



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113382749 A

(43) 申请公布日 2021.09.10

(21) 申请号 201980059592.5

(22) 申请日 2019.07.11

(30) 优先权数据

62/696673 2018.07.11 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.03.11

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/041438 2019.07.11

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/014505 EN 2020.01.16

(71) 申请人 动量制药公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 J·C·兰辛 D·奥尔蒂斯

C·J·博斯克斯

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 李志强 黄希贵

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 47/68 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

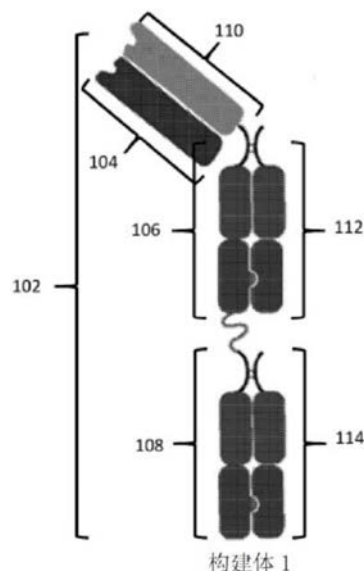
权利要求书47页 说明书201页 附图63页

(54) 发明名称

与工程化Fc-抗原结合结构域构建体有关的组合物和方法

(57) 摘要

本公开涉及工程化Fc-抗原结合结构域构建体的组合物和方法,其中所述Fc-抗原结合结构域构建体包括至少两个Fc结构域和至少一个抗原结合结构域。



1.一种组合物,其包含Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述Fc-抗原结合结构域构建体包含抗原结合结构域和通过接头与第二Fc结构域连接的第一Fc结构域,其中所述组合物中至少5%的聚糖缺少岩藻糖残基。

2.一种组合物,其包含多肽,所述多肽包含:抗原结合结构域;接头;第一IgG1 Fc结构域单体,其包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域;第二接头;第二IgG1 Fc结构域单体,其包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域;任选的第三接头;以及任选的第三IgG1 Fc结构域单体,其包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域,其中至少一个Fc结构域单体包含形成工程化突起的突变,并且其中所述组合物中至少5%的聚糖缺少岩藻糖残基。

3. 如权利要求2所述的组合物,其中所述抗原结合结构域包含抗体重链可变结构域。

4. 如权利要求2所述的组合物,其中所述抗原结合结构域包含抗体轻链可变结构域。

5.如权利要求2所述的组合物,其中所述第一IgG1 Fc结构域单体包含两个或四个反向电荷突变,并且所述第二IgG1 Fc结构域单体包含形成工程化突起的突变。

6. 如权利要求2所述的组合物,其中所述第一IgG1 Fc结构域单体包含形成工程化突起的突变,并且所述第二IgG1 Fc结构域单体包含两个或四个反向电荷突变。

7.如权利要求2所述的组合物,其中所述第一IgG1 Fc结构域单体和所述第二IgG恒定结构域单体均包含形成工程化突起的突变。

8.如权利要求2所述的组合物,其包含第三接头和第三IgG1 Fc结构域单体,其中所述第一IgG1 Fc结构域单体、所述第二IgG1 Fc结构域单体和所述第三IgG1 Fc结构域单体各自包含形成工程化突起的突变。

9.如权利要求2所述的组合物,其包含第三接头和第三IgG1 Fc结构域单体,其中所述第一IgG1 Fc结构域单体和所述第二IgG1 Fc结构域单体各自均包含形成工程化突起的突变,并且所述第三IgG1 Fc结构域单体包含两个或四个反向电荷突变。

10. 如权利要求2所述的组合物,其包含第三接头和第三IgG1 Fc结构域单体,其中所述第一IgG1 Fc结构域单体和所述第三IgG1 Fc结构域单体各自均包含形成工程化突起的突变,并且所述第二IgG1结构域单体包含两个或四个反向电荷突变。

11.如权利要求2所述的组合物,其包含第三接头和第三IgG1 Fc结构域单体,其中所述第二IgG1 Fc结构域单体和所述第三IgG1 Fc结构域单体各自均包含形成工程化突起的突变,并且所述第一IgG1结构域单体包含两个或四个反向电荷突变。

12.如权利要求2-11中任一项所述的多肽,其中包含形成工程化突起的突变的所述IgG1 Fc结构域单体还包含一个、两个或三个反向电荷突变。

13.如权利要求2-12中任一项所述的组合物,其中所述形成工程化突起的突变和所述反向电荷突变在所述CH3结构域中。

14. 如权利要求13所述的组合物,其中所述突变在从EU位置G341到EU位置K447的序列内,包括端点。

15. 如权利要求2-13中任一项所述的组合物,其中所述突变是单一氨基酸变化。

16. 如权利要求2所述的组合物,其中所述第二接头和所述任选的第三接头包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列或由这些氨基酸序列组成:

GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG、GGGS、GSGS、SGGG、GSGS、GSGSGS、GSGSGSGS、GSGSGSGSGS、
GSGSGSGSGSGS、GGS GGS、GGS GGSGGS、GGS GGSGGS GGSGGS、GGSG、GGSG、GGSGGGSG、GGSGGGSGGGSGGG

GGSGGGSGGGSGGGGS、GENLYFQSGG、SACYCELS、RSIAT、RPACKIPNDLKQKVMNH、GGSAGGSGSGSSG
GSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG、AAANSSIDLISVPVDSR、GSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGG
GS、GGGSGGGSGGGGS、SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG、GSGGGSGGGSGGGSGGS、GGGG、GGGGGGGG、
GGGGGGGGGGGG和GGGGGGGGGGGGGGGGGG。

17. 如权利要求2所述的组合物,其中所述第二接头和所述任选的第三接头是甘氨酸间隔物。

18. 如权利要求2所述的组合物,其中所述第二接头和所述任选的第三接头独立地由4至30、4至20、8至30、8至20、12至20或12至30个甘氨酸残基组成。

19. 如权利要求2所述的组合物,其中所述第二接头和所述任选的第三接头由20个甘氨酸残基组成。

20. 如权利要求2-19所述的组合物,其中至少一个所述Fc结构域单体在EU位置I253处包含单一氨基酸突变。

21. 如权利要求20所述的组合物,其中EU位置I253处的每个氨基酸突变独立地选自由以下项组成的组:I253A、I253C、I253D、I253E、I253F、I253G、I253H、I253I、I253K、I253L、I253M、I253N、I253P、I253Q、I253R、I253S、I253T、I253V、I253W和I253Y。

22. 如权利要求21所述的组合物,其中位置I253处的每个氨基酸突变是I253A。

23. 如权利要求2-22中任一项所述的组合物,其中至少一个所述Fc结构域单体在EU位置R292处包含单一氨基酸突变。

24. 如权利要求23所述的组合物,其中EU位置R292处的每个氨基酸突变独立地选自由以下项组成的组:R292D、R292E、R292L、R292P、R292Q、R292R、R292T和R292Y。

25. 如权利要求24所述的组合物,其中位置R292处的每个氨基酸突变是R292P。

26. 如权利要求2-25中任一项所述的组合物,其中每个Fc结构域单体的所述铰链独立地包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列或由这些氨基酸序列组成:EPKSCDKTHTCPPCPAPELL和DKTHTCPPCPAPELL。

27. 如权利要求26所述的组合物,其中所述第二Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体的所述铰链部分具有氨基酸序列DKTHTCPPCPAPELL。

28. 如权利要求26所述的组合物,其中所述第一Fc结构域单体的所述铰链部分具有氨基酸序列EPKSCDKTHTCPPCPAPELL。

29. 如权利要求26所述的组合物,其中所述第一Fc结构域单体的所述铰链部分具有氨基酸序列EPKSCDKTHTCPPCPAPELL,并且所述第二Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体的所述铰链部分具有氨基酸序列DKTHTCPPCPAPELL。

30. 如权利要求2-29中任一项所述的组合物,其中每个Fc结构域单体的所述CH2结构域独立地包含以下氨基酸序列:GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK,其具有不超过两个单一氨基酸缺失或置换。

31. 如权利要求2-29中任一项所述的组合物,其中每个Fc结构域单体的所述CH2结构域是相同的并且包含以下氨基酸序列:GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK,其具有不超过两个单一氨基酸缺失或置换。

32. 如权利要求2-29中任一项所述的组合物,其中每个Fc结构域单体的所述CH2结构域是相同的并且包含以下氨基酸序列:GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK,其具有不超过两个单一氨基酸置换。

33. 如权利要求2-29中任一项所述的组合物,其中每个Fc结构域单体的所述CH2结构域是相同的并且包含以下氨基酸序列:GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK。

34. 如权利要求2-29中任一项所述的组合物,其中每个Fc结构域单体的所述CH3结构域独立地包含以下氨基酸序列:GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG,其具有不超过10个单一氨基酸置换。

35. 如权利要求2-29中任一项所述的组合物,其中每个Fc结构域单体的所述CH3结构域独立地包含以下氨基酸序列:GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG,其具有不超过8个单一氨基酸置换。

36. 如权利要求2-29中任一项所述的组合物,其中每个Fc结构域单体的所述CH3结构域独立地包含以下氨基酸序列:GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG,其具有不超过6个单一氨基酸置换。

37. 如权利要求2-29中任一项所述的组合物,其中每个Fc结构域单体的所述CH3结构域独立地包含以下氨基酸序列:GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG,其具有不超过5个单一氨基酸置换。

38. 如权利要求30-37中任一项所述的组合物,其中所述单一氨基酸置换选自自由以下项组成的组:T366Y、T366W、T394W、T394Y、F405W、F405A、Y407A、S354C、Y349T、T394F、K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R、D356K和D356R。

39. 如权利要求2-29中任一项所述的组合物,其中每个所述Fc结构域单体独立地包含SEQ ID NO:42、43、45和47中任一者具有多至10个单一氨基酸置换的氨基酸序列。

40. 如权利要求39所述的组合物,其中多至6个所述单一氨基酸置换是所述CH3结构域中的反向电荷突变或是形成工程化突起的突变。

41. 如权利要求39所述的组合物,其中所述单一氨基酸置换在从EU位置G341到EU位置K447的序列内,包括端点。

42. 如权利要求2所述的组合物,其中至少一个所述形成工程化突起的突变选自自由以下项组成的组:T366Y、T366W、T394W、T394Y、F405W、F405A、Y407A、S354C、Y349T和T394F。

43. 如权利要求5、6和9-29中任一项所述的组合物,其中所述两个或四个反向电荷突变选自:K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R、D356K和D356R。

44. 如权利要求2-43中任一项所述的组合物,其中所述抗原结合结构域是scFv。

45. 如权利要求2-43中任一项所述的组合物,其中所述抗原结合结构域包含VH结构域

和CH1结构域。

46. 如权利要求43所述的组合物,其中所述抗原结合结构域还包含VL结构域。

47. 如权利要求45所述的组合物,其中所述VH结构域包含表1中列出的一组CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列。

48. 如权利要求45所述的组合物,其中所述VH结构域包含含有表2中列出的抗体的序列的VH结构域的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3。

49. 如权利要求45所述的组合物,其中所述VH结构域包含表2中列出的抗体的VH序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,并且所述VH序列不包括所述CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列时与表2中列出的抗体的所述VH序列具有至少95%或98%的同一性。

50. 如权利要求45所述的组合物,其中所述VH结构域包含表2中列出的抗体的VH序列。

51. 如权利要求45所述的组合物,其中所述抗原结合结构域包含表1中列出的一组CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列。

52. 如权利要求45所述的组合物,其中所述抗原结合结构域包含来自表2中列出的抗体的一组VH和VL序列的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列。

53. 如权利要求45所述的组合物,其中所述抗原结合结构域包含VH结构域和VL结构域,所述VH结构域包含表2中列出的抗体的VH序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,并且所述VL结构域包含表2中列出的抗体的VL序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,其中所述VH结构域和所述VL结构域序列不包括所述CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列时与表2中列出的抗体的所述VH序列和所述VL序列具有至少95%或98%的同一性。

54. 如权利要求45所述的组合物,其中所述抗原结合结构域包含表2中列出的抗体的一组VH和VL序列。

55. 如权利要求2-43所述的组合物,其中所述抗原结合结构域包含IgGCL抗体恒定结构域和IgG CH1抗体恒定结构域。

56. 如权利要求2-43所述的组合物,其中所述抗原结合结构域包含VH结构域和CH1结构域,并且可以与包含VL结构域和CL结构域的多肽结合以形成Fab。

57. 一种多肽复合物,其包含如权利要求2-56中任一项所述的组合物的两个拷贝,所述两个拷贝通过第一IgG1 Fc结构域单体或第二IgG1 Fc结构域单体的铰链内的半胱氨酸残基之间的二硫键连接。

58. 一种组合物,其包含多肽复合物,所述多肽复合物包含与第二多肽连接的如权利要求2-56中任一项所述的多肽,所述第二多肽包含IgG1 Fc结构域单体,所述IgG1 Fc结构域单体包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域,其中所述多肽和所述第二多肽通过所述多肽的第一IgG1 Fc结构域单体、第二IgG1 Fc结构域单体或第三IgG1 Fc结构域单体的所述铰链结构域内的半胱氨酸残基与所述第二多肽的所述铰链结构域内的半胱氨酸残基之间的二硫键连接,其中所述组合物中至少5%的聚糖缺少岩藻糖残基。

59. 如权利要求58所述的组合物,其中所述第二多肽单体包含形成工程化空腔的突变。

60. 如权利要求59所述的组合物,其中所述形成工程化空腔的突变选自以下项组成的组:Y407T、Y407A、F405A、T394S、T394W/Y407A、T366W/T394S、T366S/L368A/Y407V/Y349C、S364H/F405A。

61. 如权利要求58-60中任一项所述的组合物,其中所述第二多肽包含SEQ ID NO:42、

43、45和47中任一者具有多至10个单一氨基酸置换的氨基酸序列。

62. 一种多肽,其包含:抗原结合结构域;接头;第一IgG1 Fc结构域单体,其包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域;第二接头;第二IgG1 Fc结构域单体,其包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域;任选的第三接头;以及任选的第三IgG1 Fc结构域单体,其包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域,

其中至少一个Fc结构域单体包含一个、两个或三个反向电荷氨基酸突变。

63. 如权利要求62所述的组合物,其中所述抗原结合结构域包含抗体重链可变结构域。

64. 如权利要求62所述的组合物,其中所述抗原结合结构域包含抗体轻链可变结构域。

65. 如权利要求62所述的组合物,其中所述第一IgG1 Fc结构域单体包含选自表5中的突变的一组两个反向电荷突变或选自表6中的突变的一组四个反向电荷突变,并且所述第二IgG1 Fc结构域单体包括选自表4的一个、两个或三个反向电荷氨基酸突变。

66. 如权利要求62所述的组合物,其中所述第一IgG1 Fc结构域单体包含选自表4的一个、两个或三个反向电荷氨基酸突变,并且所述第二IgG1Fc结构域单体包含选自表5中的突变的一组两个反向电荷突变或选自表6中的突变的一组四个反向电荷突变。

67. 如权利要求62所述的组合物,其中所述第一IgG1 Fc结构域单体和所述第二IgG恒定结构域单体均包含选自表4的一个、两个或三个反向电荷氨基酸突变。

68. 如权利要求62所述的组合物,其包含第三接头和第三IgG1 Fc结构域单体,其中所述第一IgG1 Fc结构域单体、所述第二IgG1 Fc结构域单体和所述第三IgG1 Fc结构域单体各自包含选自表4的一个、两个或三个反向电荷氨基酸突变。

69. 如权利要求62所述的组合物,其包含第三接头和第三IgG1 Fc结构域单体,其中所述第一IgG1 Fc结构域单体和所述第二IgG1 Fc结构域单体各自均包含选自表4的一个、两个或三个反向电荷氨基酸突变,并且所述第三IgG1 Fc结构域单体包含选自表5中的突变的一组两个反向电荷突变或选自表6中的突变的一组四个反向电荷突变。

70. 如权利要求62所述的组合物,其包含第三接头和第三IgG1 Fc结构域单体,其中所述第一IgG1 Fc结构域单体和所述第三IgG1 Fc结构域单体各自均包含选自表4的一个、两个或三个反向电荷氨基酸突变,并且所述第二IgG1结构域单体包含选自表5中的突变的一组两个反向电荷突变或选自表6中的突变的一组四个反向电荷突变。

71. 如权利要求62所述的组合物,其包含第三接头和第三IgG1 Fc结构域单体,其中所述第二IgG1 Fc结构域单体和所述第三IgG1 Fc结构域单体各自均包含选自表4的一个、两个或三个反向电荷氨基酸突变,并且所述第一IgG1结构域单体包含选自表5中的突变的一组两个反向电荷突变或选自表6中的突变的一组四个反向电荷突变。

72. 如权利要求62-71中任一项所述的多肽,其中包含选自表4的一个、两个或三个反向电荷氨基酸突变的所述IgG1 Fc结构域单体具有相同的CH3结构域。

73. 如权利要求62-72中任一项所述的组合物,其中选自表4的一个、两个或三个反向电荷氨基酸突变在所述CH3结构域中。

74. 如权利要求73所述的组合物,其中所述突变在从EU位置G341到EU位置K447的序列内,包括端点。

75. 如权利要求62-73中任一项所述的组合物,其中所述突变各自是单一氨基酸变化。

76. 如权利要求72所述的组合物,其中所述第二接头和所述任选的第三接头包含选自

域是相同的并且包含以下氨基酸序列:GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK,其具有不超过两个单一氨基酸缺失或置换。

92. 如权利要求62-89中任一项所述的组合物,其中每个Fc结构域单体的所述CH2结构域是相同的并且包含以下氨基酸序列:GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK,其具有不超过两个单一氨基酸置换。

93. 如权利要求62-89中任一项所述的组合物,其中每个Fc结构域单体的所述CH2结构域是相同的并且包含以下氨基酸序列:GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK。

94. 如权利要求62-89中任一项所述的组合物,其中每个Fc结构域单体的所述CH3结构域独立地包含以下氨基酸序列:GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG,其具有不超过10个单一氨基酸置换。

95. 如权利要求62-89中任一项所述的组合物,其中每个Fc结构域单体的所述CH3结构域独立地包含以下氨基酸序列:GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG,其具有不超过8个单一氨基酸置换。

96. 如权利要求62-89中任一项所述的组合物,其中每个Fc结构域单体的所述CH3结构域独立地包含以下氨基酸序列:GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG,其具有不超过6个单一氨基酸置换。

97. 如权利要求62-89中任一项所述的组合物,其中每个Fc结构域单体的所述CH3结构域独立地包含以下氨基酸序列:GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG,其具有不超过5个单一氨基酸置换。

98. 如权利要求90-97中任一项所述的组合物,其中所述单一氨基酸置换选自以下项组成的组:T366Y、T366W、T394W、T394Y、F405W、F405A、Y407A、S354C、Y349T、T394F、K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R、D356K和D356R。

99. 如权利要求62-89中任一项所述的组合物,其中每个所述Fc结构域单体独立地包含SEQ ID NO:42、43、45和47中任一者具有多至10个单一氨基酸置换的氨基酸序列。

100. 如权利要求99所述的组合物,其中多至6个所述单一氨基酸置换是所述CH3结构域中的反向电荷突变。

101. 如权利要求99所述的组合物,其中所述单一氨基酸置换在从EU位置G341到EU位置K447的序列内,包括端点。

102. 如权利要求62所述的组合物,其中至少一个所述形成工程化突起的突变选自以下项组成的组:T366Y、T366W、T394W、T394Y、F405W、S354C、Y349T和T394F。

103. 如权利要求65、66和69-89中任一项所述的组合物,其中所述两个或四个反向电荷突变选自:K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R、D356K和

D356R。

104. 如权利要求62-103中任一项所述的组合物,其中所述抗原结合结构域是scFv。

105. 如权利要求62-103中任一项所述的组合物,其中所述抗原结合结构域包含VH结构域和CH1结构域。

106. 如权利要求103所述的组合物,其中所述抗原结合结构域还包含VL结构域。

107. 如权利要求105所述的组合物,其中所述VH结构域包含表1中列出的一组CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列。

108. 如权利要求105所述的组合物,其中所述VH结构域包含含有表2中列出的抗体的序列的VH结构域的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3。

109. 如权利要求105所述的组合物,其中所述VH结构域包含表2中列出的抗体的VH序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,并且所述VH序列不包括所述CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列时与表2中列出的抗体的所述VH序列具有至少95%或98%的同一性。

110. 如权利要求105所述的组合物,其中所述VH结构域包含表2中列出的抗体的VH序列。

111. 如权利要求105所述的组合物,其中所述抗原结合结构域包含表1中列出的一组CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列。

112. 如权利要求105所述的组合物,其中所述抗原结合结构域包含来自表2中列出的抗体的一组VH和VL序列的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列。

113. 如权利要求105所述的组合物,其中所述抗原结合结构域包含VH结构域和VL结构域,所述VH结构域包含表2中列出的抗体的VH序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,并且所述VL结构域包含表2中列出的抗体的VL序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,其中所述VH结构域和所述VL结构域序列不包括所述CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列时与表2中列出的抗体的所述VH序列和所述VL序列具有至少95%或98%的同一性。

114. 如权利要求105所述的组合物,其中所述抗原结合结构域包含表2中列出的抗体的一组VH和VL序列。

115. 如权利要求62-103所述的组合物,其中所述抗原结合结构域包含IgG CL抗体恒定结构域和IgG CH1抗体恒定结构域。

116. 如权利要求62-103所述的组合物,其中所述抗原结合结构域包含VH结构域和CH1结构域,并且可以与包含VL结构域和CL结构域的多肽结合以形成Fab。

117. 一种组合物,其包含如权利要求2-56中任一项所述的组合物的两个拷贝,所述两个拷贝通过第一IgG1 Fc结构域单体或第二IgG1 Fc结构域单体的铰链内的半胱氨酸残基之间的二硫键连接。

118. 一种组合物,其包含与第二多肽连接的如权利要求62-116中任一项所述的组合物,所述第二多肽包含IgG1 Fc结构域单体,所述IgG1 Fc结构域单体包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域,其中所述多肽和所述第二多肽通过所述多肽的第一IgG1 Fc结构域单体、第二IgG1 Fc结构域单体或第三IgG1 Fc结构域单体的所述铰链结构域内的半胱氨酸残基与所述第二多肽的所述铰链结构域内的半胱氨酸残基之间的二硫键连接。

119. 如权利要求118所述的组合物,其中所述第二多肽单体包含一个、两个或三个反向电荷突变。

120. 如权利要求129所述的组合物,其中所述第二多肽单体包含选自表4的一个、两个或三个反向电荷突变,并且与所述多肽中选自表4的所述一个、两个或三个反向电荷突变互补。

121. 如权利要求118-120中任一项所述的组合物,其中所述第二多肽包含SEQ ID NO: 42、43、45和47中任一者具有多至10个单一氨基酸置换的氨基酸序列。

122. 一种多肽,其包含:第一IgG1 Fc结构域单体,其包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域;第二接头;第二IgG1 Fc结构域单体,其包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域;任选的第三接头;以及任选的第三IgG1 Fc结构域单体,其包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域,

其中至少一个Fc结构域单体包含形成工程化突起的突变。

123. 如权利要求122所述的组合物,其还包含抗体重链可变结构域和所述第一IgG1单体的氨基末端的CH1结构域。

124. 如权利要求122所述的组合物,其还包含所述第一IgG1单体的氨基末端的scFv。

125. 如权利要求122所述的组合物,其中所述第一IgG1 Fc结构域单体包含两个或四个反向电荷突变,并且所述第二IgG1 Fc结构域单体包含形成工程化突起的突变。

126. 如权利要求122所述的组合物,其中所述第一IgG1 Fc结构域单体包含形成工程化突起的突变,并且所述第二IgG1 Fc结构域单体包含两个或四个反向电荷突变。

127. 如权利要求122所述的组合物,其中所述第一IgG1 Fc结构域单体和所述第二IgG恒定结构域单体均包含形成工程化突起的突变。

128. 如权利要求2所述的组合物,其包含第三接头和第三IgG1 Fc结构域单体,其中所述第一IgG1 Fc结构域单体、所述第二IgG1 Fc结构域单体和所述第三IgG1 Fc结构域单体各自包含形成工程化突起的突变。

129. 如权利要求122所述的组合物,其包含第三接头和第三IgG1 Fc结构域单体,其中所述第一IgG1 Fc结构域单体和所述第二IgG1 Fc结构域单体各自均包含形成工程化突起的突变,并且所述第三IgG1 Fc结构域单体包含两个或四个反向电荷突变。

130. 如权利要求122所述的组合物,其包含第三接头和第三IgG1 Fc结构域单体,其中所述第一IgG1 Fc结构域单体和所述第三IgG1 Fc结构域单体各自均包含形成工程化突起的突变,并且所述第二IgG1结构域单体包含两个或四个反向电荷突变。

131. 如权利要求122所述的组合物,其包含第三接头和第三IgG1 Fc结构域单体,其中所述第二IgG1 Fc结构域单体和所述第三IgG1 Fc结构域单体各自均包含形成工程化突起的突变,并且所述第一IgG1结构域单体包含两个或四个反向电荷突变。

132. 如权利要求122-131中任一项所述的多肽,其中包含形成工程化突起的突变的所述IgG1 Fc结构域单体还包含一个、两个或三个反向电荷突变。

133. 如权利要求122-131中任一项所述的组合物,其中所述形成工程化突起的突变和所述反向电荷突变在所述CH3结构域中。

134. 一种多肽,其包含:第一IgG1 Fc结构域单体,其包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域;第二接头;第二IgG1 Fc结构域单体,其包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域;任选的第三接头;以及任选的第三IgG1 Fc结构域单体,其包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域,

其中至少一个Fc结构域单体包含一个、两个或三个反向电荷氨基酸突变。

135.如权利要求134所述的组合物,其还包含抗体重链可变结构域和所述第一IgG1 Fc结构域单体的氨基末端的CH1结构域。

136.如权利要求134所述的组合物,其还包含所述第一IgG1 Fc结构域单体的氨基末端的scFv。

137. 如权利要求134所述的组合物,其中所述第一IgG1 Fc结构域单体包含选自表5中的突变的一组两个反向电荷突变或选自表6中的突变的一组四个反向电荷突变,并且所述第二IgG1 Fc结构域单体包括选自表4的一个、两个或三个反向电荷氨基酸突变。

138. 如权利要求134所述的组合物, 其中所述第一IgG1 Fc结构域单体包含选自表4的一个、两个或三个反向电荷氨基酸突变, 并且所述第二IgG1 Fc结构域单体包含选自表5中的突变的一组两个反向电荷突变或选自表6中的突变的一组四个反向电荷突变。

139. 如权利要求134所述的组合物, 其中所述第一IgG1 Fc结构域单体和所述第二IgG1 Fc结构域单体均包含选自表4的一个、两个或三个反向电荷氨基酸突变。

140. 如权利要求134所述的组合物,其包含第三接头和第三IgG1 Fc结构域单体,其中所述第一IgG1 Fc结构域单体、所述第二IgG1 Fc结构域单体和所述第三IgG1 Fc结构域单体各自包含选自表4的一个、两个或三个反向电荷氨基酸突变。

141. 如权利要求134所述的组合物,其包含第三接头和第三IgG1 Fc结构域单体,其中所述第一IgG1 Fc结构域单体和所述第二IgG1 Fc结构域单体各自均包含选自表4的一个、两个或三个反向电荷氨基酸突变,并且所述第三IgG1 Fc结构域单体包含选自表5中的突变的一组两个反向电荷突变或选自表6中的突变的一组四个反向电荷突变。

142. 如权利要求134所述的组合物,其包含第三接头和第三IgG1 Fc结构域单体,其中所述第一IgG1 Fc结构域单体和所述第三IgG1 Fc结构域单体各自均包含选自表4的一个、两个或三个反向电荷氨基酸突变,并且所述第二IgG1结构域单体包含选自表5中的突变的一组两个反向电荷突变或选自表6中的突变的一组四个反向电荷突变。

143. 如权利要求134所述的组合物,其包含第三接头和第三IgG1 Fc结构域单体,其中所述第二IgG1 Fc结构域单体和所述第三IgG1 Fc结构域单体各自均包含选自表4的一个、两个或三个反向电荷氨基酸突变,并且所述第一IgG1结构域单体包含选自表5中的突变的一组两个反向电荷突变或选自表6中的突变的一组四个反向电荷突变。

144. 如权利要求134-143中任一项所述的多肽,其中包含选自表4的一个、两个或三个反向电荷氨基酸突变的所述IgG1 Fc结构域单体具有相同的CH3结构域。

145. 如权利要求134-143中任一项所述的组合物,其中选自表4的一个、两个或三个反向电荷氨基酸突变在所述CH3结构域中。

146.如权利要求122-145中任一项所述的组合物,其中所述突变在从EU位置G341到EU位置K447的序列内,包括端点。

147.如权利要求122-145中任一项所述的组合物,其中所述突变各自是单一氨基酸变化。

148. 如权利要求122-145中任一项所述的组合物, 其中所述第二接头和所述任选的第三接头包含选自以下项组成的组的氨基酸序列或由这些氨基酸序列组成:

GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG、GGGGS、GGSG、SGGG、GSGS、GSGSGS、GSGSGSGS、GSGSGSGSGS、

GS GSGSGSGSGS、GGS GGS、GGS GGS GGS、GGS GGS GGS GGS、GGS G、GGS G、GGS GGS GSG、GGS GGS GGS GGS GGS GGS、GENLYFQSGG、SACYCELS、RSIAT、RPACKIPNDLKQKVMNH、GGSAGGSGSGSSG GSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG、AAANSSIDLISVPVDSR、GGS GGS GSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGG GS、GGS GGS GGS GGS、SGGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS、GGS GGS GGS GGS GGS GGS、GGGG、GGGGGGGG、GGGGGGGGGGGG和GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG。

149. 如权利要求122-145中任一项所述的组合物,其中所述第二接头和所述任选的第三接头独立地由4至30、4至20、8至30、8至20、12至20或12至30个甘氨酸残基组成。

150. 如权利要求122-145中任一项所述的组合物,其中所述第二接头和所述任选的第三接头由20个甘氨酸残基组成。

151. 如权利要求122-145中任一项所述的组合物,其中至少一个所述Fc结构域单体在EU位置I253处包含单一氨基酸突变。

152. 如权利要求151所述的组合物,其中EU位置I253处的每个氨基酸突变独立地选自以下项组成的组:I253A、I253C、I253D、I253E、I253F、I253G、I253H、I253I、I253K、I253L、I253M、I253N、I253P、I253Q、I253R、I253S、I253T、I253V、I253W和I253Y。

153. 如权利要求152所述的组合物,其中位置I253处的每个氨基酸突变是I253A。

154. 如权利要求122-145中任一项所述的组合物,其中至少一个所述Fc结构域单体在EU位置R292处包含单一氨基酸突变。

155. 如权利要求154中任一项所述的组合物,其中EU位置R292处的每个氨基酸突变独立地选自以下项组成的组:R292D、R292E、R292L、R292P、R292Q、R292R、R292T和R292Y。

156. 如权利要求155所述的组合物,其中位置R292处的每个氨基酸突变是R292P。

157. 如权利要求122-145中任一项所述的组合物,其中每个Fc结构域单体的所述铰链独立地包含选自以下项组成的组的氨基酸序列或由这些氨基酸序列组成:EPKSCDKTHTCPPCPAPELL和DKTHTCPPCPAPELL。

158. 如权利要求122-145中任一项所述的组合物,其中所述第二Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体的所述铰链部分具有氨基酸序列DKTHTCPPCPAPELL。

159. 如权利要求122-145中任一项所述的组合物,其中所述第一Fc结构域单体的所述铰链部分具有氨基酸序列EPKSCDKTHTCPPCPAPEL。

160. 如权利要求122-145中任一项所述的组合物,其中所述第一Fc结构域单体的所述铰链部分具有氨基酸序列EPKSCDKTHTCPPCPAPEL,并且所述第二Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体的所述铰链部分具有氨基酸序列DKTHTCPPCPAPELL。

161. 如权利要求122-145中任一项所述的组合物,其中每个Fc结构域单体的所述CH2结构域独立地包含以下氨基酸序列:GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK,其具有不超过两个单一氨基酸缺失或置换。

162. 如权利要求122-145中任一项所述的组合物,其中每个Fc结构域单体的所述CH2结构域是相同的并且包含以下氨基酸序列:GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK,其具有不超过两个单一氨基酸缺失或置换。

165. 如权利要求122-145中任一项所述的组合物,其中每个Fc结构域单体的所述CH2结

构域是相同的并且包含以下氨基酸序列:GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK,其具有不超过两个单一氨基酸置换。

166. 如权利要求122-145中任一项所述的组合物,其中每个Fc结构域单体的所述CH2结构域是相同的并且包含以下氨基酸序列:GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK。

167. 如权利要求122-145中任一项所述的组合物,其中每个Fc结构域单体的所述CH3结构域独立地包含以下氨基酸序列:GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG,其具有不超过10个单一氨基酸置换。

168. 如权利要求122-145中任一项所述的组合物,其中每个Fc结构域单体的所述CH3结构域独立地包含以下氨基酸序列:GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG,其具有不超过8个单一氨基酸置换。

169. 如权利要求122-145中任一项所述的组合物,其中每个Fc结构域单体的所述CH3结构域独立地包含以下氨基酸序列:GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG,其具有不超过6个单一氨基酸置换。

170. 如权利要求122-145中任一项所述的组合物,其中每个Fc结构域单体的所述CH3结构域独立地包含以下氨基酸序列:GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG,其具有不超过5个单一氨基酸置换。

171. 如权利要求122-145中任一项所述的组合物,其中所述单一氨基酸置换选自以下项组成的组:T366Y、T366W、T394W、T394Y、F405W、F405A、Y407A、S354C、Y349T、T394F、K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R、D356K和D356R。

172. 如权利要求122-145中任一项所述的组合物,其中每个所述Fc结构域单体独立地包含SEQ ID NO:42、43、45和47中任一者具有多至10个单一氨基酸置换的氨基酸序列。

173. 如权利要求99所述的组合物,其中多至6个所述单一氨基酸置换是所述CH3结构域中的反向电荷突变。

174. 如权利要求173所述的组合物,其中所述单一氨基酸置换在从EU位置G341到EU位置K447的序列内,包括端点。

175. 如权利要求122-145中任一项所述的组合物,其中至少一个所述形成工程化突起的突变选自以下项组成的组:T366Y、T366W、T394W、T394Y、F405W、F405A、Y407A、S354C、Y349T和T394F。

176. 如权利要求122-145中任一项所述的组合物,其中所述两个或四个反向电荷突变选自:K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R、D356K和D356R。

178. 如权利要求123、124、135和136中任一项所述的组合物,其中所述VH结构域或所述scFv包含表1中列出的一组CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列。

179. 如权利要求123、124、135和136中任一项所述的组合物,其中所述VH结构域或所述scFv包含含有表2中列出的抗体的序列的VH结构域的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3。

180. 如权利要求123、124、135和136中任一项所述的组合物,其中所述VH结构域或所述scFv包含表2中列出的抗体的VH序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,并且所述VH序列不包括所述CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列时与表2中列出的抗体的所述VH序列具有至少95%或98%的同一性。

181. 如权利要求123、124、135和136中任一项所述的组合物,其中所述VH结构域或所述scFv包含表2中列出的抗体的VH序列。

182. 如权利要求123、124、135和136中任一项所述的组合物,其中所述VH结构域或所述scFv包含表1中列出的一组CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列。

183. 如权利要求123、124、135和136中任一项所述的组合物,其中所述VH结构域或所述scFv包含来自表2中列出的抗体的一组VH和VL序列的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列。

184. 如权利要求123、124、135和136中任一项所述的组合物,其中所述VH结构域或所述scFv包含含有表2中列出的抗体的VH序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3的VH结构域以及含有表2中列出的抗体的VL序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3的VL结构域,其中所述VH结构域和所述VL结构域序列不包括所述CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列时与表2中列出的抗体的所述VH序列和所述VL序列具有至少95%或98%的同一性。

185. 如权利要求123、124、135和136中任一项所述的组合物,其中所述VH结构域或所述scFv包含表2中列出的抗体的一组VH和VL序列。

186. 如权利要求122-145中任一项所述的组合物,其还包含IgG CL抗体恒定结构域和IgG CH1抗体恒定结构域。

187. 一种核酸分子,其编码如权利要求2-187中任一项所述的组合物。

188. 一种表达载体,其包含如权利要求187所述的核酸分子。

189. 一种宿主细胞,其包含如权利要求187所述的核酸分子。

190. 一种宿主细胞,其包含如权利要求188所述的表达载体。

191. 一种产生如权利要求2-187中任一项所述的组合物的方法,其包括在表达所述多肽的条件下培养如权利要求189或权利要求190所述的宿主细胞。

192. 如权利要求189所述的宿主细胞,其还包含编码包含抗体VL结构域的多肽的核酸分子。

193. 如权利要求190所述的宿主细胞,其还包含编码包含抗体VL结构域的多肽的核酸分子。

194. 如权利要求189所述的宿主细胞,其还包含编码包含抗体VL结构域和抗体CL结构域的多肽的核酸分子。

195. 如权利要求190所述的宿主细胞,其还包含编码包含抗体VL结构域和抗体CL结构域的多肽的核酸分子。

196. 如权利要求189所述的宿主细胞,其还包含编码包含具有不超过10个单一氨基酸修饰的IgG1 Fc结构域单体的多肽的核酸分子。

197. 如权利要求190所述的宿主细胞,其还包含编码包含具有不超过10个单一氨基酸

修饰的IgG1 Fc结构域单体的多肽的核酸分子。

199. 如权利要求196或197所述的宿主细胞,其中所述IgG1 Fc结构域单体在所述CH3结构域中包含SEQ ID No:42、43、45和47中任一者具有不超过10、8、6或4个单一氨基酸修饰的氨基酸序列。

200. 一种药物组合物,其包含如权利要求2-186中任一项所述的组合物。

201. 如权利要求200所述的药物组合物,其中少于40%、30%、20%、10%、5%、2%的所述多肽在Fc结构域单体上具有至少一个岩藻糖修饰。

202. 如权利要求1的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述Fc-抗原结合结构域构建体包含:

- a) 第一多肽,其包含
 - i) 第一Fc结构域单体;
 - ii) 第二Fc结构域单体;以及
 - iii) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的接头;
- b) 第二多肽,其包含第三Fc结构域单体;
- c) 第三多肽,其包含第四Fc结构域单体;以及
- d) 抗原结合结构域,其与所述第一多肽、所述第二多肽或所述第三多肽连接;

其中所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域。

203. 如权利要求1或202所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述单个Fc结构域构建体是抗体。

204. 一种组合物,其包含Fc-抗原结合结构域构建体的基本上同质的群体,所述Fc-抗原结合结构域构建体包含:

- a) 第一多肽,其包含
 - i) 第一Fc结构域单体;
 - ii) 第二Fc结构域单体;以及
 - iii) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的接头;
- b) 第二多肽,其包含第三Fc结构域单体;
- c) 第三多肽,其包含第四Fc结构域单体;以及
- d) 抗原结合结构域,其与所述第一多肽、所述第二多肽或所述第三多肽连接;

其中所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域。

205. 如权利要求204所述的组合物,其中所述抗原结合结构域与所述第一多肽和所述第二多肽或所述第三多肽连接,或与所述第二多肽和所述第三多肽连接。

206. 如权利要求204所述的组合物,其中所述抗原结合结构域与所述第一多肽、所述第二多肽和所述第三多肽连接。

207. 一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包含:

- a) 第一多肽,其包含
 - i) 第一Fc结构域单体;
 - ii) 第二Fc结构域单体;以及

- iii) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的接头;
- b) 第二多肽,其包含第三Fc结构域单体;
- c) 第三多肽,其包含第四Fc结构域单体;以及
- d) 抗原结合结构域,其与所述第一多肽、所述第二多肽或所述第三多肽连接;

其中所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,并且其中所述Fc-抗原结合结构域构建体包含具有单个Fc结构域和所述抗原结合结构域的构建体未表现出的生物活性。

208. 如权利要求207所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述生物活性是Fc受体介导的效应子功能。

209. 如权利要求208所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述Fc受体介导的效应子功能是ADCC和ADCP和/或CDC活性。

210. 一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包含:

- a) 第一多肽,其包含
 - i) 第一Fc结构域单体;
 - ii) 第二Fc结构域单体;以及
 - iii) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的间隔物;
- b) 第二多肽,其包含第三Fc结构域单体;
- c) 第三多肽,其包含第四Fc结构域单体;以及
- d) 抗原结合结构域,其与所述第一多肽、所述第二多肽或所述第三多肽连接;

其中所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域。

211. 如权利要求202、207或210所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述抗原结合结构域与所述第一多肽和所述第二多肽或所述第三多肽连接,或与所述第二多肽和所述第三多肽连接。

212. 如权利要求202、207或210所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述抗原结合结构域与所述第一多肽、所述第二多肽和所述第三多肽连接。

213. 如权利要求1和202-212中任一项所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述抗原结合结构域是Fab。

214. 如权利要求202-212中任一项所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述抗原结合结构域是所述第一多肽、所述第二多肽或所述第三多肽的氨基酸序列的一部分。

215. 如权利要求214所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述抗原结合结构域是scFv。

216. 如权利要求202-212中任一项所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述抗原结合结构域包含V_H结构域和C_H1结构域,并且其中所述V_H和所述C_H1结构域是所述第一多肽、所述第二多肽或所述第三多肽的氨基酸序列的一部分。

217. 如权利要求216所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述抗原结合结构域还包含V_L结构域。

218. 如权利要求217所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述Fc-抗原结合结构域

构建体包含第四多肽,所述第四多肽包含所述 V_L 结构域。

219. 如权利要求216所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述 V_H 结构域包含表1中列出的一组CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列。

220. 如权利要求216所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述 V_H 结构域包含含有表2中列出的抗体的序列的 V_H 结构域的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3。

221. 如权利要求216所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述 V_H 结构域包含表2中列出的抗体的 V_H 序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,并且所述 V_H 序列不包括所述CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列时与表2中列出的抗体的所述 V_H 序列具有至少95%的同一性。

222. 如权利要求216所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述 V_H 结构域包含表2中列出的抗体的 V_H 序列。

223. 如权利要求1和202-215中任一项所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述抗原结合结构域包含表1中列出的一组CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列。

224. 如权利要求1和202-215中任一项所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述抗原结合结构域包含来自表2中列出的抗体的一组 V_H 和 V_L 序列的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列。

225. 如权利要求1和202-215中任一项所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述抗原结合结构域包含含有表2中列出的抗体的 V_H 序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3的 V_H 结构域,以及含有表2中列出的抗体的 V_L 序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3的 V_L 结构域,其中所述 V_H 结构域和所述 V_L 结构域序列不包括所述CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列时与表2中列出的抗体的所述 V_H 和所述 V_L 序列具有至少95%的同一性。

226. 如权利要求1和202-215中任一项所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述抗原结合结构域包含表2中列出的抗体的一组 V_H 和 V_L 序列。

227. 如权利要求1和202-212中任一项所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其还包含IgG C_L 抗体恒定结构域和IgG C_H1 抗体恒定结构域,其中所述IgG C_H1 抗体恒定结构域通过接头附接到所述第一多肽或所述第二多肽的N末端。

228. 如权利要求202-227中任一项所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体包含互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体之间的二聚化。

229. 如权利要求202-228中任一项所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体包含互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体之间的二聚化。

230. 如权利要求202-228中任一项所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述第二多肽和所述第三多肽具有相同的氨基酸序列。

231. 如权利要求228或229所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述二聚化选择性模块包括进入一个所述Fc结构域单体的所述 C_H3 结构域中的工程化空腔和进入另一个所述Fc结构域单体的所述 C_H3 结构域中的工程化突起,其中所述工程化空腔和所述工程化突起被定位成形成Fc结构域单体的突起-进入-空腔对。

232. 如权利要求231所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述工程化突起包含选自

由S354C、T366W、T366Y、T394W、T394F和F405W组成的组的至少一种修饰,并且所述工程化空腔包含选自Y349C、T366S、L368A、Y407V、Y407T、Y407A、F405A和T394S组成的组的至少一种修饰。

233. 如权利要求228或229所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中一个所述Fc结构域单体包含Y407V和Y349C,并且另一个所述Fc结构域单体包含T366W和S354C。

234. 如权利要求228或229所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述二聚化选择性模块包含进入一个所述结构域单体的所述C_H3结构域中的带负电的氨基酸和进入另一个所述Fc结构域单体的所述C_H3结构域中的带正电的氨基酸,其中所述带负电的氨基酸和所述带正电的氨基酸被定位成促进Fc结构域的形成。

235. 如权利要求234所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体中的每一者包含D399K和K409D或K409E。

236. 如权利要求234所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体中的每一者包含K392D和D399K。

237. 如权利要求234所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体中的每一者包含E357K和K370E。

238. 如权利要求234所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体中的每一者包含D356K和K439D。

239. 如权利要求234所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体中的每一者包含K392E和D399K。

240. 如权利要求234所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体中的每一者包含E357K和K370D。

241. 如权利要求234所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体中的每一者包含D356K和K439E。

242. 如权利要求234所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体中的每一者包含S354C和T366W,并且所述第三多肽和所述第四多肽各自包含Y349C、T366S、L368A和Y407V。

243. 如权利要求234所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述第三多肽和所述第四多肽中的每一者包含S354C和T366W,并且所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体各自包含Y349C、T366S、L368A和Y407V。

244. 如权利要求234所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体中的每一者包含E357K或E357R,并且所述第三多肽和所述第四多肽各自包含K370D或K370E。

245. 如权利要求234所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体包含K370D或K370E,并且所述第三多肽和所述第四多肽各自包含E357K或E357R。

246. 如权利要求234所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体中的每一者包含K409D或K409E,并且所述第三多肽和所述第四多肽各自包含D399K或D399R。

247. 如权利要求234所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述第二Fc结构域单体和

构域。

263. 如权利要求262所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中每个所述Fc结构域单体包含IgG铰链结构域、IgG C_H2抗体恒定结构域和IgG C_H3抗体恒定结构域。

264. 如权利要求262或263所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述IgG是选自由以下项组成的组的亚型: IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3和IgG4。

265. 如权利要求1和202-264中任一项所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述第一多肽、所述第二多肽、所述第三多肽和所述第四多肽中的每一者中的N末端Asp突变为Gln。

266. 如权利要求1和202-265中任一项所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述第一多肽、所述第二多肽、所述第三多肽和所述第四多肽中的一者或多者缺乏C末端赖氨酸。

267. 如权利要求266所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述第一多肽、所述第二多肽、所述第三多肽和所述第四多肽中的每一者缺乏C末端赖氨酸。

268. 如权利要求1和202-267中任一项所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其还包含通过接头与一个或多个所述多肽的N末端或C末端连接的白蛋白结合肽。

269. 一种细胞培养基,其包含Fc-抗原结合结构域构建体的群体,其中以摩尔为基础,至少50%的所述Fc-抗原结合结构域构建体包含:

a) 第一多肽,其包含

i) 第一Fc结构域单体;

ii) 第二Fc结构域单体;以及

iii) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的接头;

b) 第二多肽,其包含第三Fc结构域单体;

c) 第三多肽,其包含第四Fc结构域单体;以及

d) 抗原结合结构域,其与所述第一多肽、所述第二多肽或所述第三多肽连接;

其中所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域。

270. 如权利要求269所述的细胞培养基,其中以摩尔为基础,至少75%的所述Fc-抗原结合结构域构建体包含所述第一Fc结构域、所述第二Fc结构域和所述抗原结合结构域。

271. 一种细胞培养基,其包含Fc-抗原结合结构域构建体的群体,其中以摩尔为基础,至少50%的所述Fc-抗原结合结构域构建体在结构上是相同的,并且其中所述Fc-抗原结合结构域构建体以至少0.1mg/L的浓度存在于所述培养基中。

272. 如权利要求271所述的细胞培养基,其中以摩尔为基础,至少75%的所述Fc-抗原结合结构域构建体在结构上是相同的。

273. 如权利要求269-272中任一项所述的细胞培养基,其中所述Fc-抗原结合结构域构建体以至少10mg/L的浓度存在于所述培养基中。

274. 如权利要求269-273中任一项所述的细胞培养基,其中所述Fc-抗原结合结构域构建体以至少100mg/L的浓度存在于所述培养基中。

275. 一种制造Fc-抗原结合结构域构建体的方法,所述方法包括:

a) 培养表达以下项的宿主细胞: (1) 第一多肽,其包含

i) 第一Fc结构域单体;

ii) 第二Fc结构域单体;以及

iii) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的接头;

(2) 第二多肽,其包含第三Fc结构域单体;(3) 第三多肽,其包含第四Fc结构域单体;以及(4) 抗原结合结构域;其中所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域;其中所述抗原结合结构域与所述第一多肽、所述第二多肽或所述第三多肽连接,从而形成Fc-抗原结合结构域构建体;并且其中以摩尔为基础,细胞培养上清液中至少50%的所述Fc-抗原结合结构域构建体在结构上是相同的,并且

b) 从所述细胞培养上清液中纯化所述Fc-抗原结合结构域构建体。

276. 一种组合物,其包含Fc-抗原结合结构域构建体的基本上同质的群体,所述Fc-抗原结合结构域构建体包含:

a) 第一多肽,其包含

i) 第一Fc结构域单体;

ii) 第二Fc结构域单体;以及

iii) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的接头;

b) 第二多肽,其包含第三Fc结构域单体;

c) 第三多肽,其包含第四Fc结构域单体;

d) 第一抗原结合结构域,其与所述第一多肽连接;以及

e) 第二抗原结合结构域,其与所述第二多肽和/或所述第三多肽连接;

其中所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,并且其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域结合不同的抗原。

277. 如权利要求276所述的组合物,其中所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体包含互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体之间的二聚化,其中所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体包含互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体之间的二聚化,并且其中所述第二多肽和所述第三多肽具有不同的氨基酸序列。

278. 如权利要求277所述的组合物,其中所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体中的每一者包含E357K和K370D,并且所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体中的每一者包含K370D和E357K。

279. 一种组合物,其包含Fc-抗原结合结构域构建体的基本上同质的群体,所述Fc-抗原结合结构域构建体包含:

a) 第一多肽,其包含

i) 第一Fc结构域单体;

ii) 第二Fc结构域单体;以及

iii) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的接头;

b) 第二多肽,其包含第三Fc结构域单体;

c) 第三多肽,其包含第四Fc结构域单体;

- d) 第一抗原结合结构域,其与所述第一多肽连接;
- e) 第二抗原结合结构域,其与所述第二多肽连接;以及
- f) 第三抗原结合结构域,其与所述第三多肽连接;

其中所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,并且其中所述第一抗原结合结构域、所述第二抗原结合结构域和所述第三抗原结合结构域结合不同的抗原。

280. 如权利要求279所述的组合物,其中所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体包含互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体之间的二聚化,其中所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体包含互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体之间的二聚化,并且其中所述第二多肽和所述第三多肽具有不同的氨基酸序列。

281. 如权利要求280所述的组合物,其中所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体中的每一者包含E357K和K370D,并且所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体中的每一者包含K370D和E357K。

282. 一种组合物,其包含Fc-抗原结合结构域构建体的基本上同质的群体,所述Fc-抗原结合结构域构建体包含:

- a) 第一多肽,其包含
 - i) 第一Fc结构域单体;
 - ii) 第二Fc结构域单体;以及
 - iii) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的第一接头;以及
- b) 第二多肽,其包含
 - iv) 第三Fc结构域单体,
 - v) 第四Fc结构域单体,以及
 - vi) 连接所述第三Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体的第二接头;以及
- c) 第三多肽,其包含第五Fc结构域单体;
- d) 第四多肽,其包含第六Fc结构域单体;以及
- e) 抗原结合结构域,其与所述第一多肽、所述第二多肽、所述第三多肽或所述第四多肽连接;

其中所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且所述第二Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,所述第四Fc结构域单体和所述第六Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域。

283. 如权利要求282所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体中的每一者包含互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体之间的二聚化,

所述第二Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体中的每一者包含互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进所述第二Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体之间的二聚化;并且

所述第四Fc结构域单体和所述第六Fc结构域单体中的每一者包含互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进所述第四Fc结构域单体和所述第六Fc结构域单体之间的二聚化。

284. 一种组合物,其包含Fc-抗原结合结构域构建体的基本上同质的群体,所述Fc-抗原结合结构域构建体包含:

- a) 第一多肽,其包含
 - i) 第一Fc结构域单体;
 - ii) 第二Fc结构域单体;以及
 - iii) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的第一接头;以及
- b) 第二多肽,其包含
 - iv) 第三Fc结构域单体,
 - v) 第四Fc结构域单体,以及
 - vi) 连接所述第三Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体的第二接头;以及
- c) 第三多肽,其包含第五Fc结构域单体;
- d) 第四多肽,其包含第六Fc结构域单体;以及
- e) 抗原结合结构域,其与所述第一多肽、所述第二多肽、所述第三多肽或所述第四多肽连接;

其中所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且所述第一Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,所述第三Fc结构域单体和所述第六Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域。

285. 如权利要求284所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体中的每一者包含互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体之间的二聚化,

所述第一Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体中的每一者包含互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进所述第一Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体之间的二聚化;并且

所述第三Fc结构域单体和所述第六Fc结构域单体中的每一者包含互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进所述第三Fc结构域单体和所述第六Fc结构域单体之间的二聚化。

286. 一种组合物,其包含Fc-抗原结合结构域构建体的基本上同质的群体,所述Fc-抗原结合结构域构建体包含:

- a) 第一多肽,其包含
 - i) 第一Fc结构域单体;
 - ii) 第二Fc结构域单体,
 - iii) 第三Fc结构域单体,
 - iv) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的第一接头;以及
 - v) 连接所述第二Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体的第二接头;
- b) 第二多肽,其包含
 - vi) 第四Fc结构域单体,

vii) 第五Fc结构域单体,
viii) 第六Fc结构域单体,
ix) 连接所述第四Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体的第三接头;以及
x) 连接所述第五Fc结构域单体和所述第六Fc结构域单体的第四接头;
c) 第三多肽,其包含第七Fc结构域单体;
d) 第四多肽,其包含第八Fc结构域单体;
e) 第五多肽,其包含第九Fc结构域单体;
f) 第六多肽,其包含第十Fc结构域单体;以及
g) 抗原结合结构域,其与所述第一多肽、所述第二多肽、所述第三多肽、所述第四多肽、所述第五多肽或所述第六多肽连接;

其中所述第二Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且所述第一Fc结构域单体和所述第七Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,所述第四Fc结构域单体和所述第八Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域,所述第三Fc结构域单体和所述第九Fc结构域单体组合以形成第四Fc结构域,并且所述第六Fc结构域单体和所述第十Fc结构域单体组合以形成第五Fc结构域。

287. 如权利要求286所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述第二Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体中的每一者包含互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进所述第二Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体之间的二聚化,

所述第一Fc结构域单体和所述第七Fc结构域单体中的每一者包含互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进所述第一Fc结构域单体和所述第七Fc结构域单体之间的二聚化,

所述第四Fc结构域单体和所述第八Fc结构域单体中的每一者包含互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进所述第四Fc结构域单体和所述第八Fc结构域单体之间的二聚化,

所述第三Fc结构域单体和所述第九Fc结构域单体中的每一者包含互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进所述第三Fc结构域单体和所述第九Fc结构域单体之间的二聚化,并且

所述第六Fc结构域单体和所述第十Fc结构域单体中的每一者包含互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进所述第六Fc结构域单体和所述第十Fc结构域单体之间的二聚化。

288. 一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包含:

- a) 第一多肽,其包含
 - i) 第一Fc结构域单体;
 - ii) 第二Fc结构域单体;以及
 - iii) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的接头;
- b) 第二多肽,其包含第三Fc结构域单体;
- c) 第三多肽,其包含第四Fc结构域单体;以及
- d) 第一抗原结合结构域,其与所述第一多肽连接;以及
- e) 第二抗原结合结构域,其与所述第二多肽和/或所述第三多肽连接;

其中所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域结合不同的抗原,并且其中所述Fc-抗原结合结构域构建体相对于具有单个Fc结构域和所述抗原结合结构域的构建体在抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 测定、抗体依赖性细胞吞噬作用 (ADCP) 和/或补体依赖性细胞毒性 (CDC) 测定中具有增强的效应子功能。

289. 一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包含:

- a) 第一多肽,其包含
 - i) 第一Fc结构域单体;
 - ii) 第二Fc结构域单体;以及
 - iii) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的接头;
- b) 第二多肽,其包含第三Fc结构域单体;
- c) 第三多肽,其包含第四Fc结构域单体;
- d) 第一抗原结合结构域,其与所述第一多肽连接;以及
- e) 第二抗原结合结构域,其与所述第二多肽和/或所述第三多肽连接;

其中所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,并且其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域结合不同的抗原,并且其中所述Fc-抗原结合结构域构建体包含具有单个Fc结构域和所述抗原结合结构域的构建体未表现出的生物活性。

290. 一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包含:

- a) 第一多肽,其包含
 - i) 第一Fc结构域单体;
 - ii) 第二Fc结构域单体;以及
 - iii) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的间隔物;
- b) 第二多肽,其包含第三Fc结构域单体;
- c) 第三多肽,其包含第四Fc结构域单体;以及
- d) 第一抗原结合结构域,其与所述第一多肽连接;以及
- e) 第二抗原结合结构域,其与所述第二多肽和/或所述第三多肽连接;

其中所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,并且其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域结合不同的抗原。

291. 一种细胞培养基,其包含Fc-抗原结合结构域构建体的群体,其中以摩尔为基础,至少50%的所述Fc-抗原结合结构域构建体包含:

- a) 第一多肽,其包含
 - i) 第一Fc结构域单体;
 - ii) 第二Fc结构域单体;以及
 - iii) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的接头;
- b) 第二多肽,其包含第三Fc结构域单体;

- c) 第三多肽,其包含第四Fc结构域单体;以及
- d) 第一抗原结合结构域,其与所述第一多肽连接;以及
- e) 第二抗原结合结构域,其与所述第二多肽和/或所述第三多肽连接;

其中所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,并且其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域结合不同的抗原。

292. 一种制造Fc-抗原结合结构域构建体的方法,所述方法包括:

- a) 培养表达以下项的宿主细胞: (1) 第一多肽,其包含
 - i) 第一Fc结构域单体;
 - ii) 第二Fc结构域单体;以及
 - iii) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的接头;

(2) 第二多肽,其包含第三Fc结构域单体; (3) 第三多肽,其包含第四Fc结构域单体; (4) 第一抗原结合结构域,其与所述第一多肽连接;以及 (5) 第二抗原结合结构域,其与所述第二多肽和/或所述第三多肽连接;其中所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域;其中所述抗原结合结构域与所述第一多肽、所述第二多肽或所述第三多肽连接,从而形成Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域结合不同的抗原,并且其中以摩尔为基础,细胞培养上清液中至少50%的所述Fc-抗原结合结构域构建体在结构上是相同的,并且

- b) 从所述细胞培养上清液中纯化所述Fc-抗原结合结构域构建体。

293. 如权利要求288、289、290、291或292所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体包含互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体之间的二聚化,其中所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体包含互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体之间的二聚化,并且其中所述第二多肽和所述第三多肽具有不同的氨基酸序列。

294. 一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包含:

- a) 第一多肽,其包含
 - i) 第一Fc结构域单体;
 - ii) 第二Fc结构域单体;以及
 - iii) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的接头;
- b) 第二多肽,其包含第三Fc结构域单体;
- c) 第三多肽,其包含第四Fc结构域单体;
- d) 第一抗原结合结构域,其与所述第一多肽连接;
- e) 第二抗原结合结构域,其与所述第二多肽连接;以及
- f) 第三抗原结合结构域,其与所述第三多肽连接;

其中所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,并且其中所述第一抗原结合结构域、所述第二抗原结合结构域和所述第三抗原结合结构域结合不同的抗

原,并且其中所述Fc-抗原结合结构域构建体相对于具有单个Fc结构域和所述抗原结合结构域的构建体在抗体依赖性细胞毒性(ADCC)测定、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)测定中具有增强的效应子功能。

295. 一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包含:

- a) 第一多肽,其包含
 - i) 第一Fc结构域单体;
 - ii) 第二Fc结构域单体;以及
 - iii) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的接头;
- b) 第二多肽,其包含第三Fc结构域单体;
- c) 第三多肽,其包含第四Fc结构域单体;
- d) 第一抗原结合结构域,其与所述第一多肽连接;
- e) 第二抗原结合结构域,其与所述第二多肽连接;以及
- f) 第三抗原结合结构域,其与所述第三多肽连接;

其中所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,并且其中所述第一抗原结合结构域、所述第二抗原结合结构域和所述第三抗原结合结构域结合不同的抗原,并且其中所述Fc-抗原结合结构域构建体包含具有单个Fc结构域和所述抗原结合结构域的构建体未表现出的生物活性。

296. 一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包含:

- a) 第一多肽,其包含
 - i) 第一Fc结构域单体;
 - ii) 第二Fc结构域单体;以及
 - iii) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的间隔物;
- b) 第二多肽,其包含第三Fc结构域单体;
- c) 第三多肽,其包含第四Fc结构域单体;
- d) 第一抗原结合结构域,其与所述第一多肽连接;
- e) 第二抗原结合结构域,其与所述第二多肽连接;以及
- f) 第三抗原结合结构域,其与所述第三多肽连接;

其中所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,并且其中所述第一抗原结合结构域、所述第二抗原结合结构域和所述第三抗原结合结构域结合不同的抗原。

297. 一种细胞培养基,其包含Fc-抗原结合结构域构建体的群体,其中以摩尔为基础,至少50%的所述Fc-抗原结合结构域构建体包含:

- a) 第一多肽,其包含
 - i) 第一Fc结构域单体;
 - ii) 第二Fc结构域单体;以及
 - iii) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的接头;
- b) 第二多肽,其包含第三Fc结构域单体;

- c) 第三多肽,其包含第四Fc结构域单体;
- d) 第一抗原结合结构域,其与所述第一多肽连接;
- e) 第二抗原结合结构域,其与所述第二多肽连接;以及
- f) 第三抗原结合结构域,其与所述第三多肽连接;

其中所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,并且其中所述第一抗原结合结构域、所述第二抗原结合结构域和所述第三抗原结合结构域结合不同的抗原。

298. 一种制造Fc-抗原结合结构域构建体的方法,所述方法包括:

- a) 培养表达以下项的宿主细胞: (1) 第一多肽,其包含
 - i) 第一Fc结构域单体;
 - ii) 第二Fc结构域单体;以及
 - iii) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的接头;

(2) 第二多肽,其包含第三Fc结构域单体; (3) 第三多肽,其包含第四Fc结构域单体; (4) 第一抗原结合结构域,其与所述第一多肽连接; (5) 第二抗原结合结构域,其与所述第二多肽连接;以及 (6) 第三抗原结合结构域,其与所述第三多肽连接;其中所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域;其中所述抗原结合结构域与所述第一多肽、所述第二多肽或所述第三多肽连接,从而形成Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域结合不同的抗原,并且其中以摩尔为基础,细胞培养上清液中至少50%的所述Fc-抗原结合结构域构建体在结构上是相同的,并且

- b) 从所述细胞培养上清液中纯化所述Fc-抗原结合结构域构建体。

299. 如权利要求294、295、296、297或298所述的组合物,其中所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体包含互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体之间的二聚化,其中所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体包含互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体之间的二聚化,并且其中所述第二多肽和所述第三多肽具有不同的氨基酸序列。

300. 一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包含:

- a) 第一多肽,其包含
 - i) 第一Fc结构域单体;
 - ii) 第二Fc结构域单体;以及
 - iii) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的第一接头;以及
- b) 第二多肽,其包含
 - iv) 第三Fc结构域单体,
 - v) 第四Fc结构域单体,以及
 - vi) 连接所述第三Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体的第二接头;以及
- c) 第三多肽,其包含第五Fc结构域单体;
- d) 第四多肽,其包含第六Fc结构域单体;以及

e) 抗原结合结构域,其与所述第一多肽、所述第二多肽、所述第三多肽或所述第四多肽连接;

其中所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且所述第二Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,所述第四Fc结构域单体和所述第六Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域,并且其中所述Fc-抗原结合结构域构建体相对于具有单个Fc结构域和所述抗原结合结构域的构建体在抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 测定、抗体依赖性细胞吞噬作用 (ADCP) 和/或补体依赖性细胞毒性 (CDC) 测定中具有增强的效应子功能。

301. 一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包含:

a) 第一多肽,其包含

i) 第一Fc结构域单体;

ii) 第二Fc结构域单体;以及

iii) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的第一接头;以及

b) 第二多肽,其包含

iv) 第三Fc结构域单体,

v) 第四Fc结构域单体,以及

vi) 连接所述第三Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体的第二接头;以及

c) 第三多肽,其包含第五Fc结构域单体;

d) 第四多肽,其包含第六Fc结构域单体;以及

e) 抗原结合结构域,其与所述第一多肽、所述第二多肽、所述第三多肽或所述第四多肽连接;

其中所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且所述第二Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,所述第四Fc结构域单体和所述第六Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域,并且其中所述Fc-抗原结合结构域构建体包含具有单个Fc结构域和所述抗原结合结构域的构建体未表现出的生物活性。

302. 一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包含:

a) 第一多肽,其包含

i) 第一Fc结构域单体;

ii) 第二Fc结构域单体;以及

iii) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的第一间隔物;以及

b) 第二多肽,其包含

iv) 第三Fc结构域单体,

v) 第四Fc结构域单体,以及

vi) 连接所述第三Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体的第二间隔物;以及

c) 第三多肽,其包含第五Fc结构域单体;

d) 第四多肽,其包含第六Fc结构域单体;以及

e) 抗原结合结构域,其与所述第一多肽、所述第二多肽、所述第三多肽或所述第四多肽连接;

其中所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且所述第二Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,所述第四Fc结构域单体和所述第六Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域。

303. 一种细胞培养基,其包含Fc-抗原结合结构域构建体的群体,其中以摩尔为基础,至少50%的所述Fc-抗原结合结构域构建体包含:

- a) 第一多肽,其包含
 - i) 第一Fc结构域单体;
 - ii) 第二Fc结构域单体;以及
 - iii) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的第一接头;以及
- b) 第二多肽,其包含
 - iv) 第三Fc结构域单体,
 - v) 第四Fc结构域单体,以及
 - vi) 连接所述第三Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体的第二接头;以及
- c) 第三多肽,其包含第五Fc结构域单体;
- d) 第四多肽,其包含第六Fc结构域单体;以及
- e) 抗原结合结构域,其与所述第一多肽、所述第二多肽、所述第三多肽或所述第四多肽连接;

其中所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且所述第二Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,所述第四Fc结构域单体和所述第六Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域。

304. 一种制造Fc-抗原结合结构域构建体的方法,所述方法包括:

- a) 培养表达以下项的宿主细胞:(1) 第一多肽,其包含
 - i) 第一Fc结构域单体;
 - ii) 第二Fc结构域单体;以及
 - iii) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的第一接头;以及
- (2) 第二种多肽,其包含
 - iv) 第三Fc结构域单体,
 - v) 第四Fc结构域单体,以及
 - vi) 连接所述第三Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体的第二接头;以及
- (3) 第三多肽,其包含第五Fc结构域单体;
- (4) 第四多肽,其包含第六Fc结构域单体;以及
- (5) 抗原结合结构域,其与所述第一多肽、所述第二多肽、所述第三多肽或所述第四多肽连接;

其中所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且所述第二Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,所述第四Fc结构域单体和所述第六Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域,并且其中以摩尔为基础,细胞培养上清液中至少50%的所述Fc-抗原结合结构域构建体在结构上是相同的,以及

- b) 从所述细胞培养上清液中纯化所述Fc-抗原结合结构域构建体。

305. 如权利要求300、301、302、303或304所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述

第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体中的每一者包含互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体之间的二聚化。

所述第二Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体中的每一者包含互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进所述第二Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体之间的二聚化;并且

所述第四Fc结构域单体和所述第六Fc结构域单体中的每一者包含互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进所述第四Fc结构域单体和所述第六Fc结构域单体之间的二聚化。

306. 一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包含:

- a) 第一多肽,其包含
 - i) 第一Fc结构域单体;
 - ii) 第二Fc结构域单体;以及
 - iii) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的第一接头;以及
- b) 第二多肽,其包含
 - iv) 第三Fc结构域单体,
 - v) 第四Fc结构域单体,以及
 - vi) 连接所述第三Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体的第二接头;以及
- c) 第三多肽,其包含第五Fc结构域单体;
- d) 第四多肽,其包含第六Fc结构域单体;以及
- e) 抗原结合结构域,其与所述第一多肽、所述第二多肽、所述第三多肽或所述第四多肽连接;

其中所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且所述第一Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,所述第三Fc结构域单体和所述第六Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域,并且其中所述Fc-抗原结合结构域构建体相对于具有单个Fc结构域和所述抗原结合结构域的构建体在抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 测定、抗体依赖性细胞吞噬作用 (ADCP) 和/或补体依赖性细胞毒性 (CDC) 测定中具有增强的效应子功能。

307. 一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包含:

- a) 第一多肽,其包含
 - i) 第一Fc结构域单体;
 - ii) 第二Fc结构域单体;以及
 - iii) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的第一接头;以及
- b) 第二多肽,其包含
 - iv) 第三Fc结构域单体,
 - v) 第四Fc结构域单体,以及
 - vi) 连接所述第三Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体的第二接头;以及
- c) 第三多肽,其包含第五Fc结构域单体;
- d) 第四多肽,其包含第六Fc结构域单体;以及

e) 抗原结合结构域,其与所述第一多肽、所述第二多肽、所述第三多肽或所述第四多肽连接;

其中所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且所述第一Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,所述第三Fc结构域单体和所述第六Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域,并且其中所述Fc-抗原结合结构域构建体包含具有单个Fc结构域和所述抗原结合结构域的构建体未表现出的生物活性。

308. 一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包含:

a) 第一多肽,其包含

i) 第一Fc结构域单体;

ii) 第二Fc结构域单体;以及

iii) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的第一间隔物;以及

b) 第二多肽,其包含

iv) 第三Fc结构域单体,

v) 第四Fc结构域单体,以及

vi) 连接所述第三Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体的第二间隔物;以及

c) 第三多肽,其包含第五Fc结构域单体;

d) 第四多肽,其包含第六Fc结构域单体;以及

e) 抗原结合结构域,其与所述第一多肽、所述第二多肽、所述第三多肽或所述第四多肽连接;

其中所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且所述第一Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,所述第三Fc结构域单体和所述第六Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域。

309. 一种细胞培养基,其包含Fc-抗原结合结构域构建体的群体,其中以摩尔为基础,至少50%的所述Fc-抗原结合结构域构建体包含:

a) 第一多肽,其包含

i) 第一Fc结构域单体;

ii) 第二Fc结构域单体;以及

iii) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的第一接头;以及

b) 第二多肽,其包含

iv) 第三Fc结构域单体,

v) 第四Fc结构域单体,以及

vi) 连接所述第三Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体的第二接头;以及

c) 第三多肽,其包含第五Fc结构域单体;

d) 第四多肽,其包含第六Fc结构域单体;以及

e) 抗原结合结构域,其与所述第一多肽、所述第二多肽、所述第三多肽或所述第四多肽连接;

其中所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且所述第一Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,所述第三Fc结

构域单体和所述第六Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域。

310. 一种制造Fc-抗原结合结构域构建体的方法,所述方法包括:

- a) 培养表达以下项的宿主细胞: (1) 第一多肽,其包含
 - i) 第一Fc结构域单体;
 - ii) 第二Fc结构域单体;以及
 - iii) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的第一接头;以及(2) 第二种多肽,其包含
 - iv) 第三Fc结构域单体,
 - v) 第四Fc结构域单体,以及
 - vi) 连接所述第三Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体的第二接头;以及(3) 第三多肽,其包含第五Fc结构域单体;
- (4) 第四多肽,其包含第六Fc结构域单体;以及
- (5) 抗原结合结构域,其与所述第一多肽、所述第二多肽、所述第三多肽或所述第四多肽连接;

其中所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且所述第一Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,所述第三Fc结构域单体和所述第六Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域,并且其中以摩尔为基础,细胞培养上清液中至少50%的所述Fc-抗原结合结构域构建体在结构上是相同的,以及

- b) 从所述细胞培养上清液中纯化所述Fc-抗原结合结构域构建体。

311. 如权利要求306、307、308、309或310所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体中的每一者包含互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体之间的二聚化。

所述第一Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体中的每一者包含互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进所述第一Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体之间的二聚化;并且

所述第三Fc结构域单体和所述第六Fc结构域单体中的每一者包含互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进所述第三Fc结构域单体和所述第六Fc结构域单体之间的二聚化。

312. 一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包含:

- a) 第一多肽,其包含
 - i) 第一Fc结构域单体;
 - ii) 第二Fc结构域单体,
 - iii) 第三Fc结构域单体,
 - iv) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的第一接头;以及
 - v) 连接所述第二Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体的第二接头;
- b) 第二多肽,其包含
 - vii) 第四Fc结构域单体,
 - viii) 第五Fc结构域单体,

viii) 第六Fc结构域单体,
ix) 连接所述第四Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体的第三接头;以及
x) 连接所述第五Fc结构域单体和所述第六Fc结构域单体的第四接头;
c) 第三多肽,其包含第七Fc结构域单体;
d) 第四多肽,其包含第八Fc结构域单体;
e) 第五多肽,其包含第九Fc结构域单体;
f) 第六多肽,其包含第十Fc结构域单体;以及
g) 抗原结合结构域,其与所述第一多肽、所述第二多肽、所述第三多肽、所述第四多肽、所述第五多肽或所述第六多肽连接;

其中所述第二Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且所述第一Fc结构域单体和所述第七Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,所述第四Fc结构域单体和所述第八Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域,所述第三Fc结构域单体和所述第九Fc结构域单体组合以形成第四Fc结构域,并且所述第六Fc结构域单体和所述第十Fc结构域单体组合以形成第五Fc结构域,并且其中所述Fc-抗原结合结构域构建体相对于具有单个Fc结构域和所述抗原结合结构域的构建体在抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 测定、抗体依赖性细胞吞噬作用 (ADCP) 和/或补体依赖性细胞毒性 (CDC) 测定中具有增强的效应子功能。

313. 一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包含:

a) 第一多肽,其包含
i) 第一Fc结构域单体;
ii) 第二Fc结构域单体,
iii) 第三Fc结构域单体,
iv) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的第一接头;以及
v) 连接所述第二Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体的第二接头;
b) 第二多肽,其包含
vi) 第四Fc结构域单体,
vii) 第五Fc结构域单体,
viii) 第六Fc结构域单体,
ix) 连接所述第四Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体的第三接头;以及
x) 连接所述第五Fc结构域单体和所述第六Fc结构域单体的第四接头;
c) 第三多肽,其包含第七Fc结构域单体;
d) 第四多肽,其包含第八Fc结构域单体;
e) 第五多肽,其包含第九Fc结构域单体;
f) 第六多肽,其包含第十Fc结构域单体;以及
g) 抗原结合结构域,其与所述第一多肽、所述第二多肽、所述第三多肽、所述第四多肽、所述第五多肽或所述第六多肽连接;

其中所述第二Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且所述第一Fc结构域单体和所述第七Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,所述第四Fc结构域单体和所述第八Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域,所述第三Fc结构域单体和所

述第九Fc结构域单体组合以形成第四Fc结构域,并且所述第六Fc结构域单体和所述第十Fc结构域单体组合以形成第五Fc结构域,并且其中所述Fc-抗原结合结构域构建体包含具有单个Fc结构域和所述抗原结合结构域的构建体未表现出的生物活性。

314. 一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包含:

a) 第一多肽,其包含

i) 第一Fc结构域单体;

ii) 第二Fc结构域单体,

iii) 第三Fc结构域单体,

iv) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的第一间隔物;以及

v) 连接所述第二Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体的第二间隔物;

b) 第二多肽,其包含

vi) 第四Fc结构域单体,

vii) 第五Fc结构域单体,

viii) 第六Fc结构域单体,

ix) 连接所述第四Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体的第三间隔物;以及

x) 连接所述第五Fc结构域单体和所述第六Fc结构域单体的第四间隔物;

c) 第三多肽,其包含第七Fc结构域单体;

d) 第四多肽,其包含第八Fc结构域单体;

e) 第五多肽,其包含第九Fc结构域单体;

f) 第六多肽,其包含第十Fc结构域单体;以及

g) 抗原结合结构域,其与所述第一多肽、所述第二多肽、所述第三多肽、所述第四多肽、所述第五多肽或所述第六多肽连接;

其中所述第二Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且所述第一Fc结构域单体和所述第七Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,所述第四Fc结构域单体和所述第八Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域,所述第三Fc结构域单体和所述第九Fc结构域单体组合以形成第四Fc结构域,并且所述第六Fc结构域单体和所述第十Fc结构域单体组合以形成第五Fc结构域。

315. 一种细胞培养基,其包含Fc-抗原结合结构域构建体的群体,其中以摩尔为基础,至少50%的所述Fc-抗原结合结构域构建体包含:

a) 第一多肽,其包含

i) 第一Fc结构域单体;

ii) 第二Fc结构域单体,

iii) 第三Fc结构域单体,

iv) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的第一间隔物;以及

v) 连接所述第二Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体的第二间隔物;

b) 第二多肽,其包含

vi) 第四Fc结构域单体,

vii) 第五Fc结构域单体,

viii) 第六Fc结构域单体,

ix) 连接所述第四Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体的第三间隔物;以及
x) 连接所述第五Fc结构域单体和所述第六Fc结构域单体的第四间隔物;
c) 第三多肽,其包含第七Fc结构域单体;
d) 第四多肽,其包含第八Fc结构域单体;
e) 第五多肽,其包含第九Fc结构域单体;
f) 第六多肽,其包含第十Fc结构域单体;以及
g) 抗原结合结构域,其与所述第一多肽、所述第二多肽、所述第三多肽、所述第四多肽、所述第五多肽或所述第六多肽连接;

其中所述第二Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且所述第一Fc结构域单体和所述第七Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,所述第四Fc结构域单体和所述第八Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域,所述第三Fc结构域单体和所述第九Fc结构域单体组合以形成第四Fc结构域,并且所述第六Fc结构域单体和所述第十Fc结构域单体组合以形成第五Fc结构域。

316. 一种制造Fc-抗原结合结构域构建体的方法,所述方法包括:

a) 培养表达以下项的宿主细胞:
(1) 第一多肽,其包含
i) 第一Fc结构域单体;
ii) 第二Fc结构域单体,
iii) 第三Fc结构域单体,
iv) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的第一间隔物;以及
v) 连接所述第二Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体的第二间隔物;
(2) 第二种多肽,其包含
vi) 第四Fc结构域单体,
vii) 第五Fc结构域单体,
viii) 第六Fc结构域单体,
ix) 连接所述第四Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体的第三间隔物;以及
x) 连接所述第五Fc结构域单体和所述第六Fc结构域单体的第四间隔物;
(3) 第三多肽,其包含第七Fc结构域单体;
(4) 第四多肽,其包含第八Fc结构域单体;
(5) 第五多肽,其包含第九Fc结构域单体;
(6) 第六多肽,其包含第十Fc结构域单体;以及
(7) 抗原结合结构域,其与所述第一多肽、所述第二多肽、所述第三多肽、所述第四多肽、所述第五多肽或所述第六多肽连接;

其中所述第二Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且所述第一Fc结构域单体和所述第七Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,所述第四Fc结构域单体和所述第八Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域,所述第三Fc结构域单体和所述第九Fc结构域单体组合以形成第四Fc结构域,并且所述第六Fc结构域单体和所述第十Fc结构域单体组合以形成第五Fc结构域,并且其中以摩尔为基础,细胞培养上清液中至少50%的所述Fc-抗原结合结构域构建体在结构上是相同的,以及

b) 从所述细胞培养上清液中纯化所述Fc-抗原结合结构域构建体。

317. 如权利要求312、313、314、315或316所述的Fc-抗原结合结构域构建体, 其中所述第二Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体中的每一者包含互补的二聚化选择性模块, 所述互补的二聚化选择性模块促进所述第二Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体之间的二聚化。

所述第一Fc结构域单体和所述第七Fc结构域单体中的每一者包含互补的二聚化选择性模块, 所述互补的二聚化选择性模块促进所述第一Fc结构域单体和所述第七Fc结构域单体之间的二聚化,

所述第四Fc结构域单体和所述第八Fc结构域单体中的每一者包含互补的二聚化选择性模块, 所述互补的二聚化选择性模块促进所述第四Fc结构域单体和所述第八Fc结构域单体之间的二聚化,

所述第三Fc结构域单体和所述第九Fc结构域单体中的每一者包含互补的二聚化选择性模块, 所述互补的二聚化选择性模块促进所述第三Fc结构域单体和所述第九Fc结构域单体之间的二聚化, 并且

所述第六Fc结构域单体和所述第十Fc结构域单体中的每一者包含互补的二聚化选择性模块, 所述互补的二聚化选择性模块促进所述第六Fc结构域单体和所述第十Fc结构域单体之间的二聚化。

318. 一种组合物, 其包含如前述权利要求中任一项所述的构建体, 其中所述组合物中至少5%、10%、15%、20%、30%或40%的聚糖缺少岩藻糖残基。

319. 一种Fc-抗原结合结构域构建体, 其包含:

a) 第一多肽, 其包含:

i) 第一Fc结构域单体;

ii) 第二Fc结构域单体

iii) 第一重链结合结构域, 以及

iv) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的接头;

b) 第二多肽, 其包含:

i) 第三Fc结构域单体;

ii) 第四Fc结构域单体

iii) 第二重链结合结构域; 以及

iv) 连接所述第三Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体的接头;

c) 第三多肽, 其包含第五Fc结构域单体;

d) 第四多肽, 其包含第六Fc结构域单体;

e) 第五多肽, 其包含第一轻链结合结构域; 以及

f) 第六多肽, 其包含第二轻链结合结构域;

其中所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体一起形成第一Fc结构域, 所述第二Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体一起形成第二Fc结构域, 所述第四Fc单体和所述第六Fc单体一起形成第三Fc结构域, 所述第一抗原重链结合结构域和所述第一抗原轻链结合结构域一起形成第一Fab; 并且所述第二抗原重链结合结构域和所述第二抗原轻链结合结构域一起形成第二Fab。

320. 如权利要求319所述的Fc抗原结构域构建体,其中所述第一多肽和所述第二多肽在序列上相同。

321. 如权利要求319所述的Fc抗原结构域构建体,其中所述第三多肽和所述第四多肽在序列上相同。

322. 如权利要求319所述的Fc抗原结构域构建体,其中所述第五多肽和所述第六多肽在序列上相同。

323. 如权利要求319所述的Fc抗原结构域构建体,其中所述第一多肽和所述第二多肽在序列上相同,所述第三多肽和所述第四多肽在序列上相同,并且所述第五多肽和所述第六多肽在序列上相同。

324. 如权利要求319-323中任一项所述的Fc抗原结构域构建体,其中每个所述Fc结构域单体的所述CH3结构域包括多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换。

325. 如权利要求319-323中任一项所述的Fc抗原结构域构建体,其中与人IgG1的氨基酸序列相比,每个所述Fc结构域单体的所述CH3结构域包括多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换。

326. 如权利要求319-323中任一项所述的Fc抗原结构域构建体,其中每个所述Fc结构域单体独立地包含SEQ ID NO:42、43、45和47中任一者具有多至10、8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换的氨基酸序列。

327. 如权利要求324-326中任一项所述的Fc抗原结构域构建体,其中所述单一氨基酸置换仅在所述CH3结构域中。

328. 如权利要求319-323中任一项所述的Fc抗原结构域构建体,其中所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体包含多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换,所述置换促进所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体之间的同二聚化。

329. 如权利要求319-323中任一项所述的Fc抗原结构域构建体,其中所述第二Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体包含多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换,所述置换促进所述第二Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体之间的异二聚化,并且所述第四Fc结构域单体和所述第六Fc结构域单体包含多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换,所述置换促进所述第四Fc结构域单体和所述第六Fc结构域单体之间的异二聚化。

330. 如权利要求328所述的Fc抗原结构域构建体,其中促进同二聚化的所述置换选自表4A和表4B中的置换。

331. 如权利要求329所述的Fc抗原结构域构建体,其中促进异二聚化的所述置换选自表3中的置换。

332. 一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包含:

a) 第一多肽,其包含:

i) 第一Fc结构域单体;

ii) 第二Fc结构域单体

iii) 第一重链结合结构域,以及

iv) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的接头;

b) 第二多肽,其包含:

i) 第三Fc结构域单体;

- ii) 第四Fc结构域单体
- iii) 第二重链结合结构域;以及
- iv) 连接所述第三Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体的接头;
- c) 第三多肽,其包含第五Fc结构域单体和第一抗原轻链结合结构域;以及
- d) 第四多肽,其包含第六Fc结构域单体和第二抗原轻链结合结构域;

其中所述第一Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体一起形成第一Fc结构域,所述第二Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体一起形成第二Fc结构域,所述第四Fc单体和所述第六Fc单体一起形成第三Fc结构域,所述第一抗原重链结合结构域和所述第一抗原轻链结合结构域一起形成第一Fab;并且所述第二抗原重链结合结构域和所述第二抗原轻链结合结构域一起形成第二Fab。

333. 一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包含:

- a) 第一多肽,其包含:
 - i) 第一Fc结构域单体;
 - ii) 第二Fc结构域单体
 - iii) 第一重链结合结构域,以及
 - iv) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的接头;
- b) 第二多肽,其包含:
 - i) 第三Fc结构域单体;
 - ii) 第四Fc结构域单体
 - iii) 第二重链结合结构域;以及
 - iv) 连接所述第三Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体的接头;
- c) 第三多肽,其包含第五Fc结构域单体;
- d) 第四多肽,其包含第六Fc结构域单体;
- e) 第五多肽,其包含第一轻链结合结构域;以及
- f) 第六多肽,其包含第二轻链结合结构域;

其中所述第一Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体一起形成第一Fc结构域,所述第三Fc结构域单体和所述第六Fc结构域单体一起形成第二Fc结构域,所述第二Fc单体和所述第四Fc单体一起形成第三Fc结构域,所述第一重链结合结构域和所述第一轻链结合结构域一起形成第一Fab;并且所述第二重链结合结构域和所述第二轻链结合结构域一起形成第二Fab。

334. 如权利要求333所述的Fc抗原结构域构建体,其中所述第一多肽和所述第二多肽在序列上相同。

335. 如权利要求333所述的Fc抗原结构域构建体,其中所述第三多肽和所述第四多肽在序列上相同。

336. 如权利要求333所述的Fc抗原结构域构建体,其中所述第五多肽和所述第六多肽在序列上相同。

337. 如权利要求333所述的Fc抗原结构域构建体,其中所述第一多肽和所述第二多肽在序列上相同,所述第三多肽和所述第四多肽在序列上相同,并且所述第五多肽和所述第六多肽在序列上相同。

338. 如权利要求333-337中任一项所述的Fc抗原结构域构建体, 其中每个所述Fc结构域单体的所述CH3结构域包括多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换。

339. 如权利要求333-337中任一项所述的Fc抗原结构域构建体, 其中与人IgG1的氨基酸序列相比, 每个所述Fc结构域单体的所述CH3结构域包括多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换。

340. 如权利要求333-337中任一项所述的Fc抗原结构域构建体, 其中每个所述Fc结构域单体独立地包含SEQ ID NO:42、43、45和47中任一者具有多至10、8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换的氨基酸序列。

341. 如权利要求333-337中任一项所述的Fc抗原结构域构建体, 其中所述单一氨基酸置换仅在所述CH3结构域中。

342. 如权利要求333-337中任一项所述的Fc抗原结构域构建体, 其中所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体包含多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换, 所述置换促进所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体之间的同二聚化。

343. 如权利要求333-337中任一项所述的Fc抗原结构域构建体, 其中所述第一Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体包含多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换, 所述置换促进所述第一Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体之间的异二聚化, 并且所述第三Fc结构域单体和所述第六Fc结构域单体包含多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换, 所述置换促进所述第四Fc结构域单体和所述第六Fc结构域单体之间的异二聚化。

344. 如权利要求342所述的Fc抗原结构域构建体, 其中促进同二聚化的所述置换选自表4A和表4B中的置换。

345. 如权利要求343所述的Fc抗原结构域构建体, 其中促进异二聚化的所述置换选自表3中的置换。

346. 一种Fc-抗原结合结构域构建体, 其包含:

a) 第一多肽, 其包含:

i) 第一Fc结构域单体;

ii) 第二Fc结构域单体,

iii) 第三Fc结构域单体,

iv) 第一重链结合结构域,

v) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的接头, 以及

vi) 连接所述第二Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体的接头;

b) 第二多肽, 其包含:

i) 第四Fc结构域单体,

ii) 第五Fc结构域单体,

iii) 第六Fc结构域单体,

iv) 第二重链结合结构域,

v) 连接所述第四Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体的接头, 以及

vi) 连接所述第五Fc结构域单体和所述第六Fc结构域单体的接头;

c) 第三多肽, 其包含第七Fc结构域单体;

d) 第四多肽, 其包含第八Fc结构域单体;

- e) 第五多肽,其包含第九Fc结构域单体;
- f) 第六多肽,其包含第十Fc结构域单体;
- g) 第七多肽,其包含第一轻链结合结构域;以及
- h) 第八多肽,其包含第二轻链结合结构域;

其中所述第一Fc结构域单体和所述第七Fc结构域单体一起形成第一Fc结构域,所述第四Fc结构域单体和所述第八Fc结构域单体一起形成第二Fc结构域,所述第二Fc单体和所述第五Fc单体一起形成第三Fc结构域,所述第三Fc结构域单体和所述第九Fc结构域单体一起形成第四Fc结构域,所述第六Fc单体和所述第十Fc单体一起形成第五Fc结构域,所述第一重链结合结构域和所述第一轻链结合结构域一起形成第一Fab;并且所述第二重链结合结构域和所述第二轻链结合结构域一起形成第二Fab。

347. 如权利要求346所述的Fc抗原结构域构建体,其中所述第一多肽和所述第二多肽在序列上相同。

348. 如权利要求346所述的Fc抗原结构域构建体,其中所述第三多肽和所述第四多肽在序列上相同。

349. 如权利要求346所述的Fc抗原结构域构建体,其中所述第五多肽和所述第六多肽在序列上相同。

350. 如权利要求346所述的Fc抗原结构域构建体,其中所述第七多肽和所述第八多肽在序列上相同。

351. 如权利要求346所述的Fc抗原结构域构建体,其中所述第一多肽和所述第二多肽在序列上相同,所述第三多肽和所述第四多肽在序列上相同,所述第五多肽和所述第六多肽在序列上相同,并且所述第七多肽和所述第八多肽在序列上相同。

352. 如权利要求346-351中任一项所述的Fc抗原结构域构建体,其中每个所述Fc结构域单体的所述CH3结构域包括多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换。

353. 如权利要求346-351中任一项所述的Fc抗原结构域构建体,其中与人IgG1的氨基酸序列相比,每个所述Fc结构域单体的所述CH3结构域包括多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换。

354. 如权利要求346-351中任一项所述的Fc抗原结构域构建体,其中每个所述Fc结构域单体独立地包含SEQ ID NO:42、43、45和47中任一者具有多至10、8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换的氨基酸序列。

355. 如权利要求346-351中任一项所述的Fc抗原结构域构建体,其中所述单一氨基酸置换仅在所述CH3结构域中。

356. 如权利要求346-351中任一项所述的Fc抗原结构域构建体,其中所述第二Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体包含多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换,所述置换促进所述第二Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体之间的同二聚化。

357. 如权利要求346-351中任一项所述的Fc抗原结构域构建体,其中所述第一Fc结构域单体和所述第七Fc结构域单体包含多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换,所述置换促进所述第一Fc结构域单体和所述第七Fc结构域单体之间的异二聚化,所述第四Fc结构域单体和所述第八Fc结构域单体包含多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换,所述置换促进所述第四Fc结构域单体和所述第八Fc结构域单体之间的异二聚化,所述第三Fc结构域单

体和所述第九Fc结构域单体包含多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换,所述置换促进所述第三Fc结构域单体和所述第九Fc结构域单体之间的异二聚化,并且所述第六Fc结构域单体和所述第十Fc结构域单体包含多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换,所述置换促进所述第六Fc结构域单体和所述第十Fc结构域单体之间的异二聚化。

358.如权利要求357所述的Fc抗原结构域构建体,其中促进同二聚化的所述置换选自表4A和表4B中的置换。

359.如权利要求358所述的Fc抗原结构域构建体,其中促进异二聚化的所述置换选自表3中的置换。

360.一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包含:

a) 第一多肽,其包含:

i) 第一Fc结构域单体;

ii) 第二Fc结构域单体,

iii) 第三Fc结构域单体,

iv) 第一重链结合结构域,

v) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的接头,以及

vi) 连接所述第二Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体的接头;

b) 第二多肽,其包含:

i) 第四Fc结构域单体,

ii) 第五Fc结构域单体,

iii) 第六Fc结构域单体,

iv) 第二重链结合结构域,

v) 连接所述第四Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体的接头,以及

vi) 连接所述第五Fc结构域单体和所述第六Fc结构域单体的接头;

c) 第三多肽,其包含第七Fc结构域单体;

d) 第四多肽,其包含第八Fc结构域单体;

e) 第五多肽,其包含第九Fc结构域单体和第一轻链结合结构域;以及

f) 第六多肽,其包含第十Fc结构域单体和第二轻链结合结构域

其中所述第一Fc结构域单体和所述第七Fc结构域单体一起形成第一Fc结构域,所述第四Fc结构域单体和所述第八Fc结构域单体一起形成第二Fc结构域,所述第二Fc单体和所述第五Fc单体一起形成第三Fc结构域,所述第三Fc结构域单体和所述第九Fc结构域单体一起形成第四Fc结构域,所述第六Fc单体和所述第十Fc单体一起形成第五Fc结构域,所述第一重链结合结构域和所述第一轻链结合结构域一起形成第一Fab;并且所述第二重链结合结构域和所述第二轻链结合结构域一起形成第二Fab。

361.一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包含:

a) 第一多肽,其包含:

i) 第一Fc结构域单体;

ii) 第二Fc结构域单体,

iii) 第三Fc结构域单体,

iv) 第一重链结合结构域,

- v) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的接头,以及
- vi) 连接所述第二Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体的接头;
- b) 第二多肽,其包含:
 - i) 第四Fc结构域单体,
 - ii) 第五Fc结构域单体,
 - iii) 第六Fc结构域单体,
 - iv) 第二重链结合结构域,
- v) 连接所述第四Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体的接头,以及
- vi) 连接所述第五Fc结构域单体和所述第六Fc结构域单体的接头;
- c) 第三多肽,其包含第七Fc结构域单体;
- d) 第四多肽,其包含第八Fc结构域单体;
- e) 第五多肽,其包含第九Fc结构域单体;
- f) 第六多肽,其包含第十Fc结构域单体;
- g) 第七多肽,其包含第一轻链结合结构域;以及
- h) 第八多肽,其包含第二轻链结合结构域;

其中所述第一Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体一起形成第一Fc结构域,所述第二Fc结构域单体和所述第七Fc结构域单体一起形成第二Fc结构域,所述第五Fc单体和所述第八Fc单体一起形成第三Fc结构域,所述第三Fc结构域单体和所述第九Fc结构域单体一起形成第四Fc结构域,所述第六Fc单体和所述第十Fc单体一起形成第五Fc结构域,所述第一重链结合结构域和所述第一轻链结合结构域一起形成第一Fab;并且所述第二重链结合结构域和所述第二轻链结合结构域一起形成第二Fab。

362. 如权利要求361所述的Fc抗原结构域构建体,其中所述第一多肽和所述第二多肽在序列上相同。

363. 如权利要求361所述的Fc抗原结构域构建体,其中所述第三多肽和所述第四多肽在序列上相同。

364. 如权利要求361所述的Fc抗原结构域构建体,其中所述第五多肽和所述第六多肽在序列上相同。

365. 如权利要求361所述的Fc抗原结构域构建体,其中所述第七多肽和所述第八多肽在序列上相同。

366. 如权利要求361所述的Fc抗原结构域构建体,其中所述第一多肽和所述第二多肽在序列上相同,所述第三多肽和所述第四多肽在序列上相同,所述第五多肽和所述第六多肽在序列上相同,并且所述第七多肽和所述第八多肽在序列上相同。

367. 如权利要求361-366中任一项所述的Fc抗原结构域构建体,其中每个所述Fc结构域单体的所述CH3结构域包括多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换。

368. 如权利要求361-366中任一项所述的Fc抗原结构域构建体,其中与人IgG1的氨基酸序列相比,每个所述Fc结构域单体的所述CH3结构域包括多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换。

369. 如权利要求361-366中任一项所述的Fc抗原结构域构建体,其中每个所述Fc结构域单体独立地包含SEQ ID NO:42、43、45和47中任一者具有多至10、8、7、6、5、4、3、2或1个单

一氨基酸置换的氨基酸序列。

370. 如权利要求361-366中任一项所述的Fc抗原结构域构建体,其中所述单一氨基酸置换仅在所述CH3结构域中。

371. 如权利要求361-366中任一项所述的Fc抗原结构域构建体,其中所述第一Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体包含多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换,所述置换促进所述第一Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体之间的同二聚化。

372. 如权利要求361-366中任一项所述的Fc抗原结构域构建体,其中所述第二Fc结构域单体和所述第七Fc结构域单体包含多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换,所述置换促进所述第二Fc结构域单体和所述第七Fc结构域单体之间的异二聚化,所述第五Fc结构域单体和所述第八Fc结构域单体包含多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换,所述置换促进所述第五Fc结构域单体和所述第八Fc结构域单体之间的异二聚化,所述第三Fc结构域单体和所述第九Fc结构域单体包含多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换,所述置换促进所述第三Fc结构域单体和所述第九Fc结构域单体之间的异二聚化,并且所述第六Fc结构域单体和所述第十Fc结构域单体包含多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换,所述置换促进所述第六Fc结构域单体和所述第十Fc结构域单体之间的异二聚化。

373. 如权利要求371所述的Fc抗原结构域构建体,其中促进同二聚化的所述置换选自表4A和表4B中的置换。

374. 如权利要求372所述的Fc抗原结构域构建体,其中促进异二聚化的所述置换选自表3中的置换。

375. 一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包含:

a) 第一多肽,其包含:

i) 第一Fc结构域单体;

ii) 第二Fc结构域单体,

iii) 第三Fc结构域单体,

iv) 第一重链结合结构域,

v) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的接头,以及

vi) 连接所述第二Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体的接头;

b) 第二多肽,其包含:

i) 第四Fc结构域单体,

ii) 第五Fc结构域单体,

iii) 第六Fc结构域单体,

iv) 第二重链结合结构域,

v) 连接所述第四Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体的接头,以及

vi) 连接所述第五Fc结构域单体和所述第六Fc结构域单体的接头;

c) 第三多肽,其包含第七Fc结构域单体;

d) 第四多肽,其包含第八Fc结构域单体;

e) 第五多肽,其包含第九Fc结构域单体和第一轻链结合结构域;

f) 第六多肽,其包含第十Fc结构域单体和第二轻链结合结构域;

其中所述第一Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体一起形成第一Fc结构域,所述第

二Fc结构域单体和所述第七Fc结构域单体一起形成第二Fc结构域,所述第五Fc单体和所述第八Fc单体一起形成第三Fc结构域,所述第三Fc结构域单体和所述第九Fc结构域单体一起形成第四Fc结构域,所述第六Fc单体和所述第十Fc单体一起形成第五Fc结构域,所述第一重链结合结构域和所述第一轻链结合结构域一起形成第一Fab;并且所述第二重链结合结构域和所述第二轻链结合结构域一起形成第二Fab。

376. 一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包含:

a) 第一多肽,其包含:

i) 第一Fc结构域单体;

ii) 第二Fc结构域单体,

iii) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的接头,以及

b) 第二多肽,其包含:

i) 第三Fc结构域单体;

ii) 第四Fc结构域单体

iii) 连接所述第三Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体的接头;

c) 第三多肽,其包含第五Fc结构域单体和第一重链结合结构域,以及

d) 第四多肽,其包含第六Fc结构域单体和第二重链结合结构域;

e) 第五多肽,其包含第一轻链结合结构域;以及

f) 第六多肽,其包含第二轻链结合结构域;

其中所述第一Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体一起形成第一Fc结构域,所述第三Fc结构域单体和所述第六Fc结构域单体一起形成第二Fc结构域,所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体一起形成第三Fc结构域,所述第一重链结合结构域和所述第一轻链结合结构域一起形成第一Fab;并且所述第二重链结合结构域和所述第二轻链结合结构域一起形成第二Fab。

377. 如权利要求202所述的Fc抗原结构域构建体,其中所述第一多肽和所述第二多肽在序列上相同。

378. 如权利要求202所述的Fc抗原结构域构建体,其中所述第三多肽和所述第四多肽在序列上相同。

379. 如权利要求202所述的Fc抗原结构域构建体,其中所述第五多肽和所述第六多肽在序列上相同。

380. 如权利要求202所述的Fc抗原结构域构建体,其中所述第一多肽和所述第二多肽在序列上相同,所述第三多肽和所述第四多肽在序列上相同,并且所述第五多肽和所述第六多肽在序列上相同。

381. 如权利要求376-380中任一项所述的Fc抗原结构域构建体,其中每个所述Fc结构域单体的所述CH3结构域包括多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换。

382. 如权利要求376-380中任一项所述的Fc抗原结构域构建体,其中与人IgG1的氨基酸序列相比,每个所述Fc结构域单体的所述CH3结构域包括多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换。

383. 如权利要求376-380中任一项所述的Fc抗原结构域构建体,其中每个所述Fc结构域单体独立地包含SEQ ID NO:42、43、45和47中任一者具有多至10、8、7、6、5、4、3、2或1个单

一氨基酸置换的氨基酸序列。

384. 如权利要求376-380中任一项所述的Fc抗原结构域构建体,其中所述单一氨基酸置换仅在所述CH3结构域中。

385. 如权利要求376-380中任一项所述的Fc抗原结构域构建体,其中所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体包含多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换,所述置换促进所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体之间的同二聚化。

386. 如权利要求376-380中任一项所述的Fc抗原结构域构建体,其中所述第一Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体包含多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换,所述置换促进所述第一Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体之间的异二聚化,并且所述第三Fc结构域单体和所述第六Fc结构域单体包含多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换,所述置换促进所述第三Fc结构域单体和所述第六Fc结构域单体之间的异二聚化。

387. 如权利要求385所述的Fc抗原结构域构建体,其中促进同二聚化的所述置换选自表4A和表4B中的置换。

388. 如权利要求386所述的Fc抗原结构域构建体,其中促进异二聚化的所述置换选自表3中的置换。

389. 一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包含:

a) 第一多肽,其包含:

i) 第一Fc结构域单体;

ii) 第二Fc结构域单体,

iii) 第一重链结合结构域,以及

iv) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的接头,

b) 第二多肽,其包含:

i) 第三Fc结构域单体;

ii) 第四Fc结构域单体,

iii) 第二重链结合结构域,以及

iv) 连接所述第三Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体的接头,

c) 第三多肽,其包含第五Fc结构域单体和第三重链结合结构域;

d) 第四多肽,其包含第六Fc结构域单体和第四轻链结合结构域;

e) 第五多肽,其包含第一轻链结合结构域;

f) 第六多肽,其包含第二轻链结合结构域;

g) 第七多肽,其包含第三轻链结合结构域;以及

h) 第八多肽,其包含第四轻链结合结构域;

其中所述第一Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体一起形成第一Fc结构域,所述第三Fc结构域单体和所述第六Fc结构域单体一起形成第二Fc结构域,所述第二Fc单体和所述第四Fc单体一起形成第三Fc结构域,所述第一轻链结合结构域和所述第三重链结合结构域一起形成第一Fab,所述第二轻链结合结构域和所述第四重链结合结构域一起形成第二Fab,所述第三轻链结合结构域和所述第一重链结合结构域一起形成第三Fab;并且所述第四轻链结合结构域和所述第二重链结合结构域一起形成第二Fab。

390. 如权利要求389所述的Fc抗原结构域构建体,其中所述第一多肽和所述第二多肽

至少一个所述Fc结构域单体在EU位置I253处包含置换。

404. 如权利要求403所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中EU位置I253处的每个氨基酸突变独立地选自由以下项组成的组:I253A、I253C、I253D、I253E、I253F、I253G、I253H、I253I、I253K、I253L、I253M、I253N、I253P、I253Q、I253R、I253S、I253T、I253V、I253W和I253Y。

405. 如权利要求319-401中任一项所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中至少一个所述Fc结构域单体在EU位置R292处包含置换。

406. 如权利要求45所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中EU位置R292处的每个氨基酸置换独立地选自由以下项组成的组:R292D、R292E、R292L、R292P、R292Q、R292R、R292T和R292Y。

407. 如权利要求319-401中任一项所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中至少一个所述Fc结构域单体包含选自由以下项组成的组的置换:T366Y、T366W、T394W、T394Y、F405W、F405A、Y407A、S354C、Y349T、T394F、K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R、D356K和D356R。

408. 如权利要求319-401中任一项所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中每个Fc结构域单体的所述铰链独立地包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列或由这些氨基酸序列组成:EPKSCDKTHTCPPCPAPELL和DKTHTCPPCPAPELL。

409. 如权利要求316所述的制造方法,其中在存在FUT8表达或活性的抑制剂的情况下培养所述细胞。

与工程化Fc-抗原结合结构域构建体有关的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2017年1月6日提交的美国临时申请号62/443,523的申请日的权益,该临时申请的内容通过引用整体并入本文。

背景技术

[0003] 许多治疗性抗体通过Fc结构域的效应子功能(诸如抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)和补体依赖性细胞毒性(CDC))募集先天免疫系统的元件而发挥作用。一直需要改进的治疗性蛋白质。

[0004] 蛋白质工程化可以增强基于效应子功能的细胞杀伤。具体地,可以通过对一个或多个Fc结构域进行部分或完全无岩藻糖基化来修饰与Fc γ RIII的结合。此类修饰可改变效应子功能。然而,将无岩藻糖基化与其他增强与Fc γ 受体的结合的方法组合的一些尝试尽管增加了与Fc γ RIII的结合,但未能增加效应子功能,这表明Fc γ RIII结合的改善超过阈值可能不会进一步改善效应子功能(Repp等人(2011) Combined Fc-protein-and Fc-glyco-engineering of scFv-Fc fusion proteins synergistically enhances CD16a binding but does not further enhance NK-cell mediated ADCC. J Immunol Methods. 373:67-78)。

发明内容

[0005] 本公开的特征在于用于将抗原结合结构域的靶特异性与至少两个Fc结构域组合以产生具有独特生物活性的新治疗剂的组合物和方法。

[0006] 在一些情况下,本公开设想将包含单个Fc结构域的治疗剂(例如,已知的治疗性抗体)的抗原结合结构域与至少两个Fc结构域组合以产生具有比包含单个Fc结构域的治疗剂更大的生物活性的新型治疗剂。为了产生此类构建体,本公开提供了用于组装具有至少两个(例如,多个)Fc结构域的构建体的各种方法,并且为了控制此类构建体的同二聚化和异二聚化,本公开提供了用于由有限数量的多肽链组装不同大小的分子的各种方法,所述多肽也是本公开的主题。这些构建体的特性允许有效产生基本上同质的药物组合物。药物组合物中的此类同质性是期望的,以确保药物组合物的安全性、功效、均匀性和可靠性。

[0007] 在各种情况下,包含本文所述的构建体或多肽复合物或多肽的组合物被无岩藻糖基化至少某种程度。例如,至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%或95%存在于组合物中的聚糖(例如,Fc聚糖)缺乏岩藻糖残基。因此,5%-60%、5%-50%、5%-40%、10%-50%、10%-50%、10%-40%、20%-50%或20%-40%的聚糖缺乏岩藻糖残基。可以通过在1,3,4-三-O-乙酰基-2-脱氧基-2-氟-L-岩藻糖抑制剂存在下培养产生抗体的细胞来产生无岩藻糖基化至少某种程度的组合物。可以使用多种其他方法来产生本文所述的构建体和多肽的相对无岩藻糖基化形式,包括:在FUT8表达降低或不表达的细胞中表达(例如,通过敲除FUT8或用RNAi(siRNA、miRNA或shRNA)降低表达),以及在过表达 β -1,4-甘露糖基-糖蛋白4- β -N-乙酰氨基葡萄糖转移酶(GnT-III)的细

胞中表达。本公开设想了包含本文所述的Fc-抗原结合结构域构建体的组合物,其中组合物中存在的至少3%的聚糖缺少岩藻糖残基,即组合物中至少5%的聚糖被无岩藻糖基化。

[0008] 在第一方面,本公开的特征在于一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包括增强的效应子功能,其中该Fc-抗原结合结构域构建体包括抗原结合结构域和通过接头与第二Fc结构域连接的第一Fc结构域,其中该Fc-抗原结合结构域构建体相对于具有单个Fc结构域和抗原结合结构域的构建体在抗体依赖性细胞毒性(ADCC)测定、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)测定中具有增强的效应子功能。

[0009] 在第二方面,本公开的特征在于一种组合物,其包括Fc-抗原结合结构域构建体的基本上同质的群体,该Fc-抗原结合结构域构建体包括抗原结合结构域和通过接头与第二Fc结构域连接的第一Fc结构域。

[0010] 在第三方面,本公开的特征在于一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包括抗原结合结构域和通过接头与第二Fc结构域连接的第一Fc结构域,其中该Fc-抗原结合结构域构建体包括具有单个Fc结构域和抗原结合结构域的构建体未表现出的生物活性。

[0011] 在第四方面,本公开的特征在于一种组合物,其包括Fc-抗原结合结构域构建体的基本上同质的群体,该Fc-抗原结合结构域构建体包括:a)第一多肽,其包括i)第一Fc结构域单体,ii)第二Fc结构域单体,以及iii)连接第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的接头;b)第二多肽,其包括第三Fc结构域单体;c)第三多肽,其包括第四Fc结构域单体;以及d)抗原结合结构域,其与第一多肽、第二多肽或第三多肽连接;其中第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域。

[0012] 在第四方面的一些实施方案中,抗原结合结构域与第一多肽和第二多肽或第三多肽连接,或与第二多肽和第三多肽连接,或者抗原结合结构域与第一多肽、第二多肽和第三多肽连接。

[0013] 在第四方面,本公开的特征在于一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包括增强的效应子功能,其中该Fc-抗原结合结构域构建体包括:a)第一多肽,其包括i)第一Fc结构域单体,ii)第二Fc结构域单体,以及iii)连接第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的接头;b)第二多肽,其包括第三Fc结构域单体;c)第三多肽,其包括第四Fc结构域单体;以及d)抗原结合结构域,其与第一多肽、第二多肽或第三多肽连接;其中第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,并且

[0014] 其中该Fc-抗原结合结构域构建体相对于具有单个Fc结构域和抗原结合结构域的构建体在抗体依赖性细胞毒性(ADCC)测定、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)测定中具有增强的效应子功能。

[0015] 在第五方面的一些实施方案中,单个Fc结构域构建体是抗体。

[0016] 在第六方面,本公开的特征在于一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包括:a)第一多肽,其包括i)第一Fc结构域单体,ii)第二Fc结构域单体,以及iii)连接第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的接头;b)第二多肽,其包括第三Fc结构域单体;c)第三多肽,其包括第四Fc结构域单体;以及d)抗原结合结构域,其与第一多肽、第二多肽或第三多肽连接;

[0017] 其中第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且第二

Fc结构域单体和第四Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,并且其中该Fc-抗原结合结构域构建体包括具有单个Fc结构域和抗原结合结构域的构建体未表现出的生物活性。

[0018] 在第六方面的一些实施方案中,生物活性是Fc受体介导的效应子功能,诸如ADCC、ADCP和/或CDC活性(例如,ADCC和ADCP活性、ADCC和CDC活性、ADCP和CDC活性,或者ADCC、ADCP和CDC活性)。

[0019] 在第七方面,本公开的特征在于一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包括:a)第一多肽,其包括i)第一Fc结构域单体,ii)第二Fc结构域单体,以及iii)连接第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的间隔物;b)第二多肽,其包括第三Fc结构域单体;c)第三多肽,其包括第四Fc结构域单体;以及d)抗原结合结构域,其与第一多肽、第二多肽或第三多肽连接;其中第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域。

[0020] 在本公开的第五方面、第六方面和第七方面的一些实施方案中,抗原结合结构域与第一多肽和第二多肽或第三多肽连接,或与第二多肽和第三多肽连接,或者抗原结合结构域与第一多肽、第二多肽和第三多肽连接。

[0021] 在本公开的第一方面、第二方面、第三方面和第四方面的一些实施方案中,抗原结合结构域是Fab。

[0022] 在本公开的第四方面、第五方面、第六方面和第七方面的一些实施方案中,抗原结合结构域是第一多肽、第二多肽或第三多肽的氨基酸序列的一部分,并且在一些实施方案中,抗原结合结构域是scFv。

[0023] 在本公开的第四方面、第五方面、第六方面和第七方面的一些实施方案中,抗原结合结构域包括 V_H 结构域和 C_H1 结构域,并且其中 V_H 和 C_H1 结构域是第一多肽、第二多肽或第三多肽的氨基酸序列的一部分。在一些实施方案中,抗原结合结构域还包括 V_L 结构域,其中在一些实施方案中,Fc-抗原结合结构域构建体包括第四多肽,该第四多肽包括 V_L 结构域。在一些实施方案中, V_H 结构域包括表1中列出的一组CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列, V_H 结构域包括包含表2中列出的抗体的序列的 V_H 结构域的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3, V_H 结构域包括表2中列出的抗体的 V_H 序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,并且该 V_H 序列不包括CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列时与表2中列出的抗体的 V_H 序列具有至少95%的同一性、至少97%的同一性、至少99%的同一性或至少99.5%的同一性,或者 V_H 结构域包括表2中列出的抗体的 V_H 序列。

[0024] 在本公开的第四方面、第五方面、第六方面和第七方面的一些实施方案中,抗原结合结构域包括表1中列出的一组CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列,抗原结合结构域包括来自表2中列出的抗体的一组 V_H 和 V_L 序列的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列,抗原结合结构域包括包含表2中列出的抗体的 V_H 序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3的 V_H 结构域以及包含表2中列出的抗体的 V_L 序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3的 V_L 结构域,其中 V_H 和 V_L 结构域序列不包括CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列时与表2中列出的抗体的 V_H 和 V_L 序列具有至少有95%的同一性、至少97%的同一性、至少99%的同一性或至少99.5%的同一性,或者抗原结合结构域包括表2中列出的抗体的一组 V_H 和 V_L 序列。

[0025] 在本公开的第四方面、第五方面、第六方面和第七方面的一些实施方案中,Fc-抗原结合结构域构建体还包括IgG C_L 抗体恒定结构域和IgG C_H1 抗体恒定结构域,其中IgG

GSGSGSGSGS、GSGSGSGSGSGS、GGSGGS、GGS GGSGGS、GGS GGSGSGSGGS、GGS G、GGS G、GGS GGGSG、GGS
GGSGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGS、GENLYFQSGG、SACYCELS、RSIAT、RPACKIPNDLKQKVMNH、GG
SAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGS G、AAANSSIDLISVPVDSR、GGS GGGSEGGGSEGGGSEGGGSE
GGGSEGGGSGGGGS、GGGSGGGSGGGGS、SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG、GGS GGGSGGGSGGGSGGGSGGS、GGGG、
GGGGGGGG、GGGGGGGGGG或GGGGGGGGGGGGGGGG。在一些实施方案中，间隔物是甘氨酸间隔
物，例如由4至30、8至30或12至30个甘氨酸残基组成的间隔物，诸如由20个甘氨酸残基组成
的间隔物。

[0033] 在本公开的第四方面、第五方面、第六方面和第七方面的一些实施方案中,抗原结合结构域通过接头与Fc结构域单体连接。在一些实施方案中,接头是间隔物。

[0034] 在本公开的第四方面、第五方面、第六方面和第七方面的一些实施方案中,至少一个Fc结构域在位置I253处包括至少一个氨基酸修饰。在一些实施方案中,位置I253处的每种氨基酸修饰独立地选自I253A、I253C、I253D、I253E、I253F、I253G、I253H、I253I、I253K、I253L、I253M、I253N、I253P、I253Q、I253R、I253S、I253T、I253V、I253W和I253Y。在一些实施方案中,位置I253处的每种氨基酸修饰是I253A。

[0035] 在本公开的第四方面、第五方面、第六方面和第七方面的一些实施方案中,至少一个Fc结构域在位置R292处包括至少一个氨基酸修饰。在一些实施方案中,位置R292处的每种氨基酸修饰独立地选自R292D、R292E、R292L、R292P、R292Q、R292R、R292T和R292Y。在一些实施方案中,位置R292处的每种氨基酸修饰是R292P。

[0036] 在本公开的第四方面、第五方面、第六方面和第七方面的一些实施方案中,一个或多个Fc结构域单体包括IgG铰链结构域、IgG C_H2抗体恒定结构域和IgG C_H3抗体恒定结构域。在一些实施方案中,每个Fc结构域单体包括IgG铰链结构域、IgG C_H2抗体恒定结构域和IgG C_H3抗体恒定结构域。在一些实施方案中,IgG是选自由以下项组成的组的亚型:IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3和IgG4。

[0037] 在本公开的第四方面、第五方面、第六方面和第七方面的一些实施方案中,第四多肽、第五多肽、第六多肽和第七多肽中的每一者中的N末端Asp突变为Gln。

[0038] 在本公开的第四方面、第五方面、第六方面和第七方面的一些实施方案中,第四多肽、第五多肽、第六多肽和第七多肽中的一者或多者缺乏C末端赖氨酸。在一些实施方案中,第四多肽、第五多肽、第六多肽和第七多肽中的每一者缺乏C末端赖氨酸。

[0039] 在本公开的第四方面、第五方面、第六方面和第七方面的一些实施方案中, Fc-抗原结合结构域构建体还包括通过接头与一个或多个多肽的N末端或C末端连接的白蛋白结合肽。

[0040] 在第八方面,本公开的特征在于一种细胞培养基,其包括Fc-抗原结合结构域构建体的群体,其中以摩尔为基础,至少50%的Fc-抗原结合结构域构建体在结构上是相同的,并且其中Fc-抗原结合结构域构建体以至少0.1mg/L、10mg/L、25mg/L、50mg/L、75mg/L或100mg/L的浓度存在于培养基中。

[0041] 在本公开的第八方面的一些实施方案中,以摩尔为基础,至少75%、至少85%或至少95%的Fc-抗原结合结构域构建体在结构上是相同的。

[0042] 在第九方面,本公开的特征在于一种细胞培养基,其包括Fc-抗原结合结构域构建体的群体,其中以摩尔为基础,至少50%的Fc-抗原结合结构域构建体包括:a)第一多肽,其

包括i) 第一Fc结构域单体, ii) 第二Fc结构域单体, 以及iii) 连接第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的接头; b) 第二多肽, 其包括第三Fc结构域单体; c) 第三多肽, 其包括第四Fc结构域单体; 以及d) 抗原结合结构域, 其与第一多肽、第二多肽或第三多肽连接; 其中第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域, 并且第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域。

[0043] 在本公开的第九方面的一些实施方案中, 以摩尔为基础, 至少75%、至少85%或至少95%的Fc-抗原结合结构域构建体包括第一Fc结构域、第二Fc结构域和抗原结合结构域。

[0044] 在第十方面, 本公开的特征在于一种制造Fc-抗原结合结构域构建体的方法, 该方法包括: a) 培养表达以下项的宿主细胞: (1) 第一多肽, 其包括i) 第一Fc结构域单体, ii) 第二Fc结构域单体, 以及iii) 连接第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的接头; (2) 第二多肽, 其包括第三Fc结构域单体; (3) 第三多肽, 其包括第四Fc结构域单体; 以及(4) 抗原结合结构域; 其中第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域, 并且第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域; 其中抗原结合结构域与第一多肽、第二多肽或第三多肽连接, 从而形成Fc-抗原结合结构域构建体; 并且其中以摩尔为基础, 细胞培养上清液中至少50%的Fc-抗原结合结构域构建体在结构上是相同的, 以及b) 从细胞培养上清液中纯化Fc-抗原结合结构域构建体。

[0045] 在本公开的第九方面和第十方面的一些实施方案中, 抗原结合结构域与第一多肽和第二多肽或第三多肽连接, 或与第二多肽和第三多肽连接, 或者抗原结合结构域与第一多肽、第二多肽和第三多肽连接。

[0046] 在本公开的第九方面和第十方面的一些实施方案中, 抗原结合结构域是Fab。

[0047] 在本公开的第九方面和第十方面的一些实施方案中, 抗原结构域是第一多肽、第二多肽或第三多肽的氨基酸序列的一部分, 并且在一些实施方案中, 抗原结合结构域是scFv。

[0048] 在本公开的第九方面和第十方面的一些实施方案中, 抗原结合结构域包括 V_H 结构域和 C_H1 结构域, 并且其中 V_H 和 C_H1 结构域是第一多肽、第二多肽或第三多肽的氨基酸序列的一部分。在一些实施方案中, 抗原结合结构域还包括 V_L 结构域, 其中在一些实施方案中, Fc-抗原结合结构域构建体包括第四多肽, 该第四多肽包括 V_L 结构域。在一些实施方案中, V_H 结构域包括表1中列出的一组CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列, V_H 结构域包括包含表2中列出的抗体的序列的 V_H 结构域的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3, V_H 结构域包括表2中列出的抗体的 V_H 序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3, 并且该 V_H 序列不包括CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列时与表2中列出的抗体的 V_H 序列具有至少95%的同一性、至少97%的同一性、至少99%的同一性或至少99.5%的同一性, 或者 V_H 结构域包括表2中列出的抗体的 V_H 序列。

[0049] 在本公开的第九方面和第十方面的一些实施方案中, 抗原结合结构域包括表1中列出的一组CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列, 抗原结合结构域包括来自表2中列出的抗体的一组 V_H 和 V_L 序列的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列, 抗原结合结构域包括包含表2中列出的抗体的 V_H 序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3的 V_H 结构域以及包含表2中列出的抗体的 V_L 序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3的 V_L 结构域, 其中 V_H 和 V_L 结构域序列不包括CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列时与表2中列出的抗体的 V_H 和 V_L 序列具有至少有95%的同一性、至少97%的同一性、至少99%的同一性或

至少99.5%的同一性,或者抗原结合结构域包括表2中列出的抗体的一组 V_H 和 V_L 序列。

[0050] 在本公开的第九方面和第十方面的一些实施方案中,Fc-抗原结合结构域构建体还包括IgG C_L 抗体恒定结构域和IgG C_H1 抗体恒定结构域,其中IgG C_H1 抗体恒定结构域通过接头附接到第一多肽或第二多肽的N末端。

[0051] 在本公开的第九方面和第十方面的一些实施方案中,第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体包括互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体之间的二聚化。

[0052] 在本公开的第九方面和第十方面的一些实施方案中,第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体包括互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体之间的二聚化。

[0053] 在本公开的第九方面和第十方面的一些实施方案中,二聚化选择性模块包括进入一个Fc结构域单体的 C_H3 结构域中的工程化空腔和进入另一个Fc结构域单体的 C_H3 结构域中的工程化突起,其中工程化空腔和工程化突起被定位成形成Fc结构域单体的突起-进入-空腔对。在一些实施方案中,工程化突起包括选自S354C、T366W、T366Y、T394W、T394F和F405W的至少一种修饰,并且工程化空腔包括选自Y349C、T366S、L368A、Y407V、Y407T、Y407A、F405A和T394S的至少一种修饰。在一些实施方案中,一个Fc结构域单体包括Y407V和Y349C,而另一个Fc结构域单体包括T366W和S354C。

[0054] 在本公开的第九方面和第十方面的一些实施方案中,二聚化选择性模块包括进入一个结构域单体的 C_H3 结构域中的带负电的氨基酸和进入另一个Fc结构域单体的 C_H3 结构域中的带正电的氨基酸,其中带负电的氨基酸和带正电的氨基酸被定位成促进Fc结构域的形成。在一些实施方案中,第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体中的每一者包括D399K和K409D或K409E,第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体中的每一者包括K392D和D399K,第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体中的每一者包括E357K和K370E,第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体中的每一者包括D356K和K439D,第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体中的每一者包括K392E和D399K,第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体中的每一者包括E357K和K370D,第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体中的每一者包括D356K和K439E,第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体中的每一者包括S354C和T366W,并且第三多肽和第四多肽各自包括Y349C、T366S、L368A和Y407V,第三多肽和第四多肽中的每一者包括S354C和T366W,并且第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体各自包括Y349C、T366S、L368A和Y407V,第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体中的每一者包括E357K或E357R,并且第三多肽和第四多肽各自包括K370D或K370E,第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体中的每一者包括K370D或K370E,并且第三多肽和第四多肽各自包括E357K或E357R,第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体中的每一者包括K409D或K409E,第三多肽和第四多肽各自包括D399K或D399R,或者第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体中的每一者结构域单体包括D399K或D399R,并且第三多肽和第四多肽各自包括K409D或K409E。

[0055] 在本公开的第九方面和第十方面的一些实施方案中,第二多肽和第三多肽具有相同的氨基酸序列。

[0056] 在本公开的第九方面和第十方面的一些实施方案中,Fc-抗原结合结构域构建体中的一个或多个接头是键。

[illegible]

[0058] 在本公开的第九方面和第十方面的一些实施方案中,抗原结合结构域通过接头与Fc结构域单体连接。在一些实施方案中,接头是间隔物。

[0059] 在本公开的第九方面和第十方面的一些实施方案中,至少一个Fc结构域在位置I253处包括至少一个氨基酸修饰。在一些实施方案中,位置I253处的每种氨基酸修饰独立地选自I253A、I253C、I253D、I253E、I253F、I253G、I253H、I253I、I253K、I253L、I253M、I253N、I253P、I253Q、I253R、I253S、I253T、I253V、I253W和I253Y。在一些实施方案中,位置I253处的每种氨基酸修饰是I253A。

[0060] 在本公开的第九方面和第十方面的一些实施方案中,至少一个Fc结构域在位置R292处包括至少一个氨基酸修饰。在一些实施方案中,位置R292处的每种氨基酸修饰独立地选自R292D、R292E、R292L、R292P、R292Q、R292R、R292T和R292Y。在一些实施方案中,位置R292处的每种氨基酸修饰是R292P。

[0061] 在本公开的第九方面和第十方面的一些实施方案中,一个或多个Fc结构域单体包括IgG铰链结构域、IgG C_H2抗体恒定结构域和IgG C_H3抗体恒定结构域。在一些实施方案中,每个Fc结构域单体包括IgG铰链结构域、IgG C_H2抗体恒定结构域和IgG C_H3抗体恒定结构域。在一些实施方案中,IgG是选自由以下项组成的组的亚型:IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3和IgG4。

[0062] 在本公开的第九方面和第十方面的一些实施方案中,第一多肽、第二多肽、第三多肽和第四多肽中的每一者中的N末端Asp突变为Gln。

[0063] 在本公开的第九方面和第十方面的一些实施方案中,第一多肽、第二多肽、第三多肽和第四多肽中的一者或多者缺乏C末端赖氨酸。在一些实施方案中,第一多肽、第二多肽、第三多肽和第四多肽中的每一者缺乏C末端赖氨酸。

[0064] 在本公开的第九方面和第十方面的一些实施方案中,Fc-抗原结合结构域构建体还包括通过接头与一个或多个多肽的N末端或C末端连接的白蛋白结合肽。

[0065] 在第十一方面,本公开的特征在于一种组合物,其包括Fc-抗原结合结构域构建体的基本上同质的群体,该Fc-抗原结合结构域构建体包括:a)第一多肽,其包括i)第一Fc结构域单体,ii)第二Fc结构域单体,以及iii)连接第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的接头;b)第二多肽,其包括第三Fc结构域单体;c)第三多肽,其包括第四Fc结构域单体;d)第一抗原结合结构域,其与所述第一多肽连接;以及e)第二抗原结合结构域,其与第二多肽和/或第三多肽连接;其中第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,并且其中第一

抗原结合结构域和第二抗原结合结构域结合不同的抗原。

[0066] 在本公开的第十一方面的一些实施方案中,第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体包括互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体之间的二聚化,其中第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体包括互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体之间的二聚化,并且其中第二多肽和第三多肽具有不同的氨基酸序列。

[0067] 在本公开的第十一方面的一些实施方案中,第一抗原结合结构域与第一多肽连接,并且第二抗原结合结构域与第二多肽和第三多肽连接。

[0068] 在本公开的第十一方面的一些实施方案中,第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体中的每一者包括E357K和K370D,并且第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体中的每一者包括K370D和E357K。

[0069] 在第十二方面,本公开的特征在于一种组合物,其包括Fc-抗原结合结构域构建体的基本上同质的群体,该Fc-抗原结合结构域构建体包括:a) 第一多肽,其包括i) 第一Fc结构域单体,ii) 第二Fc结构域单体,以及iii) 连接第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的接头;b) 第二多肽,其包括第三Fc结构域单体;c) 第三多肽,其包括第四Fc结构域单体;d) 第一抗原结合结构域,其与第一多肽连接;e) 第二抗原结合结构域,其与第二多肽连接;以及f) 第三抗原结合结构域,其与第三多肽连接;其中第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,并且其中第一抗原结合结构域、第二抗原结合结构域和第三抗原结合结构域结合不同的抗原。

[0070] 在本公开的第十二方面的一些实施方案中,第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体包括互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体之间的二聚化,其中第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体包括互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体之间的二聚化,并且其中第二多肽和第三多肽具有不同的氨基酸序列。

[0071] 在本公开的第十二方面的一些实施方案中,第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体中的每一者包括D399K和K409D,并且第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体中的每一者包括E357K和K370D。

[0072] 在本公开的第十一方面和第十二方面的一些实施方案中,第一抗原结合或第二抗原结合是Fab。在本公开的第十一方面和第十二方面的一些实施方案中,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域是Fab。在本公开的第九方面的一些实施方案中,第一抗原结合结构域、第二抗原结合结构域和第三抗原结合结构域是Fab。

[0073] 在本公开的第十一方面和第十二方面的一些实施方案中,第一抗原结合和第二抗原结合是scFv。在本公开的第十一方面和第十二方面的一些实施方案中,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域是scFv。在本公开的第九方面的一些实施方案中,第一抗原结合结构域、第二抗原结合结构域和第三抗原结合结构域是scFv。

[0074] 在本公开的第十一方面的一些实施方案中,第一抗原结合结构域或第二抗原结合结构域包括 V_H 结构域和 C_H1 结构域,并且其中 V_H 和 C_H1 结构域是第一多肽、第二多肽或第三多肽的氨基酸序列的一部分。在一些实施方案中,抗原结合结构域还包括 V_L 结构域,其中在一

些实施方案中, Fc-抗原结合结构域构建体包括第四多肽, 该第四多肽包括 V_L 结构域。在一些实施方案中, V_H 结构域包括表1中列出的一组CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列, V_H 结构域包括包含表2中列出的抗体的序列的VH结构域的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3, V_H 结构域包括表2中列出的抗体的 V_H 序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3, 并且该 V_H 序列不包括CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列时与表2中列出的抗体的 V_H 序列具有至少95%的同一性、至少97%的同一性、至少99%的同一性或至少99.5%的同一性, 或者 V_H 结构域包括表2中列出的抗体的 V_H 序列。

[0075] 在本公开的第十二方面的一些实施方案中, 第一抗原结合结构域、第二抗原结合结构域或第三抗原结合结构域包括 V_H 结构域和 C_H1 结构域, 并且其中 V_H 和 C_H1 结构域是第一多肽、第二多肽或第三多肽的氨基酸序列的一部分。在一些实施方案中, 抗原结合结构域还包括 V_L 结构域, 其中在一些实施方案中, Fc-抗原结合结构域构建体包括第四多肽, 该第四多肽包括 V_L 结构域。在一些实施方案中, V_H 结构域包括表1中列出的一组CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列, V_H 结构域包括包含表2中列出的抗体的序列的VH结构域的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3, V_H 结构域包括表2中列出的抗体的 V_H 序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3, 并且该 V_H 序列不包括CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列时与表2中列出的抗体的 V_H 序列具有至少95%的同一性、至少97%的同一性、至少99%的同一性或至少99.5%的同一性, 或者 V_H 结构域包括表2中列出的抗体的 V_H 序列。

[0076] 在本公开的第十一方面的一些实施方案中, 第一抗原结合结构域或第二抗原结合结构域包括表1中列出的一组CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列, 抗原结合结构域包括来自表2中列出的抗体的一组 V_H 和 V_L 序列的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列, 抗原结合结构域包括包含表2中列出的抗体的 V_H 序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3的 V_H 结构域以及包含表2中列出的抗体的 V_L 序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3的 V_L 结构域, 其中 V_H 和 V_L 结构域序列不包括CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列时与表2中列出的抗体的 V_H 和 V_L 序列具有至少有95%的同一性、至少97%的同一性、至少99%的同一性或至少99.5%的同一性, 或者抗原结合结构域包括表2中列出的抗体的一组 V_H 和 V_L 序列。

[0077] 在本公开的第十二方面的一些实施方案中, 第一抗原结合结构域、第二抗原结合结构域或第三抗原结合结构域包括表1中列出的一组CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列, 抗原结合结构域包括来自表2中列出的抗体的一组 V_H 和 V_L 序列的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列, 抗原结合结构域包括包含表2中列出的抗体的 V_H 序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3的 V_H 结构域以及包含表2中列出的抗体的 V_L 序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3的 V_L 结构域, 其中 V_H 和 V_L 结构域序列不包括CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列时与表2中列出的抗体的 V_H 和 V_L 序列具有至少有95%的同一性、至少97%的同一性、至少99%的同一性或至少99.5%的同一性, 或者抗原结合结构域包括表2中列出的抗体的一组 V_H 和 V_L 序列。

[0078] 在本公开的第十一方面和第十二方面的一些实施方案中, Fc-抗原结合结构域构建体还包括IgG C_L 抗体恒定结构域和IgG C_H1 抗体恒定结构域, 其中IgG C_H1 抗体恒定结构域通过接头附接到第一多肽或第二多肽的N末端。

[0079] 在本公开的第十一方面和第十二方面的一些实施方案中, 第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体包括互补的二聚化选择性模块, 所述互补的二聚化选择性模块促进第一Fc

至30、8至30或12至30个甘氨酸残基组成的间隔物,诸如由20个甘氨酸残基组成的间隔物。

[0085] 在本公开的第十一方面和第十二方面的一些实施方案中,一个或多个抗原结合结构域通过接头与Fc结构域单体连接。在一些实施方案中,接头是间隔物。

[0086] 在本公开的第十一方面和第十二方面的一些实施方案中,至少一个Fc结构域在位置I253处包括至少一个氨基酸修饰。在一些实施方案中,位置I253处的每种氨基酸修饰独立地选自I253A、I253C、I253D、I253E、I253F、I253G、I253H、I253I、I253K、I253L、I253M、I253N、I253P、I253Q、I253R、I253S、I253T、I253V、I253W和I253Y。在一些实施方案中,位置I253处的每种氨基酸修饰是I253A。

[0087] 在本公开的第十一方面和第十二方面的一些实施方案中,至少一个Fc结构域在位置R292处包括至少一个氨基酸修饰。在一些实施方案中,位置R292处的每种氨基酸修饰独立地选自R292D、R292E、R292L、R292P、R292Q、R292R、R292T和R292Y。在一些实施方案中,位置R292处的每种氨基酸修饰是R292P。

[0088] 在本公开的第十一方面和第十二方面的一些实施方案中,一个或多个Fc结构域单体包括IgG铰链结构域、IgG C_H2抗体恒定结构域和IgG C_H3抗体恒定结构域。在一些实施方案中,每个Fc结构域单体包括IgG铰链结构域、IgG C_H2抗体恒定结构域和IgG C_H3抗体恒定结构域。在一些实施方案中,IgG是选自由以下项组成的组的亚型:IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3和IgG4。

[0089] 在本公开的第十一方面和第十二方面的一些实施方案中,第一多肽、第二多肽、第三多肽和第四多肽中的每一者中的N末端Asp突变为Gln。

[0090] 在本公开的第十一方面和第十二方面的一些实施方案中,第一多肽、第二多肽、第三多肽和第四多肽中的一者或多者缺乏C末端赖氨酸。在一些实施方案中,第一多肽、第二多肽、第三多肽和第四多肽中的每一者缺乏C末端赖氨酸。

[0091] 在本公开的第十一方面和第十二方面的一些实施方案中,Fc-抗原结合结构域构建体还包括通过接头与一个或多个多肽的N末端或C末端连接的白蛋白结合肽。

[0092] 在第十三方面,本公开的特征在于一种组合物,其包括Fc-抗原结合结构域构建体的基本上同质的群体,该Fc-抗原结合结构域构建体包括:a) 第一多肽,其包括i) 第一Fc结构域单体,ii) 第二Fc结构域单体,以及iii) 连接第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的第一接头;以及b) 第二多肽,其包括i) 第三Fc结构域单体,ii) 第四Fc结构域单体,以及iv) 连接第三Fc结构域单体和第四Fc结构域单体的第二接头;以及c) 第三多肽,其包括第五Fc结构域单体;d) 第四多肽,其包括第六Fc结构域单体;以及d) 抗原结合结构域,其与第一多肽、第二多肽、第三多肽或第四多肽连接;其中第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且第二Fc结构域单体和第五Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,第四Fc结构域单体和第六Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域。

[0093] 在本公开的第十三方面的一些实施方案中,第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体中的每一者包括互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体之间的二聚化,第二Fc结构域单体和第五Fc结构域单体中的每一者包括互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进第二Fc结构域单体和第五Fc结构域单体之间的二聚化,并且第四Fc结构域单体和第六Fc结构域单体中的每一者包括互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进第四Fc结构域单体

和第六Fc结构域单体之间的二聚化。

[0094] 在第十四方面,本公开的特征在于一种组合物,其包括Fc-抗原结合结构域构建体的基本上同质的群体,该Fc-抗原结合结构域构建体包括:a)第一多肽,其包括i)第一Fc结构域单体,ii)第二Fc结构域单体,以及iii)连接第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的第一接头;以及b)第二多肽,其包括i)第三Fc结构域单体,ii)第四Fc结构域单体,以及iv)连接第三Fc结构域单体和第四Fc结构域单体的第二接头;以及c)第三多肽,其包括第五Fc结构域单体;d)第四多肽,其包括第六Fc结构域单体;以及e)抗原结合结构域,其与第一多肽、第二多肽、第三多肽或第四多肽连接;其中第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域。

[0095] 在本公开的第十四方面的一些实施方案中,第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体中的每一者包括互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体之间的二聚化,第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体中的每一者包括互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体之间的二聚化,并且第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体中的每一者包括互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体之间的二聚化。

[0096] 在第十五方面,本公开的特征在于一种组合物,其包括Fc-抗原结合结构域构建体的基本上同质的群体,该Fc-抗原结合结构域构建体包括:a)第一多肽,其包括i)第一Fc结构域单体,ii)第二Fc结构域单体,iii)第三Fc结构域单体,iv)连接第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的第一接头;以及v)连接第二Fc结构域单体和第三Fc结构域单体的第二接头;b)第二多肽,其包括i)第四Fc结构域单体,ii)第五Fc结构域单体,iii)第六Fc结构域单体,iv)连接第四Fc结构域单体和第五Fc结构域单体的第三接头;以及v)连接第五Fc结构域单体和第六Fc结构域单体的第四接头;c)第三多肽,其包括第七Fc结构域单体;d)第四多肽,其包括第八Fc结构域单体;e)第五多肽,其包括第九Fc结构域单体;f)第六多肽,其包括第十Fc结构域单体;以及g)抗原结合结构域,其与第一多肽、第二多肽、第三多肽、第四多肽、第五多肽或第六多肽连接;其中第二Fc结构域单体和第五Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且第一Fc结构域单体和第七Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,第四Fc结构域单体和第八Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域,第三Fc结构域单体和第九Fc结构域单体组合以形成第四Fc结构域,并且第六Fc结构域单体和第十Fc结构域单体组合以形成第五Fc结构域。

[0097] 在本公开的第十五方面的一些实施方案中,第二Fc结构域单体和第五Fc结构域单体中的每一者包括互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进第二Fc结构域单体和第五Fc结构域单体之间的二聚化,第一Fc结构域单体和第七Fc结构域单体中的每一者包括互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进第一Fc结构域单体和第七Fc结构域单体之间的二聚化,第四Fc结构域单体和第八Fc结构域单体中的每一者包括互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进第四Fc结构域单体和第八Fc结构域单体之间的二聚化,第三Fc结构域单体和第九Fc结构域单体中的每一者包括互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进第三Fc结构域单体和第九Fc结

构域单体之间的二聚化,并且第六Fc结构域单体和第十Fc结构域单体中的每一者包括互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进第六Fc结构域单体和第十Fc结构域单体之间的二聚化。

[0098] 在本公开的第十三方面、第十四方面和第十五方面的一些实施方案中,抗原结合结构域是Fab。

[0099] 在本公开的第十三方面、第十四方面和第十五方面的一些实施方案中,抗原结合结构域是一种或多种多肽的氨基酸序列的一部分,并且在一些实施方案中,抗原结合结构域是scFv。

[0100] 在本公开的第十三方面、第十四方面和第十五方面的一些实施方案中,抗原结合结构域包括 V_H 结构域和 C_H1 结构域,并且其中 V_H 和 C_H1 结构域是第一多肽、第二多肽或第三多肽的氨基酸序列的一部分。在一些实施方案中,抗原结合结构域还包括 V_L 结构域,其中在一些实施方案中,Fc-抗原结合结构域构建体包括第四多肽,该第四多肽包括 V_L 结构域。在一些实施方案中, V_H 结构域包括表1中列出的一组CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列, V_H 结构域包括包含表2中列出的抗体的序列的 V_H 结构域的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3, V_H 结构域包括表2中列出的抗体的 V_H 序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,并且该 V_H 序列不包括CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列时与表2中列出的抗体的 V_H 序列具有至少95%的同一性、至少97%的同一性、至少99%的同一性或至少99.5%的同一性,或者 V_H 结构域包括表2中列出的抗体的 V_H 序列。

[0101] 在本公开的第十三方面、第十四方面和第十五方面的一些实施方案中,抗原结合结构域包括表1中列出的一组CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列,抗原结合结构域包括来自表2中列出的抗体的一组 V_H 和 V_L 序列的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列,抗原结合结构域包括包含表2中列出的抗体的 V_H 序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3的 V_H 结构域以及包含表2中列出的抗体的 V_L 序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3的 V_L 结构域,其中 V_H 和 V_L 结构域序列不包括CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列时与表2中列出的抗体的 V_H 和 V_L 序列具有至少有95%的同一性、至少97%的同一性、至少99%的同一性或至少99.5%的同一性,或者抗原结合结构域包括表2中列出的抗体的一组 V_H 和 V_L 序列。

[0102] 在本公开的第十三方面、第十四方面和第十五方面的一些实施方案中,Fc-抗原结合结构域构建体还包括IgG C_L 抗体恒定结构域和IgG C_H1 抗体恒定结构域,其中IgG C_H1 抗体恒定结构域通过接头附接到第一多肽或第二多肽的N末端。

[0103] 在本公开的第十三方面、第十四方面和第十五方面的一些实施方案中,二聚化选择性模块包括进入一个Fc结构域单体的 C_H3 结构域中的工程化空腔和进入另一个Fc结构域单体的 C_H3 结构域中的工程化突起,其中工程化空腔和工程化突起被定位成形成Fc结构域单体的突起-进入-空腔对。在一些实施方案中,工程化突起包括选自S354C、T366W、T366Y、T394W、T394F和F405W的至少一种修饰,并且工程化空腔包括选自Y349C、T366S、L368A、Y407V、Y407T、Y407A、F405A和T394S的至少一种修饰。在一些实施方案中,一个Fc结构域单体包括Y407V和Y349C,而另一个Fc结构域单体包括T366W和S354C。

[0104] 在本公开的第十三方面、第十四方面和第十五方面的一些实施方案中,二聚化选择性模块包括进入一个结构域单体的 C_H3 结构域中的带负电的氨基酸和进入另一个Fc结构域单体的 C_H3 结构域中的带正电的氨基酸,其中带负电的氨基酸和带正电的氨基酸被定位

成促进Fc结构域的形成。在一些实施方案中,第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体中的每一者包括D399K和K409D或K409E,第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体中的每一者包括K392D和D399K,第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体中的每一者包括E357K和K370E,第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体中的每一者包括D356K和K439D,第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体中的每一者包括K392E和D399K,第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体中的每一者包括E357K和K370D,第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体中的每一者包括D356K和K439E,第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体中的每一者包括S354C和T366W,并且第三多肽和第四多肽各自包括Y349C、T366S、L368A和Y407V,第三多肽和第四多肽中的每一者包括S354C和T366W,并且第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体各自包括Y349C、T366S、L368A和Y407V,第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体中的每一者包括E357K或E357R,并且第三多肽和第四多肽各自包括K370D或K370E,第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体中的每一者包括K370D或K370E,并且第三多肽和第四多肽各自包括E357K或E357R,第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体中的每一者包括K409D或K409E,第三多肽和第四多肽各自包括D399K或D399R,或者第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体中的每一者结构域单体包括D399K或D399R,并且第三多肽和第四多肽各自包括K409D或K409E。

[0105] 在本公开的第十三方面、第十四方面和第十五方面的一些实施方案中,Fc-抗原结合结构域构建体中的一个或多个接头是键。

[0106] 在本公开的第十三方面、第十四方面和第十五方面的一些实施方案中，Fc-抗原结合结构域构建体中的一个或多个接头是间隔物。在一些实施方案中，间隔物包括具有以下序列的多肽：GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG、GGGGS、GGSG、SGGG、GSGS、GSGSGS、GSGSGSGS、GSGSGSGSGS、GSGSGSGSGSGS、GGSGGS、GGSGGSGGS、GGSGGSGGSGGS、GGSG、GGSG、GGSGGGSG、GGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS、GENLYFQSGG、SACYCELS、RSIAT、RPACKIPNDLKQKVMNH、GG SAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG、AAANSSIDLISVPVDSR、GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSE GGGSEGGGSGGGS、GGGSGGGSGGGS、SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG、GGSGGGSGGGSGGGSGGS、GGGG、GGGGGGGG、GGGGGGGGGG或GGGGGGGGGGGGGGGG。在一些实施方案中，间隔物是甘氨酸间隔物，例如由4至30、8至30或12至30个甘氨酸残基组成的间隔物，诸如由20个甘氨酸残基组成的间隔物。

[0107] 在本公开的第十三方面、第十四方面和第十五方面的一些实施方案中,抗原结合结构域通过接头与Fc结构域单体连接。在一些实施方案中,接头是间隔物。

[1018] 在本公开的第十三方面、第十四方面和第十五方面的一些实施方案中,至少一个Fc结构域在位置I253处包括至少一个氨基酸修饰。在一些实施方案中,位置I253处的每种氨基酸修饰独立地选自I253A、I253C、I253D、I253E、I253F、I253G、I253H、I253I、I253K、I253L、I253M、I253N、I253P、I253Q、I253R、I253S、I253T、I253V、I253W和I253Y。在一些实施方案中,位置I253处的每种氨基酸修饰是I253A。

[0109] 在本公开的第十三方面、第十四方面和第十五方面的一些实施方案中,至少一个Fc结构域在位置R292处包括至少一个氨基酸修饰。在一些实施方案中,位置R292处的每种氨基酸修饰独立地选自R292D、R292E、R292L、R292P、R292Q、R292R、R292T和R292Y。在一些实施方案中,位置R292处的每种氨基酸修饰是R292P。

[0110] 在本公开的第十三方面、第十四方面和第十五方面的一些实施方案中,一个或多

个Fc结构域单体包括IgG铰链结构域、IgG C_H2抗体恒定结构域和IgG C_H3抗体恒定结构域。在一些实施方案中,每个Fc结构域单体包括IgG铰链结构域、IgG C_H2抗体恒定结构域和IgG C_H3抗体恒定结构域。在一些实施方案中,IgG是选自由以下项组成的组的亚型:IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3和IgG4。

[0111] 在本公开的第十三方面、第十四方面和第十五方面的一些实施方案中,多肽中的每一者中的N末端Asp突变为Gln。

[0112] 在本公开的第十三方面、第十四方面和第十五方面的一些实施方案中,多肽中的一者或多者缺乏C末端赖氨酸。在一些实施方案中,多肽中的每一者缺乏C末端赖氨酸。

[0113] 在本公开的第十三方面、第十四方面和第十五方面的一些实施方案中,Fc-抗原结合结构域构建体还包括通过接头与一个或多个多肽的N末端或C末端连接的白蛋白结合肽。

[0114] 在第十六方面,本公开的特征在于一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包括:a) 第一多肽,其包括i) 第一Fc结构域单体,ii) 第二Fc结构域单体,以及iii) 连接第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的接头;b) 第二多肽,其包括第三Fc结构域单体;c) 第三多肽,其包括第四Fc结构域单体;以及d) 第一抗原结合结构域,其与第一多肽连接;以及e) 第二抗原结合结构域,其与第二多肽和/或第三多肽连接;其中第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域结合不同的抗原,并且其中该Fc-抗原结合结构域构建体相对于具有单个Fc结构域和抗原结合结构域的构建体在抗体依赖性细胞毒性(ADCC)测定、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)测定中具有增强的效应子功能。

[0115] 在第十七方面,本公开的特征在于一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包括:

[0116] a) 第一多肽,其包括i) 第一Fc结构域单体,ii) 第二Fc结构域单体,以及iii) 连接第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的接头;b) 第二多肽,其包括第三Fc结构域单体;c) 第三多肽,其包括第四Fc结构域单体;d) 第一抗原结合结构域,其与第一多肽连接;以及e) 第二抗原结合结构域,其与第二多肽和/或第三多肽连接;其中第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,并且其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域结合不同的抗原,并且其中该Fc-抗原结合结构域构建体包括具有单个Fc结构域和抗原结合结构域的构建体未表现出的生物活性。

[0117] 在第十八方面,本公开的特征在于一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包括:

[0118] a) 第一多肽,其包括i) 第一Fc结构域单体,ii) 第二Fc结构域单体,以及iii) 连接第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的间隔物;b) 第二多肽,其包括第三Fc结构域单体;c) 第三多肽,其包括第四Fc结构域单体;以及d) 第一抗原结合结构域,其与第一多肽连接;以及e) 第二抗原结合结构域,其与第二多肽和/或第三多肽连接,其中第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,并且其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域结合不同的抗原。

[0119] 在第十九方面,本公开的特征在于一种细胞培养基,其包括Fc-抗原结合结构域构建体的群体,其中以摩尔为基础,至少50%的Fc-抗原结合结构域构建体包括:a) 第一多肽,

其包括i) 第一Fc结构域单体, ii) 第二Fc结构域单体, 以及iii) 连接第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的接头; b) 第二多肽, 其包括第三Fc结构域单体; c) 第三多肽, 其包括第四Fc结构域单体; d) 第一抗原结合结构域, 其与第一多肽连接; 以及e) 第二抗原结合结构域, 其与第二多肽连接和/或第三多肽连接; 其中第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域, 并且第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域, 并且其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域结合不同的抗原。

[0120] 在第二十方面, 本公开的特征在于一种制造Fc-抗原结合结构域构建体的方法, 该方法包括: a) 培养表达以下项的宿主细胞: (1) 第一多肽, 其包括i) 第一Fc结构域单体, ii) 第二Fc结构域单体, 以及iii) 连接第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的接头; (2) 第二多肽, 其包括第三Fc结构域单体; (3) 第三多肽, 其包括第四Fc结构域单体; (4) 第一抗原结合结构域, 其与第一多肽连接; 以及(5) 第二抗原结合结构域, 其与第二多肽和/或第三多肽连接; 其中第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域, 并且第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域; 其中抗原结合结构域与第一多肽、第二多肽或第三多肽连接, 从而形成Fc-抗原结合结构域构建体, 其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域结合不同的抗原, 并且其中以摩尔为基础, 细胞培养上清液中至少50%的Fc-抗原结合结构域构建体在结构上是相同的, 以及b) 从细胞培养上清液中纯化Fc-抗原结合结构域构建体。

[0121] 在本公开的第十六方面、第十七方面、第十八方面、第十九方面和第二十方面的一些实施方案中, 第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体包括互补的二聚化选择性模块, 所述模块促进第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体之间的二聚化, 其中第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体包括互补的二聚化选择性模块, 所述模块促进第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体之间的二聚化, 并且其中第二多肽和第三多肽具有不同的氨基酸序列。

[0122] 在第二十一方面, 本公开的特征在于一种Fc-抗原结合结构域构建体, 其包括:

[0123] a) 第一多肽, 其包括i) 第一Fc结构域单体, ii) 第二Fc结构域单体, 以及iii) 连接第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的接头; b) 第二多肽, 其包括第三Fc结构域单体; c) 第三多肽, 其包括第四Fc结构域单体; d) 第一抗原结合结构域, 其与第一多肽连接; e) 第二抗原结合结构域, 其与第二多肽连接; 以及f) 第三抗原结合结构域, 其与第三多肽连接; 其中第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域, 并且第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域, 并且其中第一抗原结合结构域、第二抗原结合结构域和第三抗原结合结构域结合不同的抗原, 并且其中该Fc-抗原结合结构域构建体相对于具有单个Fc结构域和抗原结合结构域的构建体在抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 测定、抗体依赖性细胞吞噬作用 (ADCP) 和/或补体依赖性细胞毒性 (CDC) 测定中具有增强的效应子功能。

[0124] 在第二十二方面, 本公开的特征在于一种Fc-抗原结合结构域构建体, 其包括: a) 第一多肽, 其包括i) 第一Fc结构域单体, ii) 第二Fc结构域单体, 以及iii) 连接第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的接头; b) 第二多肽, 其包括第三Fc结构域单体; c) 第三多肽, 其包括第四Fc结构域单体; d) 第一抗原结合结构域, 其与第一多肽连接; e) 第二抗原结合结构域, 其与第二多肽连接; 以及f) 第三抗原结合结构域, 其与第三多肽连接; 其中第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域, 并且第二Fc结构域单体和第四Fc

结构域单体组合以形成第二Fc结构域,并且其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域结合不同的抗原,并且其中该Fc-抗原结合结构域构建体包括具有单个Fc结构域和抗原结合结构域的构建体未表现出的生物活性。

[0125] 在第二十三方面,本公开的特征在于一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包括:a) 第一多肽,其包括i) 第一Fc结构域单体,ii) 第二Fc结构域单体,以及iii) 连接第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的间隔物;b) 第二多肽,其包括第三Fc结构域单体;c) 第三多肽,其包括第四Fc结构域单体;d) 第一抗原结合结构域,其与第一多肽连接;e) 第二抗原结合结构域,其与第二多肽连接;以及f) 第三抗原结合结构域,其与第三多肽连接;其中第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,并且其中第一抗原结合结构域、第二抗原结合结构域和第三抗原结合结构域结合不同的抗原。

[0126] 在第二十四方面,本公开的特征在于一种细胞培养基,其包括Fc-抗原结合结构域构建体的群体,其中以摩尔为基础,至少50%的Fc-抗原结合结构域构建体包括:a) 第一多肽,其包括i) 第一Fc结构域单体,ii) 第二Fc结构域单体,以及iii) 连接第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的接头;b) 第二多肽,其包括第三Fc结构域单体;c) 第三多肽,其包括第四Fc结构域单体;d) 第一抗原结合结构域,其与第一多肽连接;e) 第二抗原结合结构域,其与第二多肽连接;以及f) 第三抗原结合结构域,其与第三多肽连接;其中第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,并且其中第一抗原结合结构域、第二抗原结合结构域和第三抗原结合结构域结合不同的抗原。

[0127] 在第二十五方面,本公开的特征在于一种制造Fc-抗原结合结构域构建体的方法,该方法包括:a) 培养表达以下项的宿主细胞:(1) 第一多肽,其包括i) 第一Fc结构域单体,ii) 第二Fc结构域单体,以及iii) 连接第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的接头;(2) 第二多肽,其包括第三Fc结构域单体;(3) 第三多肽,其包括第四Fc结构域单体;(4) 第一抗原结合结构域,其与第一多肽连接;(5) 第二抗原结合结构域,其与第二多肽连接;以及(6) 第三抗原结合结构域,其与第三多肽连接;其中第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域;其中抗原结合结构域与第一多肽、第二多肽或第三多肽连接,从而形成Fc-抗原结合结构域构建体,其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域结合不同的抗原,并且其中以摩尔为基础,细胞培养上清液中至少50%的Fc-抗原结合结构域构建体在结构上是相同的,以及b) 从细胞培养上清液中纯化Fc-抗原结合结构域构建体。

[0128] 在本公开的第二十一方面、第二十二方面、第二十三方面、第二十四方面和第二十五方面的一些实施方案中,第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体包括互补的二聚化选择性模块,所述模块促进第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体之间的二聚化,其中第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体包括互补的二聚化选择性模块,所述模块促进第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体之间的二聚化,并且其中第二多肽和第三多肽具有不同的氨基酸序列。

[0129] 在第二十六方面,本公开的特征在于一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包括:a) 第一多肽,其包括i) 第一Fc结构域单体,ii) 第二Fc结构域单体,以及iii) 连接第一Fc结构

域单体和第二Fc结构域单体的第一接头;以及b)第二多肽,其包括iv)第三Fc结构域单体,v)第四Fc结构域单体,以及vi)连接第三Fc结构域单体和第四Fc结构域单体的第二接头;以及c)第三多肽,其包括第五Fc结构域单体;d)第四多肽,其包括第六Fc结构域单体;以及d)抗原结合结构域,其与第一多肽、第二多肽、第三多肽或第四多肽连接,其中第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且第二Fc结构域单体和第五Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,第四Fc结构域单体和第六Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域,并且其中该Fc-抗原结合结构域构建体相对于具有单个Fc结构域和抗原结合结构域的构建体在抗体依赖性细胞毒性(ADCC)测定、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)测定中具有增强的效应子功能。

[0130] 在第二十七方面,本公开的特征在于一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包括:a)第一多肽,其包括i)第一Fc结构域单体,ii)第二Fc结构域单体,以及iii)连接第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的第一接头;以及b)第二多肽,其包括iv)第三Fc结构域单体,v)第四Fc结构域单体,以及vi)连接第三Fc结构域单体和第四Fc结构域单体的第二接头;以及c)第三多肽,其包括第五Fc结构域单体;d)第四多肽,其包括第六Fc结构域单体;以及e)抗原结合结构域,其与第一多肽、第二多肽、第三多肽或第四多肽连接;其中第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且第二Fc结构域单体和第五Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,第四Fc结构域单体和第六Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域,并且其中该Fc-抗原结合结构域构建体包括具有单个Fc结构域和抗原结合结构域的构建体未表现出的生物活性。

[0131] 在第二十八方面,本公开的特征在于一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包括:a)第一多肽,其包括i)第一Fc结构域单体,ii)第二Fc结构域单体,以及iii)连接第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的第一间隔物;以及b)第二多肽,其包括iv)第三Fc结构域单体,v)第四Fc结构域单体,以及vi)连接第三Fc结构域单体和第四Fc结构域单体的第二间隔物;以及c)第三多肽,其包括第五Fc结构域单体;d)第四多肽,其包括第六Fc结构域单体;以及e)抗原结合结构域,其与第一多肽、第二多肽、第三多肽或第四多肽连接;其中第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且第二Fc结构域单体和第五Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,第四Fc结构域单体和第六Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域。

[0132] 在第二十九方面,本公开的特征在于一种细胞培养基,其包括Fc-抗原结合结构域构建体的群体,其中以摩尔为基础,至少50%的Fc-抗原结合结构域构建体包括:a)第一多肽,其包括i)第一Fc结构域单体,ii)第二Fc结构域单体,以及iii)连接第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的第一接头;以及b)第二多肽,其包括iv)第三Fc结构域单体,v)第四Fc结构域单体,以及vi)连接第三Fc结构域单体和第四Fc结构域单体的第二接头;以及c)第三多肽,其包括第五Fc结构域单体;d)第四多肽,其包括第六Fc结构域单体;以及e)抗原结合结构域,其与第一多肽、第二多肽、第三多肽或第四多肽连接;其中第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且第二Fc结构域单体和第五Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,第四Fc结构域单体和第六Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域。

[0133] 在第三十方面,本公开的特征在于一种制造Fc-抗原结合结构域构建体的方法,该

方法包括:a)培养表达以下项的宿主细胞:(1)第一多肽,其包括i)第一Fc结构域单体,ii)第二Fc结构域单体,以及iii)连接第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的第一接头;以及(2)第二多肽,其包括iv)第三Fc结构域单体,v)第四Fc结构域单体,以及vi)连接第三Fc结构域单体和第四Fc结构域单体的第二接头;以及(3)第三多肽,其包括第五Fc结构域单体;(4)第四多肽,其包括第六Fc结构域单体;以及(5)抗原结合结构域,其与第一多肽、第二多肽、第三多肽或第四多肽连接;其中第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且第二Fc结构域单体和第五Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,第四Fc结构域单体和第六Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域,并且其中以摩尔为基础,细胞培养上清液中至少50%的Fc-抗原结合结构域构建体在结构上是相同的,以及b)从细胞培养上清液中纯化Fc-抗原结合结构域构建体。

[0134] 在本公开的第二十六方面、第二十七方面、第二十八方面、第二十九方面和第三十方面的一些实施方案中,第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体中的每一者包括互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体之间的二聚化,第二Fc结构域单体和第五Fc结构域单体中的每一者包括互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进第二Fc结构域单体和第五Fc结构域单体之间的二聚化,并且第四Fc结构域单体和第六Fc结构域单体中的每一者包括互补的二聚化选择性模块,所述互补的二聚化选择性模块促进第四Fc结构域单体和第六Fc结构域单体之间的二聚化。

[0135] 在第三十一方面,本公开的特征在于一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包括:a)第一多肽,其包括i)第一Fc结构域单体,ii)第二Fc结构域单体,以及iii)连接第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的第一接头;以及b)第二多肽,其包括iv)第三Fc结构域单体,v)第四Fc结构域单体,以及vi)连接第三Fc结构域单体和第四Fc结构域单体的第二接头;以及c)第三多肽,其包括第五Fc结构域单体;d)第四多肽,其包括第六Fc结构域单体;以及e)抗原结合结构域,其与第一多肽、第二多肽、第三多肽或第四多肽连接;其中第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域,并且其中该Fc-抗原结合结构域构建体相对于具有单个Fc结构域和抗原结合结构域的构建体在抗体依赖性细胞毒性(ADCC)测定、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)测定中具有增强的效应子功能。

[0136] 在第三十二方面,本公开的特征在于一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包括:a)第一多肽,其包括i)第一Fc结构域单体,ii)第二Fc结构域单体,以及iii)连接第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的第一接头;以及b)第二多肽,其包括iv)第三Fc结构域单体,v)第四Fc结构域单体,以及vi)连接第三Fc结构域单体和第四Fc结构域单体的第二接头;以及c)第三多肽,其包括第五Fc结构域单体;d)第四多肽,其包括第六Fc结构域单体;以及e)抗原结合结构域,其与第一多肽、第二多肽、第三多肽或第四多肽连接;其中第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域,并且其中该Fc-抗原结合结构域构建体包括具有单个Fc结构域和抗原结合结构域的构建体未表现出的生物活性。

[0137] 在第三十三方面,本公开的特征在于一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包括:a) 第一多肽,其包括i) 第一Fc结构域单体,ii) 第二Fc结构域单体,以及iii) 连接第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的第一间隔物;以及b) 第二多肽,其包括iv) 第三Fc结构域单体,v) 第四Fc结构域单体,以及vi) 连接第三Fc结构域单体和第四Fc结构域单体的第二间隔物;以及c) 第三多肽,其包括第五Fc结构域单体;d) 第四多肽,其包括第六Fc结构域单体;以及e) 抗原结合结构域,其与第一多肽、第二多肽、第三多肽或第四多肽连接,其中第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域。

[0138] 在第三十四方面,本公开的特征在于一种细胞培养基,其包括Fc-抗原结合结构域构建体的群体,其中以摩尔为基础,至少50%的Fc-抗原结合结构域构建体包括:a) 第一多肽,其包括i) 第一Fc结构域单体,ii) 第二Fc结构域单体,以及iii) 连接第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的第一接头;以及b) 第二多肽,其包括iv) 第三Fc结构域单体,v) 第四Fc结构域单体,以及vi) 连接第三Fc结构域单体和第四Fc结构域单体的第二接头;以及c) 第三多肽,其包括第五Fc结构域单体;d) 第四多肽,其包括第六Fc结构域单体;以及e) 抗原结合结构域,其与第一多肽、第二多肽、第三多肽或第四多肽连接;其中第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域。

[0139] 在第三十五方面,本公开的特征在于一种制造Fc-抗原结合结构域构建体的方法,该方法包括:a) 培养表达以下项的宿主细胞:(1) 第一多肽,其包括i) 第一Fc结构域单体,ii) 第二Fc结构域单体,以及iii) 连接第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的第一接头;以及(2) 第二多肽,其包括iv) 第三Fc结构域单体,v) 第四Fc结构域单体,以及vi) 连接第三Fc结构域单体和第四Fc结构域单体的第二接头;以及(3) 第三多肽,其包括第五Fc结构域单体;(4) 第四多肽,其包括第六Fc结构域单体;以及(5) 抗原结合结构域,其与第一多肽、第二多肽、第三多肽或第四多肽连接;其中第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域,并且其中以摩尔为基础,细胞培养上清液中至少50%的Fc-抗原结合结构域构建体在结构上是相同的,以及b) 从细胞培养上清液中纯化Fc-抗原结合结构域构建体。

[0140] 在本公开的第三十一方面、第三十二方面、第三十三方面、第三十四方面或第三十五方面的一些实施方案中,第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体中的每一者包括互补的二聚化选择性模块,所述模块促进第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体之间的二聚化,第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体中的每一者包括互补的二聚化选择性模块,所述模块促进第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体之间的二聚化,并且第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体中的每一者包括互补的二聚化选择性模块,所述模块促进第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体之间的二聚化。

[0141] 在第三十六方面,本公开的特征在于一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包括:

[0142] a) 第一多肽,其包括i) 第一Fc结构域单体,ii) 第二Fc结构域单体,iii) 第三Fc结

构域单体,iv)连接第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的第一接头;以及v)连接第二Fc结构域单体和第三Fc结构域单体的第二接头;b)第二多肽,其包括vi)第四Fc结构域单体,vii)第五Fc结构域单体,viii)第六Fc结构域单体,ix)连接第四Fc结构域单体和第五Fc结构域单体的第三接头;以及x)连接第五Fc结构域单体和第六Fc结构域单体的第四接头;c)第三多肽,其包括第七Fc结构域单体;d)第四多肽,其包括第八Fc结构域单体;e)第五多肽,其包括第九Fc结构域单体;f)第六多肽,其包括第十Fc结构域单体;以及g)抗原结合结构域,其与第一多肽、第二多肽、第三多肽、第四多肽、第五多肽或第六多肽连接,其中第二Fc结构域单体和第五Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且第一Fc结构域单体和第七Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,第四Fc结构域单体和第八Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域,第三Fc结构域单体和第九Fc结构域单体组合以形成第四Fc结构域,并且第六Fc结构域单体和第十Fc结构域单体组合以形成第五Fc结构域,并且其中该Fc-抗原结合结构域构建体相对于具有单个Fc结构域和抗原结合结构域的构建体在抗体依赖性细胞毒性(ADCC)测定、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)测定中具有增强的效应子功能。

[0143] 在第三十七方面,本公开的特征在于一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包括:a)第一多肽,其包括i)第一Fc结构域单体,ii)第二Fc结构域单体,iii)第三Fc结构域单体,iv)连接第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的第一接头;以及v)连接第二Fc结构域单体和第三Fc结构域单体的第二接头;b)第二多肽,其包括vi)第四Fc结构域单体,vii)第五Fc结构域单体,viii)第六Fc结构域单体,ix)连接第四Fc结构域单体和第五Fc结构域单体的第三接头;以及x)连接第五Fc结构域单体和第六Fc结构域单体的第四接头;c)第三多肽,其包括第七Fc结构域单体;d)第四多肽,其包括第八Fc结构域单体;e)第五多肽,其包括第九Fc结构域单体;f)第六多肽,其包括第十Fc结构域单体;以及g)抗原结合结构域,其与第一多肽、第二多肽、第三多肽、第四多肽、第五多肽或第六多肽连接;其中第二Fc结构域单体和第五Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且第一Fc结构域单体和第七Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,第四Fc结构域单体和第八Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域,第三Fc结构域单体和第九Fc结构域单体组合以形成第四Fc结构域,并且第六Fc结构域单体和第十Fc结构域单体组合以形成第五Fc结构域,并且其中该Fc-抗原结合结构域构建体包括具有单个Fc结构域和抗原结合结构域的构建体未表现出的生物活性。

[0144] 在第三十八方面,本公开的特征在于一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包括:a)第一多肽,其包括i)第一Fc结构域单体,ii)第二Fc结构域单体,iii)第三Fc结构域单体,iv)连接第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的第一间隔物;以及v)连接第二Fc结构域单体和第三Fc结构域单体的第二间隔物;b)第二多肽,其包括vi)第四Fc结构域单体,vii)第五Fc结构域单体,viii)第六Fc结构域单体,ix)连接第四Fc结构域单体和第五Fc结构域单体的第三间隔物;以及x)连接第五Fc结构域单体和第六Fc结构域单体的第四间隔物;c)第三多肽,其包括第七Fc结构域单体;d)第四多肽,其包括第八Fc结构域单体;e)第五多肽,其包括第九Fc结构域单体;f)第六多肽,其包括第十Fc结构域单体;以及g)抗原结合结构域,其与第一多肽、第二多肽、第三多肽、第四多肽、第五多肽或第六多肽连接;其中第二Fc结构域单体和第五Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且第一Fc结构域单体和第七Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,第四Fc结构域单体和第八Fc结构域单体组合以形

成第三Fc结构域,第三Fc结构域单体和第九Fc结构域单体组合以形成第四Fc结构域,并且第六Fc结构域单体和第十Fc结构域单体组合以形成第五Fc结构域。

[0145] 在第三十九方面,本公开的特征在于一种细胞培养基,其包括Fc-抗原结合结构域构建体的群体,其中以摩尔为基础,至少50%的Fc-抗原结合结构域构建体包括:a) 第一多肽,其包括i) 第一Fc结构域单体,ii) 第二Fc结构域单体,iii) 第三Fc结构域单体,iv) 连接第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的第一间隔物;以及v) 连接第二Fc结构域单体和第三Fc结构域单体的第二间隔物;b) 第二多肽,其包括vi) 第四Fc结构域单体,vii) 第五Fc结构域单体,viii) 第六Fc结构域单体,ix) 连接第四Fc结构域单体和第五Fc结构域单体的第三间隔物;以及x) 连接第五Fc结构域单体和第六Fc结构域单体的第四间隔物;c) 第三多肽,其包括第七Fc结构域单体;d) 第四多肽,其包括第八Fc结构域单体;e) 第五多肽,其包括第九Fc结构域单体;f) 第六多肽,其包括第十Fc结构域单体;以及g) 抗原结合结构域,其与第一多肽、第二多肽、第三多肽、第四多肽、第五多肽或第六多肽连接;其中第二Fc结构域单体和第五Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且第一Fc结构域单体和第七Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,第四Fc结构域单体和第八Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域,第三Fc结构域单体和第九Fc结构域单体组合以形成第四Fc结构域,并且第六Fc结构域单体和第十Fc结构域单体组合以形成第五Fc结构域。

[0146] 在第四十方面,本公开的特征在于一种制造Fc-抗原结合结构域构建体的方法,该方法包括:a) 培养表达以下项的宿主细胞:(1) 第一多肽,其包括i) 第一Fc结构域单体,ii) 第二Fc结构域单体,iii) 第三Fc结构域单体,iv) 连接第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的第一间隔物;以及v) 连接第二Fc结构域单体和第三Fc结构域单体的第二间隔物;(2) 第二多肽,其包括vi) 第四Fc结构域单体,vii) 第五Fc结构域单体,viii) 第六Fc结构域单体,ix) 连接第四Fc结构域单体和第五Fc结构域单体的第三间隔物;以及x) 连接第五Fc结构域单体和第六Fc结构域单体的第四间隔物;(3) 第三多肽,其包括第七Fc结构域单体;(4) 第四多肽,其包括第八Fc结构域单体;(5) 第五多肽,其包括第九Fc结构域单体;(6) 第六多肽,其包括第十Fc结构域单体;以及(7) 抗原结合结构域,其与第一多肽、第二多肽、第三多肽、第四多肽、第五多肽或第六多肽连接;其中第二Fc结构域单体和第五Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,并且第一Fc结构域单体和第七Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,第四Fc结构域单体和第八Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域,第三Fc结构域单体和第九Fc结构域单体组合以形成第四Fc结构域,并且第六Fc结构域单体和第十Fc结构域单体组合以形成第五Fc结构域,并且其中以摩尔为基础,细胞培养上清液中至少50%的Fc-抗原结合结构域构建体在结构上是相同的,以及b) 从细胞培养上清液中纯化Fc-抗原结合结构域构建体。

[0147] 在本公开的第三十六方面、第三十七方面、第三十八方面、第三十九方面和第四十方面的一些实施方案中,第二Fc结构域单体和第五Fc结构域单体中的每一者包括互补的二聚化选择性模块,所述模块促进第二Fc结构域单体和第五Fc结构域单体之间的二聚化,第一Fc结构域单体和第七Fc结构域单体中的每一者包括互补的二聚化选择性模块,所述模块促进第一Fc结构域单体和第七Fc结构域单体之间的二聚化,第四Fc结构域单体和第八Fc结构域单体中的每一者包括互补的二聚化选择性模块,所述模块促进第四Fc结构域单体和第八Fc结构域单体之间的二聚化,第三Fc结构域单体和第九Fc结构域单体中的每一者包括互

补的二聚化选择性模块,所述模块促进第三Fc结构域单体和第九Fc结构域单体之间的二聚化,并且第六Fc结构域单体和第十Fc结构域单体中的每一者包括互补的二聚化选择性模块,所述模块促进第六Fc结构域单体和第十Fc结构域单体之间的二聚化。

[0148] 在本公开的所有方面的一些实施方案中,Fc-抗原结合结构域构建体具有减少的岩藻糖基化。因此,在一些实施方案中,包含Fc-抗原结合结构域构建体的组合物中少于40%、30%、20%、15%、10%或5%的Fc结构域单体被岩藻糖基化。

[0149] 在本公开的所有方面的一些实施方案中,Fc结构域单体在CH3结构域中包含图53A (SEQ ID NO:43)的具有多至10(9、8、7、6、5、4、3、2或1)个单一氨基酸变化的氨基酸序列。

[0150] 在本公开的所有方面的一些实施方案中,Fc结构域单体在CH3结构域中包含图53B (SEQ ID NO:45)的具有多至10(9、8、7、6、5、4、3、2或1)个单一氨基酸变化的氨基酸序列。

[0151] 在本公开的所有方面的一些实施方案中,Fc结构域单体在CH3结构域中包含图53C (SEQ ID NO:47)的具有多至10(9、8、7、6、5、4、3、2或1)个单一氨基酸变化的氨基酸序列。

[0152] 在本公开的所有方面的一些实施方案中,Fc结构域单体在CH3结构域中包含图53D (SEQ ID NO:42)的具有多至10(9、8、7、6、5、4、3、2或1)个单一氨基酸变化的氨基酸序列。

[0153] 在本公开的所有方面的一些实施方案中,例如,当Fc结构域单体在多肽的羧基末端时,Fc结构域单体不包括K447。在其他实施方案中,例如,当Fc结构域单体不在多肽的羧基末端时,Fc结构域单体包括K447。

[0154] 在本公开的所有方面的一些实施方案中,例如,当Fc结构域单体在接头的氨基末端时,Fc结构域单体不包括从E216到C220(包括端点)的铰链部分,而是包括从D221到L235(包括端点)的铰链部分。在其他实施方案中,例如,当Fc结构域单体在CH1结构域的羧基末端时,Fc结构域单体包括从E216到L235(包括端点)的铰链部分。在本公开的所有方面的一些实施方案中,铰链结构域(例如,在多肽的氨基末端的铰链结构域)在EU位置221处具有从Asp到Gln的突变。

[0155] 如上所述,本公开的Fc-抗原结合结构域构建体由多肽组装而成,所述多肽包括包含两个或更多个IgG1 Fc结构域单体的多肽,并且此类多肽是本公开的一个方面。

[0156] 在第四十一方面,本公开的特征在于一种多肽,其包含:抗原结合结构域;接头;第一IgG1 Fc结构域单体,其包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域;第二接头;第二IgG1 Fc结构域单体,其包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域;任选的第三接头;以及任选的第三IgG1 Fc结构域单体,其包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域,其中至少一个Fc结构域单体包含形成工程化突起的突变。

[0157] 在第四十一方面的各种实施方案中:抗原结合结构域包含抗体重链可变结构域;抗原结合结构域包含抗体轻链可变结构域;第一IgG1 Fc结构域单体包含两个或四个反向电荷突变,并且第二IgG1 Fc结构域单体包含形成工程化突起的突变;第一IgG1 Fc结构域单体包含形成工程化突起的突变,并且第二IgG1 Fc结构域单体包含两个或四个反向电荷突变;第一IgG1 Fc结构域单体和第二IgG1恒定结构域单体均包含形成工程化突起的突变;该多肽包含第三接头和第三IgG1 Fc结构域单体,其中第一IgG1Fc结构域单体、第二IgG1 Fc结构域单体和第三IgG1 Fc结构域单体各自包含形成工程化突起的突变;该多肽包含第三接头和第三IgG1 Fc结构域单体,其中第一IgG1 Fc结构域单体和第二IgG1 Fc结构域单体各自均包含形成工程化突起的突变,并且第三IgG1 Fc结构域单体包含两个或四个反向

电荷突变;该多肽包含第三接头和第三IgG1 Fc结构域单体,其中第一IgG1 Fc结构域单体和第三IgG1 Fc结构域单体各自均包含形成工程化突起的突变,并且第二IgG1结构域单体包含两个或四个反向电荷突变;该多肽包含第三接头和第三IgG1 Fc结构域单体,其中第二IgG1 Fc结构域单体和第三IgG1 Fc结构域单体各自均包含形成工程化突起的突变,并且第一IgG1结构域单体包含两个或四个反向电荷突变。

[0158] 在第四十一方面的各个实施方案中：包含形成工程化突起的突变的IgG1 Fc结构域单体还包含一个、两个或三个反向电荷突变；形成工程化突起的突变和反向电荷突变在CH3结构域中；突变在从EU位置G341到EU位置K447的序列内，包括端点；突变是单一氨基酸变化；第二接头和任选的第三接头包含选自以下项组成的组的氨基酸序列或由这些氨基酸序列组成：GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG、GGGGS、GGSG、SGGG、GSGS、GSGSGS、GSGSGSGS、GSGSGSGSGS、GSGSGSGSGSGS、GGSGGS、GGSGSGGS、GGSGSGSGSGS、GGSG、GGSG、GGSGGGSG、GGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG、GENLYFQSGG、SACYCELS、RSIAT、RPACKIPNDLKQKVMNH、GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG、AAANSSIDLISVPVDSR、GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGS、GGGSGGGSGGGS、SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG、GGSGGGSGGGSGGGSGGS、GGGG、GGGGGGGG、GGGGGGGGGGGG和GGGGGGGGGGGGGGGGGG；第二接头和任选的第三接头是甘氨酸间隔物；第二接头和任选的第三接头独立地由4至30、4至20、8至30、8至20、12至20或12至30个甘氨酸残基组成；第二接头和任选的第三接头由20个甘氨酸残基组成；至少一个Fc结构域单体在EU位置I253处包含单一氨基酸突变，EU位置I253处的每个氨基酸突变独立地选自以下项组成的组：I253A、I253C、I253D、I253E、I253F、I253G、I253H、I253I、I253K、I253L、I253M、I253N、I253P、I253Q、I253R、I253S、I253T、I253V、I253W和I253Y；I253位置处的每个氨基酸突变是I253A；至少一个Fc结构域单体在EU位置R292处包含单一氨基酸突变；EU位置R292处的每个氨基酸突变独立地选自以下项组成的组：R292D、R292E、R292L、R292P、R292Q、R292R、R292T和R292Y；R292位置处的每个氨基酸突变是R292P；每个Fc结构域单体独立地包含选自以下项组成的组的氨基酸序列或由这些氨基酸序列组成：EPKSCDKTHTCPPCPAPELL和DKTHTCPPCPAPELL；第二Fc结构域单体和第三Fc结构域单体的铰链部分具有氨基酸序列DKTHTCPPCPAPELL；第一Fc结构域单体的铰链部分具有氨基酸序列EPKSCDKTHTCPPCPAPPEL；第一Fc结构域单体的铰链部分具有氨基酸序列EPKSCDKTHTCPPCPAPEL，并且第二Fc结构域单体和第三Fc结构域单体的铰链部分具有氨基酸序列DKTHTCPPCPAPELL；每个Fc结构域单体的CH2结构域独立地包含以下氨基酸序列：GGPSVFLFPKPCKDTLMISRTPTEVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK，其具有不超过两个单一氨基酸缺失或置换；每个Fc结构域单体的CH2结构域是相同的并且包含以下氨基酸序列：GGPSVFLFPKPCKDTLMISRTPTEVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK，其具有不超过两个单一氨基酸缺失或置换；每个Fc结构域单体的CH2结构域是相同的并且包含以下氨基酸序列：GGPSVFLFPKPCKDTLMISRTPTEVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK，其具有不超过两个单一氨基酸置换；每个Fc结构域单体的CH2结构域是相同的并且包含以下氨基酸序列：GGPSVFLFPKPCKDTLMISRTPTEVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK；每个Fc结构域单体的CH3结构域独立地包含以下氨基酸序列：GQPREPQVY

TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSK

[0159] LTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG,其具有不超过10个单一氨基酸置换;每个Fc结构域单体的CH3结构域独立地包含以下氨基酸序列:GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSK

[0160] LTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG,其具有不超过8个单一氨基酸置换;每个Fc结构域单体的CH3结构域独立地包含以下氨基酸序列:GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSK

[0161] LTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG,其具有不超过6个单一氨基酸置换;其中每个Fc结构域单体的CH3结构域独立地包含以下氨基酸序列:GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSK

[0162] LTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG,其具有不超过5个单一氨基酸置换;单一氨基酸置换选自以下项组成的组:T366Y、T366W、T394W、T394Y、F405W、F405A、Y407A、S354C、Y349T、T394F、K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R、D356K和D356R;每个Fc结构域单体独立地包含SEQ ID NO:42、43、45和47中任一者具有多至10个单一氨基酸置换的氨基酸序列;多至6个单一氨基酸置换是CH3结构域中的反向电荷突变或是形成工程化突起的突变;单一氨基酸置换在从EU位置G341到EU位置K447的序列内,包括端点;至少一个形成工程化突起的突变选自以下项组成的组:T366Y、T366W、T394W、T394Y、F405W、S354C、Y349T和T394F;两个或四个反向电荷突变选自:K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R、D356K和D356R;抗原结合结构域是scFv;抗原结合结构域包括VH结构域和CH1结构域;抗原结合结构域还包含VL域;VH结构域包含表1中列出的一组CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列;VH结构域包含含有表2中列出的抗体的序列的VH结构域的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3;VH结构域包含表2中列出的抗体的VH序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,并且VH序列不包括CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列时与表2中列出的抗体的VH序列具有至少95%或98%的同一性;VH结构域包含表2中列出的抗体的VH序列;抗原结合结构域包含表1中列出的一组CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列;抗原结合结构域包含来自表2中列出的抗体的一组VH和VL序列的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列;抗原结合结构域包含含有表2中列出的抗体的VH序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3的VH结构域以及含有表2中列出的抗体的VL序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3的VL结构域,其中VH结构域和VL结构域序列不包括CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列时与表2中列出的抗体的VH序列和VL序列具有至少95%或98%的同一性;抗原结合结构域包含表2中列出的抗体的一组VH和VL序列;抗原结合结构域包含IgG CL抗体恒定结构域和IgG CH1抗体恒定结构域;抗原结合结构域包含VH结构域和CH1结构域,并且可以与包含VL结构域和CL结构域的多肽结合以形成Fab。

[0163] 还描述了一种多肽复合物,其包含上述组合物的两个拷贝,所述两个拷贝通过第一IgG1 Fc结构域单体或第二IgG1 Fc结构域单体的铰链内的半胱氨酸残基之间的二硫键连接。

[0164] 还描述了一种多肽复合物,其包含

[0165] 与第二多肽连接的上述多肽,该第二多肽包含IgG1 Fc结构域单体,该IgG1 Fc结构域单体包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域,其中多肽和第二多肽通过多肽的第一

GGGGGGGGGGGG和GGGGGGGGGGGGGGGGGG;第二接头和任选的第三接头是甘氨酸间隔物;第二接头和任选的第三接头独立地由4至30、4至20、8至30、8至20、12至20或12至30个甘氨酸残基组成;第二接头和任选的第三接头由20个甘氨酸残基组成;至少一个Fc结构域单体在EU位置I253处包含单一氨基酸突变,EU位置I253处的每个氨基酸突变独立地选自以下项组成的组:I253A、I253C、I253D、I253E、I253F、I253G、I253H、I253I、I253K、I253L、I253M、I253N、I253P、I253Q、I253R、I253S、I253T、I253V、I253W和I253Y;I253位置处的每个氨基酸突变是I253A;至少一个Fc结构域单体在EU位置R292处包含单一氨基酸突变;EU位置R292处的每个氨基酸突变独立地选自以下项组成的组:R292D、R292E、R292L、R292P、R292Q、R292R、R292T和R292Y;R292位置处的每个氨基酸突变是R292P;每个Fc结构域单体独立地包含选自以下项组成的组的氨基酸序列或由这些氨基酸序列组成:EPKSCDKTHTCPPCPAPELL和DKTHTCPPCPAPELL;第二Fc结构域单体和第三Fc结构域单体的铰链部分具有氨基酸序列DKTHTCPPCPAPELL;第一Fc结构域单体的铰链部分具有氨基酸序列EPKSCDKTHTCPPCPAPEL;第一Fc结构域单体的铰链部分具有氨基酸序列EPKSCDKTHTCPPCPAPEL,并且第二Fc结构域单体和第三Fc结构域单体的铰链部分具有氨基酸序列DKTHTCPPCPAPELL;每个Fc结构域单体的CH2结构域独立地包含以下氨基酸序列:GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK,其具有不超过两个单一氨基酸缺失或置换;每个Fc结构域单体的CH2结构域是相同的并且包含以下氨基酸序列:GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK,其具有不超过两个单一氨基酸缺失或置换;每个Fc结构域单体的CH2结构域是相同的并且包含以下氨基酸序列:GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK,其具有不超过两个单一氨基酸置换;每个Fc结构域单体的CH2结构域是相同的并且包含以下氨基酸序列:GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK;每个Fc结构域单体的CH3结构域独立地包含以下氨基酸序列:GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK

[0169] LTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG,其具有不超过10个单一氨基酸置换;每个Fc结构域单体的CH3结构域独立地包含以下氨基酸序列:GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK

[0170] LTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG,其具有不超过8个单一氨基酸置换;每个Fc结构域单体的CH3结构域独立地包含以下氨基酸序列:GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK

[0171] LTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG,其具有不超过6个单一氨基酸置换;其中每个Fc结构域单体的CH3结构域独立地包含以下氨基酸序列:GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK

[0172] LTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG,其具有不超过5个单一氨基酸置换;单一氨基酸置换选自以下项组成的组:T366Y、T366W、T394W、T394Y、F405W、F405A、Y407A、S354C、Y349T、T394F、K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R、D356K和D356R;每个Fc结构域单体独立地包含SEQ ID NO:42、43、45和47中任一者具

有多至10个单一氨基酸置换的氨基酸序列;多至6个单一氨基酸置换是CH3结构域中的反向电荷突变或是形成工程化突起的突变;单一氨基酸置换在从EU位置G341到EU位置K447的序列内,包括端点;至少一个形成工程化突起的突变选自由以下项组成的组:T366Y、T366W、T394W、T394Y、F405W、S354C、Y349T和T394F;两个或四个反向电荷突变选自:K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R、D356K和D356R;抗原结合结构域是scFv;抗原结合结构域包括VH结构域和CH1结构域;抗原结合结构域还包含VL域;VH结构域包含表1中列出的一组CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列;VH结构域包含含有表2中列出的抗体的序列的VH结构域的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3;VH结构域包含表2中列出的抗体的VH序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,并且VH序列不包括CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列时与表2中列出的抗体的VH序列具有至少95%或98%的同一性;VH结构域包含表2中列出的抗体的VH序列;抗原结合结构域包含表1中列出的一组CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列;抗原结合结构域包含来自表2中列出的抗体的一组VH和VL序列的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列;抗原结合结构域包含含有表2中列出的抗体的VH序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3的VH结构域以及含有表2中列出的抗体的VL序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3的VL结构域,其中VH结构域和VL结构域序列不包括CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列时与表2中列出的抗体的VH序列和VL序列具有至少95%或98%的同一性;抗原结合结构域包含表2中列出的抗体的一组VH和VL序列;抗原结合结构域包含IgG CL抗体恒定结构域和IgG CH1抗体恒定结构域;抗原结合结构域包含VH结构域和CH1结构域,并且可以与包含VL结构域和CL结构域的多肽结合以形成Fab。

[0173] 还描述了一种多肽复合物,其包含任何上述多肽的两个拷贝,所述两个拷贝通过第一IgG1 Fc结构域单体或第二IgG1 Fc结构域单体的铰链内的半胱氨酸残基之间的二硫键连接。

[0174] 还描述了一种多肽复合物,其包含与第二多肽连接的上述多肽,该第二多肽包含IgG1 Fc结构域单体,该IgG1 Fc结构域单体包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域,其中多肽和第二多肽通过多肽的第一IgG1 Fc结构域单体、第二IgG1 Fc结构域单体或第三IgG1 Fc结构域单体的铰链结构域内的半胱氨酸残基与第二多肽的铰链结构域内的半胱氨酸残基之间的二硫键连接。在各种实施方案中:第二多肽单体包含一个、两个或三个反向电荷突变;第二多肽单体包含选自表4的一个、两个或三个反向电荷突变,并且与多肽中选自表4的一个、两个或三个反向电荷突变互补;第二多肽包含SEQ ID NO:42、43、45和47中任一者具有多至10个单一氨基酸置换的氨基酸序列。

[0175] 在第四十三方面,本公开的特征在于一种多肽,该多肽包含:第一IgG1 Fc结构域单体,其包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域;第二接头;第二IgG1 Fc结构域单体,其包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域;任选的第三接头;以及任选的第三IgG1 Fc结构域单体,其包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域,其中至少一个Fc结构域单体包含形成工程化突起的突变。

[0176] 在第四十三方面的各种实施方案中:该多肽还包含:抗体重链可变结构域和第一IgG1单体的氨基末端的CH1结构域或第一IgG1单体的scFv氨基末端的scFv;第一IgG1 Fc结构域单体包含两个或四个反向电荷突变,并且第二IgG1 Fc结构域单体包含形成工程化突起的突变;第一IgG1 Fc结构域单体包含形成工程化突起的突变,并且第二IgG1 Fc结构域

单体包含两个或四个反向电荷突变;第一IgG1 Fc结构域单体和第二IgG恒定结构域单体均包含形成工程化突起的突变;该多肽包含第三接头和第三IgG1 Fc结构域单体,其中第一IgG1 Fc结构域单体、第二IgG1 Fc结构域单体和第三IgG1 Fc结构域单体各自包含形成工程化突起的突变;该多肽包含第三接头和第三IgG1 Fc结构域单体,其中第一IgG1 Fc结构域单体和第二IgG1 Fc结构域单体各自均包含形成工程化突起的突变,并且第三IgG1 Fc结构域单体包含两个或四个反向电荷突变;该多肽包含第三接头和第三IgG1 Fc结构域单体,其中第一IgG1 Fc结构域单体和第三IgG1 Fc结构域单体各自均包含形成工程化突起的突变,并且第二IgG1结构域单体包含两个或四个反向电荷突变;该多肽包含第三接头和第三IgG1 Fc结构域单体,其中第二IgG1 Fc结构域单体和第三IgG1 Fc结构域单体各自均包含形成工程化突起的突变,并且第一IgG1结构域单体包含两个或四个反向电荷突变。

[0177] 在第四十三方面的各个实施方案中:包含形成工程化突起的突变的IgG1 Fc结构域单体还包含一个、两个或三个反向电荷突变:

[illegible]

换;每个Fc结构域单体的CH2结构域是相同的并且包含以下氨基酸序列:GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK,其具有不超过两个单一氨基酸置换;每个Fc结构域单体的CH2结构域是相同的并且包含以下氨基酸序列:GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK;每个Fc结构域单体的CH3结构域独立地包含以下氨基酸序列:GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK

[0179] LTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG,其具有不超过10个单一氨基酸置换;每个Fc结构域单体的CH3结构域独立地包含以下氨基酸序列:GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK

[0180] LTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG,其具有不超过8个单一氨基酸置换;每个Fc结构域单体的CH3结构域独立地包含以下氨基酸序列:GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK

[0181] LTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG,其具有不超过6个单一氨基酸置换;其中每个Fc结构域单体的CH3结构域独立地包含以下氨基酸序列:GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK

[0182] LTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG,其具有不超过5个单一氨基酸置换;单一氨基酸置换选自以下项组成的组:T366Y、T366W、T394W、T394Y、F405W、S354C、Y349T、T394F、K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R、D356K和D356R;每个Fc结构域单体独立地包含SEQ ID NO:42、43、45和47中任一者具有多至10个单一氨基酸置换的氨基酸序列;多至6个单一氨基酸置换是CH3结构域中的反向电荷突变或是形成工程化突起的突变;单一氨基酸置换在从EU位置G341到EU位置K447的序列内,包括端点;至少一个形成工程化突起的突变选自以下项组成的组:T366Y、T366W、T394W、T394Y、F405W、S354C、Y349T和T394F;两个或四个反向电荷突变选自:K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R、D356K和D356R。

[0183] 在第四十四方面,本公开的特征在于一种多肽,该多肽包含:第一IgG1 Fc结构域单体,其包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域;第二接头;第二IgG1 Fc结构域单体,其包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域;任选的第三接头;以及任选的第三IgG1 Fc结构域单体,其包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域,其中至少一个Fc结构域单体包含一个、两个或三个反向电荷氨基酸突变。

[0184] 在第四十四方面的各种实施方案中:该多肽还包含抗体重链可变结构域和第一IgG1 Fc结构域单体的氨基末端的CH1结构域或第一IgG1 Fc结构域单体的氨基末端的scFv;第一IgG1 Fc结构域单体包含选自表5的一组两个反向电荷突变或选自表6的一组四个反向电荷突变,并且第二IgG1 Fc结构域单体包含选自表4的一个、两个或三个反向电荷氨基酸突变;第一IgG1 Fc结构域单体包含选自表4的一个、两个或三个反向电荷氨基酸突变,并且第二IgG1 Fc结构域单体包含选自表5的一组两个反向电荷突变或选自表6的一组四个反向电荷突变;第一IgG1 Fc结构域单体和第二IgG恒定结构域单体均包含选自表4的一个、两个或三个反向电荷氨基酸突变;该多肽还包含第三接头和第三IgG1 Fc结构域单体,其中第一IgG1 Fc结构域单体、第二IgG1 Fc结构域单体和第三IgG1 Fc结构域单体各自

[illegible]

换;每个Fc结构域单体的CH2结构域是相同的并且包含以下氨基酸序列:GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK,其具有不超过两个单一氨基酸置换;每个Fc结构域单体的CH2结构域是相同的并且包含以下氨基酸序列:GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK;每个Fc结构域单体的CH3结构域独立地包含以下氨基酸序列:GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK

[0185] LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG,其具有不超过10个单一氨基酸置换;每个Fc结构域单体的CH3结构域独立地包含以下氨基酸序列:GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK

[0186] LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG,其具有不超过8个单一氨基酸置换;每个Fc结构域单体的CH3结构域独立地包含以下氨基酸序列:GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK

[0187] LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG,其具有不超过6个单一氨基酸置换;其中每个Fc结构域单体的CH3结构域独立地包含以下氨基酸序列:GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK

[0188] LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG,其具有不超过5个单一氨基酸置换;单一氨基酸置换选自以下项组成的组:T366Y、T366W、T394W、T394Y、F405W、F405A、Y407A、S354C、Y349T、T394F、K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R、D356K和D356R;每个Fc结构域单体独立地包含SEQ ID NO:42、43、45和47中任一者具有多至10个单一氨基酸置换的氨基酸序列;多至6个单一氨基酸置换是CH3结构域中的反向电荷突变或形成工程化突起的突变;单一氨基酸置换在从EU位置G341到EU位置K447的序列内,包括端点;VH结构域或scFv包含表1中列出的一组CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列;VH结构域或scFv包含含有表2中列出的抗体的序列VH结构域的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3;VH结构域或scFv包含表2中列出的抗体的VH序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,并且VH序列不包括CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列时与表2中列出的抗体的VH序列具有至少95%或98%的同一性;VH结构域或scFv包含表2中列出的抗体的VH序列;VH结构域或scFv包含表1中列出的一组CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列;VH结构域或scFv包含来自表2中列出的抗体的一组VH和VL序列的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列;VH结构域或scFv包含含有表2中列出的抗体的VH序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3的VH结构域以及含有表2中列出的抗体的VL序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3的VL结构域,其中VH结构域和VL结构域序列不包括CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列时与表2中列出的抗体的VH序列和VL序列具有至少95%或98%的同一性;VH结构域或scFv包含表2中列出的抗体的一组VH和VL序列。

[0189] 还描述了编码第四十一方面、第四十二方面、第四十三方面和第四十四方面的任何前述多肽的核酸分子。

[0190] 还描述了:表达载体,其包括编码任何前述多肽的核酸;以及宿主细胞,其包含核酸或表达载体;宿主细胞,其还包含编码包含抗体VL结构域的多肽的核酸分子(例如,编码包含抗体VL结构域和抗体CL结构域的多肽的核酸分子);宿主细胞,其还包含编码包含抗体

VL结构域和抗体CL结构域的多肽的核酸分子;宿主细胞,其还包含编码包含具有不超过10个单一氨基酸突变的IgG1 Fc结构域单体的多肽的核酸分子;宿主细胞,其还包含编码包含具有不超过10个单一氨基酸突变的IgG1 Fc结构域单体的多肽的核酸分子。在各个实施方案中:IgG1 Fc结构域单体在CH3结构域中包含SEQ ID No:42、43、45和47中任一者具有不超过10、8、6或4个单一氨基酸突变的氨基酸序列。

[0191] 还描述了一种药物组合物,其包含本文所述的任何多肽或多肽复合物。在各种实施方案中,少于40%、30%、20%、10%、5%、2%的多肽具有至少一种岩藻糖。

[0192] 本公开的第四十一方面、第四十二方面、第四十三方面和第四十四方面的多肽可用作本文所述的各种Fc-抗原结合结构域构建体的组分。因此,第一方面至第四十方面中任一项的多肽(例如,那些可以包含抗原结合结构域的多肽)可以包含本公开的第四十一方面、第四十二方面、第四十三方面和第四十四方面中任一项的多肽或由这些多肽组成。

[0193] 用于本公开的所有方面的其他有用的多肽包括包含具有一个、两个或三个形成空腔的突变(例如,选自Y407T、Y407A、F405A、T394S、T394W:Y407T、T394S:Y407A、T366W:T394S、F405T、T366S:L368A:Y407V:Y349C、S364H:F405A)的Fc结构域单体(例如,包含SEQ ID No:42、43、45和47中任一者具有不超过8、6、5、4或3个单一氨基酸置换的氨基酸序列或由这些序列组成)的多肽。这些多肽可以任选地包括来自表4或表5的一个、两个或三个反向电荷突变。

[0194] 本文还描述了一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包含:

[0195] a) 第一多肽,其包含:

[0196] i) 第一Fc结构域单体;

[0197] ii) 第二Fc结构域单体

[0198] iii) 第一重链结合结构域,以及

[0199] iv) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的接头;

[0200] b) 第二多肽,其包含:

[0201] i) 第三Fc结构域单体;

[0202] ii) 第四Fc结构域单体

[0203] iii) 第二重链结合结构域;以及

[0204] iv) 连接所述第三Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体的接头;

[0205] c) 第三多肽,其包含第五Fc结构域单体;

[0206] d) 第四多肽,其包含第六Fc结构域单体;

[0207] e) 第五多肽,其包含第一轻链结合结构域;以及

[0208] f) 第六多肽,其包含第二轻链结合结构域;

[0209] 其中第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体一起形成第一Fc结构域,第二Fc结构域单体和第五Fc结构域单体一起形成第二Fc结构域,第四Fc单体和第六Fc单体一起形成第三Fc结构域,第一抗原重链结合结构域和第一抗原轻链结合结构域一起形成第一Fab;并且第二抗原重链结合结构域和第二抗原轻链结合结构域一起形成第二Fab。

[0210] 在各种实施方案中:第一多肽和第二多肽在序列上相同;第三多肽和第四多肽在序列上相同;第五多肽和第六多肽在序列上相同;第一多肽和第二多肽在序列上相同,第三多肽和第四多肽在序列上相同,并且第五多肽和第六多肽在序列上相同;每个Fc结构域单

体的CH3结构域包括多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换；与人IgG的氨基酸序列相比，每个Fc结构域单体的CH3结构域包括多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换；每个Fc结构域单体独立地包含SEQ ID NO:42、43、45和47中任一者具有多至10、8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换的氨基酸序列；单一氨基酸置换仅在CH3结构域中；第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体包含多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换，所述置换促进第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体之间的同二聚化；第二Fc结构域单体和第五Fc结构域单体包含多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换，所述置换促进第二Fc结构域单体和第五Fc结构域单体之间的异二聚化，并且第四Fc结构域单体和第六Fc结构域单体包含多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换，所述置换促进第四Fc结构域单体和第六Fc结构域单体之间的异二聚化；促进同二聚化的置换选自表4A和表4B中的置换；并且

[0211] 促进异二聚化的置换选自表3中的置换。

[0212] 还描述了一种Fc-抗原结合结构域构建体，其包含：

[0213] a) 第一多肽，其包含：

[0214] i) 第一Fc结构域单体；

[0215] ii) 第二Fc结构域单体

[0216] iii) 第一重链结合结构域，以及

[0217] iv) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的接头；

[0218] b) 第二多肽，其包含：

[0219] i) 第三Fc结构域单体；

[0220] ii) 第四Fc结构域单体

[0221] iii) 第二重链结合结构域；以及

[0222] iv) 连接所述第三Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体的接头；

[0223] c) 第三多肽，其包含第五Fc结构域单体和第一抗原轻链结合结构域；以及

[0224] d) 第四多肽，其包含第六Fc结构域单体和第二抗原轻链结合结构域；

[0225] 其中第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体一起形成第一Fc结构域，第二Fc结构域单体和第五Fc结构域单体一起形成第二Fc结构域，第四Fc单体和第六Fc单体一起形成第三Fc结构域，第一抗原重链结合结构域和第一抗原轻链结合结构域一起形成第一Fab；并且第二抗原重链结合结构域和第二抗原轻链结合结构域一起形成第二Fab。

[0226] 还描述了一种Fc-抗原结合结构域构建体，其包含：

[0227] a) 第一多肽，其包含：

[0228] i) 第一Fc结构域单体；

[0229] ii) 第二Fc结构域单体

[0230] iii) 第一重链结合结构域，以及

[0231] iv) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的接头；

[0232] b) 第二多肽，其包含：

[0233] i) 第三Fc结构域单体；

[0234] ii) 第四Fc结构域单体

[0235] iii) 第二重链结合结构域；以及

[0236] iv) 连接所述第三Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体的接头；

[0237] c) 第三多肽,其包含第五Fc结构域单体;

[0238] d) 第四多肽,其包含第六Fc结构域单体;

[0239] e) 第五多肽,其包含第一轻链结合结构域;以及

[0240] f) 第六多肽,其包含第二轻链结合结构域;

[0241] 其中第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体一起形成第一Fc结构域,第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体一起形成第二Fc结构域,第二Fc单体和第四Fc单体一起形成第三Fc结构域,第一重链结合结构域和第一轻链结合结构域一起形成第一Fab;并且第二重链结合结构域和第二轻链结合结构域一起形成第二Fab。

[0242] 在各种实施方案中:第一多肽和第二多肽在序列上相同;第三多肽和第四多肽在序列上相同;第五多肽和第六多肽在序列上相同;第一多肽和第二多肽在序列上相同,第三多肽和第四多肽在序列上相同,并且第五多肽和第六多肽在序列上相同;每个Fc结构域单体的CH3结构域包括多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换;与人IgG1的氨基酸序列相比,每个Fc结构域单体的CH3结构域包括多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换;每个Fc结构域单体独立地包含SEQ ID NO:42、43、45和47中任一者具有多至10、8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换的氨基酸序列;单一氨基酸置换仅在CH3结构域中;第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体包含多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换,所述置换促进第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体之间的同二聚化;第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体包含多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换,所述置换促进第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体之间的异二聚化,并且第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体包含多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换,所述置换促进第四Fc结构域单体和第六Fc结构域单体之间的异二聚化;促进同二聚化的置换选自表4A和表4B中的置换;并且促进异二聚化的置换选自表3中的置换。

[0243] 还描述了一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包含:

[0244] a) 第一多肽,其包含:

[0245] i) 第一Fc结构域单体;

[0246] ii) 第二Fc结构域单体,

[0247] iii) 第三Fc结构域单体,

[0248] iv) 第一重链结合结构域,

[0249] v) 连接第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的接头,以及

[0250] vi) 连接第二Fc结构域单体和第三Fc结构域单体的接头;

[0251] b) 第二多肽,其包含:

[0252] i) 第四Fc结构域单体,

[0253] ii) 第五Fc结构域单体,

[0254] iii) 第六Fc结构域单体,

[0255] iv) 第二重链结合结构域,

[0256] v) 连接第四Fc结构域单体和第五Fc结构域单体的接头,以及

[0257] vi) 连接第五Fc结构域单体和第六Fc结构域单体的接头;

[0258] c) 第三多肽,其包含第七Fc结构域单体;

[0259] d) 第四多肽,其包含第八Fc结构域单体;

[0260] e) 第五多肽,其包含第九Fc结构域单体;

[0261] f) 第六多肽,其包含第十Fc结构域单体;

[0262] g) 第七多肽,其包含第一轻链结合结构域;以及

[0263] h) 第八多肽,其包含第二轻链结合结构域;

[0264] 其中第一Fc结构域单体和第七Fc结构域单体一起形成第一Fc结构域,第四Fc结构域单体和第八Fc结构域单体一起形成第二Fc结构域,第二Fc单体和第五Fc单体一起形成第三Fc结构域,第三Fc结构域单体和第九Fc结构域单体一起形成第四Fc结构域,第六Fc单体和第十Fc单体一起形成第五Fc结构域,第一重链结合结构域和第一轻链结合结构域一起形成第一Fab;并且第二重链结合结构域和第二轻链结合结构域一起形成第二Fab。

[0265] 在各种实施方案中:第一多肽和第二多肽在序列上相同;第三多肽和第四多肽在序列上相同;第五多肽和第六多肽在序列上相同;第七多肽和第八多肽在序列上相同;第一多肽和第二多肽在序列上相同,第三多肽和第四多肽在序列上相同,第五多肽和第六多肽在序列上相同,并且第七多肽和第八多肽在序列上相同。每个Fc结构域单体的CH3结构域包括多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换;与人IgG1的氨基酸序列相比,每个Fc结构域单体的CH3结构域包括多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换;Fc结构域单体独立地包含SEQ ID NO:42、43、45和47中任一者具有多至10、8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换的氨基酸序列;单一氨基酸置换仅在CH3结构域中;第二Fc结构域单体和第五Fc结构域单体包含多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换,所述置换促进第二Fc结构域单体和第五Fc结构域单体之间的同二聚化;第一Fc结构域单体和第七Fc结构域单体包含多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换,所述置换促进第一Fc结构域单体和第七Fc结构域单体之间的异二聚化,第四Fc结构域单体和第八Fc结构域单体包含多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换,所述置换促进第四Fc结构域单体和第八Fc结构域单体之间的异二聚化;第三Fc结构域单体和第九Fc结构域单体包含多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换,所述置换促进第三Fc结构域单体和第九Fc结构域单体之间的异二聚化;并且第六Fc结构域单体和第十Fc结构域单体包含多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换,所述置换促进第六Fc结构域单体和第十Fc结构域单体之间的异二聚化;促进同二聚化的置换选自表4A和表4B中的置换;促进异二聚化的置换选自表3中的置换。

[0266] 还描述了一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包含:

[0267] a) 第一多肽,其包含:

[0268] i) 第一Fc结构域单体;

[0269] ii) 第二Fc结构域单体,

[0270] iii) 第三Fc结构域单体,

[0271] iv) 第一重链结合结构域,

[0272] v) 连接第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的接头,以及

[0273] vi) 连接第二Fc结构域单体和第三Fc结构域单体的接头;

[0274] b) 第二多肽,其包含:

[0275] i) 第四Fc结构域单体,

[0276] ii) 第五Fc结构域单体,

[0277] iii) 第六Fc结构域单体,

- [0278] iv) 第二重链结合结构域,
- [0279] v) 连接第四Fc结构域单体和第五Fc结构域单体的接头, 以及
- [0280] vi) 连接第五Fc结构域单体和第六Fc结构域单体的接头;
- [0281] c) 第三多肽, 其包含第七Fc结构域单体;
- [0282] d) 第四多肽, 其包含第八Fc结构域单体;
- [0283] e) 第五多肽, 其包含第九Fc结构域单体和第一轻链结合结构域; 以及
- [0284] f) 第六多肽, 其包含第十Fc结构域单体和第二轻链结合结构域
- [0285] 其中第一Fc结构域单体和第七Fc结构域单体一起形成第一Fc结构域, 第四Fc结构域单体和第八Fc结构域单体一起形成第二Fc结构域, 第二Fc单体和第五Fc单体一起形成第三Fc结构域, 第三Fc结构域单体和第九Fc结构域单体一起形成第四Fc结构域, 第六Fc单体和第十Fc单体一起形成第五Fc结构域, 第一重链结合结构域和第一轻链结合结构域一起形成第一Fab; 并且第二重链结合结构域和第二轻链结合结构域一起形成第二Fab。
- [0286] 还描述了一种Fc-抗原结合结构域构建体, 其包含:
- [0287] a) 第一多肽, 其包含:
- [0288] i) 第一Fc结构域单体;
- [0289] ii) 第二Fc结构域单体,
- [0290] iii) 第三Fc结构域单体,
- [0291] iv) 第一重链结合结构域,
- [0292] v) 连接第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的接头, 以及
- [0293] vi) 连接第二Fc结构域单体和第三Fc结构域单体的接头;
- [0294] b) 第二多肽, 其包含:
- [0295] i) 第四Fc结构域单体,
- [0296] ii) 第五Fc结构域单体,
- [0297] iii) 第六Fc结构域单体,
- [0298] iv) 第二重链结合结构域,
- [0299] v) 连接第四Fc结构域单体和第五Fc结构域单体的接头, 以及
- [0300] vi) 连接第五Fc结构域单体和第六Fc结构域单体的接头;
- [0301] c) 第三多肽, 其包含第七Fc结构域单体;
- [0302] d) 第四多肽, 其包含第八Fc结构域单体;
- [0303] e) 第五多肽, 其包含第九Fc结构域单体;
- [0304] f) 第六多肽, 其包含第十Fc结构域单体;
- [0305] g) 第七多肽, 其包含第一轻链结合结构域; 以及
- [0306] h) 第八多肽, 其包含第二轻链结合结构域;
- [0307] 其中第一Fc结构域单体和第四Fc结构域单体一起形成第一Fc结构域, 第二Fc结构域单体和第七Fc结构域单体一起形成第二Fc结构域, 第五Fc单体和第八Fc单体一起形成第三Fc结构域, 第三Fc结构域单体和第九Fc结构域单体一起形成第四Fc结构域, 第六Fc单体和第十Fc单体一起形成第五Fc结构域, 第一重链结合结构域和第一轻链结合结构域一起形成第一Fab; 并且第二重链结合结构域和第二轻链结合结构域一起形成第二Fab。
- [0308] 在各种实施方案中: 第一多肽和第二多肽在序列上相同; 第三多肽和第四多肽在

序列上相同；第五多肽和第六多肽在序列上相同；第七多肽和第八多肽在序列上相同；第一多肽和第二多肽在序列上相同，第三多肽和第四多肽在序列上相同，第五多肽和第六多肽在序列上相同，并且第七多肽和第八多肽在序列上相同。每个Fc结构域单体的CH3结构域包括多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换；与人IgG1的氨基酸序列相比，每个Fc结构域单体的CH3结构域包括多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换；每个Fc结构域单体独立地包含SEQ ID NO:42、43、45和47中任一者具有多至10、8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换的氨基酸序列；单一氨基酸置换仅在CH3结构域中；第一Fc结构域单体和第四Fc结构域单体包含多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换，所述置换促进第一Fc结构域单体和第四Fc结构域单体之间的同二聚化；第二Fc结构域单体和第七Fc结构域单体包含多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换，所述置换促进第二Fc结构域单体和第七Fc结构域单体之间的异二聚化，第五Fc结构域单体和第八Fc结构域单体包含多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换，所述置换促进第五Fc结构域单体和第八Fc结构域单体之间的异二聚化，第三Fc结构域单体和第九Fc结构域单体包含多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换，所述置换促进第三Fc结构域单体和第九Fc结构域单体之间的异二聚化，并且第六Fc结构域单体和第十Fc结构域单体包含多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换，所述置换促进第六Fc结构域单体和第十Fc结构域单体之间的异二聚化；促进同二聚化的置换选自表4A和表4B中的置换；并且促进异二聚化的置换选自表3中的置换。

[0309] 还描述了一种Fc-抗原结合结构域构建体，其包含：

[0310] a) 第一多肽，其包含：

[0311] i) 第一Fc结构域单体；

[0312] ii) 第二Fc结构域单体，

[0313] iii) 第三Fc结构域单体，

[0314] iv) 第一重链结合结构域，

[0315] v) 连接第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的接头，以及

[0316] vi) 连接第二Fc结构域单体和第三Fc结构域单体的接头；

[0317] b) 第二多肽，其包含：

[0318] i) 第四Fc结构域单体，

[0319] ii) 第五Fc结构域单体，

[0320] iii) 第六Fc结构域单体，

[0321] iv) 第二重链结合结构域，

[0322] v) 连接第四Fc结构域单体和第五Fc结构域单体的接头，以及

[0323] vi) 连接第五Fc结构域单体和第六Fc结构域单体的接头；

[0324] c) 第三多肽，其包含第七Fc结构域单体；

[0325] d) 第四多肽，其包含第八Fc结构域单体；

[0326] e) 第五多肽，其包含第九Fc结构域单体和第一轻链结合结构域；

[0327] f) 第六多肽，其包含第十Fc结构域单体和第二轻链结合结构域；

[0328] 其中第一Fc结构域单体和第四Fc结构域单体一起形成第一Fc结构域，第二Fc结构域单体和第七Fc结构域单体一起形成第二Fc结构域，第五Fc单体和第八Fc单体一起形成第三Fc结构域，第三Fc结构域单体和第九Fc结构域单体一起形成第四Fc结构域，第六Fc单体

和第十Fc单体一起形成第五Fc结构域,第一重链结合结构域和第一轻链结合结构域一起形成第一Fab;并且第二重链结合结构域和第二轻链结合结构域一起形成第二Fab。

[0329] 还描述了一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包含:

[0330] a) 第一多肽,其包含:

[0331] i) 第一Fc结构域单体;

[0332] ii) 第二Fc结构域单体,

[0333] iii) 连接第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的接头,以及

[0334] b) 第二多肽,其包含:

[0335] i) 第三Fc结构域单体;

[0336] ii) 第四Fc结构域单体

[0337] iii) 连接第三Fc结构域单体和第四Fc结构域单体的接头;

[0338] c) 第三多肽,其包含第五Fc结构域单体和第一重链结合结构域,以及

[0339] d) 第四多肽,其包含第六Fc结构域单体和第二重链结合结构域;

[0340] e) 第五多肽,其包含第一轻链结合结构域;以及

[0341] f) 第六多肽,其包含第二轻链结合结构域;

[0342] 其中第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体一起形成第一Fc结构域,第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体一起形成第二Fc结构域,第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体一起形成第三Fc结构域,第一重链结合结构域和第一轻链结合结构域一起形成第一Fab;并且第二重链结合结构域和第二轻链结合结构域一起形成第二Fab。

[0343] 在各种实施方案中:第一多肽和第二多肽在序列上相同;第三多肽和第四多肽在序列上相同;第五多肽和第六多肽在序列上相同;第一多肽和第二多肽在序列上相同,第三多肽和第四多肽在序列上相同,并且第五多肽和第六多肽在序列上相同;每个Fc结构域单体的CH3结构域包括多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换;与人IgG1的氨基酸序列相比,每个Fc结构域单体的CH3结构域包括多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换;每个Fc结构域单体独立地包含SEQ ID NO:42、43、45和47中任一者具有多至10、8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换的氨基酸序列;单一氨基酸置换仅在CH3结构域中;第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体包含多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换,所述置换促进第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体之间的同二聚化;第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体包含多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换,所述置换促进第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体之间的异二聚化,并且第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体包含多至8、7、6、5、4、3、2或1个单一氨基酸置换,所述置换促进第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体之间的异二聚化;促进同二聚化的置换选自表4A和表4B中的置换;促进异二聚化的置换选自表3中的置换。

[0344] 还描述了一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包含:

[0345] a) 第一多肽,其包含:

[0346] i) 第一Fc结构域单体;

[0347] ii) 第二Fc结构域单体,

[0348] iii) 第一重链结合结构域,以及

[0349] iv) 连接第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的接头,

I253H、I253I、I253K、I253L、I253M、I253N、I253P、I253Q、I253R、I253S、I253T、I253V、I253W和I253Y；至少一个Fc结构域单体在EU位置R292处包含置换；EU位置R292处的每个氨基酸置换独立地选自由以下项组成的组：R292D、R292E、R292L、R292P、R292Q、R292R、R292T和R292Y；至少一个Fc结构域单体包含选自由以下项组成的组的置换：T366Y、T366W、T394W、T394Y、F405W、F405A、Y407A、S354C、Y349T、T394F、K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R、D356K和D356R；每个Fc结构域单体的铰链独立地包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列或由这些氨基酸序列组成：EPKSCDKTHTCPPCPAPELL和DKTHTCPPCPAPELL。

[0365] 在本公开的所有方面，一些或全部Fc结构域单体（例如，包含SEQ ID No:42、43、45和47中任一者具有不超过10、8、6或4个单一氨基酸置换（例如，仅在CH3域中）的氨基酸序列的Fc结构域单体）除了具有其他氨基酸置换或修饰之外，还可以具有E345K和E430G氨基酸置换中的一者或两者。E345K和E430G氨基酸置换可以增加Fc结构域多聚化（de Jong等人PLoS Biol 14(1):e1002344）。

[0366] 定义：

[0367] 如本文所用，术语“Fc结构域单体”是指包括至少铰链结构域以及第二抗体恒定结构域和第三抗体恒定结构域（CH2和CH3）或它们的功能片段（例如，至少铰链结构域或其功能片段、CH2结构域或其功能片段以及CH3结构域或其功能片段）（例如，能够（i）与另一个Fc结构域单体二聚化形成Fc结构域的片段，并且（ii）与Fc受体结合的片段）的多肽。优选的Fc结构域单体从氨基到羧基末端包含IgG1铰链、IgG1 CH2结构域和IgG1 CH3结构域的至少一部分。因此，Fc结构域单体（例如，人IgG1 Fc结构域单体）可以从E316延伸到G446或K447，从P317延伸到G446或K447，从K318延伸到G446或K447，从K318延伸到G446或K447，从S319延伸到G446或K447，从C320延伸到G446或K447，从D321延伸到G446或K447，从K322延伸到G446或K447，从T323延伸到G446或K447，从K323延伸到G446或K447，从H324延伸到G446或K447，从T325延伸到G446或K447，或者从C326延伸到G446或K447。Fc结构域单体可以是任何免疫球蛋白抗体同种型，包括IgG、IgE、IgM、IgA或IgD（例如，IgG）。另外，Fc结构域单体可以是IgG亚型（例如，IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3或IgG4）（例如，人IgG1）。人IgG1 Fc结构域单体用于本文所述的实例中。人IgG1的全铰链结构域从EU编号E316延伸到P230或L235，CH2结构域从A231或G236延伸到K340，并且CH3结构域从G341延伸到K447。对于铰链结构域的最后一个氨基酸的位置有不同的看法。它是P230或L235。在本文的许多实例中，CH3结构域不包括K347。因此，CH3结构域可以是G341至G446。在本文的许多实例中，铰链结构域可以包括E216至L235。例如，当铰链在CH1结构域或CD38结合结构域的羧基末端时，就是如此。在一些情况下，例如当铰链位于多肽的氨基末端时，EU编号221处的Asp突变为Gln。Fc结构域单体不包括免疫球蛋白的能够充当抗原识别区域的任何部分，例如可变结构域或互补决定区（CDR）。Fc结构域单体可以包含来自野生型（例如，人）Fc结构域单体序列的多达十个变化（例如，1-10、1-8、1-6、1-4个氨基酸置换、添加或缺失），这些变化改变Fc结构域与Fc受体之间的相互作用。Fc结构域单体可以包含来自野生型Fc结构域单体序列的多达十个变化（例如，单一氨基酸变化）（例如，1-10、1-8、1-6、1-4个氨基酸置换、添加或缺失），这些变化改变Fc结构域单体之间的相互作用。在某些实施方案中，与以下人IgG1 CH3结构域序列相比，CH3结构域上有多至10、8、6或5个单一氨基酸置换：GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE

SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG。合适变化的实例是本领域已知的。

[0368] 如本文所用,术语“Fc结构域”是指能够结合Fc受体的两个Fc结构域单体的二聚体。在野生型Fc结构域中,两个Fc结构域单体通过两个C_H3抗体恒定结构域之间的相互作用以及在两个二聚化Fc结构域单体的铰链结构域之间形成的一个或多个二硫键而二聚化。

[0369] 在本公开中,术语“Fc-抗原结合结构域构建体”是指形成至少两个如本文所述的Fc结构域并且包括至少一个“抗原结合结构域”的缔合多肽链。本文所述的Fc-抗原结合结构域构建体可以包括具有相同或不同序列的Fc结构域单体。例如,Fc-抗原结合结构域构建体可以具有三个Fc结构域,其中两个包括IgG1或IgG1衍生的Fc结构域单体,并且第三个包括IgG2或IgG2衍生的Fc结构域单体。在另一个实例中,Fc-抗原结合结构域构建体可以具有三个Fc结构域,其中两个包括“突起-进入-空腔对”,并且第三个不包括“突起-进入-空腔对”。Fc结构域形成与Fc受体(例如,Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIa、Fc γ RIIIb或Fc γ RIV)结合的最小结构。

[0370] 如本文所用,术语“抗原结合结构域”是指能够特异性结合靶分子的肽、多肽或一组缔合多肽。在一些实施方案中,“抗原结合结构域”是抗体的与抗体所结合的抗原特异性结合的最小序列。表面等离子共振 (SPR) 或本领域已知的各种免疫测定(例如,Western印迹或ELISA)可以用于评估抗体对抗原的特异性。在一些实施方案中,“抗原结合结构域”包括抗体的可变结构域或互补决定区(CDR),例如表1中列出的抗体的一个或多个CDR、表2中列出的抗体的一个或多个CDR或者表2中列出的抗体的VH和/或VL结构域。在一些实施方案中,抗原结合结构域可以包括VH结构域和CH1结构域,任选地具有VL结构域。在其他实施方案中,抗原结合结构域是抗体或scFv的Fab片段。抗原结合结构域也可以是特异性结合靶标的合成工程化肽,诸如基于纤连蛋白的结合蛋白(例如,纤连蛋白III型结构域(FN3)单体)。

[0371] 如本文所用,术语“抗原结合结构域”是指能够特异性结合靶分子的肽、多肽或一组缔合多肽。在一些实施方案中,“抗原结合结构域”是抗体的与抗体所结合的抗原特异性结合的最小序列。表面等离子共振 (SPR) 或本领域已知的各种免疫测定(例如,Western印迹或ELISA)可以用于评估抗体对抗原的特异性。在一些实施方案中,“抗原结合结构域”包括抗体的可变结构域或互补决定区(CDR),例如表1中列出的抗体的一个或多个CDR、表2中列出的抗体的一个或多个CDR或者表2中列出的抗体的VH和/或VL结构域。在一些实施方案中,CD38结合结构域可以包括VH结构域和CH1结构域,任选地具有VL结构域。在其他实施方案中,抗原(例如,CD38)结合结构域是抗体或scFv的Fab片段。因此,CD38结合结构域可以包括包含VH结构域和CH1结构域或由这些结构域组成的“CD38重链结合结构域”以及包含VL结构域和C_L结构域或由这些结构域组成的“CD38轻链结合结构域”。CD38结合结构域也可以是特异性结合靶标的合成工程化肽,诸如基于纤连蛋白的结合蛋白(例如,纤连蛋白III型结构域(FN3)单体)。

[0372] 如本文所用,术语“互补决定区”(CDR)是指抗体可变结构域的氨基酸残基,其存在对于抗原结合是必需的。每个可变结构域通常具有三个CDR区,被标识为CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,以及CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3。每个互补决定区可包括来自Kabat定义的“互补决定区”的氨基酸残基(即,大约轻链可变结构域中的残基24-34(CDR-L1)、50-56(CDR-L2)和89-97(CDR-L3)以及重链可变结构域中的残基31-35(CDR-H1)、50-65(CDR-H2)和95-102

(CDR-H3);Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991))和/或来自“高变环”的那些残基(即,大约轻链可变结构域中的残基26-32(CDR-L1)、50-52(CDR-L2)和91-96(CDR-L3)以及重链可变结构域中的残基26-32(CDR-H1)、53-55(CDR-H2)和96-101(CDR-H3);Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917(1987))。在一些情况下,互补决定区可以包括来自根据Kabat定义的CDR区以及高变环两者的氨基酸。

[0373] “骨架区”(下文称为FR)是除CDR残基以外的那些可变结构域残基。每个可变结构域通常具有四个FR,被标识为FR1、FR2、FR3和FR4。如果CDR是根据Kabat定义的,则轻链FR残基位于大约残基1-23(LCFR1)、35-49(LCFR2)、57-88(LCFR3)和98-107(LCFR4)处,并且重链FR残基位于大约重链残基中的残基1-30(HCFR1)、36-49(HCFR2)、66-94(HCFR3)和103-113(HCFR4)处。如果CDR包含来自高变环的氨基酸残基,则轻链FR残基位于大约轻链中的残基1-25(LCFR1)、33-49(LCFR2)、53-90(LCFR3)和97-107(LCFR4)处,并且重链FR残基位于大约重链残基中的残基1-25(HCFR1)、33-52(HCFR2)、56-95(HCFR3)和102-113(HCFR4)处。在一些情况下,当CDR包括来自如由Kabat定义的CDR以及高变环的CDR两者的氨基酸时,将相应地调节FR残基。

[0374] “Fv”片段是包含完整抗原识别和结合位点的抗体片段。该区域由紧密缔合的一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域的二聚体组成,该二聚体在性质上可以是共价的,例如在scFv中。在这种构型中,每个可变结构域的三个CDR相互作用以在 V_H - V_L 二聚体的表面上限定抗原结合位点。

[0375] “Fab”片段包含轻链的可变结构域和恒定结构域以及重链的可变结构域和第一恒定结构域(C_{H1})。F(ab')₂抗体片段包括一对Fab片段,它们通常在其羧基末端附近通过铰链半胱氨酸共价连接。

[0376] “单链Fv”或“scFv”抗体片段在单个多肽链中包括抗体的 V_H 和 V_L 结构域。通常,scFv多肽还包括在 V_H 与 V_L 结构域之间的多肽接头,该接头使得scFv能够形成抗原结合所需的结构。

[0377] 如本文所用,术语“抗体恒定结构域”是指对应于抗体的恒定区结构域的多肽(例如, C_L 抗体恒定结构域、 C_{H1} 抗体恒定结构域、 C_{H2} 抗体恒定结构域或 C_{H3} 抗体恒定结构域)。

[0378] 如本文所用,术语“促进”意指支持且有利于,例如有利于由彼此的结合亲和力比其他不同的Fc结构域单体更高的两个Fc结构域单体形成Fc结构域。如本文所述,组合以形成Fc结构域的两个Fc结构域单体可以在其各自的 C_{H3} 抗体恒定结构域的界面处具有相容氨基酸修饰(例如,工程化突起和工程化空腔,以及/或者静电转向突变)。相容氨基酸修饰促进或有利于此类Fc结构域单体相对于与缺乏此类氨基酸修饰或具有不相容氨基酸修饰的其他Fc结构域单体彼此的选择性相互作用。这是因为,由于两个相互作用的 C_{H3} 抗体恒定结构域的界面处的氨基酸修饰,Fc结构域单体对彼此的亲和力比对缺乏氨基酸修饰的其他Fc结构域单体更高。

[0379] 如本文所用,术语“二聚化选择性模块”是指Fc结构域单体的促进两个Fc结构域单体之间的有利配对的序列。“互补”二聚化选择性模块是促进或有利于两个Fc结构域单体彼此的选择性相互作用的二聚化选择性模块。互补二聚化选择性模块可以具有相同或不同的序列。本文描述了示例性的互补的二聚化选择性模块。

[0380] 如本文所用,术语“工程化空腔”是指用侧链体积比原始氨基酸残基更小的不同氨基酸残基置换 C_H3 抗体恒定结构域中的至少一个原始氨基酸残基,从而在 C_H3 抗体恒定结构域中产生三维空腔。术语“原始氨基酸残基”是指由野生型 C_H3 抗体恒定结构域的遗传密码编码的天然存在的氨基酸残基。

[0381] 如本文所用,术语“工程化突起”是指用侧链体积比原始氨基酸残基更大的不同氨基酸残基置换 C_H3 抗体恒定结构域中的至少一个原始氨基酸残基,从而在 C_H3 抗体恒定结构域中产生三维突起。术语“原始氨基酸残基”是指由野生型 C_H3 抗体恒定结构域的遗传密码编码的天然存在的氨基酸残基。

[0382] 如本文所用,术语“突起-进入-空腔对”描述了包括两个Fc结构域单体的Fc结构域,其中第一Fc结构域单体在其 C_H3 抗体恒定结构域中包括工程化空腔,而第二Fc结构域单体在其 C_H3 抗体恒定结构域中包括工程化突起。在突起-进入-空腔对中,第一Fc结构域单体的 C_H3 抗体恒定结构域中的工程化突起被定位成使得其与第二Fc结构域单体的 C_H3 抗体恒定结构域的工程化空腔相互作用,而不显著扰乱二聚体在 C_H3 抗体恒定结构域间界面处的正常缔合。

[0383] 如本文所用,术语“异二聚体Fc结构域”是指通过两个Fc结构域单体的异二聚化形成的Fc结构域,其中所述两个Fc结构域单体含有促进这两个Fc结构域单体的有利形成的不同反向电荷突变(参见例如,表4中的突变)。在具有三个Fc结构域(一个羧基末端“茎”Fc结构域和两个氨基末端“分支”Fc结构域)Fc构建体中,每个氨基末端“分支”Fc结构域都可以是异二聚体Fc结构域(也称为“分支异二聚体Fc结构域”)。

[0384] 如本文所用,关于Fc-抗原结合结构域构建体群体的术语“在结构上相同”是指以相同比率和构型组装相同多肽序列的构建体,但不指任何翻译后修饰,诸如糖基化。

[0385] 如本文所用,术语“同二聚体Fc结构域”指通过两个Fc结构域单体的同二聚化形成的Fc结构域,其中所述两个Fc结构域单体含有相同的反向电荷突变(参见例如,表5和表6中的突变)。在具有三个Fc结构域(一个羧基末端“茎”Fc结构域和两个氨基末端“分支”Fc结构域)的Fc构建体中,羧基末端“茎”Fc结构域可以是同二聚体Fc结构域(也称为“茎同二聚体Fc结构域”)。

[0386] 如本文所用,术语“异二聚化选择性模块”是指可以在Fc结构域单体的 C_H3 抗体恒定结构域中产生的工程化突起、工程化空腔和某些反向电荷氨基酸置换,以便促进具有相容异二聚化选择性模块的两个Fc结构域单体的有利异二聚化。含有异二聚化选择性模块的Fc结构域单体可组合以形成异二聚体Fc结构域。异二聚化选择性模块的实例在表3和表4中示出。

[0387] 如本文所用,术语“同二聚化选择性模块”是指 C_H3 结构域之间的界面处的带电残基环内至少两个位置中的Fc结构域单体中的促进Fc结构域单体的同二聚化以形成同二聚体Fc结构域的反向电荷突变。同二聚化选择性模块的实例在表4和表5中示出。

[0388] 如本文所用,术语“连接”用于描述通过包括化学缀合、重组手段和化学键(例如,肽键、二硫键和酰胺键)在内的手段来组合或附接两种或更多种元件、组分或蛋白质结构域(例如,多肽)。例如,可以通过化学缀合、化学键、肽接头或任何其他共价键合手段来连接两种单个多肽以形成一个连续的蛋白质结构。在一些实施方案中,通过从编码抗原结合结构域和Fc结构域单体两者的连续核酸序列表达来将抗原结合结构域与Fc结构域单体连接。在

其他实施方案中,通过肽接头将抗原结合结构域与Fc结构域单体连接,其中通过化学键(例如,肽键)将肽接头的N末端与抗原结合结构域的C末端连接,并且通过化学键(例如,肽键)将肽接头的C末端与Fc结构域单体的N末端连接。

[0389] 如本文所用,术语“缔合”用于描述多肽(或一种单一多肽内的序列)之间的相互作用,例如氢键合、疏水相互作用或离子相互作用,使得多肽(或一种单一多肽内的序列)被定位为形成本文所述的Fc-抗原结合结构域构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc-抗原结合结构域构建体)。例如,在一些实施方案中,四种多肽(例如,各自包括两个Fc结构域单体的两种多肽和各自包括一个Fc结构域单体的两种多肽)缔合以形成具有三个Fc结构域的Fc构建体(例如,如图50和图51所描绘)。四种多肽可以通过其各自的Fc结构域单体缔合。多肽之间的缔合不包括共价相互作用。

[0390] 如本文所用,术语“接头”是指两个元件(例如,蛋白质结构域)之间的键合。接头可以是共价键或间隔物。术语“键”是指化学键(例如,酰胺键或二硫键)或由化学反应产生(例如,化学缀合)的任何种类的键。术语“间隔物”是指存在于两个多肽或多肽结构域之间以在两个多肽或多肽结构域之间提供空间和/或灵活性的部分(例如,聚乙二醇(PEG)聚合物)或氨基酸序列(例如,3-200个氨基酸、3-150个氨基酸或3-100个氨基酸序列)。氨基酸间隔物是多肽一级序列的部分(例如,经由多肽主链与间隔的多肽或多肽结构域连接)。例如在两个铰链区或形成Fc结构域的两个Fc结构域单体之间形成的二硫键不被认为是接头。

[0391] 如本文所用,术语“甘氨酸间隔物”是指串联连接两个Fc结构域单体的仅含有甘氨酸的接头。甘氨酸间隔物可含有至少4、8或12个甘氨酸(例如,4-30、8-30或12-30个甘氨酸;例如,12-30、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个甘氨酸)。在一些实施方案中,甘氨酸间隔物具有序列GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:27)。

[0392] 如本文所用,术语“白蛋白结合肽”是指对血清白蛋白具有亲和力并且具有结合血清白蛋白的功能的12至16个氨基酸的氨基酸序列。白蛋白结合肽可以具有不同起源,例如人、小鼠或大鼠。在本公开的一些实施方案中,将白蛋白结合肽与Fc结构域单体的C末端融合,以增加Fc-抗原结合结构域构建体的血清半衰期。可以直接或通过接头将白蛋白结合肽与Fc结构域单体的N末端或C末端融合。

[0393] 如本文所用,术语“纯化肽”是指可以用于纯化、分离或鉴定多肽的任何长度的肽。可以将纯化肽与多肽连接以帮助从例如细胞裂解产物混合物中纯化多肽和/或分离多肽。在一些实施方案中,纯化肽结合对纯化肽具有特异性亲和力的另一部分。在一些实施方案中,将与纯化肽特异性结合的此类部分附接到固体支持物,诸如基质、树脂或琼脂糖珠。可与Fc-抗原结合结构域构建体连接的纯化肽的实例在本文中进一步详细描述。

[0394] 如本文所用,术语“多聚体”是指包括至少两个本文所述的缔合Fc构建体或Fc-抗原结合结构域构建体的分子。

[0395] 如本文所用,术语“多核苷酸”是指寡核苷酸或核苷酸以及它们的片段或部分,并且是指基因组或合成起源的DNA或RNA,它们可以是单链或双链的,并且代表有义链或反义链。单个多核苷酸被翻译成单个多肽。

[0396] 如本文所用,术语“多肽”描述了其中单体是通过酰胺键连接在一起的氨基酸残基的单个聚合物。多肽旨在涵盖天然存在、重组或合成产生的任何氨基酸序列。

[0397] 如本文所用,术语“氨基酸位置”是指蛋白质或蛋白质结构域中氨基酸的位置编号。在标出地方(例如,对于CDR和FR区)使用Kabat编号系统(Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,National Institutes of Health,Bethesda,Md.,第5版,1991)对氨基酸位置进行编号,否则使用EU编号。

[0398] 图24A-24D描绘了使用EU编号系统编号的人IgG1 Fc结构域。

[0399] 如本文所用,术语“氨基酸修饰”是指与参考序列(例如,野生型、未突变或未修饰Fc序列)相比可对以下项有影响并且可促进改善治疗免疫和炎症疾病的功效的Fc结构域多肽序列的改变:Fc构建体的药代动力学(PK)和/或药效动力学(PD)特性、血清半衰期、效应子功能(例如,细胞裂解(例如,抗体依赖性细胞介导的毒性(ADCC)和/或补体依赖性细胞毒性活性(CDC))、吞噬作用(例如,抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)和/或补体依赖性细胞毒性(CDCC))、免疫激活和T细胞激活)、对Fc受体(例如,Fc- γ 受体(Fc γ R)(例如,Fc γ RI(CD64)、Fc γ RIIa(CD32)、Fc γ RIIb(CD32)、Fc γ RIIIa(CD16a)和/或Fc γ RIIIb(CD16b))、Fc- α 受体(Fc α R)、Fc- ϵ 受体(Fc ϵ R)和/或新生儿Fc受体(FcRn))的亲和力、对参与补体级联的蛋白质(例如,C1q)的亲和力、翻译后修饰(例如,糖基化、唾液酸化)、聚合特性(例如,形成二聚体(例如,同二聚体和/或异二聚体)和/或多聚体的能力)以及生物物理特性(例如,改变C_{H1}与C_L之间的相互作用、改变稳定性和/或改变对温度和/或pH的敏感性)。氨基酸修饰包括氨基酸置换、缺失和/或插入。在一些实施方案中,氨基酸修饰是单一氨基酸的修饰。在其他实施方案中,氨基酸修饰是多个(例如,多于一个)氨基酸的修饰。氨基酸修饰可包括氨基酸置换、缺失和/或插入的组合。包括在氨基酸修饰的描述中的是编码Fc多肽的核苷酸序列的遗传(即DNA和RNA)改变,诸如点突变(例如,单个核苷酸与另一个核苷酸的交换)、插入和缺失(例如,一个或多个核苷酸的添加和/或移除)。

[0400] 在某些实施方案中,Fc构建体或Fc-抗原结合结构域构建体内的至少一个(例如,一个、两个或三个)Fc结构域包括氨基酸修饰。在一些情况下,至少一个Fc结构域包括一个或多个(例如,两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或二十个或更多个)氨基酸修饰。

[0401] 在某些实施方案中,Fc构建体或Fc-抗原结合结构域构建体内的至少一个(例如,一个、两个或三个)Fc结构域单体包括氨基酸修饰(例如,置换)。在一些情况下,至少一个Fc结构域单体包括一个或多个(例如,不超过两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或二十个)氨基酸修饰(例如,置换)。

[0402] 如本文所用,术语“同一性百分比(%)”是指在比对序列并引入缺口(如有需要)以实现最大同一性百分比(即,可以在候选序列和参考序列中的一者或两者中引入缺口以用于最佳比对,并且可以忽略非同源序列以用于比较目的)之后,候选序列(例如,本文所述的Fc-抗原结合结构域构建体中的Fc结构域单体的序列)的氨基酸(或核酸)残基与参考序列(例如,野生型Fc结构域单体的序列)的氨基酸(或核酸)残基相同的百分比。比对以用于确定同一性百分比的目的可以以在本领域技术范围内的各种方式实现,例如使用可公开获得的计算机软件,诸如BLAST、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可以确定用于测量比对的适当参数,包括在待比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。在一些实施方案中,如下计算给定候选序列和、与或相对于给定参考序列的氨基酸(或核酸)序列同一性百分比(其可以另选地表达为给定候选序列和、与或相对于给定参考序列具有

或包括一定氨基酸(或核酸)序列同一性百分比)：

[0403] $100 \times (A/B)$ 的分数)

[0404] 其中A是在候选序列和参考序列的比对中评分为相同的氨基酸(或核酸)残基的数目,并且其中B是参考序列中氨基酸(或核酸)残基的总数。在其中候选序列的长度不等于参考序列的长度的一些实施方案中,候选序列与参考序列的氨基酸(或核酸)序列同一性百分比不等于参考序列与候选序列的氨基酸(或核酸)序列同一性百分比。

[0405] 在特定实施方案中,用于与候选序列比较而进行比对的参考序列可显示,跨越候选序列的全长或候选序列的连续氨基酸(或核酸)残基的选定部分,候选序列显示出50%至100%的同一性(例如,50%至100%、60%至100%、70%至100%、80%至100%、90%至100%、92%至100%、95%至100%、97%至100%、99%至100%或99.5%至100%的同一性)。用于比较目的而比对的候选序列的长度为参考序列长度的至少30%,例如至少40%,例如至少50%、60%、70%、80%、90%或100%。当候选序列中的位置被与参考序列中的相应位置相同的氨基酸(或核酸)残基占据时,则该分子在该位置处是相同的。

[0406] 在一些实施方案中,本文所述的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc-抗原结合结构域构建体)中的Fc结构域单体可具有与野生型Fc结构域单体的序列(例如,SEQ ID NO:42)具有至少95%同一性(至少97%、99%或99.5%同一性)的序列。在一些实施方案中,本文所述的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc-抗原结合结构域构建体)中的Fc结构域单体可具有与SEQ ID NO:44、46、48和50-53中任一者的序列具有至少95%同一性(至少97%、99%或99.5%同一性)的序列。在某些实施方案中,Fc构建体中的Fc结构域单体可具有与SEQ ID NO:48、52和53的序列具有至少95%同一性(至少97%、99%或99.5%同一性)的序列。

[0407] 在一些实施方案中,两个Fc结构域单体之间的间隔物可具有与本文进一步描述的SEQ ID NO:1-36(例如,SEQ ID NO:17、18、26和27)中任一者的序列具有至少75%同一性(至少75%、77%、79%、81%、83%、85%、87%、89%、91%、93%、95%、97%、99%、99.5%或100%同一性)的序列。

[0408] 如本文所用,术语“宿主细胞”是指包括从其对应的核酸表达蛋白质所需的必要细胞组分(例如,细胞器)的媒介物。核酸通常包括在核酸载体中,可以通过本领域已知的常规技术(转化、转染、电穿孔、磷酸钙沉淀、直接显微注射等)将所述核酸载体引入宿主细胞中。宿主细胞可以是原核细胞(例如,细菌细胞)或真核细胞(例如,哺乳动物细胞(例如,CHO细胞))。如本文所述,宿主细胞用于表达编码所需结构域的一种或多种多肽,然后将所述结构域组合以形成所需Fc-抗原结合结构域构建体。

[0409] 如本文所用,术语“药物组合物”是指含有活性成分以及一种或多种赋形剂和稀释剂以使活性成分能够适合于施用方法的医学或药物制剂。本公开的药物组合物包括与Fc-抗原结合结构域构建体相容的药理学上可接受的组分。药物组合物通常为用于静脉内或皮下施用的水性形式。

[0410] 如本文所用,多肽或Fc构建体的“基本上同质的群体”是指组合物(例如,细胞培养基或药物组合物)中至少50%的多肽或Fc构建体具有相同数量的Fc结构域,如通过非还原SDS凝胶电泳或尺寸排阻色谱测定的。多肽或Fc构建体的基本上同质的群体可在纯化之前或者在蛋白A或蛋白G纯化之后或者在只进行任何Fab或Fc特异性亲和色谱之后获得。在各

种实施方案中,组合物中至少55%、60%、65%、70%、75%、80%或85%的多肽或Fc构建体具有相同数量的Fc结构域。在其他实施方案中,组合物中至多85%、90%、92%或95%的多肽或Fc构建体具有相同数量的Fc结构域。

[0411] 如本文所用,术语“药学可接受的载体”是指药物组合物中的赋形剂或稀释剂。药学可接受的载体必须与制剂的其他成分相容并且对接受者无害。在本公开中,药学上可接受的载体必须为Fc-抗原结合结构域构建体提供足够的药物稳定性。载体的性质因施用模式而异。例如,对于经口施用,固体载体是优选的;对于静脉内施用,一般使用水性溶液载体(例如,WFI和/或缓冲溶液)。

[0412] 如本文所用,“治疗有效量”是指有效诱导受试者或患者中的所需生物效应或者有效治疗患有本文所述病症或障碍的患者的量,例如药物剂量。本文还应理解,“治疗有效量”可被解释为以一个剂量或以任何剂量或途径服用、单独或与其他治疗剂组合服用的给予所需治疗效果的量。

[0413] 如本文所用,术语“片段”和术语“部分”可以互换使用。

附图说明

[0414] 图1是包含两个Fc结构域和一个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体(构建体1)的图示。每个Fc结构域是两个Fc结构域单体的二聚体。两个Fc结构域单体(106和108)在其 C_H3 抗体恒定结构域中包含突起,而其他两个Fc结构域单体(112和114)在其 C_H3 抗体恒定结构域的并列位置中包含空腔。该构建体由三个包含Fc结构域单体的多肽形成。第一多肽(102)包含两个包含突起的Fc结构域单体(106和108),这两个Fc结构域单体通过间隔物与N末端上包含 V_H 结构域的抗原结合结构域(110)串联连接。包含 V_L 的结构域(104)与 V_H 结构域连接。第二多肽和第三多肽(112和114)中的每一者包含含空腔的Fc结构域单体。

[0415] 图2是包含三个Fc结构域和一个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体(构建体2)的图示。该构建体由四个包含Fc结构域单体的多肽形成。第一多肽(202)包含三个包含突起的Fc结构域(206、208和210),这些Fc结构域通过间隔物与N末端上包含 V_H 结构域的抗原结合结构域(212)串联连接。包含 V_L 的结构域(204)与 V_H 结构域连接。第二多肽、第三多肽和第四多肽(214、216和218)中的每一者包含含空腔的Fc结构域单体。

[0416] 图3是包含两个Fc结构域和两个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体(构建体3)的图示。该构建体由三个包含Fc结构域单体的多肽形成。第一多肽(302)包含两个含突起的Fc结构域单体(304和306),这两个Fc结构域单体通过间隔物串联连接。第二多肽和第三多肽(320和322)中的每一者包含含空腔的Fc结构域单体(310和314),这两个Fc结构域单体与N末端上包含 V_H 结构域的抗原结合结构域(316和318)串联连接。包含 V_L 的结构域(308和312)与每个 V_H 结构域连接。

[0417] 图4是包含三个Fc结构域和三个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体(构建体4)的图示。该构建体由四个包含Fc结构域单体的多肽形成。第一多肽(402)包含三个含突起的Fc结构域单体(404、406和408),这些Fc结构域单体通过间隔物串联连接。第二多肽、第三多肽和第四多肽(428、430和432)中的每一者包含含空腔的Fc结构域单体(426、420和414),这些Fc结构域单体与N末端上包含 V_H 结构域的抗原结合结构域(422、416和410)串联连接。包含 V_L 的结构域(424、418和412)与每个 V_H 结构域连接。

[0418] 图5是包含两个Fc结构域和三个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体(构建体5)的图示。该构建体由三个包含Fc结构域单体的多肽形成。第一多肽(502)包含两个包含突起的Fc结构域单体(508和506),这两个Fc结构域单体通过间隔物与N末端处包含 V_H 结构域的抗原结合结构域(510)串联连接。第二多肽和第三多肽(524和526)中的每一者包含含空腔的Fc结构域单体(516和522),这两个Fc结构域单体与N末端上包含 V_H 结构域的抗原结合结构域(512和518)串联连接。包含 V_L 的结构域(504、514和520)与每个 V_H 结构域连接。

[0419] 图6是包含三个Fc结构域和四个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体(构建体6)的图示。该构建体由四个包含Fc单体的多肽形成。第一多肽(602)包含三个包含突起的Fc结构域单体(606、608和610),这些Fc结构域单体通过间隔物与N末端处包含 V_H 结构域的抗原结合结构域(612)串联连接。第二多肽、第三多肽和第四多肽(632、634和636)中的每一者包含含空腔的Fc结构域单体(618、624和630),这些Fc结构域单体与N末端上包含 V_H 结构域的抗原结合结构域(616、622和628)串联连接。包含 V_L 的结构域(604、616、622和628)与每个 V_H 结构域连接。

[0420] 图7是包含三个Fc结构域和两个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体(构建体7)的图示。该Fc-抗原结合结构域构建体包含两个Fc结构域单体(706和718)的二聚体,其中两个Fc结构域单体在它们的 C_H3-C_H3 界面处包含与WT序列不同的带电荷氨基酸以促进这两个Fc结构域单体之间的有利静电相互作用。该构建体由四个包含Fc结构域单体的多肽形成。两个多肽(702和724)各自包含含突起的Fc结构域单体(710和720),这两个Fc结构域单体通过间隔物与在 C_H3-C_H3 界面处包含与WT序列不同的带电氨基酸的Fc结构域单体(706和718)和N末端处包含 V_H 结构域的抗原结合结构域(712和714)串联连接。第三多肽和第四多肽(708和722)各自包含含空腔的Fc结构域单体。包含 V_L 的结构域(704和716)与每个 V_H 结构域连接。

[0421] 图8是包含三个Fc结构域和两个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体(构建体8)的图示。该构建体由四个含有Fc结构域单体的多肽形成。两个多肽(802和828)各自包含含突起的Fc结构域单体(814和820),这两个Fc结构域单体通过间隔物与在 C_H3-C_H3 界面处包含与WT序列不同的带电氨基酸的Fc结构域单体(810和816)串联连接。第三多肽和第四多肽(804和826)各自包含含空腔的Fc结构域单体(808和824),这两个Fc结构域单体与N末端处包含 V_H 结构域的抗原结合结构域(812和818)串联连接。包含 V_L 的结构域(806和822)与每个 V_H 结构域连接。

[0422] 图9是包含三个Fc结构域和四个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体(构建体9)的图示。该构建体由四个含有Fc结构域单体的多肽形成。两个多肽(902和936)各自包含含突起的Fc结构域单体(918和928),这两个Fc结构域单体通过间隔物与在 C_H3-C_H3 界面处包含与WT序列不同的带电氨基酸的Fc结构域单体(910和924)和N末端处包含 V_H 结构域的抗原结合结构域(908和920)串联连接。第三多肽和第四多肽(904和934)包含含空腔的Fc结构域单体(916和932),这两个Fc结构域单体与N末端处包含 V_H 结构域的抗原结合结构域(912和926)串联连接。包含 V_L 的结构域(906、914、922和930)与每个 V_H 结构域连接。

[0423] 图10是包含五个Fc结构域和两个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体(构建体10)的图示。该构建体由六个包含Fc结构域单体的多肽形成。两个多肽(1002和1032)各自包含含突起的Fc结构域单体(1016和1030),这两个Fc结构域单体通过间隔物与

另一个包含突起的Fc结构域单体(1014和1028)、在 C_H3-C_H3 界面处包含与WT序列不同的带电氨基酸的Fc结构域单体(1008和1022)和N末端处包含 V_H 结构域的抗原结合结构域(1006和1018)串联连接。第三多肽、第四多肽、第五多肽和第六多肽(1012、1010、1026和1024)各自包含含空腔的Fc结构域单体。包含 V_L 的结构域(1004和1020)与每个 V_H 结构域连接。

[0424] 图11是包含五个Fc结构域和四个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体(构建体11)的图示。该构建体由六个包含Fc结构域单体的多肽形成。两个多肽(1102和1148)包含含突起的Fc结构域单体(1118和1132),这两个Fc结构域单体通过间隔物与另一个含突起的Fc结构域单体(1120和1130)以及在 C_H3-C_H3 界面处包含与WT序列不同的带电氨基酸的Fc结构域单体(1124和1126)串联连接。第三多肽、第四多肽、第五多肽和第六多肽(1106、1104、1144和1146)各自包含含空腔的Fc结构域单体(1116、1110、1134和1140),这些Fc结构域单体与N末端处包含 V_H 结构域的抗原结合结构域(1112、1122、1138和1128)串联连接。包含 V_L 的结构域(1108、1114、1135和1142)与每个 V_H 结构域连接。

[0425] 图12是包含五个Fc结构域和六个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体(构建体12)的图示。该构建体由六个包含Fc结构域单体的多肽形成。两个多肽(1202和1256)包含含突起的Fc结构域单体(1224和1230),这两个Fc结构域单体通过间隔物与另一个包含突起的Fc结构域单体(1226和1228)、在 C_H3-C_H3 界面处包含与WT序列不同的带电氨基酸的Fc结构域单体(1210和1244)和N末端处包含 V_H 结构域的抗原结合结构域(1250和1248)串联连接。第三多肽、第四多肽、第五多肽和第六多肽(1206、1204、1254和1252)各自包含含空腔的Fc结构域单体(1222、1216、1232和1238),这些Fc结构域单体与N末端处包含 V_H 结构域的抗原结合结构域(1218、1212、1236和1242)串联连接。包含 V_L 的结构域(1208、1214、1220、1234、1240和1246)与每个 V_H 结构域连接。

[0426] 图13是包含三个Fc结构域和两个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体(构建体13)的图示。该构建体由四个含有Fc结构域单体的多肽形成。两个多肽(1302和1324)包含在 C_H3-C_H3 界面处包含与WT序列不同的带电氨基酸的Fc结构域单体(1308和1318),这两个Fc结构域单体通过间隔物与包含突起的Fc结构域单体(1312和1316)和N末端处包含 V_H 结构域的抗原结合结构域(1310和1314)串联连接。第三多肽和第四多肽(1306和1320)包含含空腔的Fc结构域单体。包含 V_L 的结构域(1304和1322)与每个 V_H 结构域连接。

[0427] 图14是包含三个Fc结构域和两个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体(构建体14)的图示。该构建体由四个含有Fc结构域单体的多肽形成。两个多肽(1404和1426)包含在 C_H3-C_H3 界面处包含与WT序列不同的带电氨基酸的Fc结构域单体(1308和1318),这两个Fc结构域单体通过间隔物与含突起的Fc结构域单体(1414和1418)串联连接。第三多肽和第四多肽(1402和1428)各自包含含空腔的Fc结构域单体(1410和1422),这两个Fc结构域单体与N末端处包含 V_H 结构域的抗原结合结构域(1408和1416)串联连接。包含 V_L 的结构域(1406和1424)与每个 V_H 结构域连接。

[0428] 图15是包含三个Fc结构域和四个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体(构建体15)的图示。该构建体由四个含有Fc结构域单体的多肽形成。两个多肽(1502和1536)包含在 C_H3-C_H3 界面处包含与WT序列不同的带电氨基酸的Fc结构域单体(1512和1524),这两个Fc结构域单体通过间隔物与包含突起的Fc结构域单体(1518和1522)和N末端处包含 V_H 结构域的抗原结合结构域(1514和1532)串联连接。第三多肽和第四多肽(1504和

1534) 包含含空腔的Fc结构域单体(1510和1526), 这两个Fc结构域单体与N末端处包含 V_H 结构域的抗原结合结构域(1508和1530) 串联连接。包含 V_L 的结构域(1506、1516、1520和1528) 与每个 V_H 结构域连接。

[0429] 图16是包含五个Fc结构域和两个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体(构建体16)的图示。该构建体由六个包含Fc结构域单体的多肽形成。两个多肽(1602和1632) 包含在 C_H3-C_H3 界面处包含与WT序列不同的带电氨基酸的Fc结构域单体(1610和1624), 这两个Fc结构域单体通过间隔物与包含突起的Fc结构域单体(1612和1622)、第二包含突起的Fc结构域单体(1614和1620) 和N末端处包含 V_H 结构域的抗原结合结构域(1616和1618) 串联连接。第三多肽、第四多肽、第五多肽和第六多肽(1608、1606、1626和1628) 各自包含含空腔的Fc结构域。包含 V_L 的结构域(1604和1630) 与每个 V_H 结构域连接。

[0430] 图17是包含五个Fc结构域和四个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体(构建体17)的图示。该构建体由六个包含Fc单体的多肽形成。两个多肽(1702和1748) 包含在 C_H3-C_H3 界面处包含与WT序列不同的带电氨基酸的Fc结构域单体(1718和1732), 这两个Fc结构域单体通过间隔物与含突起的Fc结构域单体(1720和1730) 和N末端处含突起的Fc结构域单体(1722和1728) 串联连接。第三多肽、第四多肽、第五多肽和第六多肽(1706、1704、1746和1744) 包含含空腔的Fc结构域单体(1716、1710、1734和1740), 这些Fc结构域单体与N末端处包含 V_H 结构域的抗原结合结构域(1712、1724、1738和1726) 串联连接。包含 V_L 的结构域(1708、1714、1736和1742) 与每个 V_H 结构域连接。

[0431] 图18是包含五个Fc结构域和六个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体(构建体18)的图示。该构建体由六个包含Fc结构域单体的多肽形成。两个多肽(1802和1856) 包含在 C_H3-C_H3 界面处包含与WT序列不同的带电氨基酸的Fc结构域单体(1818和1838), 这两个Fc结构域单体通过间隔物与包含突起的Fc结构域单体(1820和1836)、第二包含突起的Fc结构域单体(1822和1834) 和N末端处包含 V_H 结构域的抗原结合结构域(1826和1830) 串联连接。第三多肽、第四多肽、第五多肽和第六多肽(1806、1804、1854和1852) 各自包含含空腔的Fc结构域单体(1816、1810、1840和1846), 这些Fc结构域单体与N末端处包含 V_H 结构域的抗原结合结构域(1812、1828、1844和1850) 串联连接。包含 V_L 的结构域(1808、1814、1824、1832、1842和1848) 与每个 V_H 结构域连接。

[0432] 图19是包含五个Fc结构域和两个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体(构建体19)的图示。该构建体由六个包含Fc结构域单体的多肽形成。两个多肽(1902和1932) 包含含有突起的Fc结构域单体(1912和1930), 这两个Fc结构域单体通过间隔物与在 C_H3-C_H3 界面处包含与WT序列不同的带电氨基酸的Fc结构域单体(1908和1926)、包含突起的Fc结构域单体(1916和1918) 和在N末端包含 V_H 结构域的抗原结合结构域(1914和1920) 串联连接。第三多肽和第四多肽(1910和1928) 包含含有空腔的Fc结构域单体, 并且第五多肽和第六多肽(1906和1924) 包含含有空腔的Fc结构域单体。包含 V_L 的结构域(1904和1922) 与每个 V_H 结构域连接。

[0433] 图20是包含五个Fc结构域和四个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体(构建体20)的图示。该构建体由六个包含Fc结构域单体的多肽形成。两个多肽(2002和2048) 包含含突起的Fc结构域单体(2020和2022), 这两个Fc结构域单体通过间隔物与在 C_H3-C_H3 界面处包含与WT序列不同的带电氨基酸的Fc结构域单体(2012和2030) 和N末端处含

突起的Fc结构域单体(2040和2038)串联连接。第三多肽、第四多肽、第五多肽和第六多肽(2006、2004、2046和2044)各自包含含有空腔的Fc结构域单体(2018、2010、2024和2032),这些Fc结构域单体与在N末端包含 V_H 结构域的抗原结合结构域(2014、2042、2028和2036)串联连接。包含 V_L 的结构域(2008、2016、2026和2034)与每个 V_H 结构域连接。

[0434] 图21是包含五个Fc结构域和六个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体(构建体21)的图示。该构建体由六个包含Fc结构域单体的多肽形成。两个多肽(2102和2156)包含含有突起的Fc结构域单体(2120和2122),这两个Fc结构域单体通过间隔物与在 C_H3-C_H3 界面处包含与WT序列不同的带电氨基酸的Fc结构域单体(2112和2130)、另一个包含突起的Fc结构域单体(2144和2142)和在N末端包含 V_H 结构域的抗原结合结构域(2148和2138)串联连接。第三多肽、第四多肽、第五多肽和第六多肽(2106、2104、2154和2152)各自包含含有空腔的Fc结构域单体(2118、2110、2124和2132),这些Fc结构域单体与N末端处包含 V_H 结构域的抗原结合结构域(2114、2150、2128和2136)串联连接。包含 V_L 的结构域(2108、2116、2126、2134、2140和2146)与每个 V_H 结构域连接。

[0435] 图22是包含两个Fc结构域和具有两种不同特异性的三个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体(构建体22)的图示。该构建体由三个含有Fc结构域单体的多肽形成。第一多肽(2202)包含含有突起的Fc结构域单体(2208),该Fc结构域单体通过间隔物与另一个包含突起的Fc结构域单体(2206)和在N末端包含 V_H 结构域的具有第一特异性的抗原结合结构域(2222)串联连接。第二多肽和第三多肽(2226和2224)各自包含含有空腔的Fc结构域单体(2210和2216),这两个Fc结构域单体与在N末端包含 V_H 结构域的具有第二特异性的抗原结合结构域(2214和2220)串联连接。包含 V_L 的结构域(2204、2212和2218)与每个 V_H 结构域连接。

[0436] 图23是包含三个Fc结构域和具有两种不同特异性的四个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体(构建体23)的图示。该构建体由四个含有Fc结构域单体的多肽形成。第一多肽(2302)包含三个包含突起的Fc结构域单体(2310、2308和2306),这些Fc结构域单体通过间隔物与在N末端包含 V_H 结构域的具有第一特异性的抗原结合结构域(2330)串联连接。第二多肽、第三多肽和第四多肽(2336、2334和2332)包含含有空腔的Fc结构域单体(2312、2318和2324),这些Fc结构域单体与在N末端包含 V_H 结构域的具有第二特异性的抗原结合结构域(2316、2322和2328)串联连接。包含 V_L 的结构域(2304、2314、2320和2326)与每个 V_H 结构域连接。

[0437] 图24是包含三个Fc结构域和具有两种不同特异性的四个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体(构建体24)的图示。该构建体由四个含有Fc结构域单体的多肽形成。两个多肽(2402和2436)包含在 C_H3-C_H3 界面处包含与WT序列不同的带电氨基酸的Fc结构域单体(2410和2412),这两个Fc结构域单体通过间隔物与包含突起的Fc结构域单体(2426和2424)和在N末端包含 V_H 结构域的具有第一特异性的抗原结合结构域(2430和2420)串联连接。第三多肽和第四多肽(2404和2434)包含含有空腔的Fc结构域单体(2408和2414),这两个Fc结构域单体与包含 V_H 结构域的具有第二特异性的抗原结合结构域(2432和2418)串联连接。包含 V_L 的结构域(2406、2416、2422和2428)与每个 V_H 结构域连接。

[0438] 图25是包含三个Fc结构域和具有两种不同特异性的四个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体(构建体25)的图示。该构建体由四个含有Fc结构域单体的多肽形成。

两个多肽(2502和2536)包含含有突起的Fc结构域单体(2516和2518),这两个Fc结构域单体通过间隔物与在C_H3-C_H3界面处包含与WT序列不同的带电氨基酸的Fc结构域单体(2508和2526)和在N末端包含V_H结构域的具有第一特异性的抗原结合结构域(2532和2530)串联连接。第二多肽和第三多肽(2504和2534)包含含有空腔的Fc结构域单体(2514和2520),这两个Fc结构域单体与在N末端包含V_H结构域的具有第二特异性的抗原结合结构域(2510和2524)串联连接。包含V_L的结构域(2506、2512、2522和2528)与每个V_H结构域连接。

[0439] 图26是包含五个Fc结构域和具有两种不同特异性的六个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体(构建体26)的图示。该构建体由六个包含Fc结构域单体的多肽形成。两个多肽(2602和2656)包含在C_H3-C_H3界面处包含与WT序列不同的带电氨基酸的Fc结构域单体(2618和2620),这两个Fc结构域单体通过间隔物与包含突起的Fc结构域单体(2642和2640)、第二包含突起的Fc结构域单体(2644和2638)和在N末端包含V_H结构域的具有第一特异性的抗原结合结构域(2648和2634)串联连接。第三多肽、第四多肽、第五多肽和第六多肽(2606、2604、2654和2652)包含含有空腔的Fc结构域单体(2616、2610、2622和2628),这些Fc结构域单体与在N末端包含V_H结构域的具有第二特异性的抗原结合结构域(2612、2650、2626和2632)串联连接。包含V_L的结构域(2608、2614、2624、2630、2636和2646)与每个V_H结构域连接。

[0440] 图27是包含五个Fc结构域和具有两种不同特异性的六个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体(构建体27)的图示。该构建体由六个包含Fc结构域单体的多肽形成。两个多肽(2702和2756)包含含有突起的Fc结构域单体(2720和2722),这两个Fc结构域单体通过间隔物与在C_H3-C_H3界面处包含与WT序列不同的带电氨基酸的Fc结构域单体(2712和2730)、包含突起的Fc结构域单体(2744和2742)和在N末端包含V_H结构域的具有第一特异性的抗原结合结构域(2748和2738)串联连接。第三多肽、第四多肽、第五多肽和第六多肽(2706、2704、2754和2752)包含含有空腔的Fc结构域单体(2718、2724、2710和2732),这些Fc结构域单体与在N末端包含V_H结构域的具有第二特异性的抗原结合结构域(2714、2728、2750和2736)串联连接。包含V_L的结构域(2708、2716、2726、2743、2740和2746)与每个V_H结构域连接。

[0441] 图28是包含五个Fc结构域和具有两种不同特异性的六个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体(构建体28)的图示。该构建体由六个包含Fc结构域单体的多肽形成。两个多肽(2802和2856)包含含有突起的Fc结构域单体(2824和2830),这两个Fc结构域单体通过间隔物与第二包含突起的Fc结构域单体(2826和2828)、在C_H3-C_H3界面处包含与WT序列不同的带电氨基酸的Fc结构域单体(2810和2844)和在N末端包含V_H结构域的具有第一特异性的抗原结合结构域(2850和2848)串联连接。第三多肽、第四多肽、第五多肽和第六多肽(2806、2804、2854和2852)包含含有空腔的Fc结构域单体(2822、2816、2832和2838),这些Fc结构域单体与在N末端包含V_H结构域的具有第二特异性的抗原结合结构域(2818、2812、2836和2842)串联连接。包含V_L的结构域(2808、2814、2820、2834、2840和2846)与每个V_H结构域连接。

[0442] 图29是包含两个Fc结构域和具有两种不同特异性的两个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体(构建体29)的图示。该构建体由三个含有Fc结构域单体的多肽形成。第一多肽(2902)包含两个各自具有一组不同的异二聚化突变的包含突起的Fc结构域单体

(2908和2906),这两个Fc结构域单体通过间隔物与包含 V_H 结构域的具有第一特异性的抗原结合结构域(2918)串联连接。第二多肽(2920)包含具有第一组异二聚化突变的包含空腔的Fc结构域单体(2910),该Fc结构域单体与在N末端包含 V_H 结构域的具有第二特异性的抗原结合结构域(2914)串联连接。第三多肽(2916)包含具有第二组异二聚化突变的包含空腔的Fc结构域单体。包含 V_L 的结构域(2904和2912)与每个 V_H 结构域连接。

[0443] 图30是包含两个Fc结构域和具有两种不同特异性的三个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体(构建体30)的图示。该构建体由三个含有Fc结构域单体的多肽形成。第一多肽(3002)包含两个各自具有一组不同的异二聚化突变的包含突起的Fc结构域单体(3008和3006),这两个Fc结构域单体通过间隔物与在N末端包含 V_H 结构域的具有第一特异性的抗原结合结构域(3022)串联连接。第二多肽(3024)包含具有第一组异二聚化突变的包含空腔的Fc结构域单体(3010),该Fc结构域单体与在N末端包含 V_H 结构域的具有第二特异性的抗原结合结构域(3014)串联连接。第三多肽(3026)包含具有第一组异二聚化突变的包含空腔的Fc结构域单体(3016),该Fc结构域单体与在N末端包含 V_H 结构域的具有第一特异性的抗原结合结构域(3020)串联连接。包含 V_L 的结构域(3004、3012和3018)与每个 V_H 结构域连接。

[0444] 图31是包含两个Fc结构域和具有三种不同特异性的三个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体(构建体31)的图示。该构建体由三个含有Fc结构域单体的多肽形成。第一多肽(3102)包含两个各自具有一组不同的异二聚化突变的包含突起的Fc结构域单体(3108和3106),这两个Fc结构域单体通过间隔物与在N末端包含 V_H 结构域的具有第一特异性的抗原结合结构域(3122)串联连接。第二多肽(3126)包含具有第一组异二聚化突变的包含空腔的Fc结构域单体(3110),该Fc结构域单体与在N末端包含 V_H 结构域的具有第二特异性的抗原结合结构域(3114)串联连接。第三多肽(3124)包含具有第二组异二聚化突变的包含空腔的Fc结构域单体(3116),该Fc结构域单体与在N末端包含 V_H 结构域的具有第三特异性的抗原结合结构域(3120)串联连接。包含 V_L 的结构域(3104、3112和3118)与每个 V_H 结构域连接。

[0445] 图32是包含三个Fc结构域和具有两种不同特异性的三个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体(构建体32)的图示。该构建体由四个含有Fc结构域单体的多肽形成。第一多肽(3202)包含三个包含突起的Fc结构域单体(3210、3208和3206)(第三Fc结构域单体具有与前两个Fc结构域单体不同的一组异二聚化突变),这些Fc结构域单体通过间隔物与在N末端包含 V_H 结构域的具有第一特异性的抗原结合结构域(3226)串联连接。第二多肽和第三多肽(3230和3228)包含具有第一组异二聚化突变的包含空腔的Fc结构域单体(3212和3218),这两个Fc结构域单体与在N末端包含 V_H 结构域的具有第二特异性的抗原结合结构域(3216和3222)串联连接。第四多肽(3224)包含具有第二组异二聚化突变的包含空腔的Fc结构域单体。包含 V_L 的结构域(3204、3214和3220)与每个 V_H 结构域连接。

[0446] 图33是包含三个Fc结构域和具有两种不同特异性的四个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体(构建体33)的图示。该构建体由四个含有Fc结构域单体的多肽形成。第一多肽(3302)包含三个包含突起的Fc结构域单体(3310、3308和3306)(第三Fc结构域单体具有与前两个Fc结构域单体不同的一组异二聚化突变),这些Fc结构域单体通过间隔物与在N末端包含 V_H 结构域的具有第一特异性的抗原结合结构域(3330)串联连接。第二多肽

和第三多肽(3336和3334)包含具有第一组异二聚化突变的包含空腔的Fc结构域单体(3312和3318),这两个Fc结构域单体与在N末端包含 V_H 结构域的具有第二特异性的抗原结合结构域(3316和3322)串联连接。第四多肽(3322)包含具有第二组异二聚化突变的包含空腔的Fc结构域单体(3324),该Fc结构域单体与在N末端包含 V_H 结构域的具有第一特异性的抗原结合结构域(3328)串联连接。包含 V_L 的结构域(3304、3314、3320和3326)与每个 V_H 结构域连接。

[0447] 图34是包含三个Fc结构域和具有三种不同特异性的四个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体(构建体34)的图示。该构建体由四个含有Fc结构域单体的多肽形成。第一多肽(3402)包含三个包含突起的Fc结构域单体(3410、3408和3406)(第三Fc结构域单体具有与前两个Fc结构域单体不同的一组异二聚化突变),这些Fc结构域单体通过间隔物与在N末端包含 V_H 结构域的具有第一特异性的抗原结合结构域(3430)串联连接。第二多肽和第三多肽(3436和3434)包含具有第一组异二聚化突变的包含空腔的Fc结构域单体(3412和3418),这两个Fc结构域单体与在N末端包含 V_H 结构域的具有第二特异性的抗原结合结构域(3416和3422)串联连接。第四多肽(3432)包含具有第二组异二聚化突变的包含空腔的Fc结构域单体(3424),该Fc结构域单体与在N末端包含 V_H 结构域的具有第三特异性的抗原结合结构域(3428)串联连接。包含 V_L 的结构域(3404、3414、3420和3426)与每个 V_H 结构域连接。

[0448] 图35是包含三个Fc结构域和具有三种不同特异性的四个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体(构建体35)的图示。该构建体由四个含有Fc结构域单体的多肽形成。第一多肽(3502)包含在 C_H3-C_H3 界面处包含与WT序列不同的带电氨基酸的Fc结构域单体(3510),该Fc结构域单体通过间隔物与具有第一组异二聚化突变的包含突起的Fc结构域单体(3526)和在N末端包含 V_H 结构域的具有第一特异性的抗原结合结构域(3530)串联连接。第二多肽(3536)包含在 C_H3-C_H3 界面处包含与WT序列不同的带电氨基酸的Fc结构域单体(3512),该Fc结构域单体通过间隔物与具有第二组异二聚化突变的包含突起的Fc结构域单体(3524)和在N末端包含 V_H 结构域的具有第一特异性的抗原结合结构域(3520)串联连接。第三多肽(3504)包含具有第一组异二聚化突变的包含空腔的Fc结构域单体(3508),该Fc结构域单体与在N末端包含 V_H 结构域的具有第二特异性的抗原结合结构域(3532)串联连接。第四多肽(3534)包含具有第二组异二聚化突变的包含空腔的Fc结构域单体(3514),该Fc结构域单体与在N末端包含 V_H 结构域的具有第三特异性的抗原结合结构域(3518)串联连接。包含 V_L 的结构域(3506、3516、3522和3528)与每个 V_H 结构域连接。

[0449] 图36是包含五个Fc结构域和具有两种不同特异性的四个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体(构建体36)的图示。该构建体由六个包含Fc结构域单体的多肽形成。两个多肽(3602和3644)包含具有第一组异二聚化突变的包含突起的Fc结构域单体(3614和3616),这两个Fc结构域单体通过间隔物与在 C_H3-C_H3 界面处包含与WT序列不同的带电氨基酸的Fc结构域单体(3610和3620)、另一个具有第二组异二聚化突变的包含突起的Fc结构域单体(3634和3632)和在N末端包含 V_H 结构域的具有第一特异性的抗原结合结构域(3638和3628)串联连接。第三多肽和第四多肽(3612和3618)包含具有第一组异二聚化突变的包含空腔的Fc结构域单体。第五多肽和第六多肽(3604和3642)包含具有第二组异二聚化突变的包含空腔的Fc结构域单体(3608和3622),这两个Fc结构域单体与在N末端包含 V_H 结构域的具有第二特异性的抗原结合结构域(3640和3626)串联连接。包含 V_L 的结构域(3606、3624、3630和3636)与每个 V_H 结构域连接。

[0450] 图37是包含五个Fc结构域和具有三种不同特异性的六个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体(构建体37)的图示。该构建体由六个包含Fc结构域单体的多肽形成。两个多肽(3702和3756)包含具有第一组异二聚化突变的包含空腔的Fc结构域单体(3720和3722),这两个Fc结构域单体通过间隔物与在 C_H3-C_H3 界面处包含与WT序列不同的带电氨基酸的Fc结构域单体(3712和3730)、另一个具有第二组异二聚化突变的包含突起的Fc结构域单体(3744和3742)和在N末端包含 V_H 结构域的具有第一特异性的抗原结合结构域(3748和3738)串联连接。第三多肽和第四多肽(3706和3754)包含具有第一组异二聚化突变的包含空腔的Fc结构域单体(3718和3724),这两个Fc结构域单体与在N末端包含 V_H 结构域的具有第二特异性的抗原结合结构域(3714和3728)串联连接。第五多肽和第六多肽(3704和3752)包含具有第二组异二聚化突变的包含空腔的Fc结构域单体(3710和3732),这两个Fc结构域单体与在N末端包含 V_H 结构域的具有第三特异性的抗原结合结构域(3750和3736)串联连接。包含 V_L 的结构域(3708、3716、3726、3734、3740和3746)与每个 V_H 结构域连接。

[0451] 图38是包含三个Fc结构域和具有三种不同特异性的四个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体(构建体38)的图示。该构建体由四个含有Fc结构域单体的多肽形成。第一多肽(3802)包含具有第一组异二聚化突变的包含突起的Fc结构域单体(3816),该Fc结构域单体通过间隔物与在 C_H3-C_H3 界面处包含与WT序列不同的带电氨基酸的Fc结构域单体(3808)和在N末端包含 V_H 结构域的具有第一特异性的抗原结合结构域(3832)串联连接。第二多肽(3836)包含具有第二组异二聚化突变的包含突起的Fc结构域单体(3818),该Fc结构域单体通过间隔物与在 C_H3-C_H3 界面处包含与WT序列不同的带电氨基酸的Fc结构域单体(3826)和在N末端包含 V_H 结构域的具有第一特异性的抗原结合结构域(3830)串联连接。第三多肽(3804)包含具有第一组异二聚化突变的包含空腔的Fc结构域单体(3814),该Fc结构域单体与在N末端包含 V_H 结构域的具有第二特异性的抗原结合结构域(3810)串联连接。第四多肽(3834)包含具有第二组异二聚化突变的包含空腔的Fc结构域单体(3820),该Fc结构域单体与在N末端包含 V_H 结构域的具有第三特异性的抗原结合结构域(3824)串联连接。包含 V_L 的结构域(3806、3812、3822和3828)与每个 V_H 结构域连接。

[0452] 图39是包含五个Fc结构域和具有两种不同特异性的四个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体(构建体39)的图示。该构建体由六个包含Fc结构域单体的多肽形成。两个多肽(3902和3944)包含在 C_H3-C_H3 界面处包含与WT序列不同的带电氨基酸的Fc结构域单体(3912和3914),这两个Fc结构域单体通过间隔物与具有第一组异二聚化突变的包含突起的Fc结构域单体(3932和3930)、具有第二组异二聚化突变的第二包含突起的Fc结构域单体(3934和3928)和在N末端包含 V_H 结构域的具有第一特异性的抗原结合结构域(3938和3924)串联连接。第三多肽和第四多肽(3910和3916)包含具有第一组异二聚化突变的包含空腔的Fc结构域单体。第五多肽和第六多肽(3904和3942)包含具有第二组异二聚化突变的包含空腔的Fc结构域单体(3908和3918),这两个Fc结构域单体与在N末端包含 V_H 结构域的具有第二特异性的抗原结合结构域(3940和3922)串联连接。包含 V_L 的结构域(3906、3920、3926和3936)与每个 V_H 结构域连接。

[0453] 图40是包含五个Fc结构域和具有三种不同特异性的六个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体(构建体40)的图示。该构建体由六个包含Fc结构域单体的多肽形成。两个多肽(4002和4056)包含在 C_H3-C_H3 界面处包含与WT序列不同的带电氨基酸的Fc结构域

单体(4018和4020),这两个Fc结构域单体通过间隔物与具有第一组异二聚化突变的包含突起的Fc结构域单体(4042和4040)、具有第二组异二聚化突变的第二包含突起的Fc结构域单体(4044和4038)和在N末端包含 V_H 结构域的具有第一特异性的抗原结合结构域(4048和4034)串联连接。第三多肽和第四多肽(4006和4054)包含具有第一组异二聚化突变的包含空腔的Fc结构域单体(4016和4022),这两个Fc结构域单体与在N末端包含 V_H 结构域的具有第二特异性的抗原结合结构域(4012和4026)串联连接。第五多肽和第六多肽(4004和4052)包含具有第二组异二聚化突变的包含空腔的Fc结构域单体(4010和4028),这两个Fc结构域单体与在N末端包含 V_H 结构域的具有第三特异性的抗原结合结构域(4050和4032)串联连接。包含 V_L 的结构域(4008、4014、4024、4030、4036和4046)与每个 V_H 结构域连接。

[0454] 图41是包含五个Fc结构域和具有两种不同特异性的四个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体(构建体41)的图示。该构建体由六个包含Fc结构域单体的多肽形成。两个多肽(4102和4144)包含具有第一组异二聚化突变的包含突起的Fc结构域单体(4118和4124),这两个Fc结构域单体通过间隔物与具有第二组异二聚化突变的第二包含突起的Fc结构域单体(4120和4122)、在 C_H3-C_H3 界面处包含与WT序列不同的带电氨基酸的Fc结构域单体(4108和4134)和在N末端包含 V_H 结构域的具有第一特异性的抗原结合结构域(4140和4138)串联连接。第三多肽和第四多肽(4104和4142)包含具有第一组异二聚化突变的包含空腔的Fc结构域单体(4116和4126),这两个Fc结构域单体与在N末端包含 V_H 结构域的具有第二特异性的抗原结合结构域(4112和4130)串联连接。第五多肽和第六多肽(4110和4132)包含具有第二组异二聚化突变的包含空腔的Fc结构域单体。包含 V_L 的结构域(4106、4114、4128和4136)与每个 V_H 结构域连接。

[0455] 图42是包含五个Fc结构域和具有三种不同特异性的六个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体(构建体42)的图示。该构建体由六个包含Fc结构域单体的多肽形成。两个多肽(4202和4256)包含具有第一组异二聚化突变的包含突起的Fc结构域单体(4224和4230),这两个Fc结构域单体通过间隔物与具有第二组异二聚化突变的第二包含突起的Fc结构域单体(4226和4228)、在 C_H3-C_H3 界面处包含与WT序列不同的带电氨基酸的Fc结构域单体(4210和4244)和在N末端包含 V_H 结构域的具有第一特异性的抗原结合结构域(4250和4248)串联连接。第三多肽和第四多肽(4206和4254)包含具有第一组异二聚化突变的包含空腔的Fc结构域单体(4222和4232),这两个Fc结构域单体与在N末端包含 V_H 结构域的具有第二特异性的抗原结合结构域(4218和4236)串联连接。第五多肽和第六多肽(4204和4252)包含具有第二组异二聚化突变的包含空腔的Fc结构域单体(4216和4238),这两个Fc结构域单体与在N末端包含 V_H 结构域的具有第三特异性的抗原结合结构域(4212和4242)串联连接。包含 V_L 的结构域(4208、4214、4220、4234、4240和4246)与每个 V_H 结构域连接。

[0456] 图43是示出利妥昔单抗(Rtxn)、抗CD20 IgG1 mAB以及构建体7、13、19和1的表达和纯度的非还原性SDS-PAGE凝胶的图片。

[0457] 图44是示出各种Fc-抗原结合结构域构建体的表达的凝胶。前三个泳道示出了在三种单独多肽的不同比例下Fc-抗原结合结构域构建体的表达。第四泳道示出了SIF3构建体(具有三个不包含抗原结合结构域的Fc结构域的构建体)的表达,并且第五泳道示出了具有五个不包含抗原结合结构域的Fc结构域的构建体的表达。第六泳道是分子量标记。

[0458] 图45是示出表面等离子体共振(SPR)测定的结果的两个图。在左图中,结果表明,

Fc3Y (具有构建体13的结构(图13)的构建体) 与其CTLA-4靶标的结合比相应的亲本单克隆抗体 (mAb) 强得多, 而Fc3I (具有构建体7的结构(图7)的构建体) 具有与亲本mAb相似的结合亲和力。在右图中, 结果表明, 将抗体无岩藻糖基化可使细胞表面Fc γ RIIa结合增加约10倍, 而使用各种Fc-抗原结合结构域构建体可使结合增强约300-800倍。

[0459] 图46是示出两个细胞表面Fc γ R结合测定的结果的两个图。左图示出了各种构建体与Fc γ RIIa的结合亲和力。将具有与Gazyva (可商购的抗CD20抗体) 相同的CDR的mAb无岩藻糖基化可使结合增强约10倍, 而所有Fc-抗原结合结构域构建体均显示出比亲本mAb增强>100倍的结合。右图示出了各种构建体与Fc γ RIIa的结合亲和力。将mAb无岩藻糖基化对结合没有影响, 而所有Fc-抗原结合结构域构建体均显示出比亲本mAb增强>100倍的结合。

[0460] 图47是示出利用靶向B细胞的各种抗CD20构建体的CDC、ADCP和ADCC测定的结果的三个图。第一个图表明, S3Y Fc-抗原结合结构域构建体可以介导CDC。中间图表明, SAI和S3Y Fc-抗原结合结构域构建体在ADCP Fc γ RIIa报告基因测定中均表现出>100倍的增强效力。第三个图表明, SAI和S3Y Fc-抗原结合结构域构建体表现出相对于岩藻糖基化mAb增强的ADCC活性, 以及相对于无岩藻糖基化mAb相似的活性。

[0461] 图48是示出利用靶向CTLA-4转染的HEK细胞的各种抗CTLA-4构建体的CDC、ADCP和ADCC测定的结果的三个图。第一个图示出了SAI (具有图7所示结构的Fc-抗原结合结构域构建体) 和S3Y (具有图13所示结构的Fc-抗原结合结构域构建体) 构建体介导增强的CDC。第二个图示出了SAI和S3Y构建体介导增强的ADCP, 并且第三个图示出了SAI和S3Y Fc-抗原结合结构域构建体均表现出相对于岩藻糖基化mAb增强的ADCC活性以及相对于无岩藻糖基化mAb相似的活性。

[0462] 图49是示出利用靶向PD-L1转染的HEK细胞的各种抗PD-L1构建体的ADCC、ADCP和CDC测定的结果的三个图。第一个图表明, SAI (具有Fc-抗原结合结构域构建体7的结构的构建体(图7)) 和S3Y Fc-抗原结合结构域 (具有Fc-抗原结合域构建体13的结构的构建体(图13)) 构建体均表现出相对于岩藻糖基化和无岩藻糖基化mAb相似的ADCC活性。第二个图表明, SAI和S3Y构建体介导增强的ADCP, 并且第三个图表明, S3Y构建体可以介导CDC。

[0463] 图50示出了在未纯化培养基中通过非还原性SDS-PAGE对Fc构建体A和Fc构建体B进行大小分布。

[0464] 图51示出了Fc构建体A以及另一个具有三个Fc结构域但在“茎”亚基中没有静电转向突变的Fc构建体的表达和装配。

[0465] 图52是可以将抗原结合结构域与Fc构建体的Fc结构域连接的三种示例性方式的示意性表示。小图A示出了抗原结合结构域的重链组分可以表达为Fc链的融合蛋白, 并且轻链组分可以表达为单独的多肽。小图B示出了表达为长Fc链的融合蛋白的scFv。小图C示出了单独表达并且外源添加到Fc-抗原结合结构域构建体中并利用化学键与Fc-抗原结合结构域构建体连接的重链和轻链组C

[0466] 图53A描绘了具有EU编号的人IgG1的氨基酸序列 (SEQ ID NO:43)。铰链区用双下划线标出, CH2结构域未用下划线标出, 而CH3区用下划线标出。

[0467] 图53B描绘了具有EU编号的人IgG1的氨基酸序列 (SEQ ID NO:45)。缺少E216-C220 (包括端点) 的铰链区用双下划线标出, CH2结构域未用下划线标出, 而CH3区用下划线标出并且缺少K447。

[0468] 图53C描绘了具有EU编号的人IgG1的氨基酸序列(SEQ ID NO:47)。铰链区用双下划线标出,CH2结构域未用下划线标出,而CH3区用下划线标出并且缺少447K。

[0469] 图53D描绘了具有EU编号的人IgG1的氨基酸序列(SEQ ID NO:42)。缺少E216-C220(包括端点)的铰链区用双下划线标出,CH2结构域未用下划线标出,而CH3区用下划线标出。

[0470] 图54是示出抗CD20构建体7、抗CD20构建体13、Gazyva和岩藻糖基化抗CD20 IgG1抗体(奥滨尤妥珠单抗)在Daudi细胞中诱导补体依赖性细胞毒性(CDC)的图。

[0471] 图55是示出在ADCP报告基因测定中抗CD20构建体7、抗CD20构建体13以及岩藻糖基化和无岩藻糖基化抗CD20 IgG1抗体(奥滨尤妥珠单抗)诱导Fc γ RIIa信号传导(倍数诱导)的图。

[0472] 图56是示出在ADCC报告基因测定中抗CD20构建体7、抗CD20构建体13以及岩藻糖基化和无岩藻糖基化抗CD20 IgG1抗体(奥滨尤妥珠单抗)诱导Fc γ RIIIa信号传导(倍数诱导)的图。

[0473] 图57是示出岩藻糖基化和无岩藻糖基化抗CD20构建体13以及岩藻糖基化和无岩藻糖基化奥滨尤妥珠单抗单克隆抗体耗竭人全血中的CD19+B细胞的图。

[0474] 图58是示出在注射单剂量的抗CD20构建体13、岩藻糖基化奥滨尤妥珠单抗单克隆抗体或达雷木单抗单克隆抗体后或在注射多剂量的抗CD20构建体13后小鼠淋巴瘤模型中肿瘤生长减少的图。

[0475] 图59是示出比较抗CD20构建体的ADCC报告基因测定结果的图。岩藻糖基化构建体被示出为通过虚线连接的灰色方形,而无岩藻糖基化构建体被示出为通过实线连接的黑色圆形。

[0476] 图60是描绘比较抗CD20构建体的ADCP报告基因测定结果的图。岩藻糖基化构建体被示出为通过虚线连接的灰色方形,而无岩藻糖基化构建体被示出为通过实线连接的黑色圆形。

[0477] 图61是描绘通过用抗CD20构建体处理所诱导的全血中CD19+B细胞的耗竭的分析结果的图。岩藻糖基化构建体被示出为通过虚线连接的灰色方形,而无岩藻糖基化构建体被示出为通过实线连接的黑色圆形。

[0478] 图62是描绘用抗PD-L1构建体处理的人肺癌细胞的ADCC的分析结果的图。岩藻糖基化构建体被示出为通过虚线连接的灰色方形,而无岩藻糖基化构建体被示出为通过实线连接的黑色圆形。

[0479] 图63是描绘用抗PD-L1构建体处理的人肺癌细胞的分析ADCP的结果的图。岩藻糖基化构建体被示出为通过虚线连接的灰色方形,而无岩藻糖基化构建体被示出为通过实线连接的黑色圆形。

[0480] 图64是描绘用抗PD-L1构建体处理的PD-L1转染的HEK细胞的分析CDC的结果的图。岩藻糖基化构建体被示出为通过虚线连接的灰色方形,而无岩藻糖基化构建体被示出为通过实线连接的黑色圆形。

具体实施方式

[0481] 许多治疗性抗体通过Fc结构域的效应子功能(诸如抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)和补体依赖性细胞毒性(CDC))募集先天免疫系统的元件

而发挥作用。在一些情况下,本公开设想将已知含单个Fc结构域的治疗剂(例如,已知治疗性抗体)的抗原结合结构域与至少两个Fc结构域组合以产生具有独特生物活性的新型治疗剂。在一些情况下,本文公开的新型治疗剂具有比已知含Fc结构域的治疗剂(例如,已知治疗性抗体)更大的生物活性。至少两个Fc结构域的存在可以增强效应子功能并激活多种效应子功能,诸如ADCC结合ADCP和/或CDC,从而提高治疗性分子的功效。为了产生具有一致生物功能的产物,控制Fc结构域的数量是至关重要的。本公开的特征在于一组Fc工程化工具,以控制编码Fc结构域的肽的同二聚化和异二聚化,以由有限数量的多肽链组装离散大小的分子。国际公开号W0/2015/168643、W02017/151971、W0 2017/205436和W0 2017/205434公开了用于组装具有两个或更多个Fc结构域的分子的Fc工程化工具和方法,并且通过引用整体并入本文。这些工程化工具包括可显著改善制造结果的结构特征(例如,甘氨酸接头)。这些构建体的特性允许有效产生基本上同质的药物组合物。药物组合物中的此类同质性是期望的,以便确保药物组合物的安全性、功效、均匀性和可靠性。在药物组合物中具有高度同质性还使由不需要的材料(例如,降解产物和/或聚集产物或多聚体)引起的药物产品的潜在聚集或降解降到最低,以及限制由不需要的材料引起的脱靶效应和不良副作用。

[0482] 如本文详细描述,我们使用以下方法来工程化Fc-抗原结合结构域构建体的Fc结构域组分改善了组合物的同质性:包括使用仅包含甘氨酸残基的间隔物串联连接两个Fc结构域单体,使用移除末端赖氨酸残基的多肽序列,以及使用两组异二聚化选择性模块:(i)具有不同反向电荷突变的异二聚化选择性模块,以及(ii)具有工程化空腔和突起的异二聚化选择性模块。

[0483] 我们使用一条包含多个被接头分开的Fc序列的长肽链以及包含单个Fc序列的短链的多个拷贝设计了一系列其中Fc结构域串联连接的Fc-抗原结合结构域构建体(Fc-抗原结合域构建体1-6;图1至图6)。将异二聚体化突变引入每个Fc序列中,以确保组装成所需的串联构型,而最小化形成较小或较大复合物。可以以这种方式串联连接任意数量的Fc结构域,从而允许创建具有2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个Fc结构域的构建体。对于具有N个Fc结构域的肽,可以将此类构建体制备成具有1至N+1个抗原结合结构域,这分别取决于将抗原结合结构域引入长肽链、短肽链还是两者中。

[0484] 在Fc-抗原结合结构域构建体1-6(图1至图6)中,Fc结构域与Fc结构域之间的单个分支点连接。这些构建体包括包含多个被接头分开的Fc序列的长肽链的两个拷贝,其中分支Fc序列包含同二聚化突变,并且非分支Fc结构域包含异二聚化突变。包含单个Fc序列且具有与长链中异二聚化突变互补的突变的短链的多个拷贝用于完成多聚体Fc支架。异二聚化Fc结构域可以与C末端(例如,Fc-抗原结合结构域构建体7-12;图7至图12)、N末端(例如,Fc-抗原结合结构域构建体13-18;图13至图18)或分支Fc结构域的两端(例如,Fc-抗原结合结构域构建体19-21;图19至图21)连接。串联的多个Fc结构域可以与分支Fc结构域的任一端连接。可将抗原结合结构域引入长肽链中,使得每个组装蛋白质分子有两个抗原结合结构域。另选地,可将抗原结合结构域引入短肽链中,使得每个组装蛋白质分子有N-1个抗原结合结构域,其中N是组装蛋白质分子中Fc结构域的数量。如果将抗原结合结构域引入短肽链和长肽链两者中,则所得的组装蛋白分子包含N+1个抗原结合结构域。

[0485] 可通过使用其中两个不同抗原结合序列串联连接的抗原结合结构域来从任何上述设计产生双特异性构建体。另选地,可从其中长链编码一个抗原结合结构域而短链编码

不同的抗原结合结构域的上述Fc支架产生双特异性构建体。不同的抗原结合结构域可使用不同的轻链或共同的轻链,或者可由scFv结构域组成。该概念的说明性实例是Fc-抗原结合结构域构建体22-28(图22-图28)。

[0486] 也可通过使用两组不同的异二聚化突变来产生双特异性和三特异性构建体(例如,Fc-抗原结合结构域构建体29-42;图29-图42)。此类异二聚化序列需要以它们不利于与其他异二聚化序列缔合的方式进行设计。此类设计可以使用本文所述的两组异二聚化突变之间的不同静电转向突变来实现。正交静电转向突变的一个实例是第一旋钮Fc中的E357K、第一孔洞Fc中的K370D、第二旋钮Fc中的D399K和第二孔洞Fc中的K409D。

[0487] 过去针对单克隆抗体(mAb)和Fc结构域进行的工程化工作包括在Fc结构域中进行突变以增强与Fc γ RIIIa的结合,从而增强抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)反应,以及对Fc结构域进行无岩藻糖基化以增强与Fc γ RIIIa的结合,从而增强ADCC反应。

[0488] 本公开中所公开的Fc-抗原结合结构域构建体与在Fc结构域中具有突变以增强与Fc γ RIIIa的结合或Fc结构域的无岩藻糖基化的抗体相比,出乎意料地能够增强与多种类型的Fc γ 受体的结合以及多种细胞毒性途径的活性。本公开的Fc-抗原结合结构域构建体与它们对应的岩藻糖基化和无岩藻糖基化亲本单克隆抗体相比,可以增强与Fc γ RIIa和Fc γ RIIIa的结合(参见实施例46)。此外,本公开的Fc-抗原结合结构域构建体除了增强ADCC途径应答之外,出乎意料地能够介导补体依赖性细胞毒性(CDC)途径和/或抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)途径(参见实施例47)。

[0489] I.Fc结构域单体

[0490] Fc结构域单体包括铰链结构域、C_H2抗体恒定结构域和C_H3抗体恒定结构域(例如,人IgG1铰链、C_H2抗体恒定结构域和具有任选氨基酸置换的C_H3抗体恒定结构域)的至少一部分。Fc结构域单体可以是免疫球蛋白抗体同种型IgG、IgE、IgM、IgA或IgD。Fc结构域单体也可以是任何免疫球蛋白抗体同种型(例如,IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3或IgG4)。Fc结构域单体也可以是杂合体,例如具有来自IgG1的铰链和C_H2以及来自IgA的C_H3或者具有来自IgG1的铰链和C_H2以及来自IgG3的C_H3。Fc结构域单体的二聚体是可以结合Fc受体(例如,Fc γ RIIIa,一种位于白细胞的表面上的受体)的Fc结构域(本文进一步定义)。在本公开中,Fc结构域单体的C_H3抗体恒定结构域可在C_H3-C_H3抗体恒定结构域的界面处含有氨基酸置换,以促进它们彼此的缔合。在其他实施方案中,Fc结构域单体包括附接到N末端或C末端的附加部分,例如白蛋白结合肽或纯化肽。在本公开中,Fc结构域单体不含有任何类型的抗体可变区,例如V_H、V_L、互补决定区(CDR)或高变区(HVR)。

[0491] 在一些实施方案中,本文所述的Fc-抗原结合结构域构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc-抗原结合结构域构建体)中的Fc结构域单体可具有与SEQ ID NO:42的序列具有至少95%同一性(至少97%、99%或99.5%同一性)的序列。在一些实施方案中,本文所述的Fc-抗原结合结构域构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc-抗原结合结构域构建体)中的Fc结构域单体可具有与SEQ ID NO:44、46、48和50-53中任一者的序列具有至少95%同一性(至少97%、99%或99.5%同一性)的序列。在某些实施方案中,Fc-抗原结合结构域构建体中的Fc结构域单体可具有与SEQ ID NO:48、52和53中任一者的序列具有至少95%同一性(至少97%、99%或99.5%同一性)的序列。

[0492] SEQ ID NO:42

[0493] DKHTCPCPCAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0494] SEQ ID NO:44

[0495] DKHTCPCPCAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSL
CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0496] SEQ ID NO:46

[0497] DKHTCPCPCAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSL
CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSL
SPG

[0498] SEQ ID NO:48

[0499] DKHTCPCPCAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSL
CAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSL
SPG

[0500] SEQ ID NO:50

[0501] DKHTCPCPCAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLW
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0502] SEQ ID NO:51

[0503] DKHTCPCPCAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0504] SEQ ID NO:52

[0505] DKHTCPCPCAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSL
SPG

[0506] SEQ ID NO:53

[0507] DKHTCPCPCAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLW
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0508] II.Fc结构域

[0509] 如本文所定义,Fc结构域包括两个Fc结构域单体,它们通过 C_H3 抗体恒定结构域之间的相互作用而二聚化。Fc结构域形成与Fc受体(例如,Fc- γ 受体(即Fc γ 受体(Fc γ R))、Fc- α 受体(即Fc α 受体(Fc α R))、Fc- ϵ 受体(即Fc ϵ 受体(Fc ϵ R))和/或新生儿Fc受体(FcRn))结合的最小结构。在一些实施方案中,本公开的Fc结构域与Fc γ 受体(例如,Fc γ RI(CD64)、Fc γ RIIa(CD32)、Fc γ RIIb(CD32)、Fc γ RIIIa(CD16a)、Fc γ RIIIb(CD16b))和/或Fc γ RIV和/或新生儿Fc受体(FcRn)结合。

[0510] III.抗原结合结构域

[0511] 抗原结合结构域包括特异性结合靶分子的一种或多种肽或多肽。抗原结合结构域可包括抗体的抗原结合结构域。在一些实施方案中,抗原结合结构域可以是抗体或抗体构建体的片段,例如抗体的与靶抗原结合的最小部分。抗原结合结构域也可以是特异性结合靶标的合成工程化肽,例如基于纤连蛋白的结合蛋白(例如, FN3单体)。片段抗原结合(Fab)片段是抗体上与靶抗原结合的区域。它由重链和轻链中每一者的一个恒定结构域和一个可变结构域构成。Fab片段包括 V_H 、 V_L 、 C_H1 和 C_L 结构域。可变结构域 V_H 和 V_L 各自在单体的氨基末端处包含一组3个互补决定区(CDR)。Fab片段可以是免疫球蛋白抗体同种型IgG、IgE、IgM、IgA或IgD。Fab片段单体也可以是任何免疫球蛋白抗体同种型(例如,IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3或IgG4)。在一些实施方案中,在对免疫球蛋白进行蛋白酶(例如,胃蛋白酶)处理之后,Fab片段可共价附接到第二相同的Fab片段,从而形成 $F(ab')_2$ 片段。在一些实施方案中,Fab可表达为单个多肽,该单个多肽包括例如与结构域之间的接头融合的可变结构域和恒定结构域。

[0512] 在一些实施方案中,可仅使用Fab片段的一部分作为抗原结合结构域。在一些实施方案中,可仅使用Fab的轻链组分(V_L+C_L),或者可仅使用Fab的重链组分(V_H+C_H)。在一些实施方案中,可使用单链可变片段(scFv),该单链可变片段是Fab可变区的 V_H 和 V_L 链的融合蛋白。在其他实施方案中,可使用线性抗体,该线性抗体包括一对串联Fd区段($V_H-C_H1-V_H-C_H1$),该对串联Fd区段与互补轻链多肽一起形成一对抗原结合区。

[0513] 在一些实施方案中,本公开的抗原结合结构域包括表1中列出的靶标或抗原,以及表1中针对所列出的靶标或抗原列出的一个、两个、三个、四个、五个或全部六个CDR序列,如下表1进一步详细提供。

[0514] 表1A

[0515]

靶标	抗体名称	CDR1- IMGT (重)	CDR2-IMGT (重)	CDR3-IMGT (重)	CDR1- IMGT (轻)	CDR 2- IMGT (轻)	CDR3- IMGT (轻)
B7-H3	Enoblitzu mab	GFTFS SFG (SEQ ID NO: 76)	ISSDSSAI (SEQ ID NO: 106)	GRGRENIYY GSRLDY (SEQ ID NO: 137)	QNVDT N (SEQ ID NO: 171)	SAS	QQYN NYPFT (SEQ ID NO: 201)
β -淀 粉 样 蛋白	甘特殊单 抗 (Gantene rumab)	GFTFS SYA (SEQ ID NO: 77)	INASGTRT (SEQ ID NO: 107)	ARGKGNTHK PYGYVRYFD V (SEQ ID NO: 138)	QSVSS Y (SEQ ID NO: 172)	GAS	LQIYN MPIT (SEQ ID NO: 202)
CCR4	莫加珠单 抗 (Mogam ulizumab)	GFIFS NYG (SEQ ID NO: 78)	ISSASTYS (SEQ ID NO: 108)	GRHSDGNFA FGY (SEQ ID NO: 139)	RNIVHI NGDTY (SEQ ID NO: 173)	KVS	FQGS L LPWT (SEQ ID NO: 203)
CD19	Inebilizu mab	GFTFS SSW (SEQ ID NO: 79)	IYPGDGDT (SEQ ID NO: 109)	ARSGFITTVR DFDY (SEQ ID NO: 140)	ESVDTF GISF (SEQ ID NO: 174)	EAS	QQSK EVPFT (SEQ ID NO: 204)
CD20	奥滨尤妥 珠 单 抗 (Obinutu zumab)	GYAFS YSW (SEQ ID NO: 80)	IFPGDGDT (SEQ ID NO: 110)	ARNVFDGYW LVY (SEQ ID NO: 141)	KSLLHS NGITY (SEQ ID NO: 175)	QMS	AQNL ELPYT (SEQ ID NO: 205)
CD20	奥卡土珠	GRTFT	AIYPLTGDT	ARSTYVGGD	SSVPY	ATS	QQWL

[0516]

	单抗 (Ocaratuzumab)	SYNMH (SEQ ID NO: 81)	(SEQ ID NO: 111)	WQFDV (SEQ ID NO: 142)	(SEQ ID NO: 176)		SNPPT (SEQ ID NO: 206)
CD20	利妥昔单抗 (Rituximab)	GYTFTSYN (SEQ ID NO: 82)	IYPGNGDT (SEQ ID NO: 112)	CARSTYYGG DWYFNV (SEQ ID NO: 143)	SSVS (SEQ ID NO: 177)	ATS	QQWT SNPPT (SEQ ID NO: 207)
CD20	乌妥昔单抗 (Ublituximab)	GYTFTSYN (SEQ ID NO: 82)	IYPGNGDT (SEQ ID NO: 112)	ARYDYNYA MDY (SEQ ID NO: 144)	SSVS (SEQ ID NO: 177)	ATS	QQWT FNPPT (SEQ ID NO: 208)
CD20	维妥珠单抗 (Veltuzumab)	GYTFTSYN (SEQ ID NO: 82)	IYPGNGDT (SEQ ID NO: 112)	ARSTYYGGD WYFDV (SEQ ID NO: 145)	SSVS (SEQ ID NO: 177)	ATS	QQWT SNPPT (SEQ ID NO: 207)
CD22	依帕珠单抗 (Epratuzumab)	GYTFTSYW (SEQ ID NO: 83)	INPRNDYT (SEQ ID NO: 113)	ARRDITTFY (SEQ ID NO: 146)	QSVLYS ANHKNY (SEQ ID NO: 178)	WAS	HQYL SS (SEQ NO: 209)
CD37	奥特乐土珠单抗 (Otlertuzumab)	GYSFTGYN (SEQ ID NO: 84)	IDPYYGGT (SEQ ID NO: 114)	ARSVGPFD (SEQ ID NO: 147)	ENVYSY (SEQ ID NO: 179)	FAK	QHHS DNPWT (SEQ ID NO: 210)
CD38	达雷木单抗 (Daratumumab)	GFTFNSFA (SEQ ID NO: 85)	ISGSGGGT (SEQ ID NO: 115)	AKDKILWFG EPVFDY (SEQ ID NO: 148)	QSVSSY (SEQ ID NO: 180)	DAS	QQRS NWPP T (SEQ ID NO: 211)
CD38	伊沙妥昔单抗 (Isatuximab)	GYTFTDYW (SEQ ID NO: 86)	IYPGDGDT (SEQ ID NO: 109)	ARGDYYGSN SLDY (SEQ ID NO: 149)	QDVSTV (SEQ ID NO: 181)	SAS	QQHY SPPYT (SEQ ID NO: 212)
CD3epsilon	弗罗鲁单抗 (Foralumab)	GFKFSGYG (SEQ ID NO: 87)	IWYDGSKK (SEQ ID NO: 116)	ARQMGYWH FDLW (SEQ ID NO: 150)	QSVSSY (SEQ ID NO: 180)	DAS	QQRS NWPP LT (SEQ ID NO: 213)
CD52	阿仑珠单抗 (Alemtuzumab)	GFTFTDFY (SEQ ID NO: 88)	IRDKAKGYT (SEQ ID NO: 117)	AREGHTAAP FDY (SEQ ID NO: 151)	QNIDKY (SEQ ID NO: 182)	NTN	LQHIS RPRT (SEQ ID NO: 214)
CD105	Carotuximab	GFTFSDAW (SEQ ID NO: 89)	IRSKASNHA T (SEQ ID NO: 118)	TRWRRFFDS (SEQ ID NO: 152)	SSVS (SEQ ID NO: 177)	ATS	QQWS SNPLT (SEQ ID NO: 215)

[0517]

		89)					215)
CD14 7	cHAb18	GFTFS DAW (SEQ ID NO: 89)	IRSANNHAP T (SEQ ID NO: 119)	TRDSTATH (SEQ ID NO: 153)	QSVIND (SEQ ID NO: 183)	TAS	QQDT SPP (SEQ ID NO: 216)
c-Met	ABT-700	GYIFT AYT (SEQ ID NO: 90)	IKPNNGLA (SEQ ID NO: 120)	ARSEITTEFD Y (SEQ ID NO: 154)	ESVDSY ANSF (SEQ ID NO: 184)	RAS	QQSK EDPLT (SEQ ID NO: 217)
CTLA -4	伊匹单抗 (Ipilimu mab)	GFTFS SYT (SEQ ID NO: 91)	ISYDGNNK (SEQ ID NO: 121)	ARTGWLGP DY (SEQ ID NO: 155)	QSVGSS Y (SEQ ID NO: 185)	GAF	QQYG SSPWT (SEQ ID NO: 218)
EGFR 2	Margetuxi mab	GFTFS DTY (SEQ ID NO: 92)	IYPTNGYT (SEQ ID NO: 122)	SRWGGDGFY AMDY (SEQ ID NO: 156)	QDVNT A (SEQ ID NO: 186)	SAS	QQHY TTPPT (SEQ ID NO: 219)
EGFR 3	Lumretuzu mab	GYTFR SSY (SEQ ID NO: 93)	IYAGTGSP (SEQ ID NO: 123)	ARHRDYYSN SLTY (SEQ ID NO: 157)	QSVLNS GNQKN Y (SEQ ID NO: 187)	WAS	QSDYS YPYT (SEQ ID NO: 220)
EphA 3	Ifabotuzu mab	GYTFT GYW (SEQ ID NO: 94)	IYPGSGNT (SEQ ID NO: 124)	ARGGYEDF DS (SEQ ID NO: 158)	QGIISY (SEQ ID NO: 188)	AAS	GQYA NYPY T (SEQ ID NO: 221)
GD3	依美昔单 抗 (Ecrome ximab)	GFAFS HYA (SEQ ID NO: 95)	ISSGGSGT (SEQ ID NO: 125)	TRVKLGTY FDS (SEQ ID NO: 159)	QDISNY (SEQ ID NO: 189)	YSS	HQYS KLP (SEQ ID NO: 222)
GPC3	克锥特珠 单抗 (Codritu zumab)	GYTFT DYE (SEQ ID NO: 96)	LDPKTGDT (SEQ ID NO: 126)	TRFYSYTY (SEQ ID NO: 160)	QSLVHS NRNTY (SEQ ID NO: 190)	KVS	SQNT HVPPT (SEQ ID NO: 223)
KIR2 DL1/2 /3	利瑞鲁单 抗 (Lirilum ab)	GGTFS FYA (SEQ ID NO: 97)	FIPIFGAA (SEQ ID NO: 127)	ARIPSGSY DYDMDV (SEQ ID NO: 161)	QSVSSY (SEQ ID NO: 180)	DAS	QQRS NWMY T (SEQ ID NO: 224)
MUC5 AC	恩妥昔单 抗 (Ensituxi mab)	GFSLS KFG (SEQ ID NO: 98)	IWGDGST (SEQ ID NO: 128)	VKPGGDY (SEQ ID NO: 162)	SSISY (SEQ ID NO: 191)	DTS	HQRD SYPW T (SEQ ID NO: 225)
磷脂 酰丝	巴维昔单 抗	GYSFT GYN (SEQ	IDPYYGDT (SEQ ID NO: 129)	VKGGYYGH WYFDV (SEQ ID NO: 163)	QDIGSS (SEQ ID NO: 192)	ATS	LQYV SSPPT (SEQ

[0518]

氨酸	(Bavituximab)	ID NO: 84)					ID NO: 226)
RHD	罗勒杜单抗 (Roledumab)	GFTFK NYA (SEQ ID NO: 99)	ISYDGRNI (SEQ ID NO: 130)	ARPVRSRWL QLGLEDAFHI (SEQ ID NO: 164)	QDIRNY (SEQ ID NO: 193)	AAS	QQYY NSPPT (SEQ ID NO: 227)
SLAMF7	埃罗妥珠单抗 (Elotuzumab)	GDFSR RYW (SEQ ID NO: 100)	INPDSSTI (SEQ ID NO: 131)	ARPDGNYWY FDV (SEQ ID NO: 165)	QDVGIA (SEQ ID NO: 194)	WAS	QQYSS YPYT (SEQ ID NO: 228)
HER2	曲妥珠单抗 (Trastuzumab)	GFNIK DTY (SEQ ID NO: 92)	IYPTNGYT (SEQ ID NO: 122)	SRWGGDGFY AMDY (SEQ ID NO: 156)	QDVNT A (SEQ ID NO: 186)	SAS	QQHY TTPPT (SEQ ID NO: 219)
OX40	欧西鲁单抗 (Oxelumab)	GFTFN SYA (SEQ ID NO: 101)	ISGSGGFT (SEQ ID NO: 132)	AKDRLVAPG TFDY (SEQ ID NO: 166)	QGISSW (SEQ ID NO: 195)	AAS	QQYN SYPYT (SEQ ID NO: 229)
PD-L1	阿维鲁单抗 (Avelumab)	GFTFS SYI (SEQ ID NO: 102)	IYPSGGIT (SEQ ID NO: 133)	ARIKLGTVTT VDY (SEQ ID NO: 167)	SSDVGG YNY (SEQ ID NO: 196)	DVS	SSYTS SSTRV (SEQ ID NO: 230)
CD135	4G8-SDIEM	SYWM H (SEQ ID NO: 103)	EIDPSDSYKD YNQKFKD (SEQ ID NO: 134)	AITTTPFDF (SEQ ID NO: 168)	RASQSI SNNLH (SEQ ID NO: 197)	YSQ SIS (SEQ ID NO: 200)	QQSN TWPYT (SEQ ID NO: 231)
HIV1	VRC01LS	GYTFL NCPI (SEQ ID NO: 104)	GWMKPRGG AVN (SEQ ID NO: 135)	ARYFFGSSPN WYFD (SEQ ID NO: 169)	SQYGSL AW (SEQ ID NO: 198)	GGG	QQYE FFGQGT (SEQ ID NO: 232)
HER3	KTN3379	GFTFS YYM Q (SEQ ID NO: 105)	IGSSGGVTN (SEQ ID NO: 136)	ARVGLGDAF DIWQQ (SEQ ID NO: 170)	SLSNIG LN (SEQ ID NO: 199)	SRN	AAWD DSPPG (SEQ ID NO: 233)

[0519] 表1B:可变结构域序列

[0520]

抗体	VH/CH1	VL
阿特珠单抗 (Atezolizumab)	EVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFSDSWIHWVR QAPGKGLEWVAWISPYGG STYYADSVKGRFTISADTS KNTAYLQMNSLRAEDTAV	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQDVSTAVAWYQ QKPGKAPKLLIYSASFLYS GVPSRFGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQYLYHP

抗体	VH/CH1	VL
PD-L1	YCARRHWPGGFDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYAST YRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCFSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	ATFGQGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
[0521] 度伐利 尤单抗 (Durval umab) PD-L1	EVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFSRYWMSWV RQAPGKGLEWVANIKQDG SEKYYVDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCAREGGWFGELAFDY WGQGTTLTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPEFEGG PSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKF FNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKA LPASIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSF	EIVLTQSPGTLSLSPGERAT LSCRASQRVSSSYLAWEYQ QKPGQAPRLLIYDASSRAT GIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYGSLP WTFGQGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC

抗体	VH/CH1	VL
	FLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK	
替西木单抗 (Tremelimumab) CTLA-4	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDP RGATLYYYYY GMDVWGQGT VTVSSASTKG PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA VLQSSGLYSL SSVVTVPSSN FGTQTYTCNV DHKPSNTKVD KTVRKCCVE CPPCPAPPVA GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVQFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF NSTFRVVSVL TVVHQDWLNG KEYKCKVSNK GLPAPIEKTI SKTKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQSIN SYLDWYQQKPGKAPKLLI YAASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYY CQQYYSTPFTFGPGTKVEI KRTVAAPS VFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPR VQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSSTLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFN RGE

[0522]

抗体	VH/CH1	VL
	PENNYKTTPP MLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K	
伊沙妥昔单抗 (Isatuximab) CD38	QVQLVQSGAEVAKPGTSV KLSCKASGYTFTDYWMQ WVKQRPGQGLEWIGTIYP GDGDTGYAQKFQGKATLT ADKSSKTVYMHLSLASED SAVYYCARGDYYGSNSLD YWGQGTSTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMIS RTP EVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK	DIVMTQSHLSMSTSLGDPV SITCKASQDVSTVVAWYQ QKPGQSPRRLIYSASYRYIG VPDRFTGSGAGTDFTFTISS VQAEDLAVYYCQQHYSP YTFGGGTKLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
MOR 202 CD38	QVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSSYYMNW VRQAPGKGLEWVSGISGDP SNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARDLPLVYTGFAIW GQGT LVT (仅 VH)	DIELTQPPSVSVAPGQTARI SCSGDNLRHYVYVYQQ KPGQAPVLVIYGDSKRPSG IP ERFSGSNSGNTATLTISGTQ AEDEADYYCQTYTGGASL VFGGGTKLTVLGQ

[0524] Fc-抗原结合结构域构建体1的抗原结合结构域(图1中的110/104)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0525] Fc-抗原结合结构域构建体2的抗原结合结构域(图2中的212/204)可以包括表1中

列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0526] Fc-抗原结合结构域构建体3的抗原结合结构域(图3中的308/316和312/318)各自可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0527] Fc-抗原结合结构域构建体4的抗原结合结构域(图4中的410/412、416/418和422/424)各自可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0528] Fc-抗原结合结构域构建体5的抗原结合结构域(图5中的510/504、512/514和518/520)各自可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0529] Fc-抗原结合结构域构建体6的抗原结合结构域(图6中的612/604、614/616、620/622和626/628)各自可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0530] Fc-抗原结合结构域构建体7的抗原结合结构域(图7中的712/714和714/716)各自可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0531] Fc-抗原结合结构域构建体8的抗原结合结构域(图8中的812/806和818/822)各自可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0532] Fc-抗原结合结构域构建体9的抗原结合结构域(图9中的908/906、920/922、912/914和926/930)各自可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0533] Fc-抗原结合结构域构建体10的抗原结合结构域(图10中的1006/1004和1018/1020)各自可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0534] Fc-抗原结合结构域构建体11的抗原结合结构域(图11中的1112/1114、1122/1108、1128/1142和1138/1136)各自可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0535] Fc-抗原结合结构域构建体12的抗原结合结构域(图12中的1218/1220、1212/1214、1250/1208、1248/1246、1242/1240和1236/1234)各自可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0536] Fc-抗原结合结构域构建体13的抗原结合结构域(图13中的1310/1304和1314/1322)各自可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0537] Fc-抗原结合结构域构建体14的抗原结合结构域(图14中的1408/1406和1416/1424)各自可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0538] Fc-抗原结合结构域构建体15的抗原结合结构域(图15中的1508/1506、1514/1516、1532/1520和1530/1528)各自可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0539] Fc-抗原结合结构域构建体16的抗原结合结构域(图16中的1616/1604和1618/1630)各自可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0540] Fc-抗原结合结构域构建体17的抗原结合结构域(图17中的1712/1714、1724/1708、1726/1742和1738/1736)各自可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0541] Fc-抗原结合结构域构建体18的抗原结合结构域(图18中的1812/1814、1828/1808、1826/1824、1830/1832、1850/1848和1844/1842)各自可以包括表1中列出的抗体中的

任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0542] Fc-抗原结合结构域构建体19的抗原结合结构域(图19中的1914/1904和1920/1922)各自可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0543] Fc-抗原结合结构域构建体20的抗原结合结构域(图20中的2014/2016、2042/2008、2036/2034和2028/2026)各自可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0544] Fc-抗原结合结构域构建体21的抗原结合结构域(图21中的2114/2116、2150/2108、2148/2146、2138/2140、2136/2134和2128/2126)各自可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0545] Fc-抗原结合结构域构建体22的抗原结合结构域(图22中的2204/2222)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0546] Fc-抗原结合结构域构建体22的抗原结合结构域(图22中的2218/2220和2212/2214中的每一者)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0547] Fc-抗原结合结构域构建体23的抗原结合结构域(图23中的2330/2304)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0548] Fc-抗原结合结构域构建体23的抗原结合结构域(图23中的2328/2326、2322/2320和2316/2314中的每一者)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0549] Fc-抗原结合结构域构建体24的抗原结合结构域(图24中的2430/2428和2420/2422中的每一者)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0550] Fc-抗原结合结构域构建体24的抗原结合结构域(图24中的2432/2406和2418/2416中的每一者)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0551] Fc-抗原结合结构域构建体25的抗原结合结构域(图25中的2532/2506和2530/2528中的每一者)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0552] Fc-抗原结合结构域构建体25的抗原结合结构域(图25中的2510/2512和2524/2522中的每一者)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0553] Fc-抗原结合结构域构建体26的抗原结合结构域(图26中的2648/2646和2634/2636中的每一者)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0554] Fc-抗原结合结构域构建体26的抗原结合结构域(图26中的2612/2614、2650/2608、2632/2630和2626/2624中的每一者)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0555] Fc-抗原结合结构域构建体27的抗原结合结构域(图27中的2748/2746和2738/2740中的每一者)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序

列。

[0556] Fc-抗原结合结构域构建体27的抗原结合结构域(图27中的2714/2716、2750/2708、2736/2734和2728/2726中的每一者)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0557] Fc-抗原结合结构域构建体28的抗原结合结构域(图27中的2850/2808和2848/2846中的每一者)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0558] Fc-抗原结合结构域构建体28的抗原结合结构域(图28中的2818/2820、2812/2814、2842/2840和2836/2834中的每一者)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0559] Fc-抗原结合结构域构建体29的抗原结合结构域(图29中的2918/2904)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0560] Fc-抗原结合结构域构建体29的抗原结合结构域(图29中的2914/2912)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0561] Fc-抗原结合结构域构建体30的抗原结合结构域(图30中的3022/3004和3020/3018中的每一者)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0562] Fc-抗原结合结构域构建体30的抗原结合结构域(图30中的3014/3012)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0563] Fc-抗原结合结构域构建体31的抗原结合结构域(图31中的3122/3104)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0564] Fc-抗原结合结构域构建体31的抗原结合结构域(图31中的3120/3118)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0565] Fc-抗原结合结构域构建体31的抗原结合结构域(图31中的3114/3112)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0566] Fc-抗原结合结构域构建体32的抗原结合结构域(图32中的3226/3204)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0567] Fc-抗原结合结构域构建体32的抗原结合结构域(图32中的3222/3220和3216/3214中的每一者)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0568] Fc-抗原结合结构域构建体33的抗原结合结构域(图33中的3330/3304和3328/3326中的每一者)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0569] Fc-抗原结合结构域构建体33的抗原结合结构域(图33中的3322/3320和3316/3314中的每一者)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0570] Fc-抗原结合结构域构建体34的抗原结合结构域(图34中的3430/3404)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0571] Fc-抗原结合结构域构建体34的抗原结合结构域(图34中的3428/3426)可以包括

表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0572] Fc-抗原结合结构域构建体34的抗原结合结构域(图34中的3422/3420和3416/3414中的每一者)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0573] Fc-抗原结合结构域构建体35的抗原结合结构域(图35中的3530/3528和3520/3522中的每一者)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0574] Fc-抗原结合结构域构建体35的抗原结合结构域(图35中的3532/3506)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0575] Fc-抗原结合结构域构建体35的抗原结合结构域(图35中的3518/3516)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0576] Fc-抗原结合结构域构建体36的抗原结合结构域(图36中的3638/3636和3628/3620中的每一者)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0577] Fc-抗原结合结构域构建体36的抗原结合结构域(图36中的3640/3606和3626/3624中的每一者)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0578] Fc-抗原结合结构域构建体37的抗原结合结构域(图37中的3748/3746和3738/3740中的每一者)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0579] Fc-抗原结合结构域构建体37的抗原结合结构域(图37中的3750/3708和3736/3734中的每一者)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0580] Fc-抗原结合结构域构建体37的抗原结合结构域(图37中的3714/3716和3728/3726中的每一者)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0581] Fc-抗原结合结构域构建体38的抗原结合结构域(图38中的3832/3806和3830/3822中的每一者)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0582] Fc-抗原结合结构域构建体38的抗原结合结构域(图38中的3810/3812)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0583] Fc-抗原结合结构域构建体38的抗原结合结构域(图38中的3824/3822)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0584] Fc-抗原结合结构域构建体39的抗原结合结构域(图39中的3938/3936和3924/3926中的每一者)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0585] Fc-抗原结合结构域构建体39的抗原结合结构域(图39中的3940/3906和3922/3920中的每一者)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0586] Fc-抗原结合结构域构建体40的抗原结合结构域(图40中的4048/4046和4034/4036中的每一者)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0587] Fc-抗原结合结构域构建体40的抗原结合结构域(图40中的4050/4008和4032/4030中的每一者)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0588] Fc-抗原结合结构域构建体40的抗原结合结构域(图40中的4012/4014和4026/4024中的每一者)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0589] Fc-抗原结合结构域构建体41的抗原结合结构域(图41中的4140/4106和4138/4136中的每一者)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0590] Fc-抗原结合结构域构建体41的抗原结合结构域(图41中的4112/4114和4130/4128中的每一者)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0591] Fc-抗原结合结构域构建体42的抗原结合结构域(图42中的4250/4208和4248/4246中的每一者)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0592] Fc-抗原结合结构域构建体42的抗原结合结构域(图42中的4218/4220和4236/4234中的每一者)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0593] Fc-抗原结合结构域构建体42的抗原结合结构域(图42中的4212/4214和4242/4240中的每一者)可以包括表1中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0594] 在一些实施方案中,抗原结合结构域(例如,Fab或scFv)包括表2中列出的抗体的V_H和V_L链。在一些实施方案中,Fab包括表2中列出的抗体的V_H和V_L链中包含的CDR。在一些实施方案中,Fab包括表2中列出的抗体的V_H和V_L链中包含的CDR,并且V_H和V_L序列的其余部分与表2中的抗体的V_H和V_L序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0595] 表2

[0596]	靶标	抗体名称

[0597]

AbGn-7抗原	AbGn-7
AMHR2	GM-102
B7-H3	DS-5573a
CA19-9	MVT-5873
CAIX	Anti-CAIX
CD19	XmAb5871
CD33	BI-836858
CD37	BI-836826
CD38	MOR-202
CD47	Anti-CD47
CD70	ARGX-110
CD70	ARGX-110
CD98	IGN-523
CD147	Metuzumab
CD157	MEN-1112
c-Met	ARGX-111
EGFR2	GT-Mab 7.3- GEX
EphA2	DS-8895a
FGFR2	FPA-144
GM2	BIW-8962
HPA-1a	NAITgam
ICAM-1	BI-505
IL-3R α	Talacotuzumab
JL-1	Leukotuximab
κ 骨髓瘤抗原	MDX-1097
KIR32DL2	IPH-4102
LAG-3	GSK-2381781
铜绿假单胞菌 (<i>P. aeruginosa</i>) 血清型O1	AR-104
pGlu- β	PBD-C06
TA-MUC1	GT-MAB 2.5- GEX

[0598] Fc-抗原结合结构域构建体1的抗原结合结构域(图1中的110/104)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的V_H和V_L序列。

[0599] Fc-抗原结合结构域构建体2的抗原结合结构域(图2中的212/204)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的V_H和V_L序列。

[0600] Fc-抗原结合结构域构建体3的抗原结合结构域(图3中的308/316和312/318)可以

包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0601] Fc-抗原结合结构域构建体4的抗原结合结构域(图4中的410/412、416/418和422/424)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0602] Fc-抗原结合结构域构建体5的抗原结合结构域(图5中的510/504、512/514和518/520)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0603] Fc-抗原结合结构域构建体6的抗原结合结构域(图6中的612/604、614/616、620/622和626/628)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0604] Fc-抗原结合结构域构建体7的抗原结合结构域(图7中的712/714和714/716)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0605] Fc-抗原结合结构域构建体8的抗原结合结构域(图8中的812/806和818/822)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0606] Fc-抗原结合结构域构建体9的抗原结合结构域(图9中的908/906、920/922、912/914和926/930)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0607] Fc-抗原结合结构域构建体10的抗原结合结构域(图10中的1006/1004和1018/1020)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0608] Fc-抗原结合结构域构建体11的抗原结合结构域(图11中的1112/1114、1122/1108、1128/1142和1138/1136)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0609] Fc-抗原结合结构域构建体12的抗原结合结构域(图12中的1218/1220、1212/1214、1250/1208、1248/1246、1242/1240和1236/1234)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0610] Fc-抗原结合结构域构建体13的抗原结合结构域(图13中的1310/1304和1314/1322)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0611] Fc-抗原结合结构域构建体14的抗原结合结构域(图14中的1408/1406和1416/1424)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0612] Fc-抗原结合结构域构建体15的抗原结合结构域(图15中的1508/1506、1514/1516、1532/1520和1530/1528)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0613] Fc-抗原结合结构域构建体16的抗原结合结构域(图16中的1616/1604和1618/1630)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0614] Fc-抗原结合结构域构建体17的抗原结合结构域(图17中的1712/1714、1724/1708、1726/1742和1738/1736)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0615] Fc-抗原结合结构域构建体18的抗原结合结构域(图18中的1812/1814、1828/1808、1826/1824、1830/1832、1850/1848和1844/1842)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0616] Fc-抗原结合结构域构建体19的抗原结合结构域(图19中的1914/1904和1920/1922)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0617] Fc-抗原结合结构域构建体20的抗原结合结构域(图20中的2014/2016、2042/2008、2036/2034和2028/2026)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0618] Fc-抗原结合结构域构建体21的抗原结合结构域(图21中的2114/2116、2150/2108、2148/2146、2138/2140、2136/2134和2128/2126)可以包括表2中列出的抗体中的任何

一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0619] Fc-抗原结合结构域构建体22的抗原结合结构域(图22中的2204/2222)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0620] Fc-抗原结合结构域构建体22的抗原结合结构域(图22中的2218/2220和2212/2214中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0621] Fc-抗原结合结构域构建体23的抗原结合结构域(图23中的2330/2304)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0622] Fc-抗原结合结构域构建体23的抗原结合结构域(图23中的2328/2326、2322/2320和2316/2314中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0623] Fc-抗原结合结构域构建体24的抗原结合结构域(图24中的2430/2428和2420/2422中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0624] Fc-抗原结合结构域构建体24的抗原结合结构域(图24中的2432/2406和2418/2416中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0625] Fc-抗原结合结构域构建体25的抗原结合结构域(图25中的2532/2506和2530/2528中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0626] Fc-抗原结合结构域构建体25的抗原结合结构域(图25中的2510/2512和2524/2522中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0627] Fc-抗原结合结构域构建体26的抗原结合结构域(图26中的2648/2646和2634/2636中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0628] Fc-抗原结合结构域构建体26的抗原结合结构域(图26中的2612/2614、2650/2608、2632/2630和2626/2624中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0629] Fc-抗原结合结构域构建体27的抗原结合结构域(图27中的2748/2746和2738/2740中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0630] Fc-抗原结合结构域构建体27的抗原结合结构域(图27中的2714/2716、2750/2708、2736/2734和2728/2726中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0631] Fc-抗原结合结构域构建体28的抗原结合结构域(图27中的2850/2808和2848/2846中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0632] Fc-抗原结合结构域构建体28的抗原结合结构域(图28中的2818/2820、2812/2814、2842/2840和2836/2834中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0633] Fc-抗原结合结构域构建体29的抗原结合结构域(图29中的2918/2904)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0634] Fc-抗原结合结构域构建体29的抗原结合结构域(图29中的2914/2912)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0635] Fc-抗原结合结构域构建体30的抗原结合结构域(图30中的3022/3004和3020/3018中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0636] Fc-抗原结合结构域构建体30的抗原结合结构域(图30中的3014/3012)可以包括

表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0637] Fc-抗原结合结构域构建体31的抗原结合结构域(图31中的3122/3104)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0638] Fc-抗原结合结构域构建体31的抗原结合结构域(图31中的3120/3118)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0639] Fc-抗原结合结构域构建体31的抗原结合结构域(图31中的3114/3112)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0640] Fc-抗原结合结构域构建体32的抗原结合结构域(图32中的3226/3204)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0641] Fc-抗原结合结构域构建体32的抗原结合结构域(图32中的3222/3220和3216/3214中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0642] Fc-抗原结合结构域构建体33的抗原结合结构域(图33中的3330/3304和3328/3326中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0643] Fc-抗原结合结构域构建体33的抗原结合结构域(图33中的3322/3320和3316/3314中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0644] Fc-抗原结合结构域构建体34的抗原结合结构域(图34中的3430/3404)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0645] Fc-抗原结合结构域构建体34的抗原结合结构域(图34中的3428/3426)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0646] Fc-抗原结合结构域构建体34的抗原结合结构域(图34中的3422/3420和3416/3414中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0647] Fc-抗原结合结构域构建体35的抗原结合结构域(图35中的3530/3528和3520/3522中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0648] Fc-抗原结合结构域构建体35的抗原结合结构域(图35中的3532/3506)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0649] Fc-抗原结合结构域构建体35的抗原结合结构域(图35中的3518/3516)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0650] Fc-抗原结合结构域构建体36的抗原结合结构域(图36中的3638/3636和3628/3620中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0651] Fc-抗原结合结构域构建体36的抗原结合结构域(图36中的3640/3606和3626/3624中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0652] Fc-抗原结合结构域构建体37的抗原结合结构域(图37中的3748/3746和3738/3740中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0653] Fc-抗原结合结构域构建体37的抗原结合结构域(图37中的3750/3708和3736/3734中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0654] Fc-抗原结合结构域构建体37的抗原结合结构域(图37中的3714/3716和3728/3726中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0655] Fc-抗原结合结构域构建体38的抗原结合结构域(图38中的3832/3806和3830/3822中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0656] Fc-抗原结合结构域构建体38的抗原结合结构域(图38中的3810/3812)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0657] Fc-抗原结合结构域构建体38的抗原结合结构域(图38中的3824/3822)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0658] Fc-抗原结合结构域构建体39的抗原结合结构域(图39中的3938/3936和3924/3926中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0659] Fc-抗原结合结构域构建体39的抗原结合结构域(图39中的3940/3906和3922/3920中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0660] Fc-抗原结合结构域构建体40的抗原结合结构域(图40中的4048/4046和4034/4036中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0661] Fc-抗原结合结构域构建体40的抗原结合结构域(图40中的4050/4008和4032/4030中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0662] Fc-抗原结合结构域构建体40的抗原结合结构域(图40中的4012/4014和4026/4024中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0663] Fc-抗原结合结构域构建体41的抗原结合结构域(图41中的4140/4106和4138/4136中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0664] Fc-抗原结合结构域构建体41的抗原结合结构域(图41中的4112/4114和4130/4128中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0665] Fc-抗原结合结构域构建体42的抗原结合结构域(图42中的4250/4208和4248/4246中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0666] Fc-抗原结合结构域构建体42的抗原结合结构域(图42中的4218/4220和4236/4234中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0667] Fc-抗原结合结构域构建体42的抗原结合结构域(图42中的4212/4214和4242/4240中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列。

[0668] Fc-抗原结合结构域构建体1的抗原结合结构域(图1中的110/104)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0669] Fc-抗原结合结构域构建体2的抗原结合结构域(图2中的212/204)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0670] Fc-抗原结合结构域构建体3的抗原结合结构域(图3中的308/316和312/318)各自可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0671] Fc-抗原结合结构域构建体4的抗原结合结构域(图4中的410/412、416/418和422/424)各自可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0672] Fc-抗原结合结构域构建体5的抗原结合结构域(图5中的510/504、512/514和518/520)各自可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0673] Fc-抗原结合结构域构建体6的抗原结合结构域(图6中的612/604、614/616、620/622和626/628)各自可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0674] Fc-抗原结合结构域构建体7的抗原结合结构域(图7中的712/714和714/716)各自可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0675] Fc-抗原结合结构域构建体8的抗原结合结构域(图8中的812/806和818/822)各自可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0676] Fc-抗原结合结构域构建体9的抗原结合结构域(图9中的908/906、920/922、912/914和926/930)各自可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0677] Fc-抗原结合结构域构建体10的抗原结合结构域(图10中的1006/1004和1018/1020)各自可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0678] Fc-抗原结合结构域构建体11的抗原结合结构域(图11中的1112/1114、1122/1108、1128/1142和1138/1136)各自可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0679] Fc-抗原结合结构域构建体12的抗原结合结构域(图12中的1218/1220、1212/1214、1250/1208、1248/1246、1242/1240和1236/1234)各自可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0680] Fc-抗原结合结构域构建体13的抗原结合结构域(图13中的1310/1304和1314/1322)各自可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0681] Fc-抗原结合结构域构建体14的抗原结合结构域(图14中的1408/1406和1416/1424)各自可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0682] Fc-抗原结合结构域构建体15的抗原结合结构域(图15中的1508/1506、1514/1516、1532/1520和1530/1528)各自可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0683] Fc-抗原结合结构域构建体16的抗原结合结构域(图16中的1616/1604和1618/1630)各自可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0684] Fc-抗原结合结构域构建体17的抗原结合结构域(图17中的1712/1714、1724/1708、1726/1742和1738/1736)各自可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0685] Fc-抗原结合结构域构建体18的抗原结合结构域(图18中的1812/1814、1828/1808、1826/1824、1830/1832、1850/1848和1844/1842)各自可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0686] Fc-抗原结合结构域构建体19的抗原结合结构域(图19中的1914/1904和1920/1922)各自可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0687] Fc-抗原结合结构域构建体20的抗原结合结构域(图20中的2014/2016、2042/2008、2036/2034和2028/2026)各自可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0688] Fc-抗原结合结构域构建体21的抗原结合结构域(图21中的2114/2116、2150/2108、2148/2146、2138/2140、2136/2134和2128/2126)各自可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0689] Fc-抗原结合结构域构建体22的抗原结合结构域(图22中的2204/2222)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0690] Fc-抗原结合结构域构建体22的抗原结合结构域(图22中的2218/2220和2212/

- 2214中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。
- [0691] Fc-抗原结合结构域构建体23的抗原结合结构域(图23中的2330/2304)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。
- [0692] Fc-抗原结合结构域构建体23的抗原结合结构域(图23中的2328/2326、2322/2320和2316/2314中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。
- [0693] Fc-抗原结合结构域构建体24的抗原结合结构域(图24中的2430/2428和2420/2422中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。
- [0694] Fc-抗原结合结构域构建体24的抗原结合结构域(图24中的2432/2406和2418/2416中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。
- [0695] Fc-抗原结合结构域构建体25的抗原结合结构域(图25中的2532/2506和2530/2528中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。
- [0696] Fc-抗原结合结构域构建体25的抗原结合结构域(图25中的2510/2512和2524/2522中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。
- [0697] Fc-抗原结合结构域构建体26的抗原结合结构域(图26中的2648/2646和2634/2636中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。
- [0698] Fc-抗原结合结构域构建体26的抗原结合结构域(图26中的2612/2614、2650/2608、2632/2630和2626/2624中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。
- [0699] Fc-抗原结合结构域构建体27的抗原结合结构域(图27中的2748/2746和2738/2740中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。
- [0700] Fc-抗原结合结构域构建体27的抗原结合结构域(图27中的2714/2716、2750/2708、2736/2734和2728/2726中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。
- [0701] Fc-抗原结合结构域构建体28的抗原结合结构域(图27中的2850/2808和2848/2846中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。
- [0702] Fc-抗原结合结构域构建体28的抗原结合结构域(图28中的2818/2820、2812/2814、2842/2840和2836/2834中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。
- [0703] Fc-抗原结合结构域构建体29的抗原结合结构域(图29中的2918/2904)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。
- [0704] Fc-抗原结合结构域构建体29的抗原结合结构域(图29中的2914/2912)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。
- [0705] Fc-抗原结合结构域构建体30的抗原结合结构域(图30中的3022/3004和3020/3018中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。
- [0706] Fc-抗原结合结构域构建体30的抗原结合结构域(图30中的3014/3012)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。
- [0707] Fc-抗原结合结构域构建体31的抗原结合结构域(图31中的3122/3104)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0708] Fc-抗原结合结构域构建体31的抗原结合结构域(图31中的3120/3118)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0709] Fc-抗原结合结构域构建体31的抗原结合结构域(图31中的3114/3112)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0710] Fc-抗原结合结构域构建体32的抗原结合结构域(图32中的3226/3204)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0711] Fc-抗原结合结构域构建体32的抗原结合结构域(图32中的3222/3220和3216/3214中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0712] Fc-抗原结合结构域构建体33的抗原结合结构域(图33中的3330/3304和3328/3326中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0713] Fc-抗原结合结构域构建体33的抗原结合结构域(图33中的3322/3320和3316/3314中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0714] Fc-抗原结合结构域构建体34的抗原结合结构域(图34中的3430/3404)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0715] Fc-抗原结合结构域构建体34的抗原结合结构域(图34中的3428/3426)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0716] Fc-抗原结合结构域构建体34的抗原结合结构域(图34中的3422/3420和3416/3414中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0717] Fc-抗原结合结构域构建体35的抗原结合结构域(图35中的3530/3528和3520/3522中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0718] Fc-抗原结合结构域构建体35的抗原结合结构域(图35中的3532/3506)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0719] Fc-抗原结合结构域构建体35的抗原结合结构域(图35中的3518/3516)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0720] Fc-抗原结合结构域构建体36的抗原结合结构域(图36中的3638/3636和3628/3620中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0721] Fc-抗原结合结构域构建体36的抗原结合结构域(图36中的3640/3606和3626/3624中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0722] Fc-抗原结合结构域构建体37的抗原结合结构域(图37中的3748/3746和3738/3740中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0723] Fc-抗原结合结构域构建体37的抗原结合结构域(图37中的3750/3708和3736/3734中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0724] Fc-抗原结合结构域构建体37的抗原结合结构域(图37中的3714/3716和3728/3726中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0725] Fc-抗原结合结构域构建体38的抗原结合结构域(图38中的3832/3806和3830/3822中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0726] Fc-抗原结合结构域构建体38的抗原结合结构域(图38中的3810/3812)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0727] Fc-抗原结合结构域构建体38的抗原结合结构域(图38中的3824/3822)可以包括

表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0728] Fc-抗原结合结构域构建体39的抗原结合结构域(图39中的3938/3936和3924/3926中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0729] Fc-抗原结合结构域构建体39的抗原结合结构域(图39中的3940/3906和3922/3920中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0730] Fc-抗原结合结构域构建体40的抗原结合结构域(图40中的4048/4046和4034/4036中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0731] Fc-抗原结合结构域构建体40的抗原结合结构域(图40中的4050/4008和4032/4030中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0732] Fc-抗原结合结构域构建体40的抗原结合结构域(图40中的4012/4014和4026/4024中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0733] Fc-抗原结合结构域构建体41的抗原结合结构域(图41中的4140/4106和4138/4136中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0734] Fc-抗原结合结构域构建体41的抗原结合结构域(图41中的4112/4114和4130/4128中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0735] Fc-抗原结合结构域构建体42的抗原结合结构域(图42中的4250/4208和4248/4246中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0736] Fc-抗原结合结构域构建体42的抗原结合结构域(图42中的4218/4220和4236/4234中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0737] Fc-抗原结合结构域构建体42的抗原结合结构域(图42中的4212/4214和4242/4240中的每一者)可以包括表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0738] Fc-抗原结合结构域构建体1的抗原结合结构域(图1中的110/104)可以包括 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列,并且 V_H 和 V_L 序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0739] Fc-抗原结合结构域构建体2的抗原结合结构域(图2中的212/204)可以包括 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列,并且 V_H 和 V_L 序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0740] Fc-抗原结合结构域构建体3的抗原结合结构域(图3中的308/316和312/318)各自可以包括 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列,并且 V_H 和 V_L 序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0741] Fc-抗原结合结构域构建体4的抗原结合结构域(图4中的410/412、416/418和422/424)各自可以包括 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列,并且 V_H 和 V_L 序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0742] Fc-抗原结合结构域构建体5的抗原结合结构域(图5中的510/504、512/514和518/520)各自可以包括 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列,并且 V_H 和 V_L 序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0743] Fc-抗原结合结构域构建体6的抗原结合结构域(图6中的612/604、614/616、620/622和626/628)各自可以包括 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列,并且 V_H 和 V_L 序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0744] Fc-抗原结合结构域构建体7的抗原结合结构域(图7中的712/714和714/716)各自可以包括 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列,并且 V_H 和 V_L 序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0745] Fc-抗原结合结构域构建体8的抗原结合结构域(图8中的812/806和818/822)各自可以包括 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列,并且 V_H 和 V_L 序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0746] Fc-抗原结合结构域构建体9的抗原结合结构域(图9中的908/906、920/922、912/914和926/930)各自可以包括 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列,并且 V_H 和 V_L 序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0747] Fc-抗原结合结构域构建体10的抗原结合结构域(图10中的1006/1004和1018/1020)各自可以包括 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列,并且 V_H 和 V_L 序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0748] Fc-抗原结合结构域构建体11的抗原结合结构域(图11中的1112/1114、1122/1108、1128/1142和1138/1136)各自可以包括 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列,并且 V_H 和 V_L 序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0749] Fc-抗原结合结构域构建体12的抗原结合结构域(图12中的1218/1220、1212/1214、1250/1208、1248/1246、1242/1240和1236/1234)各自可以包括 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列,并且 V_H 和 V_L 序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0750] Fc-抗原结合结构域构建体13的抗原结合结构域(图13中的1310/1304和1314/1322)各自可以包括 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列,并且 V_H 和 V_L 序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0751] Fc-抗原结合结构域构建体14的抗原结合结构域(图14中的1408/1406和1416/1424)各自可以包括 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列,并且 V_H 和 V_L 序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0752] Fc-抗原结合结构域构建体15的抗原结合结构域(图15中的1508/1506、1514/1516、1532/1520和1530/1528)各自可以包括 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列,并且 V_H 和 V_L 序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列具有至少95%同一性、至少97%

同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0753] Fc-抗原结合结构域构建体16的抗原结合结构域(图16中的1616/1604和1618/1630)各自可以包括V_H和V_L序列中包含的CDR序列,并且V_H和V_L序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的V_H和V_L序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0754] Fc-抗原结合结构域构建体17的抗原结合结构域(图17中的1712/1714、1724/1708、1726/1742和1738/1736)各自可以包括V_H和V_L序列中包含的CDR序列,并且V_H和V_L序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的V_H和V_L序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0755] Fc-抗原结合结构域构建体18的抗原结合结构域(图18中的1812/1814、1828/1808、1826/1824、1830/1832、1850/1848和1844/1842)各自可以包括V_H和V_L序列中包含的CDR序列,并且V_H和V_L序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的V_H和V_L序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0756] Fc-抗原结合结构域构建体19的抗原结合结构域(图19中的1914/1904和1920/1922)各自可以包括V_H和V_L序列中包含的CDR序列,并且V_H和V_L序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的V_H和V_L序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0757] Fc-抗原结合结构域构建体20的抗原结合结构域(图20中的2014/2016、2042/2008、2036/2034和2028/2026)各自可以包括V_H和V_L序列中包含的CDR序列,并且V_H和V_L序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的V_H和V_L序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0758] Fc-抗原结合结构域构建体21的抗原结合结构域(图21中的2114/2116、2150/2108、2148/2146、2138/2140、2136/2134和2128/2126)各自可以包括V_H和V_L序列中包含的CDR序列,并且V_H和V_L序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的V_H和V_L序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0759] Fc-抗原结合结构域构建体22的抗原结合结构域(图22中的2204/2222)可以包括V_H和V_L序列中包含的CDR序列,并且V_H和V_L序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的V_H和V_L序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0760] Fc-抗原结合结构域构建体22的抗原结合结构域(图22中的2218/2220和2212/2214中的每一者)可以包括V_H和V_L序列中包含的CDR序列,并且V_H和V_L序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的V_H和V_L序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0761] Fc-抗原结合结构域构建体23的抗原结合结构域(图23中的2330/2304)可以包括V_H和V_L序列中包含的CDR序列,并且V_H和V_L序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的V_H和V_L序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0762] Fc-抗原结合结构域构建体23的抗原结合结构域(图23中的2328/2326、2322/2320和2316/2314中的每一者)可以包括V_H和V_L序列中包含的CDR序列,并且V_H和V_L序列的其余部

分与表2中列出的抗体中的任何一种的V_H和V_L序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0763] Fc-抗原结合结构域构建体24的抗原结合结构域(图24中的2430/2428和2420/2422中的每一者)可以包括V_H和V_L序列中包含的CDR序列,并且V_H和V_L序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的V_H和V_L序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0764] Fc-抗原结合结构域构建体24的抗原结合结构域(图24中的2432/2406和2418/2416中的每一者)可以包括V_H和V_L序列中包含的CDR序列,并且V_H和V_L序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的V_H和V_L序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0765] Fc-抗原结合结构域构建体25的抗原结合结构域(图25中的2532/2506和2530/2528中的每一者)可以包括V_H和V_L序列中包含的CDR序列,并且V_H和V_L序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的V_H和V_L序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0766] Fc-抗原结合结构域构建体25的抗原结合结构域(图25中的2510/2512和2524/2522中的每一者)可以包括V_H和V_L序列中包含的CDR序列,并且V_H和V_L序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的V_H和V_L序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0767] Fc-抗原结合结构域构建体26的抗原结合结构域(图26中的2648/2646和2634/2636中的每一者)可以包括V_H和V_L序列中包含的CDR序列,并且V_H和V_L序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的V_H和V_L序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0768] Fc-抗原结合结构域构建体26的抗原结合结构域(图26中的2612/2614、2650/2608、2632/2630和2626/2624中的每一者)可以包括V_H和V_L序列中包含的CDR序列,并且V_H和V_L序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的V_H和V_L序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0769] Fc-抗原结合结构域构建体27的抗原结合结构域(图27中的2748/2746和2738/2740中的每一者)可以包括V_H和V_L序列中包含的CDR序列,并且V_H和V_L序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的V_H和V_L序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0770] Fc-抗原结合结构域构建体27的抗原结合结构域(图27中的2714/2716、2750/2708、2736/2734和2728/2726中的每一者)可以包括V_H和V_L序列中包含的CDR序列,并且V_H和V_L序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的V_H和V_L序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0771] Fc-抗原结合结构域构建体28的抗原结合结构域(图27中的2850/2808和2848/2846中的每一者)可以包括V_H和V_L序列中包含的CDR序列,并且V_H和V_L序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的V_H和V_L序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0772] Fc-抗原结合结构域构建体28的抗原结合结构域(图28中的2818/2820、2812/

2814、2842/2840和2836/2834中的每一者)可以包括 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列,并且 V_H 和 V_L 序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0773] Fc-抗原结合结构域构建体29的抗原结合结构域(图29中的2918/2904)可以包括 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列,并且 V_H 和 V_L 序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0774] Fc-抗原结合结构域构建体29的抗原结合结构域(图29中的2914/2912)可以包括 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列,并且 V_H 和 V_L 序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0775] Fc-抗原结合结构域构建体30的抗原结合结构域(图30中的3022/3004和3020/3018中的每一者)可以包括 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列,并且 V_H 和 V_L 序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0776] Fc-抗原结合结构域构建体30的抗原结合结构域(图30中的3014/3012)可以包括 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列,并且 V_H 和 V_L 序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0777] Fc-抗原结合结构域构建体31的抗原结合结构域(图31中的3122/3104)可以包括 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列,并且 V_H 和 V_L 序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0778] Fc-抗原结合结构域构建体31的抗原结合结构域(图31中的3120/3118)可以包括 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列,并且 V_H 和 V_L 序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0779] Fc-抗原结合结构域构建体31的抗原结合结构域(图31中的3114/3112)可以包括 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列,并且 V_H 和 V_L 序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0780] Fc-抗原结合结构域构建体32的抗原结合结构域(图32中的3226/3204)可以包括 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列,并且 V_H 和 V_L 序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0781] Fc-抗原结合结构域构建体32的抗原结合结构域(图32中的3222/3220和3216/3214中的每一者)可以包括 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列,并且 V_H 和 V_L 序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0782] Fc-抗原结合结构域构建体33的抗原结合结构域(图33中的3330/3304和3328/3326中的每一者)可以包括 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列,并且 V_H 和 V_L 序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0783] Fc-抗原结合结构域构建体33的抗原结合结构域(图33中的3322/3320和3316/3314中的每一者)可以包括 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列,并且 V_H 和 V_L 序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0784] Fc-抗原结合结构域构建体34的抗原结合结构域(图34中的3430/3404)可以包括 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列,并且 V_H 和 V_L 序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0785] Fc-抗原结合结构域构建体34的抗原结合结构域(图34中的3428/3426)可以包括 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列,并且 V_H 和 V_L 序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0786] Fc-抗原结合结构域构建体34的抗原结合结构域(图34中的3422/3420和3416/3414中的每一者)可以包括 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列,并且 V_H 和 V_L 序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0787] Fc-抗原结合结构域构建体35的抗原结合结构域(图35中的3530/3528和3520/3522中的每一者)可以包括 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列,并且 V_H 和 V_L 序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0788] Fc-抗原结合结构域构建体35的抗原结合结构域(图35中的3532/3506)可以包括 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列,并且 V_H 和 V_L 序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0789] Fc-抗原结合结构域构建体35的抗原结合结构域(图35中的3518/3516)可以包括 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列,并且 V_H 和 V_L 序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0790] Fc-抗原结合结构域构建体36的抗原结合结构域(图36中的3638/3636和3628/3620中的每一者)可以包括 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列,并且 V_H 和 V_L 序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0791] Fc-抗原结合结构域构建体36的抗原结合结构域(图36中的3640/3606和3626/3624中的每一者)可以包括 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列,并且 V_H 和 V_L 序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%

同一性或至99.5%同一性。

[0792] Fc-抗原结合结构域构建体37的抗原结合结构域(图37中的3748/3746和3738/3740中的每一者)可以包括V_H和V_L序列中包含的CDR序列,并且V_H和V_L序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的V_H和V_L序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0793] Fc-抗原结合结构域构建体37的抗原结合结构域(图37中的3750/3708和3736/3734中的每一者)可以包括V_H和V_L序列中包含的CDR序列,并且V_H和V_L序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的V_H和V_L序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0794] Fc-抗原结合结构域构建体37的抗原结合结构域(图37中的3714/3716和3728/3726中的每一者)可以包括V_H和V_L序列中包含的CDR序列,并且V_H和V_L序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的V_H和V_L序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0795] Fc-抗原结合结构域构建体38的抗原结合结构域(图38中的3832/3806和3830/3822中的每一者)可以包括V_H和V_L序列中包含的CDR序列,并且V_H和V_L序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的V_H和V_L序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0796] Fc-抗原结合结构域构建体38的抗原结合结构域(图38中的3810/3812)可以包括V_H和V_L序列中包含的CDR序列,并且V_H和V_L序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的V_H和V_L序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0797] Fc-抗原结合结构域构建体38的抗原结合结构域(图38中的3824/3822)可以包括V_H和V_L序列中包含的CDR序列,并且V_H和V_L序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的V_H和V_L序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0798] Fc-抗原结合结构域构建体39的抗原结合结构域(图39中的3938/3936和3924/3926中的每一者)可以包括V_H和V_L序列中包含的CDR序列,并且V_H和V_L序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的V_H和V_L序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0799] Fc-抗原结合结构域构建体39的抗原结合结构域(图39中的3940/3906和3922/3920中的每一者)可以包括V_H和V_L序列中包含的CDR序列,并且V_H和V_L序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的V_H和V_L序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0800] Fc-抗原结合结构域构建体40的抗原结合结构域(图40中的4048/4046和4034/4036中的每一者)可以包括V_H和V_L序列中包含的CDR序列,并且V_H和V_L序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的V_H和V_L序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0801] Fc-抗原结合结构域构建体40的抗原结合结构域(图40中的4050/4008和4032/4030中的每一者)可以包括V_H和V_L序列中包含的CDR序列,并且V_H和V_L序列的其余部分与表2

中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0802] Fc-抗原结合结构域构建体40的抗原结合结构域(图40中的4012/4014和4026/4024中的每一者)可以包括 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列,并且 V_H 和 V_L 序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0803] Fc-抗原结合结构域构建体41的抗原结合结构域(图41中的4140/4106和4138/4136中的每一者)可以包括 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列,并且 V_H 和 V_L 序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0804] Fc-抗原结合结构域构建体41的抗原结合结构域(图41中的4112/4114和4130/4128中的每一者)可以包括 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列,并且 V_H 和 V_L 序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0805] Fc-抗原结合结构域构建体42的抗原结合结构域(图42中的4250/4208和4248/4246中的每一者)可以包括 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列,并且 V_H 和 V_L 序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0806] Fc-抗原结合结构域构建体42的抗原结合结构域(图42中的4218/4220和4236/4234中的每一者)可以包括 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列,并且 V_H 和 V_L 序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0807] Fc-抗原结合结构域构建体42的抗原结合结构域(图42中的4212/4214和4242/4240中的每一者)可以包括 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列,并且 V_H 和 V_L 序列的其余部分与表2中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0808] IV. 二聚化选择性模块

[0809] 在本公开中,二聚化选择性模块包括Fc结构域单体内的组分或选择性氨基酸,所述组分或选择性氨基酸促进两个Fc结构域单体的优选配对以形成Fc结构域。具体地,二聚化选择性模块是Fc结构域单体的 C_H3 抗体恒定结构域的部分,该部分包括位于两个Fc结构域单体的相互作用的 C_H3 抗体恒定结构域之间的界面处的氨基酸置换。在二聚化选择性模块中,由于针对氨基酸置换选择的氨基酸的相容性,那些置换使得两个 C_H3 抗体恒定结构域的二聚化变得有利。有利的Fc结构域的最终形成选择性超过其他Fc结构域,所述其他Fc结构域由缺少二聚化选择性模块的Fc结构域单体形成或在二聚化选择性模块中具有不相容的氨基酸置换。这种类型的氨基酸置换可以使用本领域众所周知的常规分子克隆技术(诸如QuikChange®诱变)产生。

[0810] 在一些实施方案中,二聚化选择性模块在 C_H3 抗体恒定结构域中包括工程化空腔(或本文进一步描述的“孔洞”)。在其他实施方案中,二聚化选择性模块在 C_H3 抗体恒定结构域中包括工程化突起(或本文进一步描述的“旋钮”)。为了选择性地形成Fc结构域,具有相

容二聚化选择性模块的两个Fc结构域单体(例如,含有工程化空腔的一个 C_H3 抗体恒定结构域和含有工程化突起的另一个 C_H3 抗体恒定结构域)组合以形成Fc结构域单体的突起-进入-空腔(或“旋钮和孔洞”)对。工程化突起和工程化空腔是异二聚化选择性模块的实例,它们可以在Fc结构域单体的 C_H3 抗体恒定结构域中产生,以便促进具有相容异二聚化选择性模块的两个Fc结构域单体的有利异二聚化。表3列出了合适的突变。

[0811] 在其他实施方案中,通过使用具有包含带正电荷的氨基酸置换的二聚化选择性模块的Fc结构域单体和具有包含带负电荷的氨基酸置换的二聚化选择性模块的Fc结构域单体而实现的异二聚化可通过带电氨基酸的有利静电转向(本文进一步描述)选择性地组合以形成Fc结构域。在一些实施方案中,Fc结构域单体可以包括下述带正电荷和带负电荷的氨基酸置换之一:K392D、K392E、D399K、K409D、K409E、K439D和K439E。在一个实例中,包含带正电荷的氨基酸置换(例如,D356K或E357K)的Fc结构域单体和包含带负电荷的氨基酸置换(例如,K370D或K370E)的Fc结构域单体可通过带电氨基酸的有利静电转向选择性地组合以形成Fc结构域。在另一个实例中,包含E357K的Fc结构域单体和包含K370D的Fc结构域单体可通过带电氨基酸的有利静电转向选择性地组合以形成Fc结构域。在一些实施方案中,可将反向电荷氨基酸置换用作异二聚化选择性模块,其中包含不同但相容的反向电荷氨基酸置换的两个Fc结构域单体组合以形成异二聚体Fc结构域。表3列出了用于促进异二聚化的各种带相反电荷的二聚化选择性模块。

[0812] 除了旋钮和孔洞突变以及静电转向突变之外,还存在可以用于促进异二聚化的其他类型的突变。这些突变也在表3中列出。

[0813] 在其他实施方案中,两个Fc结构域单体包括在 C_H3 结构域之间的界面处的带电残基环内至少两个位置中包含相同的反向电荷突变的同二聚化选择性模块。同二聚体选择性模块是促进Fc结构域单体的同二聚化以形成同二聚体Fc结构域的反向电荷氨基酸置换。通过逆转两个Fc结构域单体中的两个或更多个互补残基对的两个成员的电荷,突变的Fc结构域单体保持与相同突变序列的Fc结构域单体互补,但与不含那些突变的Fc结构域单体具有更低的互补性。在一个实施方案中,Fc结构域包括Fc结构域单体,其包括双重突变体K409D/D399K、K392D/D399K、E357K/K370E、D356K/K439D、K409E/D399K、K392E/D399K、E357K/K370D或D356K/K439E。在另一个实施方案中,Fc结构域包括Fc结构域单体,其包括组合任何一对双重突变体的四重突变体,例如K409D/D399K/E357K/K370E。表4A和表4B列出了促进同二聚化的各种选择性。

[0814] 在其他实施方案中,含有(i)至少一个反向电荷突变和(ii)至少一个工程化空腔或至少一个工程化突起的Fc结构域单体可与另一个含有(i)至少一个反向电荷突变和(ii)至少一个工程化突起或至少一个工程化空腔的Fc结构域单体选择性地组合以形成Fc结构域。例如,含有反向电荷突变K370D和工程化空腔Y349C、T366S、L368A和Y407V的Fc结构域单体以及另一个含有反向电荷突变E357K和工程化突起S354C和T366W的Fc结构域单体可选择性地组合以形成Fc结构域。

[0815] 此类Fc结构域的形成通过 C_H3 抗体恒定结构域中的相容氨基酸置换来促进。含有不相容氨基酸置换的两个二聚化选择性模块(例如,两者均含有工程化空腔,两者均含有工程化突起,或两者均在 C_H3 - C_H3 界面处含有相同的带电氨基酸)不会促进异二聚体Fc结构域的形成。

[0816] 此外,用于促进具有明确的Fc结构域单体的Fc结构域的形成其他方法包括但不限于:LUZ-Y方法(美国专利申请公开号W02011034605),该方法包括使亮氨酸拉链的单体 α -螺旋与每个Fc结构域单体进行C末端融合,以允许异二聚体形成;以及链交换工程化结构域(SEED)主体方法(Davis等人,Protein Eng Des Sel.23:195-202,2010),该方法生成具有异二聚体Fc结构域单体的Fc结构域,这些异二聚体Fc结构域单体各自包括IgA和IgG C_H3序列的交替区段。

[0817] V. 工程化空腔和工程化突起

[0818] Carter和同事(Ridgway等人,Protein Eng.9:617-612,1996;Atwell等人,J Mol Biol.270:26-35,1997;Merchant等人,Nat Biotechnol.16:677-681,1998)描述了工程化空腔和工程化突起(或“旋钮-进入-孔洞”策略)的用途。旋钮和孔洞相互作用有利于异二聚体形成,而旋钮-旋钮和孔洞-孔洞相互作用由于空间冲突和有利相互作用的缺失会阻碍同二聚体形成。“旋钮-进入-孔洞”技术也在美国专利号5,731,168中公开。

[0819] 在本公开中,工程化空腔和工程化突起用于制备本文所述的Fc-抗原结合结构域构建体。工程化空腔是当用具有较小侧链体积的不同氨基酸替换蛋白质中的原始氨基酸时产生的空隙。工程化突起是当用具有较大侧链体积的不同氨基酸替换蛋白质中的原始氨基酸时产生的突起。具体地,被替换的氨基酸位于Fc结构域单体的C_H3抗体恒定结构域中,并且涉及两个Fc结构域单体的二聚化。在一些实施方案中,产生一个C_H3抗体恒定结构域中的工程化空腔,以容纳另一个C_H3抗体恒定结构域中的工程化突起,使得两个C_H3抗体恒定结构域均充当促进或有利于两个Fc结构域单体的二聚化的二聚化选择性模块(例如,异二聚化选择性模块)(上文描述)。在其他实施方案中,产生一个C_H3抗体恒定结构域中的工程化空腔,以更好地容纳另一个C_H3抗体恒定结构域中的原始氨基酸。在另外其他实施方案中,产生一个C_H3抗体恒定结构域中的工程化突起,以与另一个C_H3抗体恒定结构域中的原始氨基酸形成另外的相互作用。

[0820] 可以通过用含有较小侧链的氨基酸(诸如丙氨酸、缬氨酸或苏氨酸)替换含有较大侧链(诸如酪氨酸或色氨酸)的氨基酸来构建工程化空腔。具体地,一些二聚化选择性模块(例如,异二聚化选择性模块)(上文进一步描述)含有工程化空腔,诸如C_H3抗体恒定结构域中的Y407V突变。类似地,可以通过用含有较大侧链的氨基酸替换含有较小侧链的氨基酸来构建工程化突起。具体地,一些二聚化选择性模块(例如,异二聚化选择性模块)(上文进一步描述)含有工程化突起,诸如C_H3抗体恒定结构域中的T366W突变。在本公开中,还将工程化空腔和工程化突起与C_H3结构域间二硫键工程化组合,以增强异二聚体形成。在一个实例中,含有工程化空腔Y349C、T366S、L368A和Y407V的Fc结构域单体可与含有工程化突起S354C和T366W的另一个Fc结构域单体选择性地组合以形成Fc结构域。在另一个实例中,含有添加有Y349C的工程化空腔的Fc结构域单体和含有添加有S354C的工程化突起的Fc结构域单体可选择性地组合以形成Fc结构域。与二硫键工程化或结构计算(混合HA-TF)组合的其他工程化空腔和工程化突起包括在表3中,但不限于此。

[0821] 用不同的氨基酸残基替换C_H3抗体恒定结构域中的原始氨基酸残基可以通过改变编码原始氨基酸残基的核酸来实现。可以被替换的原始氨基酸残基的数量上限是C_H3抗体恒定结构域的界面中的残基总数,只要仍维持界面处充分的相互作用。

[0822] 将工程化空腔和工程化突起与静电转向组合

[0823] 可以将静电转向与旋钮-进入-孔洞调节技术组合,以有利于例如两个不同多肽中的Fc结构域单体之间的异二聚化作用。下文更详细描述静电转向利用肽、蛋白质结构域和蛋白质中带相反电荷的氨基酸之间的有利静电相互作用来控制更高级蛋白质分子的形成。可以使用静电转向来促进同二聚化或异二聚化,可以将后者有效地与旋钮-进入-孔洞技术组合。在异二聚化的情况下,将不同但相容的突变引入要异二聚化的每个Fc结构域单体中。因此,可以修饰Fc结构域单体以包括以下带正电荷和带负电荷的氨基酸置换中的一者:D356K、D356R、E357K、E357R、K370D、K370E、K392D、K392E、D399K、K409D、K409E、K439D和K439E。例如,一个Fc结构域单体(例如,具有空腔(Y349C、T366S、L368A和Y407V)的Fc结构域单体)还可以包括K370D突变,并且另一个Fc结构域单体(例如,具有突起(S354C和T366W)的Fc结构域单体)可以包括E357K。

[0824] 更一般地,可以将以下任何空腔突变(或突变组合)与表3中的静电转向突变组合:Y407T、Y407A、F405A、Y407T、T394S、T394W:Y407A、T366W:T394S、T366S:L368A:Y407V:Y349C和S3364H:F405,并且可以将以下任何突起突变(或突变组合)可以将T366Y、T366W、T394W、F405W、T366Y:F405A、T366W:Y407A、T366W:S354C和Y349T:T394F可以与表中的静电转向突变组合使用,该静电转向突变与表3中与空腔突变(或突变组合)组合使用的静电转向突变配对。

[0825] 更一般地,可以将以下任何空腔突变(或突变组合)与表3中的静电转向突变组合:Y407T、Y407A、F405A、Y407T、T394S、T394W:Y407A、T366W:T394S、T366S:L368A:Y407V:Y349C和S3364H:F405,并且可以将以下任何突起突变(或突变组合)与表3中的静电转向突变组合:T366Y、T366W、T394W、F405W、T366Y:F405A、T366W:Y407A、T366W:S354C和Y349T:T394F。

[0826] VI. 静电转向

[0827] 静电转向是利用肽、蛋白质结构域和蛋白质中带相反电荷的氨基酸之间的有利静电相互作用来控制更高级蛋白质分子的形成。在美国专利申请公开号2014-0024111中公开了使用静电转向效应来改变抗体结构域的相互作用以减少同二聚体形成的方法,有利于在双特异性抗体的生成中的异二聚体形成。

[0828] 在本公开中,使用静电转向来控制Fc结构域单体的二聚化和Fc-抗原结合结构域构建体的形成。具体地,为了使用静电转向来控制Fc结构域单体的二聚化,用带正电荷或带负电的氨基酸残基替换构成 C_H3 - C_H3 界面的一个或多个氨基酸残基,使得相互作用取决于引入的具体带电氨基酸而变得具有静电有利或不利。在一些实施方案中,用带负电荷的氨基酸(诸如天冬氨酸或谷氨酸)替换界面中带正电荷的氨基酸(诸如赖氨酸、精氨酸或组氨酸)。在其他实施方案中,用带正电荷的氨基酸替换界面中带负电荷的氨基酸。可将带电氨基酸引入相互作用的 C_H3 抗体恒定结构域中的一者或两者。通过将带电氨基酸引入相互作用的 C_H3 抗体恒定结构域,产生二聚化选择性模块(上文进一步描述),这些二聚化选择性模块可以选择性地形成Fc结构域单体的二聚体,如由来源于带电氨基酸之间的相互作用的静电转向效应控制。

[0829] 在一些实施方案中,为了产生包括反向电荷的二聚化选择性模块(该二聚化选择性模块可以选择性地形成Fc结构域单体的二聚体,如由静电转向效应控制),可通过异二聚化或同二聚化选择性地形成两个Fc结构域单体。

[0830] Fc结构域单体的异二聚化

[0831] 可以通过在两个Fc结构域单体中引入不同但相容的突变(诸如表3中包括的电荷残基对,但不限于此)来促进Fc结构域单体的异二聚化。在一些实施方案中,Fc结构域单体可以包括下述带正电荷和带负电荷的氨基酸置换之一:D356K、D356R、E357K、E357R、K370D、K370E、K392D、K392E、D399K、K409D、K409E、K439D和K439E。在一个实例中,包含带正电荷的氨基酸置换(例如,D356K或E357K)的Fc结构域单体和包含带负电荷的氨基酸置换(例如,K370D或K370E)的Fc结构域单体可通过带电氨基酸的有利静电转向选择性地组合以形成Fc结构域。在另一个实例中,包含E357K的Fc结构域单体和包含K370D的Fc结构域单体可通过带电氨基酸的有利静电转向选择性地组合以形成Fc结构域。

[0832] 例如,在具有三个Fc结构域的Fc-抗原结合结构域构建体中,三个Fc结构域中的两个可通过两个Fc结构域单体的异二聚化形成,如通过静电转向效应促进。“异二聚体Fc结构域”是指通过两个Fc结构域单体的异二聚化形成的Fc结构域,其中两个Fc结构域单体含有促进这两个Fc结构域单体的有利形成的不同反向电荷突变(异二聚化选择性模块)(参见例如,表4A和表4B中的突变)。在具有三个Fc结构域(一个羧基末端“茎”Fc结构域和两个氨基末端“分支”Fc结构域)的Fc-抗原结合结构域构建体中,每个氨基末端“分支”Fc结构域可以是异二聚体Fc结构域(也称为“分支异二聚体Fc结构域”)(例如,由图1中的Fc结构域单体106和114或Fc结构域单体112和116形成的异二聚体Fc结构域;由图2中的Fc结构域单体206和214或Fc结构域单体212和216形成的异二聚体Fc结构域)。分支异二聚体Fc结构域可以由含有E357K的Fc结构域单体和另一个含有K370D的Fc结构域单体形成。

[0833] 表3.Fc异二聚化方法

方法	突变(链A)	突变(链B)	参考文献
旋钮-进入-孔洞(Y-T)	Y407T	T336Y	美国专利号 8,216,805
旋钮-进入-孔洞	Y407A	T336W	美国专利号 8,216,805
旋钮-进入-孔洞	F405A	T394W	美国专利号 8,216,805
[0834] 旋钮-进入-孔洞	Y407T	T366Y	美国专利号 8,216,805
旋钮-进入-孔洞	T394S	F405W	美国专利号 8,216,805
旋钮-进入-孔洞	T394W, Y407T	T366Y, F406A	美国专利号 8,216,805
旋钮-进入-孔洞	T394S, Y407A	T366W, F405W	美国专利号 8,216,805
旋钮-进入-孔洞	T366W, T394S	F405W, T407A	美国专利号 8,216,805

[0835] 表3.Fc异二聚化方法

[0836]

方法	突变 (链 A)	突变 (链 B)	参考文献
旋钮-进入-孔洞	S354C, T366W	Y349C, T366S, L368A, Y407V	
旋钮-进入-孔洞 (CW-CSAV)	Y349C, T366S, L368A, Y407V	S354C, T366W	Zeidler 等人, <i>J Immunol.</i> 163: 1246-52, 1999
HA-TF	S364H, F405A	Y349T, T394F	WO2011028952
静电转向	K409D	D399K	US 2014/0024111
静电转向	K409D	D399R	US 2014/0024111
静电转向	K409E	D399K	US 2014/0024111
静电转向	K409E	D399R	US 2014/0024111
静电转向	K392D	D399K	US 2014/0024111
静电转向	K392D	D399R	US 2014/0024111
静电转向	K392E	D399K	US 2014/0024111
静电转向	K392E	D399R	US 2014/0024111
静电转向 (DD-KK)	K392D, K409D	E356K, D399K	Gunasekaran 等人, <i>J Biol Chem.</i> 285: 19637-46, 2010
静电转向	K370E, K409D, K439E	E356K, E357K, D399K	WO 2006/106905
旋钮-进入-孔洞加静电转向	S354C, E357K, T366W	Y349C, T366S, L368A, K370D, Y407V	WO 2015/168643
VYAV-VLLW	T350V, L351Y, F405A, Y407V	T350V, T366L, K392L, T394W	Von Kreudenstein 等人, <i>MAbs</i> , 5:646-54, 2013
EEE-RRR	D221E, P228E, L368E	D221R, P228R, K409R	Strop 等人, <i>J Mol Biol</i> ,

[0837] 表3.Fc异二聚化方法

[0838]

方法	突变 (链 A)	突变 (链 B)	参考文献
			420:204-19, 2012
EW-RVT	K360E, K409W	Q347R, D399V, F405T	Choi 等人, Mol Cancer Ther, 12:2748-59, 2013
EW-RVT _{s-s}	K360E, K409W, Y349C	Q347R, D399V, F405T, S354C	Choi 等人, Mol Immunol, 65:377-83, 2015
电荷引入 (DK)	L351D	T366K	De Nardis, J Biol Chem, 292:14706-17, 2017
电荷引入 (DEKK)	L351D, L368E	L351K, T366K	De Nardis, J Biol Chem, 292:14706-17, 2017
L-R	F405L	K409R	Labrijn 等人, Proc Natl Acad Sci USA, 110:5145-50, 2013
	IgG/A 嵌合体	IgG/A 嵌合体	Davis 等人, Protein Eng Des Sel, 23:195-202, 2010
	S364K, T366V, K370T, K392Y, F405S, Y407V, K409W, T411N	Q347E, Y349A, L351F, S364T, T366V, K370T, T394D, V397L, D399E, F405A, Y407S, K409R, T411R	Skegro 等人, J Biol Chem, 292:9745-59, 2017
	S364K, T366V, K370T, K392Y, K409W, T411N	F405A, Y407S	Skegro 等人, J Biol Chem, 292:9745-59, 2017
	Q347A, S364K, T366V, K370T,	Q347E, Y349A, L351F, S364T,	Skegro 等人, J Biol Chem,

[0839] 表3.Fc异二聚化方法

[0840]

方法	突变 (链 A)	突变 (链 B)	参考文献
	K392Y, F405S, Y407V, K409W, T411N	T366V, K370T, T394D, V397L, D399E, F405A, Y407S, K409R, T411R	292:9745-59, 2017
BEAT (A/B - T)	S364K, T366V, K370T, K392Y, F405S, Y407V, K409W, T411N	Q347E, Y349A, L351F, S364T, T366V, K370T, T394D, V397L, D399E, F405A, Y407S, K409R	Skegro 等人, J Biol Chem, 292:9745-59, 2017
DMA-RRVV	K360D, D399M, Y407A	E345R, Q347R, T366V, K409V	Leaver-Fay 等人, Structure, 24:641-51, 2016
SYMV-GDQA	Y349S, K370Y, T366M, K409V	E356G, E357D, S364Q, Y407A	Leaver-Fay 等人, Structure, 24:641-51, 2016
静电转向	K370D	E357K	
静电转向	K370D	E357R	
静电转向	K370E	E357K	
静电转向	K370E	E357R	
静电转向	K370D	D356K	
静电转向	K370D	D356R	
静电转向	K370E	D356K	
静电转向	K370E	D356R	

[0841] 注意:所有残基均按EU编号方案 (Edelman等人, Proc Natl Acad Sci USA, 63:78-85, 1969) 进行编号

[0842] Fc结构域单体的同二聚化

[0843] 可以通过以对称方式在两个Fc结构域单体中引入相同的静电转向突变(同二聚化选择性模块)来促进Fc结构域单体的同二聚化。在一些实施方案中,两个Fc结构域单体包括在 C_H3 结构域之间的界面处的带电残基环内至少两个位置中包含相同的反向电荷突变的同二聚化选择性模块。通过逆转两个Fc结构域单体中的两个或更多个互补残基对的两个成员的电荷,突变的Fc结构域单体保持与相同突变序列的Fc结构域单体互补,但与不含那些突变的Fc结构域单体具有更低的互补性。可被引入Fc结构域单体中以促进其同二聚化的静电转向突变在表4A和表4B中示出,但不限于此。在一个实施方案中,Fc结构域包括两个Fc结构域单体,每个单体包括双重反向电荷突变体(表4A和表4B),例如K409D/D399K。在另一个实施方案中,Fc结构域包括两个Fc结构域单体,每个Fc结构域单体包括四重反向突变体(表4A和表4B),例如K409D/D399K/K370D/E357K。

[0844] 例如,在具有三个Fc结构域的Fc-抗原结合结构域构建体中,三个Fc结构域中的一

个可通过两个Fc结构域单体的同二聚化形成,如通过静电转向效应促进。“同二聚体Fc结构域”是指通过两个Fc结构域单体的同二聚化形成的Fc结构域,其中两个Fc结构域单体含有相同的反向电荷突变(参见例如,表5和表6中的突变)。在具有三个Fc结构域(一个羧基末端“茎”Fc结构域和两个氨基末端“分支”Fc结构域)的Fc-抗原结合结构域构建体中,羧基末端“茎”Fc结构域可以是同二聚体Fc结构域(也称为“茎同二聚体Fc结构域”)。茎同二聚体Fc结构域可由两个Fc结构域单体形成,每个Fc结构域单体含有双重突变体K409D/D399K。

[0845] 表4A.Fc同二聚化方法—每条链中两个突变

方法	突变 (链 A 和 B)	参考文献
野生型	无	美国专利 号 8,216,805
静电转向 (KD)	D399K/K409D	Gunasekaran 等 人 , J Biol Chem. 285: 19637-46, 2010, WO 2015/168643
静电转向	D399K/K409E	Gunasekaran 等 人 , J Biol Chem. 285: 19637-46, 2010, WO 2015/168643
静电转向	E357K/K370D	Gunasekaran 等 人 , J Biol Chem. 285: 19637-46, 2010, WO 2015/168643
静电转向	E357K/K370E	Gunasekaran 等 人 , J Biol Chem. 285: 19637-46, 2010, WO 2015/168643
静电转向	D356K/K439D	Gunasekaran 等 人 , J Biol Chem. 285: 19637-

[0847] 表4A.Fc同二聚化方法—每条链中两个突变

[0848]

方法	突变 (链 A 和 B)	参考文献
		46, 2010, WO 2015/168643
静电转向	D356K/K439E	Gunasekaran 等人, J Biol Chem. 285: 19637-46, 2010, WO 2015/168643
静电转向	K392D/D399K	Gunasekaran 等人, J Biol Chem. 285: 19637-46, 2010, WO 2015/168643
静电转向	K392E/D399K	Gunasekaran 等人, J Biol Chem. 285: 19637-46, 2010, WO 2015/168643
静电转向	K409D/D399R	
静电转向	K409E/D399R	
静电转向	K392D/D399R	

[0849] 表4B.Fc同二聚化方法—每条链中四个突变

[0850]

同二聚体 Fc 结构域中两个 Fc 结构域单体中的每一者的 C _H 3 抗体恒定结构域中的反向电荷突变	同二聚体 Fc 结构域中两个 Fc 结构域单体中的每一者的 C _H 3 抗体恒定结构域中的反向电荷突变
K409D/D399K/K370D/E357K	K392D/D399K/K370D/E357K
K409D/D399K/K370D/E357R	K392D/D399K/K370D/E357R
K409D/D399K/K370E/E357K	K392D/D399K/K370E/E357K
K409D/D399K/K370E/E357R	K392D/D399K/K370E/E357R
K409D/D399K/K370D/D356K	K392D/D399K/K370D/D356K
K409D/D399K/K370D/D356R	K392D/D399K/K370D/D356R
K409D/D399K/K370E/D356K	K392D/D399K/K370E/D356K
K409D/D399K/K370E/D356R	K392D/D399K/K370E/D356R

[0851]	同二聚体 Fc 结构域中两个 Fc 结构域单体中的每一者的 C _H 3 抗体恒定结构域中的反向电荷突变	同二聚体 Fc 结构域中两个 Fc 结构域单体中的每一者的 C _H 3 抗体恒定结构域中的反向电荷突变
	K409D/D399R/K370D/E357K	K392D/D399R/K370D/E357K
	K409D/D399R/K370D/E357R	K392D/D399R/K370D/E357R
	K409D/D399R/K370E/E357K	K392D/D399R/K370E/E357K
	K409D/D399R/K370E/E357R	K392D/D399R/K370E/E357R
	K409D/D399R/K370D/D356K	K392D/D399R/K370D/D356K
	K409D/D399R/K370D/D356R	K392D/D399R/K370D/D356R
	K409D/D399R/K370E/D356K	K392D/D399R/K370E/D356K
	K409D/D399R/K370E/D356R	K392D/D399R/K370E/D356R
	K409E/D399K/K370D/E357K	K392E/D399K/K370D/E357K
	K409E/D399K/K370D/E357R	K392E/D399K/K370D/E357R
	K409E/D399K/K370E/E357K	K392E/D399K/K370E/E357K
	K409E/D399K/K370E/E357R	K392E/D399K/K370E/E357R
	K409E/D399K/K370D/D356K	K392E/D399K/K370D/D356K
	K409E/D399K/K370D/D356R	K392E/D399K/K370D/D356R
	K409E/D399K/K370E/D356K	K392E/D399K/K370E/D356K
	K409E/D399K/K370E/D356R	K392E/D399K/K370E/D356R
	K409E/D399R/K370D/E357K	K392E/D399R/K370D/E357K
	K409E/D399R/K370D/E357R	K392E/D399R/K370D/E357R
	K409E/D399R/K370E/E357K	K392E/D399R/K370E/E357K
	K409E/D399R/K370E/E357R	K392E/D399R/K370E/E357R
	K409E/D399R/K370D/D356K	K392E/D399R/K370D/D356K
	K409E/D399R/K370D/D356R	K392E/D399R/K370D/D356R
	K409E/D399R/K370E/D356K	K392E/D399R/K370E/D356K
	K409E/D399R/K370E/D356R	K392E/D399R/K370E/D356R

[0852] VII. 接头

[0853] 在本公开中,接头用于描述多肽或蛋白质结构域和/或结合的非蛋白质部分之间的键合或连接。在一些实施方案中,接头是至少两个Fc结构域单体之间的键合或连接,接头将第一Fc结构域单体的C_H3抗体恒定结构域的C末端与第二Fc结构域单体的铰链结构域的N末端连接,使得两个Fc结构域单体彼此串联连接。在其他实施方案中,接头是Fc结构域单体与附接到其上的任何其他蛋白质结构域之间的键合。例如,接头可以将Fc结构域单体的C_H3抗体恒定结构域的C末端附接到白蛋白结合肽的N末端。

[0854] 接头可以是简单的共价键(例如,肽键)、合成聚合物(例如,聚乙二醇(PEG)聚合

物)或由化学反应(例如,化学缀合)产生的任何种类的键。在接头是肽键的情况下,在一个蛋白质结构域的C末端处的羧酸基团可以在缩合反应中与另一个蛋白质结构域的N末端的氨基反应,以形成肽键。具体地,肽键可以通过本领域众所周知的常规有机化学反应由合成手段形成,或通过天然产生由宿主细胞形成,其中编码以串联系列的两种蛋白质的DNA序列的多核苷酸序列,例如两个Fc结构域的单体,可以通过宿主细胞中的必需分子机器,例如DNA聚合酶和核糖体,直接转录且翻译成编码两种蛋白质的连续多肽。

[0855] 在接头是合成聚合物例如PEG聚合物的情况下,聚合物可以在每个末端处用反应性化学官能团官能化,以与在两个蛋白质的连接末端处的末端氨基酸反应。

[0856] 在接头(除了上述肽键之外)由化学反应制成的情况下,可以分别将化学官能团(例如,胺、羧酸、酯、叠氮化物或本领域常用的其他官能团)合成地附接到一种蛋白质的C末端和另一种蛋白质的N末端。然后两个官能团可以通过合成化学手段反应,以形成化学键,因此将两种蛋白质连接在一起。此类化学缀合程序对于本领域技术人员是常规的。

[0857] 间隔物

[0858] 在本公开中,两个Fc结构域单体之间的接头可以是包括3-200个氨基酸的氨基酸间隔物(例如,3-200、3-180、3-160、3-140、3-120、3-100、3-90、3-80、3-70、3-60、3-50、3-45、3-40、3-35、3-30、3-25、3-20、3-15、3-10、3-9、3-8、3-7、3-6、3-5、3-4、4-200、5-200、6-200、7-200、8-200、9-200、10-200、15-200、20-200、25-200、30-200、35-200、40-200、45-200、50-200、60-200、70-200、80-200、90-200、100-200、120-200、140-200、160-200或180-200个氨基酸)。在一些实施方案中,两个Fc结构域单体之间的接头是含有至少12个氨基酸(诸如12-200个氨基酸(例如,12-200、12-180、12-160、12-140、12-120、12-100、12-90、12-80、12-70、12-60、12-50、12-40、12-30、12-20、12-19、12-18、12-17、12-16、12-15、12-14或12-13个氨基酸)(例如,14-200、16-200、18-200、20-200、30-200、40-200、50-200、60-200、70-200、80-200、90-200、100-200、120-200、140-200、160-200、180-200或190-200个氨基酸))的氨基酸间隔物。在一些实施方案中,两个Fc结构域单体之间的接头是含有12-30个氨基酸(例如,12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个氨基酸)的氨基酸间隔物。合适的肽间隔物是本领域已知的,并且包括例如含有柔性氨基酸残基(诸如甘氨酸和丝氨酸)的肽接头。在某些实施方案中,间隔物可以含有GS、GGS、GGGS (SEQ ID NO:1)、GGSG (SEQ ID NO:2)或SGGG (SEQ ID NO:3)的基序,例如多个或重复基序。在某些实施方案中,间隔物可以含有2至12个氨基酸,包括GS的基序,例如GS、GSGS (SEQ ID NO:4)、GSGSGS (SEQ ID NO:5)、GSGSGSGS (SEQ ID NO:6)、GSGSGSGSGS (SEQ ID NO:7)或GSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO:8)。在某些其他实施方案中,间隔物可以含有3至12个氨基酸,包括GGS的基序,例如GGS、GGS GGS (SEQ ID NO:9)、GGS GGS GGS (SEQ ID NO:10)和GGS GGS GGS GGS (SEQ ID NO:11)。在另外其他实施方案中,间隔物可以含有4至20个氨基酸,包括GGSG (SEQ ID NO:2)的基序,例如GGS GGS GGS (SEQ ID NO:12)、GGS GGS GGS GGS (SEQ ID NO:13)、GGS GGS GGS GGS GGS (SEQ ID NO:14)或GGS GGS GGS GGS GGS GGS (SEQ ID NO:15)。在其他实施方案中,间隔物可以含有GGGS (SEQ ID NO:1)的基序,例如GGGS GGS (SEQ ID NO:16)或GGGS GGS GGS GGS (SEQ ID NO:17)。在某些实施方案中,间隔物是SGGS GGS GGS GGS GGS (SEQ ID NO:18)。

[0859] 在一些实施方案中,两个Fc结构域单体之间的间隔物仅含有甘氨酸残基,例如至

少4个甘氨酸残基(例如,4-200、4-180、4-160、4-140、4-40、4-100、4-90、4-80、4-70、4-60、4-50、4-40、4-30、4-20、4-19、4-18、4-17、4-16、4-15、4-14、4-13、4-12、4-11、4-10、4-9、4-8、4-7、4-6或4-5个甘氨酸残基)(例如,4-200、6-200、8-200、10-200、12-200、14-200、16-200、18-200、20-200、30-200、40-200、50-200、60-200、70-200、80-200、90-200、100-200、120-200、140-200、160-200、180-200或190-200个甘氨酸残基)。在某些实施方案中,间隔物具有4-30个甘氨酸残基(例如,4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个甘氨酸残基)。在一些实施方案中,仅含有甘氨酸残基的间隔物可不被糖基化(例如,0-连接糖基化,也称为0-糖基化),或与例如含有一个或多个丝氨酸残基的间隔物(例如,SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG(SEQ ID NO:18))相比,可具有降低水平的糖基化(例如,降低水平的0-糖基化)(例如,降低水平的用聚糖(诸如木糖、甘露糖、唾液酸、岩藻糖(Fuc)和/或半乳糖(Gal)(例如,木糖))进行的0-糖基化)。

[0860] 在一些实施方案中,仅含有甘氨酸残基的间隔物可不被O-糖基化(例如,0-木糖基化),或与例如含有一个或多个丝氨酸残基的间隔物(例如,SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG (SEQ ID NO:18))相比,可具有降低水平的O-糖基化水平(例如,降低水平的0-木糖基化)。

[0861] 在一些实施方案中,仅含有甘氨酸残基的间隔物可不经蛋白水解,或与例如含有一个或多个丝氨酸残基的间隔物(例如,SGGSGGGSGGGSGGGSGGG(SEQ ID NO:18))相比,可具有降低速率的蛋白水解。

[0862] 在某些实施方案中,间隔物可以含有GGGG (SEQ ID NO:19) 的基序,例如GGGGGGGG (SEQ ID NO:20)、GGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:21)、GGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:22) 或 GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:23)。在某些实施方案中,间隔物可以含有GGGGG (SEQ ID NO:24) 的基序,例如GGGGGGGGGG (SEQ ID NO:25) 或GGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:26)。在某些实施方案中,间隔物是GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:27)。

[0863] 在其他实施方案中,间隔物还可以含有除甘氨酸和丝氨酸外的氨基酸,例如 GENLYFQSGG (SEQ ID NO:28)、SACYCELS (SEQ ID NO:29)、RSIAT (SEQ ID NO:30)、RPACKIPNDLKQKVMNH (SEQ ID NO:31)、GGSAGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG (SEQ ID NO:32)、AAANSSIDLISVPVDSR (SEQ ID NO:33) 或 GSGSGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGS (SEQ ID NO:34)。

[0864] 在本公开的某些实施方案中,使用12或20个氨基酸肽间隔物串联连接两个Fc结构域单体,所述12和20个氨基酸的肽间隔物由序列GGGSGGGSGGGS (SEQ ID NO:35) 和SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG (SEQ ID NO:18) 组成。在其他实施方案中,可使用由序列GGSGGGSGGGSGGGSGGS (SEQ ID NO:36) 组成的18个氨基酸肽间隔物。

[0865] 在一些实施方案中,两个Fc结构域单体之间的间隔物可具有与上文所述的SEQ ID NO:1-36中任一者的序列具有至少75%同一性(例如,至少77%、79%、81%、83%、85%、87%、89%、91%、93%、95%、97%、99%或99.5%同一性)的序列。在某些实施方案中,两个Fc结构域单体之间的间隔物可具有与SEQ ID NO:17、18、26和27中任一者的序列具有至少80%同一性(例如,至少82%、85%、87%、90%、92%、95%、97%、99%或99.5%同一性)的序列。在某些实施方案中,两个Fc结构域单体之间的间隔物可具有与SEQ ID NO:18或27的序列具有至少80%同一性(例如,至少82%、85%、87%、90%、92%、95%、97%、99%或99.5%同一性)的序列。

[0866] 在某些实施方案中,Fc结构域单体的铰链的氨基末端与同一多肽中的Fc单体的羧基末端之间的接头(即,该接头将第一Fc结构域单体的C_H3抗体恒定结构域的C-末端与第二Fc结构域单体的铰链结构域的N-末端连接,使得两个Fc结构域单体彼此串联连接)是具有3个或更多个氨基酸(例如,3-200个氨基酸(例如,3-200、3-180、3-160、3-140、3-120、3-100、3-90、3-80、3-70、3-60、3-50、3-45、3-40、3-35、3-30、3-25、3-20、3-15、3-10、3-9、3-8、3-7、3-6、3-5、3-4、4-200、5-200、6-200、7-200、8-200、9-200、10-200、15-200、20-200、25-200、30-200、35-200、40-200、45-200、50-200、60-200、70-200、80-200、90-200、100-200、120-200、140-200、160-200或180-200个氨基酸))的间隔物而不是共价键或含有至少12个氨基酸(诸如12-200个氨基酸,例如12-200、12-180、12-160、12-140、12-120、12-100、12-90、12-80、12-70、12-60、12-50、12-40、12-30、12-20、12-19、12-18、12-17、12-16、12-15、12-14或12-13个氨基酸)(例如14-200、16-200、18-200、20-200、30-200、40-200、50-200、60-200、70-200、80-200、90-200、100-200、120-200、140-200、160-200、180-200或190-200个氨基酸)的氨基酸间隔物。

[0867] 间隔物也可以存在于Fc结构域单体的铰链结构域的N-末端与CD38结合结构域(例如,CD38重链结合结构域的CH1结构域或CD38轻链结合结构域的CL结构域)的羧基末端之间,使得这些结构域通过3个或更多个氨基酸(例如,3-200个氨基酸(例如,3-200、3-180、3-160、3-140、3-120、3-100、3-90、3-80、3-70、3-60、3-50、3-45、3-40、3-35、3-30、3-25、3-20、3-15、3-10、3-9、3-8、3-7、3-6、3-5、3-4、4-200、5-200、6-200、7-200、8-200、9-200、10-200、15-200、20-200、25-200、30-200、35-200、40-200、45-200、50-200、60-200、70-200、80-200、90-200、100-200、120-200、140-200、160-200或180-200个氨基酸))的间隔物或含有至少12个氨基酸(诸如12-200个氨基酸,例如12-200、12-180、12-160、12-140、12-120、12-100、12-90、12-80、12-70、12-60、12-50、12-40、12-30、12-20、12-19、12-18、12-17、12-16、12-15、12-14或12-13个氨基酸)(例如14-200、16-200、18-200、20-200、30-200、40-200、50-200、60-200、70-200、80-200、90-200、100-200、120-200、140-200、160-200、180-200或190-200个氨基酸)的氨基酸间隔物连接。

[0868] VIII. 血清蛋白结合肽

[0869] 与血清蛋白肽结合可以改善蛋白质药物的药代动力学,并且具体地,可将本文描述的Fc-抗原结合结构域构建体与血清蛋白结合肽融合。

[0870] 作为一个实例,可以用于本文所述的方法和组合物中的白蛋白结合肽是本领域一般已知的。在一个实施方案中,白蛋白结合肽包括序列DICLPWGCLW(SEQ ID NO:37)。在一些实施方案中,白蛋白结合肽具有与SEQ ID NO:37的序列至少80%同一性(例如,80%、90%或100%同一性)的序列。

[0871] 在本公开中,可将白蛋白结合肽附接到Fc-抗原结合结构域构建体中的某些多肽的N末端或C末端。在一个实施方案中,可将白蛋白结合肽附接到含有抗原结合结构域的Fc构建体中的一个或多个多肽的C末端。在另一个实施方案中,可以将白蛋白结合肽融合到含有抗原结合结构域的Fc构建体中的编码串联连接的两个Fc结构域单体的多肽的C末端。在又一个实施方案中,可以将白蛋白结合肽附接到与编码串联连接的两个Fc结构域单体的多肽中的第二Fc结构域单体连接的Fc结构域单体(例如,图1中的Fc结构域单体114和116;图2中的Fc结构域单体214和216)的C末端。可以将白蛋白结合肽遗传融合到Fc-抗原结合结构

域构建体或通过化学手段(例如,化学缀合)附接到Fc-抗原结合结构域构建体。如果需要,可以在Fc-抗原结合结构域构建体与白蛋白结合肽之间插入间隔物。不受理论束缚,预期在本公开的Fc-抗原结合结构域构建体中包括白蛋白结合肽可通过其与血清白蛋白结合延长治疗性蛋白质的保留。

[0872] IX.Fc-抗原结合结构域构建体

[0873] 一般来讲,本公开的特征在于具有2-10个Fc结构域以及附接的一个或多个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体。这些Fc结构域对于Fc受体(例如,Fc γ RIIIa)可具有比单个野生型Fc结构域更高的结合亲和力和/或亲合力。本公开公开了工程化两个相互作用的C_H3抗体恒定结构域的界面处的氨基酸的方法,使得Fc结构域的两个Fc结构域单体彼此选择性地形成二聚体,从而防止形成不需要的多聚体或聚集体。Fc-抗原结合结构域构建体包括偶数数量的Fc结构域单体,其中每对Fc结构域单体形成Fc结构域。Fc-抗原结合结构域构建体至少包括由四个Fc结构域单体和一个抗原结合结构域的二聚体形成的两个功能性Fc结构域。可例如用接头、间隔物、肽键、化学键或化学部分将抗原结合结构域与Fc结构域连接。

[0874] Fc-抗原结合结构域构建体可以以许多方式组装。Fc-抗原结合结构域构建体可以由不对称串联Fc结构域组装而成(图1至图6)。Fc-抗原结合结构域构建体可以由单分支的Fc结构域组装而成,其中分支点在N末端Fc结构域(图7至图12)。Fc-抗原结合结构域构建体可以由单分支的Fc结构域组装而成,其中分支点在C末端Fc结构域(图13至图18)。Fc-抗原结合结构域构建体可以由单分支的Fc结构域组装而成,其中分支点在N末端或C末端Fc结构域(图19至图21)。可以使用具有不同抗原结合结构域序列(图22-图28)的长链和短链将Fc-抗原结合结构域构建体组装形成双特异性构建体。可以使用具有不同组异二聚化突变(图19-图42)和不同抗原结合结构域的链将Fc-抗原结合结构域构建体组装形成双特异性和三特异性构建体。双特异性Fc-抗原结合结构域构建体包括两个不同的抗原结合结构域。三特异性Fc-抗原结合结构域构建体包括三个不同的抗原结合结构域。

[0875] 可以以许多方式将抗原结合结构域与Fc-抗原结合结构域构建体连接。可以将抗原结合结构域表达为Fc链的融合蛋白。可以将抗原的重链组分表达为Fc链的融合蛋白,并且可以将轻链组分表达为单独的多肽(图50,小图A)。在一些实施方案中,将scFv用作抗原结合结构域。可以将scFv表达为长Fc链的融合蛋白(图50,小图B)。在一些实施方案中,单独表达重链和轻链组分并将其外源添加到Fc-抗原结合结构域构建体中。在一些实施方案中,单独表达抗原结合结构域,稍后利用化学键将其与Fc-抗原结合结构域构建体连接(图50,小图C)。

[0876] 在一些实施方案中,Fc-抗原结合结构域构建体中的一个或多个Fc多肽缺乏C末端赖氨酸残基。在一些实施方案中,Fc-抗原结合结构域构建体中的所有Fc多肽缺乏C末端赖氨酸残基。在一些实施方案中,在Fc-抗原结合结构域构建体中的一个或多个Fc多肽中不存在C末端赖氨酸可改善Fc-抗原结合结构域构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc-抗原结合结构域构建体)(例如,具有至少85%、90%、95%、98%或99%同质性的具有三个Fc结构域的Fc-抗原结合结构域构建体群体)的同质性。

[0877] 在一些实施方案中,可将本文所述的Fc-抗原结合结构域构建体中的第一多肽、第二多肽、第三多肽、第四多肽、第五多肽或第六多肽(例如,图1中的多肽102、112和114,图2

中的202、214、216和218,图3中的302、320和322,图4中的402、428、430和432,图5中的502、524和526,图6中的602、632、634和636,图7中的702、708、722和724,图8中的802、804、826和828,图9中的902、904、934和936,图10中的1002、1010、1012、1024、1026和1032,图11中的1102、1104、1106、1144、1146和1148,图12中的1202、1204、1206、1252、1254和1256,图13中的1302、1306、1320和1324,图14中的1402、1404、1426和1428,图15中的1502、1504、1534和1536,图16中的1602、1606、1608、1626、1628和1632,图17中的1702、1704、1706、1744、1746和1748,图18中的1802、1804、1806、1852、1854和1856,图19中的1902、1906、1910、1924、1928和1932,图20中的2002、2004、2006、2044、2046和2048,图21中的2102、2104、2106、2152、2154和2156,图22中的2202、2222和2224,图23中的2302、2332、2334和2336,图24中的2402、2404、2434和2436,图25中的2502、2504、2534和2536,图26中的2602、2604、2606、2652、2654和2656,图27中的2702、2704、2706、2752、2754和2756,图28中的2802、2804、2806、2852、2854和2856,图29中的2902、2916和2920,图30中的3002、3024和3026,图31中的3102、312和3126,图32中的3202、3224、3228和3230,图33中的3302、3332、3334和3336,图34中的3402、3432、3434和3436,图35中的3502、3504、3534和3536,图36中的3602、3604、3612、3618、3642和3644图37中的3702、3704、3706、3752、3754和3756,图38中的3802、3804、3834和3836,图39中的3902、3904、3910、3916、3942和3944,图40中的4002、4004、4006、4052、4054和4056,图41中的4102、4104、4110、4132、4142和4144,图42中的4202、4204、4206、4252、4254和4256)中的一者或多者的N末端Asp突变为Gln。

[0878] 对于本文实施例中描述的示例性Fc-抗原结合结构域构建体,Fc-抗原结合结构域构建体1-28可分别在旋钮和孔洞亚基中包含E357K和K370D电荷对。Fc-抗原结合结构域构建体29-42可以使用可含有E357K和K370D对的正交静电转向突变,并且还可以包括其他转向突变。对于具有正交旋钮和孔洞的Fc-抗原结合构建体29-42,除了一个正交对外,都需要静电转向突变,并且这些静电转向突变可包括在所有正交对中。

[0879] 在一些实施方案中,如果需要两个正交旋钮和孔洞,则旋钮1的静电转向修饰可以是E357K,而孔洞1的静电转向修饰可以是K370D,并且旋钮2的静电转向修饰可以是K370D,而孔洞2的静电转向修饰可以是E357K。如果需要第三正交旋钮和孔洞(例如,对于三特异性抗体),则可为旋钮3添加静电转向修饰E357K和D399K,而为孔洞3添加静电转向修饰K370D和K409D,或者可为旋钮3添加静电转向修饰K370D和K409D,而孔洞3添加静电转向修饰E357K和D399K。

[0880] 本文所述的示例性Fc-抗原结合结构域构建体(例如,Fc-抗原结合结构域构建体1-42)中的任何一种相对于具有单个Fc结构域和抗原结合结构域的构建体可以在抗体依赖性细胞毒性(ADCC)测定、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)测定中具有增强的效应子功能,或可以包括具有单个Fc结构域和抗原结合结构域的构建体不显示的生物活性。

[0881] X. 宿主细胞和蛋白质产生

[0882] 在本公开中,宿主细胞指包括从其对应的核酸表达本文所述多肽和构建体所需的必要细胞组分(例如,细胞器)的媒介物。核酸可包括在核酸载体中,可以通过本领域已知的常规技术(转化、转染、电穿孔、磷酸钙沉淀、直接显微注射等)将所述核酸载体引入宿主细胞中。宿主细胞可以是哺乳动物、细菌、真菌或昆虫起源。哺乳动物宿主细胞包括但不限于

CHO (或CHO衍生的细胞株,例如CHO-K1、CHO-DXB11 CHO-DG44)、鼠宿主细胞(例如NS0、Sp2/0)、VERY、HEK(例如HEK293)、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20和T47D、CRL7030和HsS78Bst细胞。还可以选择宿主细胞,其调节蛋白质构建体的表达,或以所需的特定方式修饰且加工蛋白质产物。不同的宿主细胞具有蛋白质产物的翻译后加工和修饰的特征和特异性机制。可以选择合适的细胞系或宿主系统,以确保表达的蛋白质的正确修饰和加工。

[0883] 为了从其相应的DNA质粒构建体表达和分泌蛋白质产物,可以用通过本领域已知的适当表达控制元件控制的DNA转染或转化宿主细胞,所述表达控制元件包括启动子、增强子、序列、转录终止子、多腺苷酸化位点和可选择标记物。用于表达治疗性蛋白质的方法是本领域已知的。参见例如,Paulina Balbas,Argelia Lorence(编辑)Recombinant Gene Expression:Reviews and Protocols(Methods in Molecular Biology),Humana Press;2004版本第2版(2004年7月20日);Vladimir Voynov和Justin A.Caravella(编辑)Therapeutic Proteins:Methods and Protocols(Methods in Molecular Biology)Humana Press;2012版本第2版(2012年6月28日)。

[0884] XI.无岩藻糖基化

[0885] 每个Fc单体在Asn 297处包括N-糖基化位点。聚糖可以以多种不同形式存在于给定的Fc单体上。在含有抗体或本文所述的抗原结合Fc构建体的组合物中,聚糖可以是非常异质的,并且存在的聚糖的性质尤其取决于用于产生抗体或抗原结合Fc构建体的细胞的类型、细胞的生长条件(包括生长培养基)和产生后纯化。在各种情况下,包含本文所述的构建体或多肽复合物或多肽的组合物被无岩藻糖基化至少某种程度。例如,至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%或95%存在于组合物中的聚糖(例如,Fc聚糖)缺乏岩藻糖残基。因此,5%-60%、5%-50%、5%-40%、10%-50%、10%-50%、10%-40%、20%-50%或20%-40%的聚糖缺乏岩藻糖残基。可以通过在1,3,4-三-O-乙酰基-2-脱氧基-2-氟-L-岩藻糖抑制剂存在下培养产生抗体的细胞来产生无岩藻糖基化至少某种程度的组合物。可以使用多种其他方法来产生本文所述的构建体和多肽的相对无岩藻糖基化形式,包括:在FUT8表达降低或不表达的细胞中表达(例如,通过敲除FUT8或用RNAi(siRNA、miRNA或shRNA)降低表达),以及在过表达 β -1,4-甘露糖基-糖蛋白4 β -N-乙酰氨基葡萄糖转移酶(GnT-III)的细胞中表达。

[0886] XII.纯化

[0887] 可以通过蛋白质纯化领域中已知的任何方法来纯化Fc-抗原结合结构域构建体,例如通过色谱法(例如,离子交换色谱法、亲和(例如,蛋白A亲和)色谱法和尺寸排阻柱色谱法)、离心、差异溶解度或通过用于蛋白质纯化的任何其他标准技术。例如,可以通过适当选择并组合亲和柱(诸如蛋白A柱)与色谱柱、过滤、超滤、盐析和透析程序来分离和纯化Fc-抗原结合结构域构建体(参见例如,Process Scale Purification of Antibodies,Uwe Gottschalk(编辑)John Wiley&Sons,Inc.,2009;以及Subramanian(编辑)Antibodies-Volume I-Production and Purification,Kluwer Academic/Plenum Publishers,New York(2004))。

[0888] 在一些情况下,可以将Fc-抗原结合结构域构建体缀合到一种或多种纯化肽,以促进从例如全细胞裂解产物混合物中纯化和分离Fc-抗原结合结构域构建体。在一些实施方

案中,纯化肽结合对纯化肽具有特异性亲和力的另一部分。在一些实施方案中,将与纯化肽特异性结合的此类部分附接到固体支持物,诸如基质、树脂或琼脂糖珠。可与Fc-抗原结合结构域构建体连接的纯化肽的实例包括但不限于六组氨酸肽、FLAG肽、myc肽和血凝素(HA)肽。六组氨酸肽(HHHHHH(SEQ ID NO:38))以微摩尔亲和力结合镍功能化的琼脂糖亲和柱。在一些实施方案中,FLAG肽包括序列DYKDDDDK(SEQ ID NO:39)。在一些实施方案中,FLAG肽包括串联的整数倍的序列DYKDDDDK,例如3xDYKDDDDK。在一些实施方案中,myc肽包括序列EQKLISEEDL(SEQ ID NO:40)。在一些实施方案中,myc肽包括串联的整数倍的序列EQKLISEEDL,例如3xEQKLISEEDL。在一些实施方案中,HA肽包括序列YPYDVPDYA(SEQ ID NO:41)。在一些实施方案中,HA肽包括串联的整数倍的序列YPYDVPDYA,例如3xYPYDVPDYA。特异性识别并结合FLAG、myc或HA纯化肽的抗体是本领域众所周知的,并且通常可商购获得。用这些抗体功能化的固体支持物(例如,基质、树脂或琼脂糖珠)可用于纯化包括FLAG、myc或HA肽的Fc-抗原结合结构域构建体。

[0889] 对于Fc-抗原结合结构域构建体,可将蛋白A柱色谱法用作纯化过程。蛋白A配体通过Fc区与Fc-抗原结合结构域构建体相互作用,使得蛋白A色谱法成为能够去除大部分宿主细胞蛋白的高选择性捕获过程。在本公开中,可使用如实施例2中所述的蛋白A柱色谱法来纯化Fc-抗原结合结构域构建体。

[0890] XIII. 药物组合物/制剂

[0891] 本公开的特征在于包括一种或多种本文所述的Fc-抗原结合结构域构建体的药物组合物。在一个实施方案中,药物组合物包括在结构上相同或基本相同的基本上同质的Fc-抗原结合结构域构建体群体。在各种实例中,药物组合物包括Fc-抗原结合结构域构建体1-42中的任何一种的基本上同质的群体。

[0892] 可以将本公开的治疗性蛋白质构建体(例如,本文所述的Fc-抗原结合结构域构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc-抗原结合结构域构建体))结合到药物组合物中。包括治疗性蛋白质的药物组合物可以通过本领域技术人员已知的方法进行配制。药物组合物可以以可注射制剂的形式肠胃外施用,所述可注射制剂包括在水或另一种药学可接受的液体中的无菌溶液或悬浮液。例如,药物组合物可以通过以下过程进行配制:将Fc-抗原结合结构域构建体与药学可接受的媒介物或介质(诸如无菌注射用水(WFI)、生理盐水、乳化剂、悬浮剂、表面活性剂、稳定剂、稀释剂、粘合剂、赋形剂)适当组合,随后以普遍接受的药学实践所需的单位剂量形式混合。在药物制剂中包括的活性成分的量使得提供在指定范围内的合适剂量。

[0893] 用于注射的无菌组合物可以根据常规药学实践使用注射用蒸馏水作为媒介物进行配制。例如,生理盐水或含有葡萄糖和其他补充剂(诸如D-山梨糖醇、D-甘露糖、D-甘露糖醇和氯化钠)的等渗溶液可用作注射用水溶液,任选与本领域普遍已知的合适的增溶剂(例如,醇诸如乙醇和多元醇诸如丙二醇或聚乙二醇)和非离子表面活性剂(诸如聚山梨醇酯80TM、HCO-50)等组合。用于治疗性蛋白质产物的配制方法是本领域已知的,参见例如Banga(编辑)Therapeutic Peptides and Proteins:Formulation,Processing and Delivery Systems(第2版)Taylor&Francis Group,CRC Press(2006)。

[0894] XIV. 治疗方法和剂量

[0895] 本文所述的构建体可以用于治疗由衍生抗原结合结构域的抗体治疗的障碍。例

如,当构建体具有识别CD38的抗原结合结构域时,构建体可以用于治疗多种癌症(例如,血液恶性肿瘤和实体瘤)和自身免疫疾病。

[0896] 药物组合物以与剂量制剂相容的方式施用,并且以治疗有效的量施用,以导致症状的改善或纠正。药物组合物以各种剂型施用,例如静脉内剂型、皮下剂型、经口剂型如可摄取溶液、药物释放胶囊等等。用于各个受试者的适当剂量取决于治疗目标、施用途径和患者的状况。一般地,重组蛋白以1-200mg/kg(例如1-100mg/kg,例如20-100mg/kg)给药。相应地,医疗保健提供者有必要根据需要进行定制且和滴定剂量且修改施用途径,以获得最佳疗效。

[0897] XV. 补体依赖性细胞毒性(CDC)

[0898] 本公开中描述的Fc-抗原结合结构域构建体能够激活各种Fc受体介导的效应子功能。免疫系统的一个组分是补体依赖性细胞毒性(CDC)系统,它是先天免疫系统的一部分,可增强抗体和吞噬细胞清除外源病原体的能力。三种生化途径激活补体系统:经典补体途径、替代补体途径和凝集素途径,这些途径都需要一组复杂的激活和信号级联。

[0899] 在经典补体途径中,IgG或IgM触发补体激活。C1q蛋白与抗原结合后与这些抗体结合,从而形成C1复合物。该复合物产生C1s酯酶,该酯酶将C4和C2蛋白裂解并激活为C4a和C4b以及C2a和C2b。然后,C2a和C4b片段形成称为C3转化酶的蛋白复合物,该蛋白复合物将C3裂解为C3a和C3b,从而使信号放大并形成膜攻击复合物。

[0900] 本公开的Fc-抗原结合结构域构建体能够通过免疫系统增强CDC活性。

[0901] 可通过使用比色测定来评估CDC,在该比色测定中,将Raji细胞(ATCC)用连续稀释的抗体、Fc-抗原结合结构域构建体或IVIg包被。可以将人血清补体(Quidel)以25%v/v添加到所有孔中,并且在37°C下温育2小时。在添加WST-1细胞增殖试剂(Roche Applied Science)后,可以将细胞在37°C下温育12小时。然后将板放置在振荡器上2分钟,并且可以测量450nm处的吸光度。

[0902] XVI. 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)

[0903] 本公开的Fc-抗原结合结构域构建体还能够通过免疫系统增强抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)活性。ADCC是适应性免疫系统的一部分,在该系统中,抗体与外源病原体的表面抗原结合并靶向它们以致死亡。ADCC涉及通过抗体激活自然杀伤(NK)细胞。NK细胞表达Fc受体,这些受体与抗体(诸如IgG和IgM)的Fc部分结合。当抗体与病原体感染的靶细胞表面结合后,它们随后会结合NK细胞并激活它们。NK细胞释放细胞因子(诸如IFN- γ)和蛋白质(诸如穿孔素和颗粒酶)。穿孔素是在钙存在下低聚的成孔溶细胞素。颗粒酶是在靶细胞中诱导程序性细胞死亡的丝氨酸蛋白酶。除NK细胞外,巨噬细胞、嗜中性粒细胞和嗜酸性粒细胞也可以介导ADCC。

[0904] 可使用发光测定来评估ADCC。将人原代NK效应细胞(Hemacare)解冻,并使其在淋巴细胞生长培养基-3(Lonza)中以 5×10^5 个/mL在37°C下静息过夜。第二天,收获人淋巴母细胞系Raji靶细胞(ATCC CCL-86),将其重悬于测定培养基(无酚红RPMI,10%FBS Δ , GlutaMAXTM)中,并在37°C下在各种浓度的每种目的探针存在下铺板30分钟。然后收获静息NK细胞,将其重悬于测定培养基中,并添加到含有抗CD20包被的Raji细胞的板中。将板在37°C下温育6小时,其中效应子与靶细胞的最终比例为5:1(5×10^4 个NK细胞:1x10⁴个Raji)。

[0905] 使用CytoTox-GloTM细胞毒性测定试剂盒(Promega)来确定ADCC活性。CytoTox-GloTM测定使用发光肽底物来测量死细胞蛋白酶活性,该蛋白酶活性由已经丧失膜完整性的

细胞(例如,裂解的Raji细胞)释放。温育6小时后,将制备的试剂(底物)添加到板的每个孔中,并在室温下置于定轨板振荡器上15分钟。使用PHERAstar F5读板仪(BMG Labtech)测量发光。从测试条件中减去对照条件(仅NK细胞+Raji)的读数以消除背景后,分析数据。

[0906] XVII. 抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)

[0907] 本公开的Fc-抗原结合结构域构建体还能够通过免疫系统增强抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)活性。ADCP(也称为抗体调理作用)是吞噬细胞标记病原体摄入和清除的过程。吞噬细胞是通过摄入有害的外源病原体以及死亡或垂死的细胞来保护人体的细胞。该过程被病原体相关分子模式(PAMPS)激活,从而引起NF- κ B激活。然后,调理素(诸如C3b)和抗体可以附着到目标病原体上。当靶标被调理素包被时,Fc结构域经由其Fc受体吸引吞噬细胞。然后吞噬细胞吞噬细胞,并且摄入物质的吞噬体与溶酶体融合。然后,随后的吞噬溶酶体蛋白水解消化细胞物质。

[0908] 可使用生物发光测定来评估ADCP。抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)是治疗性抗体的重要作用机制。ADCP可以由单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞和树突细胞经由Fc γ RIIa (CD32a)、Fc γ RI (CD64) 和Fc γ RIIIa (CD16a) 介导。三种受体都可以参与抗体识别、免疫受体聚簇和导致ADCP的信号事件;但是,阻断研究表明,Fc γ RIIa是参与该过程的主要Fc γ 受体。

[0909] Fc γ RIIa-H ADCP报告基因生物测定是一种基于生物发光细胞的测定,可以用于测量抗体和具有Fc结构域(特异性结合和激活Fc γ RIIa)的其他生物制剂的效力和稳定性。该测定由表达高亲和力人Fc γ RIIa-H变体的遗传工程化Jurkat T细胞系组成,该变体在氨基酸131处含有组氨酸(H)并且含有由NFAT响应元件(NFAT-RE)驱动的荧光素酶报告基因。

[0910] 当与靶细胞和相关抗体共培养时,Fc γ RIIa-H效应细胞结合抗体的Fc结构域,从而引起Fc γ RIIa信号传导和NFAT-RE介导的荧光素酶活性。检测生物发光信号并用荧光素酶测定和标准发光计进行定量。

[0911] 实施例

[0912] 提出以下实施例以向本领域普通技术人员提供完整的公开内容以及对如何执行、制备和评估本文所要求保护的方法和化合物的描述,并且这些实施例旨在仅是本公开的示例,并非旨在限制发明人视为其公开的内容的范围。

[0913] 在这些实例中,某些抗体和构建体被称为“无岩藻糖基化”。这并不意味着抗体或构建体被完全无岩藻糖基化。相反,其意味着相对无岩藻糖基化,例如,抗体或构建体的组合中10%或更多的聚糖缺少岩藻糖残基。

[0914] 实施例1. 具有抗CD20抗原结合结构域或抗PD-L1抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体7的设计和纯化

[0915] 蛋白质表达

[0916] Fc-抗原结合结构域构建体被设计成提高折叠效率,以最小化不受控制的亚基缔合(不受控制的亚基缔合可产生不必要的高分子量低聚体和多聚体),并产生基本上同质(例如,至少85%、90%、95%、98%或99%同质)的用于药物用途的组合物。考虑到这些目标,如下所述制备由其中分支点在N末端Fc结构域的单分支Fc结构域形成的构建体。Fc-抗原结合结构域构建体7(CD20)和构建体7(PD-L1)各自分别包括两个不同的含Fc域单体的多肽(抗CD20长Fc链(SEQ ID NO:62)或抗PD-L1长Fc链(SEQ ID NO:54)的两个拷贝)以及短Fc

链 (SEQ ID NO:63) 的两个拷贝), 以及抗CD20轻链多肽 (SEQ ID NO:61) 或抗PD-L1轻链多肽 (SEQ ID NO:49) 的两个拷贝。长Fc链包含Fc结构域单体和N末端处的抗CD20 VH和CH1结构域 (EU位置1-220) (构建体7 (CD20)) 或N末端处的抗PD-L1 VH和CH1结构域 (EU位置1-220) (构建体7 (PD-L1)), 该Fc结构域单体具有E357K电荷突变以及S354C和T366W突起形成突变 (以促进异二聚化), 并与电荷突变 (K409D/D399K突变) Fc结构域单体 (以促进同二聚化) 串联。短Fc链包含具有K370D电荷突变和Y349C、T366S、L368A和Y407V空腔形成突变 (以促进异二聚化) 的Fc结构域单体。也可以将抗CD20轻链或抗PD-L1轻链表达为作为scFv的一部分与长Fc链的N末端融合。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达, 并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾 (HEK) 293细胞中。表5中的氨基酸序列由三个单独的质粒 (一个质粒编码轻链 (抗CD20或抗PD-L1), 一个质粒编码长Fc链 (抗CD20或抗PD-L1), 并且一个质粒编码短Fc链) 编码。

[0917] 表5. 构建体7 (CD20) 和构建体7 (PD-L1) 序列

[0918]

构建体	轻链	长 Fc 链 (具有抗 CD20 或 抗 PD-L1 VH 和 CH1)	短 Fc 链
构建体 7 (CD20)	SEQ ID NO: 61 DIVMTQTPLSLP VTPGEPASISCRS SKSLLHSNGITY LYWYLQKPGQS PQLLIYQMSNLV SGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVE AEDVGVYYCAQ NLELPYTFGGGT KVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNN FYPREAKVQWK VDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKA DYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTK SFNRGEC	SEQ ID NO: 62 QVQLVQSGAEV KKPGSSVKVSC KASGYAFSYSWI NWVRQAPGQGL EWMGRIFPGDG DTDYNGKFKGR VTITADKSTSTA YMELSSLRSED AVYYCARNVFD GYWLVYWGQG TLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLV KDYFPEPVTVS WNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNH KPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVK	SEQ ID NO: 63 DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQA WLVNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQ VCTLPSPSRDEL KNQVSLSCAVD GFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFF LVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPG

[0919]

		FNWYVDGVEVH NAKTKPREEQY NSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKE YKCKVSNKALP APIEKTISKAKG QPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPE NNYKTTPPVLS DGSFFLYSDLTV DKSRWQQGNVF SCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG KGGGGGGGGG GGGGGGGGGG GDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEK TISKAKGQPREP QVYTLPPCRDKL TKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEW ESGNQPENNYK TTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPG	
构建体 7 (PD-L1)	SEQ ID NO: 49 QSALTQPASVSG SPGQSITISCTGT SSDVGGYNYVS WYQQHPGKAPK LMIYDVSNRPSG	SEQ ID NO: 54 EVQLLES GGGL VQPGGSLRLSCA ASGFTFSSYIMM WVRQAPGKGLE WVSSIYPSGGITF	SEQ ID NO: 63 DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFP PPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWY

[0920]

VSNRFSGSKSGN TASLTISGLQAE DEADYYCSSYTS SSTRVFGTGTKV TVLGQPKANPT VTLFPPSSEELQ ANKATLVCLISD FYPGAVTVAWK ADGSPVKAGVE TTKPSKQSNNK YAASSYLSLTPE QWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKT VAPTECS	YADTVKGRFTIS RDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAV YYCARIKLGTVT TVDYWGQGTLV TVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEK TISKAKGQPREP QVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYK TTPPVLKSDGSF FLYSDLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPGKGGG GGGGGGGGGG GGGGGGGDKTH TCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGV EVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVS	VDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQ VCTLPPSRDEL KNQVSLSCAVD GFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFF LVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPG

[0921]	VLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYT LPPCRDKLTKNQ VSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSL SPG	

[0922] 使用Poros MabCapture A (LifeTechnologies) 柱,通过基于蛋白A的亲和柱色谱法从细胞培养上清液中纯化表达的蛋白质。将捕获的Fc-抗原结合结构域构建体用磷酸盐缓冲盐水(低盐洗涤液)洗涤,并用100mM甘氨酸(pH 3)洗脱。洗脱物通过加入1M TRIS pH 7.4快速中和,并且通过0.2 μ m过滤器无菌过滤。使用Poros XS树脂(Applied Biosciences),通过离子交换色谱法进一步分离蛋白质。用50mM MES (pH 6,缓冲液A)预平衡柱,并且使用50mM MES、400mM氯化钠(pH 6,缓冲液B)作为洗脱缓冲液,用步进梯度洗脱样品。在离子交换后,在切向流过滤系统上,使用10kDa截止聚醚砜(PES)膜滤筒将目标级分缓冲液交换到PBS缓冲液中。将样品浓缩至大约30mg/mL,并且通过0.2 μ m过滤器无菌过滤。

[0923] 非还原性十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

[0924] 将样品在95℃的Laemmli样品缓冲液(4% SDS, Bio-Rad)中变性10分钟。使样品在Criterion TGX无染色凝胶(4-15%聚丙烯酰胺, Bio-Rad)上运行。通过UV照射或考马斯蓝染色对蛋白质条带进行可视化。通过ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad)对凝胶进行成像。使用Imagelab 4.0.1软件(Bio-Rad)执行条带的定量。Fc-抗原结合结构域构建体7 (CD20)被示出为纯的(图43,第4泳道)。

[0925] 实施例2.具有抗CD20抗原结合结构域或抗PD-L1抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体13的设计和纯化

[0926] 蛋白质表达

[0927] 如下所述制备由其中分支点在C末端Fc结构域的单分支Fc结构域形成的构建体。Fc-抗原结合结构域构建体13 (CD20) 和构建体13 (PD-L1) 各自分别包括两个不同的含Fc域单体的多肽(抗CD20长Fc链 (SEQ ID NO:64和67-69中的任何一种) 或抗PD-L1长Fc链 (SEQ ID NO:58、59、60和65中的任何一种) 的两个拷贝,以及短Fc链 (SEQ ID NO:63) 的两个拷贝),以及抗CD20轻链多肽 (SEQ ID NO:61) 或抗PD-L1轻链多肽 (SEQ ID NO:49) 的两个拷贝。长Fc链包含电荷突变(K409D/D399K突变)Fc结构域单体(以促进同二聚化)和N末端处的抗CD20 VH和CH1结构域(EU位置1-220) (构建体13 (CD20)) 或N末端处的抗PD-L1 VH和CH1结构域(EU位置1-220) (构建体13 (PD-L1)),该Fc结构域单体与具有E357K电荷突变以及S354C和T366W突起形成突变(以促进异二聚化)的Fc结构域单体串联。短Fc链包含具有K370D电荷突变和Y349C、T366S、L368A和Y407V空腔形成突变(以促进异二聚化)的Fc结构域单体。也可

以将抗CD20轻链或PD-L1轻链表达为作为scFv的一部分与长Fc链的N末端融合。可以用抗CD20重链和用抗PD-L1重链制备构建体13的四个版本,其中每个版本在长Fc链多肽的Fc结构域单体之间携带不同大小的甘氨酸间隔物(G4、G10、G15或G20接头)。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK)293细胞中。以下构建体中的每一个的氨基酸序列由三个单独的质粒(一个质粒编码轻链(抗CD20或抗PD-L1),一个质粒编码长Fc链(抗CD20或抗PD-L1),并且一个质粒编码短Fc链)编码:

[0928] 表6. 构建体13 (CD20) 和构建体13 (PD-L1) 序列

[0929]

构建体	轻链	长 Fc 链 (具有抗 CD20 或 抗 PD-L1 VH 和 CH1)	短 Fc 链
构建体 13 (CD20) , G ₂₀ 接头	SEQ ID NO: 61 DIVMTQTPLSLP VTPGEPASISCRS SKSLLHSNGITY LYWYLQKPGQS PQLLIYQMSNLV SGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVE AEDVGVYYCAQ NLELPYTFGGGT KVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNN FYPREAKVQWK VDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDST YSLSSITLTLSKA	SEQ ID NO: 64 QVQLVQSGAEV KKPGSSVKVSC KASGYAFSYSWI NWVRQAPGQGL EWMGRIFPGDG DTDYNGKFKGR VTITADKSTSTA YMELSSLRSED AVYYCARNVFD GYWLVYWGQG TLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLV KDYFPEPVTVS WNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLY	SEQ ID NO: 63 DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQA WLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQ VCTLPSSRDEL KNQVSLSCAVD GFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFF

[0930]

DYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTK SFNRGEC	SLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNH KPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVH NAKTKPREEQY NSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKE YKCKVSNKALP APIEKTISKAKG QPREPQVYTLPP CRDKLTKNQVS LWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGN VFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLS PGKGGGGGGGG GGGGGGGGGG GGDKTHTCPPCP APELLGGPSVFL FPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQYN STYRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAV EWESNGQPENN YKTTTPVLKSDG SFFLYSDLTVDK SRWQQGNVFSC	LVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPG

[0931]

		SVMHEALHNHY TQKSLSLSPG	
构建体 13 (CD20) , G ₁₅ 接头	SEQ ID NO: 61 DIVMTQTPLSLP VTPGEPASISCRS SKSLLHSNGITY LYWYLQKPGQS PQLLIYQMSNLV SGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVE AEDVGVYYCAQ NLELPYTFGGGT KVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNN FYPREAKVQWK VDNALQSGNSQ ESVTEQDSKST YSLSSLTLSKA DYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTK SFNRGEC	SEQ ID NO: 55 QVQLVQSGAEV KKPGSSVKVSC KASGYAFSYSWI NWVRQAPGQGL EWMGRIFPGDG DTDYNGKFKGR VTITADKSTSTA YMELSSLRSED AVYYCARNVFD GYWLVYWGGQ TLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLV KDYFPEPVTVS WNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNH KPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVH NAKTKPREEQY NSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKE YKCKVSNKALP APIEKTISKAKG QPREPQVYTLPP CRDKLTKNQVS LWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQ PENNYKTPPV DSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGN VFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLS PGKGGGGGGGG	SEQ ID NO: 63 DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQD WLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQ VCTLPPSRDEL KNQVSLSCAVD GFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFF LVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPG

[0932]

		GGGGGGGDKTH TCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGV EVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNG QPENNYKTTPPV LKSDGSFFLYSD LTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSL SPG	
构建体 13 (CD20) , G ₁₀ 接头	SEQ ID NO: 61 DIVMTQTPLSLP VTPGEPASISCRS SKSLLHSNGITY LYWYLQKPGQS PQLLIYQMSNLV SGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVE AEDVGVYYCAQ NLELPYTFGGGT KVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNN FYPREAKVQWK VDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKA DYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTK SFNRGEC	SEQ ID NO: 56 QVQLVQSGAEV KKPGSSVKVSC KASGYAFSYSWI NWVRQAPGQGL EWMGRIFPGDG DTDYNGKFKGR VTITADKSTSTA YMELSSLRSED AVYYCARNVFD GYWLVYWGQG TLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLV KDYFPEPPTVS WNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNH KPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCP PCPAPPELLGGPS	SEQ ID NO: 63 DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQD WLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQ VCTLPPSRDEL KNQVSLSCAVD GFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFF LVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPG

[0933]

		VFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVH NAKTKPREEQY NSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKE YKCKVSNKALP APIEKTISKAKG QPREPQVYTLPP CRDKLTKNQVS LWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGN VFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLS PGKGGGGGGGG GGDKTHTCPPCP APELLGGPSVFL FPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQYN STYRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAV EWESNGQPENN YKTTTPPVLKSDG SFFLYSDLTVDK SRWQQGNVFSC SVMHEALHNHY TQKSLSLSPG	
构建体 13 (CD20) , G ₄ 接头	SEQ ID NO: 61 DIVMTQTPLSLP VTPGEPASISCRS SKSLLHSNGITY	SEQ ID NO: 57 QVQLVQSGAEV KKPGSSVKVSC KASGYAFSYSWI	SEQ ID NO: 63 DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRT

[0934]

LYWYLQKPGQS PQLLIYQMSNLV SGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVE AEDVGVIYCAQ NLELPYTFGGGT KVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNN FYPREAKVQWK VDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDST YSLSSITLTLKA DYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTK SFNRGEC	NWVRQAPGQGL EWMGRIFPGDG DTDYNGKFKGR VTITADKSTSTA YMELSSLRSED AVYYCARNVFD GYWLVYWGQG TLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLV KDYFPEPVTVS WNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLY SLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNH KPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVH NAKTKPREEQY NSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKE YKCKVSNKALP APIEKTISKAKG QPREPQVYTLPP CRDKLTKNQVS LWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGN VFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLS PGKGGGGDKTH TCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGV EVHNAKTKPRE	PEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYR VVSIVLTVLHQD WLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQ VCTLPPSRDEL KNQVSLSCAVD GFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFF LVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPG

[0935]

		EQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNG QPENNYKTTPPV LKSDGSFFLYSD LTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSL SPG	
构建体 13 (PD- L1), G ₂₀ 接头	SEQ ID NO: 49 QSALTQPASVSG SPGQSITISCTGT SSDVGGYNYVS WYQQHPGKAPK LMIYDVSNRPSG VSNRFSGSKSGN TASLTISGLQAE DEADYYCSSYTS SSTRVFGTGTKV TVLGQPKANPT VTLFPPSSEELQ ANKATLVCLISD FYPGAVTVAWK ADGSPVKAGVE TTKPSKQSNK YAASSYLSLTPE QWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKT VAPTECS	SEQ ID NO: 58 EVQLLESGGGL VQPGGSLRLSCA ASGFTFSSYIMM WVRQAPGKGLE WVSSIYPSGGITF YADTVKGRFTIS RDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAV YYCARIKLGTVT TVDYWGQGTLV TVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCK	SEQ ID NO: 63 DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISR PEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQ VCTLPPSRDEL KNQVSLSCAVD GFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFF LVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPG

[0936]

		VSNKALPAPIEK TISKAKGQPREP QVYTLPPCRDKL TKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPGKGGG GGGGGGGGGG GGGGGGGDKTH TCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGV EVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNG QPENNYKTTPPV LKSDGSFFLYSD LTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSL SPG	
构建体 13 (PD-L1), G ₁₅ 接头	SEQ ID NO: 49 QSALTQPASVSG SPGQSITISCTGT SSDVGGYNYVS WYQQHPGKAPK LMIYDVSNRPSG VSNRFSGSKSGN TASLTISGLQAE DEADYYCSSYTS SSTRVFGTGTKV	SEQ ID NO: 59 EVQLLESGGGL VQPGGSLRLSCA ASGFTFSSYIMM WVRQAPGKGLE WVSSIYPSGGITF YADTVKGRFTIS RDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAV YYCARIKLGTVT	SEQ ID NO: 63 DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKV

[0937]

TVLGQPKANPT VTLFPPSSEELQ ANKATLVCLISD FYPGAVTVAWK ADGSPVKAGVE TTKPSKQSNNK YAASSYLSLTPE QWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKT VAPTECS	TVDYWGQGTLV TVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEK TISKAKGQPREP QVYTLPPCRDKL TKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPGKGGG GGGGGGGGGG GGDKTHTCPPCP APELLGGPSVFL FPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQYN STYRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSR	SNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQ VCTLPPSRDEL KNQVSLSCAVD GFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFF LVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPG

[0938]

		DELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAV EWESNGQPENN YKTTTPVLKSDG SFFLYSDLTVDK SRWQQGNVFSC SVMHEALHNHY TQKSLSLSPG	
构建体 13 (PD- L1), G ₁₀ 接头	SEQ ID NO: 49 QSALTQPASVSG SPGQSITISCTGT SSDVGGYNYVS WYQQHPGKAPK LMIYDVSNRPSG VSNRFSGSKSGN TASLTISGLQAE DEADYYCSSYTS SSTRVFGTGTKV TVLGQPKANPT VTLFPPSSEELQ ANKATLVCLISD FYPGAVTVAWK ADGSPVKAGVE TTKPSKQSNK YAASSYLSLTPE QWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKT VAPTECS	SEQ ID NO: 60 EVQLLESGGGL VQPGGSLRLSCA ASGFTFSSYIMM WVRQAPGKGLE WVSSIYPSGGITF YADTVKGRFTIS RDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAV YYCARIKLGTVT TVDYWGQGTLV TVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEK TISKAKGQPREP QVYTLPPCRDKL TKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYK	SEQ ID NO: 63 DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQ VCTLPPSRDEL KNQVSLSCAVD GFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFF LVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPG

[0939]

		TTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPGKGGG GGGGGGGDKTH TCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGV EVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNG QPENNYKTTPPV LKSDGSFFLYSD LTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSL SPG	
构建体 13 (PD-L1) , G ₄ 接头	SEQ ID NO: 49 QSALTQPASVSG SPGQSITISCTGT SSDVGGYNYVS WYQQHPGKAPK LMIYDVSNRPSG VSNRFSGSKSGN TASLTISGLQAE DEADYYCSSYTS SSTRVFGTGTKV TVLGQPKANPT VTLFPPSSEELQ ANKATLVCLISD FYPGAVTVAWK ADGSPVKAGVE TTKPSKQSNK YAASSYLSLTPE	SEQ ID NO: 65 EVQLLESGGGL VQPGGSLRLSCA ASGFTFSSYIMM WVRQAPGKGLE WVSSIYPSGGITF YADTVKGRFTIS RDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAV YYCARIKLGTVT TVDYWGQGTLV TVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSS	SEQ ID NO: 63 DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQ VCTLPPSRDEL KNQVSLSCAVD GFYPDIAVEWE SNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFF

[0940]

QWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKT VAPTECS	VVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEK TISKAKGQPREP QVYTLPPCRDKL TKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPGKGGG GDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEK TISKAKGQPREP QVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYK TTPPVLKSDGSF FLYSDLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPG	LVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPG

[0941] 使用Poros MabCapture A (LifeTechnologies) 柱,通过基于蛋白A的亲和柱色谱法从细胞培养上清液中纯化表达的蛋白质。将捕获的Fc-抗原结合结构域构建体用磷酸盐

缓冲盐水(低盐洗涤液)洗涤,并用100mM甘氨酸(pH 3)洗脱。洗脱物通过加入1M TRIS pH 7.4快速中和,并且通过0.2 μ m过滤器无菌过滤。使用Poros XS树脂(Applied Biosciences),通过离子交换色谱法进一步分离蛋白质。用50mM MES(pH 6,缓冲液A)预平衡柱,并且使用50mM MES、400mM氯化钠(pH 6,缓冲液B)作为洗脱缓冲液,用步进梯度洗脱样品。在离子交换后,在切向流过滤系统上,使用10kDa截止聚醚砜(PES)膜滤筒将目标级分缓冲液交换到PBS缓冲液中。将样品浓缩至大约30mg/mL,并且通过0.2 μ m过滤器无菌过滤。

[0942] 非还原性十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

[0943] 将样品在95℃的Laemmli样品缓冲液(4%SDS,Bio-Rad)中变性10分钟。使样品在Criterion TGX无染色凝胶(4-15%聚丙烯酰胺,Bio-Rad)上运行。通过UV照射或考马斯蓝染色对蛋白质条带进行可视化。通过ChemiDoc MP Imaging System(Bio-Rad)对凝胶进行成像。使用Imagelab 4.0.1软件(Bio-Rad)执行条带的定量。Fc-抗原结合结构域构建体13(CD20)被示出为纯的(图43,第5泳道)。

[0944] 实施例3.Fc-抗原结合结构域构建体1的设计和纯化

[0945] 如下所述制备由不对称串联Fc结构域形成的无支链构建体。Fc-抗原结合结构域构建体1(图1)包括两个不同的含Fc结构域单体的多肽(长Fc链以及短Fc链的两个拷贝)以及一个轻链多肽。长Fc链包含两个串联的Fc结构域单体和N末端处的抗原结合结构域,其中每个Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个突起形成突变(例如,S354C和T366W突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,E357K)(以促进异二聚化)而产生的工程化突起。可将抗原结合结构域表达为与长Fc链相同的氨基酸序列的一部分(例如,以形成scFv)。短Fc链包含Fc结构域单体,该Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个空腔形成突变(例如,Y349C、T366S、L368A和Y407V突变)以及任选的选自表4的反向电荷突变(例如,K370D)(以促进异二聚化)而产生的工程化空腔。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK)293细胞中。短Fc链和长Fc链的氨基酸序列由两个单独的质粒编码。在该实施例中,以及在Fc-抗原结合结构域构建体2-42的以下每个实施例中,细胞可包含表达抗体可变轻链的第三质粒。

[0946] 使用Poros MabCapture A(LifeTechnologies)柱,通过基于蛋白A的亲和柱色谱法从细胞培养上清液中纯化表达的蛋白质。将捕获的Fc-抗原结合结构域构建体用磷酸盐缓冲盐水(低盐洗涤液)洗涤,并用100mM甘氨酸(pH 3)洗脱。洗脱物通过加入1M TRIS pH 7.4快速中和,并且通过0.2 μ m过滤器无菌过滤。使用Poros XS树脂(Applied Biosciences),通过离子交换色谱法进一步分离蛋白质。用50mM MES(pH 6,缓冲液A)预平衡柱,并且使用50mM MES、400mM氯化钠(pH 6,缓冲液B)作为洗脱缓冲液用步进梯度洗脱样品。在离子交换后,在切向流过滤系统上,使用10kDa截止聚醚砜(PES)膜滤筒将目标级分缓冲液交换到PBS缓冲液中。将样品浓缩至大约30mg/mL,并通过0.2 μ m过滤器进行无菌过滤。

[0947] 将样品在95℃的Laemmli样品缓冲液(4%SDS,Bio-Rad)中变性10分钟。使样品在Criterion TGX无染色凝胶(4-15%聚丙烯酰胺,Bio-Rad)上运行。通过UV照射或考马斯蓝染色对蛋白质条带进行可视化。通过ChemiDoc MP Imaging System(Bio-Rad)对凝胶进行成像。使用Imagelab 4.0.1软件(Bio-Rad)执行条带的定量。

[0948] 实施例4.Fc-抗原结合结构域构建体2的设计和纯化

[0949] 如下所述制备由不对称串联Fc结构域形成的无支链构建体。Fc-抗原结合结构域构建体2(图2)包括两个不同的含Fc单体的多肽(长Fc链以及短Fc链的三个拷贝)以及一个轻链多肽。长Fc链包含三个与N末端处的抗原结合结构域串联的Fc结构域单体,其中每个Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个突起形成突变(例如,S354C和T366W突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,E357K)而产生的工程化突起。短Fc链包含Fc结构域单体,该Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个空腔形成突变(例如,Y349C、T366S、L368A和Y407V突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,K370D)而产生的工程化空腔。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK)293细胞中。短Fc链和长Fc链的氨基酸序列由两个单独的质粒编码。按实施例3纯化表达的蛋白质。

[0950] 实施例5.Fc-抗原结合结构域构建体3的设计和纯化

[0951] 如下所述制备由不对称串联Fc结构域形成的构建体。Fc-抗原结合结构域构建体3(图3)包括两个不同的含Fc单体的多肽(长Fc链以及短Fc链的两个拷贝)以及一个轻链多肽。长Fc链包含两个串联的Fc结构域单体,其中每个Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个突起形成突变(例如,S354C和T366W突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,E357K)而产生的工程化突起。短Fc链包含Fc结构域单体和N末端处的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个空腔形成突变(例如,Y349C、T366S、L368A和Y407V突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,K370D)而产生的工程化空腔。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK)293细胞中。短Fc链和长Fc链的氨基酸序列由两个单独的质粒编码。按实施例3纯化表达的蛋白质。

[0952] 实施例6.Fc-抗原结合结构域构建体4的设计和纯化

[0953] 如下所述制备由不对称串联Fc结构域形成的构建体。Fc-抗原结合结构域构建体4(图4)包括两个不同的含Fc单体的多肽(长Fc链以及短Fc链的三个拷贝)以及一个轻链多肽。长Fc链包含三个串联的Fc结构域单体,其中每个Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个突起形成突变(例如,S354C和T366W突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,E357K)而产生的工程化突起。短Fc链包含Fc结构域单体和N末端处的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个空腔形成突变(例如,Y349C、T366S、L368A和Y407V突变)以及任选的选自表4的反向电荷突变(例如,K370D)而产生的工程化空腔。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK)293细胞中。短Fc链和长Fc链的氨基酸序列由两个单独的质粒编码。按实施例3纯化表达的蛋白质。

[0954] 实施例7.Fc-抗原结合结构域构建体5的设计和纯化

[0955] 如下所述制备由不对称串联Fc结构域形成的构建体。Fc-抗原结合结构域构建体5(图5)包括两个不同的含Fc单体的多肽(长Fc链以及短Fc链的两个拷贝)以及一个轻链多肽。长Fc链包含两个与N末端处的抗原结合结构域串联的Fc结构域单体,其中每个Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个突起形成突变(例如,S354C和T366W突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,E357K)而产生的工程化突起。短Fc链包含Fc结构域单体和N末端处的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一

个空腔形成突变(例如,Y349C、T366S、L368A和Y407V突变)以及任选的选自表4的反向电荷突变(例如,K370D)而产生的工程化空腔。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK) 293细胞中。短Fc链和长Fc链的氨基酸序列由两个单独的质粒编码。按实施例3纯化表达的蛋白质。

[0956] 实施例8.Fc-抗原结合结构域构建体6的设计和纯化

[0957] 如下所述制备由不对称串联Fc结构域形成的构建体。Fc-抗原结合结构域构建体6(图6)包括两个不同的含Fc单体的多肽(长Fc链以及短Fc链的三个拷贝)以及一个轻链多肽。长Fc链包含三个与N末端处的抗原结合结构域串联的Fc结构域单体,其中每个Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个突起形成突变(例如,S354C和T366W突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,E357K)而产生的工程化突起。短Fc链包含Fc结构域单体和N末端处的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个空腔形成突变(例如,Y349C、T366S、L368A和Y407V突变)以及任选的选自表4的反向电荷突变(例如,K370D)而产生的工程化空腔。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK) 293细胞中。短Fc链和长Fc链的氨基酸序列由两个单独的质粒编码。按实施例3纯化表达的蛋白质。

[0958] 实施例9.Fc-抗原结合结构域构建体7的设计和纯化

[0959] 如下所述制备由其中分支点在N末端Fc结构域的单分支Fc结构域形成的构建体。Fc-抗原结合结构域构建体7(图7)包括两个不同的含Fc单体的多肽(长Fc链的两个拷贝以及短Fc链的两个拷贝)以及一个轻链多肽。长Fc链包含Fc结构域单体和N末端处的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个突起形成突变(例如,S354C和T366W突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,E357K)而产生的工程化突起,并与具有选自表4或表5的反向电荷突变(例如,K409D/D399K突变)的Fc结构域单体串联。短Fc链包含Fc结构域单体,该Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个空腔形成突变(例如,Y349C、T366S、L368A和Y407V突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,K370D)而产生的工程化空腔。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK) 293细胞中。短Fc链和长Fc链的氨基酸序列由两个单独的质粒编码。按实施例3纯化表达的蛋白质。

[0960] 实施例10.Fc-抗原结合结构域构建体8的设计和纯化

[0961] 如下所述制备由其中分支点在N末端Fc结构域的单分支Fc结构域形成的构建体。Fc-抗原结合结构域构建体8(图8)包括两个不同的含Fc单体的多肽(长Fc链的两个拷贝以及短Fc链的两个拷贝)以及一个轻链多肽。长Fc链包含Fc结构域单体,该Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个突起形成突变(例如,S354C和T366W突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,E357K)而产生的工程化突起,并与具有选自表4或表5的反向电荷突变(例如,K409D/D399K突变)的Fc结构域单体串联。短Fc链包含Fc结构域单体和N末端处的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个空腔形成突变(例如,Y349C、T366S、L368A和Y407V突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突

变(例如,K370D)而产生的工程化空腔。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK)293细胞中。短Fc链和长Fc链的氨基酸序列由两个单独的质粒编码。按实施例3纯化表达的蛋白质。

[0962] 实施例11.Fc-抗原结合结构域构建体9的设计和纯化

[0963] 如下所述制备由其中分支点在N末端Fc结构域的单分支Fc结构域形成的构建体。Fc-抗原结合结构域构建体9(图9)包括两个不同的含Fc单体的多肽(长Fc链的两个拷贝以及短Fc链的两个拷贝)以及一个轻链多肽。长Fc链包含Fc结构域单体和N末端处的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个突起形成突变(例如,S354C和T366W突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,E357K)而产生的工程化突起,并与具有选自表4或表5的反向电荷突变(例如,K409D/D399K突变)的Fc结构域单体串联。短Fc链包含Fc结构域单体和N末端处的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个空腔形成突变(例如,Y349C、T366S、L368A和Y407V突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,K370D)而产生的工程化空腔。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK)293细胞中。短Fc链和长Fc链的氨基酸序列由两个单独的质粒编码。按实施例3纯化表达的蛋白质。

[0964] 实施例12.Fc-抗原结合结构域构建体10的设计和纯化

[0965] 如下所述制备由其中分支点在N末端Fc结构域的单分支Fc结构域形成的构建体。Fc-抗原结合结构域构建体10(图10)包括两个不同的含Fc单体的多肽(长Fc链的两个拷贝以及短Fc链的四个拷贝)以及一个轻链多肽。长Fc链包含两个串联的Fc结构域单体和N末端处的抗原结合结构域,其中每个Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个突起形成突变(例如,S354C和T366W突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,E357K)而产生的工程化突起,并与具有选自表4或表5的反向电荷突变(例如,K409D/D399K突变)的Fc结构域单体串联。短Fc链包含Fc结构域单体,该Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个空腔形成突变(例如,Y349C、T366S、L368A和Y407V突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,K370D)而产生的工程化空腔。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK)293细胞中。短Fc链和长Fc链的氨基酸序列由两个单独的质粒编码。按实施例3纯化表达的蛋白质。

[0966] 实施例13.Fc-抗原结合结构域构建体11的设计和纯化

[0967] 如下所述制备由其中分支点在N末端Fc结构域的单分支Fc结构域形成的构建体。Fc-抗原结合结构域构建体11(图11)包括两个不同的含Fc单体的多肽(长Fc链的两个拷贝以及短Fc链的四个拷贝)以及一个轻链多肽。长Fc链包含两个串联的Fc结构域单体,其中每个Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个突起形成突变(例如,S354C和T366W突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,E357K)而产生的工程化突起,并在N末端与具有选自表4或表5的反向电荷突变(例如,K409D/D399K突变)的Fc结构域单体串联。短Fc链包含Fc结构域单体和N末端处的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个空腔形成突变(例如,Y349C、T366S、L368A和Y407V突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,K370D)而产生的工程化空腔。将DNA序列优化以在

哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK)293细胞中。短Fc链和长Fc链的氨基酸序列由两个单独的质粒编码。按实施例3纯化表达的蛋白质。

[0968] 实施例14.Fc-抗原结合结构域构建体12的设计和纯化

[0969] 如下所述制备由其中分支点在N末端Fc结构域的单分支Fc结构域形成的构建体。Fc-抗原结合结构域构建体12(图12)包括两个不同的含Fc单体的多肽(长Fc链的两个拷贝以及短Fc链的四个拷贝)以及一个轻链多肽。长Fc链包含两个串联的Fc结构域单体和N末端处的抗原结合结构域,其中每个Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个突起形成突变(例如,S354C和T366W突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,E357K)而产生的工程化突起,并与具有选自表4或表5的反向电荷突变(例如,K409D/D399K突变)的Fc结构域单体串联。短Fc链包含Fc结构域单体和N末端处的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个空腔形成突变(例如,Y349C、T366S、L368A和Y407V突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,K370D)而产生的工程化空腔。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK)293细胞中。短Fc链和长Fc链的氨基酸序列由两个单独的质粒编码。按实施例3纯化表达的蛋白质。

[0970] 实施例15.Fc-抗原结合结构域构建体13的设计和纯化

[0971] 如下所述制备由其中分支点在C末端Fc结构域的单分支Fc结构域形成的构建体。Fc-抗原结合结构域构建体13(图13)包括两个不同的含Fc单体的多肽(长Fc链的两个拷贝以及短Fc链的两个拷贝)以及一个轻链多肽。长Fc链包含Fc结构域单体和N末端处的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有选自表4或表5的反向电荷突变(例如,K409D/D399K突变),并与具有通过引入选自表3的至少一个突起形成突变(例如,S354C和T366W突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,E357K)而产生的工程化突起的Fc结构域单体串联。短Fc链包含Fc结构域单体,该Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个空腔形成突变(例如,Y349C、T366S、L368A和Y407V突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,K370D)而产生的工程化空腔。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK)293细胞中。短Fc链和长Fc链的氨基酸序列由两个单独的质粒编码。按实施例3纯化表达的蛋白质。

[0972] 实施例16.Fc-抗原结合结构域构建体14的设计和纯化

[0973] 如下所述制备由其中分支点在C末端Fc结构域的单分支Fc结构域形成的构建体。Fc-抗原结合结构域构建体14(图14)包括两个不同的含Fc单体的多肽(长Fc链的两个拷贝以及短Fc链的两个拷贝)以及一个轻链多肽。长Fc链包含Fc结构域单体,该Fc结构域单体具有选自表4或表5的反向电荷突变(例如,K409D/D399K突变),并在N末端与具有通过引入选自表3的至少一个突起形成突变(例如,S354C和T366W突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,E357K)而产生的工程化突起的Fc结构域单体串联。短Fc链包含Fc结构域单体和N末端处的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个空腔形成突变(例如,Y349C、T366S、L368A和Y407V突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,K370D)而产生的工程化空腔。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表

达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK)293细胞中。短Fc链和长Fc链的氨基酸序列由两个单独的质粒编码。按实施例3纯化表达的蛋白质。

[0974] 实施例17.Fc-抗原结合结构域构建体15的设计和纯化

[0975] 如下所述制备由其中分支点在C末端Fc结构域的单分支Fc结构域形成的构建体。Fc-抗原结合结构域构建体15(图15)包括两个不同的含Fc单体的多肽(长Fc链的两个拷贝以及短Fc链的两个拷贝)以及一个轻链多肽。长Fc链包含Fc结构域单体和N末端处的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有选自表4或表5的反向电荷突变(例如,K409D/D399K突变),并与具有通过引入选自表3的至少一个突起形成突变(例如,S354C和T366W突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,E357K)而产生的工程化突起的Fc结构域单体串联。短Fc链包含Fc结构域单体和N末端处的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个空腔形成突变(例如,Y349C、T366S、L368A和Y407V突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,K370D)而产生的工程化空腔。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK)293细胞中。短Fc链和长Fc链的氨基酸序列由两个单独的质粒编码。按实施例3纯化表达的蛋白质。

[0976] 实施例18.Fc-抗原结合结构域构建体16的设计和纯化

[0977] 如下所述制备由其中分支点在C末端Fc结构域的单分支Fc结构域形成的构建体。Fc-抗原结合结构域构建体16(图16)包括两个不同的含Fc单体的多肽(长Fc链的两个拷贝以及短Fc链的四个拷贝)以及一个轻链多肽。长Fc链包含Fc结构域单体和N末端处的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有选自表4或表5的反向电荷突变(例如,K409D/D399K突变),并与各自具有通过引入选自表3的至少一个突起形成突变(例如,S354C和T366W突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,E357K)而产生的工程化突起的两个Fc结构域单体串联。短Fc链包含Fc结构域单体,该Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个空腔形成突变(例如,Y349C、T366S、L368A和Y407V突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,K370D)而产生的工程化空腔。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK)293细胞中。短Fc链和长Fc链的氨基酸序列由两个单独的质粒编码。按实施例3纯化表达的蛋白质。

[0978] 实施例19.Fc-抗原结合结构域构建体17的设计和纯化

[0979] 如下所述制备由其中分支点在C末端Fc结构域的单分支Fc结构域形成的构建体。Fc-抗原结合结构域构建体17(图17)包括两个不同的含Fc单体的多肽(长Fc链的两个拷贝以及短Fc链的四个拷贝)以及一个轻链多肽。长Fc链包含Fc结构域单体,该Fc结构域单体具有选自表4或表5的反向电荷突变(例如,K409D/D399K突变),并在N末端与各自具有通过引入选自表3的至少一个突起形成突变(例如,S354C和T366W突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,E357K)而产生的工程化突起的两个Fc结构域单体串联。短Fc链包含Fc结构域单体和N末端处的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个空腔形成突变(例如,Y349C、T366S、L368A和Y407V突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,K370D)而产生的工程化空腔。将DNA序列优化以在哺乳动物

细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK)293细胞中。短Fc链和长Fc链的氨基酸序列由两个单独的质粒编码。按实施例3纯化表达的蛋白质。

[0980] 实施例20.Fc-抗原结合结构域构建体18的设计和纯化

[0981] 如下所述制备由其中分支点在C末端Fc结构域的单分支Fc结构域形成的构建体。Fc-抗原结合结构域构建体18(图18)包括两个不同的含Fc单体的多肽(长Fc链的两个拷贝以及短Fc链的四个拷贝)以及一个轻链多肽。长Fc链包含Fc结构域单体和N末端处的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有选自表4或表5的反向电荷突变(例如,K409D/D399K突变),并与各自具有通过引入选自表3的至少一个突起形成突变(例如,S354C和T366W突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,E357K)而产生的工程化突起的两个Fc结构域单体串联。短Fc链包含Fc结构域单体和N末端处的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个空腔形成突变(例如,Y349C、T366S、L368A和Y407V突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,K370D)而产生的工程化空腔。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK)293细胞中。短Fc链和长Fc链的氨基酸序列由两个单独的质粒编码。按实施例3纯化表达的蛋白质。

[0982] 实施例21.Fc-抗原结合结构域构建体19的设计和纯化

[0983] 如下所述制备由其中分支点既不在N末端也不在C末端Fc结构域的单分支Fc结构域形成的构建体。Fc-抗原结合结构域构建体19(图19)包括两个不同的含Fc单体的多肽(长Fc链的两个拷贝以及短Fc链的四个拷贝)以及一个轻链多肽。长Fc链包含Fc结构域单体和N末端处的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个突起形成突变(例如,S354C和T366W突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,E357K)而产生的工程化突起,并与具有选自表4或表5的反向电荷突变(例如,K409D/D399K突变)的Fc结构域单体和具有通过引入选自表3的至少一个突起形成突变(例如,S354C和T366W突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,E357K)而产生的工程化突起的另一个Fc结构域单体串联。短Fc链包含Fc结构域单体,该Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个空腔形成突变(例如,Y349C、T366S、L368A和Y407V突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,K370D)而产生的工程化空腔。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK)293细胞中。短Fc链和长Fc链的氨基酸序列由两个单独的质粒编码。按实施例3纯化表达的蛋白质。

[0984] 实施例22.Fc-抗原结合结构域构建体20的设计和纯化

[0985] 如下所述制备由其中分支点在C末端Fc结构域的单分支Fc结构域形成的构建体。Fc-抗原结合结构域构建体20(图20)包括两个不同的含Fc单体的多肽(长Fc链的两个拷贝以及短Fc链的四个拷贝)以及一个轻链多肽。长Fc链包含Fc结构域单体,该Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个突起形成突变(例如,S354C和T366W突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,E357K)而产生的工程化突起,并在N末端与具有选自表4或表5的反向电荷突变(例如,K409D/D399K突变)的Fc结构域单体和具有通过引入选自表3的至少一个突起形成突变(例如,S354C和T366W突变)以及任选的选自表4的一个或多个

反向电荷突变(例如,E357K)而产生的工程化突起的另一个Fc结构域单体串联。短Fc链包含Fc结构域单体和N末端处的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个空腔形成突变(例如,Y349C、T366S、L368A和Y407V突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,K370D)而产生的工程化空腔。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK) 293细胞中。短Fc链和长Fc链的氨基酸序列由两个单独的质粒编码。按实施例3纯化表达的蛋白质。

[0986] 实施例23.Fc-抗原结合结构域构建体21的设计和纯化

[0987] 如下所述制备由其中分支点在C末端Fc结构域的单分支Fc结构域形成的构建体。Fc-抗原结合结构域构建体21(图21)包括两个不同的含Fc单体的多肽(长Fc链的两个拷贝以及短Fc链的四个拷贝)以及一个轻链多肽。长Fc链包含Fc结构域单体和N末端处的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个突起形成突变(例如,S354C和T366W突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,E357K)而产生的工程化突起,并与具有选自表4或表5的反向电荷突变(例如,K409D/D399K突变)的Fc结构域单体、具有通过引入选自表3的至少一个突起形成突变(例如,S354C和T366W突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,E357K)而产生的工程化突起的另一个Fc结构域单体串联。短Fc链包含Fc结构域单体和N末端处的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个空腔形成突变(例如,Y349C、T366S、L368A和Y407V突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,K370D)而产生的工程化空腔。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK) 293细胞中。短Fc链和长Fc链的氨基酸序列由两个单独的质粒编码。按实施例3纯化表达的蛋白质。

[0988] 实施例24.Fc-抗原结合结构域构建体22的设计和纯化

[0989] 如下所述制备使用具有不同抗原结合结构域的长Fc链和短Fc链形成的双特异性构建体。Fc-抗原结合结构域构建体22(图22)包括两个不同的含Fc单体的多肽(长Fc链以及短Fc链的两个拷贝)以及两个不同的轻链多肽或一个共同的轻链多肽。长Fc链包含两个串联的Fc结构域单体和N末端处具有第一特异性的抗原结合结构域,每个Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个突起形成突变(例如,S354C和T366W突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,E357K)而产生的工程化突起。短Fc链包含Fc结构域单体和N末端处具有第二特异性的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个空腔形成突变(例如,Y349C、T366S、L368A和Y407V突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,K370D)而产生的工程化空腔。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK) 293细胞中。短Fc链和长Fc链的氨基酸序列由两个单独的质粒编码。按实施例3纯化表达的蛋白质。

[0990] 实施例25.Fc-抗原结合结构域构建体23的设计和纯化

[0991] 如下所述制备使用具有不同抗原结合结构域的长Fc链和短Fc链形成的双特异性构建体。Fc-抗原结合结构域构建体23(图23)包括两个不同的含Fc单体的多肽(长Fc链以及短Fc链的三个拷贝)以及两个不同的轻链多肽或一个共同的轻链多肽。长Fc链包含三个串

联的Fc结构域单体和N末端处具有第一特异性的抗原结合结构域,每个Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个突起形成突变(例如,S354C和T366W突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,E357K)而产生的工程化突起。短Fc链包含Fc结构域单体和N末端处具有第二特异性的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个空腔形成突变(例如,Y349C、T366S、L368A和Y407V突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,K370D)而产生的工程化空腔。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK) 293细胞中。短Fc链和长Fc链的氨基酸序列由两个单独的质粒编码。按实施例3纯化表达的蛋白质。

[0992] 实施例26.Fc-抗原结合结构域构建体24的设计和纯化

[0993] 如下所述制备使用具有不同抗原结合结构域的长Fc链和短Fc链形成的双特异性构建体。Fc-抗原结合结构域构建体24(图24)包括两个不同的含Fc单体的多肽(长Fc链的两个拷贝以及短Fc链的两个拷贝)以及两个不同的轻链多肽或一个共同的轻链多肽。长Fc链包含Fc结构域单体和N末端处具有第一特异性的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有选自表4或表5的反向电荷突变(例如,K409D/D399K突变),并与具有通过引入选自表3的至少一个突起形成突变(例如,S354C和T366W突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,E357K)而产生的工程化突起的Fc结构域单体串联。短Fc链包含Fc结构域单体和N末端处具有第二特异性的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个空腔形成突变(例如,Y349C、T366S、L368A和Y407V突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,K370D)而产生的工程化空腔。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK) 293细胞中。短Fc链和长Fc链的氨基酸序列由两个单独的质粒编码。按实施例3纯化表达的蛋白质。

[0994] 实施例27.Fc-抗原结合结构域构建体25的设计和纯化

[0995] 如下所述制备使用具有不同抗原结合结构域的长Fc链和短Fc链形成的双特异性构建体。Fc-抗原结合结构域构建体25(图25)包括两个不同的含Fc单体的多肽(长Fc链的两个拷贝以及短Fc链的两个拷贝)以及两个不同的轻链多肽或一个共同的轻链多肽。长Fc链包含Fc结构域单体和N末端处具有第一特异性的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个突起形成突变(例如,S354C和T366W突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,E357K)而产生的工程化突起,并与具有选自表4或表5的反向电荷突变(例如,K409D/D399K突变)的Fc结构域单体串联。短Fc链包含Fc结构域单体和N末端处具有第二特异性的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个空腔形成突变(例如,Y349C、T366S、L368A和Y407V突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,K370D)而产生的工程化空腔。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK) 293细胞中。短Fc链和长Fc链的氨基酸序列由两个单独的质粒编码。按实施例3纯化表达的蛋白质。

[0996] 实施例28.Fc-抗原结合结构域构建体26的设计和纯化

[0997] 如下所述制备使用具有不同抗原结合结构域的长Fc链和短Fc链形成的双特异性

构建体。Fc-抗原结合结构域构建体26(图26)包括两个不同的含Fc单体的多肽(长Fc链的两个拷贝以及短Fc链的四个拷贝)以及两个不同的轻链多肽或一个共同的轻链多肽。长Fc链包含Fc结构域单体和N末端处具有第一特异性的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有选自表4或表5的反向电荷突变(例如,K409D/D399K突变),并与各自具有通过引入选自表3的至少一个突起形成突变(例如,S354C和T366W突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,E357K)而产生的工程化突起的两个Fc结构域单体串联。短Fc链包含Fc结构域单体和N末端处具有第二特异性的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个空腔形成突变(例如,Y349C、T366S、L368A和Y407V突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,K370D)而产生的工程化空腔。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK)293细胞中。短Fc链和长Fc链的氨基酸序列由两个单独的质粒编码。按实施例3纯化表达的蛋白质。

[0998] 实施例29.Fc-抗原结合结构域构建体27的设计和纯化

[0999] 如下所述制备使用具有不同抗原结合结构域的长Fc链和短Fc链形成的双特异性构建体。Fc-抗原结合结构域构建体27(图27)包括两个不同的含Fc单体的多肽(长Fc链的两个拷贝以及短Fc链的四个拷贝)以及两个不同的轻链多肽或一个共同的轻链多肽。长Fc链包含Fc结构域单体和N末端处具有第一特异性的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个突起形成突变(例如,S354C和T366W突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,E357K)而产生的工程化突起,并与具有选自表4或表5的反向电荷突变(例如,K409D/D399K突变)的Fc结构域单体、具有通过引入选自表3的至少一个突起形成突变(例如,S354C和T366W突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,E357K)而产生的工程化突起的另一个包含突起的Fc结构域单体串联。短Fc链包含Fc结构域单体和N末端处具有第二特异性的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个空腔形成突变(例如,Y349C、T366S、L368A和Y407V突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,K370D)而产生的工程化空腔。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK)293细胞中。短Fc链和长Fc链的氨基酸序列由两个单独的质粒编码。按实施例3纯化表达的蛋白质。

[1000] 实施例30.Fc-抗原结合结构域构建体28的设计和纯化

[1001] 如下所述制备使用具有不同抗原结合结构域的长Fc链和短Fc链形成的双特异性构建体。Fc-抗原结合结构域构建体28(图28)包括两个不同的含Fc单体的多肽(长Fc链的两个拷贝以及短Fc链的四个拷贝)以及两个不同的轻链多肽或一个共同的轻链多肽。长Fc链包含两个Fc结构域单体和N末端处具有第一特异性的抗原结合结构域,每个Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个突起形成突变(例如,S354C和T366W突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,E357K)而产生的工程化突起,并与具有选自表4或表5的反向电荷突变(例如,K409D/D399K突变)的Fc结构域单体串联。短Fc链包含Fc结构域单体和N末端处具有第二特异性的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有通过引入选自表3的至少一个空腔形成突变(例如,Y349C、T366S、L368A和Y407V突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(例如,K370D)而产生的工程化空腔。将DNA序列优化以在哺乳动

物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK)293细胞中。短Fc链和长Fc链的氨基酸序列由两个单独的质粒编码。按实施例3纯化表达的蛋白质。

[1002] 实施例31.Fc-抗原结合结构域构建体29的设计和纯化

[1003] 如下所述制备使用具有不同抗原结合结构域以及两组不同的异二聚化突变的长Fc链和短Fc链形成的双特异性构建体。Fc-抗原结合结构域构建体29(图29)包括三个不同的含Fc单体的多肽(长Fc链,以及两个不同的短Fc链)以及两个不同的轻链多肽或一个共同的轻链多肽。长Fc链包含Fc结构域单体,每个Fc结构域单体具有选自表3的一组不同的突起形成突变(异二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变,并与N末端处具有第一特异性的抗原结合结构域串联。第一短Fc链包含Fc结构域单体和N末端处具有第二特异性的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有选自表3的第一组空腔形成突变(异二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变。第二短Fc链包含Fc结构域单体,该Fc结构域单体具有选自表3的与第一短Fc链中的第一组突变不同的第二组空腔形成突变(异二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK)293细胞中。短Fc链和长Fc链的氨基酸序列由三个单独的质粒编码。按实施例3纯化表达的蛋白质。

[1004] 实施例32.Fc-抗原结合结构域构建体30的设计和纯化

[1005] 如下所述制备使用具有不同抗原结合结构域以及两组不同的异二聚化突变的长Fc链和短Fc链形成的双特异性构建体。Fc-抗原结合结构域构建体30(图30)包括三个不同的含Fc单体的多肽(长Fc链,以及两个不同的短Fc链)以及两个不同的轻链多肽或一个共同的轻链多肽。长Fc链包含Fc结构域单体,每个Fc结构域单体具有选自表3的一组不同的突起形成突变(异二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变,并与N末端处具有第一特异性的抗原结合结构域串联。第一短Fc链包含Fc结构域单体和N末端处具有第二特异性的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有选自表3的第一组空腔形成突变(异二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变。第二短Fc链包含Fc结构域单体和N末端处具有第一特异性的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有选自表3的与第一短Fc链中的第一组突变不同的第二组空腔形成突变(异二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK)293细胞中。短Fc链和长Fc链的氨基酸序列由三个单独的质粒编码。按实施例3纯化表达的蛋白质。

[1006] 实施例33.Fc-抗原结合结构域构建体31的设计和纯化

[1007] 如下所述制备使用具有不同抗原结合结构域以及两组不同的异二聚化突变的长Fc链和短Fc链形成的三特异性构建体。Fc-抗原结合结构域构建体31(图31)包括三个不同的含Fc单体的多肽(长Fc链,以及两个不同的短Fc链)以及三个或两个不同的轻链多肽或一个共同的轻链多肽。长Fc链包含Fc结构域单体,每个Fc结构域单体具有选自表3的一组不同的突起形成突变(异二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变,并与N末端处具有第一特异性的抗原结合结构域串联。第一短Fc链包含Fc结构域单体和N末端处具有第二特异性的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有选自表3的第一组空腔形成突变(异

二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变。第二短Fc链包含Fc结构域单体和N末端处具有第三特异性的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有选自表3的与第一短Fc链中的第一组突变不同的第二组空腔形成突变(异二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK)293细胞中。氨基酸序列是由三个单独的质粒编码的短Fc链和长Fc链。按实施例3纯化表达的蛋白质。

[1008] 实施例34.Fc-抗原结合结构域构建体32的设计和纯化

[1009] 如下所述制备使用具有不同抗原结合结构域以及两组不同的异二聚化突变的长Fc链和短Fc链形成的双特异性构建体。Fc-抗原结合结构域构建体32(图32)包括三个不同的含Fc单体的多肽(长Fc链、一个短Fc链的两个拷贝以及第二短Fc链的一个拷贝)以及两条不同的轻链多肽或一条共同的轻链多肽。长Fc链包含三个Fc结构域单体,每个Fc结构域单体具有选自表3的一组突起形成突变(异二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(第三Fc结构域单体具有与前两个不同的一组异二聚化突变),并与N末端处具有第一特异性的抗原结合结构域串联。第一短Fc链包含Fc结构域单体和N末端处具有第二特异性的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有选自表3的第一组空腔形成突变(异二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变。第二短Fc链包含Fc结构域单体,该Fc结构域单体具有选自表3的与第一短Fc链中的第一组突变不同的第二组空腔形成突变(异二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK)293细胞中。短Fc链和长Fc链的氨基酸序列由三个单独的质粒编码。按实施例3纯化表达的蛋白质。

[1010] 实施例35.Fc-抗原结合结构域构建体33的设计和纯化

[1011] 如下所述制备使用具有不同抗原结合结构域以及两组不同的异二聚化突变的长Fc链和短Fc链形成的双特异性构建体。Fc-抗原结合结构域构建体33(图33)包括三个不同的含Fc单体的多肽(长Fc链,以及第一短Fc链的两个拷贝,以及第二短Fc链的一个拷贝)以及两条不同的轻链多肽或一条共同的轻链多肽。长Fc链包含三个Fc结构域单体,每个Fc结构域单体具有选自表3的一组突起形成突变(异二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(第三Fc结构域单体具有与前两个不同的一组异二聚化突变),并与N末端处具有第一特异性的抗原结合结构域串联。第一短Fc链包含Fc结构域单体和N末端处具有第二特异性的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有选自表3的第一组空腔形成突变(异二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变。第二短Fc链包含Fc结构域单体和N末端处具有第一特异性的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有选自表3的与第一短Fc链中的第一组突变不同的第二组空腔形成突变(异二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK)293细胞中。短Fc链和长Fc链的氨基酸序列由三个单独的质粒编码。按实施例3纯化表达的蛋白质。

[1012] 实施例36.Fc-抗原结合结构域构建体34的设计和纯化

[1013] 如下所述制备使用具有不同抗原结合结构域以及两组不同的异二聚化突变的长Fc链和短Fc链形成的三特异性构建体。Fc-抗原结合结构域构建体34(图34)包括三个不同

的含Fc单体的多肽(长Fc链、第一短Fc链的两个拷贝以及第二短Fc链的一个拷贝)以及三条或两条不同的轻链多肽或一条共同的轻链多肽。长Fc链包含三个Fc结构域单体,每个Fc结构域单体具有选自表3的一组突起形成突变(异二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(第三Fc结构域单体具有与前两个不同的一组异二聚化突变),并与N末端处具有第一特异性的抗原结合结构域串联。第一短Fc链包含Fc结构域单体和N末端处具有第二特异性的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有选自表3的第一组空腔形成突变(异二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变。第二短Fc链包含Fc结构域单体和N末端处具有第三特异性的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有选自表3的与第一短Fc链中的第一组突变不同的第二组空腔形成突变(异二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK)293细胞中。短Fc链和长Fc链的氨基酸序列由三个单独的质粒编码。按实施例3纯化表达的蛋白质。

[1014] 实施例37.Fc-抗原结合结构域构建体35的设计和纯化

[1015] 如下所述制备使用具有不同抗原结合结构域以及两组不同的异二聚化突变的长Fc链和短Fc链形成的三特异性构建体。Fc-抗原结合结构域构建体35(图35)包括四个不同的含Fc单体的多肽(两个不同的长Fc链,以及两个不同的短Fc链)以及三个或两个不同的轻链多肽或一个共同的轻链多肽。第一长Fc链包含Fc结构域单体和N末端处具有第一特异性的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有选自表4或表5的反向电荷突变(例如,K409D/D399K突变),并与具有选自表3的第一组突起形成突变(异二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变的Fc结构域单体串联。第二长Fc链包含Fc结构域单体和N末端处具有第一特异性的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有选自表4或表5的反向电荷突变(例如,K409D/D399K突变),并与具有选自表3的与第一长Fc链中的第一组突变不同的第二组突起形成突变(异二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变的Fc结构域单体串联。第一短Fc链包含Fc结构域单体和N末端处具有第二特异性的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有选自表3的第一组空腔形成突变(异二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变。第二短Fc链包含Fc结构域单体和N末端处具有第三特异性的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有选自表3的与第一短Fc链中的第一组突变不同的第二组空腔形成突变(异二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK)293细胞中。短Fc链和长Fc链的氨基酸序列由四个单独的质粒编码。按实施例3纯化表达的蛋白质。

[1016] 实施例38.Fc-抗原结合结构域构建体36的设计和纯化

[1017] 如下所述制备使用具有不同抗原结合结构域以及两组不同的异二聚化突变的长Fc链和短Fc链形成的双特异性构建体。Fc-抗原结合结构域构建体36(图36)包括三个不同的含Fc单体的多肽(长Fc链的两个拷贝,以及两个不同短Fc链中每一者的两个拷贝)以及两个不同的轻链多肽或一个共同的轻链多肽。长Fc链包含Fc结构域单体和N末端处具有第一特异性的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有选自表3的第一组突起形成突变(异二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变,并与具有选自表4或表5的反向电荷突变(例如,K409D/D399K突变)的Fc结构域单体、具有选自表3的第二组突起形成突变(异二

聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变的第二Fc结构域单体串联。第一短Fc链包含Fc结构域单体,该Fc结构域单体具有选自表3的第一组空腔形成突变(异二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变。第二短Fc链包含Fc结构域单体和N末端处具有第二特异性的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有选自表3的与第一短Fc链中的第一组突变不同的第二组空腔形成突变(异二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK)293细胞中。短Fc链和长Fc链的氨基酸序列由三个单独的质粒编码。按实施例3纯化表达的蛋白质。

[1018] 实施例39.Fc-抗原结合结构域构建体37的设计和纯化

[1019] 如下所述制备使用具有不同抗原结合结构域以及两组不同的异二聚化突变的长Fc链和短Fc链形成的三特异性构建体。Fc-抗原结合结构域构建体37(图37)包括三个不同的含Fc单体的多肽(长Fc链的两个拷贝,以及两个不同短Fc链中每一者的两个拷贝)以及三个或两个不同的轻链多肽或一个共同的轻链多肽。长Fc链包含Fc结构域单体和N末端处具有第一特异性的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有选自表3的第一组突起形成突变(异二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变,并与具有选自表4或表5的反向电荷突变(例如,K409D/D399K突变)的Fc结构域单体、具有选自表3的第二组突起形成突变(异二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变的第二Fc结构域单体串联。第一短Fc链包含Fc结构域单体和N末端处具有第二特异性的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有选自表3的第一组空腔形成突变(异二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变。第二短Fc链包含Fc结构域单体和N末端处具有第三特异性的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有选自表3的与第一短Fc链中的第一组突变不同的第二组空腔形成突变(异二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK)293细胞中。短Fc链和长Fc链的氨基酸序列由三个单独的质粒编码。按实施例3纯化表达的蛋白质。

[1020] 实施例40.Fc-抗原结合结构域构建体38的设计和纯化

[1021] 如下所述制备使用具有不同抗原结合结构域以及两组不同的异二聚化突变的长Fc链和短Fc链形成的三特异性构建体。Fc-抗原结合结构域构建体38(图38)包括四个不同的含Fc单体的多肽(两个不同的长Fc链,以及两个不同的短Fc链)以及三个或两个不同的轻链多肽或一个共同的轻链多肽。第一长Fc链包含Fc结构域单体和N末端处具有第一特异性的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有选自表3的第一组突起形成突变(异二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变,并与具有选自表4或表5的反向电荷突变(例如,K409D/D399K突变)的Fc结构域单体串联。第二长Fc链包含Fc结构域单体和N末端处具有第一特异性的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有选自表3的与第一长Fc链中的第一组突变不同的第二组突起形成突变(异二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变,并与具有选自表4或表5的反向电荷突变(例如,K409D/D399K突变)的Fc结构域单体串联。第一短Fc链包含Fc结构域单体和N末端处具有第二特异性的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有选自表3的第一组空腔形成突变(异二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变。第二短Fc链包含Fc结构域单体和N末端处具有第三特异性的抗

原结合结构域,该Fc结构域单体具有选自表3的与第一短Fc链中的第一组突变不同的第二组空腔形成突变(异二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK)293细胞中。短Fc链和长Fc链的氨基酸序列由四个单独的质粒编码。按实施例3纯化表达的蛋白质。

[1022] 实施例41.Fc-抗原结合结构域构建体39的设计和纯化

[1023] 如下所述制备使用具有不同抗原结合结构域以及两组不同的异二聚化突变的长Fc链和短Fc链形成的双特异性构建体。Fc-抗原结合结构域构建体39(图39)包括三个不同的含Fc单体的多肽(长Fc链的两个拷贝,以及两个不同短Fc链中每一者的两个拷贝)以及两个不同的轻链多肽或一个共同的轻链多肽。长Fc链包含Fc结构域单体和N末端处具有第一特异性的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有选自表4或表5的反向电荷突变(例如,K409D/D399K突变),并与具有选自表3的第一组突起形成突变(异二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变的Fc结构域单体、具有选自表3的第二组突起形成突变(异二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变的第二Fc结构域单体串联。第一短Fc链包含Fc结构域单体,该Fc结构域单体具有选自表3的第一组空腔形成突变(异二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变。第二短Fc链包含Fc结构域单体和N末端处具有第二特异性的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有选自表3的与第一短Fc链中的第一组突变不同的第二组空腔形成突变(异二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK)293细胞中。短Fc链和长Fc链的氨基酸序列由三个单独的质粒编码。按实施例3纯化表达的蛋白质。

[1024] 实施例42.Fc-抗原结合结构域构建体40的设计和纯化

[1025] 如下所述制备使用具有不同抗原结合结构域以及两组不同的异二聚化突变的长Fc链和短Fc链形成的三特异性构建体。Fc-抗原结合结构域构建体40(图40)包括三个不同的含Fc单体的多肽(长Fc链的两个拷贝,以及两个不同短Fc链中每一者的两个拷贝)以及三个或两个不同的轻链多肽或一个共同的轻链多肽。长Fc链包含Fc结构域单体和N末端处具有第一特异性的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有选自表4或表5的反向电荷突变(例如,K409D/D399K突变),并与具有选自表3的第一组突起形成突变(异二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变的Fc结构域单体、具有选自表3的第二组突起形成突变(异二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变的第二Fc结构域单体串联。第一短Fc链包含Fc结构域单体和N末端处具有第二特异性的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有选自表3的第一组空腔形成突变(异二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变。第二短Fc链包含Fc结构域单体和N末端处具有第三特异性的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有选自表3的与第一短Fc链中的第一组突变不同的第二组空腔形成突变(异二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK)293细胞中。短Fc链和长Fc链的氨基酸序列由三个单独的质粒编码。按实施例3纯化表达的蛋白质。

[1026] 实施例43.Fc-抗原结合结构域构建体41的设计和纯化

[1027] 如下所述制备使用具有不同抗原结合结构域以及两组不同的异二聚化突变的长Fc链和短Fc链形成的双特异性构建体。Fc-抗原结合结构域构建体41(图41)包括三个不同的含Fc单体的多肽(长Fc链的两个拷贝,以及两个不同短Fc链中每一者的两个拷贝)以及两个不同的轻链多肽或一个共同的轻链多肽。长Fc链包含两个Fc结构域单体和N末端处具有第一特异性的抗原结合结构域,每个Fc结构域单体具有选自表3的一组不同的突起形成突变(异二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变,并与具有选自表4或表5的反向电荷突变(例如,K409D/D399K突变)的Fc结构域单体串联。第一短Fc链包含Fc结构域单体和N末端处具有第二特异性的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有选自表3的第一组空腔形成突变(异二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变。第二短Fc链包含含有空腔的Fc结构域单体,该Fc结构域单体具有选自表3的与第一短Fc链中的第一组突变不同的第二组空腔形成突变(异二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK)293细胞中。短Fc链和长Fc链的氨基酸序列由三个单独的质粒编码。按实施例3纯化表达的蛋白质。

[1028] 实施例44.Fc-抗原结合结构域构建体42的设计和纯化

[1029] 如下所述制备使用具有不同抗原结合结构域以及两组不同的异二聚化突变的长Fc链和短Fc链形成的三特异性构建体。Fc-抗原结合结构域构建体42(图42)包括三个不同的含Fc单体的多肽(长Fc链的两个拷贝,以及两个不同短Fc链中每一者的两个拷贝)以及三个或两个不同的轻链多肽或一个共同的轻链多肽。长Fc链包含两个Fc结构域单体和N末端处具有第一特异性的抗原结合结构域,每个Fc结构域单体具有选自表3的一组不同的突起形成突变(异二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变,并与具有选自表4或表5的反向电荷突变(例如,K409D/D399K突变)的Fc结构域单体串联。第一短Fc链包含Fc结构域单体和N末端处具有第二特异性的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有选自表3的第一组空腔形成突变(异二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变。第二短Fc链包含Fc结构域单体和N末端处具有第三特异性的抗原结合结构域,该Fc结构域单体具有选自表3的与第一短Fc链中的第一组突变不同的第二组空腔形成突变(异二聚化突变)以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK)293细胞中。短Fc链和长Fc链的氨基酸序列由三个单独的质粒编码。按实施例3纯化表达的蛋白质。

[1030] 实施例45.Fc-抗原结合结构域构建体的表达

[1031] Fc-抗原结合结构域构建体被设计成具有三个Fc结构域和N末端处的CTLA4 Fab结构域。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK)293细胞中。按实施例1纯化表达的蛋白质。使蛋白质在非还原性SDS-PAGE凝胶上运行(图44)。S3I和S3Y SIF抗体是包括三种不同蛋白质的六聚体,每种蛋白质由不同的质粒表达。泳道上方的数字表示转染到细胞中进行表达的质粒DNA的比例。2:1:1的比例表示在用于转染1升细胞的混合物中存在0.5mg SIF抗体长链质粒、0.25mg SIF短链质粒和0.25mg Fab轻链。以1:1:1的比例使用0.33mg每种质粒。以4:1:1的比例使用0.67mg长链、0.167mg短链和0.167mg轻链。

[1032] 将样品在95℃的Laemmli样品缓冲液(4%SDS,Bio-Rad)中变性10分钟。使样品在Criterion TGX无染色凝胶(4-15%聚丙烯酰胺,Bio-Rad)上运行。通过UV照射或考马斯蓝染色对蛋白质条带进行可视化。通过ChemiDoc MP Imaging System(Bio-Rad)对凝胶进行成像。构建体被示出为与亲本抗体类似地表达,并用类似于SIF3的技术纯化,具有最少的杂质。

[1033] 实施例46.SPR测定测量Fc与靶标和Fc γ 受体的结合

[1034] 基于构建体7和13的设计,创建了两个包含抗CTLA-4抗原结合结构域的构建体。亲本mAb以及两个Fc-抗原结合结构域构建体的抗原结合结构域均包含来自伊匹单抗的CDR。进行SPR测定以测量靶标与CTLA-4的结合(图45)。在左图中,测量了亲本mAb、Fc3Y-Fc-抗原结合结构域构建体(构建体13的具有伊匹单抗抗原结合结构域的修饰版本)和Fc3I-Fc-抗原结合结构域构建体(构建体7的具有伊匹单抗抗原结合结构域的修饰版本)的离解常数。Fc3Y-Fc显示出相对于亲本mAb的CTLA-4靶标增强的结合,而Fc3I-Fc显示出相对于亲本mAb相似的与CTLA-4靶标的结合。在右图中,示出了用于测量不同Fc-抗原结合结构域构建体的Fc γ RIIIa结合的另一SPR测定的结果。测试了伊匹单抗的三种版本,发现无岩藻糖基化可使结合增强约10倍。测试了四个Fc-抗原结合结构域构建体,即SIF3I、SIF3Y以及两个具有包含伊匹单抗CDR的相应抗原结合结构域的构建体。所有四个构建体均显示出相对于亲本mAb增强约300-800倍的Fc γ RIIIa结合。

[1035] 基于Fc-抗原结合结构域构建体7和13的设计,创建了两个包含抗CD20抗原结合结构域的构建体。亲本mAb以及两个Fc-抗原结合结构域构建体的抗原结合结构域均包含来自Gazyva(奥滨尤妥珠单抗)的CDR。进行SPR测定以测量与Fc γ IIIa和Fc γ IIa两者的结合(图46)。在左图中,无岩藻糖基化使与Fc γ IIIa的结合增强了约10倍,而所有Fc-抗原结合结构域构建体均显示出相对于mAb增强>100倍的与Fc γ IIIa的结合。在右图中,无岩藻糖基化对与Fc γ IIa的结合几乎没有影响,但所有Fc-抗原结合结构域构建体均显示出相对于mAb增强>100倍的与Fc γ IIa的结合。

[1036] 实施例47.Fc-抗原结合结构域构建体对CDC、ADCP和ADCC的激活

[1037] 使用三种测定来测试亲本mAb和各种Fc-抗原结合结构域构建体对CDC、ADCP和ADCC途径的激活。创建了四个构建体,它们包含来自Gazyva(奥滨尤妥珠单抗)(抗CD20单克隆抗体)的CDR。制备了岩藻糖基化和无岩藻糖基化mAb以及S3Y(实施例2中所述的构建体13的结构,图13)和SAI(实施例1中所述的构建体7的结构,图7)Fc-抗原结合结构域构建体。CDC测定如下进行:

[1038] 1.抗CD20 CDC测定中使用的靶细胞是Raji淋巴母细胞人B细胞系(ATCC CCL-86)。通过离心从悬浮培养物中除去Raji细胞,并将其以 6×10^5 个细胞/ml重悬于X-VIVO 15培养基中。

[1039] 2.将Raji细胞以每孔100 μ l的体积(6×10^4 个细胞/孔)转移到96孔平底测定板中。

[1040] 3.将每种抗CD20单克隆抗体(mAb)和SIF抗体在X-VIVO 15培养基中稀释至3.33 μ M。然后在1.5ml聚丙烯管中分别用抗CD20 mAb和SIF抗体进行1:3连续稀释,得到11点稀释系列。

[1041] 4.将抗CD20 mAb和SIF抗体的每种稀释液以50 μ l/孔转移到测定板上的适当孔中。

[1042] 5.转移抗CD20 mAb和SIF抗体后,立即将50 μ l正常人血清补体转移到测定板的每

个孔中。

[1043] 6. 将测定板在37℃和5%CO₂下温育2小时。

[1044] 7. 温育2小时后,将20μl的WST-1增殖试剂添加到测定板的每个孔中。

[1045] 8. 将该板放回到37℃、5%CO₂的温育箱保持14小时。

[1046] 9. 温育14小时后,将板在板振荡器上振荡1分钟,并立即使用分光光度计以600nm校正正在450nm处测定孔的吸光度。

[1047] 在靶细胞为Raji的CDC测定中(图47,左图),S3Y(构建体13(CD20))构建体能够介导细胞毒性,而其他构建体则不能。

[1048] ADCP测定如下进行:

[1049] Fc γ RIIa-H ADCP报告基因生物测定完整试剂盒(Promega,目录号G9901)是一种基于生物发光细胞的测定,可以用于测量抗体和具有Fc结构域(特异性结合和激活Fc γ RIIa)的其他生物制剂的效力和稳定性。该测定由表达高亲和力人FcγRIIa-H变体的遗传工程化Jurkat T细胞系组成,该变体在氨基酸131处含有组氨酸(H)并且含有由NFAT响应元件(NFAT-RE)驱动的荧光素酶报告基因。当与靶细胞和相关抗体共培养时,Fc γ RIIa-H效应细胞结合抗体的Fc结构域,从而引起Fc γ RIIa信号传导和NFAT-RE介导的荧光素酶活性。使用Bio-Glo™荧光素酶测定系统和标准发光计检测并定量生物发光信号。在图47中图中指定的浓度下将递增浓度的抗CD20 Ab和抗CD20构建体(构建体7(CD20)或构建体13(CD20))与Raji(CD20+)靶细胞和Fc一起温育,将递增浓度的抗CD20 Ab和构建体与Raji(CD20+)靶细胞和Fc γ RIIa-H效应细胞(2:1E:T比;大约35,000个效应子:15,000个靶细胞)一起温育。在37℃下温育6小时。添加Bio-Glo™试剂,并在PHERAstar FS仪器中测量发光。使用GraphPad Prism软件RIIa-H效应细胞(2:1E:T比;大约35,000个效应子:15,000个靶细胞)在图47中图中指定的浓度下将数据拟合为4PL曲线。在37℃下温育6小时。添加Bio-Glo™试剂,并在PHERAstar FS仪器中测量发光。使用GraphPad Prism软件将数据拟合为4PL曲线(图47,中图)。SAI(构建体7(CD20))和S3Y(构建体13(CD20))构建体均显示出相对于mAb增强>100倍的效力。

[1050] ADCC测定如下进行:

[1051] 将人原代NK效应细胞(Hemacare)解冻,并使其在淋巴细胞生长培养基-3(Lonza)中以 5×10^5 个/mL在37℃下静息过夜。第二天,收获人淋巴母细胞系Raji靶细胞(ATCC CCL-86),将其重悬于测定培养基(无酚红RPMI,10%FBS Δ,GlutaMAX™)中,并在37℃下在各种浓度的每种目的探针存在下铺板30分钟。然后收获静息NK细胞,将其重悬于测定培养基中,并添加到含有抗CD20包被的Raji细胞的板中。将板在37℃下温育6小时,其中效应子与靶细胞的最终比例为5:1(5×10^4 个NK细胞:1x10⁴个Raji)。

[1052] 使用CytoTox-Glo™细胞毒性测定试剂盒(Promega)来确定ADCC活性。CytoTox-Glo™测定使用发光肽底物来测量死细胞蛋白酶活性,该蛋白酶活性由已经丧失膜完整性的细胞(例如,裂解的Raji细胞)释放。温育6小时后,将制备的试剂(底物)添加到板的每个孔中,并在室温下置于定轨板振荡器上15分钟。使用PHERAstar F5读板仪(BMG Labtech)测量发光。从测试条件中减去对照条件(仅NK细胞+Raji)的读数以消除背景后,分析数据(图47,右图)。SAI(构建体7(CD20))和S3Y(构建体13(CD20))构建体均显示出相对于岩藻糖基化mAb增强的细胞毒性,以及相对于无岩藻糖基化mAb相似的细胞毒性。

[1053] 使用基于伊匹单抗抗体的构建体进行一组相似的测定。创建了四个构建体,它们包含来自抗伊匹单抗(一种CTLA-4单克隆抗体)的CDR。制备了岩藻糖基化和无岩藻糖基化mAb以及S3Y(构建体13(CTLA-4))和SAI(构建体7(CTLA-4))Fc-抗原结合结构域构建体。在靶细胞为CTLA-4转染的HEK细胞的CDC测定(图48,左图)中,SAI(构建体7(CTLA-4))和S3Y(构建体13(CTLA-4))构建体显示出相对于两个mAb构建体增强的细胞毒性。用靶向CTLA-4转染的HEK细胞的测定法测试ADCP激活(图48,中图)。SAI(构建体7(CTLA-4))和S3Y(构建体13(CTLA-4))构建体均显示出相对于两个mAb增强的吞噬作用。使用CTLA-4转染的HEK靶细胞测定ADCC(图48,右图)。SAI(构建体7(CTLA-4))和S3Y(构建体13(CTLA-4))构建体均显示出相对于岩藻糖基化mAb增强的细胞毒性,以及相对于无岩藻糖基化mAb相似的细胞毒性。

[1054] 使用基于抗体的构建体进行了一组相似的测定。创建了四个构建体,它们包含来自抗PD-L1单克隆抗体的CDR。制备了岩藻糖基化和无岩藻糖基化mAb以及S3Y(构建体13(PD-L1))和SAI(构建体7(PD-L1))Fc-抗原结合结构域构建体。使用PD-L1转染的HEK靶细胞测定ADCC(图49,左图)。SAI(构建体7(PD-L1))和S3Y(构建体13(PD-L1))构建体均显示出与岩藻糖基化和无岩藻糖基化mAb相似的细胞毒性。用靶向PD-L1转染的HEK细胞的测定法测试ADCP激活(图49,中图)。SAI(构建体7(PD-L1))和S3Y(构建体13(PD-L1))构建体均激活了吞噬作用,而mAb均未激活。在靶向PD-L1转染的HEK细胞的CDC测定(图49,右图)中,S3Y(构建体13(PD-L1))构建体能够介导细胞毒性,而其他构建体则不能。

[1055] 实施例48.用于表征Fc-抗原结合结构域构建体的实验分析

[1056] 肽和糖肽液相色谱-MS/MS

[1057] 将蛋白质在6M胍(Sigma)中稀释至 $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。添加二硫苏糖醇(DTT),使浓度为 10mM ,以在 65°C 的变性条件下还原二硫键30分钟。在冰上冷却后,将样品与 30mM 碘乙酰胺(IAM)一起在黑暗中温育1小时,以使游离硫醇烷基化(氨甲酰甲基化)。然后将蛋白质通过 10-kDa 膜透析到 25mM 碳酸氢铵缓冲液($\text{pH } 7.8$)中,以除去IAM、DTT和胍。在Barocycler(NEP 2320; Pressure Biosciences, Inc.)中用胰蛋白酶消化蛋白质。使压力在 37°C 下在 $20,000\text{psi}$ 与环境压力之间循环,1小时内总共进行30次循环。在Ultimate 3000(Dionex)色谱系统和Q-Exactive(Thermo Fisher Scientific)质谱仪上进行肽的LC-MS/MS分析。使用 0.1% FA的水溶液和 0.1% FA的乙腈溶液作为流动相,在BEH PepMap(Waters)柱上分离肽。基于双重荷电离子($z=2$) m/z 842.5与 $\pm 1.5\text{Da}$ 的四极分离宽度,靶向单个木糖基化的接头肽。

[1058] 完整的质谱分析

[1059] 在由 78.98% 水、 20% 乙腈、 1% 甲酸(FA)和 0.02% 三氟乙酸组成的运行缓冲液中将蛋白质稀释至 $2\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的浓度。尺寸排阻层析分离在串联的两个Zenix-C SEC-300(Sepax Technologies, Newark, DE) $2.1\times 350\text{mm}$ 上执行,总柱长度为 700mm 。使用上述运行缓冲液以 $80\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速从SEC柱中洗脱蛋白质。在以正模式操作的QSTAR Elite(Applied Biosystems)Q-ToF质谱仪上获得质谱。通过对跨越层析峰的整个宽度的光谱求和,使用贝叶斯峰解卷积,将在各个尺寸级分下的中性质量解卷积。

[1060] 毛细管电泳-十二烷基硫酸钠(CE-SDS)测定

[1061] 将样品稀释至 $1\text{mg}/\text{mL}$,并与HT Protein Express变性缓冲液(PerkinElmer)混合。将混合物在 40°C 下温育20分钟。将样品用 $70\mu\text{L}$ 水稀释且转移至96孔板。通过配备有HT Protein Express LabChip(PerkinElmer)的Caliper GXII仪器(PerkinElmer)分析样品。

使用荧光强度来计算每种尺寸变体的相对丰度。

[1062] 非还原性SDS-PAGE

[1063] 将样品在95℃的Laemmli样品缓冲液(4% SDS, Bio-Rad)中变性10分钟。使样品在Criterion TGX无染色凝胶(4-15%聚丙烯酰胺, Bio-Rad)上运行。通过UV照射或考马斯蓝染色对蛋白质条带进行可视化。通过ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad)对凝胶进行成像。使用Imagelab 4.0.1软件(Bio-Rad)执行条带的定量。

[1064] 补体依赖性细胞毒性(CDC)

[1065] 通过比色测定评估CDC,在该比色测定中,将Raji细胞(ATCC)用连续稀释的利妥昔单抗、Fc构建体4或IVIg包被。将人血清补体(Quidel)以25% v/v添加到所有孔中,并且在37℃下温育2小时。在添加WST-1细胞增殖试剂(Roche Applied Science)后,将细胞在37℃下温育12小时。将板放置在振荡器上2分钟,并且测量450nm处的吸光度。

[1066] 实施例49.通过旋钮-进入-孔洞技术优化异二聚化

[1067] 将表达以下两项的质粒转染到HEK293细胞中:具有三个Fc结构域和两个“分支”亚基中的旋钮-进入-孔洞突变的Fc构建体的长多肽和短多肽(Fc构建体A),或具有三个Fc结构域和两个“分支”亚基中的旋钮-进入-孔洞和静电转向突变的Fc构建体的长多肽和短多肽(Fc构建体B)。在培养七天后,通过离心清除细胞,并且通过非还原性SDS-PAGE分离原始培养基上清液(图10)。所显现的蛋白质条带的密度计分析表明,具有三个Fc结构域的Fc构建体A和具有三个Fc结构域(Fc3)的Fc构建体B以相似水平表达。Fc构建体A的构建体表达显著更高水平的污染性二聚体(Fc2)物质(图51)。两组构建体均表达相似水平的单体物质(Fc1)。图像中存在的另外条带代表存在于模拟转染的对照中的培养基组分。

[1068] 这些结果表明,在“分支”亚基中具有促进异二聚化的静电转向突变和促进异二聚化的旋钮-进入-孔洞突变两者增强了Fc构建体中异二聚体Fc结构域的形成,优化了具有三个Fc结构域的Fc构建体的装配,并且改善了包含Fc构建体的组合物的同质性。

[1069] 实施例50.用于控制同二聚化的静电转向

[1070] 为了最小化亚基的错配缔合(其会产生不希望的高分子量低聚体和多聚体),将有利于异二聚化的突变(例如,旋钮和孔洞)引入“分支”亚基中。这些氨基酸置换保留了旋钮亚基对孔洞配对物的吸引力,同时阻碍了旋钮亚基之间的缔合。由于旋钮突变也会抑制野生型Fc序列的装配,因此人们质疑是否有必要包括另外的突变,以进一步降低“茎”Fc亚基对旋钮和孔洞“分支”亚基的亲和力。为了解决该问题,产生了Fc构建体长多肽,该长多肽在羧基末端“茎”亚基中包含野生型Fc结构域单体序列并且在氨基末端“分支”亚基中包含携带旋钮突变的Fc结构域单体。相应的短多肽是携带孔洞突变的Fc结构域单体。该Fc构建体基于Fc构建体A中的多肽的序列,但在每个长多肽的羧基末端“茎”亚基中具有野生型Fc结构域单体序列。

[1071] 用表达Fc构建体A(其在每个长多肽的羧基末端“茎”亚基中的Fc结构域单体中具有同二聚化静电转向突变)或基于Fc构建体A的Fc构建体(其中每个长多肽的羧基末端“茎”亚基中的Fc结构域单体被替换为野生型Fc结构域单体序列(SEQ ID NO:42))的质粒共转染HEK293细胞。在培养七天后,通过离心清除细胞,并且通过非还原性SDS-PAGE分离原始培养基上清液。对染色蛋白进行成像表明,在“茎”亚基中不具有静电转向突变的Fc构建体(图52中标记为“无静电转向”(泳道1-3))比Fc构建体A配对物(图52中标记为“具有静电转向”(泳

道4和5)) 包含高得多水平的单体 (Fc1) 和二聚体 (Fc2)。此外,可以检测到比三聚体数量大得多的分子量更高的条带(图52中的泳道1-3)。

[1072] 这些结果证实,在“茎”亚基中具有促进同二聚化的静电转向突变进一步增强了Fc构建体中同二聚体Fc结构域的形成,优化了具有三个Fc结构域的Fc构建体的装配,并且改善了包含Fc构建体的组合物的同质性。

[1073] 实施例51.具有抗CD20抗原结合结构域或抗PD-L1抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体4的设计和纯化

[1074] 蛋白质表达

[1075] 如下所述制备由不对称串联Fc结构域形成的构建体。Fc-抗原结合结构域构建体4 (CD20) 和构建体4 (PD-L1) 各自分别包括两个不同的含Fc结构域单体的多肽(长Fc链 (SEQ ID NO:66),以及抗CD20短Fc链 (SEQ ID NO:67) 或抗PD-L1 Fc链 (SEQ ID NO:68) 的三个拷贝) 以及抗CD20轻链多肽 (SEQ ID NO:61) 或抗PD-L1轻链多肽 (SEQ ID NO:49) 的三个拷贝。长Fc链包含三个串联的Fc结构域单体,其中每个Fc结构域单体具有E357K电荷突变以及S354C和T366W突起形成突变(以促进异二聚化)。短Fc链包含具有K370D电荷突变和Y349C、T366S、L368A和Y407V空腔形成突变(以促进异二聚化)的Fc结构域单体,以及N末端的抗CD20 VH和CH1结构域(EU位置1-220) (构建体4 (CD20)) 或N末端的抗PD-L1 VH和CH1结构域(EU位置1-220) (构建体4 (PD-L1))。也可以将抗CD20轻链或PD-L1轻链表达为作为scFv的一部分与短Fc链的N末端融合。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾 (HEK) 293细胞中。表7中每个构建体的以下氨基酸序列由三个单独的质粒(一个质粒编码轻链(抗CD20或抗PD-L1),一个质粒编码长Fc链,并且一个质粒编码短Fc链(抗CD20或抗PD-L1)) 编码:

[1076] 表7. 构建体4 (CD20) 和构建体4 (PD-L1) 序列

[1077]

构建体	轻链	长 Fc 链	短 Fc 链 (具有抗 CD20 或 抗 PD-L1 VH 和 CH1)
构建体 4 (CD20)	SEQ ID NO: 61 DIVMTQTPLSLP VTPGEPASISCRS SKSLLHSNGITY LYWYLQKPGQS PQLLIYQMSNLV SGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVE AEDVGVYYCAQ NLELPYTFGGGT KVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNN FYPREAKVQWK VDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDST YSLSSITLTLSKA DYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTK SFNRGEC	SEQ ID NO: 66 DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQA WLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQ VYTLPPCRDKLT KNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ	SEQ ID NO: 67 QVQLVQSGAEV KKPGSSVKVSC KASGYAFSYSWI NWVRQAPGQGL EWMGRIFPGDG DTDYNGKFKGR VTITADKSTSTA YMEISSLRSEDY AVYYCARNVFD GYWLVYWGQG TLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLV KDYFPEPVTVS WNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNH KPSNTKVDKKV

[1078]

		KSLSLSPGKGGG GGGGGGGGGG GGGGGGGDKTH TCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGV EVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNK ALPAIEKTISKA KGQPREPQVYT LPPCRDKLTKNQ VSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSL SPGKGGGGGGG GGGGGGGGGG GGGDKTHTCPP CPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQY NSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKE YKCKVSNKALP APIEKTISKAKG QPREPQVYTLPP CRDKLTKNQVS LWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQ PENNYKTTPPV DSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGN VFSCSVMHEAL	EPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVH NAKTKPREEQY NSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKE YKCKVSNKALP APIEKTISKAKG QPREPQVCTLPP SRDELTKNQVSL SCAVDGFYPSDI AVEWESNGQPE NNYKTTPPVLD DGSFFLVSKLTV DKSRRWQQGNVF SCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG

[1079]

		HNHYTQKSLSLSPG	
构建体 4 (PD-L1)	SEQ ID NO: 49 QSALTQPASVSG SPGQSITISCTGT SSDVGGYNYVS WYQQHPGKAPK LMIYDVSNRPSG VSNRFSGSKSGN TASLTISGLQAE DEADYYCSSYTS SSTRVFGTGTKV TVLGQPKANPT VTLFPPSSEELQ ANKATLVCLISD FYPGAVTVAWK ADGSPVKAGVE TTKPSKQSNK YAASSYLSLTPE QWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKT VAPTECS	SEQ ID NO: 66 DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQ VYTLPPCRDKLT KNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPGKGGG GGGGGGGGGG GGGGGGGDKTH TCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGV EVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYT LPPCRDKLTKNQ VSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEA	SEQ ID NO: 68 EVQLLES GGGL VQPGGSLRLSCA ASGFTFSSYIMM WVRQAPGKGLE WVSSIYPSGGITF YADTVKGRFTIS RDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAV YYCARIKLGTVT TVDYWGGQGLV TVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEK TISKAKGQPREP QVCTLPPSRDEL TKNQVSLSCAV DGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSF FLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPG

[1080]

		LHNHYTQKSLSL SPGKGGGGGGG GGGGGGGGGG GGGDKTHTCPP CPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQY NSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKE YKCKVSNKALP APIEKTISKAKG QPREPQVYTLPP CRDKLTKNQVS LWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQ PENNYKTPPVL DSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGN VFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSL PG	

[1081] 使用Poros MabCapture A(Life Technologies)柱,通过基于蛋白A的亲合柱色谱法从细胞培养上清液中纯化表达的蛋白质。将捕获的Fc-抗原结合结构域构建体用磷酸盐缓冲盐水(低盐洗涤液)洗涤,并用100mM甘氨酸(pH 3)洗脱。洗脱物通过加入1M TRIS pH 7.4快速中和,并且通过0.2 μ m过滤器无菌过滤。使用Poros XS树脂(Applied Biosciences),通过离子交换色谱法进一步分离蛋白质。用50mM MES(pH 6,缓冲液A)预平衡柱,并且使用50mM MES、400mM氯化钠(pH 6,缓冲液B)作为洗脱缓冲液,用步进梯度洗脱样品。在离子交换后,在切向流过滤系统上,使用10kDa截止聚醚砜(PES)膜滤筒将目标级分缓冲交换到PBS缓冲液中。将样品浓缩至大约30mg/mL,并且通过0.2 μ m过滤器无菌过滤。

[1082] 非还原性十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

[1083] 将样品在95℃的Laemmli样品缓冲液(4%SDS,Bio-Rad)中变性10分钟。使样品在Criterion TGX无染色凝胶(4-15%聚丙烯酰胺,Bio-Rad)上运行。通过UV照射或考马斯蓝染色对蛋白质条带进行可视化。通过ChemiDoc MP Imaging System(Bio-Rad)对凝胶进行成像。使用Imagelab 4.0.1软件(Bio-Rad)执行条带的定量。

[1084] 实施例52.具有抗CD20抗原结合结构域或抗PD-L1抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体8的设计和纯化

[1085] 蛋白质表达

[1086] 如下所述制备由其中分支点在N末端Fc结构域的单分支Fc结构域形成的构建体。Fc-抗原结合结构域构建体8(CD20)和构建体8(PD-L1)各自分别包括两个不同的含Fc结构

域单体的多肽(长Fc链(SEQ ID NO:69)的两个拷贝)以及抗CD20短Fc链(SEQ ID NO:67)或抗PD-L1短Fc链(SEQ ID NO:68)的两个拷贝)以及抗CD20轻链多肽(SEQ ID NO:61)或抗PD-L1轻链多肽(SEQ ID NO:49)的拷贝。长Fc链包含具有E357K电荷突变以及S354C和T366W突起形成突变(以促进异二聚化)并与具有反向电荷突变K409D和D399K(以促进同二聚化)的Fc结构域单体串联的Fc结构域单体。短Fc链包含具有K370D电荷突变和Y349C、T366S、L368A和Y407V空腔形成突变(以促进异二聚化)的Fc结构域单体,以及N末端的抗CD20 VH和CH1结构域(EU位置1-220)(构建体8(CD20))或N末端的抗PD-L1 VH和CH1结构域(EU位置1-220)(构建体8(PD-L1))。也可以将抗CD20轻链或PD-L1轻链表达为作为scFv的一部分与短Fc链的N末端融合。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK)293细胞中。表8中每个构建体的以下氨基酸序列由三个单独的质粒(一个质粒编码轻链(抗CD20或抗PD-L1),一个质粒编码长Fc链,并且一个质粒编码短Fc链(抗CD20或抗PD-L1))编码:

[1087] 表8. 构建体8(CD20)和构建体8(PD-L1)序列

[1088]

构建体	轻链	长 Fc 链	短 Fc 链 (具有抗 CD20 或 抗 PD-L1 VH 和 CH1)
构建体 8 (CD20)	SEQ ID NO: 61 DIVMTQTPLSLP VTPGEPASISCRS SKSLLHSNGITY LYWYLQKPGQS PQLLIYQMSNLV SGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVE AEDVGVYYCAQ NLELPYTFGGGT KVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKS	SEQ ID NO: 69 DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQA WLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQ	SEQ ID NO: 67 QVQLVQSGAEV KKPGSSVKVSC KASGYAFSYSWI NWVRQAPGQGL EWMGRIFPGDG DTDYNGKFKGR VTITADKSTSTA YMEISSLRSED AVYYCARNVFD GYWLVYWGQG TLVTVSSASTKG

[1089]

	GTASVVCLLNN FYPREAKVQWK VDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDST YSLSSLTLSKA DYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTK SFNRGEC	VYTLPPSRDEL KNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKT TPPVLKSDGSFF LYSDLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPGKGGG GGGGGGGGGG GGGGGGGGDKTH TCPPCPAPPELLG GPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGV EVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYT LPPCRDKLTKNQ VSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSL SPG	PSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLV KDYFPEPVTVS WNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNH KPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVH NAKTKPREEQY NSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKE YKCKVSNKALP APIEKTISKAKG QPREPQVCTLPP SRDELTKNQVSL SCAVDGFYPSDI AVEWESNGQPE NNYKTTPPVLD DGSFFLVSKLTV DKSRWQQGNVF SCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG
构建体 8 (PD-L1)	SEQ ID NO: 49 QSALTQPASVSG SPGQSITISCTGT SSDVGGYNYVS WYQQHPGKAPK LMIYDVSNRPSG VSNRFSGSKSGN TASLTISGLQAE DEADYYCSSYTS SSTRVFGTGTKV TVLGQPKANPT VTLFPPSSEELQ	SEQ ID NO: 69 DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQ	SEQ ID NO: 68 EVQLLESQGGGL VQPGGSLRLSCA ASGFTFSSYIMM WVRQAPGKGLE WVSSIYPSGGITF YADTVKGRFTIS RDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAV YYCARIKLGTVT TVDYWGQGTLV TVSSASTKGPSV

[1090]

ANKATLVCLISD FYPGAVTVAWK ADGSPVKAGVE TTKPSKQSNNK YAASSYLSLTPE QWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKT VAPTECS	VYTLPPSRDEL KNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKT TPPVLKSDGSFF LYSDLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPGKGGG GGGGGGGGGG GGGGGGGDKTH TCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGV EVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYT LPPCRDKLTKNQ VSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSL SPG	FPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEK TISKAKGQPREP QVCTLPSPRDEL TKNQVSLSCAV DGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSF FLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPG

[1091] 使用Poros MabCapture A (Life Technologies) 柱,通过基于蛋白A的亲和柱色谱法从细胞培养上清液中纯化表达的蛋白质。将捕获的Fc-抗原结合结构域构建体用磷酸盐缓冲盐水(低盐洗涤液)洗涤,并用100mM甘氨酸(pH 3)洗脱。洗脱物通过加入1M TRIS pH 7.4快速中和,并且通过0.2 μ m过滤器无菌过滤。使用Poros XS树脂(Applied Biosciences),通过离子交换色谱法进一步分离蛋白质。用50mM MES(pH 6,缓冲液A)预平衡柱,并且使用50mM MES、400mM氯化钠(pH 6,缓冲液B)作为洗脱缓冲液,用步进梯度洗脱样品。在离子交换后,在切向流过滤系统上,使用10kDa截止聚醚砜(PES)膜滤筒将目标级分缓冲交换到PBS缓冲液中。将样品浓缩至大约30mg/mL,并且通过0.2 μ m过滤器无菌过滤。

[1092] 非还原性十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

[1093] 将样品在95 $^{\circ}$ C的Laemmli样品缓冲液(4% SDS, Bio-Rad)中变性10分钟。使样品在Criterion TGX无染色凝胶(4-15%聚丙烯酰胺, Bio-Rad)上运行。通过UV照射或考马斯蓝染色对蛋白质条带进行可视化。通过ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad)对凝胶进行

成像。使用Imagelab 4.0.1软件(Bio-Rad)执行条带的定量。

[1094] 实施例53.具有抗CD20抗原结合结构域或抗PD-L1抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体9的设计和纯化

[1095] 蛋白质表达

[1096] 如下所述制备由其中分支点在N末端Fc结构域的单分支Fc结构域形成的构建体。Fc-抗原结合结构域构建体9 (CD20) 和构建体9 (PD-L1) 各自分别包括两个不同的含Fc域单体的多肽(抗CD20长Fc链 (SEQ ID NO:62) 或抗PD-L1长Fc链 (SEQ ID NO:54) 的两个拷贝) 以及抗CD20短Fc链 (SEQ ID NO:67) 或抗PD-L1短Fc链 (SEQ ID NO:68) 的两个拷贝), 以及抗CD20轻链多肽 (SEQ ID NO:61) 或抗PD-L1轻链多肽 (SEQ ID NO:49) 的拷贝。长Fc链包含Fc结构域单体和N末端处的抗CD20 VH和CH1结构域 (EU位置1-220) (构建体9 (CD20)) 或N末端处的抗PD-L1 VH和CH1结构域 (EU位置1-220) (构建体9 (PD-L1)), 该Fc结构域单体具有E357K电荷突变以及S354C和T366W突起形成突变 (以促进异二聚化), 并与具有反向电荷突变K409D和D399K (以促进同二聚化) 的Fc结构域单体串联。短Fc链包含具有K370D电荷突变以及Y349C、T366S、L368A和Y407V空腔形成突变 (以促进异二聚化) 的Fc结构域单体, 以及N末端处的抗CD20重链 (构建体9 (CD20)) 或N末端处的抗PD-L1重链 (构建体9 (PD-L1))。也可以将抗CD20轻链或PD-L1轻链表达为作为scFv的一部分与长Fc链和/或短Fc链的N末端融合。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达, 并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾 (HEK) 293细胞中。表9中每个构建体的以下氨基酸序列由三个单独的质粒 (一个质粒编码轻链 (抗CD20或抗PD-L1), 一个质粒编码长Fc链 (抗CD20或抗PD-L1), 并且一个质粒编码短Fc链 (抗CD20或抗PD-L1)) 编码:

[1097] 表9. 构建体9 (CD20) 和构建体9 (PD-L1) 序列

[1098]	构建体	轻链	长 Fc 链 (具有抗 CD20 或 抗 PD-L1 VH 和 CH1)	短 Fc 链 (具有抗 CD20 或 抗 PD-L1 VH 和 CH1)
	构建体 9 (CD20)	SEQ ID NO: 61 DIVMTQTPLSLP	SEQ ID NO: 62 QVQLVQSGAEV	SEQ ID NO: 67 QVQLVQSGAEV

[1099]

VTPGEPASISCRS SKSLLHSNGITY LYWYLQKPGQS PQLLIYQMSNLV SGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVE AEDVG VYYCAQ NLELPYTFGGGT KVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNN FYPREAKVQWK VDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKA DYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTK SFNRGEC	KKPGSSVKVSC KASGYAFSYSWI NWVRQAPGQGL EWMGRIFPGDG DTDYNGKFKGR VTITADKSTSTA YMELSSLRSED AVYYCARNVFD GYWLVYWGQG TLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLV KDYFPEPVTVS WNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNH KPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVH NAKTKPREEQY NSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKE YKCKVSNKALP APIEKTISKAKG QPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPE NNYKTTTPVLKS DGSFFLYSDLTV DKSRWQQGNVF SCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG KGGGGGGGGG GGGGGGGGGG GDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISR	KKPGSSVKVSC KASGYAFSYSWI NWVRQAPGQGL EWMGRIFPGDG DTDYNGKFKGR VTITADKSTSTA YMELSSLRSED AVYYCARNVFD GYWLVYWGQG TLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLV KDYFPEPVTVS WNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNH KPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVH NAKTKPREEQY NSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKE YKCKVSNKALP APIEKTISKAKG QPREPQVCTLPP SRDELTKNQVSL SCAVDGFYPSDI AVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDS DGSFFLVSKLTV DKSRWQQGNVF SCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG

[1100]

		TPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEK TISKAKGQPREP QVYTLPPCRDKL TKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPG	
构建体 9 (PD-L1)	SEQ ID NO: 49 QSALTQPASVSG SPGQSITISCTGT SSDVGGYNYVS WYQQHPGKAPK LMIYDVSNRPSG VSNRFSGSKSGN TASLTISGLQAE DEADYYCSSYTS SSTRVFGTGTKV TVLGQPKANPT VTLFPPSSEELQ ANKATLVCLISD FYPGAVTVAWK ADGSPVKAGVE TTKPSKQSNNK YAASSYLSLTPE QWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKT VAPTECS	SEQ ID NO: 54 EVQLLESGGGL VQPGGSLRLSCA ASGFTFSSYIMM WVRQAPGKGLE WVSSIYPSGGITF YADTVKGRFTIS RDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAV YYCARIKLGTVT TVDYWGQGTLV TVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAK	SEQ ID NO: 68 EVQLLESGGGL VQPGGSLRLSCA ASGFTFSSYIMM WVRQAPGKGLE WVSSIYPSGGITF YADTVKGRFTIS RDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAV YYCARIKLGTVT TVDYWGQGTLV TVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAK

[1101]

		TKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEK TISKAKGQPREP QVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYK TTPPV LKSDGSF FLYSDLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPGKGGG GGGGGGGGGGG GGGGGGGGDKTH TCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGV EVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYT LPPCRDKLTKNQ VSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPV LSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSL SPG	TKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEK TISKAKGQPREP QVCTLPPSRDEL TKNQVSLSCAV DGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYK TTPPV LKSDGSF FLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPG

[1102] 使用Poros MabCapture A (LifeTechnologies) 柱,通过基于蛋白A的亲和柱色谱法从细胞培养上清液中纯化表达的蛋白质。将捕获的Fc-抗原结合结构域构建体用磷酸盐缓冲盐水(低盐洗涤液)洗涤,并用100mM甘氨酸(pH 3)洗脱。洗脱物通过加入1M TRIS pH 7.4快速中和,并且通过0.2 μ m过滤器无菌过滤。使用Poros XS树脂(Applied Biosciences),通过离子交换色谱法进一步分离蛋白质。用50mM MES(pH 6,缓冲液A)预平衡柱,并且使用50mM MES、400mM氯化钠(pH 6,缓冲液B)作为洗脱缓冲液,用步进梯度洗脱样品。在离子交换后,在切向流过滤系统上,使用10kDa截止聚醚砜(PES)膜滤筒将目标级分缓冲交换到PBS缓冲液中。将样品浓缩至大约30mg/mL,并且通过0.2 μ m过滤器无菌过滤。

[1103] 非还原性十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

[1104] 将样品在95℃的Laemmli样品缓冲液 (4% SDS, Bio-Rad) 中变性10分钟。使样品在 Criterion TGX无染色凝胶 (4-15% 聚丙烯酰胺, Bio-Rad) 上运行。通过UV照射或考马斯蓝染色对蛋白质条带进行可视化。通过ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad) 对凝胶进行成像。使用Imagelab 4.0.1软件 (Bio-Rad) 执行条带的定量。

[1105] 实施例54. 具有抗CD20抗原结合结构域或抗PD-L1抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体10的设计和纯化

[1106] 蛋白质表达

[1107] 如下所述制备由其中分支点在N末端Fc结构域的单分支Fc结构域形成的构建体。Fc-抗原结合结构域构建体10 (CD20) 和构建体10 (PD-L1) 各自分别包括两个不同的含Fc域单体的多肽 (抗CD20长Fc链 (SEQ ID NO:70) 或抗PD-L1长Fc链 (SEQ ID NO:71) 的两个拷贝) 以及短Fc链 (SEQ ID NO:63) 的四个拷贝), 以及抗CD20轻链多肽 (SEQ ID NO:61) 或抗PD-L1轻链多肽 (SEQ ID NO:49) 的拷贝。长Fc链包含两个串联的Fc结构域单体和N末端处的抗CD20 VH和CH1结构域 (EU位置1-220) (构建体10 (CD20)) 或N末端处的抗PD-L1 VH和CH1结构域 (EU位置1-220) (构建体10 (PD-L1)), 其中每个Fc结构域单体具有E357K电荷突变以及S354C和T366W突起形成突变 (以促进异二聚化), 并与具有反向电荷突变K409D和D399K (以促进同二聚化) 的Fc结构域单体串联。短Fc链包含具有K370D电荷突变和Y349C、T366S、L368A和Y407V空腔形成突变 (以促进异二聚化) 的Fc结构域单体。也可以将抗CD20轻链或PD-L1轻链表达为作为scFv的一部分与长Fc链的N末端融合。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达, 并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾 (HEK) 293细胞中。表10中每个构建体的以下氨基酸序列由三个单独的质粒 (一个质粒编码轻链 (抗CD20或抗PD-L1), 一个质粒编码长Fc链 (抗CD20或抗PD-L1), 并且一个质粒编码短Fc链) 编码:

[1108] 表10. 构建体10 (CD20) 和构建体10 (PD-L1) 序列

	构建体	轻链	长 Fc 链 (具有抗 CD20 或 抗 PD-L1 VH 和 CH1)	短 Fc 链
[1109]				

[1110]

构建体 10 (CD20)	SEQ ID NO: 61 DIVMTQTPLSLP VTPGEPASISCRS SKSLLHSNGITY LYWYLQKPGQS PQLLIYQMSNLV SGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVE AEDVG VYYCAQ NLELPYTFGGGT KVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNN FYPREAKVQWK VDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKA DYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTK SFNRGEC	SEQ ID NO: 70 QVQLVQSGAEV KKP GSSVKVSC KASGYAFSYSWI NWVRQAPGQGL EWMGRIFPGDG DTDYNGKFKGR VTITADKSTSTA YMELSSLRSED AVYYCARNVFD GYWL VYWGQG TLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLV KDYFPEPVTVS WNSGALTSGVH TFP AVLQSSGLY SLSSV VTPSSSL GTQTYICNVNH KPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVH NAKTKPREEQY NSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKE YKCKVSNKALP APIEKTISKAKG QPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPE NNYKTTPPV LKS DGSFFLYSDLTV DKSRWQQGNVF SCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG KGGGGGGGGG GGGGGGGGGG GDKTHTCPPCPA	SEQ ID NO: 63 DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQ VCTLPPSRDEL KNQVSLSCAVD GFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFF LVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPG

[1111]

		PELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEK TISKAKGQPREP QVYTLPPCRDKL TKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPGKGGG GGGGGGGGGG GGGGGGGDKTH TCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGV EVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYT LPPCRDKLTKNQ VSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSL SPG	
构建体 10 (PD-	SEQ ID NO: 49 QSALTQPASVSG	SEQ ID NO: 71 EVQLLES GGGL	SEQ ID NO: 63 DKTHTCPPCPAP

[1112]

L1)	SPGQSITISCTGT SSDVGGYNYVS WYQQHPGKAPK LMIYDVSNRPSG VSNRFSGSKSGN TASLTISGLQAE DEADYYCSSYTS SSTRVFGTGTKV TVLGQPKANPT VTLFPPSSEELQ ANKATLVCLISD FYPGAVTVAWK ADGSPVKAGVE TTKPSKQSNK YAASSYLSLTPE QWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKT VAPTECS	VQPGGSLRLSCA ASGFTFSSYIMM WVRQAPGKGLE WVSSIYPSGGITF YADTVKGRFTIS RDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAV YYCARIKLGTVT TVDYWGQGTLV TVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEK TISKAKGQPREP QVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYK TTPPVLKSDGSF FLYSDLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPGKGGG GGGGGGGGGG GGGGGGGDKTH TCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVT	ELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQ VCTLPPSRDEL KNQVSLSCAVD GFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFF LVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPG

[1113]

		CVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGV EVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYT LPPCRDKLTKNQ VSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSL SPGKGGGGGGG GGGGGGGGGG GGGDKTHTCPP CPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQY NSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKE YKCKVSNKALP APIEKTISKAKG QPREPQVYTLPP CRDKLTKNQVS LWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGN VFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLS PG	

[1114] 使用Poros MabCapture A (LifeTechnologies) 柱,通过基于蛋白A的亲和柱色谱法从细胞培养上清液中纯化表达的蛋白质。将捕获的Fc-抗原结合结构域构建体用磷酸盐缓冲盐水(低盐洗涤液)洗涤,并用100mM甘氨酸(pH 3)洗脱。洗脱物通过加入1M TRIS pH 7.4快速中和,并且通过0.2 μ m过滤器无菌过滤。使用Poros XS树脂(Applied Biosciences),通过离子交换色谱法进一步分离蛋白质。用50mM MES (pH 6,缓冲液A)预平

衡柱,并且使用50mM MES、400mM氯化钠 (pH 6,缓冲液B) 作为洗脱缓冲液,用步进梯度洗脱样品。在离子交换后,在切向流过滤系统上,使用10kDa截止聚醚砜 (PES) 膜滤筒将目标级分缓冲交换到PBS缓冲液中。将样品浓缩至大约30mg/mL,并且通过0.2μm过滤器无菌过滤。

[1115] 非还原性十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

[1116] 将样品在95℃的Laemmli样品缓冲液 (4% SDS, Bio-Rad) 中变性10分钟。使样品在 Criterion TGX无染色凝胶 (4-15% 聚丙烯酰胺, Bio-Rad) 上运行。通过UV照射或考马斯蓝染色对蛋白质条带进行可视化。通过ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad) 对凝胶进行成像。使用Imagelab 4.0.1软件 (Bio-Rad) 执行条带的定量。

[1117] 实施例55. 具有抗CD20抗原结合结构域或抗PD-L1抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体16的设计和纯化

[1118] 蛋白质表达

[1119] 如下所述制备由其中分支点在C末端Fc结构域的单分支Fc结构域形成的构建体。Fc-抗原结合结构域构建体16 (CD20) 和构建体4 (PD-L1) 各自分别包括两个不同的含Fc域单体的多肽 (抗CD20长Fc链 (SEQ ID NO:72) 或抗PD-L1长Fc链 (SEQ ID NO:73) 的两个拷贝) 以及短Fc链 (SEQ ID NO:63) 的四个拷贝) 以及抗CD20轻链多肽 (SEQ ID NO:61) 或抗PD-L1轻链多肽 (SEQ ID NO:49) 的三个拷贝。长Fc链包含具有反向电荷突变K409D和D399K (以促进同二聚化) 的Fc结构域单体和N末端处的抗CD20 VH和CH1结构域 (EU位置1-220) (构建体10 (CD20)) 或N末端处的抗PD-L1 VH和CH1结构域 (EU位置1-220) (构建体10 (PD-L1)), 该Fc结构域单体与各自具有E357K电荷突变以及S354C和T366W突起形成突变 (以促进异二聚化) 的两个串联的Fc结构域单体串联。短Fc链包含具有K370D电荷突变和Y349C、T366S、L368A和Y407V空腔形成突变 (以促进异二聚化) 的Fc结构域单体。也可以将抗CD20轻链或PD-L1轻链表达为作为scFv的一部分与长Fc链的N末端融合。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾 (HEK) 293细胞中。表11中每个构建体的以下氨基酸序列由三个单独的质粒 (一个质粒编码轻链 (抗CD20或抗PD-L1), 一个质粒编码长Fc链 (抗CD20或抗PD-L1), 并且一个质粒编码短Fc链) 编码:

[1120] 表11. 构建体16 (CD20) 和构建体16 (PD-L1) 序列

[1121]	构建体	轻链	长 Fc 链	短 Fc 链

[1122]

		(具有抗 CD20 或 抗 PD-L1 VH 和 CH1)	
构建体 16 (CD20)	SEQ ID NO: 61 DIVMTQTPLSLP VTPGEPASISCRS SKSLLHSNGITY LYWYLQKPGQS PQLLIYQMSNLV SGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVE AEDVGVYYCAQ NLELPYTFGGGT KVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNN FYPREAKVQWK VDNALQSGNSQ ESVTEQDSKST YLSSTLTLSKA DYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTK SFNRGEC	SEQ ID NO: 72 QVQLVQSGAEV KKPGSSVKVSC KASGYAFSYSWI NWVRQAPGQGL EWMGRIFPGDG DTDYNGKFKGR VTITADKSTSTA YMELSSLRSED AVYYCARNVFD GYWLVYWGQG TLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLV KDYFPEPVTVS WNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNH KPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVH NAKTKPREEQY NSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKE YKCKVSNKALP APIEKTISKAKG QPREPQVYTLPP CRDKLTKNQVS LWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQ PENNYKTPPVL DSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGN VFSCSVMHEAL	SEQ ID NO: 63 DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQ VCTLPPSRDELT KNQVSLSCAVD GFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFF LVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPG

[1123]

		HNHYTQKSLSLS PGKGGGGGGGG GGGGGGGGGG GGDKTHTCPPCP APELLGGPSVFL FPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQYN STYRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPCR DKLTKNQVSLW CLVKGFYPSDIA VEWESNGQPEN NYKTTTPVLDS GSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFS CSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK GGGGGGGGGG GGGGGGGGGG DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELT KNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKT TPPVLKSDGSFF LYSDLTVDKSR WQQGNVFSCSV	

[1124]

		MHEALHNHYTQ KSLSLSPG	
构建体 16 (PD-L1)	SEQ ID NO: 49 QSALTQPASVSG SPGQSITISCTGT SSDVGGYNYVS WYQQHPGKAPK LMIYDVSNRPSG VSNRFSGSKSGN TASLTISGLQAE DEADYYCSSYTS SSTRVFGTGTKV TVLGQPKANPT VTLFPPSSEELQ ANKATLVCLISD FYPGAVTVAWK ADGSPVKAGVE TTKPSKQSNK YAASSYLSLTPE QWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKT VAPTECS	SEQ ID NO: 73 EVQLLES GGGL VQPGGSLRLSCA ASGFTFSSYIMM WVRQAPGKGLE WVSSIYPSGGITF YADTVKGRFTIS RDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAV YYCARIKLGTVT TVDYWGQGTLV TVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEK TISKAKGQPREP QVYTLPPCRDKL TKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPGKGGG GGGGGGGGGG	SEQ ID NO: 63 DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISR PEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQ VCTLPPSRDEL KNQVSLSCAVD GFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFF LVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPG

[1125]

		GGGGGGGDKTH TCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGV EVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYT LPPCRDKLTKNQ VSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSL SPGKGGGGGGG GGGGGGGGGG GGGDKTHTCPP CPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQY NSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKE YKCKVSNKALP APIEKTISKAKG QPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPE NNYKTTPPVLS DGSFFLYSDLTV DKSRWQQGNVF SCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG	

[1126] 使用Poros MabCapture A (LifeTechnologies) 柱,通过基于蛋白A的亲和柱色谱法从细胞培养上清液中纯化表达的蛋白质。将捕获的Fc-抗原结合结构域构建体用磷酸盐缓冲盐水(低盐洗涤液)洗涤,并用100mM甘氨酸(pH 3)洗脱。洗脱物通过加入1M TRIS pH

7.4快速中和,并且通过0.2 μ m过滤器无菌过滤。使用Poros XS树脂(Applied Biosciences),通过离子交换色谱法进一步分离蛋白质。用50mM MES(pH 6,缓冲液A)预平衡柱,并且使用50mM MES、400mM氯化钠(pH 6,缓冲液B)作为洗脱缓冲液,用步进梯度洗脱样品。在离子交换后,在切向流过滤系统上,使用10kDa截止聚醚砜(PES)膜滤筒将目标级分缓冲液交换到PBS缓冲液中。将样品浓缩至大约30mg/mL,并且通过0.2 μ m过滤器无菌过滤。

[1127] 非还原性十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

[1128] 将样品在95℃的Laemmli样品缓冲液(4%SDS,Bio-Rad)中变性10分钟。使样品在Criterion TGX无染色凝胶(4-15%聚丙烯酰胺,Bio-Rad)上运行。通过UV照射或考马斯蓝染色对蛋白质条带进行可视化。通过ChemiDoc MP Imaging System(Bio-Rad)对凝胶进行成像。使用Imagelab 4.0.1软件(Bio-Rad)执行条带的定量。

[1129] 实施例56.具有抗CD20抗原结合结构域或抗PD-L1抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体19的设计和纯化

[1130] 蛋白质表达

[1131] 如下所述制备由其中分支点既不在N末端也不在C末端Fc结构域的单分支Fc结构域形成的构建体。Fc-抗原结合结构域构建体19(CD20)和构建体19(PD-L1)各自分别包括两个不同的含Fc域单体的多肽(抗CD20长Fc链(SEQ ID NO:74)或抗PD-L1长Fc链(SEQ ID NO:75)的两个拷贝)以及短Fc链(SEQ ID NO:63)的四个拷贝),以及抗CD20轻链多肽(SEQ ID NO:61)或抗PD-L1轻链多肽(SEQ ID NO:49)的拷贝。长Fc链包含Fc结构域单体和N末端处的抗CD20 VH和CH1结构域(EU位置1-220)(构建体19(CD20))或N末端处的抗PD-L1VH和CH1结构域(EU位置1-220)(构建体19(PD-L1)),该Fc结构域单体具有E357K电荷突变以及S354C和T366W突起形成突变(以促进异二聚化),并与具有反向电荷突变K409D和D399K(以促进同二聚化)的Fc结构域单体串联,并与具有E357K电荷突变以及S354C和T366W突起形成突变(以促进异二聚化)的Fc结构域单体串联。短Fc链包含具有K370D电荷突变和Y349C、T366S、L368A和Y407V空腔形成突变(以促进异二聚化)的Fc结构域单体。也可以将抗CD20轻链或抗PD-L1轻链表达为作为scFv的一部分与长Fc链的N末端融合。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK)293细胞中。表12中每个构建体的以下氨基酸序列由三个单独的质粒(一个质粒编码轻链(抗CD20或抗PD-L1),一个质粒编码长Fc链(抗CD20或抗PD-L1),并且一个质粒编码短Fc链)编码:

[1132] 表12.构建体19(CD20)和构建体19(PD-L1)序列

[1133]

构建体	轻链	长 Fc 链 (具有抗 CD20 或 抗 PD-L1 VH 和 CH1)	短 Fc 链
构建体 19 (CD20)	SEQ ID NO: 61 DIVMTQTPLSLP VTPGEPASISCRS SKSLLHSNGITY LYWYLQKPGQS PQLLIYQMSNLV SGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVE AEDVGVIYCAQ NLELPYTFGGGT KVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLN FYPREAKVQWK VDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDS YSLSSITLTLSKA DYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTK SFNRGEC	SEQ ID NO: 74 QVQLVQSGAEV KKPGSSVKVSC KASGYAFSYSWI NWVRQAPGQGL EWMGRIFPGDG DTDYNGKFKGR VTITADKSTSTA YMELSSLRSED AVYYCARNVFD GYWLVYWGQG TLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLV KDYFPEPVTVS WNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLY SLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNH KPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVH NAKTKPREEQY NSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKE YKCKVSNKALP APIEKTISKAKG QPREPQVYTLPP CRDKLTKNQVS LWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQ	SEQ ID NO: 63 DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYR VVSIVLTVLHQD WLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQ VCTLPSSRDEL KNQVSLSCAVD GFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFF LVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPG

[1134]

		PENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGN VFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLS PGKGGGGGGGG GGGGGGGGGG GGDKTHTCPPCP APELLGGPSVFL FPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQYN STYRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAV EWESNGQPENN YKTTPPVLKSDG SFFLYSDLTVDK SRWQQGNVFSC SVMHEALHNHY TQKSLSLSPGGK GGGGGGGGGG GGGGGGGGGG DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQ VYTLPPCRDKLT KNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWE	

[1135]

		SNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPG	
构建体 19 (PD-L1)	SEQ ID NO: 49 QSALTQPASVSG SPGQSITISCTGT SSDVGGYNYVS WYQQHPGKAPK LMIYDVSNRPSG VSNRFSGSKSGN TASLTISGLQAE DEADYYCSSYTS SSTRVFGTGTKV TVLGQPKANPT VTLFPPSSEELQ ANKATLVCLISD FYPGAVTVAWK ADGSPVKAGVE TTKPSKQSNK YAASSYLSLTPE QWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKT VAPTECS	SEQ ID NO: 75 EVQLLES GGGL VQPGGSLRLSCA ASGFTFSSYIMM WVRQAPGKGLE WVSSIYPSGGITF YADTVKGRFTIS RDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAV YYCARIKLGTVT TVDYWGQGTLV TVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEK TISKAKGQPREP QVYTLPPCRDKL TKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSR	SEQ ID NO: 63 DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISR PEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQ VCTLPPSRDEL KNQVSLSCAVD GFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPG

[1136]

		WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPGKGGG GGGGGGGGGG GGGGGGGDKTH TCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGV EVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNG QPENNYKTTPPV LKSDGSFFLYSD LTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSL SPGGKGGGGGG GGGGGGGGGG GGGGDKTHTCP PCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVH NAKTKPREEQY NSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKE YKCKVSNKALP APIEKTISKAKG QPREPQVYTLPP CRDKLTKNQVS LWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQ PENNYKTTPPV DSDGSFFLYSKL	

[1137]		TVDKSRWQQGN VFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLS PG	

[1138] 使用Poros MabCapture A (LifeTechnologies) 柱,通过基于蛋白A的亲和柱色谱法从细胞培养上清液中纯化表达的蛋白质。将捕获的Fc-抗原结合结构域构建体用磷酸盐缓冲盐水(低盐洗涤液)洗涤,并用100mM甘氨酸(pH 3)洗脱。洗脱物通过加入1M TRIS pH 7.4快速中和,并且通过0.2 μ m过滤器无菌过滤。使用Poros XS树脂(Applied Biosciences),通过离子交换色谱法进一步分离蛋白质。用50mM MES(pH 6,缓冲液A)预平衡柱,并且使用50mM MES、400mM氯化钠(pH 6,缓冲液B)作为洗脱缓冲液,用步进梯度洗脱样品。在离子交换后,在切向流过滤系统上,使用10kDa截止聚醚砜(PES)膜滤筒将目标级分缓冲交换到PBS缓冲液中。将样品浓缩至大约30mg/mL,并且通过0.2 μ m过滤器无菌过滤。

[1139] 非还原性十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

[1140] 将样品在95℃的Laemmli样品缓冲液(4%SDS,Bio-Rad)中变性10分钟。使样品在Criterion TGX无染色凝胶(4-15%聚丙烯酰胺,Bio-Rad)上运行。通过UV照射或考马斯蓝染色对蛋白质条带进行可视化。通过ChemiDoc MP Imaging System(Bio-Rad)对凝胶进行成像。使用Imagelab 4.0.1软件(Bio-Rad)执行条带的定量。

[1141] 实施例57.抗CD20 Fc构建体对补体依赖性细胞毒性(CDC)的激活

[1142] 开发CDC测定以测试抗CD20 Fc构建体相对于抗CD20单克隆抗体奥滨尤妥珠单抗增强CDC活性的程度。如实施例1、2和51-56中所述产生具有Gazyva的CDR的抗CD20 Fc构建体4、7、8、9、10、13和19。创建了构建体13(CD20)的四个版本,这些版本仅在长链的长链Fc单体之间的甘氨酸间隔物(G_4 、 G_{10} 、 G_{15} 和 G_{20} 接头)的大小上有变化。在如下进行的CDC测定中测试每个抗CD20 Fc构建体和奥滨尤妥珠单抗单克隆抗体:

[1143] 将在补充有10%热灭活的FBS的RPMI-1640中生长的Daudi细胞沉淀,用冰冷的PBS洗涤1次,然后以 1.0×10^6 个活细胞/mL的浓度重悬于含0.1%BSA的RPMI-1640中。将五十微升这种细胞悬液添加到96孔板的所有孔中(板边缘除外)。将板保持在冰上,直到完成所有添加。在RPMI-1640+BSA中,将测试制品从起始浓度450nM开始连续稀释四倍。每个测试制品总共测试十个浓度。分别将五十微升添加到板中的Daudi细胞中。在RPMI-1640+BSA中以1:5稀释正常或C1q耗尽人补体血清(Quidel, San Diego, CA)。分别将五十微升添加到板中的Daudi细胞中。六个正常血清对照孔接收细胞,仅接收培养基(未处理)和1/5正常血清(正常背景)。这些孔中的三个还接收16.5 μ L Triton X-100(Promega, Madison, WI)(正常裂解对照)。类似地制备C1q耗尽背景和裂解对照。将PBS添加到所有板边缘孔中。将板在37℃下温育2小时。2小时后,将50 μ L预热的Alamar蓝(Thermo, Waltham, MA)添加到所有孔中(板边缘除外)。将板放回温育箱保持过夜(在37℃下温育18小时)。18小时后,在FlexStation 3中测量荧光。使用544/590Ex/Em过滤器和Auto Cut-Off对板进行顶部读取。计算正常背景、正常裂解对照、C1q耗尽背景和C1q耗尽裂解对照孔的平均值。如下计算细胞裂解百分比:

[1144] $\% \text{细胞裂解} = (\text{RFU测试} - \text{RFU背景}) / (\text{RFU裂解对照} - \text{RFU背景}) * 100$ 。确定每种构建体的EC50(nM)。

[1145] 如表13中所示,抗CD20 Fc构建体在Daudi细胞中诱导CDC,并且相对于奥滨尤妥珠

单抗单克隆抗体在增强细胞毒性中表现出更大的效力,如较低的EC50值所证明。图54示出了抗CD20构建体7和抗CD20构建体13的结果,并且示出了每个Fc构建体相对于岩藻糖基化抗CD20 IgG1抗体和Gazyva对照以更低的浓度诱导更大的细胞裂解。

[1146] 表13.抗CD20 Fc构建体在Daudi细胞中诱导CDC的效力

[1147]

构建体 ¹	n	EC50 (nM)		
		范围	平均值	SD
IgG1 抗体, 岩藻糖基化	5	38 – 65	47	11
S3I-AA-OBI 构建体 7 (抗 CD20)	5	0.39 - 0.70	0.55	0.12
S5I-AA-OBI 构建体 10 (抗 CD20)	1	0.88	0.88	N/A
S3W-AA-OBI 构建体 8 ² (抗 CD20)	3	0.15 - 0.18	0.17	0.017
S3A-AA-OBI 构建体 9 (抗 CD20)	3	0.19 - 0.20	0.19	0.0036

[1148]

构建体 ¹	n	EC50 (nM)		
		范围	平均值	SD
S3Y-AA-OBI4 构建体 13 (抗 CD20), G ₄ 接头	3	0.11 - 0.19	0.16	0.045
S3Y-AA-OBI10 构建体 13 (抗 CD20), G ¹⁰ 接头	3	0.11 - 0.19	0.16	0.047
S3Y-AA-OBI15 构建体 13 (抗 CD20), G ¹⁵ 接头	4	0.13 - 0.36	0.22	0.098
S3Y-AA-OBI 构建体 13 (抗 CD20), G ²⁰ 接头	4	0.13 - 0.22	0.18	0.046
S5X-AA-OBI 构建体 19 (抗 CD20)	1	0.20	0.20	N/A
S3L-AAA-OBI3 构建体 4 (抗 CD20)	4	0.12 - 0.18	0.15	0.031

[1149] ¹除非另有说明, 否则所有构建体都包括G20接头。

[1150] ²构建体包含自发E388D突变。

[1151] 实施例58. 抗PD-L1 Fc构建体对补体依赖性细胞毒性 (CDC) 的激活

[1152] 开发CDC测定以测试抗PD-L1 Fc构建体相对于抗PD-L1单克隆抗体阿维鲁单抗 (Bavencio) 增强CDC活性的程度。如实施例1、2和51-56中所述产生具有阿维鲁单抗的CDR的抗PD-L1 Fc构建体7、8、10、13和19。创建了构建体13 (PD-L1) 的四个版本, 这些版本仅在长链的长链Fc单体之间的甘氨酸间隔物 (G₄、G₁₀、G₁₅和G₂₀接头) 的大小上有变化。在如下进行的CDC测定中测试每个抗PD-L1 Fc构建体和阿维鲁单抗单克隆抗体:

[1153] 将转染以稳定表达人PD-L1基因的人胚肾 (HEK) 细胞系 (CrownBio) 在DMEM、10% FBS和2μg/mL嘌呤霉素 (作为选择标记) 中培养。收获细胞并将其在不含基因泰克汀 (genetecin) 或酚红 (Lonza) 的X-Vivo-15培养基中稀释。将100μl 6x10⁵个细胞/mL的HEK-PD-L1细胞铺在96孔组织培养处理的平底板 (BD Falcon) 中。将Fc构建体和抗体在X-Vivo-

15培养基中按以1:3连续稀释。将50 μ L稀释的构建体添加到孔中靶细胞的顶部。将50 μ L未稀释的人血清补体 (Quidel Corporation) 添加到每个孔中。然后将测定板在37 $^{\circ}$ C下温育2小时。温育2小时后,将20 μ L WST-1细胞增殖试剂 (Roche Diagnostics Corp) 添加到每个孔中,并在37 $^{\circ}$ C下温育过夜。第二天早上,将测定板放置在板振荡器上2-5分钟。在分光光度计 (Molecular Devices SPECTRAmax M2) 上以600nm校正在450nm处测定吸光度。确定每种构建体的EC50 (nM)。

[1154] 如表14中所示,一些抗PD-L1 Fc构建体在表达人PD-L1的HEK细胞中诱导CDC。

[1155] 表14. 抗PD-L1 Fc构建体在表达PD-L1的HEK细胞中诱导CDC的效力

[1156]

构建体 ¹	n	EC50 (nM)		
		范围	平均值	SD
IgG1 抗体, 岩藻糖基化	7	无 CDC 活性 ³	无 CDC 活性 ³	N/A
IgG1 抗体, 无岩藻糖基化	1	无 CDC 活性 ³	无 CDC 活性 ³	N/A
S3I-AA-AVE 构建体 7 ² (抗 PD-L1)	6	无 CDC 活性 ³	无 CDC 活性 ³	N/A
S5I-AA-AVE 构建体 10 (抗 PD-L1)	2	无 CDC 活性 ³	无 CDC 活性 ³	N/A

[1157]

构建体 ¹	n	EC50 (nM)		
		范围	平均值	SD
S3W-AA-AVE 构建体 8 ² (抗 PD-L1)	3	1.2-2.4	1.7	0.63
S3Y-AA-AVE4 构建体 13 (抗 PD-L1), G ₄ 接头	2	0.43-0.84	0.64	0.29
S3Y-AA-AVE10 构建体 13 (抗 PD-L1), G ₁₀ 接头	2	0.58-1.0	0.81	0.33
S3Y-AA-AVE15 构建体 13 (抗 PD-L1), G ₁₅ 接头	2	0.56-1.1	0.85	0.41
S3Y-AA-AVE 构建体 13 (抗 PD-L1), G ₂₀ 接头	15	0.38-3.6	1.4	1.2
S5X-AA-AVE 构建体 19 (抗 PD-L1)	3	0.88-3.4	1.9	1.4

[1158] ¹除非另有说明,否则所有构建体都包括G20接头。

[1159] ²构建体包含自发E388D突变。

[1160] ³构建体在测定条件下未产生可测量的CDC。

[1161] 实施例59.抗CD20 Fc构建体对抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)的激活

[1162] ADCP报告基因测定

[1163] 开发ADCP报告基因测定以测试抗CD20 Fc构建体相对于抗CD20单克隆奥滨尤妥珠单抗抗体(Gazyva)激活Fc γ RIIa信号传导、从而增强ADCP活性的程度。如实施例1、2和51-56中所述产生具有Gazyva的CDR的抗CD20 Fc构建体4、7、8、9、10、13和19。测试了构建体13(CD20)的四个版本,其中长链Fc单体之间的甘氨酸间隔物(G4、G10、G15和G20接头)的大小上有变化。在如下进行的ADCC报告基因测定中测试每个抗CD20 Fc构建体以及岩藻糖基化和无岩藻糖基化奥滨尤妥珠单抗单克隆抗体:

[1164] 将Raji靶细胞(1.5x10⁴个细胞/孔)和Jurkat/Fc RIIa-H效应细胞(Promega)

(3.5×10^4 个细胞/孔) 重悬于补充有4%低IgG血清 (Promega) 的RPMI 1640培养基中, 并与连续稀释的抗CD20 Fc构建体一起接种到96孔板中。在5%CO₂中在37℃下温育6小时后, 使用PHERAstar FS发光计 (BMG LABTECH) 根据制造商的规程使用Bio-Glo荧光素酶测定试剂 (Promega) 测量发光。

[1165] 如表15中所示, 抗CD20 Fc构建体在ADCP报告基因测定中诱导Fc γ RIIa信号传导, 并且相对于奥滨尤妥珠单抗单克隆抗体在增强ADCP活性中表现出更大的效力, 如较低的EC50值所证明。图55示出了抗CD20构建体7和抗CD20构建体13的结果, 并且示出了每个Fc构建体相对于岩藻糖基化和无岩藻糖基化抗CD20 IgG1抗体对照以更低的浓度诱导更大的Fc γ RIIa信号传导。

[1166] 表15. 抗CD20 Fc构建体在ADCP报告基因测定中诱导Fc γ RIIa信号传导的效力

[1167]

构建体 ¹	n	EC50 (nM)		
		范围	平均值	SD
IgG1 抗体, 岩藻糖基化	6	4.5 - 10.8	7.1	2.2
IgG1 抗体, 无岩藻糖基化	3	5.5 - 6.1	5.8	0.3
S3I-AA-OBI 构建体 7 (抗CD20)	6	0.0016 - 0.12	0.067	0.0409
S5I-AA-OBI 构建体 10 (抗CD20)	1	0.11	0.11	N/A

[1168]

构建体 ¹	n	EC50 (nM)		
		范围	平均值	SD
S3W-AA-OBI 构建体 8 ² (抗 CD20)	1	0.087	0.087	N/A
S3A-AA-OBI 构建体 9 (抗 CD20)	1	0.026	0.026	N/A
S3Y-AA-OBI4 构建体 13 (抗 CD20), G ₄ 接头	1	0.061	0.061	N/A
S3Y-AA-OBI10 构建体 13 (抗 CD20), G ₁₀ 接头	1	0.056	0.056	N/A
S3Y-AA-OBI15 构建体 13 (抗 CD20), G ₁₅ 接头	1	0.074	0.074	N/A
S3Y-AA-OBI 构建体 13 (抗 CD20), G ₂₀ 接头	5	0.041 - 0.14	0.064	0.041
S5X-AA-OBI 构建体 19 (抗 CD20)	1	0.045	0.045	N/A
S3L-AAA-OBI3 构建体 4 (抗 CD20)	1	0.055	0.055	N/A

[1169] ¹除非另有说明,否则所有构建体都包括G20接头。[1170] ²构建体包含自发E388D突变。

[1171] ADCP二次测定

[1172] 在另外的ADCP测定中测试了抗CD20 Fc构建体7、8、9、13 (G20接头) 和19,以确认

ADCP报告基因测定结果。在如下进行的ADCC测定中测试每个抗CD20 Fc构建体以及岩藻糖基化和无岩藻糖基化奥滨尤妥珠单抗单克隆抗体：

[1173] 从冷冻的PBMC中纯化单核细胞，并在存在M-CSF的情况下在袋中培养。在将分化的M2c巨噬细胞用于ADCP测定之前2天，将IL-10添加到培养袋中。单核细胞/巨噬细胞的总培养时间为8天。将抗CD20 Fc构建体连续稀释10倍，并与KILR Raji细胞温育30分钟。将巨噬细胞重悬于含有10%超低IgG Defined FBS (热灭活) (Hyclone) 的无酚红RPMI (Life Technologies) 的测定培养基中，并以8:1的 (M2c) 效应子:靶标比例添加到含有包被的KILR Raji细胞的板中，并温育24小时。温育时间后，将PathHunter® ProLabel®/ProLink™检测试剂盒试剂添加到板中，并在室温下温育60分钟后，在PHERAstar FS发光计 (BMG LABTECH) 上读取。

[1174] 表16中描绘的结果证明，抗CD20 Fc构建体在二次ADCP测定中诱导了FcγRIIa信号传导，并且相对于岩藻糖基化或无岩藻糖基化奥滨尤妥珠单抗单克隆抗体在增强ADCP活性中具有更大的效力，如较低的EC50值所证明。二次ADCP测定的结果与ADCP报告基因测定的结果一致。

[1175] 表16. 抗CD20 Fc构建体在KILR Raji细胞中诱导ADCP的效力

构建体 ¹	n	EC50 (nM)		
		范围	平均值	SD
IgG1 抗体，岩藻糖基化	8	0.00053-1.8	0.82	0.82
IgG1 抗体，无岩藻糖基化	4	0.0015-0.96	0.37	0.51
S3I-AA-OBI 构建体 7 (抗CD20)	8	0.00058-0.27	0.042	0.095

[1177]

构建体 ¹	n	EC50 (nM)		
		范围	平均值	SD
S3W-AA-OBI 构建体 8 ² (抗 CD20)	2	0.00015-0.053	0.026	0.037
S3A-AA-OBI 构建体 9 (抗 CD20)	2	0.0020-0.089	0.045	0.061
S3Y-AA-OBI 构建体 13 (抗 CD20)	4	0.000063-0.076	0.019	0.038
S5X-AA-OBI 构建体 19 (抗 CD20)	2	0.00038-0.026	0.013	0.018

[1178] ¹除非另有说明,否则所有构建体都包括G20接头。

[1179] ²构建体包含自发E388D突变。

[1180] 实施例60.抗PD-L1 Fc构建体对抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)的激活

[1181] ADCP报告基因测定

[1182] 开发ADCP报告基因测定以测试抗PD-L1 Fc构建体相对于抗PD-L1单克隆抗体阿维鲁单抗(Bavencio)激活Fc γ RIIa信号传导、从而增强ADCP活性的程度。如实施例1、2和51-56中所述产生具有阿维鲁单抗的CDR的抗PD-L1 Fc构建体4、7、8、9、10、13、16和19。测试了构建体13(PD-L1)的四个版本,其中长链Fc单体之间的甘氨酸间隔物(G4、G10、G15和G20接头)的大小上有变化。在如下进行的ADCC报告基因测定中测试每个抗PD-L1 Fc构建体以及岩藻糖基化和无岩藻糖基化阿维鲁单抗单克隆抗体:

[1183] 将HEK-PD-L1靶细胞(1.5×10^4 个细胞/孔)和效应Jurkat/Fc γ RIIa-H细胞(Promega)(3.5×10^4 个细胞/孔)重悬于补充有4%低IgG血清(Promega)的RPMI 1640培养基中,并与连续稀释的抗PD-L1 Fc构建体一起接种到96孔板中。在5%CO₂中在37℃下温育6小时后,使用PHERAstar FS发光计(BMG LABTECH)根据制造商的规程使用Bio-Glo荧光素酶测定试剂(Promega)测量发光。

[1184] 如表17中所示,抗PD-L1 Fc构建体在ADCP报告基因测定中诱导Fc γ RIIa信号传导。

[1185] 表17.抗PD-L1 Fc构建体在ADCP报告基因测定中诱导Fc γ RIIa信号传导的效力

[1186]

构造体编号 ¹	n	EC50 (nM)		
		范围	平均值	SD
IgG1 抗体, 岩藻糖基化	6	没有效果 ³	没有效果 ³	N/A
IgG1 抗体, 无岩藻糖基化	1	没有效果 ³	没有效果 ³	N/A
S3I-AA-AVE 构建体 7 ² (抗 PD-L1)	6	0.012 - 0.036	0.026	0.012
S5I-AA-AVE 构建体 10 (抗 PD-L1)	1	0.031	0.031	N/A
S3W-AA-AVE 构建体 8 ² (抗 PD-L1)	1	0.028	0.028	N/A
S3A-AA-AVE 构建体 9 ² (抗 PD-L1)	1	0.026	0.026	N/A
S3Y-AA-AVE4 构建体 13 (抗 PD-L1), G ₄ 接头	1	0.05	0.05	N/A

[1187]

构造体编号 ¹	n	EC50 (nM)		
		范围	平均值	SD
S3Y-AA-AVE10 构建体 13 (抗 PD-L1), G ₁₀ 接 头	1	0.085	0.085	N/A
S3Y-AA-AVE15 构建体 13 (抗 PD-L1), G ₁₅ 接 头	1	0.05	0.05	N/A
S3Y-AA-AVE 构建体 13 (抗 PD-L1), G ₂₀ 接 头	6	0.027 - 0.052	0.038	0.01
S5X-AA-AVE 构建体 19 (抗 PD-L1)	1	0.033	0.033	N/A
S5Y-AA-AVE 构建体 16 (抗 PD-L1)	1	0.04	0.04	N/A
S3L-3AAA-AVE 构建体 4 (抗 PD-L1)	1	0.028	0.028	N/A

[1188] ¹除非另有说明,否则所有构建体都包括G20接头。

[1189] ²构建体包含自发E388D突变。

[1190] ³构建体在测定条件下未诱导可测量的Fc γ RIIa信号传导。

[1191] ADCP二次测定

[1192] 在另外的ADCP测定中测试了抗PD-L1 Fc构建体8、9和13 (G20接头),以确认ADCP报告基因测定结果。在如下进行的ADCC测定中测试每个抗PD-L1 Fc构建体和岩藻糖基化阿维鲁单抗单克隆抗体:

[1193] 将M2c巨噬细胞以每孔 2×10^5 个细胞的浓度接种到96孔U型底超低结合板(Costar, 7007)中,并使其在37℃、5%CO₂的加湿温育箱中平衡至少1小时。根据制造商的规程,将HEK293 PD-L1细胞用钙黄绿素-AM (Invitrogen, C-3100) 进行染色,并与从6.7nM稀释5倍的抗PD-L1构建体一起在室温下预温育15分钟。然后将它们与巨噬细胞以3:1的效应子:靶标比组合,并在37℃、5%CO₂温育箱中温育2小时。将细胞转移到V型底96孔板中进行染色,然后用FACS缓冲液(PBS+2%FBS)洗涤。使用Fc阻断剂(Biolegend, 422302)阻断合并的细胞,

并在4℃下用抗CD11b-APC Ab (Biolegend, 301310) 染色1小时。用FACS缓冲液洗涤细胞,并在BD FACS Verse上读数。使用FlowJo进行分析。通过FSC-H与FSC-A图从计算结果中除去双峰。对钙黄绿素-AM和CD11b呈阳性的细胞被认为是吞噬事件或双阳性巨噬细胞 (DP)。通过计算 (DP细胞/总靶细胞)*100来计算吞噬作用百分比。

[1194] 表18中描绘的结果证明,抗PD-L1 Fc构建体在二次测定中诱导了ADCP,并且相对于岩藻糖基化阿维鲁单抗单克隆抗体在增强ADCP活性中具有更大的效力,如较低的EC50值所证明。二次ADCP测定的结果与ADCP报告基因测定的结果一致。

[1195] 表18. 抗PD-L1 Fc构建体在利用HEK-PD-L1细胞和M2c巨噬细胞进行的基于FACS的测定中诱导ADCP的效力

[1196]

构造体编号 ¹	n	EC50 (nM)		
		范围	平均值	SD
IgG1 抗体, 岩藻糖基化	1	0.211	0.211	N/A
S3W-AA-AVE 构建体 8 ² (抗 PD-L1)	1	0.054	0.054	N/A
S3A-AA-AVE 构建体 9 ² (抗 PD-L1)	2	0.00097 - 0.0061	0.0035	0.0036
S3Y-AA-AVE 构建体 13 (抗 PD-L1), G ₂₀ 接头	2	0.01947 - 0.05635	0.03791	0.026078

[1197] ¹除非另有说明,否则所有构建体都包括G20接头。

[1198] ²构建体包含自发E388D突变。

[1199] 实施例61. 抗CD20 Fc构建体对抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 的激活

[1200] ADCC报告基因测定

[1201] 开发ADCC报告基因测定以测试抗CD20 Fc构建体相对于抗CD20单克隆抗体奥滨尤妥珠单抗 (Gazyva) 诱导Fc γ RIIIIa信号传导并增强ADCC活性的程度。如实施例1、2和51-56中所述产生具有Gazyva的CDR的抗CD20 Fc构建体4、7、8、9、10、13和19。测试了构建体13 (CD20) 的四个版本,其中长链Fc单体之间的甘氨酸间隔物 (G₄、G₁₀、G₁₅和G₂₀接头) 的大小上有变化。在如下进行的ADCC报告基因测定中测试每个抗CD20 Fc构建体以及岩藻糖基化和无岩藻糖基化奥滨尤妥珠单抗单克隆抗体:

[1202] 将Raji靶细胞 (1.25x10⁴个细胞/孔) 和Jurkat/Fc γ RIIIIa效应细胞 (Promega) (7.45x10⁴个细胞/孔) 重悬于补充有4%低IgG血清 (Promega) 的RPMI 1640培养基中,并与连续稀释的抗CD20 Fc构建体一起接种到96孔板中。在5%CO₂中在37℃下温育6小时后,使

用PHERAstar FS发光计 (BMG LABTECH) 根据制造商的规程使用Bio-Glo荧光素酶测定试剂 (Promega) 测量发光。

[1203] 如表19中所示,抗CD20 Fc构建体在ADCC报告基因测定中诱导了Fc γ RIIIIa信号传导,并且相对于岩藻糖基化奥滨尤妥珠单抗单克隆抗体在增强ADCC活性中表现出更大的效力,如较低的EC50值所证明。图56示出了抗CD20构建体7和抗CD20构建体13的结果,并且示出了每个Fc构建体相对于岩藻糖基化抗CD20抗体以更低的浓度诱导更大的Fc γ RIIIIa信号传导,但是不如无岩藻糖糖基化抗CD20抗体有效。

[1204] 表19. 抗CD20 Fc构建体在ADCC报告基因测定中诱导Fc γ RIIIIa信号传导的效力

[1205]

构建体 ¹	n	EC50 (nM)		
		范围	平均值	SD
IgG1 抗体, 岩藻糖基化	6	4.5 - 10.8	7.1	2.2
IgG1 抗体, 无岩藻糖基化	3	5.5 - 6.1	5.8	0.3

[1206]

构建体 ¹	n	EC50 (nM)		
		范围	平均值	SD
S3I-AA-OBI 构建体 7 (抗 CD20)	6	0.0016 - 0.12	0.067	0.041
S5I-AA-OBI 构建体 10 (抗 CD20)	1	0.11	0.11	N/A
S3W-AA-OBI 构建体 8 ² (抗 CD20)	1	0.087	0.087	N/A
S3A-AA-OBI 构建体 9 (抗 CD20)	1	0.026	0.026	N/A
S3Y-AA-OBI4 构建体 13 (抗 CD20), G ₄ 接头	1	0.061	0.061	N/A
S3Y-AA-OBI10 构建体 13 (抗 CD20), G ₁₀ 接头	1	0.056	0.056	N/A
S3Y-AA-OBI15 构建体 13 (抗 CD20), G ₁₅ 接头	1	0.074	0.074	N/A
S3Y-AA-OBI 构建体 13 (抗 CD20), G ²⁰ 接头	5	0.041 - 0.14	0.064	0.041

[1207]

构建体 ¹	n	EC50 (nM)		
		范围	平均值	SD
S5X-AA-OBI 构建体 19 (抗 CD20)	1	0.045	0.045	N/A
S3L-AAA-OBI3 构建体 4 (抗 CD20)	1	0.055	0.055	N/A

[1208] ¹除非另有说明,否则所有构建体都包括G20接头。

[1209] ²构建体包含自发E388D突变。

[1210] ADCC二次测定

[1211] 在另外的ADCC测定中测试了抗CD20 Fc构建体7、8、9、13 (G20接头) 和19,以确认ADCC报告基因测定结果。在如下进行的ADCC测定中测试每个抗CD20 Fc构建体和岩藻糖基化Gazyva单克隆抗体:

[1212] 将NK细胞解冻,以250,000个细胞/ml重悬于Lonza LGM培养基中,并培养过夜。将探针连续稀释(10倍),并以5:1的效应子:靶标比例(50,000:10,000或25,000:5,000;取决于供体)与KILR Raji细胞温育30分钟。对NK细胞进行计数,将其重悬于含有10%超低IgG Defined FBS (热灭活) (Hyclone) 的无酚红RPMI (Life Technologies) 的测定培养基中,然后添加到含有包被的KILR Raji细胞的板中。5小时30分钟后,将KILR检测试剂混合并添加到板中。在室温下温育30分钟后,在PHERAstar FS发光计 (BMG LABTECH) 上对板进行读取。

[1213] 表20中描绘的结果证明,抗CD20 Fc构建体在二次ADCC测定中诱导了Fc γ RIIIa信号传导,并且相对于岩藻糖基化Gazyva单克隆抗体在增强ADCC活性中具有更大的效力,如较低的EC50值所证明。二次ADCC测定的结果与ADCC报告基因测定的结果一致。

[1214] 表20.抗CD20 Fc构建体在KILR Raji细胞中诱导ADCC的效力。

[1215]

构建体 ¹	n	EC50 (nM)		
		范围	平均值	SD
IgG1 抗体, 岩藻糖 基化	10	0.00043-0.17	0.033	0.052

构建体 ¹	n	EC50 (nM)		
		范围	平均值	SD
S3I-AA-OBI 构建体 7 (抗 CD20)	10	0.0000021-0.014	0.0029	0.0046
S3W-AA-OBI 构建体 8 ² (抗 CD20)	2	0.000036-0.016	0.0078	0.011
S3A-AA-OBI 构建体 9 (抗 CD20)	2	0.00018-0.011	0.0057	0.0079
S3Y-AA-OBI 构建体 14 (抗 CD20), G ²⁰ 接头	4	0.00036-0.22	0.010	0.011
S5X-AA-OBI 构建体 19 (抗 CD20)	2	0.0000041-0.0045	0.0022	0.0032

[1217] ¹除非另有说明,否则所有构建体都包括G20接头。

[1218] ²构建体包含自发E388D突变。

[1219] 实施例62. 抗PD-L1 Fc构建体对抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 的激活

[1220] ADCC报告基因测定

[1221] 开发ADCC报告基因测定以测试抗PD-L1 Fc构建体相对于抗PD-L1单克隆抗体阿维鲁单抗 (Bavencio) 诱导Fc γ RIIIIa信号传导并增强ADCC活性的程度。如实施例1、2和51-56中所述产生具有阿维鲁单抗的CDR的抗PD-L1 Fc构建体4、7、8、10、13、16和19。测试了构建体13 (PD-L1) 的四个版本,其中长链Fc单体之间的甘氨酸间隔物 (G₄、G₁₀、G₁₅和G₂₀接头) 的大小上有变化。在如下进行的ADCC报告基因测定中测试每个抗PD-L1 Fc构建体和岩藻糖基化阿维鲁单抗单克隆抗体:

[1222] 将HEK-PD-L1靶细胞 (1.25x10⁴个细胞/孔) 和效应Jurkat/Fc γ RIIIIa细胞 (Promega) (7.45x10⁴个细胞/孔) 重悬于补充有4%低IgG血清 (Promega) 的RPMI 1640培养基中,并与连续稀释的抗PD-L1构建体一起接种到96孔板中。在5%CO₂中在37℃下温育6小时后,使用PHERAstar FS发光计 (BMG LABTECH) 根据制造商的规程使用Bio-Glo荧光素酶测定试剂 (Promega) 测量发光。

[1223] 如表21中所示,抗PD-L1 Fc构建体在ADCC报告基因测定中诱导Fc γ RIIIIa信号传导。

[1224] 表21. 抗PD-L1 Fc构建体在ADCC报告基因测定中诱导Fc γ RIIIIa信号传导的效力

[1225]

构造体编号 ¹	n	EC50 (nM)		
		范围	平均值	SD
IgG1 抗体, 岩藻糖基化	5	0.037 - 0.056	0.049	0.008
S3I-AA-AVE 构建体 7 ² (抗 PD-L1)	6	0.023 - 0.05	0.039	0.012
S5I-AA-AVE 构建体 10 (抗 PD-L1)	1	0.025	0.025	N/A
S3W-AA-AVE 构建体 8 ² (抗 PD-L1)	1	0.034	0.034	N/A
S3Y-AA-AVE4 构建体 14 (抗 PD-L1), G ₄ 接头	1	0.041	0.041	N/A
S3Y-AA-AVE10 构建体 14 (抗 PD-L1), G ¹⁰ 接头	1	0.062	0.062	N/A

[1226]

构造体编号 ¹	n	EC50 (nM)		
		范围	平均值	SD
S3Y-AA-AVE15 构建体 14 (抗 PD-L1), G ₁₅ 接头	1	0.044	0.044	N/A
S3Y-AA-AVE 构建体 14 (抗 PD-L1), G ₂₀ 接头	6	0.025 - 0.044	0.032	0.008
S5X-AA-AVE 构建体 19 (抗 PD-L1)	1	0.027	0.027	N/A
S5Y-AA-AVE 构建体 16 (抗 PD-L1)	1	0.032	0.032	N/A

[1227] ¹除非另有说明, 否则所有构建体都包括G20接头。

[1228] ²构建体包含自发E388D突变。

[1229] ADCC二次测定

[1230] 在另外的ADCC测定中测试了抗PD-L1 Fc构建体8、9、13 (G20接头) 和19, 以确认ADCC报告基因测定结果。在如下进行的ADCC测定中测试每个抗PD-L1 Fc构建体以及岩藻糖基化和无岩藻糖基化阿维鲁单抗单克隆抗体:

[1231] 根据制造商的说明 (DiscoverX) 进行ADCC A549-KILR测定。使用AssayComplete™细胞培养试剂盒-105使A549-KILR细胞系在组织培养瓶中生长。使用AssayComplete™细胞分离试剂收获细胞, 将其用AssayComplete™细胞铺板39试剂调节至 2×10^5 个细胞/mL, 并以50μL/孔 (1×10^4 个细胞) 分配到96孔白底组织培养处理的板中。在AssayComplete™细胞铺板39试剂中将抗PD-L1构建体稀释至11nM, 然后立即进行连续稀释 (1:4)。将稀释的构建体以10μL/孔添加到孔中, 并将测定板在37℃和5%CO₂下温育30分钟。将冻存的NK细胞 (Hemacare) 解冻, 并使用AssayComplete™细胞铺板39试剂以 1×10^6 个细胞/mL重悬。温育30分钟后, 将NK细胞以50μL/孔 (5×10^4 个细胞/孔) 添加到测定板中。还包括使用无岩藻糖基化抗PD-L1 IgG1抗体的阳性对照和由在不存在抗体的情况下与A549-KILR细胞共培养的NK细胞组成的阴性对照。然后将测定板在37℃和5%CO₂下温育3小时。温育后, 立即将100μL/孔的KILR检测工作溶液 (由以4:1:1体积比混合的KILR检测试剂1、2和3组成) 添加到每个孔中。随后将测定板在室温下温育30分钟, 然后使用PHERAstar FS发光计 (BMG LABTECH) 确定发光水平。

[1232] 表22中描绘的结果证明, 抗PD-L1 Fc构建体在二次ADCC测定中诱导了FcγRIIIa信号传导。二次ADCC测定的结果与ADCC报告基因测定的结果一致。

[1233] 表22. 抗PD-L1 Fc构建体在KILR-A549细胞中诱导ADCC的效力

构造体编号 ¹	n	EC50 (nM)		
		范围	平均值	SD
IgG1 抗体, 岩藻糖基化	1	0.017	0.017	N/A
IgG1 抗体, 无岩藻糖基化	8	0.00016 - 0.011	0.0054	0.0041
S3W-AA-AVE 构建体 8 ² (抗 PD-L1)	1	0.0018	0.0018	N/A
S3A-AA-AVE 构建体 9 ² (抗 PD-L1)	1	0.00074	0.00074	N/A
S3Y-AA-AVE 构建体 13 (抗 PD-L1)	3	0.0042 - 0.011	0.0068	0.0035
S5X-AA-AVE 构建体 19 (抗 PD-L1)	2	0.000070 - 0.0012	0.00065	0.00082

[1235] ¹除非另有说明, 否则所有构建体都包括G20接头。[1236] ²构建体包含自发E388D突变。

[1237] 实施例63. 岩藻糖基化和无岩藻糖基化抗CD20 Fc构建体耗竭人血中的CD19+B细胞

[1238] 使用全血外周血单核细胞 (PMBC) 耗竭测定法来确定抗CD20构建体13的岩藻糖基化和无岩藻糖基化版本(下文实施例65所述)中包含来自奥滨尤妥珠单抗 (Gazyva) 的CDR的抗CD20 Fc构建体是否可以用于耗竭CD19+B细胞。CD19是B细胞特异性表面抗原, 并且源自B细胞的白血病和淋巴瘤表达CD19。将人全血收集在EDTA管中, 并将100uL与VivoTag 645标记的抗CD20 Fc构建体的连续稀释液(范围: 2.96μM至0.3pM) 在37℃下温育10分钟。将免疫细胞特异性抗体混合物(包含异硫氰酸荧光素 (FITC) 抗IgD、藻红蛋白 (PE) 抗CD11c、别藻蓝蛋白-H7 (APC/H7) 抗CD14、PerCp Cy5.5抗CD19、藻红蛋白-青色素7 (PE/Cy7) 抗CD56和太平洋蓝 (Pac Blue) 抗CD3抗体 (BioLegend)) 添加到血细胞中, 并在37℃下再染色30分钟。染色后, 在室温 (RT) 下用氯化铵溶液 (STEMCELL technologies) 将红细胞 (RBC) 裂解两次, 持续10分钟, 并在PBS中洗涤细胞。将细胞重悬于200μL FACS缓冲液(含2%FBS的PBS) 中, 并在

FACSVerse™仪器 (BD Biosciences) 中采集样品。使用前向散射 (FSC) 和侧向散射 (SSC) 设置白细胞门控, 并将B细胞表征为SSC_{low}、FSC_{int}、CD11c⁻、CD14⁻、CD56⁻、CD3⁻ 和CD19⁺、IgD⁺。

[1239] 图57示出了岩藻糖基化和无岩藻糖基化构建体13 (抗CD20) 均以比岩藻糖基化和无岩藻糖基化抗CD20 IgG1单克隆抗体 (奥滨尤妥珠单抗) 更低的浓度 (nM) 耗竭CD19⁺B细胞 (%IgD⁺细胞)。无岩藻糖基化抗CD20构建体13比岩藻糖基化抗CD20构建体13更有效地耗竭CD19⁺B细胞。类似地, 无岩藻糖基化抗CD20单克隆抗体比岩藻糖基化抗体更有效地耗竭CD19⁺B细胞。

[1240] 实施例64. 抗CD20 Fc构建体在小鼠淋巴瘤模型中减少肿瘤生长

[1241] 使用人淋巴瘤的小鼠播散性肿瘤模型通过生物发光成像来测试单剂量或多剂量的抗CD20 Fc构建体 (抗CD20构建体13) 对疾病进展和治疗反应的影响。根据IACUC规程, 在使用前将CB17-重症联合免疫缺陷 (SCID) 小鼠 (雌性, 6-7周大, 平均体重20克, 来自Charles River Laboratories的品系236) 饲养在动物护理设施中48小时。随意提供水和食物。所有实验均由机构动物伦理委员会批准。每天检查小鼠的不适迹象和一般状况。对于肿瘤异种移植模型, 通过尾静脉注射5x10⁶个表达荧光素酶的人Burkitt淋巴瘤Daudi细胞 (Daudi-Luc)。注射前, Daudi-luc细胞显示出CD20和CD38的细胞表面表达。肿瘤细胞植入后1小时对小鼠进行分期, 以基于生物发光信号 (在这种早期时间点主要集中在肺中) 随机分成不同的治疗组 (7只小鼠/组)。注射肿瘤细胞五小时后, 用类似于临床剂量范围的单剂量的药剂 (达雷木单抗 (抗CD38单克隆抗体), 18mg/kg; 奥滨尤妥珠单抗 (Gazyva, 抗CD20 IgG1单克隆抗体), 18mg/kg; 抗CD20构建体13, 30mg/kg, IgG1剂量的摩尔当量) 腹膜内治疗每组小鼠。向一组小鼠施用盐水作为阴性对照。在另一组中, 每2天以30mg/kg施用抗CD20构建体13, 总共6次剂量 (即, 在注射肿瘤细胞后1、3、5、7、9和11天用抗CD20构建体13治疗小鼠)。通过在IVIS光谱 (PerkinElmer) 上进行生物发光成像来确定肿瘤生长的时间变化。为了成像, 将小鼠麻醉, 然后注射D-荧光素 (150μL 15mg/mL储备液/小鼠)。然后将小鼠放在不透光的盒子中, 用电荷耦合器件检测器成像。在暴露期间对小鼠中从表达荧光素酶的细胞发出的光子进行计数。计算辐射的原始数据作为总通量 (光子/秒), 并使用Living Image Software (PerkinElmer) 进行定量图像分析。在照明下, 采集获取黑白图像, 以用于绘制感兴趣区域的解剖参考。在各个小鼠的整个身体面积上对从背侧和腹侧表面收集的光发射进行积分, 并以时间作为肿瘤质量发展的度量绘图。测量表示肿瘤负荷的积分生物发光光强度, 并将数据表示为平均值±SEM (7只小鼠/组)。

[1242] 图58表明抗CD20构建体13在播散性淋巴瘤模型中极大地限制了肿瘤发展。在肿瘤细胞移植后的21天内, 单剂量的抗CD20构建体13在减少肿瘤生长方面与达雷木单抗和奥滨尤妥珠单抗 (Gazyva) 一样有效。相对于相应的治疗组, 盐水组中用****标记的点的p值<0.0001。在该模型测定中, 多剂量的抗CD20构建体13与单剂量的构建体一样有效。小鼠对多剂量的构建体13耐受良好, 并且没有显示出可见的副作用 (数据未示出)。

[1243] 实施例65. 具有CCR4结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体13

[1244] CTLA-4结合结构域

[1245] 蛋白质表达

[1246] 如下所述制备由其中分支点在C末端Fc结构域的单分支Fc结构域形成的构建体。

Fc-抗原结合结构域构建体13 (CTLA-4) 各自包含两个不同的含Fc结构域单体的多肽 (抗CTLA-4长Fc链 (SEQ ID NO:ZZ中的任一者) 的两个拷贝以及短Fc链 (SEQ ID NO:ZZ) 的两个拷贝) 和抗CTLA-4轻链多肽 (SEQ ID NO:ZZ) 的两个拷贝。长Fc链包含电荷突变 (K409D/D399K突变) Fc结构域单体 (以促进同二聚化) 和N末端处的抗CTLA-4VH和CH1结构域 (EU位置1-220) (构建体13 (CTLA-4)) , 该Fc结构域单体与具有E357K电荷突变以及S354C和T366W突起形成突变 (以促进异二聚化) 的Fc结构域单体串联。短Fc链包含具有K370D电荷突变和Y349C、T366S、L368A和Y407V空腔形成突变 (以促进异二聚化) 的Fc结构域单体。抗CTLA-4轻链和抗CTLA-4VH和CH1取自伊匹单抗。也可以将CTLA-4轻链表达为作为scFv的一部分与长Fc链的N末端融合。可以用抗CTLA-4重链制备构建体13的其他版本, 其中每个版本在长Fc链多肽的Fc结构域单体之间携带不同大小的甘氨酸间隔物 (G4、G10、G15或G20接头)。将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达, 并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾 (HEK) 293细胞中。以下构建体中的每一个的氨基酸序列由三个单独的质粒 (一个质粒编码轻链 (抗CTLA-4) , 一个质粒编码长Fc链 (抗CTLA-4) , 并且一个质粒编码短Fc链) 编码:

[1247] 表23. 构建体13 (CTLA-4) 序列

[1248]

构建体	轻链	长 Fc 链 (抗 CTLA-4 VH 和 CH1)	短 Fc 链
构建体 13 (CTLA-4), G ₂₀ 接头	SEQ ID NO: EIVLTQSPGTLSL SPGERATLSCRA SQSVGSSYLAW YQQKPGQAPRL LIYGAFSRATGIP DRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFA VYYCQQYGSSP WTFGQGTKVEI KRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDN ALQSGNSQESVT EQDSKDYSL STLTLSKADYEK HKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNR GEC	SEQ ID NO: QVQLVESGGGV VQPGRSLRLSCA ASGFTFSSYTMH WVRQAPGKGLE WVTFISYDGNN KYYADSVKGRF TISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDT AIYYCARTGWL GPFDYWGQGTL VTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVK DYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKP SNTKVDKRVEP KSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQYN STYRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQP	SEQ ID NO: DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQ VCTLPPSRDEL KNQVSLSCAVD GFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFF LVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPG

[1249]	REPQVYTLPPCR DKLTKNQVSLW CLVKGFYPSDIA VEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFS CSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK GGGGGGGGGG GGGGGGGGGG DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELT KNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKT TPPVLKSDGSFF LYSDLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPG	

[1250] 实施例66. 无岩藻糖基化对构建体活性的影响

[1251] 进行了一系列研究以检查无岩藻糖基化对构建体活性的影响。构建体包括：抗CD20构建体13 (S3Y)，上文实施例2、表8所述；抗PD-L1构建体13 (S3Y)，上文实施例2、表8所述；以及抗CLTA-4构建体13 (S3Y)，上文实施例65所述。

[1252] 构建体制备和表征

[1253] 将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达，并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾 (HEK) 293细胞中。氨基酸序列由三个单独的质粒（一个质粒编码轻链，一个质粒编码长Fc链，并且一个质粒编码短Fc链）编码。通过将膜可渗透的1,3,4-三-O-乙酰基-2-脱氧基-2-氟-L-岩藻糖抑制剂添加到转染的细胞培养物中来抑制岩藻糖基化。

[1254] 蛋白质纯化

[1255] 使用Poros MabCapture A柱，通过基于蛋白A的亲和柱色谱法从细胞培养上清液

中纯化表达的蛋白质。上样后,用磷酸盐缓冲盐水(PBS,pH7.0)洗涤捕获的SIF-抗体构建体,并进一步用中间洗涤缓冲液50mM柠檬酸盐缓冲液(pH 5.5)洗涤,以除去其他与工艺有关的杂质。用100mM甘氨酸(pH 3)洗脱结合的SIF抗体物质,并通过添加1M TRIS(pH 7.4)快速中和洗脱液,然后离心并通过0.2 μ m过滤器进行无菌过滤。

[1256] 使用Poros XS树脂,通过离子交换色谱法进一步分离蛋白质。用50mM MES(pH 6,缓冲液A)预平衡柱,并且在平衡缓冲液中稀释(1:3)样品以便上样。在12-15个柱体积上,使用从50mM MES(100%A)到400mM氯化钠(pH 6,100%B)的线性梯度洗脱样品。通过分析尺寸排阻色谱法(SEC)分析洗脱期间收集的所有级分,并合并目标级分以产生纯化的物质。

[1257] 理化表征

[1258] 在离子交换后,在切向流过滤系统上,使用30kDa截止聚醚砜(PES)膜滤筒将合并物质缓冲交换到1X-PBS缓冲液中。将样品浓缩至大约10-15mg/mL,并通过0.2 μ m过滤器进行无菌过滤。

[1259] 评估构建体的尺寸纯度、内毒素和无岩藻糖基化水平。将分析尺寸排阻色谱法用于后蛋白A、合并的离子交换级分和最终的纯化物质的纯度评估。使用1X-PBS将纯化物质稀释至1mg/mL,并在具有UV&FLD检测器的Agilent 1200系统上使用Zenix SEC-300(4.6x300mm,3 μ m,300Å, Sepax,目录号213300-4630)作为分析柱进行分析。在分析前,将柱以0.3mL/min用100mM磷酸钠、200mM精氨酸、300mM氯化钠(pH=6.7)和0.05%w/v叠氮化钠缓冲液平衡一小时。进样量为大约10-15 μ L,柱温:30℃。在280nm处进行UV检测,通过在280nm处激发并且在330nm处发射进行FLD,总运行时间为15分钟。使用Charles Rivers Labs的Endosafe®-PTS内毒素测试系统测量内毒素水平。通常在每个纯化步骤结束时通过0.22 μ m过滤器过滤样品,以过滤出颗粒和细菌,然后检查内毒素。将缓冲液和探针用LAL试剂水(Charles River Labs,目录号W130)稀释10至20倍,并使用Charles River Labs Endosafe®-PTS滤筒(0.005EU/mL,目录号PTS20005F或0.01EU/mL,目录号PTS2001F)进行测试。

[1260] 通过糖肽质谱法分析无岩藻糖基化水平

[1261] 将大约50 μ g的构建体物质在6M盐酸胍的50mM碳酸氢铵(pH 7.8)缓冲液中稀释至1 μ g/ μ L。将蛋白质变性并在65℃下用DTT还原,并在室温下在黑暗中用碘乙酰胺烷基化一小时,然后在4℃下用4L 25mM碳酸氢铵透析过夜。第二天早上,以1:25的酶与底物之比添加胰蛋白酶,以在Barocycler中进行消化。将该物质立即用甲酸淬灭。

[1262] 将约2 μ g蛋白质进样到1x100mm Waters Acquity C18 BEH柱中。使用0.1%甲酸的水溶液(A)至0.1%甲酸的乙腈溶液(B)梯度,流速为75 μ L/min。质谱分析用QExactive以阳性模式操作进行,扫描范围为350-2000m/z。通过对每种糖肽物质的面积进行积分来确定N-聚糖组成。通过将所有N-聚糖上的无岩藻糖基化聚糖相加来计算无岩藻糖基化聚糖的百分比。

[1263] 抗CD20构建体13

[1264] 表26描述了在以下描述的研究中使用的抗CD20构建体的特征。

[1265] 表24.抗CD20构建体13的理化表征

	岩藻糖基化抗 CD20 构建体 13 (S3Y-AA-OBI-002)	无岩藻糖基化抗 CD20 构建体 13 (S3Y-AA-OBI-003)
[1266]	尺寸纯度 (质量%)	90%
	内毒素 (EU/g)	11.4
	无岩藻糖基化水平 (占有聚糖的百分比)	40%

[1267] 抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)

[1268] 将Raji靶细胞 (1.25×10^4 个细胞/孔) 和Jurkat/Fc RIIIa效应细胞 (Promega) (7.45×10^4 个细胞/孔) 重悬于补充有4%低IgG血清 (Promega) 的RPMI 1640培养基中, 并与连续稀释的抗CD20构建体一起接种到96孔板中。在5%CO₂中在37℃下温育6小时后, 使用PHERAstar FS发光计 (BMG LABTECH) 根据制造商的规程使用Bio-Glo荧光素酶测定试剂 (Promega) 测量发光。

[1269] 图59的结果表明, 无岩藻糖基化构建体在ADCC报告基因测定中具有比岩藻糖基化构建体增强的效力。

[1270] 抗体依赖性细胞吞噬作用 (ADCP)

[1271] 将Raji靶细胞 (1.5×10^4 个细胞/孔) 和Jurkat/Fc RIIa-H效应细胞 (Promega) (3.5×10^4 个细胞/孔) 重悬于补充有4%低IgG血清 (Promega) 的RPMI 1640培养基中, 并与连续稀释的抗CD20构建体一起接种到96孔板中。在5%CO₂中在37℃下温育6小时后, 使用PHERAstar FS发光计 (BMG LABTECH) 根据制造商的规程使用Bio-Glo荧光素酶测定试剂 (Promega) 测量发光。

[1272] 图60的结果表明, 无岩藻糖基化构建体在ADCP报告基因测定中具有与岩藻糖基化构建体相当的效力。

[1273] 全血中CD19+细胞的耗竭

[1274] 将人全血收集在EDTA管中, 并将60uL与VivoTag 645标记的抗CD20构建体的5倍连续稀释液 (范围: $2.96 \mu\text{M}$ 至 0.3pM) 在37℃下温育10分钟。将免疫细胞特异性染色混合物 (包含异硫氰酸荧光素 (FITC) 抗IgD (BioLegend)、藻红蛋白 (PE) 抗CD11c (BioLegend)、别藻蓝蛋白H7 (APC/H7) 抗CD14 (BioLegend)、PerCp Cy5.5抗CD19 (BioLegend)、藻红蛋白-青色素7 (PE/Cy7) 抗CD56 (BioLegend)、太平洋蓝 (Pac Blue) 抗CD4抗体 (BioLegend) 和BV510抗CD3 (BD Bioscience)) 添加到血细胞中, 并在37℃下再染色30分钟。此后, 在室温下用氯化铵溶液 (STEMCELL technologies) 将RBC裂解两次, 持续10分钟, 并在PBS中将细胞洗涤两次。将细胞重悬于200μL PBS/1%PFA中, 并在FACSVerse™仪器 (BD Biosciences) 中采集样品。使用前向散射 (FSC) 和侧向散射 (SSC) 设置白细胞门控, 并将B细胞表征为SSC_{low}、FSC_{int}、CD11c⁻、CD14⁻、CD56⁻、CD3⁻ 和CD19⁺、IgD⁺。

[1275] 通过抗CD20构建体处理后全血中CD19+B细胞的损失在图61中示出。无岩藻糖基化抗CD20在减少CD19+细胞的比例方面更强效。

[1276] 抗PD-L1构建体13

[1277] 表25描述了在以下描述的研究中使用的抗PD-L1构建体的特征。

[1278] 表25. 抗PD-L1构建体的理化表征

	岩藻糖基化抗 PD-L1 构建体 (S3Y)	无岩藻糖基化抗 PD-L1 构建体 (S3Y)
尺寸纯度 (质量%)	95%	98%
[1279] 内毒素 (EU/g)	3.3	3.3
无岩藻糖基化水平 (占有聚糖的百分比)	0.5%	33%

[1280] 抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)

[1281] 获得A549细胞 (ATCC) ,并在F-12K培养基 (Gibco) 、10%FBS (Hyclone) 和2mM glutamax (Gibco) 中培养。实验前二十四小时,在生长培养基中将A549细胞培养至150,000个细胞/mL,该生长培养基中添加有50ng/mL的IFN-以刺激PD-L1表达。将Hemacare NK细胞用作该测定中的效应细胞,并将其在未经组织培养处理的烧瓶 (Falcon) 中静置过夜。然后用3ml Accutase (Corning) 收获A549细胞5分钟。将细胞以 0.2×10^6 个细胞/mL重悬。将50μL A549细胞添加到96孔经组织培养处理的白色平底板 (Costar) 的每个孔中。不经过任何温育时间,将10μL构建体添加到每个孔中。之后,立即将50μL NK细胞以 1×10^6 个细胞/mL添加到板的每个孔中。将板在37C下温育5小时。然后添加50μL Cytotox glo试剂 (Promega) ,然后在37C下温育15分钟。使用PHERAstar FS (BMG Labtech) 读取发光。图62示出了用抗PD-L1构建体处理的表达PD-L1的A549细胞的ADCC测定的结果。无岩藻糖基化增加了构建体诱导ADCC的效力。

[1282] 抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)

[1283] 在存在IL-10 (R&D Systems) (50ng/mL) 的情况下,将M0巨噬细胞以50,000个细胞/孔/50μL铺在96孔平底组织培养板 (Falcon/Corning3072) 中含2%热灭活的超低IgG FBS (HyClone) 的OptiMem培养基 (Gibco) 中,以最终分化为M2c巨噬细胞。第二天,将构建体以2倍连续稀释度 (25μL/孔) 以4X浓度添加到M2c效应细胞中2-4小时。用Accutase (Corning) 将H441靶细胞从正常培养条件 (10%FBS,热灭活 (Hyclone,Defined) ,RPMI,GlutaMax) 中移出,以保留其细胞表面受体。然后用pHrodo红细胞标记试剂盒 (Essen) 在500ng/mLx1小时x37℃下以 1×10^6 /mL标记细胞。然后以10,000个细胞/孔/25μL添加标记的靶标,最终体积为100μL。通过活细胞成像系统 (Essen/Sartorius, IncuCyte S3) 增加pHrodo红色荧光强度来测量吞噬作用。

[1284] 该测定一式三份进行,用10倍物镜捕获每个孔的相和红色荧光的4张图像。每次运行对照进行分析—单独的H441 pHrodo (以设置背景红色荧光截止值) 和单独的M2c (相掩模以识别巨噬细胞)。将扫描时间设置为24小时内的每小时。分析后,用于量化总H441吞噬作用的度量标准是总红色物体积分强度 (RCU $\times \mu m^2$ /图像)。图63示出了用抗PD-L1构建体处理的表达PD-L1的A549细胞的ADCP测定的结果。无岩藻糖基化未改变构建体诱导ADCP的效力。

[1285] 补体依赖性细胞毒性

[1286] 将转染以稳定表达人PD-L1基因的人胚肾 (HEK) 细胞 (CrownBio) 在DMEM、10%FBS 和2μg/mL嘌呤霉素 (作为选择标记) 中培养。收获细胞并将其在不含基因泰克汀 (genetecin) 或酚红 (Lonza) 的X-Vivo-15培养基中稀释。将100μL 6×10^5 个细胞/mL的HEK-

PD-L1细胞铺在96孔组织培养处理的平底板 (BD Falcon) 中。将构建体和抗体在X-Vivo-15培养基中按以1:3连续稀释。将50 μ l稀释的构建体添加到孔中靶细胞的顶部。将50 μ L未稀释的人血清补体 (Quidel Corporation) 添加到每个孔中。然后将测定板在37C下温育2小时。温育2小时后,将20 μ L的WST-1细胞增殖试剂 (Roche Diagnostics Corp) 添加到每个孔中,并将板在37C下温育过夜。第二天早上,将测定板放置在板振荡器上2-5分钟。在分光光度计 (Molecular Devices SPECTRAmax M2) 上以600nm校正并在450nm处测定吸光度。

[1287] 图64示出了用抗PD-L1构建体处理的表达PD-L1的A549细胞的CDC测定的结果。无岩藻糖基化未改变构建体诱导CDC的效力。

[1288] 其他实施方案

[1289] 本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请都以引用的方式并入本文,其程度如同每个独立的出版物或专利申请具体地且个别地指出以引用的方式并入。

[1290] 虽然本公开已结合其具体实施方案进行描述,但应理解,进一步的修改是可能的,并且本专利申请预期覆盖一般而言遵循本公开的原理的本公开的任何变化、用途或适应,并且包括与本公开的此类偏离,所述偏离在本公开所属领域内的已知或惯常实践内,并且可以应用于上文所述的基本特征,并且落入权利要求的范围内。

[1291] 其他实施方案在权利要求内。

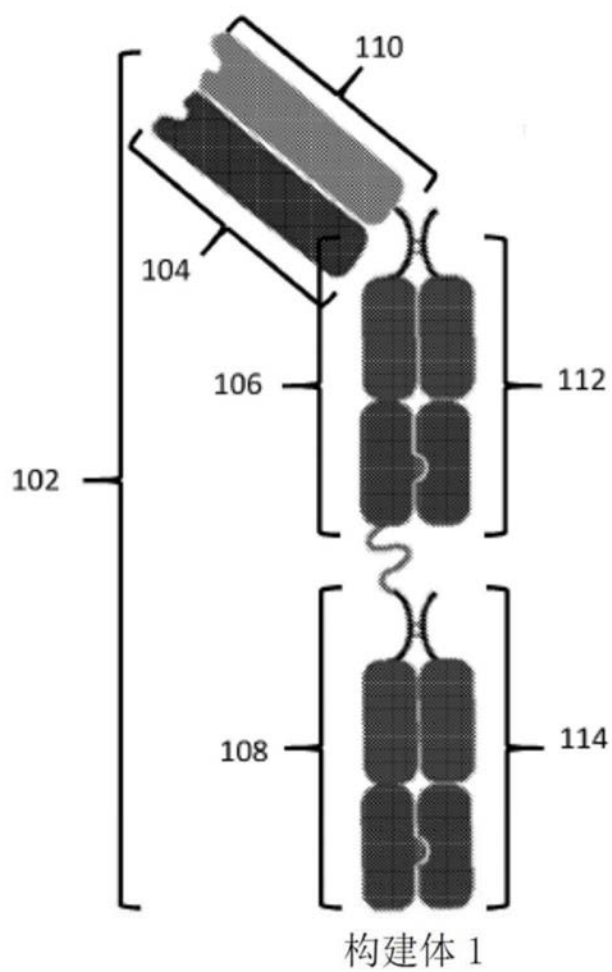


图1

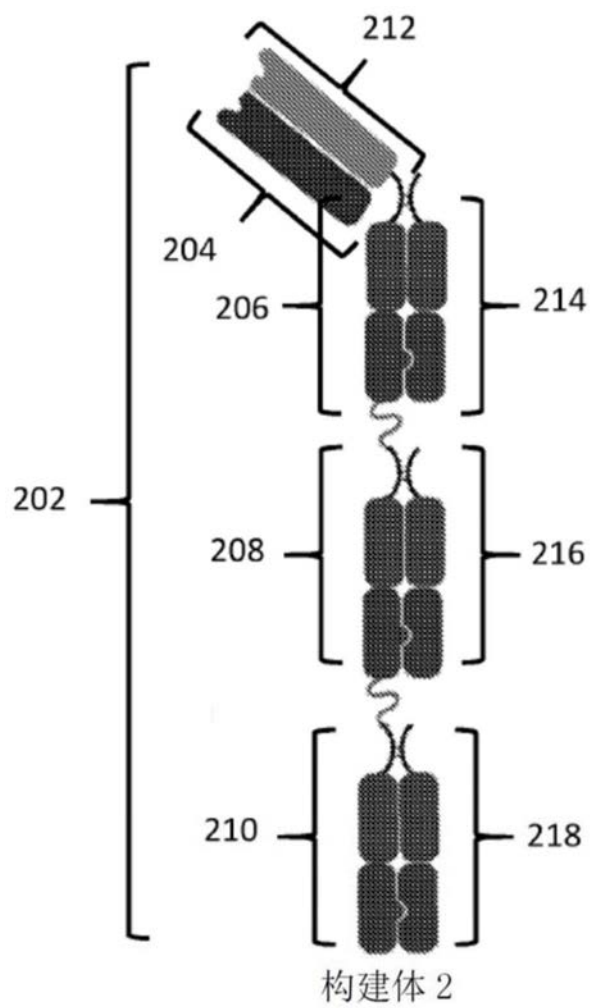


图2

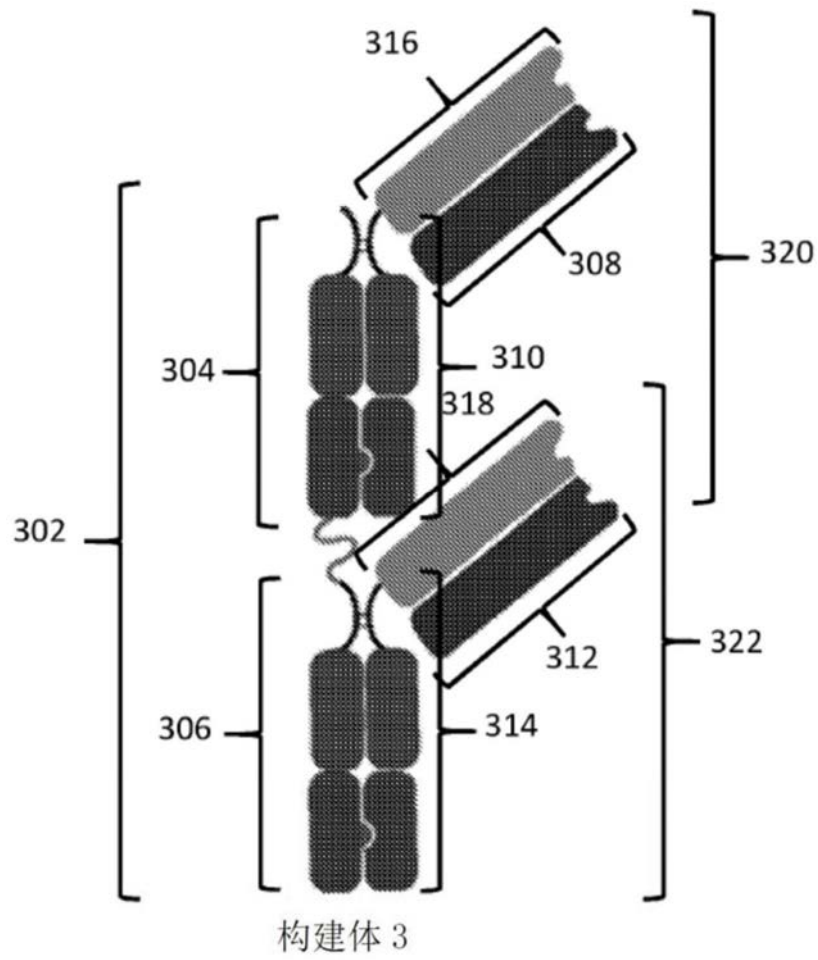


图3

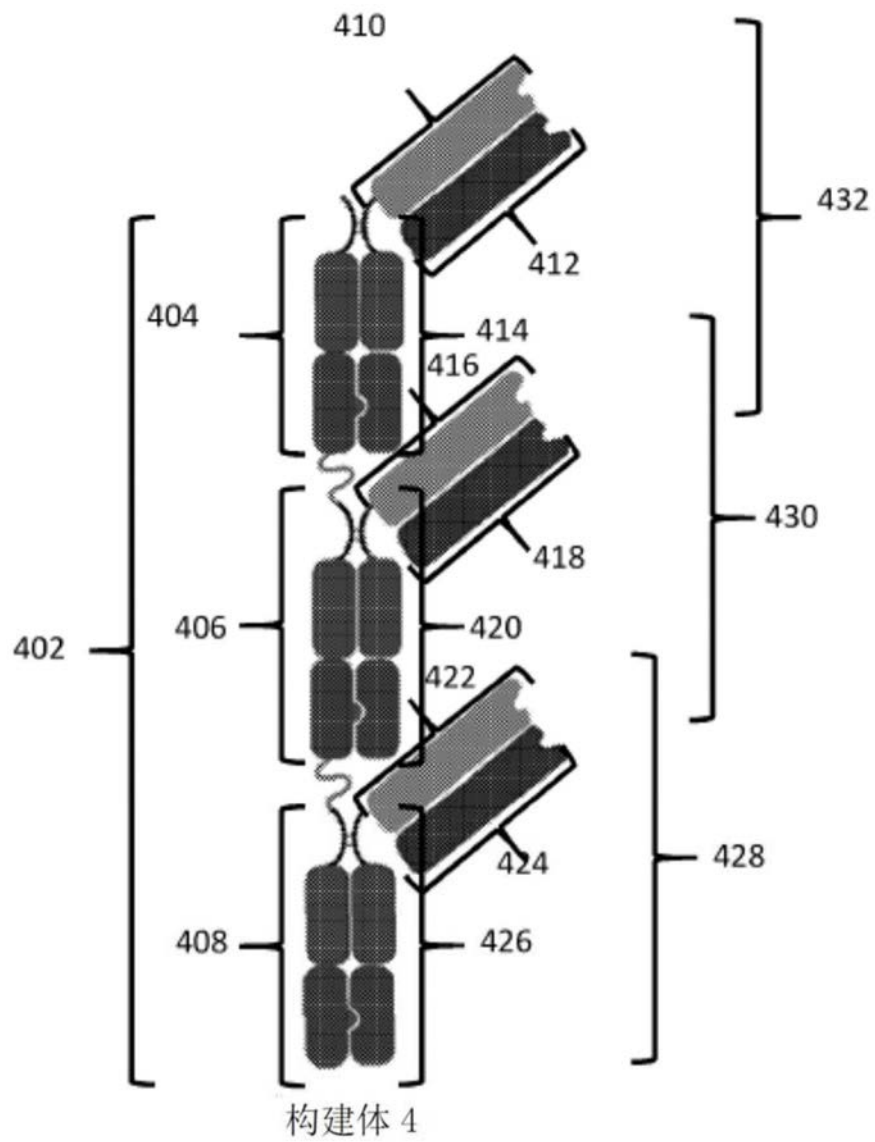


图4

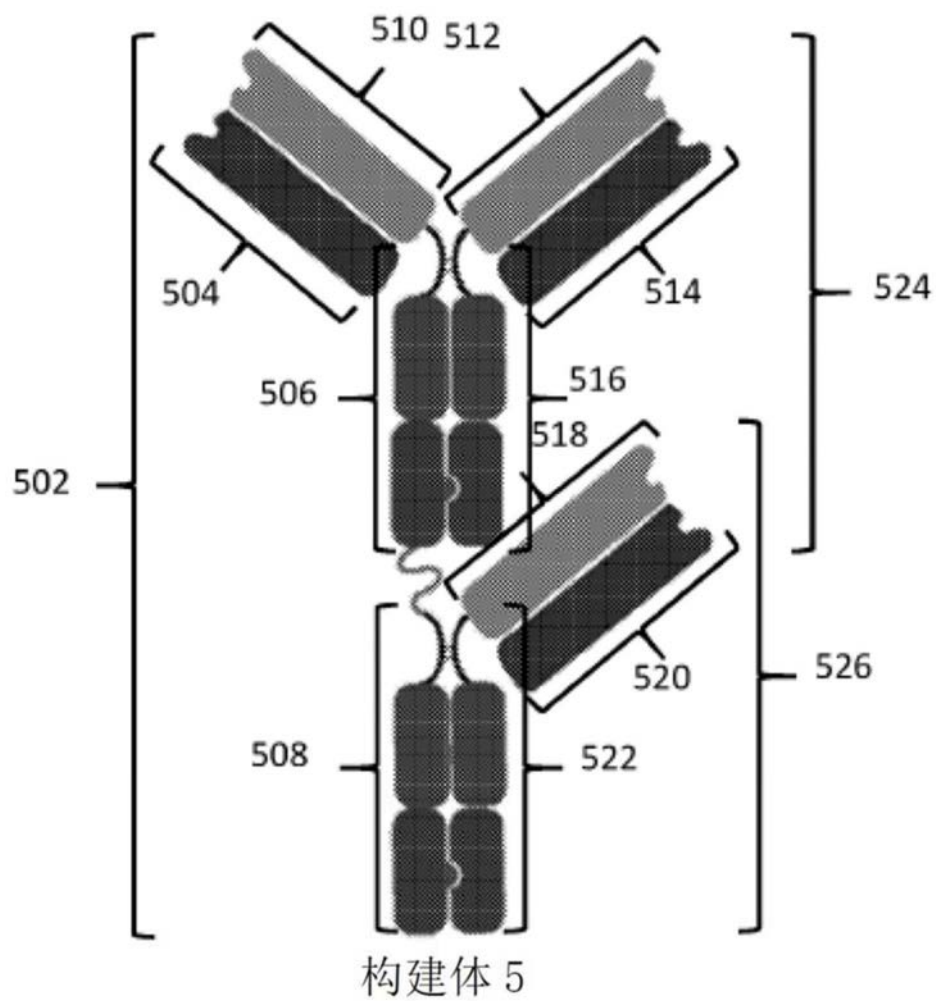


图5

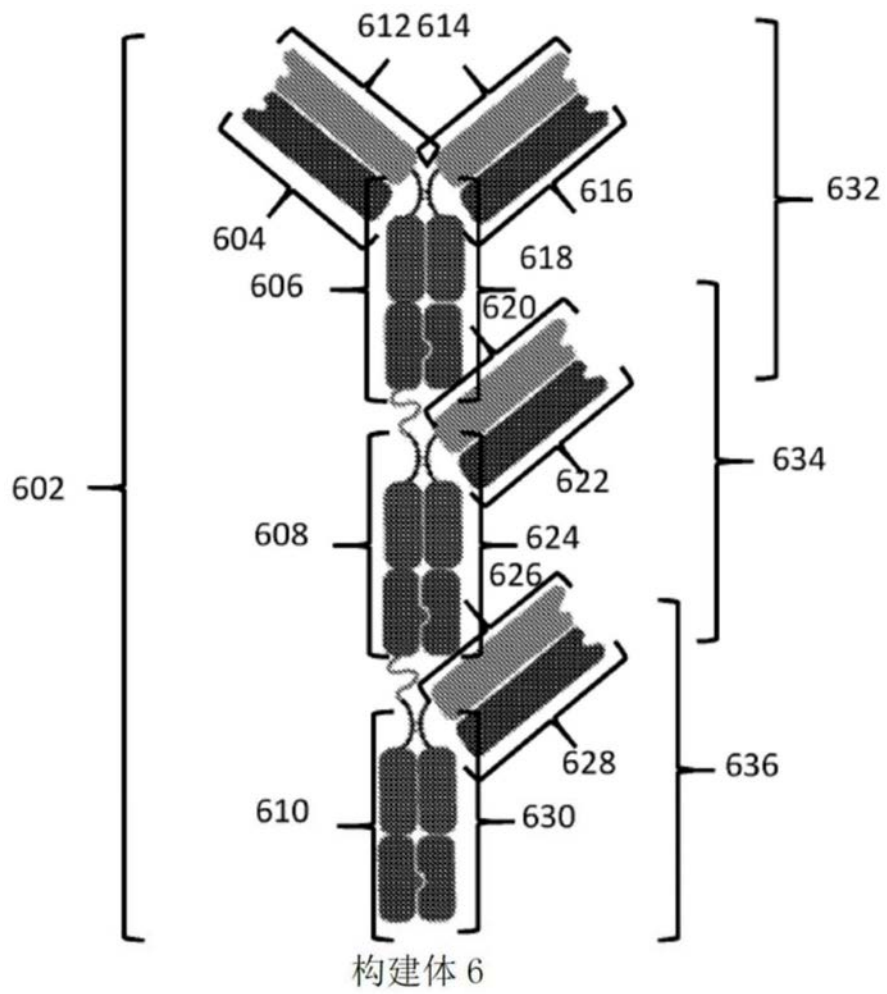


图6

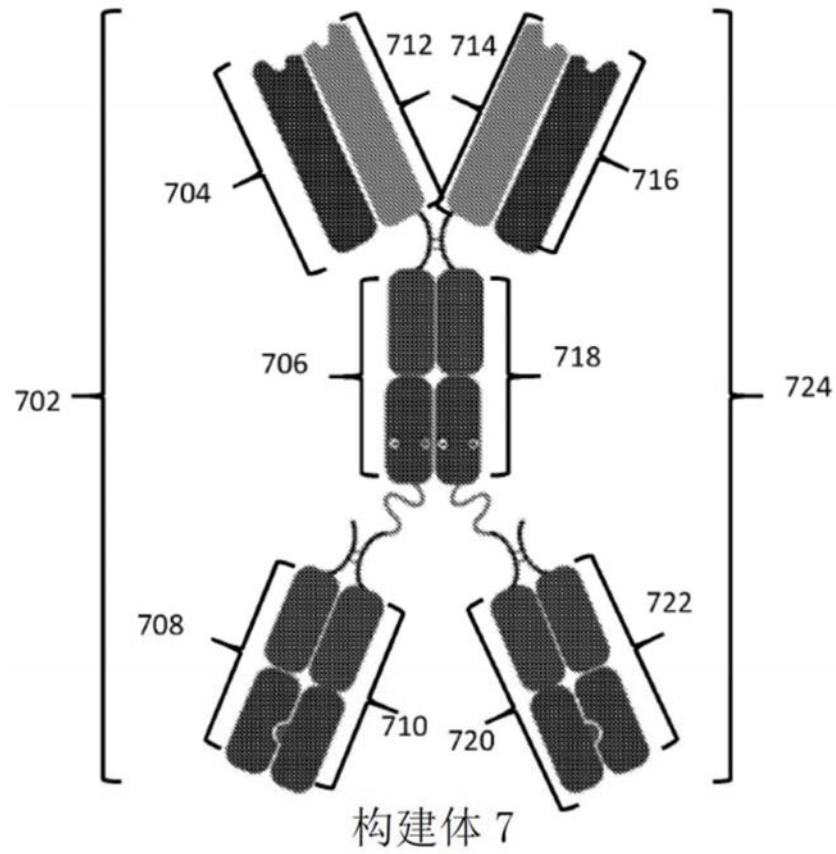


图7

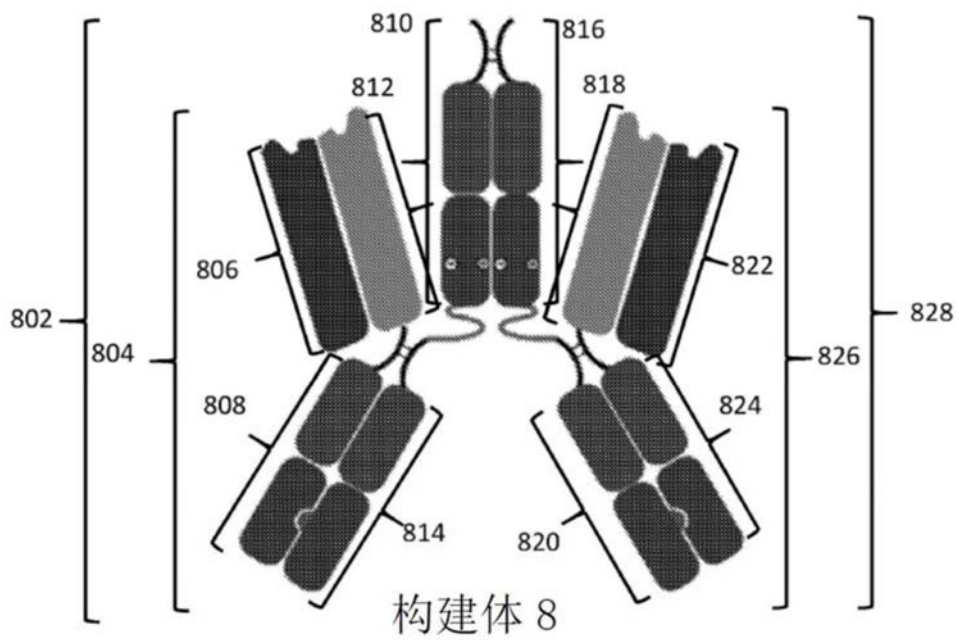
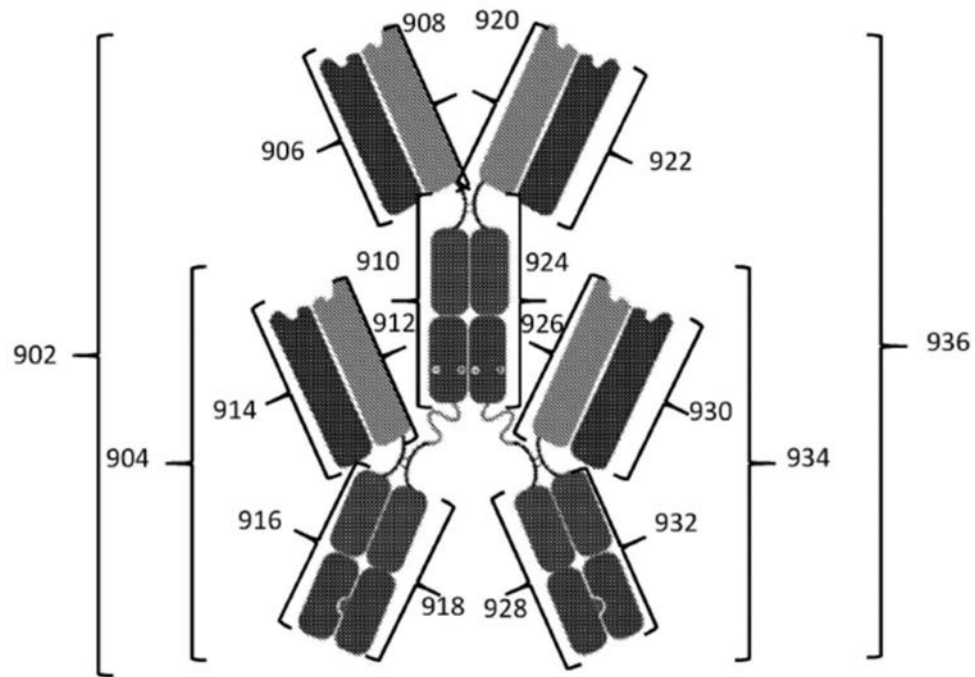


图8



构建体 9

图9

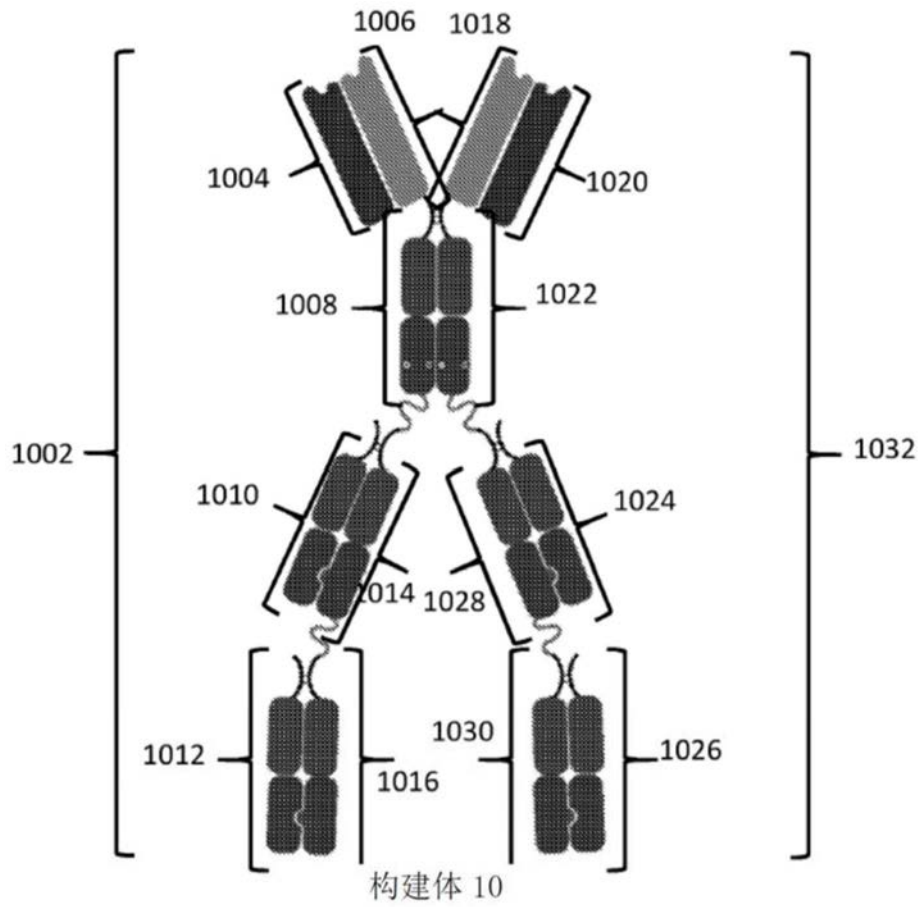


图10

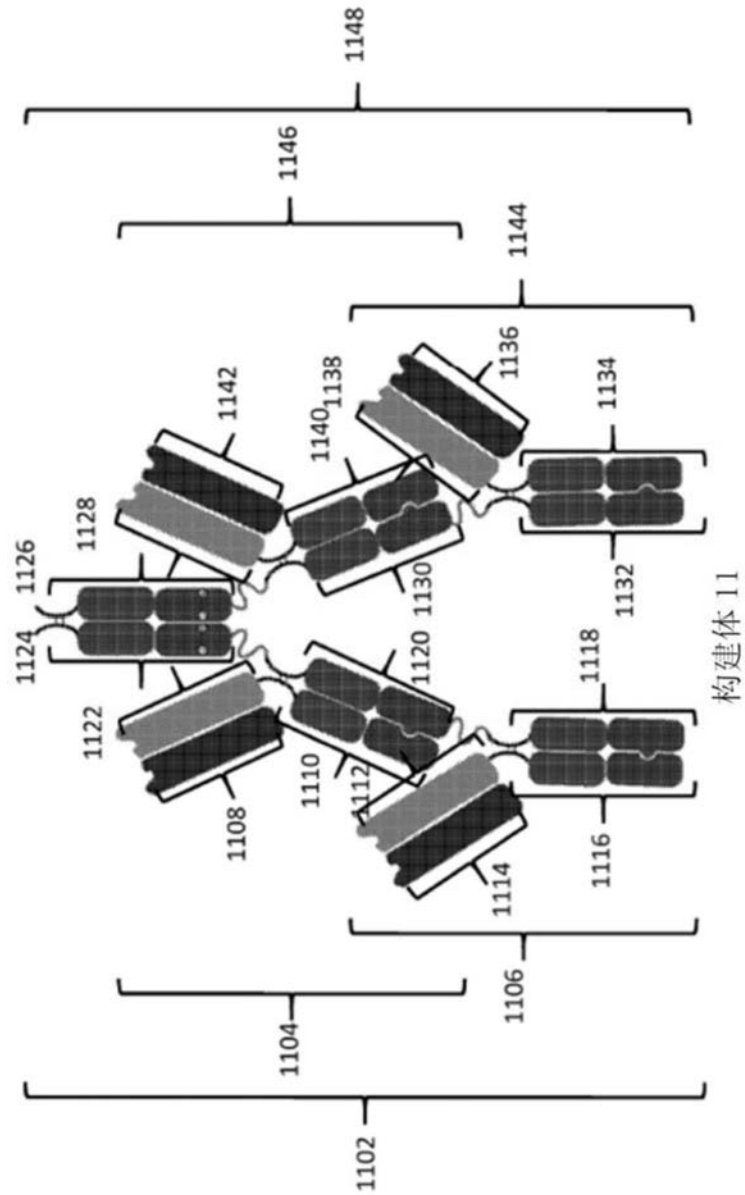


图11

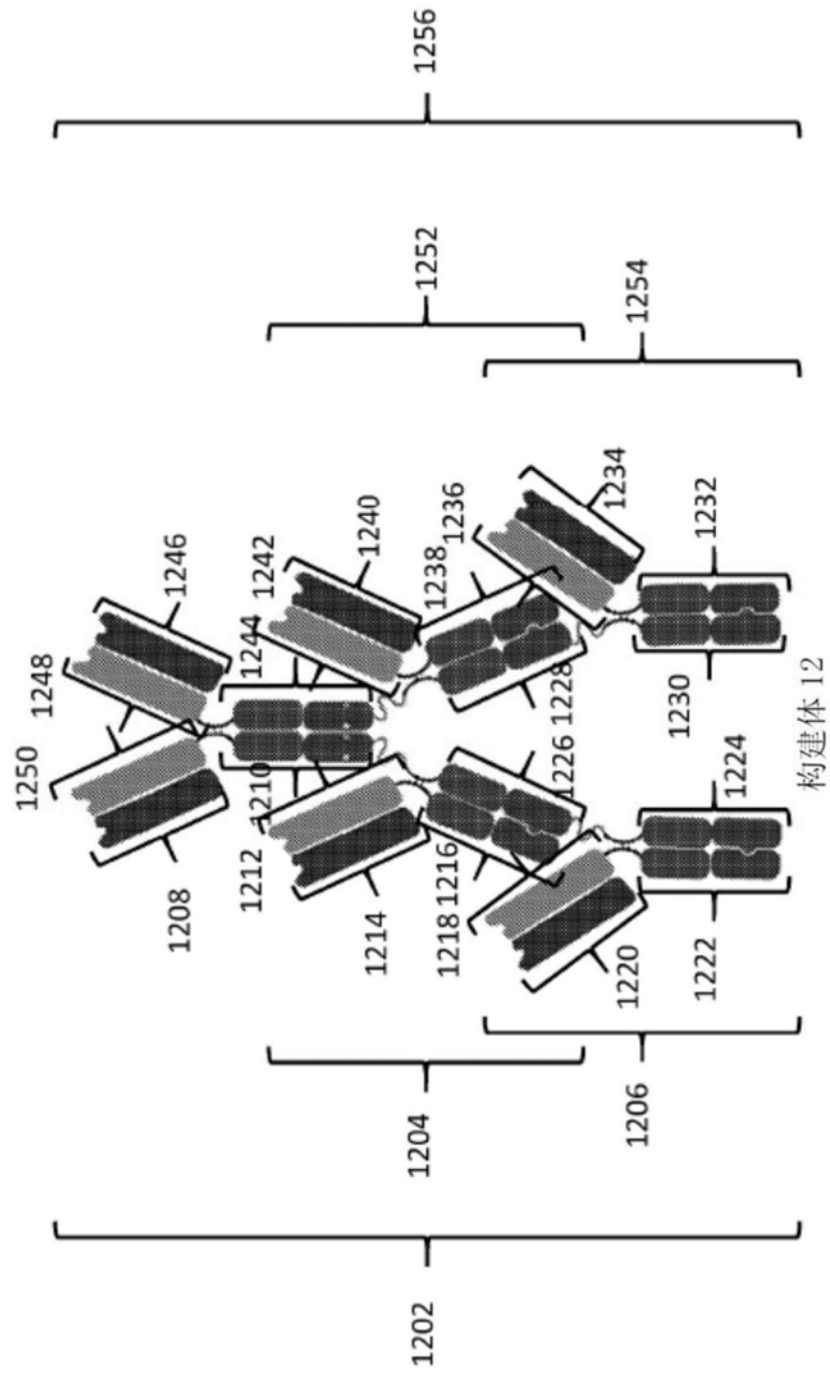


图12

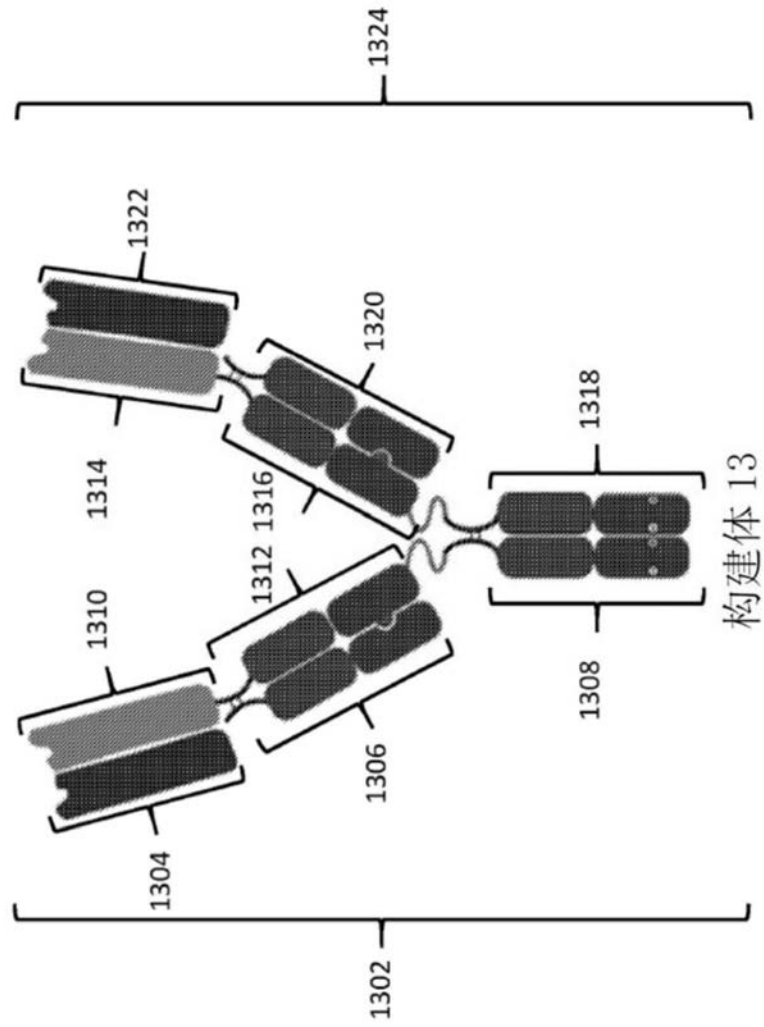


图13

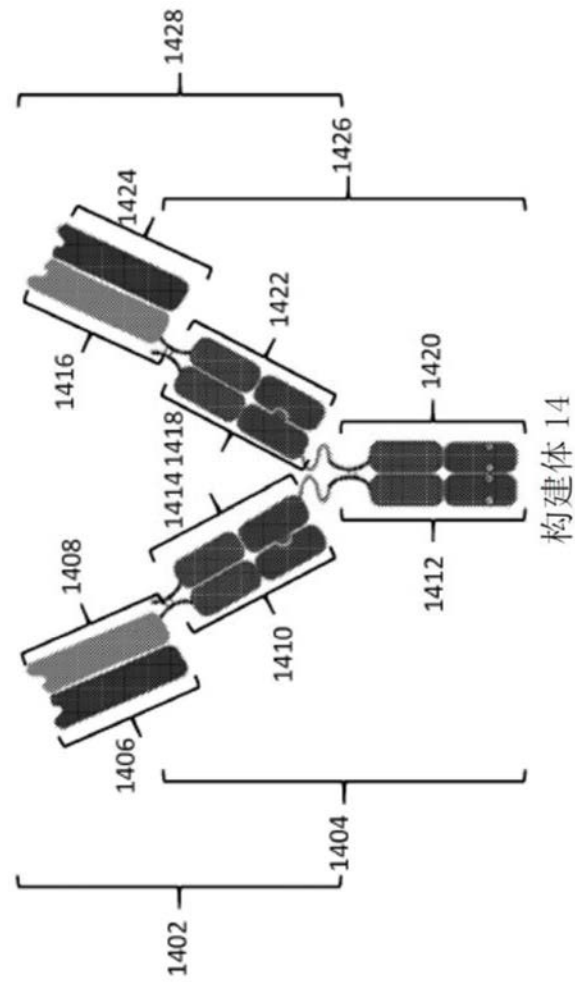


图14

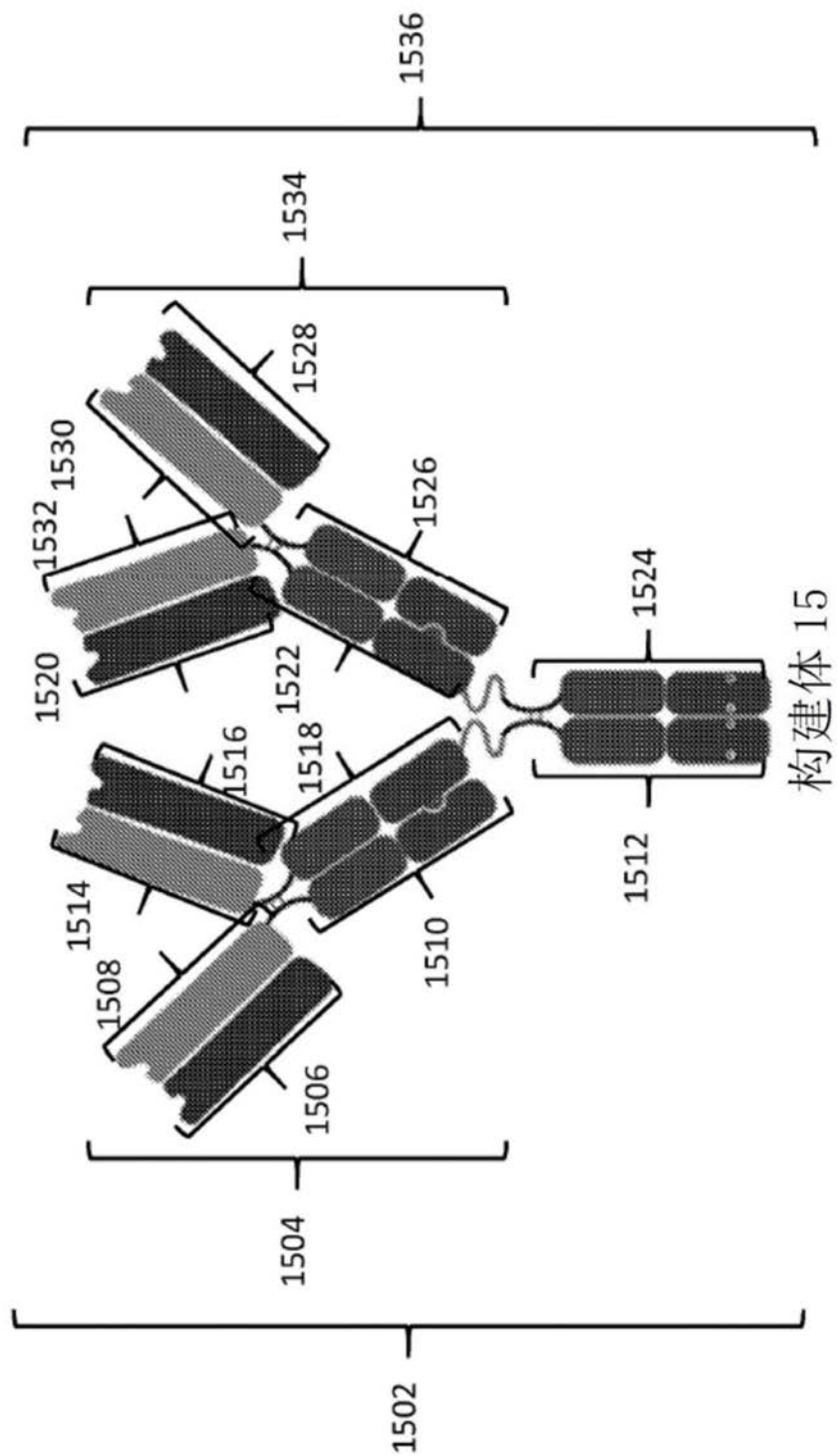


图15

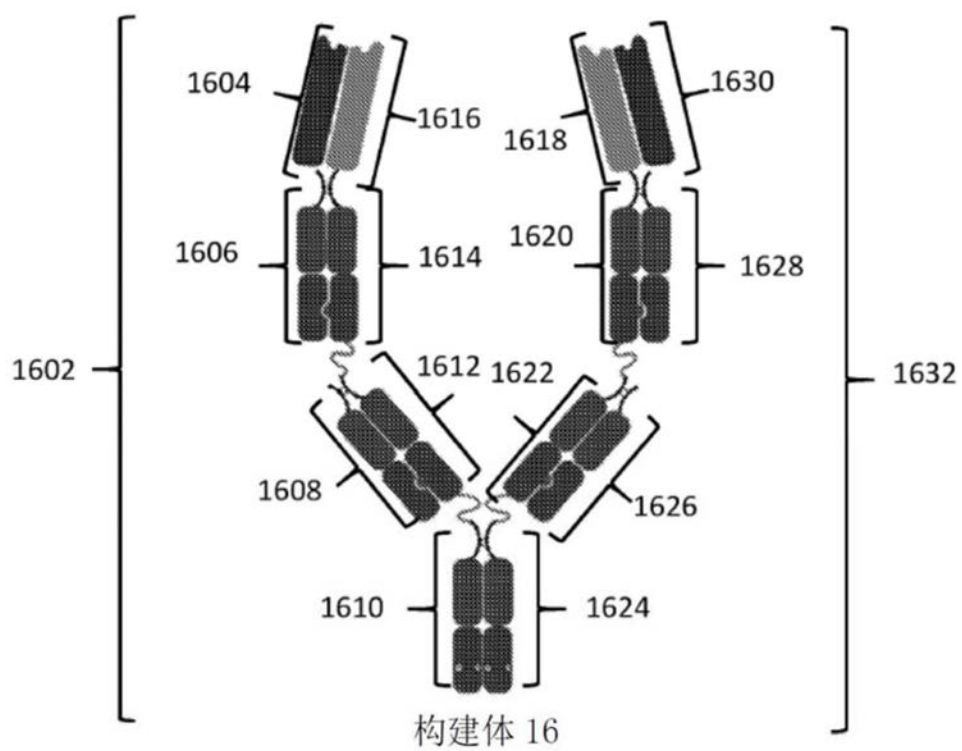


图16

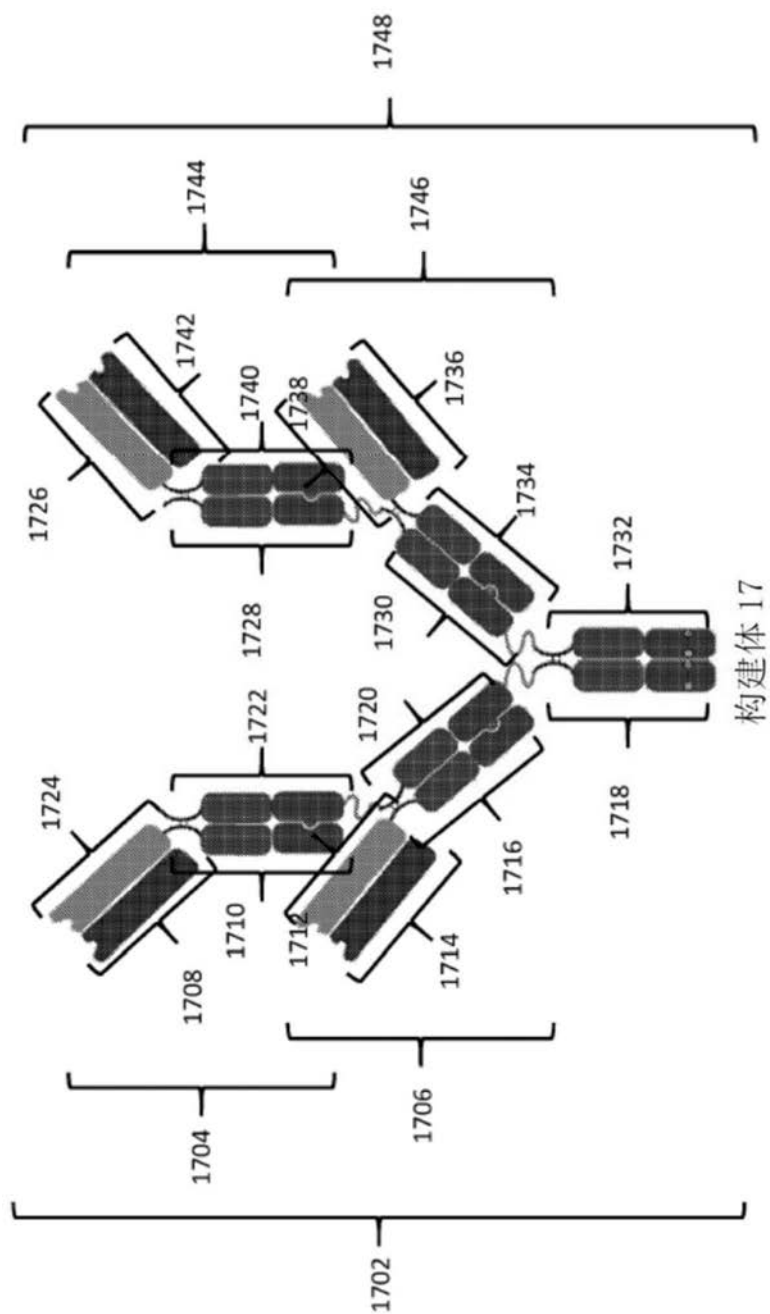


图17

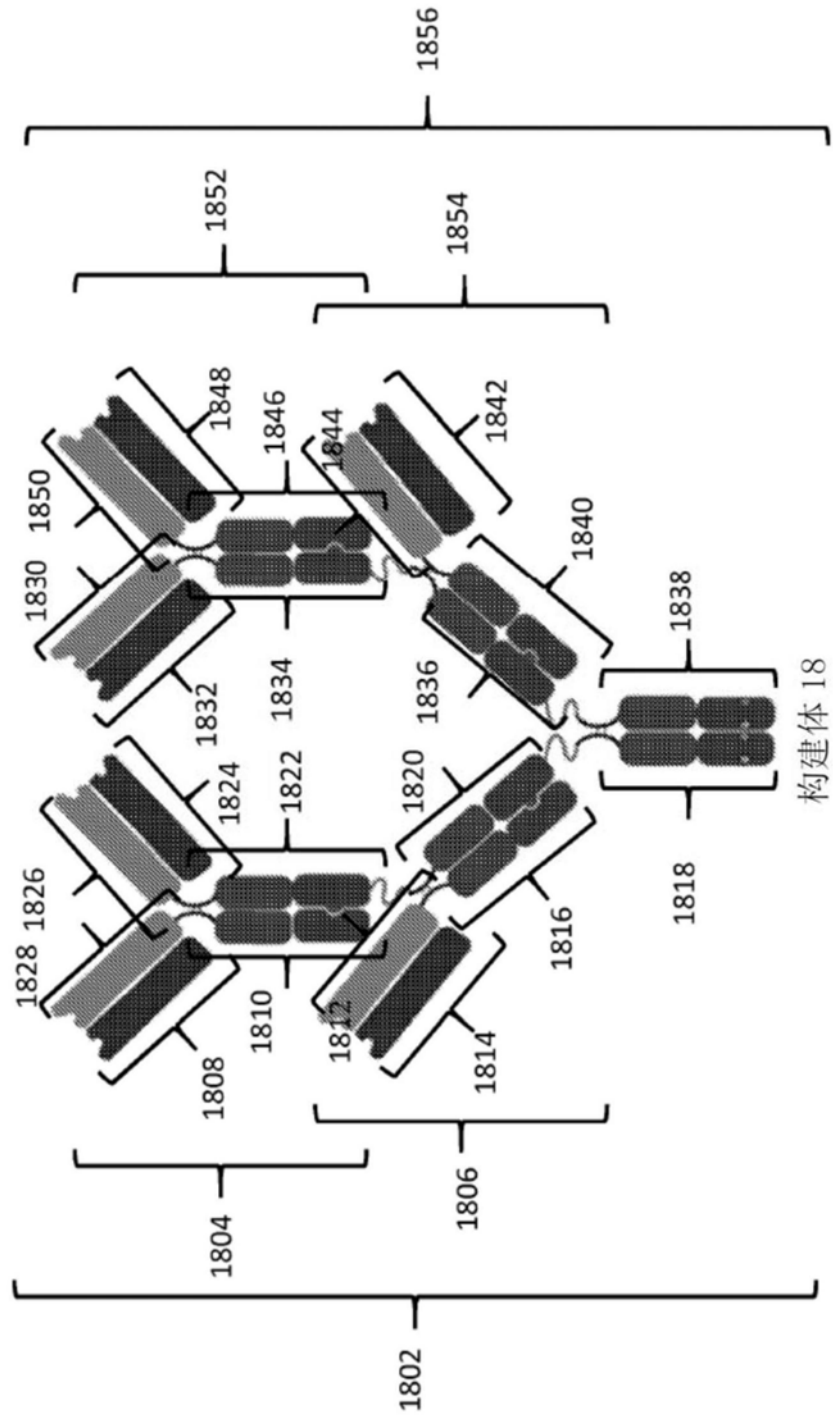


图18

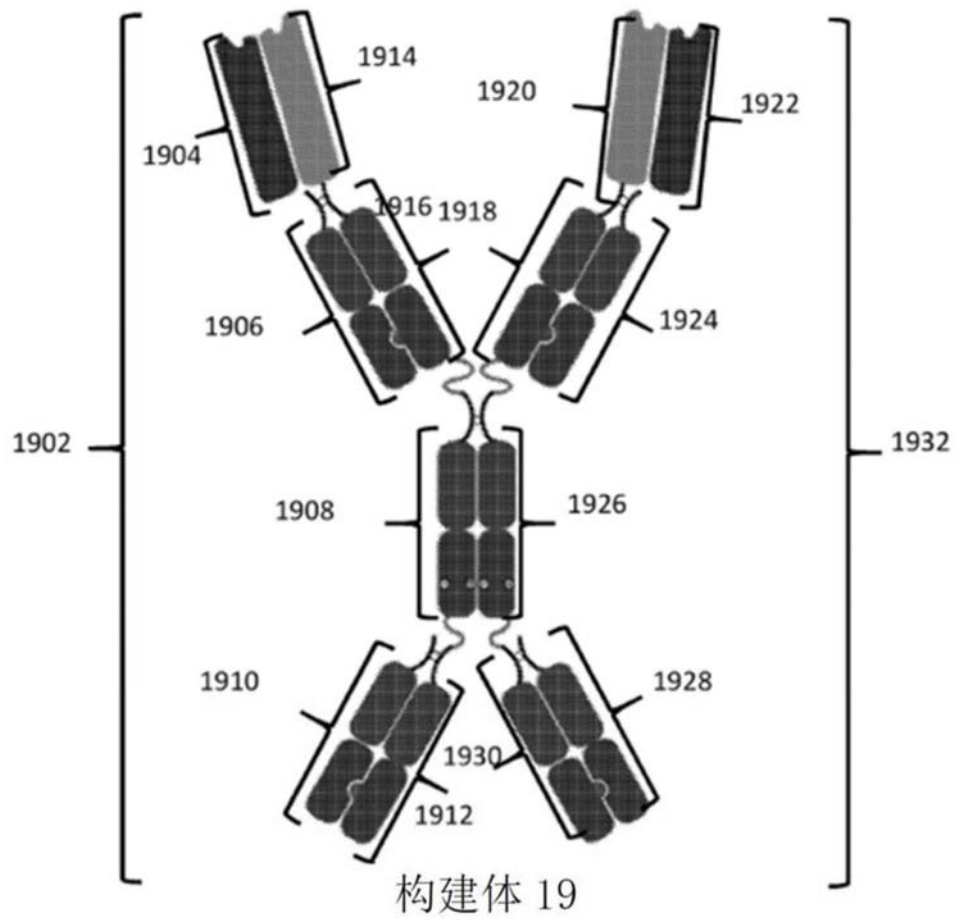


图19

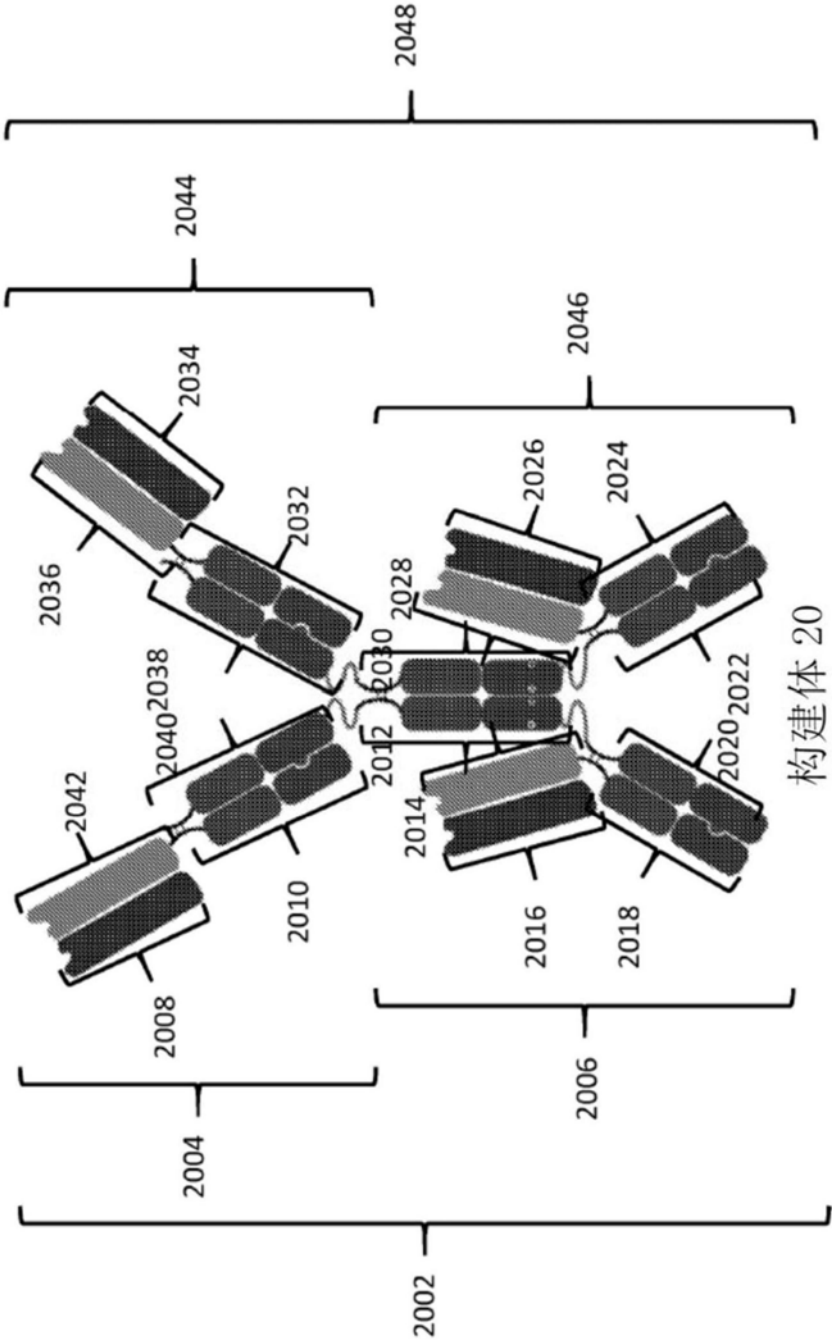


图20

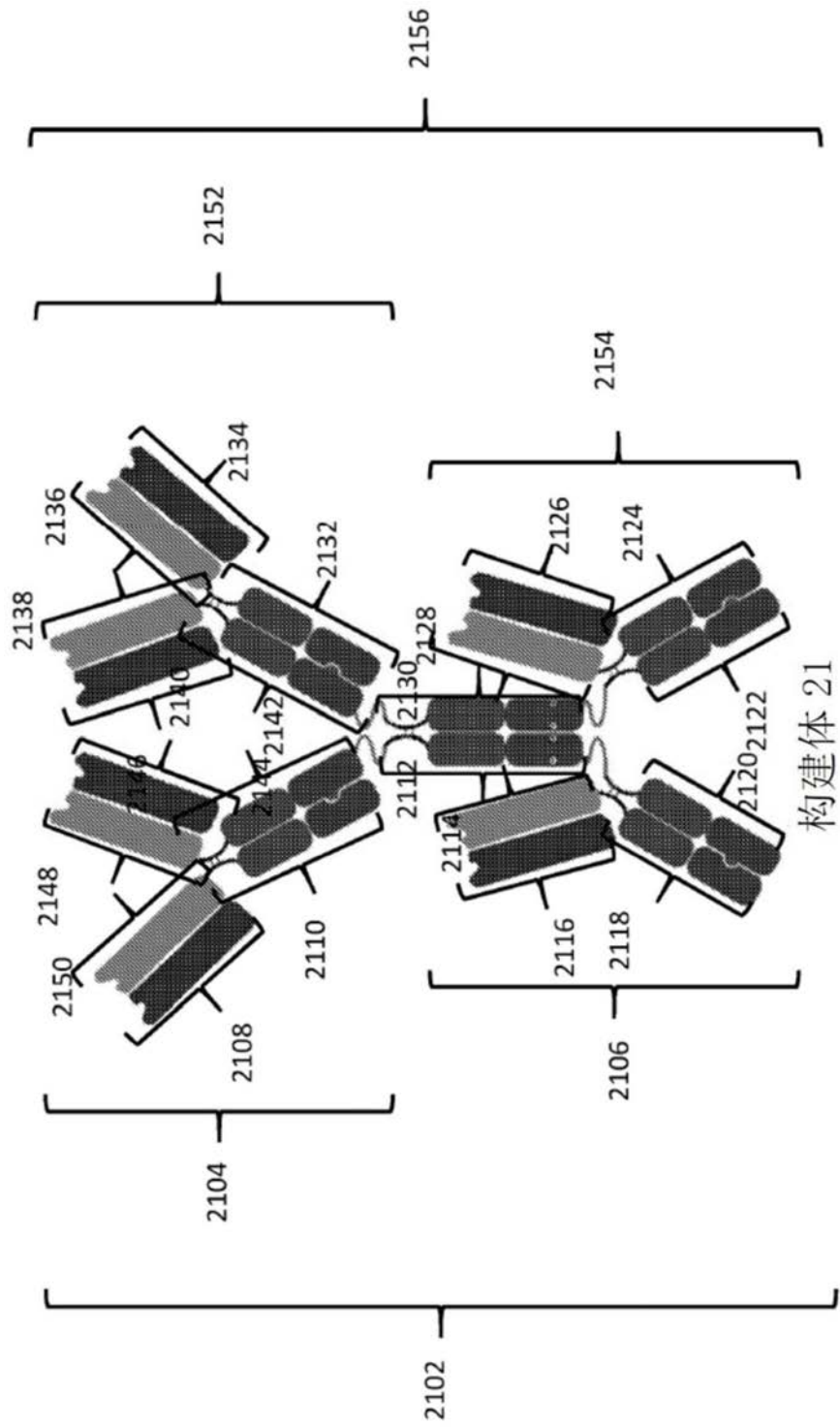


图21

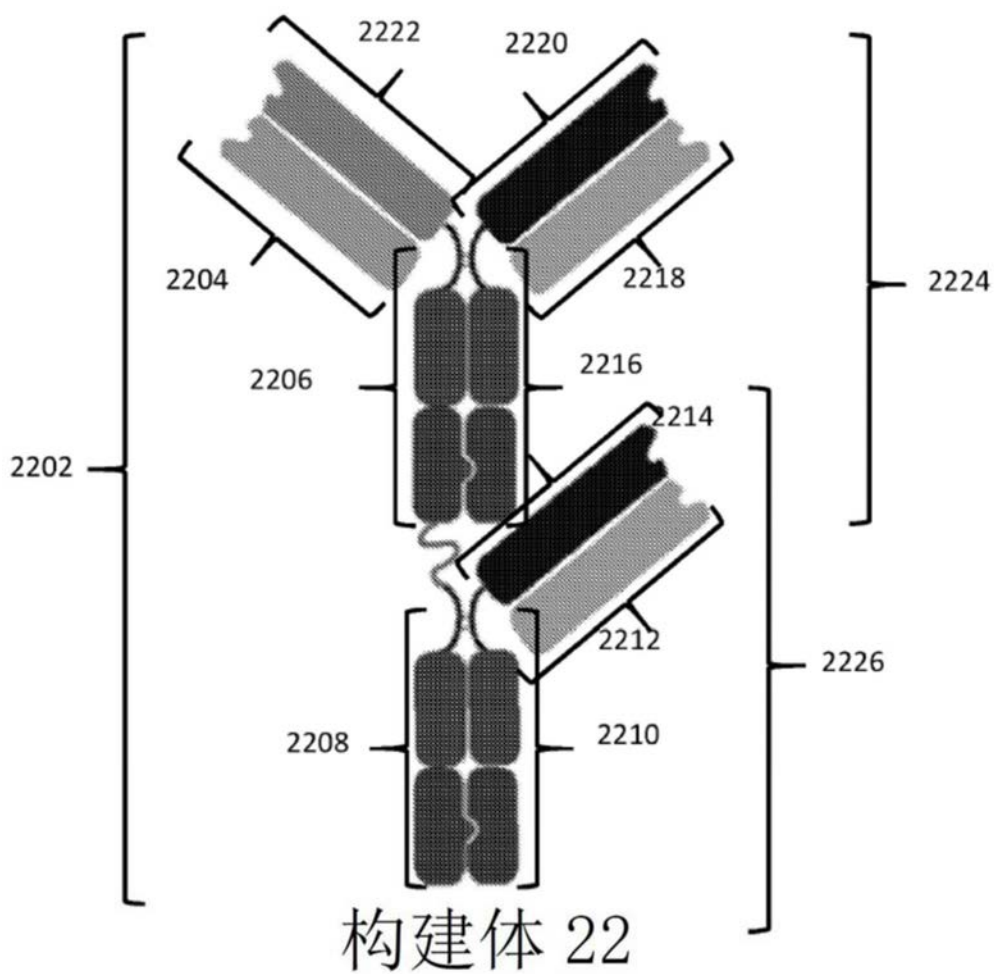


图22

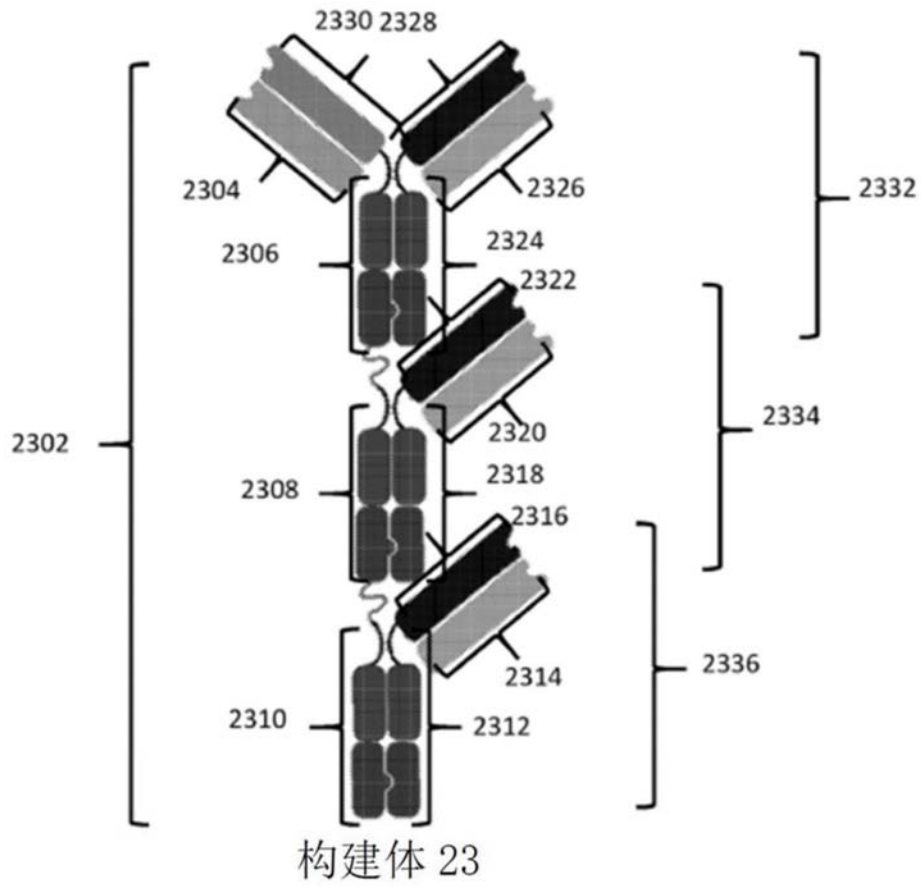


图23

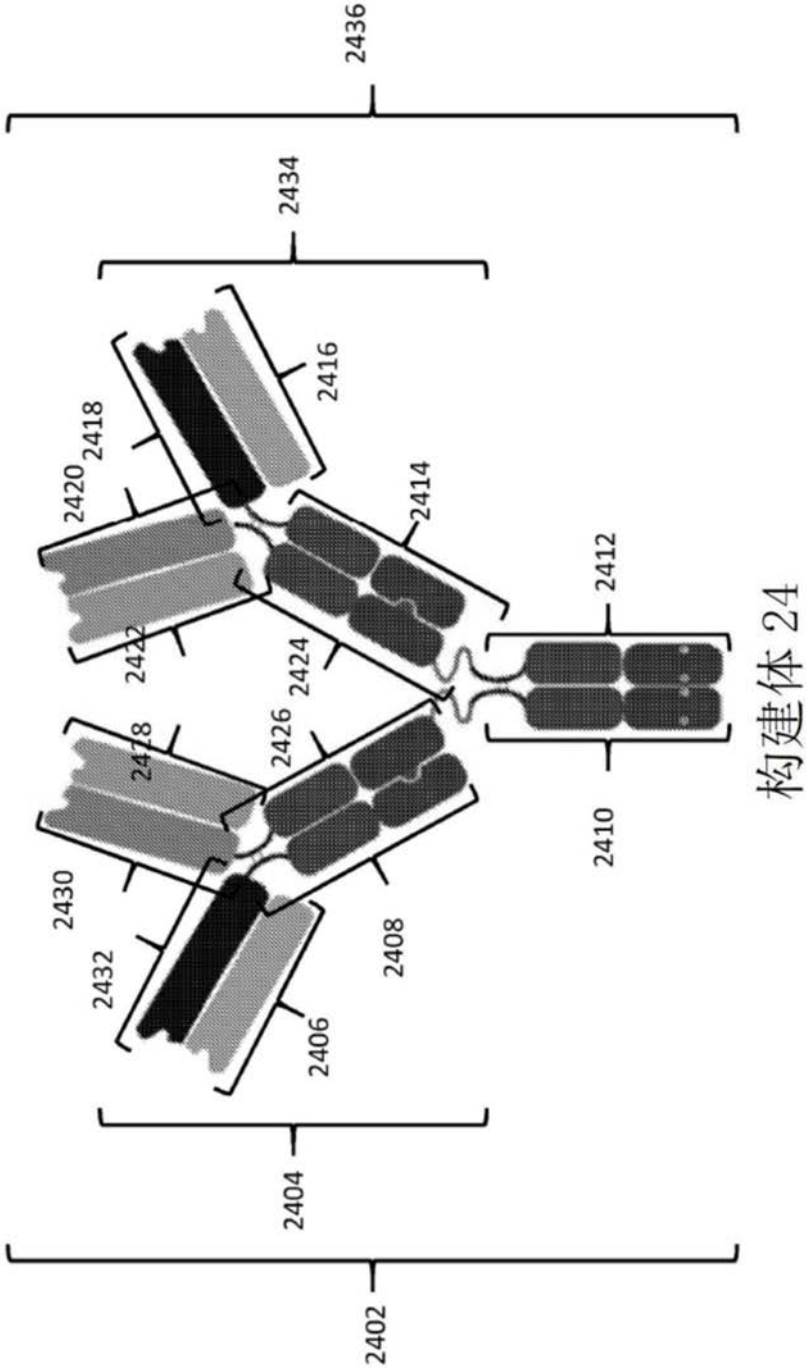


图24

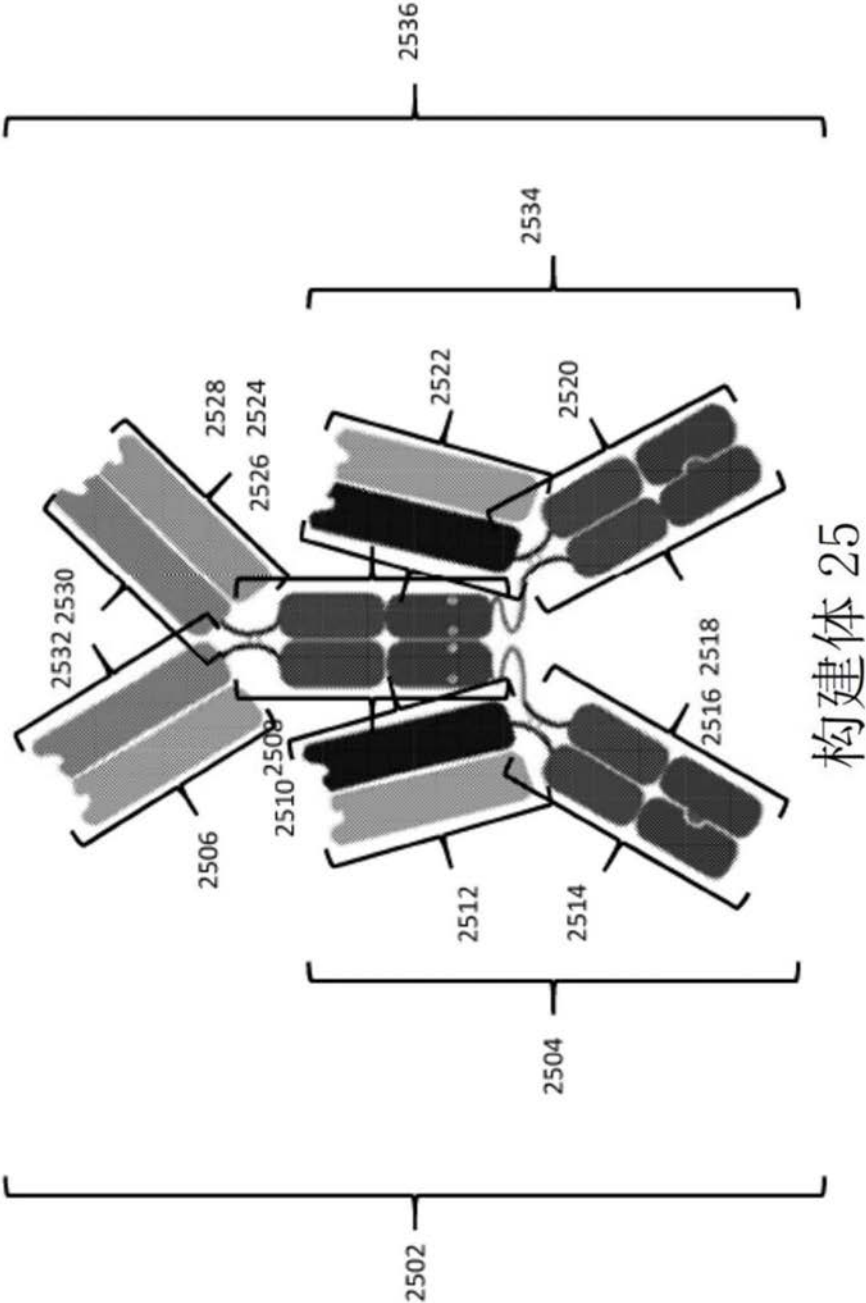


图25

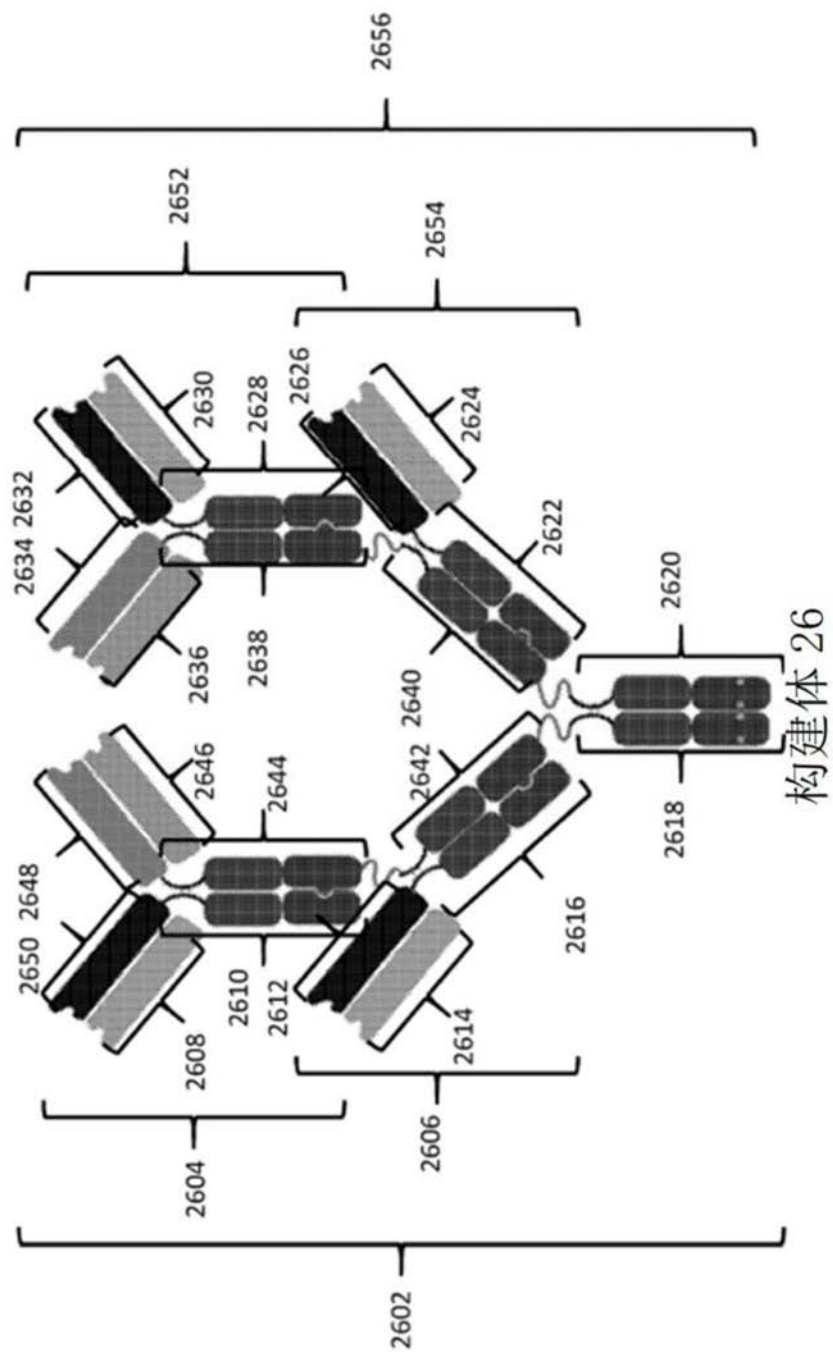


图26

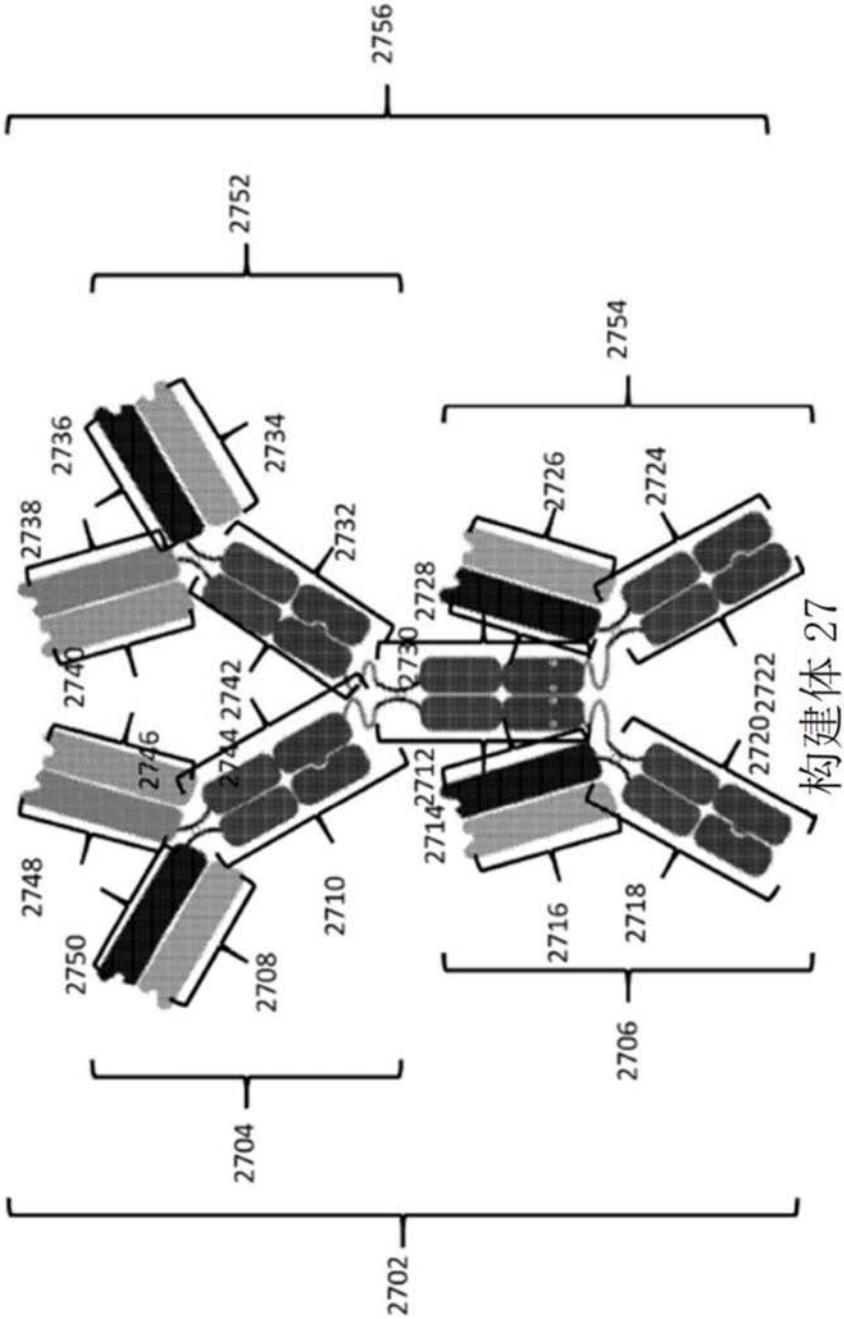


图27

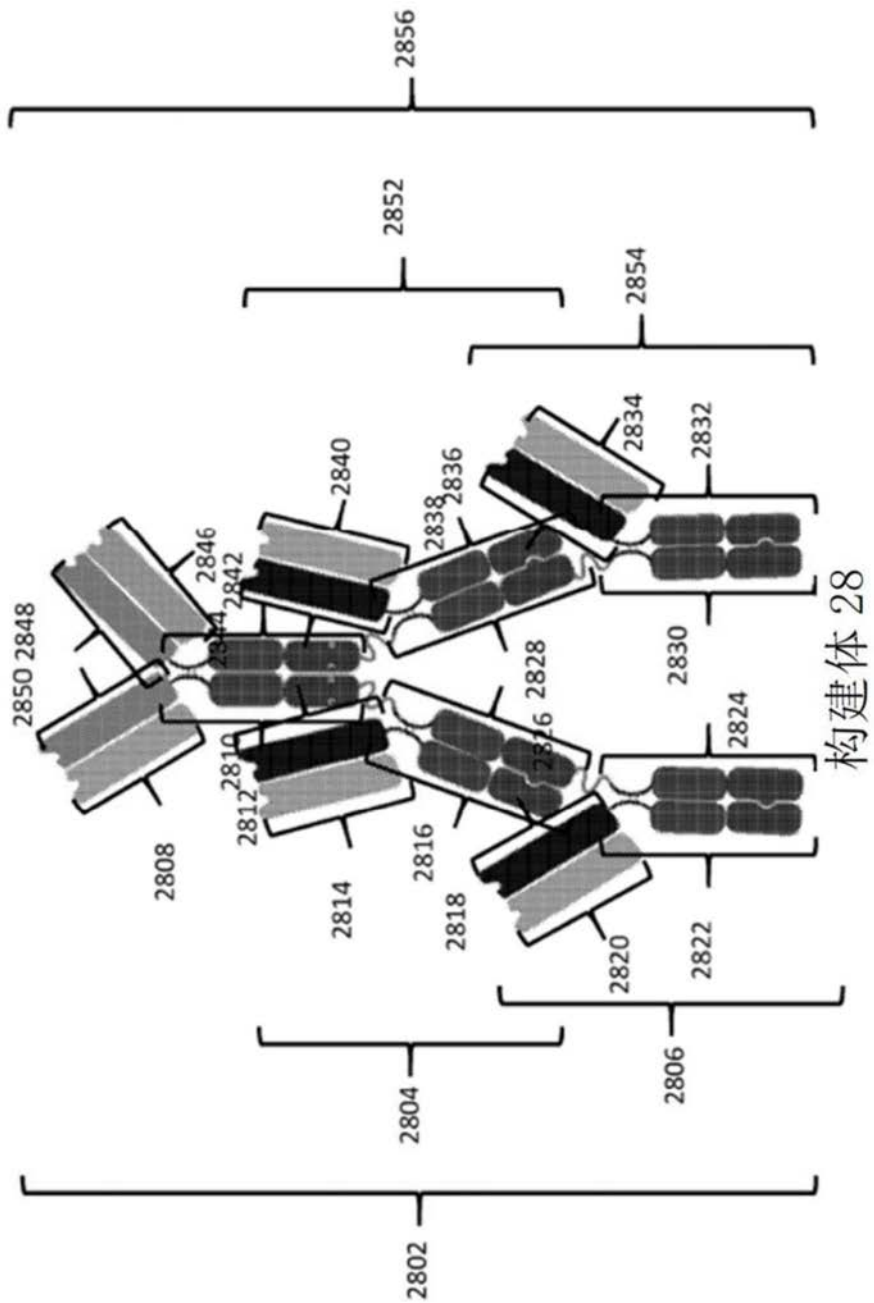


图28

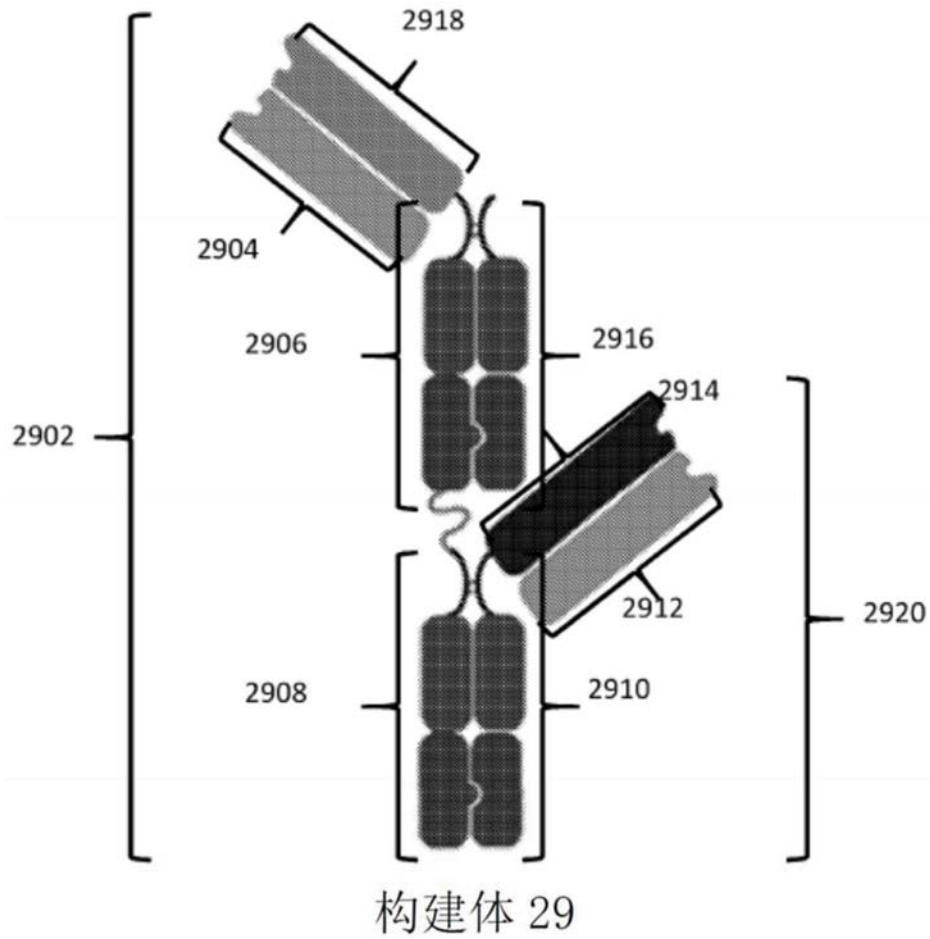


图29

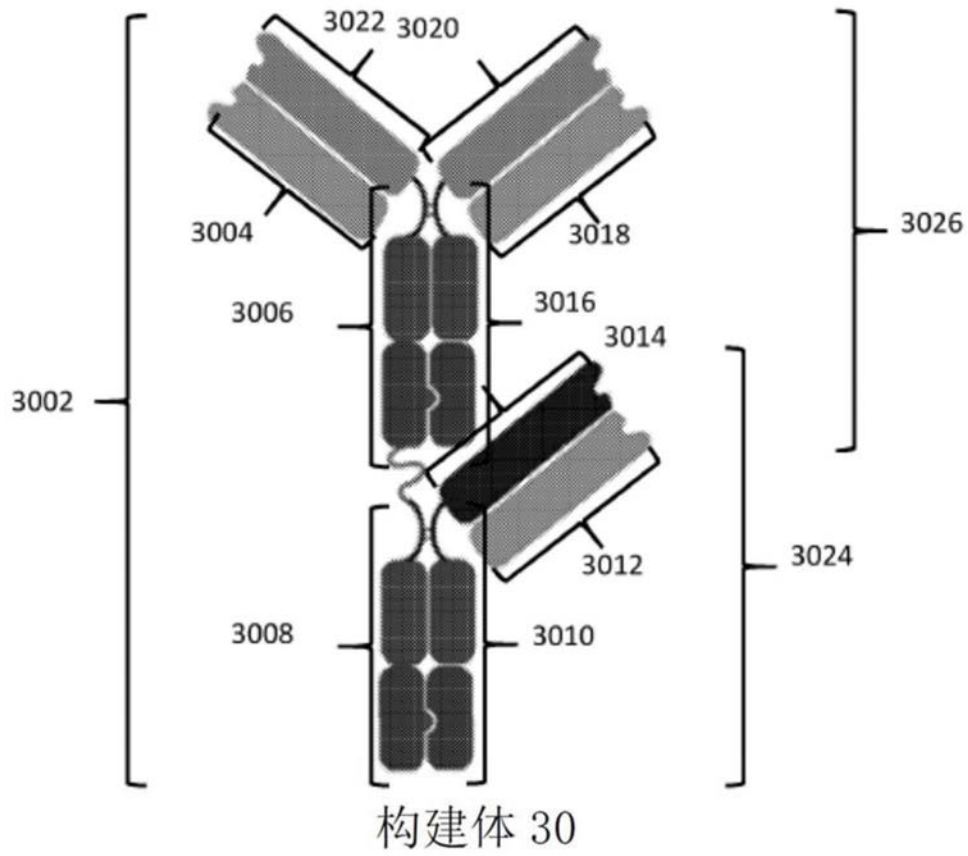


图30

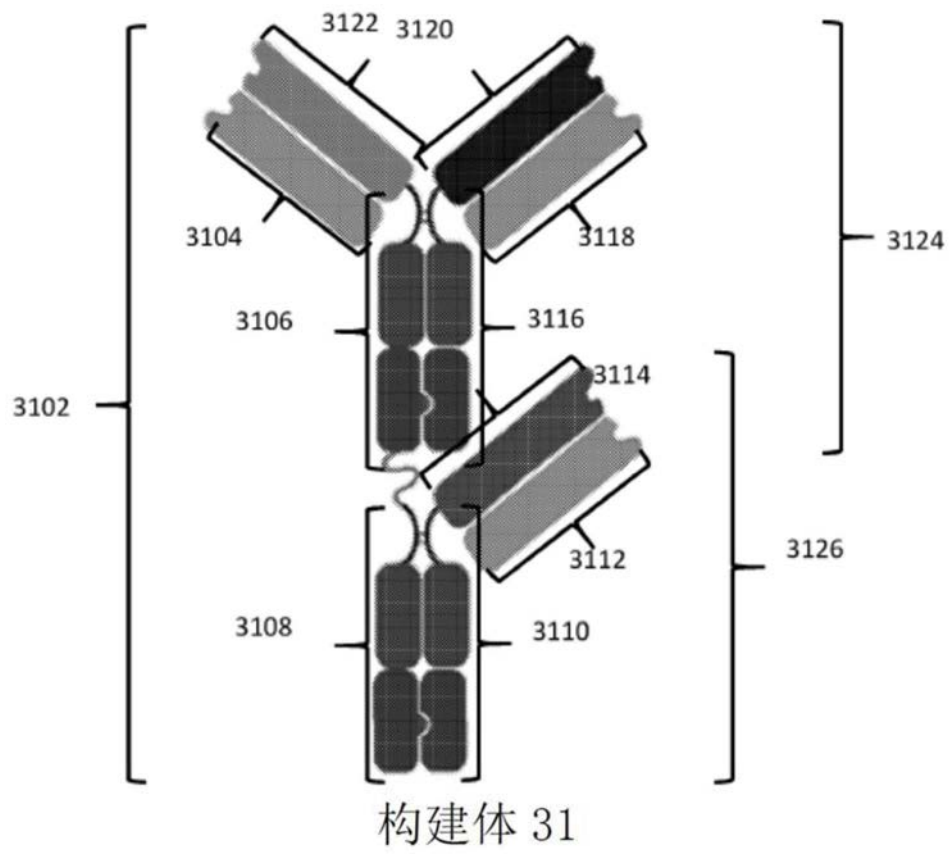


图31

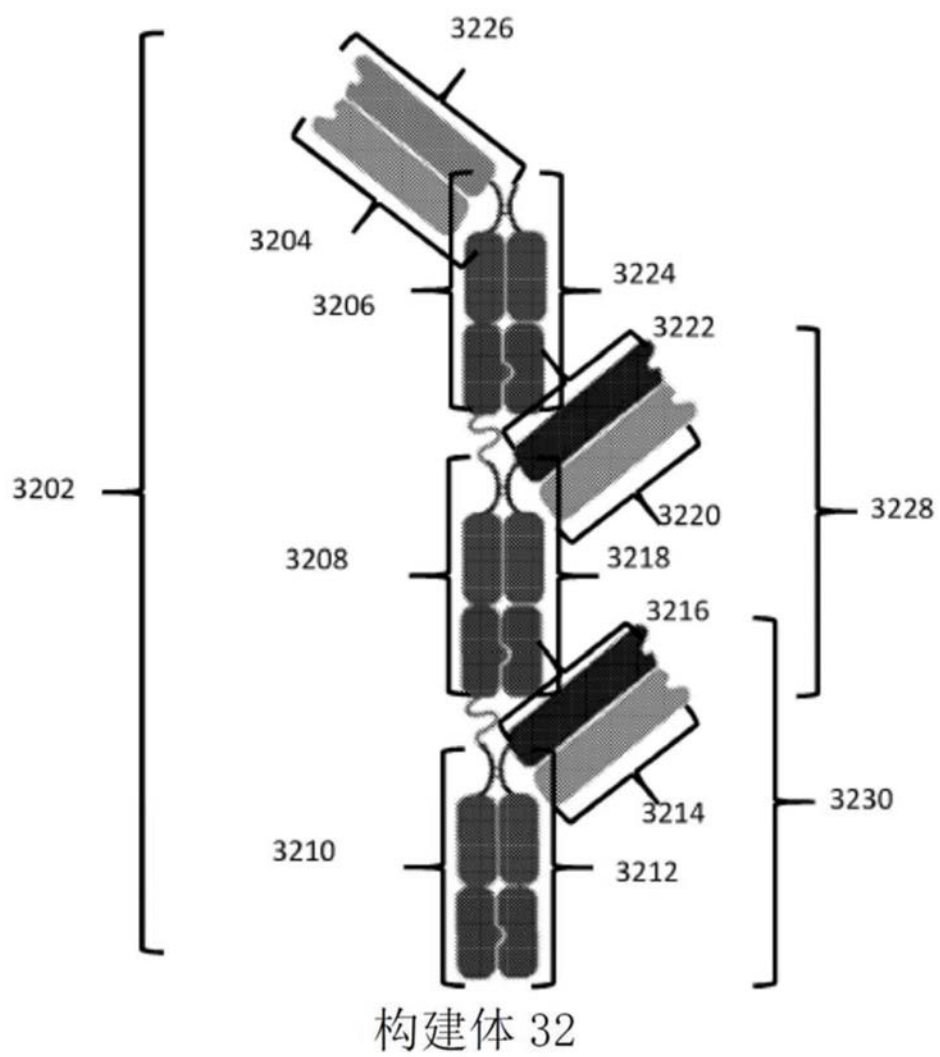


图32

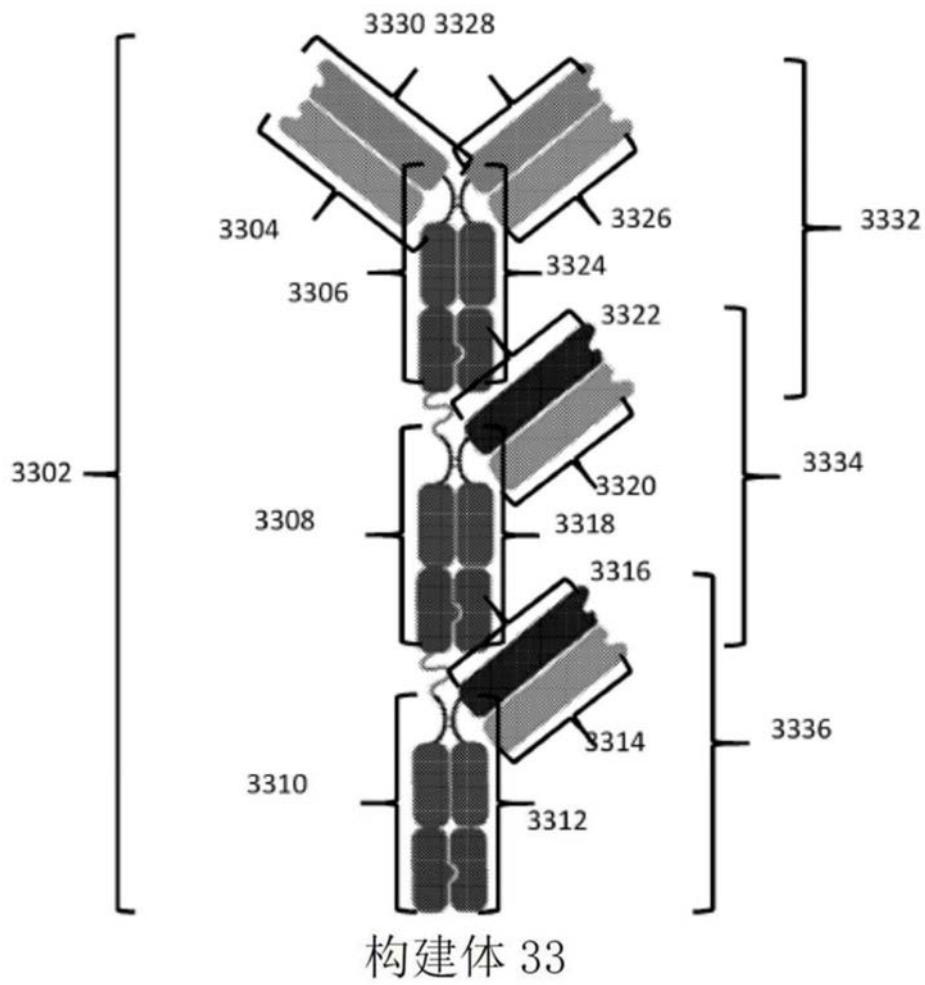


图33

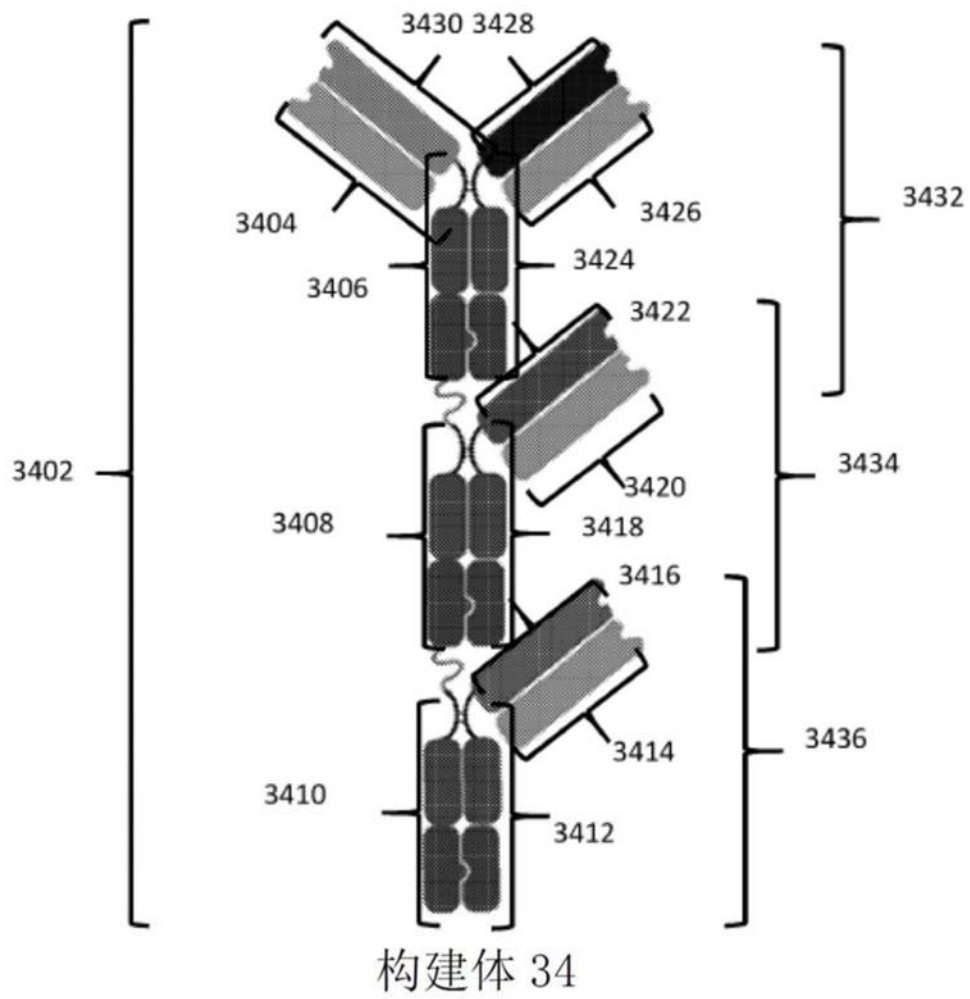


图34

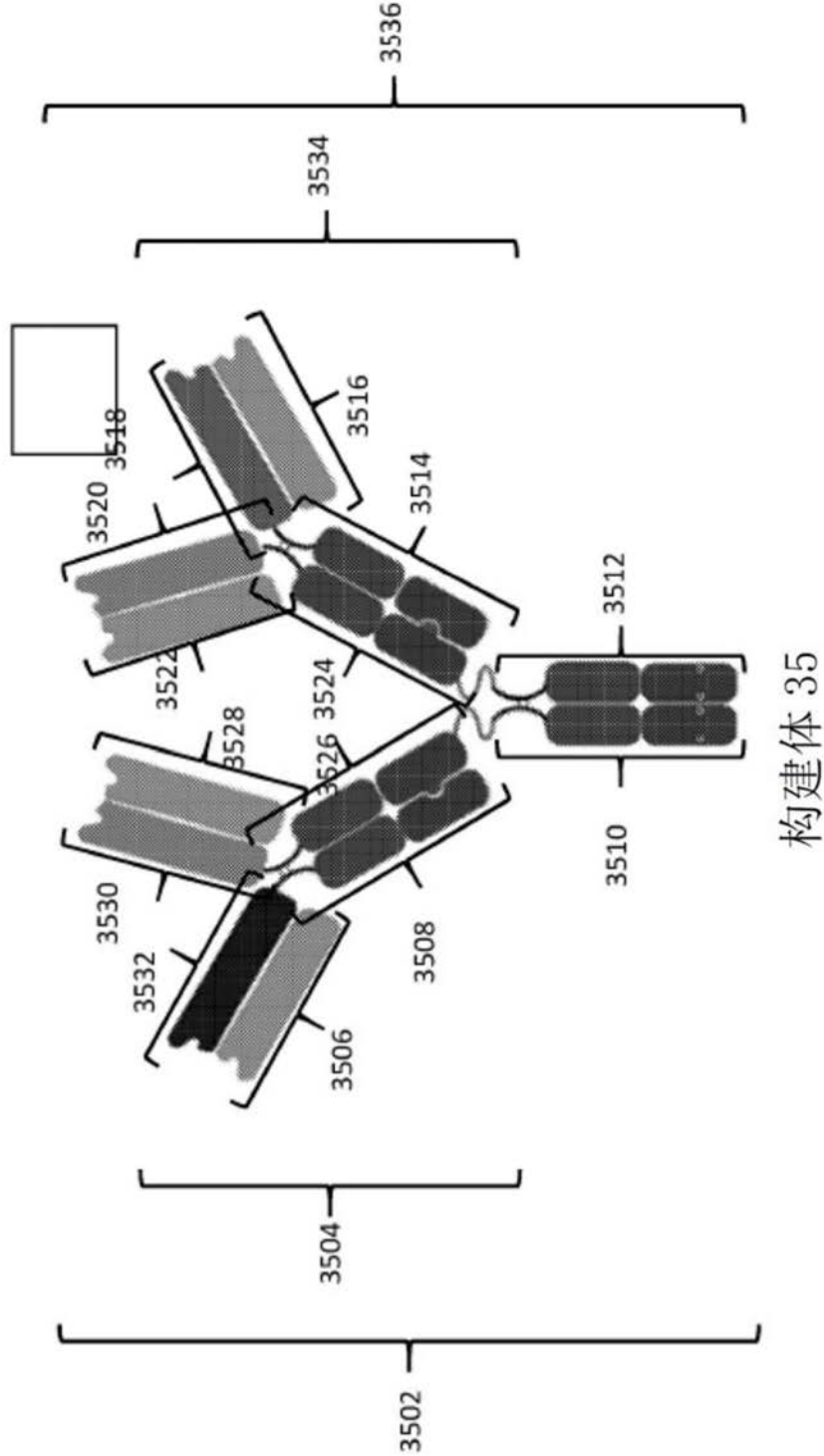


图35

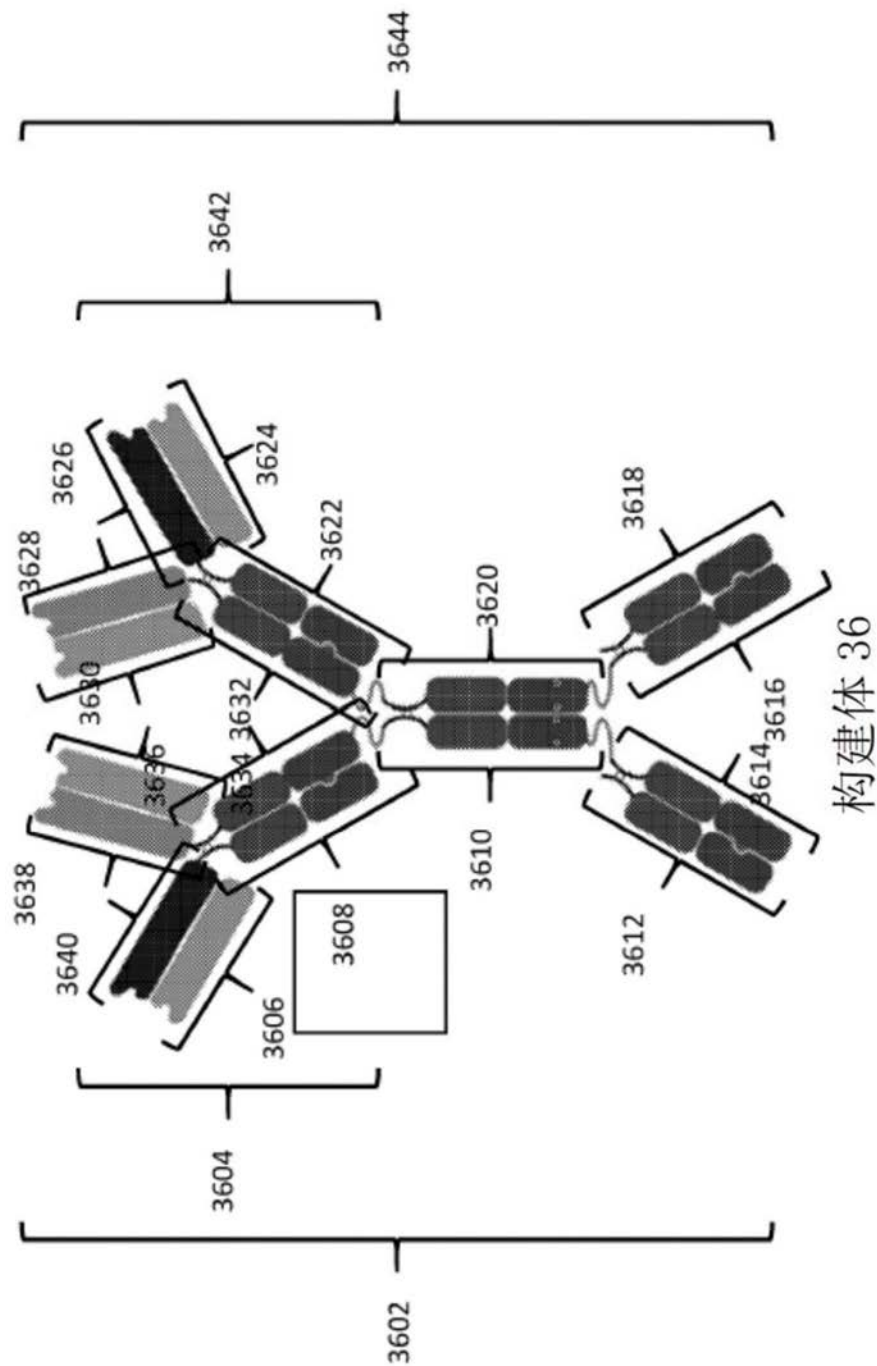


图36

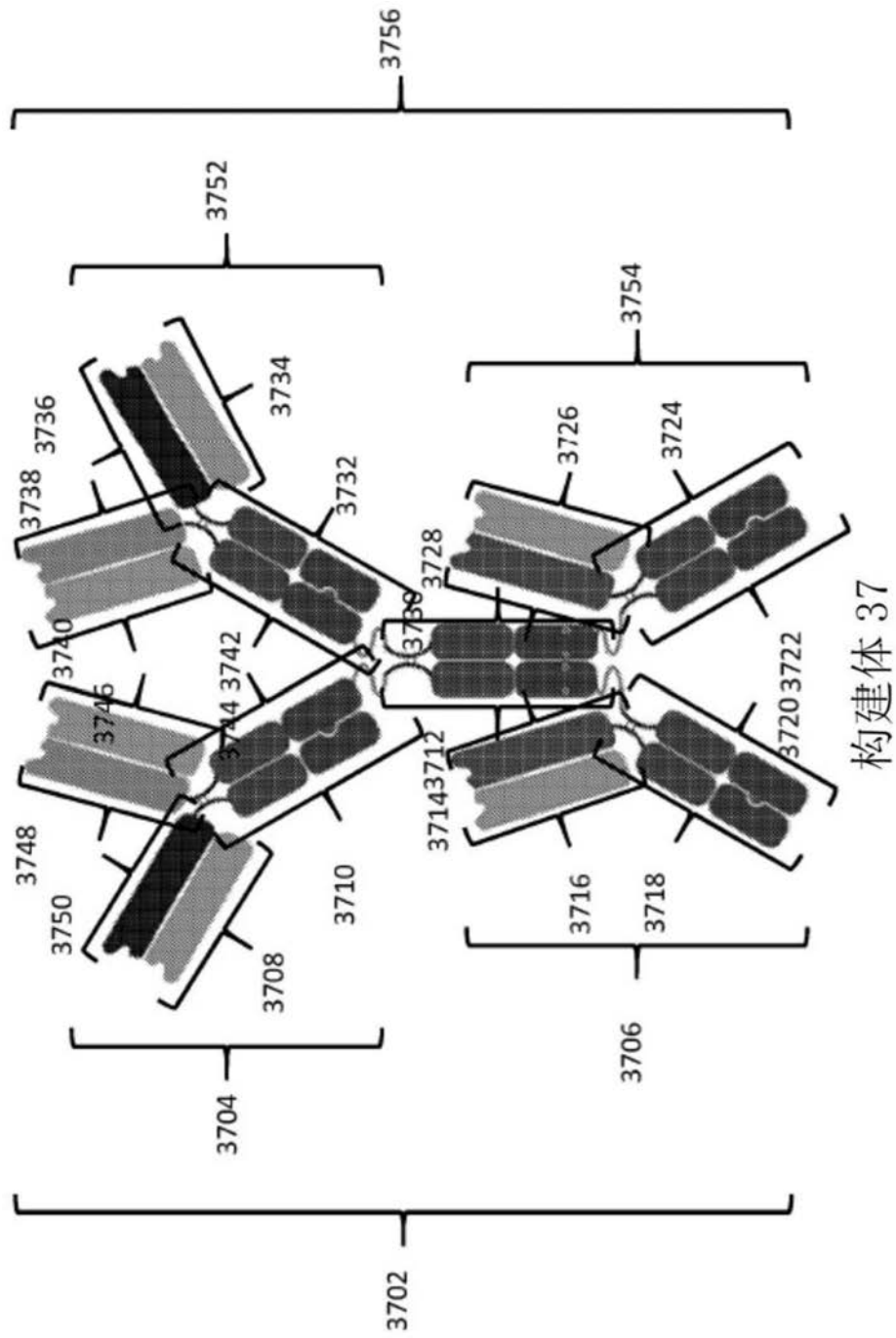
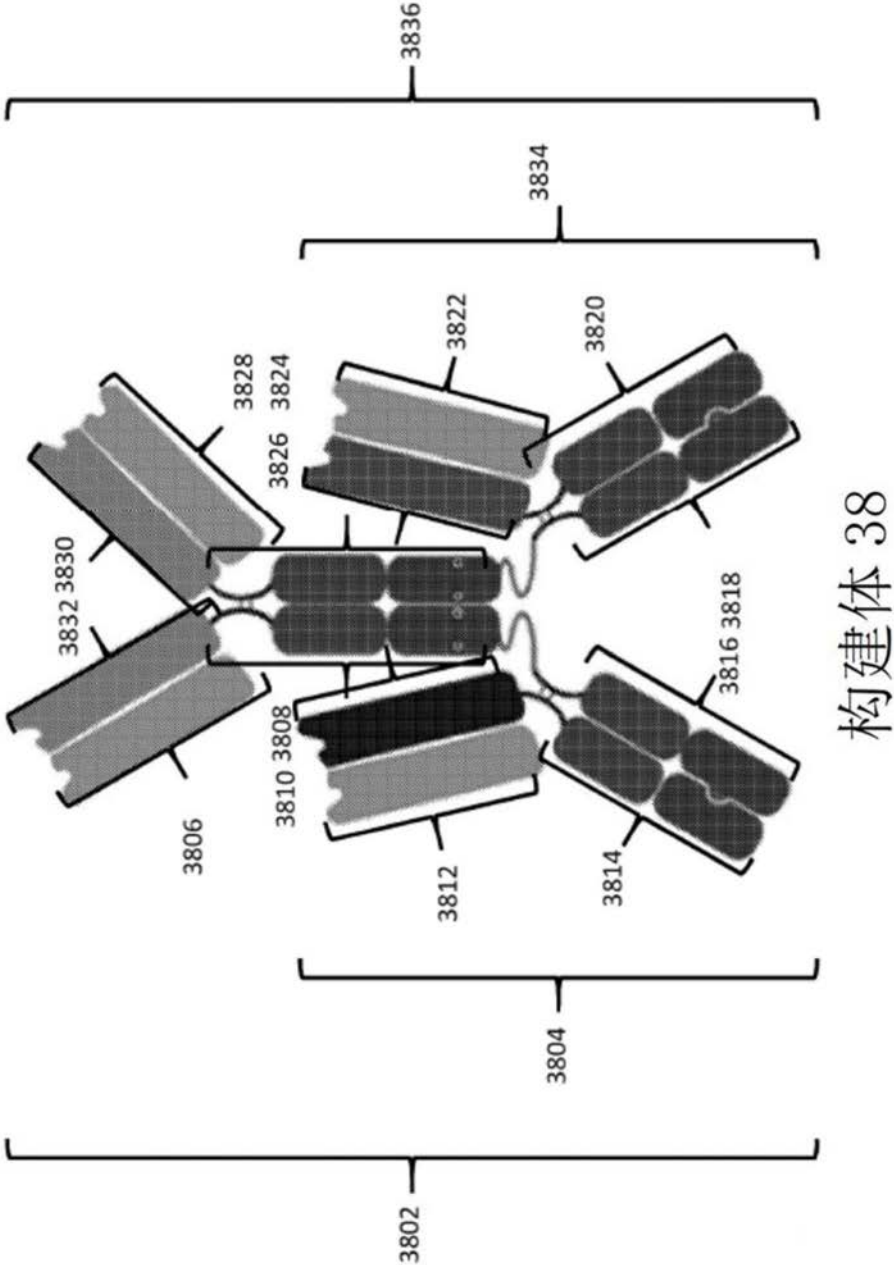


图37



构建体 38

图38

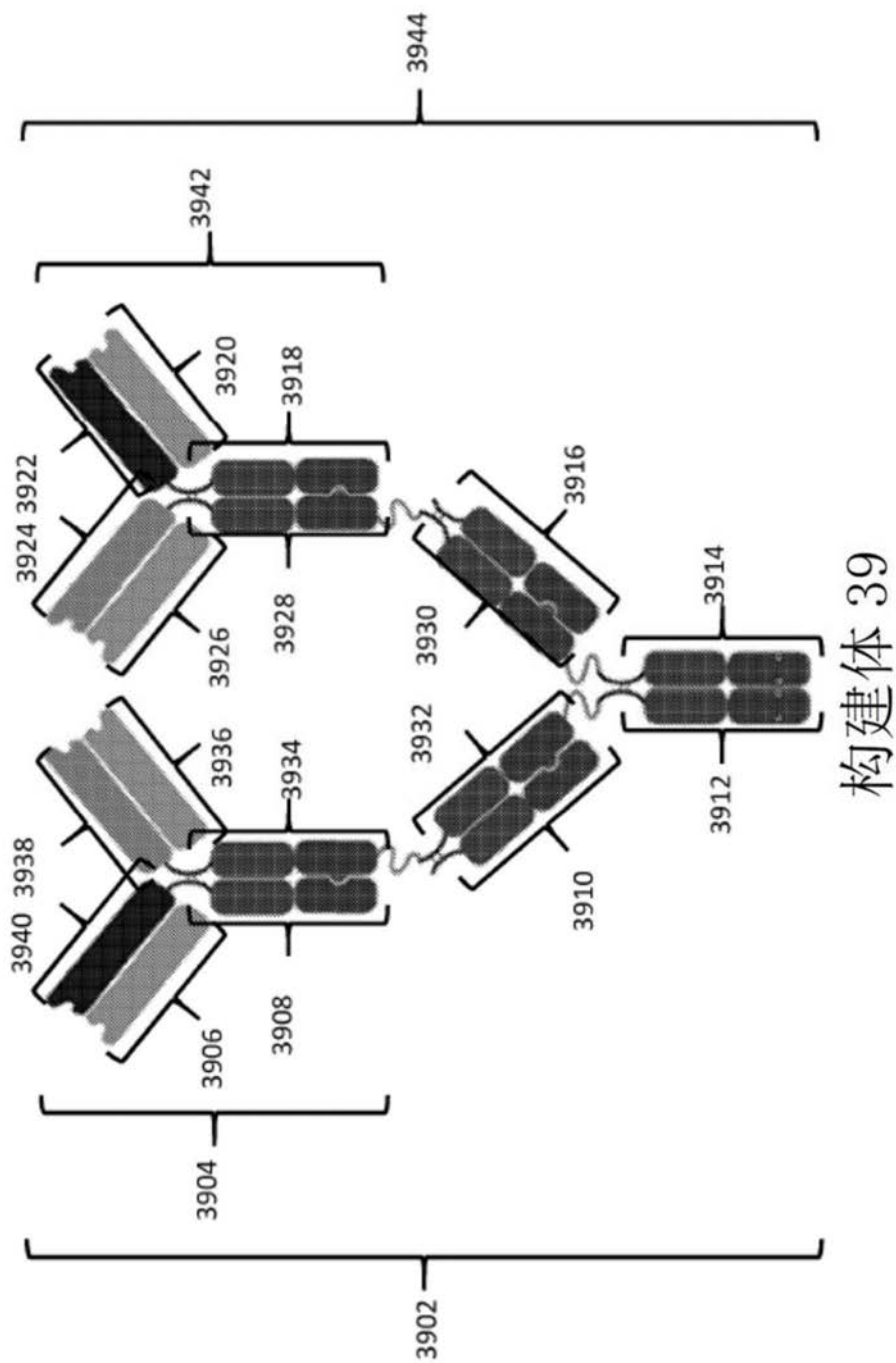


图39

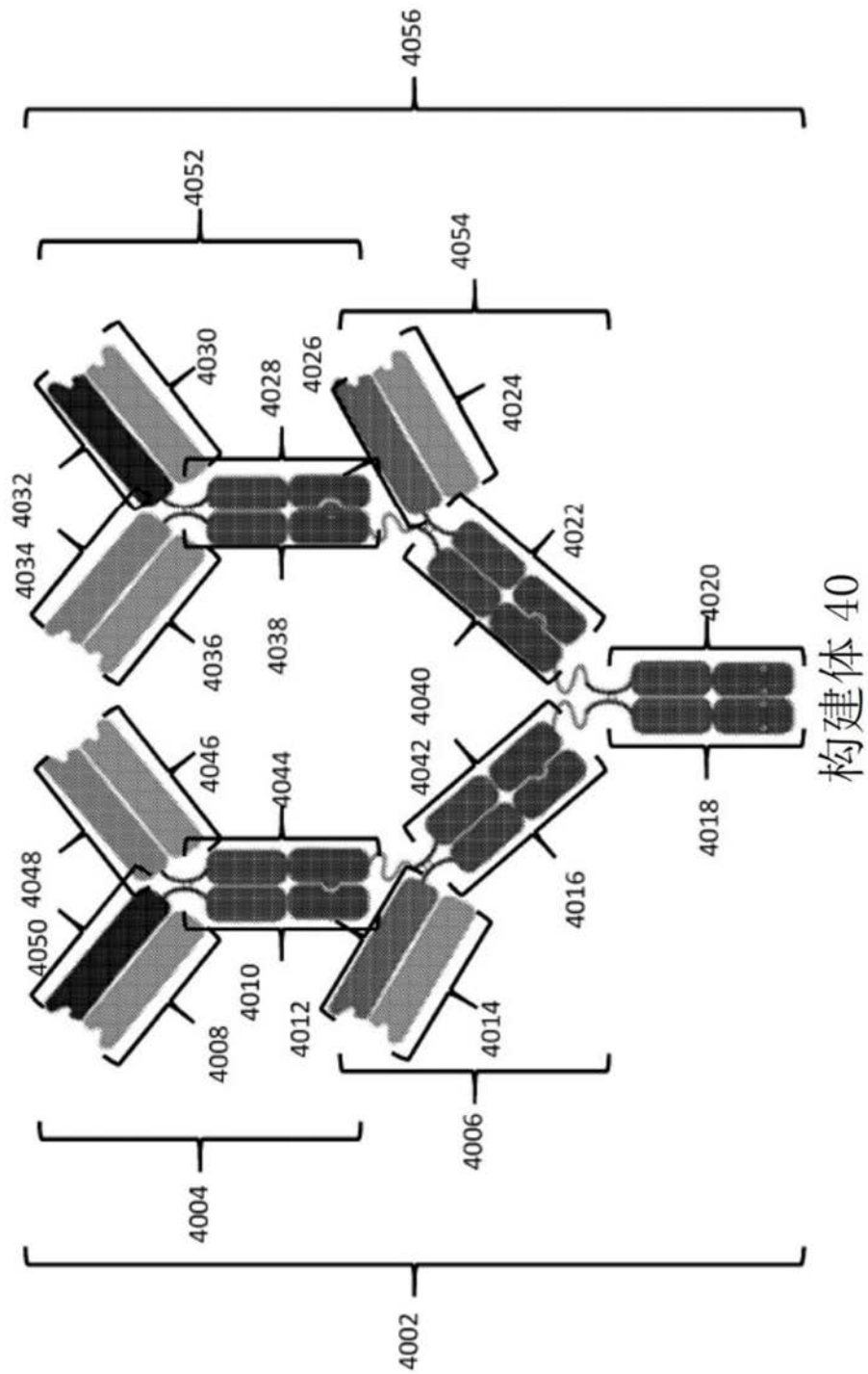


图40

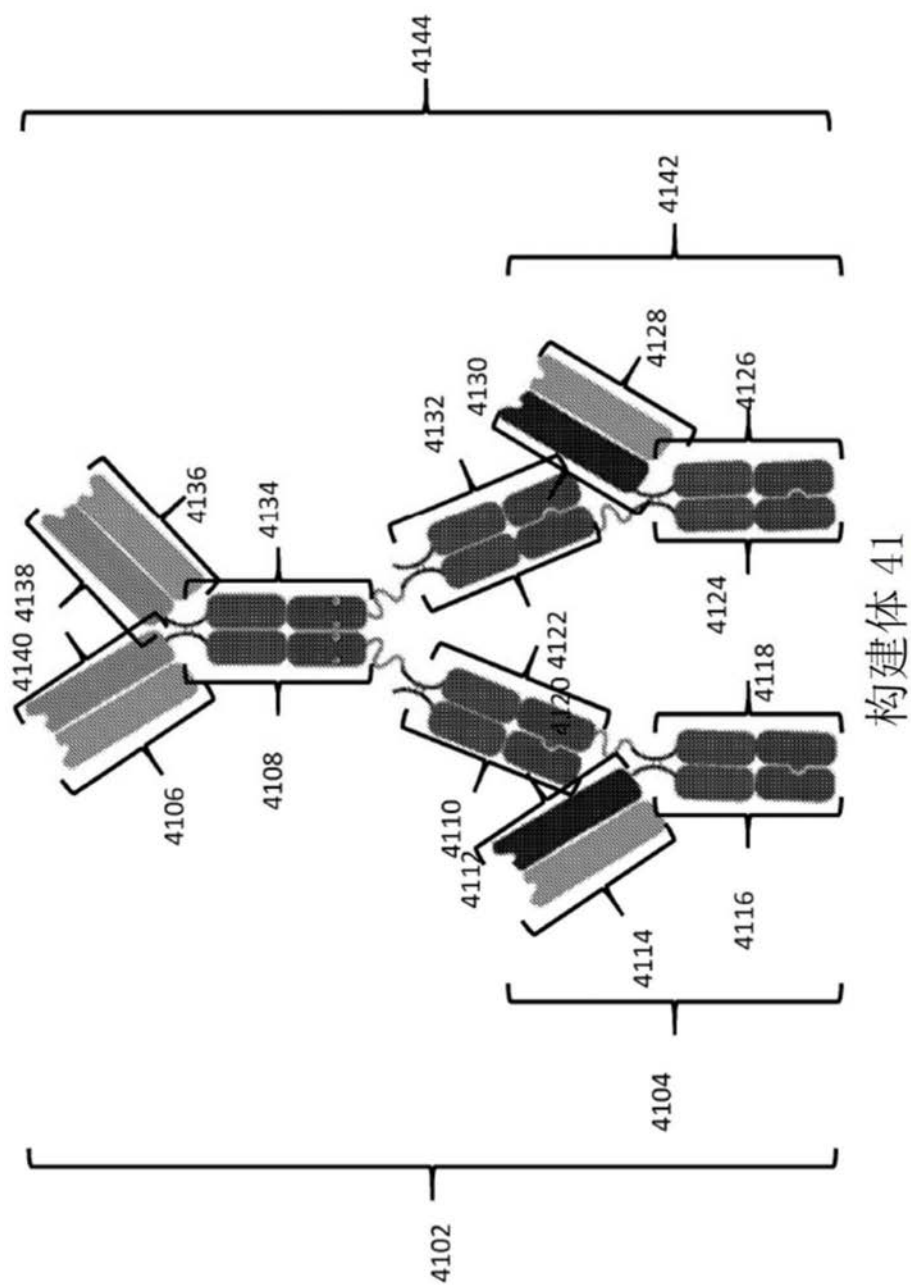


图41

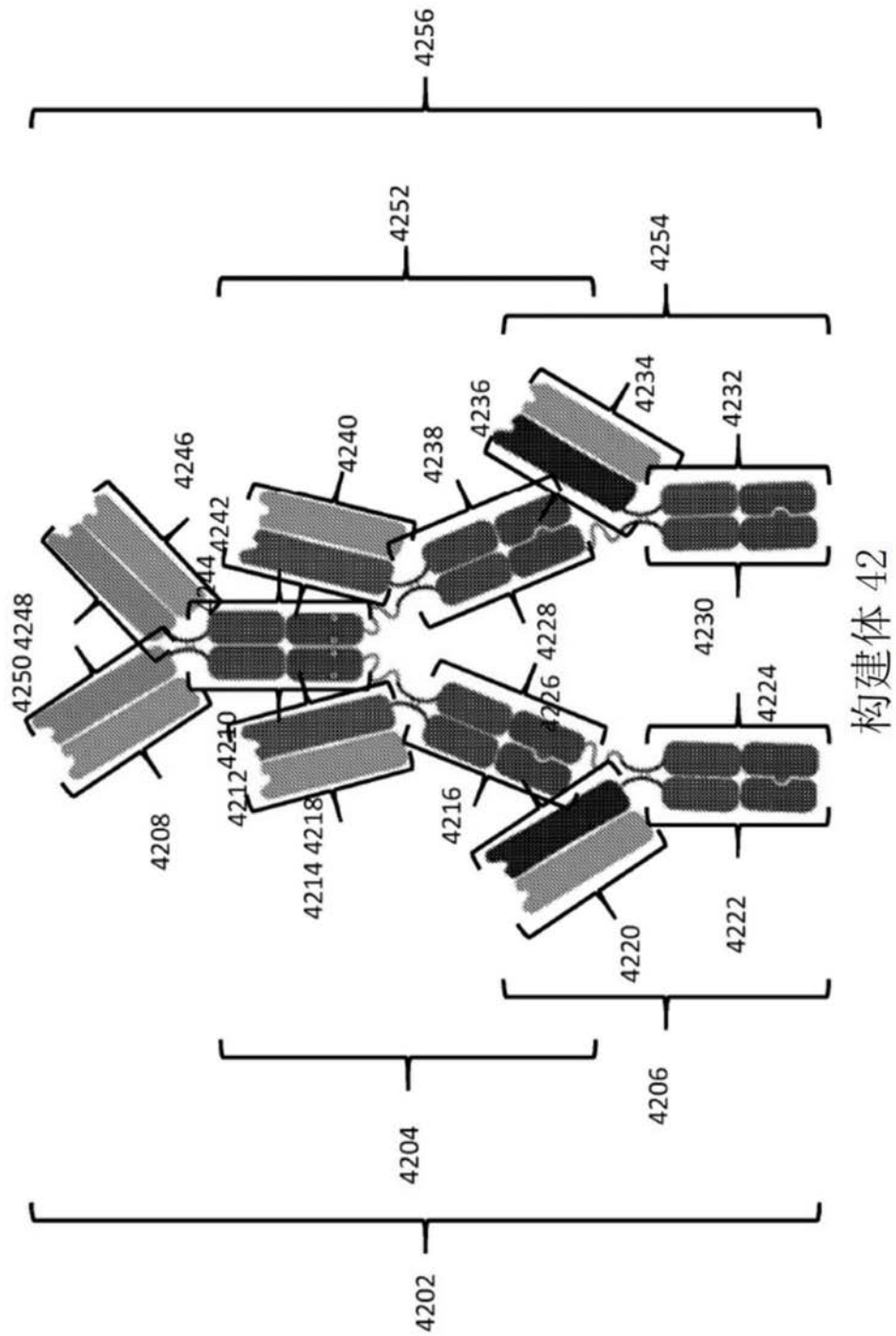


图42

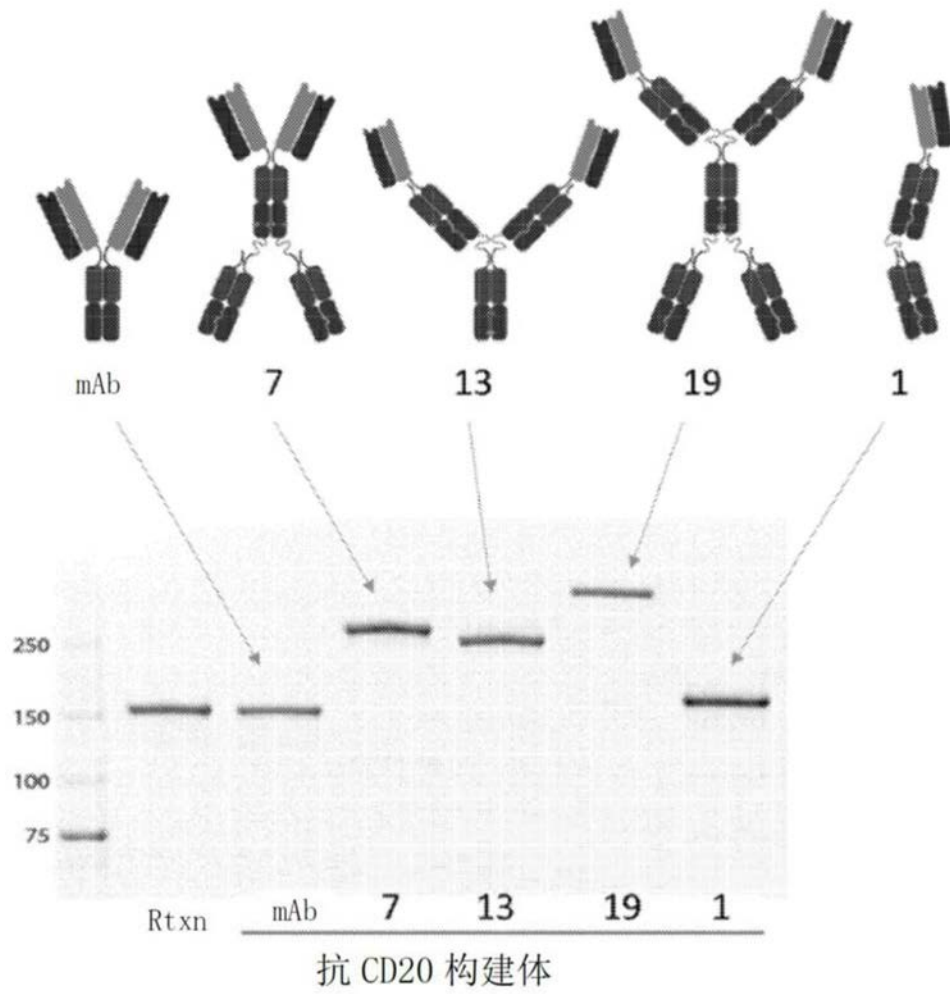


图43

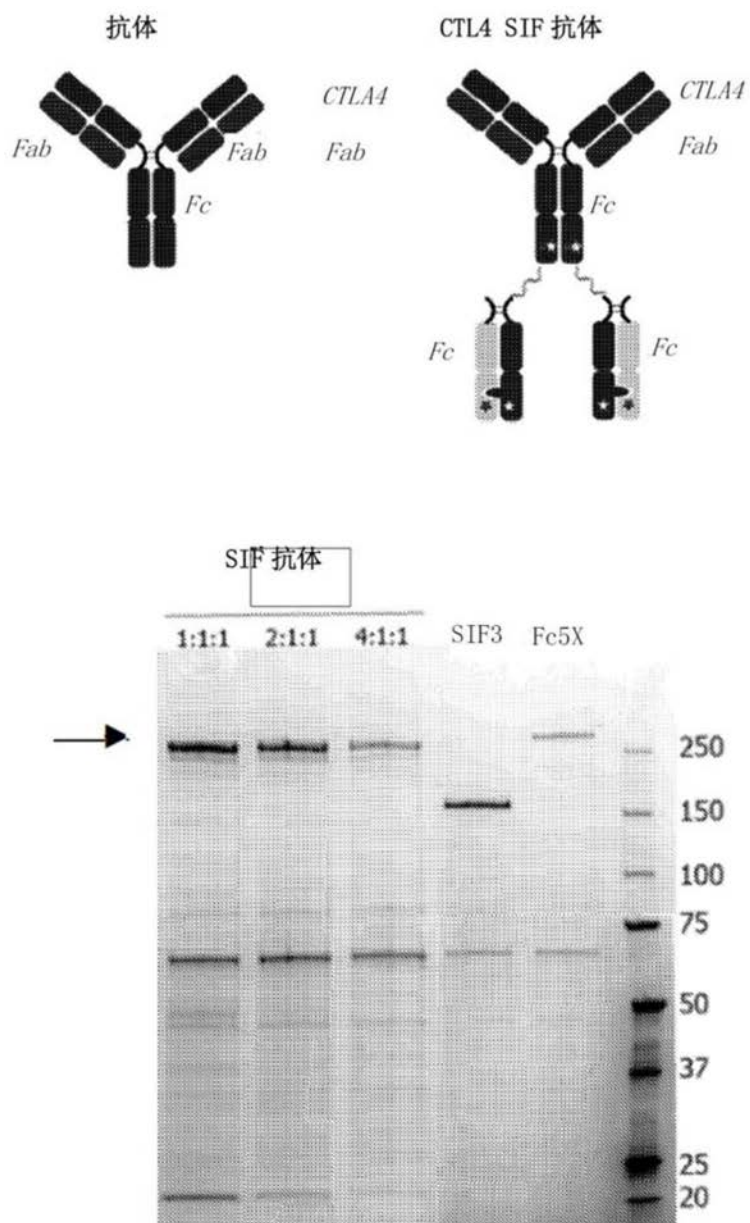


图44

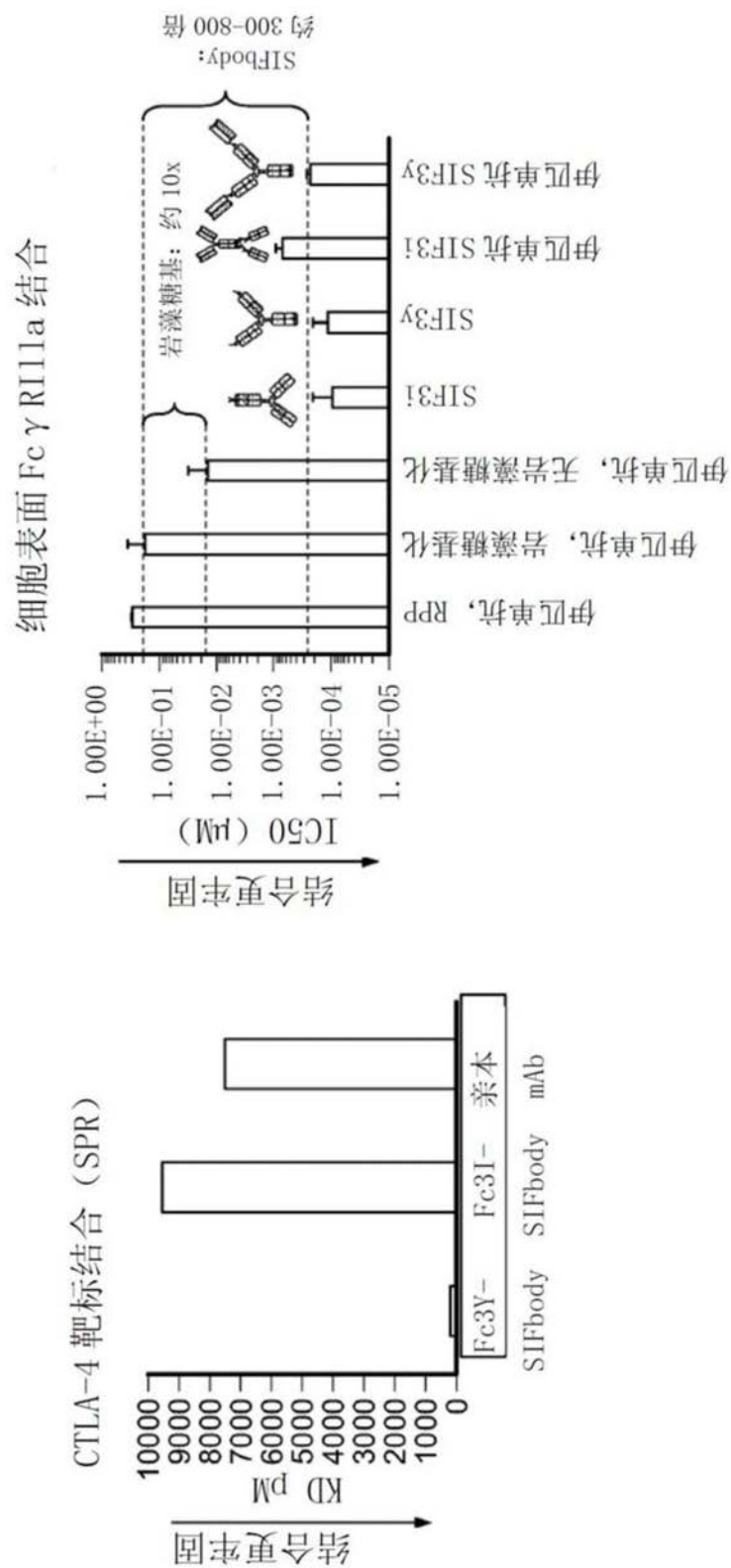


图45

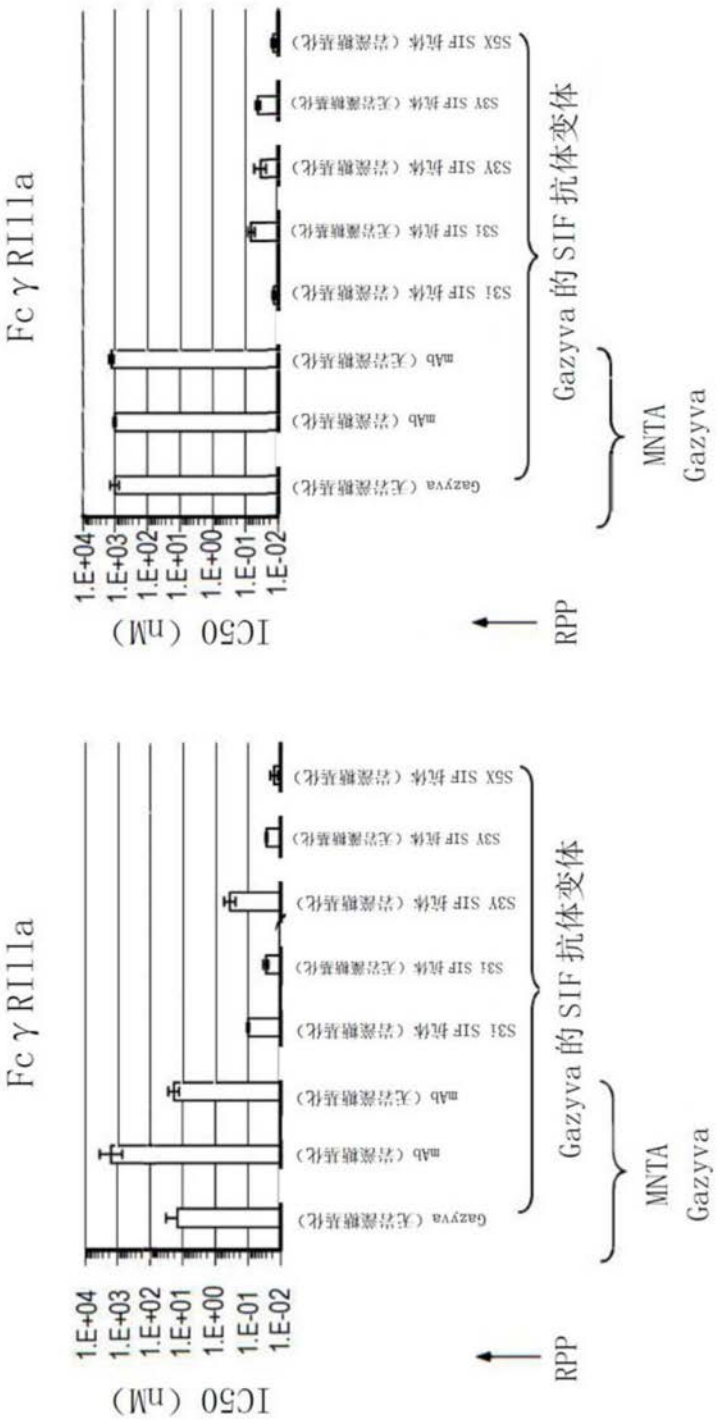


图46

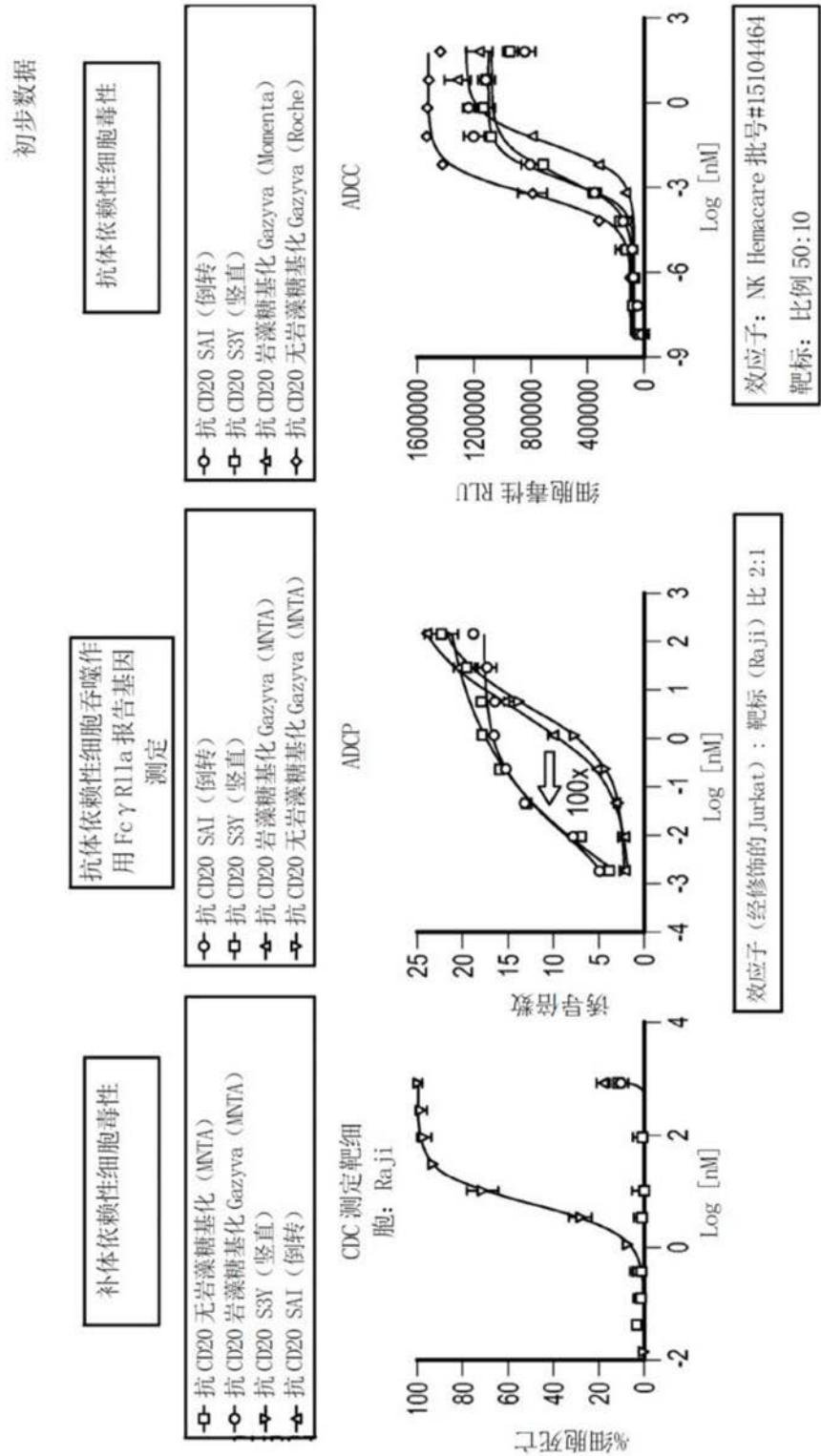


图47

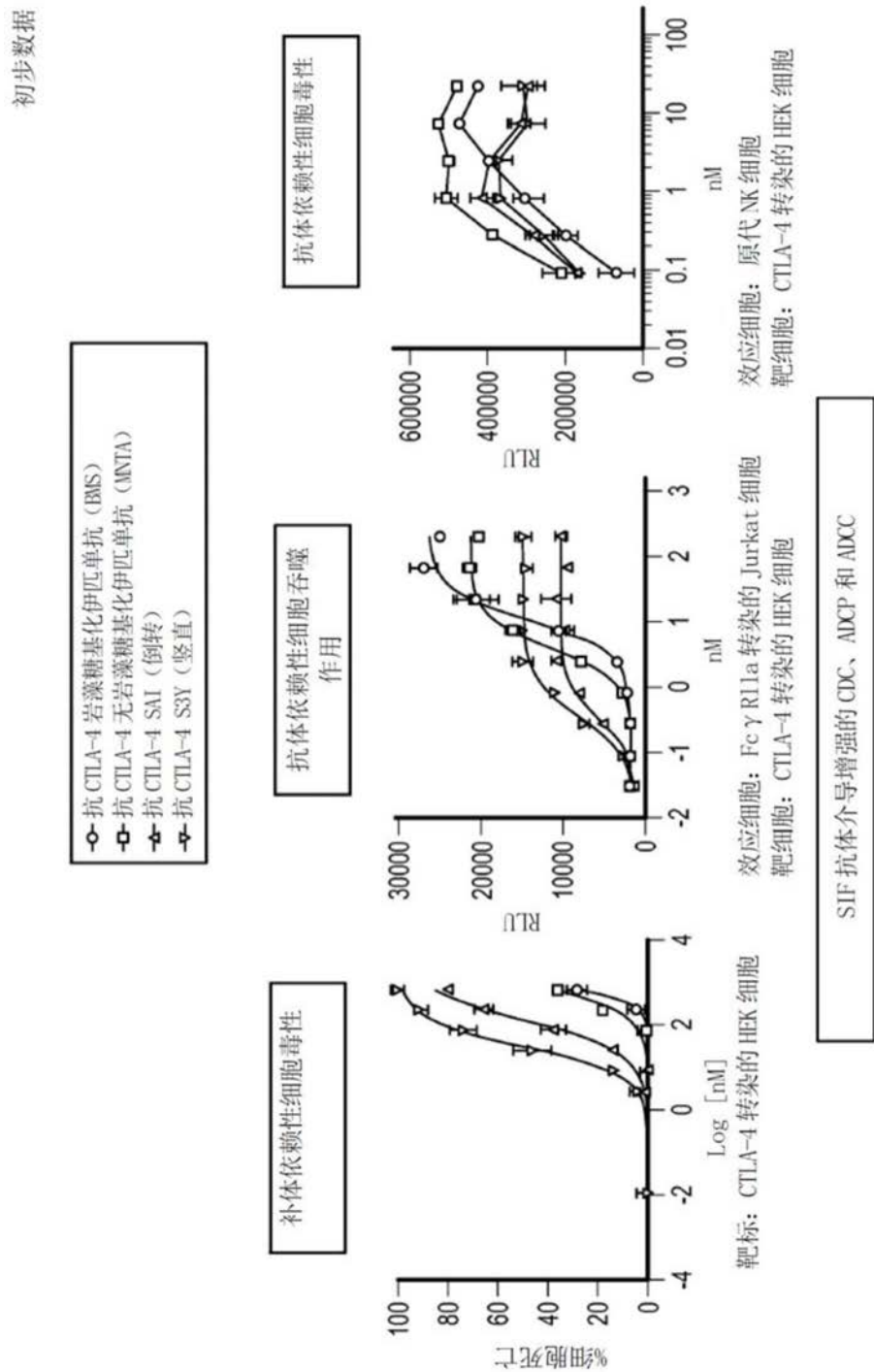


图48

初步数据

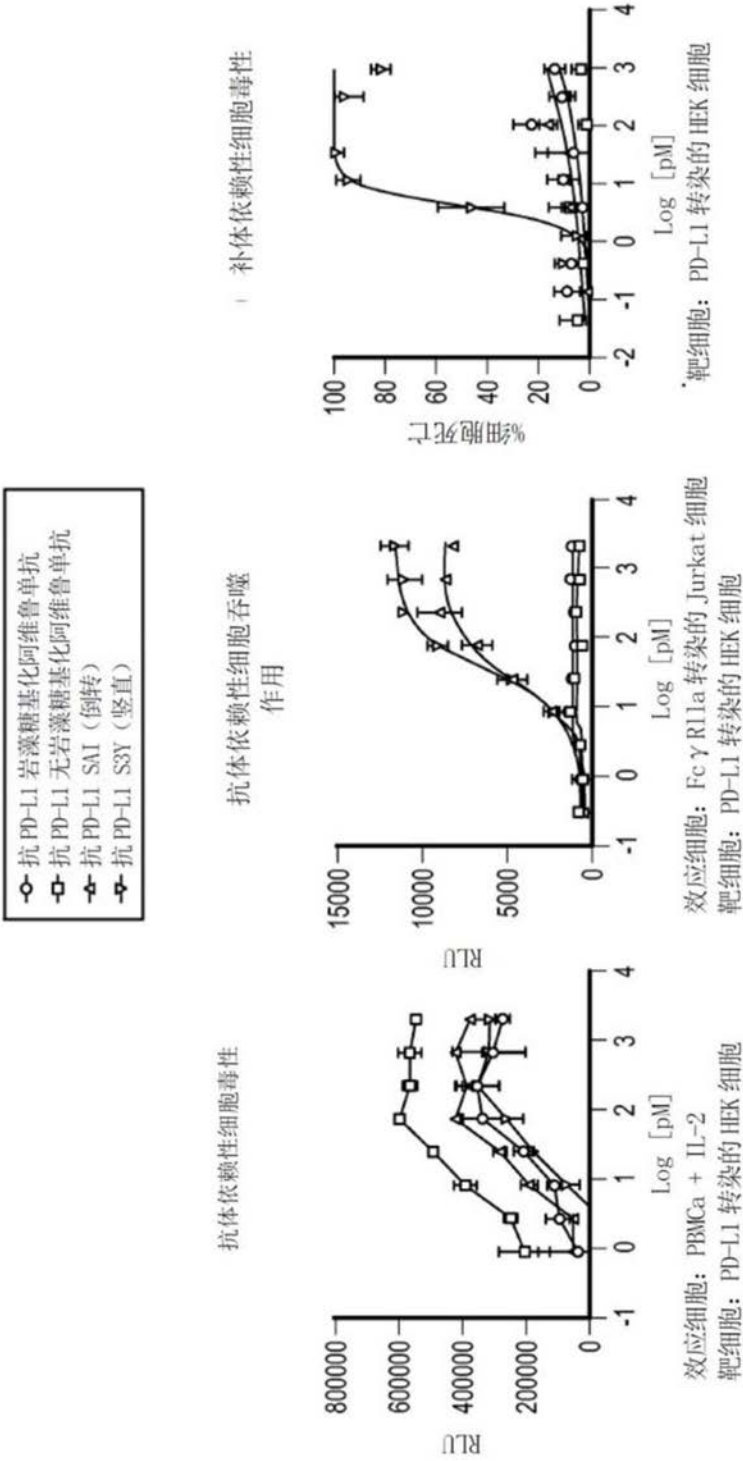


图49

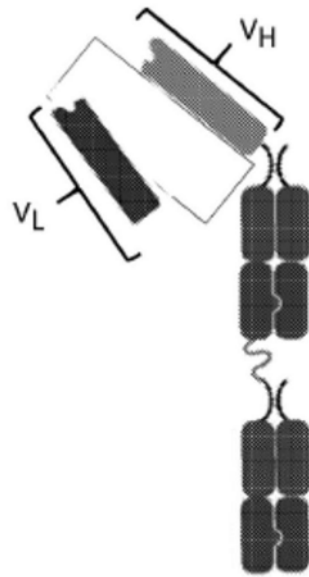


图50A

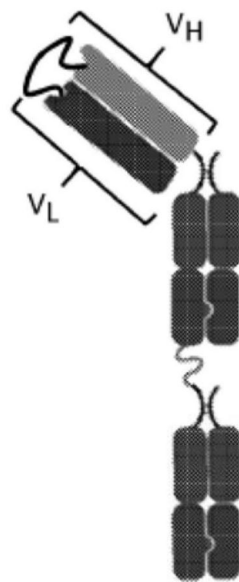


图50B

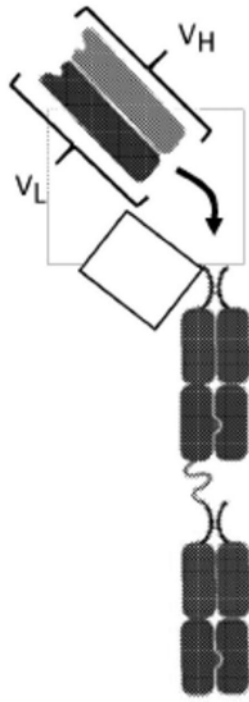


图50C

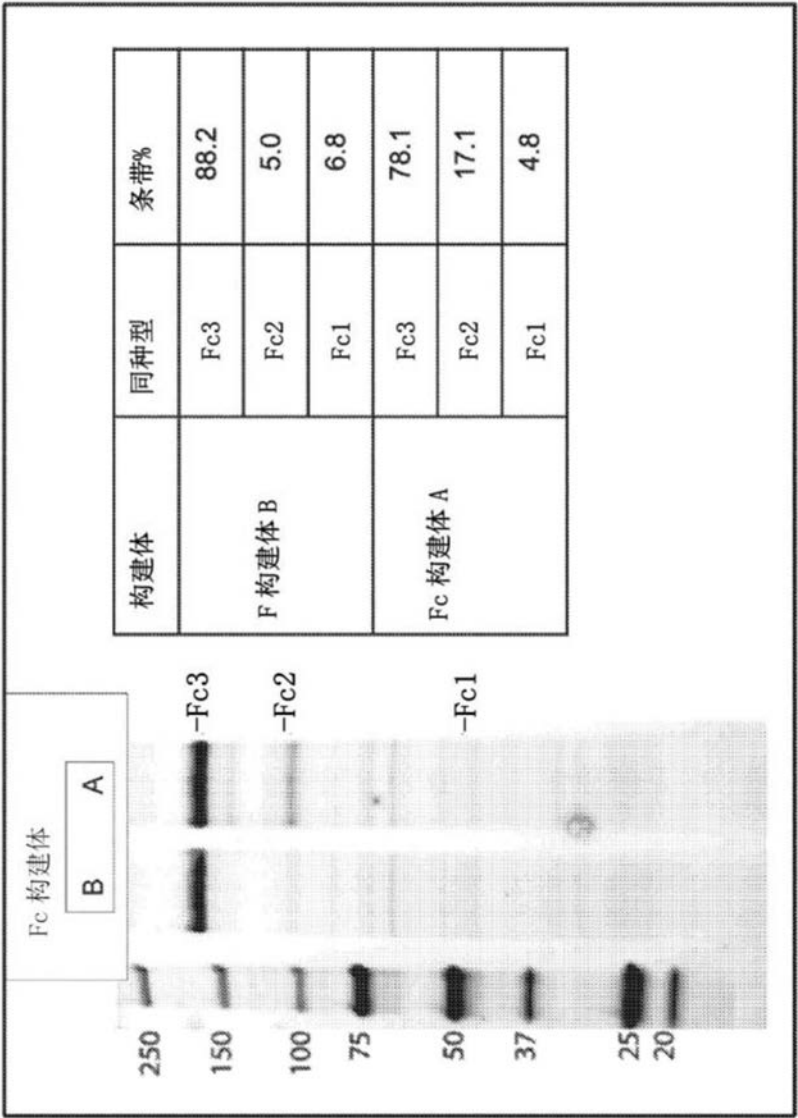


图51

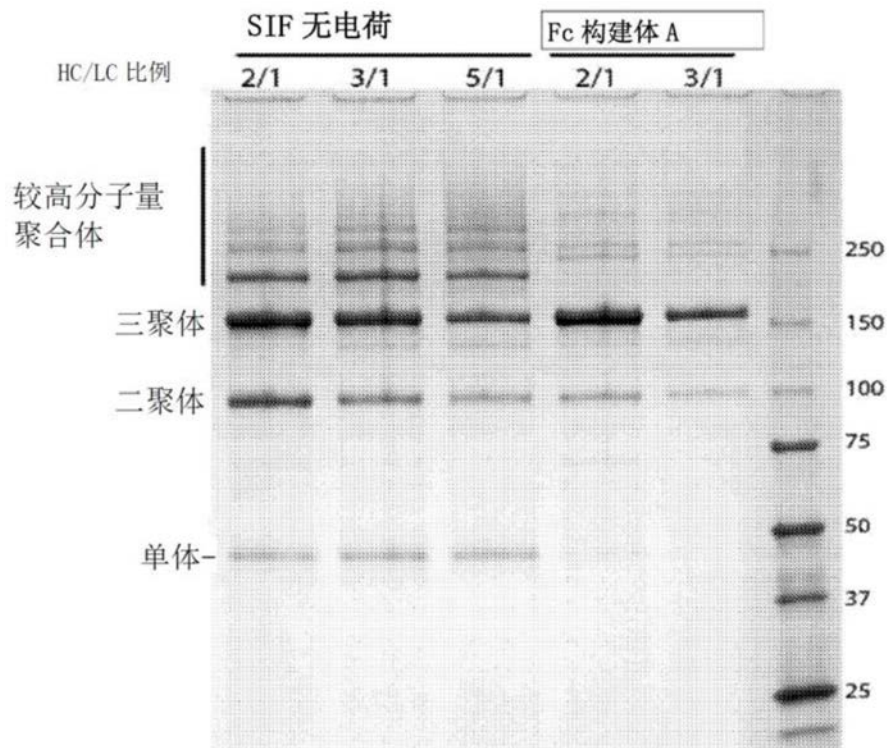


图52

		(SEQ ID NO: 43)
216	<u>EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYD</u>	280
281	<u>GVEVHNAKTKPREEQNSTYRVSVLTVLIHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR</u>	344
345	<u>EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK</u>	409
410	<u>LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>	447

图53A

221.	<u>DKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYD</u>	280	(SEQ ID NO: 45)
281.	<u>GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR</u>	344	
345	<u>EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK</u>	409	
410	<u>LTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>	446	

图53B

	(SEQ ID NO: 47)	
216	<u>EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYD</u>	280
281	<u>GVEVHNAKTKPREEQNSTYRVSVLTVLIHQDWLNGKEYCKCKVSNKALPAPTEKTTISKAKGQPR</u>	344
345	<u>EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSK</u>	409
410	<u>LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>	446

图53C

221.	<u>DKTHICPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPENTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD</u>	280	(SEQ ID NO: 42)
281	GVEVHNAKTKPREEQNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPTEKTTISKAKGQPR	344	
345	<u>EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK</u>	409	
410	<u>LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>	447	

图53D

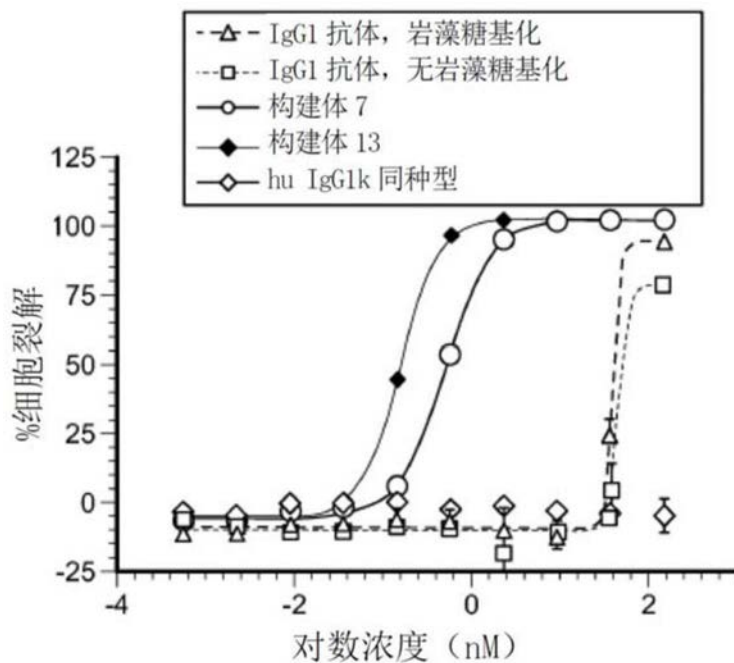


图54

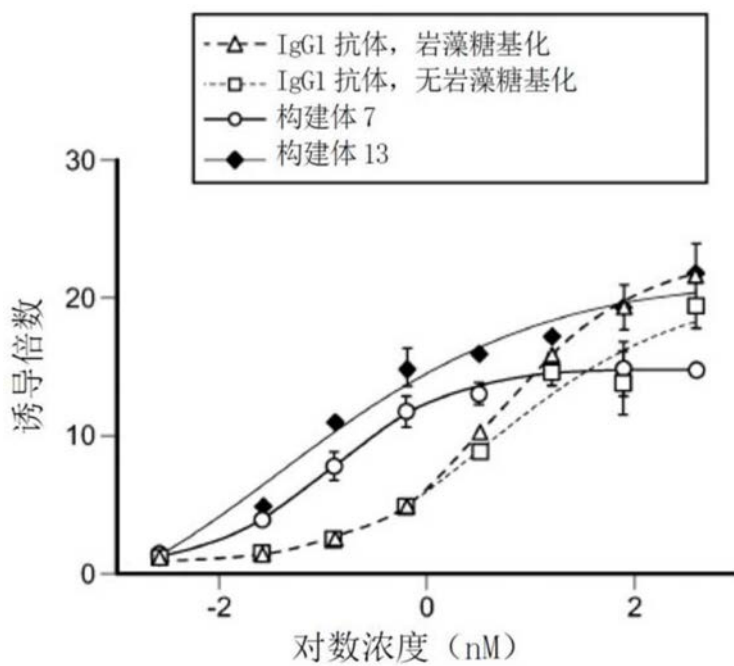


图55

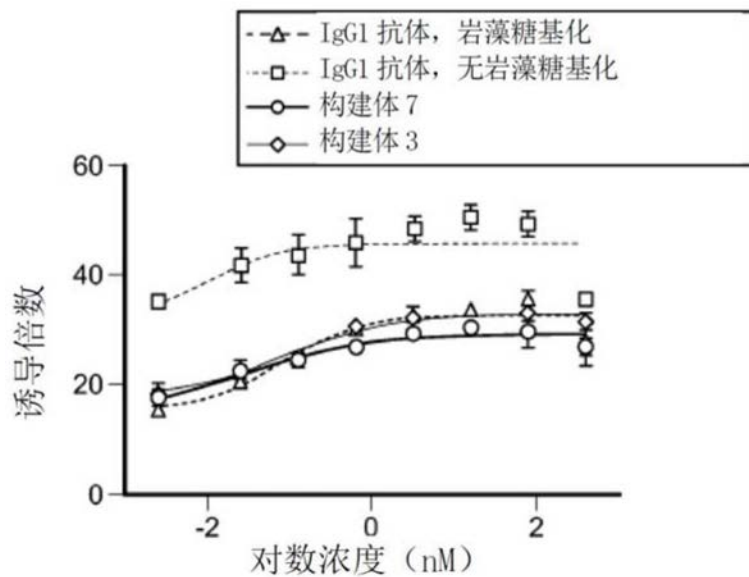


图56

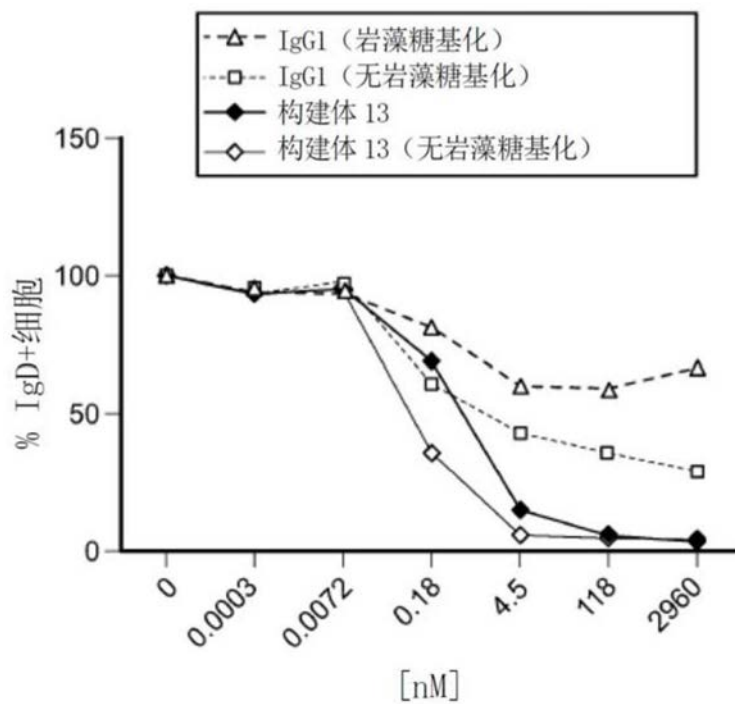


图57

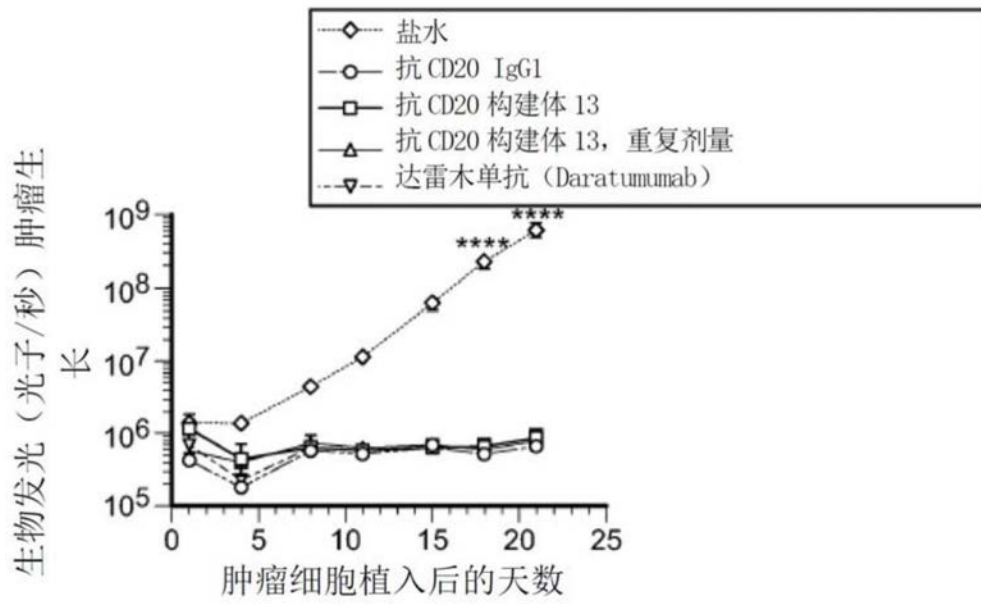


图58

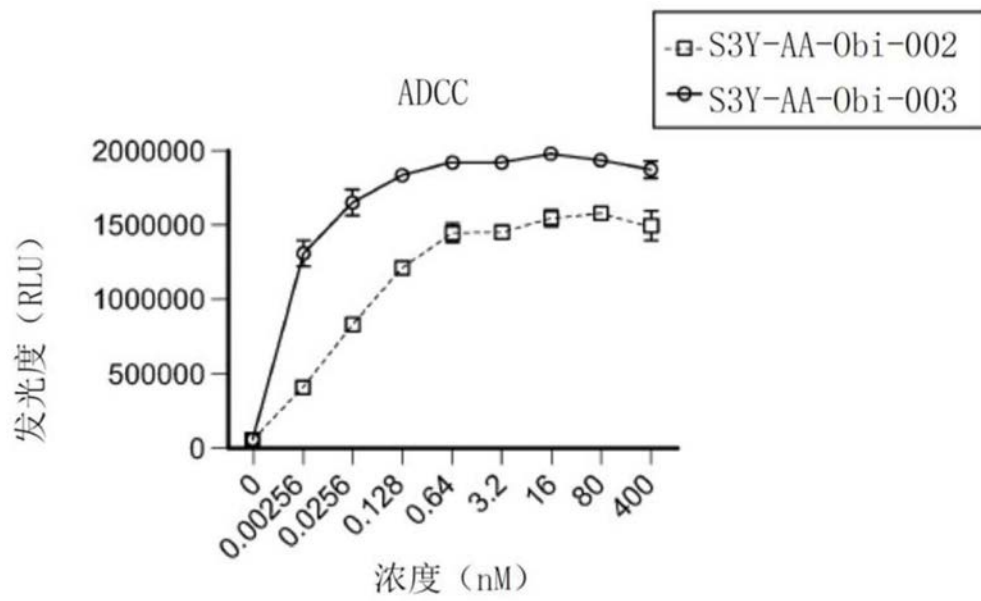


图59

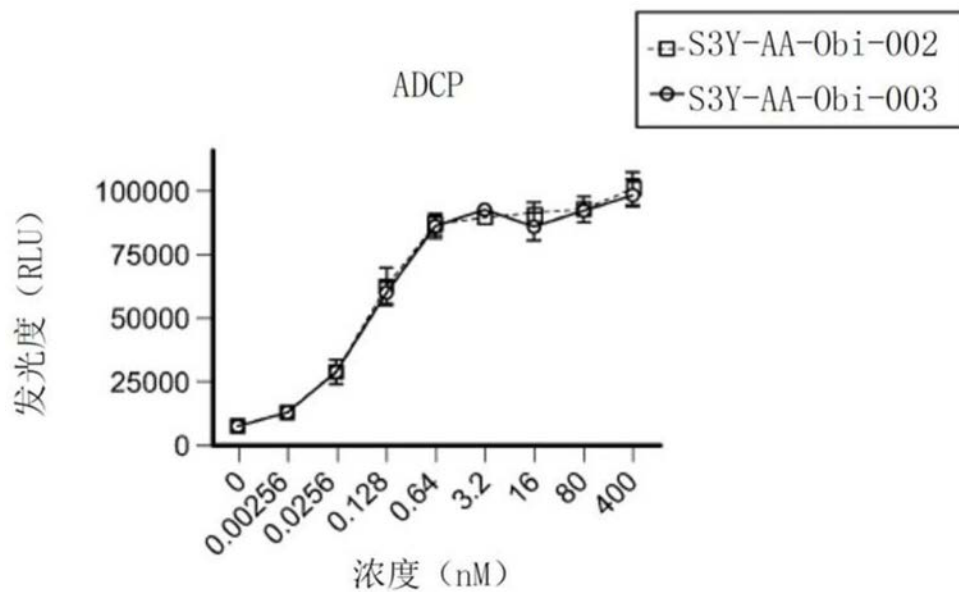


图60

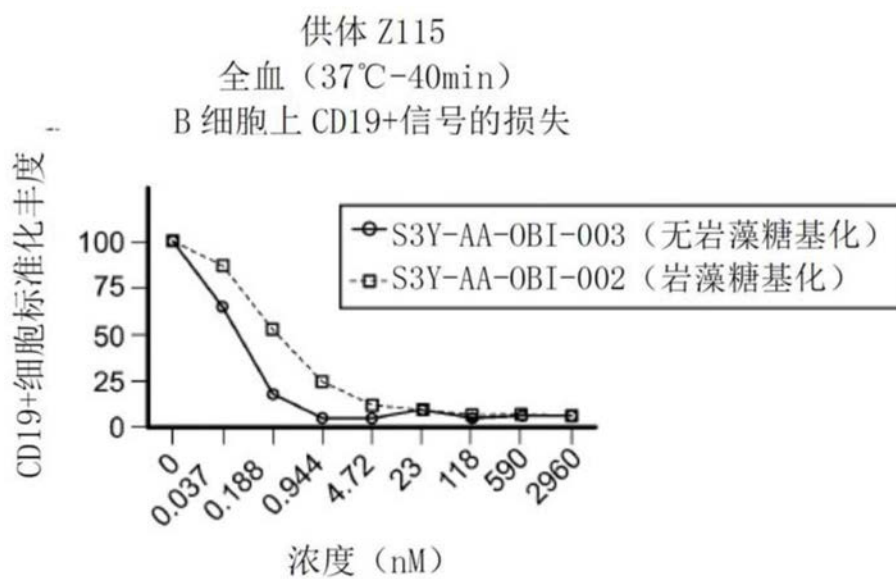


图61

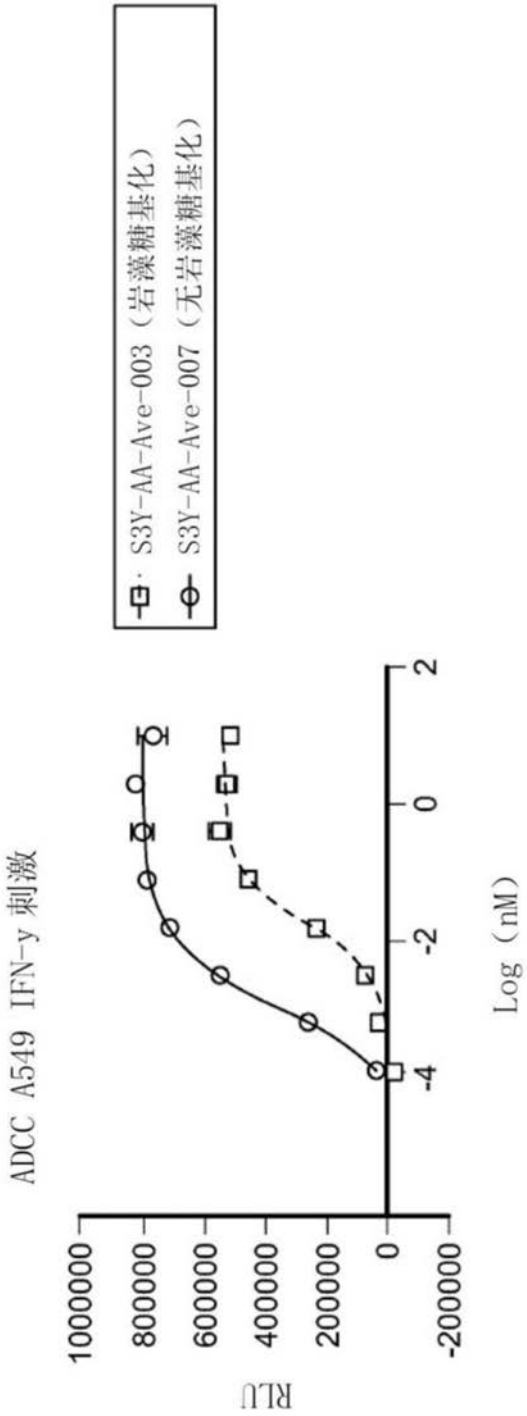


图62

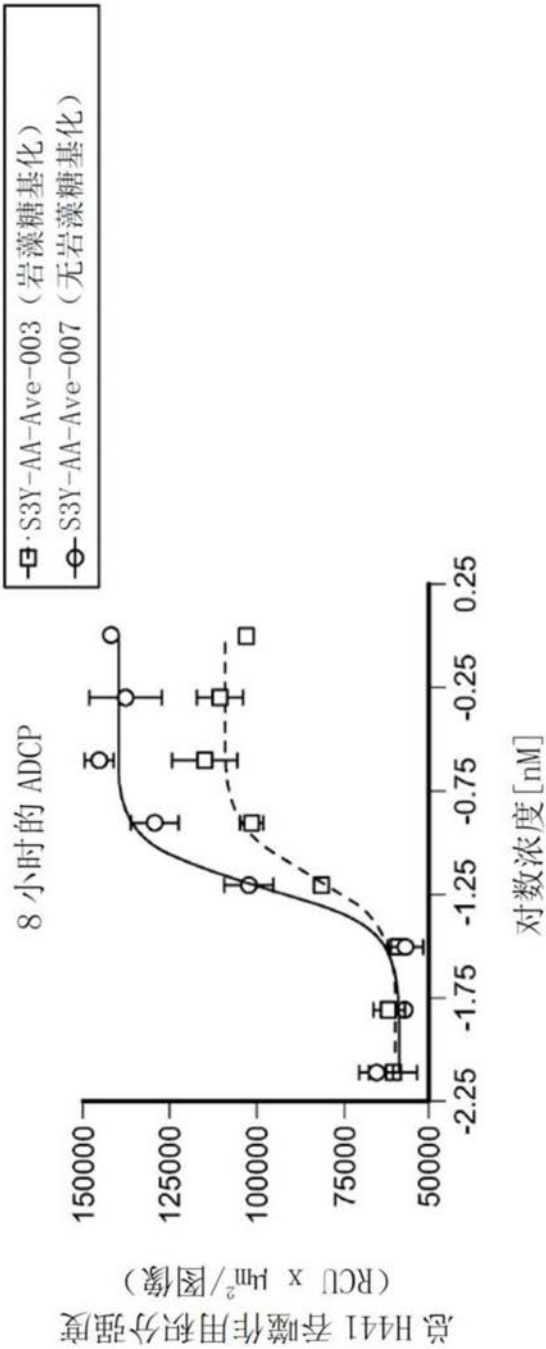


图63

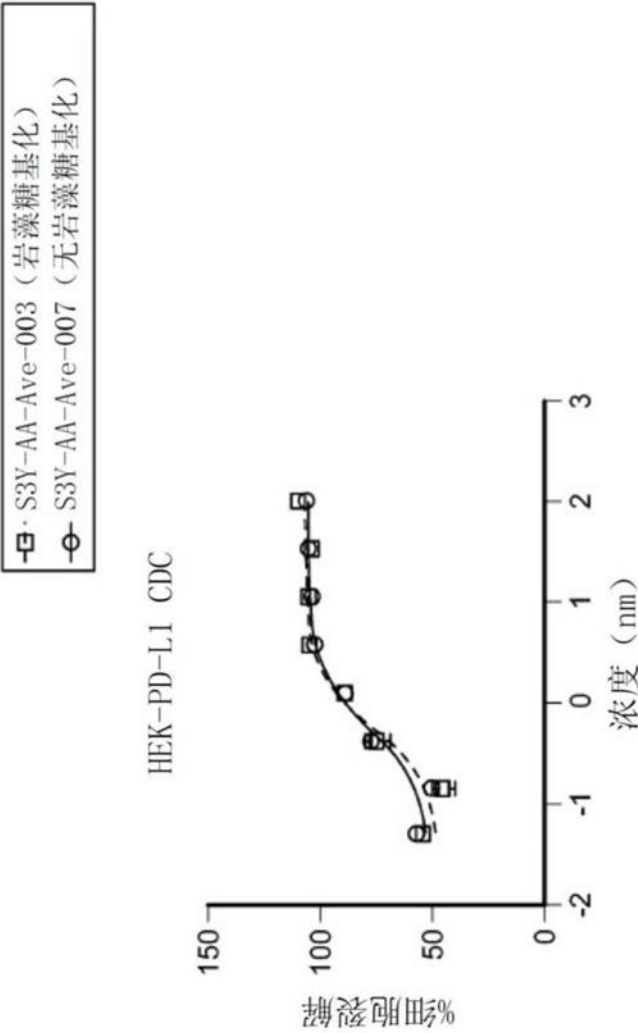


图64