



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109789203 B

(45) 授权公告日 2022.08.05

(21) 申请号 201780045710.8

(51) Int.CI.

(22) 申请日 2017.05.23

A61K 39/395 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61P 37/00 (2006.01)

申请公布号 CN 109789203 A

C07K 16/46 (2006.01)

(43) 申请公布日 2019.05.21

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

WO 2014060712 A1, 2014.04.24

62/340322 2016.05.23 US

WO 2015054958 A1, 2015.04.23

62/443451 2017.01.06 US

US 9238080 B2, 2016.01.19

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

US 7803769 B2, 2010.09.28

2019.01.23

WO 2008151088 A2, 2008.12.11

(86) PCT国际申请的申请数据

WO 2015168643 A2, 2015.11.05

PCT/US2017/034084 2017.05.23

WO 2015095684 A1, 2015.06.25

(87) PCT国际申请的公布数据

WO 2014031646 A2, 2014.02.27

W02017/205434 EN 2017.11.30

US 2014051834 A1, 2014.02.20

(73) 专利权人 动量制药公司

US 2010216663 A1, 2010.08.26

地址 美国马萨诸塞州

US 2015184142 A1, 2015.07.02

(72) 发明人 C.J.博斯克斯 J.C.兰辛

David N. A. Mekhail等.Polymeric

D.奥尔蒂斯 L.鲁蒂茨基

human Fc-fusion proteins with modified

N.J.沃什伯恩

effector functions.《Scientific Reports》

.2011,

审查员 李佳栋

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

权利要求书2页 说明书76页

72001

序列表76页 附图22页

专利代理人 初明月 万雪松

(54) 发明名称

(Fc 构建体 4)

与经改造的Fc构建体相关的组合物和方法

(57) 摘要

本公开内容涉及经改造的IgGFc构建体及其用途。

1. 一种Fc构建体,其包含:

- a) 具有式A-L-B的第一多肽;其中
  - i) A包含第一Fc结构域单体;
  - ii) L是甘氨酸间隔物;并且
  - iii) B包含第二Fc结构域单体;
- b) 具有式A'-L'-B'的第二多肽;其中
  - i) A'包含第三Fc结构域单体;
  - ii) L'是甘氨酸间隔物;并且
  - iii) B'包含第四Fc结构域单体;
- c) 包含第五Fc结构域单体的第三多肽;和
- d) 包含第六Fc结构域单体的第四多肽;

其中

所述第一多肽和第二多肽各自包含以下序列:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR  
 EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCL  
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLS  
 PGKGGGGGGGGGGGGGGGGGDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV  
 KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVY  
 TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSC  
 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 49) ,

所述第三多肽和第四多肽各自包含以下序列:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR  
 EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLSCA  
 VDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLS  
 PG (SEQ ID NO: 48) ,

B和B'组合以形成第一Fc结构域,A和第五Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,并且A'和第六Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域。

2. 根据权利要求1所述的Fc构建体,其中L和L'各自包含GGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 27) 的序列。

3. 根据权利要求1所述的Fc构建体,其中所述第一多肽和第二多肽各自由以下序列组成:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR  
 EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCL  
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLS  
 PGKGGGGGGGGGGGGGGGDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV  
 KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVY  
 TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSC  
 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 49) 。

4. 根据权利要求1所述的Fc构建体,其中所述第三多肽和第四多肽各自由以下序列组

成：

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR  
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCA  
VDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVHEALHNHYTQKSLSLSPG  
(SEQ ID NO: 48)。

5. 根据权利要求1所述的Fc构建体，其中所述第一多肽和第二多肽各自由以下序列组成：

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR  
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVYTLPPCRDKLTQNQVSLWCL  
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVHEALHNHYTQKSLSLSPG  
PGKGGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT  
KPRREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCA  
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 49)，并且

所述第三多肽和第四多肽各自由以下序列组成：

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR  
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCA  
VDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVHEALHNHYTQKSLSLSPG  
(SEQ ID NO: 48)。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的Fc构建体在制备用于减少受试者中免疫应答的免疫细胞活化的药物中的用途。

7. 根据权利要求6所述的用途，其中所述受试者患有自身免疫疾病。

8. 根据权利要求1-5中任一项所述的Fc构建体在制备用于治疗受试者中的炎症的药物中的用途。

9. 一种细胞培养基，其包含根据权利要求1-5中任一项所述的Fc构建体的基本上同质的群体。

10. 根据权利要求9所述的细胞培养基，其中所述Fc构建体的基本上同质的群体是至少85%同质的。

11. 一种制备细胞培养基的方法，所述细胞培养基包含根据权利要求1-5中任一项所述的Fc构建体的基本上同质的群体，所述方法包括：

a) 提供在细胞培养基中的宿主细胞，其中所述细胞包含编码根据权利要求1所述的第一多肽、第二多肽、第三多肽和第四多肽中的每一种的多核苷酸；

b) 在允许Fc构建体形成并分泌到细胞培养基内的条件下，在所述宿主细胞中表达所述多肽；和

c) 收集所述细胞培养基。

12. 根据权利要求11所述的方法，其中所述Fc构建体的基本上同质的群体是至少85%同质的。

## 与经改造的Fc构建体相关的组合物和方法

### [0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本专利申请要求于2016年5月23日提交的在先共同未决的美国临时申请序列号62/340,322、以及于2017年1月6日提交的在先共同未决的美国临时申请序列号62/443,451的权益。上述专利申请的公开内容在此以引用的方式全文并入。

### 背景技术

[0003] 治疗性蛋白质,例如治疗性抗体和Fc-融合蛋白,已迅速成为患有免疫疾病和炎性疾病、癌症和感染的患者的临幊上重要的药物类别。

### 发明内容

[0004] 本公开内容的特征在于含有生物活性Fc结构域的治疗构建体。此类构建体可以具有Fc受体的期望血清半衰期和/或结合亲和力和/或亲合力。

[0005] 一般而言,本公开内容的特征在于具有2-10个Fc结构域的Fc构建体,例如具有2、3、4、5、6、7、8、9或10个Fc结构域的Fc构建体。在一些实施例中,Fc构建体包括2-10个Fc结构域、2-5个Fc结构域、2-4个Fc结构域、2-3个Fc结构域、3-5个Fc结构域、2-8个Fc结构域或2-6个Fc结构域。在一些实施例中,Fc构建体包括2-4个Fc结构域。在一些实施例中,Fc构建体包括5-10个Fc结构域(例如,5-6、5-7、5-8、5-9或5-10个Fc结构域)。

[0006] 在一些实施例中,本公开内容的构建体(例如,具有2-4个Fc结构域,例如2、3或4个Fc结构域的Fc构建体)和同质药物组合物(例如,含有具有2-4个Fc结构域,例如2、3或4个Fc结构域的Fc构建体的那些)可用于例如减少受试者中的炎症,促进受试者中自身抗体的清除,压制受试者中的抗原呈递,阻断免疫应答,例如阻断受试者中基于免疫复合物的免疫应答的活化,并且治疗受试者中的免疫疾病和炎性疾病(例如,自身免疫疾病)。本文所述的Fc构建体可以用于治疗患有免疫疾病和炎性疾病而无免疫细胞的显著刺激的患者。在一些实施例中,本公开内容的构建体(例如,具有5-10个Fc结构域,例如5、6、7、8、9或10个Fc结构域的Fc构建体)和同质药物组合物(例如,含有具有5-10个Fc结构域,例如5、6、7、8、9或10个Fc结构域的Fc构建体的那些)可用于例如诱导受试者中免疫应答的免疫细胞活化,增加受试者中的靶细胞(即,癌细胞或受感染的细胞)的吞噬作用,且治疗受试者中的疾病如癌症和感染。

[0007] 这些构建体的性质允许有效生成基本上同质的组合物。组合物的同质性程度影响组合物的药代动力学和体内性能。组合物中的此类同质性是期望的,以便确保组合物的安全性、功效、均匀性和可靠性。本公开内容的Fc构建体可以是基本上同质(例如,至少85%、90%、95%、98%或99%同质)的群体或组合物。

[0008] 如本文进一步详细描述的,本公开内容的特征在于含有Fc构建体的基本上同质的组合物,所述Fc构建体都具有相同数目的Fc结构域,以及制备此类基本上同质的组合物的方法。

[0009] 在第一个方面,本公开内容的特征在于包括以下的Fc构建体:a)具有式A-L-B的第

一多肽；其中i) A包括第一Fc结构域单体；ii) L是甘氨酸间隔物；且iii) B包括第二Fc结构域单体；b) 具有式A'-L'-B'的第二多肽；其中i) A'包括第三Fc结构域单体；ii) L'是甘氨酸间隔物；且iii) B'包括第四Fc结构域单体；c) 包括第五Fc结构域单体的第三多肽；以及d) 包括第六Fc结构域单体的第四多肽；其中B和B'组合以形成第一Fc结构域，A和第五Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域，并且A'和第六Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域。

[0010] 在该方面的一些实施例中，B和B'各自包括突变D399K和K409D，A和A'各自包括突变S354C、T366W和E357K，并且第五Fc结构域单体和第六Fc结构域单体各自包括突变Y349C、T366S、L368A、Y407V和K370D。

[0011] 在第二个方面，本公开内容的特征在于包括以下的Fc构建体：a) 具有式A-L-B的第一多肽；其中i) A包括第一Fc结构域单体；ii) L是甘氨酸间隔物；且iii) B包括第二Fc结构域单体；b) 具有式A'-L'-B'的第二多肽；其中i) A'包括第三Fc结构域单体；ii) L'是甘氨酸间隔物；且iii) B'包括第四Fc结构域单体；c) 包括第五Fc结构域单体的第三多肽；以及d) 包括第六Fc结构域单体的第四多肽；其中A和A'组合以形成第一Fc结构域，B和第五Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域，并且B'和第六Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域。

[0012] 在该方面的一些实施例中，A和A'各自包括突变D399K和K409D，B和B'各自包括突变S354C、T366W和E357K，并且第五Fc结构域单体和第六Fc结构域单体各自包括突变Y349C、T366S、L368A、Y407V和K370D。

[0013] 在本公开内容的前两个方面的一些实施例中，L和L'各自包括至少4、8、12、14、16、18或20个甘氨酸。在一些实施例中，L和L'各自包括4-30、8-30或12-30个甘氨酸。在一些实施例中，L和L'各自包含GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:27)、由其组成或基本上由其组成。

[0014] 在本公开内容的前两个方面的一些实施例中，A由Fc结构域单体组成。在一些实施例中，B由Fc结构域单体组成。在一些实施例中，A'由Fc结构域单体组成。在一些实施例中，B'由Fc结构域单体组成。在一些实施例中，第三多肽由Fc结构域单体组成。在一些实施例中，第四多肽由Fc结构域单体组成。

[0015] 在一些实施例中，一个或多个Fc结构域单体包括IgG铰链结构域、IgG C<sub>H</sub>2抗体恒定结构域和IgG C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域。在一些实施例中，每个Fc结构域单体包括IgG铰链结构域、IgG C<sub>H</sub>2抗体恒定结构域和IgG C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域。在一些实施例中，每个Fc结构域单体是IgG1Fc结构域单体。

[0016] 在本公开内容的前两个方面的一些实施例中，第一多肽、第二多肽、第三多肽和第四多肽中的一种或多种中的N末端Asp突变为Gln。在一些实施例中，第一多肽、第二多肽、第三多肽和第四多肽各自中的N末端Asp突变为Gln。

[0017] 在一些实施例中，第一多肽、第二多肽、第三多肽和第四多肽中的一种或多种缺乏C末端赖氨酸。在一些实施例中，第一多肽、第二多肽、第三多肽和第四多肽各自缺乏C末端赖氨酸。

[0018] 在本公开内容的前两个方面的一些实施例中，第一多肽和第二多肽具有相同的氨基酸序列，并且其中第三多肽和第四多肽具有相同的氨基酸序列。

[0019] 在本公开内容的第一个方面的一些实施例中，第一多肽和第二多肽各自与以下序列具有至少95%的序列同一性（例如，至少97%、99%或99.5%的序列同一性）：

[0020] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDQLTKNQVS  
LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS  
LSLSPGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH  
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE  
PVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGN  
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSPG (SEQ ID NO: 49)。在一些实施例中，第一多肽和第二多肽各自  
包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成：

[0021] DKTHCPPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNFSCSVMHEALHNHTQKSLSLSPGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGDKTHCPPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGVFSCSVMHEALHNHTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:49)。

[0022] 在本公开内容的一些实施例中,第一多肽和第二多肽各自包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成:

[0023] DKTHTCPPCAPELLGGPSVLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDQLTKNQVS  
LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS  
LSLSPGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGDKTHTCPPCAPELLGGPSVLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH  
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE  
PVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGN  
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:49), 其具有至多10个(9、8、7、6、5、4、3、2或1个)  
单个氨基酸修饰(例如取代, 例如保守取代)。

[0024] 在本公开内容的第一个方面的一些实施例中，第三多肽和第四多肽各自与以下序列具有至少95%的序列同一性(例如，至少97%、99%或99.5%的序列同一性)：

[0025] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVCTLPPSDELTKNQVS  
LSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSVHEALHNHYTQKS  
LSLSPG (SEQ ID NO:48)。在一些实施例中，第三多肽和第四多肽各自包含以下序列、由以下  
序列组成或基本上由以下序列组成：

[0026] DKTHTCPPCAPELLGGPSVLFPPPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVCTLPPSDELTKNQVS  
LSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS  
LSLSPG (SEQ\_ID NO:48)。

[0027] 在本公开内容的一些实施例中，第三多肽和第四多肽各自包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成：

[0028] DKHTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPPKPKDTLMISRTEVTCVVVDVSHEDPEVKENWYVDGVEVHNAK

TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPVQVCTLPPSRDELTKNQVS  
LSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS  
LSLSPG (SEQ ID NO:48), 其具有至多10个(9、8、7、6、5、4、3、2或1个)单个氨基酸修饰(例如  
取代,例如保守取代)。

[0029] 在本公开内容的第一个方面的一些实施例中，第一多肽和第二多肽各自包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成：

[0030] DKTHCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGooooooooooooooDKTHCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ\_ID NO:49), 并且

[0031] 第三多肽和第四多肽各自包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成：

[0032] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVCTLPPSRDELTKNQVS  
LSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS  
LSLSPG (SEQ ID NO:48)。

[0033] 在本公开内容的第一个方面的一些实施例中,第一多肽和第二多肽各自包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成:

[0034] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:49), 其具有至多10个(9、8、7、6、5、4、3、2或1个)单个氨基酸修饰(例如取代, 例如保守取代), 和

[0035] 第三多肽和第四多肽各自包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成：

[0036] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPPKDTLMISRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAGQPREPVQVCTLPPSRDELTKNQVS  
LSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS  
LSLSPG (SEQ ID NO:48),其具有至多10个(9、8、7、6、5、4、3、2或1个)单个氨基酸修饰(例如  
取代,例如保守取代)。

[0037] 在本公开内容的第一个方面的一些实施例中,第一多肽和第二多肽各自包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成:

[0038] QKTHCTPPCPAPELLGGPSVLEPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKENWYVDGVEVHNAK

TKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLTQNQVS  
LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS  
LSLSPGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH  
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE  
PVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGN  
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:60),并且第三多肽和第四多肽各自包含以下序  
列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成:

[0039] QKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDTLMISRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVCTLPPSRDELTKNQVLSACAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ\_ID NO:59)。

[0040] 在本公开内容的第二个方面的一些实施例中,第一多肽和第二多肽各自包含与以下序列至少95%的序列同一性(例如,至少97%、99%或99.5%的序列同一性)、由其组成或基本上由其组成:

[0041] DKTHCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS  
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS  
LSLSPGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGDKTHCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE  
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE  
PQVYTLPPCRDKLTQNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN  
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSPG (SEQ ID NO:61)。

[0042] 在一些实施例中,第一多肽和第二多肽各自包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成:

[0043] DKTHCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS  
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS  
LSLSPGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGDKTHCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE  
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE  
PQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN  
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:61)。

[0044] 在本公开内容的一些实施例中,第一多肽和第二多肽各自包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成:

[0045] DKTHCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVS  
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS  
LSLSPGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGDKTHCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRPEVTCVVVDVSHE  
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE  
PVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN  
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID N0:61),其具有至多10个(9、8、7、6、5、4、3、2或1个)

单个氨基酸修饰(例如取代,例如保守取代)。

[0046] 在本公开内容的第二个方面的一些实施例中,第三多肽和第四多肽各自与以下序列具有至少95%的序列同一性(例如,至少97%、99%或99.5%的序列同一性):

[0047] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWFYVDGVEVHNAK  
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVCTLPPSRDELTKNQVS  
LSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKS  
LSLSPG (SEQ ID NO:48)。在一些实施例中,第三多肽和第四多肽各自包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成:

[0048] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWFYVDGVEVHNAK  
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVCTLPPSRDELTKNQVS  
LSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKS  
LSLSPG (SEQ ID NO:48)。在一些实施例中,第三多肽和第四多肽各自包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成:

[0049] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWFYVDGVEVHNAK  
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVCTLPPSRDELTKNQVS  
LSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKS  
LSLSPG (SEQ ID NO:48),其具有至多10个(9、8、7、6、5、4、3、2或1个)单个氨基酸修饰(例如取代,例如保守取代)。

[0050] 在本公开内容的第二个方面的一些实施例中,第一多肽和第二多肽各自包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成:

[0051] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWFYVDGVEVHNAK  
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVYTLPPSRDELTKNQVS  
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKS  
LSLSPGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWFYVDGVEVHNAK  
PQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN  
VFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:61),并且第三多肽和第四多肽各自包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成:

[0052] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWFYVDGVEVHNAK  
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVCTLPPSRDELTKNQVS  
LSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKS  
LSLSPG (SEQ ID NO:48)。

[0053] 在本公开内容的第二个方面的一些实施例中,第一多肽和第二多肽各自包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成:

[0054] QKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWFYVDGVEVHNAK  
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVYTLPPSRDELTKNQVS  
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKS  
LSLSPGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWFYVDGVEVHNAK  
DPEVKFNWFYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE

PQVYTLPPCRDKLTQNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:62), 并且第三多肽和第四多肽各自包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成:

[0055] QKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDITMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVCTLPPSRDELTKNQVLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:59)。

[0056] 在另一个方面,本公开内容的特征在于包括以下的Fc构建体:a) 具有式A-L-B的第一多肽;其中i) A包括第一Fc结构域单体;ii) L是接头;且iii) B包括第二Fc结构域单体;b) 具有式A'-L'-B'的第二多肽;其中i) A'包括第三Fc结构域单体;ii) L'是接头;且iii) B'包括第四Fc结构域单体;c) 包括第五Fc结构域单体的第三多肽;以及d) 包括第六Fc结构域单体的第四多肽;其中B和B'组合以形成第一Fc结构域,A和第五Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,并且A'和第六Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域,并且其中所述第一多肽和第二多肽各自包含SEQ ID NO:49的序列、由其组成或基本上由其组成,其中所述第三多肽和第四多肽各自包含SEQ ID NO:48的序列、由其组成或基本上由其组成。

[0057] 在另一个方面,本公开内容的特征在于包括以下的Fc构建体:a) 具有式A-L-B的第一多肽;其中i) A包括第一Fc结构域单体;ii) L是接头;且iii) B包括第二Fc结构域单体;b) 具有式A'-L'-B'的第二多肽;其中i) A'包括第三Fc结构域单体;ii) L'是接头;且iii) B'包括第四Fc结构域单体;c) 包括第五Fc结构域单体的第三多肽;以及d) 包括第六Fc结构域单体的第四多肽;其中A和A'组合以形成第一Fc结构域,B和第五Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,并且B'和第六Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域,并且其中所述第一多肽和第二多肽各自包含SEQ ID NO:61的序列、由其组成或基本上由其组成,其中所述第三多肽和第四多肽各自包含SEQ ID NO:48的序列、由其组成或基本上由其组成。

[0058] 在另一个方面,本公开内容的特征在于包括以下的Fc构建体:a) 具有式A-L-B的第一多肽;其中i) A包括第一Fc结构域单体;ii) L是甘氨酸间隔物;并且iii) B包括第二Fc结构域单体;b) 包括第三Fc结构域单体的第二多肽;以及c) 包括第四Fc结构域单体的第三多肽;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。

[0059] 在本公开内容的该方面的一些实施例中,第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体各自包括互补的二聚化选择性模块,其促进第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体之间的二聚化,并且第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体各自包括互补的二聚化选择性模块,其促进第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体之间的二聚化。在一些实施例中,第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体各自的互补的二聚化选择性模块包括经改造的突起,并且第三Fc结构域单体和第四Fc结构域单体各自的互补的二聚化选择性模块包括经改造的空腔。

[0060] 在本公开内容的该方面的一些实施例中,L包括至少4、8或12个甘氨酸。在一些实施例中,L包括4-30、8-30或12-30个甘氨酸。在一些实施例中,L包含GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:27) 的序列、由其组成或基本上由其组成。

[0061] 在本公开内容的该方面的一些实施例中,A、B、第二多肽和第三多肽中的一种或多种由Fc结构域单体组成。在一些实施例中,A、B、第二多肽和第三多肽中各自由Fc结构域单

体组成。

[0062] 在本公开内容的该方面的一些实施例中,第一多肽、第二多肽和第三多肽中的一种或多种中的N末端Asp突变为Gln。在一些实施例中,第一多肽、第二多肽和第三多肽各自中的N末端Asp突变为Gln。

[0063] 在本公开内容的该方面的一些实施例中,第一多肽、第二多肽和第三多肽中的一种或多种缺乏C末端赖氨酸。在一些实施例中,第一多肽、第二多肽和第三多肽各自缺乏C末端赖氨酸。

[0064] 在本公开内容的该方面的一些实施例中,第二多肽和第三多肽具有相同的氨基酸序列。

[0065] 在另一个方面,本公开内容的特征在于包括以下的Fc构建体:a)具有式A-L1-B-L2-C的第一多肽;其中i)A包括第一Fc结构域单体;ii)L1是甘氨酸间隔物;iii)B包括第二Fc结构域单体;iv)L2是甘氨酸间隔物;并且v)C包括第三Fc结构域单体;b)具有式A'-L1'-B'-L2'-C'的第二多肽;其中i')A'包括第四Fc结构域单体;ii')L1'是甘氨酸间隔物;iii')B'包括第五Fc结构域单体;iv')L2'是甘氨酸间隔物;并且v')C'包括第六Fc结构域单体;c)包括第七Fc结构域单体的第三多肽;d)包括第八Fc结构域单体的第四多肽;e)包括第九Fc结构域单体的第五多肽;以及f)包括第十Fc结构域单体的第六多肽;其中A和第七Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,B和B'组合以形成第二Fc结构域,C和第八Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域,A'和第九Fc结构域单体组合以形成第四Fc结构域,并且C'和第十Fc结构域单体组合以形成第五Fc结构域。

[0066] 在本公开内容的该方面的一些实施例中,第一Fc结构域单体和第七Fc结构域单体各自包括互补的二聚化选择性模块,其促进第一Fc结构域单体和第七Fc结构域单体之间的二聚化,第二Fc结构域单体和第五Fc结构域单体各自包括互补的二聚化选择性模块,其促进第二Fc结构域单体和第五Fc结构域单体之间的二聚化,第三Fc结构域单体和第八Fc结构域单体各自包括互补的二聚化选择性模块,其促进第三Fc结构域单体和第八Fc结构域单体之间的二聚化;第四Fc结构域单体和第九Fc结构域单体各自包括互补的二聚化选择性模块,其促进第四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结构域单体各自包括互补的二聚化选择性模块,其促进第六Fc结构域单体和第十Fc结构域单体之间的二聚化。

[0067] 在一些实施例中,第二Fc结构域单体的互补的二聚化选择性模块包括带负电荷的氨基酸取代,第五Fc结构域单体的互补的二聚化选择性模块包括带正电荷的氨基酸取代,第一Fc结构域单体、第三Fc结构域单体、第四Fc结构域单体和第六Fc结构域单体各自的互补的二聚化选择性模块包括经改造的突起,并且第七Fc结构域单体、第八Fc结构域单体、第九Fc结构域单体和第十Fc结构域单体各自的互补的二聚化选择性模块包括经改造的空腔。

[0068] 在另一个方面,本公开内容的特征在于包括以下的Fc构建体:a)具有式A-L1-B-L2-C的第一多肽;其中i)A包括第一Fc结构域单体;ii)L1是甘氨酸间隔物;iii)B包括第二Fc结构域单体;iv)L2是甘氨酸间隔物;并且v)C包括第三Fc结构域单体;b)具有式A'-L1'-B'-L2'-C'的第二多肽;其中i')A'包括第四Fc结构域单体;ii')L1'是甘氨酸间隔物;iii')B'包括第五Fc结构域单体;iv')L2'是甘氨酸间隔物;并且v')C'包括第六Fc结构域单体;c)包括第七Fc结构域单体的第三多肽;d)包括第八Fc结构域单体的第四多肽;e)包括第九Fc结构

域单体的第五多肽；以及f)包括第十Fc结构域单体的第六多肽；其中C和C'组合以形成第一Fc结构域，B和第七Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域，A和第八Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域，B'和第九Fc结构域单体组合以形成第四Fc结构域，并且A'和第十Fc结构域单体组合以形成第五Fc结构域。

[0069] 在本公开内容的该方面的一些实施例中，第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体各自包括互补的二聚化选择性模块，其促进第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体之间的二聚化，第二Fc结构域单体和第七Fc结构域单体各自包括互补的二聚化选择性模块，其促进第二Fc结构域单体和第七Fc结构域单体之间的二聚化，第一Fc结构域单体和第八Fc结构域单体各自包括互补的二聚化选择性模块，其促进第一Fc结构域单体和第八Fc结构域单体之间的二聚化；第五Fc结构域单体和第九Fc结构域单体各自包括互补的二聚化选择性模块，其促进第五Fc结构域单体和第九Fc结构域单体之间的二聚化；并且第四Fc结构域单体和第十Fc结构域单体各自包括互补的二聚化选择性模块，其促进第四Fc结构域单体和第十Fc结构域单体之间的二聚化。

[0070] 在一些实施例中，第三Fc结构域单体的互补的二聚化选择性模块包括带负电荷的氨基酸取代，第六Fc结构域单体的互补的二聚化选择性模块包括带正电荷的氨基酸取代，第一Fc结构域单体、第二Fc结构域单体、第四Fc结构域单体和第五Fc结构域单体各自的互补的二聚化选择性模块包括经改造的突起，并且第七Fc结构域单体、第八Fc结构域单体、第九Fc结构域单体和第十Fc结构域单体各自的互补的二聚化选择性模块包括经改造的空腔。

[0071] 在另一个方面，本公开内容的特征在于包括以下的Fc构建体：a)具有式A-L1-B-L2-C的第一多肽；其中i)A包括第一Fc结构域单体；ii)L1是甘氨酸间隔物；iii)B包括第二Fc结构域单体；iv)L2是甘氨酸间隔物；并且v)C包括第三Fc结构域单体；b)具有式A'-L1'-B'-L2'-C'的第二多肽；其中i)A'包括第四Fc结构域单体；ii)L1'是甘氨酸间隔物；iii)B'包括第五Fc结构域单体；iv)L2'是甘氨酸间隔物；并且v)C'包括第六Fc结构域单体；c)包括第七Fc结构域单体的第三多肽；d)包括第八Fc结构域单体的第四多肽；e)包括第九Fc结构域单体的第五多肽；以及f)包括第十Fc结构域单体的第六多肽；其中A和A'组合以形成第一Fc结构域，B和第七Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域，C和第八Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域，B'和第九Fc结构域单体组合以形成第四Fc结构域，并且C'和第十Fc结构域单体组合以形成第五Fc结构域。

[0072] 在本公开内容的该方面的一些实施例中，第一Fc结构域单体和第四Fc结构域单体各自包括互补的二聚化选择性模块，其促进第一Fc结构域单体和第四Fc结构域单体之间的二聚化，第二Fc结构域单体和第七Fc结构域单体各自包括互补的二聚化选择性模块，其促进第二Fc结构域单体和第七Fc结构域单体之间的二聚化，第三Fc结构域单体和第八Fc结构域单体各自包括互补的二聚化选择性模块，其促进第三Fc结构域单体和第八Fc结构域单体之间的二聚化；第五Fc结构域单体和第九Fc结构域单体各自包括互补的二聚化选择性模块，其促进第五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结构域单体各自包括互补的二聚化选择性模块，其促进第六Fc结构域单体和第十Fc结构域单体之间的二聚化。

[0073] 在一些实施例中，第一Fc结构域单体的互补的二聚化选择性模块包括带负电荷的氨基酸取代，第四Fc结构域单体的互补的二聚化选择性模块包括带正电荷的氨基酸取代，

第二Fc结构域单体、第三Fc结构域单体、第五Fc结构域单体和第六Fc结构域单体各自的互补的二聚化选择性模块包括经改造的突起，并且第七Fc结构域单体、第八Fc结构域单体、第九Fc结构域单体和第十Fc结构域单体各自的互补的二聚化选择性模块包括经改造的空腔。

[0074] 在如本文所述的具有五个Fc结构域的Fc构建体的一些实施例中，L1、L2、L1'和L2'各自包括至少4、8或12个甘氨酸。在一些实施例中，L1、L2、L1'和L2'各自包括4-30、8-30或12-30个甘氨酸。在一些实施例中，L1、L2、L1'和L2'各自包含GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:27) 的序列、由其组成或基本上由其组成。

[0075] 在如本文所述的具有五个Fc结构域的Fc构建体的一些实施例中，A、B、C、A'、B'、C'、第三多肽、第四多肽、第五多肽和六多肽各自由Fc结构域单体组成。

[0076] 在如本文所述的具有五个Fc结构域的Fc构建体的一些实施例中，第一多肽、第二多肽、第三多肽、第四多肽、第五多肽和第六多肽中的一种或多种中的N末端Asp突变为Gln。在一些实施例中，第一多肽、第二多肽、第三多肽、第四多肽、第五多肽和第六多肽各自中的N末端Asp突变为Gln。

[0077] 在一些实施例中，第一多肽、第二多肽、第三多肽、第四多肽、第五多肽和第六多肽中的一种或多种缺乏C末端赖氨酸。在一些实施例中，第一多肽、第二多肽、第三多肽、第四多肽、第五多肽和第六多肽各自缺乏C末端赖氨酸。

[0078] 在一些实施例中，第一多肽和第二多肽具有相同的氨基酸序列，并且第三多肽、第四多肽、第五多肽和第六多肽具有相同的氨基酸序列。

[0079] 在另一个方面，本公开内容的特征在于包括以下的Fc构建体：a) 具有式A-L1-B-L2-C的第一多肽；其中i) A包括第一Fc结构域单体；ii) L1是接头；iii) B包括第二Fc结构域单体；iv) L2是甘氨酸间隔物；v) C包括第三Fc结构域单体；并且b) 具有式A'-L1'-B'-L2'-C'的第二多肽；其中i) A'包括第四Fc结构域单体；ii) L1'是接头；iii) B'包括第五Fc结构域单体；iv) L2'是甘氨酸间隔物；v) C'包括第六Fc结构域单体；其中第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域，第四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，并且第三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。

[0080] 在本公开内容的该方面的一些实施例中，第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体各自包括互补的二聚化选择性模块，其促进第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体之间的二聚化，第四Fc结构域单体和第五Fc结构域单体各自包括互补的二聚化选择性模块，其促进第四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结构域单体各自包括互补的二聚化选择性模块，其促进第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体之间的二聚化。

[0081] 在一些实施例中，第一Fc结构域单体和第四Fc结构域单体各自的互补的二聚化选择性模块包括经改造的突起，第二Fc结构域单体和第五Fc结构域单体各自的互补的二聚化选择性模块包括经改造的空腔，第三Fc结构域单体的互补的二聚化选择性模块包括带负电荷的氨基酸取代，并且第六Fc结构域单体的互补的二聚化选择性模块包括带正电荷的氨基酸取代，

[0082] 在本公开内容的该方面的一些实施例中，L2和L2'各自包括至少12个甘氨酸。在一些实施例中，L2和L2'各自包括4-30、8-30或12-30个甘氨酸。在一些实施例中，L2和L2'各自包含GGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:27) 的序列、由其组成或基本上由其组成。

[0083] 在本公开内容的该方面的一些实施例中, A、B、C、A'、B' 和 C' 各自由Fc结构域单体组成。

[0084] 在本公开内容的该方面的一些实施例中, 第一多肽和第二多肽具有相同的氨基酸序列。

[0085] 在另一个方面, 本公开内容的特征在于包括以下的Fc构建体:a) 具有式A-L-B的第一多肽; 其中i) A包括第一Fc结构域单体; ii) L是接头; iii) B包括第二Fc结构域单体; b) 具有式A'-L'-B'的第二多肽; 其中i) A'包括第三个Fc结构域单体; ii) L'是接头; iii) B'包括第四Fc结构域单体; 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L和L'中的至少一个是甘氨酸间隔物。

[0086] 在该方面的一些实施例中, 第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体各自包括互补的二聚化选择性模块, 其促进第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体之间的二聚化, 并且第二和第四Fc结构域单体各自包括互补的二聚化选择性模块, 其促进第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体之间的二聚化。

[0087] 在该方面的一些实施例中, 第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体各自的互补的二聚化选择性模块包括经改造的突起, 并且第三Fc结构域单体和第四Fc结构域单体各自的互补的二聚化选择性模块包括经改造的空腔。

[0088] 在该方面的一些实施例中, L和L'中的至少一个包括至少4、8或12个甘氨酸。在一些实施例中, L和L'中的至少一个包括4-30、8-30或12-30个甘氨酸。在一些实施例中, L和L'中的至少一个包含GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:27) 的序列、由其组成或基本上由其组成。在该方面的一些实施例中, L和L'各自包括至少4、8或12个甘氨酸。在一些实施例中, L和L'各自包括4-30、8-30或12-30个甘氨酸。在一些实施例中, L和L'各自包含GGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:27) 的序列、由其组成或基本上由其组成。

[0089] 在该方面的一些实施例中, A、B、A' 和 B' 中的一个或多个由Fc结构域单体组成。在该方面的一些实施例中, A、B、A' 和 B' 各自由Fc结构域单体组成。

[0090] 在本公开内容的前两个方面的一些实施例中, 第一多肽和第二多肽中的一种或多种中的N末端Asp突变为Gln。在一些实施例中, 第一多肽和第二多肽各自中的N末端Asp突变为Gln。

[0091] 在本公开内容的前两个方面的一些实施例中, 第一多肽和第二多肽中的一种或多种缺乏C末端赖氨酸。在一些实施例中, 第一多肽和第二多肽各自缺乏C末端赖氨酸。

[0092] 在一些实施例中, 本文所述的Fc构建体中的每个Fc结构域单体包括IgG铰链结构域、IgG C<sub>H</sub>2抗体恒定结构域和IgG C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域。在一些实施例中, 本文所述的Fc构建体中的每个Fc结构域单体是IgG1Fc结构域单体。

[0093] 在另一个方面, 本公开内容的特征在于包括Fc构建体的基本上同质群体的组合物, 所述Fc构建体包括:a) 具有式A-L-B的第一多肽; 其中i) A包括第一Fc结构域单体; ii) L是甘氨酸间隔物; 且iii) B包括第二Fc结构域单体; b) 具有式A'-L'-B'的第二多肽; 其中i) A'包括第三Fc结构域单体; ii) L'是甘氨酸间隔物; 且iii) B'包括第四Fc结构域单体; c) 包括第五Fc结构域单体的第三多肽; 以及d) 包括第六Fc结构域单体的第四多肽; 其中B和B'组合以形成第一Fc结构域, A和第五Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域, 并且A'和第六Fc

结构域单体组合以形成第三Fc结构域。

[0094] 在该方面的一些实施例中, B和B'各自包括突变D399K和K409D, A和A'各自包括突变S354C、T366W和E357K, 并且第五Fc结构域单体和第六Fc结构域单体各自包括突变Y349C、T366S、L368A、Y407V和K370D。

[0095] 在该方面的一些实施例中, 第一多肽和第二多肽具有相同的氨基酸序列, 并且其中第三多肽和第四多肽在组合物的Fc构建体中具有相同的氨基酸序列。

[0096] 在一些实施例中, 第一多肽和第二多肽各自与以下序列具有至少95%的序列同一性(例如, 至少97%、99%或99.5%的序列同一性):

[0097] DKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLTQNQVS  
LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKS  
LSLSPGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHES  
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE  
PQVYTLPPSRDELTQNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGN  
VFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:49)。在一些实施例中, 第一多肽和第二多肽各自包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成:

[0098] DKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLTQNQVS  
LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKS  
LSLSPGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHES  
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE  
PQVYTLPPSRDELTQNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGN  
VFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:49)。在一些实施例中, 第一多肽和第二多肽各自包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成:DKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK  
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK  
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLTQNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLD  
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGDKHTCP  
PCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV  
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTQNQVSLTCLVKGFYPSDIAV  
EWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID  
NO:49), 其具有至多10个(9、8、7、6、5、4、3、2或1个)单个氨基酸修饰(例如取代, 例如保守取代)。

[0099] 在一些实施例中, 第三多肽和第四多肽各自与以下序列具有至少95%的序列同一性(例如, 至少97%、99%或99.5%的序列同一性):

[0100] DKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTQNQVS  
LSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKS  
LSLSPG (SEQ ID NO:48)。在一些实施例中, 第三多肽和第四多肽各自包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成:

[0101] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVCTLPPSRDELTKNQVLSCAVDGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSPG (SEQ ID N0:48)。在本公开内容的一些实施例中,第三多肽和第四多肽各自包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成:DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVCTLPPSRDELTKNQVSLCAVDGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSPG (SEQ ID N0:48),其具有至多10个(9、8、7、6、5、4、3、2或1个)单个氨基酸修饰(例如取代,例如保守取代)。

[0102] 在该方面的一些实施例中,组合物中的Fc构建体中的第一多肽和第二多肽各自包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成:

[0103] DKTHCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAGQPREPVQVYTLPPCRDKLTKNQVS  
LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS  
LSLSPGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGDKTHCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTEVTCVVVDVSH  
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAGQPRE  
PVQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGN  
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSPG (SEQ ID NO: 49), 并且组合物中的Fc构建体中的第三多肽和  
第四多肽各自包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成:

[0104] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAGQPREPVQVCTLPPSDELTKNQVLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:48)。在一些实施例中,Fc构建体包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成:DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAGQPREPVQVYTLPPCDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAGQPREPVQVYTLPPSDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:49),其具有至多10个(9、8、7、6、5、4、3、2或1个)单个氨基酸修饰(例如取代,例如保守取代),并且组合物中的Fc构建体中的第三多肽和第四多肽各自包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成:

[0105] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVCTLPPSRDELTKNQVS  
LSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSVHEALHNHYTQKS  
LSLSPG (SEQ ID NO:48),其具有至多10个(9、8、7、6、5、4、3、2或1个)单个氨基酸修饰(例如  
取代,例如保守取代)。在一些情况下,本文所述的任何一种Fc构建体都具有抗炎活性。

[0106] 在本文所述的任何Fc构建体的一些实施例中,一个或多个Fc结构域单体是IgG Fc结构域单体(例如,IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3或IgG4)。在一些情况下,一个或多个Fc结构域

单体是具有至多十个氨基酸修饰(例如,至多1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸修饰)的IgG Fc结构域单体。在一些情况下,每个Fc结构域单体具有不超过十个氨基酸修饰(例如,至多1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸修饰)。

[0107] 在另一个方面,本公开内容的特征在于包括Fc构建体的基本上同质群体的组合物,所述Fc构建体包括:a)具有式A-L-B的第一多肽;其中i)A包括第一Fc结构域单体;ii)L是甘氨酸间隔物;且iii)B包括第二Fc结构域单体;b)具有式A'-L'-B'的第二多肽;其中i)A'包括第三Fc结构域单体;ii)L'是甘氨酸间隔物;且iii)B'包括第四Fc结构域单体;c)包括第五Fc结构域单体的第三多肽;以及d)包括第六Fc结构域单体的第四多肽;其中A和A'组合以形成第一Fc结构域,B和第五Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,并且B'和第六Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域。

[0108] 在该方面的一些实施例中，A和A'各自包括突变D399K和K409D，B和B'各自包括突变S354C、T366W和E357K，并且第五Fc结构域单体和第六Fc结构域单体各自包括突变Y349C、T366S、L368A、Y407V和K370D。

[0109] 在该方面的一些实施例中,第一多肽和第二多肽具有相同的氨基酸序列,并且其中第三多肽和第四多肽在组合物的Fc构建体中具有相同的氨基酸序列。在一些实施例中,第一多肽和第二多肽具有相同的氨基酸序列(例如,SEQ ID NO:49),并且其中第三多肽和第四多肽在组合物中的Fc构建体中具有相同的氨基酸序列(例如,SEQ ID NO:48)。

[0110] 在该方面的一些实施例中,第一多肽和第二多肽各自与以下序列具有至少95%的序列同一性(例如,至少97%、99%或99.5%的序列同一性):

[0112] DKTHCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGGGGGDKTHCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ\_ID NO:61)。

[0113] 在该方面的一些实施例中,第三多肽和第四多肽各自与以下序列具有至少95%的序列同一性(例如,至少97%、99%或99.5%的序列同一性):

[0114] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVCTLPPSRDELTKNQVS  
LSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS

LSLSPG (SEQ\_ID NO:48)。在一些实施例中，第三多肽和第四多肽各自包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成：

[0115] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDTLMISRPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVCTLPPSRDELTKNQLSACAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ\_ID NO:48)。

[0116] 在该方面的一些实施例中,组合物中的Fc构建体中的第一多肽和第二多肽各自包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成:

[0118] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDTLMISRPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVCTLPPSRDELTKNQVS  
LSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS  
LSLSPG (SEQ\_ID NO:48)。

[0119] 在另一个方面,本公开内容的特征在于包括Fc构建体的基本上同质群体的组合物,所述Fc构建体包括:a)具有式A-L-B的第一多肽;其中i)A包括第一Fc结构域单体;ii)L是接头;且iii)B包括第二Fc结构域单体;b)具有式A'-L'-B'的第二多肽;其中i)A'包括第三Fc结构域单体;ii)L'是接头;且iii)B'包括第四Fc结构域单体;c)包括第五Fc结构域单体的第三多肽;以及d)包括第六Fc结构域单体的第四多肽;其中B和B'组合以形成第一Fc结构域,A和第五Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,并且A'和第六Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域,并且其中所述第一多肽和第二多肽各自包含SEQ ID NO:49的序列、由其组成或基本上由其组成,其中所述第三多肽和第四多肽各自包含SEQ ID NO:48的序列、由其组成或基本上由其组成。

[0120] 在另一个方面,本公开内容的特征在于包括Fc构建体的基本上同质群体的组合物,所述Fc构建体包括:a)具有式A-L-B的第一多肽;其中i)A包括第一Fc结构域单体;ii)L是接头;且iii)B包括第二Fc结构域单体;b)具有式A'-L'-B'的第二多肽;其中i)A'包括第三Fc结构域单体;ii)L'是接头;且iii)B'包括第四Fc结构域单体;c)包括第五Fc结构域单体的第三多肽;以及d)包括第六Fc结构域单体的第四多肽;其中A和A'组合以形成第一Fc结构域,B和第五Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,并且B'和第六Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域,并且其中所述第一多肽和第二多肽各自包含SEQ ID NO:61的序列、由其组成或基本上由其组成,其中所述第三多肽和第四多肽各自包含SEQ ID NO:48的序列、由其组成或基本上由其组成。

[0121] 在另一个方面,本公开内容的特征在于包括Fc构建体的基本上同质群体的组合

物,所述Fc构建体包括:a) 具有式A-L-B的第一多肽;其中i) A包括第一Fc结构域单体;ii) L是甘氨酸间隔物;并且iii) B包括第二Fc结构域单体;b) 包括第三Fc结构域单体的第二多肽;以及c) 包括第四Fc结构域单体的第三多肽;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。

[0122] 在该方面的一些实施例中,组合物中的Fc构建体中的第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体各自包括互补的二聚化选择性模块,其促进第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体之间的二聚化,并且组合物中的Fc构建体中的第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体各自包括互补的二聚化选择性模块,其促进第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体之间的二聚化。

[0123] 在该方面的一些实施例中,第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体各自的互补的二聚化选择性模块包括经改造的突起,并且第三Fc结构域单体和第四Fc结构域单体各自的互补的二聚化选择性模块包括经改造的空腔。

[0124] 在该方面的一些实施例中,第二多肽和第三多肽具有相同的氨基酸序列。

[0125] 在另一个方面,本公开内容的特征在于包括Fc构建体的基本上同质群体的组合物,所述Fc构建体包括:a) 具有式A-L1-B-L2-C的第一多肽;其中i) A包括第一Fc结构域单体;ii) L1是甘氨酸间隔物;iii) B包括第二Fc结构域单体;iv) L2是甘氨酸间隔物;并且v) C包括第三Fc结构域单体;b) 具有式A'-L1'-B'-L2'-C'的第二多肽;其中i) A'包括第四Fc结构域单体;ii) L1'是甘氨酸间隔物;iii) B'包括第五Fc结构域单体;iv) L2'是甘氨酸间隔物;并且v) C'包括第六Fc结构域单体;c) 包括第七Fc结构域单体的第三多肽;d) 包括第八Fc结构域单体的第四多肽;e) 包括第九Fc结构域单体的第五多肽;以及f) 包括第十Fc结构域单体的第六多肽;其中A和第七Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,B和B'组合以形成第二Fc结构域,C和第八Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域,A'和第九Fc结构域单体组合以形成第四Fc结构域,并且C'和第十Fc结构域单体组合以形成第五Fc结构域。

[0126] 在该方面的一些实施例中,组合物中的Fc构建体中的第一Fc结构域单体和第七Fc结构域单体各自包括互补的二聚化选择性模块,其促进第一Fc结构域单体和第七Fc结构域单体之间的二聚化;组合物中的Fc构建体中的第二Fc结构域单体和第五Fc结构域单体各自包括互补的二聚化选择性模块,其促进第二Fc结构域单体和第五Fc结构域单体之间的二聚化;组合物中的Fc构建体中的第三Fc结构域单体和第八Fc结构域单体各自包括互补的二聚化选择性模块,其促进第三Fc结构域单体和第八Fc结构域单体之间的二聚化;组合物中的Fc构建体中的第四Fc结构域单体和第九Fc结构域单体各自包括互补的二聚化选择性模块,其促进第四Fc结构域单体和第九Fc结构域单体之间的二聚化;组合物中的Fc构建体中的第六Fc结构域单体和第十Fc结构域单体各自包括互补的二聚化选择性模块,其促进第六Fc结构域单体和第十Fc结构域单体之间的二聚化。

[0127] 在该方面的一些实施例中,第二Fc结构域单体的互补的二聚化选择性模块包括带负电荷的氨基酸取代,第五Fc结构域单体的互补的二聚化选择性模块包括带正电荷的氨基酸取代,第一Fc结构域单体、第三Fc结构域单体、第四Fc结构域单体和第六Fc结构域单体各自的互补的二聚化选择性模块包括经改造的突起,并且第七Fc结构域单体、第八Fc结构域单体、第九Fc结构域单体和第十Fc结构域单体各自的互补的二聚化选择性模块包括经改造

的空腔。

[0128] 在另一个方面,本公开内容的特征在于包括Fc构建体的基本上同质群体的组合物,所述Fc构建体包括:a)具有式A-L1-B-L2-C的第一多肽;其中i)A包括第一Fc结构域单体;ii)L1是甘氨酸间隔物;iii)B包括第二Fc结构域单体;iv)L2是甘氨酸间隔物;并且v)C包括第三Fc结构域单体;b)具有式A'-L1'-B'-L2'-C'的第二多肽;其中i)A'包括第四Fc结构域单体;ii)L1'是甘氨酸间隔物;iii)B'包括第五Fc结构域单体;iv)L2'是甘氨酸间隔物;并且v)C'包括第六Fc结构域单体;c)包括第七Fc结构域单体的第三多肽;d)包括第八Fc结构域单体的第四多肽;e)包括第九Fc结构域单体的第五多肽;以及f)包括第十Fc结构域单体的第六多肽;其中C和C'组合以形成第一Fc结构域,B和第七Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,A和第八Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域,B'和第九Fc结构域单体组合以形成第四Fc结构域,并且A'和第十Fc结构域单体组合以形成第五Fc结构域。

[0129] 在该方面的一些实施例中,组合物中的Fc构建体中的第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体各自包括互补的二聚化选择性模块,其促进第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体之间的二聚化;组合物中的Fc构建体中的第二Fc结构域单体和第七Fc结构域单体各自包括互补的二聚化选择性模块,其促进第二Fc结构域单体和第七Fc结构域单体之间的二聚化;组合物中的Fc构建体中的第一Fc结构域单体和第八Fc结构域单体各自包括互补的二聚化选择性模块,其促进第一Fc结构域单体和第八Fc结构域单体之间的二聚化;组合物中的Fc构建体中的第五Fc结构域单体和第九Fc结构域单体各自包括互补的二聚化选择性模块,其促进第五Fc结构域单体和第九Fc结构域单体之间的二聚化;并且组合物中的Fc构建体中的第四Fc结构域单体和第十Fc结构域单体各自包括互补的二聚化选择性模块,其促进第四Fc结构域单体和第十Fc结构域单体之间的二聚化。

[0130] 在该方面的一些实施例中,第三Fc结构域单体的互补的二聚化选择性模块包括带负电荷的氨基酸取代,第六Fc结构域单体的互补的二聚化选择性模块包括带正电荷的氨基酸取代,第一Fc结构域单体、第二Fc结构域单体、第四Fc结构域单体和第五Fc结构域单体各自的互补的二聚化选择性模块包括经改造的突起,并且第七Fc结构域单体、第八Fc结构域单体、第九Fc结构域单体和第十Fc结构域单体各自的互补的二聚化选择性模块包括经改造的空腔。

[0131] 在另一个方面,本公开内容的特征在于包括Fc构建体的基本上同质群体的组合物,所述Fc构建体包括:a)具有式A-L1-B-L2-C的第一多肽;其中i)A包括第一Fc结构域单体;ii)L1是甘氨酸间隔物;iii)B包括第二Fc结构域单体;iv)L2是甘氨酸间隔物;并且v)C包括第三Fc结构域单体;b)具有式A'-L1'-B'-L2'-C'的第二多肽;其中i)A'包括第四Fc结构域单体;ii)L1'是甘氨酸间隔物;iii)B'包括第五Fc结构域单体;iv)L2'是甘氨酸间隔物;并且v)C'包括第六Fc结构域单体;c)包括第七Fc结构域单体的第三多肽;d)包括第八Fc结构域单体的第四多肽;e)包括第九Fc结构域单体的第五多肽;以及f)包括第十Fc结构域单体的第六多肽;其中A和A'组合以形成第一Fc结构域,B和第七Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,C和第八Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域,B'和第九Fc结构域单体组合以形成第四Fc结构域,并且C'和第十Fc结构域单体组合以形成第五Fc结构域。

[0132] 在该方面的一些实施例中,组合物中的Fc构建体中的第一Fc结构域单体和第四Fc结构域单体各自包括互补的二聚化选择性模块,其促进第一Fc结构域单体和第四Fc结构域

单体之间的二聚化；组合物中的Fc构建体中的第二Fc结构域单体和第七Fc结构域单体各自包括互补的二聚化选择性模块，其促进第二Fc结构域单体和第七Fc结构域单体之间的二聚化；组合物中的Fc构建体中的第三Fc结构域单体和第八Fc结构域单体各自包括互补的二聚化选择性模块，其促进第三Fc结构域单体和第八Fc结构域单体之间的二聚化；组合物中的Fc构建体中的第五Fc结构域单体和第九Fc结构域单体各自包括互补的二聚化选择性模块，其促进第五Fc结构域单体和第九Fc结构域单体之间的二聚化；并且组合物中的Fc构建体中的第六Fc结构域单体和第十Fc结构域单体各自包括互补的二聚化选择性模块，其促进第六Fc结构域单体和第十Fc结构域单体之间的二聚化。

[0133] 在该方面的一些实施例中，第一Fc结构域单体的互补的二聚化选择性模块包括带负电荷的氨基酸取代，第四Fc结构域单体的互补的二聚化选择性模块包括带正电荷的氨基酸取代，第二Fc结构域单体、第三Fc结构域单体、第五Fc结构域单体和第六Fc结构域单体各自的互补的二聚化选择性模块包括经改造的突起，并且第七Fc结构域单体、第八Fc结构域单体、第九结构域单体和第十Fc结构域单体各自的互补的二聚化选择性模块包括经改造的空腔。

[0134] 在包括本文所述Fc构建体(其具有五个Fc结构域)的基本上同质群体的组合物的一些实施例中，第一多肽和第二多肽具有相同的氨基酸序列，并且第三多肽、第四多肽、第五多肽和第六多肽具有相同的氨基酸序列。

[0135] 在另一个方面，本公开内容的特征在于包括Fc构建体的基本上同质群体的组合物，所述Fc构建体包括：a) 具有式A-L1-B-L2-C的第一多肽；其中i) A包括第一Fc结构域单体；ii) L1是接头；iii) B包括第二Fc结构域单体；iv) L2是甘氨酸间隔物；v) C包括第三Fc结构域单体；并且b) 具有式A'-L1'-B'-L2'-C'的第二多肽；其中i) A'包括第四Fc结构域单体；ii) L1'是接头；iii) B'包括第五Fc结构域单体；iv) L2'是甘氨酸间隔物；v) C'包括第六Fc结构域单体；其中第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域，第四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，并且第三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。

[0136] 在该方面的一些实施例中，组合物中的Fc构建体中的第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体各自包括互补的二聚化选择性模块，其促进第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体之间的二聚化；组合物中的Fc构建体中的第四Fc结构域单体和第五Fc结构域单体各自包括互补的二聚化选择性模块，其促进第四Fc结构域单体和第五Fc结构域单体之间的二聚化；并且组合物中的Fc构建体中的第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体各自包括互补的二聚化选择性模块，其促进第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体之间的二聚化。

[0137] 在该方面的一些实施例中，第一Fc结构域单体和第四Fc结构域单体各自的互补的二聚化选择性模块包括经改造的突起，第二Fc结构域单体和第五Fc结构域单体各自的互补的二聚化选择性模块包括经改造的空腔，第三Fc结构域单体的互补的二聚化选择性模块包括带负电荷的氨基酸取代，并且第六Fc结构域单体的互补的二聚化选择性模块包括带正电荷的氨基酸取代。

[0138] 在该方面的一些实施例中，第一多肽和第二多肽具有相同的氨基酸序列。

[0139] 在另一个方面，本公开内容的特征在于包括Fc构建体的基本上同质群体的组合物，所述Fc构建体包括：a) 具有式A-L-B的第一多肽；其中i) A包括第一Fc结构域单体；ii) L

是接头;iii)B包括第二Fc结构域单体;b)具有式A'-L'-B'的第二多肽;其中i)A'包括第三个Fc结构域单体;ii)L'是接头;iii)B'包括第四Fc结构域单体;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L和L'中的至少一个是甘氨酸间隔物。

[0140] 在该方面的一些实施例中,组合物中的Fc构建体中的第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体各自包括互补的二聚化选择性模块,其促进第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体之间的二聚化,并且组合物中的Fc构建体中的第二Fc结构域和第四Fc结构域单体各自包括互补的二聚化选择性模块,其促进第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体之间的二聚化。

[0141] 在该方面的一些实施例中,组合物中的Fc构建体中的第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体各自的互补的二聚化选择性模块包括经改造的突起,并且组合物中的Fc构建体中的第三Fc结构域单体和第四Fc结构域单体各自的互补的二聚化选择性模块包括经改造的空腔。

[0142] 在该方面的一些实施例中,组合物中的Fc构建体中的L和L'中的至少一个包含至少4、8或12个甘氨酸。在一些实施例中,L和L'中的至少一个包括4-30、8-30或12-30个甘氨酸。在一些实施例中,L和L'中的至少一个包含GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:27)的序列、由其组成或基本上由其组成。在该方面的一些实施例中,组合物中的Fc构建体中的L和L'各自包含至少4、8或12个甘氨酸。在一些实施例中,L和L'各自包括4-30、8-30或12-30个甘氨酸。在一些实施例中,L和L'各自包含GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:27)的序列、由其组成或基本上由其组成。

[0143] 在该方面的一些实施例中,组合物中的Fc构建体中的A、B、A'和B'中的一个或多个由Fc结构域单体组成。在该方面的一些实施例中,A、B、A'和B'各自由Fc结构域单体组成。

[0144] 在包括本文所述的Fc构建体的基本上同质群体的组合物的一些实施例中,组合物中的Fc构建体中的L、L'、L1、L2、L1'和L2'中的一个或多个包括至少4、8或12个甘氨酸。在一些实施例中,L、L'、L1、L2、L1'和L2'各自包括至少4、8或12个甘氨酸。

[0145] 在包括本文所述的Fc构建体的基本上同质群体的组合物的一些实施例中,组合物中的Fc构建体中的L、L'、L1、L2、L1'和L2'中的一个或多个包括4-30、8-30或12-30个甘氨酸。在一些实施例中,L、L'、L1、L2、L1'和L2'各自包括4-30、8-30或12-30个甘氨酸。

[0146] 在包括本文所述的Fc构建体的基本上同质群体的组合物的一些实施例中,组合物中的Fc构建体中的L、L'、L1、L2、L1'和L2'中的一个或多个包含GGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:27)的序列、由其组成或基本上由其组成。在一些实施例中,L、L'、L1、L2、L1'和L2'各自包含GGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:27)的序列、由其组成或基本上由其组成。

[0147] 在包括本文所述的Fc构建体的基本上同质群体的组合物的一些实施例中,组合物中的Fc构建体中的A、B、C、A'、B'、C'、第二多肽、第三多肽、第四多肽、第五多肽和第六多肽中的一种或多种由Fc结构域单体组成。在包括本文所述的Fc构建体的基本上同质群体的组合物的一些实施例中,A、B、C、A'、B'、C'、第二多肽、第三多肽、第四多肽、第五多肽和第六多肽各自由Fc结构域单体组成。

[0148] 在包括本文所述的Fc构建体的基本上同质群体的组合物的一些实施例中,组合物中的Fc构建体中的一个或多个Fc结构域单体包括IgG铰链结构域、IgG C<sub>H</sub>2抗体恒定结构域

和IgG C<sub>H</sub>3抗体恒定域。在包括本文所述的Fc构建体的基本上同质群体的组合物的一些实施例中,每个Fc结构域单体包括IgG铰链结构域、IgG C<sub>H</sub>2抗体恒定结构域和IgG C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域。

[0149] 在包括本文所述的Fc构建体的基本上同质群体的组合物的一些实施例中,组合物中的Fc构建体中的一个或多个Fc结构域单体是IgG1Fc结构域单体。在包括本文所述的Fc构建体的基本上同质群体的组合物的一些实施例中,每个Fc结构域单体是IgG1Fc结构域单体。

[0150] 在包括本文所述的Fc构建体的基本上同质群体的组合物的一些实施例中,组合物中的Fc构建体中的一种或多种多肽中的N末端Asp突变为Gln。在包括本文所述的Fc构建体的基本上同质群体的组合物的一些实施例中,组合物中的Fc构建体的每种多肽中的N末端Asp突变为Gln。

[0151] 在包括本文所述的Fc构建体的基本上同质群体的组合物的一些实施例中,组合物中的Fc构建体中的一种或多种多肽缺乏C端赖氨酸。在包括本文所述的Fc构建体的基本上同质群体的组合物的一些实施例中,组合物中的Fc构建体中的每种多肽缺乏C端赖氨酸。

[0152] 在另一个方面,本公开内容的特征在于包括Fc构建体的基本上同质群体的组合物,所述Fc构建体包括:a) 具有式A-L-B的第一多肽;其中i) A包括第一Fc结构域单体;ii) L是接头;且iii) B包括第二Fc结构域单体;b) 具有式A'-L'-B'的第二多肽;其中i) A'包括第三Fc结构域单体;ii) L'是接头;且iii) B'包括第四Fc结构域单体;c) 包括第五Fc结构域单体的第三多肽;以及d) 包括第六Fc结构域单体的第四多肽;其中B和B'组合以形成第一Fc结构域,A和第五Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,并且A'和第六Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域,并且其中第一多肽、第二多肽、第三多肽和第四多肽各自缺乏C末端赖氨酸。

[0153] 在另一个方面,本公开内容的特征在于表达两者均缺乏C末端赖氨酸的密码子的两种多核苷酸的宿主细胞,其中第一多核苷酸编码本公开内容的前一方面的第一多肽和第二多肽中的每一种,并且第二多核苷酸编码本公开内容的前一方面的第三多肽和第四多肽中的每一种。

[0154] 在另一个方面,本公开内容的特征在于包括Fc构建体的基本上同质群体的组合物,所述Fc构建体包括:a) 具有式A-L-B的第一多肽;其中i) A包括第一Fc结构域单体;ii) L是接头;并且iii) B包括第二Fc结构域单体;b) 包括第三Fc结构域单体的第二多肽;以及c) 包括第四Fc结构域单体的第三多肽;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,并且其中第一多肽、第二多肽和第三多肽各自缺乏C末端赖氨酸。

[0155] 在另一个方面,本公开内容的特征在于表达两者均缺乏C末端赖氨酸的密码子的两种多核苷酸的宿主细胞,其中第一多核苷酸编码本公开内容的前一方面的第一多肽,并且第二多核苷酸编码本公开内容的前一方面的第二多肽和第三多肽中的每一种。

[0156] 在另一个方面,本公开内容的特征在于包括Fc构建体的基本上同质群体的组合物,所述Fc构建体包括:a) 具有式A-L1-B-L2-C的第一多肽;其中i) A包括第一Fc结构域单体;ii) L1是接头;iii) B包括第二Fc结构域单体;iv) L2是接头;并且v) C包括第三Fc结构域单体;b) 具有式A'-L1'-B'-L2'-C'的第二多肽;其中i) A'包括第四Fc结构域单体;ii) L1'是

接头;iii)B'包括第五Fc结构域单体;iv)L2'是接头;并且v)C'包括第六Fc结构域单体;c)包括第七Fc结构域单体的第三多肽;d)包括第八Fc结构域单体的第四多肽;e)包括第九Fc结构域单体的第五多肽;以及f)包括第十Fc结构域单体的第六多肽;其中A和第七Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,B和B'组合以形成第二Fc结构域,C和第八Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域,A'和第九Fc结构域单体组合以形成第四Fc结构域,并且C'和第十Fc结构域单体组合以形成第五Fc结构域,并且其中第一多肽、第二多肽、第三多肽、第四多肽、第五多肽和第六多肽各自缺乏C末端赖氨酸。

[0157] 在另一个方面,本公开内容的特征在于包括Fc构建体的基本上同质群体的组合物,所述Fc构建体包括:a)具有式A-L1-B-L2-C的第一多肽;其中i)A包括第一Fc结构域单体;ii)L1是接头;iii)B包括第二Fc结构域单体;iv)L2是接头;并且v)C包括第三Fc结构域单体;b)具有式A'-L1'-B'-L2'-C'的第二多肽;其中i)A'包括第四Fc结构域单体;ii)L1'是接头;iii)B'包括第五Fc结构域单体;iv)L2'是接头;并且v)C'包括第六Fc结构域单体;c)包括第七Fc结构域单体的第三多肽;d)包括第八Fc结构域单体的第四多肽;e)包括第九Fc结构域单体的第五多肽;以及f)包括第十Fc结构域单体的第六多肽;其中C和C'组合以形成第一Fc结构域,B和第七Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,A和第八Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域,B'和第九Fc结构域单体组合以形成第四Fc结构域,并且A'和第十Fc结构域单体组合以形成第五Fc结构域,其中第一多肽、第二多肽、第三多肽、第四多肽、第五多肽和第六多肽各自缺乏C末端赖氨酸。

[0158] 在另一个方面,本公开内容的特征在于包括Fc构建体的基本上同质群体的组合物,所述Fc构建体包括:a)具有式A-L1-B-L2-C的第一多肽;其中i)A包括第一Fc结构域单体;ii)L1是接头;iii)B包括第二Fc结构域单体;iv)L2是接头;并且v)C包括第三Fc结构域单体;b)具有式A'-L1'-B'-L2'-C'的第二多肽;其中i)A'包括第四Fc结构域单体;ii)L1'是接头;iii)B'包括第五Fc结构域单体;iv)L2'是接头;并且v)C'包括第六Fc结构域单体;c)包括第七Fc结构域单体的第三多肽;d)包括第八Fc结构域单体的第四多肽;e)包括第九Fc结构域单体的第五多肽;以及f)包括第十Fc结构域单体的第六多肽;其中A和A'组合以形成第一Fc结构域,B和第七Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,C和第八Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域,B'和第九Fc结构域单体组合以形成第四Fc结构域,并且C'和第十Fc结构域单体组合以形成第五Fc结构域,其中第一多肽、第二多肽、第三多肽、第四多肽、第五多肽和第六多肽各自缺乏C末端赖氨酸。

[0159] 在另一个方面,本公开内容的特征在于表达两者均缺乏C末端赖氨酸的密码子的两种多核苷酸的宿主细胞,其中第一多核苷酸编码本公开内容的前三个方面中的任何一个的第一多肽和第二多肽中的每一种,并且第二多核苷酸编码本公开内容的前三个方面中的任何一个的第三多肽、第四多肽、第五多肽和第六多肽中的每一种。

[0160] 在另一个方面,本公开内容的特征在于包括Fc构建体的基本上同质群体的组合物,所述Fc构建体包括:a)具有式A-L1-B-L2-C的第一多肽;其中i)A包括第一Fc结构域单体;ii)L1是接头;iii)B包括第二Fc结构域单体;iv)L2是接头;v)C包括第三Fc结构域单体;并且b)具有式A'-L1'-B'-L2'-C'的第二多肽;其中i)A'包括第四Fc结构域单体;ii)L1'是接头;iii)B'包括第五Fc结构域单体;iv)L2'是接头;v)C'包括第六Fc结构域单体;其中第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,第四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，并且第三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，其中第一多肽和第二多肽各自缺乏C末端赖氨酸。

[0161] 在另一个方面，本公开内容的特征在于包括Fc构建体的基本上同质群体的组合物，所述Fc构建体包括：a) 具有式A-L-B的第一多肽；其中i) A包括第一Fc结构域单体；ii) L是接头；iii) B包括第二Fc结构域单体；b) 具有式A'-L'-B'的第二多肽；其中i) A'包括第三Fc结构域单体；ii) L'是接头；iii) B'包括第四Fc结构域单体；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，并且其中第一多肽和第二多肽各自缺乏C末端赖氨酸。

[0162] 在另一个方面，本公开内容的特征在于表达缺乏C末端赖氨酸的密码子的多核苷酸的宿主细胞，其中所述多核苷酸编码本公开内容的前两个方面中的任何一个的第一多肽和第二多肽中的每一种。

[0163] 在另一个方面，本公开内容的特征在于制备本文所述的Fc构建体的方法。该方法包括：a) 提供包括编码本公开内容的多肽的多核苷酸的宿主细胞；b) 在允许Fc构建体形成的条件下，在宿主细胞中表达多肽；并且c) 回收Fc构建体。

[0164] 在另一个方面，本公开内容的特征在于表达本文所述的Fc构建体的宿主细胞。宿主细胞包括编码本公开内容的多肽的多核苷酸，其中所述多核苷酸在宿主细胞中表达。

[0165] 在另一个方面，本公开内容的特征在于包括本文所述的Fc构建体的基本上同质群体(例如，具有三个Fc结构域的Fc构建体)的药物组合物，或包括本文所述的Fc构建体的基本上同质群体的组合物(例如，包括具有三个Fc结构域的Fc构建体的基本上同质群体的组合物)和一种或多种药学可接受的载体或赋形剂。可以在没有Fc构建体的基本聚集或不需要的多聚化的情况下产生此类药物组合物。

[0166] 在另一个方面，本公开内容的特征在于减少受试者中免疫应答的免疫细胞活化的方法，其包括向受试者施用本文所述的Fc构建体(例如，具有三个Fc结构域的Fc构建体)、或包括本文所述的Fc构建体的基本上同质群体的组合物(例如，包括具有三个Fc结构域的Fc构建体的基本上同质群体的组合物)。在一些实施例中，受试者患有自身免疫疾病。

[0167] 在另一个方面，本公开内容的特征在于治疗受试者中的炎症或炎性疾病的方法，其包括向受试者施用本文所述的Fc构建体(例如，具有三个Fc结构域的Fc构建体)、或包括本文所述的Fc构建体的基本上同质群体的组合物(例如，包括具有三个Fc结构域的Fc构建体的基本上同质群体的组合物)。

[0168] 在另一个方面，本公开内容的特征在于促进受试者中的自身抗体清除和/或压制抗原呈递的方法，其包括向受试者施用本文所述的Fc构建体(例如，具有三个Fc结构域的Fc构建体)、或包括本文所述的Fc构建体的基本上同质群体的组合物(例如，包括具有三个Fc结构域的Fc构建体的基本上同质群体的组合物)。

[0169] 在一些实施例中，可以通过施用本文所述的Fc构建体(例如，具有三个Fc结构域的Fc构建体)治疗的示例性疾病包括：类风湿性关节炎(RA)；系统性红斑狼疮(SLE)；ANCA相关性血管炎；抗磷脂抗体综合征；自身免疫性溶血性贫血；慢性炎症性脱髓鞘性神经病；移植中抗allo(anti-allo)的清除，GVHD中的抗自身，抗替代，IgG治疗，IgG副蛋白；皮肌炎；古德巴斯捷氏综合症(Goodpasture's Syndrome)；通过抗体依赖性细胞介导的细胞毒性介导的器官系统靶向的II型超敏综合征，例如格巴二氏综合征、CIDP、皮肌炎、费尔蒂综合征、抗体

介导的排斥、自身免疫性甲状腺疾病、溃疡性结肠炎、自身免疫性肝病；特发性血小板减少性紫癜；重症肌无力，视神经脊髓炎；天疱疮及其它自身免疫性水疱病症；干燥综合症；自身免疫性血细胞减少症和通过抗体依赖性吞噬作用介导的其它病症；其它FcR依赖性炎性综合征，例如滑膜炎、皮肌炎、系统性血管炎、肾小球炎和血管炎。

[0170] 在另一个方面，本公开内容的特征在于包括Fc构建体的基本上同质群体的细胞培养基，所述Fc构建体包括：a) 具有式A-L-B的第一多肽；其中i) A包括第一Fc结构域单体；ii) L是甘氨酸间隔物；且iii) B包括第二Fc结构域单体；b) 具有式A'-L'-B'的第二多肽；其中i) A'包括第三Fc结构域单体；ii) L'是甘氨酸间隔物；且iii) B'包括第四Fc结构域单体；c) 包括第五Fc结构域单体的第三多肽；以及d) 包括第六Fc结构域单体的第四多肽；其中所述第一多肽和第二多肽各自与以下序列具有至少95%的序列同一性：

[0171] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLTQNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGKGHHGGGGGGGGGGGGGGDKTHCTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTQNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNFSCSVMHEALHNHYTQKSLSPG (SEQ ID NO:49)，所述第三多肽和第四多肽各自与以下序列具有至少95%的序列同一性：DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTQNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNFSCSVMHEALHNHYTQKSLSPG (SEQ ID NO:48)，B和B'组合以形成第一Fc结构域，A和第五Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域，并且A'和第六Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域，B和B'各自包括突变D399K和K409D，A和A'各自包括突变S354C、T366W和E357K，并且第五Fc结构域单体和第六Fc结构域单体各自包括突变Y349C、T366S、L368A、Y407V和K370D，L和L'各自包括12-30个甘氨酸，并且第一多肽、第二多肽、第三多肽和第四多肽各自缺乏C末端赖氨酸。

[0172] 在另一个方面，本公开内容的特征在于制备细胞培养基的方法，所述细胞培养基包括本文所述的Fc构建体(例如，本公开内容的第一个方面的Fc构建体的基本上同质群体)。该方法包括：a) 提供在细胞培养基中的宿主细胞，其中所述细胞包括编码Fc构建体(例如，本公开内容的第一个方面的Fc构建体)的第一多肽、第二多肽、第三多肽和第四多肽中的每一种的多核苷酸；b) 在允许Fc构建体形成并分泌到细胞培养基内的条件下，在宿主细胞中表达多肽；并且c) 收集细胞培养基。

[0173] 另外，本公开内容的特征还在于包括本公开内容的其它Fc构建体的基本上同质群体的其它细胞培养基、以及制备此类细胞培养基的方法。

[0174] 在一些实施例中，本文所述的Fc构建体不包括抗原识别区，例如可变结构域或互补决定区(CDR)。在一些实施例中，Fc构建体(或Fc构建体内的Fc结构域)完全或部分地由存在于不同多肽中的Fc结构域单体的结合形成。在一些实施例中，本文所述的Fc构建体包括抗原识别区，例如可变结构域或CDR。在某些实施例中，Fc构建体不包括促进两种多肽结合的另外的结构域(例如，IgM尾端(tailpiece)或IgA尾端)。在其它实施例中，共价键合仅在

连接以形成Fc结构域的两个Fc结构域单体之间存在于Fc构建体中。在其它实施例中，Fc构建体不包括Fc结构域之间的共价键合。在另外其它实施例中，Fc构建体提供足够的结构柔性，使得Fc构建体中的所有或基本上所有Fc结构域能够同时与细胞表面上的Fc受体相互作用。在一个实施例中，结构域单体在一级序列中与野生型或彼此不同，因为它们具有二聚化选择性模块。

[0175] 构建体的Fc结构域的Fc结构域单体可以具有相同的一级氨基酸序列。例如，Fc结构域的两个Fc结构域单体均可以具有相同的二聚化选择性模块，例如，Fc结构域的两个Fc结构域单体均可以在C<sub>H</sub>3结构域之间的界面处的荷电残基环内的至少两个位置中具有相同的反向电荷突变。

[0176] 在本文所述的任何Fc构建体中，构建体的Fc结构域的Fc结构域单体可以具有不同的序列，例如，在两个Fc结构域单体之间（即，在Fc构建体的Fc结构域单体和另一个单体之间）相差不超过20个氨基酸（例如，不超过15、10个氨基酸），例如不超过20、15、10、8、7、6、5、4、3或2个氨基酸的序列。例如，本文描述的构建体的Fc结构域单体序列可以是不同的，因为任何Fc构建体的互补的二聚化选择性模块可以包括在一个结构域单体的C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中的经改造的空腔、以及在另一个Fc结构域单体的C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中的经改造的突起，其中所述经改造的空腔和所述经改造的突起被定位为形成Fc结构域单体的突起进入空腔对。示例性经改造的空腔和突起显示于表1中。在其它实施例中，互补的二聚化选择性模块包括在一个结构域单体的C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中的经改造的（取代的）带负电荷的氨基酸、以及在另一个Fc结构域单体中的C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中的经改造的（取代的）带正电荷的氨基酸，其中所述带负电荷的氨基酸和所述带正电荷的氨基酸被定位为促进互补结构域单体之间Fc结构域的形成。示例性互补的氨基酸变化显示于表2A-2C中。

[0177] 本公开内容的特征还在于药物组合物，其包括本文所述的任何Fc构建体的基本上同质的群体。在一个实施例中，对于药学用途合格的无菌注射器或小瓶含有药物组合物，其中唯一或主要活性成分是本文所述的任何一种Fc构建体的基本上同质的群体。药物组合物可以包括一种或多种非活性成分，例如选自盐、去污剂、表面活性剂、填充剂、聚合物、防腐剂和其它药物赋形剂。

[0178] 在另一个方面，本公开内容提供了药物组合物，其包括本文所述的任何Fc构建体。

[0179] 在一些实施例中，Fc构建体至少部分地通过存在于不同多肽中的Fc结构域单体的结合而形成。在某些实施例中，Fc构建体通过存在于不同多肽中的Fc结构域单体的结合而形成。在这些实施例中，Fc构建体不包括促进两种多肽（例如IgM尾端或IgA尾端）结合的另外结构域。在其它实施例中，共价键合（例如，二硫桥）仅存在于连接以形成Fc结构域的两个Fc结构域单体之间。在其它实施例中，Fc构建体不包括Fc结构域之间的共价键合（例如，二硫桥）。在另外其它实施例中，Fc构建体提供足够的结构柔性，使得Fc构建体中的所有或基本上所有Fc结构域能够同时与细胞表面上的Fc受体相互作用。在任何这些实施例的某些例子中，Fc构建体包括通过接头连接的至少两个Fc结构域（例如，柔性氨基酸间隔物）。

[0180] 在另一个方面，本公开内容的特征在于用于促进Fc结构域单体的选择性二聚化的组合物和方法。本公开内容包括Fc结构域，其中所述Fc结构域的两个Fc结构域单体包括在C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域之间的界面处的荷电残基环内的至少两个位置中的相同突变。本公开内容还包括制备此类Fc结构域的方法，其包括在C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域之间的界面处的荷电

残基环内的至少两个位置中,引入在两个Fc结构域单体序列中具有相同突变的互补的二聚化选择性模块。 $C_{H3}$ 抗体恒定结构域之间的界面由被荷电残基环包围的疏水性贴片组成。当一个 $C_{H3}$ 抗体恒定结构域与另一个结合在一起时,这些荷电残基与相反电荷的残基配对。通过逆转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。在该实施例中,相同的二聚化选择性模块促进同源二聚化。此类Fc结构域包括含有双重突变体K409D/D399K、K392D/D399K、E357K/K370E、D356K/K439D、K409E/D399K、K392E/D399K、E357K/K370D或D356K/K439E的Fc结构域单体。在另一个实施例中,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。

[0181] 在另一个实施例中,除相同的二聚化选择性模块之外,Fc结构域的Fc结构域单体包括具有促进特异性结合的非相同突变的互补的二聚化选择性模块(例如,经改造的空腔和突起)。因此,两个Fc结构域单体包括两个二聚化选择性模块并且彼此保持互补,但与其它Fc结构域单体具有降低的互补性。该实施例促进含空腔的Fc结构域和含突起的Fc结构域单体之间的异源二聚化。在一个例子中,在两个Fc结构域单体的荷电对残基中具有不相同突变的互补的二聚化选择性模块与一个Fc结构域单体上的突起和另一个Fc结构域单体上的空腔组合。

[0182] 在本文所述的任何Fc构建体中,应理解Fc结构域单体的次序是可互换的。例如,在具有式ALB的多肽中,A的羧基末端可以连接至L的氨基末端,所述L的氨基末端依次又在其羧基末端处连接至B的氨基末端。可替代地,B的羧基末端可以连接至L的氨基末端,所述L的氨基末端依次又在其羧基末端处连接至C的氨基末端。这两种构型均由式A-L-B涵盖。

[0183] 定义:

[0184] 如本文使用的,术语“Fc结构域单体”指这样的多肽链,其包括至少一个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( $C_{H2}$ 和 $C_{H3}$ )或其功能片段(例如,能够(i)与另一个Fc结构域单体二聚化以形成Fc结构域,和(ii)结合Fc受体的片段)。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,IgG1)。Fc结构域单体不包括能够充当抗原识别区域的免疫球蛋白的任何部分,例如可变结构域或互补决定区(CDR)。Fc结构域单体可以含有来自野生型Fc结构域单体序列的多达十种变化(例如,1-10、1-8、1-6、1-4个氨基酸取代、添加或缺失),其改变Fc结构域和Fc受体之间的相互作用。合适变化的例子是本领域已知的。

[0185] 如本文使用的,术语“Fc结构域”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。

[0186] 在本公开内容中,术语“Fc构建体”指形成如本文所述的Fc结构域的相关多肽链(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)。本文描述的Fc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,并且第三个包含IgG2或IgG2衍生的Fc结构域单体。在另一个例子中,Fc构建体可以具有三个Fc结构域,其中两个包括“突起进入空腔内对(protuberance-into-

cavity)" ,并且第二个不包括“突起进入空腔内对”。在本公开内容中,Fc结构域不包括抗体的可变区,例如 $V_H$ 、 $V_L$ 、CDR或HVR。Fc结构域形成与Fc受体结合的最小结构,所述Fc受体例如Fc  $\gamma$  RI、Fc  $\gamma$  RIIa、Fc  $\gamma$  RIIb、Fc  $\gamma$  RIIIa、Fc  $\gamma$  RIIIb、Fc  $\gamma$  RIV。在一些实施例中,本文所述的Fc构建体不包括抗原识别区,例如可变结构域或互补决定区(CDR)。在一些实施例中,本文所述的Fc构建体包括抗原识别区,例如可变结构域或CDR。

[0187] 如本文使用的,术语“抗体恒定结构域”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)。

[0188] 如本文使用的,术语“促进”意指支持且有利于,例如有利于从两个Fc结构域单体形成Fc结构域,所述两个Fc结构域单体对于彼此具有的结合亲和力比对于其它不同的Fc结构域单体更高。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的氨基酸修饰(例如,经改造的突起和经改造的空腔)。相对于缺乏此类氨基酸修饰或具有不相容的氨基酸修饰的其它Fc结构域单体,相容的氨基酸修饰促进或有利于此类Fc结构域单体与彼此的选择性相互作用。这因为以下而发生:由于在两个相互作用的 $C_H3$ 抗体恒定结构域的界面处的氨基酸修饰,Fc结构域单体针对彼此具有的亲和力比缺乏氨基酸修饰的其它Fc结构域单体更高。

[0189] 如本文使用的,术语“二聚化选择性模块”指Fc结构域单体的序列,其促进两个Fc结构域单体之间的有利配对。“互补的”二聚化选择性模块是二聚化选择性模块,其促进或有利于两个Fc结构域单体彼此的选择性相互作用。互补的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。

[0190] 如本文使用的,术语“经改造的空腔”指用不同的氨基酸残基(其具有比原始氨基酸残基更小的侧链体积)取代 $C_H3$ 抗体恒定结构域中的至少一个原始氨基酸残基,因此在 $C_H3$ 抗体恒定结构域中产生三维空腔。术语“原始氨基酸残基”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。

[0191] 如本文使用的,术语“经改造的突起”指用不同的氨基酸残基(其具有比原始氨基酸残基更大的侧链体积)取代 $C_H3$ 抗体恒定结构域中的至少一个原始氨基酸残基,因此在 $C_H3$ 抗体恒定结构域中产生三维突起。术语“原始氨基酸残基”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。

[0192] 如本文使用的,术语“突起进入空腔内对”描述包括两个Fc结构域单体的Fc结构域,其中第一Fc结构域单体包括在其 $C_H3$ 抗体恒定结构域中的经改造的空腔,并且第二Fc结构域单体包括在其 $C_H3$ 抗体恒定结构域中的经改造的突起。在突起进入空腔内对中,第一Fc结构域单体的 $C_H3$ 抗体恒定结构域中的经改造的突起这样定位,使得它与第二Fc结构域单体的 $C_H3$ 抗体恒定结构域的经改造的空腔相互作用,而不显著扰乱在 $C_H3$ 抗体恒定结构域间界面处的二聚体的正常结合。

[0193] 如本文使用的,术语“异二聚体Fc结构域”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结构域单体含有不同的反向电荷突变(参见例如,表2A中的突变),其促进这两个Fc结构域单体的有利形成。如图1和2中所示,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-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)。

[0194] 如本文使用的,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2B和表2C中的突变)。如图1和2中所示,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”) (例如,由图1中的Fc结构域单体104和110形成的同二聚体Fc结构域;由图2中的Fc结构域单体204和210形成的同二聚体Fc结构域)。

[0195] 如本文使用的,术语“异二聚化选择性模块”指经改造的突起、经改造的空腔和某些反向电荷氨基酸取代,其可以在Fc结构域单体的C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中进行,以便促进具有相容的异二聚化选择性模块的两个Fc结构域单体的有利的异二聚化。含有异二聚化选择性模块的Fc结构域单体可以组合,以形成异二聚体Fc结构域。异二聚化选择性模块的例子显示于表1和2A中。

[0196] 如本文使用的,术语“同二聚化选择性模块”指在C<sub>H</sub>3结构域之间的界面处的荷电残基环内的至少两个位置中的Fc结构域单体中的反向电荷突变,其促进Fc结构域单体的同二聚化以形成同二聚体Fc结构域。同二聚化选择性模块的例子显示于表2A和2B中。

[0197] 如本文使用的,术语“连接”用于描述通过手段包括化学缀合、重组手段和化学键,例如二硫键和酰胺键,两种或更多种元件、组分或蛋白质结构域(例如多肽)的组合或附着。例如,可以通过化学缀合、化学键、肽接头或任何其它共价键合手段,将两种单一多肽连接以形成一个连续的蛋白质结构。在一些实施例中,第一Fc结构域单体通过肽接头连接至第二Fc结构域单体,其中所述肽接头的N末端通过化学键例如肽键连接至第一Fc结构域单体的C末端,并且肽接头的C末端通过化学键例如肽键连接至第二Fc结构域单体的N末端。在其它实施例中,白蛋白结合肽的N末端通过接头以与上述相同的方式连接至Fc结构域单体的C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域的C末端。

[0198] 如本文使用的,术语“结合”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)定位为形成本文所述的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)。例如,在一些实施例中,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含一个Fc结构域单体的两种多肽)组合,以形成具有三个Fc结构域的Fc构建体(例如,如图1和2中所示)。四种多肽可以通过其各自的Fc结构域单体结合。多肽之间的结合不包括共价相互作用。

[0199] 如本文使用的,术语“接头”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”指化学键,例如酰胺键或二硫键,或由化学反应产生的任何种类的键,例如化学缀合。术语“间隔物”指在两种多肽或多肽结构域之间出现的部分(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、3-100个氨基酸、3-60个氨基酸、3-50个氨基酸、3-40个氨基酸、3-30个氨基酸、3-20个氨基酸、3-10个氨基酸、3-8个氨基酸、3-5个氨基酸、4-30个氨基酸、5-30个氨基酸、6-30个氨基酸、8-30个氨基酸、10-20个氨基酸、10-30个氨基酸、12-30个氨基酸、14-30个氨基酸、20-30个氨基酸、15-25个氨基酸、15-30个氨基酸、18-22个氨基酸和20-30个氨基酸序列),以在两种多肽或多肽结构域之间提供空间和/或柔性。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

结构域单体之间的二硫键形成不视为接头。

[0200] 如本文使用的,术语“甘氨酸间隔物”指仅含有以串联系列连接两个Fc结构域单体的甘氨酸的接头。甘氨酸间隔物可以含有至少4、8、10、12、14、16、18或20个甘氨酸(例如,4-30、8-30、12-30、12-50、12-100或12-200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)。在一些实施例中,甘氨酸间隔物包含GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID N0:27) 的序列、由其组成或基本上由其组成。

[0201] 如本文使用的,术语“白蛋白结合肽”指12至16个氨基酸的氨基酸序列,其对于血清白蛋白具有亲和力且作用于结合血清白蛋白。白蛋白结合肽可以具有不同起源,例如人、小鼠或大鼠。在本公开内容的一些实施例中,白蛋白结合肽与Fc结构域单体的C末端融合,以增加Fc构建体的血清半衰期。白蛋白结合肽可以直接或通过接头与Fc结构域单体的N末端或C末端融合。

[0202] 如本文使用的,术语“纯化肽”指可以用于纯化、分离或鉴定多肽的任何长度的肽。纯化肽可以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。在一些实施例中,纯化肽结合对于纯化肽具有特异性亲和力的另一部分。在一些实施例中,将与纯化肽特异性结合的此类部分附着至固体支持物,例如基质、树脂或琼脂糖珠。可以与Fc构建体连接的纯化肽的例子在本文中进一步详细描述。

[0203] 如本文使用的,术语“多聚体”指包括本文所述的至少两个结合的Fc构建体的分子。

[0204] 如本文使用的,术语“抗原识别区”指抗体的轻链和重链的部分,其负责识别抗体并将抗体与抗原结合。抗原识别区域包括轻链和重链的可变结构域(Fab),其包括互补决定区(CDR,例如CDR L1、CDR L2、CDR L3、CDRH1、CDRH2和CDRH3)和构架区(FR)。

[0205] 如本文使用的,短语“免疫应答的免疫细胞活化”指通过免疫复合物或Fc构建体与细胞(例如,免疫细胞(例如,单核细胞))上的Fc $\gamma$ 受体(Fc $\gamma$ R)(例如,活化Fc $\gamma$ R,例如,Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RIIa、Fc $\gamma$ RIIc、Fc $\gamma$ RIIIa或Fc $\gamma$ RIIIb)的结合诱导或活化的免疫应答。免疫复合物是由抗体与抗原组合而形成的抗原-抗体复合物。免疫复合物经常具有多个Fc结构域,其聚集Fc $\gamma$ R并抑制或活化在炎症、感染及其它疾病中起关键作用的细胞过程。在一些实施例中,本公开内容的Fc构建体能够结合Fc $\gamma$ R,并且诱导免疫细胞(例如单核细胞)上的活化Fc $\gamma$ R(例如,Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RIIa、Fc $\gamma$ RIIc、Fc $\gamma$ RIIIa或Fc $\gamma$ RIIIb)信号传导。在Fc $\gamma$ R表达细胞中的某些下游信号传导事件,例如激酶磷酸化(例如,Syk磷酸化)和钙流入的测量,可以用于检测由免疫复合物或Fc构建体的结合引起的免疫应答的免疫细胞活化。例如,如果激酶磷酸化(例如,Syk磷酸化)水平或细胞的钙流入水平比没有通过免疫复合物或Fc构建体的任何活化的细胞的激酶磷酸化(例如,Syk磷酸化)或细胞的钙流入水平高至少5倍,例如5-100倍(例如,5-100、10-95、15-90、20-85、25-80、30-75、35-70、40-65、45-60或50-55倍;例如,5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100倍),则诱导免疫应答的免疫细胞活化。

[0206] 如本文使用的,术语“吞噬作用”指内吞作用的一种形式,其中细胞(通常是吞噬细胞(例如单核细胞))吞噬另一种细胞、颗粒或病原体(例如,微生物或寄生虫),以形成吞噬体。在免疫系统中,吞噬作用是用于去除患病细胞(例如,癌细胞、受感染细胞或死细胞)、病原体和细胞碎片的主要机制。靶向被另一种细胞(例如吞噬细胞(例如,单核细胞))吞噬的细胞被称为靶细胞。例如,通过本公开内容的Fc构建体与免疫细胞上的Fc $\gamma$ R(例如,Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RIIa、Fc $\gamma$ RIIc、Fc $\gamma$ RIIIa或Fc $\gamma$ RIIIb)的结合而活化的免疫细胞(例如,单核细胞)可以吞噬靶细胞,其可以是受试者中的癌细胞或受感染细胞。

[0207] 如本文使用的,“增加(increase)”或“增加(increasing)”靶细胞的吞噬作用指相对于没有Fc构建体诱导时发生的吞噬作用水平,由本公开内容的Fc构建体与免疫细胞(例如单核细胞)上的Fc $\gamma$ R(例如,Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RIIa、Fc $\gamma$ RIIc、Fc $\gamma$ RIIIa或Fc $\gamma$ RIIIb)结合诱导的吞噬作用中的增加。例如,如果吞噬作用的水平比没有Fc构建体诱导时发生的吞噬作用水平高至少10%,例如10-100%(例如,10-100%、15-95%、20-90%、25-85%、30-80%、35-75%、40-70%、45-65%或50-60%;例如,10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%),则靶细胞的吞噬作用增加。

[0208] 如本文使用的,术语“治疗癌症”指受试者中癌症的治疗性处理。治疗性处理减缓癌症的进展,改善受试者的结果,和/或消除癌症。

[0209] 如本文使用的,术语“治疗感染”指受试者中感染的治疗性处理。治疗性处理减缓感染的进展,改善受试者的结果,和/或消除感染。

[0210] 如本文使用的,术语“感染”指受试者的细胞、组织和/或器官被病原体侵入,所述病原体例如细菌、病毒、真菌、蠕虫、原生动物、节肢动物及其它微生物、寄生虫和肠虫。在一些实施例中,病原体可以在受试者的细胞、组织和/或器官中生长、繁殖和/或产生毒素。在一些实施例中,受试者可以发展针对病原体的阴性反应(即,过敏反应或免疫应答)。感染的例子包括但不限于细菌感染、病毒感染、真菌感染、蠕虫感染和原生动物感染。

[0211] 如本文使用的,术语“细菌感染”指由一种或多种细菌引起的感染。引起感染的细菌的例子是本领域众所周知的,包括但不限于链球菌属(*Streptococcus*)中的细菌(例如酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*))、埃希氏菌属(*Escherichia*)中的细菌(例如大肠杆菌(*Escherichia coli*))、弧菌属(*Vibrio*)中的细菌(例如霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*))、肠炎属(*Enteritis*)中的细菌(例如肠炎沙门氏菌(*Enteritis salmonella*))、以及沙门氏菌属(*Salmonella*)中的细菌(例如伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*))。

[0212] 如本文使用的,术语“病毒感染”指由一种或多种病毒引起的感染。引起感染的病毒的例子是本领域众所周知的,包括但不限于逆转录病毒科中的病毒(例如人免疫缺陷病毒(HIV))、腺病毒科中的病毒(例如腺病毒)、疱疹病毒科中的病毒(例如1型和2型单纯疱疹病毒)、乳头状瘤病毒科中的病毒(例如人乳头状瘤病毒(HPV))、痘病毒科中的病毒(例如天花)、微小核糖核酸病毒科中的病毒(例如甲型肝炎病毒、脊髓灰质炎病毒、鼻病毒)、嗜肝

DNA病毒科中的病毒(例如乙型肝炎病毒)、黄病毒科中的病毒(例如丙型肝炎病毒、黄热病病毒、西尼罗河病毒)、披膜病毒科中的病毒(例如风疹病毒)、正粘病毒科中的病毒(例如流感病毒)、丝状病毒科中的病毒(例如埃博拉病毒、马尔堡病毒)和副粘病毒科中的病毒(例如麻疹病毒、腮腺炎病毒)。

[0213] 如本文使用的,术语“真菌感染”指由一种或多种真菌引起的感染。引起感染的真菌的例子是本领域众所周知的,包括但不限于曲霉属(*Aspergillus*)中的真菌(例如烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)、黄曲霉(*A. flavus*)、土曲霉(*A. terreus*)、黑曲霉(*A. niger*)、白曲霉(*A. candidus*)、棒曲霉(*A. clavatus*)、赭曲霉(*A. ochraceus*))、念珠菌属(*Candida*)中的真菌(例如白色念珠菌(*Candida albicans*)、近平滑念珠菌(*C. parapsilosis*)、光滑念珠菌(*C. glabrata*)、高里念珠菌(*C. guilliermondii*)、克柔念珠菌(*C. krusei*)、鲁希特念珠菌(*C. lusitaniae*)、热带念珠菌(*C. tropicalis*))、隐球菌属(*Cryptococcus*)中的真菌(例如新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*))、以及镰刀菌属(*Fusarium*)中的真菌(例如茄病镰刀菌(*Fusarium solani*)、串株镰刀菌(*F. verticillioides*)、尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*))。

[0214] 如本文使用的,术语“蠕虫感染”指由一种或多种蠕虫引起的感染。蠕虫的例子包括但不限于绦虫(tapeworm)(绦虫(cestode))、圆虫(线虫)、吸虫(fluke)(吸虫(trematode))和单殖亚纲动物。

[0215] 如本文使用的,术语“原生动物感染”指由一种或多种原生动物引起的感染。原生动物的例子包括但不限于内阿米巴属(*Entamoeba*)中的原生动物(例如溶组织内阿米巴(*Entamoeba histolytica*))、疟原虫属(*Plasmodium*)中的原生动物(例如恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)、三日疟原虫(*P. malariae*))、贾第虫属(*Giardia*)中的原生动物(例如兰伯贾第虫(*Giardia lamblia*))、以及锥虫属(*Trypanosoma*)中的原生动物(例如布氏锥虫(*Trypanosoma brucei*))。

[0216] 如本文使用的,术语“多核苷酸”指寡核苷酸、或核苷酸、及其片段或部分、以及基因组或合成起源的DNA或RNA,其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一多肽。

[0217] 如本文使用的,术语“多肽”描述单一聚合物,其中单体是通过酰胺键连接在一起的氨基酸残基。多肽预期涵盖天然存在、重组或合成产生的任何氨基酸序列。

[0218] 如本文使用的,术语“氨基酸位置”指蛋白质或蛋白质结构域中氨基酸的位置编号。使用Kabat编号系统(Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,National Institutes of Health,Bethesda,Md.,ed 5,1991),对抗体或Fc构建体的氨基酸位置进行编号。

[0219] 如本文使用的,术语“氨基酸修饰”或指Fc结构域多肽序列的改变,与参考序列(例如,野生型、未突变的或未经修饰的Fc序列)相比,所述改变可以对Fc构建体的以下具有作用:药代动力学(PK)和/或药效学(PD)性质、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))、免疫活化和T细胞活化)、对于Fc受体(例如,Fc- $\gamma$ 受体(*Fc  $\gamma$  R*)(例如,*Fc  $\gamma$  RI (CD64)*、*Fc  $\gamma$  RIIa (CD32)*、*Fc  $\gamma$  RIIb (CD32)*、*Fc  $\gamma$  RIIIa (CD16a)*和/或*Fc  $\gamma$  RIIIb (CD16b)*)、*Fc- $\alpha$ 受体 (Fc $\alpha$ R)*、*Fc- $\epsilon$ 受体*

(Fc $\epsilon$ R) 和/或新生儿Fc受体 (FcRn) ) 的亲和力、对于涉及补体级联的蛋白质 (如C1q) 的亲和力、翻译后修饰 (例如, 糖基化、唾液酸化) 、聚集性质 (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) 和生物物理学性质 (例如, 改变C<sub>H</sub>1和C<sub>L</sub>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) , 并且可以促进免疫疾病和炎性疾病、癌症和感染治疗的改善功效。氨基酸修饰包括氨基酸取代、缺失和/或插入。在一些实施例中, 氨基酸修饰是单个氨基酸的修饰。在其它实施例中, 氨基酸修饰是多个 (例如, 多于一个) 氨基酸的修饰。氨基酸修饰可以包含氨基酸取代、缺失和/或插入的组合。在氨基酸修饰的描述中包括的是编码Fc多肽的核苷酸序列的遗传 (即DNA和RNA) 改变, 例如点突变 (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/或去除) 。

[0220] 在某些实施例中, Fc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。在一些情况下, 至少一个Fc结构域包括不超过十六个氨基酸修饰 (例如, 不超过一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四四个、十五个或十六个氨基酸修饰) 。在一些情况下, Fc结构域单体包括不超过十个氨基酸修饰。在一些情况下, Fc结构域单体包括不超过12个氨基酸修饰。在一些情况下, Fc结构域单体包括不超过14个氨基酸修饰。

[0221] 如本文使用的, 术语“同一性百分比 (%)”指在比对序列并且在需要时引入缺口以实现最大同一性百分比后 (即, 可以在候选序列和参考序列之一或两者中引入缺口用于最佳比对, 并且可以忽略非同源序列用于比较目的) , 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) 残基相同的候选序列 (例如本文所述的Fc构建体中的Fc结构域单体的序列) 的氨基酸 (或核酸) 残基的百分比。用于确定同一性百分比目的的比对可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, 例如BLAST、ALIGN或Megalign (DNASTAR) 软件。本领域技术人员可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。在一些实施例中, 如下计算给定候选序列和、与或针对给定参考序列的氨基酸 (或核酸) 序列同一性百分比 (其可以可替代地表达为和、与或针对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) :

[0222]  $100 \times (A/B)$  (分数)

[0223] 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例中, 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。

[0224] 在特定实施例中, 用于与候选序列比较而比对的参考序列可以显示, 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。

[0225] 在一些实施例中, 本文所述的Fc构建体 (例如, 具有三个Fc结构域的Fc构建体) 中

的Fc结构域单体可以具有与野生型Fc结构域单体的序列(例如,SEQ ID NO:42)至少95%相同(例如,至少97%、99%或99.5%相同)的序列。在一些实施例中,本文所述的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)中的Fc结构域单体可以具有与SEQ ID NO:44、46、48和50-53中的任何一个的序列至少95%相同(例如,至少97%、99%或99.5%相同)的序列。在某些实施例中,Fc构建体中的Fc结构域单体可以具有与SEQ ID NO:48、52和53的序列至少95%相同(例如,至少97%、99%或99.5%相同)的序列。

[0226] 在一些实施例中,本文所述的Fc构建体(例如,具有多个Fc结构域的Fc构建体)中的Fc结构域单体可以具有含有至多10个(例如,9、8、7、6、5、4、3、2或1个)单一氨基酸修饰(例如取代,例如保守取代)的序列。在一些情况下,至少一个Fc结构域包括不超过十六个氨基酸修饰(例如,不超过一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个、十五个或十六个氨基酸修饰)。

[0227] 在一些实施例中,在本文所述的Fc构建体中具有两个Fc结构域单体的多肽(例如,图1中的多肽102和108;图2中的多肽202和208)可以具有与SEQ ID NO:43、45、47和49中的任何一个的序列至少95%相同(例如,至少97%、99%或99.5%相同)的序列。在某些实施例中,在本文所述的Fc构建体中具有两个Fc结构域单体的多肽可以具有与SEQ ID NO:49的序列至少95%相同(例如,至少97%、99%或99.5%相同)的序列。

[0228] 在一些实施例中,两个Fc结构域单体之间的间隔物可以具有与SEQ ID NO:1-36中的任何一个(例如,SEQ ID NO:17、18、26和27)至少75%相同(例如,75%、77%、79%、81%、83%、85%、87%、89%、91%、93%、95%、97%、99%、99.5%或100%相同)且在本文中进一步描述的序列。

[0229] 如本文使用的,术语“宿主细胞”指包括从其相应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,所述核酸载体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)引入宿主细胞内。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,然后可以将其组合以形成所需的Fc构建体。

[0230] 如本文使用的,术语“药物组合物”指医学或药物制剂,其含有活性成分以及一种或多种赋形剂和稀释剂,以致使活性成分适合于施用方法。本公开内容的药物组合物包括与Fc构建体相容的药学可接受的组分。药物组合物通常为用于静脉内或皮下施用的水性形式。

[0231] 如本文使用的,多肽或Fc构建体的“基本上同质的群体”是组合物(例如,细胞培养基或药物组合物)中至少50%的多肽或Fc构建体具有相同数目的Fc结构域,如通过非还原SDS凝胶电泳或尺寸排阻层析测定的。可以在纯化之前,或者在蛋白A或蛋白G纯化之后,或在仅任何Fab或Fc特异性亲和层析之后,获得多肽或Fc构建体的基本上同质的群体(例如,至少85%、90%或95%同质的群体)。在各种实施例中,组合物中至少55%、60%、65%、70%、75%、80%或85%的多肽或Fc构建体具有相同数目的Fc结构域。在其它实施例中,组合物中至多85%、90%、92%或95%的多肽或Fc构建体具有相同数目的Fc结构域。

[0232] 如本文使用的,术语“药学可接受的载体”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它成分相容并且对接受者无害。在本公开内容中,药学可

接受的载体必须为Fc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)。

[0233] 如本文使用的,“治疗有效量”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状况或病症的患者的量,例如药物剂量。本文还应理解,“治疗有效量”可以解释为给予所需疗效的量,以单个剂量或任何剂量或途径服用,单独服用或与其它治疗剂组合服用。

## 附图说明

[0234] 图1是含有由四种多肽形成的三个Fc结构域的Fc构建体(Fc构建体1、Fc构建体2或Fc构建体3)的图示。第一多肽(102)含有与含突起的Fc结构域单体(106)串联连接的一个Fc结构域单体(104),其在C<sub>H</sub>3-C<sub>H</sub>3界面处含有与野生型Fc结构域单体序列不同的荷电氨基酸。第二多肽(108)含有与含突起的Fc结构域单体(112)串联连接的另一个Fc结构域单体(110),其在C<sub>H</sub>3-C<sub>H</sub>3界面处含有与野生型Fc结构域单体序列不同的荷电氨基酸。第三多肽和第四多肽(分别为114和116)各自含有含空腔的Fc结构域单体。

[0235] 图2是含有由四种多肽形成的三个Fc结构域的Fc构建体(Fc构建体4)的图示。第一多肽(202)含有与含不同荷电氨基酸和突起的Fc结构域单体(206)串联连接的一个Fc结构域单体(204),其在C<sub>H</sub>3-C<sub>H</sub>3界面处含有与野生型Fc结构域单体序列不同的荷电氨基酸。第二多肽(208)含有与含不同荷电氨基酸和突起的Fc结构域单体(212)串联连接的另一个Fc结构域单体(210),其在C<sub>H</sub>3-C<sub>H</sub>3界面处含有与野生型Fc结构域单体序列不同的荷电氨基酸。第三多肽和第四多肽(分别为214和216)各自包含含有不同荷电氨基酸和空腔的Fc结构域单体。

[0236] 图3显示了通过LC-MS/MS鉴定Fc构建体2接头(SGGGSGGSGGGSGGGSGGG(SEQ ID NO:18))中的0-木糖基化Ser。

[0237] 图4显示了如通过LC-MS/MS测定的,具有两个Fc结构域的Fc构建体(图13中所示的Fc构建体)中接头0-木糖基化的丰度。

[0238] 图5显示了如通过CE-SDS测定的,在45°C下贮存后,来自Fc构建体2和4的单体Fc种类的形成。

[0239] 图6显示了如通过CE-SDS测定的,在45°C下贮存两周后,Fc构建体2的蛋白水解产物。

[0240] 图7显示了如通过CE-SDS测定的,在45°C下贮存两周后,Fc构建体4的蛋白水解产物。

[0241] 图8显示了通过具有不同接头长度的Fc构建体2对通过THP-1细胞的IL-8释放的抑制。

[0242] 图9显示了通过具有不同接头长度的Fc构建体2对嗜中性粒细胞中的钙通量的抑制。

[0243] 图10显示了通过在未纯化的培养基中的Fc构建体2和Fc构建体4的非还原SDS-PAGE的大小分布。

[0244] 图11显示了Fc构建体2(“具有静电转向”)和另一个具有三个Fc结构域但在“茎”亚

基中没有静电转向突变的Fc构建体(“无静电转向”)的表达和组装。

[0245] 图12显示了去除C末端赖氨酸以生成Fc构建体2在体外不诱导补体依赖性细胞毒性(CDC)。

[0246] 图13是含有由三种多肽形成的两个Fc结构域的Fc构建体的图示。

[0247] 图14是含有由六种多肽形成的五个Fc结构域的Fc构建体(Fc5X)的图示。

[0248] 图15是含有由六种多肽形成的五个Fc结构域的Fc构建体(Fc5Y)的图示。

[0249] 图16是含有由六种多肽形成的五个Fc结构域的Fc构建体(Fc5Y-反转)的图示。

[0250] 图17是含有由两种多肽形成的三个Fc结构域的Fc构建体的图示。

[0251] 图18显示了在慢性ITP模型中比较IVIG、构建体2和构建体4的血小板水平。

[0252] 图19显示了在慢性ITP模型中比较IVIG、构建体2和构建体4的血小板水平。

[0253] 图20显示了在慢性IPT模型中比较IVIG、构建体2和构建体4的血小板水平。

[0254] 图21显示了通过纯化的Fc构建体4(中间)和纯化的构建体X1(右)的非还原SDS-PAGE的大小分布。分子量标准显示在左侧上。

[0255] 图22显示了构建体4(具有实线的黑色方块)和构建体X1(具有虚线的空心圆圈)在24小时内的药代动力学行为。

[0256] 图23显示了构建体4(具有实线的黑色方块)和构建体X1(具有虚线的空心圆圈)在12小时内的药代动力学行为。

[0257] 图24显示了在胶原抗体诱导的关节炎(CAIA)模型中,在第6天时,以50mg/kg(黑色三角形,实心黑线)、25mg/kg(黑色方块,黑色虚线)、或12.5mg/kg(黑色圆圈,黑色虚线)治疗性给药的构建体4。在第6天时给予等价体积的盐水(灰色交叉(gray exes),灰色实线)作为媒介物对照。显示了每个时间点的平均值和平均值的标准误。

[0258] 图25比较了在胶原抗体诱导的关节炎(CAIA)模型中,在第1天时,以100mg/kg预防性给药的构建体4(AA:黑色方块,实线)或盐水(灰色圆圈,点划线)的功效。在第1天时给予等价体积的盐水(灰色圆圈,点划线)。显示了每个时间点的平均值和平均值的标准误。

[0259] 图26显示了通过由构建体4(SIF)和构建体4-Fc $\gamma$ RIIb+突变体的表达获得的澄清培养基的非还原SDS-PAGE的大小分布。

[0260] 图27显示了与IgG1对照、构建体4(SIF3)和构建体4-Fc $\gamma$ RIIb+突变体(FcfRIIB+)的Fc $\gamma$ 受体的相对结合。

[0261] 图28显示了在单核细胞衍生的树突状细胞(moDC)上的CD86表面表达。

[0262] 图29显示了在单核细胞衍生的树突状细胞(moDC)上的CD86表面表达。

## 具体实施方式

[0263] 包括IgG的Fc结构域的治疗性蛋白质可以用于治疗炎症以及免疫疾病和炎性疾病、癌症和感染。本公开内容的特征在于用于制备含有Fc结构域的Fc构建体(例如,具有2-10个Fc结构域的Fc构建体,例如具有2、3、4、5、6、7、8、9或10个Fc结构域的Fc构建体)的组合物和方法。本文所述的Fc构建体通过掺入显著改善制造结果的结构特征(例如,甘氨酸间隔物)而促进同质药物组合物的制备。

[0264] 相应地,本公开内容的特征在于药物组合物,其包括本文所述的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)的基本上同质的群体。同质性是药物组合物的重要方面,因

为它影响组合物的药代动力学和体内性能。传统上,在药物产品的制造中,存在产品异质性的问题,这可能由几个因素引起,取决于产品如何进行生产。例如,药物产品可以经历随机产物切割、蛋白水解、降解和/或聚集,亚基的脱靶结合和/或无效的蛋白质折叠。具有不同生物合成过程的不同生物或用于生产药物产品的细胞机制也可能引起产品中的异质性。通常,含有所需药物产品的初始培养物需要经过严格的纯化过程,以产生含有药物产品的较少异质性的组合物。

[0265] 在一个方面,本公开内容的特征在于具有结构特征的Fc构建体,所述结构特征显著改善Fc构建体的折叠效率且使亚基的脱靶结合降到最低,因此导致含有这些Fc构建体的药物组合物具有高同质性。具有高度同质性确保了药物组合物的安全性、功效、均匀性和可靠性。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。

[0266] 如本文详细描述的,本公开内容的特征在于含有Fc构建体的基本上同质的组合物,所述Fc构建体都具有相同数目的Fc结构域,以及制备此类基本上同质的组合物的方法。

[0267] 本文所述的Fc构建体包括Fc结构域之间的甘氨酸间隔物。如本领域众所周知的,含有丝氨酸和甘氨酸两者的接头在蛋白质中提供结构灵活性,并且通常用于连接两种多肽。我们通过实验(参见实例4)已观察到,含有丝氨酸和甘氨酸两者的接头经历在接头中的多个丝氨酸处的O-糖基化(例如O-木糖基化),以及在丝氨酸的N末端侧处的蛋白水解。我们旨在优化接头序列和长度,以进一步改善Fc构建体的同质性。我们制备了Fc构建体,其中构建体内的所有接头都是仅具有甘氨酸的甘氨酸间隔物(例如至少12个甘氨酸,例如12-30个甘氨酸;例如20个甘氨酸,SEQ ID NO:27)。通过去除在丝氨酸处的O-糖基化并且还降低构建体的蛋白水解速率,在Fc构建体中具有所有甘氨酸间隔物进一步改善了Fc构建体的同质性(参见实例4)。因此,通过使用Fc构建体中的所有甘氨酸间隔物,我们能够获得Fc构建体的更基本上同质的群体。

[0268] 同质性是Fc构建体组分的结果。例如,在第一种方法(“方法(a)”)中,可以利用仅含有甘氨酸的接头的掺入以连接Fc结构域单体。如我们通过实验观察到的,Fc构建体中的所有甘氨酸间隔物(例如至少12个甘氨酸,例如12-30个甘氨酸;SEQ ID NO:27)不经历O-糖基化,并且与包括丝氨酸和甘氨酸的传统接头相比较,较不易受蛋白水解的影响(参见实例4)。

[0269] 另外,在另一种方法(“方法(b)”)中,通过去除C末端赖氨酸改善了含有本文所述的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)的组合物的同质性。此类C末端赖氨酸残基在跨越许多物种的免疫球蛋白中是高度保守的,并且可以在蛋白质生产过程中被细胞机制完全或部分去除。去除本公开内容的Fc构建体中的C末端赖氨酸改善了所得到的组合物的均匀性,并且实现了更同质的Fc构建体制备(参见实例8)。例如,在本文所述的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)的一些实施例中,去除C末端赖氨酸的密码子,因此生成具有不含C末端赖氨酸残基的多肽的Fc构建体和所得的同质群体。

[0270] 改善含有本文所述的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)的组合物的同质性的进一步方法(“方法(c)”),利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和(ii)具有经改造的空腔和突起的异二聚化选择性模块。我们

已通过实验观察到,例如,参见实例6,当尝试在Fc构建体中形成异二聚体Fc结构域时,具有(i)和(ii)两者进一步改善通过减少Fc结构域单体的不受控制的结合,以及因此不期望的低聚物和多聚体而产生的药物组合物的同质性。在特定例子中,可以产生含有(i)至少一个反向电荷突变和(ii)至少一个经改造的空腔或至少一个经改造的突起的Fc结构域单体,并且将选择性地与另一个含有(i)至少一个反向电荷突变和(ii)至少一个经改造的突起或至少一个经改造的空腔的Fc结构域单体组合,以形成Fc结构域。在另一个例子中,可以产生含有反向电荷突变K370D与经改造的空腔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与经改造的突起S354C和T366W的Fc结构域单体,并且将选择性地组合以形成Fc结构域。

[0271] 如本文详细描述的,含有本公开内容的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)的基本上同质的组合物可以通过以下来实现:使用Fc构建体中的两个Fc结构域单体之间的全甘氨酸间隔物(方法(a)),使用在Fc构建体中缺乏C末端赖氨酸的多肽(方法(b)),和/或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和(ii)具有经改造的空腔和突起的异二聚化选择性模块),以促进通过Fc构建体中的一些Fc结构域单体的异二聚体Fc结构域形成(方法(c))。

[0272] 在一些实施例中,可以通过方法(a)实现含有本文所述的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)的基本上同质的组合物。

[0273] 在一些实施例中,可以通过方法(b)实现含有本文所述的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)的基本上同质的组合物。

[0274] 在一些实施例中,可以通过方法(c)实现含有本文所述的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)的基本上同质的组合物。

[0275] 在一些实施例中,可以通过方法(a)和(b)的组合实现含有本文所述的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)的基本上同质的组合物。

[0276] 在一些实施例中,可以通过方法(a)和(c)的组合实现含有本文所述的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)的基本上同质的组合物。

[0277] 在一些实施例中,可以通过方法(b)和(c)的组合实现含有本文所述的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)的基本上同质的组合物。

[0278] 在一些实施例中,可以通过方法(a)、(b)和(c)的组合实现含有本文所述的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)的基本上同质的组合物。

[0279] 在一些实施例中,为了进一步改善含有本文所述的Fc构建体的药物组合物的同质性,将组合物中的Fc构建体中的一种或多种多肽中的N末端Asp突变为Gln。在包括本文所述的Fc构建体的基本上同质群体的组合物的一些实施例中,组合物中的Fc构建体的每种多肽中的N末端Asp突变为Gln。

[0280] 此外,在本公开内容的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)中,连接Fc结构域单体的接头的长度影响Fc构建体的折叠效率。在一些实施例中,具有至少4、8或12个甘氨酸(例如,4-30、8-30、12-30个甘氨酸;SEQ ID NO:26和27)的接头可以用于连接本公开内容的Fc构建体中的Fc结构域单体。

[0281] I.Fc结构域单体

[0282] Fc结构域单体包括铰链结构域、C<sub>H</sub>2抗体恒定结构域和C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域。Fc结构

域单体可以具有免疫球蛋白抗体同种型 IgG、IgE、IgM、IgA 或 IgD。Fc 结构域单体也可以具有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<sub>H</sub>2 与来自 IgA 的 C<sub>H</sub>3, 或具有来自 IgG1 的铰链和 C<sub>H</sub>2, 但来自 IgG3 的 C<sub>H</sub>3。Fc 结构域单体的二聚体是Fc 结构域 (本文进一步定义), 其可以结合Fc受体, 例如Fc  $\gamma$  RIIIa, 其是位于白细胞的表面上的受体。在本公开内容中, Fc 结构域单体的 C<sub>H</sub>3 抗体恒定结构域可以在 C<sub>H</sub>3-C<sub>H</sub>3 抗体恒定结构域的界面处含有氨基酸取代, 以促进它们彼此的结合。在其它实施例中, Fc 结构域单体包括附着至 N 末端或 C 末端的另外部分, 例如白蛋白结合肽或纯化肽。在本公开内容中, Fc 结构域单体不包含任何类型的抗体可变区, 例如 V<sub>H</sub>、V<sub>L</sub>、互补决定区 (CDR) 或高变区 (HVR)。Fc 结构域单体可以具有不同的来源, 例如人、小鼠或大鼠。

[0283] 在一些实施例中, 本文所述的Fc构建体 (例如, 具有三个Fc结构域的Fc构建体) 中的Fc结构域单体可以具有与野生型Fc结构域单体的序列 (SEQ ID NO:42) 至少95%相同 (例如, 至少97%、99%或99.5%相同) 的序列。在一些实施例中, 本文所述的Fc构建体 (例如, 具有三个Fc结构域的Fc构建体) 中的Fc结构域单体可以包含以下、由以下组成或基本上由以下组成: 其为野生型Fc结构域单体的序列 (SEQ ID NO:42) 的序列, 其具有至多10个 (9、8、7、6、5、4、3、2或1个) 单个氨基酸修饰 (例如取代, 例如保守取代)。在一些实施例中, 本文所述的Fc构建体 (例如, 具有三个Fc结构域的Fc构建体) 中的Fc结构域单体可以具有与SEQ ID NO:44、46、48和50-53中的任何一个的序列至少95%相同 (例如, 至少97%、99%或99.5%相同) 的序列 (参见实例1、表4和5)。在一些实施例中, 本文所述的Fc构建体 (例如, 具有三个Fc结构域的Fc构建体) 中的Fc结构域单体可以具有其为SEQ ID NO:44、46、48和50-53中的任何一个的序列的序列 (参见实例1, 表4和5), 其具有至多10个 (9、8、7、6、5、4、3、2或1个) 单个氨基酸修饰 (例如取代, 例如保守取代)。在某些实施例中, Fc构建体中的Fc结构域单体可以具有与SEQ ID NO:48、52和53中的任何一个的序列至少95%相同 (例如, 至少97%、99%或99.5%相同) 的序列。在某些实施例中, Fc构建体中的Fc结构域单体可以具有其为SEQ ID NO:48、52和53中的任何一个的序列的序列, 其具有至多10个 (9、8、7、6、5、4、3、2或1个) 单个氨基酸修饰 (例如取代, 例如保守取代)。

[0284] SEQ ID NO:42: 野生型人 IgG1Fc 结构域单体氨基酸序列

[0285] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT  
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLT  
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVHEALHNHTQKSLSL  
SPGK

[0286] SEQ ID NO:44

[0287] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT  
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSL  
CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVHEALHNHTQKSLSL  
SPGK

[0288] SEQ ID NO:46

[0289] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT  
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSL

CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL  
SPG

[0290] SEQ ID NO:48

[0291] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT  
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVTLPPSRDELTKNQVSL  
CAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL  
SPG

[0292] SEQ ID NO:50

[0293] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT  
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVYTLPPCRDELTKNQVSLW  
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL  
SPGK

[0294] SEQ ID NO:51

[0295] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT  
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVYTLPPSRDELTKNQVSLT  
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL  
SPGK

[0296] SEQ ID NO:52

[0297] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT  
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVYTLPPSRDELTKNQVSLT  
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL  
SPG

[0298] SEQ ID NO:53

[0299] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT  
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVYTLPPCRDKLTQNQVSLW  
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL  
SPGK

[0300] II.Fc结构域

[0301] 如本文定义的,Fc结构域包括两个Fc结构域单体,其通过C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域之间的相互作用而二聚化。在本公开内容中,Fc结构域不包括抗体的可变区,例如V<sub>H</sub>、V<sub>L</sub>、CDR或HVR。Fc结构域形成与Fc受体结合的最小结构,所述Fc受体例如Fc-γ受体(即Fc γ受体(Fc γ R))、Fc-α受体(即Fcα受体(FcαR))、Fc-ε受体(即Fcε受体(FcεR))和/或新生儿Fc受体(FcRn)。在一些实施例中,本公开内容的Fc结构域结合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)。

[0302] 在本文所述的任何Fc构建体中,氨基酸修饰可以改变对一种或多种Fc受体的结合亲和力。在一些实施例中,氨基酸修饰是S267E/L328F。在一些实施例中,Fc受体是Fc γ RIIb。在一些情况下,本文描述的修饰增加了对Fc γ RIIb受体的亲和力。在一些情况下,S267E/L328F修饰增加了对Fc γ RIIb的结合亲和力。

[0303] III. 二聚化选择性模块

[0304] 在本公开内容中,二聚化选择性模块是Fc结构域单体的部分,其促进两个Fc结构域单体的优先配对以形成Fc结构域。具体地,二聚化选择性模块是Fc结构域单体的C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域的部分,其包括位于两个Fc结构域单体的相互作用的C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域之间的界面处的氨基酸取代。在二聚化选择性模块中,由于为了那些取代选择的氨基酸的相容性,氨基酸取代使得两个C<sub>H</sub>3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它Fc结构域,所述其它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取代。这种类型的氨基酸取代可以使用本领域众所周知的常规分子克隆技术,例如QuikChange<sup>®</sup>诱变进行制备。

[0305] 在一些实施例中,二聚化选择性模块包括C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中的经改造的空腔(在本文中进一步描述)。在其它实施例中,二聚化选择性模块包括C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中的经改造的突起(在本文中进一步描述)。为了选择性地形成Fc结构域,具有相容的二聚化选择性模块的两个Fc结构域单体,例如,含有经改造的空腔的一个C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域和含有经改造的突起的另一个C<sub>H</sub>3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内对。经改造的突起和经改造的空腔是异二聚化选择性模块的例子,其可以在Fc结构域单体的C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中制备,以便促进具有相容的异二聚化选择性模块的两个Fc结构域单体的有利的异二聚化。

[0306] 在其它实施例中,具有带正电荷的氨基酸取代的二聚化选择性模块的Fc结构域单体和具有带负电荷的氨基酸取代的二聚化选择性模块的Fc结构域单体,可以通过荷电氨基酸的有利的静电转向(在本文中进一步描述)选择性地组合,以形成Fc结构域。在一些实施例中,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取代之一:K392D、K392E、D399K、K409D、K409E、K439D和K439E。在一个例子中,含有带正电荷的氨基酸取代例如D356K或E357K的Fc结构域单体、以及含有带负电荷的氨基酸取代例如K370D或K370E的Fc结构域单体,可以通过荷电氨基酸的有利的静电转向选择性地组合,以形成Fc结构域。在另一个例子中,含有E357K的Fc结构域单体和含有K370D的Fc结构域单体,可以通过荷电氨基酸的有利的静电转向选择性地组合,以形成Fc结构域。在一些实施例中,反向电荷氨基酸取代可以用作异二聚化选择性模块,其中含有不同但相容的反向电荷氨基酸取代的两个Fc结构域单体组合,以形成异二聚体Fc结构域。在下文进一步描述的表1和2A中进一步列出了特定的二聚化选择性模块,但不限于此。

[0307] 在其它实施例中,两个Fc结构域单体包括同二聚化选择性模块,其在C<sub>H</sub>3结构域之间的界面处的荷电残基环内的至少两个位置含有相同的反向电荷突变。同二聚体选择性模块是反向电荷氨基酸取代,其促进Fc结构域单体的同二聚化,以形成同二聚体Fc结构域。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。在一个实施例中,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。在另一个实施例中,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。同二聚化选择性模块的例子进一步显示于表2B和2C中。

[0308] 未经修饰的Fc结构域单体可以是天然存在的人Fc结构域单体或WT人Fc结构域单体。Fc结构域单体可以是天然存在的人Fc结构域单体,其包含铰链、CH2结构域和CH3结构域;或其具有至多16个(例如,至多2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16个)氨基酸修饰(例如,单个氨基酸修饰)以适应或促进定向二聚化的变体。在一些情况下,Fc结构域包括至少一个氨基酸修饰,其中所述氨基酸修饰改变以下中的一种或多种:(i)对一种或多种Fc受体的结合亲和力、(ii)效应子功能、(iii)Fc结构域硫酸盐化水平、(iv)半衰期、(v)蛋白酶抗性、(vi)Fc结构域稳定性、和/或(vii)对降解的敏感性。在进一步的实施例中,含有(i)至少一个反向电荷突变和(ii)至少一个经改造的空腔或至少一个经改造的突起的Fc结构域单体,可以与另一个含有(i)至少一个反向电荷突变和(ii)至少一个经改造的突起或至少一个经改造的空腔的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与经改造的空腔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与经改造的突起S354C和T366W的Fc结构域单体,可以选择性地组合以形成Fc结构域。在一些情况下,Fc结构域包括不超过16个氨基酸修饰(例如,CH3结构域中不超过2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16个氨基酸修饰)。

[0309] 通过C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中相容的氨基酸取代促进此类Fc结构域的形成。含有不相容的氨基酸取代的两个二聚化选择性模块,例如两者均含有经改造的空腔、两者均含有经改造的突起、或两者均在C<sub>H</sub>3-C<sub>H</sub>3界面处含有相同的荷电氨基酸,不促进异二聚体Fc结构域的形成。

[0310] 此外,用于促进具有确定的Fc结构域单体的Fc结构域形成的其它方法包括但不限于LUZ-Y方法(美国专利申请公开号W02011034605),其包括亮氨酸拉链的单体α-螺旋与每个Fc结构域单体的C末端融合,以允许异二聚体形成,以及链交换改造的结构域(SEED)主体方法(Davis等人,Protein Eng Des Sel.23:195-202,2010),其生成具有异二聚体Fc结构域单体的Fc结构域,所述异二聚体Fc结构域单体各自包括IgA和IgG C<sub>H</sub>3序列的交替区段。

[0311] IV.经改造的空腔和经改造的突起

[0312] 通过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)描述了经改造的空腔和经改造的突起(或“旋钮进洞(knob-into-hole)”策略)的使用。旋钮和洞相互作用有利于异二聚体的形成,而由于空间碰撞和有利相互作用的缺失,旋钮-旋钮和洞-动相互作用阻碍了同二聚体形成。在美国专利号5,731,168中也公开了“旋钮进洞”技术。

[0313] 在本公开内容中,经改造的空腔和经改造的突起用于制备本文所述的Fc构建体。经改造的空腔是当蛋白质中的原始氨基酸替换为具有较小侧链体积的不同氨基酸时产生的空隙。经改造的突起是当蛋白质中的原始氨基酸替换为具有较大侧链体积的不同氨基酸时产生的突起。具体地,待替换的氨基酸位于Fc结构域单体的C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中,并且涉及两个Fc结构域单体的二聚化。在一些实施例中,产生一个C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中的经改造的空腔,以容纳另一个C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中的经改造的突起,使得两个C<sub>H</sub>3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)(上文描述的)。在其它实施例中,产生一个C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中的经改造的空腔,以更好地容纳另一个C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中的原始氨基酸。在另外其它实施例中,产生一个C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中的经改造的突起,以与另一个C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中的原始氨

基酸形成另外的相互作用。

[0314] 可以通过用含有较小侧链的氨基酸(例如丙氨酸、缬氨酸或苏氨酸)替换含有较大侧链(例如酪氨酸或色氨酸)的氨基酸来构建经改造的空腔。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)含有经改造的空腔,例如C<sub>H</sub>3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经改造的突起。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)含有经改造的突起,例如C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中的T366W突变。在本公开内容中,经改造的空腔和经改造的突起也与C<sub>H</sub>3结构域间二硫键改造组合,以增强异二聚体形成。在一个例子中,含有经改造的空腔Y349C、T366S、L368A和Y407V的Fc结构域单体,可以与另一个含有经改造的突起S354C和T366W的Fc结构域单体选择性地组合,以形成Fc结构域。在另一个例子中,含有经改造的空腔Y349C的Fc结构域单体和含有经改造的突起S354C的Fc结构域单体,可以选择性地组合以形成Fc结构域。与二硫键改造或结构计算(混合HA-TF)组合的其它经改造的空腔和经改造的突起包括但不限于表1。

[0315] 表1

策略	Fc 结构域单体 1 的 CH <sub>3</sub> 抗体恒定结构域	Fc 结构域单体 2 的 CH <sub>3</sub> 抗体恒定结构域	参考文献
[0316]	Y407T	T366Y	US 8,216,805
	Y407A	T366W	US 8,216,805
[0317]	F405A	T394W	US 8,216,805
	Y407T	T366Y	US 8,216,805
	T394S	F405W	US 8,216,805
	T394W:Y407T	T366Y:F405A	US 8,216,805
	T394S:Y407A	T366W:F405W	US 8,216,805
	T366W:T394S	F405W:Y407A	US 8,216,805
	T366S:L368A:Y407V:Y349C	T366W:S354C	Zeidler 等人, <i>J immunol.</i> 163:1246-52,1999
	S364H:F405A	Y349T:T394F	WO2006106905

[0318] 用不同的氨基酸残基替换C<sub>H</sub>3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。可以替换的原始氨基酸残基数目的上限是C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域的界面中残基的总数目,假定仍维持在界面处的充分相互作用。

[0319] V. 静电转向

[0320] 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。

[0321] 在本公开内容中,静电转向用于控制Fc结构域单体的二聚化和Fc构建体的形成。特别地,为了使用静电控制来控制Fc结构域单体的二聚化,构成C<sub>H</sub>3-C<sub>H</sub>3界面的一个或多个氨基酸残基替换为带正电荷或带负电荷的氨基酸残基,使得相互作用变得具有静电有利或不利,取决于引入的具体荷电氨基酸。在一些实施例中,界面中的带正电荷的氨基酸例如赖氨酸、精氨酸或组氨酸,替换为带负电荷的氨基酸例如天冬氨酸或谷氨酸。在其它实施例中,界面中的带负电荷的氨基酸替换为带正电荷的氨基酸。荷电氨基酸可以引入相互作用的C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域之一或两者。通过将荷电氨基酸引入相互作用的C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域,产生二聚化选择性模块(上文进一步描述的),其可以选择性地形成Fc结构域单体的二聚体,如受来源于荷电氨基酸之间的相互作用的静电转向效应控制的。

[0322] 在一些实施例中,为了产生包括反向电荷的二聚化选择性模块,其可以如通过静电转向效应控制的选择性地形成Fc结构域单体的二聚体,可以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。

[0323] Fc结构域单体的异二聚化

[0324] Fc结构域单体的异二聚化可以通过在两个Fc结构域单体中引入不同但相容的突变得到促进,例如包括但不限于表2A中的电荷残基对。在一些实施例中,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取代之一:D356K、D356R、E357K、E357R、K370D、K370E、K392D、K392E、D399K、K409D、K409E、K439D和K439E。在一个例子中,含有带正电荷的氨基酸取代例如D356K或E357K的Fc结构域单体、以及含有带负电荷的氨基酸取代例如K370D或K370E的Fc结构域单体,可以通过荷电氨基酸的有利的静电转向选择性地组合,以形成Fc结构域。在另一个例子中,含有E357K的Fc结构域单体和含有K370D的Fc结构域单体,可以通过荷电氨基酸的有利的静电转向选择性地组合,以形成Fc结构域。

[0325] 例如,在具有三个Fc结构域的Fc构建体中,三个Fc结构域中的两个可以通过两个Fc结构域单体的异二聚化形成,如通过静电转向效应所促进的。“异二聚体Fc结构域”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结构域单体含有不同的反向电荷突变(异二聚化选择性模块)(参见例如,表2A中的突变),其促进这两个Fc结构域单体的有利形成。如图1和2中所示,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-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。

[0326] 表2A

[0327]

<b>Fc 结构域单体 1 的 C<sub>H</sub>3 抗体恒定结构域中的反向 电荷突变</b>	<b>Fc 结构域单体 2 的 C<sub>H</sub>3 抗体恒定结构域中的反向 电荷突变</b>
K409D	D399K

[0328]

<b>Fc 结构域单体 1 的 C<sub>H</sub>3 抗体恒定结构域中的反向 电荷突变</b>	<b>Fc 结构域单体 2 的 C<sub>H</sub>3 抗体恒定结构域中的反向 电荷突变</b>
K409D	D399R
K409E	D399K
K409E	D399R
K392D	D399K
K392D	D399R
K392E	D399K
K392E	D399R
K370D	E357K
K370D	E357R
K370E	E357K
K370E	E357R
K370D	D356K
K370D	D356R
K370E	D356K
K370E	D356R
K409D, K392D	D399K, E356K
K370E, K409D, K439E	E356K, E357K, D399K

[0329] Fc结构域单体的同二聚化

[0330] 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),可以促进Fc结构域单体的同二聚化。在一些实施例中,两个Fc结构域单体包括同二聚体选择性模块,其在C<sub>H</sub>3结构域之间的界面处的荷电残基环内的至少两个位置含有相

同的反向电荷突变。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。可以引入Fc结构域单体内以促进其同二聚化的静电转向突变显示于表2B和2C中,但不限于此。在一个实施例中,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2B),例如K409D/D399K。在另一个实施例中,Fc结构域包括两个Fc结构域单体,每个单体包括四重反向突变体(表2C),例如K409D/D399K/K370D/E357K。

[0331] 例如,在具有三个Fc结构域的Fc构建体中,三个Fc结构域之一可以通过两个Fc结构域单体的同二聚化形成,如通过静电转向效应所促进的。“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2B和表2C中的突变)。如图1和2中所示,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”) (例如,由图1中的Fc结构域单体104和110形成的同二聚体Fc结构域;由图2中的Fc结构域单体204和210形成的同二聚体Fc结构域)。茎同二聚体Fc结构域可以由两个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。

[0332] 表2B

在同二聚体 Fc 结构域中的两个 Fc 结构域单体各自的 $\text{C}_{\text{H}}3$ 抗体恒定结构域中的反向电荷突变	
	K409D/D399K
	K409D/D399R
	K409E/D399K
	K409E/D399R
[0333]	K392D/D399K
	K392D/D399R
	K392E/D399K
	K392E/D399R
	K370D/E357K
	K370D/E357R
	K370E/E357K

[0334]

在同二聚体 Fc 结构域中的两个 Fc 结构域单体各自的 C<sub>H</sub>3 抗体恒定结构域中的反向电荷突变

K370E/E357R

K370D/D356K

K370D/D356R

K370E/D356K

K370E/D356R

[0335]

表2C

[0336]

在同二聚体 Fc 结构域中的两个 Fc 结构域单体各自的 C <sub>H</sub> 3 抗体恒定结构域中的反向电荷突变	在同二聚体 Fc 结构域中的两个 Fc 结构域单体各自的 C <sub>H</sub> 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
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

在同二聚体 Fc 结构域中的两个 Fc 结构域单体各自的 C <sub>H</sub> 3 抗体恒定结构域中的反向电荷突变	在同二聚体 Fc 结构域中的两个 Fc 结构域单体各自的 C <sub>H</sub> 3 抗体恒定结构域中的反向电荷突变
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

[0337]

## [0338] VI. 接头

[0339] 在本公开内容中,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。在一些实施例中,接头是至少两个Fc结构域单体之间的键合或连接,对于其接头将第一Fc结构域单体的C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域的C末端连接至第二Fc结构域单体的铰链结构域的N末端,使得两个Fc结构域单体以串联形式彼此连接。在其它实施例中,接头是Fc结构域单体和与其附着的任何其它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<sub>H</sub>3抗体恒定结构域的C末端附着至白蛋白结合肽的N末端。

[0340] 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,其中编码以串联形式的两种蛋白质的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。

[0341] 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。

[0342] 在接头(除了上述肽键之外)由化学反应制成的情况下,化学官能团,例如胺、羧酸、酯、叠氮化物或本领域常用的其它官能团,可以分别合成地附着至一种蛋白质的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。

### [0343] 间隔物

[0344] 在本公开内容中,两个Fc结构域单体之间的接头可以是包括3-200个氨基酸(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)(例如,3-150、3-100、3-60、3-50、3-40、3-30、3-20、3-10、3-8、3-5、4-30、5-30、6-30、8-30、10-20、10-30、12-30、14-30、20-30、15-25、15-30、18-22和20-30个氨基酸)的氨基酸间隔物。在一些实施例中,两个Fc结构域单体之间的接头是含有至少12个氨基酸,例如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)(例如,3-150、3-100、3-60、3-50、3-40、3-30、3-20、3-10、3-8、3-5、4-30、5-30、6-30、8-30、10-20、10-30、12-30、14-30、20-30、15-25、15-30、18-22和20-30个氨基酸)的氨基酸间隔物。在一些实施例中,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(例如甘氨酸和丝氨酸)的肽接头。在某些实施例中,间隔物可含有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。在某些实施例中,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)。在某些其它实施例中,间隔物可以含有3至12个氨基酸,包括GGS的基序,例如GGS、GGSGGS(SEQ ID NO:9)、GGSGGSGGS(SEQ ID NO:10)和GGSGGSGGSGGS(SEQ ID NO:11)。在另外其它实施例中,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GGSGGGSG(SEQ ID NO:12)、GGSGGGSGGGSG(SEQ ID NO:13)、GGSGGGSGGGSGGGSG(SEQ ID NO:14)或GGSGGGSGGGSGGGSG(SEQ ID NO:15)。在其它实施例中,间隔物可以含有GGGGS(SEQ ID NO:1)的基序,例如GGGGSGGGGS(SEQ ID NO:16)或GGGGSGGGSGGGGS(SEQ ID NO:17)。在某些实施例中,间隔物是SGGGSGGGSGGGSGGG(SEQ ID NO:18)。

[0345] 在一些实施例中,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、190-200或20个甘氨酸残基)。在某些实施例中,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)。在一些实施例中,仅含有甘氨酸残基的间隔物可以不是糖基化的(例如,0联糖基化,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,可以具有降低水平的糖基化(例如,降低水平的0-糖基化)(例如,降低水平的由聚糖如木糖、甘露糖、唾液酸、岩藻糖(Fuc)和/或半乳糖(Gal)(例如,木糖)的0-糖基化)(参见实例4)。

[0346] 在一些实施例中,仅含有甘氨酸残基的间隔物可以不是0-糖基化的(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,可以具有降低水平的0-糖基化水平(例如,降低水平的0-木糖基化)。

[0347] 在一些实施例中,仅含有甘氨酸残基的间隔物可能不经历蛋白水解,或与例如含有一个或多个丝氨酸残基的间隔物(例如,SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG (SEQ ID NO:18))相比,可以具有降低速率的蛋白水解(参见实例4)。

[0348] 在某些实施例中,间隔物可以含有GGGG (SEQ ID NO:19) 的基序,例如,GGGGGGGG (SEQ ID NO:20)、GGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:21)、GGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:22)、或GGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:23)。在某些实施例中,间隔物可以含有GGGGG (SEQ ID NO:24) 的基序,例如,GGGGGGGGGG (SEQ ID NO:25)、或GGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:26)。在某些实施例中,间隔物是GGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:27)。

[0349] 在其它实施例中,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)、GGSAGGSGSGSSGGASGTGTAGGTGSGSGTGSG (SEQ ID NO:32)、AAANSSIDLISVPVDSR (SEQ ID NO:33)、或GGSGGGSEGGSEGGSEGGSEGGSEGGSGGGS (SEQ ID NO:34)。

[0350] 在本公开内容的某些实施例中,12或20氨基酸肽间隔物用于连接以串联形式的两个Fc结构域单体(例如,图1中的多肽102和108;图2中的多肽202和208),分别由序列GGGSGGGSGGG (SEQ ID NO:35) 和SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG (SEQ ID NO:18) 组成的12和20氨基酸肽间隔物。在其它实施例中,可以使用由序列GGSGGGSGGGSGGGSGGS (SEQ ID NO:36) 组成的18氨基酸肽间隔物。

[0351] 在一些实施例中,两个Fc结构域单体之间的间隔物包含序列、由序列组成或基本上由序列组成,所述序列与上述SEQ ID NO:1-36中的任何一个的序列至少75%相同(例如,至少77%、79%、81%、83%、85%、87%、89%、91%、93%、95%、97%、99%或99.5%相同)。在某些实施例中,两个Fc结构域单体之间的间隔物包含序列、由序列组成或基本上由序列组成,所述序列与SEQ ID NO:17、18、26和27中的任何一个的序列至少80%相同(例如,至少82%、85%、87%、90%、92%、95%、97%、99%或99.5%相同)。在某些实施例中,两个Fc结构域单体之间的间隔物包含序列、由序列组成或基本上由序列组成,所述序列与SEQ ID NO:18或27的序列至少80%相同(例如,至少82%、85%、87%、90%、92%、95%、97%、99%或99.5%相同)。在某些实施例中,两个Fc结构域单体之间的间隔物包含上述SEQ ID NO:1-

36中的任何一个的序列、由其组成或基本上由其组成。

[0352] VII. 血清蛋白结合肽

[0353] 与血清蛋白肽结合可以改善蛋白质药物的药代动力学,并且特别地,本文描述的Fc构建体可以与血清蛋白结合肽融合。

[0354] 作为一个例子,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。在一个实施例中,白蛋白结合肽包括序列D1CLPRWGCLW (SEQ ID NO:37)。在一些实施例中,白蛋白结合肽具有与SEQ ID NO:37的序列至少80%相同(例如,80%、90%或100%相同)的序列。

[0355] 在本公开内容中,白蛋白结合肽可以附着至Fc构建体中某些多肽的N或C末端。在一个实施例中,白蛋白结合肽可以附着至构建体1-4中的一种或多种多肽的C末端(图1和2)。在另一个实施例中,白蛋白结合肽可以融合至编码在Fc构建体1-4中以串联连接的两个Fc结构域单体的多肽(例如,图1中的多肽102和108以及图2中的多肽202和208)的C末端。在另外一个实施例中,白蛋白结合肽可以附着至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,其连接至编码以串联连接的两个Fc结构域单体的多肽中的第二Fc结构域单体。白蛋白结合肽可以与Fc构建体遗传融合或通过化学手段例如化学缀合与Fc构建体附着。如果需要,则可以在Fc构建体和白蛋白结合肽之间插入间隔物。不受理论束缚,预期在本公开内容的Fc构建体中包括白蛋白结合肽可以通过其与血清白蛋白的结合导致治疗性蛋白质的延长保留。

[0356] VIII. Fc构建体

[0357] 一般而言,本公开内容的特征在于具有Fc结构域的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)。对于Fc受体,例如Fc  $\gamma$  RIIIa,这些可以具有比单个野生型Fc结构域更高的结合亲和力和/或亲合力。本公开内容公开了改造在两个相互作用的C<sub>H</sub>3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,因此阻止不需要的多聚体或聚集体的形成。Fc构建体包括偶数数目的Fc结构域单体,其中每对Fc结构域单体形成Fc结构域。Fc构建体最低限度包括由两个Fc结构域单体的二聚体形成的一个功能性Fc结构域。在一些实施例中,本文所述的Fc构建体不包括抗原识别区,例如可变结构域(例如,V<sub>H</sub>、V<sub>L</sub>、高变区(HVR))或互补决定区(CDR)。在一些实施例中,本文所述的Fc构建体包括抗原识别区,例如可变结构域(例如,V<sub>H</sub>、V<sub>L</sub>、HVR)或CDR。

[0358] 含有三个Fc结构域的Fc构建体可以由四种多肽形成(图1和2)。第一多肽和第二多肽(例如,图1中的多肽102和108;图2中的多肽202和208)可以相同或不同,如第三多肽和第四多肽(例如,图1中的多肽114和116;图2中的多肽214和216)一样。在图1中,第一多肽和第二多肽均编码以串联连接的两个Fc结构域单体(例如,Fc结构域单体104、106、110和112),其中一个Fc结构域单体含有在C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中的荷电氨基酸取代(例如,Fc结构域单体104和110),而另一个Fc结构域单体含有在C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中的突起(例如,Fc结构域单体106和112)。第三多肽和第四多肽均编码具有空腔的Fc结构域单体(例如,Fc结构域单体114和116)。可以通过组合Fc结构域单体104和110来形成茎同二聚体Fc结构域,所述Fc结构域单体各自在其C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中含有相同的反向电荷突变(例如,Fc结构域单体104和110各自含有D399K和K409D)。可以通过组合Fc结构域单体106和114(例如,Fc结构域单体106含有经改造的突起S354C和T366W,并且Fc结构域单体114含有经改

造的空腔Y349C、T366S、L368A和Y409V),来形成第一分支异二聚体Fc结构域。可以通过组合Fc结构域单体112和116(例如,Fc结构域单体112含有经改造的突起S354C和T366W,并且Fc结构域单体116含有经改造的空腔Y349C、T366S、L368A和Y409V),来形成第二异二聚体Fc结构域。

[0359] 在图2中,第一多肽和第二多肽均编码以串联形式通过接头连接的两个Fc结构域单体(例如,Fc结构域单体204、206、210和212),其中一个Fc结构域单体含有在C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中的荷电氨基酸取代(例如,Fc结构域单体204和210),而另一个Fc结构域单体含有在C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中的突起和荷电氨基酸取代(例如,Fc结构域单体206和212)。第三多肽和第四多肽均编码具有空腔和荷电氨基酸取代的Fc结构域单体(例如,Fc结构域单体214和216)。可以通过组合Fc结构域单体204和210来形成茎同二聚体Fc结构域,所述Fc结构域单体各自在其C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中含有相同的反向电荷突变(例如,Fc结构域单体204和210各自含有D399K和K409D)。可以通过组合Fc结构域单体206和214(例如,Fc结构域单体206含有经改造的突起S354C和T366W以及反向电荷突变E357K,并且Fc结构域单体214含有经改造的空腔Y349C、T366S、L368A和Y409V以及反向电荷突变K370D),来形成第一分支异二聚体Fc结构域。可以通过组合Fc结构域单体212和216(例如,Fc结构域单体212含有经改造的突起S354C和T366W以及反向电荷突变E357K,并且Fc结构域单体216包含经改造的空腔Y349C、T366S、L368A和Y409V以及反向电荷突变K370D),来形成第二分支异二聚体Fc结构域。

[0360] 在进一步的实施例中,含有(i)至少一个反向电荷突变和(ii)至少一个经改造的空腔或至少一个经改造的突起的Fc结构域单体,可以与另一个含有(i)至少一个反向电荷突变和(ii)至少一个经改造的突起或至少一个经改造的空腔的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与经改造的空腔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与经改造的突起S354C和T366W的Fc结构域单体,可以选择性地组合以形成Fc结构域。

[0361] 在一些实施例中,在包括以下的Fc构建体中:a) 具有式A-L-B的第一多肽;其中i) A包括第一Fc结构域单体;ii) L是接头;且iii) B包括第二Fc结构域单体;b) 具有式A'-L'-B'的第二多肽;其中i) A'包括第三Fc结构域单体;ii) L'是接头;且iii) B'包括第四Fc结构域单体;c) 包括第五Fc结构域单体的第三多肽;以及d) 包括第六Fc结构域单体的第四多肽;其中B和B'组合以形成第一Fc结构域,A和第五Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,并且A'和第六Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域,可以掺入Fc构建体中的Fc结构域单体内的某些氨基酸突变的例子显示于表3A-3D中。在一些实施例中,Fc构建体中的第一多肽、第二多肽、第三多肽和第四多肽各自缺乏C端赖氨酸。在一些实施例中,Fc构建体中的第一多肽、第二多肽、第三多肽和第四多肽各自中的N末端Asp突变为Gln。在一些实施例中,L和L'各自包含序列GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:27)、由其组成或基本上由其组成。

[0362] 表3A

<b>[0363]</b> <b>Fc 结构域单体</b>	<b>氨基酸突变</b> <b>(每列代表具有三个 Fc 结构域的 Fc 构建体中的一组突变)</b>
----------------------------------	--

Fc 结 构域 单体	氨基酸突变 (每列代表具有三个 Fc 结构域的 Fc 构建体中的一组突变)																	
	经改造 的突起		反向的 电荷突 变															
A 和 A'	S35	S35	S35	S35	S35	S35	S35	S35	S35	S35	S35	S35	S35	S35	S35	S35	S35	S35
	4C	4C	4C	4C	4C	4C	4C	4C	4C	4C	4C	4C	4C	4C	4C	4C	4C	4C
L 和 L'	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36
	6W	6W	6W	6W	6W	6W	6W	6W	6W	6W	6W	6W	6W	6W	6W	6W	6W	6W
[0364]	E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35
	7K	7R	7K	7K	7R	7R	7K	7R	7K	7R	7K	7K	7R	7R	7K	7R	7K	7R
B 和 B'	D39	D39	D39	D39	D39	D39	D39	D39	D39	D39	D39	D39	D39	D39	D39	D39	D39	D39
	9K	9K	9R	9K	9R	9K	9R	9R	9K	9K	9K	9R	9K	9R	9K	9R	9K	9R
第 5Fc 结 构 域 单 体 和 第 6Fc 结 构 域 单 体	K40	K40	K40	K40	K40	K40	K40	K40	K40	K40	K40	K40	K40	K40	K40	K40	K40	K40
	9D	9D	9D	9E	9D	9E	9E	9E	9D	9D	9D	9D	9E	9D	9E	9E	9D	9E
域单 体 Fc 结 构域 单体	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34
	9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C
[0365]	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36
	6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S
域单 体 Fc 结 构域 单体	L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36
	8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A
域单 体 Fc 结 构域 单体	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40
	7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V
域单 体 Fc 结 构域 单体	K37	K37	K37	K37	K37	K37	K37	K37	K37	K37	K37	K37	K37	K37	K37	K37	K37	K37
	0D	0D	0D	0D	0D	0D	0D	0D	0D	0D	0D	0D	0D	0D	0D	0D	0D	0D

[0365] 表3B

Fc 结构域单体		氨基酸突变 (每列代表具有三个 Fc 结构域的 Fc 构建体中的一组突变)																		
		S35		S35		S35		S35		S35		S35		S35		S35		S35		
A 和 A'	经改造的突起	S35	S35	S35	S35	S35	S35	S35	S35	S35	S35	S35	S35	S35	S35	S35	S35	S35	S35	
		4C	4C	4C	4C	4C	4C	4C	4C	4C	4C	4C	4C	4C	4C	4C	4C	4C	4C	
[0366]	L 和 L'	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	
		6W	6W	6W	6W	6W	6W	6W	6W	6W	6W	6W	6W	6W	6W	6W	6W	6W	6W	
B 和 B'	反向的电荷突变	K37	K37	K37	K37	K37	K37	K37	K37	K37	K37	K37	K37	K37	K37	K37	K37	K37	K37	
		0D	0D	0D	0D	0D	0D	0D	0D	0D	0E									
GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG(SEQ ID NO: 27)																				
[0367]	第 5Fc 结构域单体和第 6Fc 结构域单体	D39	D39	D39	D39	D39	D39	D39	D39	D39	D39	D39	D39	D39	D39	D39	D39	D39	D39	
		9K	9K	9R	9K	9R	9K	9R	9R	9K	9R									
[0367]	域单体 Fc 结构域单体	K40	K40	K40	K40	K40	K40	K40	K40	K40	K40	K40	K40	K40	K40	K40	K40	K40	K40	
		9D	9D	9D	9E	9D	9E	9E	9D	9D	9D	9D	9D	9E	9D	9E	9D	9E	9E	
Y34		Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	
9C		9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C	
T36		T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	
6S		6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S	
L36		L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36	
8A		8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A	
Y40		Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	
7V		7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V	
E35		E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35	
7K		7R	7K	7K	7K	7R	7R	7K	7R											

[0367] 表3C

Fc 结构域单体		氨基酸突变 (每列代表具有三个 Fc 结构域的 Fc 构建体中的一组突变)																		
A 和 A'	经改造的空腔	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	
		9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C	
		T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	
		6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S	
		L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36	
		8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A	
		Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	
	反向的电荷突变	7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V	
		E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35	
		7K	7R	7K	7K	7R	7R	7K	7R											
[0368]	L 和 L'	GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG(SEQ ID NO: 27)																		
	B 和 B'	反向的电荷突变	D39																	
第 5Fc 结构域单体和第 6Fc 结构域单体 Fc 结构域单体			9K	9K	9R	9K	9R	9K	9R	9R	9K	9R	9K	9R	9K	9R	9K	9R	9R	
			K40																	
			9D	9D	9D	9E	9D	9E	9E	9E	9D	9D	9D	9E	9D	9E	9E	9E	9E	
			S354																	
			C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	4C	
			T36																	
			6W																	
			K37																	
			0D	0E																

[0369] 表3D

Fc 结构域单体		氨基酸突变 (每列代表具有三个 Fc 结构域的 Fc 构建体中的一组突变)																	
		Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34	Y34
A 和 A'	经改造的空腔	9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C	9C
		T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36
		6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S	6S
		L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36	L36
		8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A	8A
		Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40	Y40
		7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V	7V
[0370]	L 和 L'	K37	K37	K37	K37	K37	K37	K37	K37	K37	K37	K37	K37	K37	K37	K37	K37	K37	K37
		0D	0D	0D	0D	0D	0D	0D	0D	0D	0E								
B 和 B'	反向的电荷突变	D39	D39	D39	D39	D39	D39	D39	D39	D39	D39	D39	D39	D39	D39	D39	D39	D39	D39
		9K	9K	9R	9K	9R	9K	9R	9R	9K	9R								
		K40	K40	K40	K40	K40	K40	K40	K40	K40	K40	K40	K40	K40	K40	K40	K40	K40	K40
		9D	9D	9D	9E	9D	9E	9E	9E	9D	9D	9D	9D	9E	9D	9E	9E	9D	9E
		S354	S354	S354	S354	S354	S354	S354	S354	S354	S354	S354	S354	S354	S354	S354	S354	S354	S354
		C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	4C
		T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36	T36
[0371]	第 5Fc 结构域单体和第 6Fc 结构域单体 Fc 结构域单体	6W	6W	6W	6W	6W	6W	6W	6W	6W	6W	6W	6W	6W	6W	6W	6W	6W	6W
		E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35	E35
		7K	7R	7K	7K	7R	7R	7K	7R										

在一些实施例中, Fc构建体含有由三种多肽形成的两个Fc结构域。第一多肽含有以通过接头(例如甘氨酸间隔物; SEQ ID NO:26和27)连接的串联系列连接的两个Fc结构域单体, 并且第二多肽和第三多肽含有一个Fc结构域单体。第二多肽和第三多肽可以是相同的多肽或可以是不同的多肽。图13描绘了此类Fc构建体的例子。第一多肽(1302)含有通过接头(例如甘氨酸间隔物; SEQ ID NO:26和27)以串联系列连接的两个Fc结构域单体(1304

和1306)。Fc结构域单体1304和1306均含有在C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中的经改造的突起。第二多肽和第三多肽(1308和1310)各自含有一个Fc结构域单体,其在C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中具有经改造的空腔。第一多肽中的一个Fc结构域单体(1304)与第二多肽(1308)形成第一异二聚体Fc结构域,而第一多肽中的另一个Fc结构域单体(1306)与第三多肽(1310)形成第二异二聚体Fc结构域。第二多肽和第三多肽彼此不附着或连接。经改造的突起进入空腔内C<sub>H</sub>3-C<sub>H</sub>3界面有利于Fc结构域单体的异二聚体的形成,并且阻止不需要的多聚体的不受控制的形成。在一些实施例中,每个Fc结构域单体还可以含有反向电荷突变以促进异二聚化。例如,具有经改造的突起和反向电荷突变(例如,E357K)的Fc结构域单体1304可以有利地与具有经改造的空腔和反向电荷突变(例如,K370D)的Fc结构域单体1308形成异二聚体Fc结构域。

[0372] 在另外其它实施例中,Fc构建体可以含有由六种多肽形成的五个Fc结构域。图14和15中描绘了两个例子。虽然这些描绘的Fc构建体由六种多肽组成,但是四种多肽可以由相同的核酸编码,并且剩余的两种多肽也可以由相同的核酸编码。因此,这些Fc构建体可以通过在合适的宿主细胞中表达两种核酸来产生。

[0373] 图14是含有由六种多肽形成的五个Fc结构域的Fc构建体的图示。第一多肽和第二多肽(1402和1410)各自含有通过接头(例如甘氨酸间隔物;SEQ ID NO:26和27),以串联连接的三个Fc结构域单体(分别为1404、1406、1408和1412、1414、1416)。具体地,在多肽1402或1410中,第一含突起的Fc结构域单体(1404或1412)连接至第二Fc结构域单体(1406或1414),所述第二Fc结构域单体在C<sub>H</sub>3-C<sub>H</sub>3界面处含有与野生型序列不同的荷电氨基酸,所述第二Fc结构域单体连接至第三含突起的Fc结构域单体(1408或1416)。Fc结构域单体1406和1414可以各自含有相同的反向电荷突变(例如,D399K/K409D),其促进同二聚体Fc结构域的形成。第三多肽直到第六多肽(1418、1420、1422和1424)各自含有含空腔的Fc结构域单体,并且分别与Fc结构域单体1404、1408、1412和1416各自形成异二聚体Fc结构域。在一些实施例中,Fc结构域单体1404、1408、1412、1416、1418、1420、1422和1424各自还可以含有反向电荷突变,以促进异二聚化。例如,具有经改造的突起和反向电荷突变(例如,E357K)的Fc结构域单体1408可以有利地与具有经改造的空腔和反向电荷突变(例如,K370D)的Fc结构域单体1420形成异二聚体Fc结构域。

[0374] 图15是含有由六种多肽形成的五个Fc结构域的Fc构建体的图示。第一多肽和第二多肽(1502和1510)各自含有通过接头(例如甘氨酸间隔物;SEQ ID NO:26和27),以串联连接的三个Fc结构域单体(分别为1504、1506、1508和1512、1514、1516)。具体地,在多肽1502或1510中,第一含突起的Fc结构域单体(1504或1512)连接至第二含突起的Fc结构域单体(1506或1514),所述第二含突起的Fc结构域单体连接至在C<sub>H</sub>3-C<sub>H</sub>3界面处含有与野生型序列不同的荷电氨基酸的第三Fc结构域单体(1508或1516)。Fc结构域单体1508和1516可以各自含有相同的反向电荷突变(例如,D399K/K409D),其促进同二聚体Fc结构域的形成。第三多肽直到第六多肽(1518、1520、1522和1524)各自含有含空腔的Fc结构域单体,并且分别与Fc结构域单体1504、1506、1512和1514各自形成异二聚体Fc结构域。在一些实施例中,Fc结构域单体1504、1506、1512、1514、1518、1520、1522和1524各自还可以含有反向电荷突变,以促进异二聚化。例如,具有经改造的突起和反向电荷突变(例如,E357K)的Fc结构域单体1504可以有利地与具有经改造的空腔和反向电荷突变(例如,K370D)的Fc结构域单体1518

形成异二聚体Fc结构域。

[0375] 图16是含有由六种多肽形成的五个Fc结构域的另一种Fc构建体的图示。第一多肽和第二多肽(1602和1610)各自含有通过接头(例如甘氨酸间隔物;SEQ ID NO:26和27),以串联方式连接的三个Fc结构域单体(分别为1604、1606、1608和1612、1614、1616)。具体地,在多肽1602或1610中,在C<sub>H</sub>3-C<sub>H</sub>3界面处含有与野生型序列不同的荷电氨基酸的第一Fc结构域单体(1604或1612)连接至第二含突起的Fc结构域单体(1606或1614),其连接至第三含突起的Fc结构域单体(1608或1616)。Fc结构域单体1604和1612可以各自含有相同的反向电荷突变(例如,D399K/K409D),其促进同二聚体Fc结构域的形成。第三多肽直到第六多肽(1618、1620、1622和1624)各自含有含空腔的Fc结构域单体,并且分别与Fc结构域单体1606、1608、1614、1616和1618各自形成异二聚体Fc结构域。在一些实施例中,Fc结构域单体1606、1608、1614、1616、1618、1620、1622和1624各自还可以含有反向电荷突变,以促进异二聚化。例如,具有经改造的突起和反向电荷突变(例如,E357K)的Fc结构域单体1608可以有利地与具有经改造的空腔和反向电荷突变(例如,K370D)的Fc结构域单体1620形成异二聚体Fc结构域。

[0376] 在另一个实施例中,含有两个或更多个Fc结构域的Fc构建体可以由具有相同一级序列的两种多肽形成。此类构建体可以由宿主细胞中单一多肽序列的表达形成。图17中描绘了一个例子。在该例子中,单个核酸足以编码含有三个Fc结构域的Fc构建体。通过包括足够长度和柔性的柔性接头,允许其为相同多肽的部分的两个Fc结构域单体形成异二聚体Fc结构域。该相同多肽还含有通过柔性接头(例如甘氨酸间隔物;SEQ ID NO:26和27)连接的第三Fc结构域单体。该第三Fc结构域单体(1708)能够连接至另一个Fc结构域单体(1716),以形成同二聚体Fc结构域并产生图17中描绘的Y形Fc构建体。可以通过使用二聚化选择性模块来控制Fc结构域的形成,如图17中所示。在一些实施例中,Fc结构域单体1704、1706、1712和1714各自还可以含有反向电荷突变,以促进异二聚化。例如,具有经改造的突起和反向电荷突变(例如,E357K)的Fc结构域单体1704可以有利地与具有经改造的空腔和反向电荷突变(例如,K370D)的Fc结构域单体1706形成异二聚体Fc结构域。

[0377] 在一些实施例中,Fc构建体(例如,图1中的Fc构建体1-3;图2中的Fc构建体4)中的一种或多种Fc多肽缺乏C端赖氨酸残基。在一些实施例中,Fc构建体中的所有Fc多肽都缺乏C端赖氨酸残基。在一些实施例中,Fc构建体中的一种或多种Fc多肽中C末端赖氨酸的不存在可以改善Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)群体的同质性,例如,基本上是同质的具有三个Fc结构域的Fc构建体群体(参见实例8)。在一个例子中,可以去除具有SEQ ID NO:43和44中的任何一个的序列的Fc多肽中的C末端赖氨酸残基(参见实例1,表6),以生成不含有C末端赖氨酸残基的相应Fc多肽。

[0378] 在一些实施例中,Fc构建体中的一种或多种Fc多肽包括S267E/L328F突变。在一些情况下,Fc构建体是Fc构建体4,并且构建体包括S267E/L328F突变。该突变增加Fc构建体对Fc $\gamma$  RIIb的结合亲和力。

[0379] 在一些实施例中,本文所述的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)中的Fc结构域单体可以具有与野生型Fc结构域单体的序列(例如,SEQ ID NO:42)至少95%相同(例如,至少97%、99%或99.5%相同)的序列。在一些实施例中,本文所述的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)中的Fc结构域单体可以具有与SEQ ID NO:44、46、48和

50-53中的任何一个的序列至少95%相同(例如,至少97%、99%或99.5%相同)的序列。在某些实施例中,Fc构建体中的Fc结构域单体可以具有与SEQ ID NO:48、52和53的序列至少95%相同(例如,至少97%、99%或99.5%相同)的序列。

[0380] 在一些实施例中,在本文所述的Fc构建体中具有两个Fc结构域单体的多肽(例如,图1中的多肽102和108;图2中的多肽202和208)可以包含序列、由序列组成或基本上由序列组成,所述序列与SEQ ID NO:43、45、47和49中的任何一个的序列至少95%相同(例如,至少97%、99%或99.5%相同)(参见实例1,表6)。在某些实施例中,在本文所述的Fc构建体中具有两个Fc结构域单体的多肽可以包含序列、由序列组成或基本上由序列组成,所述序列与SEQ ID NO:49的序列至少95%相同(例如,至少97%、99%或99.5%相同)。在一些实施例中,在本文所述的Fc构建体中具有两个Fc结构域单体的多肽(例如,图1中的多肽102和108;图2中的多肽202和208)中的氨基酸突变仅在Fc结构域单体(例如,图1中的Fc结构域单体104、106、110和112;图2中的Fc结构域单体204、206、210和212)中发生,并且不在间隔物中发生。例如,在表8中所示的多肽中,可以在Fc结构域单体中制备另外的氨基酸突变,所述Fc结构域单体包含SEQ ID NO:50-53的序列、由其组成或基本上由其组成,而具有SEQ ID NO:18、26和27的序列的间隔物不变。

[0381] 在一些实施例中,本文所述的Fc构建体中的第一多肽、第二多肽、第三多肽和第四多肽中的一种或多种(例如,图1中的多肽102、108、114和116;图2中的202、208、214和216)中的N末端Asp可以突变为Gln。在一些实施例中,本文所述的Fc构建体中的第一多肽、第二多肽、第三多肽和第四多肽各自中的N末端Asp突变为Gln。在其它实施例中,本文所述的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)可以包括具有N末端Asp突变为Gln的一个或多个Fc结构域单体。在一些实施例中,本文所述的Fc构建体中的第一多肽、第二多肽、第三多肽和第四多肽中的一种或多种中的N末端Asp至Gln的突变可以改善Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)群体,例如基本上同质的具有三个Fc结构域的Fc构建体群体的同质性。例如,表4显示了在具有三个Fc结构域的Fc构建体中具有N末端Asp突变为Gln的第一多肽、第二多肽、第三多肽和第四多肽的氨基酸序列。

[0382] 表4

[0383]

在所有四种多肽中，具有 N 末端 Asp 突变为 Gln 的 Fc 构建体	
第一多肽 和第二多肽	QKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPCRDELTQNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGGGGGGGGGGGGGGGGGG GDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTQNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 54)
	QKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVCTLPPSRDELTQNQVSLCAVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGVFSCS MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 55)
在所有四种多肽中，具有 N 末端 Asp 突变为 Gln 的 Fc 构建体	
第一多肽 和第二多肽	QKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPCRDELTQNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGGGGGGGGGGGGGGGG GDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTQNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 56)

[0384]	<p>第三多肽 和第四多肽</p> <p>QKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 57)</p>
	<p>在所有四种多肽中，具有 N 末端 Asp 突变为 Gln 的 Fc 构建体</p>
<p>第一多肽 和第二多肽</p> <p>QKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGGDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQOPEN NYKTPPVVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 58)</p>	
<p>第三多肽 和第四多肽</p> <p>QKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 59)</p>	
<p>在所有四种多肽中，具有 N 末端 Asp 突变为 Gln 的 Fc 构建体</p>	

[0385]	第一多肽 和第二多肽	<p>QKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV      VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV      SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR      EPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG      QPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGVNFSCS      VMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGGGGG      GGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC      VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR      VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ      PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN      GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGVNFSC      SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 60)</p>
	第三多肽 和第四多肽	<p>QKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV      VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV      SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR      EPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQ      PENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGVNFSCS      MHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 59)</p>

[0386] IX. 宿主细胞和蛋白质的产生

[0387] 在本公开内容中,宿主细胞指包括从其相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。核酸可以包括在核酸载体中,所述核酸载体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)引入宿主细胞内。宿主细胞可以具有哺乳动物、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-DXB11CHO-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。

[0388] 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、多腺昔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;第2版2004年版本(2004年7月20日);Vladimir Voynov和Justin A.Caravella(编辑) Therapeutic Proteins:Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology) HumanaPress;第2版2012年版本(2012年6月28日)。

[0389] X. 纯化

[0390] Fc构建体可以通过蛋白质纯化领域中已知的任何方法进行纯化,例如,通过层析(例如,离子交换层析、亲和(例如蛋白A亲和)层析和尺寸排阻柱层析)、离心、差异溶解度、或通过用于蛋白质纯化的任何其它标准技术。例如,可以通过适当选择且组合亲和柱,例如蛋白A柱与层析柱、过滤、超滤、盐析和透析程序,来分离且纯化Fc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))。

[0391] 在一些情况下,Fc构建体可以与一种或多种纯化肽缀合,以促进Fc构建体从例如全细胞裂解产物混合物中的纯化和分离。在一些实施例中,纯化肽结合对于纯化肽具有特异性亲和力的另一部分。在一些实施例中,将与纯化肽特异性结合的此类部分附着至固体支持物,例如基质、树脂或琼脂糖珠。可以与Fc构建体连接的纯化肽的例子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))以具有微摩尔亲和力结合镍官能化的琼脂糖亲和柱。在一些实施例中,FLAG肽包括序列DYKDDDDK (SEQ ID NO:39)。在一些实施例中,FLAG肽包括以串联系列的序列DYKDDDDK的整数倍,例如3xDYKDDDDK。在一些实施例中,myc肽包括序列EQKLISEEDL (SEQ ID NO:40)。在一些实施例中,myc肽包括以串联系列的序列EQKLISEEDL的整数倍,例如3xEQKLISEEDL。在一些实施例中,HA肽包括序列YPYDVPDYA (SEQ ID NO:41)。在一些实施例中,HA肽包括以串联系列的序列YPYDVPDYA的整数倍,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,并且经常是商购可得的。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)可以用于纯化包括FLAG、myc或HA肽的Fc构建体。

[0392] 对于Fc构建体,蛋白A柱层析可以用作纯化过程。蛋白A配体通过Fc区与Fc构建体相互作用,使得蛋白A层析成为高选择性捕获过程,其能够去除大部分宿主细胞蛋白。在本公开内容中,可以使用如实施例2中所述的蛋白A柱层析纯化Fc构建体。

[0393] XI. 药物组合物/制剂

[0394] 本公开内容的特征在于包括本文所述的一种或多种Fc构建体的药物组合物。在一个实施例中,药物组合物包括Fc构建体的基本上同质的群体。在各种例子中,药物组合物包含Fc构建体1-4中的任何一种的基本上同质的群体。

[0395] 可以将本公开内容的治疗性蛋白质构建体,例如本文所述的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)掺入药物组合物中。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进行配制:将Fc构建体与药学可接受的媒介物或介质(例如无菌注射用水(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,随后以一般公认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。

[0396] 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它补充剂如D-山梨糖醇、D-甘露糖、D-甘露糖醇和氯化钠的等渗溶液可以用作注射用水溶液,任选与本领域一般已知的合适的增溶剂和非离子表面活性剂组合,所述增溶剂例如醇如乙醇和多元醇如丙二醇或聚乙二醇,所述非离

子表面活性剂如聚山梨醇酯80<sup>TM</sup>、HCO-50等等。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)。

[0397] **XII. 剂量**

[0398] 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定制且和滴定剂量且修改施用途径,以获得最佳疗效。

[0399] **XIII. 适应症**

[0400] 本公开内容的药物组合物(例如,含有具有2、3或4个Fc结构域的Fc构建体的那些)可用于减少受试者中的炎症,促进受试者中自身抗体的清除,压制受试者中的抗原呈递,减少免疫应答,例如阻断受试者中基于免疫复合物的免疫应答的活化,并且治疗受试者中的免疫和炎性状况或疾病。示例性状况和疾病包括类风湿性关节炎(RA);系统性红斑狼疮(SLE);ANCA相关性血管炎;抗磷脂抗体综合征;自身免疫性溶血性贫血;慢性炎症性脱髓鞘性神经病;移植中抗allo的清除,GVHD中的抗自身,抗替代,IgG治疗,IgG副蛋白;皮肌炎;吉德巴斯捷氏综合症;通过抗体依赖性细胞介导的细胞毒性介导的器官系统靶向的II型超敏综合征,例如格巴二氏综合征、CIDP、皮肌炎、费尔蒂综合征、抗体介导的排斥、自身免疫性甲状腺疾病、溃疡性结肠炎、自身免疫性肝病;特发性血小板减少性紫癜;重症肌无力,视神经脊髓炎;天疱疮和其它自身免疫性水疱病症;干燥综合症;自身免疫性血细胞减少症和通过抗体依赖性吞噬作用介导的其它病症;其它FcR依赖性炎性综合征,例如滑膜炎、皮肌炎、系统性血管炎、肾小球炎和血管炎。

[0401] 在一些实施例中,含有具有5-10个Fc结构域的Fc构建体的本公开内容的药物组合物也可用于例如诱导受试者中免疫应答的免疫细胞活化,增加受试者中的靶细胞(即,癌细胞或受感染的细胞)的吞噬作用,且治疗受试者中的疾病如癌症和感染。本公开内容的Fc构建体和同质药物组合物可以结合活化的Fc  $\gamma$  受体(例如,Fc  $\gamma$  RI、Fc  $\gamma$  RIIa、Fc  $\gamma$  RIIc、Fc  $\gamma$  RIIIa和Fc  $\gamma$  RIIIb),以诱导免疫应答。本公开内容的Fc构建体和同质药物组合物可以活化来自原代THP-1单核细胞的Syk磷酸化和钙通量。活化的单核细胞及其分化的巨噬细胞具有吞噬或杀死靶细胞的能力。因此,本公开内容提供了可以用于治疗受试者的治疗方法,所述受试者患有疾病和病症例如癌症和感染。在一些实施例中,本文所述的Fc构建体和同质药物组合物可以以治疗有效量施用于受试者,以吞噬或杀死受试者中的癌细胞或受感染细胞。

[0402] 顺应根据本公开内容的方法治疗的癌症包括但不限于膀胱癌、胰腺癌、肺癌、肝癌、卵巢癌、结肠癌、胃癌、乳腺癌、前列腺癌、肾癌、睾丸癌、甲状腺癌、子宫癌、直肠癌、呼吸系统癌、泌尿系统癌、口腔癌、皮肤癌、白血病、肉瘤、癌、基底细胞癌、非霍奇金淋巴瘤、急性髓样白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、B细胞慢性淋巴细胞白血病(B-CLL)、多发性骨髓瘤(MM)、红白血病、肾细胞癌、星形细胞瘤、寡突星形细胞瘤、胆道癌、绒毛膜癌、CNS癌、喉癌、小细胞肺癌、腺癌、巨大(或燕麦)细胞癌、鳞状细胞癌、间变性大细胞淋巴瘤、非小细胞肺癌、神经母细胞瘤、横纹肌肉瘤、神经外胚层癌、胶质母细胞瘤、乳腺癌、黑色素瘤、炎性

肌纤维母细胞瘤和软组织肿瘤癌。

[0403] 适合根据本公开内容的方法治疗的感染包括但不限于细菌感染、病毒感染、真菌感染、蠕虫感染和原生动物感染。

[0404] 引起感染的细菌的例子是本领域众所周知的,包括但不限于链球菌属中的细菌(例如酿脓链球菌)、埃希氏菌属中的细菌(例如大肠杆菌)、弧菌属中的细菌(例如霍乱弧菌)、肠炎属中的细菌(例如肠炎沙门氏菌)、以及沙门氏菌属中的细菌(例如伤寒沙门氏菌)。

[0405] 引起感染的病毒的例子是本领域众所周知的,包括但不限于逆转录病毒科中的病毒(例如人免疫缺陷病毒(HIV))、腺病毒科中的病毒(例如腺病毒)、疱疹病毒科中的病毒(例如1型和2型单纯疱疹病毒)、乳头状瘤病毒科中的病毒(例如人乳头状瘤病毒(HPV))、痘病毒科中的病毒(例如天花)、微小核糖核酸病毒科中的病毒(例如甲型肝炎病毒、脊髓灰质炎病毒、鼻病毒)、嗜肝DNA病毒科中的病毒(例如乙型肝炎病毒)、黄病毒科中的病毒(例如丙型肝炎病毒、黄热病病毒、西尼罗河病毒)、披膜病毒科中的病毒(例如风疹病毒)、正粘病毒科中的病毒(例如流感病毒)、丝状病毒科中的病毒(例如埃博拉病毒、马尔堡病毒)和副粘病毒科中的病毒(例如麻疹病毒、腮腺炎病毒)。

[0406] 引起感染的真菌的例子是本领域众所周知的,包括但不限于曲霉属中的真菌(例如烟曲霉、黄曲霉、土曲霉、黑曲霉、白曲霉、棒曲霉、赭曲霉)、念珠菌属中的真菌(例如白色念珠菌、近平滑念珠菌、光滑念珠菌、高里念珠菌、克柔念珠菌、鲁希特念珠菌、热带念珠菌)、隐球菌属中的真菌(例如新型隐球菌)、以及镰刀菌属中的真菌(例如茄病镰刀菌、串珠镰刀菌、尖孢镰刀菌)。

[0407] 蠕虫的例子包括但不限于绦虫(tapeworm)(绦虫(cestode))、圆虫(线虫)、吸虫(fluke)(吸虫(trematode))和单殖亚纲动物。

[0408] 原生动物的例子包括但不限于内阿米巴属中的原生动物(例如溶组织内阿米巴)、疟原虫属中的原生动物(例如恶性疟原虫、三日疟原虫)、贾第虫属中的原生动物(例如兰伯贾第虫)、以及锥虫属中的原生动物(例如布氏锥虫)。

[0409] 实例

[0410] 实例1.Fc构建体设计

[0411] 期望地,Fc构建体设计为增加折叠效率,使亚基的不受控制的结合降到最低,其可以产生不需要的高分子量低聚物和多聚体,并且生成基本上同质的组合物。考虑到这些目标,我们设计了四种Fc构建体(图1和2),每种构建体包括长多肽和短多肽,所述长多肽包括由间隔物分开的两个Fc结构域单体(图1中的多肽102和108以及图2中的多肽202和208),所述短多肽包括单个Fc结构域单体(图1中的多肽114和116以及图2中的多肽214和216)。每种都基于IgG1Fc序列,包括经改造的空腔、经改造的突起和/或静电转向修饰,以控制多肽的组装。编码长多肽和短多肽的DNA序列被优化用于在哺乳动物细胞中表达,并且克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体内。DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK)293细胞内。总共八种DNA质粒构建体用于组装各自具有三个Fc结构域的四种Fc构建体。

[0412] 对于每个Fc构建体,当共表达时,长多肽和短多肽产生含有三个Fc结构域的分支分子,其中长多肽的C末端Fc单体彼此特异性结合,以形成一个C末端Fc结构域,并且长多肽的N末端Fc单体与短多肽特异性结合,以形成两个N末端Fc结构域。Fc构建体1-4及其设计在

表5以及图1和2中描述。每种Fc构建体中使用的序列显示于表6中。下表7进一步概括了构建体1-4各自中的长多肽和短多肽的特征。

[0413] 表5

Fc 构建体	长多肽# (SEQ ID NO)	短多肽# (SEQ ID NO)	附图
[0414]	Fc 构建体 1	102 和 108 (SEQ ID NO: 43)	114 和 116 (SEQ ID NO: 44)
	Fc 构建体 2	102 和 108 (SEQ ID NO: 45)	114 和 116 (SEQ ID NO: 46)
	Fc 构建体 3	102 和 108 (SEQ ID NO: 47)	114 和 116 (SEQ ID NO: 48)
	Fc 构建体 4	202 和 208 (SEQ ID NO: 49)	214 和 216 (SEQ ID NO: 48)

[0415] 表6

SEQ ID NO	氨基酸序列	
SEQ ID NO:4 3	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPC RDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGVFSCSVMHEALHNHYTQKSL LSPGKSGGGSGGGSGGGSGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
[0416]	SEQ ID NO:4 4	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPS RDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVL DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGVFSCSVMHEALHNHYTQKSL LSPGK
	SEQ ID NO:4 5	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPC RDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGVFSCSVMHEALHNHYTQKSL LSPGKSGGGSGGGSGGGSGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO	氨基酸序列
SEQ ID NO:4 6	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVCTLPPS RDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVPL DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL LSPG
[0417]	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPC RDKLTQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVPL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL LSPGKGGGGGGGGGGGGGGDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPVPLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:4 8	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVCTLPPS RDELTKNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVPL DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL LSPG

SEQ ID NO	氨基酸序列
[0418] SEQ ID NO:49	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSSFLYSKLTVDKSRWQQGVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLKSDGSFLYSDLTVDKSRWQQGVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0419] 表7

	Fc 构建体 1	Fc 构建体 2	Fc 构建体 3	Fc 构建体 4
长多肽 (102/202 和 108/208) 中的间隔物	SGGGSGG GSGGGSG GGSGGG (SEQ ID NO: 18)	SGGGSGG GSGGGSG GGSGGG (SEQ ID NO: 18)	GGGGGGG GGGGGGG G (SEQ ID NO: 26)	GGGGGGG GGGGGGG GGGGGG (SEQ ID NO: 27)
[0420] 长多肽 (102/202 和 108/208) ? 中的 C 末端赖氨酸	Y	N	N	N
短多肽 (114/214 和 116/216) ? 中的 C 末端赖氨酸	Y	N	N	N
106/206 和 108/208 中的氨基酸突变	S354C* T366W	S354C T366W	S354C E357K T366W	S354C E357K T366W

	<b>Fc 构建体 1</b>	<b>Fc 构建体 2</b>	<b>Fc 构建体 3</b>	<b>Fc 构建体 4</b>
<b>104/204 和 110/210 中的氨基酸突变</b>	D399K K409D	D399K K409D	D399K K409D	D399K K409D
<b>114/214 和 116/216 中的氨基酸突变</b>	Y349C T366S L368A Y407V	Y349C T366S L368A Y407V	Y349C T366S L368A K370D Y407V	Y349C T366S L368A K370D Y407V
<b>附图</b>	图 1	图 1	图 1	图 2

[0421] [0422] \*序列位置根据Kabat编号系统 (Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 第5版, 1991) 进行编号。

[0423] Fc构建体1-3 (图1) 中的长多肽102和108以及Fc构建体4 (图2) 中的长多肽202和208各自含有通过间隔物以串联系列连接的两个Fc结构域单体。下表8提供了长多肽中的Fc结构域单体和Fc构建体1-4中的间隔物的序列。

[0424] 表8

<b>Fc 构建体 1 多肽 102/108</b>	
<b>N 末端 Fc 结构域单体</b>	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 50)
<b>间隔物</b>	SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG (SEQ ID NO: 18)
<b>C 末端 Fc 结构域单体</b>	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 51)

Fc 构建体 2 多肽 102/108	
<b>N 末端 Fc 结构域单体</b>	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 50)
<b>间隔物</b>	SGGGSGGGSGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 18)
<b>C 末端 Fc 结构域单体</b>	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGN FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 52)
[0426] Fc 构建体 3 多肽 102/108	
<b>N 末端 Fc 结构域单体</b>	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 53)
<b>间隔物</b>	GGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 26)
<b>C 末端 Fc 结构域单体</b>	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGN FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 52)
Fc 构建体 4 多肽 202/208	

[0427]	<b>N末端 Fc 结构域单体</b>	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 53)
	<b>间隔物</b>	GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 27)
	<b>C末端 Fc 结构域单体</b>	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGN FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 52)

[0428] 实例2.Fc构建体的表达

[0429] 使用Poros MabCapture A (LifeTechnologies) 柱,通过基于蛋白A的亲和柱层析,从细胞培养上清液中纯化所表达的蛋白质。捕获的Fc构建体用磷酸盐缓冲盐水洗涤(低盐洗涤),并且用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0.2μm过滤器无菌过滤。

[0430] 使用Poros XS树脂 (Applied Biosciences) ,通过离子交换层析进一步分离蛋白质。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。

[0431] 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,将靶级分缓冲液交换到PBS缓冲液内。将样品浓缩至大约30mg/mL,并且通过0.2μm过滤器无菌过滤。

[0432] 实例3.用于表征Fc构建体的实验测定

[0433] 肽和糖肽液相层析-MS/MS

[0434] 将蛋白质在6M胍 (Sigma) 中稀释至1μg/μL。加入二硫苏糖醇 (DTT) 至10mM的浓度,以在变性条件下在65°C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(氨基甲酰基甲基化 (carbamidomethylate))。然后将蛋白质通过10-kDa膜透析到25mM碳酸氢铵缓冲液 (pH 7.8) 内,以去除IAM、DTT和胍。在Barocycler (NEP 2320; Pressure Biosciences, Inc.) 中用胰蛋白酶消化蛋白质。压力在20,000psi和环境压力之间在37°C下循环,在1小时内总共30次循环。肽的LC-MS/MS分析在Ultimate 3000 (Dionex) Chromatography System和Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific) Mass Spectrometer上执行。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) Column柱上分离肽。基于双重荷电离子 (z=2) m/z 842.5与±1.5Da的四极分离宽度,靶向单个木糖基化的接头肽。

[0435] 完整的质谱法

[0436] 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 $\mu$ g/ $\mu$ 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 $\times$ 350mm上执行,总柱长度为700mm。使用上述运行缓冲液以80 $\mu$ L/分钟的流速,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。

[0437] 毛细管电泳-十二烷基硫酸钠(CE-SDS)测定

[0438] 将样品稀释至1mg/mL,并且与HT Protein Express变性缓冲液(PerkinElmer)混合。将混合物在40℃下温育20分钟。将样品用70 $\mu$ 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。荧光强度用于计算每种尺寸变体的相对丰度。

[0439] 非还原性SDS-PAGE

[0440] 将样品在Laemmli样品缓冲液(4% SDS, Bio-Rad)中在95℃下变性10分钟。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显现蛋白质条带。凝胶通过Chemiluminescence Imaging System(Bio-Rad)进行成像。使用ImageJ 4.0.1软件(Bio-Rad)执行条带的定量。

[0441] 补体依赖性细胞毒性(CDC)

[0442] 通过比色测定评估CDC,其中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加入所有孔中,并且在37℃下温育2小时。在加入WST-1细胞增殖试剂(Roche Applied Science)后,使细胞在37℃下温育12小时。将板置于振荡器上2分钟,并且测量在450nm处的吸光度。

[0443] 实例4.接头丝氨酸残基的O-糖基化和蛋白水解

[0444] 在接头丝氨酸残基处的O-糖基化

[0445] 如实例1中所述,我们设计了Fc构建体以增加折叠效率,使亚基的不受控制的结合降到最低,并且生成基本上同质的用于药物用途的组合物。在实现这些目标的努力中,我们调查了长多肽中两个Fc结构域单体(图1中的102和108;图2中的202和208)之间的不同接头。Fc构建体1和Fc构建体2各自具有在长多肽中的两个Fc结构域单体之间的丝氨酸-甘氨酸接头(SGGSGGGSGGGSGGGGG (SEQ ID NO:18))。

[0446] 当通过肽LC-MS/MS分析在长多肽中的两个Fc结构域单体之间含有接头SGGGSGGGSGGGSGGGGG (SEQ ID NO:18)的Fc构建体2时,观察到O-木糖基化(图3)。然而,由于片段y2至y9不含木糖,接头中的第五个丝氨酸不是O-木糖基化的。可能存在O-木糖基化的多个位点,但每种肽仅是单一O-木糖基化的。该翻译后修饰的程度和位置可能取决于序列和表达系统两者。

[0447] 同样地,在具有两个Fc结构域的Fc构建体(图13中所示的Fc构建体)中观察到O-木糖基化,所述Fc结构域含有相同的(SG<sub>3</sub>)<sub>5</sub>接头(图4)。在多个位点处观察到修饰,其中每个接头中具有至多两个木糖修饰。此外,批次之间的修饰水平是可变的。

[0448] 在观察丝氨酸-甘氨酸接头中的丝氨酸残基处的O-木糖基化后,我们调查了仅含有甘氨酸残基的可替代接头,以便进一步优化接头序列并改善Fc构建体的同质性。因此,选择全甘氨酸间隔物用于Fc构建体3和Fc构建体4中。Fc构建体3具有在长多肽中的两个Fc结构域单体之间的15聚体全甘氨酸间隔物(GGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:26))。Fc构建体4具

有在长多肽中的两个Fc结构域单体之间的20聚体全甘氨酸间隔物 (GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:27))。

[0449] 在接头丝氨酸残基处的蛋白水解

[0450] 在一些实施例中,发现Fc构建体在45°C下在磷酸盐缓冲盐水中温育后经历接头中的蛋白水解,生成单体Fc产物。Fc构建体2(其在多肽102和108各自中含有接头SGGGSGGGSGGGSGGG)中的单体形成速率比Fc构建体4(其在多肽202和208各自中含有全甘氨酸间隔物GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG)更快(图5),指示全甘氨酸间隔物较不易受蛋白水解的影响。发现这种效应在对于多重接头长度具有三个Fc结构域的分支Fc构建体中是普遍的;所有甘氨酸间隔物比丝氨酸-甘氨酸接头更慢地蛋白水解(表9)。

[0451] 表9

接头序列	单体形成的速率 (%单体/天)
G <sub>8</sub>	0.17
G <sub>15</sub>	
G <sub>20</sub>	
(SG <sub>4</sub> ) <sub>4</sub>	
(SG <sub>3</sub> ) <sub>5</sub>	

[0453] 此外,通过Fc构建体2(其在多肽102和108各自中具有(SG<sub>3</sub>)<sub>5</sub>接头)中的单体Fc产物的质谱法分析,证明了主要产物被切割至丝氨酸的N末端侧,除了易受蛋白水解影响的第一丝氨酸之外(图6)。相比之下,Fc构建体4(其在多肽202和208各自中具有G<sub>20</sub>间隔物)的切割产物,对于任何特定的间隔物残基都没有显示强特异性(图7)。总之,这些结果指示全甘氨酸间隔物具有针对蛋白水解降低的敏感性。为了限制蛋白水解,可以使用不含丝氨酸的间隔物,例如Fc构建体4中使用的G<sub>20</sub>间隔物。此类甘氨酸间隔物的使用基本上改善了最终Fc构建体组合物的同质性。

[0454] 实例5.接头长度的优化

[0455] 为了进一步优化同质性,通过制备关于Fc构建体2序列的变化来探索接头长度,其中(SG<sub>3</sub>)<sub>5</sub>接头被替换为G<sub>8</sub>、G<sub>15</sub>或G<sub>20</sub>间隔物。通过体外测定的分析指示接头长度影响生物活性,可能是通过改变Fc构建体与Fc γ受体相互作用的能力。

[0456] 发现通过由板结合的IgG刺激的THP-1细胞的IL-8释放的抑制取决于接头长度(图8)。在低Fc构建体浓度下的抑制遵循次序G<sub>8</sub> < G<sub>15</sub> < G<sub>20</sub>,其中Fc构建体2具有最强抑制通过THP-1细胞的IL-8释放的G<sub>20</sub>间隔物。

[0457] 此外,发现嗜中性粒细胞中钙通量的抑制取决于接头长度(图9)。抑制遵循次序G<sub>8</sub> < G<sub>15</sub> < G<sub>20</sub>,其中Fc构建体2具有显示出嗜中性粒细胞中钙通量的最大抑制的G<sub>20</sub>间隔物。

[0458] 实例6.通过旋钮进洞技术的异二聚化优化

[0459] 表达Fc构建体2长多肽和短多肽(图1中的多肽102、108、114和116)或Fc构建体4长多肽和短多肽(图2中的多肽202、208、214和216)的质粒被转染到HEK293细胞内。在培养七天后,通过离心澄清细胞,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揭示具有三个Fc结构域的Fc构建体2和具有三个Fc结构域(Fc3)的Fc构建体4以相似水平表达。然而,用于Fc构建体2的构建体表达显著更高水平的污染二聚体(Fc2)种类(图10)。两组构建体均表达相似水平的单体种类(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。

[0460] 这些结果指示具有促进异二聚化的静电转向突变和促进“分支”亚基中的异二聚化的旋钮进洞突变两者(例如,图1中的Fc结构域单体106、114、112和116;图2中的Fc结构域单体206、214、212和216)增强Fc构建体中异二聚体Fc结构域的形成,优化具有三个Fc结构域的Fc构建体的组装,并且改善含有Fc构建体的组合物的同质性。

[0461] 实例7. 用于控制同二聚化的静电转向

[0462] 为了使生成不需要的高分子量寡聚体和多聚体的亚基的脱靶结合(off-register association)降到最低,将有利于异二聚化的突变(例如,旋钮和洞)引入“分支”亚基内(例如,图1中的Fc结构域单体106、112、114和116;图2中的Fc结构域单体206、212、214和216)。这些氨基酸取代保存了旋钮亚基(例如,图1中的Fc结构域单体106和112;图2中的Fc结构域单体206和212)对于洞配对物(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)的吸引力,并且同时阻碍了旋钮亚基之间的结合。因为旋钮突变也抑制与野生型Fc序列的组装,所以质疑是否需要包括另外的突变,以进一步减少“茎”Fc亚基(例如,图1中的Fc结构域单体104和110;图2中的Fc结构域单体204和210)对于旋钮和洞“分支”亚基的亲和力。为了解决该问题,生成了Fc构建体长多肽,其在羧基末端“茎”亚基中含有野生型Fc结构域单体序列,且在氨基末端“分支”亚基中含有携带旋钮突变的Fc结构域单体。相应的短多肽是携带洞突变的Fc结构域单体。该Fc构建体基于Fc构建体2中的多肽序列,但在每种长多肽的羧基末端“茎”亚基中具有野生型Fc结构域单体序列。

[0463] 用质粒共转染HEK293细胞,所述质粒表达Fc构建体2(其在每种长多肽的羧基末端“茎”亚基中的Fc结构域单体中具有同二聚化的静电转向突变;参见实例1中的表5和6)、或基于Fc构建体2的Fc构建体,其中每种长多肽的羧基末端“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)(如上所述)。在培养七天后,通过离心澄清细胞,并且通过非还原性SDS-PAGE分离原始培养基上清液。染色蛋白的成像揭示,在“茎”亚基中不含静电转向突变的Fc构建体(图11中标记为“无静电转向”(泳道1-3))含有比Fc构建体2配对物(图11中标记为“具有静电转向”(泳道4和5))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目大得多的分子量更高的条带(图11中的泳道1-3)。

[0464] 这些结果证实,具有促进“茎”亚基中的同二聚化的静电转向突变(例如,图1中的Fc结构域单体104和110;图2中的Fc结构域单体204和210)进一步增强了Fc构建体中的同二聚体Fc结构域形成,优化具有三个Fc结构域的Fc构建体的组装,并且改善含有Fc构建体的组合物的同质性。

[0465] 实例8. 通过消除C末端赖氨酸残基来优化组合物同质性

[0466] 免疫球蛋白的C末端赖氨酸残基跨越许多物种是高度保守的。在一些情况下,在蛋白质生产过程中通过细胞机制去除多肽中的C末端赖氨酸。我们旨在通过从Fc构建体中的每种多肽中去除C末端赖氨酸,进一步改善组合物中的Fc构建体的均一性,且获得含有本文所述的Fc构建体的更同质的组合物。Fc构建体2在其长多肽(102和108;参见实例1,表5-7;图1)或短多肽(114和116)中不含任何C末端赖氨酸残基。图12显示了去除C末端赖氨酸以生

成Fc构建体2在体外不诱导补体依赖性细胞毒性(CDC)。因此,通过去除C末端赖氨酸残基,我们能够改善Fc构建体药物组合物的同质性而不触发不利的免疫副作用。

[0467] 实例9.Fc构建体在慢性特发性血小板减少性紫癜(ITP)模型中的功效

[0468] 称重18-22克的雌性C57BL/6小鼠购自Charles River Labs,并且在适应一周后用于研究。小鼠用大鼠抗小鼠CD41抗体(抗CD41;1.5 $\mu$ g/小鼠)i.p.处理4天。在第3天时的第3次抗体注射后一至两小时,i.v.给予盐水、IVIg、构建体2和构建体4。在第4次抗CD41抗体注射后24小时,在第5天时,在通过下颌下出血采集的血液中测量血小板水平。

[0469] 在ITP模型中执行了比较构建体2和构建体4的多项研究(图18、图19和20)。在所有三项研究中,构建体4显示比以0.1g/kg给药的构建体2更高的功效。

[0470] 实例10.构建体4在与Fc多聚体构建体的比较中的药代动力学行为

[0471] 如(Strome等人,US 2010/0239633A1;Jain等人,Arthritis Res.Ther.14,R192(2012))中所述生成Fc多聚体。具体地,野生型IgG1Fc在C末端处与IgG2铰链序列(构建体X1)融合。经由脂质体将DNA质粒构建体转染到HEK293细胞内。在培养七天后,通过离心澄清细胞。

[0472] 使用Poros MabCapture A柱,通过基于蛋白A的亲和柱层析,从细胞培养上清液中纯化所表达的蛋白质。捕获的构建体用磷酸盐缓冲盐水洗涤(低盐洗涤),并且用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 $\mu$ m过滤器无菌过滤。

[0473] 使用Poros XS树脂,通过离子交换层析进一步分离蛋白质。用50mM MES,pH 6(缓冲液A)预平衡柱,并且在加载前将样品在平衡缓冲液中稀释。用50mM MES,400mM氯化钠,pH 6(缓冲液B)作为洗脱缓冲液,使用多步梯度洗脱样品。梯度步骤包括0-40% B共2个柱体积(CV)以去除低分子量种类,保持在40% B(4CV)下的步骤,随后为40-80% B(4CV)以分离靶种类,然后线性增加至100% B。通过分析型尺寸排阻层析筛选所有含蛋白质的级分,并且通过在280nm处的吸光度定量组分。将Fc(大约50kDa)加上Fc二聚体(大约100kDa)总含量不超过8%的级分合并,以产生纯化的Fc多聚体。

[0474] 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,将靶级分缓冲液交换到PBS缓冲液内。将样品浓缩至大约30mg/mL,并且通过0.2 $\mu$ m过滤器无菌过滤。

[0475] 通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳比较构建体4和构建体X1的分子量分布(图21)。构建体4主要由~150kDa种类(三个Fc结构域)组成。相比之下,构建体X1由范围从~100kDa(两个Fc结构域)开始的多个种类组成,具有高于250kDa的许多条带,并且大多数没有单一组分。

[0476] 雌性C57BL/6小鼠(n=15,8周龄)用0.1g/kg构建体X1或构建体4各自静脉内(i.v.)给药。血液(25 $\mu$ L)从下颌下静脉中收集且加工成血清。每组五只小鼠在直到第5天的交替时间点放血,而对于所有剩余时间点,所有十五只小鼠在每组中放血。收集的时间点包括15和30分钟;1、2、4、6、8和24小时;2、3、4、5、7、9、11、14、16、18、21和24天。通过使用Fc特异性检测抗体的抗人IgG ELISA测定Fc多聚体血清浓度。

[0477] 如图22中证实的,尽管曲线在第3天和第5天之间短暂交叉,但构建体X1的血清水平在大多数时间点低于构建体4的血清水平。在图22中,构建体4用黑色方块和实线显示,并且构建体X1用空心圆圈、虚线显示。早期时间点的扩展显示于图23中,使用构建体4(带实线

的黑色方块)和构建体X1(带虚线的空心圆圈)。

[0478] 实例11.Fc构建体在胶原抗体诱导的关节炎(CAIA)模型中的功效

[0479] 雄性C57BL/6小鼠用针对胶原蛋白II的四种抗体的关节炎性单克隆抗体混合物(ArthritoMab, MDBiosciences; 8mg)进行i.p.注射。在第4天时,动物用脂多糖(100 $\mu$ g)进行i.p.注射。在范围从第1天到第-14天(天数编号省略零)的一天内,动物用媒介物或测试化合物进行i.v.给药。临床评分参数如下:0=正常,无肿胀、发红或变形;完全的关节灵活性。1=轻度关节炎:轻度肿胀和/或变形;完全的关节灵活性。2=中度关节炎:中度肿胀和/或变形;减少的关节灵活性或握力。3=重度关节炎:重度肿胀和/或变形;严重减少的关节灵活性或握力。4=强直性关节;无关节灵活性和严重受损的运动;垂死。在12天后处死动物。

[0480] 图24是比较在胶原抗体诱导的关节炎(CAIA)模型中,在第6天时,以50mg/kg(黑色三角形,实心黑线)、25mg/kg(黑色方块,黑色虚线)、或12.5mg/kg(黑色圆圈,黑色虚线)治疗性给药的构建体4的功效的图。在第6天时给予等价体积的盐水(灰色交叉(gray exes),灰色实线)作为媒介物对照。显示了每个时间点的平均值和平均值的标准误。

[0481] 在第1天时用100mg/kg构建体4执行CAIA模型中的预防性给药(图25)。媒介物对照(盐水)仅在第1天时给药。

[0482] 图25是比较在胶原抗体诱导的关节炎(CAIA)模型中,在第1天时,以100mg/kg预防性给药的构建体4(AA:黑色方块,实线)或盐水(灰色圆圈,点划线)的功效的图。在第1天时给予等价体积的盐水(灰色圆圈,点划线)。显示了每个时间点的平均值和平均值的标准误。

[0483] 发现构建体4在治疗上(图24)或预防上(图25)给药时,与媒介物对照相比减少疾病严重性。

[0484] 实例12.Fc构建体与Fc  $\gamma$  RIIb结合的增强

[0485] 先前已显示S267E/L328F突变显著且特异性地增强IgG1与Fc  $\gamma$  RIIb受体的结合(Chu等人Molecular Immunology 45:2008)。将S267E/L328F突变掺入构建体4(SIF)主链内。该构建体4-Fc  $\gamma$  RIIb+突变体良好表达且组装(参见图26)(SIF:构建体4;Fc  $\gamma$  RIIb+:构建体4-Fc  $\gamma$  RIIb+突变体)。图26是关于得自构建体4(SIF)和构建体4-Fc  $\gamma$  RIIb+突变体的瞬时表达的澄清培养基,非还原的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳结果的图像。将编码构建体4-Fc  $\gamma$  RIIb的长链和短链的质粒以1/1(w/w)或2/1比率转染到HEK293细胞内。

[0486] 当与构建体4(SIF3)对照相比时,构建体4-Fc  $\gamma$  RIIb+突变体与抑制性Fc  $\gamma$  RIIb受体的结合极大增强(结合增加超过300倍)。相反,与活化Fc  $\gamma$  RIIa的结合相对不受影响,而与Fc  $\gamma$  RIIa的结合减少(参见图27)。

[0487] 图27是概括比较IgG1对照、构建体4和构建体4-Fc  $\gamma$  RIIb+突变体的Fc  $\gamma$ 受体的结合的实验结果的图。使用基于细胞的竞争性时间分辨荧光共振能量转移测定(CisBio Bioassays, Bedford, MA),测量相对结合。结果表示为EC 50值,指示置换与特定细胞表面Fc  $\gamma$ 受体结合的荧光标记抗体所需的先证者(proband)浓度。数字越高,结合或亲和力越低。

[0488] 实例13.单核细胞衍生的树突状细胞(moDC)活化的抑制

[0489] 构建体4-Fc  $\gamma$  RIIb+突变体极大地加强了单核细胞衍生的树突状细胞(moDC)的活化。其为最重要的专职抗原呈递细胞群体的树突状细胞(DC),处理抗原材料且将其呈递在细胞表面上,目的是启动T细胞应答。Fc  $\gamma$  R可以在调节moDC功能中起主要作用。活化Fc  $\gamma$  R的免疫复合物接合可以触发未成熟的人moDC的成熟和活化。相反,抑制性Fc  $\gamma$  RIIb的接合

可以压制成熟和活化 (Boruchov AM 等人 J Clin Invest. 2005 115 (10) )。我们先前已显示 Fc 构建体可以抑制 moDC 的成熟和活化 (Ortiz 等人 Sci Transl Med 2016 和参见图3)。另一方面, 具有 Fc  $\gamma$  RIIb+ 突变的 Fc 构建体 (例如, 构建体4/SIF3) 可以响应对免疫复合物替代物例如板结合的 IgG1 的暴露而显著加强 moDC 活化 (图28)。单独与构建体4-Fc  $\gamma$  RIIb+ 温育不诱导 moDC 活化 (图29)。

[0490] 在 100ng/mL GM-CSF 和 50ng/mL IL-4 的存在下, 从负选择的 CD14+ 单核细胞生成未成熟的人 moDC。将收获的 DC 与 PBS、抗 CD32a 抗体 IV.3、构建体4 (SIF3) 或构建体4-Fc  $\gamma$  RIIb+ 一起在 37°C 下在培养基中温育 20 分钟。在封闭后, 将细胞悬浮液转移到 IgG1 包被的板中, 并且加入另外的补充 GM-CSF 和 IL-4 的培养基。在 48 小时温育后, 通过用冰冷的 PBS 洗涤板两次收获轻度贴壁的细胞。将收获的细胞用抗 HLA-DR FITC 和抗 CD86-PE Cy7 Ab 染色。用 FACSCanto (BD) 和 FlowJo 软件 (TreeStar) 分析细胞。

[0491] 图28: 构建体4抑制通过板结合的 IgG 的 moDC 活化, 而构建体4-Fc  $\gamma$  RIIb+ 增强活化。代表性直方图显示在 moDC 上的 CD86 表面表达, 所述 moDC 作为阴性对照 (UT) 在未经处理的板上培养, 或用阻断活化 Fc  $\gamma$  RIIa 的抗体 (IV.3)、构建体4 或渐增浓度的构建体4-Fc  $\gamma$  RIIb+ 预处理 20 分钟。然后将经处理的细胞转移到含有固定的 IgG1 (PB IgG) 的板。肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNFa) 处理用作阳性对照。通过流式细胞术评价 CD86 的表面表达。使用未刺激的细胞作为对照门控 CD86 表达的直方图。在 y 轴上绘制对于治疗条件 CD86 阳性细胞的百分比。

[0492] 图29: 构建体4-Fc  $\gamma$  RIIb+ 本身不诱导 moDC 活化, 但的确增强通过板结合的 IgG 的活化。代表性直方图显示在 moDC 上的 CD86 表面表达, 所述 moDC 作为阴性对照 (UT) 在未经处理的板上培养, 或用构建体4-Fc  $\gamma$  RIIb+ 预处理 20 分钟, 然后转移至未经处理的板 (仅 Fc  $\gamma$  RIIb+)。用 PBS (PB IgG)、阻断活化 Fc  $\gamma$  RIIa 的抗体 (IV.3) 或构建体4-Fc  $\gamma$  RIIb+ (FcgrRIIb+) 预处理的 MoDC 转移到含有固定的 IgG1 (PB IgG) 的板。通过流式细胞术评价 CD86 的表面表达。使用未刺激的细胞作为对照门控 CD86 表达的直方图。在 y 轴上绘制对于治疗条件 CD86 阳性细胞的百分比。

[0493] 其它实施例

[0494] 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。

[0495] 虽然本公开内容已结合其具体实施例进行描述, 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内容的原理的本公开内容的任何变化、用途或适应, 并且包括与公开内容的此类偏离, 所述偏离在本公开内容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, 并且落入权利要求书的范围内。

[0496] 其它实施例在权利要求书内。

[0497] 所要求保护的是:

## 序列表

<110> Momenta Pharmaceuticals, Inc.

<120> 与经改造的 Fc 构建体相关的组合物和方法

<130> 14131-0148WO2

<140> PCT/US2017/034084

<141> 2017-05-23

<150> 62/443,451

<151> 2017-01-06

[0001]

<150> 62/340,322

<151> 2016-05-23

<160> 62

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 1

Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 2

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 2

[0002]

Gly Gly Ser Gly

1

<210> 3

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 3

Ser Gly Gly Gly

1

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成多肽

&lt;400&gt; 4

Gly Ser Gly Ser

1

[0003]

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成多肽

&lt;400&gt; 5

Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5

&lt;210&gt; 6

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 6

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5

<210> 7

<211> 10

[0004] <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 7

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5 10

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 8

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5 10

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0005]

<223> 合成多肽

<400> 9

Gly Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 10

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

[0006] <400> 11

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 12

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly

1 5

<210> 13

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 13

[0007] Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly

1 5 10

<210> 14

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 14

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

<210> 15

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 15

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Ser Gly

[0008]

20

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 16

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 17

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

[0009] <210> 18

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 18

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly

1 5 10 15

Ser Gly Gly Gly

20

<210> 19

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 19

Gly Gly Gly Gly

1

<210> 20

[0010] <211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 20

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 21

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 21

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5 10

<210> 22

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

[0011]

<220>

<223> 合成多肽

<400> 22

Gly Gly

1 5 10 15

<210> 23

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 23

Gly Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly

20

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

[0012]

<220>

<223> 合成多肽

<400> 24

Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 25

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5 10

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

[0013]

<400> 26

Gly Gly

1 5 10 15

<210> 27

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 27

Gly Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly

20

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

[0014]

<400> 28

Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly Gly

1 5 10

<210> 29

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 29

Ser Ala Cys Tyr Cys Glu Leu Ser

1 5

<210> 30

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 30

Arg Ser Ile Ala Thr

[0015]

1 5

<210> 31

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 31

Arg Pro Ala Cys Lys Ile Pro Asn Asp Leu Lys Gln Lys Val Met Asn

1 5 10 15

His

<210> 32

<211> 36

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 32

Gly Gly Ser Ala Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Ser  
[0016] 1 5 10 15

Gly Ala Ser Gly Thr Gly Thr Ala Gly Gly Thr Gly Ser Gly

20 25 30

Thr Gly Ser Gly

35

<210> 33

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 33

Ala Ala Ala Asn Ser Ser Ile Asp Leu Ile Ser Val Pro Val Asp Ser

1 5 10 15

Arg

<210> 34

<211> 36

<212> PRT

<213> 人工序列  
[0017]

<220>

<223> 合成多肽

<400> 34

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Gly Gly Ser Glu Gly Gly

1 5 10 15

Ser Glu Gly Gly Ser Glu Gly Gly Ser Glu Gly Gly Ser

20 25 30

Gly Gly Gly Ser

35

<210> 35

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 35

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser

1 5 10

[0018] <210> 36

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 36

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Ser

<210> 37

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 37

Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp

1 5 10

<210> 38

[0019] <211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 38

His His His His His

1 5

<210> 39

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 39

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys

1 5

<210> 40

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

[0020]

<220>

<223> 合成多肽

<400> 40

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

1 5 10

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 41

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala

1 5

<210> 42

<211> 227

<212> PRT

<213> 智人

<400> 42

[0021]

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145 150 155 160

[0022]

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Thr Thr Pro Pro

165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210 215 220

Pro Gly Lys

225

<210> 43

<211> 474

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 43

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1 5 10 15

[0023] Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Thr Thr Pro Pro

165 170 175

[0024]

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210 215 220

Pro Gly Lys Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser

225 230 235 240

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

245 250 255

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

260 265 270

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

275 280 285

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

290 295 300

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

305 310 315 320

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

325 330 335

[0025]

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

340 345 350

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

355 360 365

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu

370 375 380

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

385 390 395 400

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

405 410 415

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Lys Ser Asp Gly Ser Phe Phe

420 425 430

Leu Tyr Ser Asp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

435 440 445

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

450 455 460

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

465 470

[0026] &lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 227

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成多肽

&lt;400&gt; 44

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

[0027]

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115 120 125

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val

180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210 215 220

Pro Gly Lys

225

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 473

&lt;212&gt; PRT

[0028] &lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成多肽

&lt;400&gt; 45

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115 120 125

[0029]

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210 215 220

Pro Gly Lys Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser

225 230 235 240

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

245 250 255

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

260 265 270

[0030]

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

275 280 285

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

290 295 300

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

305 310 315 320

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

325 330 335

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

340 345 350

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

355 360 365

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu

370 375 380

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

385 390 395 400

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

405 410 415

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Lys Ser Asp Gly Ser Phe Phe

420 425 430

[0031]

Leu Tyr Ser Asp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

435 440 445

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

450 455 460

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

465 470

<210> 46

<211> 226

<212> PRT

<213> 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成多肽

&lt;400&gt; 46

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

[0032]

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115 120 125

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Thr Thr Pro Pro

165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val

180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205

[0033]

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210 215 220

Pro Gly

225

<210> 47

<211> 468

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

&lt;400&gt; 47

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

[0034]

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Lys Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Thr Thr Pro Pro

165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210 215 220

[0035]

Pro Gly Lys Gly Gly

225 230 235 240

Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu

245 250 255

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr

260 265 270

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val

275 280 285

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

290 295 300

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser

305 310 315 320

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu

325 330 335

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala

340 345 350

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro

355 360 365

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln

370 375 380

[0036]

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

385 390 395 400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr

405 410 415

Pro Pro Val Leu Lys Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Asp Leu

420 425 430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Asn Val Phe Ser Cys Ser

435 440 445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser

450 455 460

Leu Ser Pro Gly

465

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 226

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成多肽

&lt;400&gt; 48

[0037]

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115 120 125

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140

Leu Ser Cys Ala Val Asp Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145 150 155 160

[0038]

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Thr Thr Pro Pro

165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val

180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210 215 220

Pro Gly

225

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 473

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成多肽

&lt;400&gt; 49

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1 5 10 15

[0039]

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Lys Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Thr Lys Thr Pro Pro

165 170 175

[0040]

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210 215 220

Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

225 230 235 240

Gly Gly Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

245 250 255

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

260 265 270

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

275 280 285

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Phe Asn Trp

290 295 300

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

305 310 315 320

[0041]

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

325 330 335

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

340 345 350

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

355 360 365

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu

370 375 380

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

385 390 395 400

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

405 410 415

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Lys Ser Asp Gly Ser Phe Phe

420 425 430

Leu Tyr Ser Asp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

435 440 445

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

450 455 460

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

465 470

[0042]

<210> 50

<211> 227

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 50

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

[0043]

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210 215 220

Pro Gly Lys

225

<210> 51

<211> 227

[0044] <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 51

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

[0045]

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

165 170 175

Val Leu Lys Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Asp Leu Thr Val

180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210 215 220

Pro Gly Lys

225

<210> 52

<211> 226

<212> PRT

<213> 人工序列

[0046] <220>

<223> 合成多肽

<400> 52

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115 120 125

[0047]

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Thr Thr Pro Pro

165 170 175

Val Leu Lys Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Asp Leu Thr Val

180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210 215 220

Pro Gly

225

<210> 53

<211> 227

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

[0048] <400> 53

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Lys Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140

[0049]

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Thr Thr Pro Pro

165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210 215 220

Pro Gly Lys

225

<210> 54

<211> 474

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 54

Gln Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

[0050] 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145 150 155 160

[0051]

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Thr Thr Pro Pro

165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210 215 220

Pro Gly Lys Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser

225 230 235 240

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

245 250 255

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

260 265 270

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

275 280 285

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

290 295 300

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

305 310 315 320

[0052]

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

325 330 335

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

340 345 350

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

355 360 365

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu

370 375 380

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

385 390 395 400

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

405 410 415

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Lys Ser Asp Gly Ser Phe Phe

420 425 430

Leu Tyr Ser Asp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

435 440 445

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

450 455 460

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

[0053] 465 470

<210> 55

<211> 227

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 55

Gln Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

[0054]

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115 120 125

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val

180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210 215 220

Pro Gly Lys

225

<210> 56

[0055] <211> 473

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 56

Gln Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

[0056]

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Thr Thr Pro Pro

165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210 215 220

Pro Gly Lys Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser

225 230 235 240

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

245 250 255

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

260 265 270

[0057]

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

275 280 285

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

290 295 300

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

305 310 315 320

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

325 330 335

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

340 345 350

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

355 360 365

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu

370 375 380

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

385 390 395 400

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

405 410 415

[0058] Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Lys Ser Asp Gly Ser Phe Phe

420 425 430

Leu Tyr Ser Asp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

435 440 445

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

450 455 460

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

465 470

&lt;210&gt; 57

&lt;211&gt; 226

&lt;212&gt; PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 57

Gln Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

[0059] 35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115 120 125

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Thr Thr Pro Pro

165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val

180 185 190

[0060] Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210 215 220

Pro Gly

225

&lt;210&gt; 58

&lt;211&gt; 468

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 合成多肽

<400> 58

Gln Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

[0061] 50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Lys Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Thr Thr Pro Pro

165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205

[0062]

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210 215 220

Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

225 230 235 240

Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu

245 250 255

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr

260 265 270

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val

275 280 285

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

290 295 300

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser

305 310 315 320

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu

325 330 335

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala

340 345 350

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro

355 360 365

[0063]

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln

370 375 380

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

385 390 395 400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr

405 410 415

Pro Pro Val Leu Lys Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Asp Leu

420 425 430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser

435 440 445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser

450 455 460

Leu Ser Pro Gly

465

<210> 59

<211> 226

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

[0064]

<400> 59

Gln Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115 120 125

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140

[0065]

Leu Ser Cys Ala Val Asp Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val

180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210 215 220

Pro Gly

225

<210> 60

<211> 473

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 60

[0066] Gln Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Lys Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145 150 155 160

[0067]

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Thr Thr Pro Pro

165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210 215 220

Pro Gly Lys Gly Gly

225 230 235 240

Gly Gly Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

245 250 255

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

260 265 270

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

275 280 285

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

290 295 300

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

305 310 315 320

[0068]

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

325 330 335

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

340 345 350

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

355 360 365

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu

370 375 380

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

385 390 395 400

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

405 410 415

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Lys Ser Asp Gly Ser Phe Phe

420 425 430

Leu Tyr Ser Asp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

435 440 445

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

450 455 460

[0069] Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

465 470

<210> 61

<211> 473

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 61

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

[0070]

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

165 170 175

Val Leu Lys Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Asp Leu Thr Val

180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210 215 220

Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

225 230 235 240

[0071]

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

245 250 255

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

260 265 270

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

275 280 285

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

290 295 300

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

305 310 315 320

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

325 330 335

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

340 345 350

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

355 360 365

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Lys

370 375 380

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

385 390 395 400

[0072]

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

405 410 415

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

420 425 430

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

435 440 445

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

450 455 460

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

465 470

<210> 62

<211> 473

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 62

Gln Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1 5 10 15

[0073] Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Thr Thr Pro Pro

165 170 175

[0074]

Val Leu Lys Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Asp Leu Thr Val

180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210 215 220

Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

225 230 235 240

Gly Gly Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

245 250 255

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

260 265 270

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

275 280 285

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

290 295 300

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

305 310 315 320

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

325 330 335

[0075]

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

340 345 350

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

355 360 365

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Lys

370 375 380

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

385 390 395 400

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

405 410 415

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

420 425 430

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

[0076] 435 440 445

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

450 455 460

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

465 470

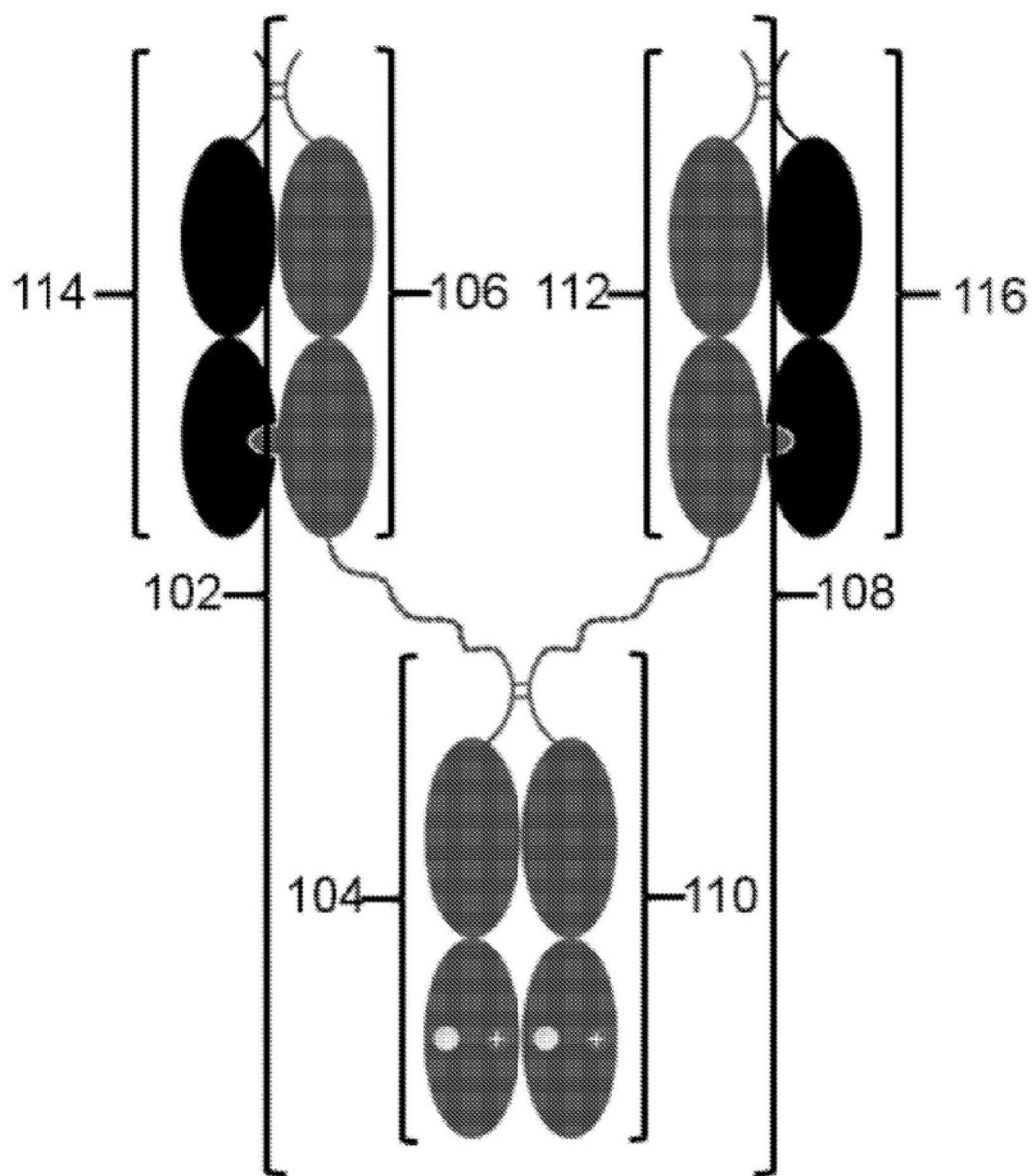


图1 (Fc构建体1、2和3)

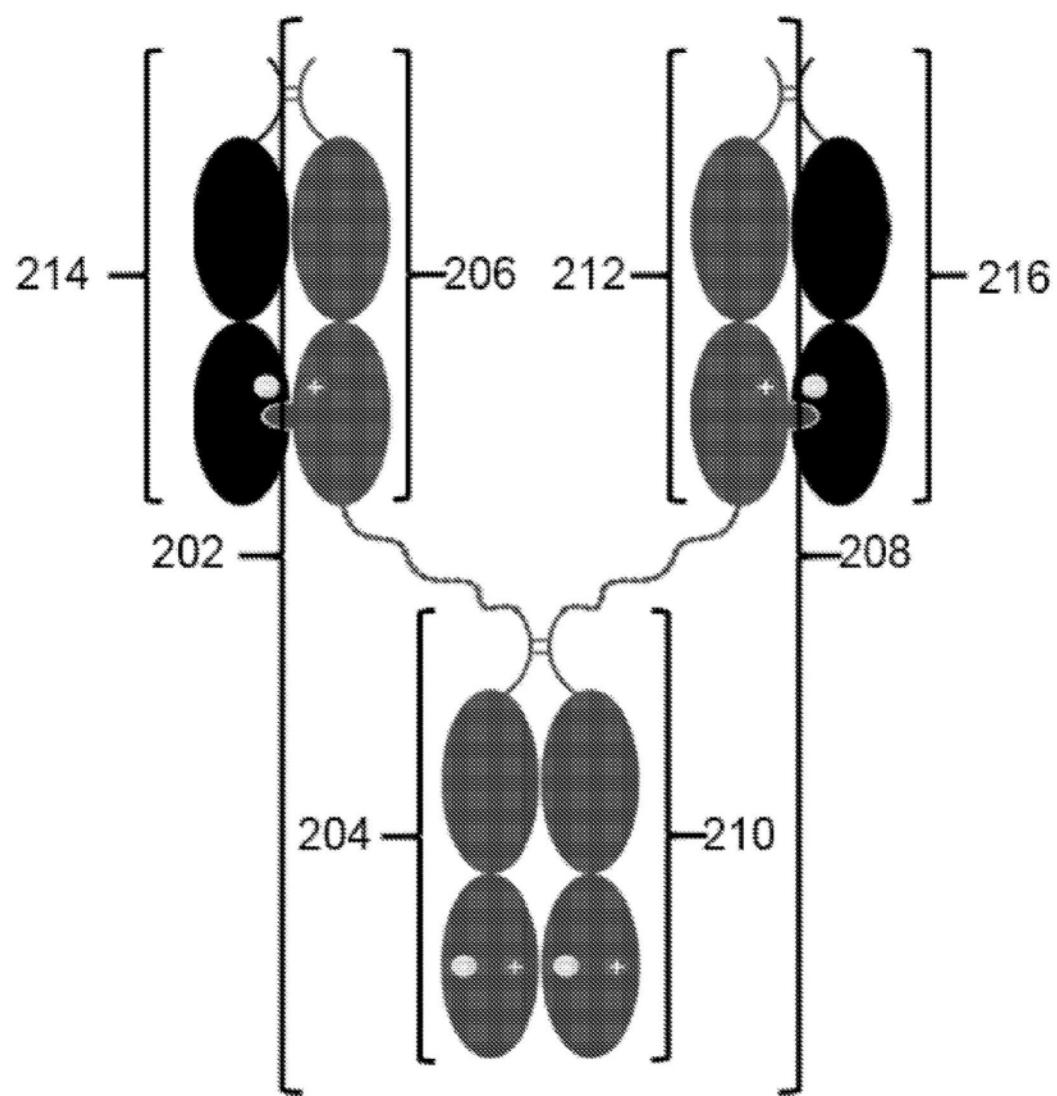


图2 (Fc构建体4)

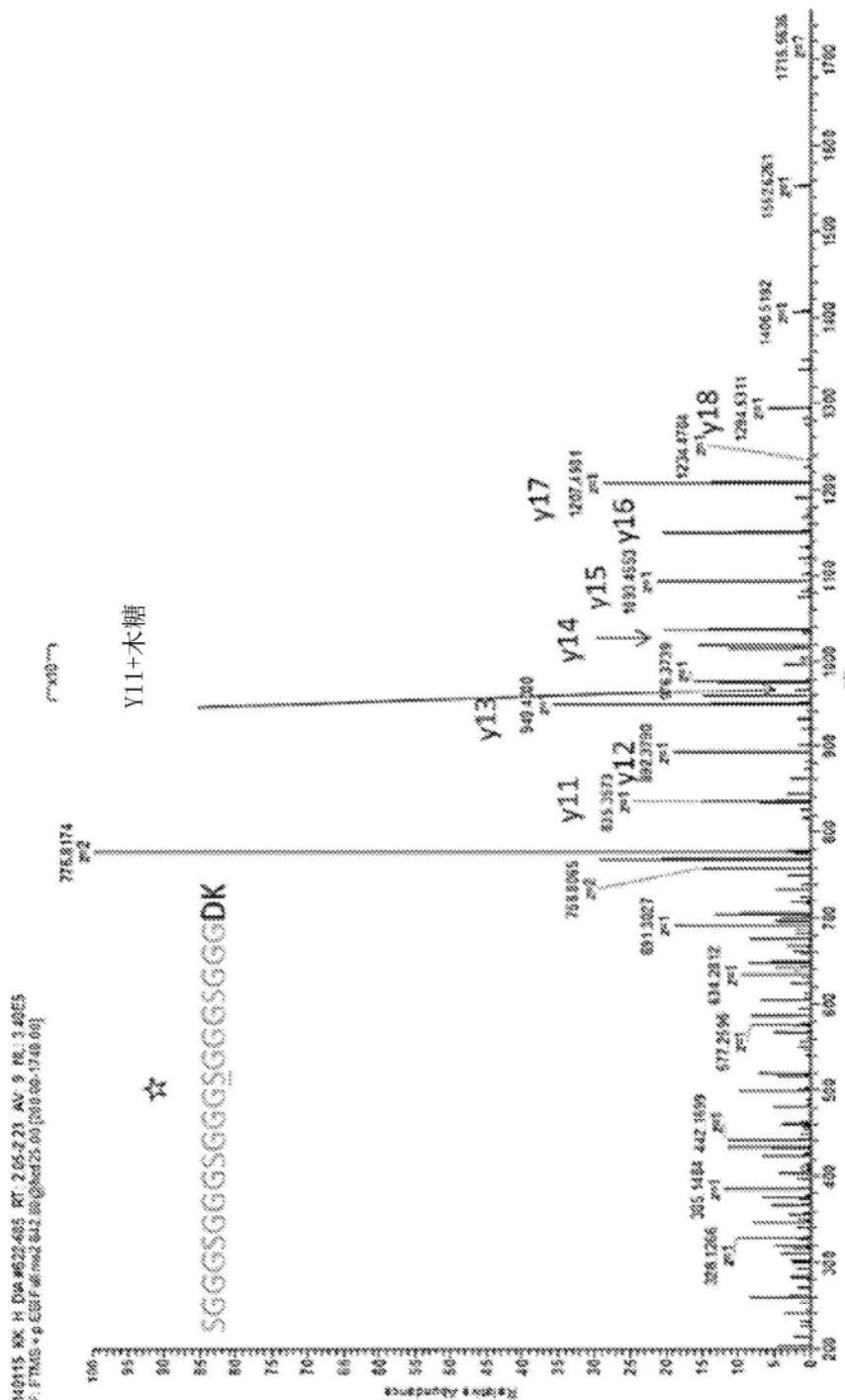


图3

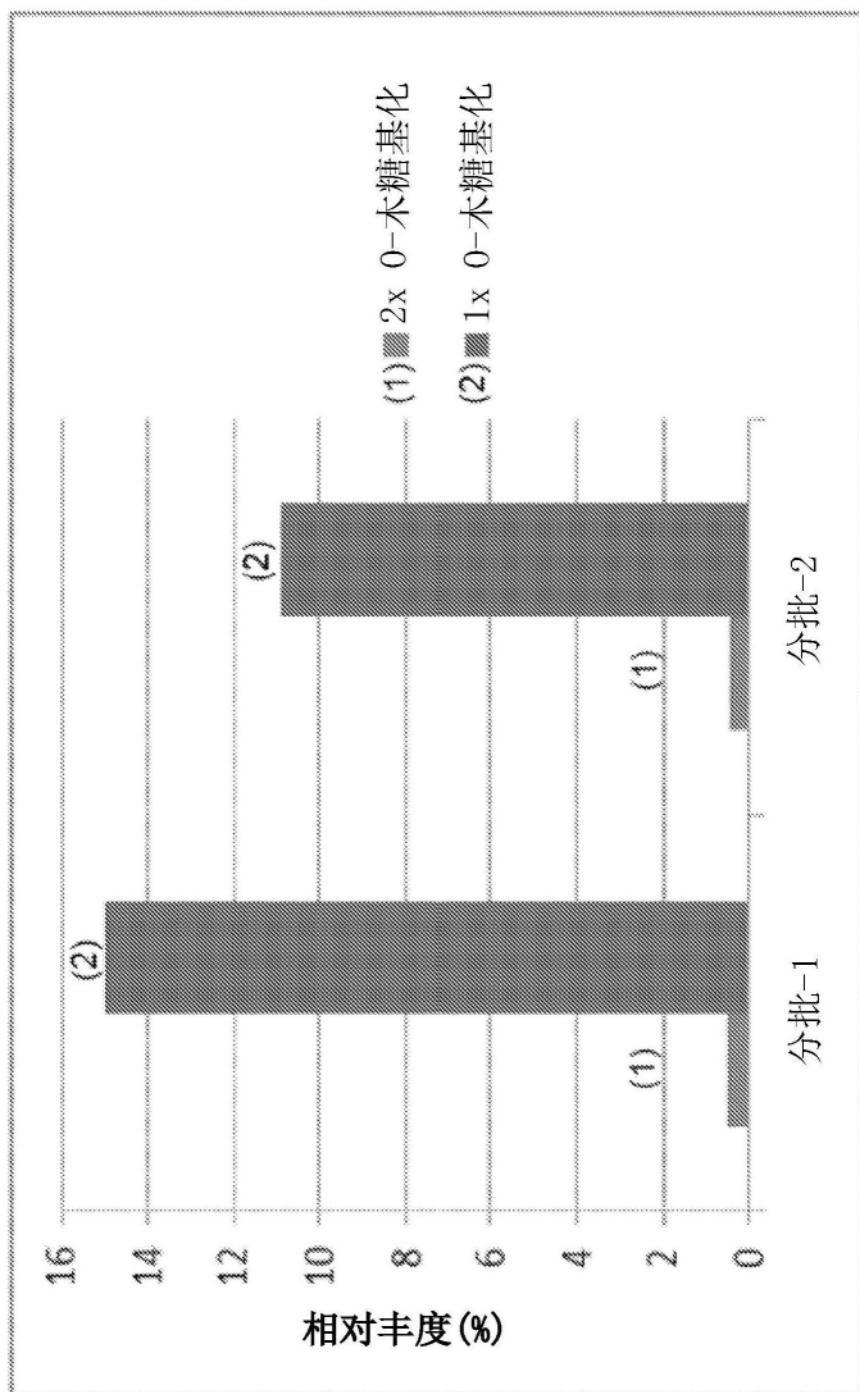


图4

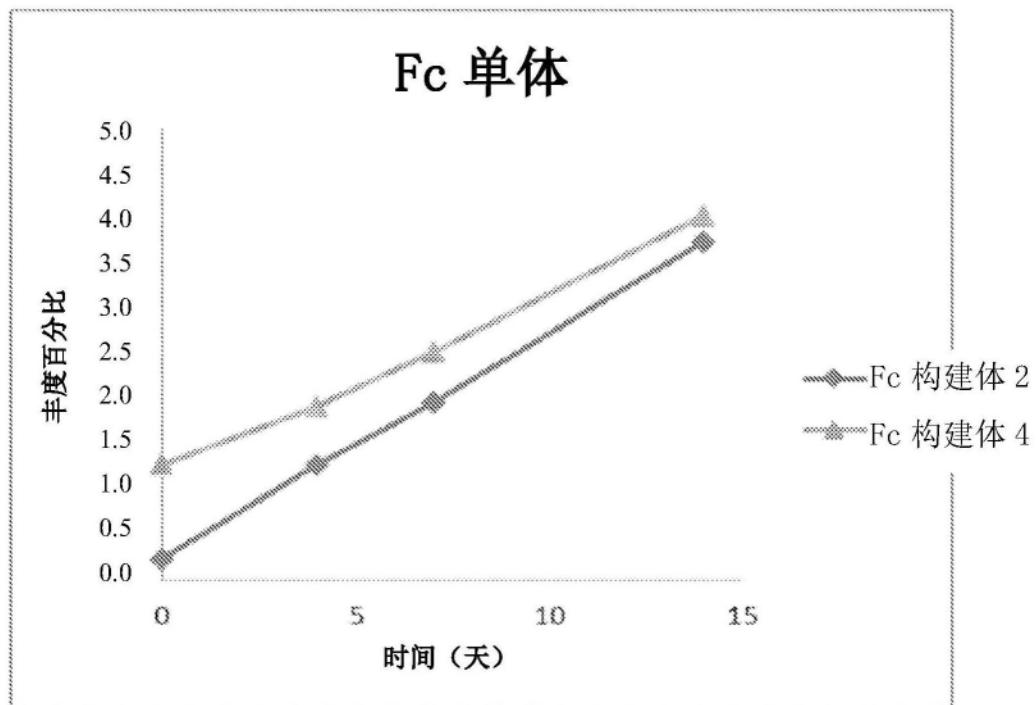
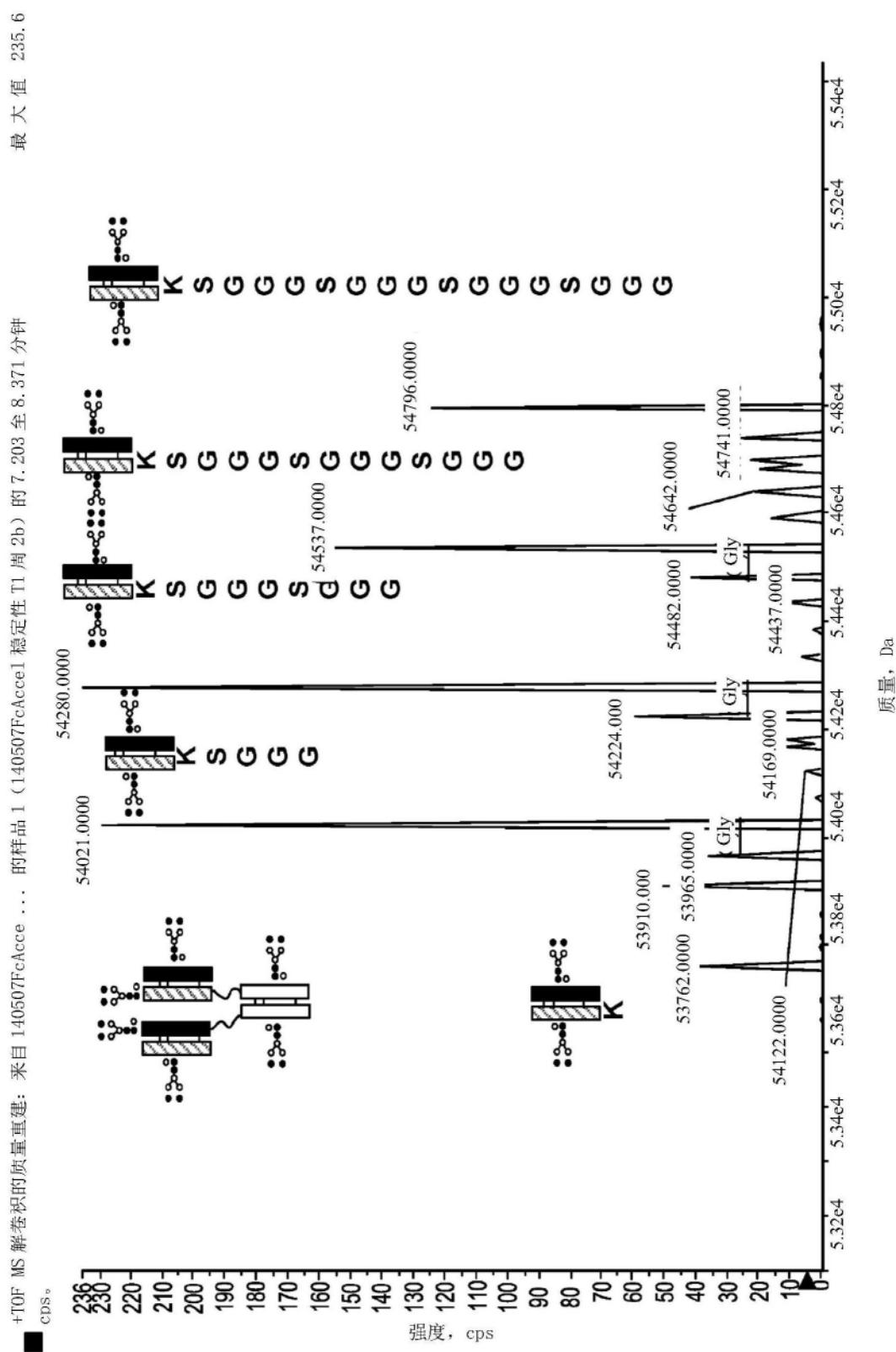


图5



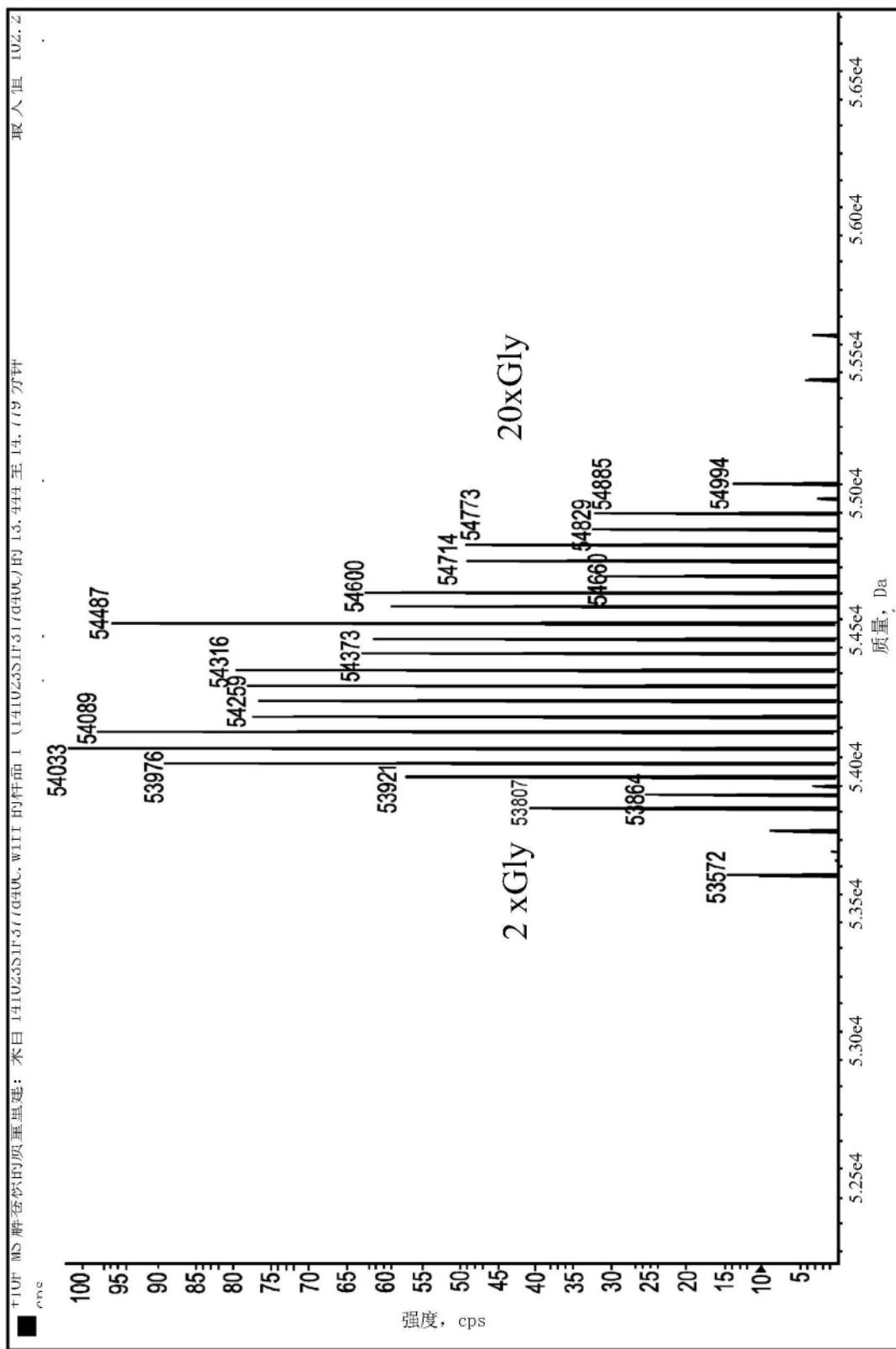


图7

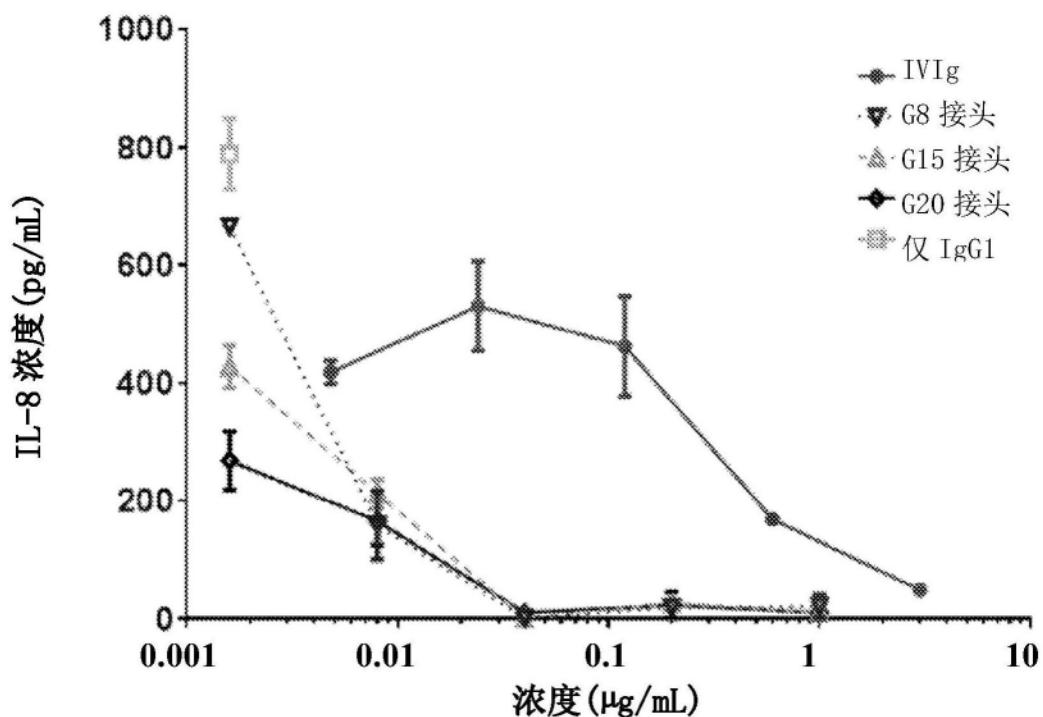


图8

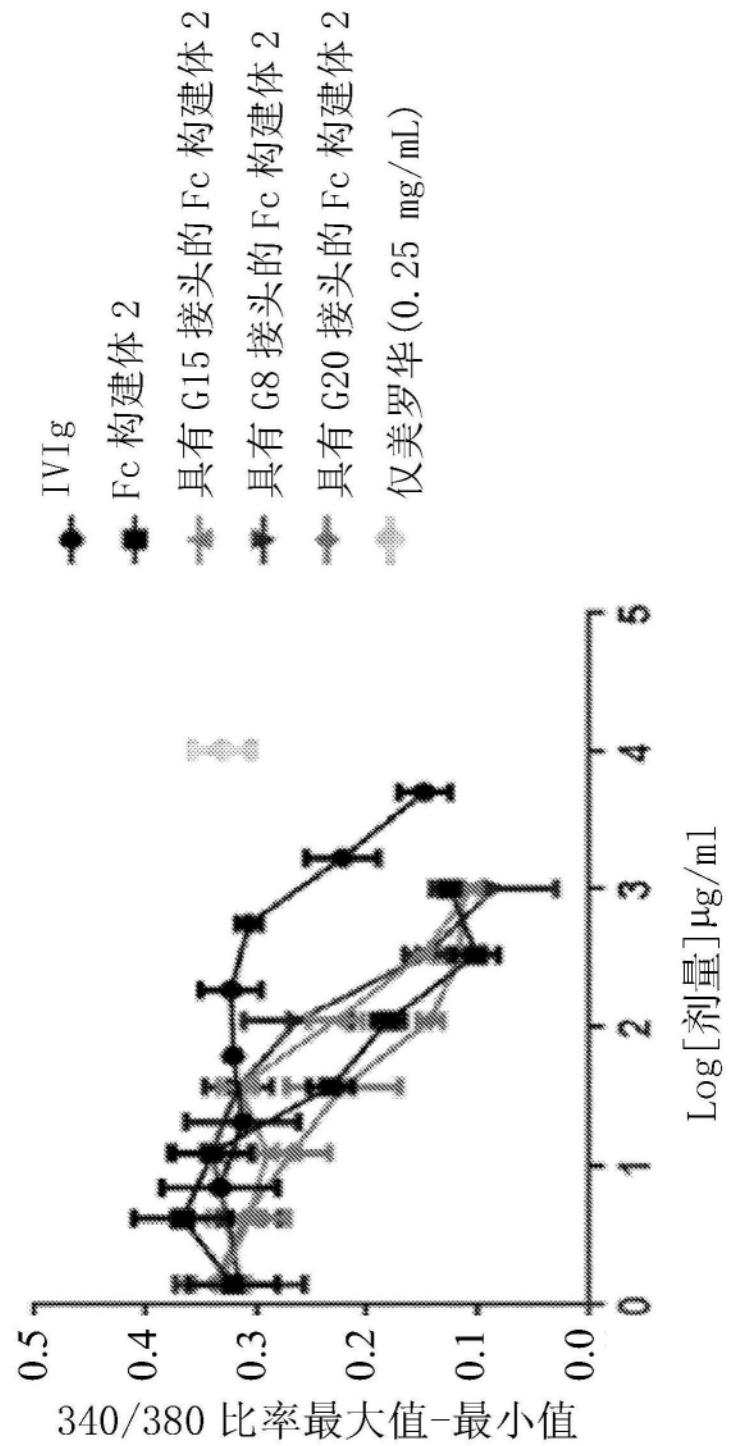


图9

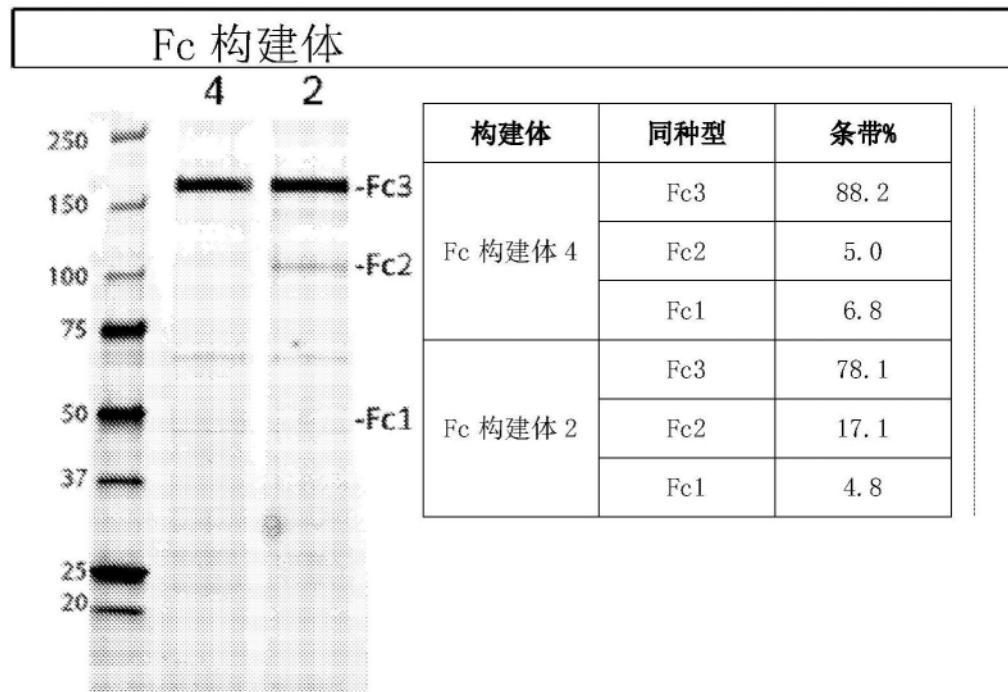


图10

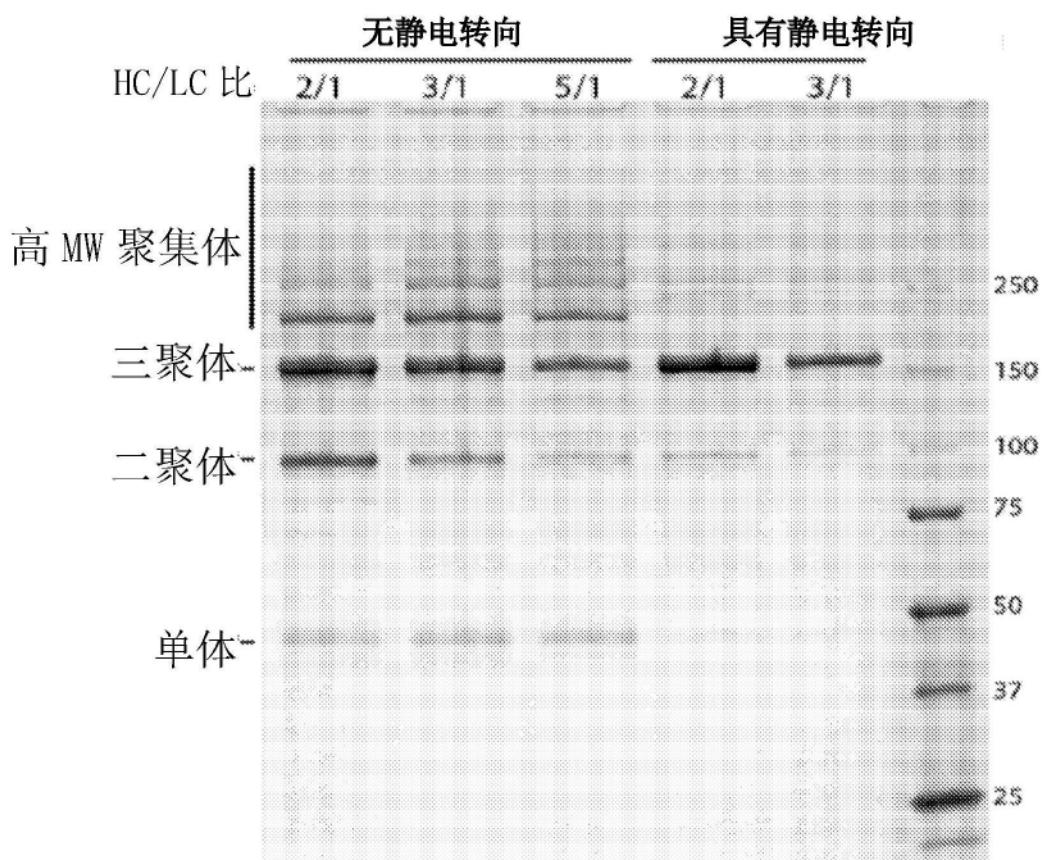


图11

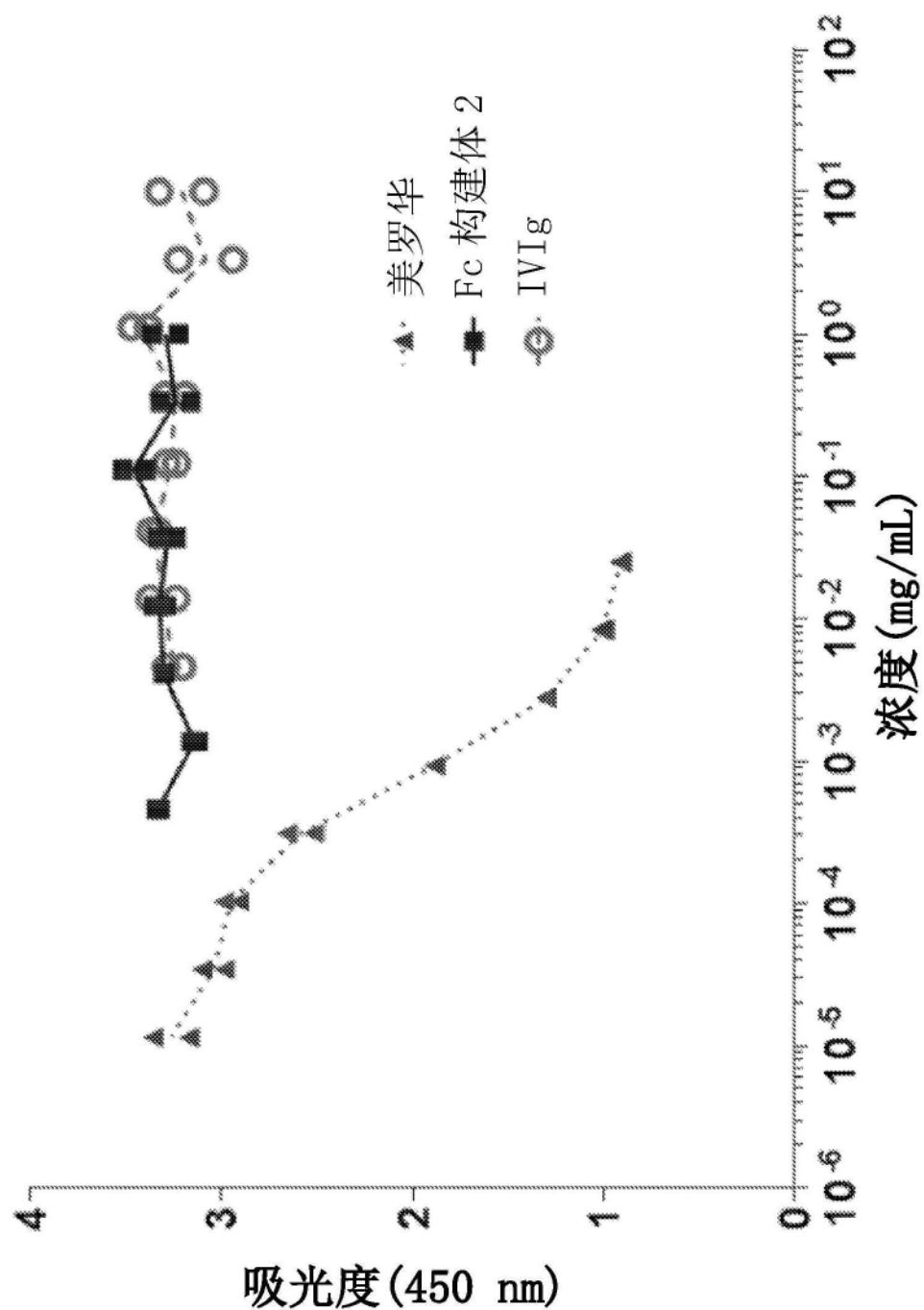


图12

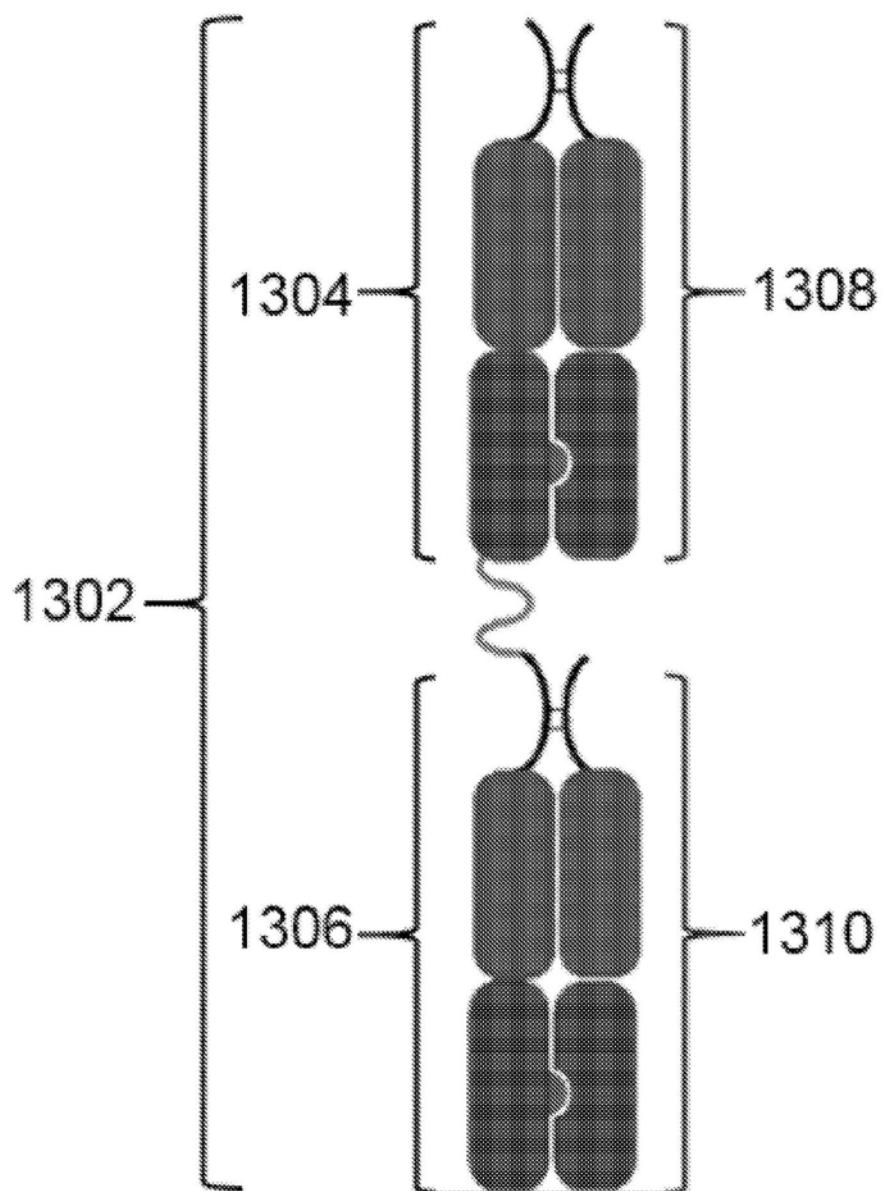


图13

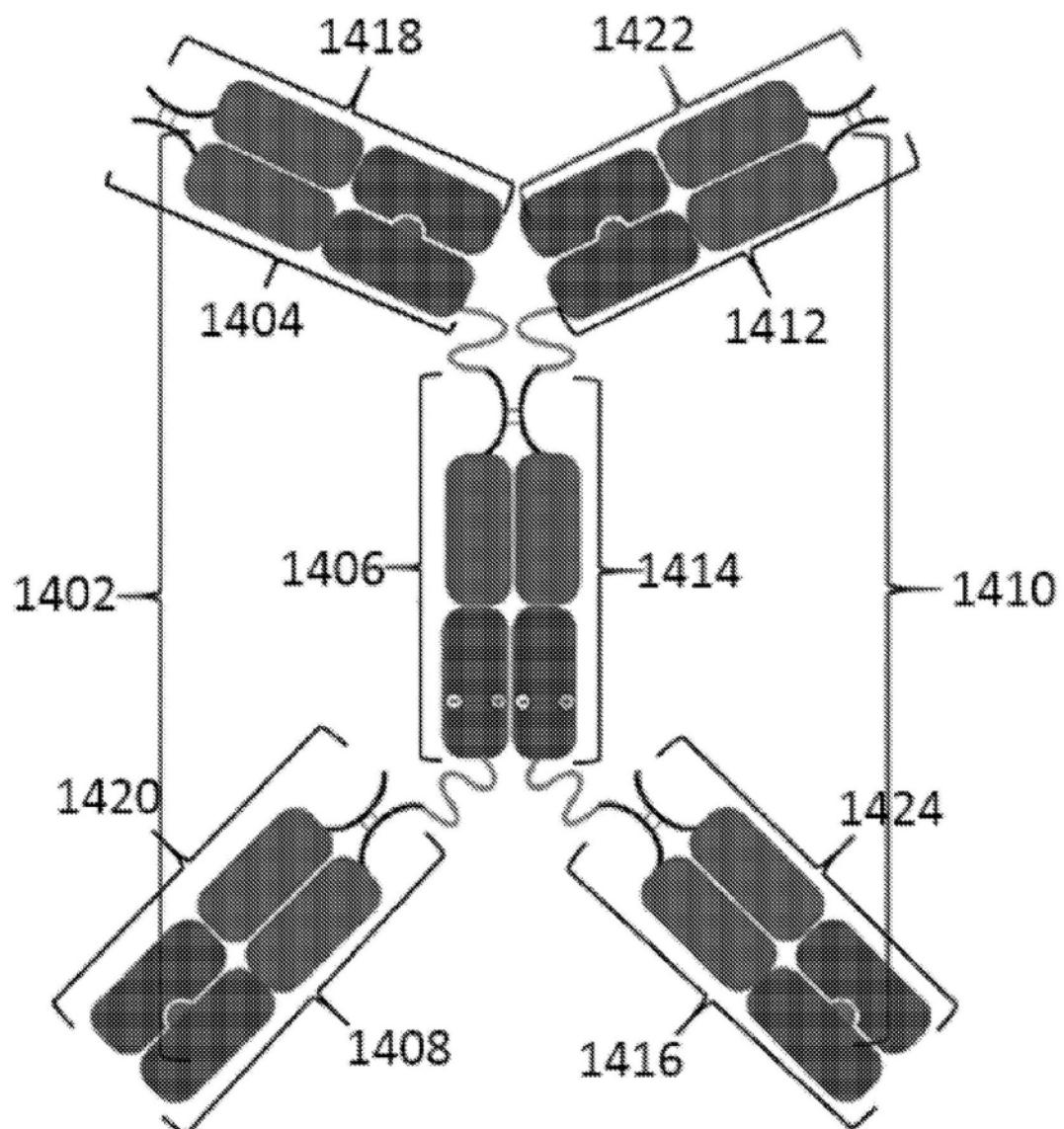


图14

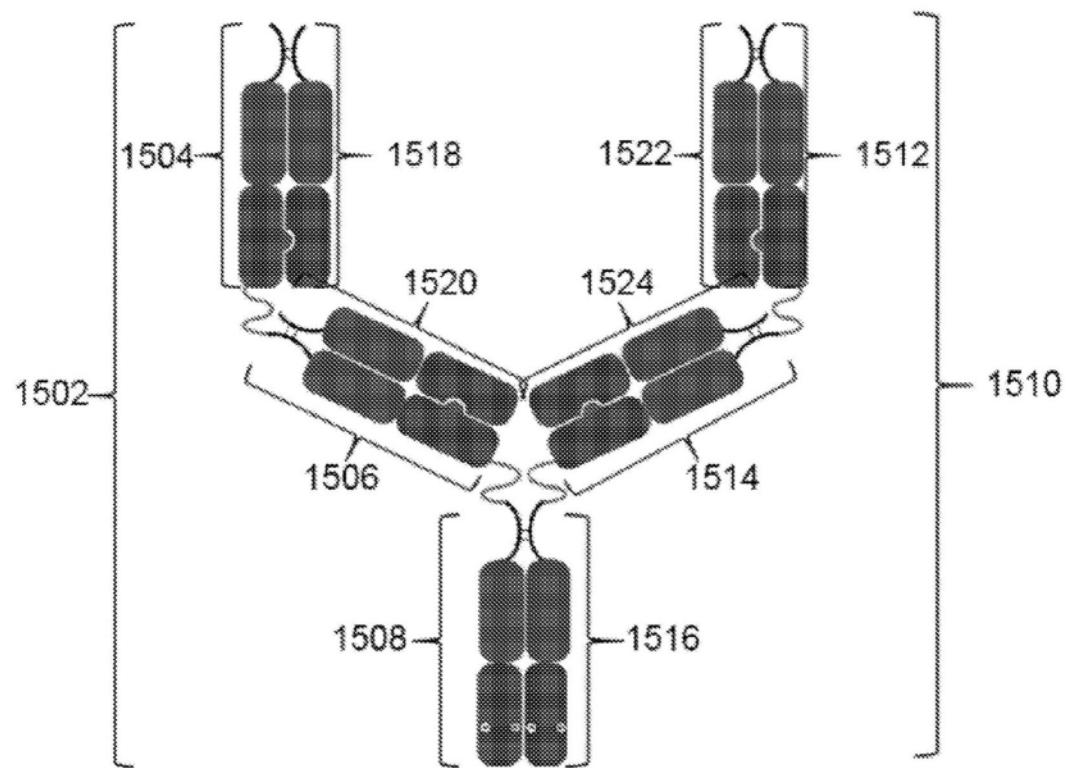


图15

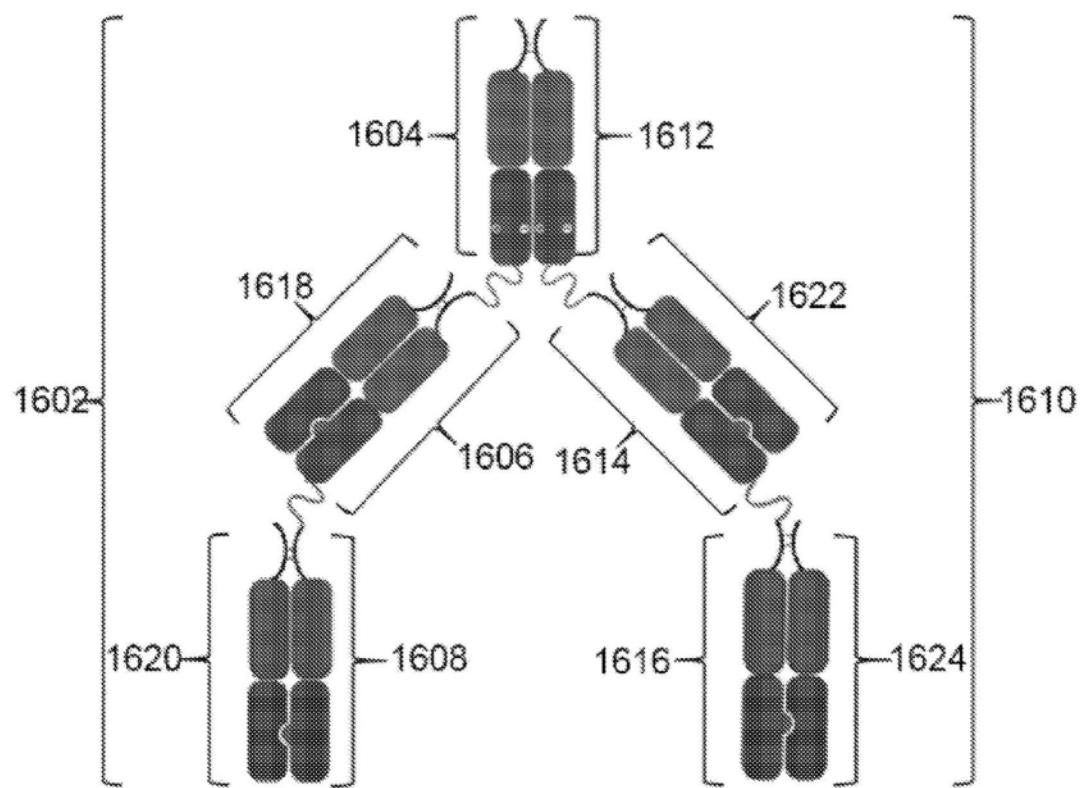


图16

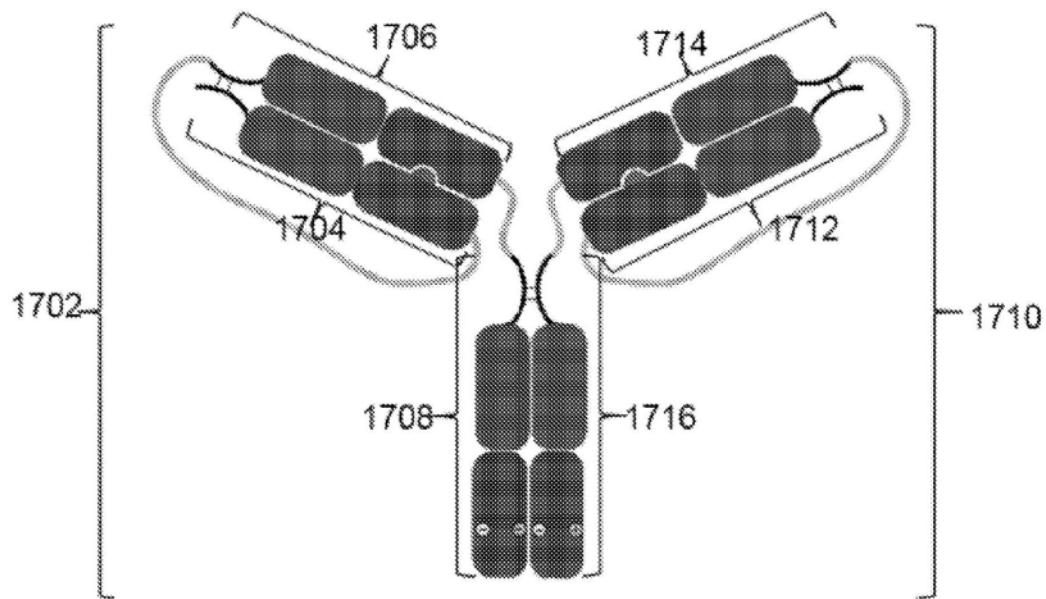


图17

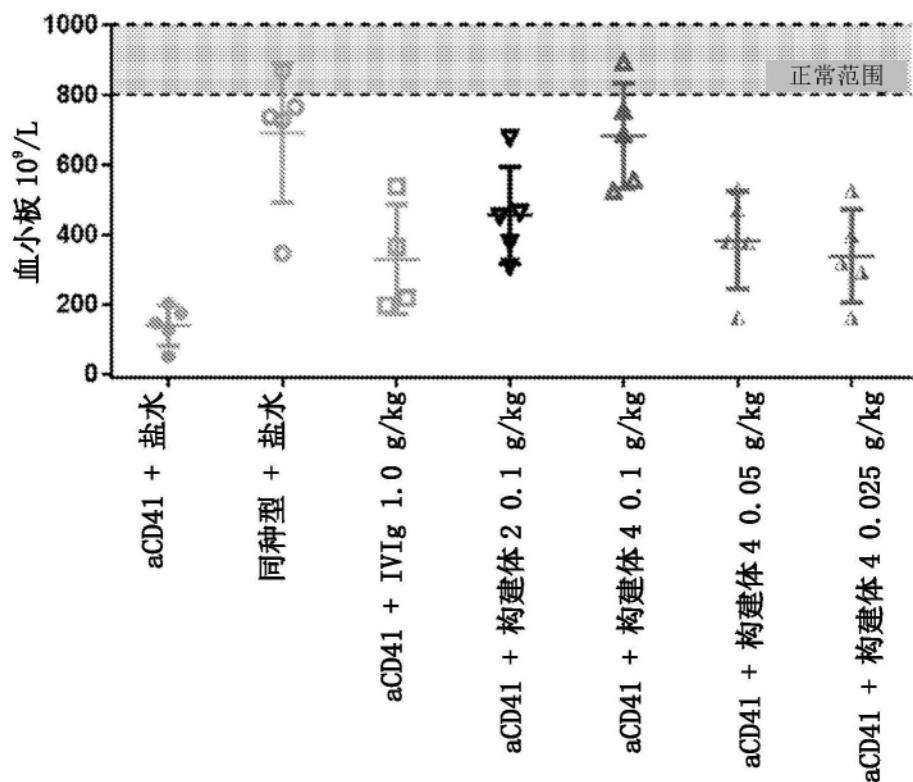


图18

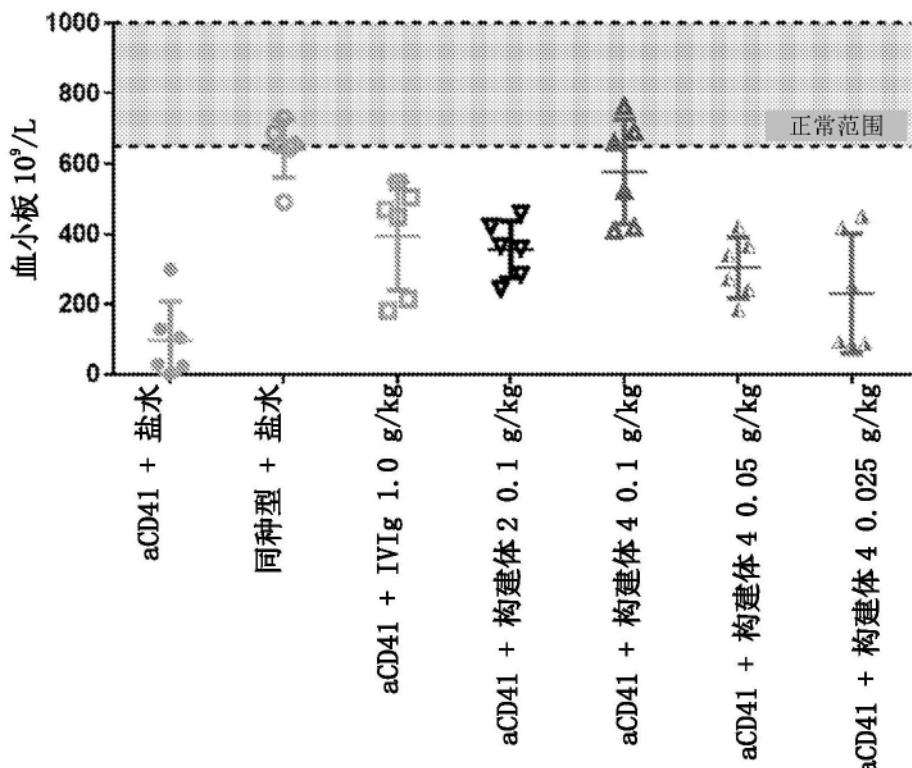


图19

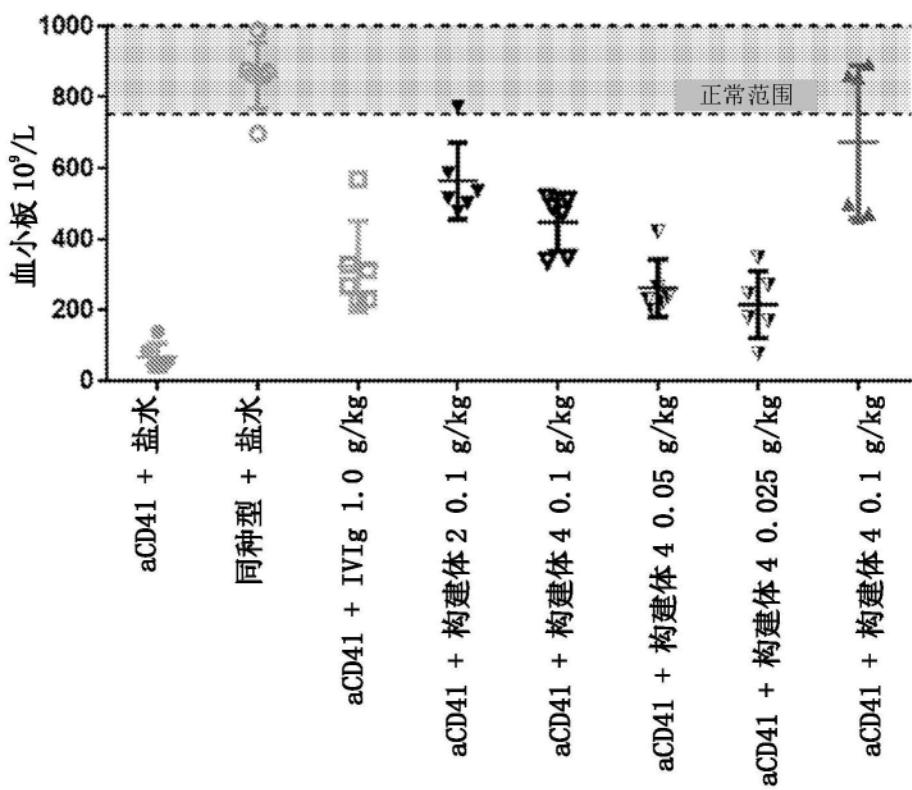


图20

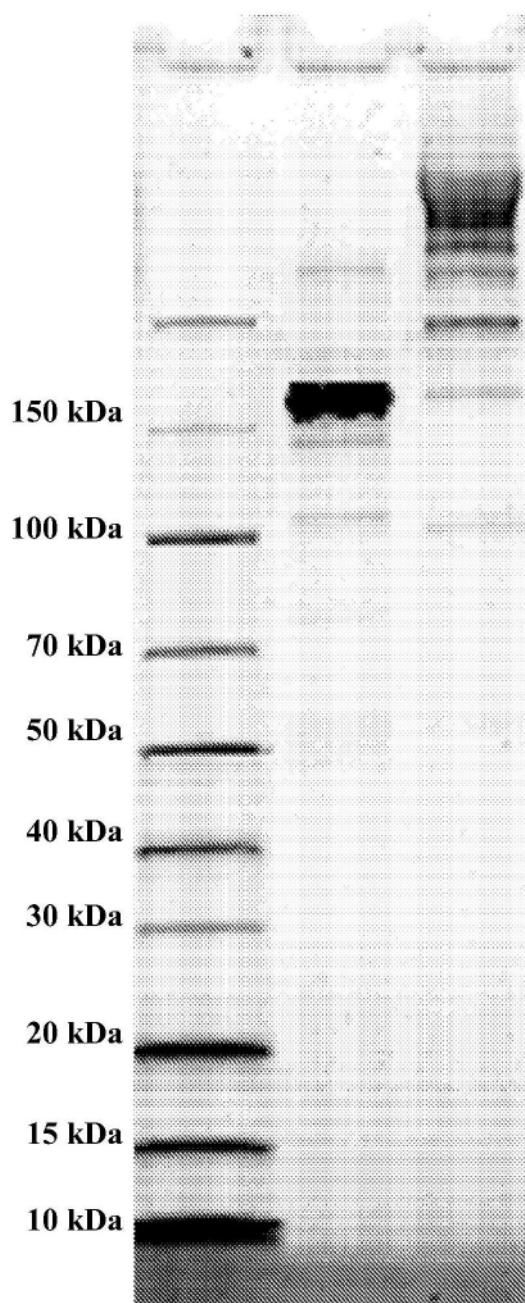


图21

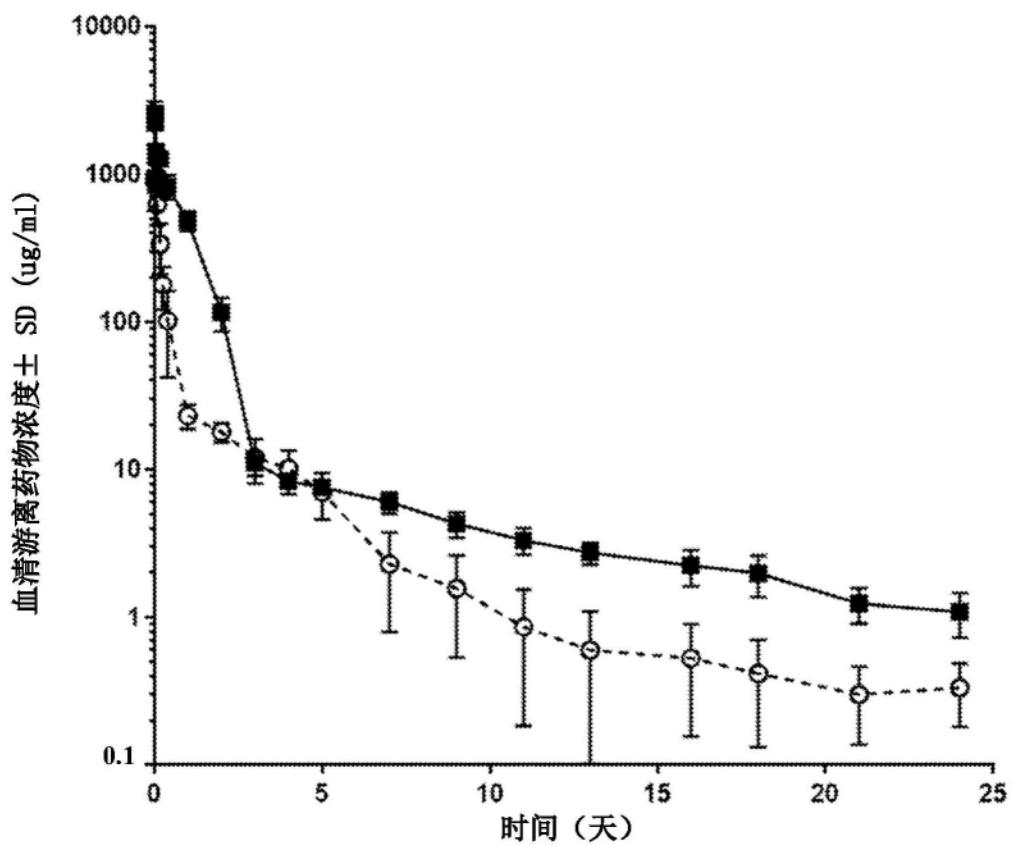


图22

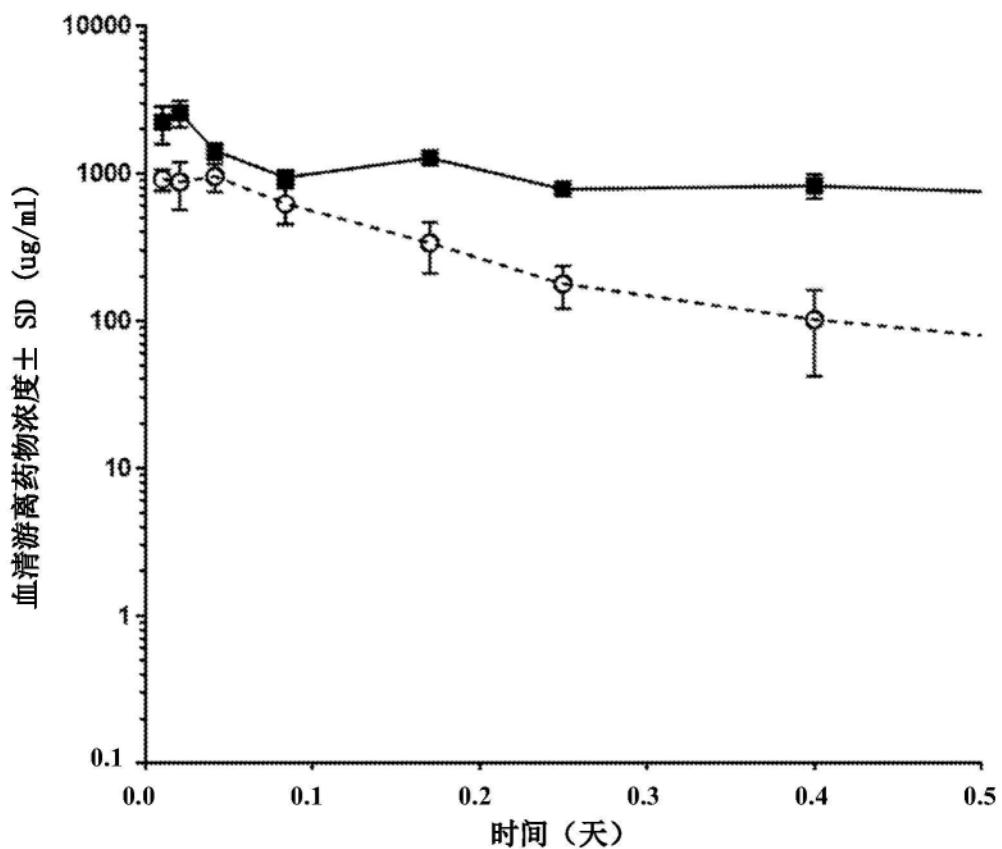


图23

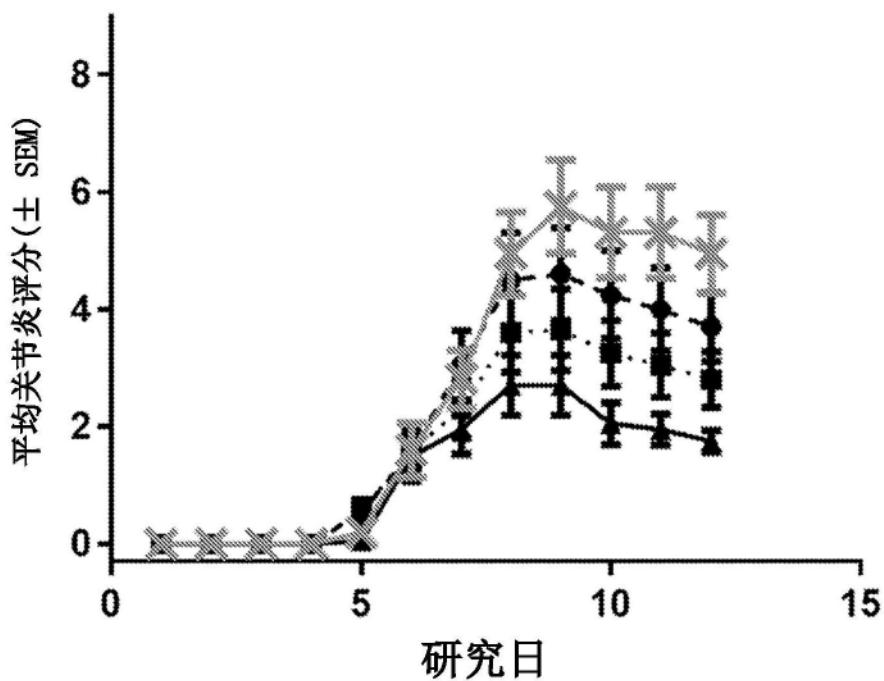


图24

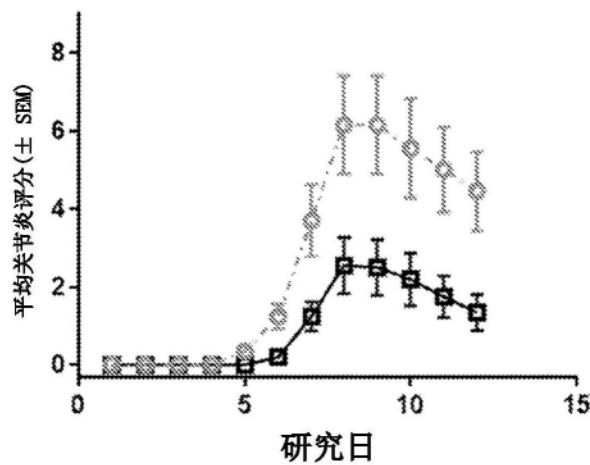


图25

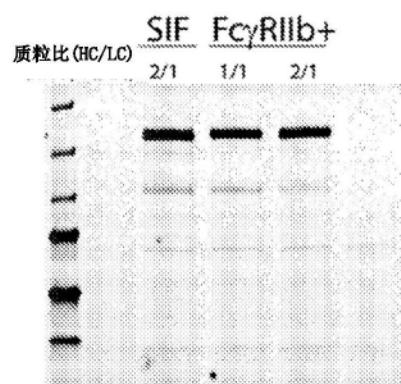


图26

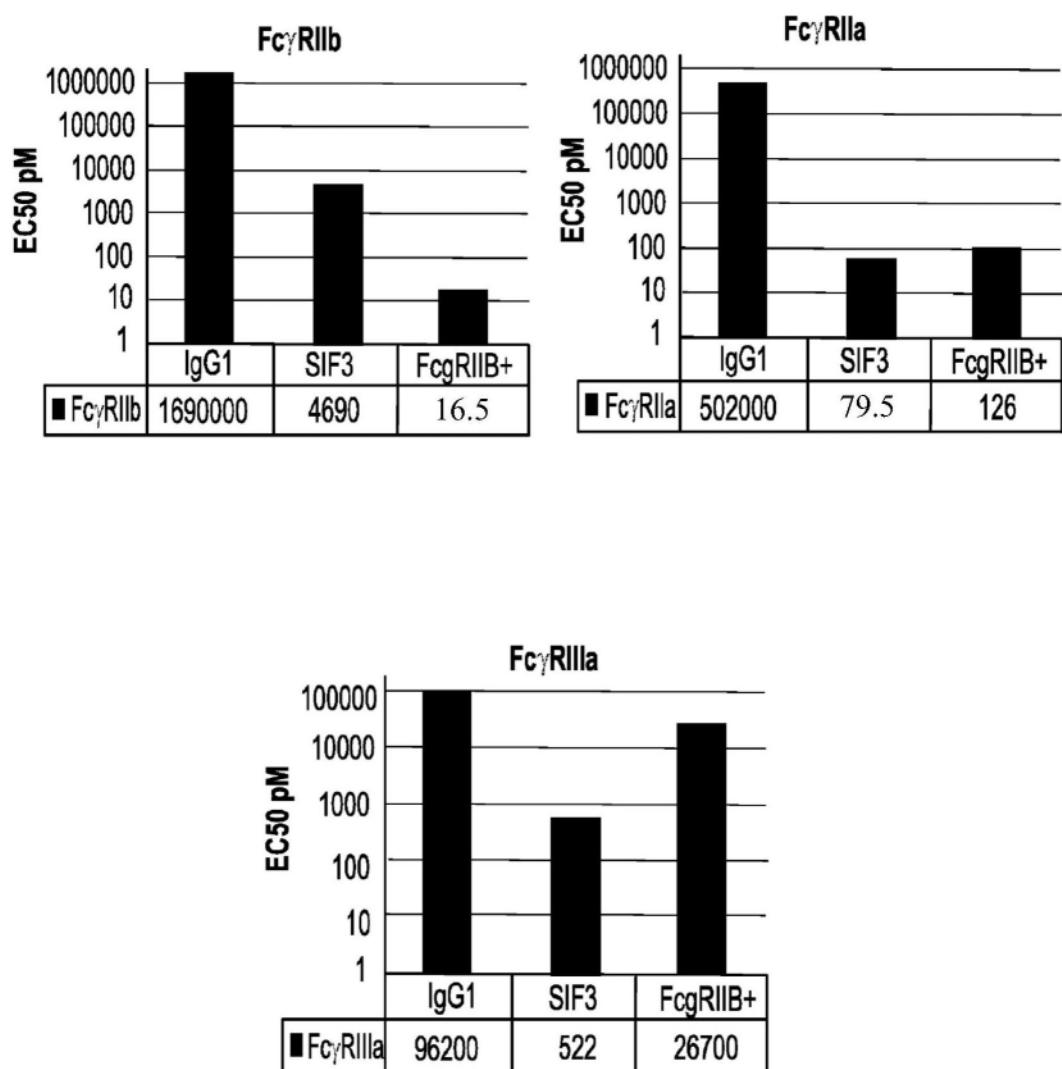


图27

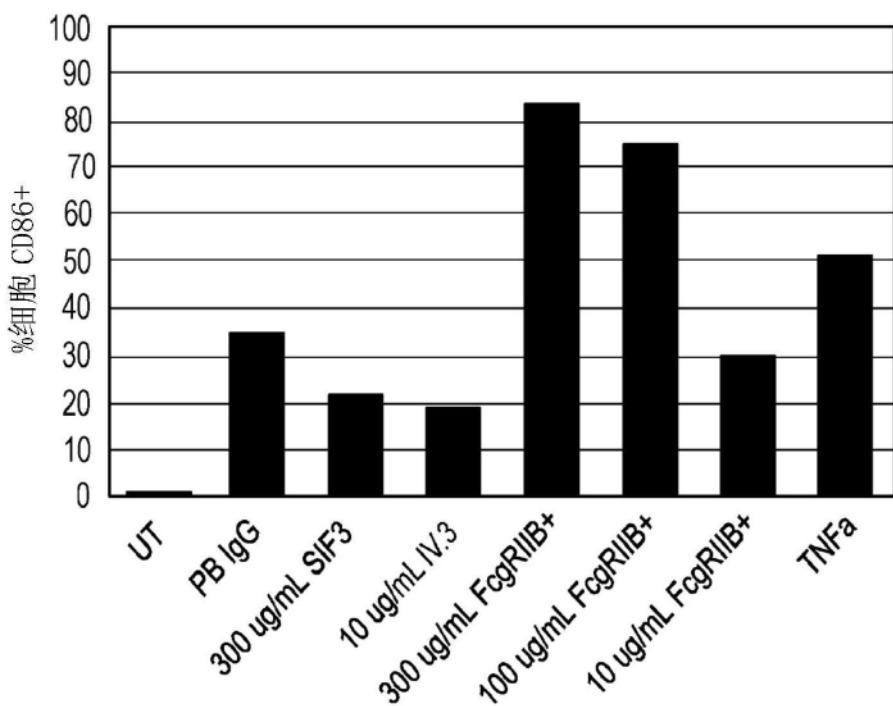


图28

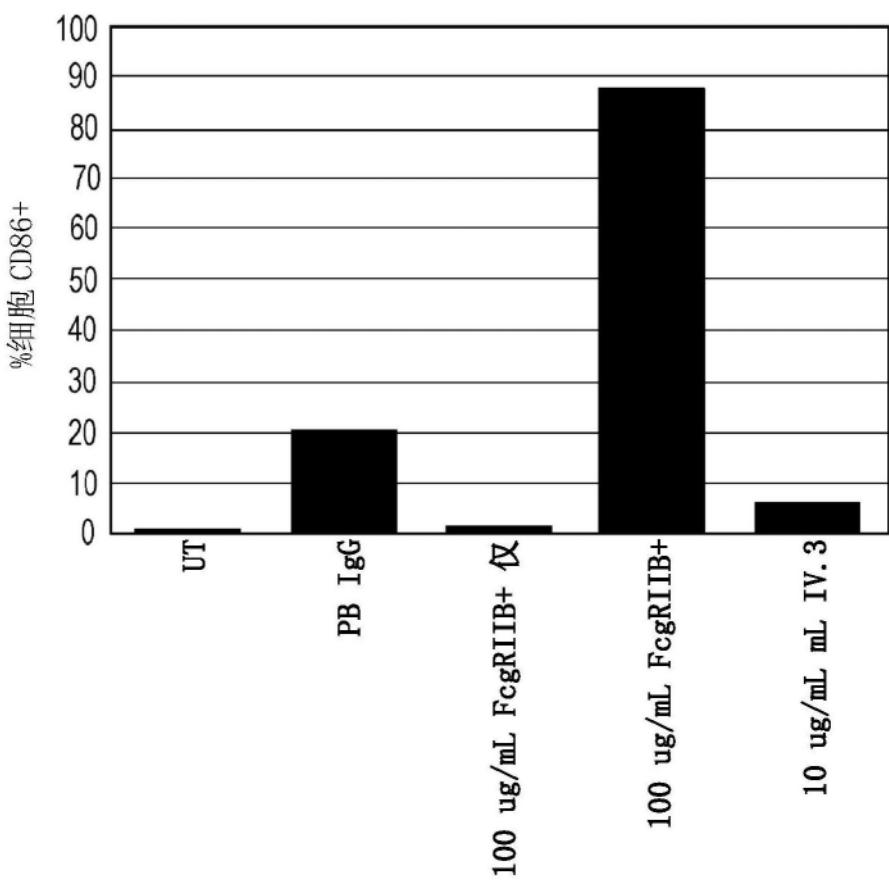


图29