



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117597365 A

(43) 申请公布日 2024. 02. 23

(21) 申请号 202280047414.2

(22) 申请日 2022.05.03

(30) 优先权数据

63/183,976 2021.05.04 US

63/333,293 2022.04.21 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.01.02

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/027413 2022.05.03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/235628 EN 2022.11.10

(71) 申请人 再生元制药公司

地址 美国纽约州

(72) 发明人 Y·沈 A·H·李 C·Y·林

N·S·阿瓦鲁 S·达维斯

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

专利代理师 邹宗亮

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

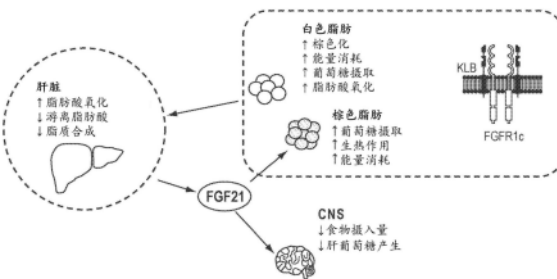
权利要求书5页 说明书88页
序列表51页 附图33页

(54) 发明名称

多特异性FGF21受体激动剂及其应用

(57) 摘要

包含与FGR1c、Klotho β (“KLB”)的GH1结构域和KLB的GH2结构域结合的至少三个抗原结合位点的多特异性结合分子(MBM), 含有MBM的药物组合物, 使用MBM和药物组合物治疗代谢疾病的方法, 编码MBM的核酸, 工程化以表达MBM的细胞以及产生MBM的方法。



1. 方法, 其包括向受试者施用多特异性结合分子 (MBM) 或包含所述MBM的药物组合物, 其中所述MBM包含:

(a) 特异性结合人成纤维细胞生长因子受体1c同种型 (“FGFR1c”) 的抗原结合模块1 (ABM1);

(b) 特异性结合人klotho β (“KLB”) GH1结构域的抗原结合模块2 (ABM2); 和

(c) 特异性结合人KLB的GH2结构域的抗原结合模块3 (ABM3)。

2. 权利要求1所述的方法, 其是三特异性结合分子 (“TBM”)。

3. 权利要求1或权利要求2所述的方法, 其中ABM1是scFv或Fab。

4. 权利要求1至3中任一项所述的方法, 其中ABM2是scFv或Fab。

5. 权利要求1至4中任一项所述的方法, 其中ABM3是scFv或Fab。

6. 权利要求1至5中任一项所述的方法, 其中所述MBM包含Fc异二聚体。

7. 权利要求6所述的方法, 其中所述MBM包含:

(a) 第一多肽链, 其在N至C末端方向上包含 (i) scFv, 其可操作地连接至 (ii) 第一Fab的第一重链区, 所述第一Fab的第一重链区可操作地连接至 (iii) Fc结构域;

(b) 第二多肽链, 其在N至C末端方向上包含 (i) 第二Fab的第二重链区, 所述第二Fab的第二重链区可操作地连接至 (ii) Fc结构域;

(c) 第三多肽链, 其包含与所述第一重链区配对以形成所述第一Fab的第一轻链;

(d) 第四多肽链, 其包含与所述第二重链区配对以形成所述第二Fab的第二轻链。

8. 权利要求7所述的方法, 其中ABM1是所述第一Fab。

9. 权利要求8所述的方法, 其中ABM2是所述scFv并且ABM3是所述第二Fab。

10. 权利要求8所述的方法, 其中ABM2是所述第二Fab并且ABM3是所述scFv。

11. 权利要求7至10中任一项所述的方法, 其中所述scFv经由接头连接至所述第一重链区。

12. 权利要求11所述的方法, 其中所述接头的长度为5个氨基酸至45个氨基酸。

13. 权利要求11所述的方法, 其中所述接头的长度为7个氨基酸至30个氨基酸。

14. 权利要求6所述的方法, 其中所述MBM包含:

(a) 第一多肽链, 其在N至C末端方向上包含 (i) 第一Fab的第一重链区, 所述第一Fab的第一重链区可操作地连接至 (ii) 第二Fab的第二重链区, 所述第二Fab的第二重链区可操作地连接至 (iii) Fc结构域;

(b) 第二多肽链, 其在N至C末端方向上包含 (i) 第三Fab的第三重链区, 所述第三Fab的第三重链区可操作地连接至 (ii) Fc结构域;

(c) 第三多肽链, 其包含与所述第一重链区配对以形成所述第一Fab的第一轻链;

(d) 第四多肽链, 其包含与所述第二重链区配对以形成所述第二Fab的第二轻链; 和

(e) 第五多肽链, 其包含与所述第三重链区配对以形成所述第三Fab的第三轻链。

15. 权利要求14所述的方法, 其中所述第一Fab、第二Fab和第三Fab仅是抗原结合分子。

16. 权利要求14或权利要求15所述的方法, 其中ABM1是所述第二Fab。

17. 权利要求16所述的方法, 其中ABM2是所述第一Fab并且ABM3是所述第三Fab。

18. 权利要求16所述的方法, 其中ABM3是所述第一Fab并且ABM2是所述第三Fab。

19. 权利要求1至18中任一项所述的方法, 其中所述受试者患有代谢病症。

20. 权利要求1至19中任一项所述的方法,其中所述MBM是三价MBM。
21. 权利要求1至20中任一项所述的方法,其中所述MBM包含恒定结构域的异二聚体对。
22. 权利要求126所述的方法,其中每个恒定结构域包含具有降低的效应功能的铰链序列。
23. 权利要求137所述的方法,其中所述铰链序列包含或组成为SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:70和SEQ ID NO:71中任一个的氨基酸序列。
24. 权利要求137或权利要求138所述的方法,其中每个恒定结构域包含与SEQ ID NO:46具有至少90%序列同一性的氨基酸序列,其中:
- (a) 两个恒定结构域都包含在氨基酸位置233-236(EU编号)处的P-V-A-缺失序列;
 - (b) 一个恒定结构域包含杆突变T366W并且另一个恒定结构域包含臼突变T366S、L368A和Y407V;
 - (c) 任选地,一个或两个恒定结构域包含star突变H435R和Y436F;和
 - (d) 两个恒定结构域都包含或都不包含二硫键结构突变S354C或E356C。
25. 权利要求137或权利要求138所述的方法,其中所述恒定结构域各自包含与SEQ ID NO:49(hIgG1 N180G,也称为hIgG1 N297G)具有至少90%序列同一性的氨基酸序列,其中:
- (a) 两个恒定结构域都包含所述N180G/N297G氨基酸取代;
 - (b) 一个恒定结构域包含杆突变T366W并且另一个恒定结构域包含臼突变T366S、L368A和Y407V;
 - (c) 任选地,一个或两个恒定结构域包含star突变H435R和Y436F;和
 - (d) 两个恒定结构域都包含或都不包含二硫键结构突变S354C或E356C。
26. 权利要求137或权利要求138所述的方法,其中所述恒定结构域各自包含与SEQ ID NO:53(hIgG4 S108P,也称为hIgG4 S228P)具有至少90%序列同一性的氨基酸序列,其中:
- (a) 两个恒定结构域都包含所述S108P/S228P取代;
 - (b) 一个恒定结构域包含杆突变T366W并且另一个恒定结构域包含臼突变T366S、L368A和Y407V;
 - (c) 任选地,一个或两个恒定结构域包含star突变H435R和Y436F;和
 - (d) 两个恒定结构域都包含或都不包含二硫键结构突变S354C或E356C。
27. 权利要求137和权利要求138所述的方法,其中所述恒定结构域各自包含与SEQ ID NO:54(具有S108P(也称为hIgG4 S228P)取代的变体IgG4以及IgG1 CH2和CH3结构域)具有至少90%序列同一性的氨基酸序列,其中:
- (a) 两个恒定结构域都包含所述S108P/S228P氨基酸取代;
 - (b) 一个恒定结构域包含杆突变T366W并且另一个恒定结构域包含臼突变T366S、L368A和Y407V;
 - (c) 任选地,一个或两个恒定结构域包含star突变H435R和Y436F;和
 - (d) 两个恒定结构域都包含或都不包含二硫键结构突变S354C或E356C。
28. 多特异性结合分子(MBM),其包含:
- (a) 特异性结合人成纤维细胞生长因子受体1c同种型("FGFR1c")的抗原结合模块1(ABM1);
 - (b) 特异性结合人klotho β ("KLB")的GH1结构域的抗原结合模块2(ABM2);和

- (c) 特异性结合人KLB的GH2结构域的抗原结合模块3 (ABM3)。
29. 权利要求28所述的MBM, 其是三特异性结合分子 (“TBM”)。
30. 权利要求28或权利要求29所述的MBM, 其中ABM1是Fab或scFv。
31. 权利要求28至30中任一项所述的MBM, 其中ABM2是Fab或scFv。
32. 权利要求28至31中任一项所述的MBM, 其中ABM3是Fab或scFv。
33. 权利要求28至32中任一项所述的MBM, 其包含Fc异二聚体。
34. 权利要求33所述的MBM, 其包含:
- (a) 第一多肽链, 其在N至C末端方向上包含 (i) scFv, 其可操作地连接至 (ii) 第一Fab的第一重链区, 所述第一Fab的第一重链区可操作地连接至 (iii) Fc结构域;
- (b) 第二多肽链, 其在N至C末端方向上包含 (i) 第二Fab的第二重链区, 所述第二Fab的第二重链区可操作地连接至 (ii) Fc结构域;
- (c) 第三多肽链, 其包含与所述第一重链区配对以形成所述第一Fab的第一轻链;
- (d) 第四多肽链, 其包含与所述第二重链区配对以形成所述第二Fab的第二轻链。
35. 权利要求34所述的MBM, 其中ABM1是所述第一Fab。
36. 权利要求35所述的MBM, 其中ABM2是所述scFv并且ABM3是所述第二Fab。
37. 权利要求35所述的MBM, 其中ABM2是所述第二Fab并且ABM3是所述scFv。
38. 权利要求34至37中任一项所述的MBM, 其中所述scFv经由接头连接至所述第一重链区。
39. 权利要求38所述的MBM, 其中所述接头的长度为5个氨基酸至45个氨基酸。
40. 权利要求38所述的MBM, 其中所述接头的长度为7个氨基酸至30个氨基酸。
41. 权利要求33所述的MBM, 其包含:
- (a) 第一多肽链, 其在N至C末端方向上包含 (i) 第一Fab的第一重链区, 所述第一Fab的第一重链区可操作地连接至 (ii) 第二Fab的第二重链区, 所述第二Fab的第二重链区可操作地连接至 (iii) Fc结构域;
- (b) 第二多肽链, 其在N至C末端方向上包含 (i) 第三Fab的第三重链区, 所述第三Fab的第三重链区可操作地连接至 (ii) Fc结构域;
- (c) 第三多肽链, 其包含与所述第一重链区配对以形成所述第一Fab的第一轻链;
- (d) 第四多肽链, 其包含与所述第二重链区配对以形成所述第二Fab的第二轻链; 和
- (e) 第五多肽链, 其包含与所述第三重链区配对以形成所述第三Fab的第三轻链。
42. 权利要求41所述的MBM, 其中所述第一Fab、第二Fab和第三Fab仅是抗原结合模块。
43. 权利要求41或权利要求42所述的MBM, 其中ABM1是所述第二Fab。
44. 权利要求43所述的MBM, 其中ABM2是所述第一Fab并且ABM3是所述第三Fab。
45. 权利要求43所述的MBM, 其中ABM3是所述第一Fab并且ABM2是所述第三Fab。
46. 权利要求28至45中任一项所述的MBM, 其是三价MBM。
47. 权利要求28至46中任一项所述的MBM, 其包含恒定结构域的异二聚体对。
48. 权利要求28至47所述的MBM, 其中每个恒定结构域包含具有降低的效应功能的铰链序列。
49. 权利要求28至48所述的MBM, 其中所述铰链序列包含或组成为SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:70和SEQ ID NO:71中任一个的氨基酸序列。

50. 权利要求287至49中任一项所述的MBM, 其中每个恒定结构域包含与SEQ ID NO:46具有至少90%序列同一性的氨基酸序列, 其中:

(a) 两个恒定结构域都包含在氨基酸位置233-236 (EU编号) 处的P-V-A-缺失序列;

(b) 一个恒定结构域包含杵突变T366W并且另一个恒定结构域包含臼突变T366S、L368A和Y407V;

(c) 任选地, 一个或两个恒定结构域包含star突变H435R和Y436F; 和

(d) 两个恒定结构域都包含或都不包含二硫键结构突变S354C或E356C。

51. 权利要求287至49中任一项所述的MBM, 其中所述恒定结构域各自包含与SEQ ID NO:49 (hIgG1 N180G, 也称为hIgG1 N297G) 具有至少90%序列同一性的氨基酸序列, 其中:

(a) 两个恒定结构域都包含所述N180G/N297G氨基酸取代;

(b) 一个恒定结构域包含杵突变T366W并且另一个恒定结构域包含臼突变T366S、L368A和Y407V;

(c) 任选地, 一个或两个恒定结构域包含star突变H435R和Y436F; 和

(d) 两个恒定结构域都包含或都不包含二硫键结构突变S354C或E356C。

52. 权利要求287至49中任一项所述的MBM, 其中所述恒定结构域各自包含与SEQ ID NO:53 (hIgG4 S108P, 也称为hIgG4 S228P) 具有至少90%序列同一性的氨基酸序列, 其中:

(a) 两个恒定结构域都包含所述S108P/S228P氨基酸取代;

(b) 一个恒定结构域包含杵突变T366W并且另一个恒定结构域包含臼突变T366S、L368A和Y407V;

(c) 任选地, 一个或两个恒定结构域包含star突变H435R和Y436F; 和

(d) 两个恒定结构域都包含或都不包含二硫键结构突变S354C或E356C。

53. 权利要求287至49中任一项所述的MBM, 其中所述恒定结构域各自包含与SEQ ID NO:54 (具有S108P (也称为hIgG4 S228P) 取代的变体IgG4以及IgG1 CH2和CH3结构域) 具有至少90%序列同一性的氨基酸序列, 其中:

(a) 两个恒定结构域都包含所述S108P/S228P氨基酸取代;

(b) 一个恒定结构域包含杵突变T366W并且另一个恒定结构域包含臼突变T366S、L368A和Y407V;

(c) 任选地, 一个或两个恒定结构域包含star突变H435R和Y436F; 和

(d) 两个恒定结构域都包含或都不包含二硫键结构突变S354C或E356C。

54. 药物组合物, 其包含权利要求28至325中任一项所述的MBM。

55. 方法, 其包含向受试者施用权利要求28至53中任一项所述的MBM或权利要求54所述的药物组合物。

56. 权利要求55所述的方法, 其中所述MBM或所述药物组合物以有效量施用于受试者以:

(a) 治疗代谢病况; 和/或

(b) 改善代谢。

57. 权利要求55或权利要求56所述的方法, 其中所述受试者患有代谢病症。

58. 一种核酸或多种核酸, 其编码权利要求28至325中任一项所述的MBM。

59. 细胞, 其被工程化以表达权利要求28至325中任一项所述的MBM。

60. 用一种或多种表达载体转染的细胞,所述表达载体包含在一种或多种启动子的控制下编码权利要求28至325中任一项所述的MBM的一种或多种核酸序列。

61. 生产MBM的方法,其包括:

- (a) 在表达所述MBM的条件下培养权利要求59或权利要求60所述的细胞;和
- (b) 从细胞培养物中回收所述MBM。

62. 权利要求61所述的方法,其进一步包括对所述MBM进行富集。

63. 权利要求61或权利要求62所述的方法,其进一步包括纯化所述MBM。

多特异性FGF21受体激动剂及其应用

[0001] 1. 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求享有2021年5月4日提交的美国临时专利申请号63/183,976和2022年4月21日提交的美国临时申请号63/333,293的权益,其中每篇的全部内容均通过引用并入本文。

[0003] 2. 序列表

[0004] 本申请包含序列表,该序列表已以ASCII格式电子提交且其全部内容通过引用并入本文。所述ASCII副本于2022年4月28日创建,被命名为RGN-004WO_SL.txt,并且大小为103,195字节。

3. 背景技术

[0005] 成纤维细胞生长因子21 (FGF21) 是在肝脏中高水平合成的蛋白质,其在多个组织中的能量稳态的许多方面发挥旁分泌和内分泌控制作用。FGF21作用于由两种蛋白质组成的细胞表面受体复合物:FGF受体 (FGFR) 和称为 β -Klotho (KLB) 的共受体蛋白。FGF21直接与这两种蛋白结合以激活FGFR信号传导活性 (Kuro-O, 2018, Nature 552:409-410; Lee等人, 2018, Nature 553:501-505)。

[0006] FGF受体是具有三个胞外免疫球蛋白型结构域 (D1-D3) 和一个胞内酪氨酸激酶结构域的单次跨膜受体蛋白。KLB是I型膜蛋白,由信号序列、大的胞外配体结合区、单次跨膜结构域和小胞质区组成 (Kuro-O, 2012, Adv Exp Med Biol 728:25-40)。KLB的胞外配体结合区由称为GH1和GH2的串联重复组成,其氨基酸序列与糖苷水解酶家族1酶 (所谓的切糖酶) 相似,并与FGF21的C端尾部结合 (Lee等人, 2018, Nature 553:501-505)。

[0007] 在体外,FGF21可以通过与任何FGFR1c、FGFR2c和FGFR3c同种型复合的KLB起作用。然而,基因敲除 (KO) 分析和对FGFR1或FGFR1/KLB复合物特异性的激活抗体的研究表明,FGFR1c可能对FGF21的体内作用特别重要 (Adams等人, 2012, Molecular Metabolism 2:31-37; Foltz等人, 2012, Science Translational Medicine 4:162ra153; Kolumam等人, 2015, EBioMedicine 2:730-743; Lan等人, 2017, Cell Metabolism 26:709-718; Wu等人, 2011, Science Translational Medicine 3:113ra126)。

[0008] 在肥胖症和2型糖尿病的临床前模型中,用FGF21治疗可改善葡萄糖稳态并促进体重减轻,因此,FGF21作为用于治疗人类中代谢综合征的治疗剂吸引了相当大的关注 (参见,例如, Lewis等人, 2019, Trends in Endocrinology & Metabolism 30:491-504)。

[0009] 工程化的FGF21类似物在药理学水平上在动物模型中显示出代谢综合征表型的相当大的改善。然而,只有其中一些效果 (降低血脂异常和体重) 在人类中是明显的 (参见,例如, Zhang等人, 2015, Frontiers in Endocrinology 6:168)。为了解决这些缺点,已生成与KLB和FGFR1结合的双特异性抗体作为替代的FGF21激动剂 (参见,例如, Kolumam等人, 2015, EBioMedicine 2(7):730-743; U.S. Patent No. 9,884,919; Smith等人, 2013, PLoS One 8:e61432)。然而,如本文所证明的,双特异性抗体仅具有FGF21激动剂活性的一部分。

[0010] 因此,本领域需要更有效的FGF21激动剂。本公开解决了该需求以及本领域的其他

需求。

[0011] 4. 发明概述

[0012] 本公开提供了含有至少三个抗原结合位点(“ABS”)的多特异性结合分子(“MBMs”),其中第一个(“ABS1”)与FGFR1c结合,第二个(“ABS2”)与KLB的GH2结构域结合,第三个(“ABS3”)与KLB的GH2结构域结合。不受理论的束缚,据信除了MBM中的FGFR1c抗原结合位点之外,还包含两个针对KLB的抗原结合位点,其中一个针对GH1结构域,另一个针对GH2结构域,产生了KLB-FGFR1c-MBM复合物,其化学计量比双特异性抗体可达到的更大的FGFR1c激动作用。例如,在一些实施方案中,与相应的亲本单特异性抗体或双特异性抗体相比,MBM可以具有较低的结合靶分子的KD和/或在基于细胞的结合测定中具有更有效的EC50值(例如,如第7.5节中所述)。本公开的示例性MBM描述于下文第6.2节和具体实施方案181至326中。

[0013] 本公开进一步提供了编码本公开的MBM的核酸。编码MBM的核酸可以是单个核酸(例如,编码MBM的所有多肽链的载体)或多个核酸(例如,编码MBM的不同多肽链的两个或更多个载体)。本公开进一步提供了经工程改造以表达本公开的核酸和MBM的宿主细胞和细胞系。本公开还提供了产生本公开的MBM的方法。示例性核酸、宿主细胞、细胞系和产生MBM的方法描述于下文第6.4节以及具体实施方案348和353中。

[0014] 本公开进一步提供了包含本公开的MBM的药物组合物。示例性药物组合物描述于下文第6.5节以及具体实施方案327中。

[0015] 本文进一步提供了使用本公开的MBM和药物组合物的方法,例如用于治疗代谢病况和/或改善代谢。示例性方法描述于下文第6.6节和具体实施方案1至180和328至347中。在一些方面,该方法利用如第6.2节和具体实施方案181至326中描述的MBM。

5. 附图说明

[0016] 图1:FGF21调节的代谢途径示意图,FGF21是FGF家族的成员,充当内分泌激素。

[0017] 图2:新型KLB和FGFR1c结合剂的示意图:22414、22401和22393,其与KLB的GH1结构域结合;22532,其与KLB的GH2结构域结合;和ADI-19842,其与FGFR1c的D3结构域结合。

[0018] 图3:FGFR1c/KLB的FGFR1受体/共受体复合物中由双特异性结合分子(BBM) REGN4355、REGN 4366、REGN 4370、REGN 4376和REGN 4304结合的结构域的示意图。REGN4304靶向FGFR1c D2和KLB GH2,而其余双特异性结合分子靶向FGFR1c D3和KLB GH1结构域。

[0019] 图4:示出了与FGFR21相比,HEK293/SRE-luc/hFGFR1c/hKLB细胞中双特异性结合分子(BBM) REGN4366和REGN4304的适度激活的图。

[0020] 图5:图5显示了含有三个抗原结合部分(表示为“1”、“2”、“3”)的三特异性结合分子的示例性构型。从左上角顺时针方向:含有N末端scFv结构域的三特异性变体(2+1N-scFv构型);含有C末端scFv结构域的三特异性变体(2+1C-scFv构型);含有C末端Fab结构域的三特异性变体(2+1C-Fab构型);含有N末端Fab结构域的三特异性变体(2+1N-Fab构型)。三个抗原结合部分一起具有三个抗原结合位点,其以不特定的顺序与KLB的GH1结构域、KLB的GH2结构域和FGFR1c(例如,在D1、D2或D3结构域中)结合。

[0021] 图6A-6B:图6A显示了REGN4366的三特异性变体,其是靶向KLB的GH1结构域和

FGFR1c的D3结构域的双特异性结合分子,其通过在分子中的不同位置添加GH2结合臂而产生。从左上角顺时针方向:含有N末端scFv结构域的三特异性变体(2+1N-scFv构型);含有C末端scFv结构域的三特异性变体(2+1C-scFv构型);含有C末端Fab结构域的三特异性变体(2+1C-Fab构型);含有N末端Fab结构域的三特异性变体(2+1N-Fab构型)。图6B:显示了与接头长度变化相关的活性的条形图。

[0022] 图7A-7B:图7A是示出了在HEK293.SREI1uc.hFGFR1c.hKLB细胞报告基因测定中F1K_scFv6和F1K_Fab6与亲本REGN4366以及RGN4304相比增强的活性的图。图7A中的实心圆描绘了作为阳性对照的人FGF21的数据点。图7B是靶向GH2结构域以及其如何与更好的激动作用相关的示意图。

[0023] 图8A-8B:图8A是2+1N-scFv形式变体的筛选的示意图,包括接头变体(I);同种型变体(II);具有替代GH2结合序列的变体(III);以及具有替代GH1结合序列的变体。图8A按出现顺序分别公开了SEQ ID NO:55、24、73、57、74-75和44。图8B是2+1N-scFv形式的臂排列、距离和方向变体的筛选的示意图。

[0024] 图9:图9显示了评估称为scFv6的分子的六种接头长度变体(在(1)位置处含有称为22393(或393)的GH1结合剂,在(2)位置处含有称为ADI-19842或842的FGFR1结合剂,并且在(3)位置处含有scFv形式的称为22532(或532)的GH2结合剂)的研究结果。这些分子在FGFR1结合结构域和N末端532scFv结构域组分之间含有7至45个氨基酸的接头。scFv按照VL-VH的顺序配置,并且接头名称“L20H7”、“L20H15”、“L20H22”、“L20H30”、“L20H37”和“L20H45”是指分隔scFv的VL和VH的20个氨基酸接头,以及scFv C末端的7、15、22、30、37或45个氨基酸的接头,将scFv与相邻的VH分开。所有接头长度的三特异性结合分子均表现出比对照双特异性结合分子REGN4304更高的活性。

[0025] 图10A-10B:F1K_scFv6(30个氨基酸接头)和scFv6_LK7(7个氨基酸接头)在稳定表达hFGFR1c和hKLB的HEK293细胞中强烈激活FGFR1c信号传导。图10A:Western印迹示出了由于血清饥饿16小时,随后以1nM和10nM浓度的药物处理15分钟导致的通过ERK和PLC γ 磷酸化的药物浓度依赖性FGFR1c信号传导。图10B:Western印迹示出了由于血清饥饿16小时,随后以10nM浓度的药物处理15、30分钟以及1、2、4和6小时的孵育期,导致的通过ERK和PLC γ 磷酸化的时间依赖性FGFR1c信号传导。除非另有说明,否则图10A-10B中和本说明书中其他地方没有接头长度后缀的术语“F1K_scFv6”是指在scFv结构域(图5中的ABS3)和Fab结构域之间具有30个氨基酸接头的分子,并且有时被称为F1K_scFv6-LK30。

[0026] 图11A-11C:F1K_scFv6和Fab6激活原代人脂肪细胞中的ERK通路。图11A:Western印迹示出了原代人脂肪细胞中通过ERK和PLC γ 磷酸化的FGFR1c信号传导。脂肪细胞分化8天,然后血清饥饿4小时并用浓度为10nM的药物处理15分钟。图11B和11C:该图示出了使用基于FRET的p-ERK免疫捕获测定法,F1K_scFv6和F1K_Fab6相对于REGN1945和REGN4366增强的ERK活性。将分化的人皮下脂肪细胞培养一天以恢复,然后血清饥饿4小时并用药物处理15-60分钟。除非另有说明,否则图11A-11C中和本说明书中其他地方没有接头长度后缀的术语“F1K_scFv6”是指在scFv结构域(图5中的ABS3)和Fab结构域之间具有30个氨基酸接头的分子,并且有时被称为F1K_scFv6-LK30。除非另有说明,否则图11B-11C中和本说明书中的其他地方没有接头长度后缀的术语“F1K_Fab6”是指在ABS3的Fab结构域(如图5中的“3”所示)和Fc结构域之间具有30个氨基酸接头的分子,并且有时被称为F1K_Fab6-LK30。

[0027] 图12A-12B:FGFR1c、KLB和FGF21簇如何形成活性复合物(图12A)以及与双特异性和单特异性对照相比,FGFR1c和KLB受体与三特异性F1K_scFv6或F1K_Fab6之间形成的潜在化学计量复合物(图12B)的示意图。除非另有说明,否则图12B中和本说明书中的其他地方没有后缀的术语“F1K_scFv6”是指在scFv结构域(图5中的ABS3)和Fab结构域之间具有30个氨基酸接头的分子,并且有时被称为F1K_scFv6-LK30。除非另有说明,否则图12B中和本说明书中其他地方没有后缀的术语“F1K_Fab6”是指在ABS3的Fab结构域(如图5中的“3”所示)和Fc结构域之间具有30个氨基酸接头的分子,并且有时被称为F1K_Fab6-LK30。

[0028] 图13A-13D:与三特异性mAb(F1K_scFv6 IgG1和F1K_Fab6 IgG1)相比,单特异性结合分子(抗KLB;REGN4661)和双特异性结合分子(抗KLBxFGFR1c;REGN4304)以不同的化学计量结合KLB/FGFR1c。图13A:通过不对称流场流分离偶联多角度光散射(A4F-MALS)对REGN4661:KLB复合物(实线)进行分析。REGN4661(虚线)和KLB(点划线)的各个样品的分形图也被覆盖。显示了每个样品在215nm处的相对UV吸光度作为保留时间的函数,并指示了可分辨峰的测量摩尔质量。图13B:通过不对称流场流分离偶联多角度光散射(A4F-MALS)对REGN4303:KLB复合物(粗实线)和REGN4303:KLB:FGFR1c复合物(细实线)进行分析。REGN4303(虚线)、KLB(点划线)和FGFR1c(灰色点划线)的各个样品的分形图也被覆盖。显示了每个样品在215nm处的相对UV吸光度作为保留时间的函数,并指示了可分辨峰的测量摩尔质量。图13C:通过不对称流场流分离偶联多角度光散射(A4F-MALS)对F1K_scFv6 IgG1:KLB复合物(粗实线)和F1K_scFv6IgG1:KLB:FGFR1复合物(0.2 μ m:0.2 μ m:0.2 μ m,细实线)进行分析。显示了每个样品在215nm处的相对UV吸光度作为保留时间的函数,并指示了可分辨峰的测量摩尔质量。图13D:通过不对称流场流分离偶联多角度光散射(A4F-MALS)对F1K_scFv6 IgG1:KLB复合物(粗实线)和F1K_scFv6IgG1:KLB:FGFR1复合物(0.2 μ m:0.2 μ m:0.2 μ m,细实线)进行分析。显示了每个样品在215nm处的相对UV吸光度作为保留时间的函数,并指示了可分辨峰的测量摩尔质量。除非另有说明,否则图13C中和本说明书中的其他地方没有后缀的术语“F1K_scFv6”是指在scFv结构域(图5中的ABS3)和Fab结构域之间具有30个氨基酸接头的分子,并且有时被称为F1K_scFv6-LK30。除非另有说明,否则图13D中和本说明书中其他地方没有后缀的术语“F1K_Fab6”是指在ABS3的Fab结构域(如图5中的“3”所示)和Fc结构域之间具有30个氨基酸接头的分子,并且有时被称为F1K_Fab6-LK30。

[0029] 图14:图14描绘了人IgG1重链恒定区的野生型序列(人IGHG1重链恒定区;UniProt登录号P01857)。CH1=氨基酸1-98;上铰链=氨基酸99-108;核心铰链=109-112;下铰链=113-121;CH2=120-223;CH3=224-330。指示的氨基酸编号是相对于所描述的序列而言的。上部、核心和下部铰链区域加框显示。如图所示,下铰链的最后两个氨基酸对应于CH2结构域的前两个氨基酸。图14公开了SEQ ID NO:76。

[0030] 图15:图15描绘了人IgG2重链恒定区的野生型序列(人IGHG2重链恒定区;UniProt登录号P01859)。CH1=氨基酸1-98;上铰链=氨基酸99-105;核心铰链=106-109;下铰链=110-117;CH2=116-219;CH3=220-326。指示的氨基酸编号是相对于所描述的序列而言的。如图所示,下铰链的最后两个氨基酸对应于CH2结构域的前两个氨基酸。图15公开了SEQ ID NO:77。

[0031] 图16:图16描绘了人IgG4重链恒定区的野生型序列(人IGHG4重链恒定区;UniProt登录号P01861)。CH1=氨基酸1-98;上铰链=氨基酸99-105;核心铰链=106-109;下铰链=

110-118;CH2=117-220;CH3=221-227。指示的氨基酸编号是相对于所描述的序列而言的。如图所示,下铰链的最后两个氨基酸对应于CH2结构域的前两个氨基酸。图16公开了SEQ ID NO:78。

[0032] 图17:图17描绘了所述嵌合IgG重链恒定结构域构建体的上铰链、核心铰链、下铰链、CH2和CH3的氨基酸序列比对。指示的氨基酸编号为EU编号。下铰链的阴影单元表示氨基酸也对应于CH2结构域的第一个氨基酸。

[0033] 图18:图18描绘了显示包含IgG4 S108P/IgG4 S108P Star(H315R,Y316F)或IgG1 PVA/IgG1 PVA Star(H315R,Y316F)的异源二聚体的所描绘的F1K_scFv6接头长度变体在中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中稳定表达后的抗体效价的代表性数据。测试了Fab和scFv之间不同长度的接头。

[0034] 图19A-19G:图19A-19G描绘了代表性酶联免疫吸附测定(ELISA)数据,其显示了所述的对照和抗体与hFCR γ 1(图19A);hFCR γ 2A(H131)(图19B);hFCR γ 2A(R131)(图19C);hFCR γ 2B(图19D);hFCR γ 3A(V158)(图19E);hFCR γ 3A(F158)(图19F);和hFCR γ 3B(图19G)的结合。表7提供了对照和测试抗体的描述。

[0035] 图20:图20描绘了来自替代抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)测定的代表性结果,其中测试了具有不同Fc区的所示F1K_Fab6变体以及对照。

[0036] 图21:图21描绘了来自替代ADCC测定的代表性结果,其中测试了具有不同Fc区的所示F1K_Fab6变体以及对照。

[0037] 图22:图22描绘了来自荧光素酶报告基因测定的代表性结果,显示了具有不同Fc区的F1K_scFv6变体以及对照引起HEK293.SRE1uc.hFGFR1c.hKLB细胞的激活。

[0038] 图23:图23描绘了来自萤光素酶报告基因测定的代表性结果,显示了具有不同Fc区和接头长度的F1K_Fab6变体以及对照引起HEK293.SRE1uc.hFGFR1c.hKLB细胞的激活。

[0039] 图24:图24描绘了来自磷酸-ERK激活测定的代表性结果,显示了具有IgG4 S108P或IgG1 PVAFc区或His.hFGF21的F1K_scFv6和Fab6构建体在原代人脂肪细胞中引起激活。

[0040] 6.发明详述

[0041] 6.1定义

[0042] 如本文所用,以下术语具有以下含义:

[0043] 抗原结合位点或ABS:本文使用的术语“抗原结合位点”或“ABS”是指MBM中能够与靶分子特异性、非共价且可逆结合的部分。本公开的MBM包括第一ABS(“ABS1”)、第二ABS(“ABS2”)和第三ABS(“ABS3”)。

[0044] 缔合的:术语“缔合的”在MBM的上下文中是指两个或更多个多肽链之间的功能关系。具体地,术语“缔合的”意指两个或更多个多肽彼此缔合,例如通过分子相互作用非共价地缔合或通过一个或多个二硫桥或化学交联共价地缔合,以便产生功能性MBM,其中ABS1、ABS2和ABS3可以结合各自的靶标。可能存在于本公开的MBM中的缔合的实例包括(但不限于)Fc区中同二聚体或异二聚体Fc结构域之间的缔合、Fab或scFv中VH和VL区之间的缔合、Fab中CH1和CL之间的缔合、CH3和结构域替代的Fab中CH3之间的缔合。

[0045] 互补决定区或CDR:本文所用的术语“互补决定区”或“CDR”是指抗体可变区内赋予抗原特异性和结合亲和力的氨基酸序列。一般来说,每个重链可变区有3个CDR(CDR-H1、CDR-H2、HCDR-H3),每个轻链可变区有3个CDR(CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3)。可用于鉴定CDR的

边界的示例性惯例包括,例如Kabat定义、Chothia定义、ABS定义和IMGT定义。参见,例如,Kabat,1991,“Sequences of Proteins of Immunological Interest,”National Institutes of Health, Bethesda, Md. (Kabat编号方案); Al-Lazikani等人,1997, J. Mol. Biol. 273: 927-948 (Chothia编号方案); Martin等人,1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 9268-9272 (ABS编号方案); and Lefranc等人,2003, Dev. Comp. Immunol. 27: 55-77 (IMGT编号方案)。公共数据库也可用于鉴定抗体内的CDR序列。

[0046] 衍生自:如本文所用,术语“衍生自”表示第一分子和第二分子之间的关系。它通常指第一分子和第二分子之间的结构相似性,并且不意味着或包括对衍生自第二分子的第一分子的过程或来源限制。

[0047] EC50:术语“EC50”是指在指定的暴露时间之后诱导基线和最大值之间的中间响应的抗体或MBM的半最大有效浓度。EC50本质上代表观察到50%最大效果时抗体或MBM的浓度。在某些实施方案中,EC50值等于对表达可被抗体或MBM特异性结合的靶分子的细胞产生半最大结合的抗体或MBM的浓度,例如,如通过FACS结合测定所确定的。因此,随着EC50或半最大有效浓度值的增加,观察到减少或减弱的结合。在一些实施方案中,本公开的MBM的EC50值可以由约 10^{-5} M或更低的EC50值表征(例如,小于 10^{-5} M、小于 10^{-6} M、小于 10^{-7} M、小于 10^{-8} M、小于 10^{-9} M)。

[0048] 表位:表位或抗原决定簇是被本文所述的抗体或其他抗原结合部分识别的抗原(例如靶分子)的一部分。表位可以是线性的或构象的。

[0049] Fab:在本公开的MBM的上下文中,术语“Fab”指一对多肽链,第一多肽链包含抗体N末端的可变重(VH)结构域至第一恒定结构域(本文称为C1),第二个多肽链包含抗体N末端的可变轻(VL)结构域至第二恒定结构域(本文称为C2),其能够与第一恒定结构域配对。在天然抗体中,VH是重链第一恒定结构域(CH1)的N末端,VL是轻链恒定结构域(CL)的N末端。本公开的Fab可根据天然方向排列或包括有助于改正VH和VL配对的结构域取代或互换,特别是当本公开的MBM包含不同的Fab时。例如,可以用CH3结构域对替换Fab中的CH1和CL结构域对,以促进异二聚体MBM中正确的修饰Fab链配对。还可以颠倒CH1和CL,使得CH1附接到VL并且CL附接到VH,这种构型通常被称为Crossmab。或者,或除使用取代或互换的恒定结构域之外,还可以通过使用可与本公开的异二聚体MBM的两个可变区配对的通用轻链来实现正确的链配对。

[0050] FGF受体1c和FGFR1c:术语“FGF受体1c”、“FGFR1c”和类似术语是指来自任何脊椎动物来源的任何天然成纤维细胞生长因子受体1c (FGFR1c),包括哺乳动物,如灵长类动物(例如,人、食蟹猴(cyno))、狗和啮齿动物(例如,小鼠和大鼠),除非另有说明。该术语涵盖“全长”、未加工的FGFR1c以及细胞中加工产生的任何形式的FGFR1c。该术语还涵盖天然存在的FGFR1c变体,例如,剪接变体或等位基因变体。示例性人FGFR1c的氨基酸序列是:

MWSWKCLLFWAVLVTATLCTARPSPTLPEQAQPWGAPVEVESFLVHPGDL
LQLRCRLRDDVQSINWLRDGVQLAESNRTRITGEEVEVQDSVPADSGLYA
CVTSSPSGSDTTYFSVNVSDALPSSSEDDDDDDSSSEEKETDNTKPNPVA
PYWTSPEKMEKKLHAVPAAKTVKFKCPSSGTPNPTLRWLKNGKEFKPDRI
[0051] GGYKVRATWSIIMDSVVP SDKGN YTCIVENEYGSINHTYQLDVVERSPH
RPILQAGLPANKTVALGSNVEFMCKVYSDPQPHIQWLKHIEVNGSKIGPD
NLPYVQILKTAGYNTTDKEMEVLHLRNVSFEDAGEYTCLAGNSIGLSHHS
AWLTVLEALEERPAVIVITSPLYLEIIIIYCTGAFLISCMVGSVIVYKMKS
GTKKSDFHSQMAVEIKLAKSIPLRRQVTVSADSSASMNSGVLLVRPSRLS
SSGTPMLAGVSEYELPEDPRWELPRDRLVLGKPLGEGCFGQVVLAEAIGL
DKDKPNRVTKVAVKMLKSDATEKDLSDLISEMEMMKMIGKEIKNIINLLG
ACTQDGPLYVIVEYASKGNLREYLQARRPPGLEYCYNPSHNPEEQLSSKD
LVSCAYQVARGMEYLASKKCIHRDLAARNVLVTEDNVMKIADFGLARDIH
[0052] HIDYYKKTNGRLPVKWMapeALFDRIYTHQSDVWSFGVLLWEIFTLGGs
PYPGVPVEELFKLLKEGHRMDKPSNCTNELYMMMRDCWHAVPSQRPTFKQ
LVEDLDRIVALTSNQEYLDLSMPLDQYSPSPDTRSSSTCSSGEDSVFSHE
PLPEEPCLPRHPAQLANGGLKRR (SEQ ID NO: 1)

[0053] 半抗体:术语“半抗体”是指包含至少一个ABS或ABS链(例如,Fab的一条链)并且可以通过例如以下方式与包含ABS或ABS链的另一分子缔合的分子:二硫键或分子相互作用(例如,Fc异源二聚体之间的杵臼(knob-in-hole)相互作用)。半抗体可以由一条多肽链或多于一条多肽链(例如,Fab的两条多肽链)组成。在优选的实施方案中,半抗体包含Fc结构域。

[0054] 宿主细胞:本文使用的术语“宿主细胞”是指已引入本公开的核酸的细胞。术语“宿主细胞”和“重组宿主细胞”在本文中可互换使用。应当理解,此类术语是指特定的受试细胞以及此类细胞的后代或潜在后代。因为由于突变或环境影响,某些修饰可能在后续世代中发生,因此此类后代实际上可能与亲代细胞不同,但仍包括在本文所用术语的范围内。典型的宿主细胞是真核宿主细胞,例如哺乳动物宿主细胞。示例性真核宿主细胞包括酵母和哺乳动物细胞,例如脊椎动物细胞如小鼠、大鼠、猴或人细胞系,例如HKB11细胞、PER.C6细胞、HEK细胞或CHO细胞。

[0055] Beta (β)klotho、klotho β 和KLB:术语“beta (β)klotho”、“klotho β ”、“KLB”和类似术语是指来自任何脊椎动物来源的多肽或任何天然 β klotho,脊椎动物来源包括哺乳动物,例如灵长类动物(例如,人类、食蟹猴(cyno))、狗和啮齿类动物(例如,小鼠和大鼠),除非另有说明,并且,在某些实施方案中,包括相关的 β klotho多肽,包括其SNP变体。 β klotho包含两个结构域: β klotho 1(KLB1)和 β klotho 2(KLB2)。每个 β klotho结构域含糖基水解酶区域。例如,人 β klotho的KLB1结构域包含氨基酸残基1-508,其中第一糖基水解酶区域(本文称为GH1)包含氨基酸残基77-508,并且人 β klotho的KLB2结构域包含氨基酸残基509-1044,其中第二糖基水解酶区域(本文称为GH2)包含氨基酸残基517-967。术语“beta (β)klotho”、“klotho β ”和“KLB”涵盖“全长”、未加工的KLB以及细胞中加工产生的任何形式的KLB。该术

语还涵盖KLB天然存在的变体,例如,剪接变体或等位基因变体。示例性人KLB的氨基酸序列是:

FSGDGRAIWSKNPNFTPVNESQLFLYDTFPKNFFWGIGTGALQVEGSWKK
DGKGPSIWDEIFIHTEILKNVSSTNGSSDSYIFLEKDLSALDFIGVSFYQ
FSISWPRLFPDGIPTVANAKGLQYYSTLLDALVLRNIEPIVTLYHWDLPL
ALQEKYGGWKNDTIIDIFNDYATYCFQMFGDRVKYWITIEINPYLVAWHG
YGTGMHAPGEKGNLAAVYTVGHNLIKAHASKVWEINYNTEIFRPHQKGWLS
ITLGSHWIEPNRSENTMDIFKQSQSMVSVLGWFANPIHGDGDYPEGMRKK
LFSVLPIFSEAEKEIEMRGTAFFAFSFGPNNFKPLNTMAKMGQNVSLNL
REALNWIKLEYNNPRILIAENGWFTDSRVKTEDTTAIYMMKNFLSQVLQA
IRLDEIRVFGYTAWSLLDGFEWQDAYTIRRGLFYVDFNSKQKERKPKSSA
HYYKQIIIRENGFSLKESTPDVQGGFPCDFSWGVTESVLKPESVASSPQFS
[0056] DPEILYVWNATGNRLLEIRVEGVRLKTRPAQCTDFVNIKKQLEMLARMKV
THYRFALDWASVLPTGNLSAVNRQALRYRCVVSEGLKLGISAMVTLYYP
THAEILGLPEPLHADGWLNPSTAEAFQAYAGLCFQELGDLVKLWITINE
PNRLSDIYNRSGNDTYGAAEINLLVAHALAWRLYDRQFRPSQRGAVSLSL
HADWAEPANPYADSHWRAAERFLQFEIAWFAEPLFKTGDYPAAMREYIAS
KEIRRGLSSSALPRLTEAERRLLKGTVDFCALNEIFTTRFVMHEQLAGSR
YDSRDIQFLQDITRLSSPTRLAVIPWGVRLKLLRWVRRNYGDMDIYITAS
GIDDQALEDDRLRKYYLGKYLQEVKAYLIDKVRIKGYAFKLAEEKSKP
RFGFFTSDFKAKSSIQFYNKVISSRGFPFENSSSRCSQTQENTECTVCLF
LVQKKPLIFLGCCFFSTLVLLLSIAIFQRQKRRKFWKAKNLQHIPLKKGK RVVS (SEQ ID
NO: 2)

[0057] 代谢病况:本文使用的术语“代谢病况”是指代谢病症以及其中代谢指标(例如,体重或体重指数、HDL胆固醇、LDL胆固醇、血液甘油三酯、血糖)超出医疗专业人员普遍认为的正常或健康的范围的情况。代谢病症的实例包括代谢综合征、肥胖症、脂肪肝、高胰岛素血症、2型糖尿病、非酒精性脂肪性肝炎(“NASH”)、非酒精性脂肪肝病(“NAFLD”)、高胆固醇血症和高血糖症。

[0058] 多特异性结合分子或MBM:本文所用的术语“多特异性结合分子”或“MBM”是指包含两个半抗体并且特异性结合至少两个不同表位(以及在一些情况下三个或更多个不同的表位),并包含ABS1、ABS2和ABS3的分子(例如,多个多肽链的组装体)。

[0059] 可操作地连接:本文所用的术语“可操作地连接”是指多肽链的两个或更多个区域之间的功能关系,其中两个或更多个区域连接以产生功能性多肽。

[0060] 肽、多肽和蛋白质:术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,并且是指包含通过肽键共价连接的氨基酸残基的分子或化合物。蛋白质、多肽或肽必须含有至少两个氨基酸,并且对分子或化合物中氨基酸的最大数量没有限制。因此,这些术语指短链和较长链,短链在本领域通常也称为例如肽、寡肽和寡聚物,长链在本领域一般称为蛋白质或多肽,其中有很多种类。

[0061] 单链Fv或scFv: 本文使用的术语“单链Fv”或“scFv”是指包含抗体的VH和VL结构域的多肽链, 其中这些结构域存在于单条多肽链中。

[0062] 特异性(或选择性)结合: 本文所用的术语“特异性(或选择性)结合”是指MBM或其抗原结合位点(“ABS”)与靶分子(例如, KLB或FGFR1c)形成在生理条件下相对稳定的复合物。特异性结合的特征可以是约 5×10^{-2} M或更低(例如, 小于 5×10^{-2} M、小于 10^{-2} M、小于 5×10^{-3} M、小于 10^{-3} M、小于 5×10^{-4} M、小于 10^{-4} M、小于 5×10^{-5} M、小于 10^{-5} M、小于 5×10^{-6} M、小于 10^{-6} M、小于 5×10^{-7} M、小于 10^{-7} M、小于 5×10^{-8} M、小于 10^{-8} M、小于 5×10^{-9} M、小于 10^{-9} M、或小于 10^{-10} M)的KD。用于确定抗体或抗体片段(例如MBM或ABS)与靶分子的结合亲和力的方法是本领域熟知的并且包括例如平衡透析、表面等离子体共振(例如Biacore测定)、荧光激活细胞分选(FACS)结合测定等。然而, 特异性结合来自一种物种的靶分子的MBM或其ABS抗体可以与来自一种或多种其他物种的靶分子具有交叉反应性。

[0063] 受试者: 术语“受试者”包括人类和非人类动物。非人类动物包括所有脊椎动物, 例如哺乳动物和非哺乳动物, 例如非人类灵长类动物、绵羊、狗、牛、鸡、两栖动物和爬行动物。除非另有说明, 术语“患者”或“受试者”在本文中可互换使用。

[0064] 四价: 本文所用的术语“四价”是指具有四个抗原结合位点, 例如ABS1、ABS2和ABS3以及第四抗原结合位点(ABS4)的MBM。一般而言, 四个抗原结合位点可以结合相同表位或不同表位, 但在本公开的MBM的优选实施方案中, ABS1、ABS2和ABS3是FGFR1c、GH1和GH2结合位点并且ABS4可以是FGFR1c、GH1、GH2或其他结合位点。在一些实施方案中, 四价MBM是三特异性的并且仅结合FGFR1c、GH1和GH2。

[0065] 治疗(Treat)、治疗(Treatment)、治疗(Treating): 如本文所用, 术语“治疗(Treat)”、“治疗(Treatment)”和“治疗(Treating)”是指减少或改善代谢病况的进展、严重性和/或持续时间, 或者改善由施用本公开的一种或多种MBM导致的代谢病况的一种或多种症状(优选地, 一种或多种可辨别的症状)。在具体的实施方案中, 术语“治疗(Treat)”、“治疗(Treatment)”和“治疗(Treating)”是指代谢病况的至少一种可测量的物理参数的改善, 不一定能由患者察觉, 例如体重减轻、循环HGL胆固醇减少、循环LDL胆固醇增加、血液甘油三酯减少和血糖降低。体重减轻、循环HGL胆固醇减少、循环LDL胆固醇增加、血液甘油三酯减少和血糖降低被认为是新陈代谢的改善。在其他实施方案中, 术语“治疗(Treat)”、“治疗(Treatment)”和“治疗(Treating)”是指在物理上通过例如可辨别的症状的稳定、在生理上通过例如物理参数的稳定, 或两者, 而抑制代谢病况的进展。在其他实施方案中, 术语“治疗(Treat)”、“治疗(Treatment)”和“治疗(Treating)”是指代谢病况的稳定。本公开的MBM和药物组合物可以以有效治疗受试者中的代谢病况和/或改善受试者中的代谢的量施用于受试者。

[0066] 三特异性结合分子: 本文所用的术语“三特异性结合分子”或“TBM”是指特异性结合三个表位并包含三个或更多个抗原结合位点的分子。本公开的TBM结合FGFR1c、GH1和GH2。抗原结合位点可以各自独立地是抗体片段(例如, scFv、Fab、纳米抗体)或非抗体衍生的结合剂(例如, 纤连蛋白、Fynomer、DARPin)。

[0067] 三价: 本文使用的术语“三价”是指具有三个抗原结合位点, 例如ABS1、ABS2和ABS3的MBM。一般而言, 三个抗原结合位点可以结合相同表位或不同表位, 但在本公开的MBM的优选实施方案中, 三个抗原结合位点包含GH1抗原结合位点、GH2抗原结合位点和GFGR1c抗原

结合位点。

[0068] 通用轻链: 本文在MBM的上下文中使用的术语“通用轻链”是指能够与Fab1的重链区域配对以形成Fab1并且能够与Fab2到的重链区域配对以形成Fab2的轻链多肽。通用轻链也称为“普遍轻链”。

[0069] VH: 术语“VH”指抗体的免疫球蛋白重链的可变区, 包括scFv或Fab的重链。

[0070] VL: 术语“VL”指免疫球蛋白轻链的可变区, 包括scFv或Fab的轻链。

[0071] Fc结构域和Fc区: 术语“Fc结构域”是指与另一重链的相应部分配对的重链的一部分。术语“Fc区”是指通过两个重链Fc结构域缔合而形成的基于抗体的结合分子的区域。Fc区内的两个Fc结构域可以彼此相同或不同。在天然抗体中, Fc结构域通常是相同的, 但为了产生本公开的MBM, 可以有利地修饰一个或两个Fc结构域以允许异二聚化。

[0072] 6.2. 多特异性结合分子 (MBM)

[0073] 6.2.1. KLB和FGFR1c ABS

[0074] 本公开的MBM含有结合FGFR1c的ABS1、结合KLB的GH2结构域的ABS2、以及结合KLB的GH2结构域的ABS3。不受理论的束缚, 据信MBM与这三个结合结构域的结合激活受体复合物并导致图1中所示的代谢益处。ABS1、ABS2和ABS3可以衍生自一种或多种合适的抗FGFR1c、抗GH1结构域和抗GH2结构域抗体或基于非免疫球蛋白的抗原结合位点。衍生ABS1、ABS2和ABS3中的一种或多种的抗体有时在本文中被称为“亲本”抗体。

[0075] KLB和FGFR1c亲本抗体可以是单克隆抗体 (例如, 鼠或兔单克隆抗体)、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、灵长类抗体、双特异性抗体、单链抗体等。在各种实施方案中, 本公开的MBM包含亲本衍生的恒定区的全部或一部分。在一些实施方案中, 恒定区是选自以下的同种型: IgA (例如, IgA1或IgA2)、IgD、IgE、IgG (例如, IgG1、IgG2、IgG3或IgG4) 和IgM。

[0076] 本文使用的术语“单克隆抗体”不限于通过杂交瘤技术产生的抗体。单克隆抗体通过本领域可用或已知的任何方法衍生自单个克隆, 包括任何真核、原核或噬菌体克隆。

[0077] 可用作KLB和FGFR1c ABS来源的单克隆抗体可以使用本领域已知的多种技术来制备, 包括使用杂交瘤、重组和噬菌体展示技术或其组合。

[0078] 如本文使用的术语“嵌合”抗体是指具有衍生自非人免疫球蛋白 (例如兔、大鼠或小鼠抗体) 和人免疫球蛋白恒定区 (通常选自人免疫球蛋白) 的可变序列的抗体。产生嵌合抗体的方法是本领域已知的。参见, 例如, Morrison, 1985, Science 229 (4719): 1202-7; Oi 等人, 1986, BioTechniques 4: 214-221; Gillies 等人, 1985, J. Immunol. Methods 125: 191-202; 美国专利号5,807,715; 4,816,567; 和4,816,397, 其全部内容通过引用并入本文。

[0079] 非人 (例如, 鼠) 抗体的“人源化”形式是含有衍生自非人免疫球蛋白的最少序列的嵌合免疫球蛋白。一般而言, 人源化抗体将包含至少一个、通常两个可变结构域的基本上全部, 其中所有或基本上所有CDR区对应于非人免疫球蛋白的CDR区, 以及所有或基本上所有FR区是人免疫球蛋白序列的那些。人源化抗体还可以包含免疫球蛋白恒定区 (Fc) 的至少一部分, 通常是人免疫球蛋白共有序列的恒定区。抗体人源化的方法是本领域已知的。参见, 例如, Riechmann 等人, 1988, Nature 332: 323-7; 美国专利号5,530,101; 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762; 和6,180,370; Queen 等人; EP239400; PCT公开号W0 91/09967; 美国专利号5,225,539; EP592106; EP519596; Padlan, 1991, Mol. Immunol., 28: 489-498; Studnicka 等人, 1994, Prot. Eng. 7: 805-814; Roguska 等人, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 969-973; 和

美国专利号5,565,332,其全部内容通过引用并入本文。

[0080] “人抗体”包括具有人免疫球蛋白的氨基酸序列的抗体,并且包括从人免疫球蛋白文库或从一种或多种人免疫球蛋白转基因且不表达内源免疫球蛋白的动物分离的抗体。人抗体可以通过本领域已知的多种方法来制备,包括使用衍生自人免疫球蛋白序列的抗体文库的噬菌体展示方法。参见美国专利号4,444,887和4,716,111;和PCT公开号W0 98/46645;W0 98/50433;W0 98/24893;W0 98/16654;W0 96/34096;W0 96/33735;和W0 91/10741,其各自的全部内容通过引用并入本文。人抗体也可以使用不能表达功能性内源免疫球蛋白但可以表达人免疫球蛋白基因的转基因小鼠来产生。参见,例如,PCT公开号W0 98/24893;W0 92/01047;W0 96/34096;W0 96/33735;美国专利号5,413,923;5,625,126;5,633,425;5,569,825;5,661,016;5,545,806;5,814,318;5,885,793;5,916,771;和5,939,598,其全部内容通过引用并入本文。可以使用称为“引导选择”的技术来生成识别选定表位的完全人抗体。在该方法中,选择的非人单克隆抗体,例如,小鼠抗体,用于指导识别相同表位的完全人抗体的选择(参见,Jespers等人,1988,Biotechnology 12:899-903)。

[0081] “灵长类抗体”包含猴可变区和人恒定区。用于产生灵长类抗体的方法是本领域已知的。参见,例如,美国专利号5,658,570;5,681,722;和5,693,780,其全部内容通过引用并入本文。

[0082] 在一些实施方案中,本公开的MBM的亲本抗体使用**VELOCIMMUNE®**技术生成(参见,例如,US 6,596,541,Regeneron Pharmaceuticals,**VELOCIMMUNE®**)。可首先分离具有人可变区和小鼠恒定区的针对FGFR1c、GH2结构域、GH2结构域或其任意组合的高亲和力嵌合亲本抗体。**VELOCIMMUNE®**技术涉及生成转基因小鼠,其具有包含与内源小鼠恒定区基因座可操作连接的人重链和轻链可变区的基因组,使得小鼠响应于抗原刺激而产生包含人可变区和小鼠恒定区的抗体。编码抗体重链和轻链可变区的DNA被分离并可操作地连接至编码人重链和轻链恒定区的DNA。然后DNA在能够表达全人抗体的细胞中表达。

[0083] 一般而言,用感兴趣的抗原攻击**VELOCIMMUNE®**小鼠,并从表达抗体的小鼠中回收淋巴细胞(例如B细胞)。淋巴细胞可以与骨髓瘤细胞系融合以制备永生杂交瘤细胞系,并且筛选和选择此类杂交瘤细胞系以鉴定产生对感兴趣抗原具有特异性的抗体的杂交瘤细胞系。编码重链和轻链可变区的DNA可以被分离并连接至重链和轻链的期望同种型恒定区。这样的抗体蛋白可以在细胞例如CHO细胞中产生。或者,编码抗原特异性嵌合抗体或轻链和重链可变结构域的DNA可以直接从抗原特异性淋巴细胞中分离。

[0084] 感兴趣的抗体也可以从小鼠B细胞中分离。简言之,从每只小鼠收获脾细胞,并通过FACS使用感兴趣的抗原作为结合和鉴定反应性抗体(抗原阳性B细胞)的分选试剂来分选B细胞(例如,如US2007/0280945A1中所述)。鉴定和分选抗原阳性B细胞以及通过PCR构建免疫球蛋白基因表达盒以制备表达重组抗体的细胞的各种方法是本领域众所周知的。参见,例如,W020141460741、美国专利号7884054B2和Liao等人,2009,J Virol Methods158(1-2):171-9。

[0085] 首先,分离具有人可变区和小鼠恒定区的高亲和力嵌合抗体。对抗体进行表征和选择期望的特性,包括亲和力、选择性、表位等。用期望的人恒定区替换小鼠恒定区以生成本发明的完全人抗体,例如野生型或修饰的IgG1或IgG4。虽然所选择的恒定区可能根据具

体用途而变化,但高亲和力抗原结合和靶特异性特征存在于可变区中。

[0086] 公开了用于本公开的MBM中的抗FGFR1c和/或抗KLB亲本抗体的出版物的实例包括但不限于美国专利公开号US2015/0218276和US 2011/0135657;美国专利号9,738,716、9,085,626、8,263,074;Min等人,2018,J. Biol. Chem. 293:14678;和Foltz等人,2012, Sci. Transl. Med. 4:162ra153。

[0087] 在一些实施方案中,可掺入本公开的MBM中的FGFR1c结合剂和FGFR1c结合剂序列分别在表1A和1B中鉴定。由于选择性剪接,FGFR1c的某些同种型中不存在FGFR1c的D1环。因此,优选ABS1结合FGFR1c的环D2或环D3。

[0088]

表 1A FGFR1c 结合剂			
名称	表位	参考	专利参考中的序列
YW182.5_YGDY (Genentech)	环 D2	US 2015/0218276	重链: Seq ID No. 133; 轻链: Seq ID No. 135
R1Mab1 (Genentech)	环 D2	US 9,085,626	重链: Seq ID No. 2; 轻链: Seq ID No. 6
R1Mab2 (Genentech)	环 D2	US 9,085,626	重链: Seq ID No. 3; 轻链: Seq ID No. 6
R1Mab3 (Genentech)	环 D2	US 9,085,626	重链: Seq ID No. 4; 轻链: Seq ID No. 6
FR1-H7 (ImClone/Eli Lilly)	环 D2	US 8,263,074	重链: 图 1A; 轻链: 图 1B
FR1-A1 (ImClone/Eli Lilly)	环 D3	US 8,263,074	重链: 图 2A; 轻链: 图 2B

[0089]

TABLE 1B FGFR1c 结合剂 - VH 和 VL 序列			
结合剂	链	序列	SEQ ID NO:
FR1-H7 (ImClone/Eli Lilly)	VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTFTDYMHVWVQ QAPGKGLEWMGLVDPEDGETIYAEKFQGRVTITADTSTD TAYMELSSLRSEDTAVYYCARDDYMDVWGKGLVTVSS	3
	VL	ETTLTQSPDTLSLSPGEGATLSCRASQSVSGSALAWYQQK PGQAPRLLIYDASSRATGVPDRFSGSGSGADFSLTISRLEPE DFAVYSCQQYGSSPLTFGPGTKVDVK	4
FR1-A1 (ImClone/Eli Lilly)	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGQTFTGYMHVWR QAPGQGLEWMGRIPILGIANYAQKFQGRVTITADKSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCARGGDLGGMDVWGQG	5
	VL	EIVLTQSPSLPVTTPGEPASISCRSSQSLRHSNGYNYLDWY LQKPGQSPQLLIYLASNRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVGVYYCMQALQIPPTFGPGTKVDK	6
R1Mab1 (Genentech)	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSTWISWVPGK GLEWVGEIDPYDGDITYADSVKGRFTISADTSKNLQMNS LRAEDTAVYYCASSGYGGSDYAMDYWGQ	7
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKP GKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQSYTTPPTFGQGTKWEIK	8

[0090]

TABLE 1B FGFR1c 结合剂 - VH 和 VL 序列			
结合剂	链	序列	SEQ ID NO:
R1Mab2 (Genentech)	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNNYIHVWPG KGLEWVADIYPNDGDTDYADSVKGRFTISADTSKNLQMN SLRAEDTAVYYCAREHFDVHYYVMDYWGQ	9
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKP GKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQSYTTPPTFGQGTKWEIK	8
R1Mab3 (Genentech)	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSNWISWVPGK GLEWVAEIDPYDGATDYADSVKGRFTISADTSKNLQMNS LRAEDTAVYYCATGTDWMDYWGQ	10
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKP GKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQSYTTPPTFGQGTKWEIK	8

[0091] 在进一步的实施方案中,可掺入本公开的MBM中的GH1结构域结合剂和GH1结构域结合剂序列分别在表2A和2B中鉴定。

表 2A GH1 结构域结合剂		
名称	参考	专利参考中的序列
[0092] 39F7 (Amgen)	US 8,263,074; Min 等人, 2018, J. Biol. Chem. 293:14678	重链: Seq ID No. 82; 轻链: Seq ID No. 27

表 2B GH1 结构域结合剂- VH 和 VL 序列		
结合剂	链	序列
[0093] 39F7 (Amgen)	VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGIHWVRQAPGKGLE WVAVIWYDGSIKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARDRAAAGLHYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 11)
	VL	EIVLTQSPGTL SLS PGERATL SCRASQSVSSTYLA WYQQKPGQAPRLL IYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSGSSPL TFGGGTEVEIK (SEQ ID NO: 12)

[0094] 在进一步的实施方案中,可掺入本公开的MBM中的GH2结构域结合剂和GH2结构域结合剂序列分别在表3A和3B中鉴定。

表 3A GH2 结构域结合剂		
名称	参考	专利参考中的序列
[0095] 8C5.K4H3.M4L.KNV (Genentech)	US 2015/0218276	重链: Seq ID No. 129; 轻链: Seq ID No. 131
5H23_人源化 (NGM)	US 9,738,716	重链: Seq ID No. 317; 轻链: Seq ID No. 319

表 3B GH2 结构域结合剂 - VH 和 VL 序列		
结合剂	链	序列
[0096] 5H23 (NGM)	VH (vH3)	QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQAPGQGL EWIGWIYPGDGSTKYNEKFKGKATITRDTASTAYMELSSLRSEDTA VYFCARSDYYGSRSFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 13)
	VL (vL2)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRA SKSVSTSGYVYMHWYQQKPGQ PPKLLIYLASYLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SVQAEDVAVYYCQH SRDLTFPFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 14)

[0097] 另外的KLB结合物是本领域已知的(例如,mimAb1 (Amgen);参见,例如,US2011/0135657和Foltz等人,2012,Sci.Transl.Med.4:162ra153)。KLB结合剂的结合特征,例如,它们是否结合GH1结构域或GH2结构域中的表位,可以由本领域技术人员使用本领域已知的方法容易地确定。鉴定KLB结合抗体在KLB上的结合位点可以经由已知技术实现,包括例如基于阵列的寡肽扫描、交联偶联质谱法、高通量鸟枪诱变表位作图、氢-氘交换、定点突变作图、X射线共晶体学和低温电子显微镜。或者,KLB结合剂与GH1结构域或GH2结构域的结合可以通过,例如,免疫测定法如酶联免疫吸附测定法(ELISA)、基于Luminix微球的测定法、中尺度发现(MSD)、AlphaLISA和流式细胞术来检测。

[0098] 优选地,本公开的MBM对GH1和GH2结构域的结合是非竞争性和非阻断性的,即,结

合GH1结构域的ABS和结合GH2结构域的ABS不竞争结合KLB。用于测量抗体和抗体片段之间的结合竞争的测定是本领域已知的,并且包括例如酶联免疫吸附测定(ELISA)、荧光激活细胞分选(FACS)测定和表面等离子体共振测定。

[0099] 例如,可以在Octet HTX生物传感器平台(Pa11 ForteBio Corp.)上使用实时、无标记生物层干涉测定法来确定与靶分子结合的竞争。在测定的具体实施方案中,整个测定在25℃下在10mM HEPES、150mM NaCl、3mM EDTA、1mg/mL BSA、0.05% v/v表面活性剂Tween-20、pH 7.4的缓冲液(HBS-EBT缓冲液)中进行,并且板以1000rpm的速度摇动。为了评估两种抗体或其抗原结合片段是否能够相互竞争结合其特定靶抗原上各自的表位,首先将五His标记(SEQ ID NO:41)的靶抗原捕获到抗五His(SEQ ID NO:41)抗体包被的Octet生物传感器尖端(Fortebio Inc, #18-5122),通过将生物传感器尖端浸入含有五His标记(SEQ ID NO:41)的靶抗原的孔中来实现。然后,通过浸入含有Ab-1溶液(例如50μg/mL溶液)的孔中,用第一抗体或其抗原结合片段(随后称为Ab-1)使抗原捕获的生物传感器尖端饱和。随后将生物传感器尖端浸入含有第二抗体或其抗原结合片段(随后称为Ab-2)的溶液(例如,50μg/mL溶液)的孔中。在测定的每个步骤之间,生物传感器尖端均在HBS-EBT缓冲液中清洗。可以在整个测定过程中监测实时结合反应,并且可以记录每个步骤结束时的结合反应。可以比较与Ab-1预复合的靶抗原结合的Ab-2的反应,也可以确定不同抗体/抗原结合片段对同一靶抗原的竞争/非竞争行为。

[0100] 因此,本公开的MBM可以包括,例如,任何前述抗FGFR1c或抗KLB抗体的CDR或VH和/或VL序列,例如任何抗FGFR1c、抗GH1结构域或抗GH2结构域抗体分别在表1A和1B(对于FGFR1c/ABS1)、表2A和2B(对于KLB GH1结构域/ABS2)、表3A和3B(对于KLB GH2结构域/ABS3)中提供。

[0101] 本公开的MBM的抗原结合位点可以选自基于免疫球蛋白的和基于非免疫球蛋白的结合结构域。

[0102] 在一些实施方案中,一种或多种ABS衍生自免疫球蛋白,例如包含或组成为Fab(如第6.2.4节中所描述的)、scFv(如第6.2.3节中所描述的)或另一种基于免疫球蛋白的形式,如Fv、dsFv、(Fab²)、单结构域抗体(SDAB)、VH或VL结构域、或骆驼科动物VHH结构域(也称为纳米抗体)。

[0103] ABS可以衍生自由单个VH或VL结构域组成的单结构域抗体,其表现出对靶标的足够的亲和力。在具体的实施方案中,单结构域抗体是骆驼科动物VHH结构域(参见,例如, Riechmann,1999,Journal of Immunological Methods 231:25-38;WO 94/04678)。

[0104] 在某些实施方案中,一种或多种ABS衍生自非抗体支架蛋白(包括但不限于设计的锚蛋白重复蛋白(DARPin)、Avimers(亲和力多聚体的缩写)、Anticalin/Lipocalins、Centyrins、Kunitz结构域、Adnexins、Affilins、Affitins(也称为Nonfitins)、Knottins、Pronectins、Versabodies、Duocalins和Fynomers)、配体、受体、细胞因子或趋化因子。

[0105] 可用于本公开的MBM中的非免疫球蛋白支架包括在以下中列出的那些:Mintz和Crea,2013,Bioprocess International 11(2):40-48的表3和4;Vazquez-Lombardi等人,2015,Drug Discovery Today 20(10):1271-83的图1、表1和图I;Skrlec等人,2015,Trends in Biotechnology 33(7):408-18的表1和框2。Mintz和Crea,2013,Bioprocess International 11(2):40-48的表3和4;Vazquez-Lombardi等人,2015,Drug Discovery

Today 20(10):1271-83的图1、表1和图I;Skrlec等人,2015,Trends in Biotechnology 33(7):408-18的表1和框2中的内容(统称为“支架公开”)。在具体实施方案中,支架公开通过引用并入其公开的与Adnexins相关的内容。在另一个实施方案中,支架公开通过引用并入其公开的与Avimers相关的内容。在另一个实施方案中,支架公开通过引用并入其公开的与Affibodies相关的内容。在又一个实施方案中,支架公开通过引用并入其公开的与Anticalins相关的内容。在又一个实施方案中,支架公开通过引用并入其公开的与DARPs相关的内容。在又一个实施方案中,支架公开通过引用并入其公开的与Kunitz结构域相关的内容。在又一个实施方案中,支架公开通过引用并入其公开的与Knottins相关的内容。在又一个实施方案中,支架公开通过引用并入其公开的与Pronectins相关的内容。在又一个实施方案中,支架公开通过引用并入其公开的与Nanofitins相关的内容。在又一个实施方案中,支架公开通过引用并入其公开的与Affilins相关的内容。在又一个实施方案中,支架公开通过引用并入其公开的与Adnectins相关的内容。在又一个实施方案中,支架公开通过引用并入其公开的与ABDs相关的内容。在又一个实施方案中,支架公开通过引用并入其公开的与Adhirons相关的内容。在又一个实施方案中,支架公开通过引用并入其公开的与Affimers相关的内容。在又一个实施方案中,支架公开通过引用并入其公开的与Alphabodies相关的内容。在又一个实施方案中,支架公开通过引用并入其公开的与Armadillo重复蛋白相关的内容。在又一个实施方案中,支架公开通过引用并入其公开的与Atrimers/Tetranectins相关的内容。在又一个实施方案中,支架公开通过引用并入其公开的与Obodies/OB-folds相关的内容。在又一个实施方案中,支架公开通过引用并入其公开的与Centyrins相关的内容。在又一个实施方案中,支架公开通过引用并入其公开的与Repebodies相关的内容。在又一个实施方案中,支架公开通过引用并入其公开的与Anticalins相关的内容。在又一个实施方案中,支架公开通过引用并入其公开的与Atrimers相关的内容。在又一个实施方案中,支架公开通过引用并入其公开的与二环肽相关的内容。在又一个实施方案中,支架公开通过引用并入其公开的与半胱氨酸结相关的内容。在又一个实施方案中,支架公开通过引用并入其公开的与Fn3支架(包括Adnectins、Centyrins、Pronectins和Tn3)相关的内容。

[0106] 6.2.2.MBM形式

[0107] 在各个方面,本公开的MBM包含两个半抗体,一个包含两个ABS,另一个包含一个ABS,两个半抗体通过Fc区配对。

[0108] 在一个方面,第一半抗体包含一个scFv和一个Fc结构域,并且第二半抗体包含一个Fab结构域、一个scFv结构域和一个Fc结构域。第一半抗体和第二半抗体通过形成Fc区的Fc结构域缔合。在各种实施方案中,第二半抗体中的scFv结构域可以是Fab结构域的N末端或Fc结构域的C末端。

[0109] 在另一个方面,第一半抗体包含两个Fab结构域和一个Fc结构域,并且第二半抗体包含一个Fab结构域和一个Fc结构域。第一半抗体和第二半抗体通过形成Fc区的Fc结构域缔合。在多个实施方案中,第一半抗体中的第二Fab结构域可以是第一Fab结构域的N末端(称为2+1N-Fab的构型)或Fc结构域的C末端(称为2+1C-Fab的构型)。

[0110] 在另一个方面,第一半抗体包含一个Fab结构域、一个scFv结构域和一个Fc结构域,并且第二半抗体包含一个Fab结构域和一个Fc结构域。第一半抗体和第二半抗体通过形

成Fc区的Fc结构域缔合。在各种实施方案中,第一半抗体中的scFv结构域可以是Fab结构域的N末端(称为2+1N-scFv的构型)或Fc结构域的C末端(称为2+1C-scFv的构型)。

[0111] 在另一个方面,第一半抗体包含一个scFv结构域和一个Fc结构域,并且第二半抗体包含两个Fab结构域和一个Fc结构域。第一半抗体和第二半抗体通过形成Fc区的Fc结构域缔合。在各种实施方案中,第二半抗体中的第二Fab结构域可以是第一Fab结构域的N末端或Fc结构域的C末端。

[0112] 在另一个方面,第一半抗体包含两个Fab结构域和一个Fc结构域,并且第二半抗体包含一个基于非免疫球蛋白的ABS和一个Fc结构域。第一半抗体和第二半抗体通过形成Fc区的Fc结构域缔合。在各种实施方案中,第一半抗体中的第二Fab结构域可以是第一Fab结构域的N末端或Fc结构域的C末端。

[0113] 在另一个方面,第一半抗体包含一个Fab结构域、一个scFv结构域和一个Fc结构域,并且第二半抗体包含一个基于非免疫球蛋白的ABS和一个Fc结构域。第一半抗体和第二半抗体通过形成Fc区的Fc结构域缔合。第一半抗体中的scFv结构域可以是Fab结构域的N末端或Fc结构域的C末端。

[0114] 在进一步的方面,第一半抗体包含一个scFv结构域和一个Fc结构域,并且第二半抗体包含scFv结构域、一个Fc结构域和第二scFv结构域。第一半抗体和第二半抗体通过形成Fc区的Fc结构域缔合。在各种实施方案中,第二半抗体中的第二scFv结构域可以是第一scFv结构域的N末端或Fc结构域的C末端。

[0115] 或者,MBM可以是单链。例如,MBM可以包含通过接头连接的三个scFv结构域。

[0116] 在一些实施方案中,该MBM公开是或包含以2+1N-scFv形式排列的抗原结合部分。因此,本公开提供了MBM,其包含:

[0117] (a) 第一多肽链,其在N末端至C末端方向上包含(i) scFv,其可操作地连接至(ii) 第一Fab的第一重链区,该第一Fab的第一重链区可操作地连接至(iii) Fc区;

[0118] (b) 第二多肽链,其在N末端至C末端方向上包含(i) 第二Fab的第二重链区,该第二Fab的第二重链区可操作地连接至(ii) Fc区;

[0119] (c) 第三多肽链,其包含与第一重链区配对以形成第一Fab的第一轻链;

[0120] (d) 第四多肽链,其包含与第二重链区配对以形成第二Fab的第二轻链。

[0121] scFv可以是VH-VL方向或VL-VH方向。

[0122] 在一些实施方案中,ABS1是第一Fab,ABS2是scFv,并且ABS3是第二Fab。

[0123] 在其他实施方案中,ABS1是第一Fab,ABS3是scFv,并且ABS2是第二Fab。

[0124] 在一些实施方案中,ABS2是第一Fab,ABS1是scFv,并且ABS3是第二Fab。

[0125] 在其他实施方案中,ABS2是第一Fab,ABS3是scFv,并且ABS1是第二Fab。

[0126] 在一些实施方案中,ABS3是第一Fab,ABS2是scFv,并且ABS1是第二Fab。

[0127] 在其他实施方案中,ABS3是第一Fab,ABS1是scFv,并且ABS2是第二Fab。

[0128] scFv可以经由接头连接至第一重链区,例如, (a) 长度为至少5个氨基酸、至少6个氨基酸或至少7个氨基酸;以及任选地 (b) 长度最多至30个氨基酸、最多至40个氨基酸、最多至50个氨基酸或最多至60个氨基酸的肽接头。在各种实施方案中,接头的长度为5个氨基酸至50个氨基酸、长度为5个氨基酸至45个氨基酸、长度为5个氨基酸至40个氨基酸、长度为5个氨基酸至35个氨基酸、长度为5个氨基酸至30个氨基酸、长度为5个氨基酸至25个氨基酸;

长度为5个氨基酸至20个氨基酸;长度为6个氨基酸至50个氨基酸;长度为6个氨基酸至45个氨基酸;长度为6个氨基酸至40个氨基酸;长度为6个氨基酸至35个氨基酸;长度为6个氨基酸至30个氨基酸;长度为6个氨基酸至25个氨基酸;长度为6个氨基酸至20个氨基酸;长度为7个氨基酸至40个氨基酸;长度为7个氨基酸至35个氨基酸;长度为7个氨基酸至30个氨基酸;长度为7个氨基酸至25个氨基酸;长度为7个氨基酸至20个氨基酸。

[0129] 肽接头可以包含GnS (SEQ ID NO:15) 或SGn (SEQ ID NO:16) 的多聚体,例如,其中n是1至7的整数(例如,G4S (SEQ ID NO:17) 的多聚体),和/或甘氨酸多聚体(例如,两个连续的甘氨酸(2Gly)、三个连续的甘氨酸(3Gly)、四个连续的甘氨酸(4Gly (SEQ ID NO:18))、五个连续的甘氨酸(5Gly (SEQ ID NO:19))、六个连续的甘氨酸(6Gly (SEQ ID NO:20))、七个连续的甘氨酸(7Gly (SEQ ID NO:21))、八个连续的甘氨酸(8Gly (SEQ ID NO:22))或九个连续的甘氨酸(9Gly (SEQ ID NO:23)))。

[0130] 在一些实施方案中,该MBM公开是或包含以2+1N-Fab形式排列的抗原结合部分。因此,本公开进一步提供了MBM,其包含:

[0131] (a) 第一多肽链,其在N末端至C末端方向上包含(i) 第一Fab的第一重链区,该第一Fab的第一重链区可操作地连接至(ii) 第二Fab的第二重链区,该第二Fab的第二重链区可操作地连接至(iii)Fc区;

[0132] (b) 第二多肽链,其在N末端至C末端方向上包含(i) 第三Fab的第三重链区,该第三Fab的第三重链区可操作地连接至(ii)Fc区;

[0133] (c) 第三多肽链,其包含与第一重链区配对以形成第一Fab的第一轻链;

[0134] (d) 第四多肽链,其包含与第二重链区配对以形成第二Fab的第二轻链;和

[0135] (e) 第五多肽链,其包含与第三重链区配对以形成第三Fab的第三轻链。

[0136] 在一些实施方案中,ABS1是第二Fab,ABS2是第一Fab,并且ABS3是第三Fab。

[0137] 在其他实施方案中,ABS1是第二Fab,ABS3是第一Fab,并且ABS2是第三Fab。

[0138] 在一些实施方案中,ABS2是第二Fab,ABS1是第一Fab,并且ABS3是第三Fab。

[0139] 在其他实施方案中,ABS2是第二Fab,ABS3是第一Fab,并且ABS1是第三Fab。

[0140] 在一些实施方案中,ABS3是第二Fab,ABS2是第一Fab,并且ABS1是第三Fab。

[0141] 第一和第二Fab,例如,第一Fab的第一重链区和第二Fab的第二重链区,经由接头,例如,(a) 长度为至少5个氨基酸、至少6个氨基酸或至少7个氨基酸;以及任选地(b) 长度最多至30个氨基酸、最多至40个氨基酸、最多至45个氨基酸、最多至50个氨基酸或最多至60个氨基酸的肽接头。在各种实施方案中,接头的长度为5个氨基酸至50个氨基酸、长度为5个氨基酸至45个氨基酸、长度为5个氨基酸至40个氨基酸、长度为5个氨基酸至35个氨基酸、长度为5个氨基酸至30个氨基酸、长度为5个氨基酸至25个氨基酸;长度为5个氨基酸至20个氨基酸;长度为6个氨基酸至50个氨基酸;长度为6个氨基酸至45个氨基酸;长度为6个氨基酸至40个氨基酸;长度为6个氨基酸至35个氨基酸;长度为6个氨基酸至30个氨基酸;长度为6个氨基酸至25个氨基酸;长度为6个氨基酸至20个氨基酸;长度为7个氨基酸至40个氨基酸;长度为7个氨基酸至35个氨基酸;长度为7个氨基酸至30个氨基酸;长度为7个氨基酸至25个氨基酸;长度为7个氨基酸至20个氨基酸。肽接头可以包含GnS (SEQ ID NO:15) 或SGn (SEQ ID NO:16) 的多聚体,例如,其中n是1至7的整数(例如,G4S (SEQ ID NO:17) 的多聚体),和/或甘氨酸的多聚体(例如,两个连续的甘氨酸(2Gly)、三个连续的甘氨酸(3Gly)、四个连续的甘

氨酸(4Gly (SEQ ID NO:18))、五个连续的甘氨酸(5Gly (SEQ ID NO:19))、六个连续的甘氨酸(6Gly (SEQ ID NO:20))、七个连续的甘氨酸(7Gly (SEQ ID NO:21))、八个连续的甘氨酸(8Gly (SEQ ID NO:22))或九个连续的甘氨酸(9Gly (SEQ ID NO:23)))。

[0142] 在前述实施方案中,Fab可以是第6.2.4节中描述的任何Fab并且scFv可以是第6.2.3节中描述的任何scFv。

[0143] 优选地,本公开的MBM包含Fc异二聚体,例如第6.2.7.2节中所描述的,并且还可以含有一种或多种降低效应功能的突变,例如第6.2.7.1节中所描述的。

[0144] Fc异二聚体的实例包括具有star突变和/或具有杵臼突变的Fc区。例如,在一些实施方案中,一个Fc结构域包含杵突变并且第二Fc结构域包含臼突变和star突变。在2+1N-scFv和/或2+1C-scFv形式中,具有臼突变和star突变的Fc结构域可以位于含有scFv的链或不含scFv的链上。在其他实施方案中,一个Fc结构域包含杵突变和star突变并且第二Fc结构域包含臼突变。在2+1N-scFv和/或2+1C-scFv形式中,具有臼突变的Fc结构域可以位于含有scFv的链或不含scFv的链上。类似地,在2+1N-Fab和/或2+1C-Fab形式中,具有臼突变和star突变的Fc结构域可以位于包含两个Fab结构域的半抗体或包含单个Fab结构域的半抗体上。在其他实施方案中,一个Fc结构域包含杵突变和star突变并且第二Fc结构域包含臼突变。在2+1N-Fab和/或2+1C-Fab形式中,具有臼突变的Fc结构域可以位于包含两个Fab结构域的半抗体中或包含单个Fab结构域的半抗体中。

[0145] 在一些实施方案中,本公开的MBM具有一对恒定结构域,如第6.3节中阐述的和/或如具体实施方案126至165中所定义的。

[0146] 6.2.3.scFv

[0147] 单链Fv或“scFv”抗体片段包含单多肽链中抗体的VH和VL结构域,能够作为单链多肽表达,并保留衍生其的完整抗体的特异性。一般而言,scFv多肽还包含VH和VL结构域之间的多肽接头,其使得scFv能够形成用于靶标结合的期望结构。适合连接scFv的VH和VL链的接头的例子是第6.2.5节中确定的接头。

[0148] 除非具体说明,否则如本文所用,scFv可以具有任一顺序的VL和VH可变区,例如,相对于多肽的N末端和C末端,scFv可以包含VL-接头-VH或者可以包含VH-接头-VL。

[0149] scFv可包含来自任何合适物种的VH和VL序列,例如鼠、人或人源化VH和VL序列。

[0150] 为了产生scFv编码的核酸,将编码VH和VL的DNA片段可操作地连接至编码接头的另一个片段,例如,编码第6.2.5节中描述的任何接头(通常是含有氨基酸甘氨酸和丝氨酸的序列的重复,例如氨基酸序列(Gly4~Ser)₃ (SEQ ID NO:24),使得VH和VL序列可以表达为连续的单链蛋白,其中VL和VH区由柔性接头连接(参见,例如,Bird等人,1988,Science 242:423-426;Huston等人,1988,Proc.Natl.Acad.Sci.USA85:5879-5883;McCafferty等人,1990,Nature 348:552-554)。

[0151] 6.2.4.Fab

[0152] 本公开的MBM可以包含一个或多个Fab结构域并且通常在每个半抗体中包含至少一个Fab结构域。Fab结构域传统上是通过使用例如木瓜蛋白酶的酶对免疫球蛋白分子进行蛋白水解切割而产生的。在本公开的MBM中,Fab结构域重组表达为较大分子的一部分。

[0153] Fab结构域可以包含来自任何合适物种的恒定结构域和可变区序列,并且因此可以是鼠的、嵌合的、人的或人源化的。

[0154] Fab结构域通常包含附接至VH结构域的CH1结构域,其与附接至VL结构域的CL结构域配对。在野生型免疫球蛋白中,VH结构域与VL结构域配对以构成Fv区,CH1结构域与CL结构域配对以进一步稳定结合模块。两个恒定结构域之间的二硫键可以进一步稳定Fab结构域。

[0155] 对于本公开的MBM,特别是当轻链不是共同或通用轻链时,有利的是使用Fab异二聚体策略以允许属于相同ABS的Fab结构域的正确缔合并最小化属于不同ABS的Fab结构域的异常配对。例如,可以使用下表4所示的Fab异二聚体策略:

表 4 Fab 异二聚体策略					
策略	VH	CH1	VL	CL	参考
[0156] CrossMabCH1-CL	WT	CL 结构域	WT	CH1 结构域	Schaefer 等人, 2011, Cancer Cell 2011; 20:472-86; PMID:22014573.
正交 Fab VHVRD1CH1CRD 2 - VLVRD1CLCRD2	39K, 62E	H172A, F174G	1R, 38D, (36F)	L135Y, S176W	Lewis 等人, 2014, Nat Biotechnol 32:191-8

表 4 Fab 异二聚体策略					
策略	VH	CH1	VL	CL	参考
[0157] 正交 Fab VHVRD2CH1wt - VLVRD2CLwt	39Y	WT	38R	WT	Lewis 等人, 2014, Nat Biotechnol 32:191-8
TCR CαCβ	39K	TCR Cα	38D	TCR Cβ	Wu 等人, 2015, MAbs 7:364-76
CR3	WT	T192E	WT	N137K, S114A	Golay 等人, 2016, J Immunol 196:3199-211.
MUT4	WT	L143Q, S188V	WT	V133T, S176V	Golay 等人, 2016, J Immunol 196:3199-211.
DuetMab	WT	F126C	WT	S121C	Mazor 等人, 2015, MAbs 7:377-89; Mazor 等人, 2015, MAbs 7:461-669.
已交换的结构域	WT	CH3 + 杆突变 或白突变	WT	CH3 + 杆突变或 白突变	Wozniak-Knopp 等人, 2018, PLoSONE13(4):e0195442

[0158] 因此,在某些实施方案中,通过彼此交换Fab的VL和VH结构域或彼此交换CH1和CL结构域来促进Fab的两个多肽之间的正确缔合,例如,如W02009/080251中所描述的。

[0159] 正确的Fab配对还可通过在Fab的CH1结构域中引入一个或多个氨基酸修饰和在Fab的CL结构域中引入一个或多个氨基酸修饰和/或在VH结构域中引入一个或多个氨基酸修饰和在VL结构域中引入一个或多个氨基酸修饰来促进。被修饰的氨基酸通常是VH:VL和CH1:CL界面的一部分,使得Fab组分优先彼此配对而不是与其他Fab的组分配对。

[0160] 在一个实施方案中,一个或多个氨基酸修饰限于可变结构域(VH、VL)和恒定结构域(CH1、CL)的保守框架残基,如残基的Kabat编号所示。Almagro, 2008, Frontiers In Bioscience 13:1619-1633提供了基于Kabat、Chothia和IMGT编号方案的框架残基的定义。

[0161] 在一个实施方案中,在VH和CH1和/或VL和CL结构域中引入的修饰是彼此互补的。重链和轻链界面处的互补性可以基于空间接触和疏水接触、静电/电荷相互作用或各种相

相互作用的组合来实现。蛋白质表面之间的互补性在文献中广泛描述为锁和钥匙适合、杵入臼、突起和空腔、供体和受体等,所有这些都意味着两个相互作用表面之间的结构和化学匹配的性质。

[0162] 在一个实施方案中,所引入的一个或多个修饰在Fab组分的界面上引入新的氢键。在一个实施方案中,所引入的一个或多个修饰引入了跨Fab组分的界面的新盐桥。示例性取代描述于W0 2014/150973和W0 2014/082179中,其内容通过引用并入本文。

[0163] 在一些实施方案中,Fab结构域包含CH1结构域中的192E取代以及CL结构域中的114A和137K取代,其在CH1与CL结构域之间引入盐桥(参见,例如,Golay等人,2016,J Immunol 196:3199-211)。

[0164] 在一些实施方案中,Fab结构域包含CH1结构域中的143Q和188V取代以及CL结构域中的113T和176V取代,其用于交换CH1和CL结构域之间接触的疏水性和极性区域(参见,例如,Golay等人,2016,J Immunol 196:3199-211)。

[0165] 在一些实施方案中,Fab结构域可包含在VH、CH1、VL、CL结构域中一些或全部中的修饰以引入促进Fab结构域正确组装的正交Fab界面(Lewis等人,2014 Nature Biotechnology 32:191-198)。在一个实施方案中,在VH结构域中引入39K、62E修饰,在CH1结构域中引入H172A、F174G修饰,在VL结构域中引入1R、38D、(36F)修饰,并且在CL结构域中引入L135Y、S176W修饰。在另一个实施方案中,在VH结构域中引入39Y修饰并且在VL结构域中引入38R修饰。

[0166] 还可以修饰Fab结构域以用工程化的二硫键取代天然的CH1:CL二硫键,从而提高Fab组分配对的效率。例如,可以通过在CH1结构域中引入126C和在CL结构域中引入121C来引入工程化的二硫键(参见,例如,Mazor等人,2015,MAbs 7:377-89)。

[0167] 还可以通过用促进正确组装的替代结构域替换CH1结构域和CL结构域来修饰Fab结构域。例如,Wu等人,2015,MAbs 7:364-76,描述了用T细胞受体的恒定结构域取代CH1结构域,并用T细胞受体的b结构域取代CL结构域,并通过在VL结构域中引入38D修饰和在VH结构域中引入39K修饰,将这些结构域替换与VL和VH结构域之间的另外的电荷-电荷相互作用配对。

[0168] 代替或除了使用Fab异二聚体策略来促进正确的VH-VL配对之外,共同轻链(也称为通用轻链)的VL可用于本公开的MBM的每个Fab VL区。在各种实施方案中,与采用原始同源VL相比,采用本文所述的共同轻链减少了MBM的不适当种类的数量。在各种实施方案中,从包含共同轻链的单特异性抗体中鉴定MBM的VL结构域。在各种实施方案中,MBM的VH区包含在小鼠B细胞内体内重排的人重链可变基因片段,该小鼠B细胞先前已被工程化以表达有限的人轻链库,或与人重链同源的单个人轻链,并且响应于暴露于感兴趣的抗原,生成含有多个人VH的抗体库,该多个人VH与两个可能的人VL中的一个或之一同源,其中该抗体库对感兴趣的抗原具有特异性。常见轻链是那些衍生自重排的人V κ 1-39J κ 5序列或重排的人V κ 3-20J κ 1序列,并且包括体细胞突变(例如,亲和力成熟)形式。参见,例如,美国专利号10,412,940。

[0169] 6.2.5. 接头

[0170] 在某些方面,本公开提供了MBM,其中ABS的两种或更多种组分(例如,scFv的VH和VL)、两种或更多种ABS(例如,半抗体的scFv和Fab)、或ABS和非ABS组分(例如,Fab或scFv和

Fc结构域)通过肽接头彼此连接。此类接头有时在本文中称为“ABS接头”。

[0171] 肽接头的范围可以是2个氨基酸至60个或更多个氨基酸,并且在某些方面,肽接头的范围可以是长度为3个氨基酸至50个氨基酸、4至30个氨基酸、5至25个氨基酸、10至25个氨基酸、10个氨基酸至60个氨基酸、12个氨基酸至20个氨基酸、20个氨基酸至50个氨基酸、或25个氨基酸至35个氨基酸。

[0172] 在具体方面,肽接头,例如,将scFv和重链分离到其C末端的肽接头,长度为至少5个氨基酸、至少6个氨基酸或至少7个氨基酸,并且任选地,长度为最多至30个氨基酸、最多至40个氨基酸、最多至50个氨基酸或最多至60个氨基酸。

[0173] 在所述的一些实施方案中,接头的长度范围为5个氨基酸至50个氨基酸,例如,长度范围为5个至50个、5个至45个、5个至40个、5个至35个、5个至30个、5个至25个、或5个至20个氨基酸。在所述的其他实施方案中,接头的长度范围为6个氨基酸至50个氨基酸,例如,长度范围为6个至50个、6个至45个、6个至40个、6个至35个、6个至30个、6个至25个、或6个至20个氨基酸。在所述的又一些实施方案中,接头的长度范围为7个氨基酸至50个氨基酸,例如,长度范围为7个至50个、7个至45个、7个至40个、7个至35个、7个至30个、7个至25个、或7个至20个氨基酸。

[0174] 带电的(例如,带电的亲水性接头)和/或柔性接头是特别优选的。

[0175] 可用于本公开的MBM中的柔性ABS接头的实例包括Chen等人,2013,Adv Drug Deliv Rev.65(10):1357-1369以及Klein等人,2014,Protein Engineering,Design& Selection 27(10):325-330公开的那些。特别有用的柔性接头是或包含甘氨酸和丝氨酸的重复,例如 G_nS (SEQ ID NO:25)或 SG_n (SEQ ID NO:26)的单体或多聚体,其中n是1至10的整数,例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一个实施方案中,接头是或包含 G_4S (SEQ ID NO:17)的重复的单体或多聚体,例如,(GGGGS) $_n$ (SEQ ID NO:17)。

[0176] 聚甘氨酸接头可以合适地用于本公开的MBM中。在一些实施方案中,肽接头,例如,分离scFv结构域和重链(例如ABS1的scFv结构域和ABS2的重链可变区)的肽接头,包含两个连续的甘氨酸(2Gly)、三个连续的甘氨酸(3Gly)、四个连续的甘氨酸(4Gly(SEQ ID NO:18))、五个连续的甘氨酸(5Gly(SEQ ID NO:19))、六个连续的甘氨酸(6Gly(SEQ ID NO:20))、七个连续的甘氨酸(7Gly(SEQ ID NO:21))、八个连续的甘氨酸(8Gly(SEQ ID NO:22))或九个连续的甘氨酸(9Gly(SEQ ID NO:23))。

[0177] 6.2.6铰链区

[0178] 本公开的MBM还可以包含铰链区,例如,将ABS模块连接到Fc区。铰链区可以是天然的或修饰的铰链区。铰链区通常位于Fc区的N末端。

[0179] 天然铰链区是通常在天然存在的抗体中的Fab和Fc结构域之间发现的铰链区。

[0180] 除非上下文另有规定,否则术语“铰链区”是指天然存在的(或天然的)或非天然存在的铰链序列,其在单个或单体多肽链的上下文中是单体铰链结构域并且在多聚体多肽(例如,本公开的MBM)的上下文包含至少两条具有相关铰链序列的单独的多肽链。有时,当描述单个多肽链的铰链序列时,铰链区被称为铰链“结构域”。通常,在包含两个相关铰链序列的多聚体多肽中,这两个相关铰链序列是相同的。

[0181] 铰链区域由上铰链、核心铰链和下铰链组成。

[0182] 在人IgG1中,上铰链对应于图14所示序列的氨基酸99-108,核心铰链对应于图14

所示序列的氨基酸109-112,以及下铰链对应于图14所示序列的氨基酸113-121。人IgG1的完整铰链序列给出为SEQ ID NO:68。如图14所示,下铰链的最后两个氨基酸对应于CH2结构域的前两个氨基酸。

[0183] 在人IgG2中,上铰链对应于图15所示序列的氨基酸99-105,核心铰链对应于图15所示序列的氨基酸106-109,以及下铰链对应于图15所示序列的氨基酸110-117。人IgG1的完整铰链序列给出为SEQ ID NO:69。如图15所示,下铰链的最后两个氨基酸对应于CH2结构域的前两个氨基酸。

[0184] 在人IgG4中,上铰链对应于图16所示序列的氨基酸99-105,核心铰链对应于图16所示序列的氨基酸106-109,以及下铰链对应于图16所示序列的氨基酸110-118。人IgG4的完整铰链序列给出为SEQ ID NO:72。如图16所示,下铰链的最后两个氨基酸对应于CH2结构域的前两个氨基酸。

[0185] 修饰的铰链区是长度和/或组成不同于天然铰链区的任何铰链。此类铰链可包括来自其他物种的铰链区,例如人、小鼠、大鼠、兔、鲨鱼、猪、仓鼠、骆驼、美洲驼或山羊铰链区。其他修饰的铰链区可包含衍生自与重链Fc区不同类别或亚类的抗体的完整铰链区。或者,修饰的铰链区可包含天然铰链或重复单元的一部分,其中重复中的每个单元衍生自天然铰链区。在进一步的替代方案中,可以通过将一个或多个半胱氨酸或其他残基转化为中性残基,例如丝氨酸或丙氨酸,或通过适当放置的残基转化为半胱氨酸残基来改变天然铰链区。通过这种方式,铰链区中半胱氨酸残基的数量可以增加或减少。其他修饰的铰链区可以是完全合成的并且可以被设计为具有期望的性质,例如长度、半胱氨酸组成和柔性。

[0186] 许多修饰的铰链区已经描述于例如美国专利号5,677,425、W09915549、W02005003170、W02005003169、W02005003170、W09825971和W02005003171中,并且这些通过引用并入本文。

[0187] 在一个实施方案中,本公开的一种或两种半抗体的Fc区在其N末端拥有完整的铰链区。

[0188] 在各种实施方案中,铰链结构域内的位置233-236可以是G、G、G和未被占据;G、G、未被占据、和未被占据;G、未被占据、未被占据、和未被占据;或全部未被占据,其中位置按EU编号进行编号。

[0189] 在一些实施方案中,本公开的ABM包含相对于相同同种型(例如,人IgG1或人IgG4)的野生型铰链结构域降低对Fc γ 受体的结合亲和力的修饰的铰链结构域。

[0190] 在一个实施方案中,本公开的ABM的一条或两条链的Fc区在其N末端拥有完整的铰链结构域。在其N末端包含铰链结构域的Fc区在本文中称为“恒定结构域”。示例性恒定结构域在本文和第6.3节中进行了描述。

[0191] 在一个实施方案中,本公开的ABM的Fc区和铰链区均衍生自IgG4并且铰链区包含修饰的序列CPPC(SEQ ID NO:27)。与含有序列CPPC(SEQ ID NO:27)的IgG1相比,人IgG4的核心铰链区含有序列CPSC(SEQ ID NO:28)。IgG4序列中存在的丝氨酸残基导致该区域的柔性增加,因此一部分分子在同一蛋白链内形成二硫键(链内二硫键),而不是桥接到IgG分子中的其他重链以形成链间二硫键(Angel等人,1993,Mol Immunol 30(1):105-108)。将丝氨酸残基改为脯氨酸以得到与IgG1相同的核心序列,可以在IgG4铰链区完全形成链间二硫键,从而减少纯化产物的异质性。这种改变的同种型称为IgG4P(有时称为IgG4 S108P)。

[0192] 可以并入本公开的MBM中的示例性铰链序列在图17中列出,例如,SEQ ID NO:66至72中任一个的铰链序列。

[0193] 6.2.6.1.嵌合铰链序列

[0194] 铰链区可以是嵌合铰链区。

[0195] 例如,嵌合铰链可以包含衍生自人IgG1、人IgG2或人IgG4铰链区的“上铰链”序列,与衍生自人IgG1、人IgG2或人IgG4铰链区的“下铰链”序列组合。

[0196] 在具体实施方案中,嵌合铰链区包含氨基酸序列EPKSCDKTHTCPPCPAPPVA (SEQ ID NO:29) (先前公开为W02014/121087的SEQ ID NO:8,其全部内容通过引用并入本文)或ESKYGPPCPPCPAPPVA (SEQ ID NO:30) (先前公开为W02014/121087的SEQ ID NO:9)。此类嵌合铰链序列可以适当地连接至IgG4 CH2区(例如通过并入IgG4 Fc结构域,例如人或鼠Fc结构域,其可以在CH2和/或CH3结构域中进一步修饰以降低效应功能,例如第6.2.7.1节中所描述的)。

[0197] 示例性嵌合铰链序列在图17中列出为SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:70和SEQ ID NO:71。

[0198] 6.2.6.2.具有减少的效应功能的铰链序列

[0199] 在进一步的实施方案中,铰链区可以被修饰以减少效应功能,例如如W02016161010A2中所描述的,其全部内容通过引用并入本文。在各种实施方案中,修饰的铰链区的位置233-236是G、G、G和未被占据;G、G、未被占据、和未被占据;G、未被占据、未被占据、未被占据;或全部未被占据,其中位置按EU编号进行编号(如W02016161010A2的图1所示)。这些片段可以表示为GGG-、GG--、G---或----,其中“-”表示未被占据的位置。

[0200] 位置236在典型的人IgG2中未被占据,但在其他典型的人IgG同种型中被占据。在所有四种人类同种型中,位置233-235被G以外的残基占据(如W02016161010A2的图1所示)。

[0201] 位置233-236内的铰链修饰可以与被P占据的位置228组合。位置228在人IgG1和IgG2中天然地被P占据,但在人IgG4中被S占据并且在人IgG3中被R占据。IgG4抗体中的S228P突变有利于稳定IgG4抗体并减少外源抗体和内源抗体之间重链轻链对的交换。优选地,位置226-229分别被C、P、P和C占据。

[0202] 示例性铰链区具有残基226-236,有时称为中(或核心)和下铰链,其被命名为GGG-(233-236)、GG--(233-236)、G---(233-236)和无G(233-236)的修饰铰链序列占据。任选地,铰链结构域氨基酸序列包含CPPCPAPGGG-GPSVF (SEQ ID NO:31) (先前公开为W02016161010A2的SEQ ID NO:1)、CPPCPAPGG-GPSVF (SEQ ID NO:32) (先前公开为W02016161010A2的SEQ ID NO:2)、CPPCPAPG---GPSVF (SEQ ID NO:33) (先前公开为W02016161010A2的SEQ ID NO:3)、或CPCCPAP---GPSVF (SEQ ID NO:34) (先前公开为W02016161010A2的SEQ ID NO:4)。

[0203] 上述修饰的铰链区可以并入重链恒定区,重链恒定区通常包括CH2和CH3结构域,并且其可以具有侧接指定区域的附加铰链区段(例如,上铰链)。存在的此类另外的恒定区片段通常具有相同的同种型,优选人同种型,尽管可以是不同同种型的杂合体。此类另外的人恒定区片段的同种型优选地是人IgG4,但也可以是人IgG1、IgG2或IgG3或其结构域是不同同种型的杂合体。人IgG1、IgG2和IgG4的示例性序列显示于W02016161010A2的图2-4中。

[0204] 在具体的实施方案中,修饰的铰链序列可以连接至IgG4 CH2区(例如通过并入

IgG4 Fc结构域,例如人或鼠Fc结构域,其可以在CH2和/或CH3结构域中被进一步修饰以降低效应功能,例如如第6.2.7.1节中所描述的)。

[0205] 6.2.6.2.Fc结构域

[0206] 本公开的MBM可以包括衍生自任何合适物种的Fc区。在一个实施方案中,Fc区衍生自人Fc结构域。

[0207] Fc结构域可衍生自任何合适类别的抗体,包括IgA(包括亚类IgA1和IgA2)、IgD、IgE、IgG(包括亚类IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)和IgM。在一个实施方案中,Fc结构域衍生自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。在一个实施方案中,Fc结构域衍生自IgG1。在一个实施方案中,Fc结构域衍生自IgG4。

[0208] Fc区内的两个Fc结构域可以彼此相同或不同。在天然抗体中,Fc结构域通常是相同的,但为了产生多特异性结合分子,例如,本公开的MBM,Fc结构域可以有利地不同以允许异二聚化,如下文第6.2.7.2节中所描述的。

[0209] 在天然抗体中,IgA、IgD和IgG的重链Fc结构域由两个重链恒定结构域(CH2和CH3)组成,并且IgE和IgM的重链Fc结构域由三个重链恒定结构域(CH2、CH3和CH3)组成。这些二聚化以形成Fc区域。

[0210] 在本公开的MBM中,Fc区和/或其内的Fc结构域可以包含来自一种或多种不同类别(例如一种、两种或三种不同类别)的抗体的重链恒定结构域。

[0211] 在一个实施方案中,Fc区包含衍生自IgG1的CH2和CH3结构域。

[0212] 在一个实施方案中,Fc区包含衍生自IgG2的CH2和CH3结构域。

[0213] 在一个实施方案中,Fc区包含衍生自IgG3的CH2和CH3结构域。

[0214] 在一个实施方案中,Fc区包含衍生自IgG4的CH2和CH3结构域。

[0215] 在一个实施方案中,Fc区包含来自IgM的CH4结构域。IgM CH4结构域通常位于CH3结构域的C末端。

[0216] 在一个实施方案中,Fc区包含衍生自IgG的CH2和CH3结构域以及衍生自IgM的CH4结构域。

[0217] 应当理解,用于产生本公开的MBM的Fc区的重链恒定结构域可以包括上述天然存在的恒定结构域的变体。与野生型恒定结构域相比,此类变体可包含一种或多种氨基酸变异。在一个实例中,本公开的Fc区包含至少一个恒定结构域,其序列与野生型恒定结构域不同。应当理解,变体恒定结构域可以比野生型恒定结构域更长或更短。优选地,变体恒定结构域与野生型恒定结构域至少60%相同或相似。在另一个实例中,变体恒定结构域至少70%相同或相似。在另一个实例中,变体恒定结构域至少80%相同或相似。在另一个实例中,变体恒定结构域至少90%相同或相似。在另一个实例中,变体恒定结构域至少95%相同或相似。

[0218] IgM和IgA作为共同H2L2抗体单元的共价多聚体天然存在于人类中。当IgM包含J链时,它会以五聚体的形式出现;当IgM缺少J链时,它会以六聚体的形式出现。IgA以单体和二聚体形式出现。IgM和IgA的重链具有延伸至C末端恒定结构域的18个氨基酸,称为尾巴。尾巴包括半胱氨酸残基,该残基在聚合物的重链之间形成二硫键,并且被认为在聚合中具有重要作用。尾巴还含有糖基化位点。在某些实施方案中,本公开的MBM不包含尾巴。

[0219] 掺入本公开的MBM中的Fc结构域可以包含改变蛋白质的功能特性的一种或多种修

饰,例如结合至Fc-受体如FcRn或白细胞受体、结合至补体、修饰的二硫键结构、或改变的糖基化模式。

[0220] 具有修饰的二硫键结构的Fc结构域包括CH3(S-S)工程化的Fc结构域,例如通过在CH3结构域之一中引入E356C或S354C突变。任选地,将Y349C突变引入另一个CH3结构域(根据EU编号)。

[0221] 改变效应功能的示例性Fc修饰在第6.2.7.1节中描述。

[0222] 还可以改变Fc结构域以包括改进不对称MBM的可制造性的修饰,例如通过允许异二聚化,异二聚化是不同的Fc结构域相对于相同的Fc结构域的优先配对。异二聚化允许产生MBM,其中不同的ABS通过含有序列不同的Fc结构域的Fc区彼此连接。异二聚化策略的实例在第6.2.7.2节中举例说明。

[0223] 应当理解,上述提到的任何修饰可以以任何合适的方式组合以实现期望的功能特性和/或与其他修饰组合以改变MBM的特性。

[0224] 6.2.7.1.具有改变的效应功能的Fc结构域

[0225] 在一些实施方案中,Fc结构域包含减少与Fc受体的结合和/或效应功能的一个或多个氨基酸取代。

[0226] 在特定实施方案中,Fc受体是Fc γ 受体。在一个实施方案中,Fc受体是人Fc受体。在一个实施方案中,Fc受体是激活性Fc受体。在具体实施方案中,Fc受体是激活性人Fc γ 受体,更具体地是人Fc γ RIIa、Fc γ RI或Fc γ RI1a,最具体地是人Fc γ RI1a。在一个实施方案中,效应功能是选自补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)和细胞因子分泌的组中的一种或多种。在特定实施方案中,效应功能是ADCC。

[0227] 在某些方面,具有降低的效应功能的Fc区包含在S228、E233、L234、L235、D265、N297、P329和P331(均根据EU编号)中一处或多处的氨基酸取代。

[0228] S228处的示例性取代包括S228P。

[0229] E233处的示例性取代包括E233A和E233P。

[0230] L234处的示例性取代包括L234A。

[0231] L235处的示例性取代包括L235A和L235E。

[0232] D265处的示例性取代包括D265A。

[0233] N297处的示例性取代包括N297A和N297D。

[0234] P329处的示例性取代包括P329G或P329A。

[0235] P331处的示例性取代包括P331S。

[0236] 在一些实施方案中,Fc区在选自L234、L235和P329(根据Kabat EU索引编号)的组的位置处包含氨基酸取代。在一些实施方案中,Fc区包含氨基酸取代L234A和L235A(根据Kabat EU索引编号)。在一个这样的实施方案中,Fc区是Igd Fc区,特别是人Igd Fc区。在一个实施方案中,Fc区包含位置P329处的氨基酸取代。在更具体的实施方案中,氨基酸取代是P329A或P329G,特别是P329G(根据Kabat EU索引编号)。在一个实施方案中,Fc区包含位置P329处的氨基酸取代和选自E233、L234、L235、N297和P331(根据Kabat EU索引编号)的位置处的进一步氨基酸取代。在更具体的实施方案中,进一步的氨基酸取代是E233P、L234A、L235A、L235E、N297A、N297D或P331S。在特定实施方案中,Fc区包含位置P329、L234和L235

(根据Kabat EU索引编号)处的氨基酸取代。在更特定的实施方案中,Fc区包含氨基酸突变L234A、L235A和P329G(“P329G LALA”、“PGLALA”或“LALAPG”)。

[0237] 通常,相同的一个或多个氨基酸取代存在于Fc区的两个Fc结构域中的每一个。因此,在特定实施方案中,Fc区的每个Fc结构域包含氨基酸取代L234A、L235A和P329G(Kabat EU索引编号),即在Fc区的第一和第二Fc结构域的每一个中,位置234的亮氨酸残基被丙氨酸残基取代(L234A),位置235的亮氨酸残基被丙氨酸残基取代(L235A),以及位置329的脯氨酸被甘氨酸残基取代(P329G)(根据Kabat EU索引编号)。

[0238] 适合于降低效应功能的另外的取代组合包括(1) D265A/P329A, (2) D265A/N297A, (3) L234/L235A, 和(4) P329A/L234A/L235A。

[0239] 在一个实施方案中,Fc结构域是IgG1 Fc结构域,特别是人IgG1 Fc结构域。

[0240] 通常,相同的一个或多个氨基酸取代存在于Fc区的两个Fc结构域中的每一个。因此,在特定实施方案中,Fc区的每个Fc结构域包含氨基酸取代L234A、L235A和P329G(Kabat EU索引编号),即在Fc区的第一和第二Fc结构域的每一个中,位置234的亮氨酸残基被丙氨酸残基取代(L234A),位置235的亮氨酸残基被丙氨酸残基取代(L235A),以及位置329的脯氨酸被甘氨酸残基取代(P329G)(根据Kabat EU索引编号)。

[0241] 在一个实施方案中,Fc结构域是IgG1 Fc结构域,特别是人IgG1 Fc结构域。在一些实施方案中,IgG1 Fc结构域是包含D265A、N297A突变(EU编号)以降低效应功能的变体IgG1。

[0242] 在另一个实施方案中,Fc结构域是与Fc受体的结合降低的IgG4 Fc结构域。与Fc受体的结合降低的示例性IgG4 Fc结构域可以包含选自下表5的氨基酸序列。在一些实施方案中,Fc结构域仅包括以下所示序列的粗体部分:

表 5

Fc 结构域	序列
WO2014/121087 的 SEQ ID NO:1	Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys (SEQ ID NO: 35)
WO2014/121087 的 SEQ ID NO: 2	Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys (SEQ ID NO: 36)

[0243]

表 5

Fc 结构域	序列
WO2014/121087 的 SEQ ID NO: 30	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys (SEQ ID NO: 37)
WO2014/121087 的 SEQ ID NO: 31	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys (SEQ ID NO: 38)
WO2014/121087 的 SEQ ID NO: 37	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

[0244]

表 5

Fc 结构域	序列
	Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys (SEQ ID NO: 39)
WO2014/121087 的 SEQ ID NO: 38	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys (SEQ ID NO: 40)

[0245]

[0246] 在特定实施方案中,具有降低的效应功能降低的IgG4包含WO2014/121087的SEQ ID NO:31的氨基酸序列的粗体部分,有时在本文中称为IgG4或hIgG4。

[0247] 对于异源二聚体ABM,可以并入上述变体IgG4 Fc序列的组合,例如包含WO2014/121087的SEQ ID NO:30(或其粗体部分)和WO2014/121087的SEQ ID NO:37(或其粗体部分)的组合的Fc区或包含WO2014/121087的SEQ ID NO:31(或其粗体部分)和WO2014/121087的SEQ ID NO:38(或其粗体部分)的组合的Fc区。

[0248] 6.2.7.2.Fc异二聚体变体

[0249] 许多多特异性分子形式需要两个Fc结构域之间的二聚化,其与天然免疫球蛋白不同,可操作地连接至不相同的抗原结合结构域(或其部分,例如Fab的VH或VH-CH1)。两个Fc区形成Fc结构域的不充分异二聚化可能是增加期望多特异性分子产量的障碍,并且呈现为纯化中的挑战。本领域可用的多种方法可用于增强可能存在于本公开的MBM中的Fc结构域的二聚化,例如如EP 1870459A1;美国专利号5,582,996;美国专利号5,731,168;美国专利号5,910,573;美国专利号5,932,448;美国专利号6,833,441;美国专利号7,183,076;美国专利申请公开号2006204493A1;以及PCT公开号W02009/089004A1中所公开的。

[0250] 本公开提供包含Fc异二聚体的MBM,即包含异源、不相同的Fc结构域的Fc区。异二聚化策略用于增强可操作地连接至不同ABS(或其部分,例如Fab的VH或VH-CH1)的Fc区的二聚化并减少可操作地连接至相同ABS的Fc结构域的二聚化。通常,Fc异二聚体中的每个Fc结

构域包含抗体的CH3结构域。CH3结构域衍生自任何同种型、类别或亚类的抗体的恒定区,并且优选IgG(IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)类别的抗体的恒定区,如前一节所描述的。

[0251] CH3结构域处两条不同重链的异二聚化产生期望的MBM,而相同重链的同二聚化将降低期望MBM的产率。因此,在优选的实施方案中,缔合形成本公开的MBM的两个半抗体将含有相对于未修饰的链具有有利于异二聚体缔合的修饰的CH3结构域。

[0252] 在具体实施方案中,所述促进Fc异二聚体形成的修饰是所谓的“杵入臼(knob-into-hole)”或“杵臼(knob-in-hole)”修饰,包括在Fc结构域之一中的“杵”修饰以及在另一个Fc结构域中的“臼”修饰。杵入臼技术描述于,例如,美国专利号5,731,168;US 7,695,936;Ridgway等人,1996,Prot Eng 9:617-621以及Carter,2001,Immunol Meth 248:7-15中。一般而言,该方法涉及在第一多肽的界面处和在第二多肽的界面中相应的空腔(“臼”)引入突起(“杵”),使得突起可以放置在空腔中,从而促进异二聚体形成并阻碍同二聚体形成。通过用较大侧链(例如,酪氨酸或色氨酸)替换第一多肽界面的小氨基酸侧链来构建突起。通过用较小的氨基酸侧链(例如,丙氨酸或苏氨酸)替换大的氨基酸侧链,在第二多肽的界面中产生与突起大小相同或相似的补偿空腔。

[0253] 因此,在一些实施方案中,Fc结构域的第一亚基的CH3结构域中的氨基酸残基被具有较大侧链体积的氨基酸残基取代,从而在第一亚基的CH3结构域内生成突起,该突起位于第二亚基的CH3结构域内的空腔中,并且Fc结构域的第二亚基的CH3结构域中的氨基酸残基被具有较小侧链体积的氨基酸残基取代,从而生成第二亚基的CH3结构域内的空腔,第一亚基的CH3结构域内的突起可放置在该空腔内。优选地,所述具有较大侧链体积的氨基酸残基选自精氨酸(R)、苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)和色氨酸(W)。优选地,所述具有较小侧链体积的氨基酸残基选自丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)和缬氨酸(V)。突起和空腔可以通过改变编码多肽的核酸来制造,例如,通过位点特异性诱变,或通过肽合成。示例性取代是Y470T。

[0254] 在具体的此类实施方案中,在第一Fc结构域中,位置366处的苏氨酸残基被色氨酸残基(T366W)替换,并且在Fc结构域中,位置407处的酪氨酸残基被缬氨酸残基(Y407V)替换,且任选地,位置366处的苏氨酸残基被丝氨酸残基(T366S)替换,并且位置368处的亮氨酸残基被丙氨酸残基(L368A)替换(根据Kabat EU索引编号)。在进一步的实施方案中,在第一Fc结构域中,另外地位置354处的丝氨酸残基被半胱氨酸残基(S354C)替换,或者位置356处的谷氨酸残基被半胱氨酸残基(E356C)替换(特别是位置354处的丝氨酸残基被半胱氨酸残基替换),并且在第二Fc结构域中,另外地位置349处的酪氨酸残基被半胱氨酸残基(Y349C)替换(根据Kabat EU索引编号)。在特定实施方案中,第一Fc结构域包含氨基酸取代S354C和T366W,并且第二Fc结构域包含氨基酸取代Y349C、T366S、L368A和Y407V(根据Kabat EU索引编号)。

[0255] 在一些实施方案中,静电转向(例如,如Gunasekaran等人,2010,J Biol Chem 285(25):19637-46中所描述的)可用于促进Fc结构域的第一和第二亚基的缔合。

[0256] 作为使用经修饰以促进异二聚化的Fc结构域的替代或附加,可修饰Fc结构域以允许能够选择Fc异二聚体的纯化策略。在一个这样的实施方案中,一个半抗体包含修饰的消除其与蛋白A的结合的Fc结构域,从而使能够产生异二聚体蛋白的纯化方法成为可能。参见,例如,美国专利号8,586,713。因此,MBM包含第一CH3结构域和第二Ig CH3结构域,其中第一和第二Ig CH3结构域彼此有至少一个氨基酸不同,并且与缺乏氨基酸差异的相应的

MBM相比,其中至少一个氨基酸差异减少了MBM与蛋白A的结合。在一个实施方案中,第一CH3结构域结合蛋白A并且第二CH3结构域含有减少或消除蛋白A结合的突变/修饰,例如H95R修饰(通过IMGT外显子编号;通过EU编号为H435R)。第二CH3可进一步包含Y96F修饰(通过IMGT;通过EU为Y436F)。因此,修饰类别在本文中被称为“star”突变。

[0257] 在某些方面,本公开的MBM可以包括杵臼突变和star突变以促进纯化。在各种实施方案中,一个半抗体含有杵或臼突变,而另一个半抗体包含相应的臼或杵突变。因此,在一些实施方案中,一个半抗体的Fc结构域包含一个或多个杵突变和star突变,并且另一个半抗体的Fc结构域包含一个或多个臼突变。在其他实施方案中,一个半抗体的Fc结构域包含一个或多个臼突变和star突变,并且另一个半抗体的Fc结构域包含一个或多个杵突变。

[0258] 6.3. 恒定结构域

[0259] 本公开的MBM通常包含两个半抗体。通常,每个半抗体包含由CH2和CH3结构域组成的恒定结构域(例如,如第6.2.7节的Fc结构域的上下文中所描述的)以及在其N末端的铰链结构域(例如,如第6.2.6节中所描述的)。每个恒定结构域可以在其N末端融合抗原结合位点或其多肽链之一,例如Fab结构域的CH1部分。

[0260] 在一些实施方案中,恒定结构域具有图17中所示的任何配置或序列。在各种实施方案中,恒定结构域包含具有图17中所示的铰链序列的铰链(例如,SEQ ID NO:66至72中的任一个),其具有野生型或修饰的CH2和/或CH3结构域,例如,修饰以降低效应功能、促进正确异二聚体形成、修饰以促进纯化等。示例性的修饰在第6.2.7节中阐述,包括其小节第6.2.7.1节和第6.2.7.2节。

[0261] 在一些实施方案中,本公开的MBM含有包含根据SEQ ID NO:45的氨基酸序列的氨基酸序列的恒定结构域、包含根据SEQ ID NO:46的氨基酸序列的氨基酸序列的恒定结构域、包含根据SEQ ID NO:48的氨基酸序列的氨基酸序列的恒定结构域、包含根据SEQ ID NO:49的氨基酸序列的氨基酸序列的恒定结构域、包含根据SEQ ID NO:50的氨基酸序列的氨基酸序列的恒定结构域、包含根据SEQ ID NO:51的氨基酸序列的氨基酸序列的恒定结构域、包含根据SEQ ID NO:52的氨基酸序列的氨基酸序列的恒定结构域、包含根据SEQ ID NO:53的氨基酸序列的氨基酸序列的恒定结构域、包含根据SEQ ID NO:54的氨基酸序列的氨基酸序列的恒定结构域、包含根据SEQ ID NO:58的氨基酸序列的氨基酸序列的恒定结构域、包含根据SEQ ID NO:59的氨基酸序列的氨基酸序列的恒定结构域、包含根据SEQ ID NO:60的氨基酸序列的氨基酸序列的恒定结构域、包含根据SEQ ID NO:61的氨基酸序列的氨基酸序列的恒定结构域、包含根据SEQ ID NO:62的氨基酸序列的氨基酸序列的恒定结构域、包含根据SEQ ID NO:63的氨基酸序列的氨基酸序列的恒定结构域、包含根据SEQ ID NO:64的氨基酸序列的氨基酸序列的恒定结构域、包含根据SEQ ID NO:65的氨基酸序列的氨基酸序列的恒定结构域,或包含与任意前述序列标识符提供的氨基酸序列具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的氨基酸序列的恒定结构域。

[0262] 在一些实施方案中,恒定结构域是“嵌合的”,包含来自多于一种免疫球蛋白同种型的恒定结构域序列。在一些实施方案中,嵌合恒定结构域具有来自不同IgG同种型(例如,IgG1、IgG2、IgG3和IgG4中的任意两种)的序列。

[0263] 示例性嵌合恒定结构域是本文中称为“IgG1 PVA”同种型或类似术语,其包含IgG1

上铰链结构域、IgG1核心铰链结构域和在氨基酸位置233-236(EU编号)处具有取代/缺失突变ELLG→PVA-(或“P-V-A-缺失”)(“ELLG”公开为SEQ ID NO:79)的IgG1下铰链结构域、IgG1 CH2结构域和IgG1 CH3结构域。ELLG→PVA-(或“P-V-A-缺失”)(“ELLG”公开为SEQ ID NO:79)修饰将IgG2序列并入IgG1中。在某些方面,嵌合恒定结构域包含与SEQ ID NO:46(hIgG1 PVA恒定结构域)具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%序列同一性的氨基酸序列。

[0264] 嵌合恒定结构域可以被进一步修饰以,例如,进一步改变效应功能(例如,如第6.2.7.1节中所描述的)和/或促进MBM与不对称半抗体的正确配对或纯化(例如,如第6.2.7.2节中所描述的)。

[0265] 在特定实施方案中,本公开的MBM包含含有Fc异二聚体的两个恒定结构域,其中这两个恒定结构域包含与SEQ ID NO:46(hIgG1 PVA恒定结构域)具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、97%或至少98%的序列同一性的氨基酸序列,其中:

[0266] a) 两个恒定结构域都在氨基酸位置233-236(EU编号)处包含P-V-A缺失序列;

[0267] b) 一个恒定结构域包含杆突变T366W并且另一个恒定结构域包含白突变T366S、L368A和Y407V;

[0268] c) 任选地,一个或两个恒定结构域包含star突变H435R和Y436F;和

[0269] d) 两个恒定结构域都或都不包含二硫键结构突变S354C或E356C。

[0270] 在特定实施方案中,本公开的MBM包含含有Fc异二聚体的两个恒定结构域,其中这两个恒定结构域包含:

[0271] a) 第一恒定结构域,其包含与SEQ ID NO:58具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,如果氨基酸序列与SEQ ID NO:58具有小于100%的同一性,则该序列保留在铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236(EU编号)处的P-V-A-缺失)以及杆突变T366W;和

[0272] b) 第二恒定结构域,其包含与SEQ ID NO:62具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,如果氨基酸序列与SEQ ID NO:62具有小于100%的同一性,则该序列保留在铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236(EU编号)处的P-V-A-缺失)以及白突变T366S、L368A和Y407V。

[0273] 在另一个特定实施方案中,本公开的MBM包含含有Fc异二聚体的两个恒定结构域,其中这两个恒定结构域包含:

[0274] a) 第一恒定结构域,其包含与SEQ ID NO:58具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,如果氨基酸序列与SEQ ID NO:58具有小于100%的同一性,则该序列保留在铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236(EU编号)处的P-V-A-缺失)以及杆突变T366W;和

[0275] b) 第二恒定结构域,其包含与SEQ ID NO:63具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,如果氨基酸序列与SEQ ID NO:63具有小于100%的同一性,则该序列保留在铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236(EU编号)处的P-V-A-缺失)、白突变T366S、L368A和Y407V以及star突变H435R和Y436F。

[0276] 在另一个特定实施方案中,本公开的MBM包含含有Fc异二聚体的两个恒定结构域,

其中这两个恒定结构域包含：

[0277] a) 第一恒定结构域,其包含与SEQ ID NO:59具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,如果氨基酸序列与SEQ ID NO:59具有小于100%的同一性,则该序列保留在铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236(EU编号)处的P-V-A-缺失)、白突变T366W、以及star突变H435R和Y436F;和

[0278] b) 第二恒定结构域,其包含与SEQ ID NO:62具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,如果氨基酸序列与SEQ ID NO:62具有小于100%的同一性,则该序列保留在铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236(EU编号)处的P-V-A-缺失)以及白突变T366S、L368A和Y407V。

[0279] 在另一个特定实施方案中,本公开的MBM包含含有Fc异二聚体的两个恒定结构域,其中这两个恒定结构域包含：

[0280] a) 第一恒定结构域,其包含与SEQ ID NO:59具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,如果氨基酸序列与SEQ ID NO:59具有小于100%的同一性,则该序列保留在铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236(EU编号)处的P-V-A-缺失)、knob突变T366W、以及star突变H435R和Y436F;和

[0281] b) 第二恒定结构域,其包含与SEQ ID NO:63具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,如果氨基酸序列与SEQ ID NO:63具有小于100%的同一性,则该序列保留在铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236(EU编号)处的P-V-A-缺失)、白突变T366S、L368A和Y407V以及star突变H435R和Y436F。

[0282] 在另一个特定实施方案中,本公开的MBM包含含有Fc异二聚体的两个恒定结构域,其中这两个恒定结构域包含：

[0283] a) 第一恒定结构域,其包含与SEQ ID NO:60具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,如果氨基酸序列与SEQ ID NO:60具有小于100%的同一性,则该序列保留在铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236(EU编号)处的P-V-A-缺失)、二硫键结构突变S354C以及白突变T366W;和

[0284] b) 第二恒定结构域,其包含与SEQ ID NO:64具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,如果氨基酸序列与SEQ ID NO:64具有小于100%的同一性,则该序列保留在铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236(EU编号)处的P-V-A-缺失)、二硫键结构突变S354C以及白突变T366S、L368A和Y407V。

[0285] 在另一个特定实施方案中,本公开的MBM包含含有Fc异二聚体的两个恒定结构域,其中这两个恒定结构域包含：

[0286] a) 第一恒定结构域,其包含与SEQ ID NO:60具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,如果氨基酸序列与SEQ ID NO:60具有小于100%的同一性,则该序列保留在铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236(EU编号)处的P-V-A-缺失)、二硫键结构突变S354C(或者替代性地结构突变S354C被二硫键结构突变E356C取代)以及白突变T366W;和

[0287] b) 第二恒定结构域,其包含与SEQ ID NO:65具有至少90%、至少93%、至少95%、

至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,如果氨基酸序列与SEQ ID NO:65具有小于100%的同一性,则该序列保留在铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236(EU编号)处的P-V-A-缺失)、二硫键结构突变S354C(或者替代性地结构突变S354C被二硫键结构突变E356C取代)、白突变T366S、L368A和Y407V以及star突变H435R和Y436F。

[0288] 在另一个特定实施方案中,本公开的MBM包含含有Fc异二聚体的两个恒定结构域,其中这两个恒定结构域包含:

[0289] a) 第一恒定结构域,其包含与SEQ ID NO:61具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,如果氨基酸序列与SEQ ID NO:61具有小于100%的同一性,则该序列保留在铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236(EU编号)处的P-V-A-缺失)、二硫键结构突变S354C(或者替代性地结构突变S354C被二硫键结构突变E356C取代)、白突变T366W以及star突变H435R和Y436F;和

[0290] b) 第二恒定结构域,其包含与SEQ ID NO:64具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,如果氨基酸序列与SEQ ID NO:64具有小于100%的同一性,则该序列保留在铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236(EU编号)处的P-V-A-缺失)、二硫键结构突变S354C(或者替代性地结构突变S354C被二硫键结构突变E356C取代)以及白突变T366S、L368A和Y407V。

[0291] 在另一个特定实施方案中,本公开的MBM包含含有Fc异二聚体的两个恒定结构域,其中这两个恒定结构域包含:

[0292] a) 第一恒定结构域,其包含与SEQ ID NO:61具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,如果氨基酸序列与SEQ ID NO:61具有小于100%的同一性,则该序列保留在铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236(EU编号)处的P-V-A-缺失)、二硫键结构突变S354C(或者替代性地结构突变S354C被二硫键结构突变E356C取代)、白突变T366W以及star突变H435R和Y436F;和

[0293] b) 第二恒定结构域,其包含与SEQ ID NO:65具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,如果氨基酸序列与SEQ ID NO:65具有小于100%的同一性,则该序列保留在铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236(EU编号)处的P-V-A-缺失)、二硫键结构突变S354C(或者替代性地结构突变S354C被二硫键结构突变E356C取代)、白突变T366S、L368A和Y407V以及star突变H435R和Y436F。

[0294] 在又进一步的实施方案中,本公开的MBM包含含有Fc异源二聚体的两个恒定结构域,其中这两个恒定结构域包含与SEQ ID NO:49(hIgG1 N180G,也称为hIgG1 N297G)具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、或至少98%序列同一性的氨基酸序列,其中:

[0295] a) 两个恒定结构域都包含N180G/N297G氨基酸取代;

[0296] b) 一个恒定结构域包含杆突变T366W并且另一个恒定结构域包含白突变T366S、L368A和Y407V;

[0297] c) 任选地,一个或两个恒定结构域包含star突变H435R和Y436F;和

[0298] d) 两个恒定结构域都包含或都不包含二硫键结构突变S354C或E356C。

[0299] 在又进一步的实施方案中,本公开的MBM包含含有Fc异二聚体的两个恒定结构域,其中这两个恒定结构域包含与SEQ ID NO:53(hIgG4 S108P,也称为hIgG4 S228P)具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、或至少98%序列同一性的氨基酸序列,其中:

[0300] a) 两个恒定结构域都包含S108P/S228P氨基酸取代;

[0301] b) 一个恒定结构域包含杆突变T366W并且另一个恒定结构域包含臼突变T366S、L368A和Y407V;

[0302] c) 任选地,一个或两个恒定结构域包含star突变H435R和Y436F;和

[0303] d) 两个恒定结构域都包含或都不包含二硫键结构突变S354C或E356C。

[0304] 在又进一步的实施方案中,本公开的MBM包含含有Fc异二聚体的两个恒定结构域,其中这两个恒定结构域包含与SEQ ID NO:54(具有S108P(也称为hIgG4 S228P)取代的变体IgG4、以及IgG1 CH2和CH3结构域)具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%或至少98%序列同一性的氨基酸序列,其中:

[0305] a) 两个恒定结构域都包含S108P/S228P氨基酸取代;

[0306] b) 一个恒定结构域包含杆突变T366W并且另一个恒定结构域包含臼突变T366S、L368A和Y407V;

[0307] c) 任选地,一个或两个恒定结构域包含star突变H435R和Y436F;和

[0308] d) 两个恒定结构域都包含或都不包含二硫键结构突变S354C或E356C。

[0309] 6.4.核酸和宿主细胞

[0310] 在另一个方面,本公开提供了编码本公开的MBM的核酸。在一些实施方案中,MBM由单一核酸编码。在其他实施方案中,MBM由多个(例如,两个、三个、四个或更多个)核酸编码。

[0311] 单个核酸可以编码包含单个多肽链的MBM、包含两个或更多个多肽链的MBM、或包含多于两个多肽链的MBM的一部分(例如,单个核酸可以编码包含三个、四个或更多个多肽链的MBM的两个多肽链,或包含四个或更多个多肽链的MBM的三个多肽链)。为了单独控制表达,编码两个或更多个多肽链的开放阅读框可以处于单独转录调控元件(例如,启动子和/或增强子)的控制之下。编码两个或更多个多肽的开放阅读框也可以由相同的转录调控元件控制,并由内部核糖体进入位点(IRES)序列分开,从而允许翻译成单独的多肽。

[0312] 在一些实施方案中,包含两个或更多个多肽链的MBM由两个或更多个核酸编码。编码MBM的核酸的数量可以等于或小于MBM中的多肽链的数量(例如,当多于一个的多肽链由单个核酸编码时)。

[0313] 本公开的核酸可以是DNA或RNA(例如,mRNA)。

[0314] 在另一个方面,本公开提供了含有本公开的核酸的宿主细胞和载体。该核酸可存在于单一载体中或相同宿主细胞或单独宿主细胞中的单独载体中,如下文更详细所描述的。

[0315] 6.4.1.载体

[0316] 本公开提供了包含编码本文所述的MBM或MBM组分的核苷酸序列的载体,例如单抗体的一个或两个多肽链。载体包括但不限于病毒、质粒、粘粒、λ噬菌体或酵母人工染色体(YAC)。

[0317] 可以采用许多载体系统。例如,一类载体利用衍生自动物病毒的DNA元件,例如牛

乳头状瘤病毒、多瘤病毒、腺病毒、牛痘病毒、杆状病毒、逆转录病毒(Rous肉瘤病毒、MMTV或MOMLV)或SV40病毒。另一类载体利用衍生自RNA病毒的RNA元件,例如塞姆利基森林病毒、东方马脑炎病毒和黄病毒。

[0318] 此外,可以通过引入一种或多种允许选择转染宿主细胞的标记来选择已将DNA稳定整合到其染色体中的细胞。该标记可以提供例如对营养缺陷型宿主的原养型、杀虫剂抗性(例如,抗生素)或对重金属(例如铜)的抗性等。选择标记基因可以直接连接至待表达的DNA序列,或通过共转化引入同一细胞中。mRNA的最佳合成可能还需要另外的元件。这些元件可以包括剪接信号以及转录启动子、增强子和终止信号。

[0319] 一旦制备好用于表达的表达载体或含有构建体的DNA序列,就可以将表达载体转染或引入适当的宿主细胞中。可以采用各种技术来实现这一点,例如原生质体融合、磷酸钙沉淀、电穿孔、逆转录病毒转导、病毒转染、基因枪、基于脂质的转染或其他常规技术。用于培养所得转染细胞和用于回收表达的多肽的方法和条件是本领域技术人员已知的,并且可以根据基于本描述的所使用的特定表达载体和哺乳动物宿主细胞而变化或优化。

[0320] 6.4.2. 细胞

[0321] 本公开还提供了包含本公开的核酸的宿主细胞。

[0322] 在一个实施方案中,宿主细胞被基因工程改造以包含本文描述的一种或多种核酸。

[0323] 在一个实施方案中,通过使用表达盒对宿主细胞进行基因工程改造。短语“表达盒”指能够影响基因在与此类序列相容的宿主中表达的核苷酸序列。此类盒可包括启动子、具有或不具有内含子的开放阅读框和终止信号。还可以使用影响表达所必需的或有帮助的额外因子,如,例如,诱导型启动子。

[0324] 本公开还提供了包含本文描述的载体的宿主细胞。

[0325] 细胞可以是但不限于真核细胞、细菌细胞、昆虫细胞或哺乳动物(例如人)细胞。合适的真核细胞包括但不限于Vero细胞、HeLa细胞、COS细胞、CHO细胞、HEK293细胞、BHK细胞和MDCKII细胞。还包括前述细胞类型的衍生物(例如,但不限于Expi293,已适应于更高密度生长的HEK293的衍生物)。合适的昆虫细胞包括但不限于Sf9细胞。

[0326] 6.5. 药物组合物

[0327] 本公开的MBM可以是包含MBM和一种或多种载剂、赋形剂和/或稀释剂的组合物的形式。组合物可以配制用于特定用途,例如用于兽医用途或人类药物用途。组合物的形式(例如,干粉、液体制剂等)和所使用的赋形剂、稀释剂和/或载剂将取决于MBM的预期用途以及施用模式(对于治疗用途)。

[0328] 对于治疗用途,组合物可以作为包括药学上可接受的载剂的无菌药物组合物的一部分来提供。该组合物可以是任何合适的形式(取决于将其施用于患者的期望方法)。药物组合物可以通过多种途径施用于患者,例如口服、经皮、皮下、鼻内、静脉内、肌内、鞘内、外用或局部。在任何给定情况下最合适的施用途径将取决于特定受试者、疾病的性质和严重程度以及受试者的身体状况。通常,药物组合物将静脉内或皮下施用。

[0329] 药物组合物可以方便地以每剂量含有预定量的本公开的MBM的单位剂型存在。单位剂量中包含的MBM的量将取决于所治疗的疾病以及本领域众所周知的其他因素。此类单位剂量可以是包含适合单次施用的量的MBM的冻干干粉的形式,或者是液体的形式。干粉单

位剂型可以与注射器、适量的稀释剂和/或用于施用的其他组分一起包装在试剂盒中。液体形式的单位剂量可以以预先填充有适合单次施用的量的MBM的注射器的形式方便地提供。

[0330] 药物组合物还可以以含有适合多次施用的量的MBM的散装形式提供。

[0331] 可以通过将具有期望纯度的MBM与本领域通常使用的任选的药学上可接受的载剂、赋形剂或稳定剂(所有这些在本文中称为“载剂”),即缓冲剂、稳定剂、防腐剂、等渗剂、非离子洗涤剂、抗氧化剂和其他混杂的添加剂混合来制备药物组合物用于以冻干制剂或水溶液形式储存。参见,Remington's Pharmaceutical Sciences,16th edition (Osol, ed.1980)。此类添加剂在所使用的剂量和浓度下应当对接受者无毒。

[0332] 缓冲剂有助于将pH维持在接近生理条件的范围内。它们可以多种浓度存在,但通常以约2mM至约50mM范围内的浓度存在。用于本公开的合适的缓冲剂包括有机酸和无机酸及其盐,如柠檬酸盐缓冲剂(例如,柠檬酸单钠-柠檬酸二钠混合物、柠檬酸-柠檬酸三钠混合物、柠檬酸-柠檬酸单钠混合物等)、琥珀酸盐缓冲剂(例如,琥珀酸-琥珀酸单钠混合物、琥珀酸-氢氧化钠混合物、琥珀酸-琥珀酸二钠混合物等)、酒石酸盐缓冲剂(例如,酒石酸-酒石酸钠混合物、酒石酸-酒石酸钾混合物、酒石酸-氢氧化钠混合物等)、富马酸盐缓冲剂(例如,富马酸-富马酸单钠混合物、富马酸-富马酸二钠混合物、富马酸单钠-富马酸二钠混合物等)、葡糖酸盐缓冲剂(例如,葡萄糖酸-葡糖酸钠混合物、葡萄糖酸-葡糖酸钾混合物等)、草酸盐缓冲液(例如,草酸-草酸钠混合物、草酸-氢氧化钠混合物、草酸-草酸钾混合物等)、乳酸盐缓冲液(例如,乳酸-乳酸钠混合物、乳酸-氢氧化钠混合物、乳酸-乳酸钾混合物等)和乙酸盐缓冲液(例如,乙酸-乙酸钠混合物、乙酸-氢氧化钠混合物等)。另外,可以使用磷酸盐缓冲液、组氨酸缓冲液和三甲胺盐如Tris。

[0333] 可以添加防腐剂以延缓微生物生长,并且可以以约0.2%-1% (w/v) 范围内的量添加。用于本发明的合适的防腐剂包括苯酚、苯甲醇、间甲酚、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、十八烷基二甲基苄基氯化铵、苯扎卤化物(例如,氯化物、溴化物和碘化物)、六甲铵氯化物和对羟基苯甲酸烷基例如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯、儿茶酚、间苯二酚、环己醇和3-戊醇。可以添加有时被称为“稳定剂”的等渗剂以确保本公开的液体组合物的等渗性,并且包括多元糖醇,例如三元或高级糖醇,例如甘油、赤藓糖醇、阿拉伯糖醇、木糖醇、山梨糖醇和甘露糖醇。稳定剂是指一大类赋形剂,其功能范围从填充剂到溶解治疗剂或有助于防止变性或粘附到容器壁的添加剂。典型的稳定剂可以是多元糖醇(上面列举的);氨基酸如精氨酸、赖氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、丙氨酸、鸟氨酸、L-亮氨酸、2-苯丙氨酸、谷氨酸、苏氨酸等,有机糖或糖醇如乳糖、海藻糖、水苏糖、甘露醇、山梨醇、木糖醇、核糖醇、肌醇、半乳糖醇、甘油等,包括环醇如肌醇;聚乙二醇;氨基酸聚合物;含硫还原剂,如尿素、谷胱甘肽、硫辛酸、硫代乙醇酸钠、硫代甘油、 α -单硫代甘油和硫代硫酸钠;低分子量多肽(例如,10个残基或更少的肽);蛋白质,如人血清白蛋白、牛血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮单糖,如木糖、甘露糖、果糖、葡萄糖;二糖,如乳糖、麦芽糖、蔗糖、海藻糖;以及三糖,如棉子糖;和多糖,如右旋糖酐。稳定剂可以每wt MBM 0.5至10wt %范围的量存在。

[0334] 可以添加非离子表面活性剂或去污剂(也称为“润湿剂”)以帮助溶解糖蛋白以及保护糖蛋白免于搅拌引起的聚集,这也允许制剂暴露于剪切表面应力而不引起蛋白质变性。合适的非离子表面活性剂包括聚山梨醇酯(20、80等)、polyoxamers(184、188等)和普朗

尼克多元醇。非离子表面活性剂可以以约0.05mg/mL至约1.0mg/mL、例如约0.07mg/mL至约0.2mg/mL的范围存在。

[0335] 另外的混杂的赋形剂包括填充剂(例如,淀粉)、螯合剂(例如,EDTA)、抗氧化剂(例如,抗坏血酸、甲硫氨酸、维生素E)和助溶剂。

[0336] 6.6. 治疗适应症

[0337] 本公开的MBM和药物组合物可用于治疗受试者的代谢病况和/或改善受试者的代谢。本公开的MBM和药物组合物可用于治疗可通过刺激、模拟和/或促进FGF21信号传导而改善或改进的任何疾病或病况。这通常通过本公开的MBM通过激动(即,刺激)FGF21受体复合物来实现。本公开的MBM和药物组合物可用于治疗或预防可通过降低血糖水平、激活受试者中的葡萄糖摄取或增加胰岛素敏感性来改善的任何疾病或病况。

[0338] 在一些实施方案中,本公开的MBM和药物组合物可用于治疗非酒精性脂肪性肝炎(“NASH”)、治疗非酒精性脂肪肝病(NAFLD)、治疗代谢性疾病、减少循环HDL胆固醇、增加循环LDL胆固醇、降低血甘油三酯、降低血糖、治疗肥胖、治疗糖尿病。

[0339] 因此,一方面,本公开提供了降低循环HDL胆固醇的方法,包括向患有升高HDL水平的受试者施用有效量的本公开的MBM或药物组合物。

[0340] 在另一个方面,本公开提供了增加循环LDL胆固醇的方法,包括向患有低LDL水平的受试者施用有效量的本公开的MBM或药物组合物。

[0341] 在另一个方面,本公开提供了降低血甘油三酯的方法,包括向患有升高甘油三酯水平的受试者施用有效量的本公开的MBM或药物组合物。

[0342] 在另一个方面,本公开提供了降低血糖的方法,包括向患有升高血糖水平的受试者施用有效量的本公开的MBM或药物组合物。

[0343] 在另一个方面,本公开提供了治疗肥胖症的方法,包括向患有肥胖症的受试者施用有效量的本公开的MBM或药物组合物。

[0344] 在另一个方面,本公开提供了治疗糖尿病的方法,包括向患有糖尿病的受试者施用有效量的本公开的MBM或药物组合物。

7. 实施例

[0345] 7.1. 实施例1:本公开的构建体

[0346] 7.1.1. 与KLB和FGFR1c结合的抗体

[0347] 进行抗体筛选活动以鉴定与人KLB结合的抗体和与人FGFR1c结合的抗体。鉴定出以下抗体:

[0348] 结合KLB的GH1结构域的抗体:22414(也称为414);22401(也称为401);22393(也称为393);17067。

[0349] 结合KLB的GH2结构域的抗体:22532。

[0350] 结合FGFR1c的抗体:ADI-19842或19842、ADI-19851或19851、ADI-19839或19839、以及ADI-19863或19863。

[0351] 当与共同轻链配对时,这些抗体以P2后缀表示(例如,22414P2、22401P2、22393P2、17067P2、22532P2等)。

[0352] 抗体的结合结构域描绘于图2中。

[0353] 这些研究中使用的另外的抗体包括REGN4304,一种双特异性抗KLB、抗FGFR1c抗体,其亲本KLB结合臂基于抗GH。

[0354] 这些研究中使用的另外的构建体包括:REGN17067,一种与BetV1(一种来自垂枝桦(*Betula pendula*)的花粉抗原)结合的非结合对照抗体,和REGN1438,其是6His-FGF21。

[0355] 7.1.2. 恒定结构域

[0356] 生成了包含恒定结构域和接头序列的抗体构建体,如下表6所示。构建体描述于表7中。

[0357]

表 6-测试和对照构建体的组件序列		
描述	氨基酸序列	SEQ ID NO.
hIgG1 (216-447; EU 编号) hIgG1 铰链和 Fc.	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	45
hIgG1 PVA: 变体 hIgG1 铰链和 Fc, 具有基于 IgG2 的铰链区以及 IgG1 CH2 和 CH3	EPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	46
hIgG1 PVA star:	EPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TI	47

表 6-测试和对照构建体的组件序列

描述	氨基酸序列	SEQ ID NO.
变体 hIgG1 铰链和 Fc，具有基于 IgG2 的铰链区以及带有 star 突变的 IgG1 CH2 和 CH3	SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMEALHNRTQKSLSLSPGK	
hIgG1: 变体 hIgG1 铰链和 Fc，具有基于 IgG2 的铰链区以及 IgG4 CH2 和 IgG1 CH3	DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDK KSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	48
hIgG1 N180G，也称为 N297G: 变体 hIgG1 铰链和 Fc，所示序列中具有 N180G 突变(EU 编号为 N297G)	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	49
hIgG2 (216-447; EU 编号) hIgG2 铰链和 Fc 根据 Uniprot P01859	ERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV SVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	50
hIgG2 (216-447; EU 编号) 变体 hIgG2 序列，在所示序列的位置 159 处具有 S 至 A 取代(DISVE 至 DIAVE)。除非另有说明，否则变体 hIgG2 序列用于本文示例的构建体中。	ERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV SVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	51
hIgG4 (216-447; EU 编号):	ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK	52
hIgG4 S108P:	ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK	53

[0358]

表 6-测试和对照构建体的组件序列

描述	氨基酸序列	SEQ ID NO.
变体 hIgG4 铰链和 Fc, 具有 S108P 突变 (EU 编号为 S228P)。	VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK	
hIgG4: 变体 hIgG4 铰链和 Fc, 具有带有 S108P 突变的基于 IgG2 的铰链区(EU 编号为 S228P), 以及 IgG1 CH2 和 CH3	ESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK	54
G4S:	GGGGS	17
7-氨基酸接头	GGGGSGG	55
15-氨基酸接头	3x G4S (即, GGGGSGGGGSGGGGS)	56
30-氨基酸接头	6x G4S (即, GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS)	57
IgG1PVA_hinge-Fc knob 变体 hIgG1 铰链和 Fc, 具有基于 IgG2 的铰链区以及具有杵突变 T366W 的 IgG1 CH2 和 CH3	EPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	58
IgG1PVA_hinge-Fc knob_star 变体 hIgG1 铰链和 Fc, 具有基于 IgG2 的铰链区以及具有杵突变 T366W 和 star 突变 H435R、Y436F 的 IgG1 CH2 和 CH3	EPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNRFYQKSLSLSPGK	59
IgG1PVA_hinge-Fc knob_Cys 变体 hIgG1 铰链和 Fc, 具有基于 IgG2 的铰链区和具有杵突变 T366W 和 Cys 突	EPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD	60

[0359]

表 6-测试和对照构建体的组件序列

描述	氨基酸序列	SEQ ID NO.
变 S354C 的 IgG1 CH2 和 CH3	IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	
IgG1PVA_hinge-Fc knob_Cys_star 变体 hIgG1 铰链和 Fc, 具有基于 IgG2 的铰链区和具有杵突变 T366W、Cys 突变 S354C 突变和 star 突变 H435R、Y436F 的 IgG1 CH2 和 CH3	EPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMEALHNRFTQKSLSLSPGK	61
IgG1PVA_hinge-Fc Hole 变体 hIgG1 铰链和 Fc, 具有基于 IgG2 的铰链区和具有白突变 T366S、L368A、Y407V 的 IgG1 CH2 和 CH3	EPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	62
IgG1PVA_hinge-Fc Hole_star 变体 hIgG1 铰链和 Fc, 具有基于 IgG2 的铰链区和具有白突变 T366S、L368A、Y407V 和 star 突变 H435R、Y436F 的 IgG1 CH2 和 CH3	EPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMEALHNRFTQKSLSLSPGK	63
IgG1PVA_hinge-Fc Hole_Cys 变体 hIgG1 铰链和 Fc, 具有基于 IgG2 的铰链区和具有白突变 T366S、L368A、Y407V 和 Cys 突变 S354C 的 IgG1 CH2 和 CH3	EPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	64
IgG1PVA_hinge-Fc Hole_Cys_star 变体 hIgG1 铰链和 Fc, 具有基于 IgG2	EPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI	65

[0360]

表 6-测试和对照构建体的组件序列

[0361]

描述	氨基酸序列	SEQ ID NO.
的铰链区和具有白突 变 T366S、L368A、 Y407V、Cys 突变 S354C 和 star 突变 H435R、Y436F 的 IgG1 CH2 和 CH3	SKAKGQPREPQVCTLP PSRDELTKNQVSLSCA VKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSK LTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEAL HNRFTQKSLSLSPGK	

[0362] 7.1.3. 构建体描述

[0363] 测试和对照构建体包括各种双特异性和三特异性结合分子,如下表7所示,其提供了本文所述研究中所使用的各种对照和测试构建体的描述。三特异性构建体中的“ABS1靶标”是指图5的示意图中标记为“1”的抗原结合模块的靶标。三特异性构建体中的“ABS2靶标”是指图5的示意图中标记为“2”的抗原结合模块的靶标。三特异性构建体中的“ABS3靶标”是指图5的示意图中标记为“3”的抗原结合模块的靶标。提及“ABS3接头长度”是指分隔图5的示意图中标记为“3”的抗原结合模块与相邻的Fab或Fc结构域的接头的长度(如果适用)。

[0364]

表 7

命名	形式	IgG 同种型	ABS1 靶标	ABS2 靶标	ABS3 靶标	ABS3 接 头长度	亲本抗体
REGN4355	Std. 1+1 双特异性	IgG4	GH1	D3	N/A	N/A	22393P2 (GH1), ADI-19839 (D3)
REGN4366	Std. 1+1 双特异性	IgG4	GH1	D3	N/A	N/A	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3)
REGN4370	Std. 1+1 双特异性	IgG4	GH1	D3	N/A	N/A	22393P2 (GH1), ADI-19851 (D3)
REGN4376	Std. 1+1 双特异性	IgG4	GH1	D3	N/A	N/A	22393P2 (GH1), ADI-19863 (D3)
REGN4304	Std. 1+1 双特异性	IgG4s	GH2	D2	N/A	N/A	eKLB (GH2), cFGFR1c (D2)
F1K_scFv1	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH1	15	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22414P2 (GH1)
F1K_scFv2	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH1	15	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22401P2 (GH1)
F1K_scFv3	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH2	15	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1K_scFv4	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH1	30	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22414P2 (GH1)
F1K_scFv5	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH1	30	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22401P2 (GH1)
F1K_scFv6	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH2	30	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1K_scFv7	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH1	45	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22414P2 (GH1)
F1K_scFv8	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH1	45	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22401P2 (GH1)
F1K_scFv9	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH2	45	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1K_scFv10	2+1 C-scFv	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH1	15	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22414P2 (GH1)

[0365]

表 7

命名	形式	IgG 同种型	ABS1 靶标	ABS2 靶标	ABS3 靶标	ABS3 接 头长度	亲本抗体
F1K_scFv11	2+1 C-scFv	IgG1 K/H*, S- S	GH1	D3	GH1	15	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22401P2 (GH1)
F1K_scFv12	2+1 C-scFv	IgG1 K/H*, S- S	GH1	D3	GH2	15	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1K_scFv13	2+1 C-scFv	IgG1 K/H*, S- S	GH1	D3	GH1	30	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22414P2 (GH1)
F1K_scFv14	2+1 C-scFv	IgG1 K/H*, S- S	GH1	D3	GH1	30	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22401P2 (GH1)
F1K_scFv15	2+1 C-scFv	IgG1 K/H*, S- S	GH1	D3	GH2	30	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1K_scFv16	2+1 C-scFv	IgG1 K/H*, S- S	GH1	D3	GH1	45	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22414P2 (GH1)
F1K_scFv17	2+1 C-scFv	IgG1 K/H*, S- S	GH1	D3	GH1	45	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22401P2 (GH1)
F1K_scFv18	2+1 C-scFv	IgG1 K/H*, S- S	GH1	D3	GH2	45	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1k-scFv6-LK7	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, S- S	GH1	D3	GH2	7	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1k-scFv6-LK15	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, S- S	GH1	D3	GH2	15	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1k-scFv6-LK22	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, S- S	GH1	D3	GH2	22	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1k-scFv6-LK30	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, S- S	GH1	D3	GH2	30	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1k-scFv6-LK37	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, S- S	GH1	D3	GH2	37	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)

[0366]

表 7

命名	形式	IgG 同种型	ABS1 靶标	ABS2 靶标	ABS3 靶标	ABS3 接 头长度	亲本抗体
F1k-scFv6-LK45	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, S- S	GH1	D3	GH2	45	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1k-scFv6-hG4	2+1 N-scFv	IgG4 K/H*, S- S	GH1	D3	GH2	30	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1k-scFv6-HL (重/轻链 互换)	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, S- S	GH1	D3	GH2	30	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1k-scFv19	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, S- S	GH1	D3	GH2	30	22477P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1k-scFv20	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, S- S	GH1	D3	GH2	30	22401P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1k-scFv6-RT1	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, N180G	GH1	D3	GH2	30	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1k-scFv6-RT2	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, N180G	D3	GH1	GH2	30	ADI-19842 (D3), 22393P2 (GH1), 22532P2 (GH2)
F1k-scFv6-RT3	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, N180G	GH1	GH2	D3	30	22393P2 (GH1), 22532P2 (GH2), ADI-19842 (D3)
F1k-scFv6-RT4	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, N180G	GH2	GH1	D3	30	22532P2 (GH2), 22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3)
F1k-scFv6-RT5	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, N180G	D3	GH2	GH1	30	ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2), 22393P2 (GH1)
F1k-scFv6-RT6	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, N180G	GH2	D3	GH1	30	22532P2 (GH2), ADI-19842 (D3), 22393P2 (GH1)
FIK_Fab1	2+1 N-Fab	IgG1 K/H*, S- S	GH1	D3	GH1	15	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22414P2 (GH1)
FIK_Fab 2	2+1 N-Fab	IgG1 K/H*, S- S	GH1	D3	GH1	15	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22401P2 (GH1)

[0367]

表 7

命名	形式	IgG 同种型	ABS1 靶标	ABS2 靶标	ABS3 靶标	ABS3 接 头长度	亲本抗体
F1K_Fab 3	2+1 N-Fab	IgG1 K/H*, S- S	GH1	D3	GH2	15	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1K_Fab 4	2+1 N-Fab	IgG1 K/H*, S- S	GH1	D3	GH1	30	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22414P2 (GH1)
F1K_Fab 5	2+1 N-Fab	IgG1 K/H*, S- S	GH1	D3	GH1	30	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22401P2 (GH1)
F1K_Fab 6	2+1 N-Fab	IgG1 K/H*, S- S	GH1	D3	GH2	30	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1K_Fab 7	2+1 N-Fab	IgG1 K/H*, S- S	GH1	D3	GH1	45	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22414P2 (GH1)
F1K_Fab 8	2+1 N-Fab	IgG1 K/H*, S- S	GH1	D3	GH1	45	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22401P2 (GH1)
F1K_Fab 9	2+1 N-Fab	IgG1 K/H*, S- S	GH1	D3	GH2	45	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1K_Fab 10	2+1 N-Fab	IgG1 K/H*, S- S	GH1	D3	GH1	15	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22414P2 (GH1)
F1K_Fab 11	2+1 N-Fab	IgG1 K/H*, S- S	GH1	D3	GH1	15	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22401P2 (GH1)
F1K_Fab12	2+1 N-Fab	IgG1 K/H*, S- S	GH1	D3	GH2	15	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1K_Fab13	2+1 C-Fab	IgG1 K/H*, S- S	GH1	D3	GH1	30	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22414P2 (GH1)
F1K_Fab14	2+1 C-Fab	IgG1 K/H*, S- S	GH1	D3	GH1	30	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22401P2 (GH1)
F1K_Fab15	2+1 C-Fab	IgG1 K/H*, S- S	GH1	D3	GH2	30	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)

[0368]

表 7

命名	形式	IgG 同种型	ABS1 靶标	ABS2 靶标	ABS3 靶标	ABS3 接 头长度	亲本抗体
F1K_Fab16	2+1 C-Fab	IgG1 K/H*, S- S	GH1	D3	GH1	45	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22414P2 (GH1)
F1K_Fab17	2+1 C-Fab	IgG1 K/H*, S- S	GH1	D3	GH1	45	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22401P2 (GH1)
F1K_Fab18	2+1 C-Fab	IgG1 K/H*, S- S	GH1	D3	GH2	45	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
KFB-FabN	2+1 N-Fab	IgG1 K/H*, S- S	BetV1	D3	GH1	30	17067P2 (BetV1), ADI-19842 (D3), 22414P2 (GH1)
KBK-scFvN	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, S- S	GH1	BetV1	GH1	30	22393P2 (GH1), 17067P2 (BetV1), 22414P2 (GH1)
F1k-scFv6LK7 IgG1 PVA	2+1 N-scFv	IgG1 PVA	GH1	D3	GH2	7	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1k-scFv6LK7 IgG4 S108P	2+1 N-scFv	IgG4 S108P	GH1	D3	GH2	7	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1k-scFv6LK15 IgG1 PVA	2+1 N-scFv	IgG1 PVA	GH1	D3	GH2	15	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1k-scFv6LK15 IgG4 S108P	2+1 N-scFv	IgG4 S108P	GH1	D3	GH2	15	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1k-scFv6 IgG1 PVA	2+1 N-scFv	IgG1 PVA	GH1	D3	GH2	30	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1k-scFv6, IgG4s S108P	2+1 N-scFv	IgG4s S108P	GH1	D3	GH2	30	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1k-scFv6, IgG1 N180G	2+1 N-scFv	IgG1 N180G	GH1	D3	GH2	15	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1k-scFv6 IgG1	2+1 N-scFv	IgG1	GH1	D3	GH2	30	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)

[0369]

表 7								
命名	形式	IgG 同种型	ABS1 靶标	ABS2 靶标	ABS3 靶标	ABS3 接 头长度	亲本抗体	
F1k-Fab6, IgG1 PVA	2+1 N-Fab	IgG1 PVA	GH1	D3	GH2	30	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)	
F1k-Fab6, IgG4s S108P	2+1 N-Fab	IgG4s S108P	GH1	D3	GH2	30	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)	
F1K-Fab6 IgG1 N180G	2+1 N-Fab	IgG1 N180G	GH1	D3	GH2	30	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)	
F1K-Fab6 IgG1	2+1 N-Fab	IgG1	GH1	D3	GH2	30	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)	
IgG1 PVA	2+1 N-Fab	IgG1 PVA	GH1	D3	GH2	15	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)	
IgG4s S108P	2+1 N-Fab	IgG4s S108P	GH1	D3	GH2	15	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)	
IgG4s	三特异性	IgG4s	用于 IgG4s 对照的无关靶标					

- [0370] 7.2. 实施例2:评估双特异性形式的KLB和FGFR1c抗体
- [0371] 7.2.1. 双特异性结合分子和对照结合剂的克隆和表达

[0372] 使用IgG4 Fc和star突变生成含有实施例1中鉴定的抗体的结合结构域的双特异性结合分子以选择正确配对的异二聚体,如下表8中所示:

表 8		
	抗-FCFR1c(IgG4*)	抗-KLB (hlgG4)
[0373]	REGN4366	ADI-19842
	REGN4370	ADI-19851
	REGN4355	ADI-19839
	REGN4376	ADI-19863
		22393 (22393 重链/ P2 通用轻链)
		22393 (22393 重链/ P2 通用轻链)
		22393 (22393 重链/ P2 通用轻链)
		22393 (22393 重链/ P2 通用轻链)

[0374] 经由直接DNA合成或亚克隆编码KLB或FGFR1c VH和VL结构域的DNA片段经由NEBuilder HiFi DNA组装试剂盒(New England BioLabs Inc.)或按照New England BioLabs Inc.提供的标准分子克隆方案进行限制性消化和连接,插入到含有人IgG4或具有star突变(H435R、Y436F,EU编号)的人IgG4主链的哺乳动物表达载体中。生成CHO稳定表达细胞系。使用蛋白A亲和力、抗star亲和和尺寸排阻色谱法进行哺乳动物表达和纯化,以产生和纯化用于分析的双特异性抗体。

[0375] REGN4304的克隆、表达和纯化与所描述的双特异性抗体的生成相似,除了以下差异之外:1.将每个KLB和FGFR1c半抗体的VH结构域插入到具有杵突变(S354C、T366W,EU编号)的人IgG4 Fc,以及具有白突变(Y349C、T366S、L368A、Y407V)和star突变(H435R、Y436F)的人IgG4 Fc。2.单独表达靶向FGFR1c或KLB的半抗体,并按照所述(Williams等人,2015, Biocatalysts and Bioreactor Design(31)-5)经由氧化还原退火进行组装。

[0376] REGN1438的克隆、表达和纯化与所描述的双特异性抗体的生成相似,除了以下差异之外:1.具有N末端六His标签(SEQ ID NO:42)的人FGF21(H29-S209,L174P)被插入到表达载体中;2.采用HisTrap亲和色谱法和尺寸排阻色谱法进行纯化。

[0377] 7.2.2.用于FGFR1c/KLB激活的报告基因测定

[0378] 使用稳定表达人FGFR1c和KLB以及在含有血清反应元件(SRE)的启动子控制下的萤光素酶报告基因的HEK293.SRE1uc.hFGFR1c/hKLB细胞测试抗体的激动剂活性。使用具有6xHis标签(SEQ ID NO:42)的重组人FGF21作为阳性对照,从FGF21获得的最大报告活性定义为100%活性。用每种抗体或6xHis-FGF21处理细胞6小时,然后进行萤光素酶测定。将各个抗体诱导的活性百分比针对FGF21的最大活性进行归一化。进行剂量反应测定以确定EC50。抗Fe1D1同种型对照抗体REGN1945用作阴性对照。

[0379] 7.2.3.结果

[0380] 剂量反应测定的结果显示在图4中。如图所示,双特异性结合分子激活KLB-FGFR1c的活性几乎比FGF21低一个数量级。

[0381] 7.3.实施例3:通过三特异性结合分子评估FGFR1c/KLB的激活

[0382] 7.3.1.背景

[0383] 另外结合KLB的GH1和GH2结构域三特异性结合分子是通过向REGN4366添加另外的结合结构域来生成的,试图增加其对FGFR1c/KLB共受体复合物的激动作用。REGN4366是双特异性结合分子,靶向KLB的GH1结构域和FGFR1c的D3结构域。如图6A所示,将Fab或scFv形式的GH2结合臂添加到分子中的不同位置,分子的REGN4366部分和GH2结合臂之间的接头长度在G4S接头(SEQ ID NO:43)的3至6至9个重复不同(即,范围为15至45个氨基酸)。

[0384] 7.3.2.三特异性结合分子的克隆和表达

[0385] 编码以下的DNA片段: (i) VL (具有100C突变, Kabat编号)、接头 (4xG₄S (SEQ ID NO: 44)) 和VH (具有44C突变, Kabat编号) 方向的KLB或FGFR1c或BetV1 scFv, 然后是连接scFv到FGFR1c结合Fab的不同长度的接头, (ii) KLB或FGFR1c或BetV1结合Fab, 以及 (iii) 具有杵形成突变 (S354C、T366W, EU编号)、臼形成突变 (Y349C、T366S、L368A、Y407V, EU编号)、糖基化突变 (N297G, EU编号) 和Star突变 (H435R、Y436F, EU编号) 的IgG1Fc结构域, 由Integrated DNA Technologies, Inc. (San Diego, California)、GenScript (Piscataway, NJ) 或Life Technologies (Carlsbad, CA) 合成。

[0386] 通过NEBuilder HiFi DNA组装试剂盒 (New England BioLabs Inc.) 或按照New England BioLabs Inc. 提供的标准分子克隆方案进行限制性消化然后连接来产生各个重链的哺乳动物表达载体。一些DNA片段被制备为可以在Life Technologies (Carlsbad, CA) 的pcDNA3.4 Topo表达系统中使用构建体。用于表达图6A所示的和表9A所列的分子, 按照制造商的方案将重链 (“Hc1-Knob” 和 “Hc2-Hole*”) 和通用轻链的DNA共转染到Expi293细胞 (ThermoFisher Scientific) 中。收获50ml细胞培养基并经由HiTrap Protein A FF柱 (GE Healthcare) 进行纯化。为了确认功能, 将选定的MBM扩增至200ml, 并进行一系列纯化程序, 包括作为最后一步的尺寸排阻色谱法。

[0387] 7.3.3. 三特异性结合分子的活性和组装评估

[0388] 在报告基因测定中评估三特异性结合分子的活性, 如第7.2.2节中所描述的。

[0389] 根据制造商的方案 (Perkin Elmer, Waltham, MA) 在Clipper LabChip GX上通过高通量分析来测定三特异性结合分子的组装。简而言之, 通过将7ml HT蛋白表达样品缓冲液与240μl BME (还原) 或25mM碘乙酰胺 (IAM, 用于非还原测定) 混合来制备样品缓冲液。用样品缓冲液将样品归一化至0.5mg/ml, 然后在70℃下加热10分钟。在装载到仪器上之前, 向每个样品中添加70μl水。该芯片是根据制造商的说明制备的。使用LabChip GX软件分析样品的电泳图。非还原电泳图的峰表示完整抗体的%。

[0390] 7.4. 结果

[0391] 下表9A显示了各种三特异性分子的组装百分比与活性百分比, 并且下表9B显示了具有不同接头长度的三特异性2+1N-scFv分子的活性。图6B是表9B中的数据的条形图。

表 9A

形式	分子	组装百分比%	活性百分比%
N-scFv	F1K_scFv1	98.4	5
N-scFv	F1K_scFv2	94.3	6.2
N-scFv	F1K_scFv3	100	28.9
N-scFv	F1K_scFv4	78.3	4.7
N-scFv	F1K_scFv5	83.3	3
N-scFv	F1K_scFv6	100	54.1
N-scFv	F1K_scFv7	94.3	5.5
N-scFv	F1K_scFv8	77.2	4.2
N-scFv	F1K_scFv9	100	20.7
N-scFv	F1K_scFv10	100	34.6
N-scFv	F1K_scFv11	60.4	31.5
N-scFv	F1K_scFv12	73.6	60.8
C-scFv	F1K_scFv13	100	28.8
C-scFv	F1K_scFv14	25	37.2
C-scFv	F1K_scFv15	32.6	59.1
C-scFv	F1K_scFv16	29.7	14.7
C-scFv	F1K_scFv17	10.7	35.9
C-scFv	F1K_scFv18	43.6	47.8
N-Fab	F1K_Fab1	100	2.2

表 9A

形式	分子	组装百分比%	活性百分比%
N-Fab	F1K_Fab2	79.2	3.5
N-Fab	F1K_Fab3	100	31.5
N-Fab	F1K_Fab4	100	2.7
N-Fab	F1K_Fab5	97.3	5.5
N-Fab	F1K_Fab6	93.6	38.2
N-Fab	F1K_Fab7	19.2	8.2
N-Fab	F1K_Fab8	81	8
N-Fab	F1K_Fab9	93.9	39.3
C-Fab	F1K_Fab10	93.5	11.5
C-Fab	F1K_Fab11	100	18.4
C-Fab	F1K_Fab12	100	25.5
C-Fab	F1K_Fab13	51.3	15.9
C-Fab	F1K_Fab14	39.8	23.6
C-Fab	F1K_Fab15	88.2	29.9
C-Fab	F1K_Fab16	100	13.7
C-Fab	F1K_Fab17	43.8	23.5
C-Fab	F1K_Fab18	27.2	37.8
REGN1945	REGN1945	100	0

表 9B

接头长度	活性百分比%
LK7	104.5
LK15	97.5
LK22	87.9
LK30	66.4
LK37	80.4
LK45	78.7
FGF21	100

[0394]

[0395] 结果表明,在N末端掺入另外的结构域(以2+1N-scFv或2+1N-Fab三特异性结合分子(TBM)形式)比在C末端掺入另外的结合结构域(以2+1C-scFv或2+1C-Fab三特异性结合分子(TBM)形式)提供了更好的组装,而以2+1C-scFv形式在C末端掺入另外的结合域导致了更好的活性。

[0396] 7.5. 实施例4:三特异性结合分子与双特异性结合分子的激动活性的比较

[0397] 7.5.1. 材料与方法

[0398] 将含有a的实施例3中描述的2+1N-scFv(F1K_scFv6)和2+1N-Fab(F1K_Fab6)三特异性分子的激动活性与实施例2(REGN4304和REGN4366)中描述的双特异性分子的激动活性进行比较,使用第7.2.2节中描述的报告基因测定。

[0399] HEK293.FGFR1c敲除细胞用FGFR1c或KLB或FGFR1c+KLB稳定过表达。在标准条件下(37℃,含有5% CO₂的潮湿气氛),在补充有10% FBS(Gibco,USA)的DMEM(Gibco,USA)中培养细胞。对于Flow结合测定,将 1×10^5 个细胞/100μL/孔接种到96孔板中。使用不含Ca/Mg的PBS(补充有1%FBS)作为抗体稀释和后续洗涤的染色缓冲液。将细胞与指定量的一抗在4℃下孵育30分钟。两次洗涤后,二抗(F(ab')₂Fc γ 片段特异性,Jackson免疫研究,109-136-098)在4℃下染色30分钟。随后洗涤后,将细胞在2%多聚甲醛中室温固定30分钟。将固定的细胞洗涤并重悬于200μL染色缓冲液中以进行流式细胞术分析。在流式细胞仪(Fortessa)上采集每个样品至少10,000个单细胞,并分析数据,并使用FlowJo程序计算最大MFI。图使用Graphpad Prism软件创建。

[0400] 7.5.2. 结果

[0401] 结果如图7A、下表10(报告基因测定中的%活性)和下表11(与KLB和FGFR1c的结合亲和力)所示。

表 10

分子	描述	%活性	EC50(M)
REGN1438	6His-FGF21	100	2.9E-09
REGN4366	双特异性结合分子	24.8	2.4E-08
F1K_scFv6	2+1 N-scFv	65.9	1.9E-09
F1K_Fab6	2+1 N-Fab	39.9	2.1E-09
REGN4304	双特异性结合分子	23.5	7.2E-09

[0402]

表 11

分子	hKLB 结合 KD (M)	hFGFR1c 结合 KD (M)
[0403] F1K_scFv6	1.47E-11	2.11E-06
F1K_Fab6	1.18E-11	2.29E-06
REGN4304	4.40E-11	1.09E-07
REGN4366	2.55E-08	5.39E-07

[0404] 图7B描绘了双特异性分子和三特异性结合分子与FGFR1c和KLB的结合。不受理论的束缚,据信该实施例的数据显示hKLB的双表位参加改善了抗体介导的KLB/FGFR1c受体复合物相互作用和潜在的细胞表面聚集。

[0405] 7.6. 实施例5:三特异性形式的优化

[0406] 进行三轮筛选以优化三特异性结合分子的活性。

[0407] 在第一轮筛选中,GH2结合部分被取代并且接头长度将GH2结合部分分开,并且结合分子的其余部分在15至45个氨基酸之间变化。如第7.3.2节中所述构建和表达分子,并在第7.2.2节中描述的报告基因测定中评估所得分子。结果如下表12所示:

表 12

	1	2	3	接头	%活性	EC50
REGN1945	IgG4 同种型对照					
REGN1438	6His-FGF21					100
F1K_Fab1	22393	ADI-19842	22414	15	2.2	5.0E-10
F1K_Fab2	22393	ADI-19842	22401	15	3.5	1.9E-09
F1K_Fab3	22393	ADI-19842	22532	15	31.5	6.5E-10
F1K_Fab4	22393	ADI-19842	22414	30	2.7	8.5E-10
F1K_Fab5	22393	ADI-19842	22401	30	5.5	1.3E-09
F1K_Fab6	22393	ADI-19842	22532	30	38.2	6.2E-10
F1K_Fab7	22393	ADI-19842	22414	45	8.2	3.7E-08
F1K_Fab8	22393	ADI-19842	22401	45	8.0	3.6E-09
F1K_Fab9	22393	ADI-19842	22532	45	39.3	1.8E-09
KFB_FabN	17067	ADI-19842	22414	30	1.8	8.3E-10
F1K_scFv1	22393	ADI-19842	22414	L20H15	5.0	3.9E-09
F1K_scFv2	22393	ADI-19842	22401	L20H15	6.2	3.7E-08
F1K_scFv3	22393	ADI-19842	22532	L20H15	28.9	7.9E-09
F1K_scFv4	22393	ADI-19842	22414	L20H30	4.7	3.5E-09
F1K_scFv5	22393	ADI-19842	22401	L20H30	3.0	4.7E-08
F1K_scFv6	22393	ADI-19842	22532	L20H30	54.1	9.8E-10
F1K_scFv7	22393	ADI-19842	22414	L20H45	5.5	3.6E-09
F1K_scFv8	22393	ADI-19842	22401	L20H45	4.2	4.2E-08
F1K_scFv9	22393	ADI-19842	22532	L20H45	20.7	2.4E-09
KBK_scFvN	22393	17067	22414	L20H30	2.1	1.2E-09

[0409] 7.7. 实施例6:三特异性形式的进一步优化

[0410] 在进一步的筛选中,图8A(尤其具有接头长度变体)和图8B(具有重新配置的GH1、GH2和FGFR1c结构域)中所示的变体在第7.2.2节中描述的报告基因测定中评估。命名为2和3的结构域之间接头长度变化的结果在图9和下表13中显示:

表 13

	1	2	3	接头	EC50	%活性
REGN1438	6His-FGF21				5.7E-10	100.0
[0411] F1K_scFv6-LK7	22393	ADI-19842	22532	L20H7	1.7E-09	104.5
F1K_scFv6-LK15	22393	ADI-19842	22532	L20H15	1.6E-09	97.5
F1K_scFv6-LK22	22393	ADI-19842	22532	L20H22	1.3E-09	87.9
F1K_scFv6-LK30	22393	ADI-19842	22532	L20H30	2.0E-09	84.2
F1K_scFv6-LK37	22393	ADI-19842	22532	L20H37	1.1E-09	80.4
F1K_scFv6-LK45	22393	ADI-19842	22532	L20H45	1.5E-09	78.7

表 13

	1	2	3	接头	EC50	%活性
[0412] REGN4304					1.8E-09	42.0

[0413] 7.8.实施例7:HEK293细胞中FGFR1c信号传导的激活

[0414] 7.8.1.材料与方法

[0415] HEK293.SREluc.hFGFR1c.hKLB稳定细胞系通过用SRE-萤光素酶报告基因、全长人FGFR1c和全长人KLB质粒顺序转染HEK293细胞来生成。对于western印迹分析,将HEK293.SREluc.hFGFR1c.hKLB细胞铺板于6孔板中,并在含有10%胎牛血清(FBS)的完全培养基中过夜培养。将培养基更换为补充有0.1% FBS的Opti-MEM减血清培养基(ThermoFisher,USA)。大约24小时后,将稀释的配体添加到细胞中,直至最终浓度为1nM或10nM。处理15分钟后,用冷PBS洗涤细胞,然后在RIPA裂解缓冲液(150mM Tris/HCl,pH 7.4, 50mM NaCl,1% NP-40和0.1% Tween 20)中裂解。通过SDS-PAGE分解总细胞裂解物,并转移到PVDF膜上。对于western印迹分析,使用以下一抗:总ERK(Cell Signaling,9102)、磷酸化ERK(Cell Signaling,9101)、PLC-gamma(Cell Signaling,5690)、磷酸化PLCgamma(Cell Signaling,2821)。对于萤光素酶测定,将HEK293.SREluc.hFGFR1c.hKLB细胞铺板于384孔板中,并在含有10%胎牛血清(FBS)的完全培养基中过夜培养。将培养基更换为补充有0.1% FBS的Opti-MEM减血清培养基(ThermoFisher,USA)。大约24小时后,用系列稀释的配体处理细胞6小时,然后根据制造商的说明使用ONE-GloTM萤光素酶测定系统(Promega,USA)进行萤光素酶测定。

[0416] 7.8.2.结果

[0417] 为了确定F1K_scFv6和F1K_scFv6LK7的激动剂活性,我们处理了稳定表达人FGFR1c和人KLB的HEK293.SREluc.hFGFR1c.hKLB细胞,并测量由活化的FGFR1c诱导的ERK和PLC- γ 磷酸化(图10A)。F1K_scFv6LK7和F1K_scFv6LK7在1nM和10nM浓度下均强烈诱导ERK和PLC- γ 磷酸化。值得注意的是,F1K_scFv6或F1K_scFv6LK7处理的细胞中的磷酸-ERK和磷酸-PLC- γ 水平显著高于那些用相应浓度的亲本双特异性抗体(REGN4366)、FGFR1/KLB激动剂双特异性抗体(REGN4304)或重组人FGF21(REGN1438)处理的细胞中的磷酸-ERK和磷酸-PLC- γ 水平。

[0418] 为了评估通过F1K_scFv6处理激活FGFR1c的时程,用配体处理HEK293.SREluc.hFGFR1c.hKLB细胞不同时间,并收获用于western印迹分析(图10B)。早在使用REGN1438、REGN4304或F1K_scFv6处理后15分钟就观察到了通过磷酸化ERK水平测量的ERK激活,这种激活可持续最长达6小时。在整个处理过程中,与REGN1438或REGN4304相比,F1K_scFv6显示出更高的磷酸化ERK水平。F1K_scFv6在15分钟时间点强烈诱导磷酸化PLCgamma,然后随着时间的推移逐渐减少。

[0419] 7.9. 实施例8:脂肪细胞中ERK的激活

[0420] 7.9.1. 材料与方法

[0421] 皮下人前脂肪细胞获自Zen-Bio, Inc., 并维持在由Zen-Bio提供的前脂肪细胞培养基中的6孔板中。通过在脂肪细胞分化培养基中培养汇合的前脂肪细胞14天, 前脂肪细胞分化为脂肪细胞。对于western印迹分析, 分化的脂肪细胞用补充有0.1% FBS的Opti-MEM减少血清培养基(ThermoFisher, USA) 预处理4小时, 然后用药物处理15分钟。用冷PBS洗涤细胞, 然后在RIPA缓冲液中裂解用于western印迹分析。

[0422] 分化的人皮下脂肪细胞获自Zen-Bio, Inc., 并维持在由Zen-Bio提供的脂肪细胞维持培养基中的96孔板中。对于磷酸化ERK测定, 细胞用补充有0.1% FBS的Opti-MEM还原血清培养基(ThermoFisher, USA) 预处理4小时, 然后用系列稀释的配体或抗体处理。根据制造商的建议, 使用AlphaScreen SureFire p-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204) 测定试剂盒(Perkin Elmer, Waltham, MA) 确定ERK磷酸化水平。

[0423] 7.9.2. 结果

[0424] 为了确定内源表达FGFR1c和KLB的人脂肪细胞中的F1K_scFv6和F1K_scFv6LK7的激动剂活性, 用这些分子处理原代人脂肪细胞(图11A)。KLB表达在脂肪细胞分化期间被诱导。F1K_scFv6和F1K_scFv6LK7在人脂肪细胞中诱导磷酸-ERK, 这与REGN1438 (即FGF21) 治疗相当。

[0425] 为了确定F1K_scFv6和F1K_Fab6对FGFR1c信号传导的剂量依赖性作用, 用系列稀释的药物处理人脂肪细胞, 使用AlphaScreen SureFire p-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204) 测定试剂盒测量磷酸-ERK水平(图11A)。F1K_scFv6和F1K_Fab6强烈诱导p-ERK, 具有比亲本双特异性抗体(REGN4366) 和REGN4304更高的功效, 这表明F1K_scFv6和F1K_Fab6是激活FGFR1c/KLB信号传导的有效激动剂。

[0426] 7.10. 实施例9: 通过不对称流场-流分离偶联多角度光散射(A4F-MALLS) 对KLB、FGFR1c和结合分子之间形成的体外复合物的尺寸分析7.10.1. 概述

[0427] 原则上, 本公开的三特异性结合分子可以与FGFR1c和KLB形成不同类型的复合物, 如图12A和图12B所示。为了确定形成的复合物的类型, 使用不对称流场流分离偶联多角度光散射(A4F-MALS), 对2+1N-scFv和2+1N-Fab三特异性结合分子之间形成的体外复合物进行了尺寸分析。A4F-MALLS还用于分析由对照双特异性结合分子(REGN4304) 和单特异性KLB结合分子(REGN4661) 形成的复合物。

[0428] 7.10.2. 材料与方法

[0429] 7.10.2.1. A4F-MALLS流动相缓冲液

[0430] 流动相缓冲液(10mM磷酸钠, 500mM氯化钠, pH 7.0±0.1) 通过组合1.4g磷酸二氢钠一水合物、10.7g磷酸氢二钠七水合物和500mL 5M氯化钠来制备; 然后用HPLC级水将溶液定容至5.0L。最终测量的缓冲液pH值为7.0。流动相缓冲液在使用前被过滤(0.2μm)。

[0431] 7.10.2.2. A4F-MALLS

[0432] A4F-MALLS系统由与装备有紫外(UV) 二极管阵列检测器的Agilent 1200系列HPLC系统偶联的Eclipse™3+A4F分离系统、Wyatt Technology Dawn HELEOS®II激光光散射仪(LS) 和Optilab®T-rEX示差折光仪(RI) 检测器组成。检测器按以下顺序串联: UV-LS-RI。LS和RI检测器根据Wyatt Technology提供的说明进行校准。

[0433] 将适量的抗KLB和抗FGFR1c多特异性结合分子候选物各自与REGN6424 (重组KLB) 和REGN6152 (重组FGFR1c) 组合并在1X DPBS, pH7.4中稀释以产生等摩尔比:0.2 μ M多特异性结合分子:0.2 μ M REGN REGN6424或0.2 μ M多特异性结合分子:0.2 μ M REGN REGN6424:0.2 μ M REGN REGN6152。所有样品在室温下孵育2小时,在4℃下保持未过滤,然后注射到装有W350间隔箔(间隔箔厚度350 μ m,间隔箔宽度2.2cm)的Eclipse™短通道中,并使用10kDa的MWC0再生的纤维素膜。在注射每个样品之前,用流动相缓冲液(10mM磷酸钠,500mM氯化钠,pH 7.0 $\pm$ 0.1)对通道进行预平衡。牛血清白蛋白(BSA;2mg/mL;10 μ g样品载荷)单独注射,并作为系统适用性对照。

[0434] 分离法由四个步骤组成:注射、聚焦、洗脱和通道“冲洗”步骤。在整个分离方法中使用A4F-MALLS流动相缓冲液(10mM磷酸钠,500mM氯化钠,pH 7.0 $\pm$ 0.1)。每个样品(7 μ g)以0.2mL/min的流速注射1分钟,随后以1.0mL/min的聚焦流速聚焦3分钟。以1.0mL/min的通道流速和3.0mL/min的恒定横流洗脱样品15分钟,然后在5分钟内进行从3.0mL/min到0mL/min的线性梯度横流。最后,横流保持在0mL/min用于另外5分钟以冲洗通道。使用相同的参数设置对BSA进行分离。

[0435] 7.10.2.3.MALLS数据分析

[0436] 使用ASTRA V软件(版本5.3.4.14,Wyatt Technology)分析数据。数据符合将过量散射光与溶质浓度和重均摩尔质量 M_w 联系起来的方程(Kendrick等人,2001,Anal Biochem.299(2):136-46;Wyatt,1993,Anal.Chim.Acta272(1):1-40):

[0437] 方程1:
$$\frac{K^*c}{R(\theta,c)} = \frac{1}{M_w P(\theta)} + 2A_2c$$

[0438] 其中c是溶质浓度, $R(\theta,c)$ 是溶质的过量瑞利比,作为散射角和浓度的函数, M_w 是摩尔质量, $P(\theta)$ 描述了散射光的角度依赖性(对于回转半径<50nm的颗粒约1), A_2 是渗透压膨胀中的第二维里系数(可以忽略,因为测量是在稀溶液上进行的)并且

[0439] 方程2:
$$K^* = \frac{4\pi^2 n_0^2}{N_A \lambda_0^4} \left(\frac{dn}{dc} \right)^2$$

[0440] 其中 n_0 代表溶剂折射率, N_A 是阿伏加德罗数, λ_0 是真空中入射光的波长, dn/dc 代表溶质的比折射率增量。

[0441] BSA单体的摩尔质量用于评估数据收集期间光散射和示差折射率检测器的校准常数(系统适用性检查)。由UV和RI检测器测定的BSA平均摩尔质量的相对标准偏差(%RSD) $\leq$ 5.0%。

[0442] 用于所采用的A4F-MALLS条件收集的BSA色谱图计算光散射检测器的归一化系数、检测器间延迟体积和谱带增宽项。这些值应用于针对所有其他样品收集的数据文件以校正这些项。

[0443] 使用Astra软件中提供的蛋白质缀合物分析通过实验确定215nm处的 dn/dc 值和消光系数。校正后的消光系数和 dn/dc 值用于分析所有蛋白质-蛋白质复合物样品。

[0444] 7.10.3.结果

[0445] A4F-MALLS用于评估重组KLB(REGN6424)、重组FGFR1c(REGN6152)和几种单特异性(REGN4661)、双特异性(REGN4304)和三特异性(2+1N-scFv和2+1N-Fab)结合分子之间形成的复合物的相对尺寸分布。结果如图13A(对于REGN4661)、图13B(对于4304)、图13C(2+1N-

scFv形式)和图13D(2+1N-Fab形式)所示。潜在抗体:抗原复合物的理论摩尔质量和预测化学计量作为图13A-13D中的插图提供。正如预期的,当以等摩尔比组合时,单特异性KLB结合分子(REGN4661)与KLB形成典型的1:1(峰1,~280kDa)和1:2(峰2,~356kDa)复合物(图13A)。类似地,当对照双特异性结合分子(抗KLBxFGFR1c;REGN4304)与等摩尔量的KLB混合时,观察到计算摩尔质量为~280kDa的离散、均质峰(峰1)(图13B)。根据计算出的各个组分的摩尔质量,峰1可能代表1:1双特异性:KLB复合物。向该混合物中进一步添加FGFR1c产生宽峰(峰2),计算摩尔质量范围为~305-444kDa,这通常与1:1:1双特异性:KLB:FGFR1c三元复合物一致(图13B)。峰2尾部摩尔质量的上升趋势表明,经由KLB-FGFR1c相互作用弱缔合的较大复合物也可能存在于溶液中,但在分馏时很容易解离。

[0446] 与对照单特异性和双特异性结合分子相比,每种新型三特异性结合分子以独特的、更高阶的化学计量结合KLB和FGFR1c。当与等摩尔量的KLB混合时,F1K-scFv6 IgG1形成很大程度上离散的、具有摩尔质量为~579kDa的均质峰(峰1),这可能代表含有2分子F1K-scFv6 IgG1与2分子KLB结合(2:2复合物;图13C)的复合物。向该混合物中添加不同量的FGFR1c后,观察到稍宽、较晚洗脱的峰(峰2),计算摩尔质量范围为~607-644kDa。峰2可能代表含有2分子F1K-scFv6 IgG1、2分子KLB和1-2分子FGFR1c的三元复合物(2:2:1和2:2:2复合物;图13C)的混合物。相比之下,F1K-Fab6 IgG似乎与单独的KLB形成了2:2和2:3复合物的广泛异质混合物(峰2;681-811kDa),而随后添加FGFR1c导致洗脱和摩尔质量与2:2:1F1K-Fab6IgG:KLB:FGFR1c三元复合物一致(峰3,~720-730kDa;图13D)。在这些样品中还可以观察到与1:1:1F1K-Fab6 IgG:KLB:FGFR1c复合物一致的小峰(峰1;~362kDa)。代表F1K-Fab6 IgG、KLB和FGFR1c复合物的峰的宽度可能表明所得复合物采用异质构象和/或在分离时快速解离。总之,这些数据表明,与对照单特异性和双特异性结合分子相比,两种三特异性结合分子都可以结合KLB和FGFR1c以形成具有独特化学计量的三元复合物。

[0447] 7.11.三特异性抗体恒定结构域变体的材料和方法(实施例10至14)

[0448] 7.11.1.恒定结构域变体的载体构建体

[0449] 编码抗KLB GH1 Fab、抗KLB GH2 Fab、抗KLB GH2 scFv和抗FGFR1c Fab结构域的DNA片段;各种氨基酸接头;各种IgG铰链和Fc结构域由Integrated DNA Technologies, Inc. (San Diego, California)或Geneart/Thermo Fisher Scientific (Regensburg, Germany)合成。

[0450] 通过NEBuilder HiFi DNA组装试剂盒(New England BioLabs Inc.)或按照New England BioLabs Inc.提供的标准分子克隆方案限制性消化然后连接,来产生各个多肽链的哺乳动物表达载体。DNA作为单个质粒或重链和轻链对转染,按照制造商的方案。收获50ml细胞培养物上清液并经由HiTrap™ Protein G HP或MabSelect SuRe pcc柱(Cytiva)进行纯化。

[0451] 某些构建体通过瞬时转染(Thermo Fisher Scientific)在Expi293F™细胞中表达。使用ProteinMaker系统(Protein BioSolutions, Gaithersburg, MD)和HiTrap™ Protein G HP或MabSelect SuRe pcc柱(Cytiva)纯化Expi293F上清液中的蛋白质。单步洗脱后,中和抗体,透析到具有5%甘油的磷酸盐缓冲盐水(PBS)的最终缓冲液中,等分并储存在-80℃。对于某些构建体,使用HiPrep 26/60Sephacryl S-200柱进行尺寸排阻色谱的另外的步骤。

[0452] 其他表达载体在中国仓鼠卵巢 (CHO) 表达系统中稳定表达。

[0453] 7.11.2.通过Biacore的Fc受体结合的动力学测量

[0454] 简而言之,表面等离子体共振 (SPR) 实验在25℃下在Biacore T200仪器上使用羧甲基葡聚糖包被的 (CM-5) 芯片进行。使用标准胺偶联化学将小鼠单克隆抗五组氨酸抗体 (GE Healthcare) 固定在CM-5传感器芯片的表面上。在抗五组氨酸胺偶联的CM-5芯片上捕获His标记的人、猴或小鼠Fc γ R蛋白的140RU-376RU,并将抗体储备液以50 μ l/min注射到捕获的蛋白上2分钟,系列稀释 (6 μ M-24.7nM)。监测mAb结合反应,对于低亲和力受体,计算稳态结合平衡。通过使用Scrubber 2.0曲线拟合软件处理数据并将其拟合至1:1结合模型,确定动力学缔合 (ka) 和解离 (kd) 速率常数。结合解离平衡常数 (KD) 和解离半衰期 (t1/2) 由动力学速率常数计算为:KD (M) =kd/ka;和t1/2 (min) = (ln2/(60*kd))。一些KD是使用稳态平衡解离常数得出的;NB=未观察到结合;IC=由于低特异性RU信号而导致不确定的亲和力测定。

[0455] 7.11.3.酶联免疫吸附测定 (ELISA)

[0456] 将微量滴定板的孔用100 μ l PBS中的4 μ g/ml 6x-His (SEQ ID NO:42) 标签单克隆抗体 (4E3D10H2/E3) (Thermo Scientific) 包被 (18h,4℃),然后用阻断缓冲液 (PBS中的2% BSA) 在室温下封闭1h。不同的Fc受体 (2 μ g/ml,100 μ l/孔) 一式两份上样,并在室温下孵育1h。同时,将抗体从起始浓度6.0x 10⁻⁶M在阻断缓冲液中以1:5的比例稀释。然后将稀释的抗体 (100 μ l) 加入到孔中并在室温下孵育1h。室温下加入过氧化物酶缀合的山羊抗人IgG、F (ab')₂检测抗体100 μ l/孔 (阻断缓冲液中1:5000) 1h,并通过添加100 μ l过氧化物酶底物 (KPL-TMB) 30分钟观察反应。用100 μ l TMB终止缓冲液终止反应,并使用ELISA读板器 (Envision,PerkinElmer) 测量450nm处的吸光度。每个步骤后用洗涤缓冲液 (PBS,pH 7.4,含有0.05% (v/v) Tween 20) 洗涤板3次。

[0457] 7.11.4.替代ADCC测定

[0458] 7.11.4.1.靶细胞

[0459] HEK293/hFGFR1c/hKLB/hCD20:其中内源性FGFR1被CRISPR-Cas9切除的HEK293细胞被工程化以组成性地表达全长人CD20 (hCD20,登录号NP_690605.1的氨基酸M1-P297)、FGFR1c (hFGFR1c,登录号NP_075594的氨基酸M1-R731) 和KLB (hKLB,登录号NP_783864.1的氨基酸M1-S1044)。对细胞进行分选用于检测所有受体的高表达。

[0460] 7.11.4.2.报告基因细胞

[0461] Jurkat/NFAT-Luc/Fc γ R3a 176Val:Jurkat T细胞被工程化以稳定表达活化T细胞核因子 (NFAT) 萤光素酶报告基因构建体以及高亲和力人Fc γ R3a176Val同种异型受体 (登录号P08637 VAR_003960的氨基酸M1-K254)。

[0462] 7.11.4.3.测定设置

[0463] 实验前三天,将Jurkat报告基因细胞在RPMI1640+10% FBS+P/S/G+0.5 μ g/ml嘌呤霉素+500 μ g/ml G418生长培养基中分裂成1.25x 10⁵个细胞/ml。实验当天,将靶细胞和报告基因细胞转移至测定培养基 (RPMI+10% FBS+P/S/G) 中,并以1:1的比例 (每种细胞类型3x 10⁴/孔) 添加至96孔白色微量滴定板。多特异性抗FGFR1c/KLB抗体和hIgG4 S108P同种对照抗体以7点、1:4系列稀释进行滴定,最终浓度范围为73.2pM至300nM,最后第8个点不含抗体,并添加到一式两份的细胞。将板在37℃/5% CO2下孵育4.6h,然后添加等体积的

ONE-Glo™ (Promega) 试剂来裂解细胞并检测萤光素酶活性。在多标签读板器Envision (PerkinElmer) 上以相对光单位 (RLU) 捕获发射的光。使用GraphPad Prism软件由8点剂量反应曲线 (包括背景信号) 上的4参数逻辑方程确定抗体的EC50值。使用以下公式计算最大折叠诱导: 倍数诱导 = 每种抗体测试剂量范围内的最大平均RLU / 平均RLU (背景信号 = 无抗体)

[0464] 7.11.5. 稳定表达和抗体滴度

[0465] 将编码具有各种IgG亚类的不同抗体的重组蛋白克隆到表达质粒中, 转染到CHO细胞中, 并在用400mg/L潮霉素选择12-14天后分离稳定转染池。稳定的CHO细胞池在化学界定的无蛋白质悬浮培养基中生长, 用于生产用于测试的蛋白质。

[0466] 通过用0.5mg/L多西环素诱导细胞培养物五天并收获条件培养基来产生蛋白质。用Octet仪器 (ForteBio) 使用蛋白A传感器以不同浓度的已知标准测定蛋白滴度。

[0467] 7.11.6. 萤光素酶报告基因检测

[0468] 使用稳定表达人FGFR1c和KLB以及在含有血清反应性元件 (SRE) 的启动子控制下的萤光素酶报告基因的HEK293.SRE1uc.hFGFR1c/hKLB细胞测试包括不同IgG铰链和Fc结构域的抗体的激动剂活性。使用具有6xHis (SEQ ID NO: 42) 标签的重组人FGF21作为阳性对照, 从FGF21获得的最大报告基因活性定义为100%活性。用每种抗体或6xHis-FGF21处理细胞6小时, 然后进行萤光素酶测定。将各个抗体诱导的活性百分比相对于FGF21的最大活性进行归一化。进行剂量反应测定以确定EC50。抗Fe1D1同种型 (hIgG4-S108P) 对照抗体用作阴性对照。

[0469] 7.11.7. 人原代脂肪细胞信号传导测定

[0470] 从皮下前脂肪细胞分化的人原代脂肪细胞获自Zen-Bio Inc (Durham, NC)。将细胞在无血清培养基中培养4小时, 然后用系列稀释的抗体处理15分钟。使用AlphaScreen™ SureFire™ ERK测定试剂盒的裂解缓冲液裂解细胞, 该试剂盒可测量处理后的细胞裂解物中的磷酸-ERK (PerkinElmer, Shelton, CT)。SureFire™ ERK测定是根据制造商的方案进行的。His标记的人FGF21和同种型对照人IgG4抗体分别作为阳性对照和阴性对照进行测试。实验中还包括FGFR1c/KLB双特异性抗体。

[0471] 7.12. 实施例10: IgG1 PVA恒定结构域的设计、克隆和表达

[0472] 7.12.1. 概述

[0473] IgG1 Fc和IgG4 Fc具有不同的Fc γ 受体结合能力和电荷分布, 这提供了最佳Fc功能接合的选择以及与抗体构建模块 (例如Fab、scFv和替代形式抗体融合蛋白) 的不同相容性。IgG1和IgG4的铰链区也具有不同的长度和灵活性。IgG4 (S108P或S228P, EU编号) 已用于多种已批准的抗体产品, 例如派姆单抗、纳武单抗和Ixekezumab, 这些产品需要降低的Fc效应功能。由于抗体构建模块 (例如Fab、scFv) 对特定免疫球蛋白亚类的偏好, 寻找了不同于IgG4 (S108P) 的基于人IgG1 Fc的替代和天然序列变体, 该变体显示Fc γ 受体结合减少, Fc受体效应功能降低。

[0474] 图17显示了各种IgG铰链/Fc变体与各种野生型和修饰的人IgG1和IgG4铰链区域之间的序列比对, 以及所使用的CH2和CH3 Fc区域从氨基酸226到447 (EU编号) 的描述。hIgG1 PVA被设计为在完全IgG1背景下 (例如, IgG1上铰链、CH2和CH3区域) 包含下铰链区域的PVA突变。

[0475] 为了测试hIgG1 PVA的特性,将其掺入具有2+1N-scFv或2+1N-Fab形式的替代形式抗体中(参见,例如,图5为2+1N-scFv形式的说明;在2+1N-Fab形式中,N末端scFv结构域被Fab结构域替代,也如图5所示)。

[0476] 7.12.2.结果

[0477] 成功表达和纯化了掺入各种IgG铰链和Fc结构域的对照和双特异性抗体。

[0478] 当在CHO细胞中表达时,在scFv和Fab之间具有不同接头长度的IgG1 PVA主链中的F1K_scFv6构建体比包括IgG4 S108P的构建体具有更高的抗体效价(作为总抗体种类测量)(图18)。

[0479] 7.13.实施例11:恒定结构域变体对Fc γ 受体的结合动力学

[0480] 7.13.1.概述

[0481] 具有不同铰链-Fc区的各种抗体与Fc γ 受体的结合亲和力和信号通过Biacore测量,如第7.11.2节中所描述的。

[0482] 7.13.1.1.结果

[0483] 结果示于下表14和15中。

[0484]

表 14								
不同 Fc 变体的抗体与人 Fc γ R 结合的结合信号								
	FcR 捕获 (RU)	615.9 $\pm$ 0.8	164.4 $\pm$ 0.4	364.4 $\pm$ 0.6	378.2 $\pm$ 1	208 $\pm$ 1.7	899 $\pm$ 2.7	548 $\pm$ 2.4
抗体	Fc 变体	人 Fc γ RI	人 Fc γ RIIa (R131)	人 Fc γ RIIa (H131)	人 Fc γ RIIb	人 Fc γ RIIIa (F176)	人 Fc γ RIIIa (V176)	人 Fc γ RIIIb
mAb1	hIgG1	1606	457	614	833	322	2228	1028
mAb2	hIgG4 S108P	1475	181	393	737	28	429	-2
mAb3	hIgG4s	36	340	419	226	6	34	-8
AF2a	hIgG1 PVA	6	91	21	-1	4	144	-5
AF2c	hIgG1 N180G	518	-5	-9	-9	-5	-11	-7

表 15

高、低亲和力 Fc γ R 结合的 KD (M)值

抗体	Fc 变体	人 Fc γ RI	人 Fc γ RIIa (R131)	人 Fc γ RIIa (H131)	人 Fc γ RIIb	人 Fc γ RIIIa (F176)	人 Fc γ RIIIa (V176)	人 Fc γ RIIIb
mAb1	hIgG1	1.76E-09	3.40E-07	3.40E-07	5.40E-07	1.02E-06	6.20E-07	1.02E-06
mAb2	hIgG4 S108P	5.35E-09	5.70E-06	1.50E-06	7.20E-07	WB	4.90E-06	NB
mAb3	hIgG4s	NB	1.32E-06	1.61E-06	1.23E-05	NB	WB	NB
AF2a	hIgG1 PVA	NB	WB	WB	NB	NB	7.20E-05	NB
AF2c	hIgG1 N180G	2.21E-06	NB	NB	NB	NB	NB	NB

[0486] 在表15中,NB指不结合;WB指弱结合。

[0487] IgG1 PVA在Fc γ R1、Fc γ R2b、Fc γ R3a (F176)、Fc γ R3b中没有结合信号。它与Fc γ R2a (R131和H131) 的结合信号较低,但与IgG1和IgG4 S108P相比,其水平显著降低(分别为91和21RU)。IgG1 PVA对Fc γ R3a (V176) 具有弱至中等的结合信号(144RU), $KD=7.2 \times 10^{-5} M$,比IgG1和IgG4 S108P的结合信号更弱(表14和表15)。

[0488] 7.14. 实施例12:与Fc γ 受体的ELISA结合

[0489] 7.14.1. 概述

[0490] 通过ELISA评估包括各种IgG铰链区和Fc区的FGFR1c/KLB三特异性抗体的结合,如第7.11.3节中所描述的。

[0491] 7.14.2. 结果

[0492] 指示了对照和测试抗体结合各种Fc γ 受体的能力的结合曲线描绘于图19A-19G中。含有野生型IgG1铰链和Fc结构域的抗体表现出与hFCR γ 1的最高结合力。hFCR γ 1与IgG1 PVA的结合显著减少,显示了与IgG4的类似结合(图19A)。与IgG1 N180G的结合也同样减少。与野生型IgG1相比,IgG4 S108P与hFCR γ 1的结合仅略有减少。在hFCR γ 3A(V158)和hFCR γ 3A(F158)的结合中观察到类似的趋势(图19E、图19F)。用hFCR γ 2A(H131)、hFCR γ 2A(R131)观察到结合的非常小的差异(图19B和图19C)。但是IgG1 PVA在hFCR γ 2B中具有比IgG4 S108P更弱的结合并且比IgG1稍弱(图19D)。在hFCR γ 3B中,IgG1 PVA具有比IgG1更少的结合(图19G)。

[0493] 7.15. 实施例13:抗体依赖性细胞毒性

[0494] 7.15.1.概述

[0495] 利用第7.11.4节中描述的替代抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 测定法,确定了IgG1 PVA的细胞毒活性并与其他IgG变体(例如,IgG1 N180G和IgG4S108P)的细胞毒活性进行比较。

[0496] 使用与抗体结合的报告基因细胞和靶细胞在替代生物测定中测量了靶向hFGFR1c和hKLB的三特异性抗体与Fc γ R3a相互作用的能力,Fc γ R3a是一种在NK细胞上显著表达的Fc受体,其诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)。在此测定中,工程化Jurkat T细胞在转录因子NFAT(NFAT-Luc)以及高亲和力人Fc γ R3a 176Val同种异型受体(Jurkat/NFAT-Luc/hFc γ R3a 176Val)的控制下表达报告基因萤光素酶。靶细胞是工程化的HEK293细胞以表达人CD20以及全长人FGFR1c和人KLB。报告基因细胞与靶细胞一起孵育,经由与靶细胞结合的人IgG1抗体的Fc结构域的Fc γ R3a的参与导致报告基因细胞中转录因子NFAT的激活,并驱动萤光素酶的表达,然后经由发光读数进行测量。

[0497] 7.15.2.结果

[0498] 来自ADCC测定的代表性数据描述于图20和21中。仅具有野生型IgG1、F1K_scFv6-LK30 IgG1和F1K_Fab6-LK30 IgG1的抗体显示出萤光素酶信号的诱导,分别为1.9倍($EC_{50}=307pM$)和3.4倍($EC_{50}=1.04nM$)。具有IgG1PVA、IgG1 N180G或IgG4 S108P的2+1N-scFv或2+1N-Fab形式的三特异性抗体均未在替代ADCC测定中显示出活性。

[0499] 7.16.实施例14:分子活性

[0500] 7.16.1.概述

[0501] 使用第7.11.6节和第7.11.7节中描述的萤光素酶报告基因测定和人原代脂肪细胞信号传导测定来测试包括IgG1 PVA和对照的FGFR1c/KLB三特异性抗体的活性。

[0502] 7.16.2.结果

[0503] HEK.293SRE1uc.hFGFR1c/hKLB中的三特异性抗体的活性显示于图22(F1K_scFv6-LK30、IgG1 PVA和F1K_scFv6-LK30、IgG4 S108P)和图22(F1K_Fab6-LK30、IgG1 PVA;F1K_Fab6-LK15、IgG1 PVA;F1K_Fab6-LK30、IgG4 S108P和F1K_Fab6-LK15、IgG4 S108P)中。人脂肪细胞中的活性如图24(F1K_scFv6-LK30、IgG1 PVA;F1K_scFv6-LK30、IgG4 S108P;F1K_Fab6-LK15、IgG1 PVA;和F1K_Fab6-LK15、IgG4 S108P)所示。掺入IgG1 PVA的2+1N-scFv形式的抗体在HEK FGFR1c/KLB细胞(图22)和人脂肪细胞(图23)中显示出优于IgG4 S108P的激动剂活性。在报告基因细胞测定中,具有IgG1PVA恒定结构域的2+1N-Fab形式的抗体比具有IgG4 S108P恒定结构域的抗体引起更大的最大激活(图24)。

[0504] 8.具体的实施方案

[0505] 本公开通过以下具体实施方案进行举例说明。

[0506] 1.方法,其包括向受试者施用多特异性结合分子(MBM)或包含所述MBM的药物组合物,其中所述MBM包含:

[0507] (a) 特异性结合人成纤维细胞生长因子受体1c同种型(“FGFR1c”)的抗原结合模块1(ABM1);

[0508] (b) 特异性结合人klotho β (“KLB”)的GH1结构域的抗原结合模块2(ABM2);和

[0509] (c) 特异性结合人KLB的GH2结构域的抗原结合模块3(ABM3)。

[0510] 2.实施方案1的方法,其中以有效量向所述受试者施用所述MBM以:

- [0511] (a) 治疗代谢病况;和/或
- [0512] (b) 改善代谢。
- [0513] 3. 实施方案1或实施方案2的方法,其中所述方法有效激动所述受试者中的FGF21受体复合物。
- [0514] 4. 实施方案1至3中任一项的方法,其中每个抗原结合模块能够在每个其他抗原结合模块结合其各自的靶标的同时结合其各自的靶标。
- [0515] 5. 实施方案1至4中任一项的方法,其中ABM1结合FGFR1c的环D3。
- [0516] 6. 实施方案1至4中任一项的方法,其中ABM1结合FGFR1c的环D2。
- [0517] 7. 实施方案1至6中任一项的方法,其中所述MBM是三特异性结合分子(“TBM”)。
- [0518] 8. 实施方案1至7中任一项的方法,其中ABM1是抗体片段、scFv、dsFv、Fv、Fab、scFab、(Fab')₂、单结构域抗体(SDAB)、VH或VL结构域、或骆驼科VHH结构域。
- [0519] 9. 实施方案1至8中任一项的方法,其中ABM2是抗体片段、scFv、dsFv、Fv、Fab、scFab、(Fab')₂、单结构域抗体(SDAB)、VH或VL结构域、或骆驼科VHH结构域。
- [0520] 10. 实施方案1至9中任一项的方法,其中ABM3是抗体片段、scFv、dsFv、Fv、Fab、scFab、(Fab')₂、单结构域抗体(SDAB)、VH或VL结构域、或骆驼科VHH结构域。
- [0521] 11. 实施方案1至10中任一项的方法,其中ABM1是scFv。
- [0522] 12. 实施方案1至10中任一项的方法,其中ABM1是Fab。
- [0523] 13. 实施方案12的方法,其中ABM1的轻链是通用轻链。
- [0524] 14. 实施方案12的方法,其中ABM1的轻链恒定区和第一重链恒定区(CH1)处于Crossmab排列中。
- [0525] 15. 实施方案1至14中任一项的方法,其中ABM2是scFv。
- [0526] 16. 实施方案1至12中任一项的方法,其中ABM2是Fab。
- [0527] 17. 实施方案16的方法,其中ABM2的轻链是通用轻链。
- [0528] 18. 实施方案16的方法,其中ABM2的轻链恒定区和第一重链恒定区(CH1)处于Crossmab排列中。
- [0529] 19. 实施方案1至18中任一项的方法,其中ABM3是scFv。
- [0530] 20. 实施方案1至18中任一项的方法,其中ABM3是Fab。
- [0531] 21. 实施方案20的方法,其中ABM3的轻链是通用轻链。
- [0532] 22. 实施方案20的方法,其中ABM3的轻链恒定区和第一重链恒定区(CH1)处于Crossmab排列中。
- [0533] 23. 实施方案1至22中任一项的方法,其中所述MBM包含Fc异二聚体。
- [0534] 24. 实施方案23的方法,其中与野生型Fc结构域相比,Fc异二聚体中的Fc结构域包含杆臼突变。
- [0535] 25. 实施方案23或实施方案24的方法,其中与野生型Fc结构域相比,所述Fc异二聚体中的Fc结构域包含star突变。
- [0536] 26. 实施方案23至25中任一项的方法,其中所述MBM包含:
- [0537] (a) 第一多肽链,其在N至C末端方向上包含(i) scFv,其可操作地连接至(ii) 第一Fab的第一重链区,所述第一Fab的第一重链区可操作地连接至(iii) Fc结构域;
- [0538] (b) 第二多肽链,其在N至C末端方向上包含(i) 第二Fab的第二重链区,所述第二

Fab的第二重链区可操作地连接至(ii)Fc结构域;

- [0539] (c) 第三多肽链,其包含与所述第一重链区配对以形成所述第一Fab的第一轻链;
- [0540] (d) 第四多肽链,其包含与所述第二重链区配对以形成所述第二Fab的第二轻链。
- [0541] 27. 实施方案26的方法,其中所述第一轻链和所述第二轻链是相同的。
- [0542] 28. 实施方案26或实施方案27的方法,其中ABM1是所述第一Fab。
- [0543] 29. 实施方案28的方法,其中ABM2是所述scFv并且ABM3是所述第二Fab。
- [0544] 30. 实施方案28的方法,其中ABM2是所述第二Fab并且ABM3是所述scFv。
- [0545] 31. 实施方案26至30中任一项的方法,其中所述scFv经由接头连接至所述第一重链区。
- [0546] 32. 实施方案31的方法,其中所述接头是:
 - [0547] (a) 长度为至少5个氨基酸、至少6个氨基酸或至少7个氨基酸;以及任选地
 - [0548] (b) 长度最多至30个氨基酸、最多至40个氨基酸、最多至50个氨基酸或最多至60个氨基酸。
- [0549] 33. 实施方案32的方法,其中所述接头是:
 - [0550] (a) 长度为5个氨基酸至50个氨基酸;
 - [0551] (b) 长度为5个氨基酸至45个氨基酸;
 - [0552] (c) 长度为5个氨基酸至40个氨基酸;
 - [0553] (d) 长度为5个氨基酸至35个氨基酸;
 - [0554] (e) 长度为5个氨基酸至30个氨基酸;
 - [0555] (f) 长度为5个氨基酸至25个氨基酸;或者
 - [0556] (g) 长度为5个氨基酸至20个氨基酸。
- [0557] 34. 实施方案32的方法,其中所述接头是:
 - [0558] (a) 长度为6个氨基酸至50个氨基酸;
 - [0559] (b) 长度为6个氨基酸至45个氨基酸;
 - [0560] (c) 长度为6个氨基酸至40个氨基酸;
 - [0561] (d) 长度为6个氨基酸至35个氨基酸;
 - [0562] (e) 长度为6个氨基酸至30个氨基酸;
 - [0563] (f) 长度为6个氨基酸至25个氨基酸;或者
 - [0564] (g) 长度为6个氨基酸至20个氨基酸。
- [0565] 35. 实施方案32的方法,其中所述接头是:
 - [0566] (a) 长度为7个氨基酸至40个氨基酸;
 - [0567] (b) 长度为7个氨基酸至35个氨基酸;
 - [0568] (c) 长度为7个氨基酸至30个氨基酸;
 - [0569] (d) 长度为7个氨基酸至25个氨基酸;
 - [0570] (e) 长度为7个氨基酸至20个氨基酸。
- [0571] 36. 实施方案32的方法,其中所述接头的长度为5个氨基酸至45个氨基酸。
- [0572] 37. 实施方案32的方法,其中所述接头的长度为7个氨基酸至30个氨基酸。
- [0573] 38. 实施方案32的方法,其中所述接头的长度为5个氨基酸至25个氨基酸。
- [0574] 39. 实施方案32的方法,其中所述接头的长度为10个氨基酸至60个氨基酸。

- [0575] 40. 实施方案39的方法,其中所述接头的长度为20个氨基酸至50个氨基酸。
- [0576] 41. 实施方案40的方法,其中所述接头的长度为25个氨基酸至35个氨基酸。
- [0577] 42. 实施方案31至41中任一项的方法,其中所述接头是或包含 G_nS (SEQ ID NO:15) 或 SG_n (SEQ ID NO:16) 的多聚体,其中n是1至7的整数。
- [0578] 43. 实施方案42的方法,其中所述接头是或包含 G_4S (SEQ ID NO:17) 的多聚体。
- [0579] 44. 实施方案31至41中任一项的方法,其中所述接头是或包含两个连续的甘氨酸 (2Gly)、三个连续的甘氨酸 (3Gly)、四个连续的甘氨酸 (4Gly (SEQ ID NO:18))、五个连续的甘氨酸 (5Gly (SEQ ID NO:19))、六个连续的甘氨酸 (6Gly (SEQ ID NO:20))、七个连续的甘氨酸 (7Gly (SEQ ID NO:21))、八个连续的甘氨酸 (8Gly (SEQ ID NO:22)) 或九个连续的甘氨酸 (9Gly (SEQ ID NO:23))。
- [0580] 45. 实施方案23至25中任一项的方法,其中所述MBM包含:
- [0581] (a) 第一多肽链,其在N至C末端方向上包含 (i) 第一Fab的第一重链区,所述第一Fab的第一重链区可操作地连接至 (ii) 第二Fab的第二重链区,所述第二Fab的第二重链区可操作地连接至 (iii) Fc结构域,任选地其中任选地所述第一重链区经由接头连接至所述第二重链区,任选地其中所述接头如实施方案32至44中任一项所定义;
- [0582] (b) 第二多肽链,其在N至C末端方向上包含 (i) 第三Fab的第三重链区,所述第三Fab的第三重链区可操作地连接至 (ii) Fc结构域;
- [0583] (c) 第三多肽链,其包含与所述第一重链区配对以形成所述第一Fab的第一轻链;
- [0584] (d) 第四多肽链,其包含与所述第二重链区配对以形成所述第二Fab的第二轻链;
- 和
- [0585] (e) 第五多肽链,其包含与所述第三重链区配对以形成所述第三Fab的第三轻链。
- [0586] 46. 实施方案45的方法,其中所述第一、第二和第三Fab是仅有的抗原结合模块。
- [0587] 47. 实施方案45至46中任一项的方法,其中所述第一轻链和所述第二轻链是相同的。
- [0588] 48. 实施方案45至47中任一项的方法,其中ABM1是所述第二Fab。
- [0589] 49. 实施方案48的方法,其中ABM2是所述第一Fab并且ABM3是所述第三Fab。
- [0590] 50. 实施方案48的方法,其中ABM3是所述第一Fab并且ABM2是所述第三Fab。
- [0591] 51. 实施方案1至50中任一项的方法,其中ABM1包含表1B中列出的CDR序列。
- [0592] 52. 实施方案1至51中任一项的方法,其中ABM2包含表2B中列出的CDR序列。
- [0593] 53. 实施方案1至52中任一项的方法,其中ABM3包含表3B中列出的CDR序列。
- [0594] 54. 实施方案1至53中任一项的方法,其中所述MBM是三价MBM。
- [0595] 55. 实施方案1至53中任一项的方法,其中所述MBM是四价MBM。
- [0596] 56. 实施方案1至55中任一项的方法,其中所述方法有效减轻所述受试者的体重。
- [0597] 57. 实施方案1至56的方法,其中所述方法有效降低所述受试者中的循环高密度脂蛋白胆固醇。
- [0598] 58. 实施方案1至57的方法,其中所述方法有效增加所述受试者中的循环低密度脂蛋白胆固醇。
- [0599] 59. 实施方案1至58的方法,其中所述方法有效降低所述受试者中的血甘油三酯。
- [0600] 60. 实施方案1至59的方法,其中所述方法有效降低所述受试者中的血糖。

- [0601] 61. 实施方案1至60的方法,其中所述受试者患有代谢病症。
- [0602] 62. 实施方案61的方法,其中所述代谢病症是代谢综合征。
- [0603] 63. 实施方案61的方法,其中所述代谢病症是肥胖症。
- [0604] 64. 实施方案61的方法,其中所述代谢病症是脂肪肝。
- [0605] 65. 实施方案61的方法,其中所述代谢病症是高胰岛素血症。
- [0606] 66. 实施方案61的方法,其中所述代谢病症是2型糖尿病。
- [0607] 67. 实施方案61的方法,其中所述代谢病症是非酒精性脂肪性肝炎(“NASH”)。
- [0608] 68. 实施方案61的方法,其中所述代谢病症是非酒精性脂肪肝病(“NAFLD”)。
- [0609] 69. 实施方案61的方法,其中所述代谢病症是高胆固醇血症。
- [0610] 70. 实施方案61的方法,其中所述代谢病症是高血糖症。
- [0611] 71. 方法,其包括向受试者施用多特异性结合分子(MBM)或包含所述MBM的药物组合物,其中所述MBM包含:
- [0612] (a) 用于特异性结合人成纤维细胞生长因子受体1c同种型(“FGFR1c”)的第一抗原结合工具;
- [0613] (b) 用于特异性结合人klotho β (“KLB”)的GH1结构域的第二抗原结合工具;和
- [0614] (c) 用于特异性结合人KLB的GH2结构域的第三抗原结合工具。
- [0615] 72. 实施方案71的方法,其中以有效量向所述受试者施用所述MBM以:
- [0616] (a) 治疗代谢状况;和/或
- [0617] (b) 改善代谢。
- [0618] 73. 实施方案71或实施方案72的方法,其中所述方法有效激动所述受试者中的FGF21受体复合物。
- [0619] 74. 实施方案71至73中任一项的方法,其中每个抗原结合工具能够在每个其他抗原结合工具结合其各自靶标的同时结合其各自靶标。
- [0620] 75. 实施方案71至74中任一项的方法,其中所述第一抗原结合工具结合FGFR1c的环D3。
- [0621] 76. 实施方案71至74中任一项的方法,其中所述第一抗原结合工具结合FGFR1c的环D2。
- [0622] 77. 实施方案71至76中任一项的方法,其中所述MBM是三特异性结合分子(“TBM”)。
- [0623] 78. 实施方案71至77中任一项的方法,其中所述第一抗原结合工具是抗体片段、scFv、dsFv、Fv、Fab、scFab、(Fab')₂、单结构域抗体(SDAB)、VH或VL结构域、或骆驼科VHH结构域。
- [0624] 79. 实施方案71至78中任一项的方法,其中所述第二抗原结合工具是抗体片段、scFv、dsFv、Fv、Fab、scFab、(Fab')₂、单结构域抗体(SDAB)、VH或VL结构域、或骆驼科VHH结构域。
- [0625] 80. 实施方案71至79中任一项的方法,其中所述第三抗原结合工具是抗体片段、scFv、dsFv、Fv、Fab、scFab、(Fab')₂、单结构域抗体(SDAB)、VH或VL结构域、或骆驼科VHH结构域。
- [0626] 81. 实施方案71至80中任一项的方法,其中所述第一抗原结合工具是scFv。
- [0627] 82. 实施方案71至80中任一项的方法,其中所述第一抗原结合工具是Fab。

- [0628] 83. 实施方案82的方法, 其中所述第一抗原结合工具的轻链是通用轻链。
- [0629] 84. 实施方案82的方法, 其中所述第一抗原结合工具的轻链恒定区和第一重链恒定区 (CH1) 处于Crossmab排列中。
- [0630] 85. 实施方案71至84中任一项的方法, 其中所述第二抗原结合工具是scFv。
- [0631] 86. 实施方案71至82中任一项的方法, 其中所述第二抗原结合工具是Fab。
- [0632] 87. 实施方案86的方法, 其中所述第二抗原结合工具的轻链是通用轻链。
- [0633] 88. 实施方案86的方法, 其中所述第二抗原结合工具的轻链恒定区和第一重链恒定区 (CH1) 处于Crossmab排列中。
- [0634] 89. 实施方案71至88中任一项的方法, 其中所述第三抗原结合工具是scFv。
- [0635] 90. 实施方案71至88中任一项的方法, 其中所述第三抗原结合手段是Fab。
- [0636] 91. 实施方案90的方法, 其中所述第三抗原结合工具的轻链是通用轻链。
- [0637] 92. 实施方案90的方法, 其中所述第三抗原结合工具的轻链恒定区和第一重链恒定区 (CH1) 处于Crossmab排列中。
- [0638] 93. 实施方案71至92中任一项的方法, 其中所述MBM包含Fc异二聚体。
- [0639] 94. 实施方案93或实施方案94的方法, 其中与野生型Fc结构域相比, 所述Fc异二聚体中的Fc结构域包含杵臼突变。
- [0640] 95. 实施方案93的方法, 其中与野生型Fc结构域相比, 所述Fc异二聚体中的Fc结构域包含star突变。
- [0641] 96. 实施方案93至95中任一项的方法, 其中所述MBM包含:
- [0642] (a) 第一多肽链, 其在N至C末端方向上包含 (i) scFv, 其可操作地连接至 (ii) 第一Fab的第一重链区, 所述第一Fab的第一重链区可操作地连接至 (iii) Fc结构域;
- [0643] (b) 第二多肽链, 其在N至C末端方向上包含 (i) 第二Fab的第二重链区, 所述第二Fab的第二重链区可操作地连接至 (ii) Fc结构域;
- [0644] (c) 第三多肽链, 其包含与所述第一重链区配对以形成所述第一Fab的第一轻链;
- [0645] (d) 第四多肽链, 其包含与所述第二重链区配对以形成所述第二Fab的第二轻链。
- [0646] 97. 实施方案96的方法, 其中所述第一轻链和所述第二轻链是相同的。
- [0647] 98. 实施方案96或实施方案97的方法, 其中所述第一抗原结合工具是所述第一Fab。
- [0648] 99. 实施方案98的方法, 其中所述第二抗原结合工具是所述scFv并且所述第二抗原结合工具是所述第二Fab。
- [0649] 100. 实施方案98的方法, 其中所述第二抗原结合工具是所述第二Fab并且所述第三抗原结合工具是所述scFv。
- [0650] 101. 实施方案96至100中任一项的方法, 其中所述scFv经由接头连接至所述第一重链区。
- [0651] 102. 实施方案101的方法, 其中所述接头是:
- [0652] (a) 长度为至少5个氨基酸、至少6个氨基酸或至少7个氨基酸; 以及任选地
- [0653] (b) 长度最多至30个氨基酸、最多至40个氨基酸、最多至50个氨基酸或最多至60个氨基酸。
- [0654] 103. 实施方案102的方法, 其中所述接头是:

- [0655] (a) 长度为5个氨基酸至50个氨基酸；
- [0656] (b) 长度为5个氨基酸至45个氨基酸；
- [0657] (c) 长度为5个氨基酸至40个氨基酸；
- [0658] (d) 长度为5个氨基酸至35个氨基酸；
- [0659] (e) 长度为5个氨基酸至30个氨基酸；
- [0660] (f) 长度为5个氨基酸至25个氨基酸；或者
- [0661] (g) 长度为5个氨基酸至20个氨基酸。
- [0662] 104. 实施方案102的方法，其中所述接头是：
- [0663] (a) 长度为6个氨基酸至50个氨基酸；
- [0664] (b) 长度为6个氨基酸至45个氨基酸；
- [0665] (c) 长度为6个氨基酸至40个氨基酸；
- [0666] (d) 长度为6个氨基酸至35个氨基酸；
- [0667] (e) 长度为6个氨基酸至30个氨基酸；
- [0668] (f) 长度为6个氨基酸至25个氨基酸；或者
- [0669] (g) 长度为6个氨基酸至20个氨基酸。
- [0670] 105. 实施方案102的方法，其中所述接头是：
- [0671] (a) 长度为7个氨基酸至40个氨基酸；
- [0672] (b) 长度为7个氨基酸至35个氨基酸；
- [0673] (c) 长度为7个氨基酸至30个氨基酸；
- [0674] (d) 长度为7个氨基酸至25个氨基酸；
- [0675] (e) 长度为7个氨基酸至20个氨基酸。
- [0676] 106. 实施方案102的方法，其中所述接头的长度为5个氨基酸至45个氨基酸。
- [0677] 107. 实施方案102的方法，其中所述接头的长度为7个氨基酸至30个氨基酸。
- [0678] 108. 实施方案102的方法，其中所述接头的长度为5个氨基酸至25个氨基酸。
- [0679] 109. 实施方案102的方法，其中所述接头的长度为10个氨基酸至60个氨基酸。
- [0680] 110. 实施方案109的方法，其中所述接头的长度为20个氨基酸至50个氨基酸。
- [0681] 111. 实施方案110的方法，其中所述接头的长度为25个氨基酸至35个氨基酸。
- [0682] 112. 实施方案101至111中任一项的方法，其中所述接头是或包含 G_nS (SEQ ID NO: 15) 或 SG_n (SEQ ID NO: 16) 的多聚体，其中n是1至7的整数。
- [0683] 113. 实施方案109的方法，其中所述接头是或包含 G_4S (SEQ ID NO: 17) 的多聚体。
- [0684] 114. 实施方案101至111中任一项的方法，其中所述接头是或包含两个连续的甘氨酸 (2Gly)、三个连续的甘氨酸 (3Gly)、四个连续的甘氨酸 (4Gly (SEQ ID NO: 18))、五个连续的甘氨酸 (5Gly (SEQ ID NO: 19))、六个连续的甘氨酸 (6Gly (SEQ ID NO: 20))、七个连续的甘氨酸 (7Gly (SEQ ID NO: 21))、八个连续的甘氨酸 (8Gly (SEQ ID NO: 22)) 或九个连续的甘氨酸 (9Gly (SEQ ID NO: 23))。
- [0685] 115. 实施方案93至95中任一项的方法，其中所述MBM包含：
- [0686] (a) 第一多肽链，在N至C末端方向上包含 (i) 第一Fab的第一重链区，所述第一Fab的第一重链区可操作地连接至 (ii) 第二Fab的第二重链区，所述第二Fab的第二重链区可操作地连接至 (iii) Fc结构域，任选地其中任选地所述第一重链区经由接头连接至所述第二

重链区,任选地其中所述接头如实施方案32至44中任一项所定义;

[0687] (b) 第二多肽链,其在N至C末端方向上包含(i) 第三Fab的第三重链区,所述第三Fab的第三重链区可操作地连接至(ii)Fc结构域;

[0688] (c) 第三多肽链,其包含与所述第一重链区配对以形成所述第一Fab的第一轻链;

[0689] (d) 第四多肽链,其包含与所述第二重链区配对以形成所述第二Fab的第二轻链;
和

[0690] (e) 第五多肽链,其包含与所述第三重链区配对以形成所述第三Fab的第三轻链。

[0691] 116.实施方案115的方法,其中所述第一、第二和第三Fab是仅有的抗原结合模块。

[0692] 117.实施方案115至116中任一项的方法,其中所述第一轻链和所述第二轻链是相同的。

[0693] 118.实施方案115至117中任一项的方法,其中所述第一抗原结合工具是所述第二Fab。

[0694] 119.实施方案118的方法,其中所述第二抗原结合工具是所述第一Fab并且所述第三抗原结合工具是所述第三Fab。

[0695] 120.实施方案118的方法,其中所述第三抗原结合工具是所述第一Fab并且所述第二抗原结合工具是所述第三Fab。

[0696] 121.实施方案71至120中任一项的方法,其中所述第一抗原结合工具包含表1B中列出的CDR序列。

[0697] 122.实施方案71至121中任一项的方法,其中所述第二抗原结合工具包含表2B中列出的CDR序列。

[0698] 123.实施方案71至122中任一项的方法,其中所述第三抗原结合工具包含表3B中列出的CDR序列。

[0699] 124.实施方案71至123中任一项的方法,其中所述MBM是三价MBM。

[0700] 125.实施方案71至123中任一项的方法,其中所述MBM是四价MBM。

[0701] 126.实施方案1至125中任一项的方法,其中所述MBM包含恒定结构域的异二聚体对。

[0702] 127.实施方案126的方法,其中每个恒定结构域包含在S228、E233、L234、L235、D265、N297、P329或P331(全部根据EU编号)处的一个或多个取代。

[0703] 128.实施方案127的方法,其中所述恒定结构域包含S228P取代。

[0704] 129.实施方案127的方法,其中所述恒定结构域包含E233A或E233P取代。

[0705] 130.实施方案127的方法,其中所述恒定结构域包含L234A取代。

[0706] 131.实施方案127的方法,其中所述恒定结构域包含L235A。

[0707] 132.实施方案127的方法,其中所述恒定结构域包含D265A取代。

[0708] 133.实施方案127的方法,其中所述恒定结构域包含N297A或N297D取代。

[0709] 134.实施方案127的方法,其中所述恒定结构域包含P329G或P329A取代。

[0710] 135.实施方案127的方法,其中所述恒定结构域包含P331S。

[0711] 136.实施方案126至135中任一项的方法,其包含第6.2.7.1节中阐述的取代的任意组合。

[0712] 137.实施方案126至136中任一项的方法,其中每个恒定结构域包含具有降低的效

应功能的铰链序列。

[0713] 138. 实施方案137的方法, 其中所述铰链序列包含或组成为SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:70和SEQ ID NO:71中任一项的氨基酸序列。

[0714] 139. 实施方案137的方法, 其中所述铰链序列包含第6.2.6.2节中阐述的任何铰链修饰。

[0715] 140. 实施方案126至139中任一项的方法, 其中每个恒定结构域包含与SEQ ID NO:46具有至少90%序列同一性的氨基酸序列, 其中:

[0716] (a) 两个恒定结构域都包含在氨基酸位置233-236(EU编号)处的P-V-A-缺失序列;

[0717] (b) 一个恒定结构域包含杆突变T366W并且另一个恒定结构域包含臼突变T366S、L368A和Y407V;

[0718] (c) 任选地, 一个或两个恒定结构域包含star突变H435R和Y436F; 和

[0719] (d) 两个恒定结构域都包含或都不包含二硫键结构突变S354C或E356C的。

[0720] 141. 实施方案140的方法, 其中每个恒定结构域包含与SEQ ID NO:46具有至少93%序列同一性的氨基酸序列。

[0721] 142. 实施方案140的方法, 其中每个恒定结构域包含与SEQ ID NO:46具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

[0722] 143. 实施方案140的方法, 其中每个恒定结构域包含与SEQ ID NO:46具有至少97%序列同一性的氨基酸序列。

[0723] 144. 实施方案126至139中任一项的方法, 其中所述恒定结构域包含:

[0724] (a) 第一恒定结构域, 其包含与SEQ ID NO:58具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列, 如果所述氨基酸序列与SEQ ID NO:58具有小于100%的同一性, 则所述序列保留在所述铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236(EU编号)处的P-V-A-缺失)以及所述杆突变T366W; 和

[0725] (b) 第二恒定结构域, 其包含与SEQ ID NO:62具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列, 如果所述氨基酸序列与SEQ ID NO:62具有小于100%的同一性, 则所述序列保留在所述铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236(EU编号)处的P-V-A-缺失)以及所述臼突变T366S、L368A和Y407V。

[0726] 145. 实施方案144的方法, 其中所述第一恒定结构域与SEQ ID NO:58具有至少95%(或100%)的序列同一性, 并且所述第二恒定结构域与SEQ ID NO:62具有至少95%(或100%)的序列同一性。

[0727] 146. 实施方案126至139中任一项的方法, 其中所述恒定结构域包含:

[0728] (a) 第一恒定结构域, 其包含与SEQ ID NO:58具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列, 如果所述氨基酸序列与SEQ ID NO:58具有小于100%的同一性, 则所述序列保留在所述铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236(EU编号)处的P-V-A-缺失)以及所述杆突变T366W; 和

[0729] (b) 第二恒定结构域, 其包含与SEQ ID NO:63具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列, 如果所述氨基酸序列与SEQ ID NO:63具有小于100%的同一性, 则所述序列保留在所述铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236(EU编号)处的P-V-A-缺失)、所述臼突变T366S、L368A和Y407V以及所

述star突变H435R和Y436F。

[0730] 147.实施方案146的方法,其中所述第一恒定结构域与SEQ ID NO:58具有至少95% (或100%)的序列同一性,并且所述第二恒定结构域与SEQ ID NO:63具有至少95% (或100%)的序列同一性。

[0731] 148.实施方案126至139中任一项的方法,其中所述恒定结构域包含:

[0732] (a) 第一恒定结构域,其包含与SEQ ID NO:59具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,如果所述氨基酸序列与SEQ ID NO:59具有小于100%的同一性,则所述序列保留在所述铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236 (EU编号)处的P-V-A-缺失)、所述杆突变T366W以及所述star突变H435R和Y436F;和

[0733] (b) 第二恒定结构域,其包含与SEQ ID NO:62具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,如果所述氨基酸序列与SEQ ID NO:62具有小于100%的同一性,则所述序列保留在所述铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236 (EU编号)处的P-V-A-缺失)以及所述白突变T366S、L368A和Y407V。

[0734] 149.实施方案148的方法,其中所述第一恒定结构域与SEQ ID NO:59具有至少95% (或100%)的序列同一性,并且所述第二恒定结构域与SEQ ID NO:62具有至少95% (或100%)的序列同一性。

[0735] 150.实施方案126至139中任一项的方法,其中所述恒定结构域包含:

[0736] (a) 第一恒定结构域,其包含与SEQ ID NO:59具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,如果所述氨基酸序列与SEQ ID NO:59具有小于100%的同一性,则所述序列保留在所述铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236 (EU编号)处的P-V-A-缺失)、所述白突变T366W以及所述star突变H435R和Y436F;和

[0737] (b) 第二恒定结构域,其包含与SEQ ID NO:63具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,如果所述氨基酸序列与SEQ ID NO:63具有小于100%的同一性,则所述序列保留在所述铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236 (EU编号)处的P-V-A-缺失)、所述白突变T366S、L368A和Y407V以及所述star突变H435R和Y436F。

[0738] 151.实施方案150的方法,其中所述第一恒定结构域与SEQ ID NO:59具有至少95% (或100%)的序列同一性,并且所述第二恒定结构域与SEQ ID NO:62具有至少95% (或100%)的序列同一性。

[0739] 152.实施方案126至139中任一项的方法,其中所述恒定结构域包含:

[0740] (a) 第一恒定结构域,其包含与SEQ ID NO:60具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,如果所述氨基酸序列与SEQ ID NO:60具有小于100%的同一性,则所述序列保留在所述铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236 (EU编号)处的P-V-A-缺失)、所述二硫键结构突变S354C以及所述杆突变T366W;和

[0741] (b) 第二恒定结构域,其包含与SEQ ID NO:64具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,如果所述氨基

酸序列与SEQ ID NO:64具有小于100%的同一性,则所述序列保留在所述铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236(EU编号)处的P-V-A-缺失)、所述二硫键结构突变S354C以及所述白突变T366S、L368A和Y407V。

[0742] 153.实施方案152的方法,其中所述第一恒定结构域与SEQ ID NO:60具有至少95%(或100%)的序列同一性,并且所述第二恒定结构域与SEQ ID NO:64具有至少95%(或100%)的序列同一性。

[0743] 154.实施方案126至139中任一项的方法,其中所述恒定结构域包含:

[0744] (a) 第一恒定结构域,其包含与SEQ ID NO:60具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,如果所述氨基酸序列与SEQ ID NO:60具有小于100%的同一性,则所述序列保留在所述铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236(EU编号)处的P-V-A-缺失)、所述二硫键结构突变S354C(或者替代性地结构突变S354C被二硫键结构突变E356C取代)以及所述杆突变T366W;和

[0745] (b) 第二恒定结构域,其包含与SEQ ID NO:65具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,如果所述氨基酸序列与SEQ ID NO:65具有小于100%的同一性,则所述序列保留在所述铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236(EU编号)处的P-V-A-缺失)、所述二硫键结构突变S354C(或者替代性地结构突变S354C被二硫键结构突变E356C取代)、所述杆突变T366S、L368A和Y407V以及所述star突变H435R和Y436F。

[0746] 155.实施方案154的方法,其中所述第一恒定结构域与SEQ ID NO:60具有至少95%(或100%)的序列同一性,并且所述第二恒定结构域与SEQ ID NO:65具有至少95%(或100%)的序列同一性。

[0747] 156.实施方案126至139中任一项的方法,其中所述恒定结构域包含:

[0748] (a) 第一恒定结构域,其包含与SEQ ID NO:61具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,如果所述氨基酸序列与SEQ ID NO:61具有小于100%的同一性,则所述序列保留在所述铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236(EU编号)处的P-V-A-缺失)、所述二硫键结构突变S354C(或者替代性地结构突变S354C被二硫键结构突变E356C取代)、所述杆突变T366W、以及所述star突变H435R和Y436F;和

[0749] (b) 第二恒定结构域,其包含与SEQ ID NO:64具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,如果所述氨基酸序列与SEQ ID NO:64具有小于100%的同一性,则所述序列保留在所述铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236(EU编号)处的P-V-A-缺失)、所述二硫键结构突变S354C(或者替代性地结构突变S354C被二硫键结构突变E356C取代)、以及所述白突变T366S、L368A和Y407V。

[0750] 157.实施方案156的方法,其中所述第一恒定结构域与SEQ ID NO:61具有至少95%(或100%)的序列同一性,并且所述第二恒定结构域与SEQ ID NO:64具有至少95%(或100%)的序列同一性。

[0751] 158.实施方案126至139中任一项的方法,其中所述恒定结构域包含:

[0752] (a) 第一恒定结构域,其包含与SEQ ID NO:61具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,如果所述氨基

酸序列与SEQ ID NO:61具有小于100%的同一性,则所述序列保留在所述铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236(EU编号)处的P-V-A-缺失)、所述二硫键结构突变S354C(或者替代性地结构突变S354C被二硫键结构突变E356C取代)、所述杆突变T366W、以及所述star突变H435R和Y436F;和

[0753] (b) 第二恒定结构域,其包含与SEQ ID NO:65具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,如果所述氨基酸序列与SEQ ID NO:65具有小于100%的同一性,则所述序列保留在所述铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236(EU编号)处的P-V-A-缺失)、二硫键结构突变S354C(或者替代性地结构突变S354C被二硫键结构突变E356C取代)、所述臼突变T366S、L368A和Y407V以及所述star突变H435R和Y436F。

[0754] 159. 实施方案158的方法,其中所述第一恒定结构域与SEQ ID NO:61具有至少95%(或100%)的序列同一性,并且所述第二恒定结构域与SEQ ID NO:65具有至少95%(或100%)的序列同一性。

[0755] 160. 实施方案126至139中任一项的方法,其中所述恒定结构域各自包含与SEQ ID NO:49(hIgG1 N180G,也称为hIgG1 N297G)具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%或至少98%序列同一性的氨基酸序列,其中:

[0756] (a) 两个恒定结构域都包含N180G/N297G氨基酸取代;

[0757] (b) 一个恒定结构域包含杆突变T366W并且另一个恒定结构域包含臼突变T366S、L368A和Y407V;

[0758] (c) 任选地,一个或两个恒定结构域包含star突变H435R和Y436F;和

[0759] (d) 两个恒定结构域都包含或都不包含二硫键结构突变S354C或E356C。

[0760] 161. 实施方案160的方法,其中每个恒定结构域与SEQ ID NO:49具有至少95%的序列同一性。

[0761] 162. 实施方案126至139中任一项的方法,其中所述恒定结构域各自包含与SEQ ID NO:53(hIgG4 S108P,也称为hIgG4 S228P)具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%或至少98%序列同一性的氨基酸序列,其中:

[0762] (a) 两个恒定结构域都包含S108P/S228P氨基酸取代;

[0763] (b) 一个恒定结构域包含杆突变T366W并且另一个恒定结构域包含臼突变T366S、L368A和Y407V;

[0764] (c) 任选地,一个或两个恒定结构域包含star突变H435R和Y436F;和

[0765] (d) 两个恒定结构域都包含或都不包含二硫键结构突变S354C或E356C。

[0766] 163. 实施方案162的方法,其中每个恒定结构域与SEQ ID NO:49具有至少95%的序列同一性。

[0767] 164. 实施方案126至139中任一项的方法,其中所述恒定结构域各自包含与SEQ ID NO:54(具有S108P(也称为hIgG4 S228P)取代的变体IgG4以及IgG1 CH2和CH3结构域)具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%或至少98%序列同一性的氨基酸序列,其中:

[0768] (a) 两个恒定结构域都包含S108P/S228P氨基酸取代;

[0769] (b) 一个恒定结构域包含杆突变T366W并且另一个恒定结构域包含臼突变T366S、

L368A和Y407V;

[0770] (c) 任选地,一个或两个恒定结构域包含star突变H435R和Y436F;和

[0771] (d) 两个恒定结构域都包含或都不包含二硫键结构突变S354C或E356C。

[0772] 165.实施方案164的方法,其中每个恒定结构域与SEQ ID NO:49具有至少95%的序列同一性。

[0773] 166.实施方案71至165中任一项的方法,其中所述方法有效减轻所述受试者的体重。

[0774] 167.实施方案71至166的方法,其中所述方法有效降低所述受试者中的循环高密度脂蛋白胆固醇。

[0775] 168.实施方案71至167的方法,其中所述方法有效增加所述受试者中的循环低密度脂蛋白胆固醇。

[0776] 169.实施方案71至168的方法,其中所述方法有效降低所述受试者中的血甘油三酯。

[0777] 170.实施方案71至169的方法,其中所述方法有效降低所述受试者中的血糖。

[0778] 171.实施方案71至170的方法,其中所述受试者患有代谢病症。

[0779] 172.实施方案171的方法,其中所述代谢病症是代谢综合征。

[0780] 173.实施方案171的方法,其中所述代谢病症是肥胖症。

[0781] 174.实施方案171的方法,其中所述代谢病症是脂肪肝。

[0782] 175.实施方案171的方法,其中所述代谢病症是高胰岛素血症。

[0783] 176.实施方案171的方法,其中所述代谢病症是2型糖尿病。

[0784] 177.实施方案171的方法,其中所述代谢病症是非酒精性脂肪性肝炎(“NASH”)。

[0785] 178.实施方案171的方法,其中所述代谢病症是非酒精性脂肪肝病(“NAFLD”)。

[0786] 179.实施方案171的方法,其中所述代谢病症是高胆固醇血症。

[0787] 180.实施方案171的方法,其中所述代谢病症是高血糖症。

[0788] 181.多特异性结合分子(MBM),其包含:

[0789] (a) 特异性结合人成纤维细胞生长因子受体1c同种型(“FGFR1c”)的抗原结合模块1(ABM1);

[0790] (b) 特异性结合人klotho β (“KLB”)的GH1结构域的抗原结合模块2(ABM2);和

[0791] (c) 特异性结合人KLB的GH2结构域的抗原结合模块3(ABM3)。

[0792] 182.实施方案181的MBM,其中每个抗原结合模块能够在每个其他抗原结合模块结合其各自的靶标的同时结合其各自的靶标。

[0793] 183.实施方案181或实施方案182的MBM,其中ABM1结合FGFR1c的环D3。

[0794] 184.实施方案181或实施方案182的MBM,其中ABM1结合FGFR1c的环D2。

[0795] 185.实施方案181至184中任一项的MBM,其是三特异性结合分子(“TBM”)。

[0796] 186.实施方案181至185中任一项的MBM,其中ABM1是抗体片段、scFv、dsFv、Fv、Fab、scFab、(Fab')₂、单结构域抗体(SDAB)、VH或VL结构域、或骆驼科VHH结构域。

[0797] 187.实施方案181至186中任一项的MBM,其中ABM2是抗体片段、scFv、dsFv、Fv、Fab、scFab、(Fab')₂、单结构域抗体(SDAB)、VH或VL结构域、或骆驼科VHH结构域。

[0798] 188.实施方案181至187中任一项的MBM,其中ABM3是抗体片段、scFv、dsFv、Fv、

Fab、scFab、(Fab')₂、单结构域抗体(SDAB)、VH或VL结构域、或骆驼科VHH结构域。

[0799] 189. 实施方案181至188中任一项的MBM, 其中ABM1是scFv。

[0800] 190. 实施方式181至188中任一项的MBM, 其中ABM1是Fab。

[0801] 191. 实施方案190的MBM, 其中ABM1的轻链是通用轻链。

[0802] 192. 实施方案190的MBM, 其中ABM1的轻链恒定区和第一重链恒定区(CH1)处于Crossmab排列中。

[0803] 193. 实施方案181至192中任一项的MBM, 其中ABM2是scFv。

[0804] 194. 实施方式181至190中任一项的MBM, 其中ABM2是Fab。

[0805] 195. 实施方案194的MBM, 其中ABM2的轻链是通用轻链。

[0806] 196. 实施方案194的MBM, 其中ABM2的轻链恒定区和第一重链恒定区(CH1)处于Crossmab排列中。

[0807] 197. 实施方案181至196中任一项的MBM, 其中ABM3是scFv。

[0808] 198. 实施方案181至196中任一项的MBM, 其中ABM3是Fab。

[0809] 199. 实施方案198的MBM, 其中ABM3的轻链是通用轻链。

[0810] 200. 实施方案198的MBM, 其中ABM3的轻链恒定区和第一重链恒定区(CH1)处于Crossmab排列中。

[0811] 201. 实施方案181至200中任一项的MBM, 其包含Fc异二聚体。

[0812] 202. 实施方案201的MBM, 其中与野生型Fc结构域相比, 所述Fc异二聚体中的所述Fc结构域包含杵臼突变。

[0813] 203. 实施方案201的MBM, 其中与野生型Fc结构域相比, 所述Fc异二聚体中的所述Fc结构域包含star突变。

[0814] 204. 实施方案201至203中任一项的MBM, 其包含:

[0815] (a) 第一多肽链, 其在N至C末端方向上包含(i) scFv, 其可操作地连接至(ii) 第一Fab的第一重链区, 所述第一Fab的第一重链区可操作地连接至(iii) Fc结构域;

[0816] (b) 第二多肽链, 其在N至C末端方向上包含(i) 第二Fab的第二重链区, 所述第二Fab的第二重链区可操作地连接至(ii) Fc结构域;

[0817] (c) 第三多肽链, 其包含与所述第一重链区配对以形成所述第一Fab的第一轻链;

[0818] (d) 第四多肽链, 其包含与所述第二重链区配对以形成所述第二Fab的第二轻链。

[0819] 205. 实施方案204的MBM, 其中所述第一轻链和所述第二轻链是相同的。

[0820] 206. 实施方案204或实施方案205的MBM, 其中ABM1是所述第一Fab。

[0821] 207. 实施方案206的MBM, 其中ABM2是所述scFv并且ABM3是所述第二Fab。

[0822] 208. 实施方案206的MBM, 其中ABM2是所述第二Fab并且ABM3是所述scFv。

[0823] 209. 实施方案204至208中任一项的MBM, 其中所述scFv经由接头连接至所述第一重链区。

[0824] 210. 实施方案209的MBM, 其中所述接头是:

[0825] (a) 长度为至少5个氨基酸、至少6个氨基酸或至少7个氨基酸; 以及任选地

[0826] (b) 长度最多至30个氨基酸、最多至40个氨基酸、最多至50个氨基酸或最多至60个氨基酸。

[0827] 211. 实施方案210的MBM, 其中所述接头是:

- [0828] (a) 长度为5个氨基酸至50个氨基酸；
- [0829] (b) 长度为5个氨基酸至45个氨基酸；
- [0830] (c) 长度为5个氨基酸至40个氨基酸；
- [0831] (d) 长度为5个氨基酸至35个氨基酸；
- [0832] (e) 长度为5个氨基酸至30个氨基酸；
- [0833] (f) 长度为5个氨基酸至25个氨基酸；或者
- [0834] (g) 长度为5个氨基酸至20个氨基酸。
- [0835] 212. 实施方案210的MBM, 其中所述接头是：
- [0836] (a) 长度为6个氨基酸至50个氨基酸；
- [0837] (b) 长度为6个氨基酸至45个氨基酸；
- [0838] (c) 长度为6个氨基酸至40个氨基酸；
- [0839] (d) 长度为6个氨基酸至35个氨基酸；
- [0840] (e) 长度为6个氨基酸至30个氨基酸；
- [0841] (f) 长度为6个氨基酸至25个氨基酸；或者
- [0842] (g) 长度为6个氨基酸至20个氨基酸。
- [0843] 213. 实施方案210的MBM, 其中所述接头是：
- [0844] (a) 长度为7个氨基酸至40个氨基酸；
- [0845] (b) 长度为7个氨基酸至35个氨基酸；
- [0846] (c) 长度为7个氨基酸至30个氨基酸；
- [0847] (d) 长度为7个氨基酸至25个氨基酸；
- [0848] (e) 长度为7个氨基酸至20个氨基酸。
- [0849] 214. 实施方案210的MBM, 其中所述接头的长度为5个氨基酸至45个氨基酸。
- [0850] 215. 实施方案210的MBM, 其中所述接头的长度为7个氨基酸至30个氨基酸。
- [0851] 216. 实施方案210的MBM, 其中所述接头的长度为5个氨基酸至25个氨基酸。
- [0852] 217. 实施方案210的MBM, 其中所述接头的长度为10个氨基酸至60个氨基酸。
- [0853] 218. 实施方案217的MBM, 其中所述接头的长度为20个氨基酸至50个氨基酸。
- [0854] 219. 实施方案218的MBM, 其中所述接头的长度为25个氨基酸至35个氨基酸。
- [0855] 220. 实施方案209至219中任一项的MBM, 其中所述接头是或包含 G_nS (SEQ ID NO: 15) 或 SG_n (SEQ ID NO: 16) 的多聚体, 其中n是1至7的整数。
- [0856] 221. 实施方案220的MBM, 其中所述接头是或包含 G_4S (SEQ ID NO: 17) 的多聚体。
- [0857] 222. 实施方案204至219中任一项的MBM, 其中所述接头是或包含两个连续的甘氨酸 (2Gly)、三个连续的甘氨酸 (3Gly)、四个连续的甘氨酸 (4Gly (SEQ ID NO: 18))、五个连续的甘氨酸 (5Gly (SEQ ID NO: 19))、六个连续的甘氨酸 (6Gly (SEQ ID NO: 20))、七个连续的甘氨酸 (7Gly (SEQ ID NO: 21))、八个连续的甘氨酸 (8Gly (SEQ ID NO: 22)) 或九个连续的甘氨酸 (9Gly (SEQ ID NO: 23))。
- [0858] 223. 实施方案201至203中任一项的MBM, 其包含：
- [0859] (a) 第一多肽链, 其在N至C末端方向上包含 (i) 第一Fab的第一重链区, 所述第一Fab的第一重链区可操作地连接至 (ii) 第二Fab的第二重链区, 所述第二Fab的第二重链区可操作地连接至 (iii) Fc结构域, 任选地其中任选地所述第一重链区经由接头连接至所述

第二重链区,任选地其中所述接头如实施方案32至44中任一项所定义;

[0860] (b) 第二多肽链,其在N至C末端方向上包含(i) 第三Fab的第三重链区,所述第三Fab的第三重链区可操作地连接至(ii)Fc结构域;

[0861] (c) 第三多肽链,其包含与所述第一重链区配对以形成所述第一Fab的第一轻链;

[0862] (d) 第四多肽链,其包含与所述第二重链区配对以形成所述第二Fab的第二轻链;
和

[0863] (e) 第五多肽链,其包含与所述第三重链区配对以形成所述第三Fab的第三轻链。

[0864] 224. 实施方案223的MBM,其中所述第一、第二和第三Fab是仅有的抗原结合模块。

[0865] 225. 实施方案223至224中任一项的MBM,其中所述第一轻链和所述第二轻链是相同的。

[0866] 226. 实施方案223至225中任一项的MBM,其中ABM1是所述第二Fab。

[0867] 227. 实施方案226的MBM,其中ABM2是所述第一Fab并且ABM3是所述第三Fab。

[0868] 228. 实施方案226的MBM,其中ABM3是所述第一Fab并且ABM2是所述第三Fab。

[0869] 229. 实施方案181至228中任一项的MBM,其中ABM1包含表1B中列出的CDR序列。

[0870] 230. 实施方案181至229中任一项的MBM,其中ABM2包含表2B中列出的CDR序列。

[0871] 231. 实施方案181至230中任一项的MBM,其中ABM3包含表3B中列出的CDR序列。

[0872] 232. 实施方案181至231中任一项的MBM,其是三价MBM。

[0873] 233. 实施方案181至231中任一项的MBM,其是四价MBM。

[0874] 234. 多特异性结合分子(MBM),其包含:

[0875] (a) 用于特异性结合人成纤维细胞生长因子受体1c同种型("FGFR1c")的第一抗原结合工具;

[0876] (b) 用于特异性结合人klotho β ("KLB")的GH1结构域的第二抗原结合工具;和

[0877] (c) 用于特异性结合人KLB的GH2结构域的第三抗原结合工具。

[0878] 235. 实施方案234的MBM,其中每个抗原结合工具能够在每个其他抗原结合工具结合其各自的靶标的同时结合其各自的靶标。

[0879] 236. 实施方案234或实施方案235的MBM,其中所述第一抗原结合工具结合FGFR1c的环D3。

[0880] 237. 实施方案234或实施方案235的MBM,其中所述第一抗原结合工具结合FGFR1c的环D2。

[0881] 238. 实施方案234至237中任一项的MBM,其是三特异性结合分子("TBM")。

[0882] 239. 实施方案234至238中任一项的MBM,其中所述第一抗原结合工具是抗体片段、scFv、dsFv、Fv、Fab、scFab、(Fab')₂、单结构域抗体(SDAB)、VH或VL结构域、或骆驼科VHH结构域。

[0883] 240. 实施方案234至239中任一项的MBM,其中所述第二抗原结合工具是抗体片段、scFv、dsFv、Fv、Fab、scFab、(Fab')₂、单结构域抗体(SDAB)、VH或VL结构域、或骆驼科VHH结构域。

[0884] 241. 实施方案234至240中任一项的MBM,其中所述第三抗原结合工具是抗体片段、scFv、dsFv、Fv、Fab、scFab、(Fab')₂、单结构域抗体(SDAB)、VH或VL结构域、或骆驼科VHH结构域。

- [0885] 242. 实施方案234至241中任一项的MBM,其中所述第一抗原结合工具是scFv。
- [0886] 243. 实施方案234至241中任一项的MBM,其中所述第一抗原结合工具是Fab。
- [0887] 244. 实施方案243的MBM,其中所述第一抗原结合工具的轻链是通用轻链。
- [0888] 245. 实施方案243的MBM,其中所述第一抗原结合工具的轻链恒定区和第一重链恒定区(CH1)处于Crossmab排列中。
- [0889] 246. 实施方案234至245中任一项的MBM,其中所述第二抗原结合工具是scFv。
- [0890] 247. 实施方案234至243中任一项的MBM,其中所述第二抗原结合手段是Fab。
- [0891] 248. 实施方案247的MBM,其中所述第二抗原结合工具的轻链是通用轻链。
- [0892] 249. 实施方案247的MBM,其中所述第二抗原结合工具的轻链恒定区和第一重链恒定区(CH1)处于Crossmab排列中。
- [0893] 250. 实施方案234至249中任一项的MBM,其中所述第三抗原结合工具是scFv。
- [0894] 251. 实施方案234至249中任一项的MBM,其中所述第三抗原结合工具是Fab。
- [0895] 252. 实施方案251的MBM,其中所述第三抗原结合工具的轻链是通用轻链。
- [0896] 253. 实施方案251的MBM,其中所述第三抗原结合工具的轻链恒定区和第一重链恒定区(CH1)处于Crossmab排列中。
- [0897] 254. 实施方案234至253中任一项的MBM,其包含Fc异二聚体。
- [0898] 255. 实施方案254的MBM,其中与野生型Fc结构域相比,所述Fc异二聚体中的所述Fc结构域包含杵臼突变。
- [0899] 256. 实施方案254的MBM,其中与野生型Fc结构域相比,所述Fc异二聚体中的所述Fc结构域包含star突变。
- [0900] 257. 实施方案254至256中任一项的MBM,其包含:
- [0901] (a) 第一多肽链,其在N至C末端方向上包含(i) scFv,其可操作地连接至(ii) 第一Fab的第一重链区,所述第一Fab的第一重链区可操作地连接至(iii) Fc结构域;
- [0902] (b) 第二多肽链,其在N至C末端方向上包含(i) 第二Fab的第二重链区,所述第二Fab的第二重链区可操作地连接至(ii) Fc结构域;
- [0903] (c) 第三多肽链,其包含与所述第一重链区配对以形成所述第一Fab的第一轻链;
- [0904] (d) 第四多肽链,其包含与所述第二重链区配对以形成所述第二Fab的第二轻链。
- [0905] 258. 实施方案257的MBM,其中所述第一轻链和所述第二轻链是相同的。
- [0906] 259. 实施方案257或实施方案258的MBM,其中所述第一抗原结合工具是所述第一Fab。
- [0907] 260. 实施方案259的MBM,其中所述第二抗原结合工具是所述scFv并且所述第三抗原结合工具是所述第二Fab。
- [0908] 261. 实施方案259的MBM,其中所述第二抗原结合工具是所述第二Fab并且所述第三抗原结合工具是所述scFv。
- [0909] 262. 实施方案257至261中任一项的MBM,其中所述scFv经由接头连接至所述第一重链区。
- [0910] 263. 实施方案262的MBM,其中所述接头是:
- [0911] (a) 长度为至少5个氨基酸、至少6个氨基酸或至少7个氨基酸;以及任选地
- [0912] (b) 长度最多至30个氨基酸、最多至40个氨基酸、最多至50个氨基酸或最多至60个

氨基酸。

[0913] 264. 实施方案263的MBM, 其中所述接头是:

[0914] (a) 长度为5个氨基酸至50个氨基酸;

[0915] (b) 长度为5个氨基酸至45个氨基酸;

[0916] (c) 长度为5个氨基酸至40个氨基酸;

[0917] (d) 长度为5个氨基酸至35个氨基酸;

[0918] (e) 长度为5个氨基酸至30个氨基酸;

[0919] (f) 长度为5个氨基酸至25个氨基酸; 或者

[0920] (g) 长度为5个氨基酸至20个氨基酸。

[0921] 265. 实施方案263的MBM, 其中所述接头是:

[0922] (a) 长度为6个氨基酸至50个氨基酸;

[0923] (b) 长度为6个氨基酸至45个氨基酸;

[0924] (c) 长度为6个氨基酸至40个氨基酸;

[0925] (d) 长度为6个氨基酸至35个氨基酸;

[0926] (e) 长度为6个氨基酸至30个氨基酸;

[0927] (f) 长度为6个氨基酸至25个氨基酸; 或者

[0928] (g) 长度为6个氨基酸至20个氨基酸。

[0929] 266. 实施方案263的MBM, 其中所述接头是:

[0930] (a) 长度为7个氨基酸至40个氨基酸;

[0931] (b) 长度为7个氨基酸至35个氨基酸;

[0932] (c) 长度为7个氨基酸至30个氨基酸;

[0933] (d) 长度为7个氨基酸至25个氨基酸;

[0934] (e) 长度为7个氨基酸至20个氨基酸。

[0935] 267. 实施方案263的MBM, 其中所述接头的长度为5个氨基酸至45个氨基酸。

[0936] 268. 实施方案263的MBM, 其中所述接头的长度是7个氨基酸至30个氨基酸。

[0937] 269. 实施方案263的MBM, 其中所述接头的长度为5个氨基酸至25个氨基酸。

[0938] 270. 实施方案263的MBM, 其中所述接头的长度为10个氨基酸至60个氨基酸。

[0939] 271. 实施方案270的MBM, 其中所述接头的长度为20个氨基酸至50个氨基酸。

[0940] 272. 实施方案271的MBM, 其中所述接头的长度为25个氨基酸至35个氨基酸。

[0941] 273. 实施方案257至272中任一项的MBM, 其中所述接头是或包含 G_nS (SEQ ID NO: 15) 或 SG_n (SEQ ID NO: 16) 的多聚体, 其中n是1至7的整数。

[0942] 274. 实施方案273的MBM, 其中所述接头是或包含 G_4S (SEQ ID NO: 17) 的多聚体。

[0943] 275. 实施方案257至272中任一项的MBM, 其中所述接头是或包含两个连续的甘氨酸 (2Gly)、三个连续的甘氨酸 (3Gly)、四个连续的甘氨酸 (4Gly (SEQ ID NO: 18))、五个连续的甘氨酸 (5Gly (SEQ ID NO: 19))、六个连续的甘氨酸 (6Gly (SEQ ID NO: 20))、七个连续的甘氨酸 (7Gly (SEQ ID NO: 21))、八个连续的甘氨酸 (8Gly (SEQ ID NO: 22)) 或九个连续的甘氨酸 (9Gly (SEQ ID NO: 23))。

[0944] 276. 实施方案254至256中任一项的MBM, 其包含:

[0945] (a) 第一多肽链, 其在N至C末端方向上包含 (i) 第一Fab的第一重链区, 所述第一

Fab的第一重链区可操作地连接至(ii)第二Fab的第二重链区,所述第二Fab的第二重链区可操作地连接至(iii)Fc结构域,任选地其中任选地所述第一重链区经由接头连接至所述第二重链区,任选地其中所述接头如实施方案32至44中任一项所定义;

[0946] (b) 第二多肽链,其在N至C末端方向上包含(i)第三Fab的第三重链区,所述第三Fab的第三重链区可操作地连接至(ii)Fc结构域;

[0947] (c) 第三多肽链,其包含与所述第一重链区配对以形成所述第一Fab的第一轻链;

[0948] (d) 第四多肽链,其包含与所述第二重链区配对以形成所述第二Fab的第二轻链;
和

[0949] (e) 第五多肽链,其包含与所述第三重链区配对以形成所述第三Fab的第三轻链。

[0950] 277.实施方案276的MBM,其中所述第一、第二和第三Fab是仅有的抗原结合模块。

[0951] 278.实施方案276至277中任一项的MBM,其中所述第一轻链和所述第二轻链是相同的。

[0952] 279.实施方案276至278中任一项的MBM,其中所述第一抗原结合工具是所述第二Fab。

[0953] 280.实施方案279的MBM,其中所述第二抗原结合工具是所述第一Fab并且所述第三抗原结合工具是所述第三Fab。

[0954] 281.实施方案279的MBM,其中所述第三抗原结合工具是所述第一Fab并且所述第二抗原结合工具是所述第三Fab。

[0955] 282.实施方案234至281中任一项的MBM,其中所述第一抗原结合工具包含表1B中列出的CDR序列。

[0956] 283.实施方案234至282中任一项的MBM,其中所述第二抗原结合工具包含表2B中列出的CDR序列。

[0957] 284.实施方案234至283中任一项的MBM,其中所述第三抗原结合工具包含表3B中列出的CDR序列。

[0958] 285.实施方案234至284中任一项的MBM,其是三价MBM。

[0959] 286.实施方案234至284中任一项的MBM,其是四价MBM。

[0960] 287.实施方案181至286中任一项的MBM,其包含恒定结构域的异二聚体对。

[0961] 288.实施方案287的MBM,其中每个恒定结构域包含在S228、E233、L234、L235、D265、N297、P329或P331(全部根据EU编号)处的一个或多个取代。

[0962] 289.实施方案288的MBM,其中所述恒定结构域包含S228P取代。

[0963] 290.实施方案288的MBM,其中所述恒定结构域包含E233A或E233P取代。

[0964] 291.实施方案288的MBM,其中所述恒定结构域包含L234A取代。

[0965] 292.实施方案288的MBM,其中所述恒定结构域包含L235A。

[0966] 293.实施方案288的MBM,其中所述恒定结构域包含D265A取代。

[0967] 294.实施方案288的MBM,其中所述恒定结构域包含N297A或N297D取代。

[0968] 295.实施方案288的MBM,其中所述恒定结构域包含P329G或P329A取代。

[0969] 296.实施方案288的MBM,其中所述恒定结构域包含P331S。

[0970] 297.实施方案287至296中任一项的MBM,其包含第6.2.7.1节中阐述的取代的任意组合。

[0971] 298. 实施方案287至297中任一项的MBM, 其中每个恒定结构域包含具有降低的效应功能的铰链序列。

[0972] 299. 实施方案298的MBM, 其中所述铰链序列包含或组成为SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:70和SEQ ID NO:71中任一项的氨基酸序列。

[0973] 300. 实施方案298的MBM, 其中所述铰链序列包括第6.2.6.2节中阐述的任何铰链修饰。

[0974] 301. 实施方案287至300中任一项的MBM, 其中每个恒定结构域包含与SEQ ID NO:46具有至少90%序列同一性的氨基酸序列, 其中:

[0975] (a) 两个恒定结构域都包含在氨基酸位置233-236(EU编号)处的P-V-A-缺失序列;

[0976] (b) 一个恒定结构域包含杆突变T366W并且另一个恒定结构域包含臼突变T366S、L368A和Y407V;

[0977] (c) 任选地, 一个或两个恒定结构域包含star突变H435R和Y436F; 和

[0978] (d) 两个恒定结构域都包含或都不包含二硫键结构突变S354C或E356C。

[0979] 302. 实施方案301的MBM, 其中每个恒定结构域包含与SEQ ID NO:46具有至少93%序列同一性的氨基酸序列。

[0980] 303. 实施方案301的MBM, 其中每个恒定结构域包含与SEQ ID NO:46具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

[0981] 304. 实施方案301的MBM, 其中每个恒定结构域包含与SEQ ID NO:46具有至少97%序列同一性的氨基酸序列。

[0982] 305. 实施方案287至300中任一项的MBM, 其中所述恒定结构域包含:

[0983] (a) 第一恒定结构域, 其包含与SEQ ID NO:58具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列, 如果所述氨基酸序列与SEQ ID NO:58具有小于100%的同一性, 则所述序列保留在所述铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236(EU编号)处的P-V-A-缺失)以及所述杆突变T366W; 和

[0984] (b) 第二恒定结构域, 其包含与SEQ ID NO:62具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列, 如果所述氨基酸序列与SEQ ID NO:62具有小于100%的同一性, 则所述序列保留在所述铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236(EU编号)处的P-V-A-缺失)以及所述臼突变T366S、L368A和Y407V。

[0985] 306. 实施方案305的MBM, 其中所述第一恒定结构域与SEQ ID NO:58具有至少95%(或100%)的序列同一性, 并且所述第二恒定结构域与SEQ ID NO:62具有至少95%(或100%)的序列同一性。

[0986] 307. 实施方案287至300中任一项的MBM, 其中所述恒定结构域包含:

[0987] (a) 第一恒定结构域, 其包含与SEQ ID NO:58具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列, 如果所述氨基酸序列与SEQ ID NO:58具有小于100%的同一性, 则所述序列保留在所述铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236(EU编号)处的P-V-A-缺失)以及所述杆突变T366W; 和

[0988] (b) 第二恒定结构域, 其包含与SEQ ID NO:63具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列, 如果所述氨基酸序列与SEQ ID NO:63具有小于100%的同一性, 则所述序列保留在所述铰链中的PVA修饰

(氨基酸位置233-236 (EU编号) 处的P-V-A-缺失)、所述杆突变T366S、L368A和Y407V以及所述star突变H435R和Y436F。

[0989] 308. 实施方案307的MBM, 其中所述第一恒定结构域与SEQ ID NO:58具有至少95% (或100%) 的序列同一性, 并且所述第二恒定结构域与SEQ ID NO:63具有至少95% (或100%) 的序列同一性。

[0990] 309. 实施方案287至300中任一项的MBM, 其中所述恒定结构域包含:

[0991] (a) 第一恒定结构域, 其包含与SEQ ID NO:59具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列, 如果所述氨基酸序列与SEQ ID NO:59具有小于100%的同一性, 则所述序列保留在所述铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236 (EU编号) 处的P-V-A-缺失)、所述杆突变T366W以及所述star突变H435R和Y436F; 和

[0992] (b) 第二恒定结构域, 其包含与SEQ ID NO:62具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列, 如果所述氨基酸序列与SEQ ID NO:62具有小于100%的同一性, 则所述序列保留在所述铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236 (EU编号) 处的P-V-A-缺失) 以及所述杆突变T366S、L368A和Y407V。

[0993] 310. 实施方案309的MBM, 其中所述第一恒定结构域与SEQ ID NO:59具有至少95% (或100%) 的序列同一性, 并且所述第二恒定结构域与SEQ ID NO:62具有至少95% (或100%) 的序列同一性。

[0994] 311. 实施方案287至300中任一项的MBM, 其中所述恒定结构域包含:

[0995] (a) 第一恒定结构域, 其包含与SEQ ID NO:59具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列, 如果所述氨基酸序列与SEQ ID NO:59具有小于100%的同一性, 则所述序列保留在所述铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236 (EU编号) 处的P-V-A-缺失)、所述杆突变T366W以及所述star突变H435R和Y436F; 和

[0996] (b) 第二恒定结构域, 其包含与SEQ ID NO:63具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列, 如果所述氨基酸序列与SEQ ID NO:63具有小于100%的同一性, 则所述序列保留在所述铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236 (EU编号) 处的P-V-A-缺失)、所述杆突变T366S、L368A和Y407V以及所述star突变H435R和Y436F。

[0997] 312. 实施方案311的MBM, 其中所述第一恒定结构域与SEQ ID NO:59具有至少95% (或100%) 的序列同一性, 并且所述第二恒定结构域与SEQ ID NO:62具有至少95% (或100%) 的序列同一性。

[0998] 313. 实施方案287至300中任一项的MBM, 其中所述恒定结构域包含:

[0999] (a) 第一恒定结构域, 其包含与SEQ ID NO:60具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列, 如果所述氨基酸序列与SEQ ID NO:60具有小于100%的同一性, 则所述序列保留在所述铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236 (EU编号) 处的P-V-A-缺失)、所述二硫键结构突变S354C以及所述杆突变T366W; 和

[1000] (b) 第二恒定结构域, 其包含与SEQ ID NO:64具有至少90%、至少93%、至少95%、

至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,如果所述氨基酸序列与SEQ ID NO:64具有小于100%的同一性,则所述序列保留在所述铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236(EU编号)处的P-V-A-缺失)、所述二硫键结构突变S354C以及所述白突变T366S、L368A和Y407V。

[1001] 314.实施方案313的MBM,其中所述第一恒定结构域与SEQ ID NO:60具有至少95%(或100%)的序列同一性,并且所述第二恒定结构域与SEQ ID NO:64具有至少95%(或100%)的序列同一性。

[1002] 315.实施方案287至300中任一项的MBM,其中所述恒定结构域包含:

[1003] (a) 第一恒定结构域,其包含与SEQ ID NO:60具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,如果所述氨基酸序列与SEQ ID NO:60具有小于100%的同一性,则所述序列保留在所述铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236(EU编号)处的P-V-A-缺失)、所述二硫键结构突变S354C(或者替代性地结构突变S354C被二硫键结构突变E356C取代)以及所述杆突变T366W;和

[1004] (b) 第二恒定结构域,其包含与SEQ ID NO:65具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,如果所述氨基酸序列与SEQ ID NO:65具有小于100%的同一性,则所述序列保留在所述铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236(EU编号)处的P-V-A-缺失)、所述二硫键结构突变S354C(或者替代性地结构突变S354C被二硫键结构突变E356C取代)、所述白突变T366S、L368A和Y407V以及所述star突变H435R和Y436F。

[1005] 316.实施方案315的MBM,其中所述第一恒定结构域与SEQ ID NO:60具有至少95%(或100%)的序列同一性,并且所述第二恒定结构域与SEQ ID NO:65具有至少95%(或100%)的序列同一性。

[1006] 317.实施方案287至300中任一项的MBM,其中所述恒定结构域包含:

[1007] (a) 第一恒定结构域,其包含与SEQ ID NO:61具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,如果所述氨基酸序列与SEQ ID NO:61具有小于100%的同一性,则所述序列保留在所述铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236(EU编号)处的P-V-A-缺失)、所述二硫键结构突变S354C(或者替代性地结构突变S354C被二硫键结构突变E356C取代)、所述杆突变T366W以及所述star突变H435R和Y436F;和

[1008] (b) 第二恒定结构域,其包含与SEQ ID NO:64具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,如果所述氨基酸序列与SEQ ID NO:64具有小于100%的同一性,则所述序列保留在所述铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236(EU编号)处的P-V-A-缺失)、所述二硫键结构突变S354C(或者替代性地结构突变S354C被二硫键结构突变E356C取代)以及所述白突变T366S、L368A和Y407V。

[1009] 318.实施方案317的MBM,其中所述第一恒定结构域与SEQ ID NO:61具有至少95%(或100%)的序列同一性,并且所述第二恒定结构域与SEQ ID NO:64具有至少95%(或100%)的序列同一性。

[1010] 319.实施方案287至300中任一项的MBM,其中所述恒定结构域包含:

[1011] (a) 第一恒定结构域,其包含与SEQ ID NO:61具有至少90%、至少93%、至少95%、

至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,如果所述氨基酸序列与SEQ ID NO:61具有小于100%的同一性,则所述序列保留在所述铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236(EU编号)处的P-V-A-缺失)、所述二硫键结构突变S354C(或者替代性地结构突变S354C被二硫键结构突变E356C取代)、所述杆突变T366W、以及所述star突变H435R和Y436F;和

[1012] (b) 第二恒定结构域,其包含与SEQ ID NO:65具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,如果所述氨基酸序列与SEQ ID NO:65具有小于100%的同一性,则所述序列保留在所述铰链中的PVA修饰(氨基酸位置233-236(EU编号)处的P-V-A-缺失)、所述二硫键结构突变S354C(或者替代性地结构突变S354C被二硫键结构突变E356C取代)、所述杆突变T366S、L368A和Y407V以及所述star突变H435R和Y436F。

[1013] 320. 实施方案319的MBM,其中所述第一恒定结构域与SEQ ID NO:61具有至少95%(或100%)的序列同一性,并且所述第二恒定结构域与SEQ ID NO:65具有至少95%(或100%)的序列同一性。

[1014] 321. 实施方案287至300中任一项的MBM,其中所述恒定结构域各自包含与SEQ ID NO:49(hIgG1 N180G,也称为hIgG1 N297G)具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%或至少98%的序列同一性,其中:

[1015] (a) 两个恒定结构域都包含N180G/N297G氨基酸取代;

[1016] (b) 一个恒定结构域包含杆突变T366W并且另一个恒定结构域包含杆突变T366S、L368A和Y407V;

[1017] (c) 任选地,一个或两个恒定结构域包含star突变H435R和Y436F;和

[1018] (d) 两个恒定结构域都包含或都不包含二硫键结构突变S354C或E356C。

[1019] 322. 实施方案321的MBM,其中每个恒定结构域与SEQ ID NO:49具有至少95%的序列同一性。

[1020] 323. 实施方案287至300中任一项的MBM,其中所述恒定结构域各自包含与SEQ ID NO:53(hIgG4 S108P,也称为hIgG4 S228P)具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%或至少98%序列同一性的氨基酸序列,其中:

[1021] (a) 两个恒定结构域都包含S108P/S228P氨基酸取代;

[1022] (b) 一个恒定结构域包含杆突变T366W并且另一个恒定结构域包含杆突变T366S、L368A和Y407V;

[1023] (c) 任选地,一个或两个恒定结构域包含star突变H435R和Y436F;和

[1024] (d) 两个恒定结构域都包含或都不包含二硫键结构突变S354C或E356C。

[1025] 324. 实施方案323的MBM,其中每个恒定结构域与SEQ ID NO:49具有至少95%的序列同一性。

[1026] 325. 实施方案287至300中任一项的MBM,其中所述恒定结构域各自包含与SEQ ID NO:54(具有S108P(也称为hIgG4 S228P)取代的变体IgG4以及IgG1 CH2和CH3结构域)具有至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%或至少98%序列同一性的氨基酸序列,其中:

[1027] (a) 两个恒定结构域都包含S108P/S228P氨基酸取代;

- [1028] (b) 一个恒定结构域包含杆突变T366W并且另一个恒定结构域包含白突变T366S、L368A和Y407V;
- [1029] (c) 任选地,一个或两个恒定结构域包含star突变H435R和Y436F;和
- [1030] (d) 两个恒定结构域都包含或都不包含二硫键结构突变S354C或E356C。
- [1031] 326. 实施方案325的MBM,其中每个恒定结构域与SEQ ID NO:49具有至少95%的序列同一性。
- [1032] 327. 药物组合物,其包含实施方案181至326中任一项的MBM。
- [1033] 328. 方法,其包括向受试者施用实施方案181至326中任一项的MBM、或实施方案327的药物组合物。
- [1034] 329. 实施方案328的方法,其中以有效量向所述受试者施用所述MBM以:
- [1035] (a) 治疗代谢病况;和/或
- [1036] (b) 改善代谢。
- [1037] 330. 实施方案328或实施方案329的方法,其中所述方法有效激动所述受试者中的FGF21受体复合物。
- [1038] 331. 实施方案328至330的方法,其中所述受试者患有具有代谢病症。
- [1039] 332. 实施方案331的方法,其中所述代谢病症是代谢综合征。
- [1040] 333. 实施方案331的方法,其中所述代谢病症是肥胖症。
- [1041] 334. 实施方案331的方法,其中所述代谢病症是脂肪肝。
- [1042] 335. 实施方案331的方法,其中所述代谢病症是高胰岛素血症。
- [1043] 336. 实施方案331的方法,其中所述代谢病症是2型糖尿病。337. 实施方案331的方法,其中所述代谢病症是非酒精性脂肪性肝炎(“NASH”)。
- [1044] 338. 实施方案331的方法,其中所述代谢病症是高胆固醇血症。
- [1045] 339. 实施方案331的方法,其中所述代谢病症是高血糖症。
- [1046] 340. 减轻体重的方法,其包括向超重受试者施用有效量的实施方案181至326中任一项的MBM或实施方案327的药物组合物。
- [1047] 341. 实施方案340的方法,其中所述受试者肥胖。
- [1048] 342. 治疗非酒精性脂肪性肝炎(“NASH”)的方法,其包括向患有NASH的受试者施用有效量的实施方案181至286中任一项的MBM或实施方案327的药物组合物。
- [1049] 343. 治疗非酒精性脂肪肝病(NAFLD)的方法,其包括向患有NAFLD的受试者施用有效量的实施方案181至326中任一项的MBM或实施方案327的药物组合物。
- [1050] 344. 降低循环HDL胆固醇的方法,其包括向患有升高的HDL水平的受试者施用有效量的实施方案181至326中任一项的MBM或实施方案327的药物组合物。
- [1051] 345. 增加循环LDL胆固醇的方法,其包括向患有低LDL水平的受试者施用有效量的实施方案181至326中任一项的MBM或实施方案327的药物组合物。
- [1052] 346. 降低血甘油三酯的方法,其包括向患有升高的甘油三酯水平的受试者施用有效量的实施方案181至326中任一项的MBM或实施方案327的药物组合物。
- [1053] 347. 降低血糖的方法,其包括向患有升高的血糖水平的受试者施用有效量的实施方案181至326中任一项的MBM或实施方案327的药物组合物。
- [1054] 348. 编码实施方案181至326中任一项的MBM的核酸或多种核酸。

- [1055] 349.被工程化以表达实施方案181至326中任一项的MBM的细胞。
- [1056] 350.用一种或多种表达载体转染的细胞,所述表达载体包含在一种或多种启动子的控制下编码实施方案181至326中任一项的MBM的一种或多种核酸序列。
- [1057] 351.生产MBM的方法,其包括:
- [1058] (a) 在表达所述MBM的条件下培养实施方案349或350的细胞;和
- [1059] (b) 从所述细胞培养物中回收所述MBM。
- [1060] 352.实施方案351的方法,其进一步包含对所述MBM进行富集。
- [1061] 353.实施方案351或实施方案352的方法,其进一步包含纯化所述MBM。
- [1062] 9.参考文献的引用
- [1063] 本申请中引用的所有出版物、专利、专利申请和其他文件用于所有目的通过引用其整体并入本文,其程度如同每个单独的出版物、专利、专利申请或其他文件被单独地表明为用于所有目的通过引用并入。如果本文并入的一个或多个参考文献的教导与本公开之间存在不一致,则旨在以本说明书的教导为准。

序列表

<110> 再生元制药公司

<120> 多特异性FGF21受体激动剂及其应用

<130> RGN-004W0

<140>

<141>

<150> 63/183,976

<151> 2021-05-04

<160> 79

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 823

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

```

Met Trp Ser Trp Lys Cys Leu Leu Phe Trp Ala Val Leu Val Thr Ala
1           5           10           15
Thr Leu Cys Thr Ala Arg Pro Ser Pro Thr Leu Pro Glu Gln Ala Gln
          20           25           30
Pro Trp Gly Ala Pro Val Glu Val Glu Ser Phe Leu Val His Pro Gly
          35           40           45
Asp Leu Leu Gln Leu Arg Cys Arg Leu Arg Asp Asp Val Gln Ser Ile
          50           55           60
Asn Trp Leu Arg Asp Gly Val Gln Leu Ala Glu Ser Asn Arg Thr Arg
65           70           75           80
Ile Thr Gly Glu Glu Val Glu Val Gln Asp Ser Val Pro Ala Asp Ser
          85           90           95
Gly Leu Tyr Ala Cys Val Thr Ser Ser Pro Ser Gly Ser Asp Thr Thr
          100          105          110
Tyr Phe Ser Val Asn Val Ser Asp Ala Leu Pro Ser Ser Glu Asp Asp
          115          120          125
Asp Asp Asp Asp Asp Ser Ser Ser Glu Glu Lys Glu Thr Asp Asn Thr
          130          135          140
Lys Pro Asn Pro Val Ala Pro Tyr Trp Thr Ser Pro Glu Lys Met Glu
145          150          155          160
Lys Lys Leu His Ala Val Pro Ala Ala Lys Thr Val Lys Phe Lys Cys
          165          170          175
Pro Ser Ser Gly Thr Pro Asn Pro Thr Leu Arg Trp Leu Lys Asn Gly

```

			180				185				190						
Lys	Glu	Phe	Lys	Pro	Asp	Arg	Ile	Gly	Gly	Tyr	Lys	Val	Arg	Tyr	Ala		
			195				200				205						
Thr	Trp	Ser	Ile	Ile	Met	Asp	Ser	Val	Val	Pro	Ser	Asp	Lys	Gly	Asn		
			210				215				220						
Tyr	Thr	Cys	Ile	Val	Glu	Asn	Glu	Tyr	Gly	Ser	Ile	Asn	His	Thr	Tyr		
225							230				235				240		
Gln	Leu	Asp	Val	Val	Glu	Arg	Ser	Pro	His	Arg	Pro	Ile	Leu	Gln	Ala		
			245								250				255		
Gly	Leu	Pro	Ala	Asn	Lys	Thr	Val	Ala	Leu	Gly	Ser	Asn	Val	Glu	Phe		
			260								265				270		
Met	Cys	Lys	Val	Tyr	Ser	Asp	Pro	Gln	Pro	His	Ile	Gln	Trp	Leu	Lys		
			275								280				285		
His	Ile	Glu	Val	Asn	Gly	Ser	Lys	Ile	Gly	Pro	Asp	Asn	Leu	Pro	Tyr		
			290								295				300		
Val	Gln	Ile	Leu	Lys	Thr	Ala	Gly	Tyr	Asn	Thr	Thr	Asp	Lys	Glu	Met		
305							310				315				320		
Glu	Val	Leu	His	Leu	Arg	Asn	Val	Ser	Phe	Glu	Asp	Ala	Gly	Glu	Tyr		
			325								330				335		
Thr	Cys	Leu	Ala	Gly	Asn	Ser	Ile	Gly	Leu	Ser	His	His	Ser	Ala	Trp		
			340								345				350		
Leu	Thr	Val	Leu	Glu	Ala	Leu	Glu	Glu	Arg	Pro	Ala	Val	Ile	Val	Ile		
			355								360				365		
Thr	Ser	Pro	Leu	Tyr	Leu	Glu	Ile	Ile	Ile	Tyr	Cys	Thr	Gly	Ala	Phe		
			370								375				380		
Leu	Ile	Ser	Cys	Met	Val	Gly	Ser	Val	Ile	Val	Tyr	Lys	Met	Lys	Ser		
385							390				395				400		
Gly	Thr	Lys	Lys	Ser	Asp	Phe	His	Ser	Gln	Met	Ala	Val	Glu	Ile	Lys		
			405								410				415		
Leu	Ala	Lys	Ser	Ile	Pro	Leu	Arg	Arg	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Asp		
			420								425				430		
Ser	Ser	Ala	Ser	Met	Asn	Ser	Gly	Val	Leu	Leu	Val	Arg	Pro	Ser	Arg		
			435								440				445		
Leu	Ser	Ser	Ser	Gly	Thr	Pro	Met	Leu	Ala	Gly	Val	Ser	Glu	Tyr	Glu		
			450								455				460		
Leu	Pro	Glu	Asp	Pro	Arg	Trp	Glu	Leu	Pro	Arg	Asp	Arg	Leu	Val	Leu		
465							470				475				480		
Gly	Lys	Pro	Leu	Gly	Glu	Gly	Cys	Phe	Gly	Gln	Val	Val	Leu	Ala	Glu		
			485								490				495		

Ala Ile Gly Leu Asp Lys Asp Lys Pro Asn Arg Val Thr Lys Val Ala		
500	505	510
Val Lys Met Leu Lys Ser Asp Ala Thr Glu Lys Asp Leu Ser Asp Leu		
515	520	525
Ile Ser Glu Met Glu Met Met Lys Met Ile Gly Lys Glu Ile Lys Asn		
530	535	540
Ile Ile Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Gln Asp Gly Pro Leu Tyr Val		
545	550	555
Ile Val Glu Tyr Ala Ser Lys Gly Asn Leu Arg Glu Tyr Leu Gln Ala		
565	570	575
Arg Arg Pro Pro Gly Leu Glu Tyr Cys Tyr Asn Pro Ser His Asn Pro		
580	585	590
Glu Glu Gln Leu Ser Ser Lys Asp Leu Val Ser Cys Ala Tyr Gln Val		
595	600	605
Ala Arg Gly Met Glu Tyr Leu Ala Ser Lys Lys Cys Ile His Arg Asp		
610	615	620
Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Thr Glu Asp Asn Val Met Lys Ile		
625	630	635
Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile His His Ile Asp Tyr Tyr Lys		
645	650	655
Lys Thr Thr Asn Gly Arg Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ala		
660	665	670
Leu Phe Asp Arg Ile Tyr Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly		
675	680	685
Val Leu Leu Trp Glu Ile Phe Thr Leu Gly Gly Ser Pro Tyr Pro Gly		
690	695	700
Val Pro Val Glu Glu Leu Phe Lys Leu Leu Lys Glu Gly His Arg Met		
705	710	715
Asp Lys Pro Ser Asn Cys Thr Asn Glu Leu Tyr Met Met Met Arg Asp		
725	730	735
Cys Trp His Ala Val Pro Ser Gln Arg Pro Thr Phe Lys Gln Leu Val		
740	745	750
Glu Asp Leu Asp Arg Ile Val Ala Leu Thr Ser Asn Gln Glu Tyr Leu		
755	760	765
Asp Leu Ser Met Pro Leu Asp Gln Tyr Ser Pro Ser Phe Pro Asp Thr		
770	775	780
Arg Ser Ser Thr Cys Ser Ser Gly Glu Asp Ser Val Phe Ser His Glu		
785	790	795
Pro Leu Pro Glu Glu Pro Cys Leu Pro Arg His Pro Ala Gln Leu Ala		

	805	810	815
Asn Gly Gly Leu Lys Arg Arg			
820			
<210> 2			
<211> 1004			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 2			
Phe Ser Gly Asp Gly Arg Ala Ile Trp Ser Lys Asn Pro Asn Phe Thr			
1 5 10 15			
Pro Val Asn Glu Ser Gln Leu Phe Leu Tyr Asp Thr Phe Pro Lys Asn			
20 25 30			
Phe Phe Trp Gly Ile Gly Thr Gly Ala Leu Gln Val Glu Gly Ser Trp			
35 40 45			
Lys Lys Asp Gly Lys Gly Pro Ser Ile Trp Asp Glu Ile Phe Ile His			
50 55 60			
Thr Glu Ile Leu Lys Asn Val Ser Ser Thr Asn Gly Ser Ser Asp Ser			
65 70 75 80			
Tyr Ile Phe Leu Glu Lys Asp Leu Ser Ala Leu Asp Phe Ile Gly Val			
85 90 95			
Ser Phe Tyr Gln Phe Ser Ile Ser Trp Pro Arg Leu Phe Pro Asp Gly			
100 105 110			
Ile Val Thr Val Ala Asn Ala Lys Gly Leu Gln Tyr Tyr Ser Thr Leu			
115 120 125			
Leu Asp Ala Leu Val Leu Arg Asn Ile Glu Pro Ile Val Thr Leu Tyr			
130 135 140			
His Trp Asp Leu Pro Leu Ala Leu Gln Glu Lys Tyr Gly Gly Trp Lys			
145 150 155 160			
Asn Asp Thr Ile Ile Asp Ile Phe Asn Asp Tyr Ala Thr Tyr Cys Phe			
165 170 175			
Gln Met Phe Gly Asp Arg Val Lys Tyr Trp Ile Thr Ile Glu Ile Asn			
180 185 190			
Pro Tyr Leu Val Ala Trp His Gly Tyr Gly Thr Gly Met His Ala Pro			
195 200 205			
Gly Glu Lys Gly Asn Leu Ala Ala Val Tyr Thr Val Gly His Asn Leu			
210 215 220			
Ile Lys Ala His Ser Lys Val Trp Glu Ile Asn Tyr Asn Thr Glu Ile			
225 230 235 240			
Phe Arg Pro His Gln Lys Gly Trp Leu Ser Ile Thr Leu Gly Ser His			

	245	250	255
Trp Ile Glu Pro Asn Arg Ser Glu Asn Thr Met Asp Ile Phe Lys Cys			
	260	265	270
Gln Gln Ser Met Val Ser Val Leu Gly Trp Phe Ala Asn Pro Ile His			
	275	280	285
Gly Asp Gly Asp Tyr Pro Glu Gly Met Arg Lys Lys Leu Phe Ser Val			
	290	295	300
Leu Pro Ile Phe Ser Glu Ala Glu Lys Glu Ile Glu Met Arg Gly Thr			
305	310	315	320
Ala Asp Phe Phe Ala Phe Ser Phe Gly Pro Asn Asn Phe Lys Pro Leu			
	325	330	335
Asn Thr Met Ala Lys Met Gly Gln Asn Val Ser Leu Asn Leu Arg Glu			
	340	345	350
Ala Leu Asn Trp Ile Lys Leu Glu Tyr Asn Asn Pro Arg Ile Leu Ile			
	355	360	365
Ala Glu Asn Gly Trp Phe Thr Asp Ser Arg Val Lys Thr Glu Asp Thr			
	370	375	380
Thr Ala Ile Tyr Met Met Lys Asn Phe Leu Ser Gln Val Leu Gln Ala			
385	390	395	400
Ile Arg Leu Asp Glu Ile Arg Val Phe Gly Tyr Thr Ala Trp Ser Leu			
	405	410	415
Leu Asp Gly Phe Glu Trp Gln Asp Ala Tyr Thr Ile Arg Arg Gly Leu			
	420	425	430
Phe Tyr Val Asp Phe Asn Ser Lys Gln Lys Glu Arg Lys Pro Lys Ser			
	435	440	445
Ser Ala His Tyr Tyr Lys Gln Ile Ile Arg Glu Asn Gly Phe Ser Leu			
	450	455	460
Lys Glu Ser Thr Pro Asp Val Gln Gly Gln Phe Pro Cys Asp Phe Ser			
465	470	475	480
Trp Gly Val Thr Glu Ser Val Leu Lys Pro Glu Ser Val Ala Ser Ser			
	485	490	495
Pro Gln Phe Ser Asp Pro Glu Ile Leu Tyr Val Trp Asn Ala Thr Gly			
	500	505	510
Asn Arg Leu Leu Glu Ile Arg Val Glu Gly Val Arg Leu Lys Thr Arg			
	515	520	525
Pro Ala Gln Cys Thr Asp Phe Val Asn Ile Lys Lys Gln Leu Glu Met			
	530	535	540
Leu Ala Arg Met Lys Val Thr His Tyr Arg Phe Ala Leu Asp Trp Ala			
545	550	555	560

Ser Val Leu Pro Thr Gly Asn Leu Ser Ala Val Asn Arg Gln Ala Leu		
565	570	575
Arg Tyr Tyr Arg Cys Val Val Ser Glu Gly Leu Lys Leu Gly Ile Ser		
580	585	590
Ala Met Val Thr Leu Tyr Tyr Pro Thr His Ala Glu Ile Leu Gly Leu		
595	600	605
Pro Glu Pro Leu Leu His Ala Asp Gly Trp Leu Asn Pro Ser Thr Ala		
610	615	620
Glu Ala Phe Gln Ala Tyr Ala Gly Leu Cys Phe Gln Glu Leu Gly Asp		
625	630	635
640		
Leu Val Lys Leu Trp Ile Thr Ile Asn Glu Pro Asn Arg Leu Ser Asp		
645	650	655
Ile Tyr Asn Arg Ser Gly Asn Asp Thr Tyr Gly Ala Ala Glu Ile Asn		
660	665	670
Leu Leu Val Ala His Ala Leu Ala Trp Arg Leu Tyr Asp Arg Gln Phe		
675	680	685
Arg Pro Ser Gln Arg Gly Ala Val Ser Leu Ser Leu His Ala Asp Trp		
690	695	700
Ala Glu Pro Ala Asn Pro Tyr Ala Asp Ser His Trp Arg Ala Ala Glu		
705	710	715
720		
Arg Phe Leu Gln Phe Glu Ile Ala Trp Phe Ala Glu Pro Leu Phe Lys		
725	730	735
Thr Gly Asp Tyr Pro Ala Ala Met Arg Glu Tyr Ile Ala Ser Lys Glu		
740	745	750
Ile Arg Arg Gly Leu Ser Ser Ser Ala Leu Pro Arg Leu Thr Glu Ala		
755	760	765
Glu Arg Arg Leu Leu Lys Gly Thr Val Asp Phe Cys Ala Leu Asn Glu		
770	775	780
Ile Phe Thr Thr Arg Phe Val Met His Glu Gln Leu Ala Gly Ser Arg		
785	790	795
800		
Tyr Asp Ser Asp Arg Asp Ile Gln Phe Leu Gln Asp Ile Thr Arg Leu		
805	810	815
Ser Ser Pro Thr Arg Leu Ala Val Ile Pro Trp Gly Val Arg Lys Leu		
820	825	830
Leu Arg Trp Val Arg Arg Asn Tyr Gly Asp Met Asp Ile Tyr Ile Thr		
835	840	845
Ala Ser Gly Ile Asp Asp Gln Ala Leu Glu Asp Asp Arg Leu Arg Lys		
850	855	860
Tyr Tyr Leu Gly Lys Tyr Leu Gln Glu Val Leu Lys Ala Tyr Leu Ile		

865	870	875	880
Asp Lys Val Arg Ile Lys Gly Tyr Tyr Ala Phe Lys Leu Ala Glu Glu			
	885	890	895
Lys Ser Lys Pro Arg Phe Gly Phe Phe Thr Ser Asp Phe Lys Ala Lys			
	900	905	910
Ser Ser Ile Gln Phe Tyr Asn Lys Val Ile Ser Ser Arg Gly Phe Pro			
	915	920	925
Phe Glu Asn Ser Ser Ser Arg Cys Ser Gln Thr Gln Glu Asn Thr Glu			
	930	935	940
Cys Thr Val Cys Leu Phe Leu Val Gln Lys Lys Pro Leu Ile Phe Leu			
945	950	955	960
Gly Cys Cys Phe Phe Ser Thr Leu Val Leu Leu Leu Ser Ile Ala Ile			
	965	970	975
Phe Gln Arg Gln Lys Arg Arg Lys Phe Trp Lys Ala Lys Asn Leu Gln			
	980	985	990
His Ile Pro Leu Lys Lys Gly Lys Arg Val Val Ser			
	995	1000	
<210> 3			
<211> 115			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人工序列描述:人工多肽			
<400> 3			
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr			
	20	25	30
Tyr Met His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met			
	35	40	45
Gly Leu Val Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Glu Lys Phe			
	50	55	60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Arg Asp Asp Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr			
	100	105	110
Val Ser Ser			

115

<210> 4

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 4

Glu	Thr	Thr	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Gly	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Gly	Ser
			20					25					30		
Ala	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
		35					40					45			
Ile	Tyr	Asp	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
	50					55					60				
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Ala	Asp	Phe	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu
65				70					75					80	
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Ser	Cys	Gln	Gln	Tyr	Gly	Ser	Ser	Pro
			85						90					95	
Leu	Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Val	Lys				
			100						105						

<210> 5

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 5

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gln	Thr	Phe	Thr	Gly	Tyr
			20					25					30		
Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Arg	Ile	Pro	Ile	Leu	Gly	Ile	Ala	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	Gln
	50					55					60				
Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met
65				70						75				80	

Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Gly Gly Asp Leu Gly Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

<210> 6

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 6

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Arg His Ser
 20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95

Leu Gln Ile Pro Pro Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Lys
 100 105 110

<210> 7

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 7

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr
 20 25 30

Trp Ile Ser Trp Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Glu Ile
 35 40 45

Asp Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg

50					55					60					
Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu
65					70					75					80
Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ser	Ser	Gly	Tyr	Gly
85					90					95					
Gly	Ser	Asp	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln					
100					105										

 $\langle 400 \rangle$ 8

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5				10				15			
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser	Thr	Ala
20				25				30							
Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
35				40				45							
Tyr	Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
50				55				60							
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65				70				75				80			
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Tyr	Thr	Thr	Pro	Pro
85				90				95							
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Trp	Glu	Ile	Lys					
100				105											

 $\langle 400 \rangle$ 9

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asn	Asn
			20					25					30		

Tyr Ile His Trp Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Asp Ile
35 40 45
Tyr Pro Asn Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
50 55 60
Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Leu Gln Met Asn Ser Leu
65 70 75 80
Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Phe Asp
85 90 95
Ala Trp Val His Tyr Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105

<210> 10

<211> 102

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 10

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Ser Asn
20 25 30
Trp Ile Ser Trp Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile
35 40 45
Asp Pro Tyr Asp Gly Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
50 55 60
Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Leu Gln Met Asn Ser Leu
65 70 75 80
Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Gly Thr Asp Trp
85 90 95
Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100

<210> 11

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 11

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr			
20	25	30	
Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
35	40	45	
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val			
50	55	60	
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Arg Asp Arg Ala Ala Ala Gly Leu His Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp			
100	105	110	
Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser			
115	120		

<210> 12

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 12

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
1	5	10	15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Thr			
20	25	30	
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu			
35	40	45	
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser			
50	55	60	
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu			
65	70	75	80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Gly Ser Ser Pro			
85	90	95	
Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Glu Ile Lys			
100	105		

<210> 13

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 13

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
			20					25					30		
Asp	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			
Gly	Trp	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Gly	Ser	Thr	Lys	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe
	50					55				60					
Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Ile	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70				75					80	
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys
				85				90					95		
Ala	Arg	Ser	Asp	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Arg	Ser	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
		115				120									

<210> 14

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 14

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Arg	Ala	Ser	Lys	Ser	Val	Ser	Thr	Ser
			20					25					30		
Gly	Tyr	Val	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro
		35					40					45			
Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Ala	Ser	Tyr	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Asp
	50					55				60					
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser
65					70				75					80	
Ser	Val	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Ser	Arg
				85				90					95		

Asp Leu Thr Phe Pro Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 15

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<220>

<221> SITE

<222> (1) .. (7)

<223> 该区域可能包含 1-7 个残基

<400> 15

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<220>

<221> SITE

<222> (2) .. (8)

<223> 该区域可能包含 1-7 个残基

<400> 16

Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 17

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 18

<211> 4

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成多肽
<400> 18
Gly Gly Gly Gly
1
<210> 19
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成多肽
<400> 19
Gly Gly Gly Gly Gly
1 5
<210> 20
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成多肽
<400> 20
Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5
<210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成多肽
<400> 21
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5
<210> 22
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 22

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 23

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 24

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

1 5 10 15

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<220>

<221> SITE

<222> (1) .. (10)

<223> 该区域可能包含 1-10 个残基

<400> 25

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<220>

<221> SITE

<222> (2) .. (11)

<223> 该区域可能包含 1-10 个残基

<400> 26

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

1 5 10

<210> 27

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 27

Cys Pro Pro Cys

1

<210> 28

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 28

Cys Pro Ser Cys

1

<210> 29

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 29

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1 5 10 15

Pro Pro Val Ala

20

<210> 30

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 30

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

1

5

10

15

Ala

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 31

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Gly Gly Gly Gly Pro Ser Val Phe

1

5

10

15

<210> 32

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 32

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Gly Gly Gly Pro Ser Val Phe

1

5

10

<210> 33

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 33

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Gly Gly Pro Ser Val Phe

1

5

10

<210> 34

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 34

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Gly Pro Ser Val Phe

1 5 10

<210> 35

<211> 232

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 35

Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10 15

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

20 25 30

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

35 40 45

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe

195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220
 Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 225 230
 <210> 36
 <211> 235
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述:合成多肽
 <400> 36
 Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 1 5 10 15
 Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 20 25 30
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 35 40 45
 Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
 50 55 60
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 65 70 75 80
 Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 85 90 95
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 100 105 110
 Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 115 120 125
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 130 135 140
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 145 150 155 160
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 165 170 175
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 180 185 190
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 195 200 205
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 210 215 220

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230 235
 <210> 37
 <211> 329
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述:合成多肽
 <400> 37
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 115 120 125
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 130 135 140
 Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
 145 150 155 160
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 165 170 175
 Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 180 185 190
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 195 200 205
 Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 210 215 220
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 225 230 235 240

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 245 250 255
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 260 265 270
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 275 280 285
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 290 295 300
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 305 310 315 320
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 38

<211> 326

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 38

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140
 Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160

Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	
				165					170					175		
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	
				180					185					190		
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	
				195					200					205		
Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	
				210					215					220		
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	
				225					230					235		
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	
				245					250					255		
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	
				260					265					270		
Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	
				275					280					285		
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	
				290					295					300		
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	
				305					310					315		
Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys											
				325												

<210> 39

<211> 329

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 39

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	
1				5				10				15				
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	
				20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	
				35					40					45		
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	
				50					55					60		
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	
				65					70					75		

Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
				85					90					95	
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
			100					105					110		
Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys
			115				120					125			
Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val
			130				135					140			
Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr
145					150					155					160
Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu
				165					170					175	
Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His
			180					185					190		
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys
			195				200					205			
Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln
			210				215					220			
Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu
225					230					235					240
Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro
				245					250					255	
Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn
			260					265					270		
Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu
			275				280						285		
Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val
			290				295				300				
Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	Arg	Phe	Thr	Gln
305					310					315					320
Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys							
				325											

<210> 40

<211> 326

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 40

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
		35					40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
	50					55					60				
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr
65					70					75				80	
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85					90					95		
Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
			100					105					110		
Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
		115					120					125			
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
	130					135					140				
Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
145					150					155				160	
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn
			165					170					175		
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp
		180						185					190		
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro
	195					200					205				
Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
	210					215					220				
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
225					230					235				240	
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
			245					250					255		
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
		260					265						270		
Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg
		275					280					285			
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
	290					295				300					
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	Arg	Phe	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 44

Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
1				5					10					15	
Gly	Gly	Gly	Ser												
				20											

<210> 45

<211> 232

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 45

Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala
1				5					10					15	
Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro
				20					25					30	
Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val
				35					40					45	
Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val
				50					55					60	
Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln
65						70				75					80
Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln
						85				90					95
Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala
				100					105					110	
Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro
				115					120					125	
Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr
						130							140		
Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser
145						150								155	
Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr
						165								170	
															175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230
 <210> 46
 <211> 231
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述:合成多肽
 <400> 46
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15
 Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 20 25 30
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 35 40 45
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 50 55 60
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 65 70 75 80
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 85 90 95
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 100 105 110
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 115 120 125
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 130 135 140
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 145 150 155 160
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 165 170 175
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 180 185 190

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 195 200 205
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 210 215 220
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230
 <210> 47
 <211> 231
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述:合成多肽
 <400> 47
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15
 Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 20 25 30
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 35 40 45
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 50 55 60
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 65 70 75 80
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 85 90 95
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 100 105 110
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 115 120 125
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 130 135 140
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 145 150 155 160
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 165 170 175
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 180 185 190
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 195 200 205

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser
 210 215 220
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230
 <210> 48
 <211> 235
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述:合成多肽
 <400> 48
 Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 1 5 10 15
 Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 20 25 30
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 35 40 45
 Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
 50 55 60
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 65 70 75 80
 Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 85 90 95
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 100 105 110
 Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 115 120 125
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 130 135 140
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 145 150 155 160
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 165 170 175
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 180 185 190
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 195 200 205
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 210 215 220

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230 235
 <210> 49
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述:合成多肽
 <400> 49
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80
 Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 130 135 140
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230

<210> 50

<211> 228

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 50

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
 1 5 10 15
 Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 20 25 30
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 35 40 45
 His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 50 55 60
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
 65 70 75 80
 Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn
 85 90 95
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro
 100 105 110
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 115 120 125
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 130 135 140
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ser Val
 145 150 155 160
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 165 170 175
 Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 180 185 190
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 195 200 205
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 210 215 220
 Ser Pro Gly Lys
 225

<210> 51

<211> 228

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 51

```

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
1           5           10           15
Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
          20           25           30
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
          35           40           45
His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
          50           55           60
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
65           70           75           80
Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn
          85           90           95
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro
          100          105          110
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
          115          120          125
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
          130          135          140
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
          145          150          155          160
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
          165          170          175
Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
          180          185          190
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
          195          200          205
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
          210          215          220
Ser Pro Gly Lys
225

```

<210> 52

<211> 229

<212> PRT

<213> 人工序列

$\langle 220 \rangle$

〈223〉 人工序列描述:合成多肽

<400> 52

[illegible]

⟨210⟩ 53

<211> 229

<212> PRT

〈213〉 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

〈223〉 人工序列描述:合成多肽

<400> 53

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
 1 5 10 15
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 20 25 30
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 35 40 45
 Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 50 55 60
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
 65 70 75 80
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 85 90 95
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
 100 105 110
 Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 115 120 125
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 130 135 140
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 145 150 155 160
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 165 170 175
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
 180 185 190
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 195 200 205
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 210 215 220
 Leu Ser Leu Gly Lys
 225

<210> 54

<211> 228

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 54

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

1	5	10	15
Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu			
20	25	30	
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser			
35	40	45	
Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu			
50	55	60	
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr			
65	70	75	80
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn			
85	90	95	
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser			
100	105	110	
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln			
115	120	125	
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val			
130	135	140	
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val			
145	150	155	160
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro			
165	170	175	
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr			
180	185	190	
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val			
195	200	205	
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu			
210	215	220	
Ser Leu Gly Lys			
225			
<210> 55			
<211> 7			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人工序列描述:合成多肽			
<400> 55			
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly			
1	5		
<210> 56			

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 56

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

1 5 10 15

<210> 57

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 57

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 58

<211> 231

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 58

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1 5 10 15

Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100	105	110
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg		
115	120	125
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys		
130	135	140
Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp		
145	150	155
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys		
165	170	175
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser		
180	185	190
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser		
195	200	205
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser		
210	215	220
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
225	230	
<210> 59		
<211> 231		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列描述:合成多肽		
<400> 59		
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala		
1	5	10
Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys		
20	25	30
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val		
35	40	45
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp		
50	55	60
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr		
65	70	75
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp		
85	90	95
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu		
100	105	110
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg		

115	120	125
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu	Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys	
130	135	140
Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp		
145	150	155
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys		
165	170	175
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser		
180	185	190
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser		
195	200	205
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser		
210	215	220
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
225	230	
<210> 60		
<211> 231		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列描述:合成多肽		
<400> 60		
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala		
1	5	10
Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys		
20	25	30
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val		
35	40	45
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp		
50	55	60
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr		
65	70	75
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp		
85	90	95
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu		
100	105	110
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg		
115	120	125
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys		

130	135	140
Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp		
145	150	155
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys		
165	170	175
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser		
180	185	190
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser		
195	200	205
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser		
210	215	220
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
225	230	
<210> 61		
<211> 231		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列描述:合成多肽		
<400> 61		
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala		
1	5	10
Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys		
20	25	30
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val		
35	40	45
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp		
50	55	60
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr		
65	70	75
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp		
85	90	95
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu		
100	105	110
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg		
115	120	125
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys		
130	135	140
Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp		

145	150	155	160
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys			
	165	170	175
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser			
	180	185	190
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser			
	195	200	205
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser			
	210	215	220
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
225	230		
<210> 62			
<211> 231			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人工序列描述:合成多肽			
<400> 62			
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala			
1	5	10	15
Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys			
	20	25	30
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val			
	35	40	45
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp			
	50	55	60
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr			
65	70	75	80
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp			
	85	90	95
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu			
	100	105	110
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg			
	115	120	125
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys			
	130	135	140
Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp			
145	150	155	160
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys			

				165					170					175			
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser		
				180					185					190			
Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser		
				195					200					205			
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser		
				210					215					220			
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys											
225									230								
<210>	63																
<211>	231																
<212>	PRT																
<213>	人工序列																
<220>																	
<223>	人工序列描述:合成多肽																
<400>	63																
Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala		
1				5					10					15			
Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys		
				20					25					30			
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val		
				35					40					45			
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp		
				50					55					60			
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr		
65					70					75					80		
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp		
				85					90					95			
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu		
				100					105					110			
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg		
				115					120					125			
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys		
				130					135					140			
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp		
145					150					155					160		
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys		
				165					170					175			
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser		

				180				185				190				
Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	
				195				200				205				
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	Arg	Phe	Thr	Gln	Lys	Ser	
				210				215				220				
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys										
225				230												
<210> 64																
<211> 231																
<212> PRT																
<213> 人工序列																
<220>																
<223> 人工序列描述:合成多肽																
<400> 64																
Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	
1				5				10				15				
Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	
				20				25				30				
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	
				35				40				45				
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	
50				55				60								
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	
65					70				75				80			
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	
				85				90				95				
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	
				100				105				110				
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	
				115				120				125				
Glu	Pro	Gln	Val	Cys	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	
130				135				140								
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	
145				150				155				160				
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	
				165				170				175				
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	
				180				185				190				
Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	

195	200	205
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser		
210	215	220
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
225	230	
<210> 65		
<211> 231		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列描述:合成多肽		
<400> 65		
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala		
1	5	10
Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys		
20	25	30
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val		
35	40	45
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp		
50	55	60
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr		
65	70	75
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp		
85	90	95
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu		
100	105	110
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg		
115	120	125
Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys		
130	135	140
Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp		
145	150	155
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys		
165	170	175
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser		
180	185	190
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser		
195	200	205
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser		

210	215	220
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
225	230	
<210> 66		
<211> 22		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列描述:合成多肽		
<400> 66		
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala		
1	5	10
Pro Pro Val Ala Gly Pro		15
	20	
<210> 67		
<211> 22		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列描述:合成多肽		
<400> 67		
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala		
1	5	10
Pro Pro Val Ala Gly Pro		15
	20	
<210> 68		
<211> 23		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列描述:合成多肽		
<400> 68		
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala		
1	5	10
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro		15
	20	
<210> 69		
<211> 19		
<212> PRT		

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 69

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val

1 5 10 15

Ala Gly Pro

<210> 70

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 70

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe

1 5 10 15

Leu Gly Gly Pro

20

<210> 71

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 71

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

1 5 10 15

Ala Gly Pro

<210> 72

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 72

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe

1 5 10 15

Leu Gly Gly Pro

20

<210> 73

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 73

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20

<210> 74

<211> 37

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 74

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30
Gly Gly Ser Gly Gly
35

<210> 75

<211> 45

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 75

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
35 40 45

<210> 76

<211> 330

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 76

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5				10						15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
			35				40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
		50				55					60				
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70				75					80	
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85					90					95		
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
			100					105					110		
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
			115				120					125			
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
			130				135					140			
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145					150				155					160	
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
			165					170						175	
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
			180					185					190		
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
			195				200					205			
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
			210				215					220			
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu
225					230				235					240	
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
			245					250					255		
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
			260					265					270		

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 77

<211> 326

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 77

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175
 Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255
 Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270
 Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 78

<211> 327

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 78

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys		
115	120	125
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val		
130	135	140
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp		
145	150	155
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe		
165	170	175
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp		
180	185	190
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu		
195	200	205
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg		
210	215	220
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys		
225	230	235
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp		
245	250	255
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys		
260	265	270
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser		
275	280	285
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser		
290	295	300
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser		
305	310	315
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
325		

<210> 79

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 79

Glu Leu Leu Gly

1

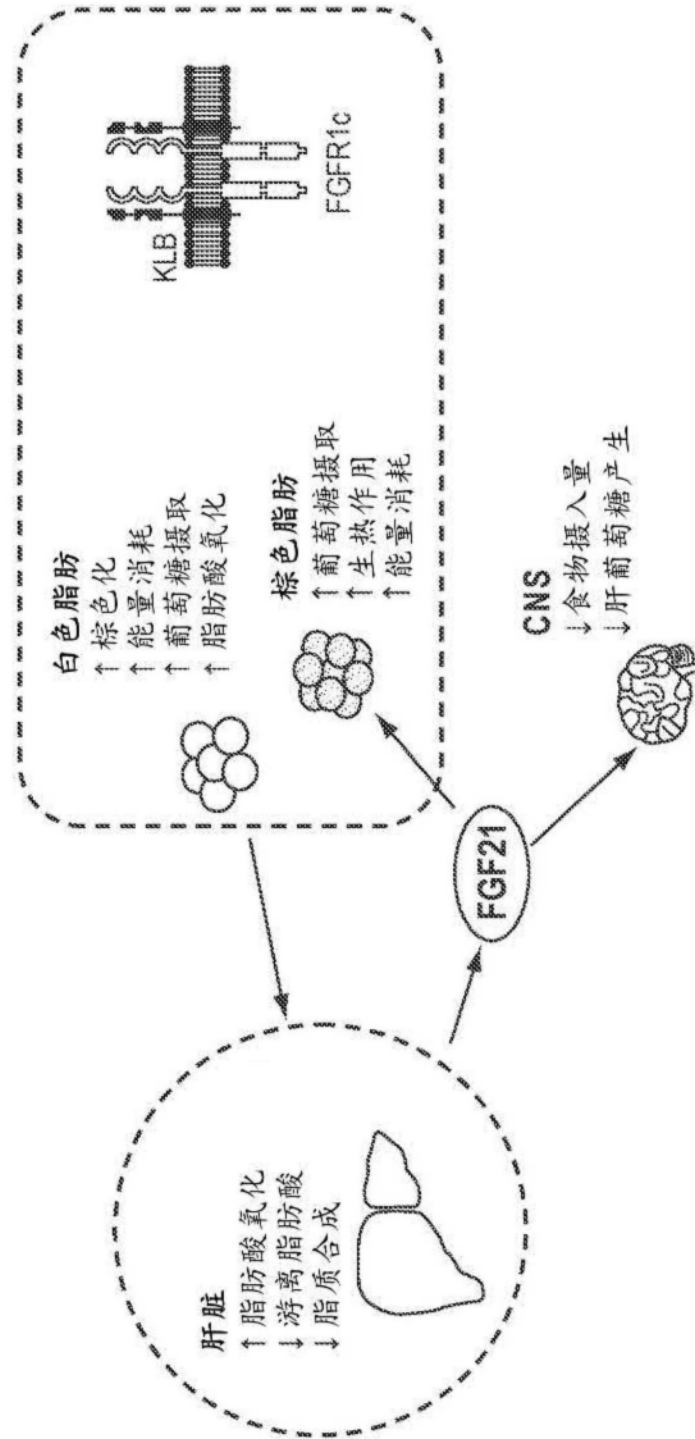


图1

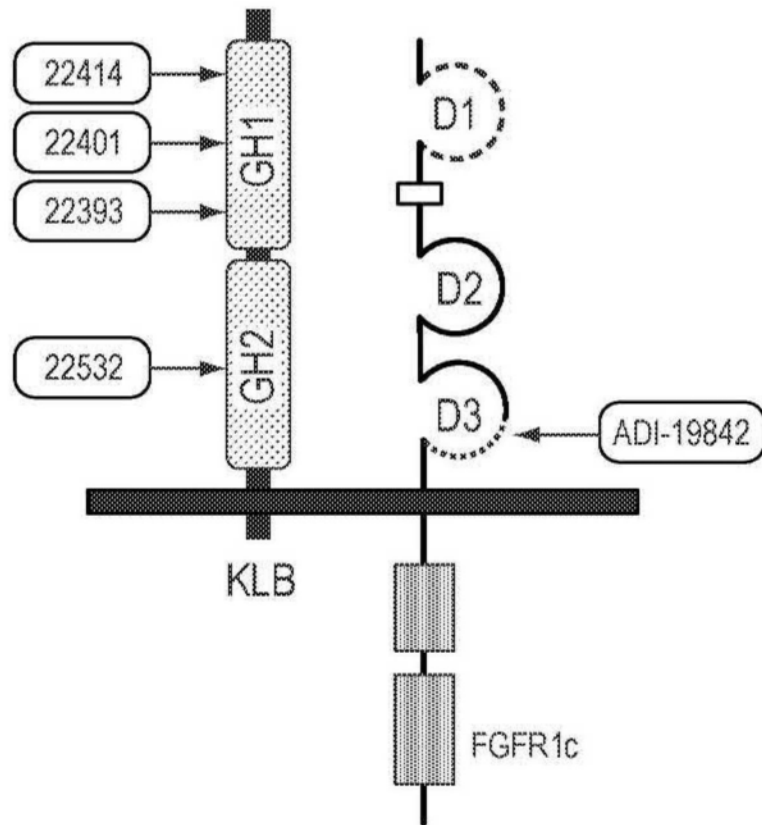


图2

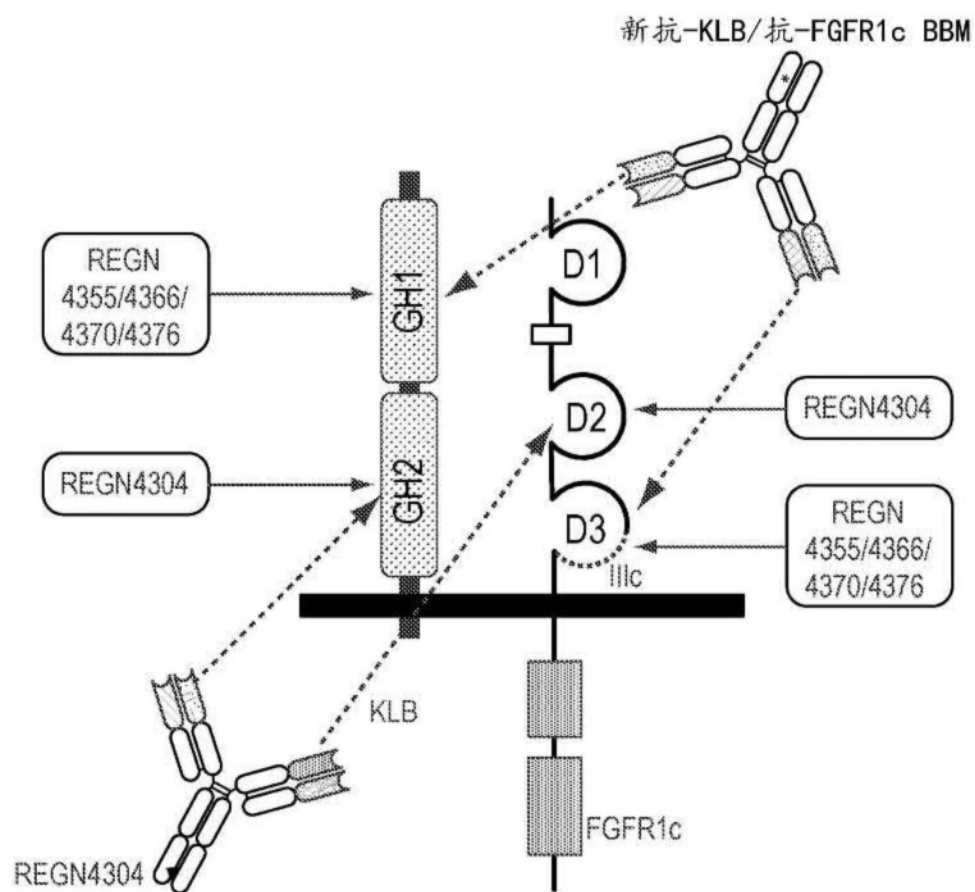


图3

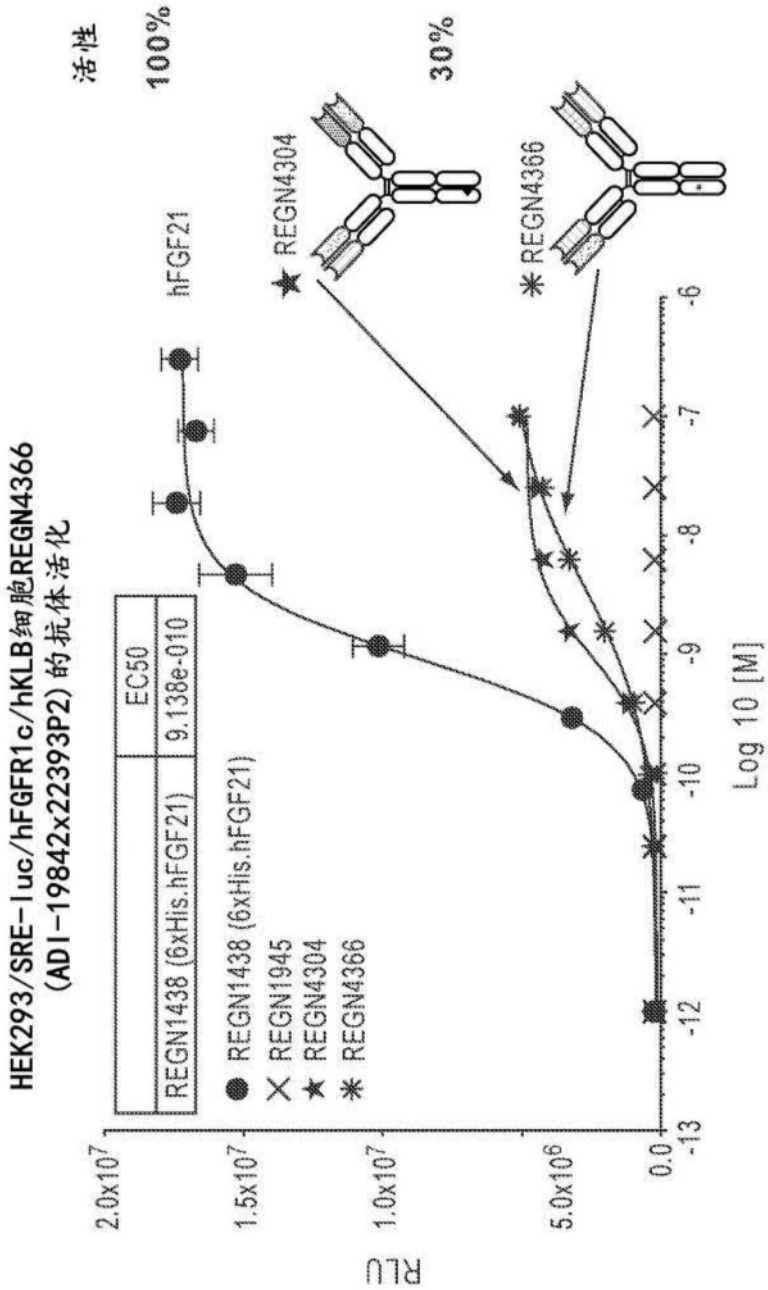


图4

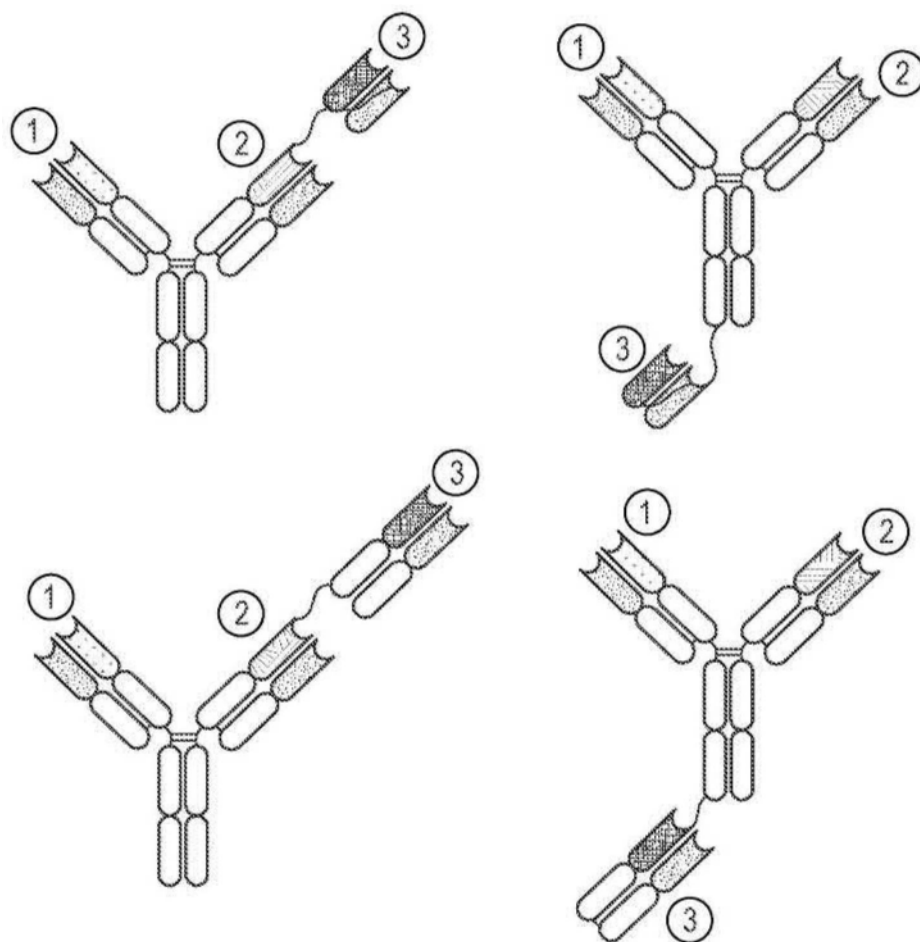


图5

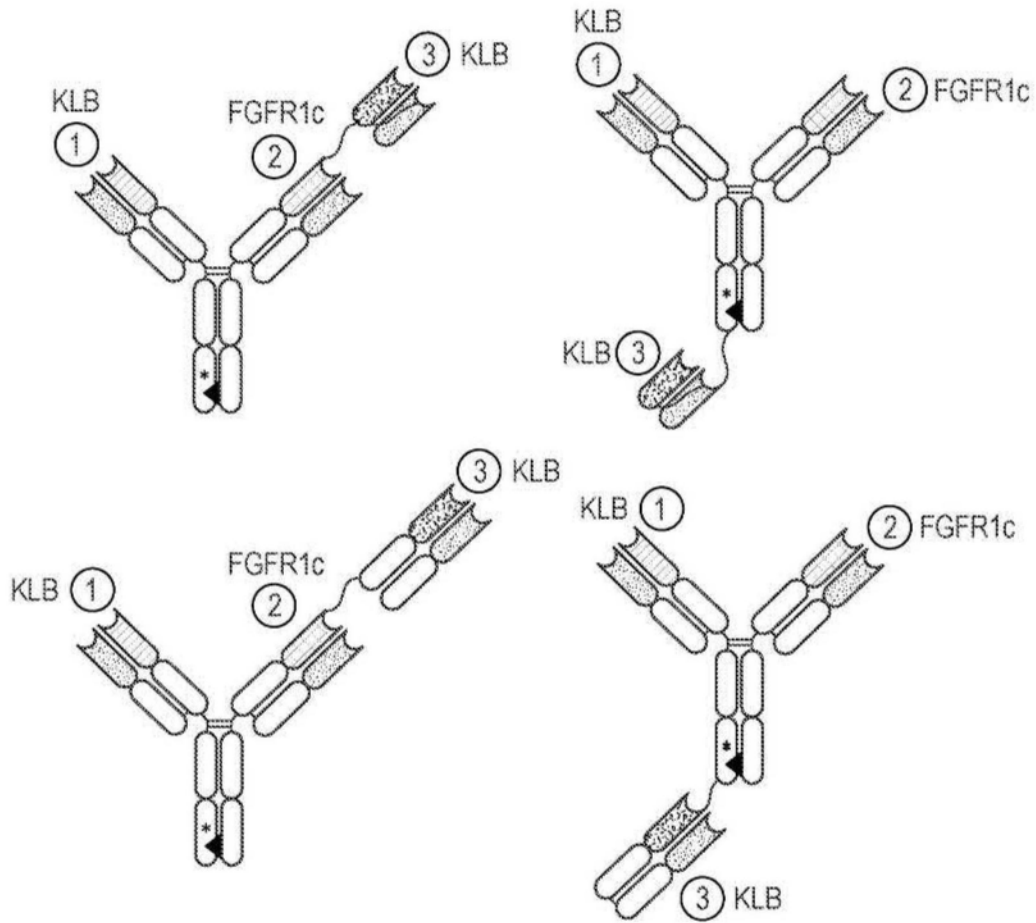


图6A

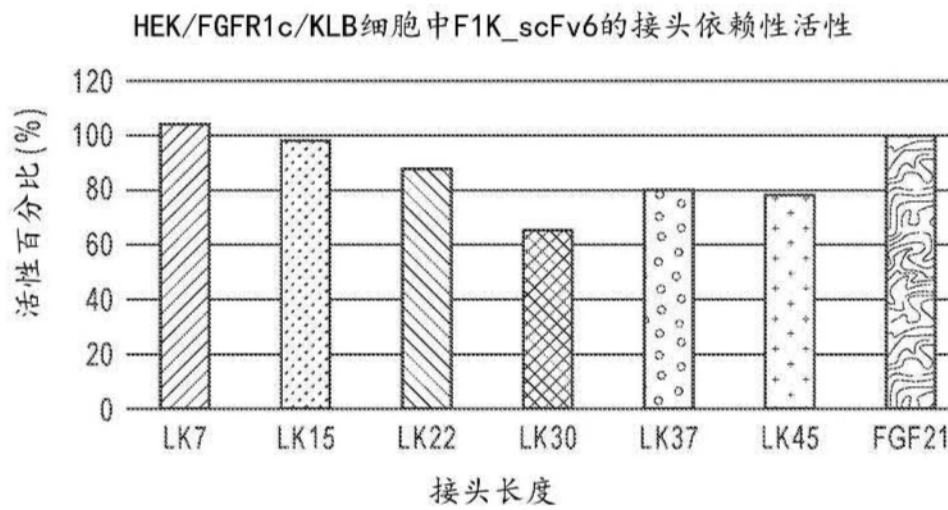


图6B

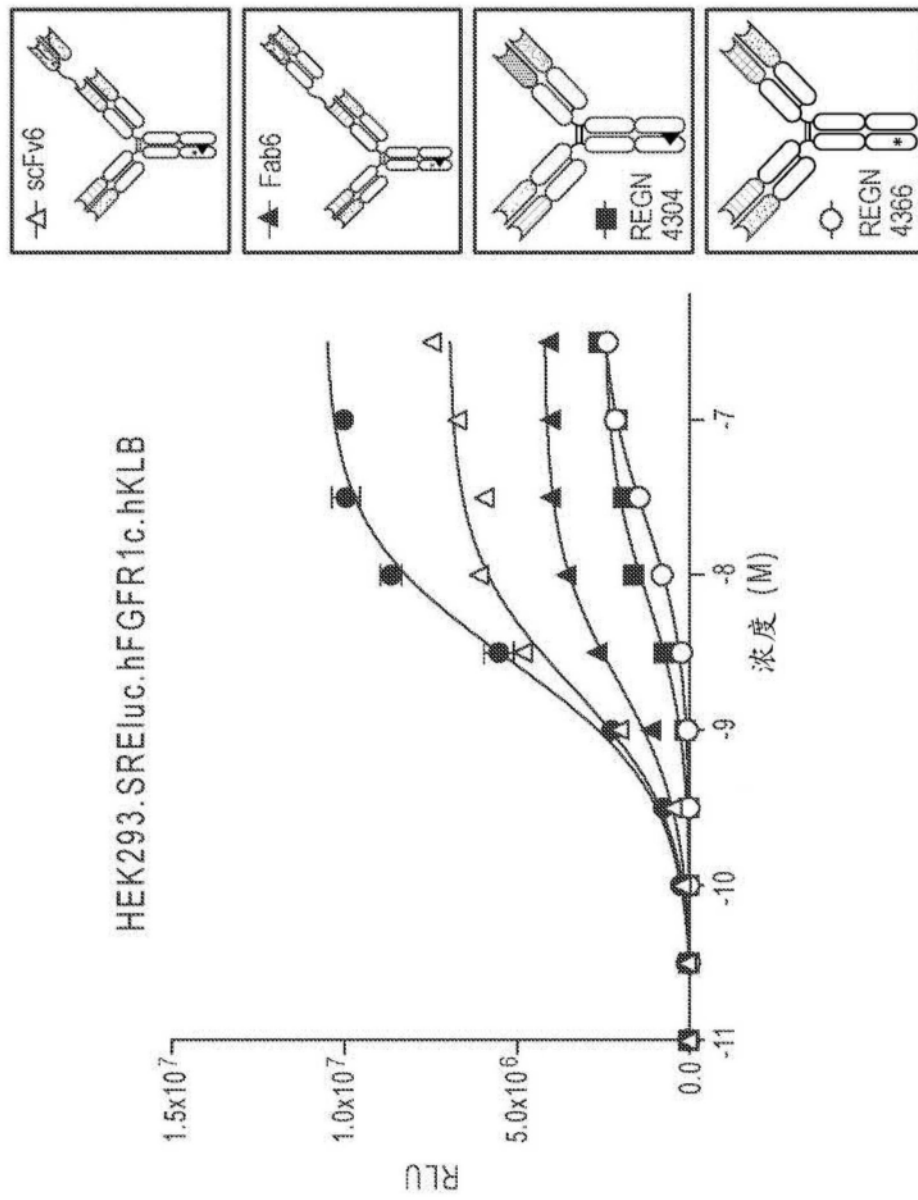


图7A

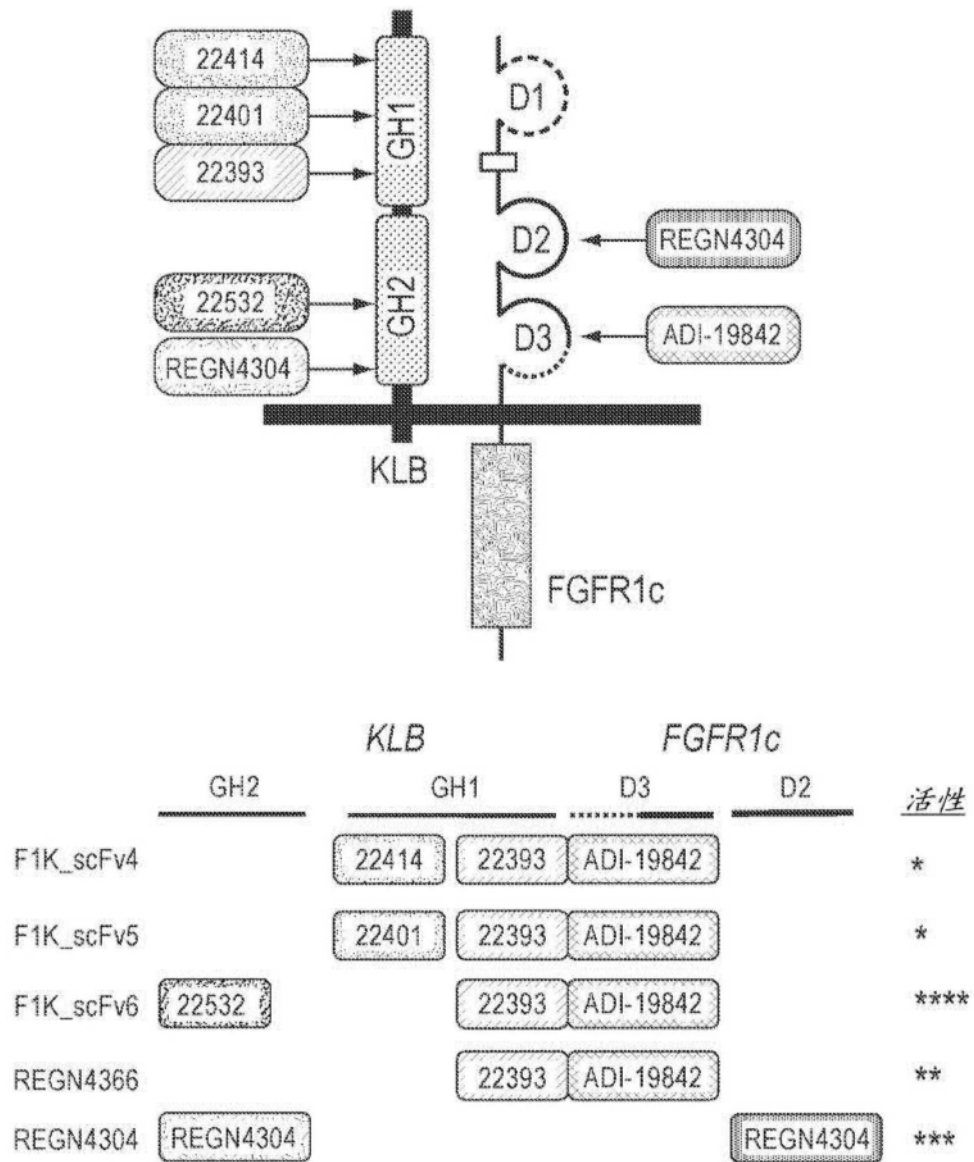


图7B

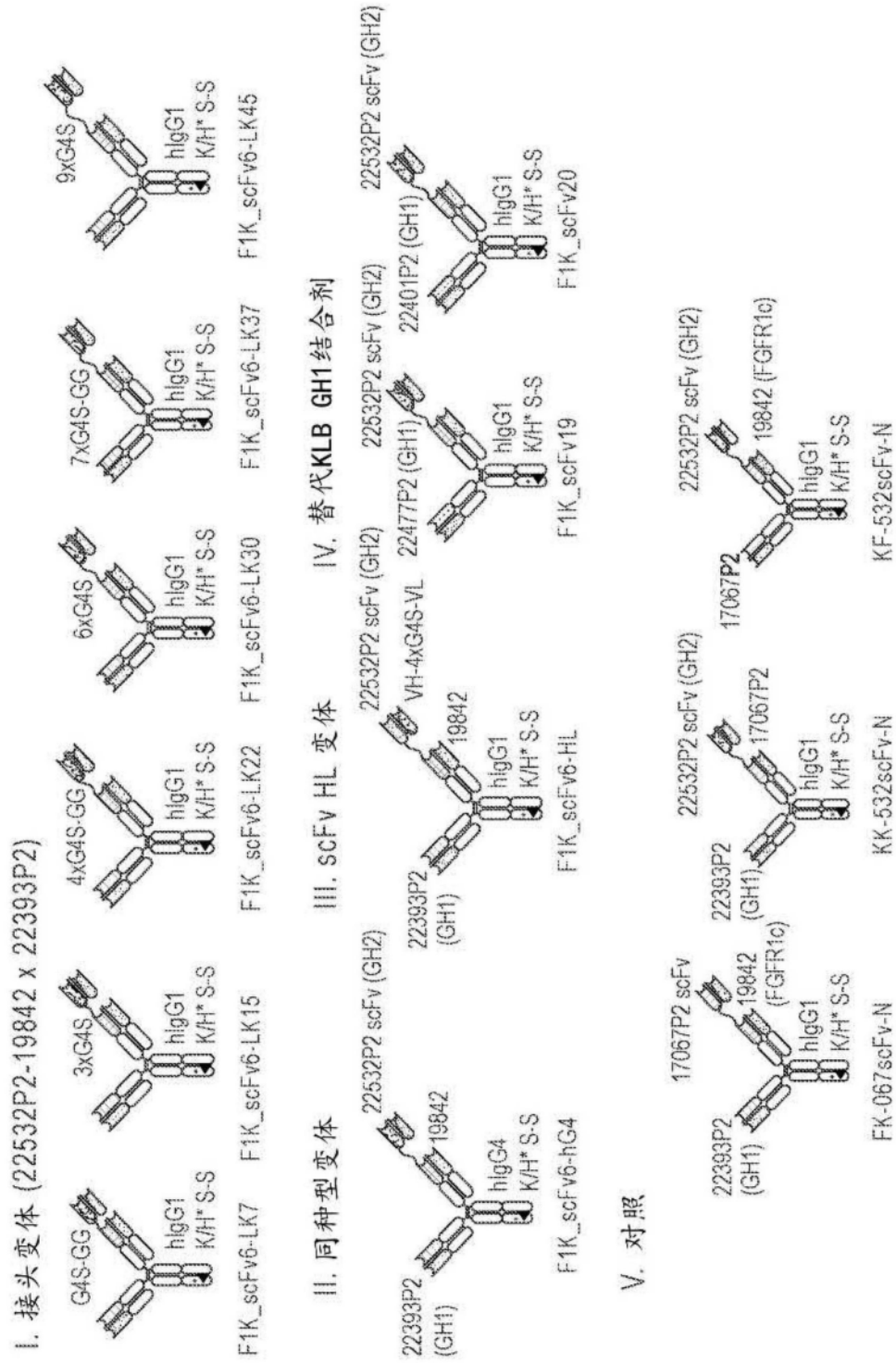


图8A

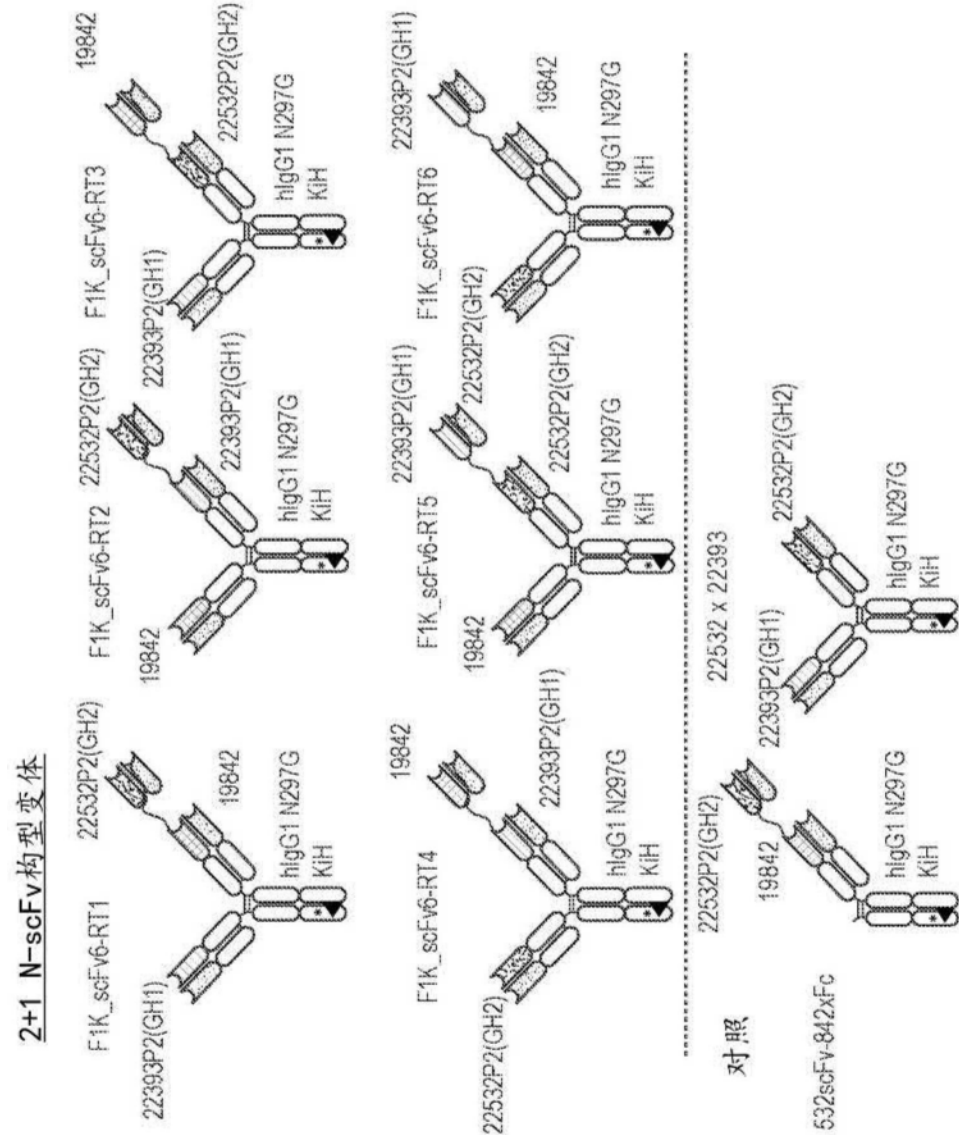


图8B

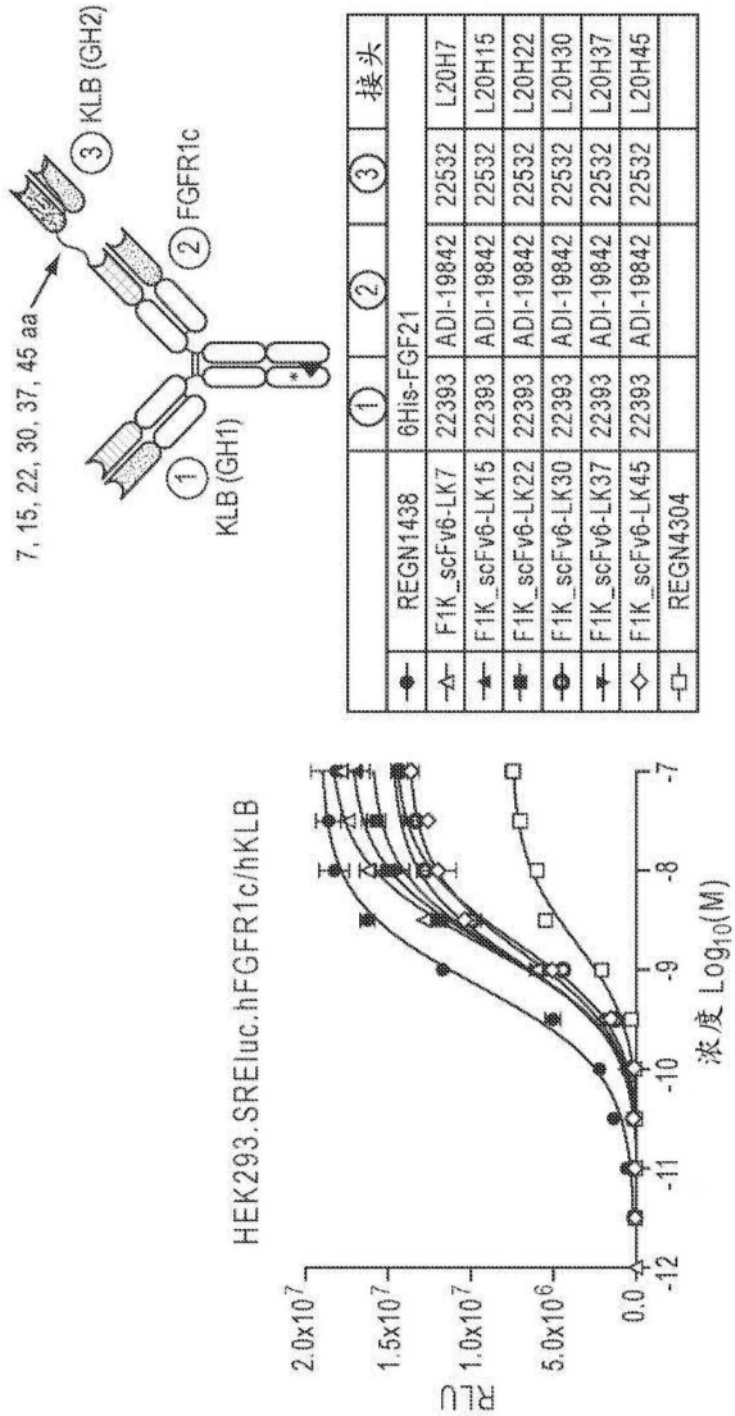


图9

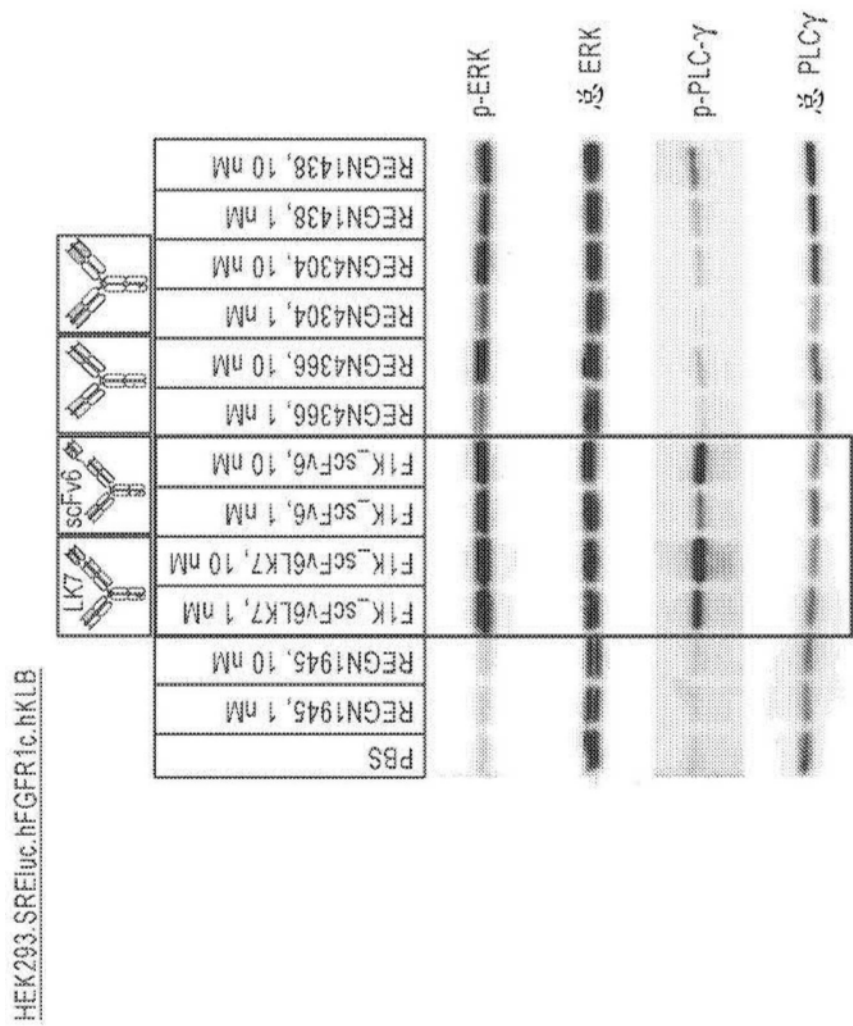


图10A

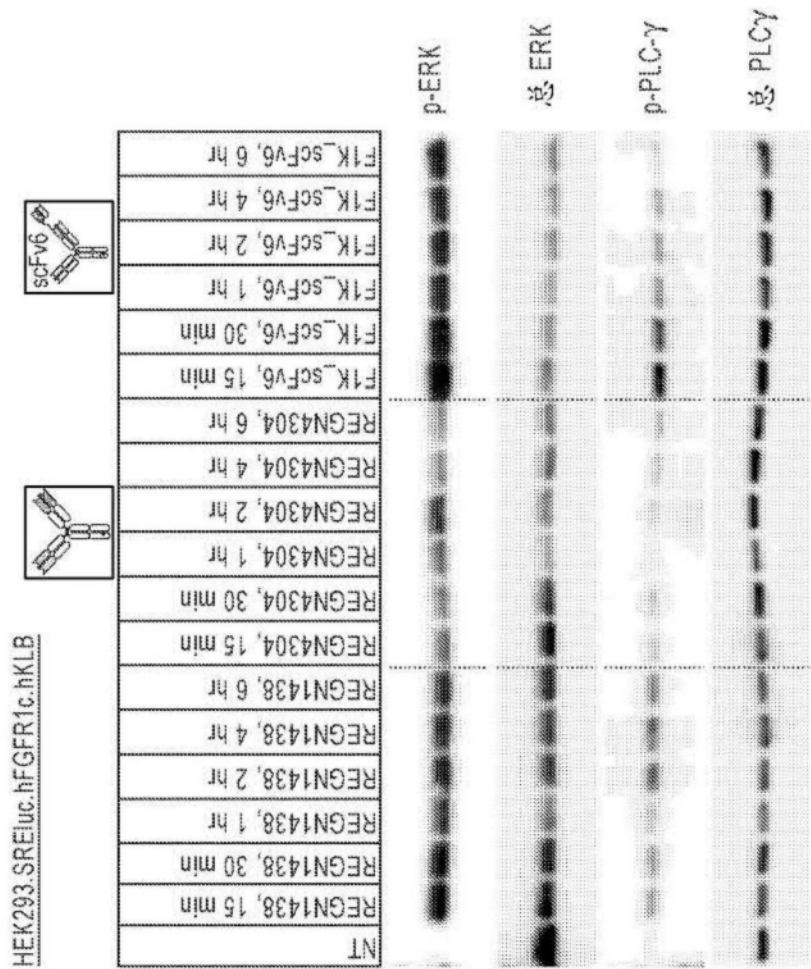


图10B

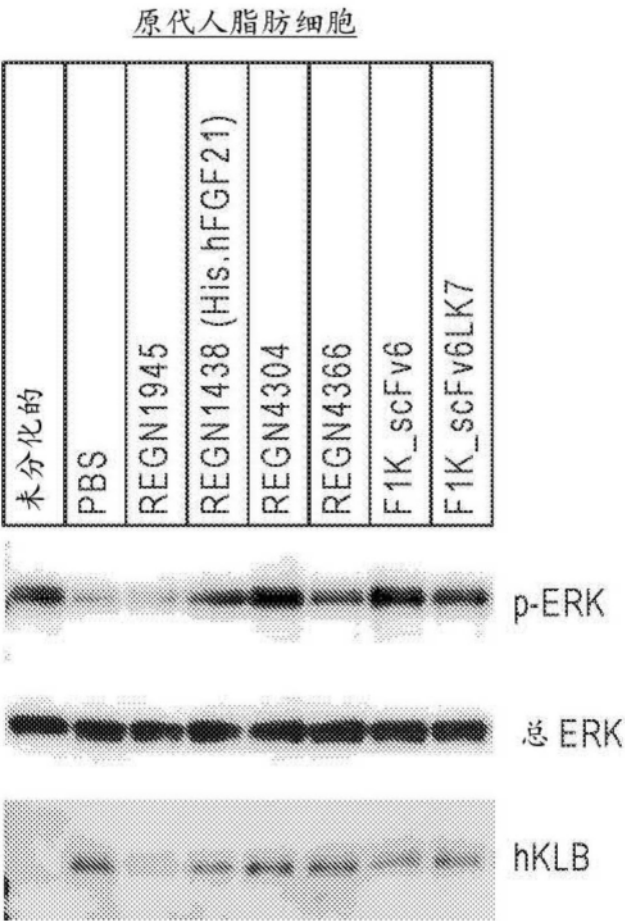


图11A

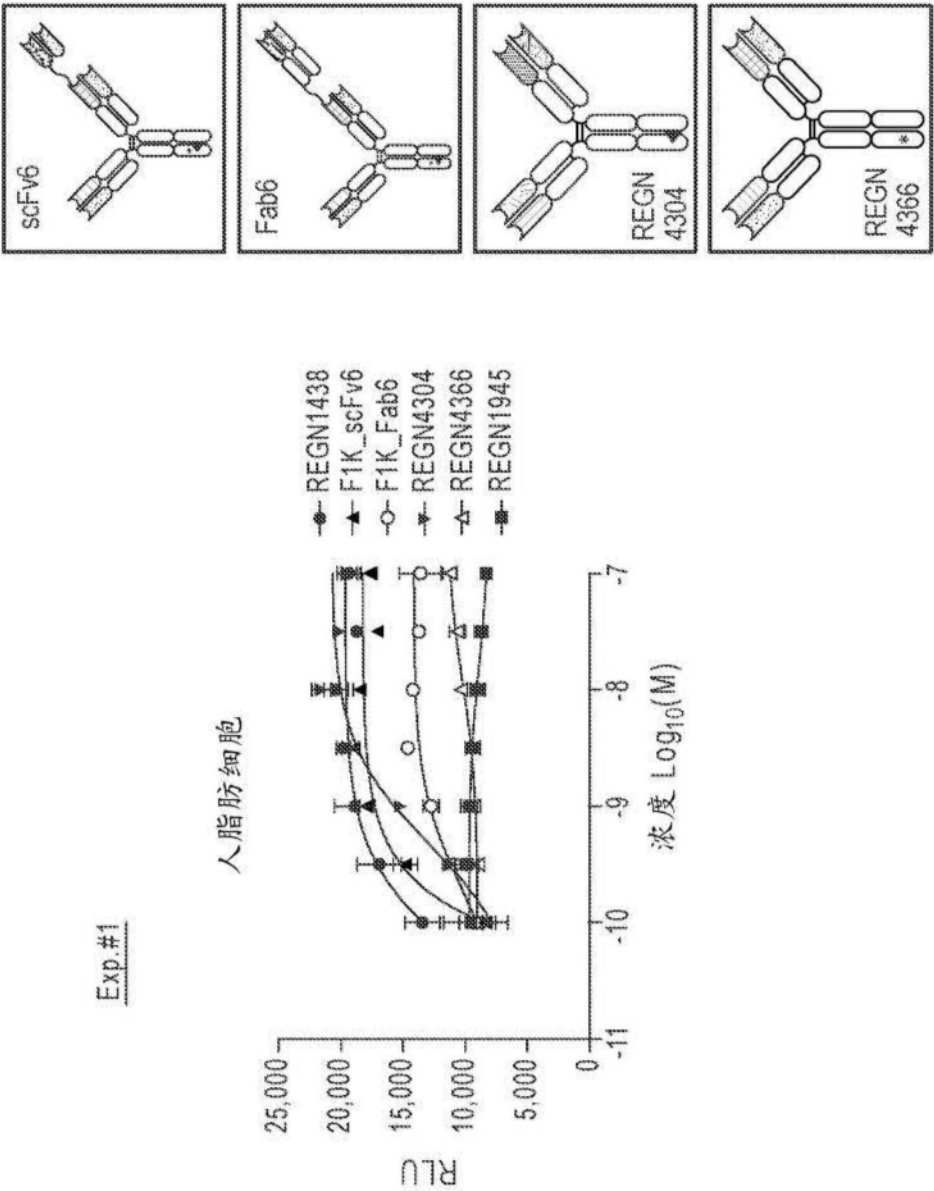


图11B

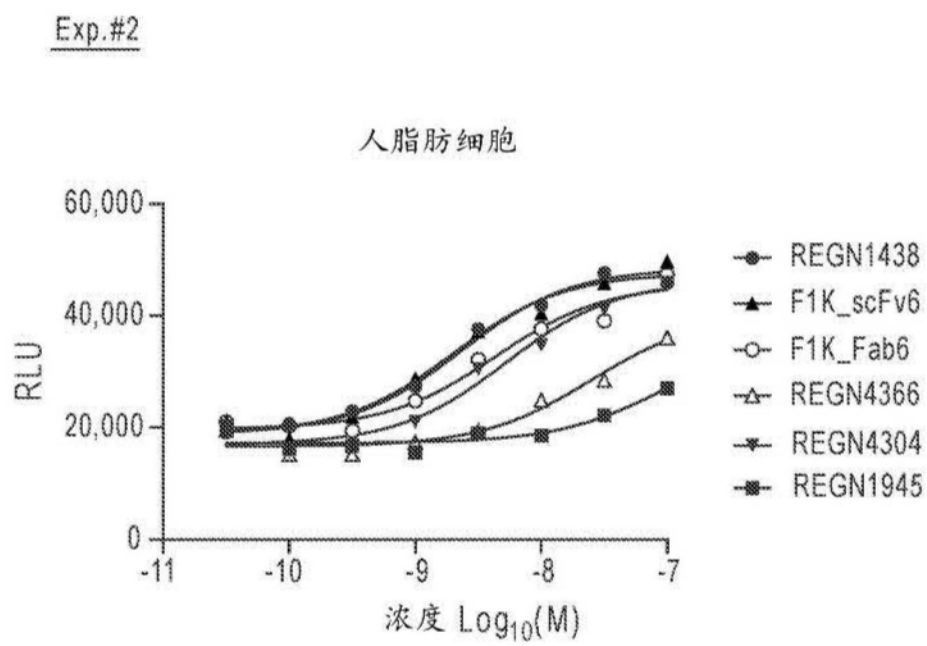


图11C

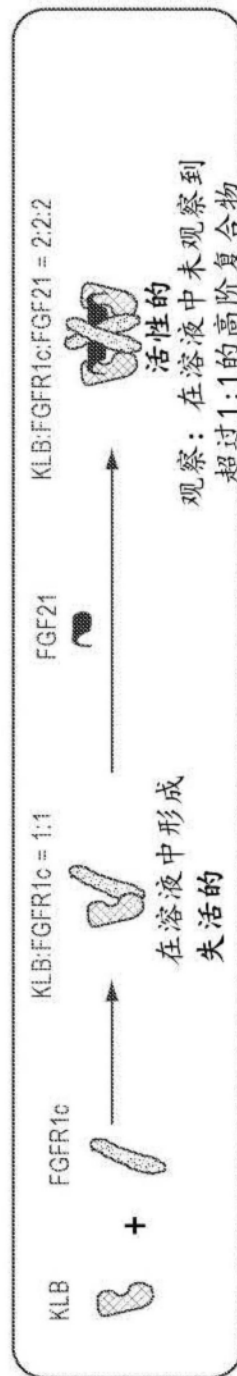


图12A

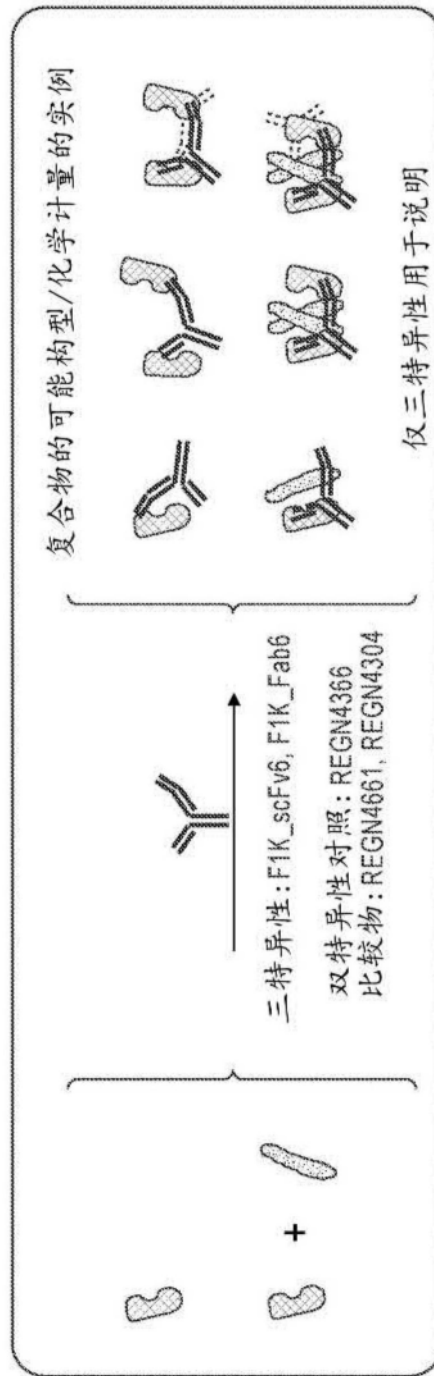


图12B

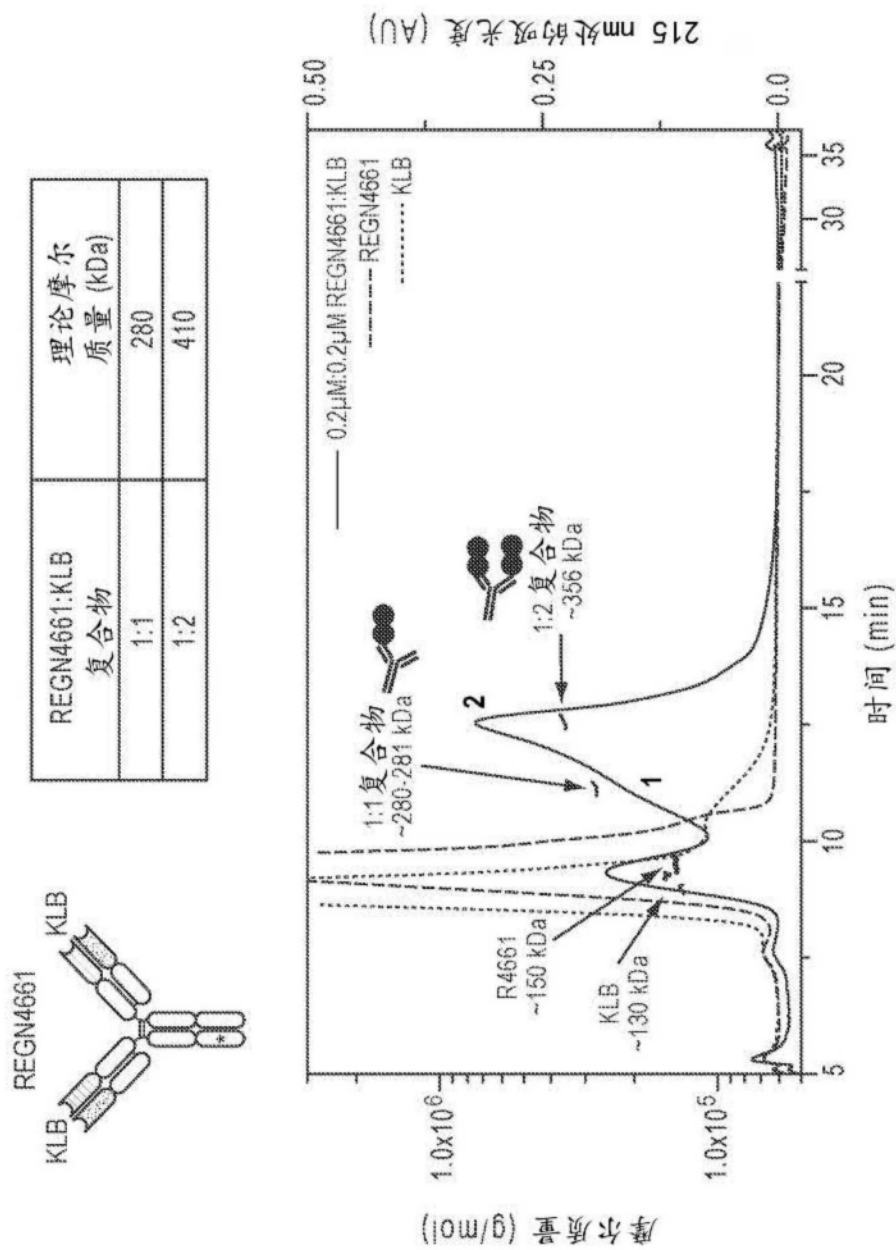


图13A

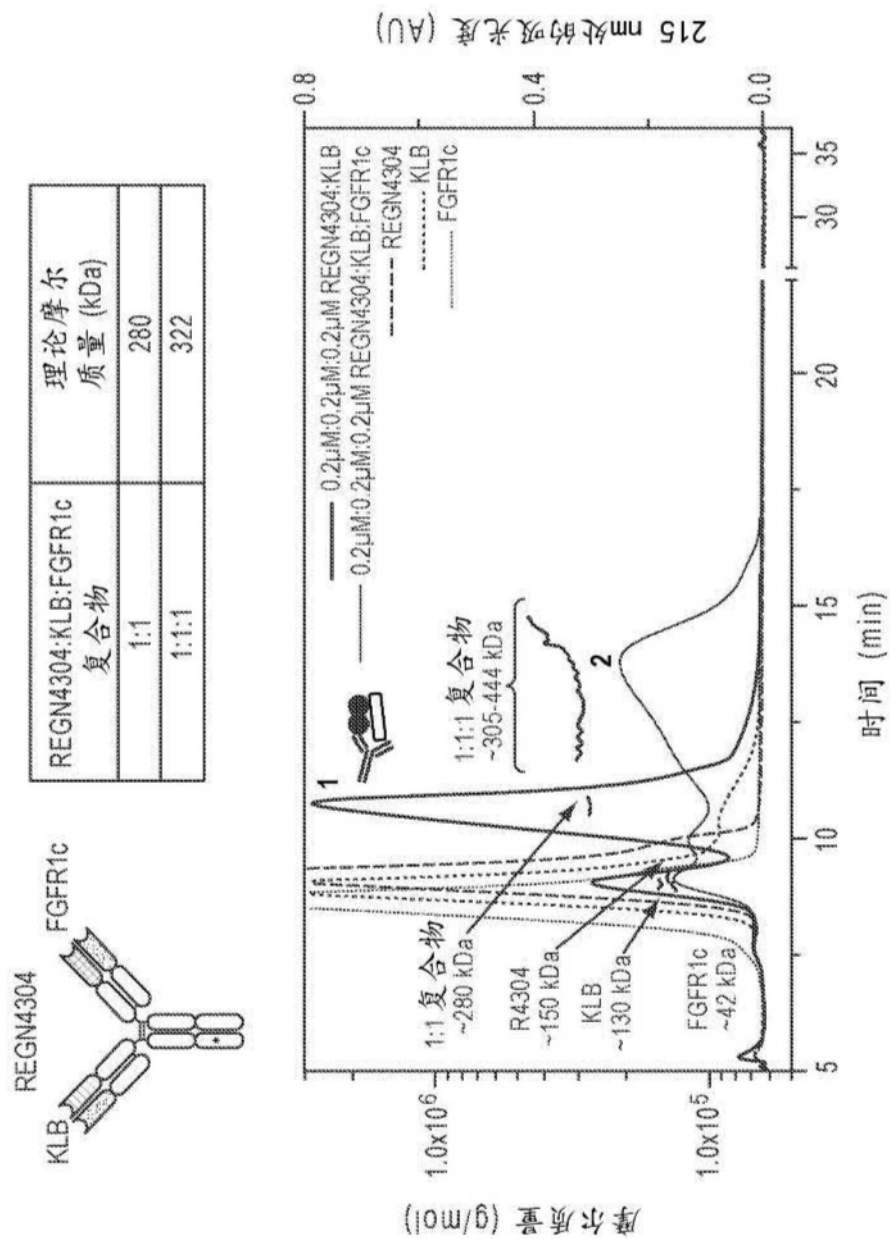


图13B

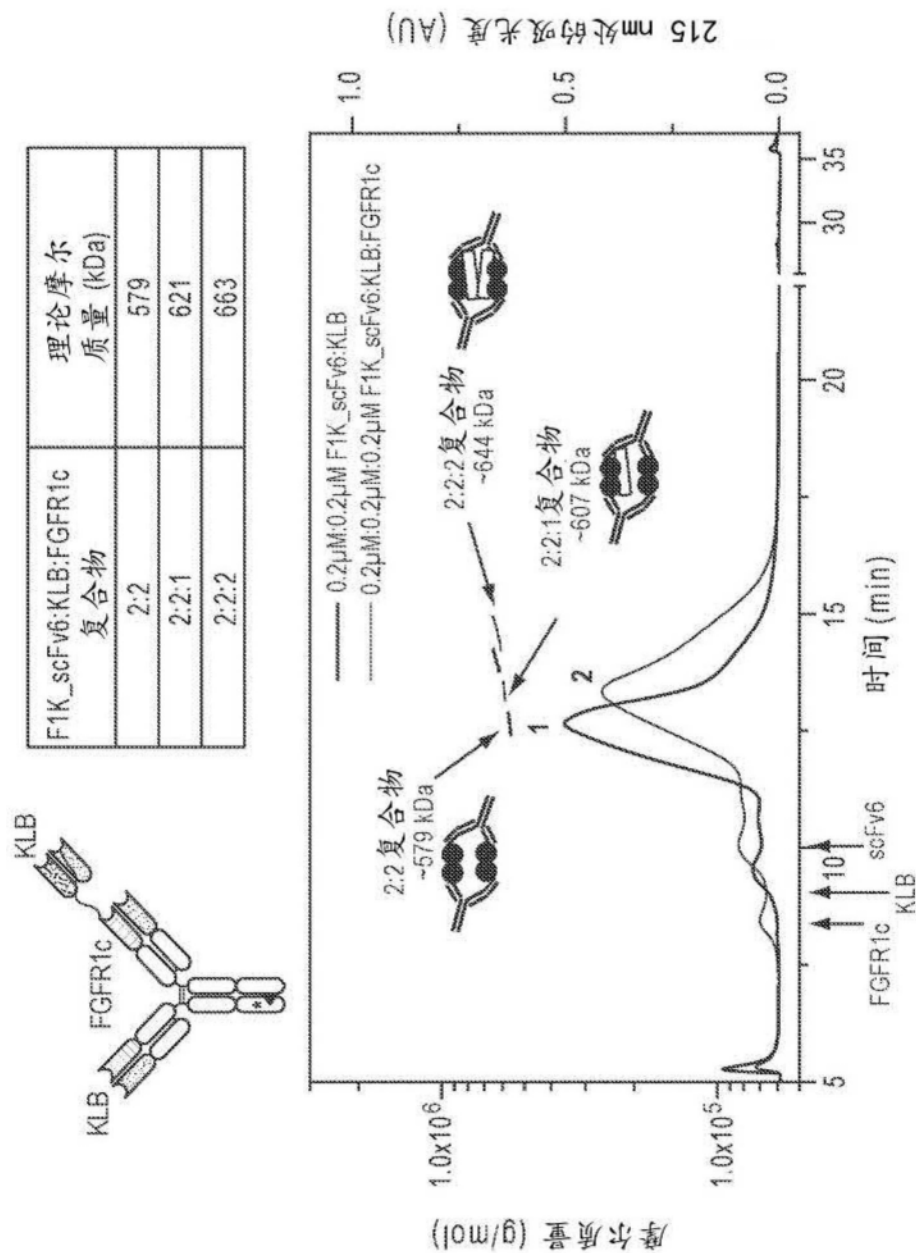


图13C

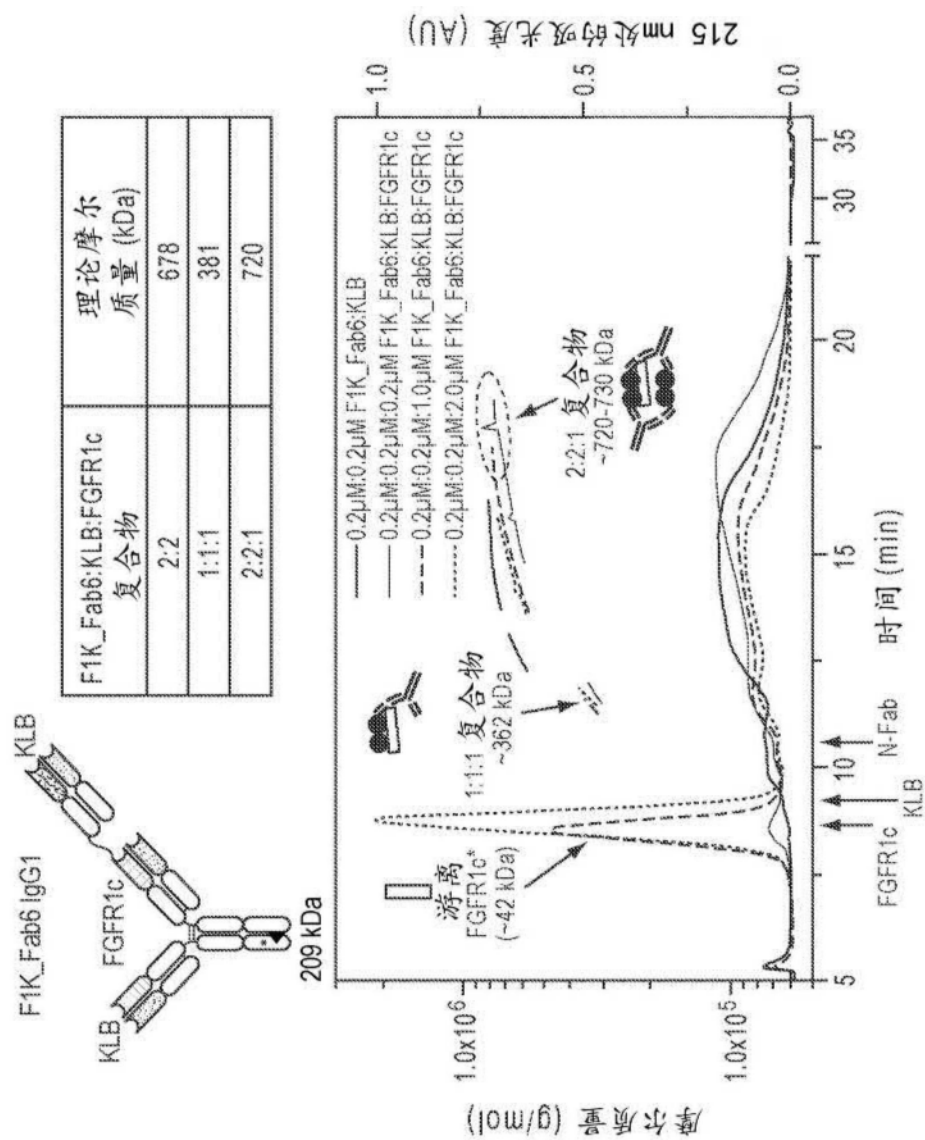


图13D

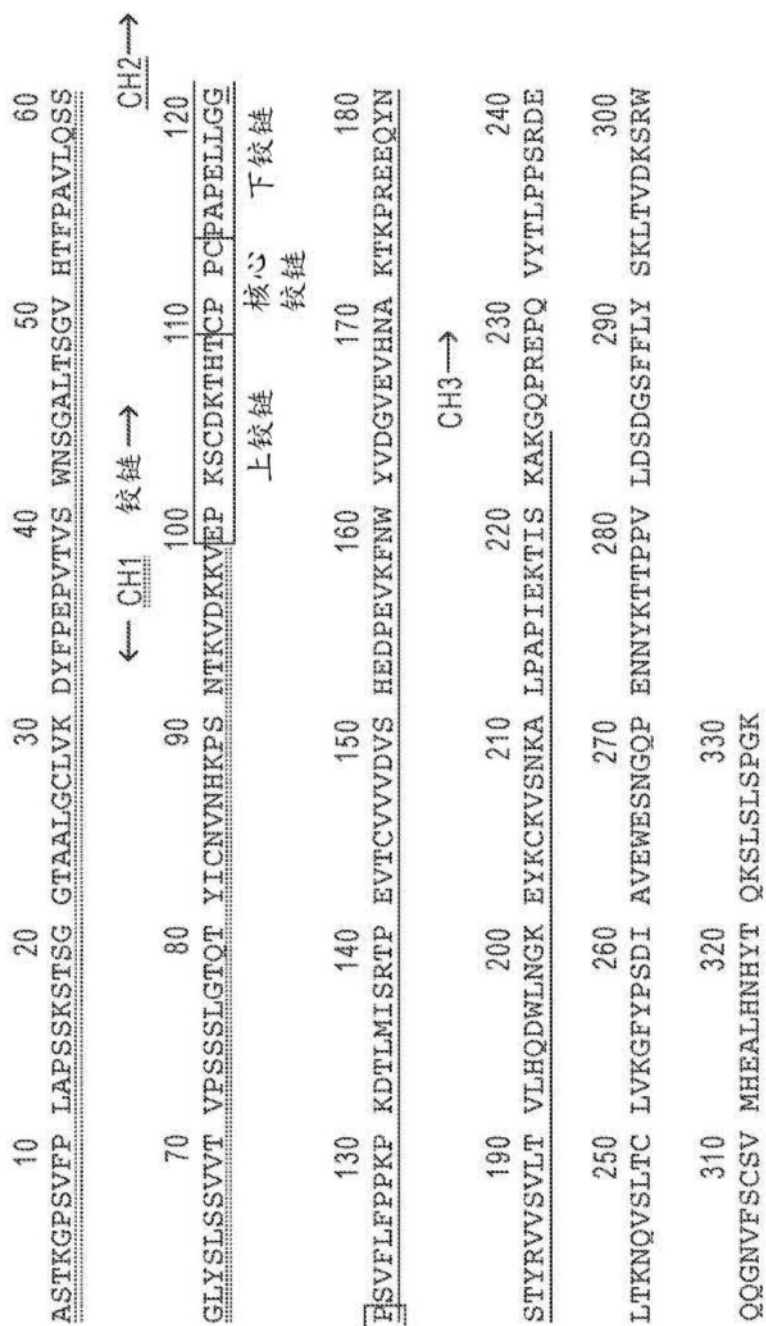


图14

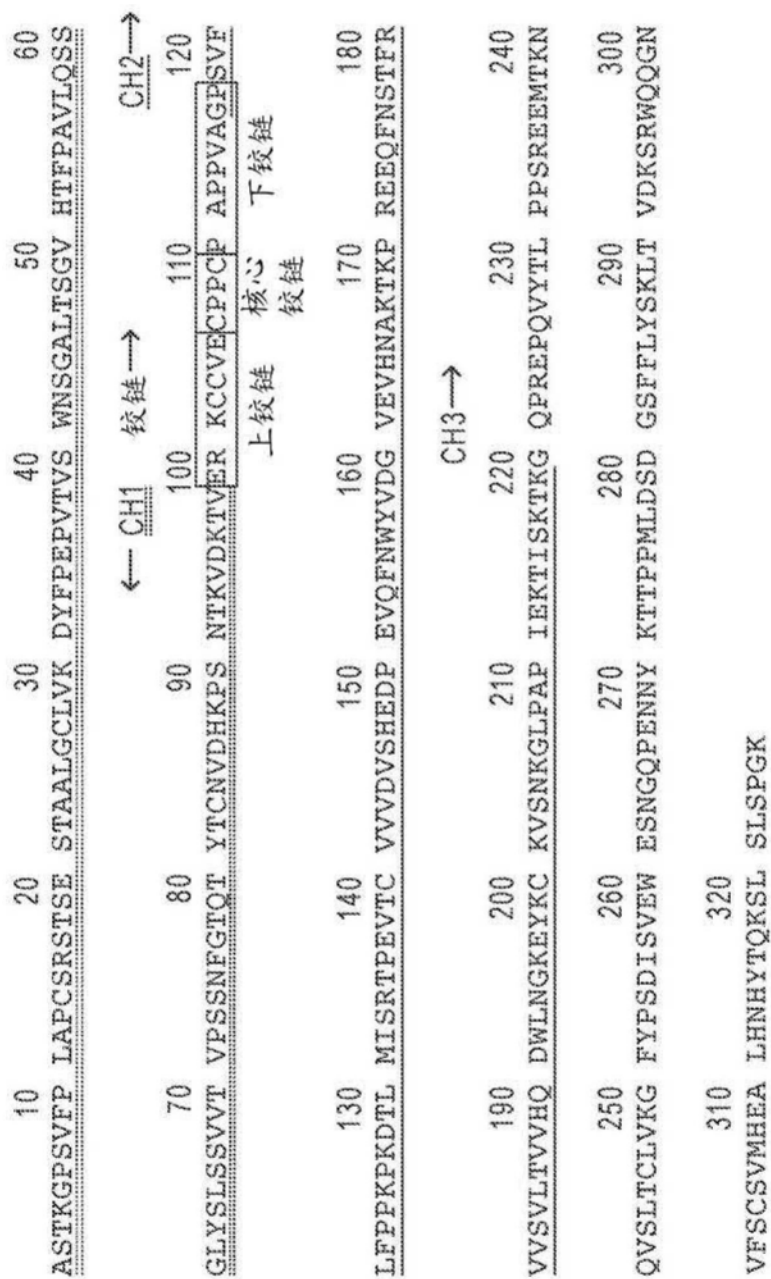


图15

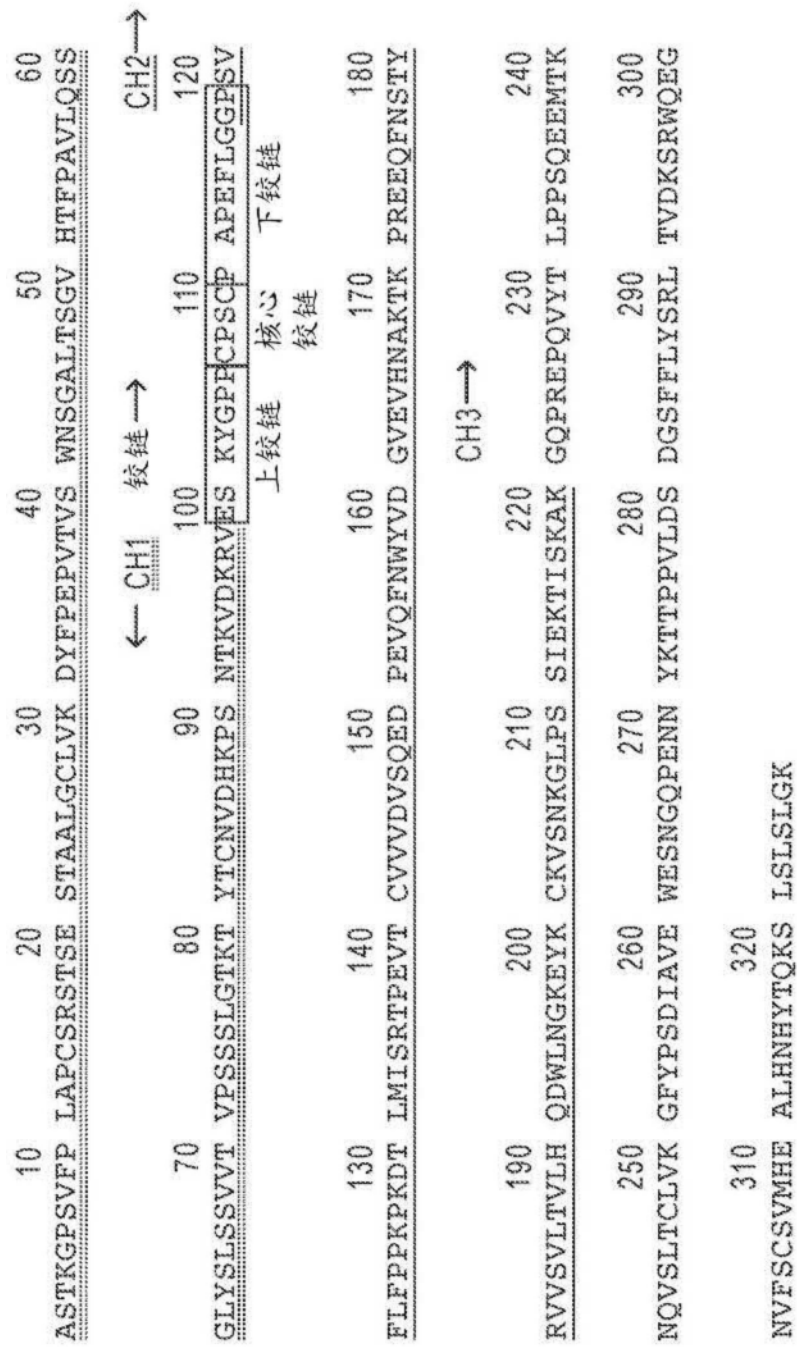


图16

	上铰链	核心铰链				下铰链								CH2	CH3	铰链 SEQ ID NO:	
		226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	CH2		CH3
构建体	216-225 (IgG1)														CH2	CH3	
hIgG1 PVA	EPKSCDKTHT	C	P	P	C	P	A	P	P	V	A	-	G	P	IgG1	IgG1	66
hIgG1s	EPKSCDKTHT	C	P	P	C	P	A	P	P	V	A	-	G	P	IgG4	IgG1	67
hIgG1	EPKSCDKTHT	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	IgG1	IgG1	68
hIgG2	ERK CCVE	C	P	P	C	P	A	P	P	V	A	-	G	P	IgG2	IgG2	69
hIgG4 S108P	ESKYGPP	C	P	P	C	P	A	P	E	F	L	G	G	P	IgG4	IgG4	70
hIgG4s	ESKYGPP	C	P	P	C	P	A	P	P	V	A	-	G	P	IgG4	IgG4	71
hIgG4	ESKYGPP	C	P	S	C	P	A	P	E	F	L	G	G	P	IgG4	IgG4	72

图17

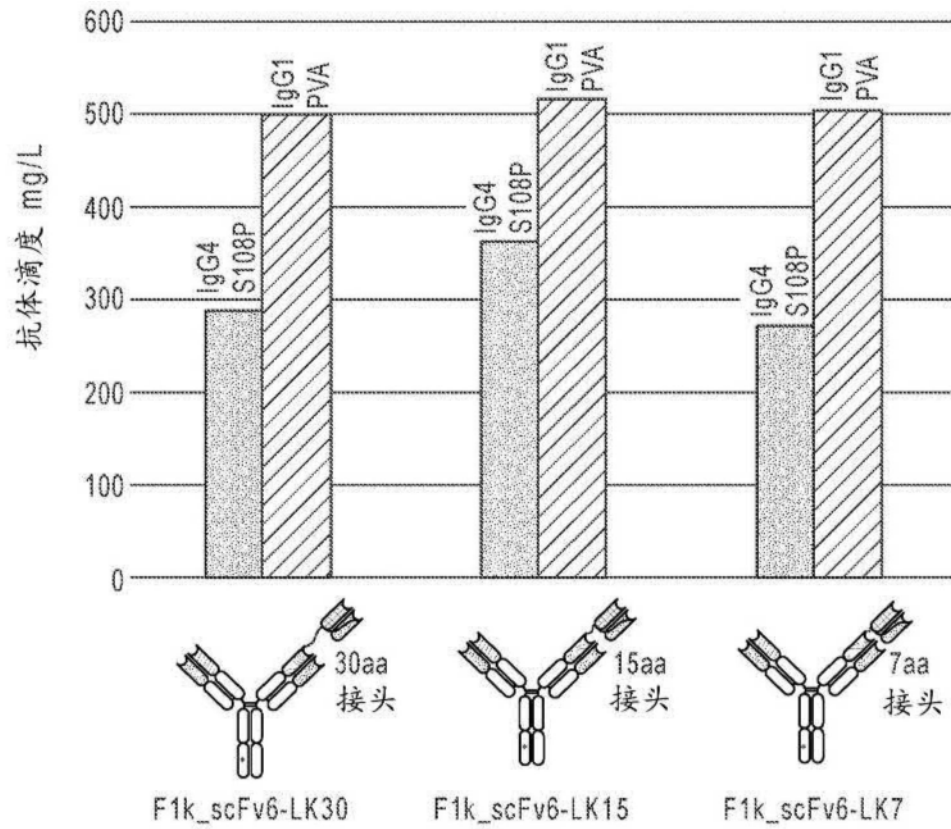


图18

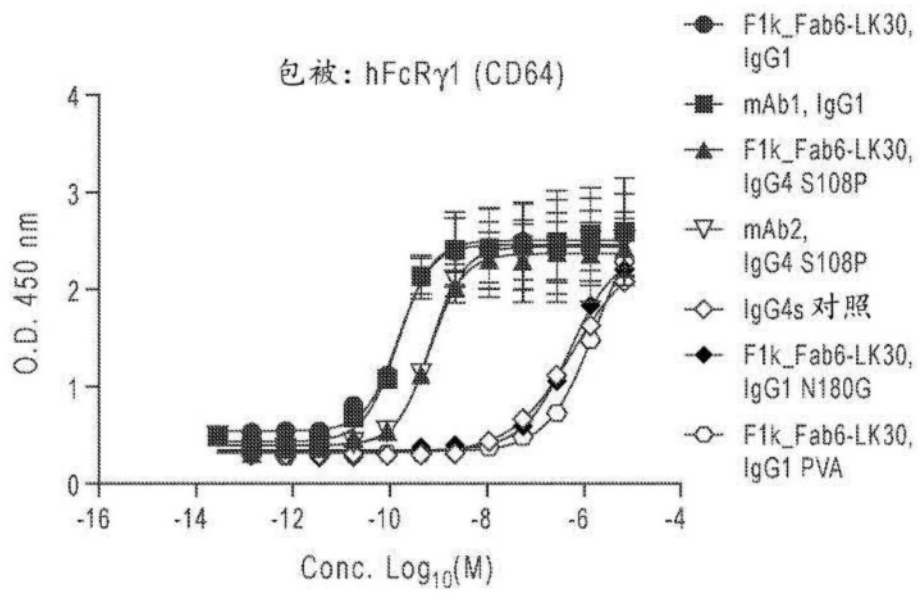


图19A

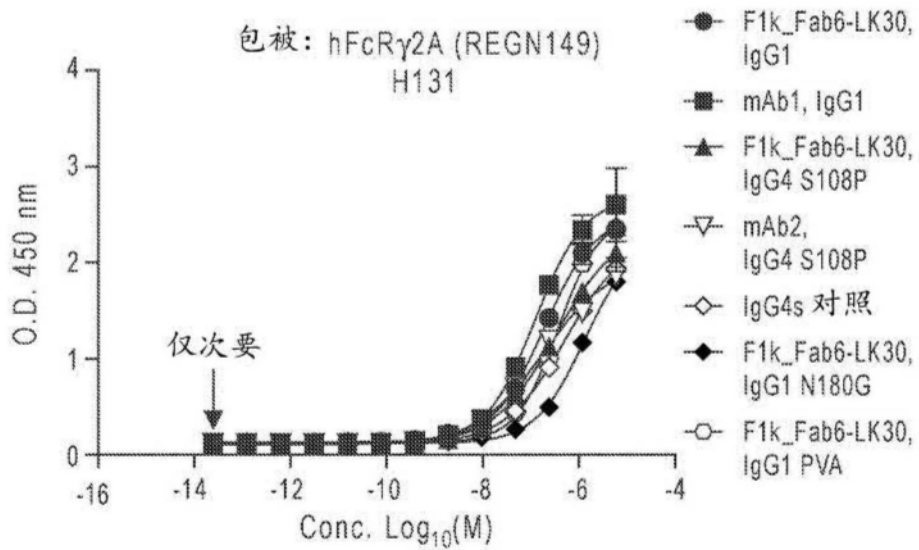


图19B

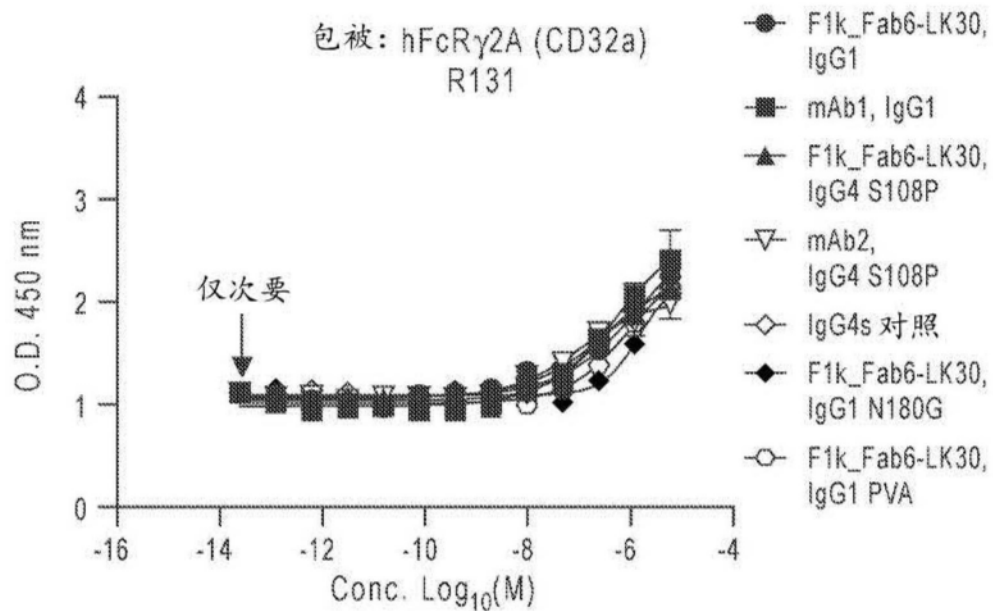


图19C

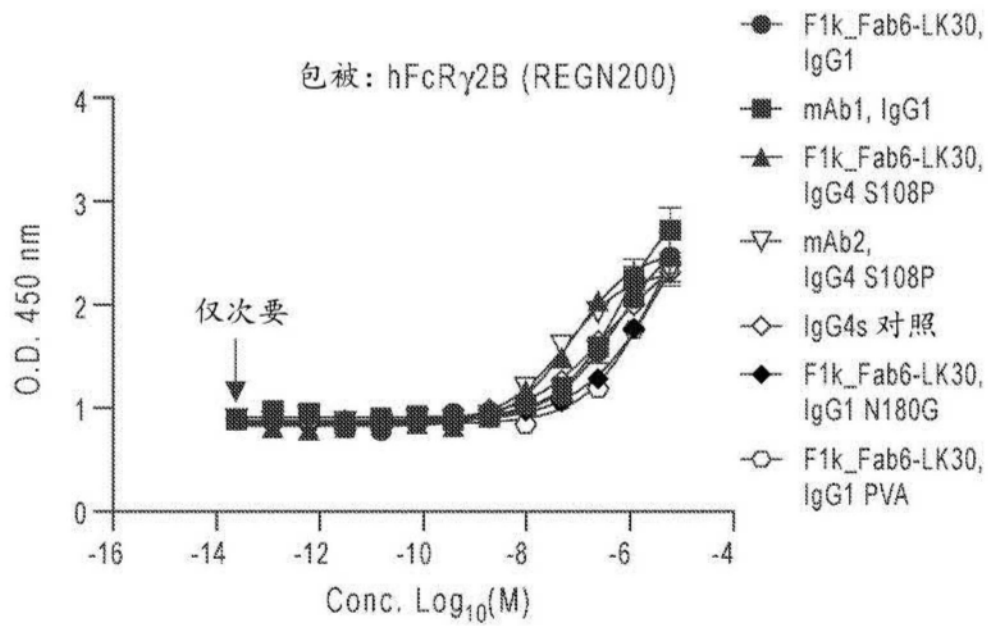


图19D

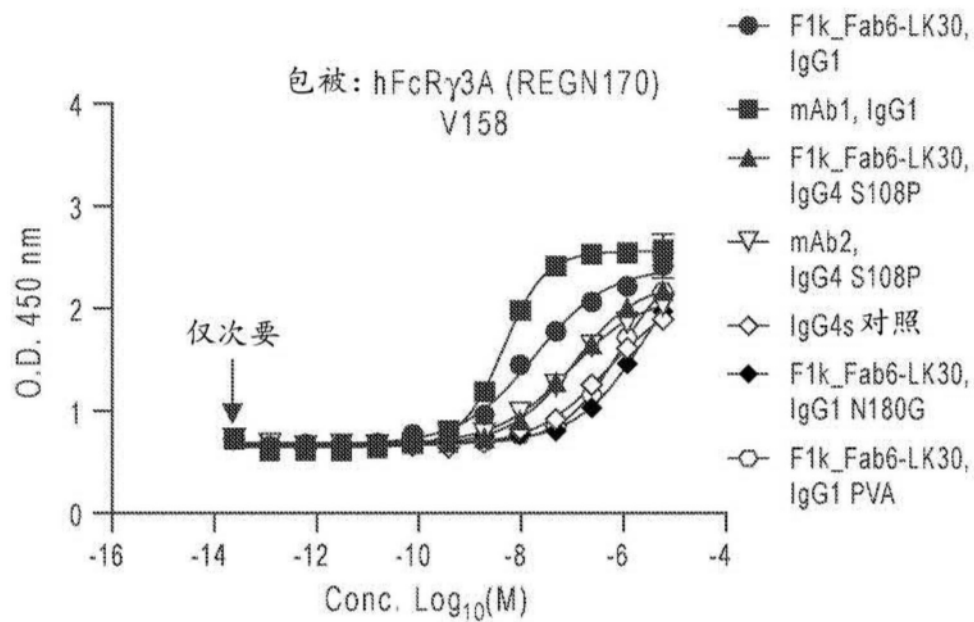


图19E

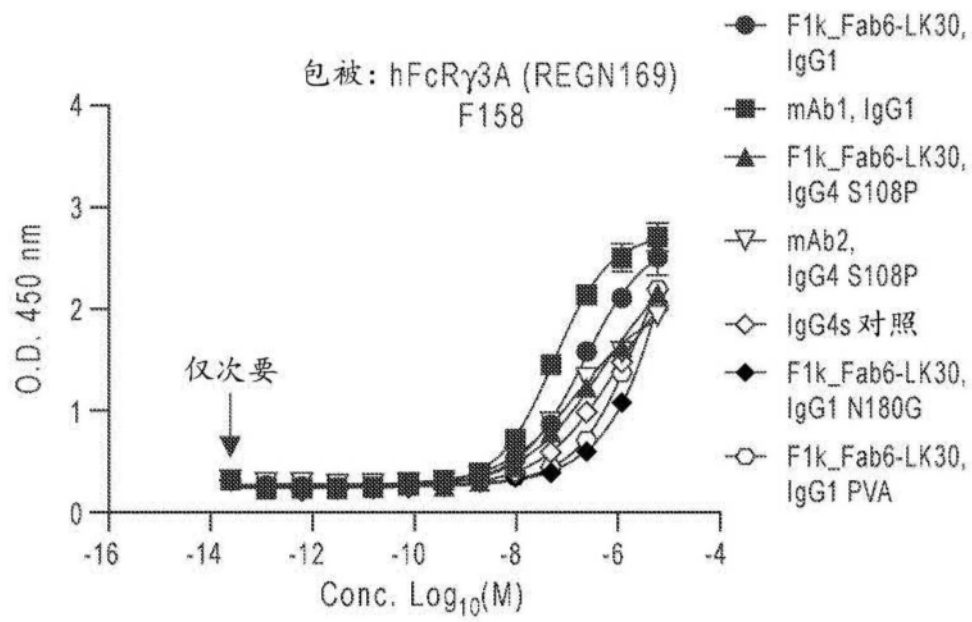


图19F

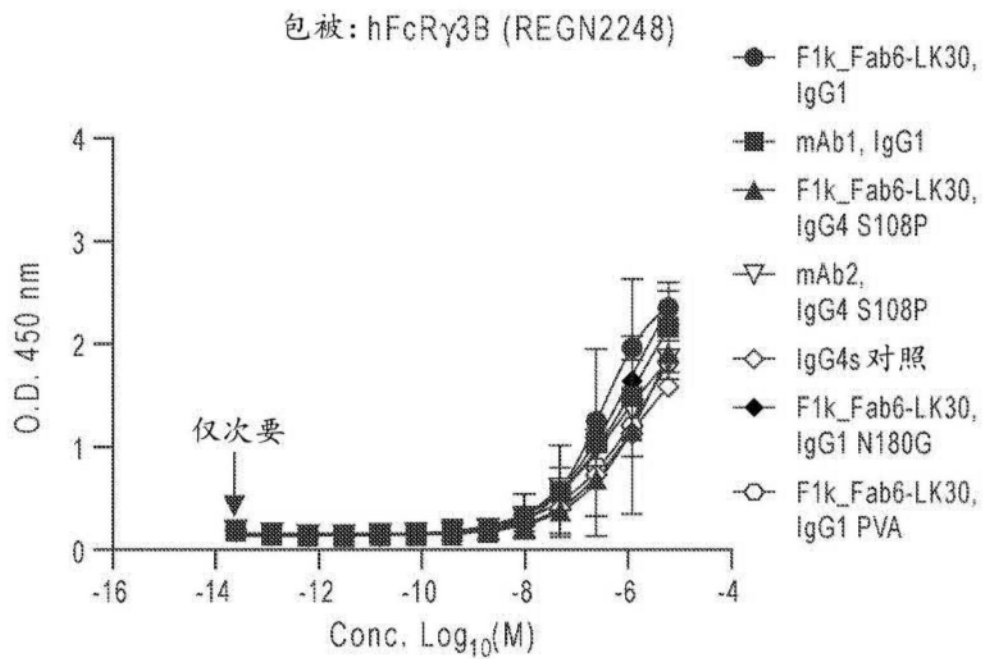


图19G

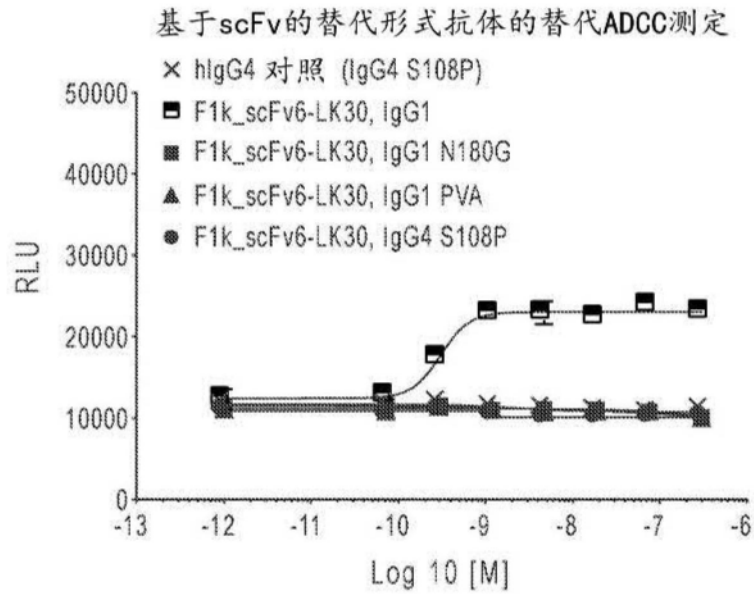


图20

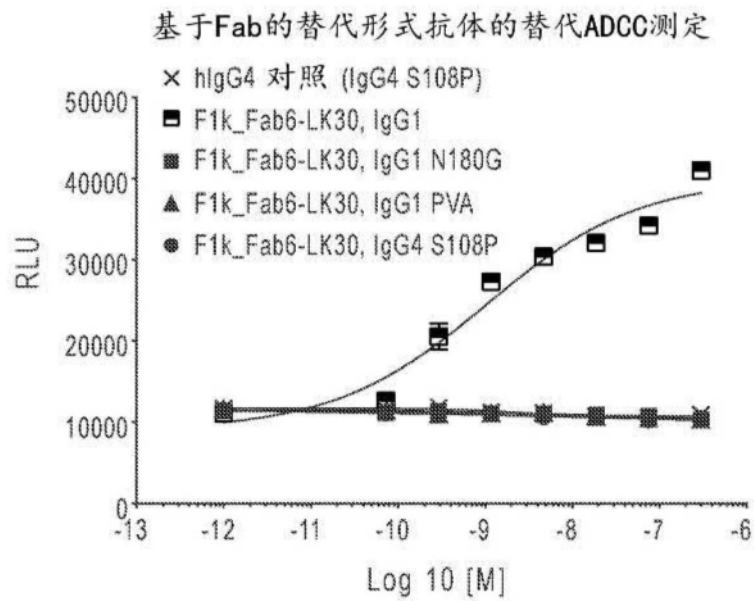


图21

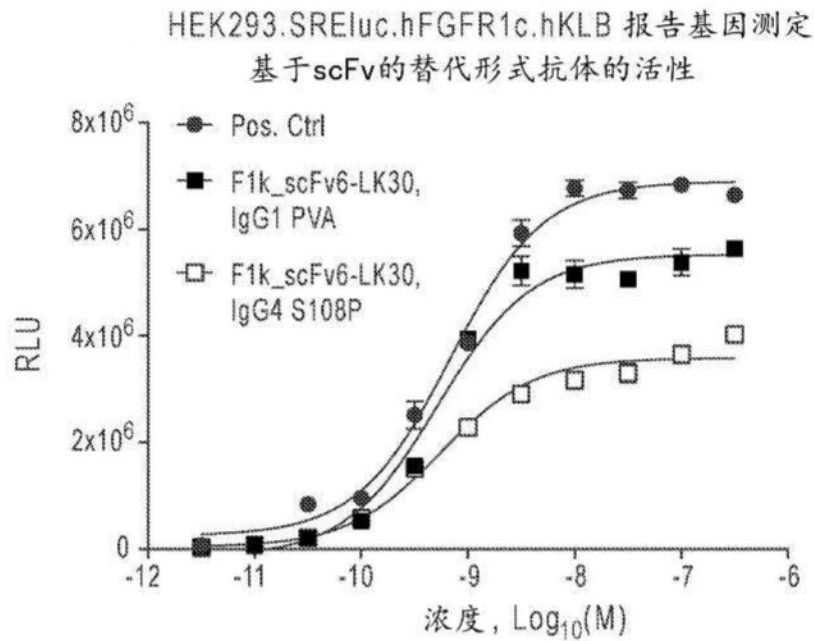


图22

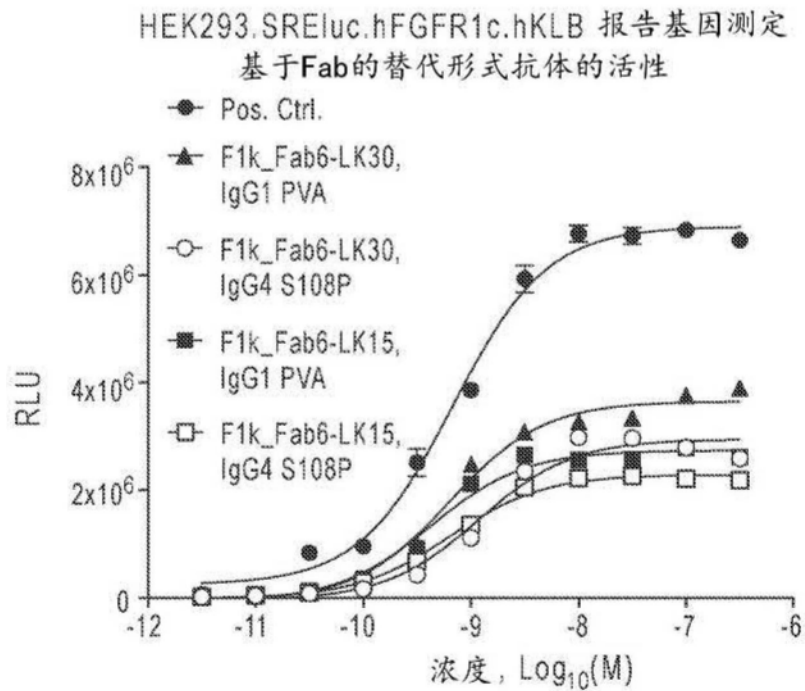
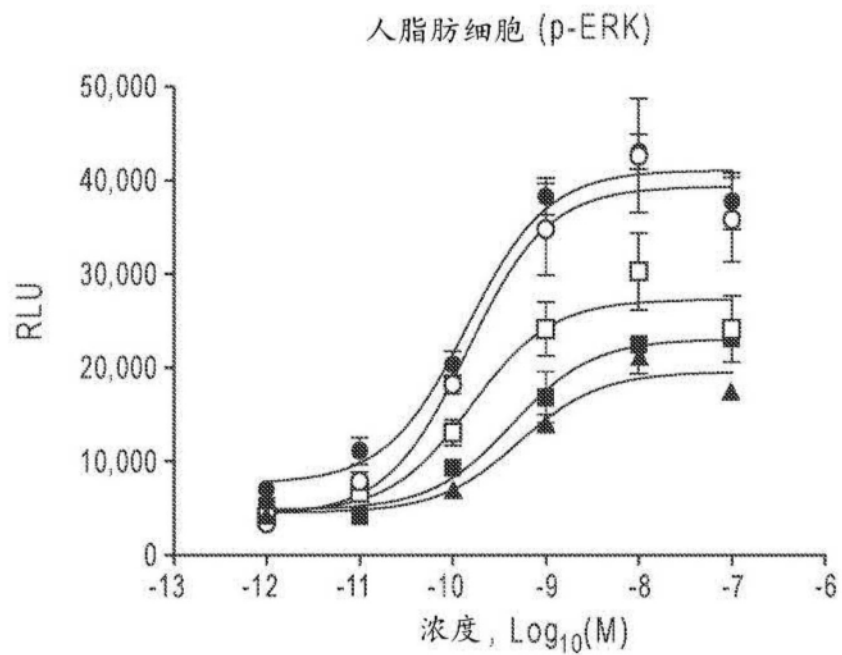


图23



	EC50 (M)	FGF21的 活性%
● His.hFGF21	1.4E-10	100.0
○ F1k_scFv6-LK30, IgG1 PVA	1.4E-10	95.2
■ F1k_Fab6-LK15, IgG1 PVA	4.3E-10	50.7
□ F1k_scFv6-LK30, IgG4 S108P	1.6E-10	62.2
▲ F1k_Fab6-LK15, IgG4 S108P	5.1E-10	41.1

图24