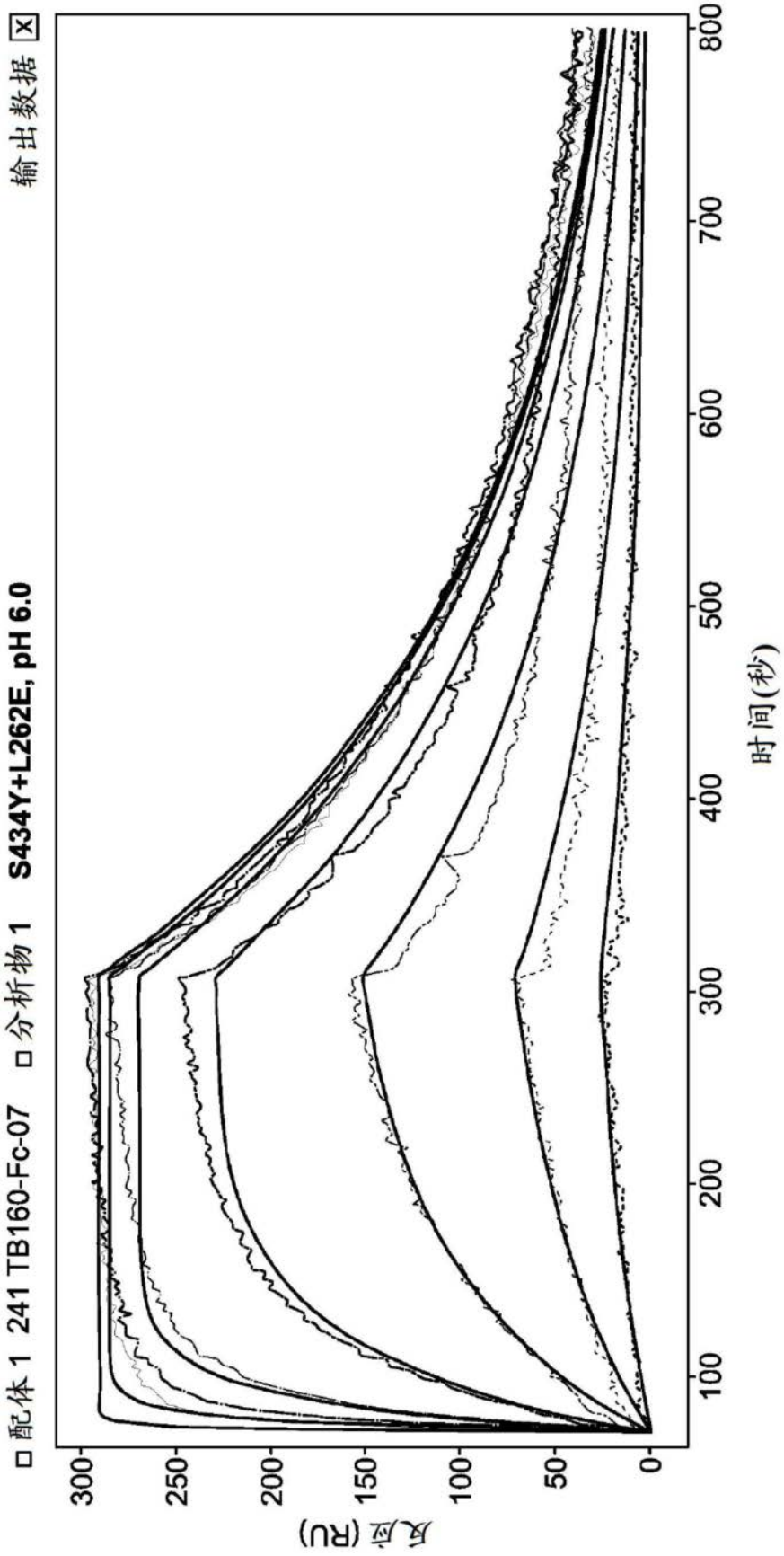

□ 配体 1 241 TB160-Fc-07 □ 分析物 1 S434Y+L262E, pH 6.0
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
0
50
100
150
200
250
300
100
200
300
400
500
600
700
800

图13A

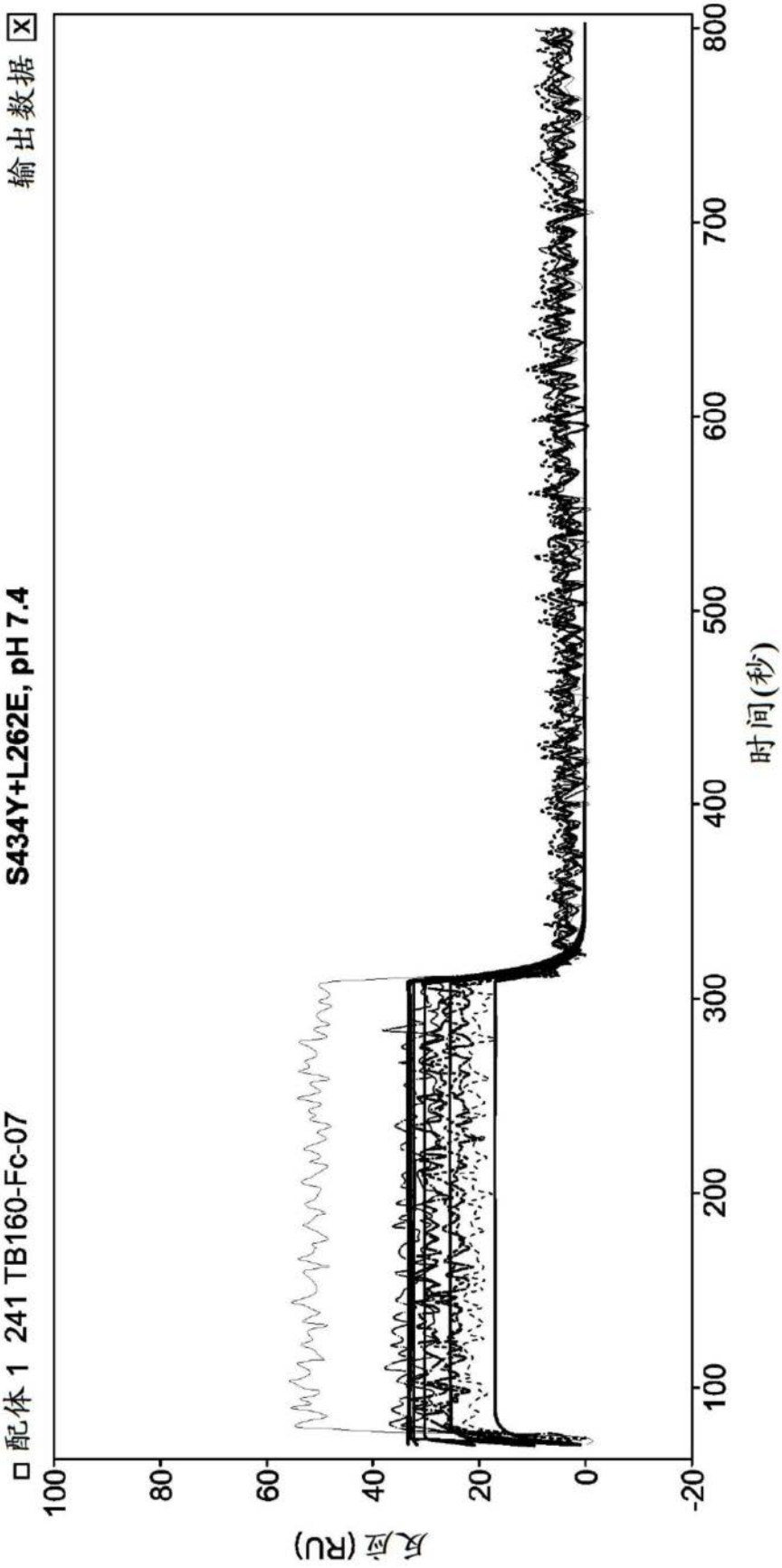

配体 1 241 TB160-Fc-07
S434Y+L262E, pH 7.4
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图13B

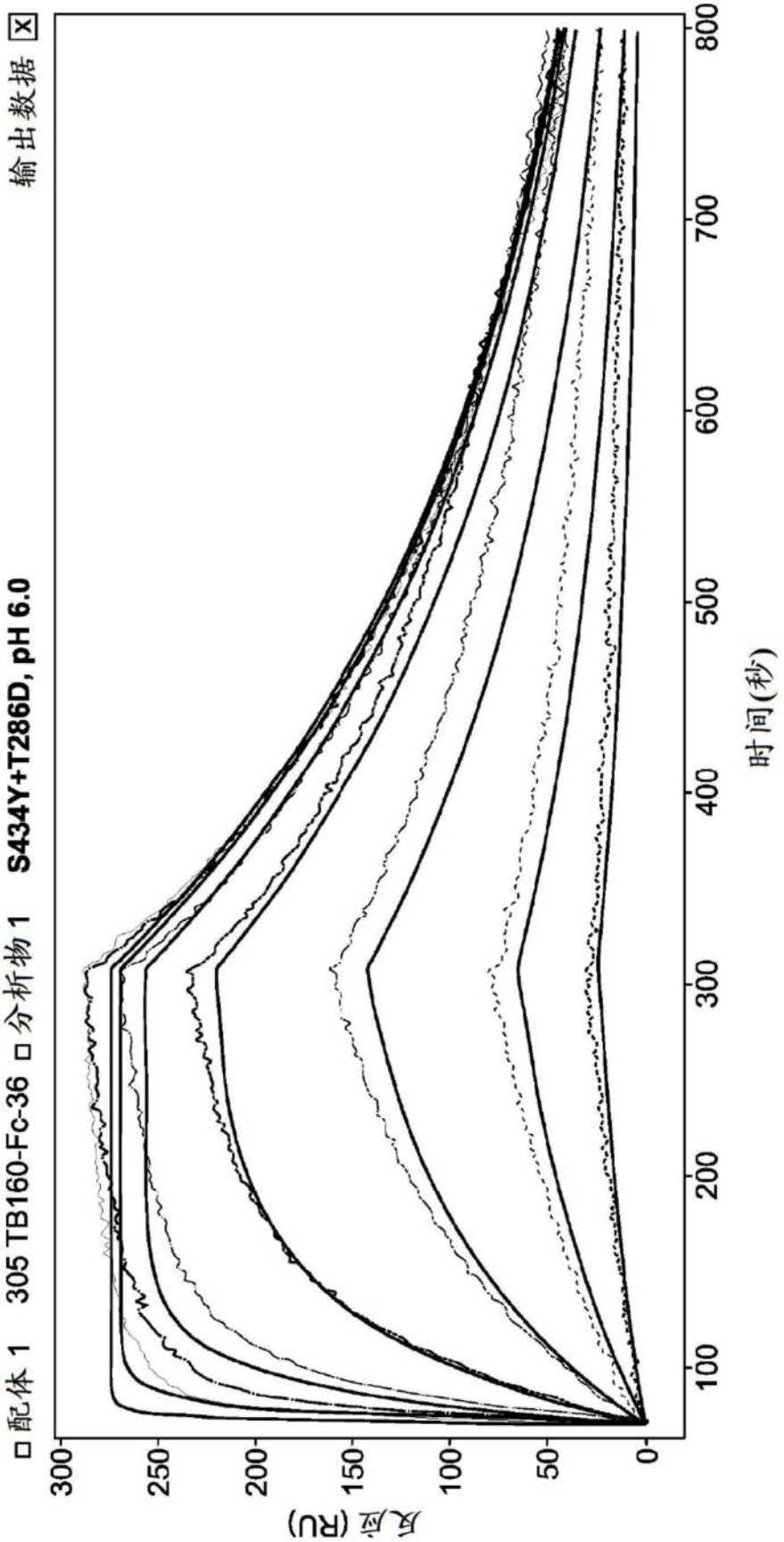

□ 配体 1 305 TB160-Fc-36 □ 分析物 1 S434Y+T286D, pH 6.0
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
300
250
200
150
100
50
0
100
200
300
400
500
600
700
800

图14A

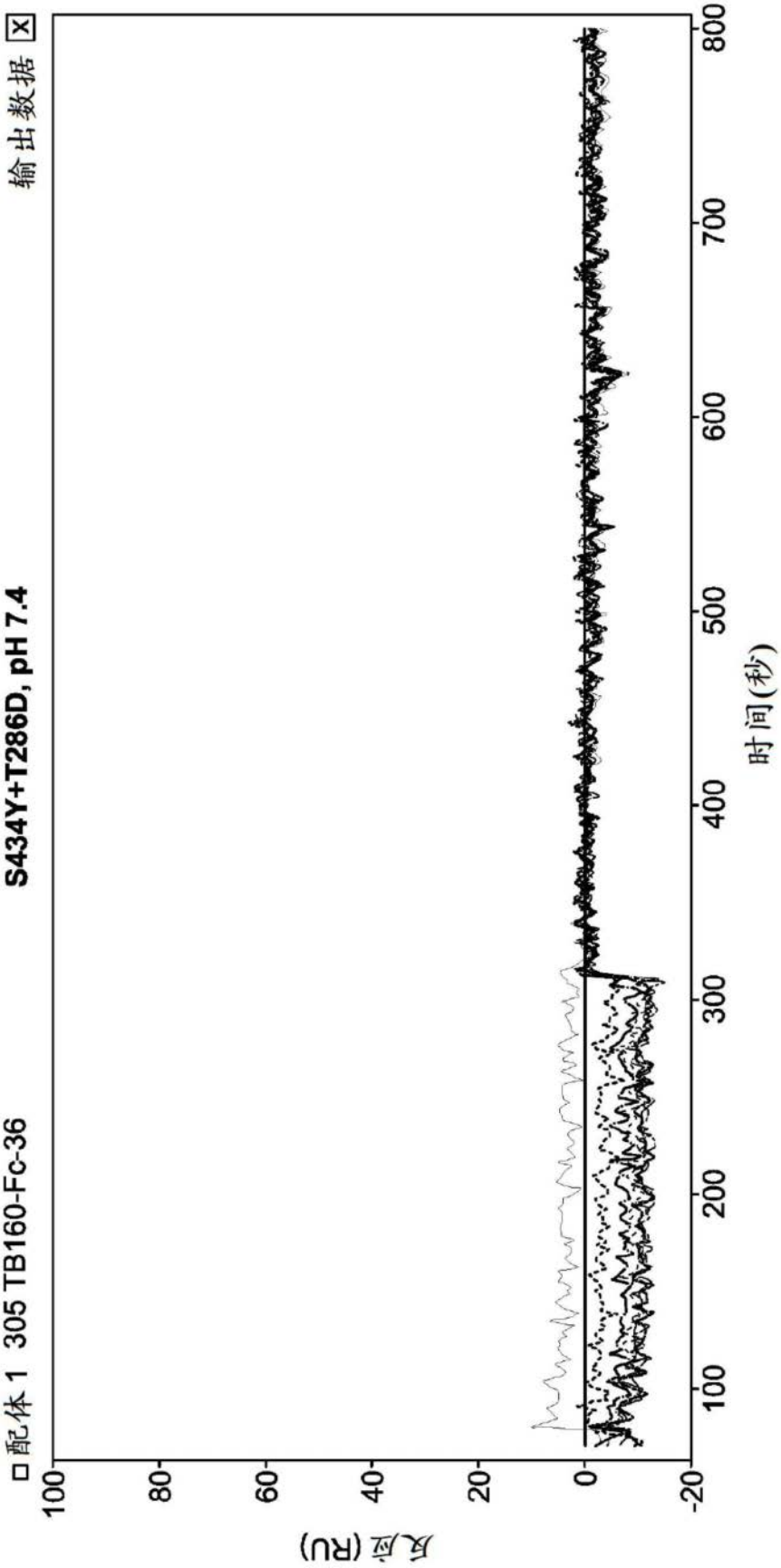

配体 1 305 TB160-Fc-36
S434Y+T286D, pH 7.4
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图14B

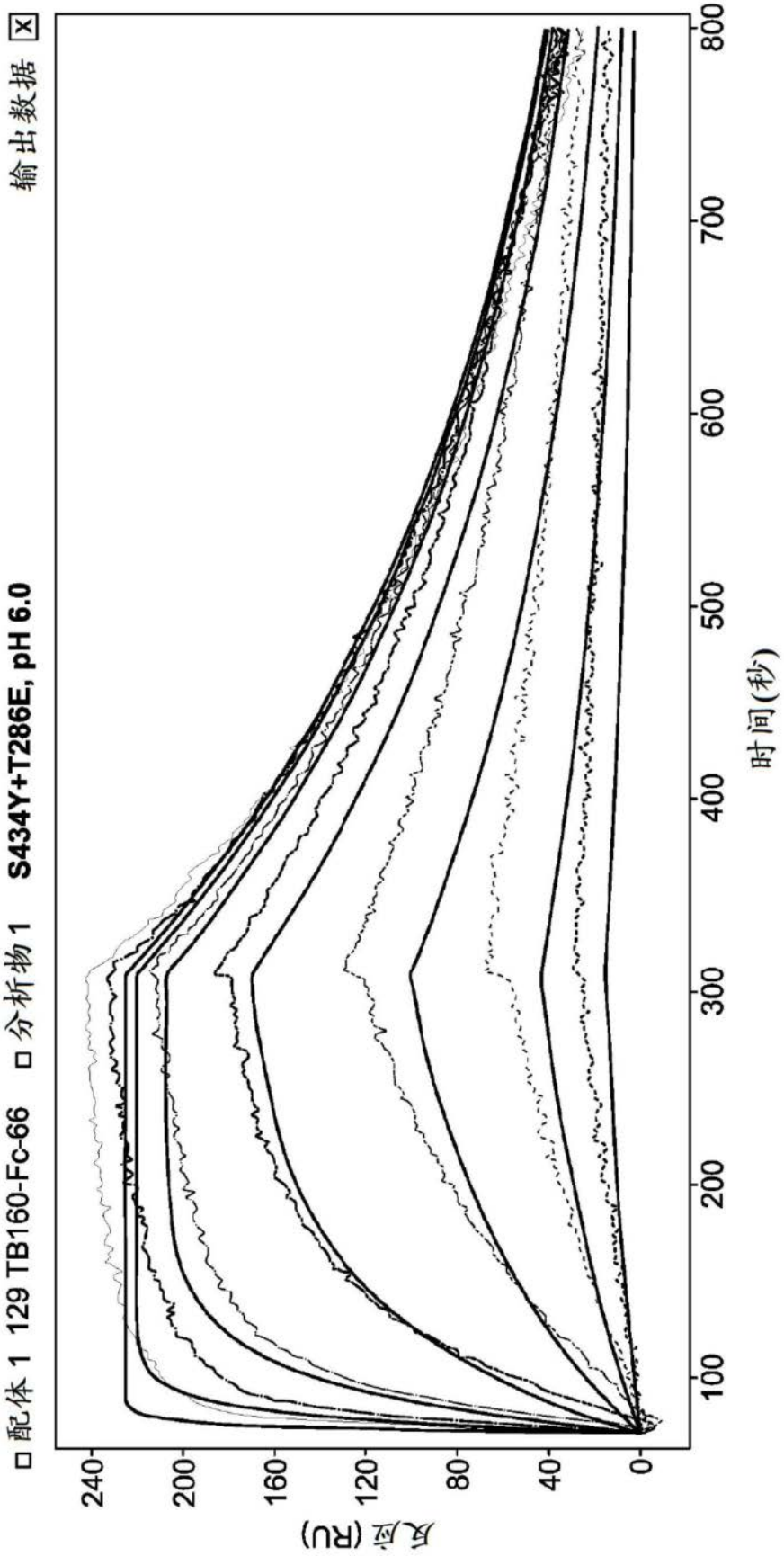

□ 配体 1 129 TB160-Fc-66 □ 分析物 1 S434Y+T286E, pH 6.0
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
0
40
80
120
160
200
240
100
200
300
400
500
600
700
800

图15A

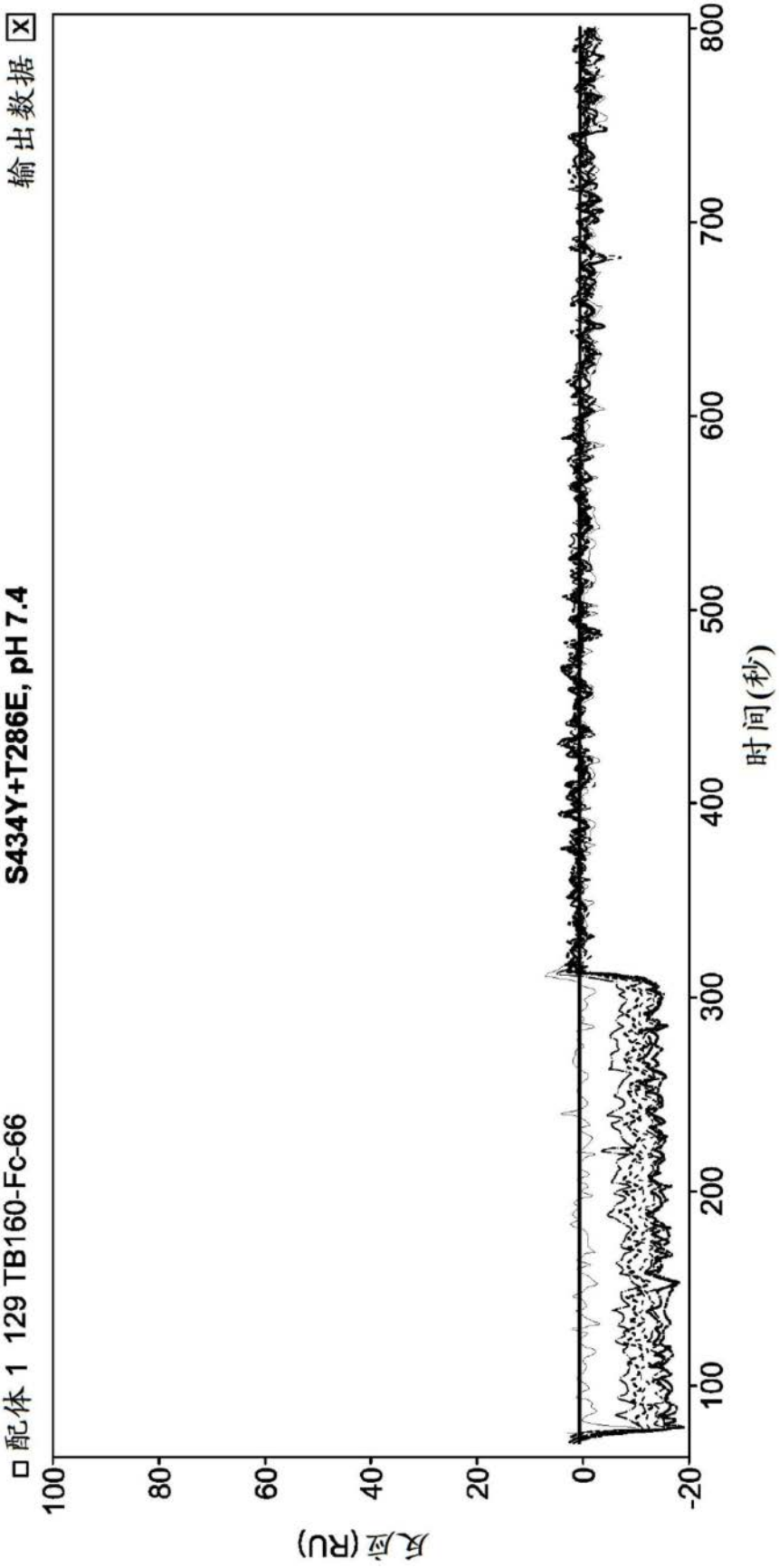

配体 1 129 TB160-Fc-66
S434Y+T286E, pH 7.4
输出数据
反应(RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图15B

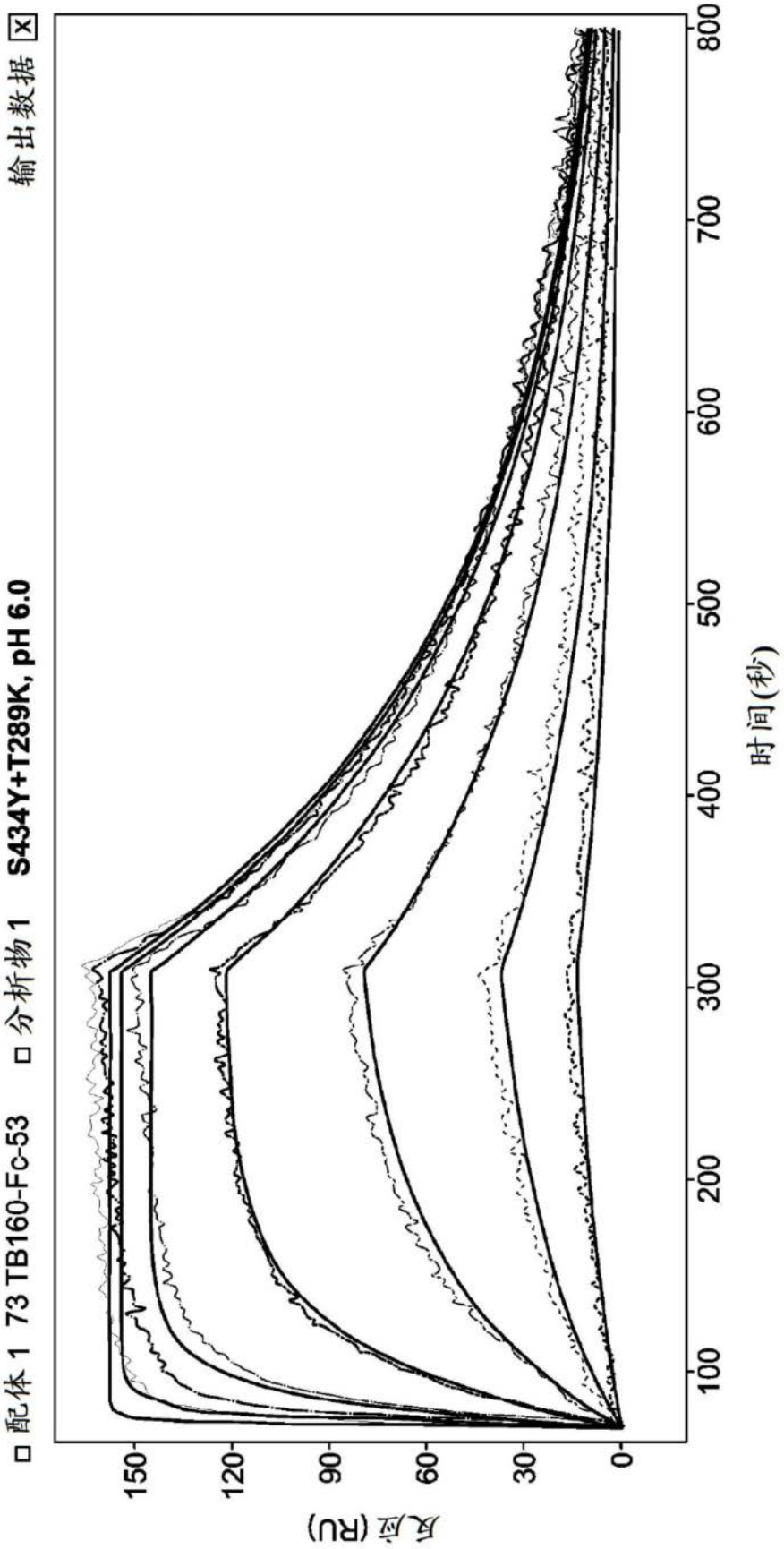

输出数据
配体 1 73 TB160-Fc-53
分析物 1 S434Y+T289K, pH 6.0
反应 (RU)
150
120
90
60
30
0
100
200
300
400
500
600
700
800
时间(秒)

图16A

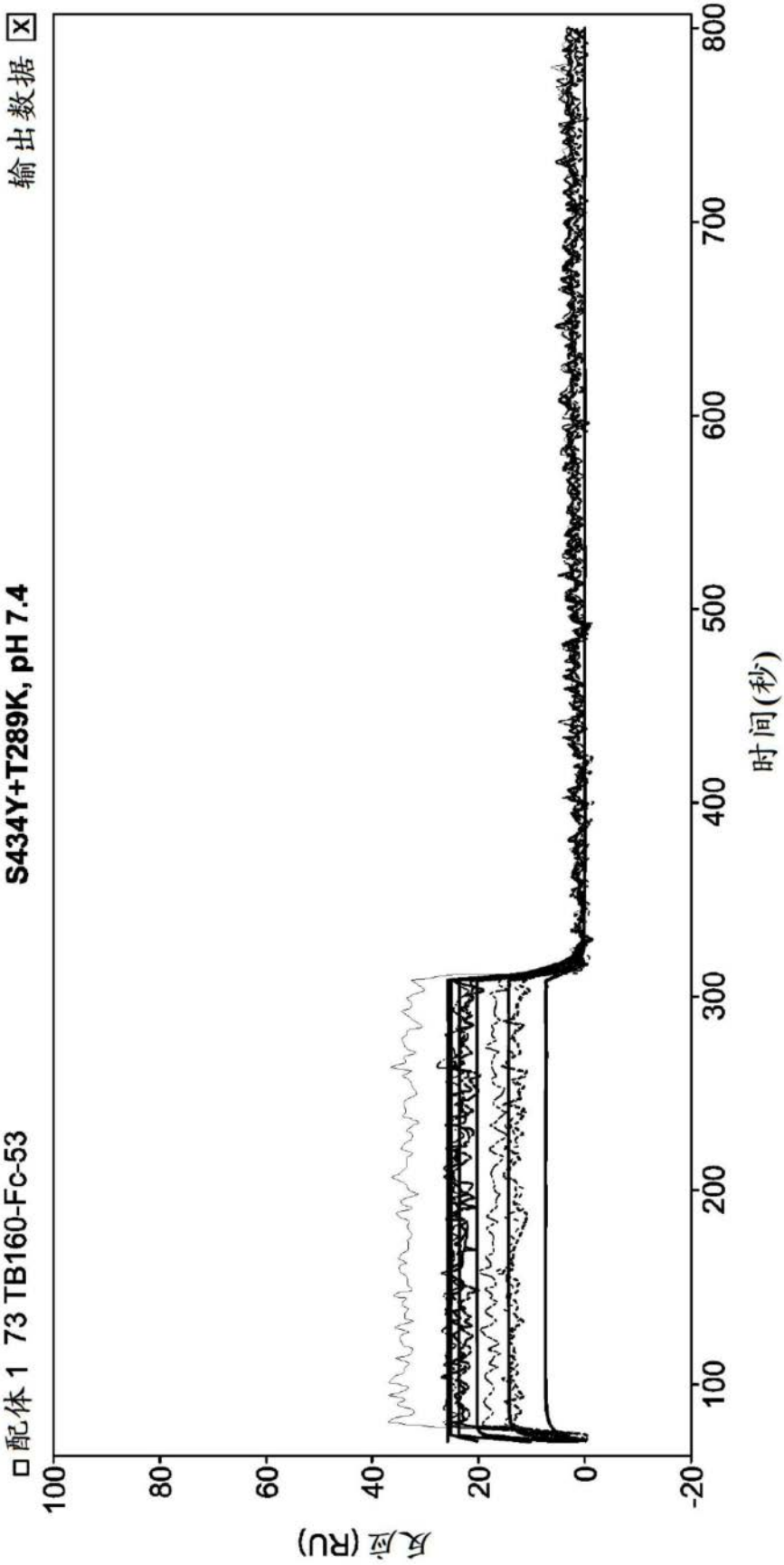

配体 1 73 TB160-Fc-53
S434Y+T289K, pH 7.4
输出数据
反应 (RU)
时间 (秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图16B

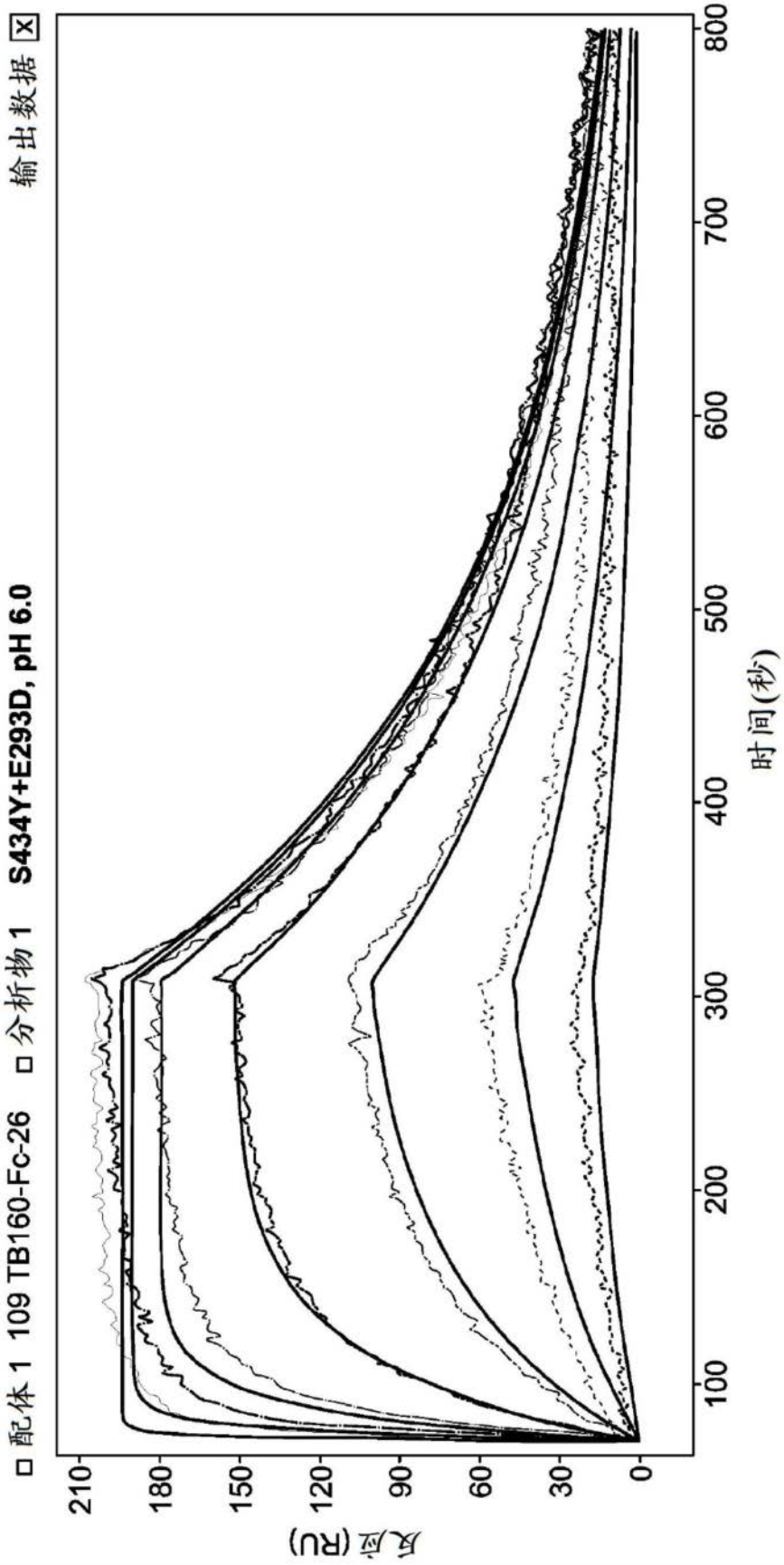

□ 配体 1 109 TB160-Fc-26 □ 分析物 1 S434Y+E293D, pH 6.0
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
0
30
60
90
120
150
180
210
100
200
300
400
500
600
700
800

图17A

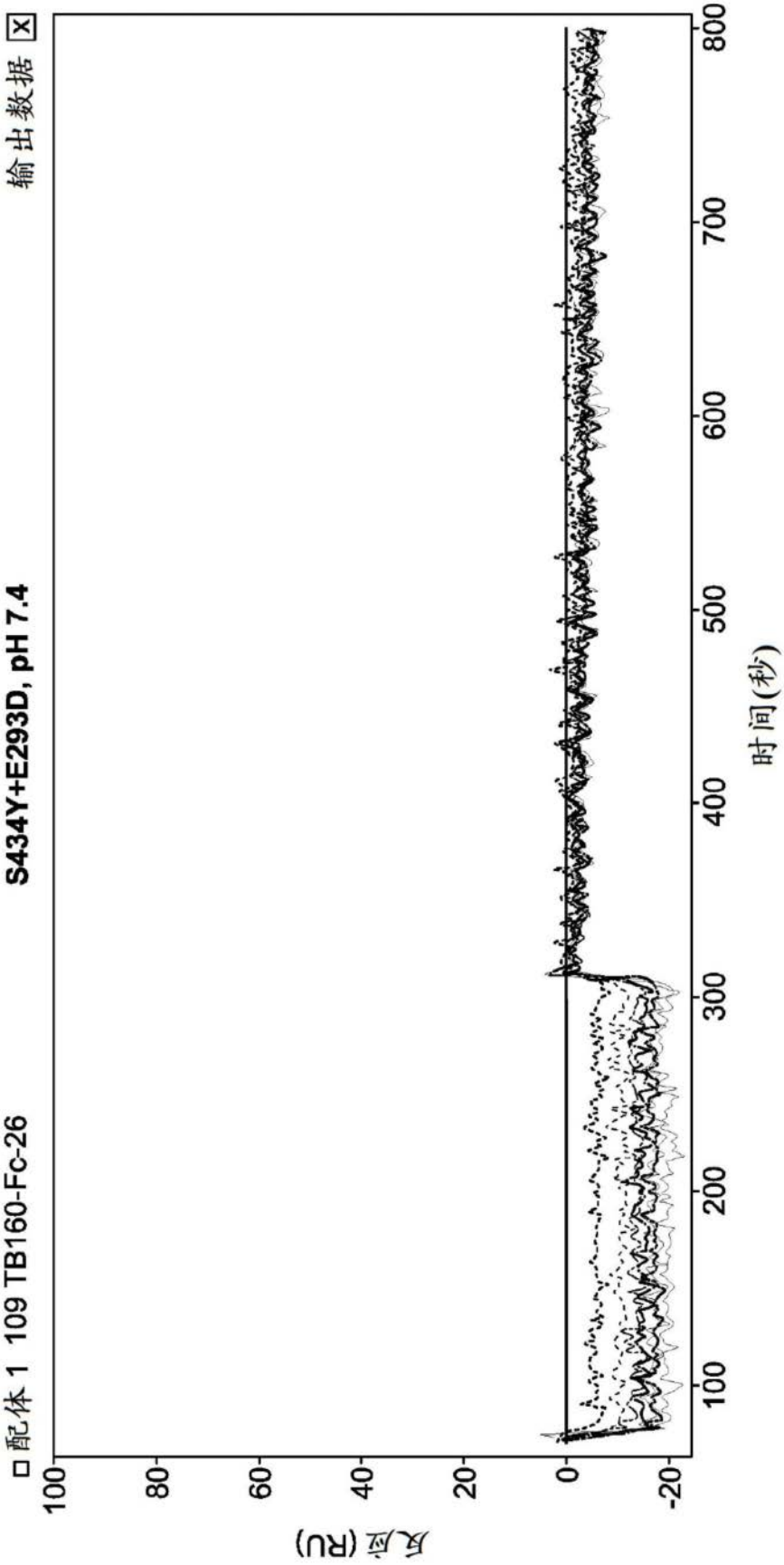

配体 1 109 TB160-Fc-26
S434Y+E293D, pH 7.4
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图17B

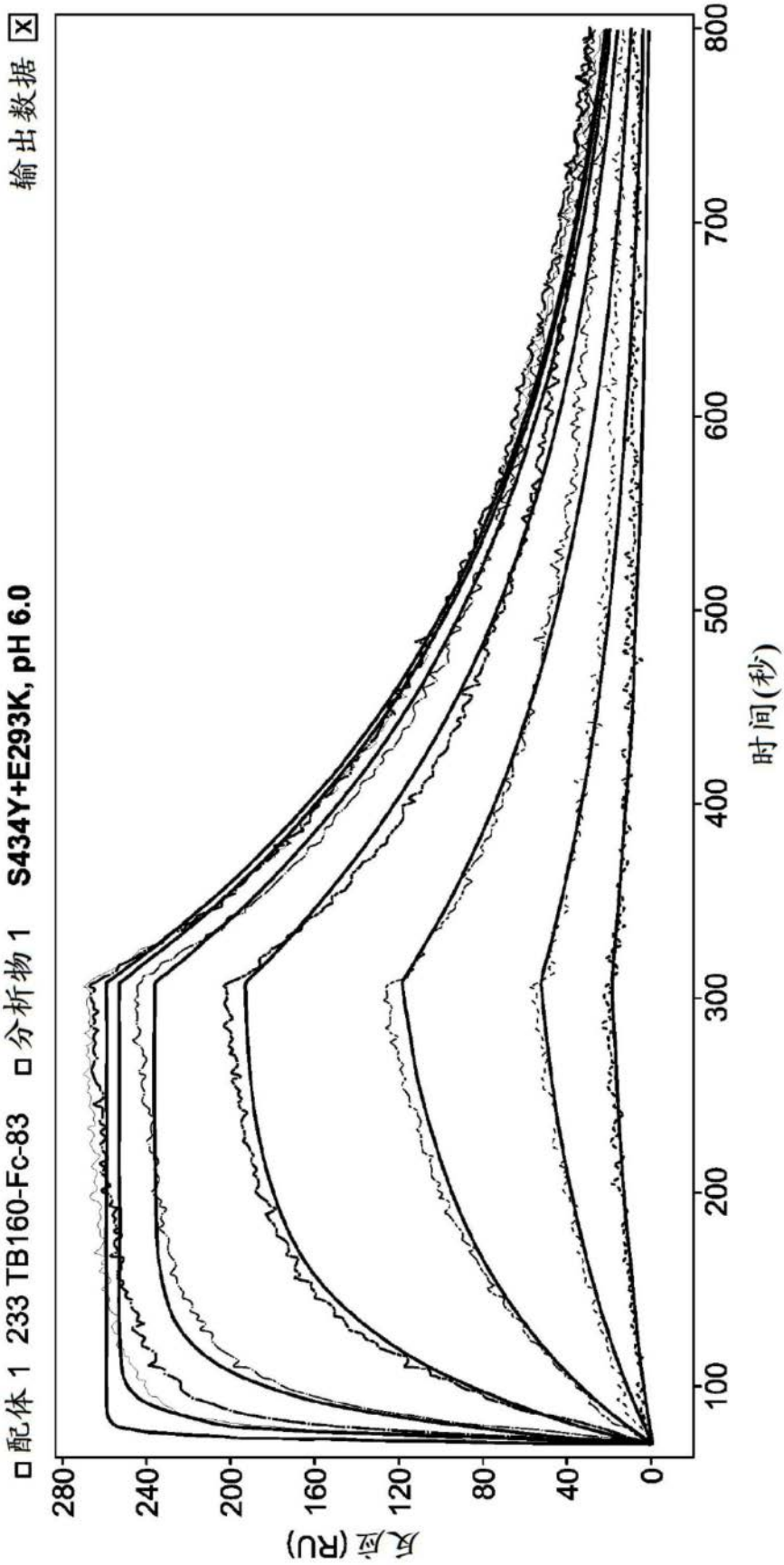

配体 1 233 TB160-Fc-83
分析物 1 S434Y+E293K, pH 6.0
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
0
40
80
120
160
200
240
280
100
200
300
400
500
600
700
800

图18A

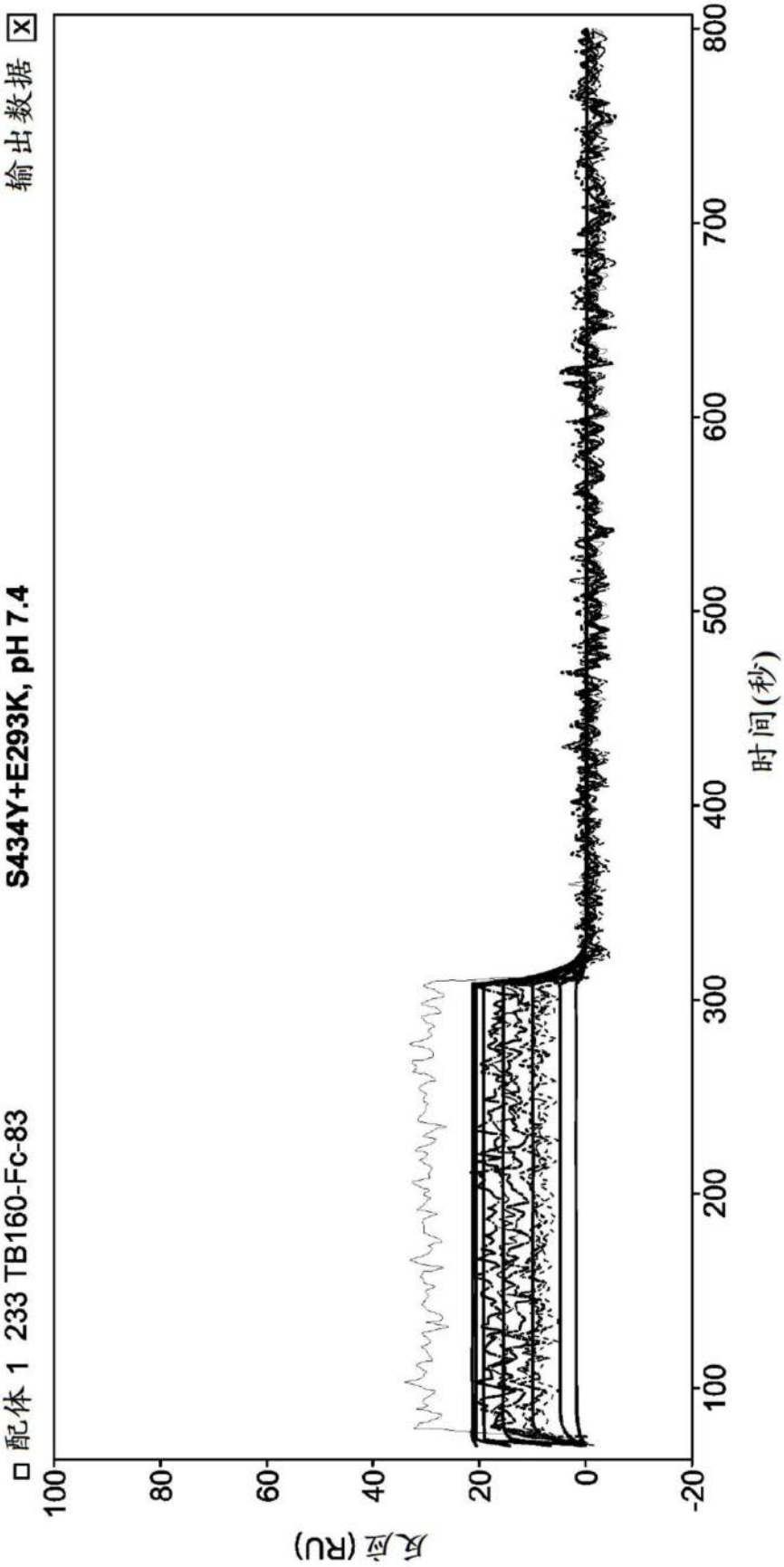

配体 1 233 TB160-Fc-83
S434Y+E293K, pH 7.4
输出数据
反应 (RU)
时间 (秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图18B

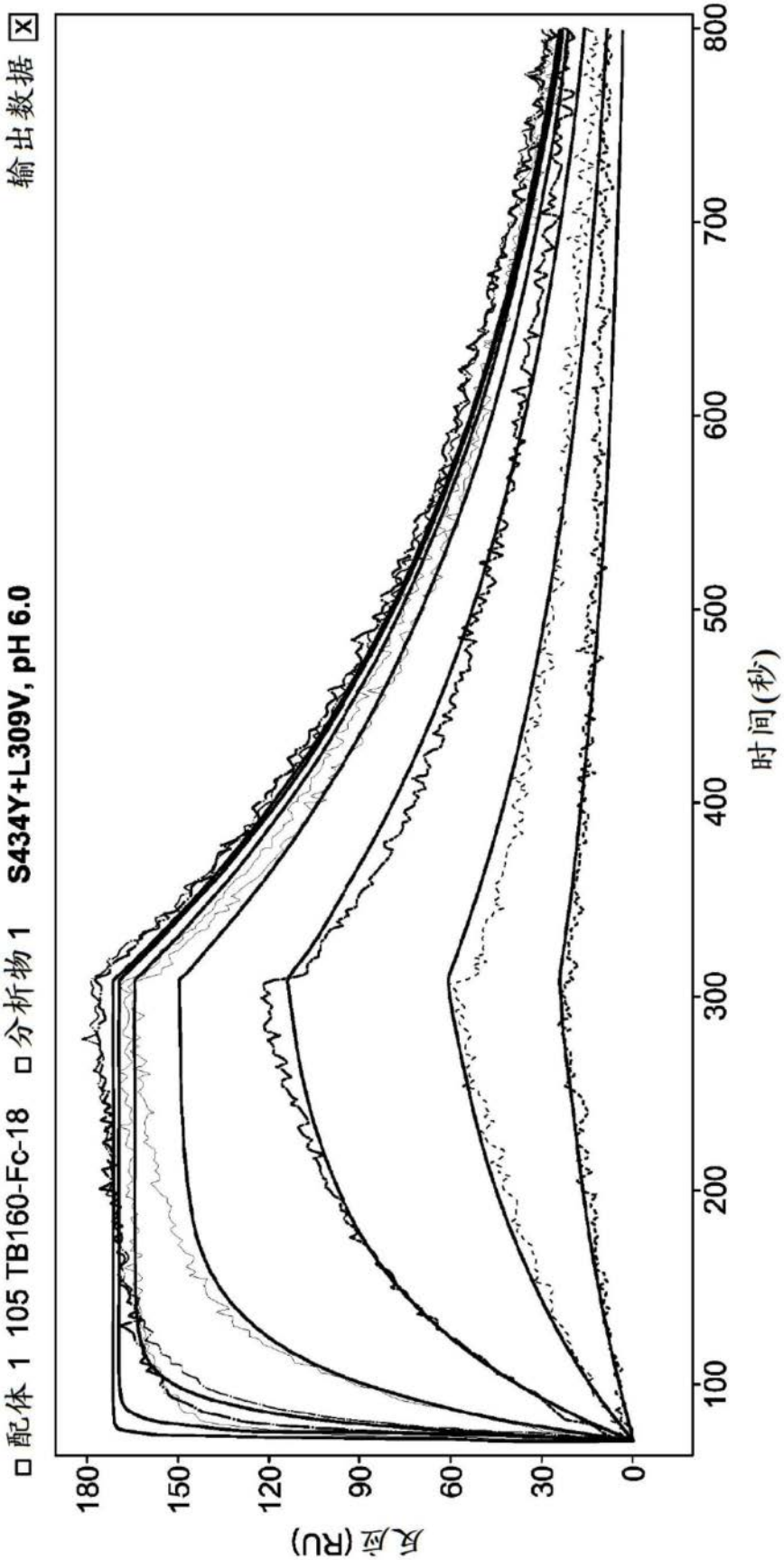

□ 配体 1 105 TB160-Fc-18 □ 分析物 1 S434Y+L309V, pH 6.0
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
0
30
60
90
120
150
180
100
200
300
400
500
600
700
800

图19A

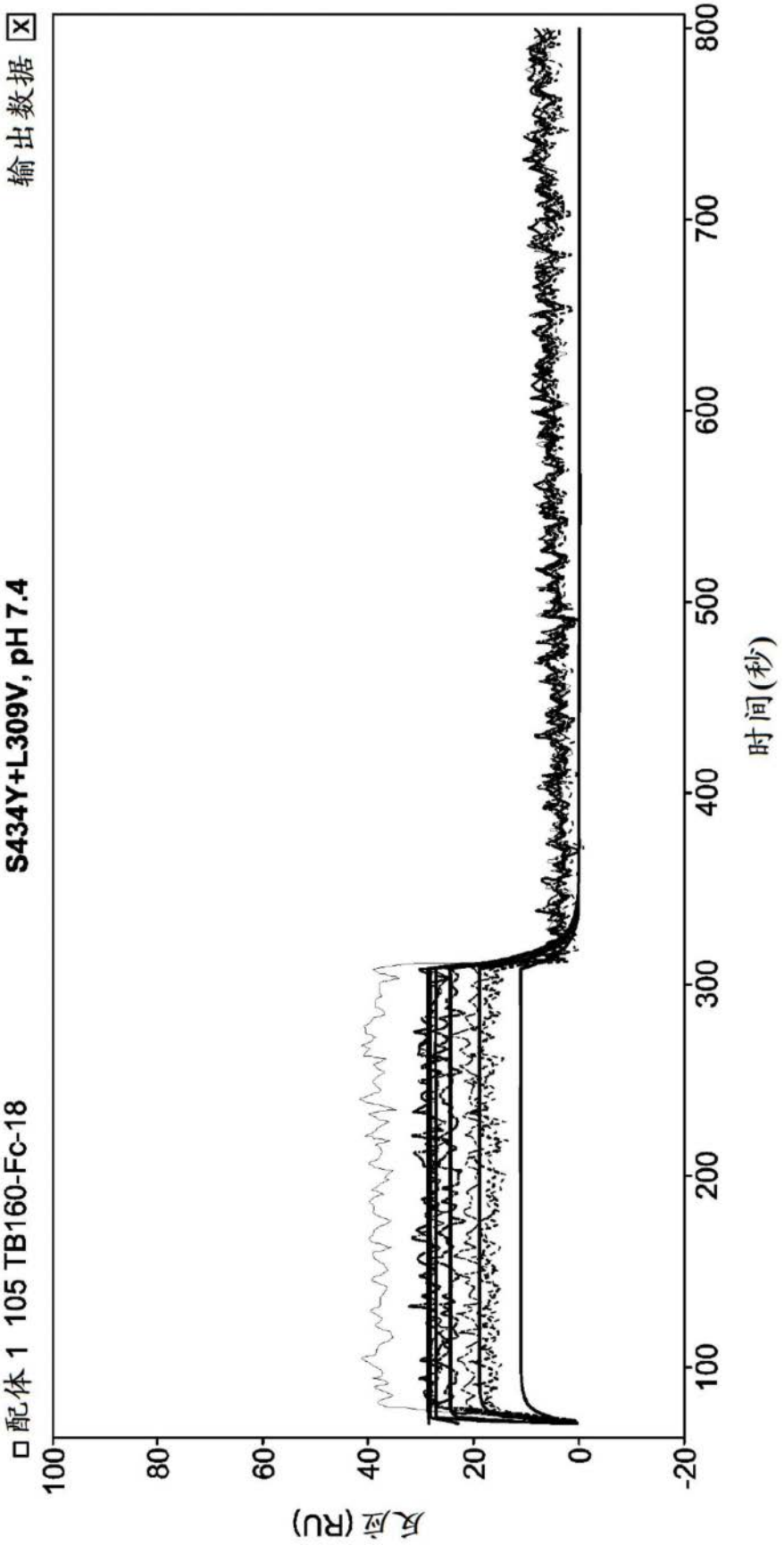

输出数据
S434Y+L309V, pH 7.4
配体 1 105 TB160-Fc-18
反应 (RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图19B

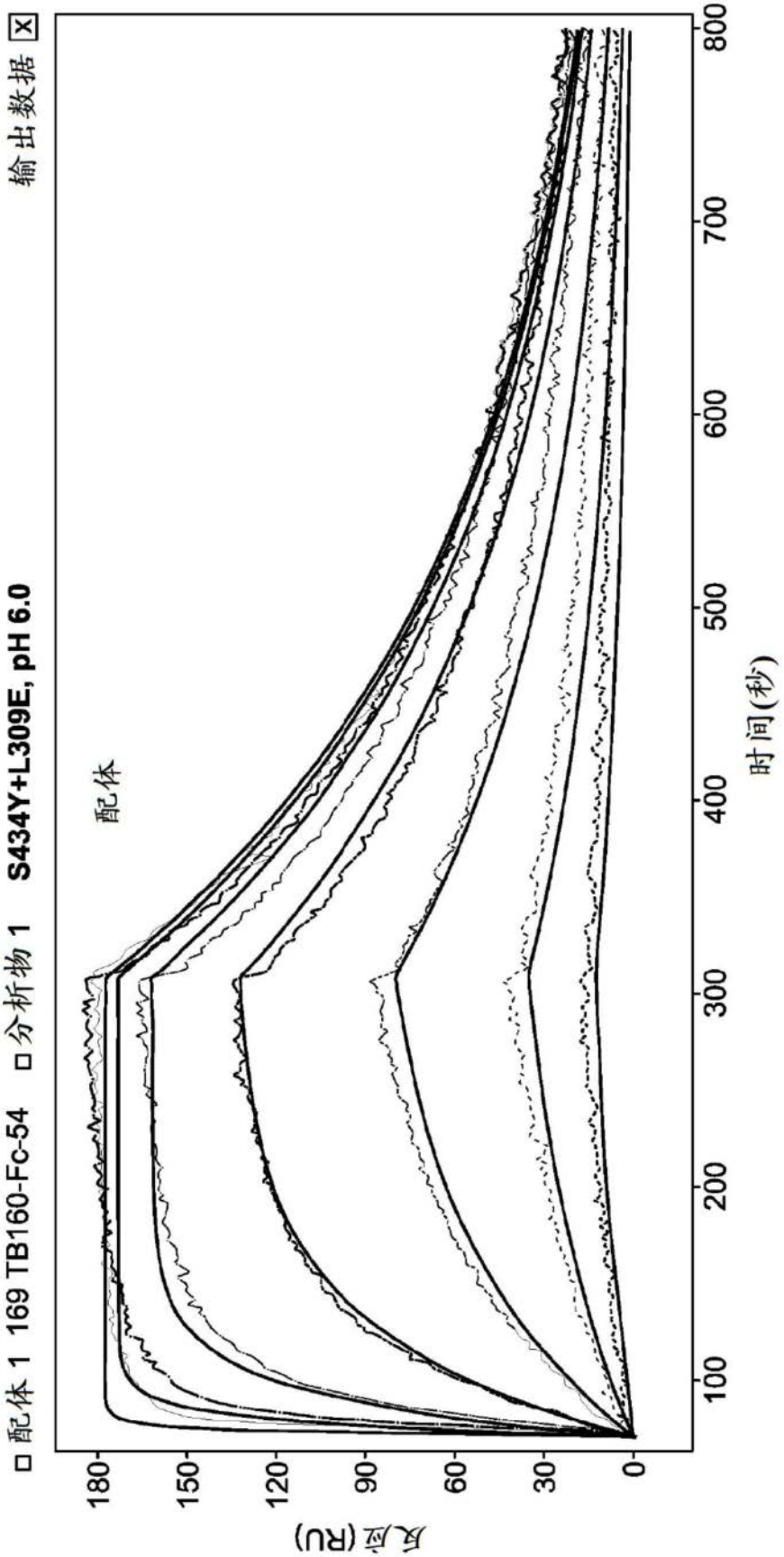

□ 配体 1 169 TB160-Fc-54 □ 分析物 1 S434Y+L309E, pH 6.0
输出数据
配体
反应(RU)
时间(秒)
0
30
60
90
120
150
180
100
200
300
400
500
600
700
800

图20A

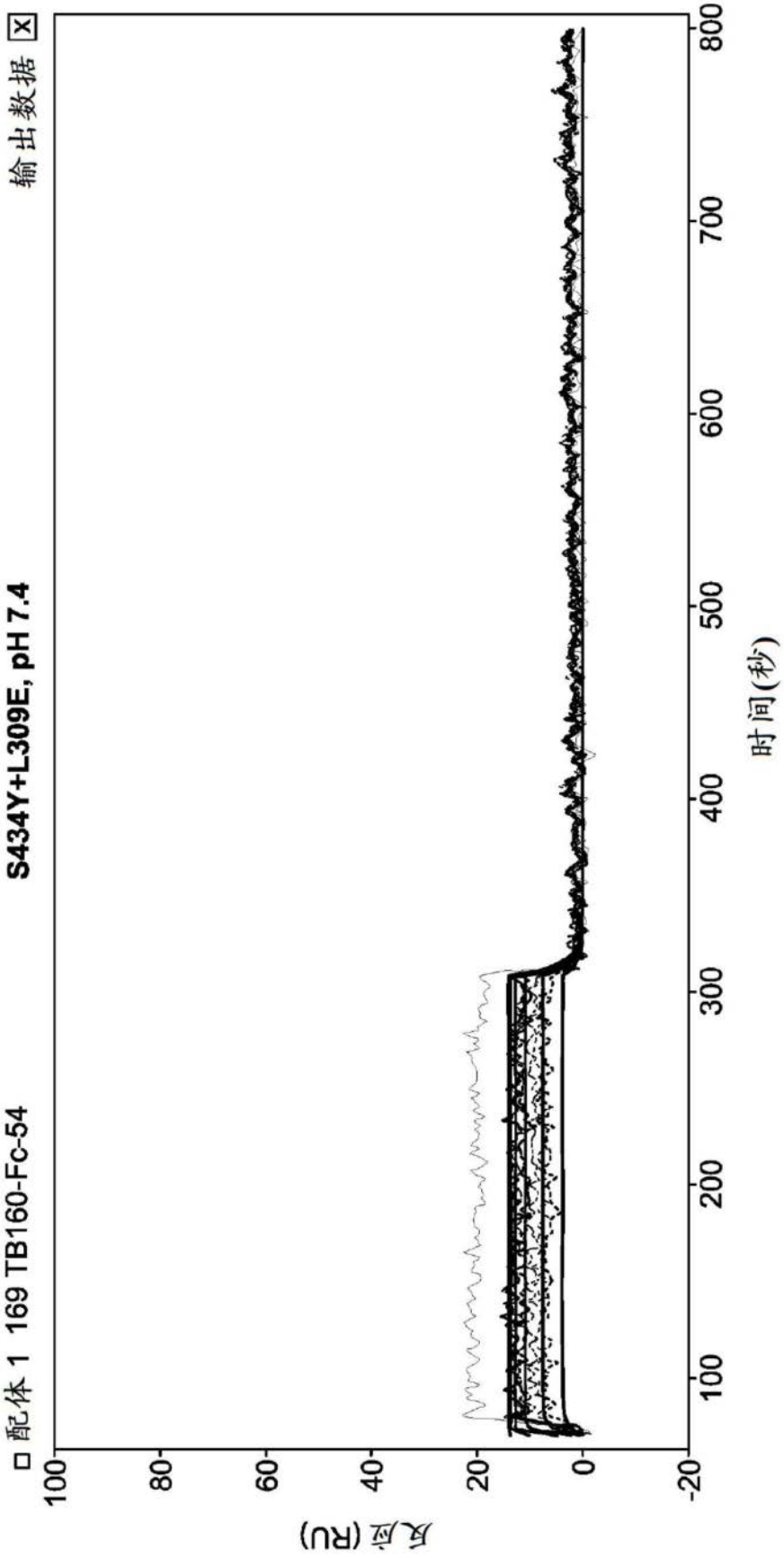

配体 1 169 TB160-Fc-54
S434Y+L309E, pH 7.4
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图20B

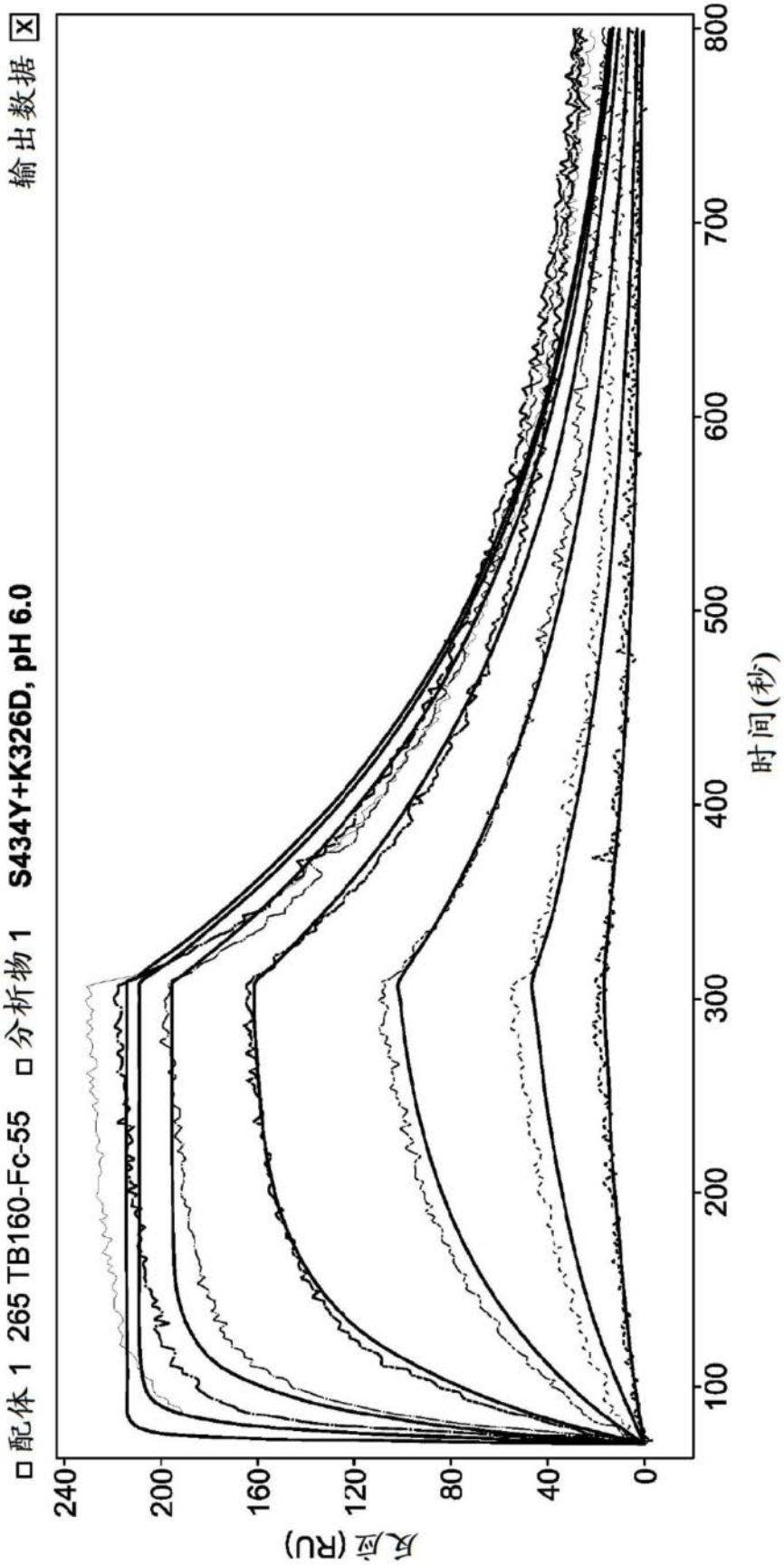

□ 配体 1 265 TB160-Fc-55 □ 分析物 1 S434Y+K326D, pH 6.0
输出数据
反应 (RU)
时间 (秒)
0
40
80
120
160
200
240
100
200
300
400
500
600
700
800

图21A

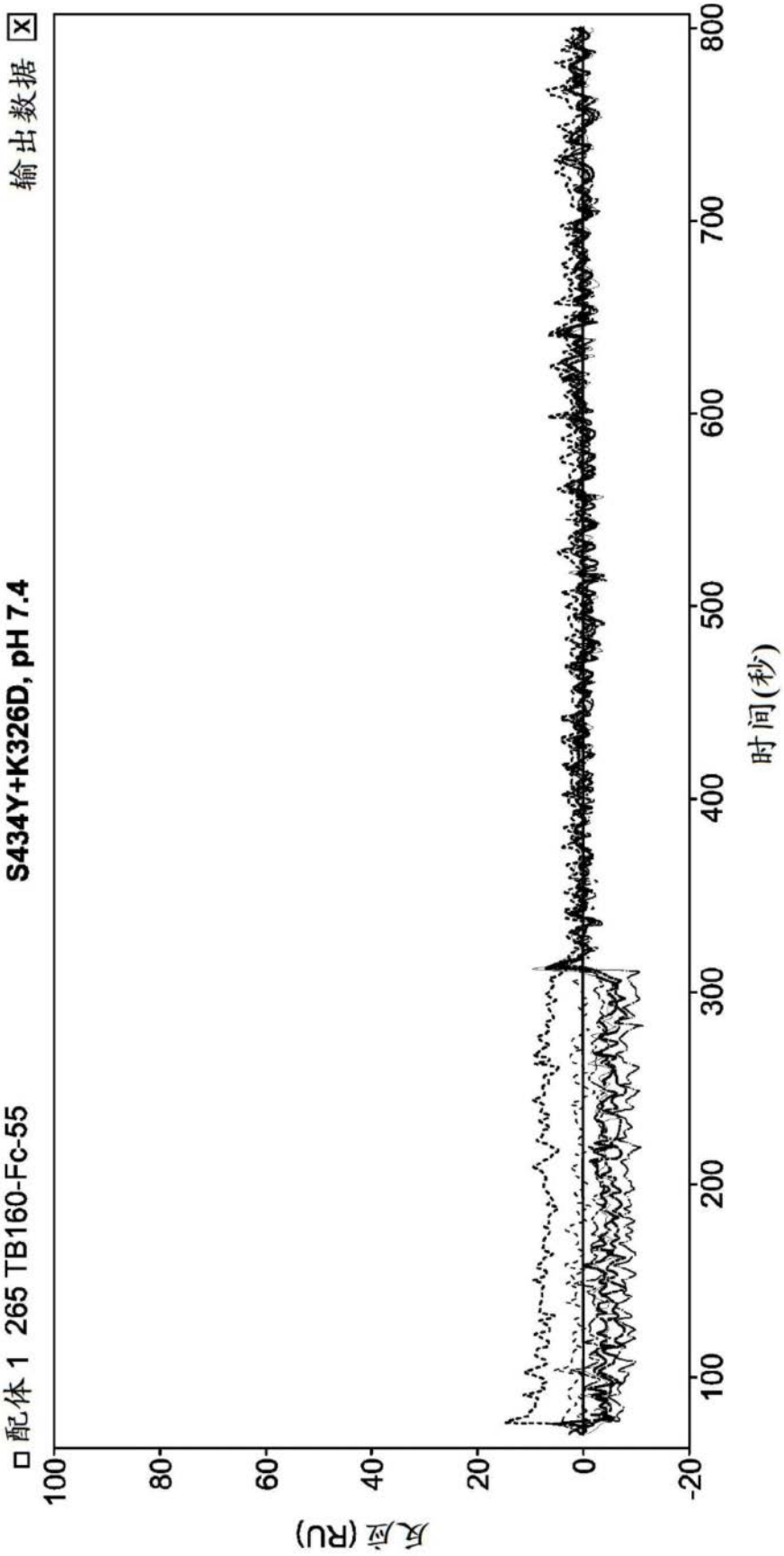

输出数据
S434Y+K326D, pH 7.4
配体 1 265 TB160-Fc-55
反应 (RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图21B

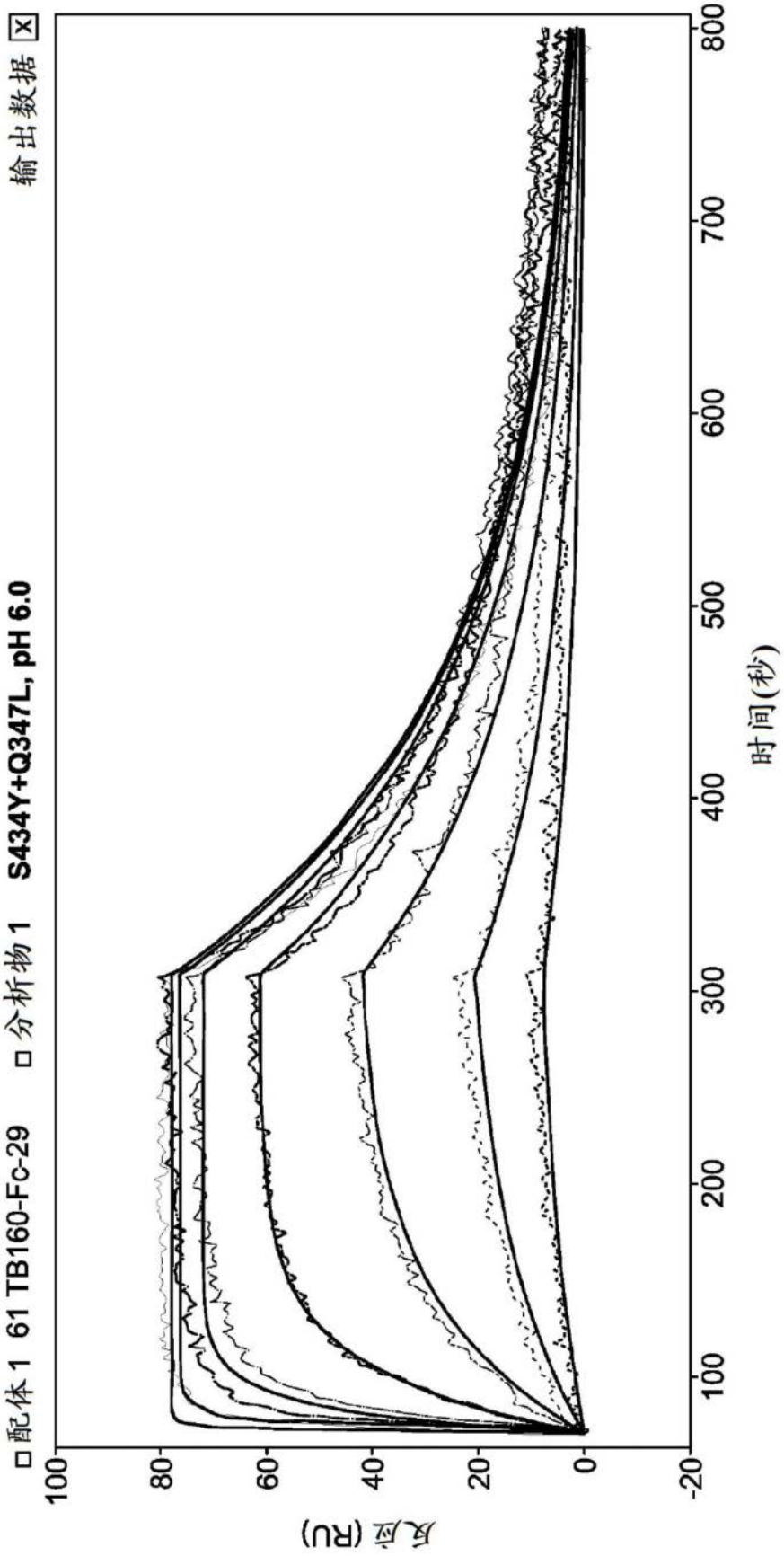

□配体 1 61 TB160-Fc-29 □分析物 1 S434Y+Q347L, pH 6.0
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图22A

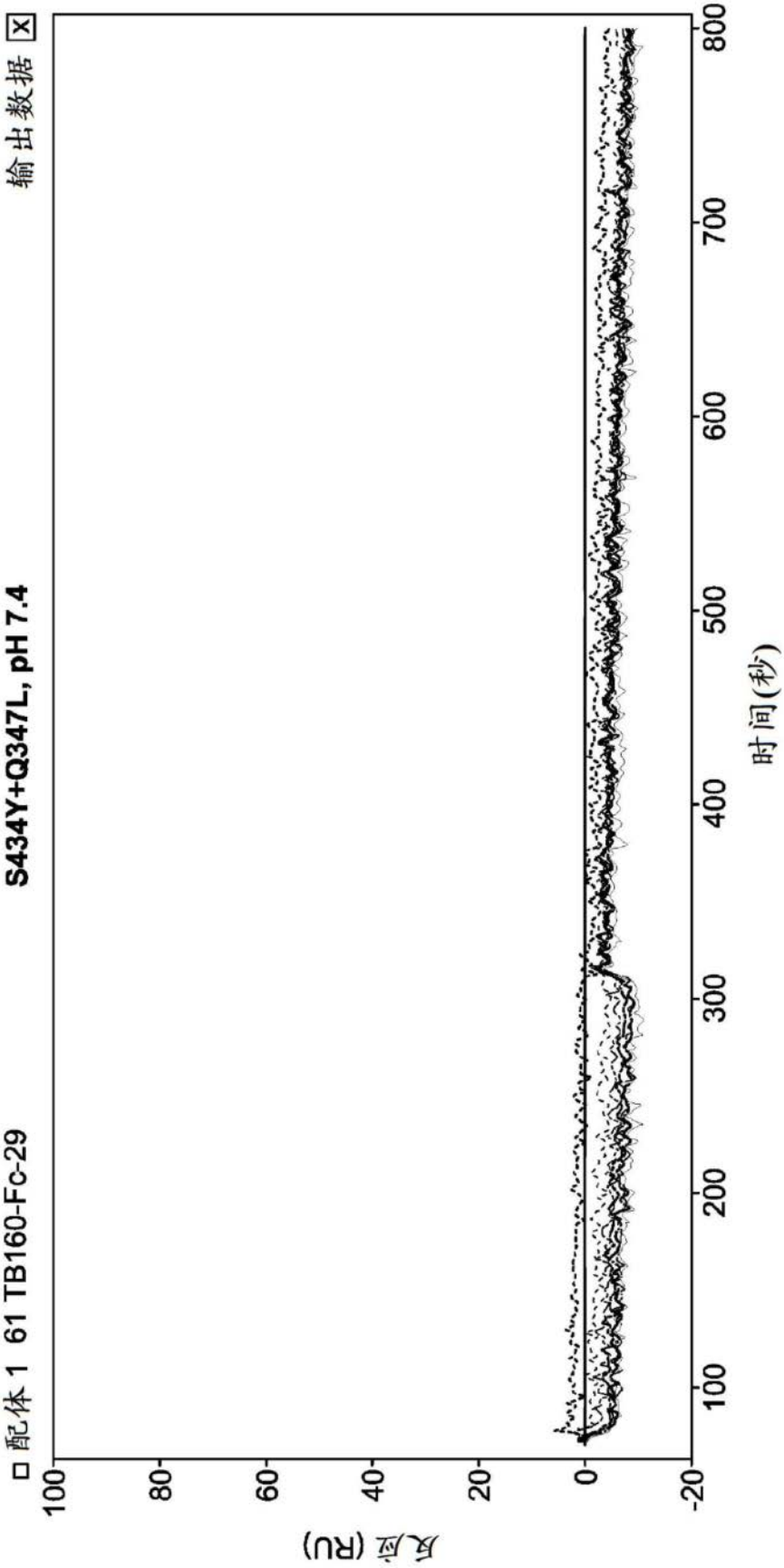

配体 1 61 TB160-Fc-29
S434Y+Q347L, pH 7.4
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图22B

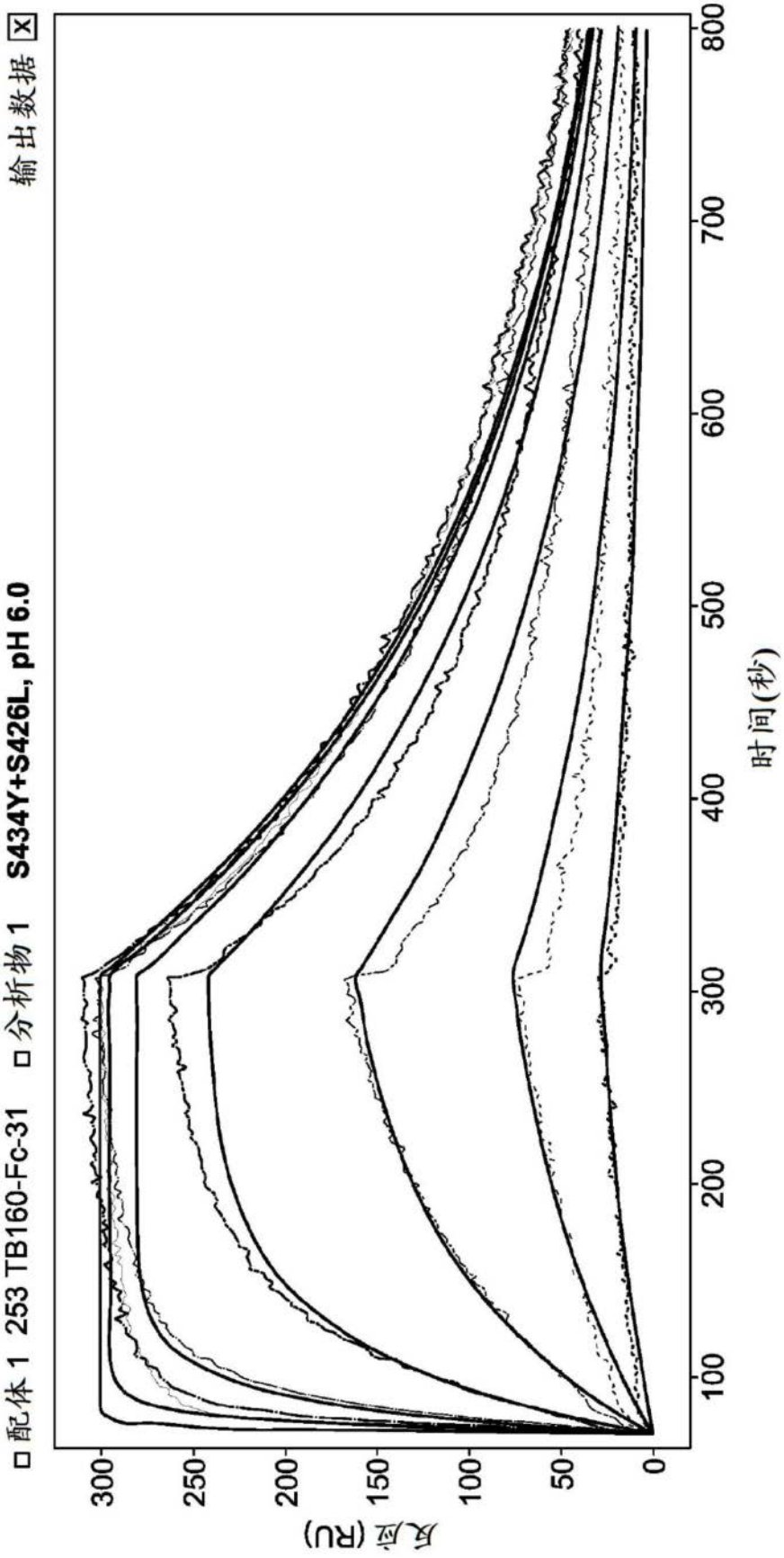

□ 配体 1 253 TB160-Fc-31 □ 分析物 1 S434Y+S426L, pH 6.0
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
0
50
100
150
200
250
300
100
200
300
400
500
600
700
800

图23A

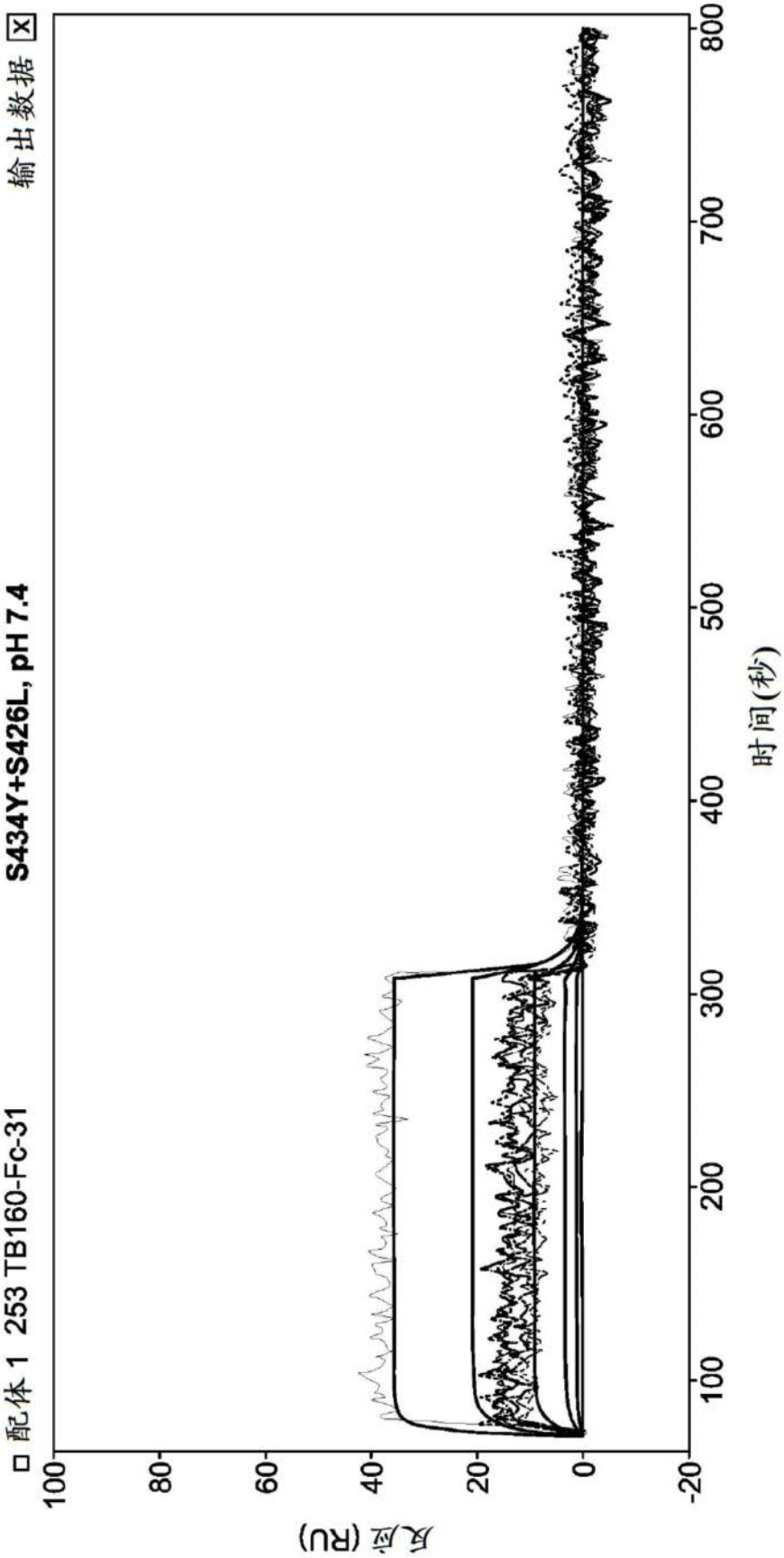

配体 1 253 TB160-Fc-31
S434Y+S426L, pH 7.4
输出数据
反应 (RU)
时间 (秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图23B

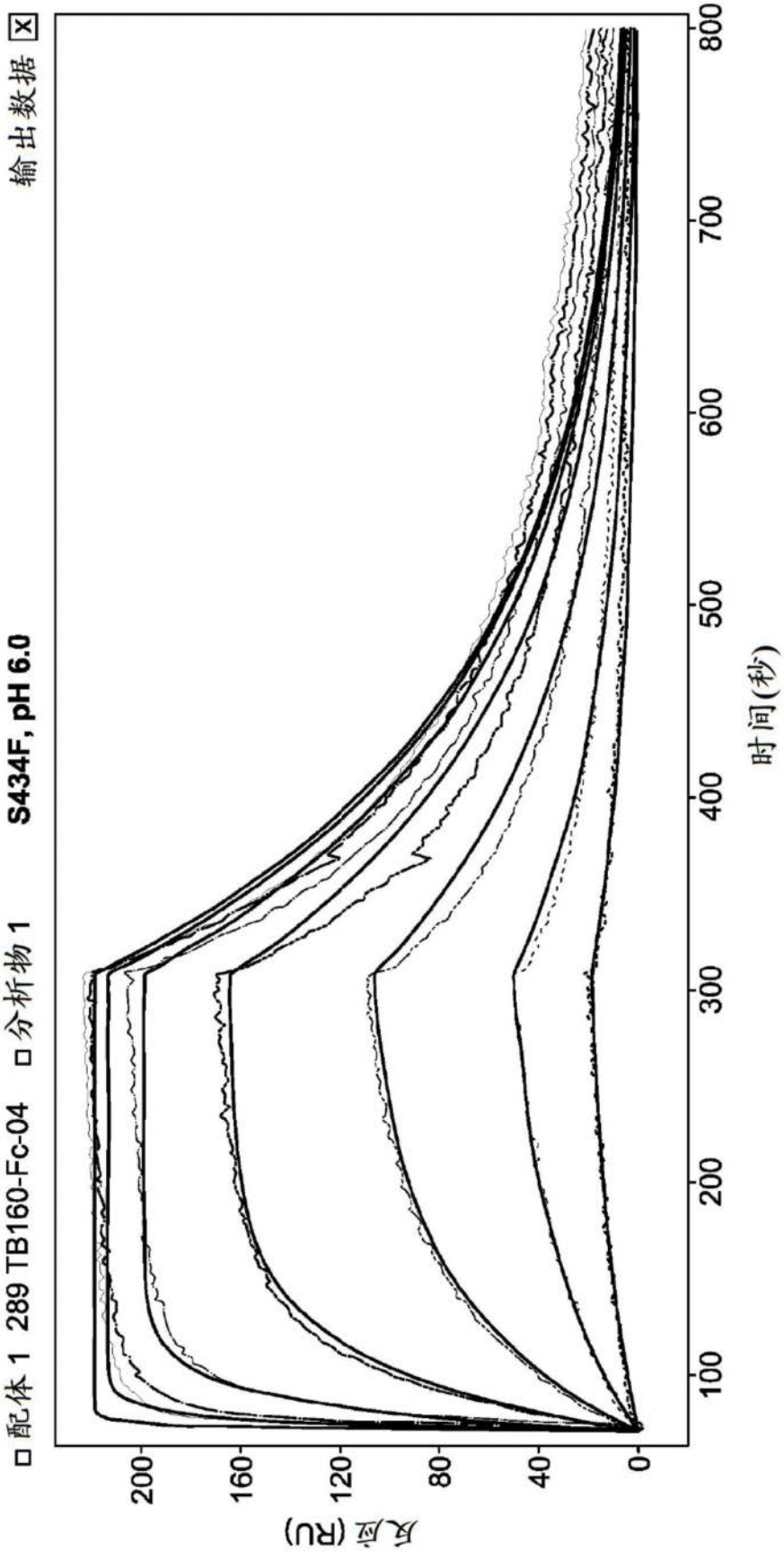

□ 配体 1 289 TB160-Fc-04 □ 分析物 1 S434F, pH 6.0
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
0
40
80
120
160
200
100
200
300
400
500
600
700
800

图24A

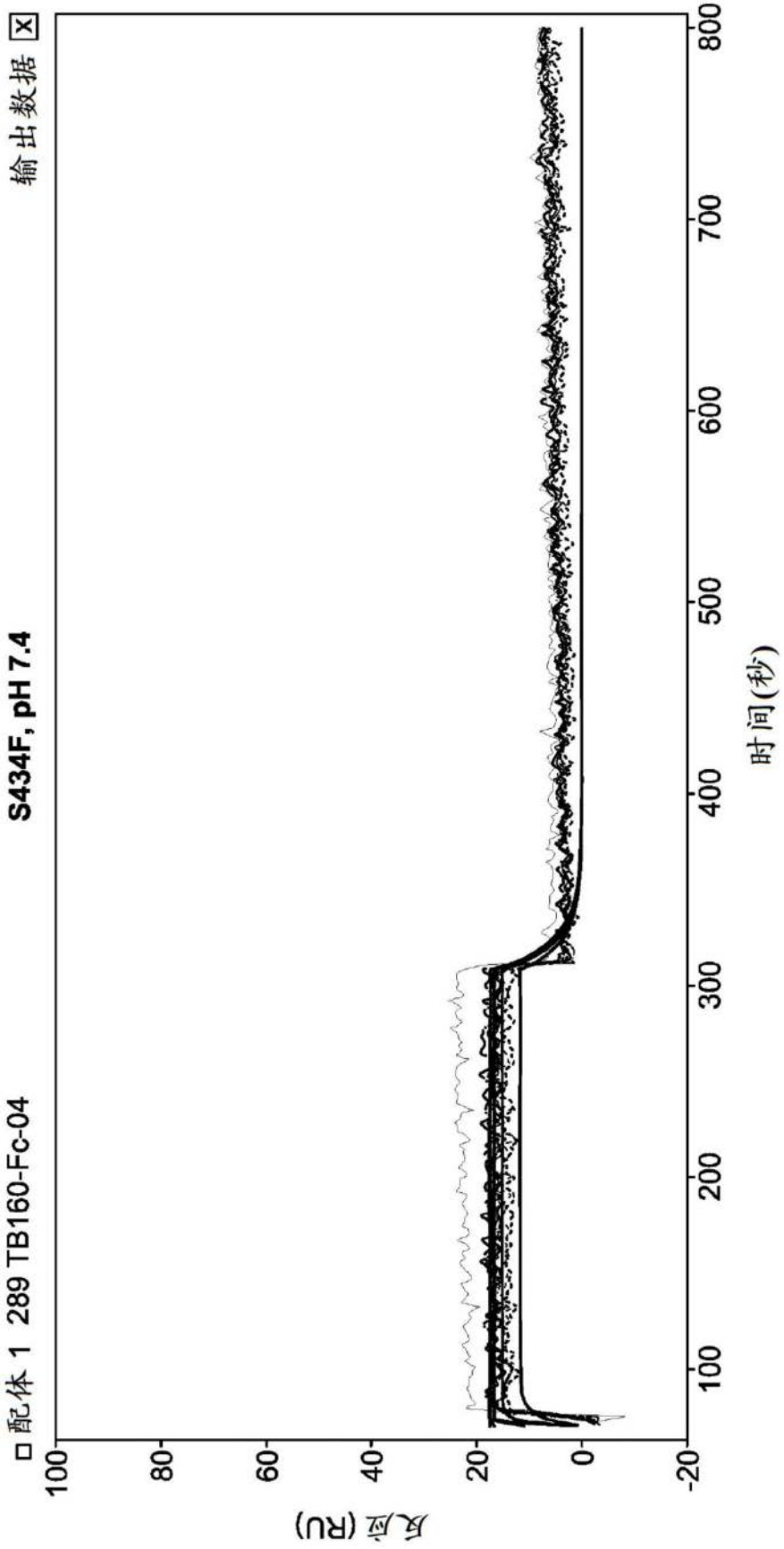

输出数据
S434F, pH 7.4
配体 1 289 TB160-Fc-04
反应 (RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图24B

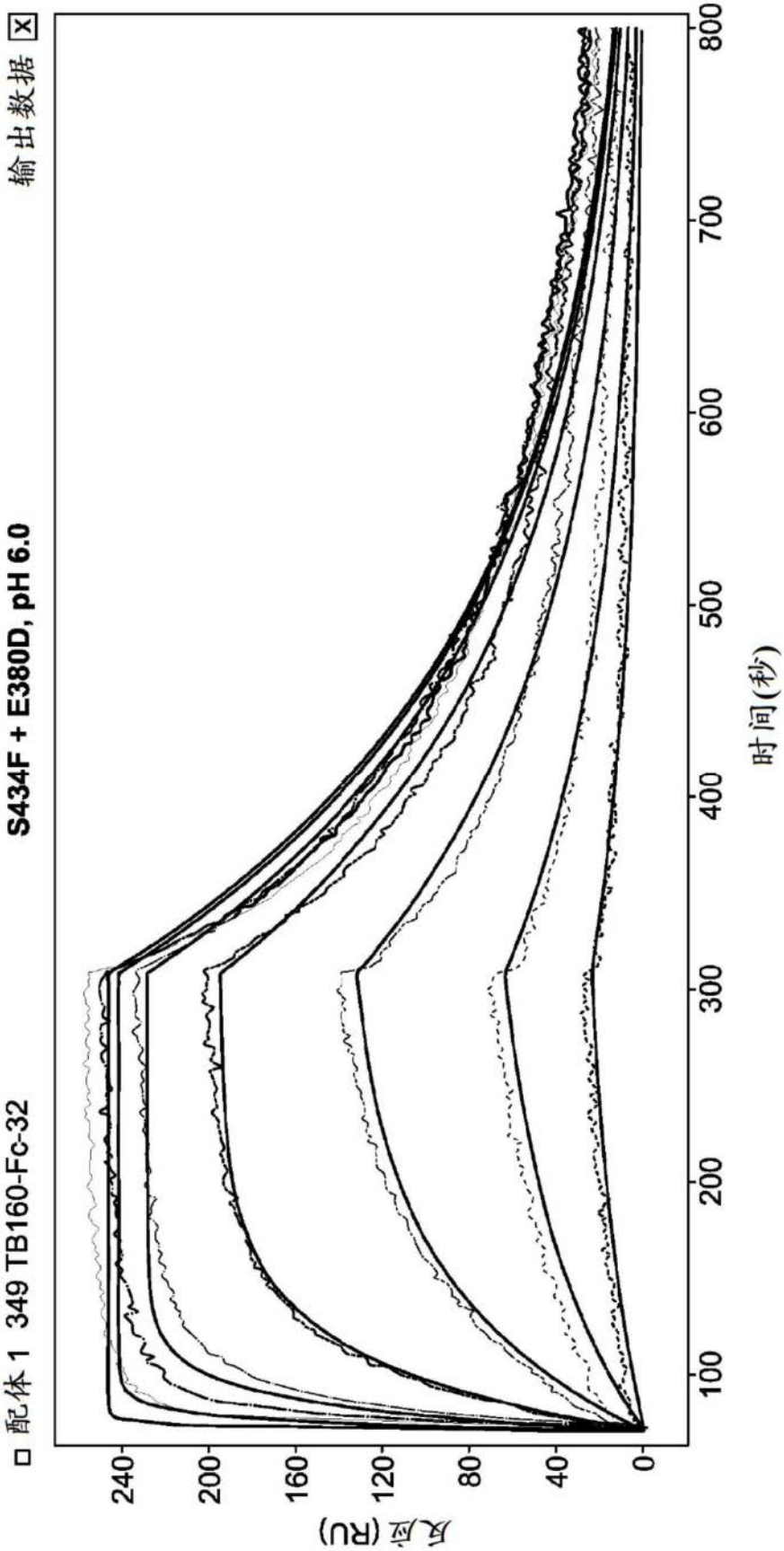

配体 1 349 TB160-Fc-32
S434F + E380D, pH 6.0
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
0
40
80
120
160
200
240
100
200
300
400
500
600
700
800

图25A

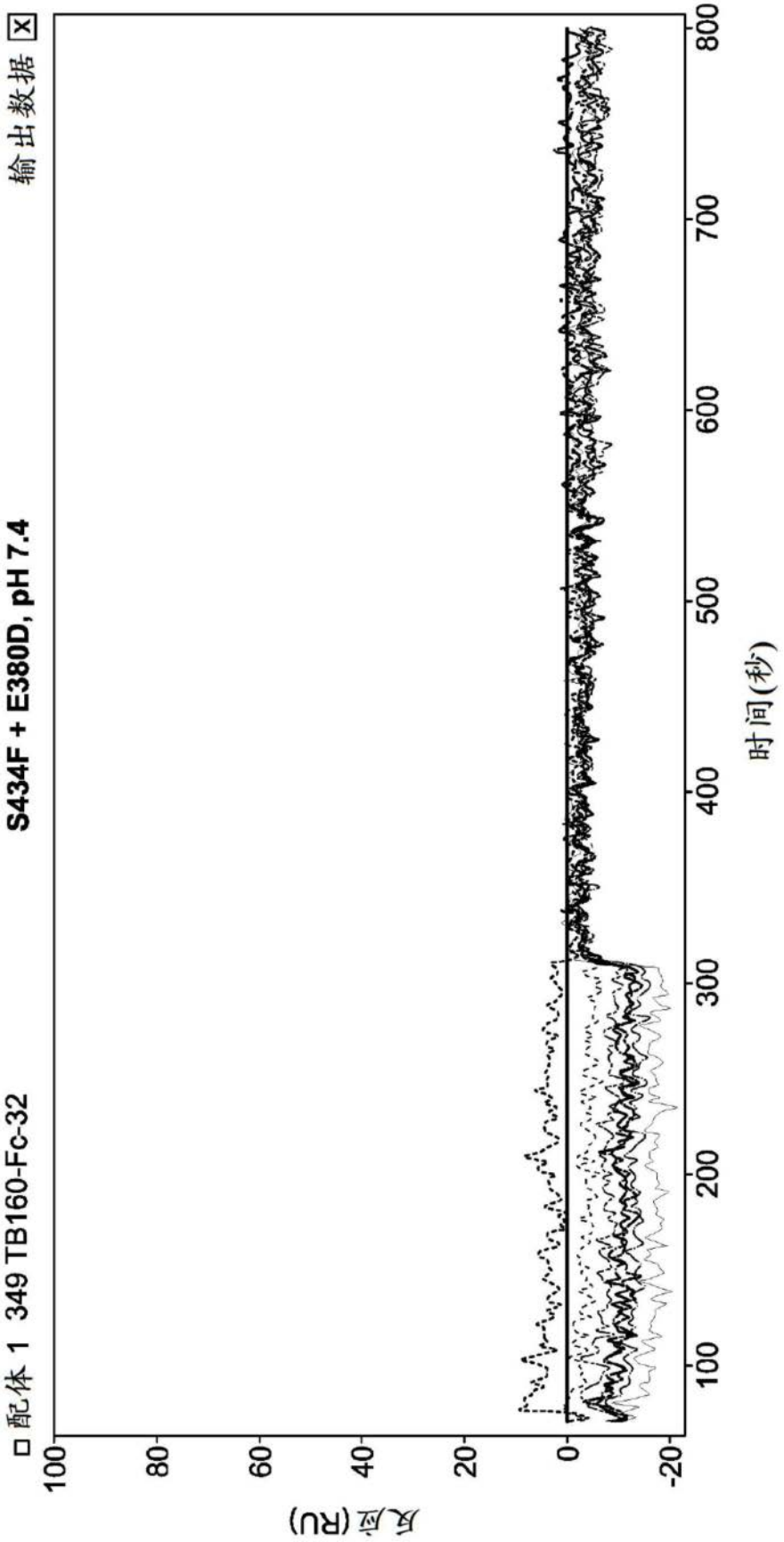

输出数据
S434F + E380D, pH 7.4
配体 1 349 TB160-Fc-32
反应 (RU)
时间 (秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图25B

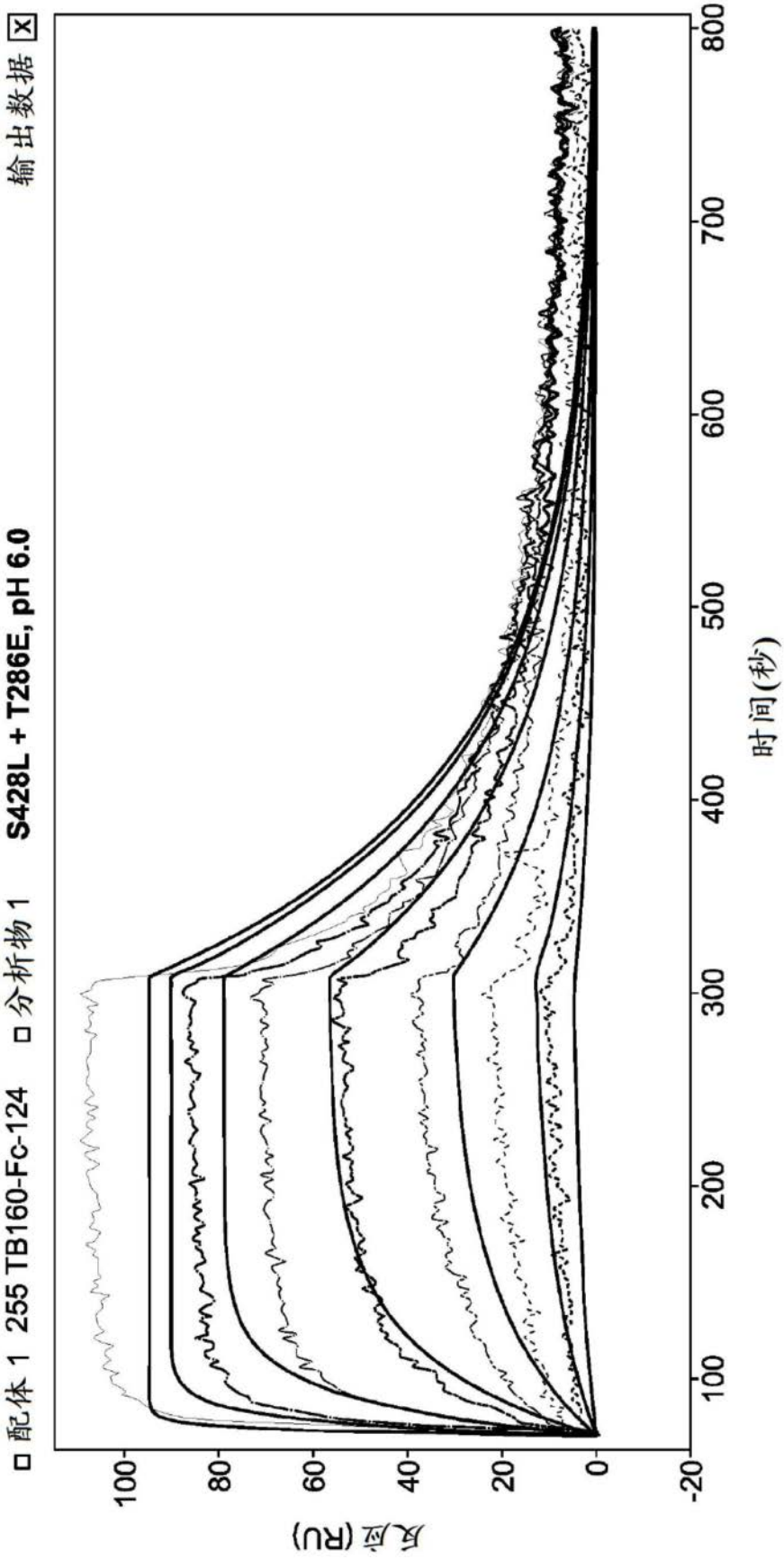

□ 配体 1 255 TB160-Fc-124 □ 分析物 1 S428L + T286E, pH 6.0
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图26A

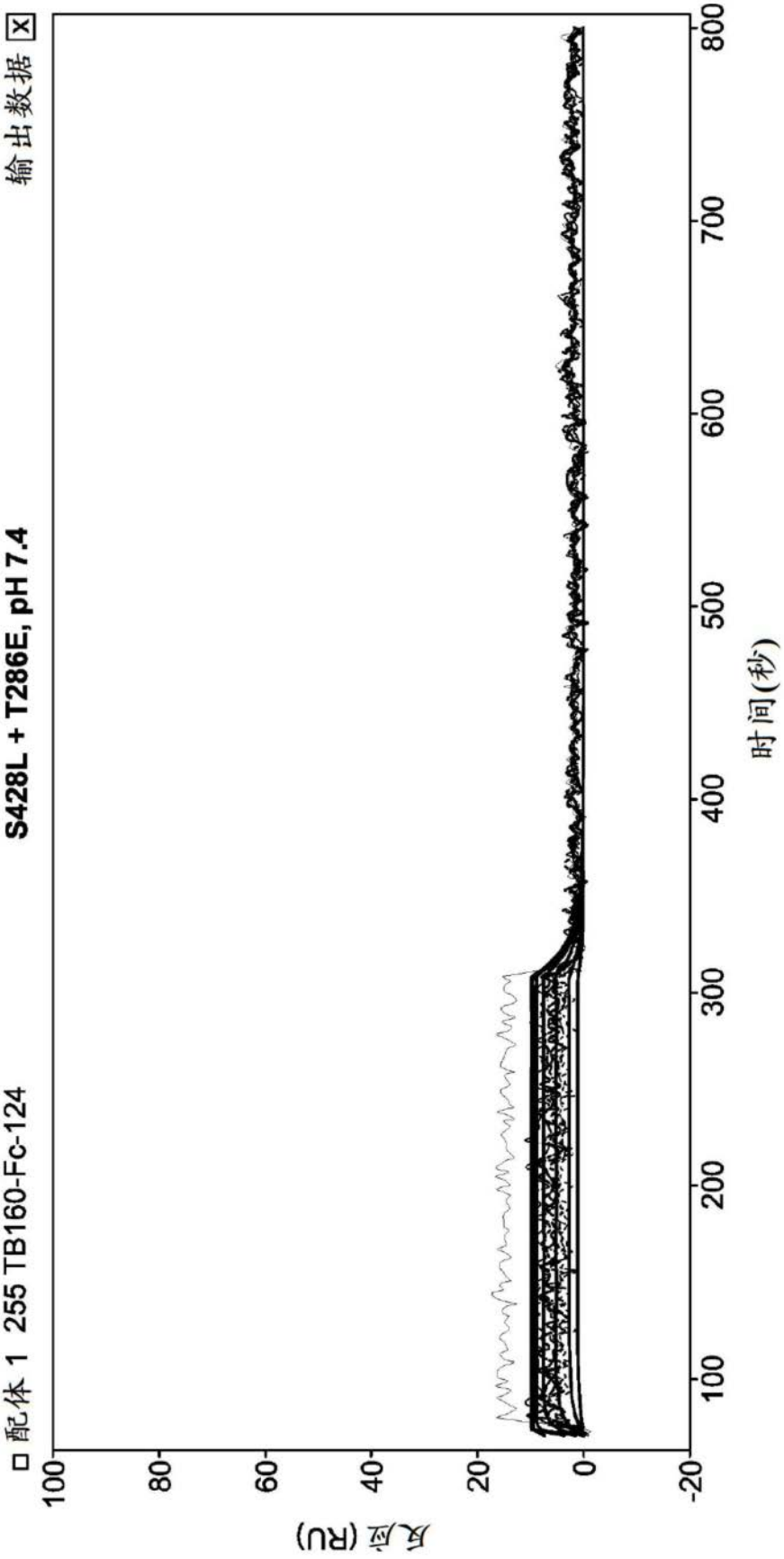

配体 1 255 TB160-Fc-124
S428L + T286E, pH 7.4
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图26B

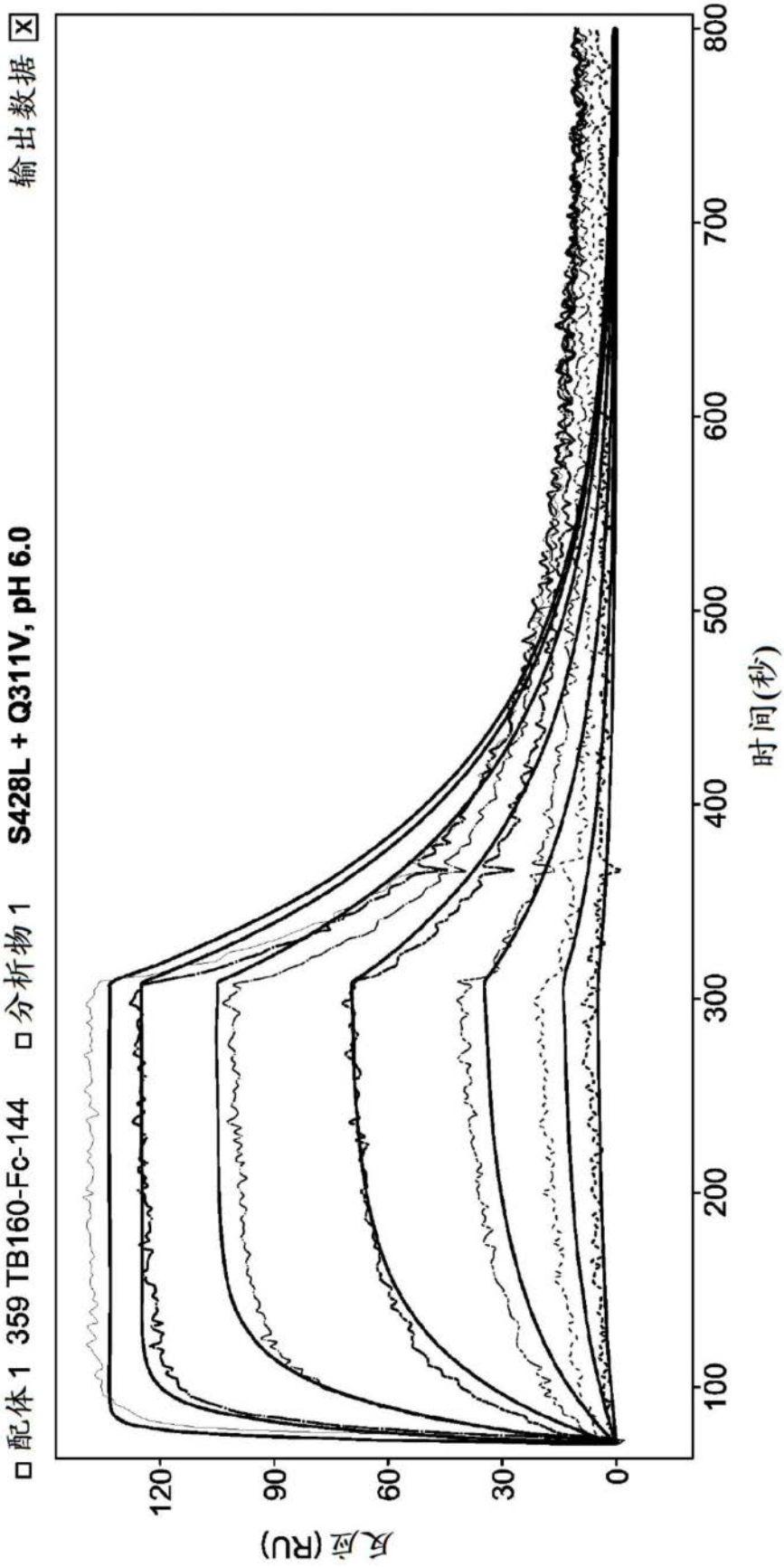

配体 1 359 TB160-Fc-144
分析物 1 S428L + Q311V, pH 6.0
输出数据
反应(RU)
120
90
60
30
0
100
200
300
400
500
600
700
800
时间(秒)

图27A

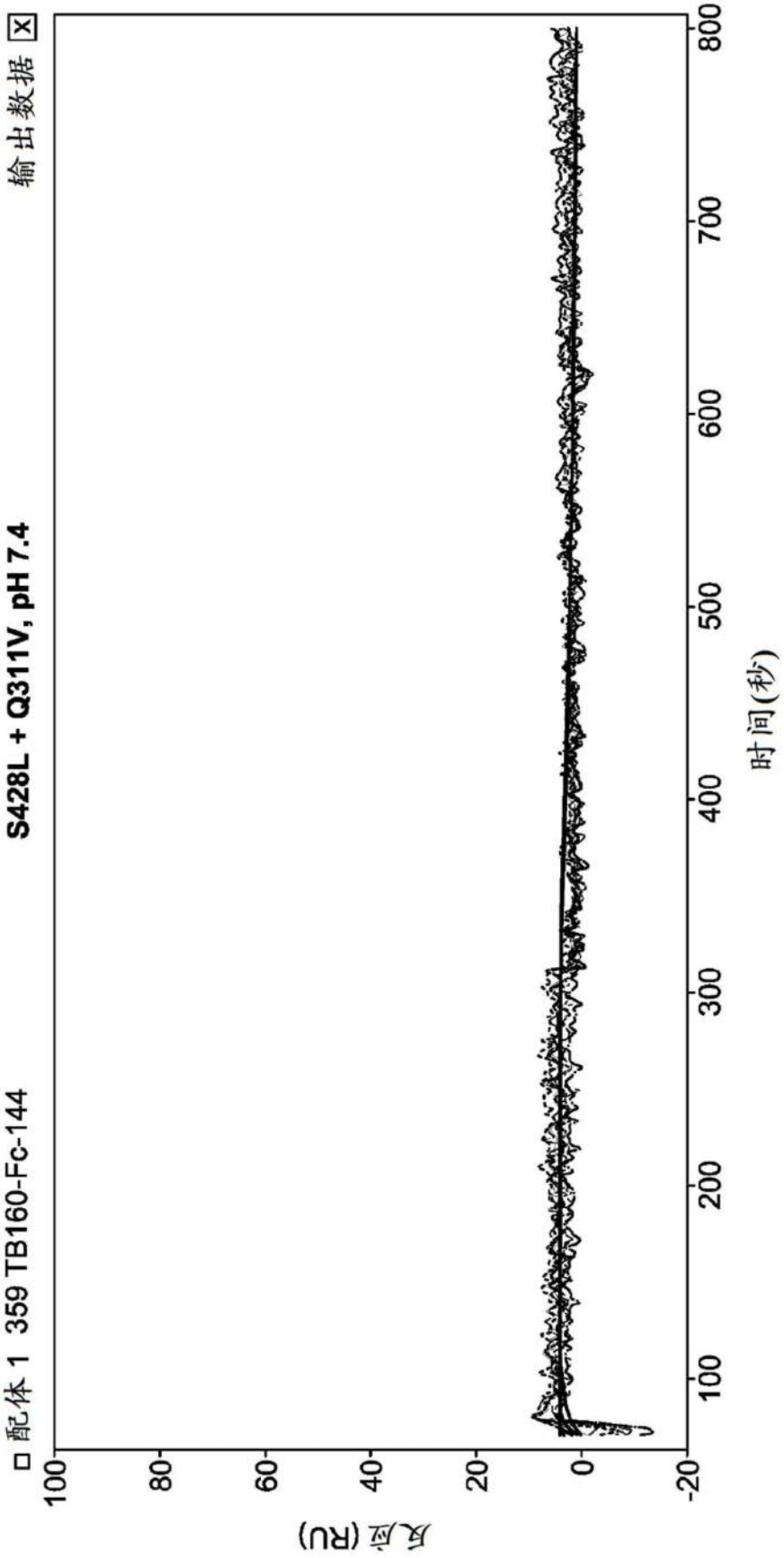

配体 1 359 TB160-Fc-144
S428L + Q311V, pH 7.4
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图27B

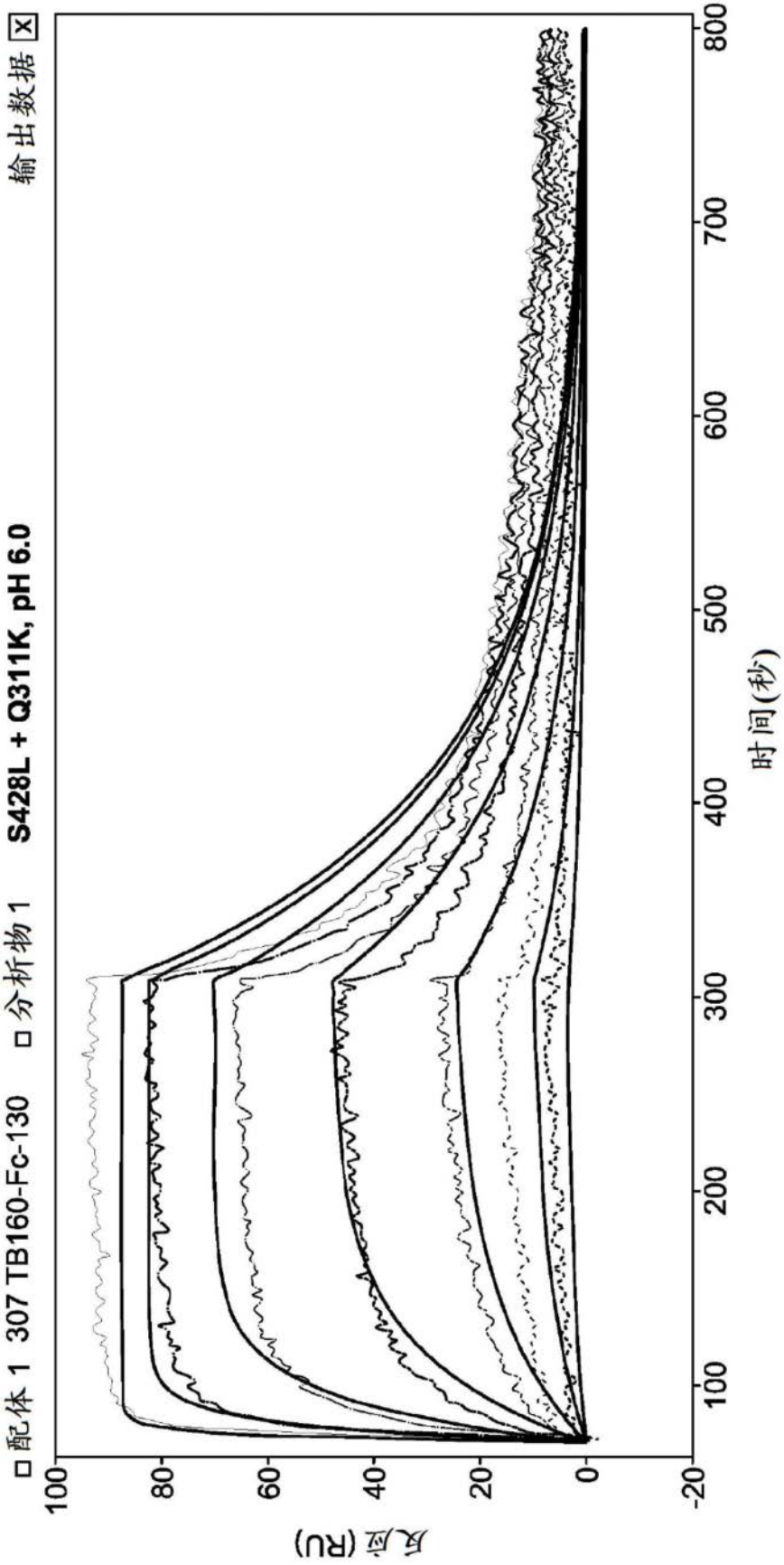

配体 1 307 TB160-Fc-130
分析物 1 S428L + Q311K, pH 6.0
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图28A

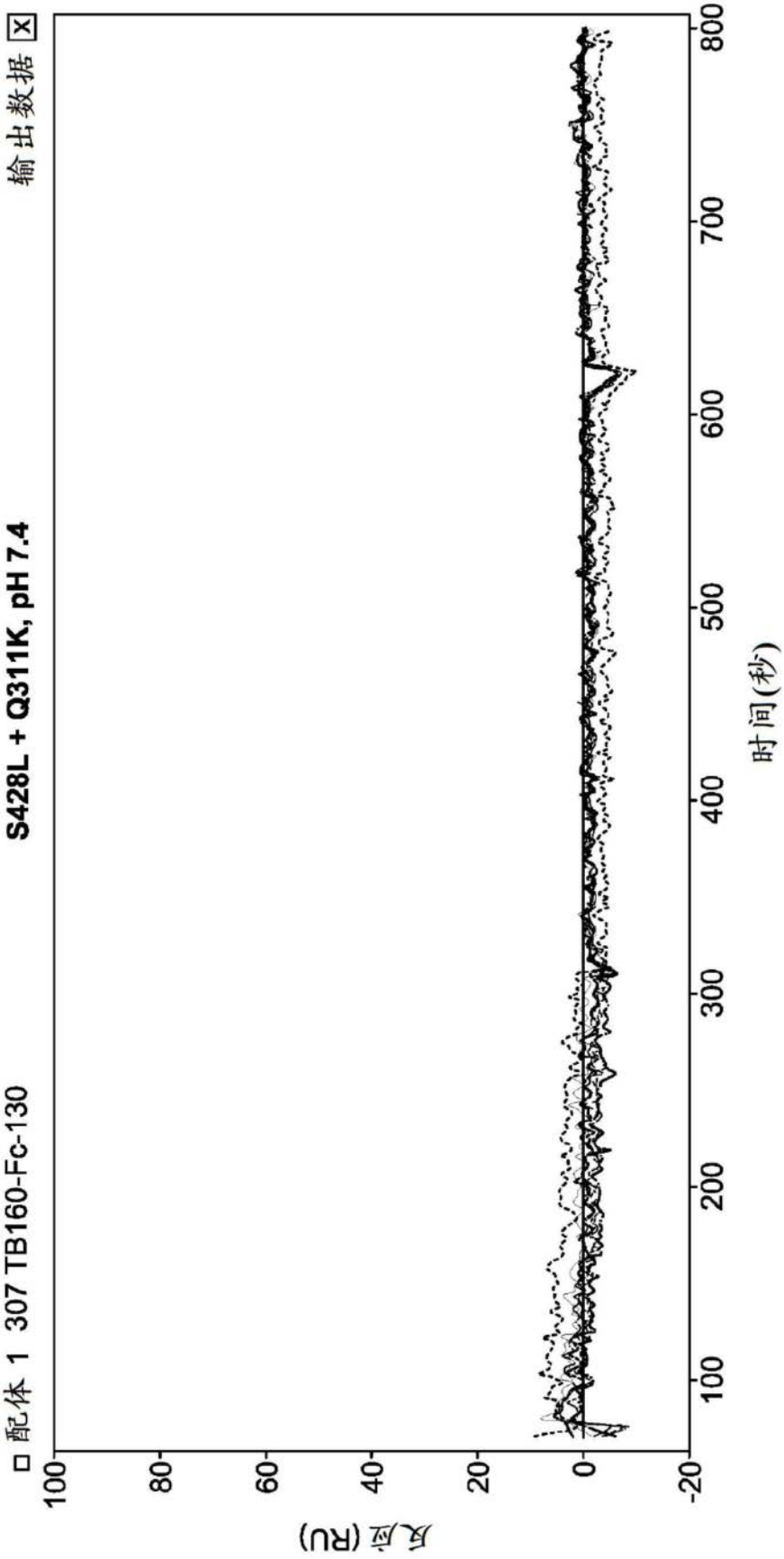

配体 1 307 TB160-Fc-130
S428L + Q311K, pH 7.4
输出数据
反应 (RU)
时间 (秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图28B

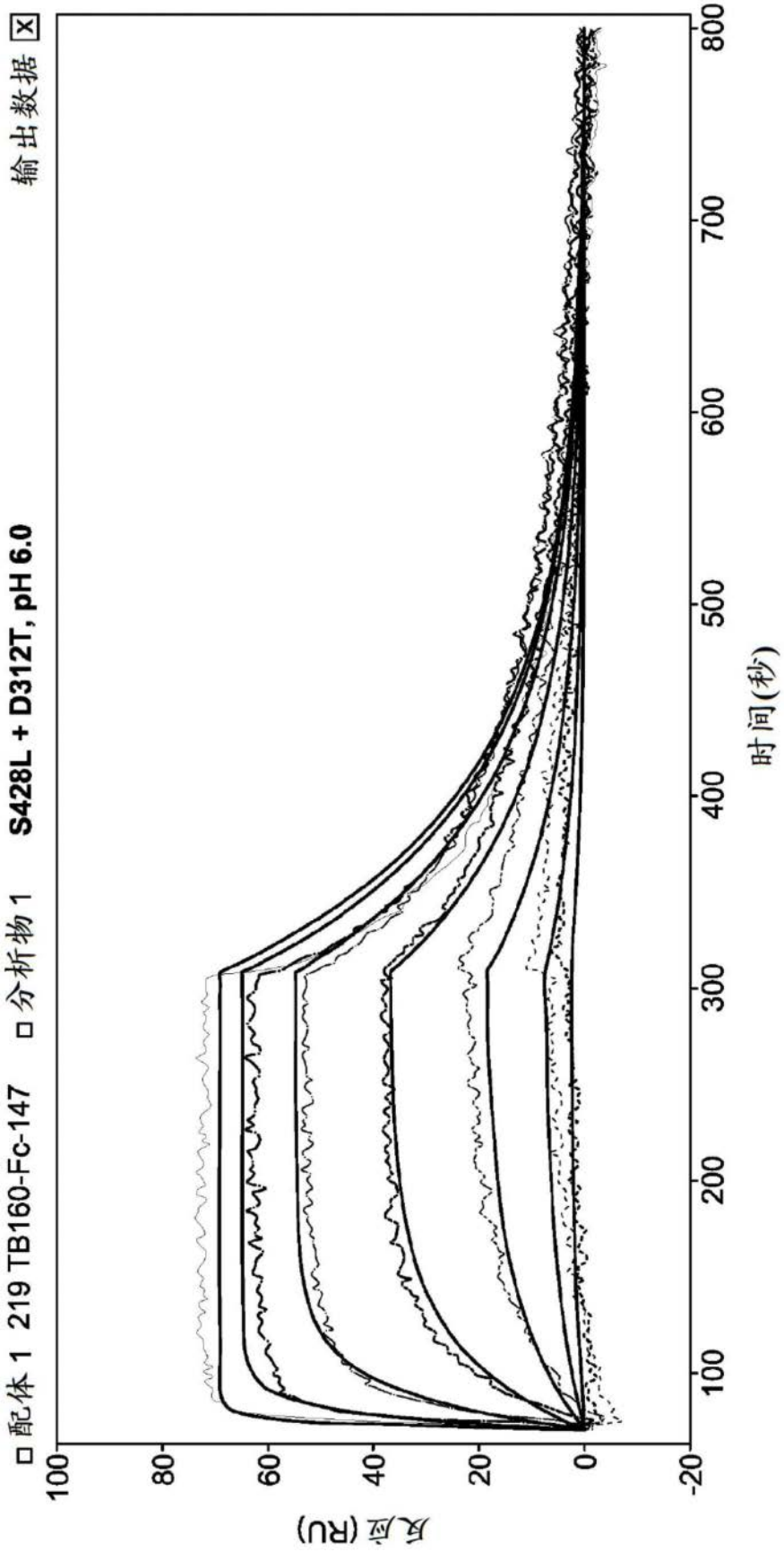

配体 1 219 TB160-Fc-147
分析物 1
S428L + D312T, pH 6.0
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图29A

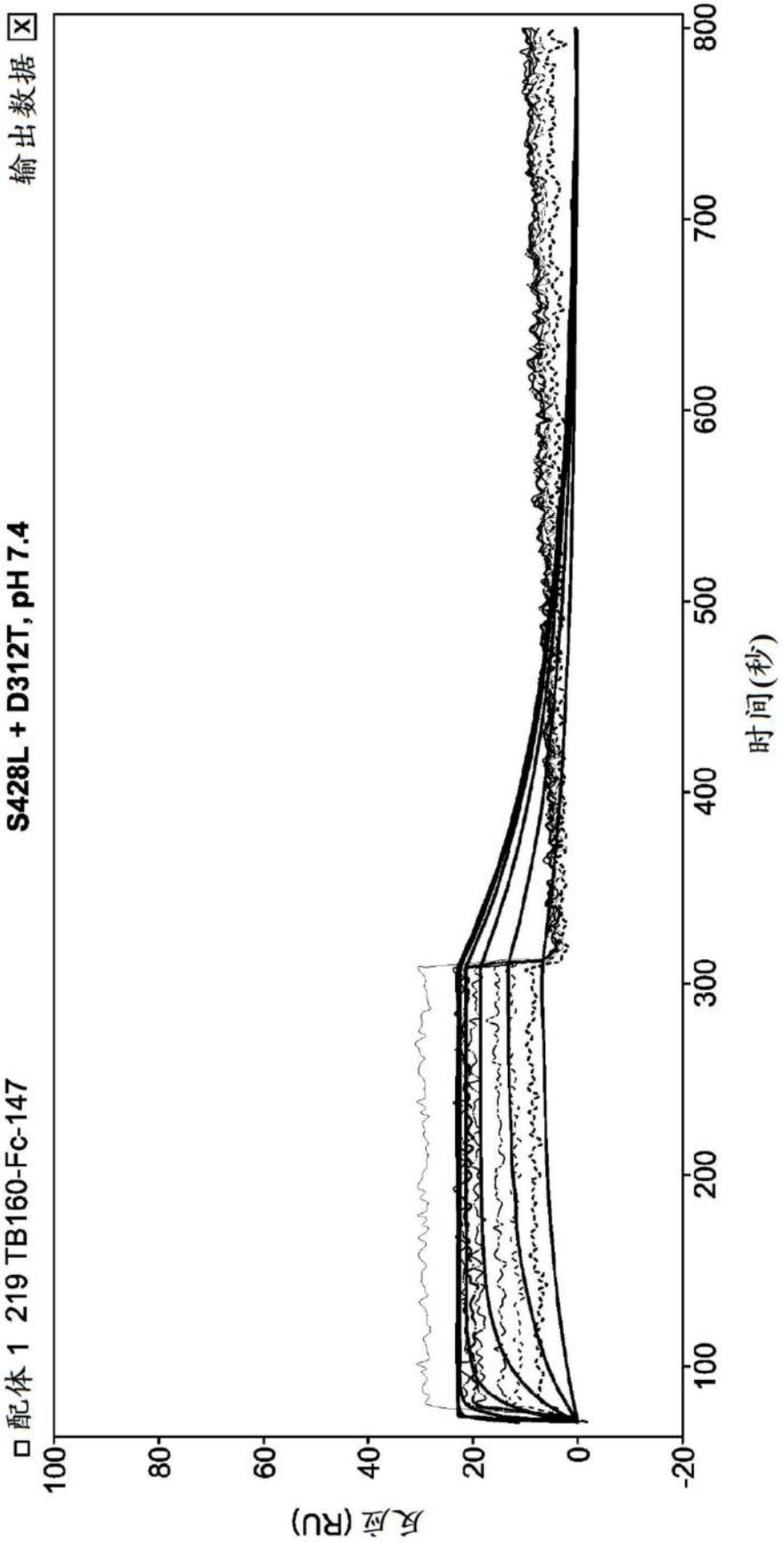

配体 1 219 TB160-Fc-147
S428L + D312T, pH 7.4
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图29B

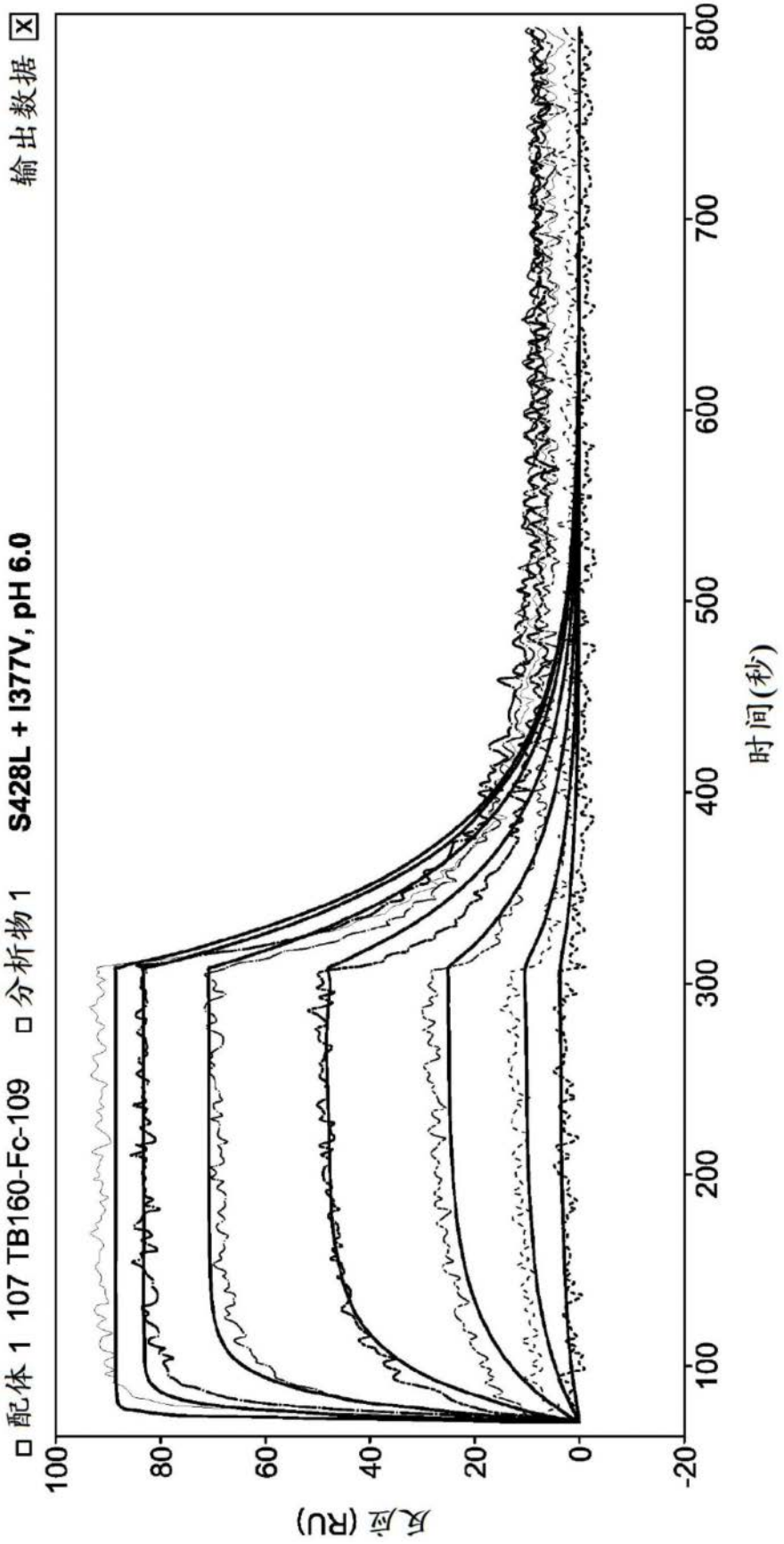

□ 配体 1 107 TB160-Fc-109 □ 分析物 1 S428L + I377V, pH 6.0
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图30A

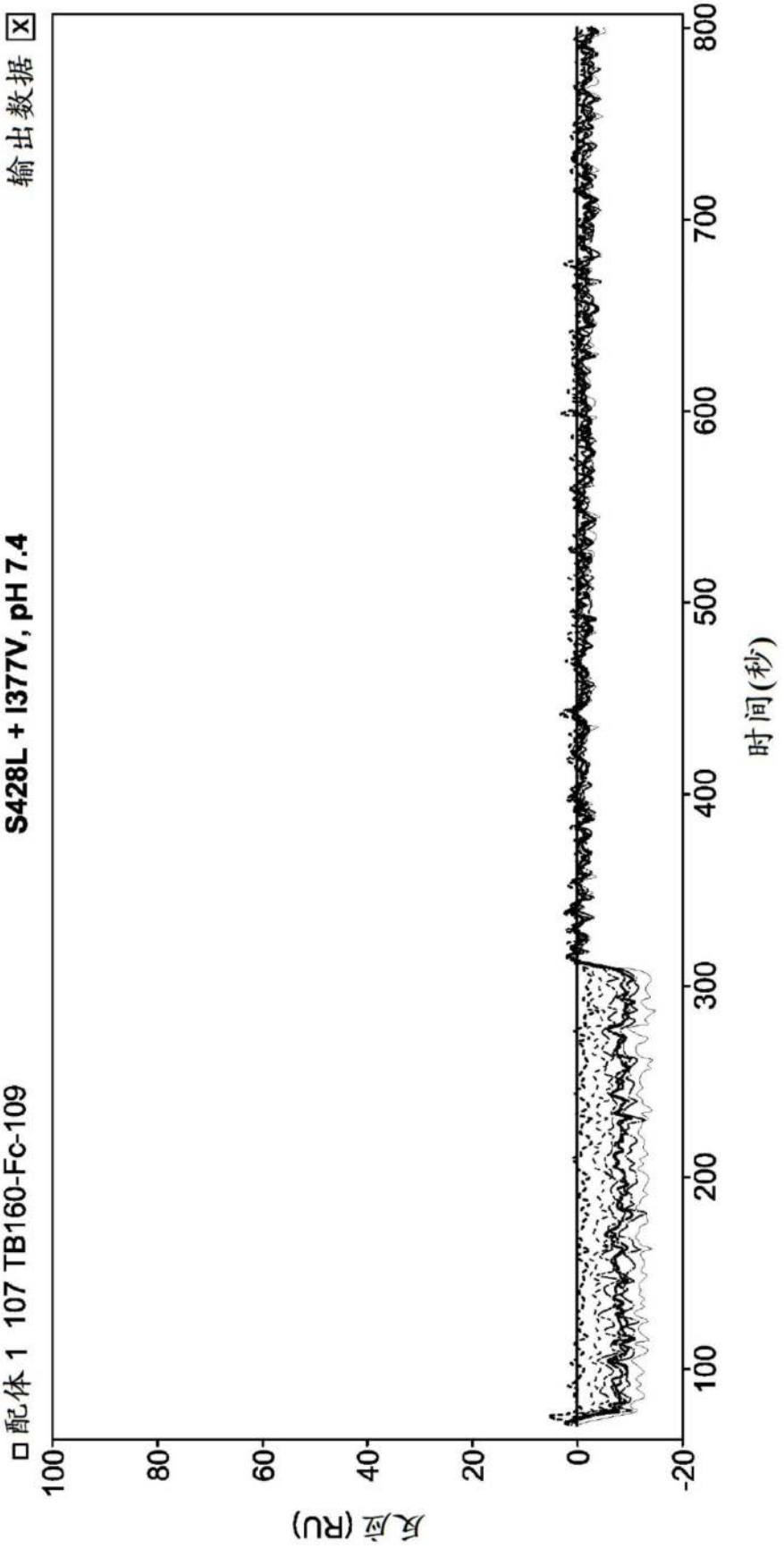

配体 1 107 TB160-Fc-109
S428L + I377V, pH 7.4
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图30B

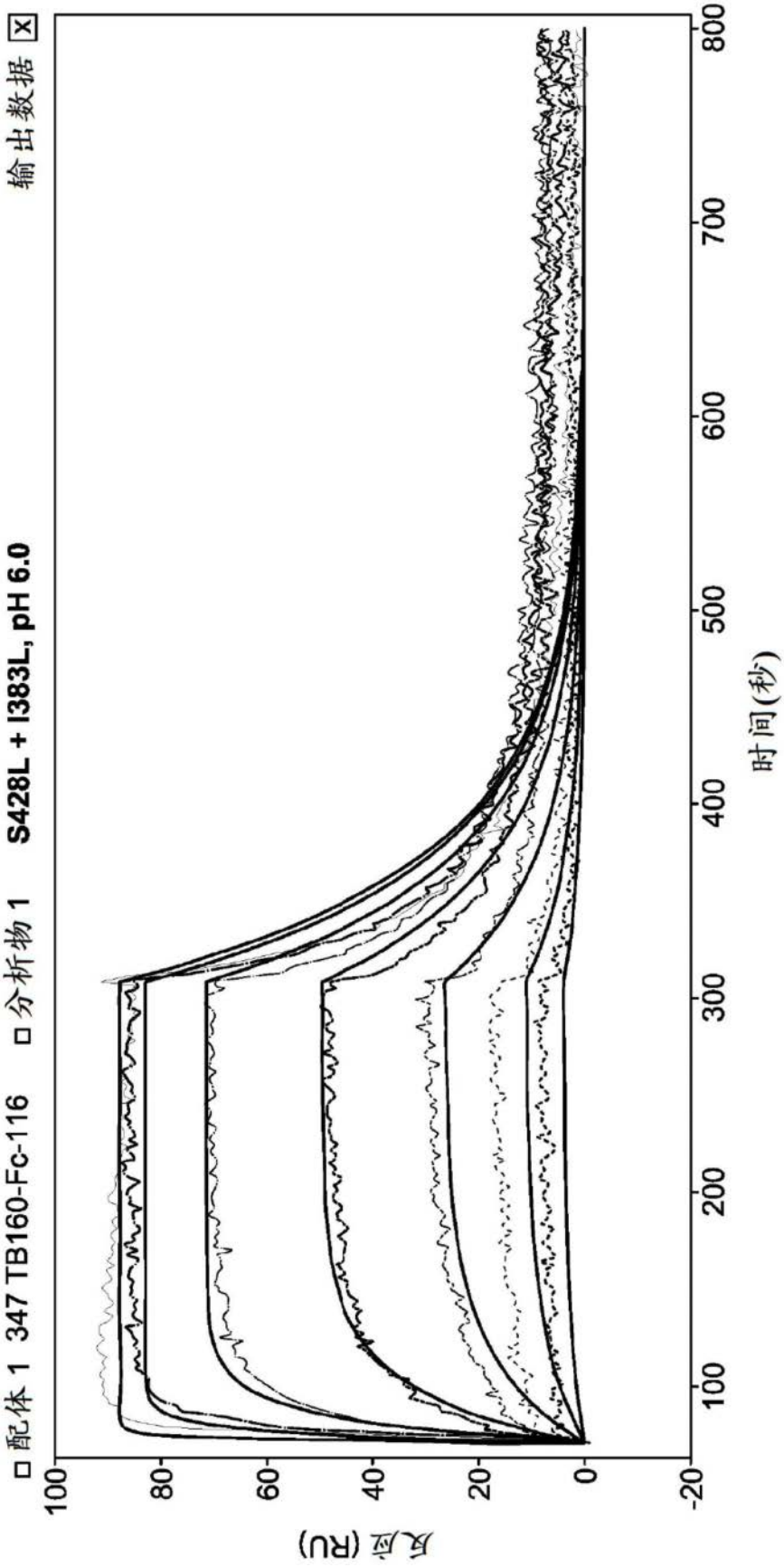

□ 配体 1 347 TB160-Fc-116 □ 分析物 1 S428L + I383L, pH 6.0
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图31A

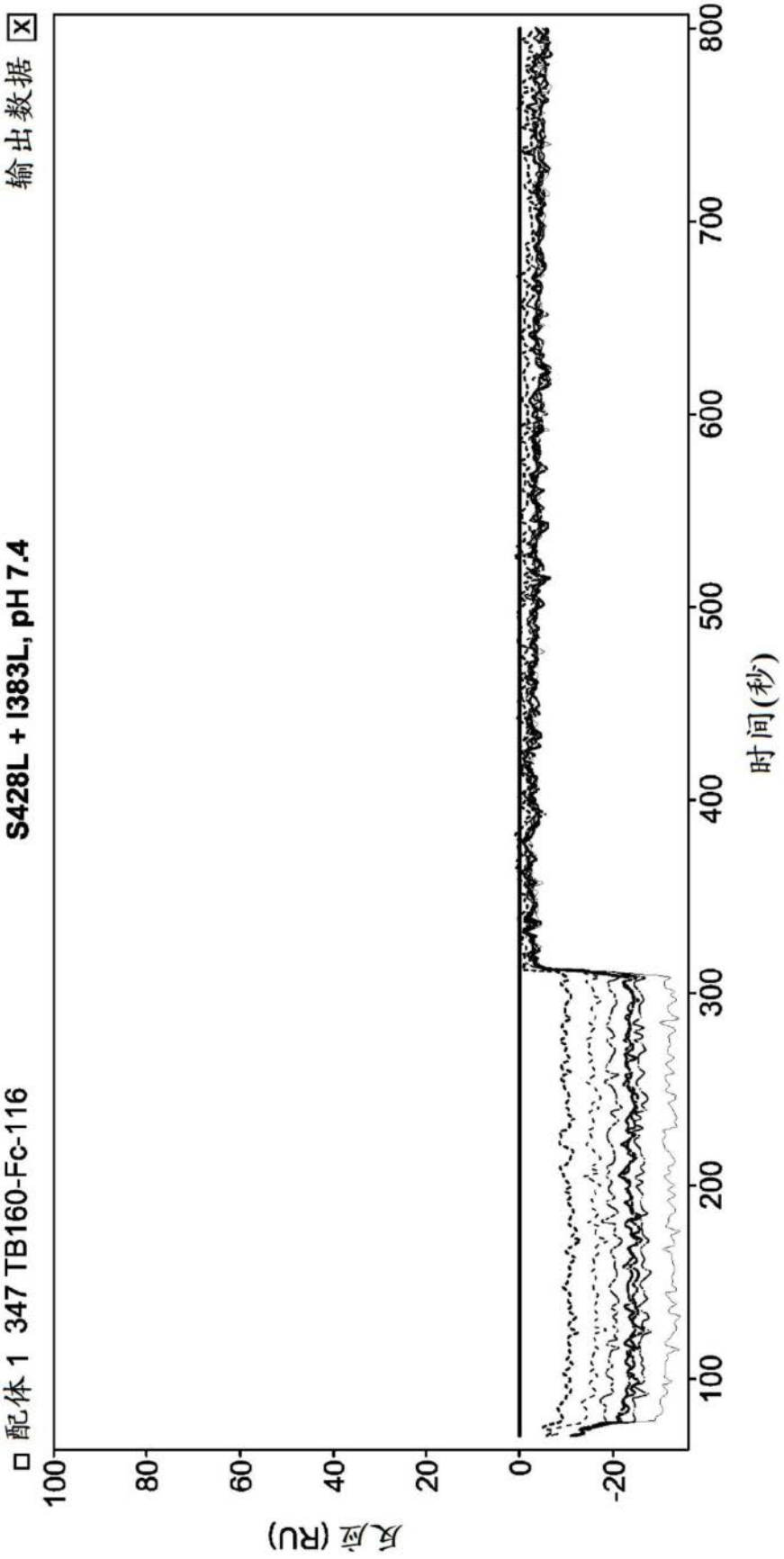

配体 1 347 TB160-Fc-116
S428L + I383L, pH 7.4
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图31B

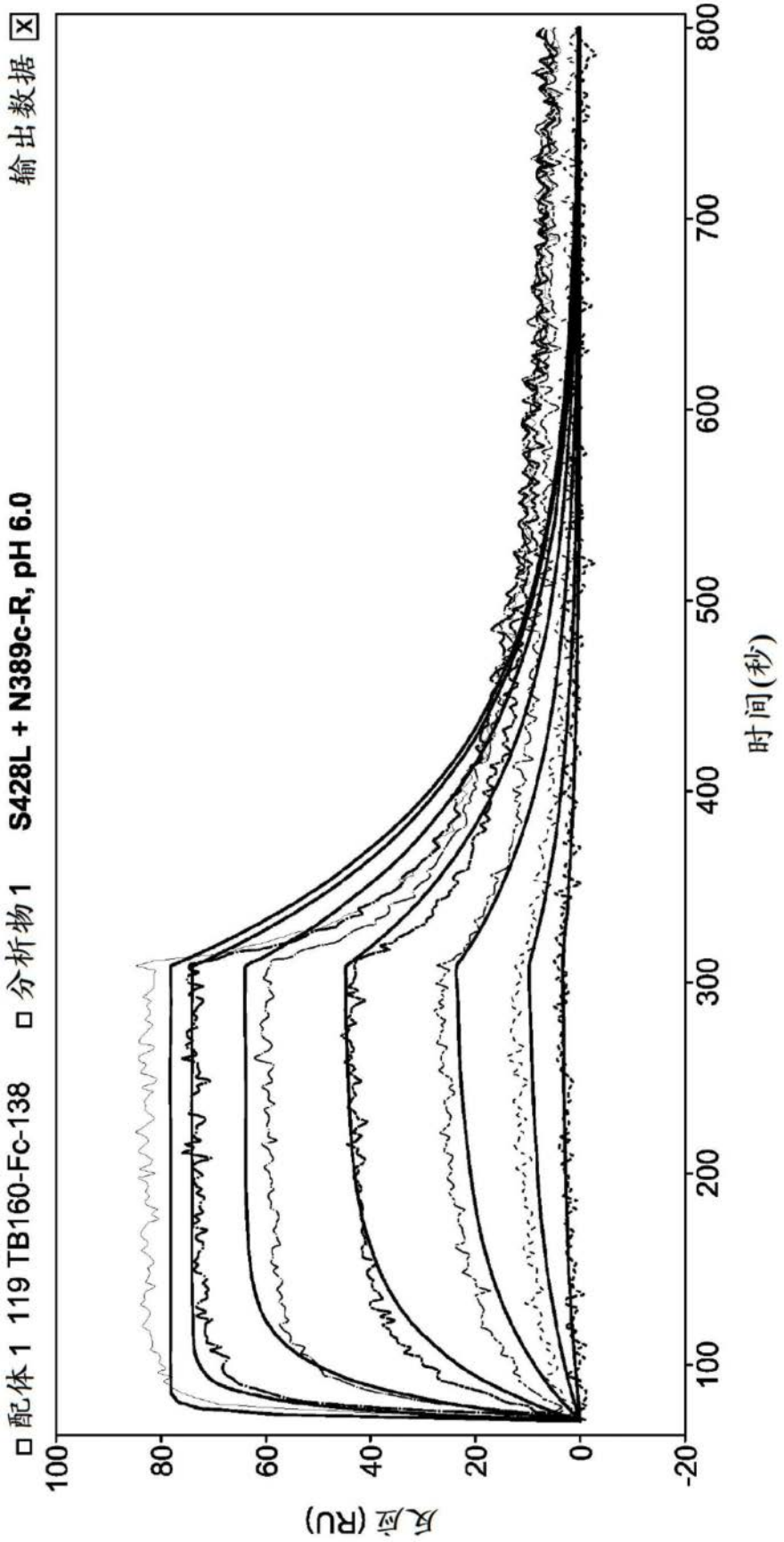

□ 配体 1 119 TB160-Fc-138 □ 分析物 1 S428L + N389c-R, pH 6.0
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图32A

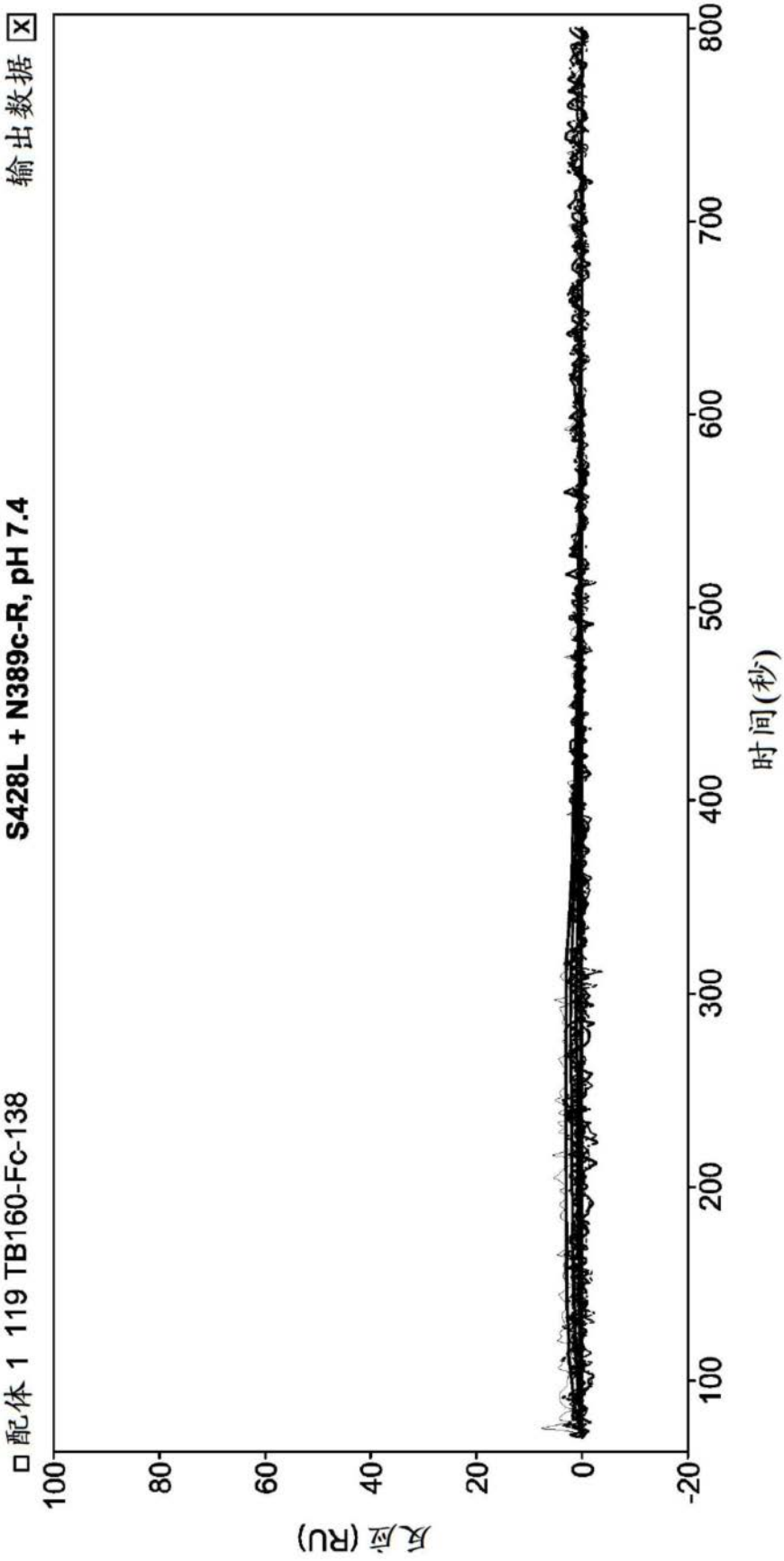

配体 1 119 TB160-Fc-138
S428L + N389c-R, pH 7.4
输出数据
反应 (RU)
时间 (秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图32B

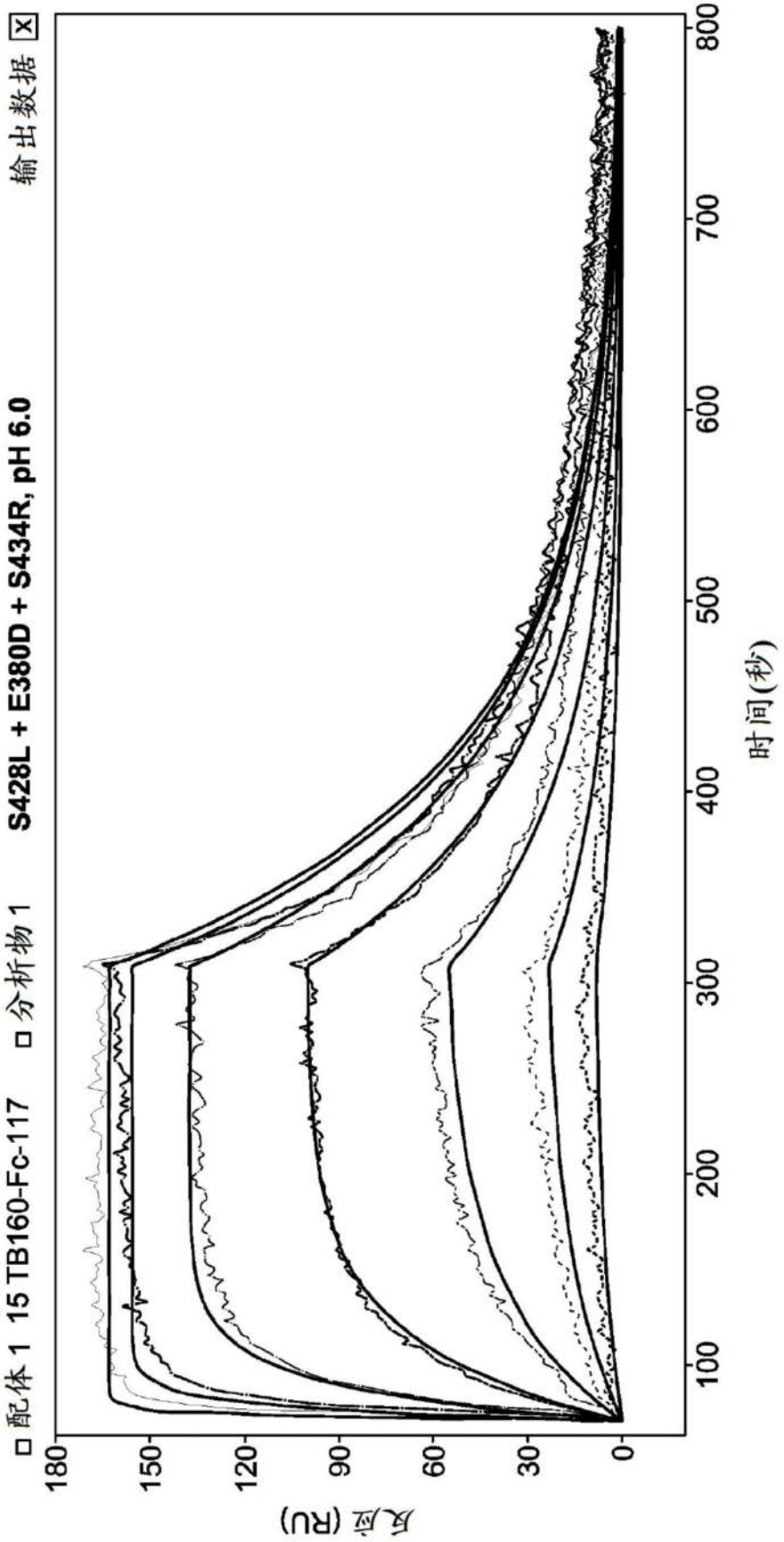

配体 1 15 TB160-Fc-117
分析物 1
S428L + E380D + S434R, pH 6.0
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
180
150
120
90
60
30
0
100
200
300
400
500
600
700
800

图33A

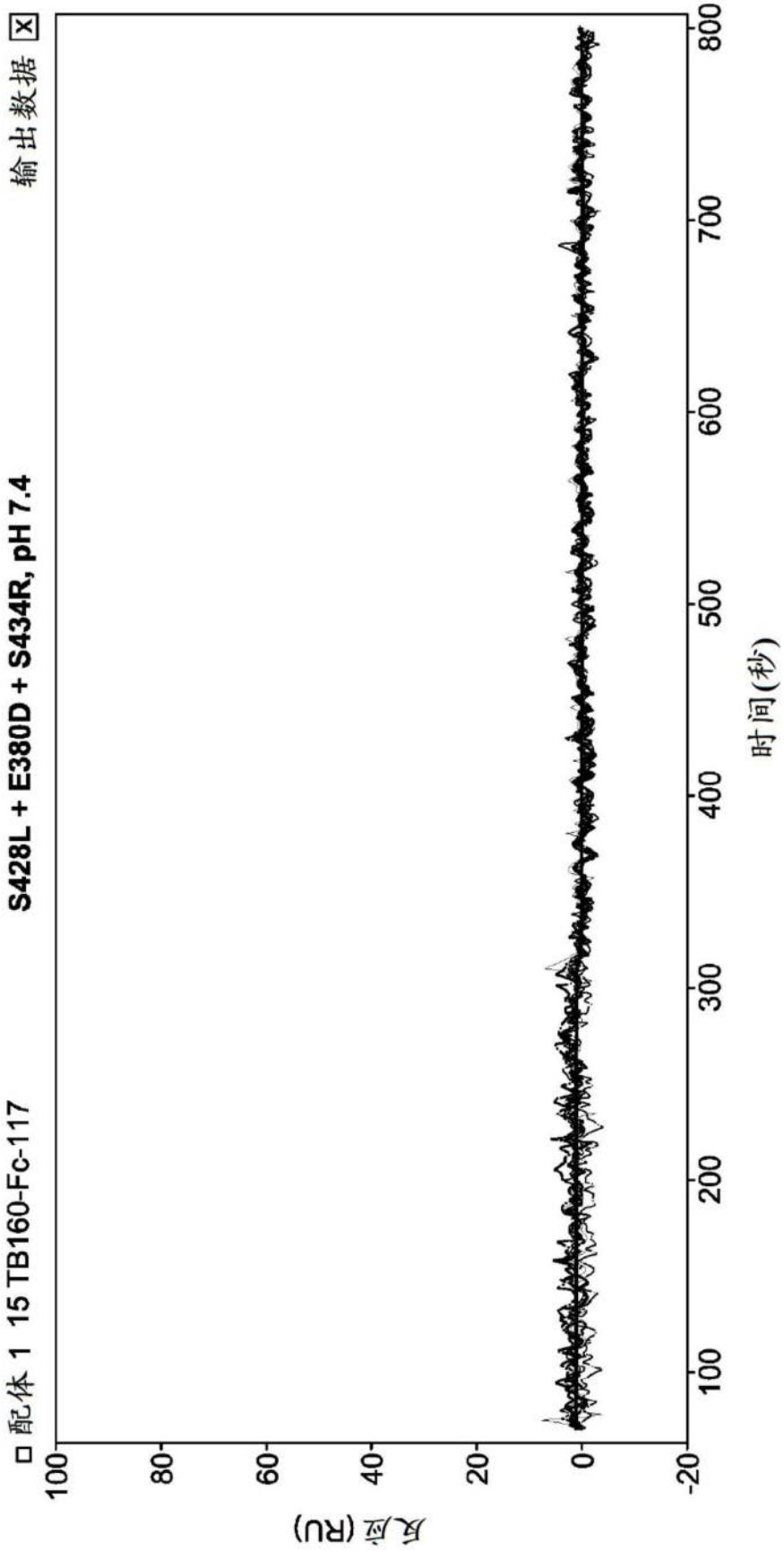

配体 1 15 TB160-Fc-117
S428L + E380D + S434R, pH 7.4
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图33B

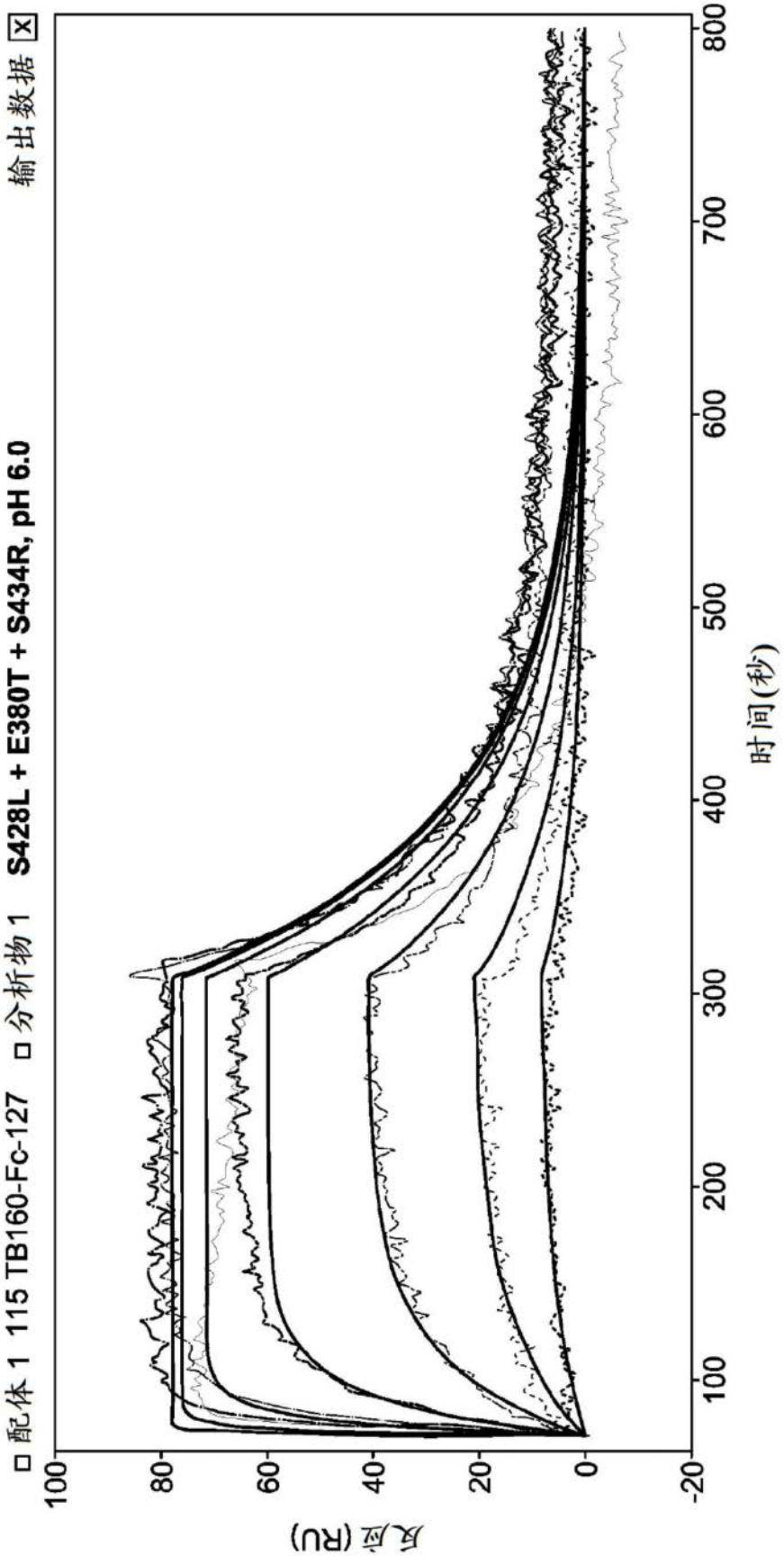

配体 1 115 TB160-Fc-127
分析物 1 S428L + E380T + S434R, pH 6.0
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图34A

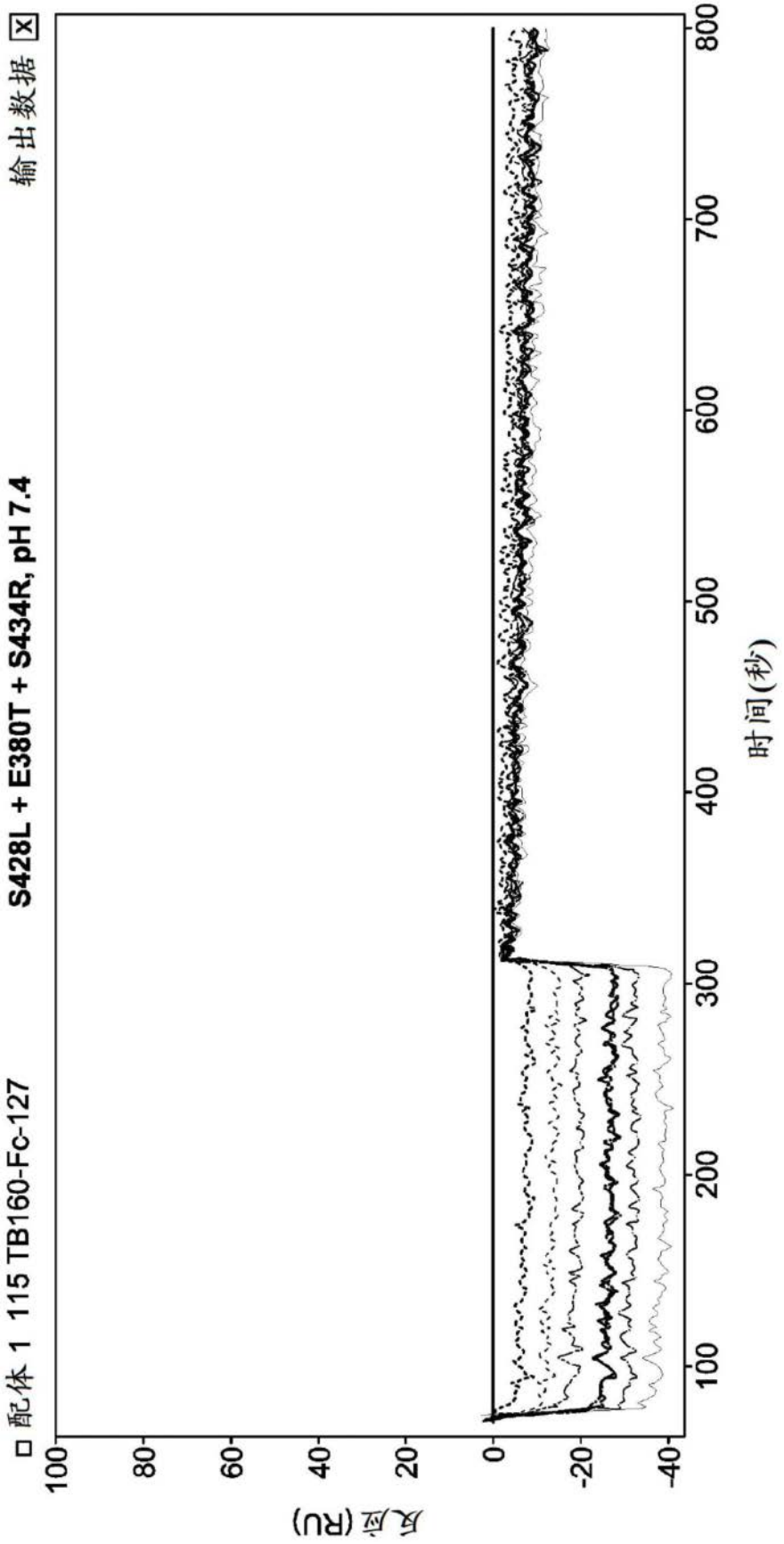

配体 1 115 TB160-Fc-127
S428L + E380T + S434R, pH 7.4
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
-40
100
200
300
400
500
600
700
800

图34B

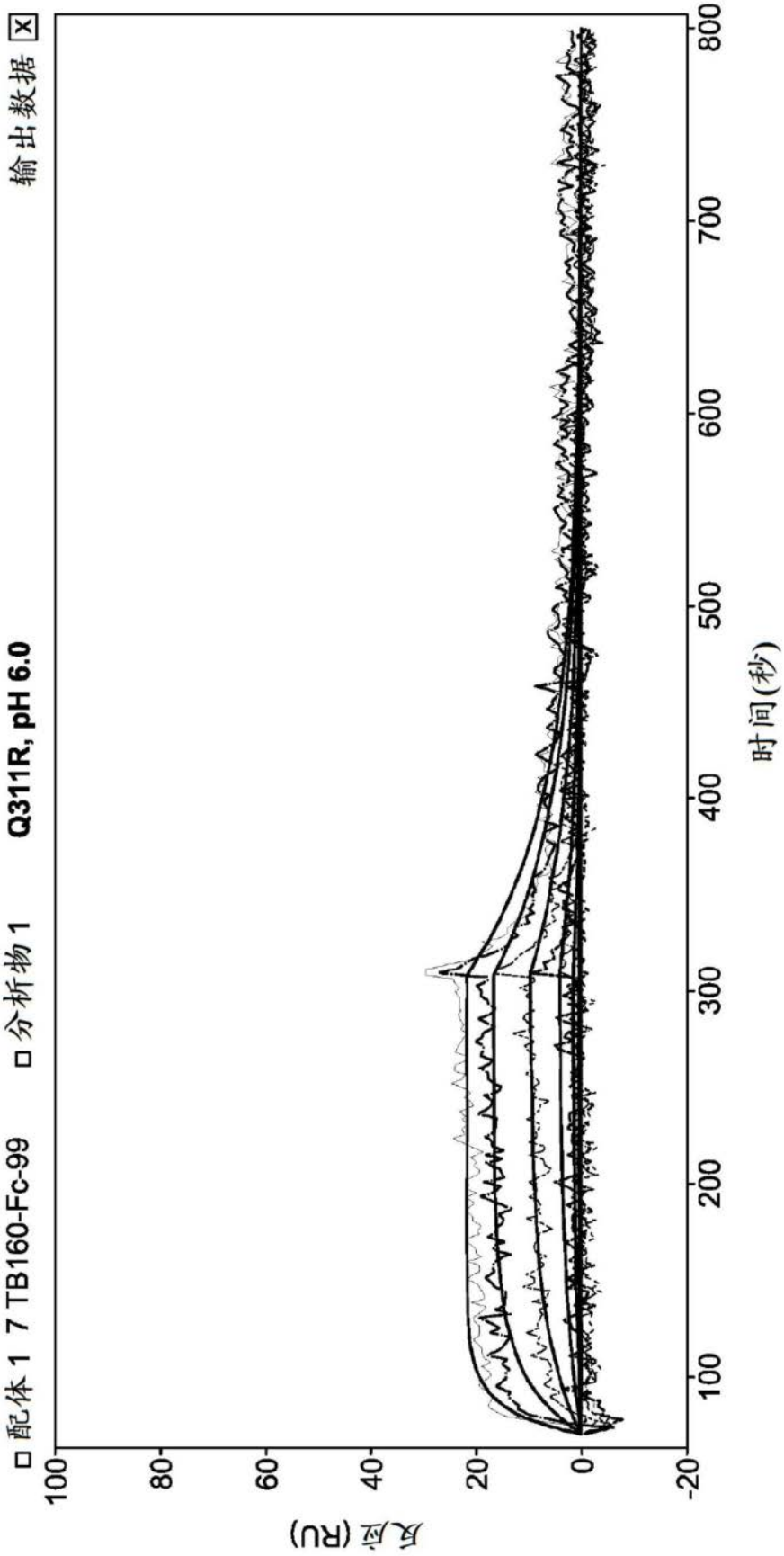

配体 1 7 TB160-Fc-99
分析物 1 Q311R, pH 6.0
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图35A

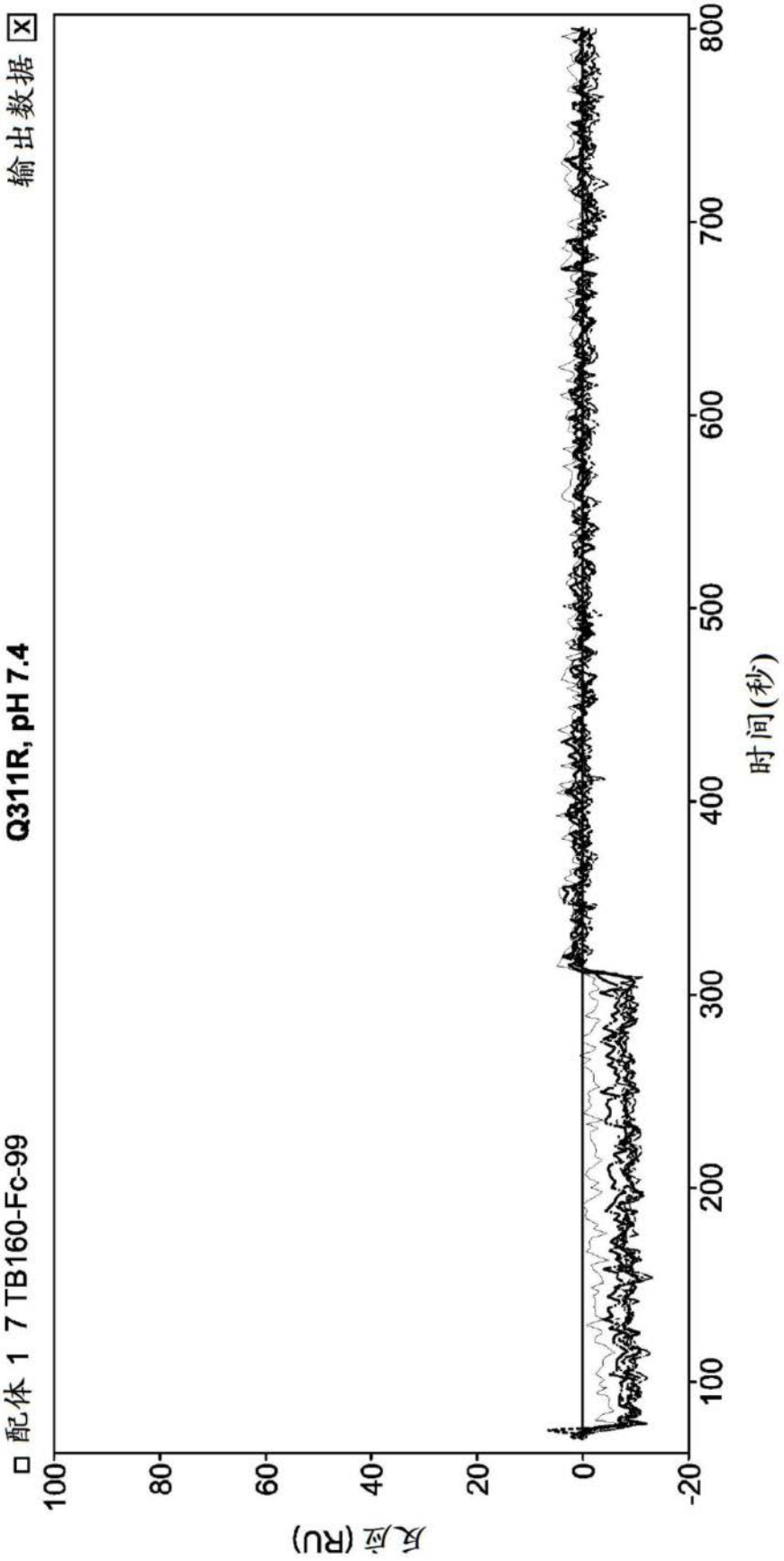

配体 1 7 TB160-Fc-99
Q311R, pH 7.4
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图35B

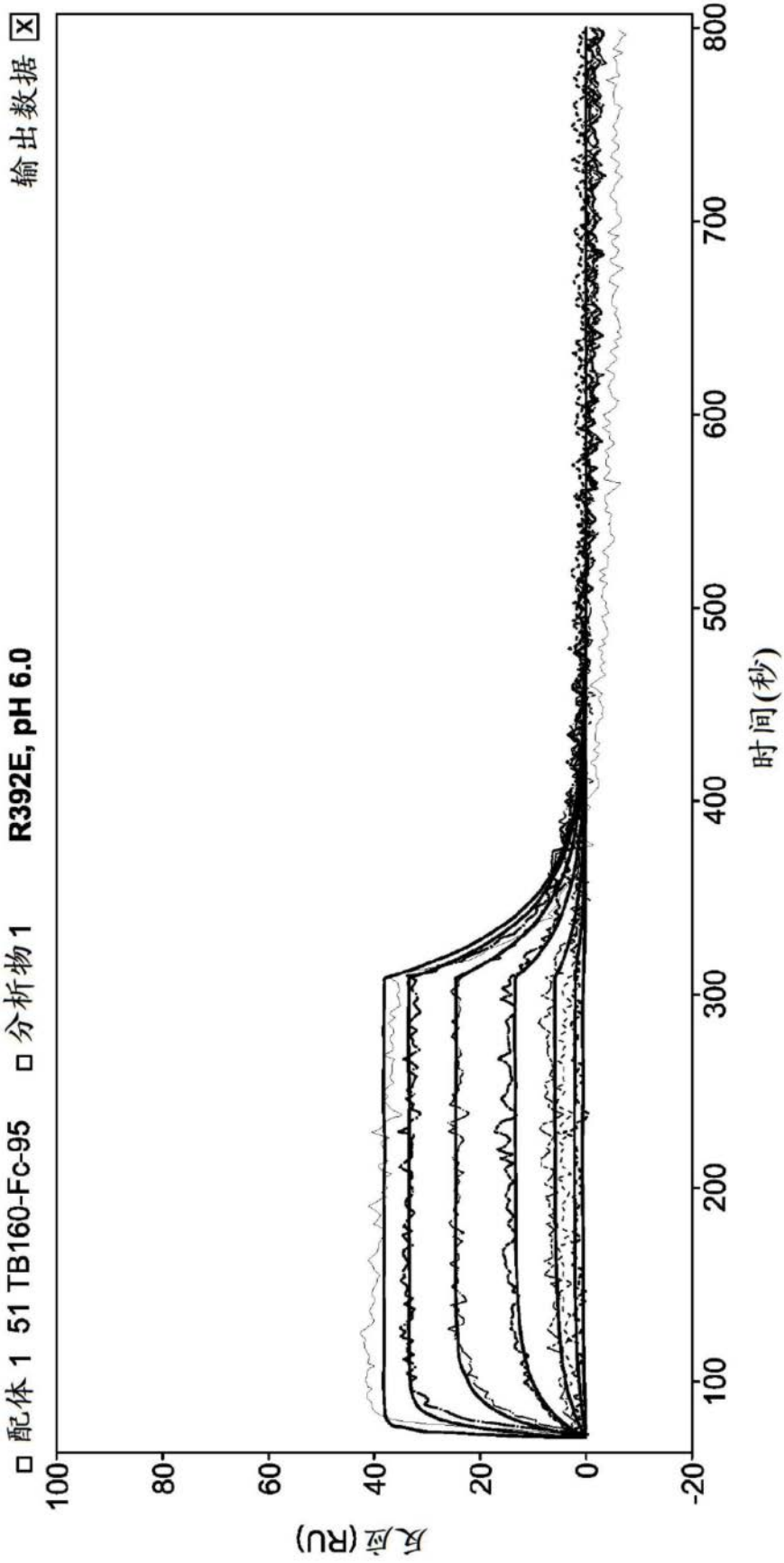

配体 1 51 TB160-Fc-95
分析物 1
R392E, pH 6.0
输出数据
反应(RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图36A

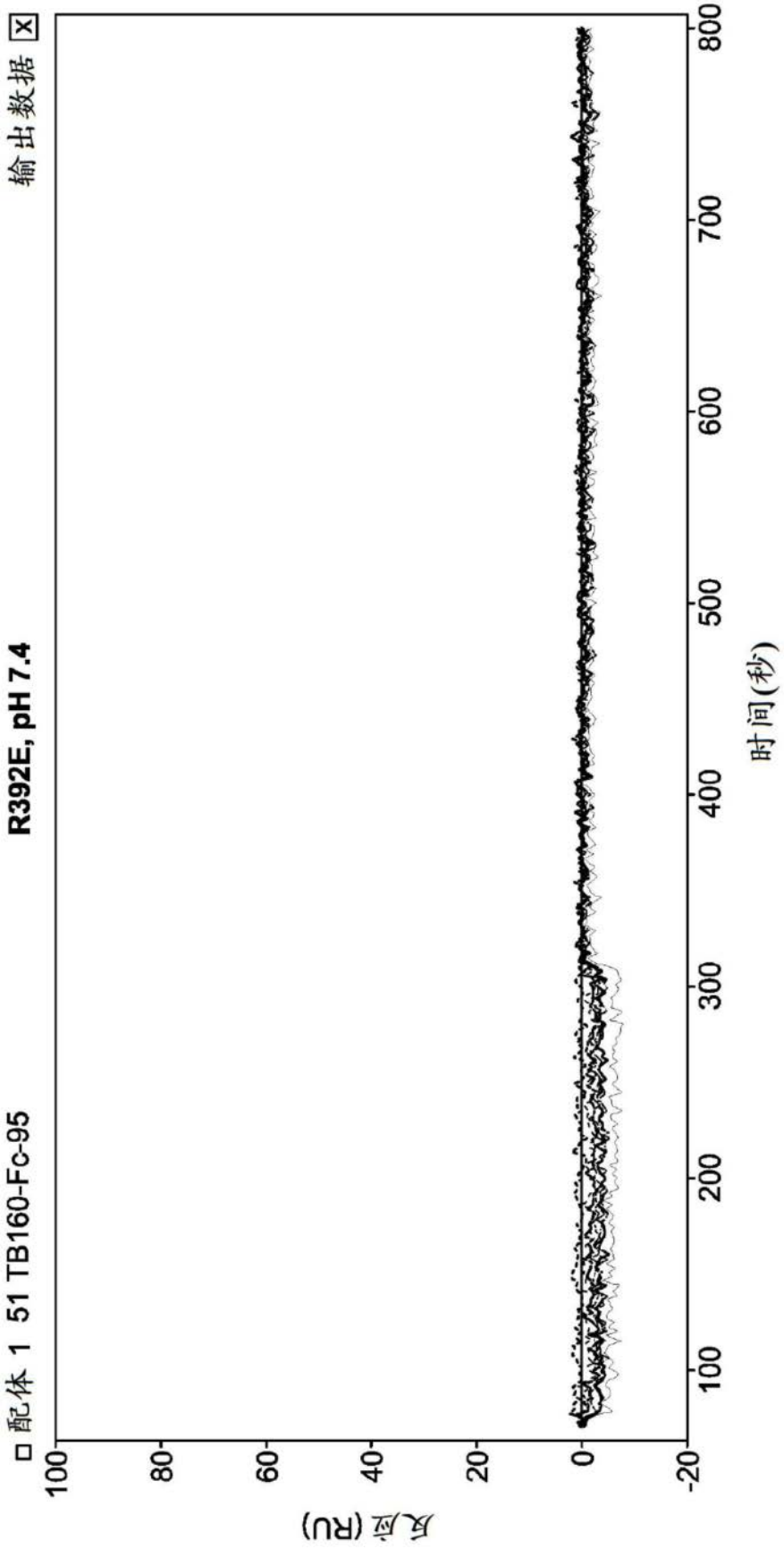

配体 1 51 TB160-Fc-95
R392E, pH 7.4
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图36B

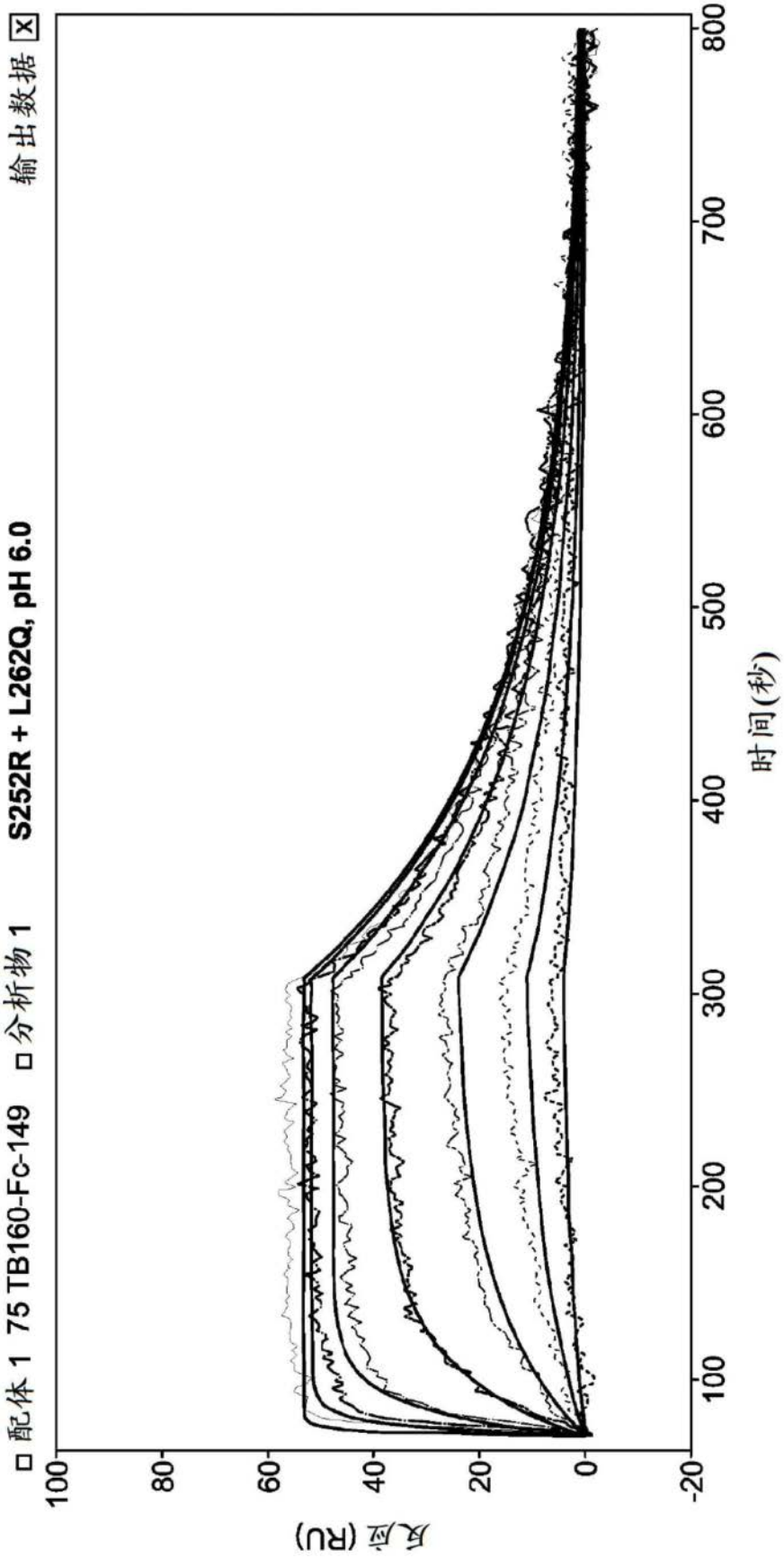

□ 配体 1 75 TB160-Fc-149 □ 分析物 1 S252R + L262Q, pH 6.0
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图37A

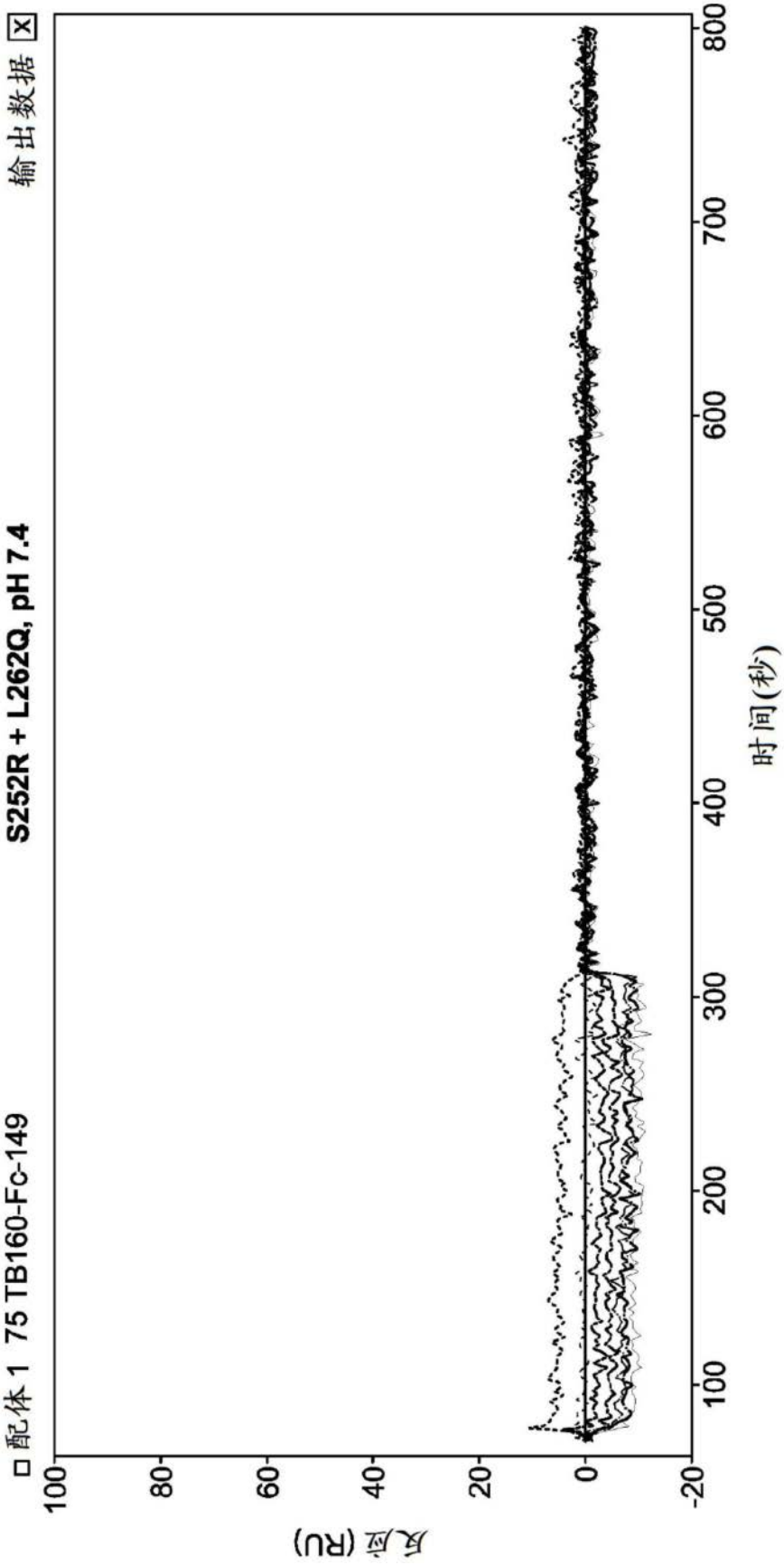

配体 1 75 TB160-Fc-149
S252R + L262Q, pH 7.4
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图37B

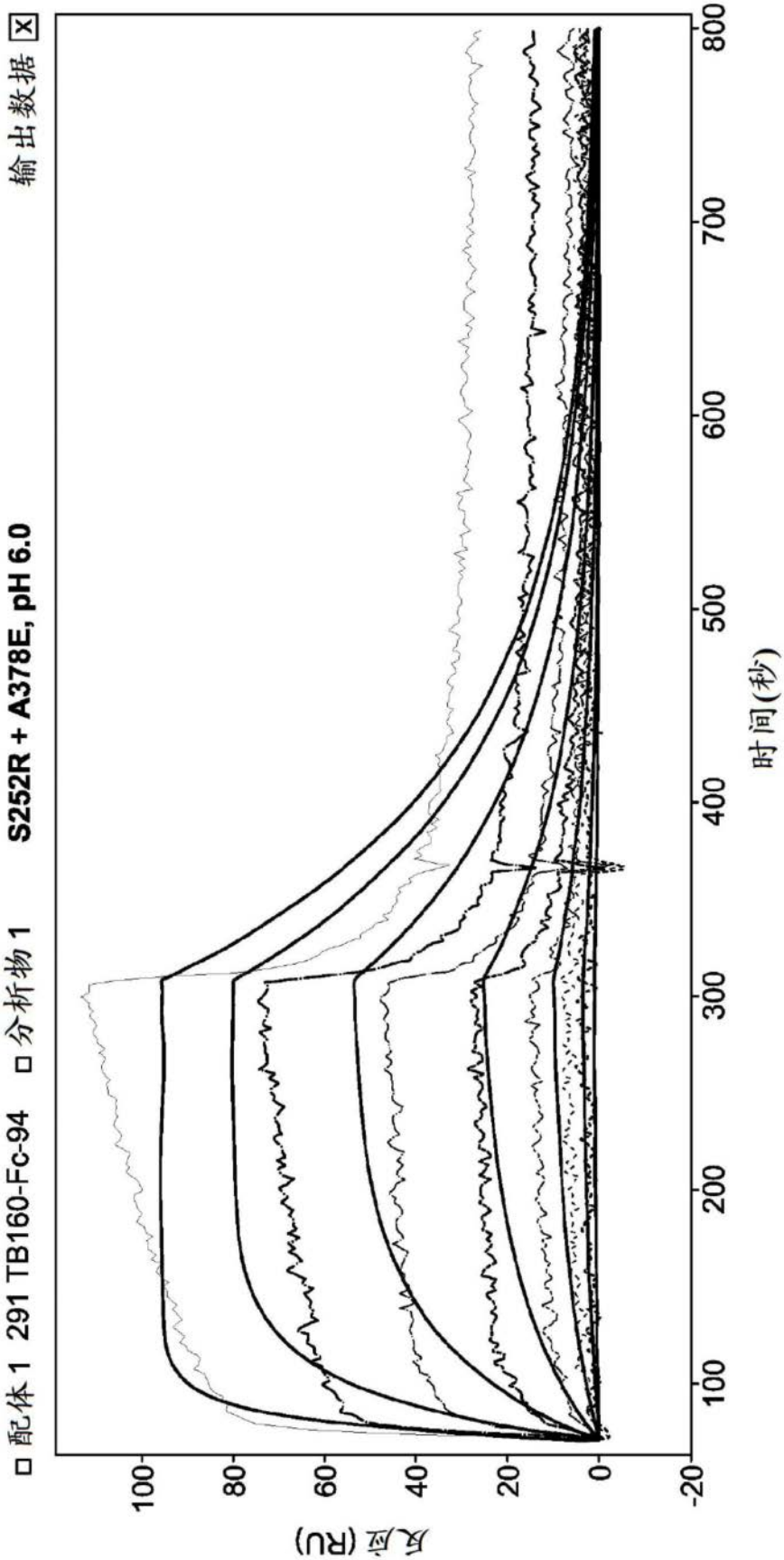

配体 1 291 TB160-Fc-94
分析物 1
S252R + A378E, pH 6.0
输出数据
反应 (RU)
时间 (秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图38A

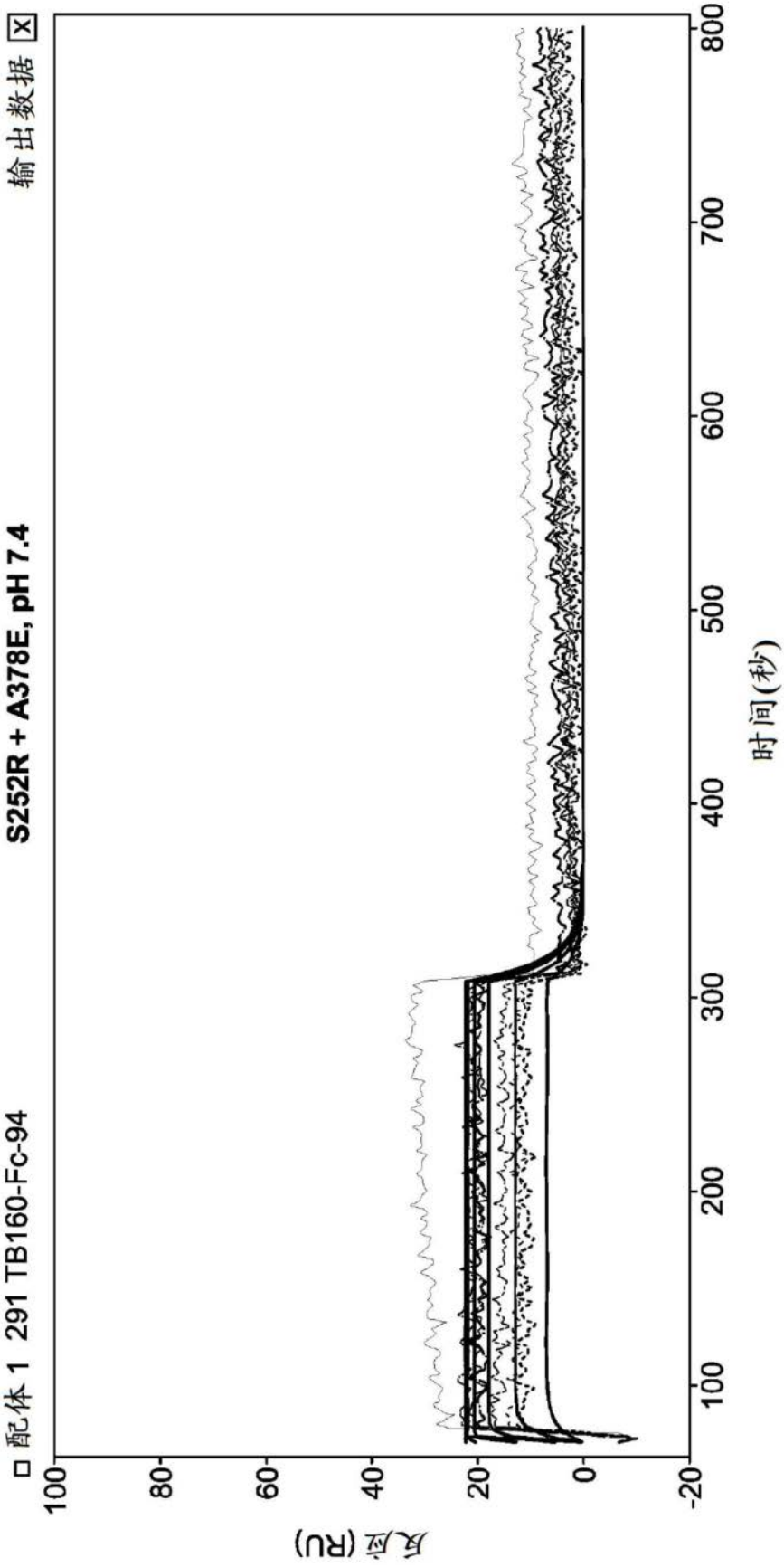

配体 1 291 TB160-Fc-94
S252R + A378E, pH 7.4
输出数据
反应 (RU)
时间 (秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图38B

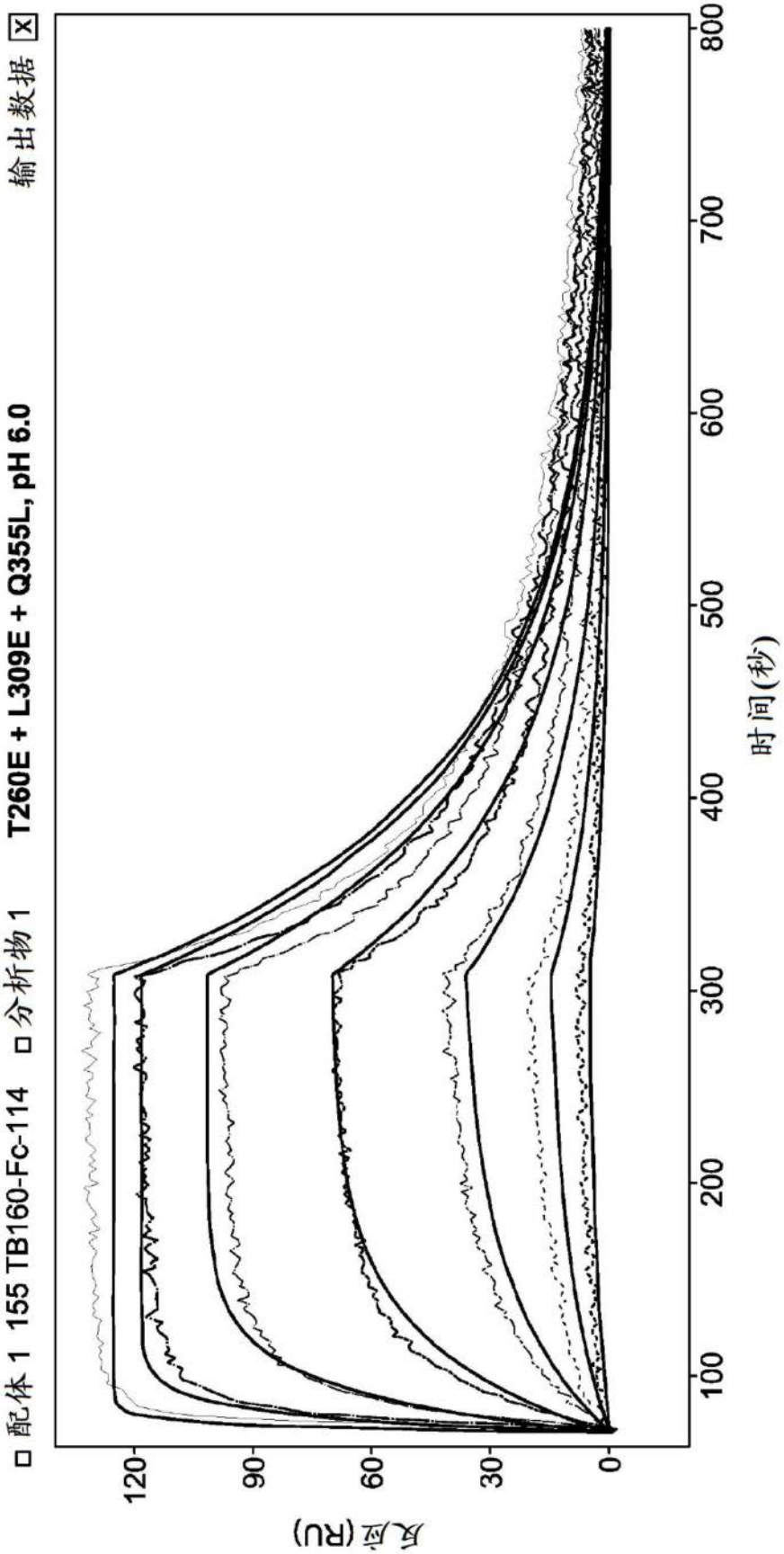

□ 配体 1 155 TB160-Fc-114 □ 分析物 1 T260E + L309E + Q355L, pH 6.0 输出数据
反应 (RU)
120
90
60
30
0
100
200
300
400
500
600
700
800
时间(秒)

图39A

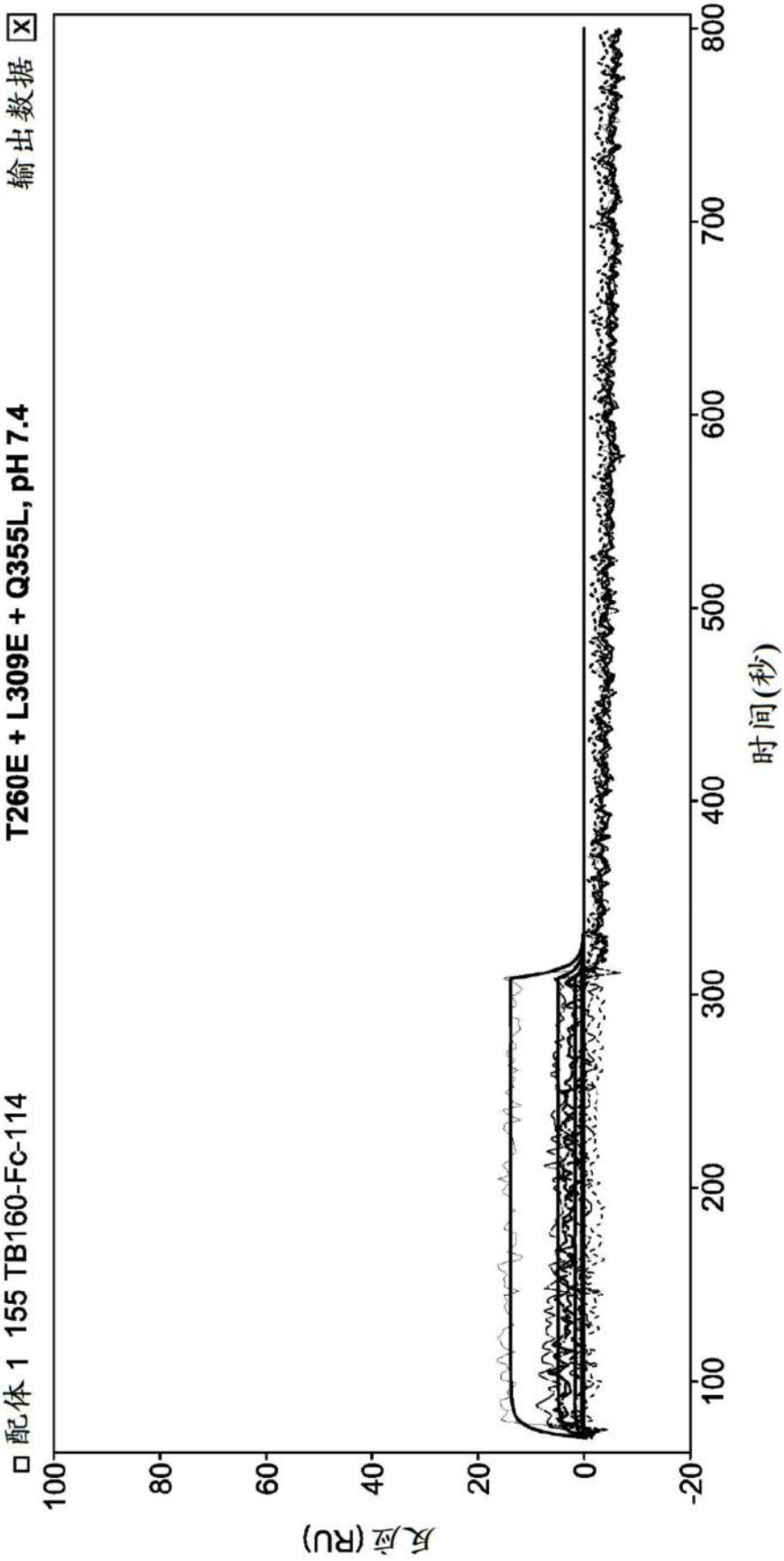

配体 1 155 TB160-Fc-114
T260E + L309E + Q355L, pH 7.4
输出数据
反应(RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图39B

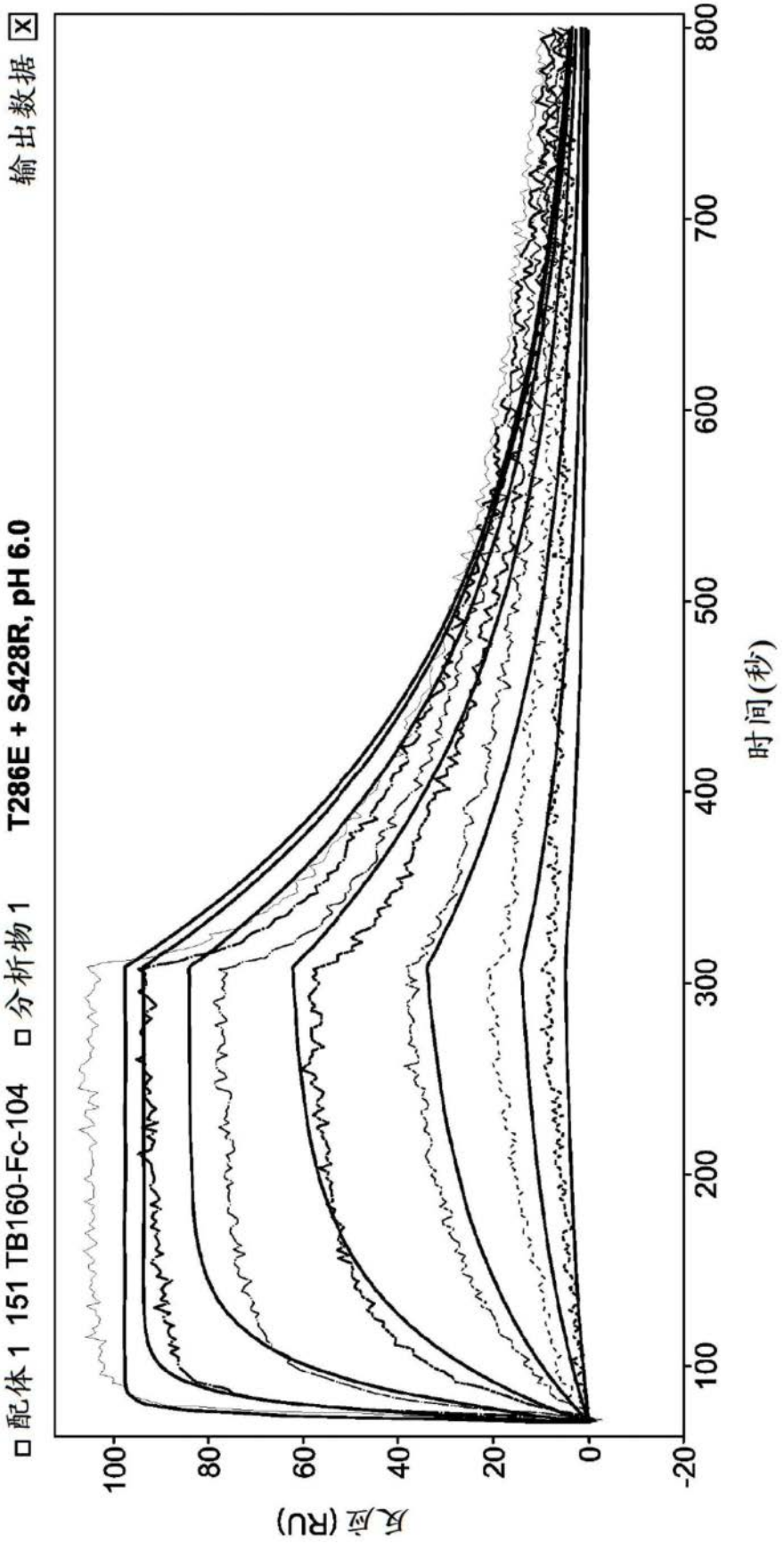

□ 配体 1 151 TB160-Fc-104 □ 分析物 1 T286E + S428R, pH 6.0
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图40A

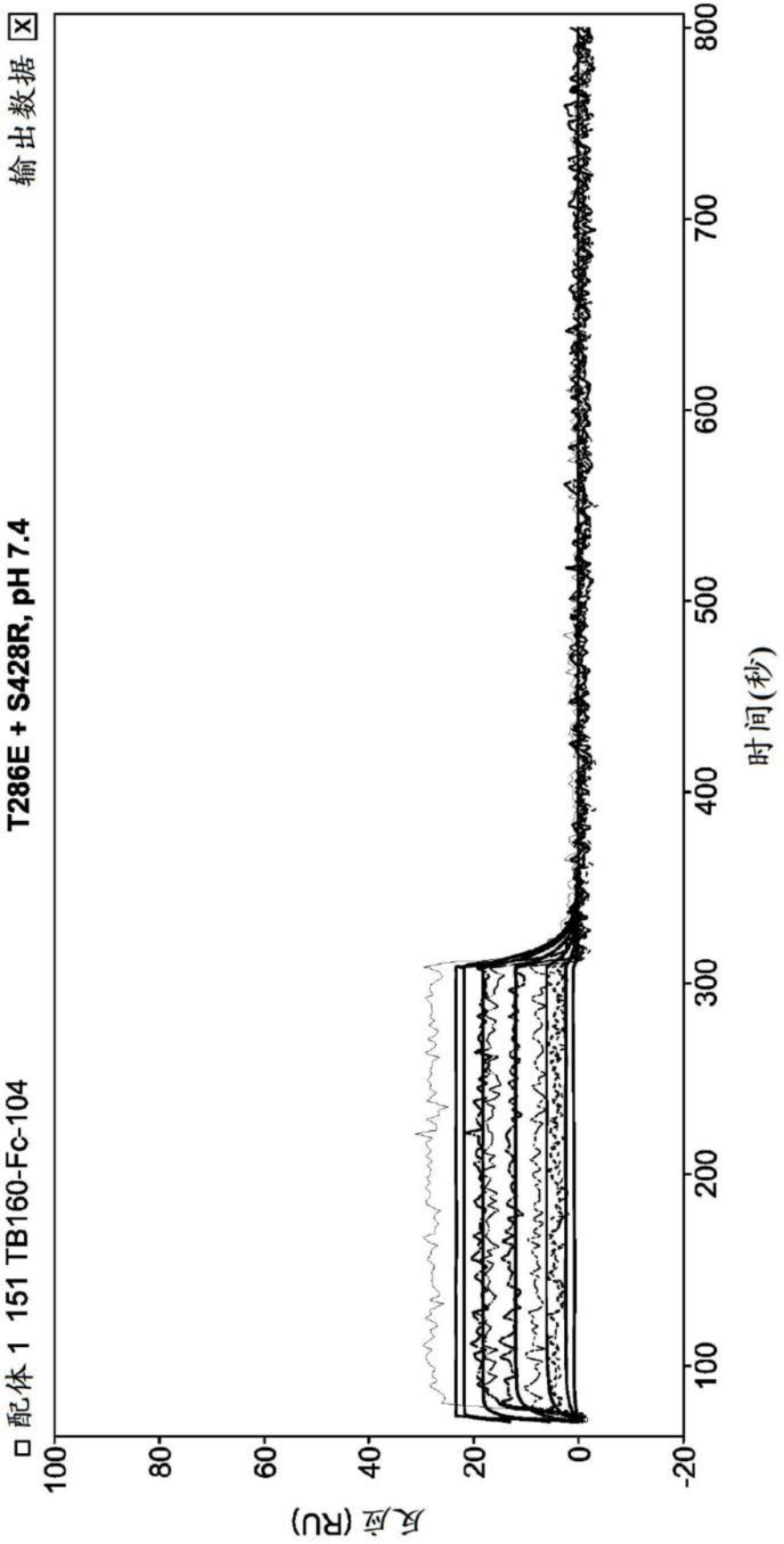

配体 1 151 TB160-Fc-104
T286E + S428R, pH 7.4
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图40B

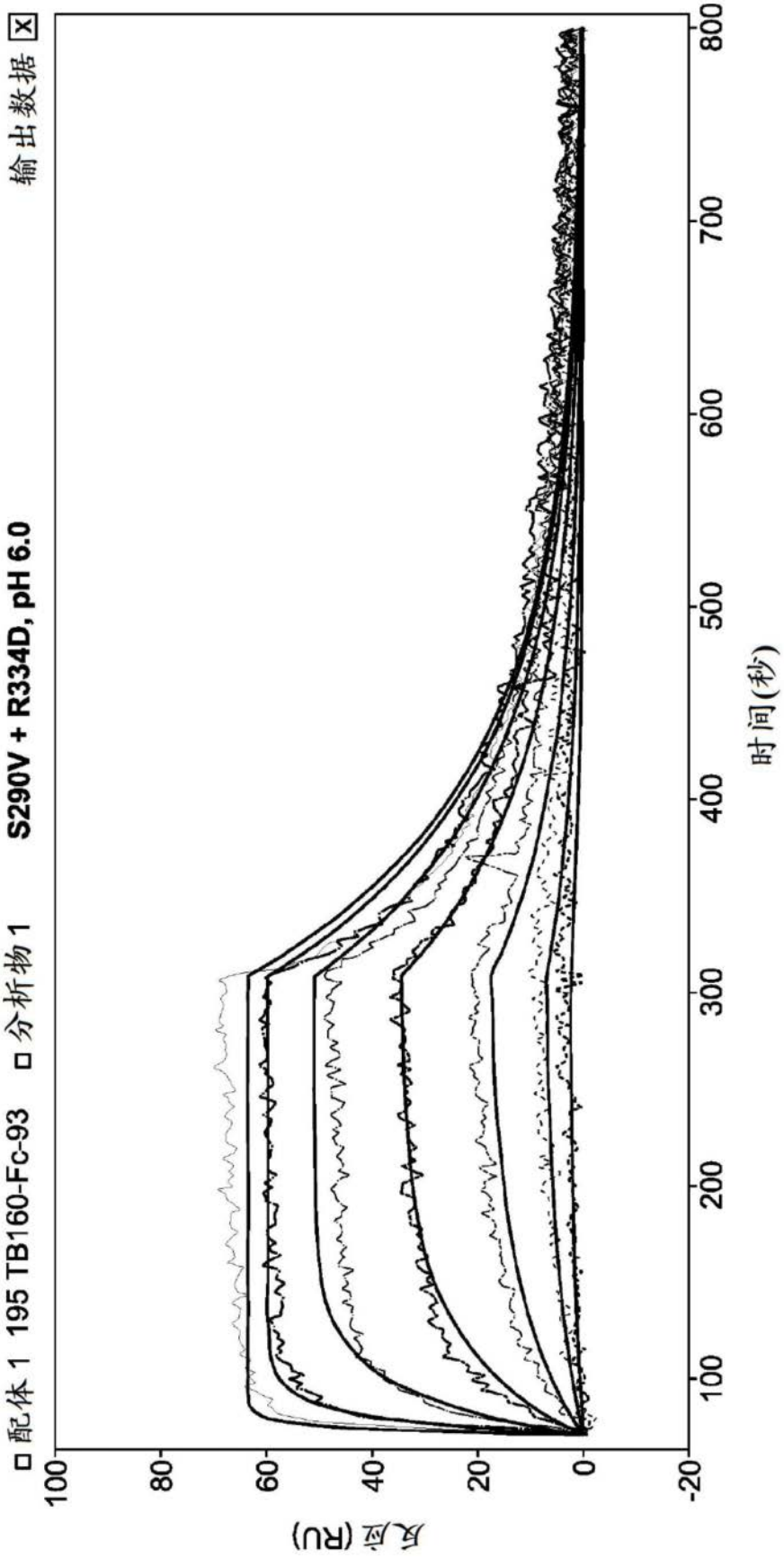

配体 1 195 TB160-Fc-93
分析物 1
S290V + R334D, pH 6.0
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图41A

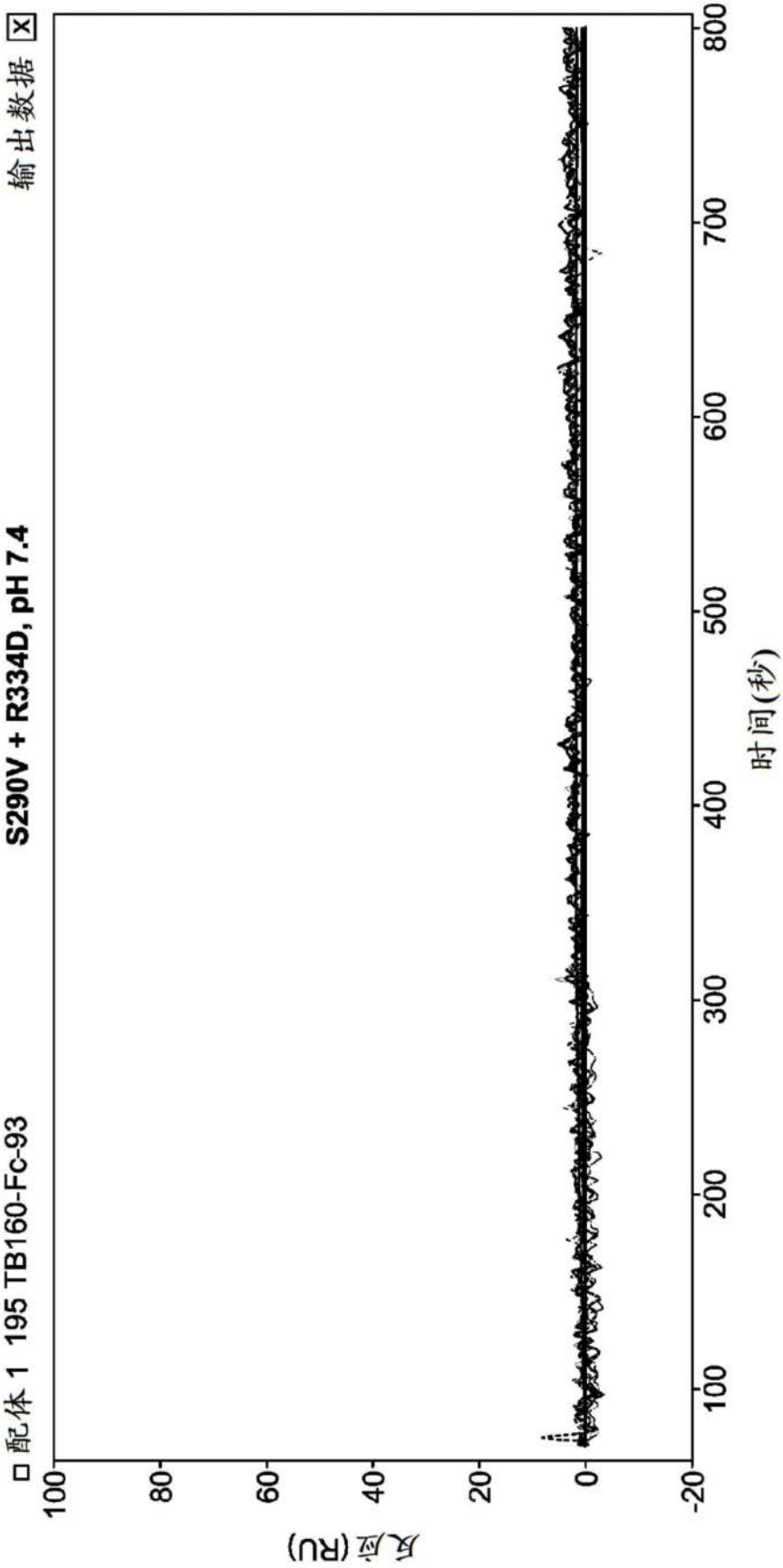

配体 1 195 TB160-Fc-93
S290V + R334D, pH 7.4
输出数据
反应(RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图41B

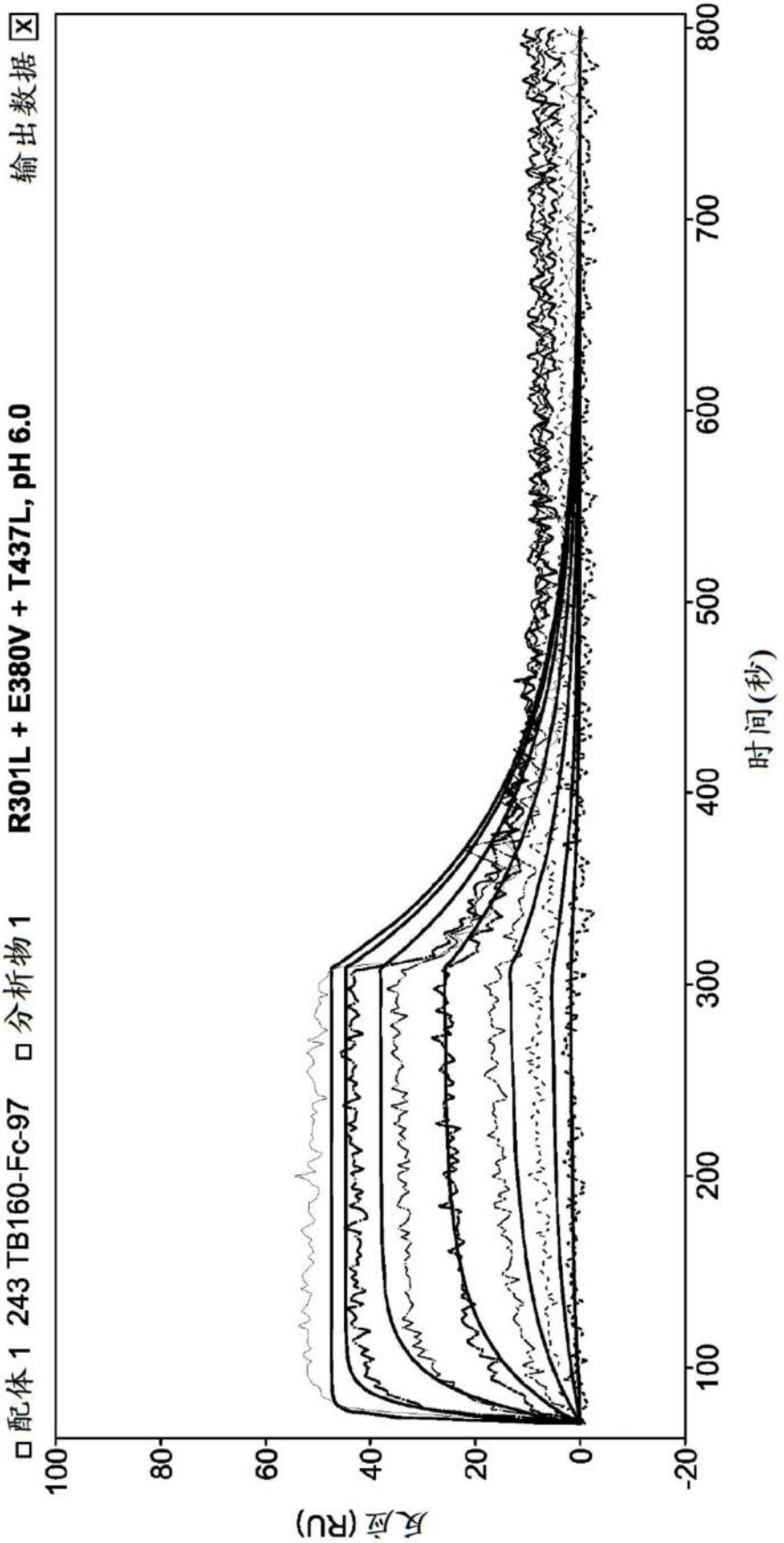

配体 1 243 TB160-Fc-97
分析物 1
R301L + E380V + T437L, pH 6.0
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图42A

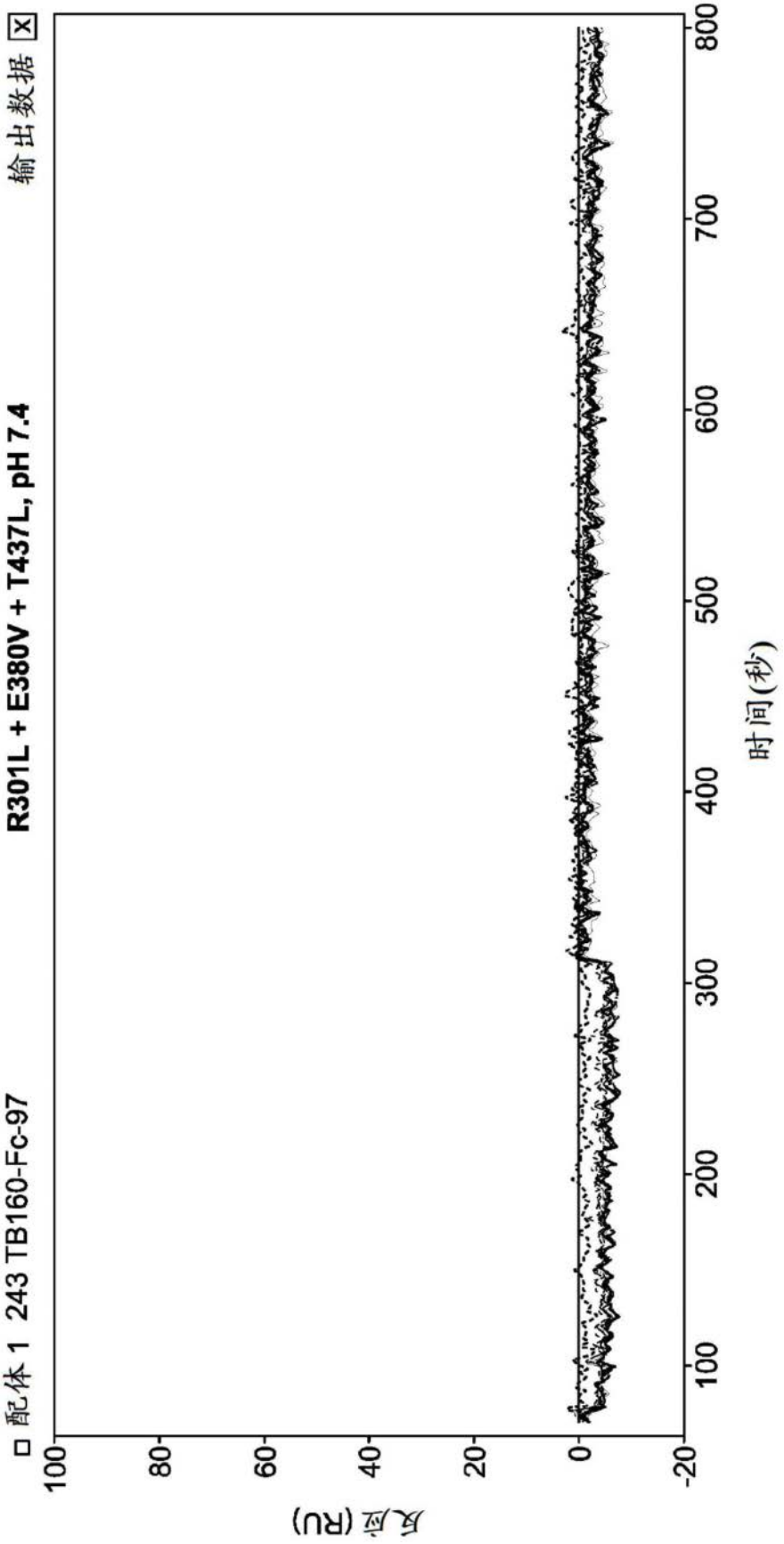

配体 1 243 TB160-Fc-97
R301L + E380V + T437L, pH 7.4
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图42B

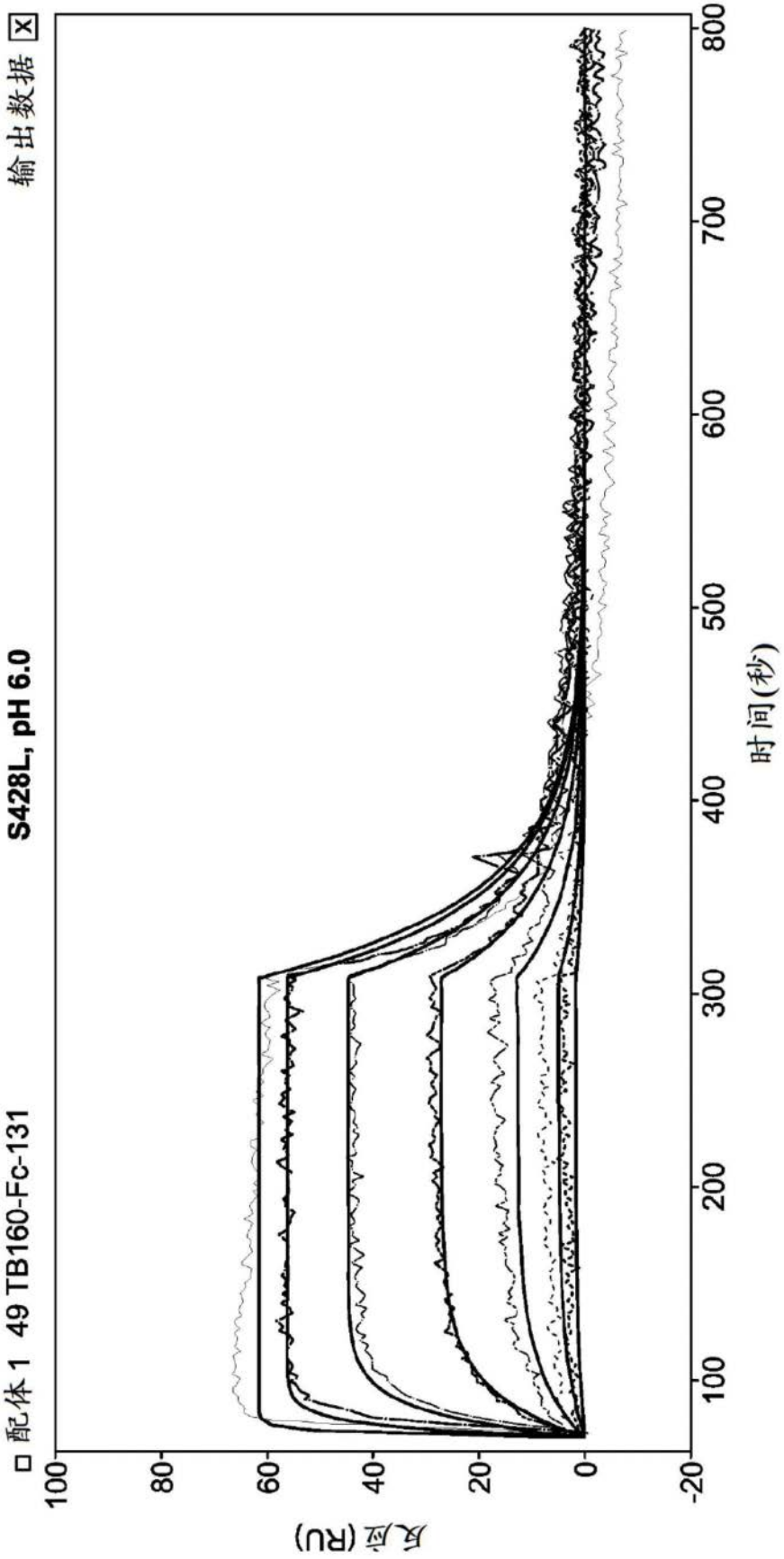

配体 1 49 TB160-Fc-131
S428L, pH 6.0
输出数据
反应 (RU)
时间 (秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图43A

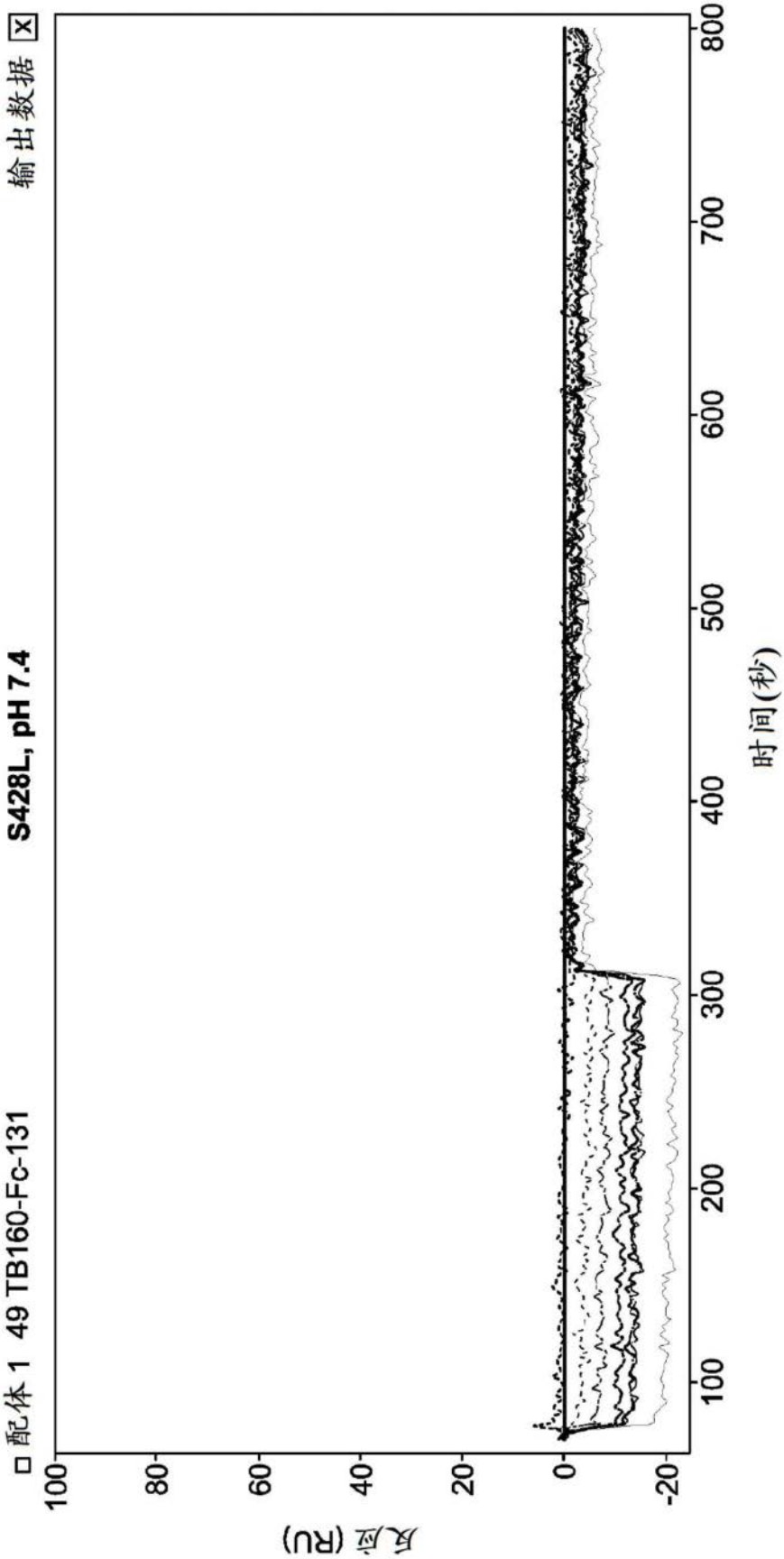

配体 1 49 TB160-Fc-131
S428L, pH 7.4
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图43B

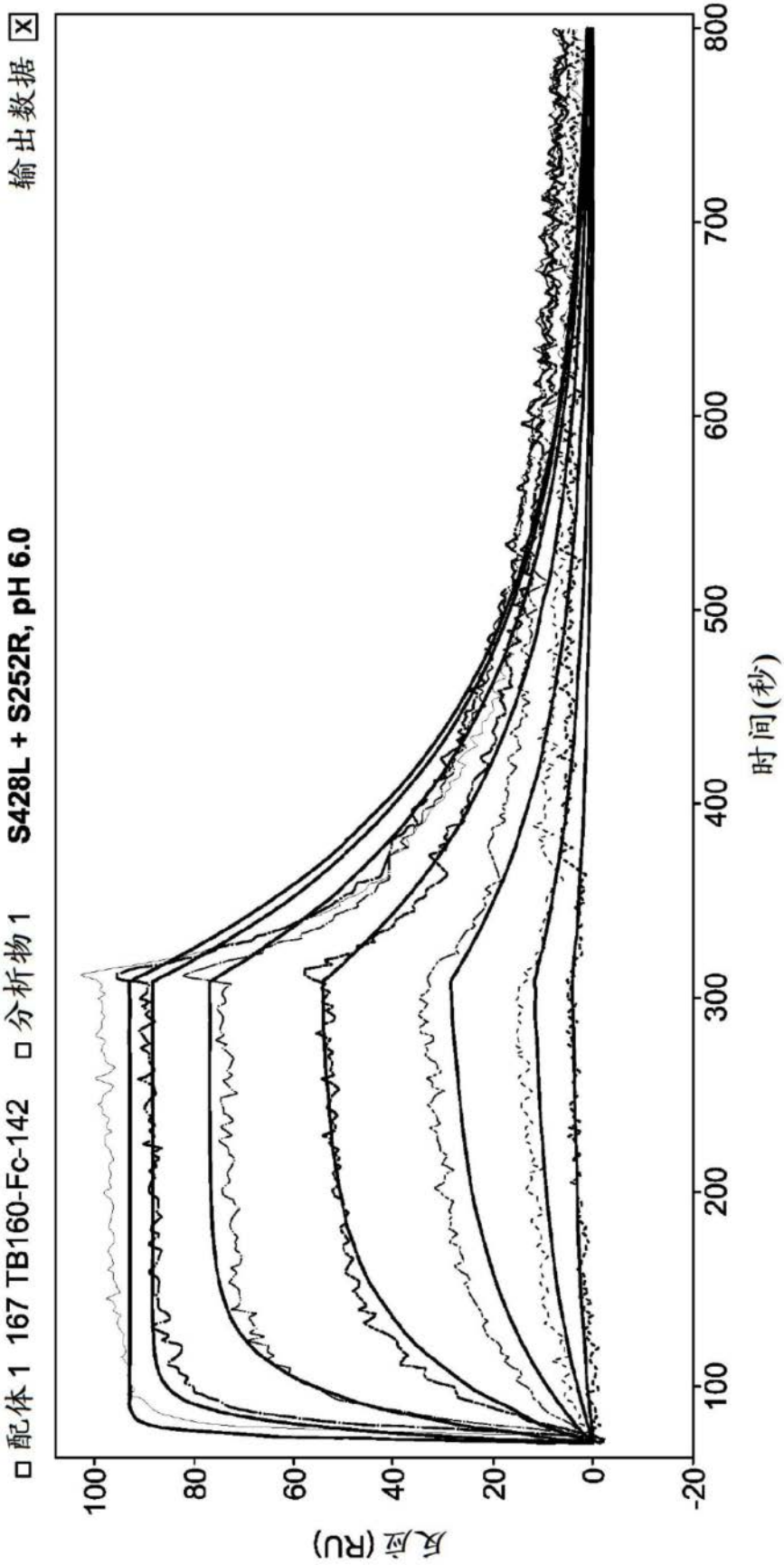

□ 配体 1 167 TB160-Fc-142 □ 分析物 1 S428L + S252R, pH 6.0 输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图44A

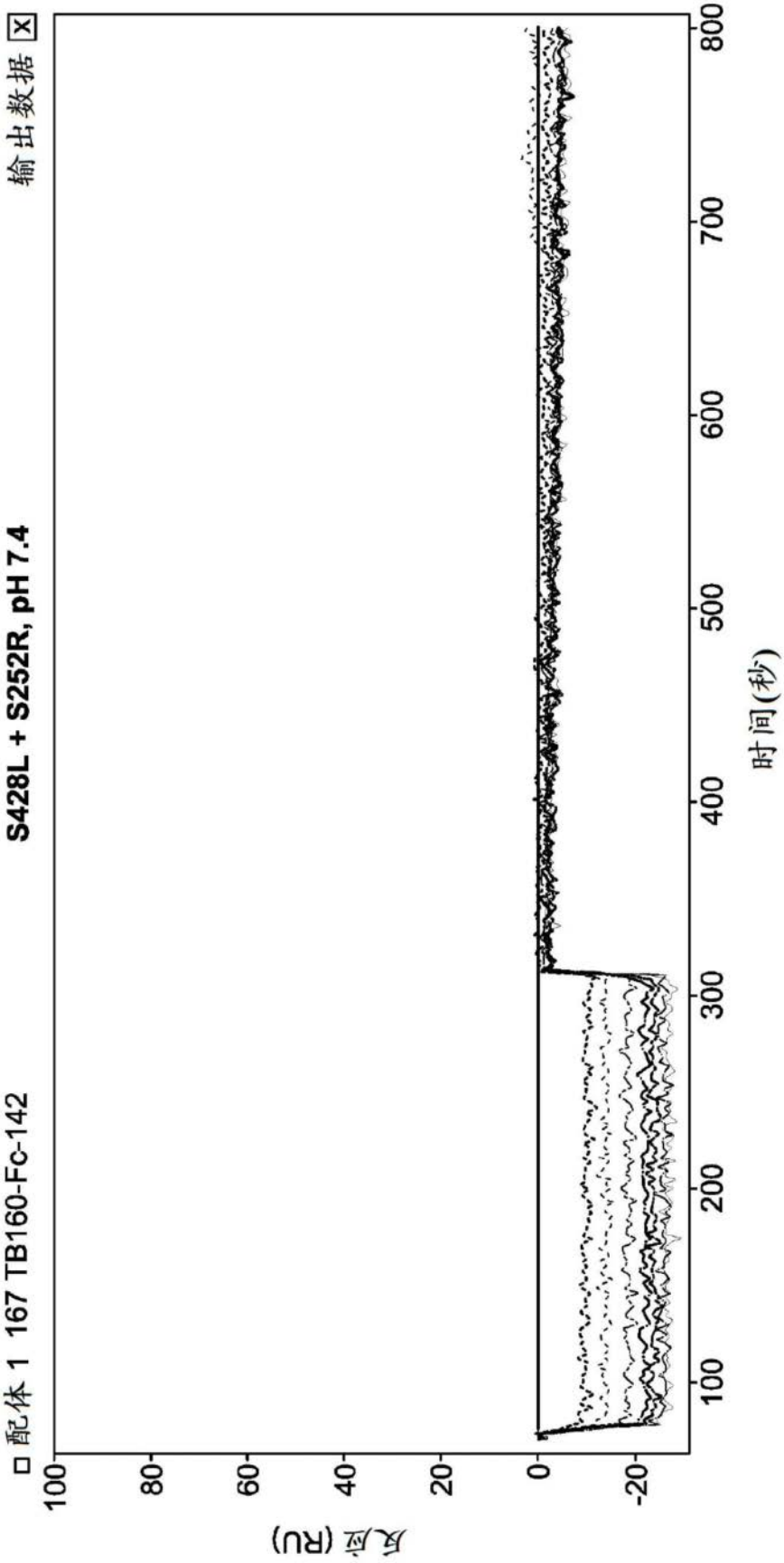

□ 配体 1 167 TB160-Fc-142
S428L + S252R, pH 7.4
输出数据
反应 (RU)
时间 (秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图44B

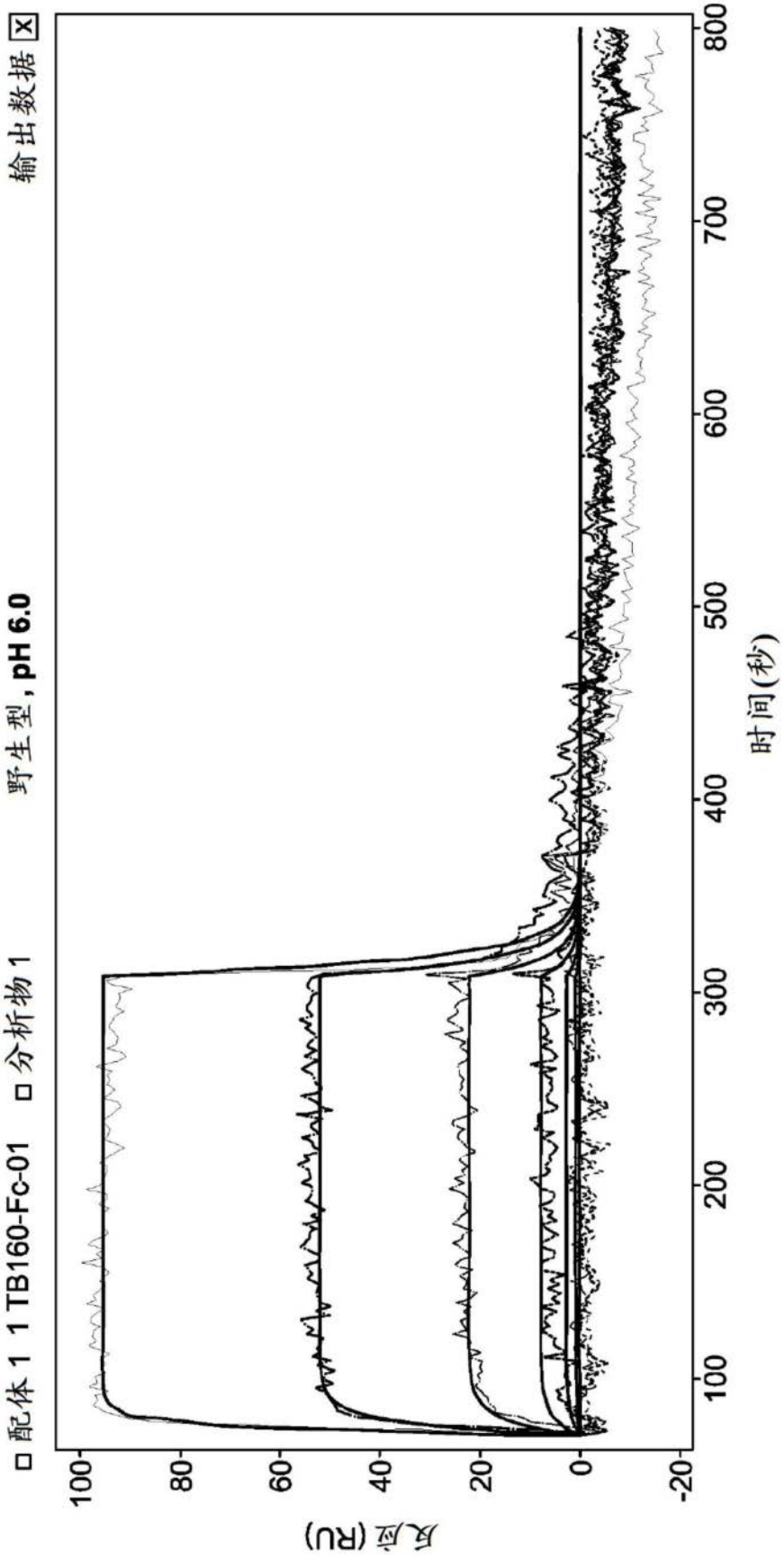

配体 1 1 TB160-Fc-01
分析物 1
野生型, pH 6.0
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图45A

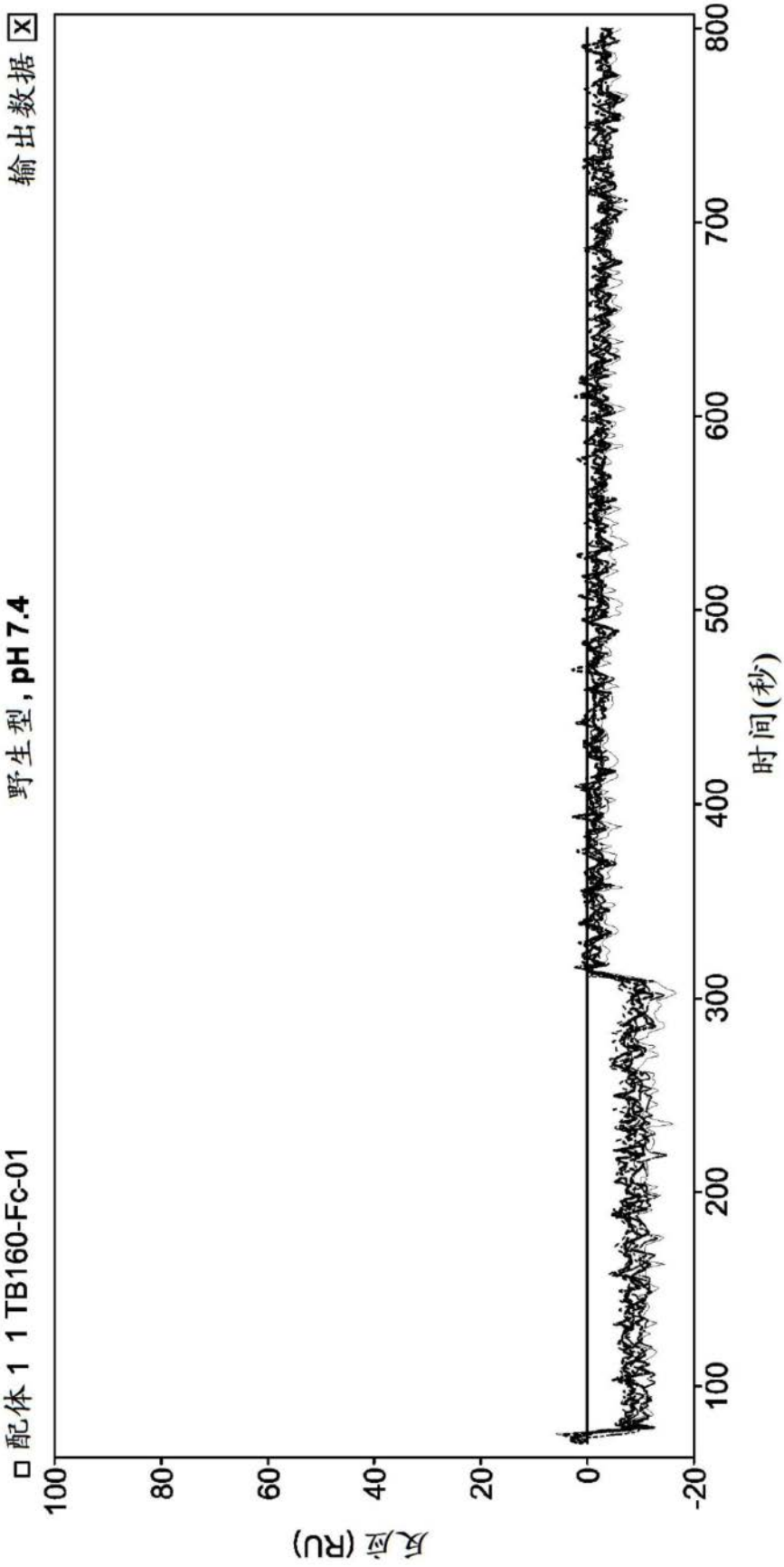

配体 1 1 TB160-Fc-01
野生型, pH 7.4
输出数据
反应 (RU)
时间(秒)
100
80
60
40
20
0
-20
100
200
300
400
500
600
700
800

图45B

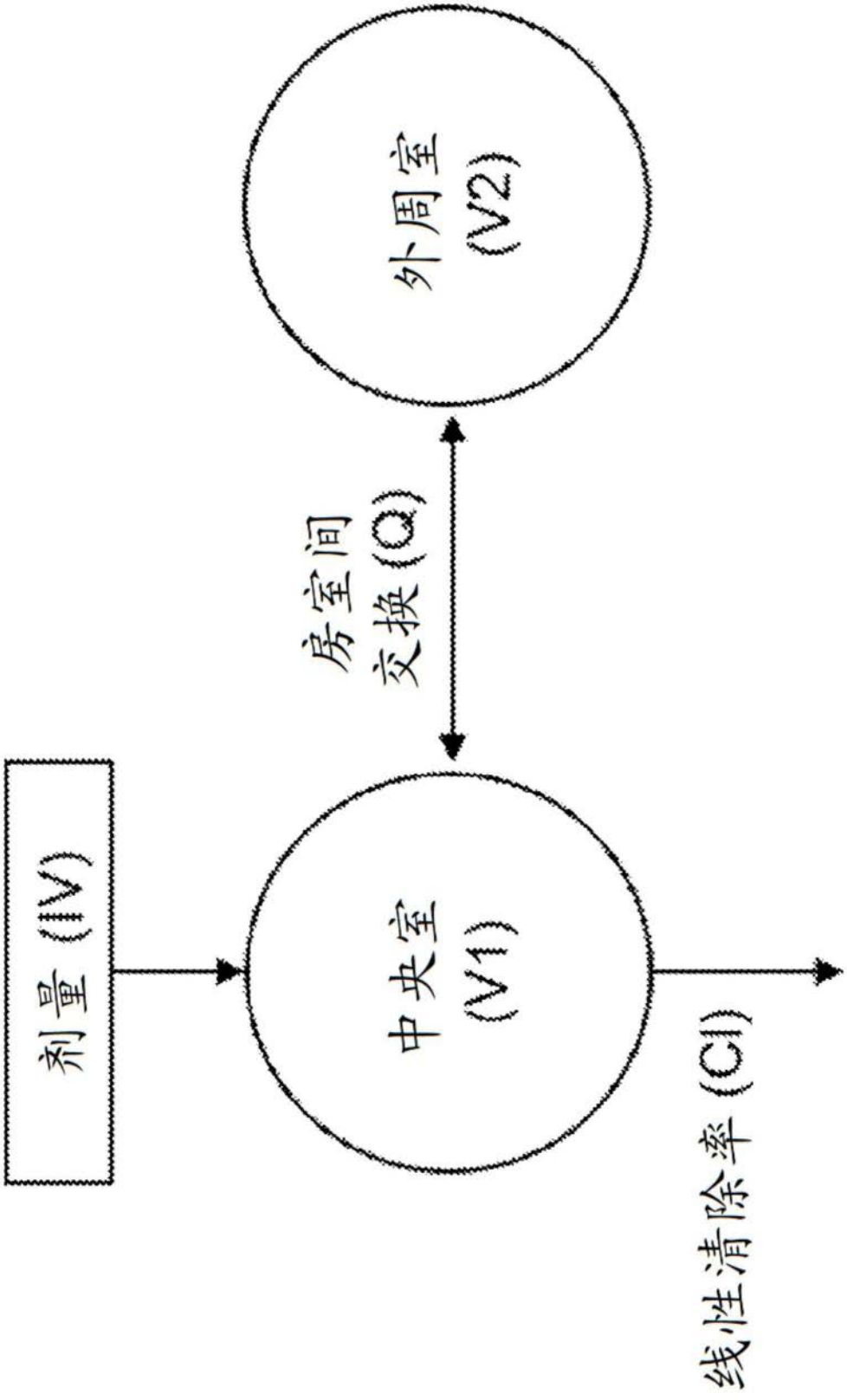


图46

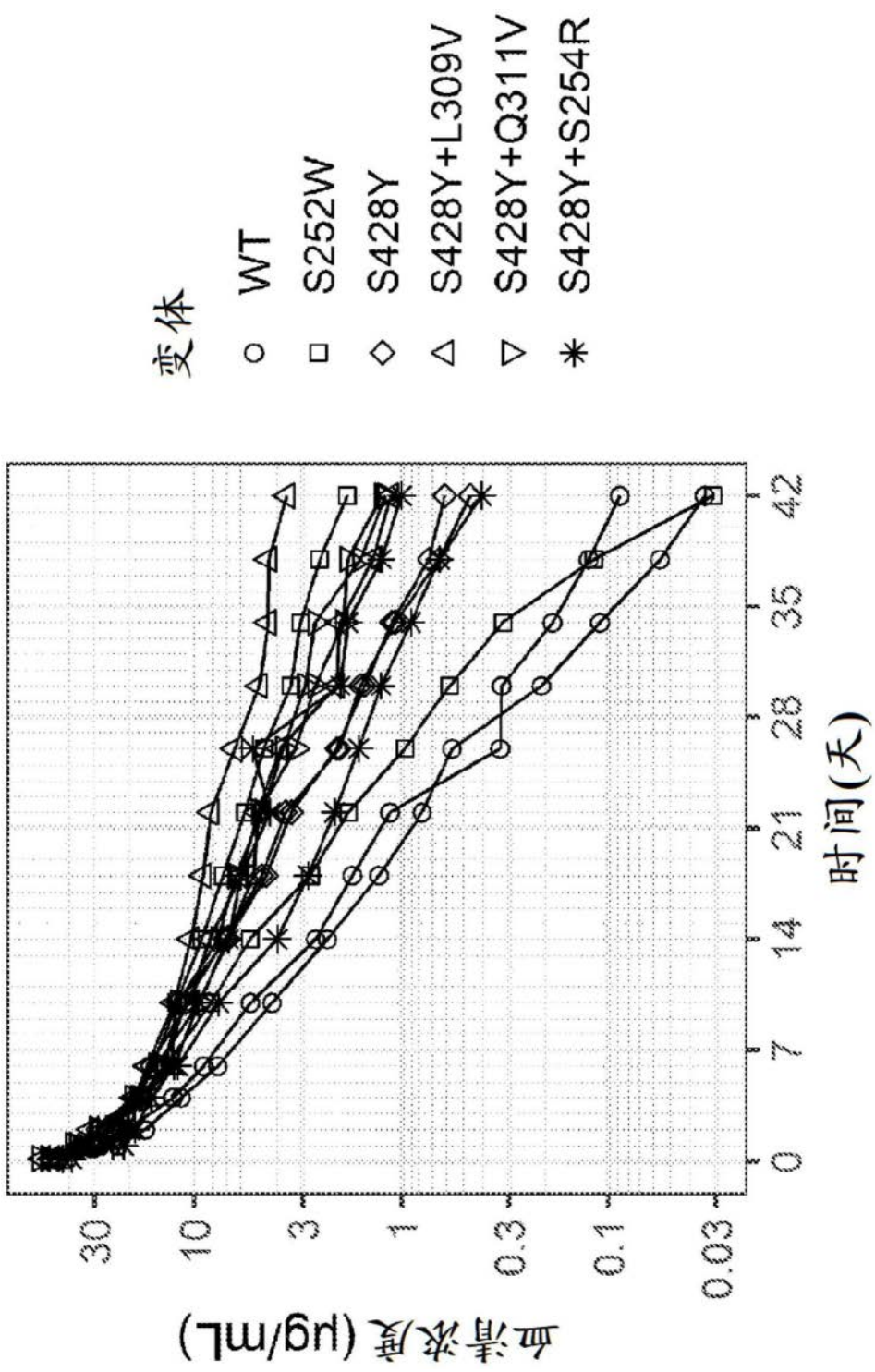

变体
WT
S252W
S428Y
S428Y+L309V
S428Y+Q311V
S428Y+S254R
血清浓度 (μg/mL)
30
10
3
1
0.3
0.1
0.03
0
7
14
21
28
35
42
时间(天)

图47

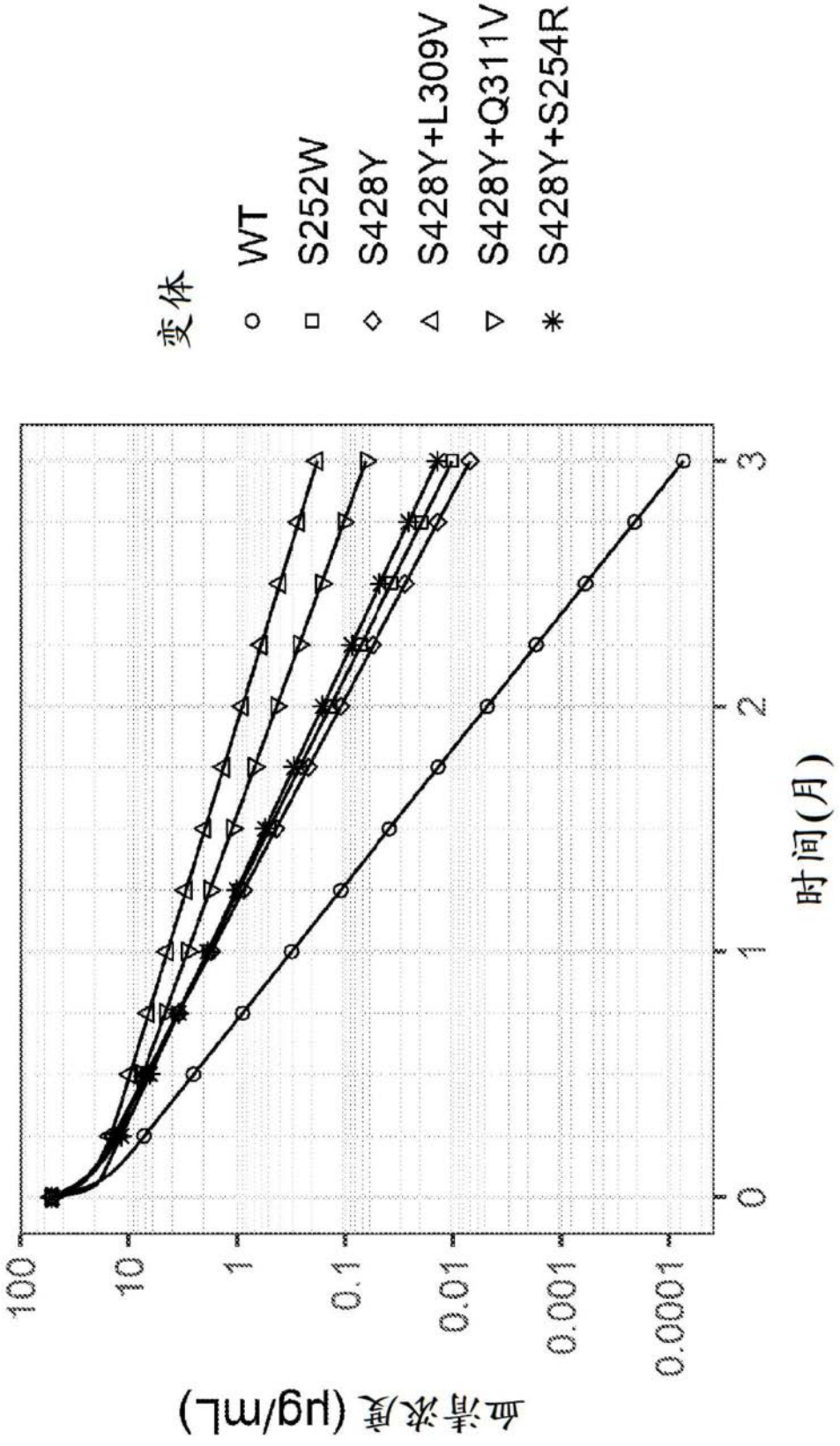

变体
WT
S252W
S428Y
S428Y+L309V
S428Y+Q311V
S428Y+S254R
血清浓度 (μg/mL)
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
0
1
2
3
时间(月)

图48

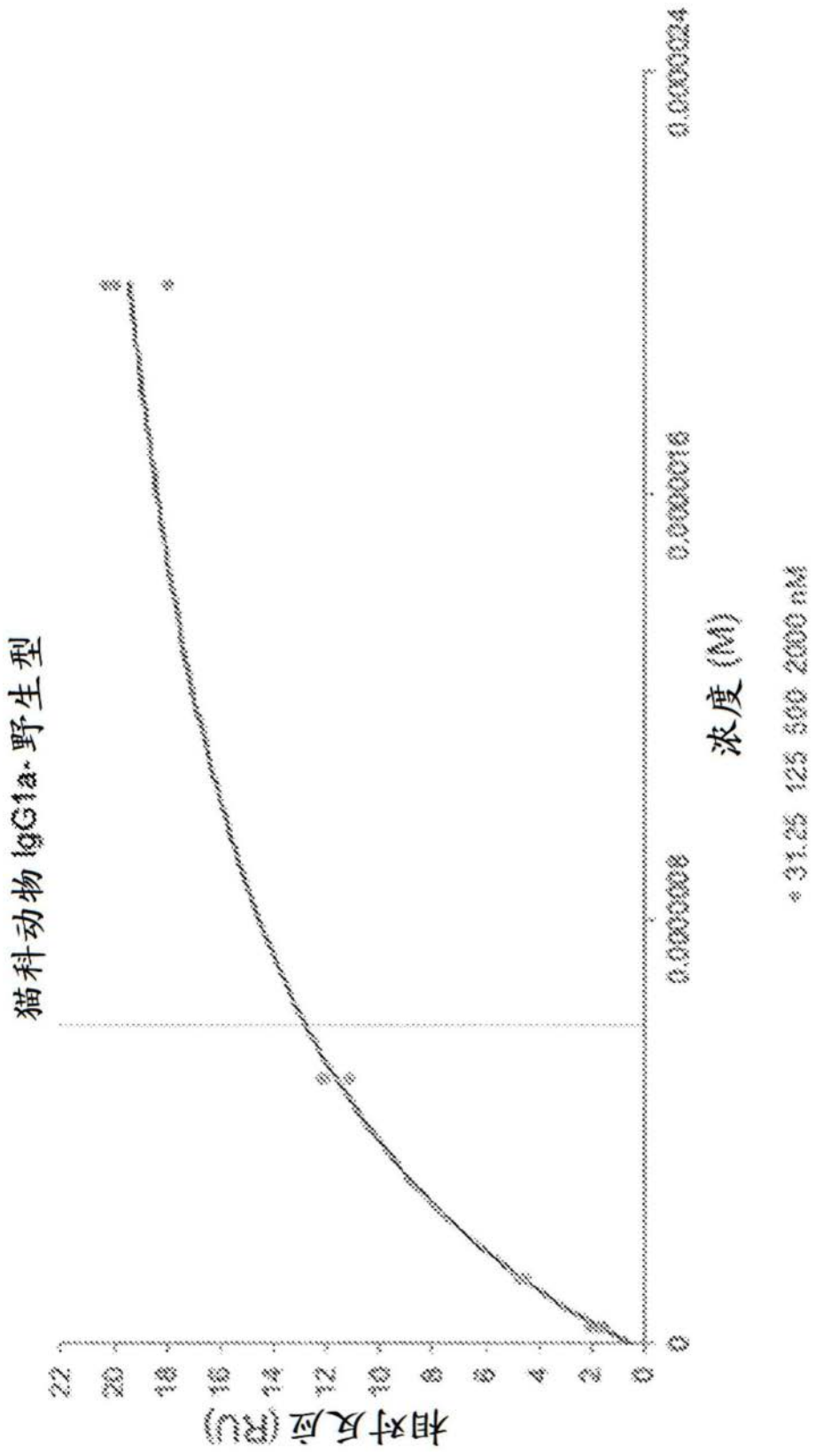


图49A

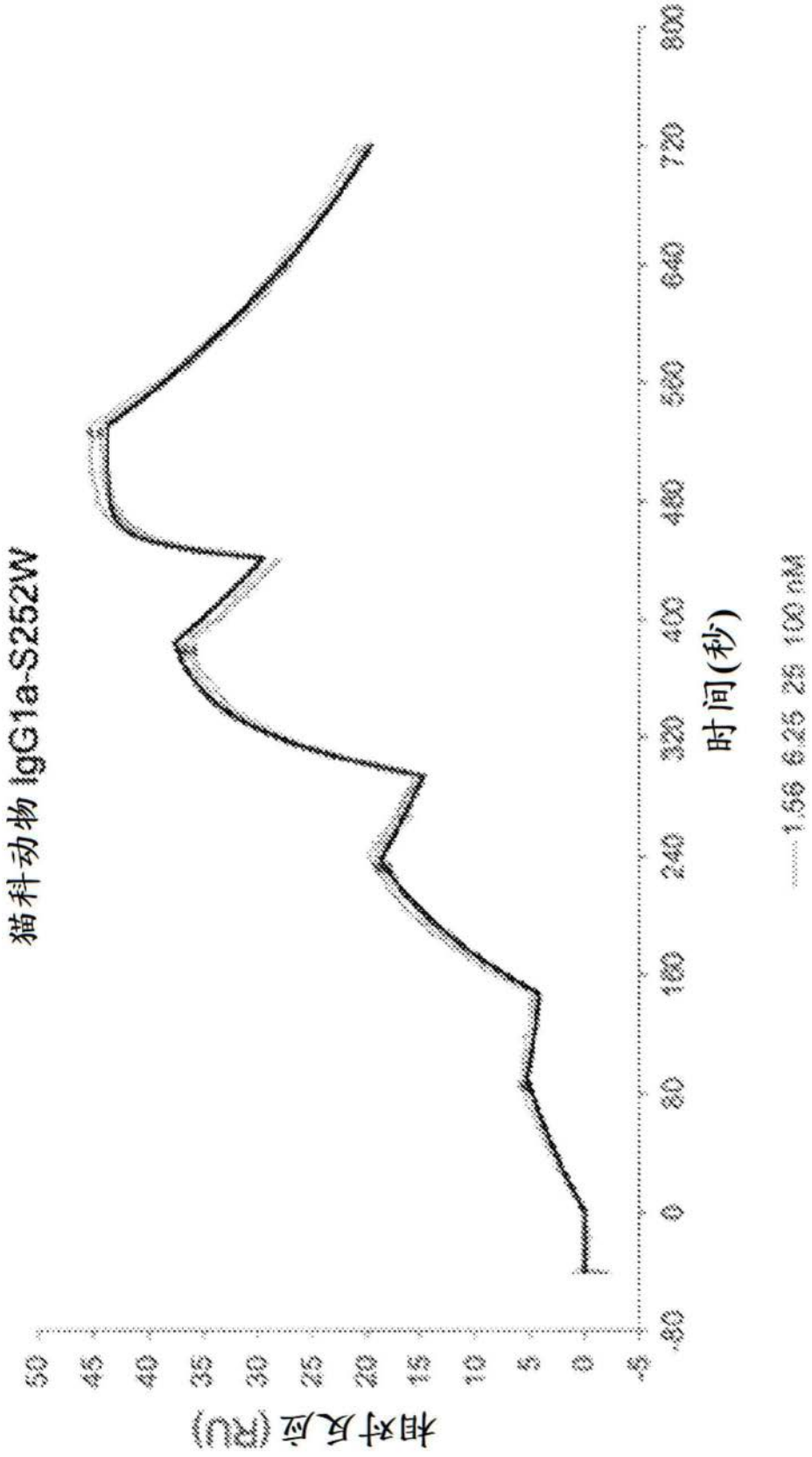

猫科动物 IgG1a-S252W
相对反应 (RU)
时间(秒)
1.56 6.25 25 100 nM
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
-5
-80
0
80
160
240
320
400
480
560
640
720
800

图49B

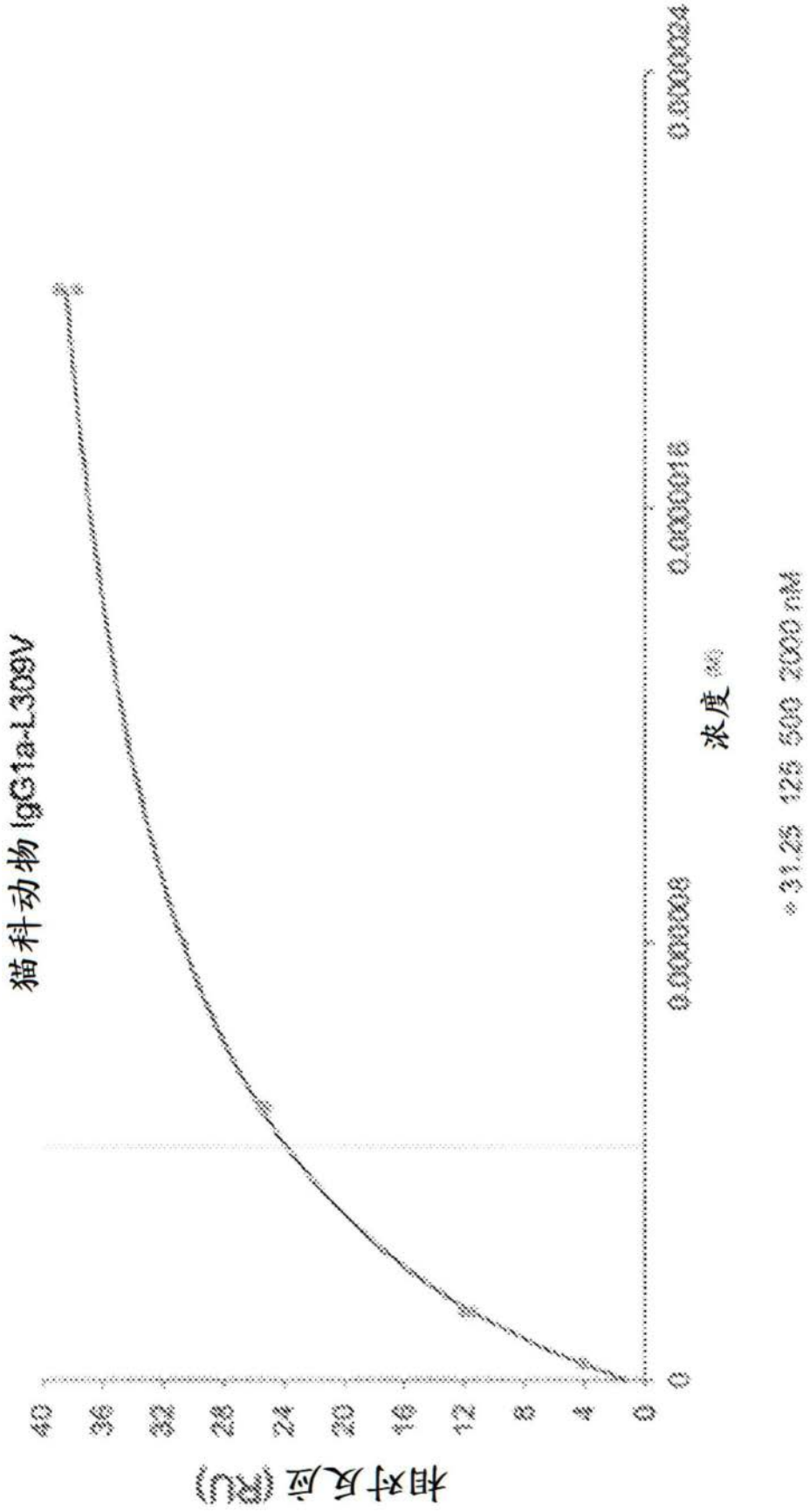

猫科动物 IgG1a-L309V
相对反应 (RU)
浓度 (M)
0
0.000008
0.000016
0.000024
31.25 125 500 2000 nM

图49C

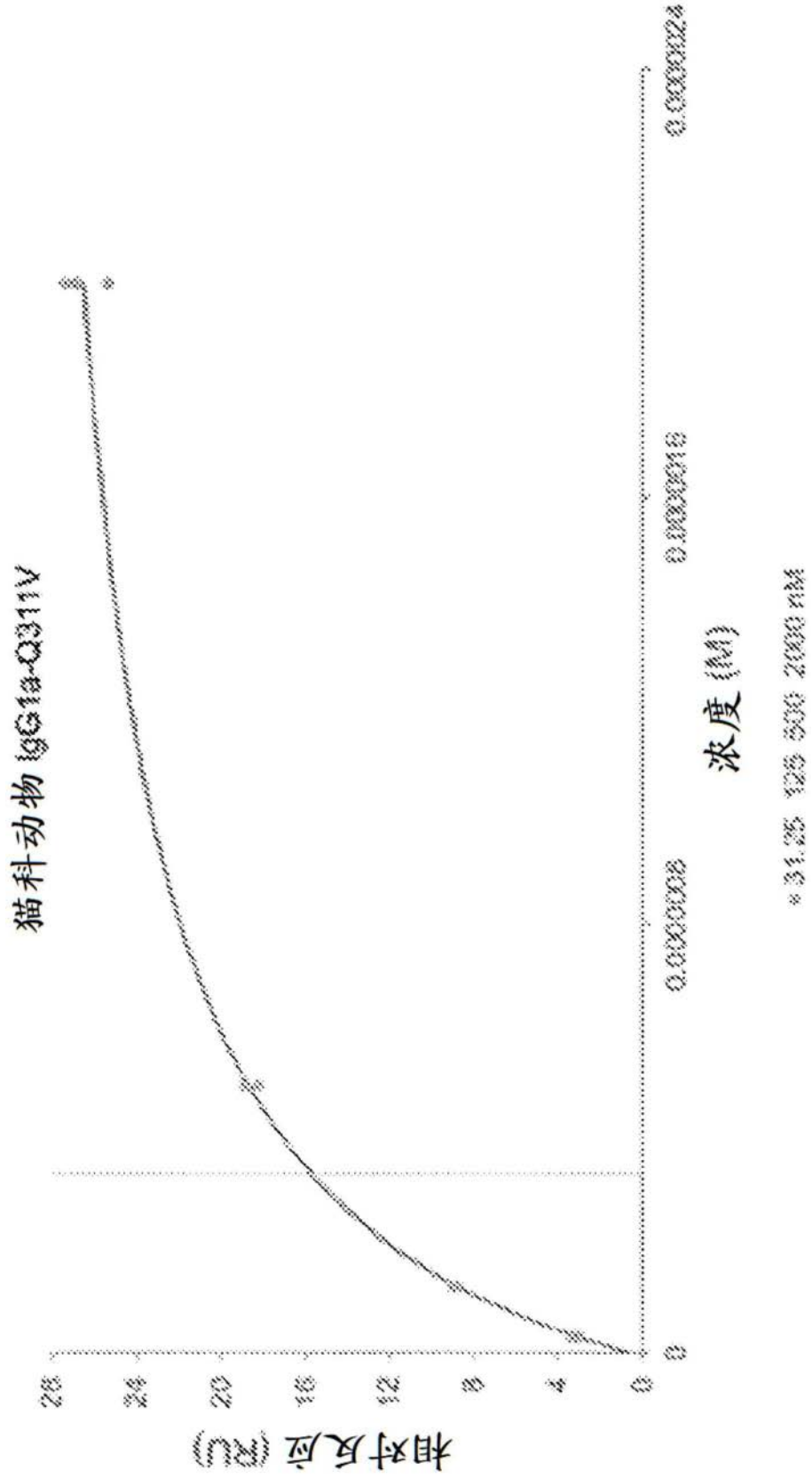

猫科动物 IgG1a-Q311V
相对反应 (RU)
浓度 (M)
0
4
8
12
16
20
24
28
0.000000
0.000018
0.000024

图49D

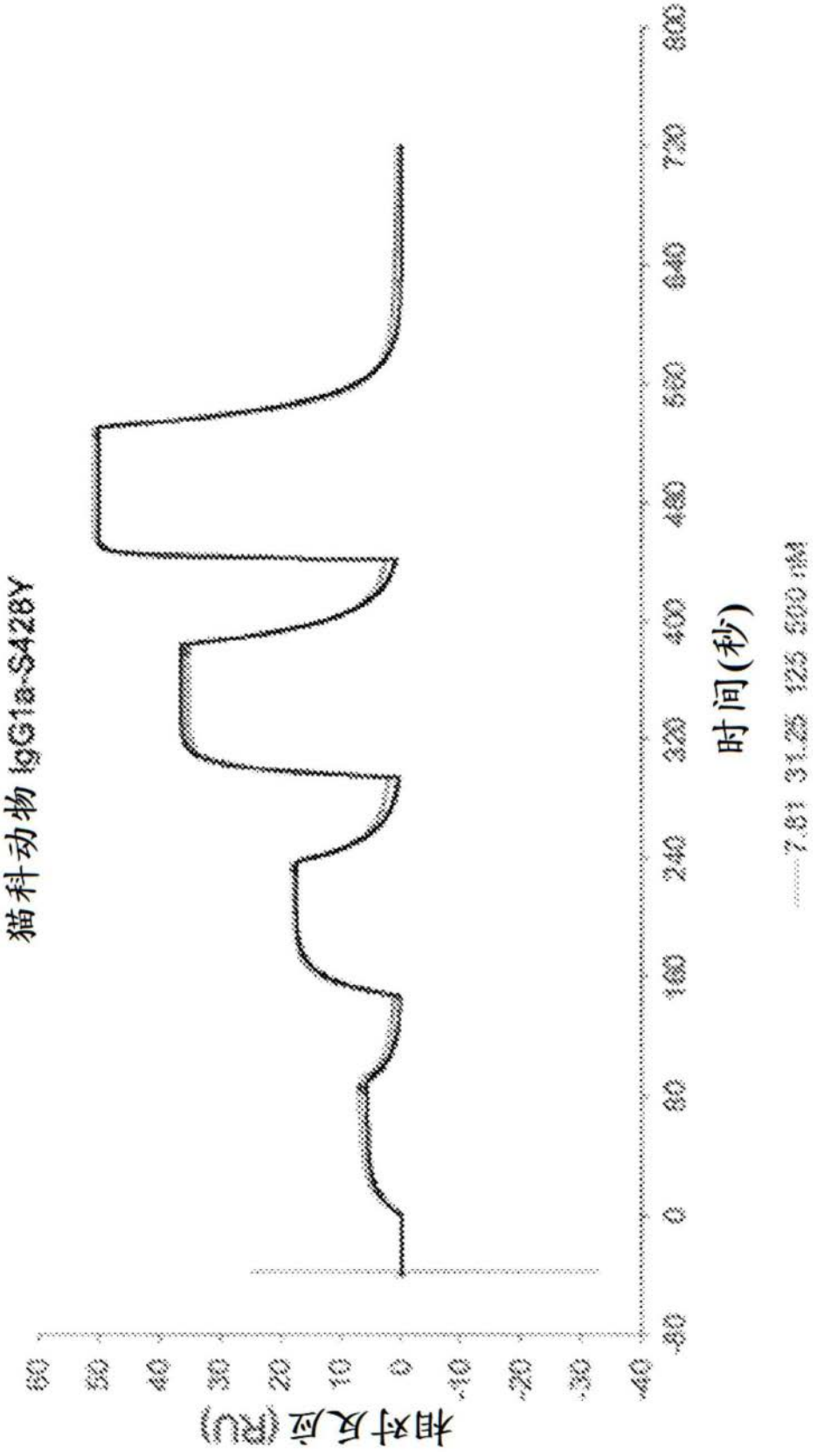


图49E

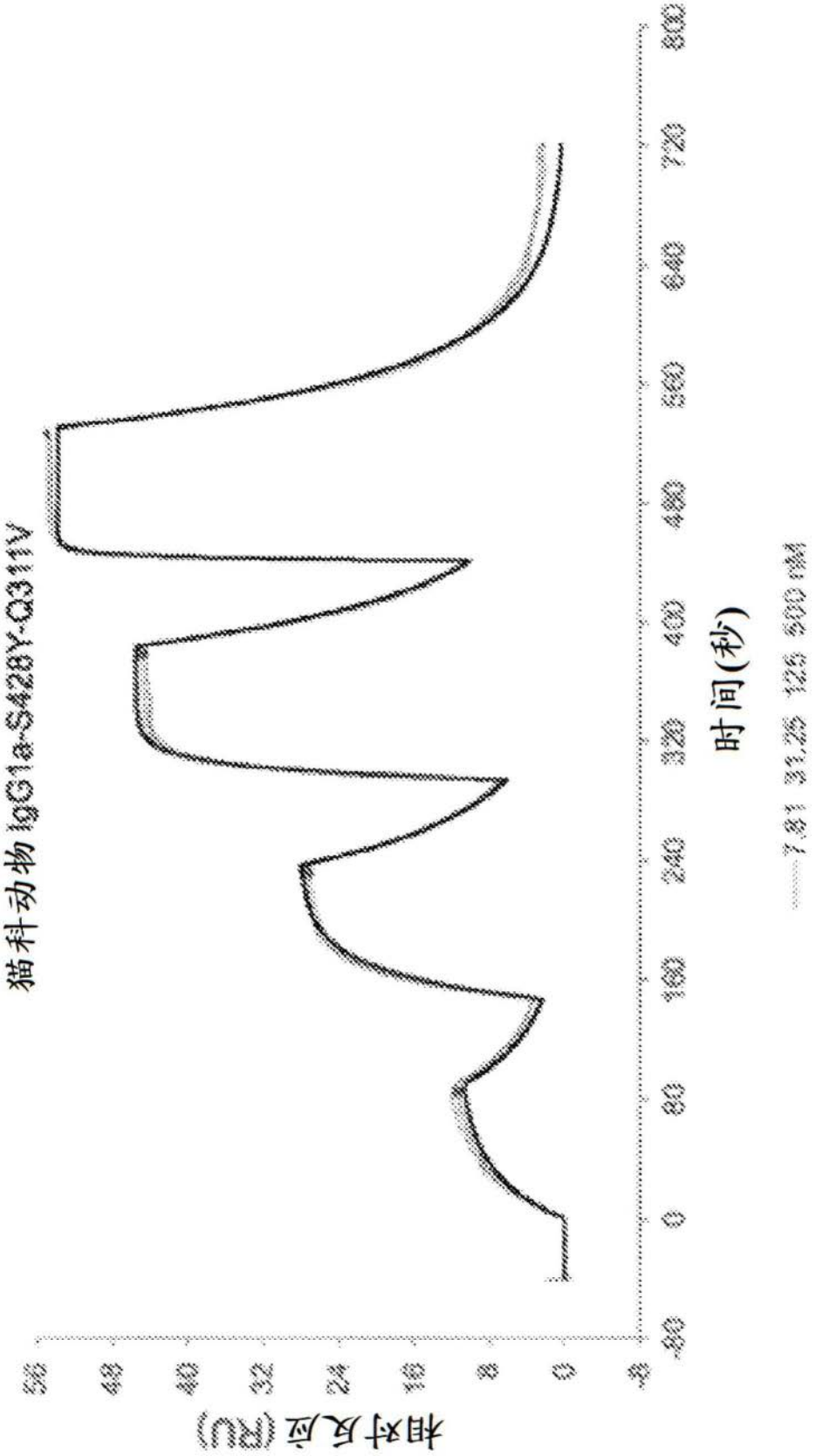

猫科动物 IgG1a-S428Y-Q311V
相对反应 (RU)
时间(秒)
-40
0
80
160
240
320
400
480
560
640
720
800
0
8
16
24
32
40
48
56
7.81 31.25 125 500 nM

图49F

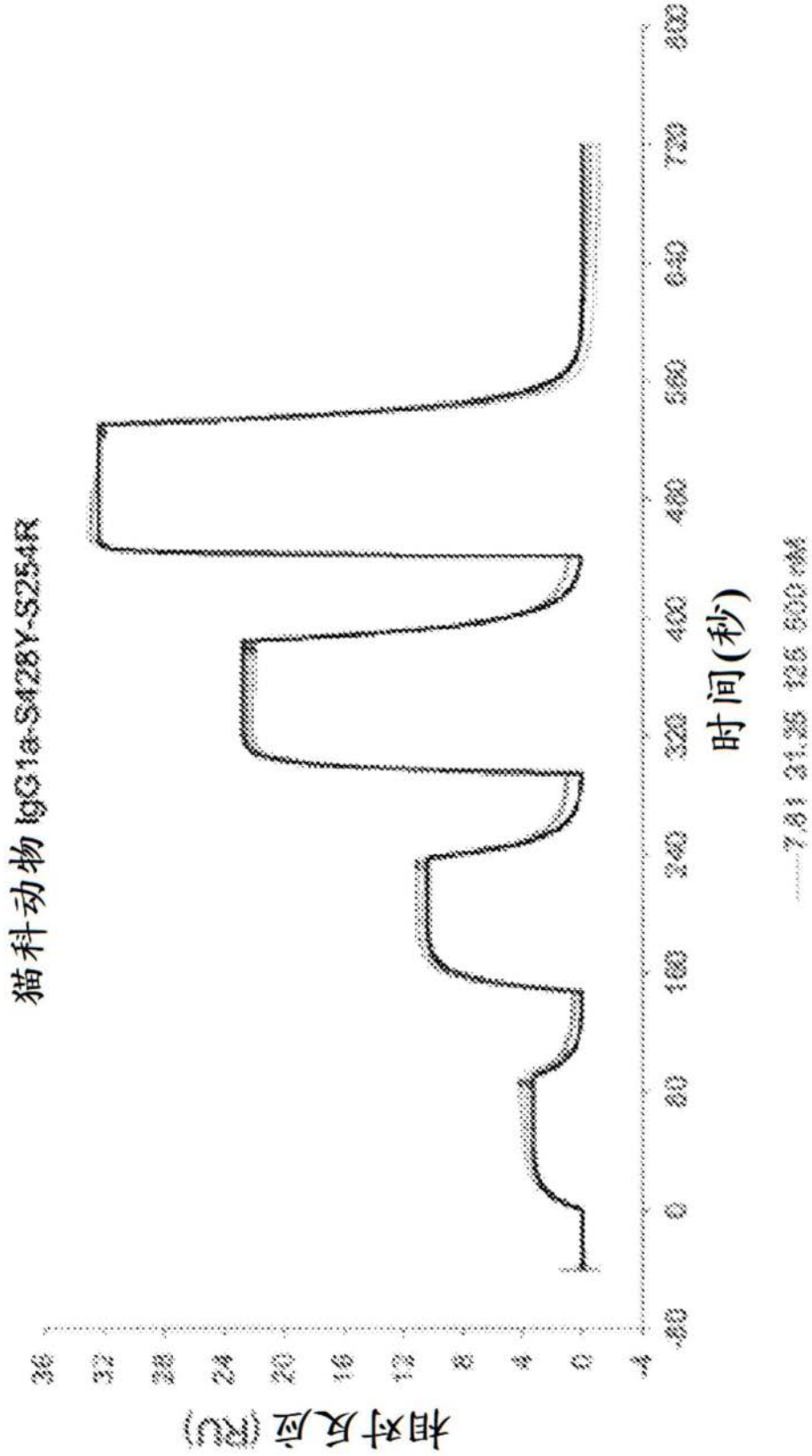


图49G

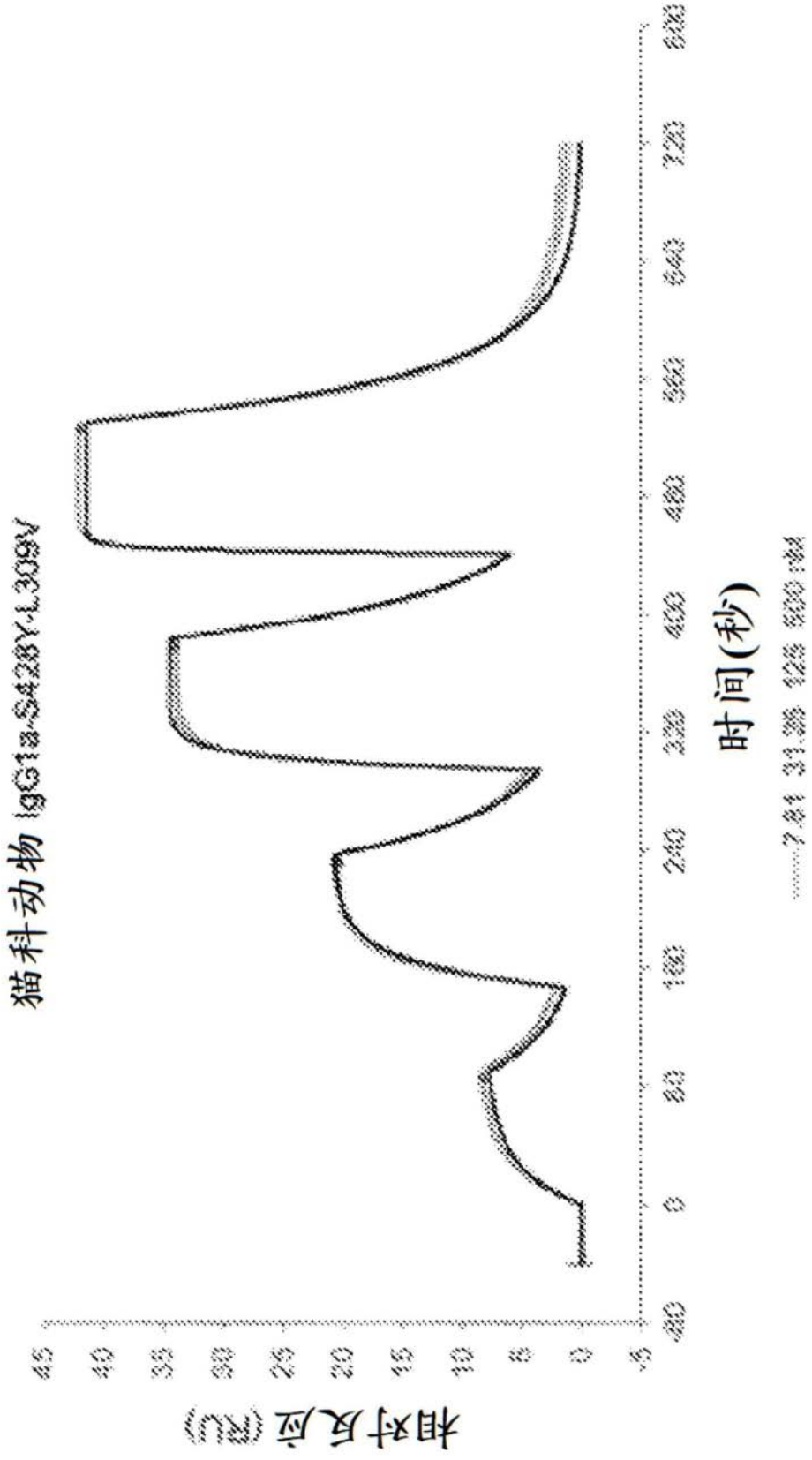


图49H

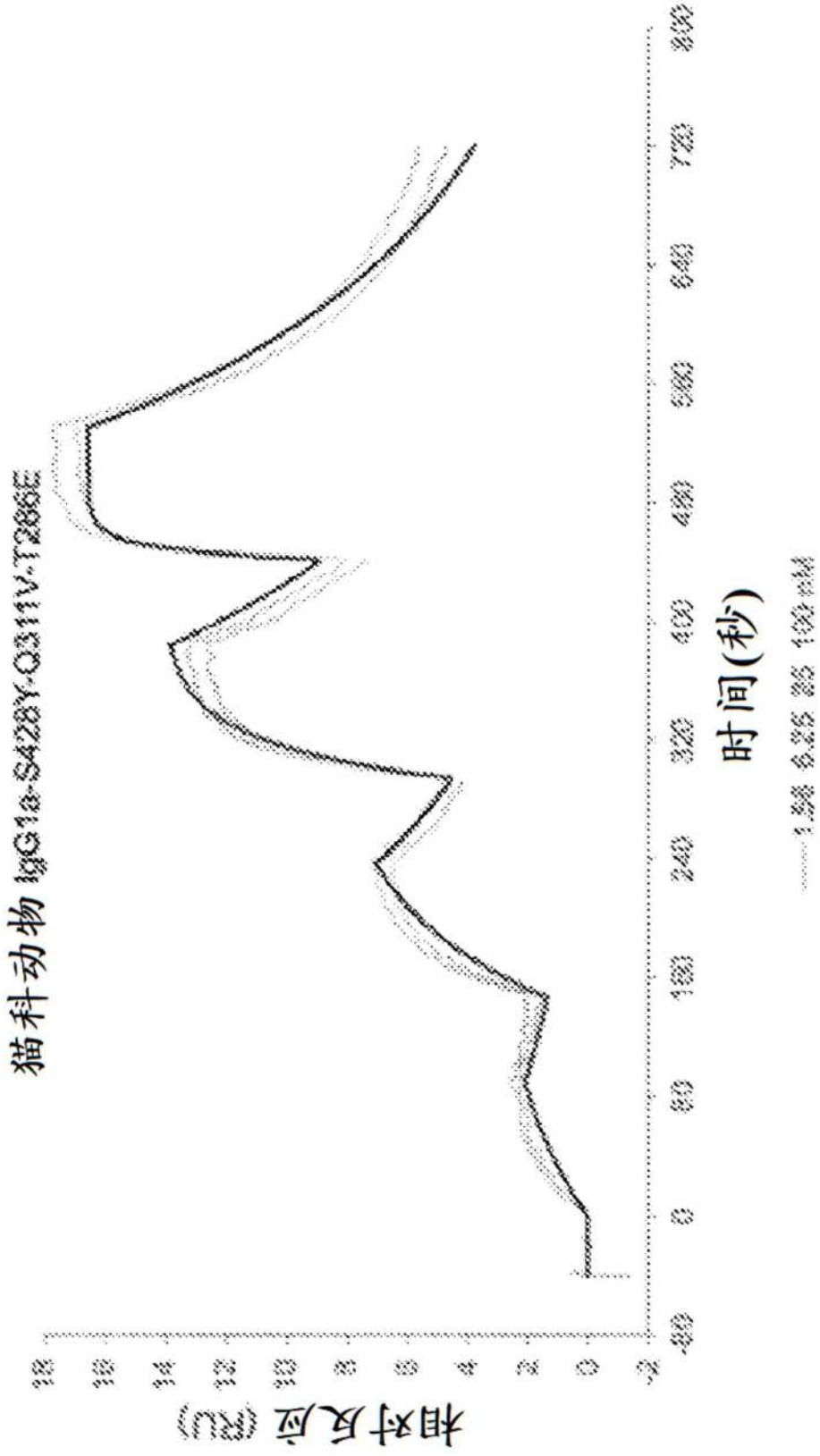


图49I

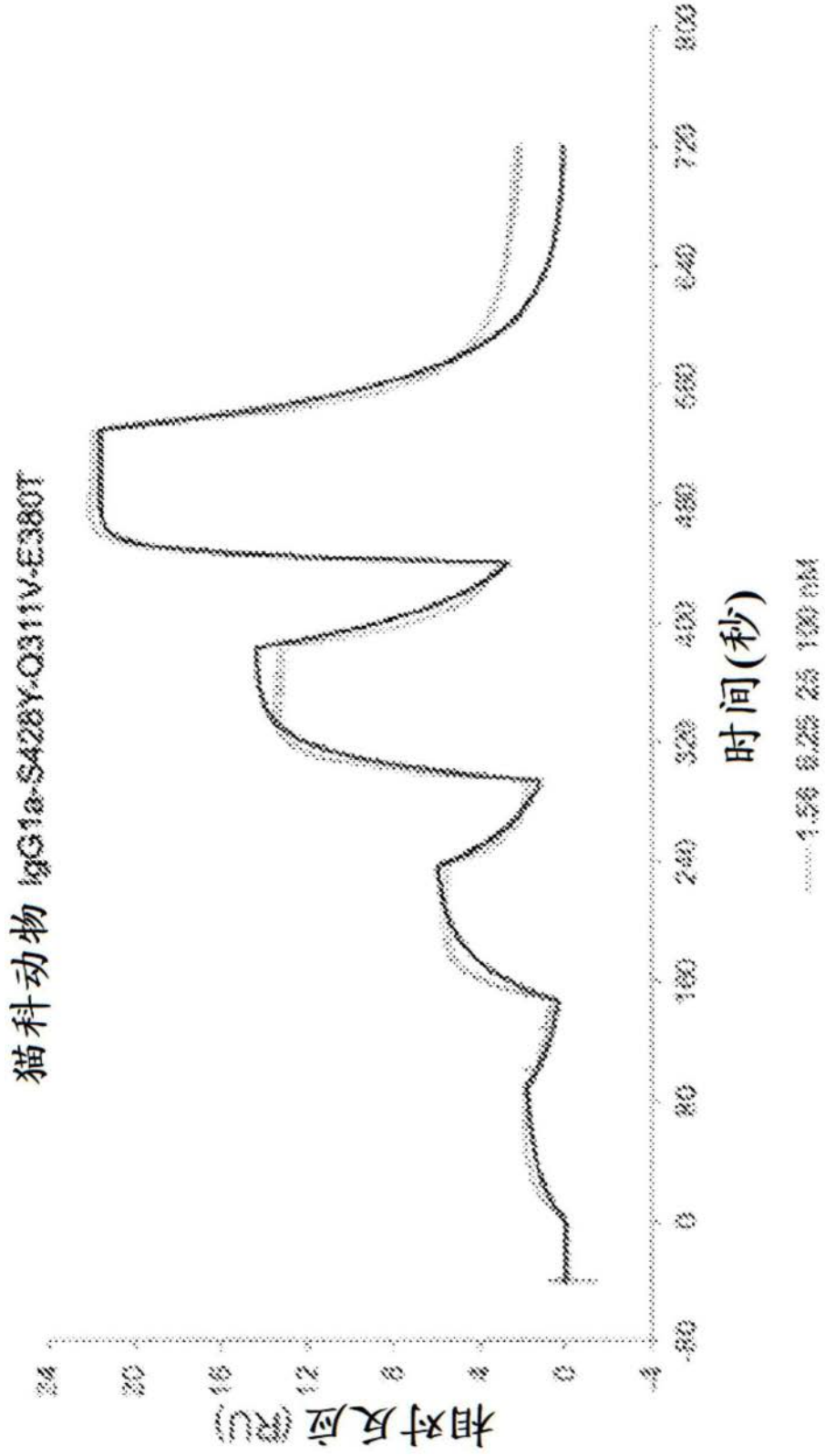


图49J

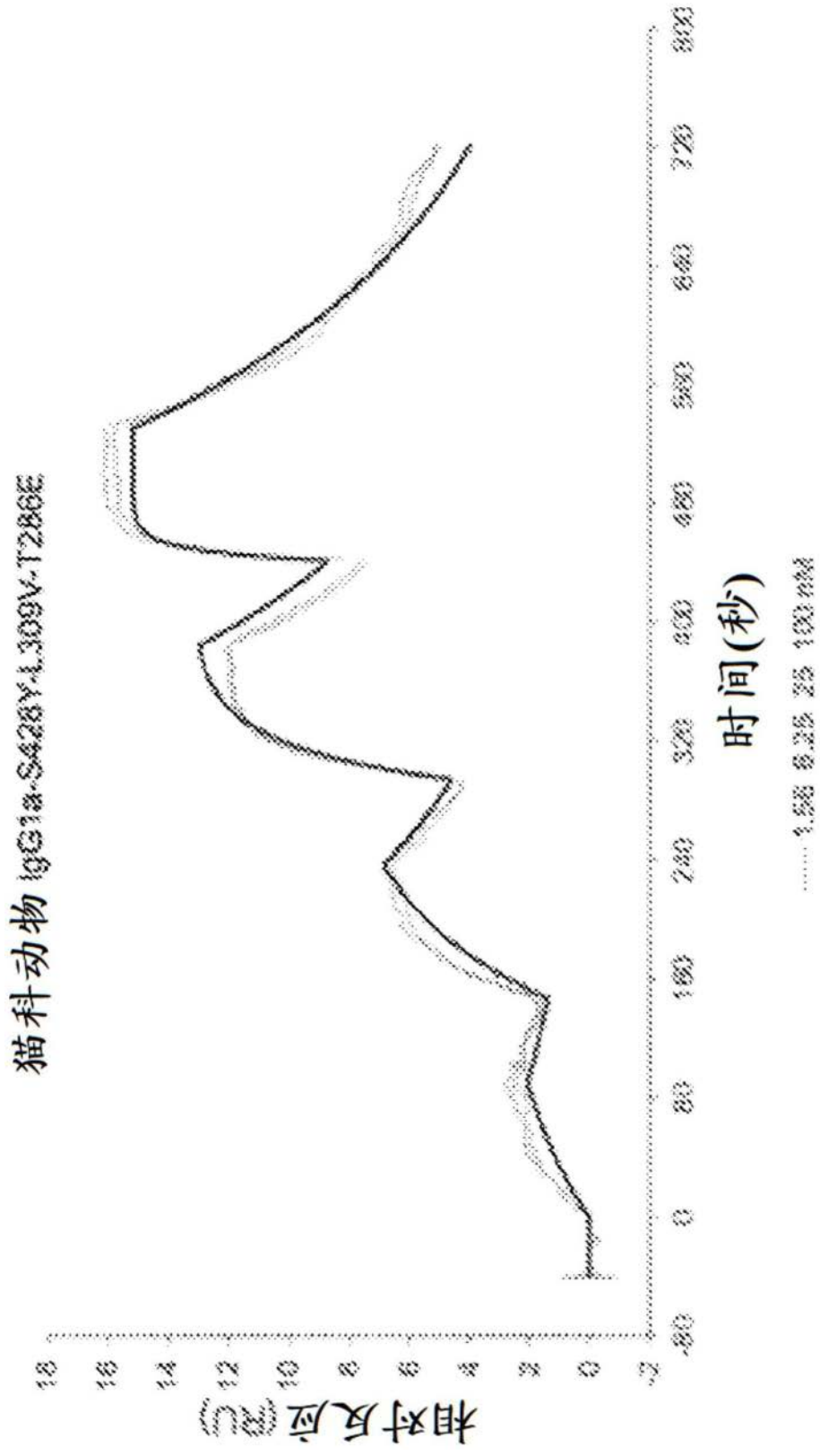


图49K

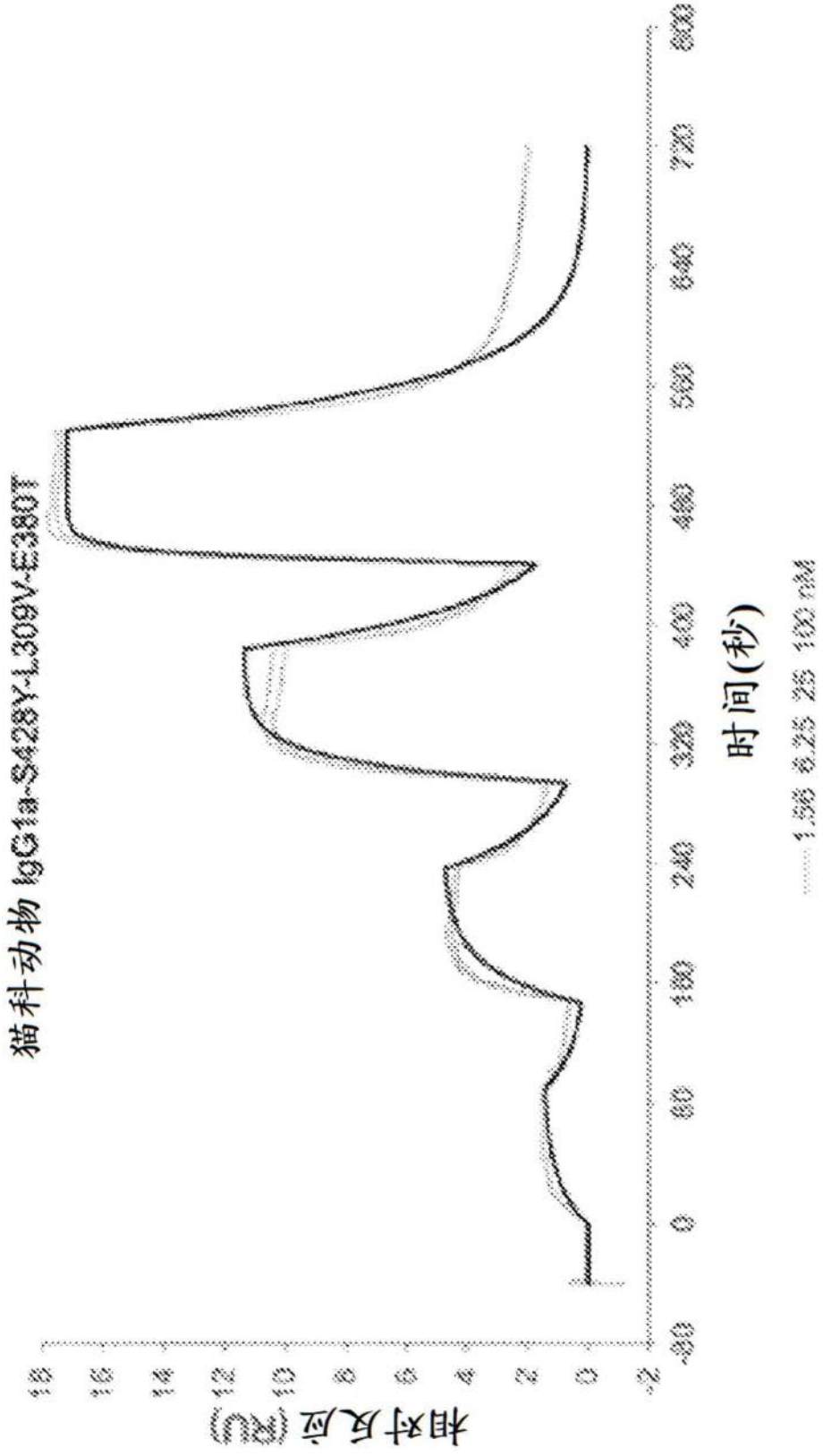


图49L

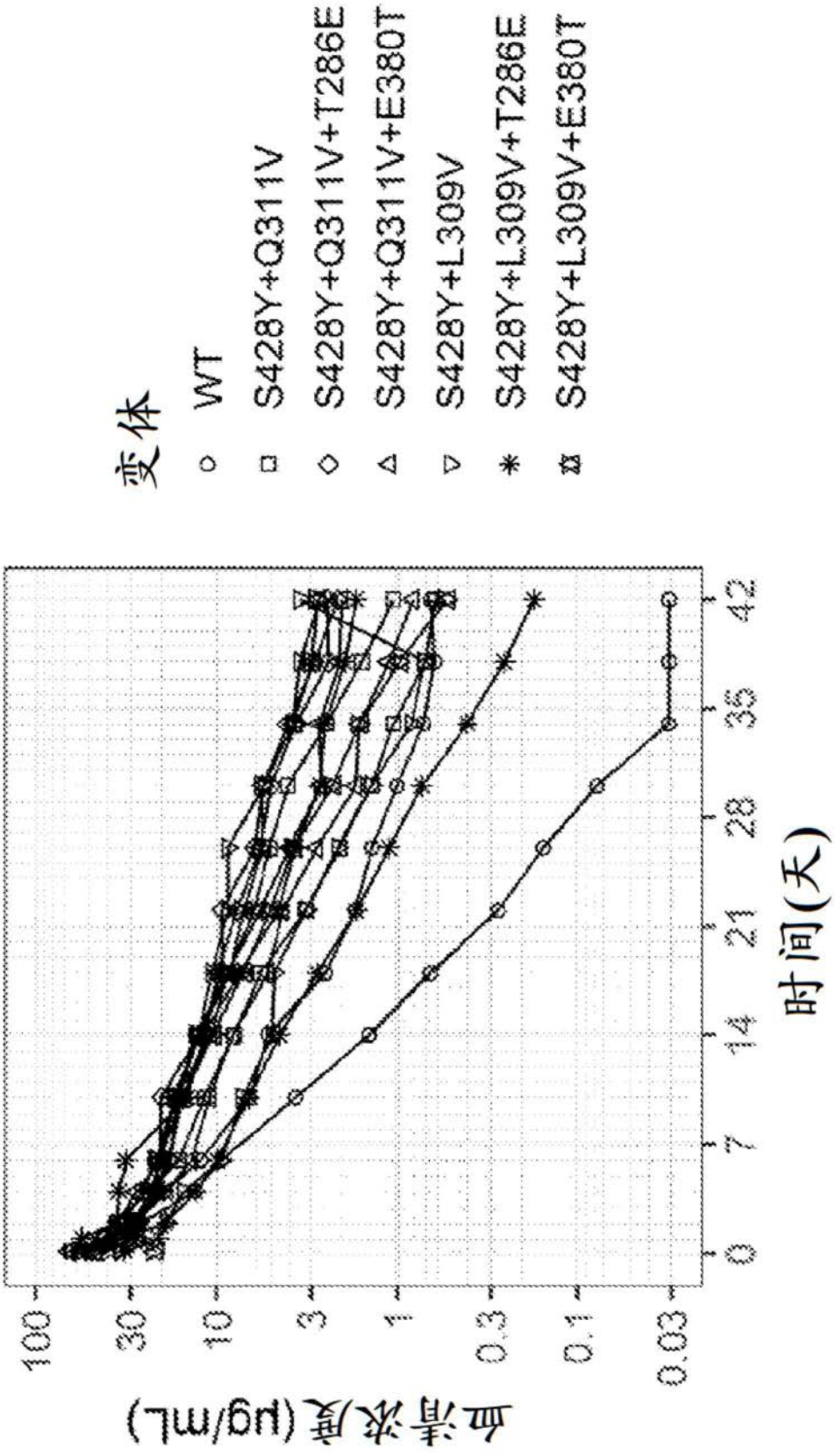

变体
WT
S428Y+Q311V
S428Y+Q311V+T286E
S428Y+Q311V+E380T
S428Y+L309V
S428Y+L309V+T286E
S428Y+L309V+E380T
血清浓度(μg/mL)
100
30
10
3
1
0.3
0.1
0.03
0
7
14
21
28
35
42
时间(天)

图50

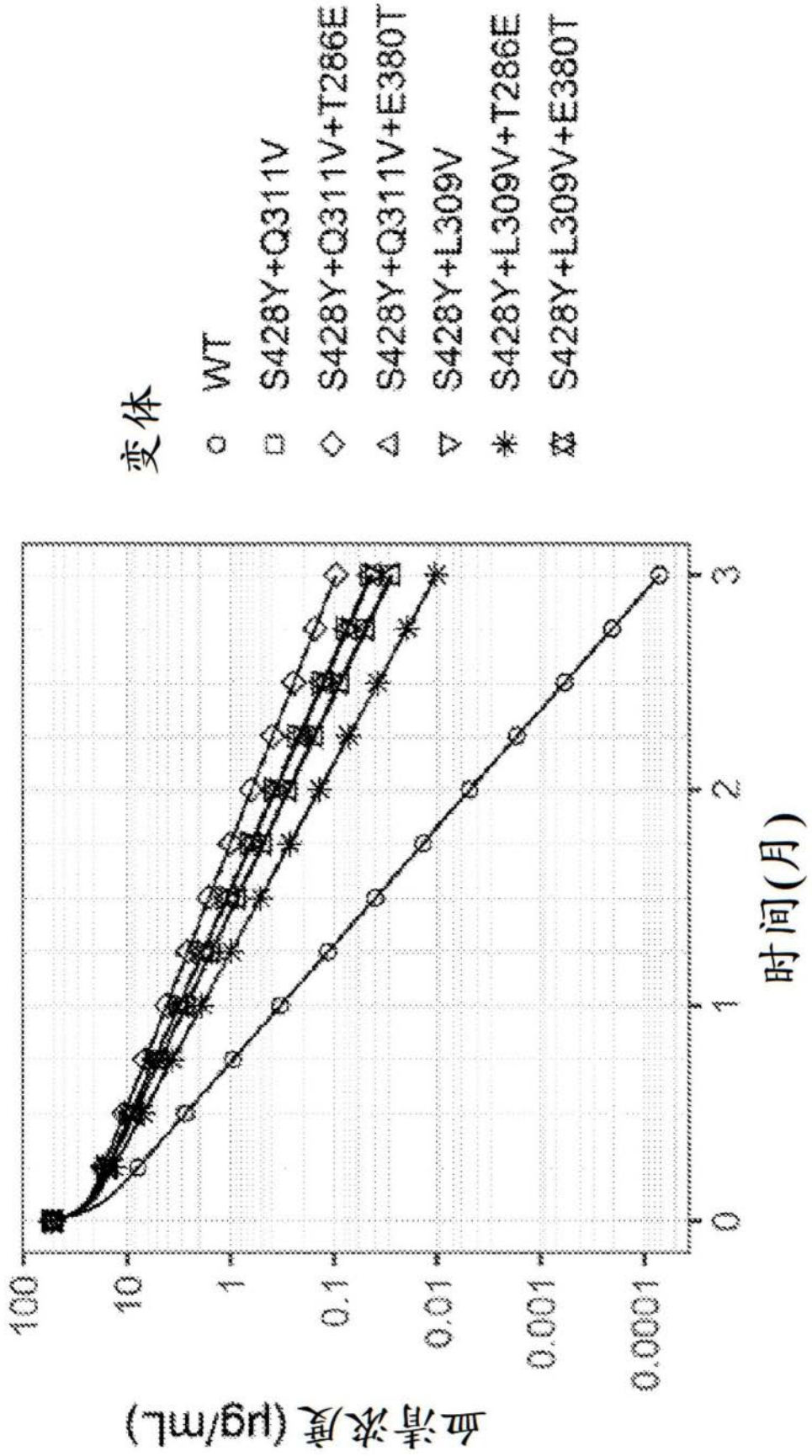

变体
WT
S428Y+Q311V
S428Y+Q311V+T286E
S428Y+Q311V+E380T
S428Y+L309V
S428Y+L309V+T286E
S428Y+L309V+E380T
血清浓度 (μg/mL)
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
0
1
2
3
时间(月)

图51