



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117886928 A

(43) 申请公布日 2024.04.16

(21) 申请号 202311710523.0

(51) Int.Cl.

(22) 申请日 2018.01.05

C07K 16/00 (2006.01)

### (30) 优先权数据

62/443495 2017.01.06 US

62/510228 2017.05.23 US

62/589473 2017.11.21 US

### (62) 分案原申请数据

201880016496.8 2018.01.05

(71) 申请人 动量制药公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 C.J.博斯克斯 J.C.兰辛

D.奥尔蒂斯

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

专利代理人 罗文锋 彭昶

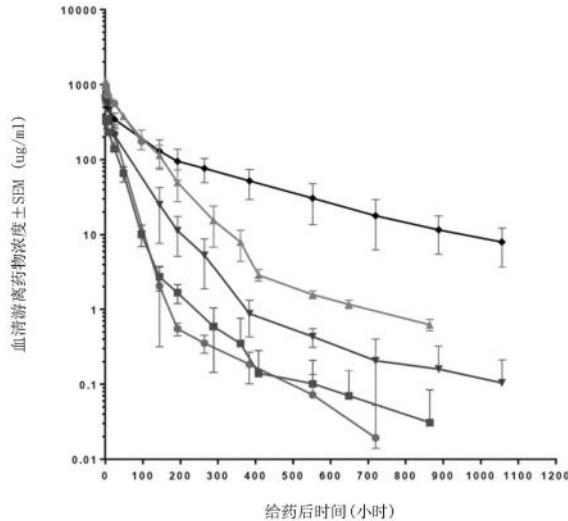
权利要求书2页 说明书72页  
序列表(电子公布) 附图55页

### (54) 发明名称

与经工程改造的Fc构建体相关的组合物和方法

### (57) 摘要

本公开涉及与经工程改造的Fc构建体相关的组合物和方法。本公开涉及经工程改造的IgGFc构建体及其用途。



1. 一种Fc构建体,所述Fc构建体包含:

- a) 第一多肽,所述第一多肽包含
  - i) . 第一Fc结构域单体;
  - ii) . 第二Fc结构域单体;以及
  - iii) . 将所述第一Fc结构域单体连接至所述第二Fc结构域单体的接头;
- b) 第二多肽,所述第二多肽包含
  - i) . 第三Fc结构域单体;
  - ii) . 第四Fc结构域单体;以及
  - iii) . 将所述第三Fc结构域单体连接至所述第四Fc结构域单体的接头;
- c) 第三多肽,所述第三多肽包含第五Fc结构域单体;以及
- d) 第四多肽,所述第四多肽包含第六Fc结构域单体;

其中所述第一Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体组合形成第一Fc结构域;所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体组合形成第二Fc结构域;并且所述第三Fc结构域单体和所述第六Fc结构域单体组合形成第三Fc结构域;所述第一多肽和所述第二多肽中的每个包含以下序列:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT  
KPP  
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLT  
KNQVSLWCL  
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK  
SLSLS  
PGKGGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTC  
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV  
KFNWYVDGVEVHNAKT  
KPP  
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY  
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG  
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTV  
DKSRWQQGNVFSC  
SVMHEALHNHYTQK  
SLSLSPG (SEQ ID NO: 76); 并且所述第三多肽和所述第四多肽中的每个包含以下序列:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT  
KPP  
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV  
CTLPPSRDELTKNQVSL  
SCA  
VDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL  
VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK  
SLSLS  
PG (SEQ ID NO: 70)。

2. 一种Fc构建体,所述Fc构建体包含:

- a) 第一多肽,所述第一多肽包含
  - i) . 第一Fc结构域单体;
  - ii) . 第二Fc结构域单体;以及
  - iii) . 将所述第一Fc结构域单体连接至所述第二Fc结构域单体的接头;
- b) 第二多肽,所述第二多肽包含
  - i) . 第三Fc结构域单体;
  - ii) . 第四Fc结构域单体;以及
  - iii) . 将所述第三Fc结构域单体连接至所述第四Fc结构域单体的接头;
- c) 第三多肽,所述第三多肽包含第五Fc结构域单体;以及
- d) 第四多肽,所述第四多肽包含第六Fc结构域单体;

其中所述第一Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体组合形成第一Fc结构域,所述第

二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体组合形成第二Fc结构域,并且所述第三Fc结构域单体和所述第六Fc结构域单体组合形成第三Fc结构域,并且其中至少一个Fc结构域单体包含位置I253处的氨基酸置换。

3. 如权利要求2所述的Fc构建体,其中所述第一Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体中的一者或两者包含位置I253处的氨基酸置换。

4. 如权利要求2或权利要求3所述的Fc构建体,其中所述第二Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体中的一者或两者包含位置I253处的氨基酸置换。

5. 如权利要求2至权利要求4中任一项所述的Fc构建体,其中所述第三Fc结构域单体和所述第六Fc结构域单体中的一者或两者包含位置I253处的氨基酸置换。

6. 如权利要求2至权利要求5中任一项所述的Fc构建体,其中位置I253处的每种氨基酸置换独立地选自I253A、I253C、I253D、I253E、I253F、I253G、I253H、I253I、I253K、I253L、I253M、I253N、I253P、I253Q、I253R、I253S、I253T、I253V、I253W和I253Y。

7. 如权利要求6所述的Fc构建体,其中位置I253处的每种氨基酸置换为I253A。

8. 如权利要求2至权利要求7中任一项所述的Fc构建体,其中至少一个Fc结构域单体包含位置R292处的氨基酸置换。

9. 如权利要求2至权利要求8中任一项所述的Fc构建体,其中所述第一Fc结构域包含位置R292处的氨基酸置换。

10. 如权利要求2至权利要求9中任一项所述的Fc构建体,其中所述第二Fc结构域包含位置R292处的氨基酸置换。

## 与经工程改造的Fc构建体相关的组合物和方法

[0001] 本申请为分案申请,原申请的申请日为2018年1月5日,申请号为201880016496.8 (PCT/US2018/012488),发明名称为“与经工程改造的Fc构建体相关的组合物和方法”。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本专利申请要求2017年1月6日提交的美国临时申请号62/443,495、2017年5月23日提交的美国临时申请号62/510,228和2017年11月21日提交的美国临时申请号62/589,473的申请日的权益。这些专利申请中的每个的内容以引用的方式整体并入本文。

### 背景技术

[0004] 治疗性蛋白质,例如治疗性抗体和Fc-融合蛋白,已迅速成为患有免疫疾病和炎性疾病、癌症和感染的患者的临幊上重要的药物类别。

### 发明内容

[0005] 本公开的特征在于含有生物活性Fc结构域的治疗构建体。此类构建体可以具有Fc受体的期望血清半衰期和/或结合亲和力和/或亲合力。

[0006] 一般而言,本公开的特征在于具有2-10个Fc结构域的Fc构建体,例如具有2、3、4、5、6、7、8、9或10个Fc结构域的Fc构建体。在一些实施方案中,Fc构建体包括2-10个Fc结构域、2-5个Fc结构域、2-4个Fc结构域、2-3个Fc结构域、3-5个Fc结构域、2-8个Fc结构域或2-6个Fc结构域。在一些实施方案中,Fc构建体包括2-4个Fc结构域。在一些实施方案中,Fc构建体包括5-10个Fc结构域(例如,5-6、5-7、5-8、5-9或5-10个Fc结构域)。

[0007] 在一些实施方案中,本公开的构建体(例如,具有2-4个Fc结构域,例如2、3或4个Fc结构域的Fc构建体)和同质药物组合物(例如,含有具有2-4个Fc结构域,例如2、3或4个Fc结构域的Fc构建体的那些)可用于例如减少受试者中的炎症,促进受试者中自身抗体的清除,压制受试者中的抗原呈递,阻断免疫应答,例如阻断受试者中基于免疫复合物的免疫应答的活化,并且治疗受试者中的免疫疾病和炎性疾病(例如,自身免疫疾病)。本文所述的Fc构建体可以用于治疗患有免疫疾病和炎性疾病而无免疫细胞的显著刺激的患者。在一些实施方案中,本公开的构建体(例如,具有5-10个Fc结构域,例如5、6、7、8、9或10个Fc结构域的Fc构建体)和同质药物组合物(例如,含有具有5-10个Fc结构域,例如5、6、7、8、9或10个Fc结构域的Fc构建体的那些)可用于例如诱导受试者中免疫应答的免疫细胞活化,增加受试者中的靶细胞(即,癌细胞或受感染的细胞)的吞噬作用,且治疗受试者中的疾病如癌症和感染。

[0008] 这些构建体的性质允许有效生成基本上同质的组合物。组合物的同质性程度影响组合物的药代动力学和体内性能。组合物中的此类同质性是期望的,以便确保组合物的安全性、功效、均匀性和可靠性。本公开的Fc构建体可以是基本上同质的(例如,至少85%、90%、95%、98%或99%同质的)组合物或群体的形式。

[0009] 如本文进一步详细描述的,本公开的特征在于含有Fc构建体的基本上同质的组合物,所述Fc构建体都具有相同数目的Fc结构域,以及制备此类基本上同质的组合物的方法。

[0010] 在第一方面,本公开的特征在于Fc构建体,所述Fc构建体包含a)第一多肽,所述第

一多肽包含i) 第一Fc结构域单体；ii) 第二Fc结构域单体和iii) 将第一Fc结构域单体连接至第二Fc结构域单体的接头；b) 第二多肽，所述第二多肽包含i) 第三Fc结构域单体；ii) 第四Fc结构域单体和iii) 将第三Fc结构域单体连接至第四Fc结构域单体的接头；c) 第三多肽，所述第三多肽包含第五Fc结构域单体以及d) 第四多肽，所述第四多肽包含第六Fc结构域单体；其中第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体组合形成第一Fc结构域，第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体组合形成第二Fc结构域，并且第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体组合形成第三Fc结构域，并且其中第一多肽和第二多肽中的每个包含以下序列：DK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNNAKTKPPEEQYNS TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG GGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWY DGVEVHNNAKTKPPEEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 76)，并且第三多肽和第四多肽中的每个包含以下序列：DKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNNAKTKPPEEQYNST YRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVDGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 70)。

[0011] 在另一个方面，本公开的特征在于Fc构建体，所述Fc构建体包含a) 第一多肽，所述第一多肽包含i) 第一Fc结构域单体；ii) 第二Fc结构域单体和iii) 将第一Fc结构域单体连接至第二Fc结构域单体的接头；b) 第二多肽，所述第二多肽包含i) 第三Fc结构域单体；ii) 第四Fc结构域单体和iii) 将第三Fc结构域单体连接至第四Fc结构域单体的接头；c) 第三多肽，所述第三多肽包含第五Fc结构域单体以及d) 第四多肽，所述第四多肽包含第六Fc结构域单体；其中第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体组合形成第一Fc结构域，第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体组合形成第二Fc结构域，并且第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体组合形成第三Fc结构域，并且其中至少一个Fc结构域包含位置I253处的氨基酸修饰(例如，位置I253处的单一氨基酸修饰)。在另一个方面，本公开的特征在于Fc构建体，所述Fc构建体包含a) 第一多肽，所述第一多肽包含i) 第一Fc结构域单体；ii) 第二Fc结构域单体和iii) 将第一Fc结构域单体连接至第二Fc结构域单体的接头；b) 第二多肽，所述第二多肽包含i) 第三Fc结构域单体；ii) 第四Fc结构域单体和iii) 将第三Fc结构域单体连接至第四Fc结构域单体的接头；c) 第三多肽，所述第三多肽包含第五Fc结构域单体以及d) 第四多肽，所述第四多肽包含第六Fc结构域单体；其中第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体组合形成第一Fc结构域，第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体组合形成第二Fc结构域，并且第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体组合形成第三Fc结构域，并且其中至少一个Fc结构域单体包含位置I253处的氨基酸置换。

[0012] 在一些情况下，第一多肽和第二多肽是彼此相同的，并且第三多肽和第四多肽是彼此相同的。在一些实施方案中，第一Fc结构域包含位置I253处的氨基酸修饰。在一些情况下，第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体中的一者或两者包含位置I253处的氨基酸置换。在一些实施方案中，第二Fc结构域包含位置I253处的氨基酸修饰。在一些实施方案中，

第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体中的一者或两者包含位置I253处的氨基酸置换。在一些实施方案中,第三Fc结构域包含位置I253处的氨基酸修饰。在一些实施方案中,第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体中的一者或两者包含位置I253处的氨基酸置换。在一些实施方案中,位置I253处的每种氨基酸修饰(例如,置换)独立地选自I253A、I253C、I253D、I253E、I253F、I253G、I253H、I253I、I253K、I253L、I253M、I253N、I253P、I253Q、I253R、I253S、I253T、I253V、I253W和I253Y。在一些实施方案中,位置I253处的每种氨基酸修饰(例如,置换)为I253A。在一些实施方案中,Fc构建体(例如,至少一个Fc结构域单体)包含位置R292处的至少一种氨基酸修饰。在一些实施方案中,至少一个Fc结构域单体包含位置R292处的氨基酸置换。在一些实施方案中,第一Fc结构域包含位置R292处的氨基酸修饰。在一些实施方案中,第一Fc结构域(例如,第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体中的一者或两者)包含位置R292处的氨基酸置换。在一些实施方案中,第二Fc结构域包含位置R292处的氨基酸修饰。在一些实施方案中,第二Fc结构域(例如,第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体中的一者或两者)包含位置R292处的氨基酸置换。在一些实施方案中,第三Fc结构域包含位置R292处的氨基酸修饰。在一些实施方案中,第三Fc结构域(例如,第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体中的一者或两者)包含位置R292处的氨基酸置换。在一些实施方案中,第一Fc结构域、第二Fc结构域和第三Fc结构域中的每个包含位置R292处的氨基酸修饰(例如,置换)。在一些情况下,第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体中的一者或两者包含位置R292处的氨基酸置换,第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体中的一者或两者包含位置R292处的氨基酸置换,并且第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体中的一者或两者包含位置R292处的氨基酸置换。在一些实施方案中,第一Fc结构域、第二Fc结构域和第三Fc结构域中的每个包含氨基酸修饰(例如,置换)R292P。在一些实施方案中,位置R292处的每种氨基酸修饰(例如,置换)独立地选自R292D、R292E、R292L、R292P、R292Q、R292R、R292T和R292Y。在一些实施方案中,位置R292处的每种氨基酸修饰(例如,置换)为R292P。

**[0013]** 在所有方面的一些实施方案中,Fc结构域中的每个基于人IgG1 Fc序列,并且包含本文描述的修饰(即,是人IgG Fc序列的变体)。在一些实施方案中,基础IgG1 Fc序列为SEQ ID NO:42,并且包含最多10个单一氨基酸修饰。在一些实施方案中,本文描述的Fc构建体的Fc结构域中的每个为具有最多10个单一氨基酸修饰的IgG1 Fc序列(例如,SEQ ID NO:42)。在一些实施方案中,IgG1 Fc序列为SEQ ID NO:42,并且包含控制多肽的组装的经工程改造的空腔、经工程改造的突起的修饰和/或静电转向修饰;和/或改变构建体的药代动力学的结合相关突变的修饰,如本文所述。因此,最多10个单一氨基酸修饰可以包括I253(例如,I253A)和R292(例如,R292P)中的一者或两者处的修饰(例如,置换)以及提供经工程改造的空腔和经工程改造的突起的修饰(例如,置换)和/或控制多肽的组装的修饰。在一些情况下,除I253和R292中的一者或两者处的置换之外,每个Fc结构域单体还包含最多10个、9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个单一氨基酸修饰。提供经工程改造的空腔、经工程改造的突起的修饰和/或控制多肽的组装的静电转向修饰优选地在Fc结构域的一个或多个CH3结构域中。

**[0014]** 在另一个方面,本公开的特征在于Fc构建体,所述Fc构建体包含a)第一多肽,所述第一多肽包含i)第一Fc结构域单体;ii)第二Fc结构域单体和iii)将第一Fc结构域单体连接至第二Fc结构域单体的接头;b)第二多肽,所述第二多肽包含i)第三Fc结构域单体;ii)

第四Fc结构域单体和iii)将第三Fc结构域单体连接至第四Fc结构域单体的接头;c)第三多肽,所述第三多肽包含第五Fc结构域单体以及d)第四多肽,所述第四多肽包含第六Fc结构域单体;其中第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体组合形成第一Fc结构域,第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体组合形成第二Fc结构域,并且第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体组合形成第三Fc结构域,并且其中至少一个Fc结构域包含位置R292处的氨基酸修饰(例如,单一氨基酸修饰)。在另一个方面,本公开的特征在于Fc构建体,所述Fc构建体包含a)第一多肽,所述第一多肽包含i)第一Fc结构域单体;ii)第二Fc结构域单体和iii)将第一Fc结构域单体连接至第二Fc结构域单体的接头;b)第二多肽,所述第二多肽包含i)第三Fc结构域单体;ii)第四Fc结构域单体和iii)将第三Fc结构域单体连接至第四Fc结构域单体的接头;c)第三多肽,所述第三多肽包含第五Fc结构域单体以及d)第四多肽,所述第四多肽包含第六Fc结构域单体;其中第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体组合形成第一Fc结构域,第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体组合形成第二Fc结构域,并且第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体组合形成第三Fc结构域,并且其中至少一个Fc结构域单体包含位置R292处的氨基酸置换。

[0015] 在一些实施方案中,第一Fc结构域包含位置R292处的氨基酸修饰。在一些实施方案中,第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体中的一者或两者包含位置R292处的氨基酸置换。在一些实施方案中,第二Fc结构域包含位置R292处的氨基酸修饰。在一些实施方案中,第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体中的一者或两者包含位置R292处的氨基酸置换。在一些实施方案中,第三Fc结构域包含位置R292处的氨基酸修饰。在一些实施方案中,第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体中的一者或两者包含位置R292处的氨基酸置换。在一些实施方案中,第一Fc结构域、第二Fc结构域和第三Fc结构域中的每个包含位置R292处的氨基酸修饰(例如,置换)。在一些实施方案中,第一Fc结构域、第二Fc结构域和第三Fc结构域中的每个包含氨基酸修饰(例如,置换)R292P(即,每个Fc单体具有R292P修饰,例如与SEQ ID N0:42相比)。在一些实施方案中,第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换R292P,第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换R292P,并且第三Fc结构域单体和第六中的一者或两者包含氨基酸置换R292P。

[0016] 在一些实施方案中,位置R292处的每种氨基酸修饰(例如,置换)独立地选自R292D、R292E、R292L、R292P、R292Q、R292R、R292T或R292Y。在一些实施方案中,位置R292处的每种氨基酸修饰(例如,置换)为R292P。在一些实施方案中,第一Fc结构域和第三Fc结构域包含氨基酸修饰(例如,置换)I253A,并且第一Fc结构域、第二Fc结构域和第三Fc结构域中的每个包含氨基酸修饰(例如,置换)R292P。在一些实施方案中,第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换I253A,并且第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换I253A,第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换R292P,第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换R292P,并且第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换R292P。在一些实施方案中,第一Fc结构域、第二Fc结构域和第三Fc结构域中的每个包含氨基酸修饰(例如,置换)I253A和R292P。在一些实施方案中,第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换I253A,第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换I253A,并且第三Fc结构域单体和第六

Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换I253A,第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换R292P,第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换R292P,并且第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换R292P。

[0017] 在一些实施方案中,每个Fc结构域的序列基于具有不超过十个单一氨基酸修饰的人IgG1 Fc结构域序列。在一些实施方案中,每个Fc结构域的序列基于具有不超过十个单一氨基酸修饰的SEQ ID NO:42。

[0018] 在一些实施方案中,第一Fc结构域和第三Fc结构域中的每个包含氨基酸置换I253A和R292P,并且第二Fc结构域包含氨基酸置换R292P。在一些情况下,第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换I253A;第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换R292P;第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换I253A;第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换R292P;并且第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换R292P。

[0019] 在一些实施方案中,第二Fc结构域包含氨基酸置换I253A。在一些实施方案中,第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换I253A。在一些实施方案中,第一Fc结构域和第三Fc结构域中的每个包含氨基酸置换I253A。在一些实施方案中,第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换I253A,并且第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换I253A。在一些实施方案中,第一Fc结构域、第二Fc结构域和第三Fc结构域中的每个包含氨基酸置换I253A。在一些实施方案中,第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换I253A,第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换I253A,并且第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换I253A。

[0020] 在一些实施方案中,第二Fc结构域包含氨基酸置换R292P。在一些实施方案中,第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换R292P。在一些实施方案中,第二Fc结构域包含氨基酸置换I253A和R292P。在一些实施方案中,第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换I253A,并且第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换R292P。在一些实施方案中,第一Fc结构域和第三Fc结构域中的每个包含氨基酸置换I253A,并且第二Fc结构域包含氨基酸置换R292P。在一些实施方案中,第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换I253A;第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换I253A,并且第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换R292P。

[0021] 在一些实施方案中,第一Fc结构域和第三Fc结构域中的每个包含氨基酸置换I253A,并且第二Fc结构域包含氨基酸置换I253A和R292P。在一些实施方案中,第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换I253A;第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换I253A;第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换I253A;并且第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换R292P。在一些实施方案中,第一Fc结构域和第三Fc结

构域中的每个包含氨基酸置换R292P。在一些实施方案中,第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换R292P,并且第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换R292P。

[0022] 在一些实施方案中,第一Fc结构域和第三Fc结构域包含氨基酸置换R292P,并且第二Fc结构域包含氨基酸置换I253A。在一些实施方案中,第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换R292P;第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换R292P,并且第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换I253A。在一些实施方案中,第一Fc结构域和第三Fc结构域中的每个包含I253A和R292P(例如,包含氨基酸置换I253A和R292P)。在一些实施方案中,第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换I253A;第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换R292P;第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换I253A;并且第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换R292P。

[0023] 在一些实施方案中,第一Fc结构域和第三Fc结构域中的每个包含氨基酸置换I253A和R292P,并且第二Fc结构域包含氨基酸置换I253A。在一些实施方案中,第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换I253A;第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换R292P;第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换I253A;第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换R292P;并且第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换I253A。在一些实施方案中,第一Fc结构域、第二Fc结构域和第三Fc结构域中的每个包含氨基酸置换R292P。在一些实施方案中,第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换R292P,第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换R292P,并且第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换R292P。

[0024] 在一些实施方案中,第一Fc结构域和第三Fc结构域中的每个包含氨基酸置换R292P,并且第二Fc结构域包含氨基酸置换I253A和R292P。在一些实施方案中,第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换R292P;第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换R292P;第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换I253A;并且第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换R292P。在一些实施方案中,第一Fc结构域、第二Fc结构域和第三Fc结构域中的每个包含氨基酸置换I253A和R292P。在一些实施方案中,第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换I253A;第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换R292P;第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换I253A;第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换R292P;第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换I253A;并且第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体中的一者或两者包含氨基酸置换R292P。

[0025] 在一些实施方案中,第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体包含互补的二聚化选择性模块,所述模块促进第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体之间的二聚化。在一些实

施方案中,第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体包含互补的二聚化选择性模块,所述模块促进第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体之间的二聚化。在一些实施方案中,第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体包含互补的二聚化选择性模块,所述模块促进第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体之间的二聚化。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽包含相同的氨基酸序列,由该序列组成或基本上由该序列组成,并且其中第三多肽和第四多肽包含相同的氨基酸序列,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体中的每个包含D399K以及K409D或K409E。在一些实施方案中,第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体中的每个包含K392D和D399K。在一些实施方案中,第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体中的每个包含E357K和K370E。在一些实施方案中,第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体中的每个包含D356K和K439D。在一些实施方案中,第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体中的每个包含K392E和D399K。在一些实施方案中,第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体中的每个包含E357K和K370D。在一些实施方案中,第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体中的每个包含D356K和K439E。在一些实施方案中,第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体中的每个包含S354C和T366W,并且第五Fc结构域单体和第六Fc结构域单体各自包含Y349C、T366S、L368A和Y407V。在一些实施方案中,第三多肽和第四多肽中的每个包含S354C和T366W,并且第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体各自包含Y349C、T366S、L368A和Y407V。在一些实施方案中,第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体中的每个包含E357K或E357R,并且第五Fc结构域单体和第六Fc结构域单体各自包含K370D或K370E。在一些实施方案中,第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体包含K370D或K370E,并且第五Fc结构域单体和第六Fc结构域单体各自包含E357K或E357R。在一些实施方案中,第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体中的每个包含K409D或K409E,并且第五Fc结构域单体和第六Fc结构域单体各自包含D399K或D399R。在一些实施方案中,第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体包含D399K或D399R,并且第五Fc结构域单体和第六Fc结构域单体各自包含K409D或K409E。

[0026] 在一些实施方案中,接头(例如,间隔物)包含具有以下序列的多肽:GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:23)、GGGGS (SEQ ID NO:1)、GGSG (SEQ ID NO:2)、SGGG (SEQ ID NO:3)、GSGS (SEQ ID NO:4)、GSGSGS (SEQ ID NO:5)、GSGSGSGS (SEQ ID NO:6)、GSGSGSGSGS (SEQ ID NO:7)、GSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO:8)、GGSGGS (SEQ ID NO:9)、GGSGGGSGGS (SEQ ID NO:10)、GGSGGGSGGS (SEQ ID NO:11)、GGSGGGSG (SEQ ID NO:12)、GGSGGGSGGGSG (SEQ ID NO:13)、GGSGGGSGGGSGGGSG (SEQ ID NO:14)、GGSGGGSGGGSGGGGGSGGGSG (SEQ ID NO:80)、GENLYFQSGG (SEQ ID NO:28)、SACYCELS (SEQ ID NO:29)、RSIAT (SEQ ID NO:30)、RPACKIPNDLKQKVMNH (SEQ ID NO:31)、GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTA GGTGSGSGTGSG (SEQ ID NO:32)、AAANSSIDLISVPVDSR (SEQ ID NO:33)、GGSGGGSEGGGSEGGGS EGGGSEGGGSEGGGSGGG (SEQ ID NO:34)、GGGSGGGSGGG (SEQ ID NO:35)、SGGGSGGGSGGGSGGG (SEQ ID NO:18)、GGSGGGSGGGSGGG (SEQ ID NO:36)、GGGG (SEQ ID NO:19)、GGGGGGGG (SEQ ID NO:20)、GGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:21)或GGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:22)。在其他实施方案中,本文描述的Fc构建体中的一个或多个接头是间隔物,例如具有2-200个氨基酸(例如,2-100、3-200、3-150、3-100、3-60、3-50、3-40、3-30、3-20、3-10、3-8、3-5、4-30、5-30、6-30、8-30、10-20、10-30、12-30、14-30、20-30、15-25、15-30、

18-22和20-30个氨基酸)的氨基酸间隔物。在一些情况下,氨基酸间隔物仅包括甘氨酸、仅包括丝氨酸、或仅包括丝氨酸和甘氨酸。在一些实施方案中,氨基酸间隔物仅包含甘氨酸。

**[0027]** 在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含以下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPCRDKLTQKSLQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGGGGGDKTHCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVVLKSDGSFFLYS DLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:78)。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个(9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的以下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP PEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDQLTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGKGGGGGGGGGGGGGGGGGGGDKTHCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVVLKSDGSFFLYSDLTVVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:78)。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含在接头外部(例如,子序列GGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:23)外部)的区域中具有最多10个(例如,不超过1个、不超过2个、不超过3个、不超过4个、不超过5个、不超过6个、不超过7个、不超过8个、不超过9个)单一氨基酸修饰的SEQ ID NO:78的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成。SEQ ID NO:78内的接头可以被替代性接头替换。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的SEQ ID NO:78的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID NO:78的位置33为丙氨酸,SEQ ID NO:78的位置72为脯氨酸,并且SEQ ID NO:78的位置319为脯氨酸即可。

**[0028]** 在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含以下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPCRDKLTQKSLQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGGGDKTHCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVVLKSDGSFFLYS DLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:49)。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个(例如,最多9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID NO:49,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的SEQ ID NO:49的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要所述最多10个(例如,不超过1个、不超过2个、不超过3个、不超过4个、不超过5个、不超过6

个、不超过7个、不超过8个、不超过9个)单一氨基酸修饰都不在接头外部(例如,子序列GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:23)外部)的区域中即可。SEQ ID NO:49内的接头可以被替代性接头替换。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的SEQ ID NO:49的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID NO:49的位置134为半胱氨酸,SEQ ID NO:49的位置137为赖氨酸,SEQ ID NO:49的位置146为色氨酸,SEQ ID NO:49的位置426为赖氨酸,并且SEQ ID NO:49的位置436为天冬氨酸即可。

[0029] 在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含以下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPCRDKLTQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS DLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:62)。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个(例如,最多9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID NO:62,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含在接头外部(例如,子序列GGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:23)外部)的区域中具有最多10个(例如,不超过1个、不超过2个、不超过3个、不超过4个、不超过5个、不超过6个、不超过7个、不超过8个、不超过9个)单一氨基酸修饰的SEQ ID NO:62的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成。SEQ ID NO:62内的接头可以被替代性接头替换。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的SEQ ID NO:62的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID NO:62的位置134为半胱氨酸,SEQ ID NO:62的位置137为赖氨酸,SEQ ID NO:62的位置146为色氨酸,SEQ ID NO:62的位置280为丙氨酸,SEQ ID NO:62的位置426为赖氨酸,并且SEQ ID NO:62的位置436为天冬氨酸即可。

[0030] 在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含以下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPCRDKLTQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS DLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:64)。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个(例如,不超过1个、不超过2个、不超过3个、不超过4个、不超过5个、不超过6个、不超过7个、不超过8个、不超过9个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的SEQ ID NO:64的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含在接头外部(例如,子序列GGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:23)外部)的区域中具有最多10个单一氨基酸修饰的

SEQ ID NO:64的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成。SEQ ID NO:64内的接头可以被替代性接头替换。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的SEQ ID NO:64的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID NO:64的位置33为丙氨酸即可。

[0031] 在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含以下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPCRDQLTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVVLKSDGSFFLYS DLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:65)。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个(例如,最多9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID NO:65,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含在接头(例如,子序列GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:23))外部的区域中具有最多10个(例如,不超过1个、不超过2个、不超过3个、不超过4个、不超过5个、不超过6个、不超过7个、不超过8个、不超过9个)单一氨基酸修饰的SEQ ID NO:65的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成。SEQ ID NO:65内的接头可以被替代性接头替换。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的SEQ ID NO:65的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID NO:65的位置33为丙氨酸,SEQ ID NO:65的位置134为半胱氨酸,SEQ ID NO:65的位置137为赖氨酸,SEQ ID NO:65的位置146为色氨酸,SEQ ID NO:65的位置280为丙氨酸,SEQ ID NO:65的位置426为赖氨酸,并且SEQ ID NO:65的位置436为天冬氨酸即可。

[0032] 在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含以下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPCRDQLTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVVLKSDGSFFLYS DLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:66)。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个(例如,不超过1个、不超过2个、不超过3个、不超过4个、不超过5个、不超过6个、不超过7个、不超过8个、不超过9个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID NO:66,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含在接头外部(例如,子序列GGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:23)外部)的区域中具有最多10个单一氨基酸修饰的SEQ ID NO:66的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成。SEQ ID NO:66内的接头可以被替代性接头替换。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个

单一氨基酸修饰的SEQ ID NO:66的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID NO:66的位置134为半胱氨酸,SEQ ID NO:66的位置137为赖氨酸,SEQ ID NO:66的位置146为色氨酸,SEQ ID NO:66的位置319为脯氨酸,SEQ ID NO:66的位置426为赖氨酸,并且SEQ ID NO:66的位置436为天冬氨酸即可。

[0033] 在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含以下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPCRDQLTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVVLKSDGSFFLYS DLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:67)。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个(例如,最多9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID NO:67,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含在接头(例如,子序列GGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:23))外部的区域中具有最多10个(例如,不超过1个、不超过2个、不超过3个、不超过4个、不超过5个、不超过6个、不超过7个、不超过8个、不超过9个)单一氨基酸修饰的SEQ ID NO:67的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成。SEQ ID NO:67内的接头可以被替代性接头替换。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的SEQ ID NO:67的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID NO:67的位置134为半胱氨酸,SEQ ID NO:67的位置137为赖氨酸,SEQ ID NO:67的位置146为色氨酸,SEQ ID NO:67的位置280为丙氨酸,SEQ ID NO:67的位置318为脯氨酸,SEQ ID NO:67的位置426为赖氨酸,并且SEQ ID NO:67的位置436为天冬氨酸即可。

[0034] 在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含以下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPCRDQLTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVVLKSDGSFFLYS DLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:68)。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个(例如,最多9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID NO:68,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含在接头(例如,子序列GGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:23))外部的区域中具有最多10个(例如,不超过1个、不超过2个、不超过3个、不超过4个、不超过5个、不超过6个、不超过7个、不超过8个、不超过9个)单一氨基酸修饰的SEQ ID NO:68的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成。SEQ ID NO:68内的接头可以被替代性接头替换。在一些实施方案中,第一多肽和第二

多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的SEQ ID N0:68的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID N0:68的位置33为丙氨酸,SEQ ID N0:68的位置134为半胱氨酸,SEQ ID N0:68的位置137为赖氨酸,SEQ ID N0:68的位置146为色氨酸,SEQ ID N0:68的位置319为脯氨酸,SEQ ID N0:68的位置426为赖氨酸,并且SEQ ID N0:68的位置436为天冬氨酸即可。

**[0035]** 在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含以下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSCHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLTQNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGGGDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSCHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTQNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID N0:69)。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个(例如,最多9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID N0:69,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含在接头(例如,子序列GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID N0:23))外部的区域中具有最多10个(例如,不超过1个、不超过2个、不超过3个、不超过4个、不超过5个、不超过6个、不超过7个、不超过8个、不超过9个)单一氨基酸修饰的SEQ ID N0:69的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成。SEQ ID N0:69内的接头可以被替代性接头替换。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的SEQ ID N0:69的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID N0:69的位置33为丙氨酸,SEQ ID N0:69的位置134为半胱氨酸,SEQ ID N0:69的位置137为赖氨酸,SEQ ID N0:69的位置146为色氨酸,SEQ ID N0:69的位置280为丙氨酸,SEQ ID N0:69的位置319为脯氨酸,SEQ ID N0:69的位置426为赖氨酸,并且SEQ ID N0:69的位置436为天冬氨酸即可。

**[0036]** 在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含以下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDLMISRTPEVTCVVVDVSCHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTQNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDLMISRTPEVTCVVVDVSCHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTQNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID N0:71)。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个(例如,最多9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID N0:71,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含在接头(例如,子序列GGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID N0:23))外部的区域中具有最多10个(例如,不超过1个、不超过2个、不超过3个、不超过4个、不超过5个、不超过6个、不超过7个、不超过8个、不超过9个)单一氨基酸修饰的SEQ ID N0:71的序列,由该序列组成或基本上由该序列

组成。SEQ ID NO:71内的接头可以被替代性接头替换。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的SEQ ID NO:71的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID NO:71的位置71为脯氨酸,SEQ ID NO:71的位置134为半胱氨酸,SEQ ID NO:71的位置137为赖氨酸,SEQ ID NO:71的位置146为色氨酸,SEQ ID NO:71的位置426为赖氨酸,并且SEQ ID NO:71的位置436为天冬氨酸即可。

[0037] 在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含以下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:72)。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个(例如,最多9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID NO:72,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含在接头(例如,子序列GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:23))外部的区域中具有最多10个(例如,不超过1个、不超过2个、不超过3个、不超过4个、不超过5个、不超过6个、不超过7个、不超过8个、不超过9个)单一氨基酸修饰的SEQ ID NO:72的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成。SEQ ID NO:72内的接头可以被替代性接头替换。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的SEQ ID NO:72的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID NO:72的位置72为脯氨酸,SEQ ID NO:72的位置134为胱氨酸,SEQ ID NO:72的位置137为赖氨酸,SEQ ID NO:72的位置146为色氨酸,SEQ ID NO:72的位置426为赖氨酸,并且SEQ ID NO:72的位置436为天冬氨酸即可。

[0038] 在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含以下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:74)。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个(例如,最多9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID NO:74,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含在接头(例如,子序列GGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:23))外部的区域中具有最多10个(例如,不超过1个、不超过2个、不超过3个、不超过4个、不超过5个、不超过6个、不超过7个、不超过8个、不超过9个)单一氨基酸修饰的SEQ ID NO:74的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成。SEQ ID NO:74内的接头可以被替代性接头替换。在一些实施方案中,第一多肽和第二

多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的SEQ ID NO:74的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID NO:74的位置33为丙氨酸,SEQ ID NO:74的位置72为脯氨酸,SEQ ID NO:74的位置134为半胱氨酸,SEQ ID NO:74的位置137为赖氨酸,SEQ ID NO:74的位置146为色氨酸,SEQ ID NO:74的位置426为赖氨酸,并且SEQ ID NO:74的位置436为天冬氨酸即可。

**[0039]** 在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含以下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDEPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTL PPCRDKLTQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGGGDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMASRT PEVTCVVVDVSHEDEPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS DLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:75)。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个(例如,最多9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID NO:75,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含在接头(例如,子序列GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:23))外部的区域中具有最多10个(例如,不超过1个、不超过2个、不超过3个、不超过4个、不超过5个、不超过6个、不超过7个、不超过8个、不超过9个)单一氨基酸修饰的SEQ ID NO:75的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成。SEQ ID NO:75内的接头可以被替代性接头替换。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的SEQ ID NO:75的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID NO:75的位置33为丙氨酸,SEQ ID NO:75的位置72为脯氨酸,SEQ ID NO:75的位置134为半胱氨酸,SEQ ID NO:75的位置137为赖氨酸,SEQ ID NO:75的位置146为色氨酸,SEQ ID NO:75的位置280为丙氨酸,SEQ ID NO:75的位置426为赖氨酸,并且SEQ ID NO:75的位置436为天冬氨酸即可。

**[0040]** 在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含以下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDEPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTL PPCRDKLTQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMSRT PEVTCVVVDVSHEDEPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS DLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:76)。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个(例如,最多9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID NO:76,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含在接头(例如,子序列GGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:23))外部的区域中具有最多10个(例如,不超过1个、不超过2个、不超过3个、不超过4个、不超过5个、不超过6个、不超过7个、不超过8个、不超过9个)单一氨基酸修饰的SEQ ID NO:76的序列,由该序列组成或基本上由该序列

组成。SEQ ID NO:76内的接头可以被替代性接头替换。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的SEQ ID NO:76的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID NO:76的位置72为脯氨酸,并且SEQ ID NO:76的位置319为脯氨酸即可。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含以下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPCRDKLTQKSLSPGKGGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTQKSLSPG (SEQ ID NO:77)。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个(例如,最多9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID NO:77,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含在接头(例如,子序列GGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:23))外部的区域中具有最多10个(例如,不超过1个、不超过2个、不超过3个、不超过4个、不超过5个、不超过6个、不超过7个、不超过8个、不超过9个)单一氨基酸修饰的SEQ ID NO:77的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成。SEQ ID NO:77内的接头可以被替代性接头替换。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的SEQ ID NO:77的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID NO:77的位置72为脯氨酸,SEQ ID NO:77的位置134为半胱氨酸,SEQ ID NO:77的位置137为赖氨酸,SEQ ID NO:77的位置146为色氨酸,SEQ ID NO:77的位置280为丙氨酸,SEQ ID NO:77的位置319为脯氨酸,SEQ ID NO:77的位置426为赖氨酸,并且SEQ ID NO:77的位置436为天冬氨酸即可。

**[0041]** 在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含以下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKF NWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPCRDQKLTQKSLSPGKGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRT PEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTQKSLSPG (SEQ ID NO:79)。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个(例如,最多9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID NO:79,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含在接头(例如,子序列GGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:23))外部的区域中具有最多10个(例如,不超过1个、不超过2个、不超过3个、不超过4个、不超过5个、不超过6个、不超过7个、不超过8个、不超过9个)单一氨基酸修饰的SEQ ID NO:79的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成。SEQ ID NO:79内的接头可以被替代性接头替换。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的SEQ ID NO:79的序列,由该序列组成或

基本上由该序列组成,只要SEQ ID NO:79的位置33为丙氨酸,SEQ ID NO:79的位置72为脯氨酸,SEQ ID NO:79的位置280为丙氨酸,并且SEQ ID NO:79的位置319为脯氨酸即可。

[0042] 在一些实施方案中,第三多肽和第四多肽中的每个包含以下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:

[0043] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVCTLPPSRDELTQNQVS  
LSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGVFSCVMHEALHNHYTQKS  
LSLSPG (SEQ ID NO:73)。在一些实施方案中,第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个(例如,最多9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID NO:73,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:73,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID NO:73的位置33为丙氨酸,并且SEQ ID NO:73的位置72为脯氨酸即可。

[0044] 在一些实施方案中,第三多肽和第四多肽中的每个包含以下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:

[0045] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVCTLPPSRDELTQNQVS  
LSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGVFSCVMHEALHNHYTQKS  
LSLSPG (SEQ ID NO:61)。在一些实施方案中,第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个(例如,最多9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID NO:61,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:61,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID NO:61的位置129为半胱氨酸,SEQ ID NO:61的位置146为丝氨酸,SEQ ID NO:61的位置148为丙氨酸,SEQ ID NO:61的位置150为天冬氨酸,并且SEQ ID NO:61的位置187为缬氨酸即可。

[0046] 在一些实施方案中,第三多肽和第四多肽中的每个包含以下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:

[0047] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVCTLPPSRDELTQNQVS  
LSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGVFSCVMHEALHNHYTQKS  
LSLSPG (SEQ ID NO:63)。在一些实施方案中,第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个(例如,最多9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID NO:63,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:63,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID NO:63的位置33为丙氨酸即可。

[0048] 在一些实施方案中,第三多肽和第四多肽中的每个包含以下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:

[0049] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVCTLPPSRDELTQNQVS

LSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKS LSLSPG (SEQ ID NO:70)。在一些实施方案中,第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个(例如,最多9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID NO:70,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:70,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID NO:70的位置72为脯氨酸即可。

[0050] 在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含以下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:

[0051] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPPEEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLTQNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKS LSLSPGKGCGGGGGGGGGGGGGGGDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTQNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:78),并且第三多肽和第四多肽中的每个包含以下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVCTLPPSRDELTQNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVS KLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:73)。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个(例如,最多9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID NO:78,由该序列组成或基本上由该序列组成,并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个(9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID NO:73,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:78,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要所述最多10个(例如,不超过1个、不超过2个、不超过3个、不超过4个、不超过5个、不超过6个、不超过7个、不超过8个、不超过9个)单一氨基酸修饰都不在接头(例如,子序列GGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:23))外部的区域中即可。SEQ ID NO:78内的接头可以被替代性接头替换。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:78,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID NO:78的位置33为丙氨酸,SEQ ID NO:78的位置72为脯氨酸,并且SEQ ID NO:78的位置319为脯氨酸即可,并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:73,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID NO:73的位置33为丙氨酸,并且SEQ ID NO:73的位置72为脯氨酸即可。

[0052] 在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含以下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:

[0053] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPPEEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLTQNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKS

LSLSPGKGGGGGGGGGGGGGGGDKTHCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSKLDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:49), 并且第三多肽和第四多肽中的每个包含以下序列, 由该序列组成或基本上由该序列组成:

[0054] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVS LSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG (SEQ ID NO:61)。在一些实施方案中, 第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个(9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如, 置换(例如, 保守置换))的序列SEQ ID NO:49, 由该序列组成或基本上由该序列组成, 并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个(9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如, 置换(例如, 保守置换))的序列SEQ ID NO:61, 由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中, 第一多肽和第二多肽中的每个包含在接头(例如, 子序列GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:23); SEQ ID NO:76内的接头可以被替代性接头替换)外部的区域中具有最多(例如, 不超过1个、不超过2个、不超过3个、不超过4个、不超过5个、不超过6个、不超过7个、不超过8个、不超过9个)单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:49, 由该序列组成或基本上由该序列组成, 并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:61, 由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中, 第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:49, 由该序列组成或基本上由该序列组成, 只要SEQ ID NO:49的位置134为半胱氨酸, SEQ ID NO:49的位置137为赖氨酸, SEQ ID NO:49的位置146为色氨酸, SEQ ID NO:49的位置426为赖氨酸, 并且SEQ ID NO:49的位置436为天冬氨酸即可; 并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:61, 由该序列组成或基本上由该序列组成, 只要SEQ ID NO:61的位置129为半胱氨酸, SEQ ID NO:61的位置146为丝氨酸, SEQ ID NO:61的位置148为丙氨酸, SEQ ID NO:61的位置150为天冬氨酸, 并且SEQ ID NO:61的位置187为缬氨酸即可。

[0055] 在一些实施方案中, 第一多肽和第二多肽中的每个包含以下序列, 由该序列组成或基本上由该序列组成:

[0056] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGKGGGGGGGGGGGGGDKTHCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSKLDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:62), 并且第三多肽和第四多肽中的每个包含以下序列, 由该序列组成或基本上由该序列组成:

[0057] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVS

LSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKS LSLSPG (SEQ ID NO:61)。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个(9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID NO:62,由该序列组成或基本上由该序列组成,并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个(9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID NO:61,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含在接头(例如,子序列GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:23);SEQ ID NO:62内的接头可以被替代性接头替换)外部的区域中具有最多10个(例如,不超过1个、不超过2个、不超过3个、不超过4个、不超过5个、不超过6个、不超过7个、不超过8个、不超过9个)单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:62,由该序列组成或基本上由该序列组成,并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:61,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:62,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID NO:62的位置134为半胱氨酸,SEQ ID NO:62的位置137为赖氨酸,SEQ ID NO:62的位置146为色氨酸,SEQ ID NO:62的位置280为丙氨酸,SEQ ID NO:62的位置426为赖氨酸,并且SEQ ID NO:62的位置436为天冬氨酸即可;并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:61,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID NO:61的位置129为半胱氨酸,SEQ ID NO:61的位置146为丝氨酸,SEQ ID NO:61的位置148为丙氨酸,SEQ ID NO:61的位置150为天冬氨酸,并且SEQ ID NO:61的位置187为缬氨酸即可。

[0058] 在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含以下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:

[0059] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKS LSLSPGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGN VFSCVMHEALHNHYTQKSLSPG (SEQ ID NO:64),并且第三多肽和第四多肽中的每个包含以下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:

[0060] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVCTLPPSRDELTKNQVS LSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKS LSLSPG (SEQ ID NO:63)。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个(9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID NO:64,由该序列组成或基本上由该序列组成,并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个(9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID NO:63,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含在接头(例如,子序列

GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:23) ; SEQ ID NO:64内的接头可以被替代性接头替换) 外部的区域中具有最多10个(例如,不超过1个、不超过2个、不超过3个、不超过4个、不超过5个、不超过6个、不超过7个、不超过8个、不超过9个)单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:64,由该序列组成或基本上由该序列组成,并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:63,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:64,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID NO:64的位置33为丙氨酸即可,并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:63,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID NO:63的位置33为丙氨酸即可。

[0061] 在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含以下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:

[0062] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKS LSLSPGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTQNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:65),并且第三多肽和第四多肽中的每个包含以下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:

[0063] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVCTLPPSRDELTQNQVS LSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKS LSLSPG (SEQ ID NO:63)。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个(9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID NO:65,由该序列组成或基本上由该序列组成,并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个(9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID NO:63,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含在接头(例如,子序列GGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:23) ; SEQ ID NO:65内的接头可以被替代性接头替换)外部的区域中具有最多10个(例如,不超过1个、不超过2个、不超过3个、不超过4个、不超过5个、不超过6个、不超过7个、不超过8个、不超过9个)单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:65,由该序列组成或基本上由该序列组成,并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:63,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:65,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID NO:65的位置33为丙氨酸,SEQ ID NO:65的位置134为半胱氨酸,SEQ ID NO:65的位置137为赖氨酸,SEQ ID NO:65的位置146为色氨酸,SEQ ID NO:65的位置280为丙氨酸,SEQ ID NO:65的位置426为赖氨酸,并且SEQ ID NO:65的位置436为天冬氨酸即可;并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:63,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要

SEQ ID NO:63的位置33为丙氨酸即可。

[0064] 在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含以下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:

[0065] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGGGGDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTQNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:66),并且第三多肽和第四多肽中的每个包含以下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTQNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:61)。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个(9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID NO:66,由该序列组成或基本上由该序列组成,并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个(9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID NO:61,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含在接头(例如,子序列GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:23);SEQ ID NO:66内的接头可以被替代性接头替换)外部的区域中具有最多10个(例如,不超过1个、不超过2个、不超过3个、不超过4个、不超过5个、不超过6个、不超过7个、不超过8个、不超过9个)单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:66,由该序列组成或基本上由该序列组成,并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:61,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:66,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID NO:66的位置134为半胱氨酸,SEQ ID NO:66的位置137为赖氨酸,SEQ ID NO:66的位置146为色氨酸,SEQ ID NO:66的位置319为脯氨酸,SEQ ID NO:66的位置426为赖氨酸,并且SEQ ID NO:66的位置436为天冬氨酸即可;并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:61,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID NO:61的位置129为半胱氨酸,SEQ ID NO:61的位置146为丝氨酸,SEQ ID NO:61的位置148为丙氨酸,SEQ ID NO:61的位置150为天冬氨酸,并且SEQ ID NO:61的位置187为缬氨酸即可。

[0066] 在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含以下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:

[0067] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGGGGDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:66),并且第三多肽和第四多肽中的每个包含以下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTQNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:61)。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个(9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID NO:66,由该序列组成或基本上由该序列组成,并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个(9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID NO:61,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含在接头(例如,子序列GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:23);SEQ ID NO:66内的接头可以被替代性接头替换)外部的区域中具有最多10个(例如,不超过1个、不超过2个、不超过3个、不超过4个、不超过5个、不超过6个、不超过7个、不超过8个、不超过9个)单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:66,由该序列组成或基本上由该序列组成,并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:61,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:66,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID NO:66的位置134为半胱氨酸,SEQ ID NO:66的位置137为赖氨酸,SEQ ID NO:66的位置146为色氨酸,SEQ ID NO:66的位置319为脯氨酸,SEQ ID NO:66的位置426为赖氨酸,并且SEQ ID NO:66的位置436为天冬氨酸即可;并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:61,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID NO:61的位置129为半胱氨酸,SEQ ID NO:61的位置146为丝氨酸,SEQ ID NO:61的位置148为丙氨酸,SEQ ID NO:61的位置150为天冬氨酸,并且SEQ ID NO:61的位置187为缬氨酸即可。

DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPPEEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:67), 并且第三多肽和第四多肽中的每个包含以下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:

[0068] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVCTLPPSDELTKNQVLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPG (SEQ ID NO:61)。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个(9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID NO:67,由该序列组成或基本上由该序列组成,并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个(9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID NO:61,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含在接头(例如,子序列GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:23); SEQ ID NO:67内的接头可以被替代性接头替换)外部的区域中具有最多10个(例如,不超过1个、不超过2个、不超过3个、不超过4个、不超过5个、不超过6个、不超过7个、不超过8个、不超过9个)单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:67,由该序列组成或基本上由该序列组成,并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:61,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:67,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID NO:67的位置134为半胱氨酸,SEQ ID NO:67的位置137为赖氨酸,SEQ ID NO:67的位置146为色氨酸,SEQ ID NO:67的位置280为丙氨酸,SEQ ID NO:67的位置318为脯氨酸,SEQ ID NO:67的位置426为赖氨酸,并且SEQ ID NO:67的位置436为天冬氨酸即可,并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:61,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID NO:61的位置129为半胱氨酸,SEQ ID NO:61的位置146为丝氨酸,SEQ ID NO:61的位置148为丙氨酸,SEQ ID NO:61的位置150为天冬氨酸,并且SEQ ID NO:61的位置187为缬氨酸即可。

[0069] 在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含以下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:

[0070] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVS  
LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS  
LSLSPGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH  
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE  
PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGN  
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID N0:68), 并且第三多肽和第四多肽中的每个包含以  
下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:

[0071] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMAASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAT  
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVCTLPPSDELTKNQVS

LSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKS LSLSPG (SEQ ID NO:63)。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个(9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID NO:68,由该序列组成或基本上由该序列组成,并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个(9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID NO:63,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含在接头(例如,子序列GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:23);SEQ ID NO:68内的接头可以被替代性接头替换)外部的区域中具有最多10个(例如,不超过1个、不超过2个、不超过3个、不超过4个、不超过5个、不超过6个、不超过7个、不超过8个、不超过9个)单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:68,由该序列组成或基本上由该序列组成,并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:63,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:68,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID NO:68的位置33为丙氨酸,SEQ ID NO:68的位置134为半胱氨酸,SEQ ID NO:68的位置137为赖氨酸,SEQ ID NO:68的位置146为色氨酸,SEQ ID NO:68的位置319为脯氨酸,SEQ ID NO:68的位置426为赖氨酸,并且SEQ ID NO:68的位置436为天冬氨酸即可;并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:63,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID NO:63的位置33为丙氨酸即可。

[0072] 在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含以下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:

[0073] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKS LSLSPGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:69),并且第三多肽和第四多肽中的每个包含以下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:

[0074] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVS LSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKS LSLSPG (SEQ ID NO:63)。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个(9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID NO:69,由该序列组成或基本上由该序列组成,并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个(9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID NO:63,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含在接头(例如,子序列GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:23);SEQ ID NO:69内的接头可以被替代性接头替换)

外部的区域中具有最多10个(例如,不超过1个、不超过2个、不超过3个、不超过4个、不超过5个、不超过6个、不超过7个、不超过8个、不超过9个)单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:69,由该序列组成或基本上由该序列组成,并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:63,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:69,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID NO:69的位置33为丙氨酸,SEQ ID NO:69的位置134为半胱氨酸,SEQ ID NO:69的位置137为赖氨酸,SEQ ID NO:69的位置146为色氨酸,SEQ ID NO:69的位置280为丙氨酸,SEQ ID NO:69的位置319为脯氨酸,SEQ ID NO:69的位置426为赖氨酸,并且SEQ ID NO:69的位置436为天冬氨酸即可,并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:63,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID NO:63的位置33为丙氨酸即可。

[0075] 在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含以下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:

[0076] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVS  
LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVHEALHNHYTQKS  
LSLSPGKGKGKGKGKGKGKGKGKGDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVS  
DPEVKGKQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGN  
VFSCSVHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:71),并且第三多肽和第四多肽中的每个包含以下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:

[0077] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS  
LSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVHEALHNHYTQKS  
LSLSPG (SEQ ID NO:70)。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个(9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID NO:71,由该序列组成或基本上由该序列组成,并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个(9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID NO:70,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含在接头(例如,子序列GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:23);SEQ ID NO:71内的接头可以被替代性接头替换)外部的区域中具有最多10个(例如,不超过1个、不超过2个、不超过3个、不超过4个、不超过5个、不超过6个、不超过7个、不超过8个、不超过9个)单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:71,由该序列组成或基本上由该序列组成,并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:70,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:71,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID NO:71的位置71为脯氨酸,SEQ ID NO:71的位置134为半胱氨酸,SEQ ID NO:71的位置137为赖氨酸,SEQ ID NO:71的位置146为色氨酸,SEQ ID NO:71的位置426为赖氨酸,并且SEQ ID NO:71的位置436为天冬氨酸即可,

并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO: 70,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID NO:70的位置72为脯氨酸即可。

[0078] 在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含以下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:

[0079] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVS  
LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS  
LSLSPGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTQNQVS  
LSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS  
LSLSPG (SEQ ID NO:70),并且第三多肽和第四多肽中的每个包含以下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:

[0080] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTQNQVS  
LSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS  
LSLSPG (SEQ ID NO:70)。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个(9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID NO:72,由该序列组成或基本上由该序列组成,并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个(9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID NO:70,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含在接头(例如,子序列GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:23); SEQ ID NO:72内的接头可以被替代性接头替换)外部的区域中具有最多10个(例如,不超过1个、不超过2个、不超过3个、不超过4个、不超过5个、不超过6个、不超过7个、不超过8个、不超过9个)单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:72,由该序列组成或基本上由该序列组成,并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:70,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:70,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID NO:72的位置72为脯氨酸,SEQ ID NO:72的位置134为胱氨酸,SEQ ID NO:72的位置137为赖氨酸,SEQ ID NO:72的位置146为色氨酸,SEQ ID NO:72的位置426为赖氨酸,并且SEQ ID NO:72的位置436为天冬氨酸即可,并且第三多肽和第四多肽中的每个包含序列SEQ ID NO:70,由该序列组成或基本上由该序列组成,该序列具有最多10个单一氨基酸修饰,并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:70,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID NO:70的位置72为脯氨酸即可。

[0081] 在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含以下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:

[0082] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVS  
LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS

LSLSPGKGGGGGGGGGGGGGGGDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 74), 并且第三多肽和第四多肽中的每个包含以下序列, 由该序列组成或基本上由该序列组成:

[0083] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 73)。在一些实施方案中, 第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个(9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如, 置换(例如, 保守置换))的序列SEQ ID NO: 74, 由该序列组成或基本上由该序列组成, 并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个(9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如, 置换(例如, 保守置换))的序列SEQ ID NO: 73, 由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中, 第一多肽和第二多肽中的每个包含在接头(例如, 子序列GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 23); SEQ ID NO: 74内的接头可以被替代性接头替换)外部的区域中具有最多10个(例如, 不超过1个、不超过2个、不超过3个、不超过4个、不超过5个、不超过6个、不超过7个、不超过8个、不超过9个)单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO: 74, 由该序列组成或基本上由该序列组成, 并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO: 73, 由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中, 第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO: 74, 由该序列组成或基本上由该序列组成, 只要SEQ ID NO: 74的位置33为丙氨酸, SEQ ID NO: 74的位置72为脯氨酸, SEQ ID NO: 74的位置134为半胱氨酸, SEQ ID NO: 74的位置137为赖氨酸, SEQ ID NO: 74的位置146为色氨酸, SEQ ID NO: 74的位置426为赖氨酸, 并且SEQ ID NO: 74的位置436为天冬氨酸即可; 并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO: 73, 由该序列组成或基本上由该序列组成, 只要SEQ ID NO: 73的位置33为丙氨酸, 并且SEQ ID NO: 73的位置72为脯氨酸即可。

[0084] 在一些实施方案中, 第一多肽和第二多肽中的每个包含以下序列, 由该序列组成或基本上由该序列组成:

[0085] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGGGGGDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 75), 并且第三多肽和第四多肽中的每个包含以下序列, 由该序列组成或基本上由该序列组成:

[0086] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 76), 并且第三多肽和第四多肽中的每个包含以下序列, 由该序列组成或基本上由该序列组成:

LSLSPG (SEQ ID N0:73)。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个(9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID N0:75,由该序列组成或基本上由该序列组成,并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个(9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID N0:73,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含在接头(例如,子序列GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID N0:23);SEQ ID N0:75内的接头可以被替代性接头替换)外部的区域中具有最多10个(例如,不超过1个、不超过2个、不超过3个、不超过4个、不超过5个、不超过6个、不超过7个、不超过8个、不超过9个)单一氨基酸修饰的序列SEQ ID N0:75,由该序列组成或基本上由该序列组成,并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID N0:73,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID N0:75,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID N0:75的位置33为丙氨酸,SEQ ID N0:75的位置72为脯氨酸,SEQ ID N0:75的位置134为半胱氨酸,SEQ ID N0:75的位置137为赖氨酸,SEQ ID N0:75的位置146为色氨酸,SEQ ID N0:75的位置280为丙氨酸,SEQ ID N0:75的位置426为赖氨酸,并且SEQ ID N0:75的位置436为天冬氨酸即可,并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID N0:73,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID N0:73的位置33为丙氨酸,并且SEQ ID N0:73的位置72为脯氨酸即可。

[0087] 在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含以下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:

[0088] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPPEEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVS  
LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS  
LSLSPGKGGGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE  
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE  
PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGN  
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSPG (SEQ ID NO: 76), 并且第三多肽和第四多肽中的每个包含以  
下序列, 由该序列组成或基本上由该序列组成:

[0089] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
 TKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAGQPREPVQVCTLPPSRDELTKNQVS  
 LSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKS  
 LSLSPG (SEQ ID N0:70)。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多  
 10个(9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守  
 置换))的序列SEQ ID N0:76,由该序列组成或基本上由该序列组成,并且第三多肽和第四  
 多肽中的每个包含具有最多10个(9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸  
 修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID N0:70,由该序列组成或基本上由该序列  
 组成。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含在接头(例如,子序列  
 GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID N0:23);SEQ ID N0:76内的接头可以被替代性接头替换)

外部的区域中具有最多10个(例如,不超过1个、不超过2个、不超过3个、不超过4个、不超过5个、不超过6个、不超过7个、不超过8个、不超过9个)单一氨基酸修饰的序列SEQ ID N0:76,由该序列组成或基本上由该序列组成,并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID N0:70,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID N0:76,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID N0:76的位置72为脯氨酸,并且SEQ ID N0:76的位置319为脯氨酸即可,并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID N0:70,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID N0:70的位置72为脯氨酸即可。

[0090] 在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含以下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:

[0091] DKTHCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPPEEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLTKNQVS  
LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS  
LSLSPGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGDKTHCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTEVTCVVVDVSH  
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE  
PVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVKSRWQQGN  
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSPG (SEQ ID NO: 76), 并且第三多肽和第四多肽中的每个包含以  
下序列, 由该序列组成或基本上由该序列组成:

[0092] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPPKDTLMISRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVCTLPPSRDELTKNQVS  
LSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS  
LSLSPG (SEQ ID NO:70)。

[0093] 在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含以下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:

[0094] DKTHCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVS  
LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS  
LSLSPGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGDKTHCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHE  
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE  
PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGN  
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSPG (SEQ ID NO:77),并且第三多肽和第四多肽中的每个包含以  
下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:

[0095] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
 TKPPEEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAGQPREPVQVCTLPPSDELTKNQVS  
 LSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS  
 LSLSPG (SEQ ID NO: 70)。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多  
 10个(9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守  
 置换))的序列SEQ ID NO:77,由该序列组成或基本上由该序列组成,并且第三多肽和第四

多肽中的每个包含具有最多10个(9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID NO:70,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含在接头(例如,子序列GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG(SEQ ID NO:23);SEQ ID NO:77内的接头可以被替代性接头替换)外部的区域中具有最多10个(例如,不超过1个、不超过2个、不超过3个、不超过4个、不超过5个、不超过6个、不超过7个、不超过8个、不超过9个)单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:77,由该序列组成或基本上由该序列组成,并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:70,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:77,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID NO:77的位置72为脯氨酸,SEQ ID NO:77的位置134为半胱氨酸,SEQ ID NO:77的位置137为赖氨酸,SEQ ID NO:77的位置146为色氨酸,SEQ ID NO:77的位置280为丙氨酸,SEQ ID NO:77的位置319为脯氨酸,SEQ ID NO:77的位置426为赖氨酸,并且SEQ ID NO:77的位置436为天冬氨酸即可,并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:70,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID NO:70的位置72为脯氨酸即可。

[0096] 在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含以下序列,由该序列组成或基本上由该序列组成:

[0097] DKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSPGKGGGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDEPVVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSPG (SEQ ID NO: 79), 并且第三多肽和第四多肽中的每个包含以下序列, 由该序列组成或基本上由该序列组成:

[0098] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAGQPREPVQVCTLPPSDELTKNQVLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID N0:73)。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个(9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID N0:79,由该序列组成或基本上由该序列组成,并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个(9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID N0:73,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含在接头(例如,子序列GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID N0:23); SEQ ID N0:79内的接头可以被替代性接头替换)外部的区域中具有最多10个(例如,不超过1个、不超过2个、不超过3个、不超过4个、不超过5个、不超过6个、不超过7个、不超过8个、不超过9个)单一氨基酸修饰的序列SEQ ID N0:79,由该序列组成或基本上由该序列组成,并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID N0:73,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实

施方案中,第一多肽和第二多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:79,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID NO:79的位置33为丙氨酸,SEQ ID NO:79的位置72为脯氨酸,SEQ ID NO:79的位置280为丙氨酸,并且SEQ ID NO:79的位置319为脯氨酸即可,并且第三多肽和第四多肽中的每个包含具有最多10个单一氨基酸修饰的序列SEQ ID NO:73,由该序列组成或基本上由该序列组成,只要SEQ ID NO:73的位置33为丙氨酸,并且SEQ ID NO:73的位置72为脯氨酸即可。在一些实施方案中,Fc构建体为构建体4、构建体5、构建体6、构建体7、构建体8、构建体9、构建体10、构建体11、构建体12、构建体13、构建体14、构建体15、构建体16、构建体17、构建体18或构建体19。

[0099] 在一些实施方案中,  $\text{Fc}$  构建体为构建体5、构建体6、构建体7、构建体9、构建体10、构建体11、构建体13、构建体14、构建体15、构建体16、构建体17、构建体18或构建体19。

[0100] 在一些实施方案中,第一多肽、第二多肽、第三多肽和/或第四多肽中的每个包含N-末端的D至Q氨基酸置换。

[0101] 在第二方面,本公开的Fc构建体包含(i)第一Fc结构域,所述第一Fc结构域包含第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体,以及(ii)第二Fc结构域,所述第二Fc结构域包含第三Fc结构域单体和第四Fc结构域单体,其中至少一个Fc结构域包含位置I253处的氨基酸修饰。在另一个方面,本公开的Fc构建体包含(i)第一Fc结构域,所述第一Fc结构域包含第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体,以及(ii)第二Fc结构域,所述第二Fc结构域包含第三Fc结构域单体和第四Fc结构域单体,其中至少一个Fc结构域单体包含位置I253处的氨基酸置换。在一些实施方案中,位置I253处的每种氨基酸修饰(例如,置换)独立地选自I253A、I253C、I253D、I253E、I253F、I253G、I253H、I253I、I253K、I253L、I253M、I253N、I253P、I253Q、I253R、I253S、I253T、I253V、I253W和I253Y。在一些实施方案中,位置I253处的氨基酸修饰(例如,置换)为I253A。在一些实施方案中,Fc构建体包含位置R292处的至少一种氨基酸修饰(例如,置换)。在一些实施方案中,位置R292处的氨基酸修饰(例如,置换)选自R292D、R292E、R292L、R292P、R292Q、R292R、R292T和R292Y。在一些实施方案中,位置R292处的氨基酸修饰(例如,置换)为R292P。

(SEQ ID NO:22)。

[0103] 在一些实施方案中,第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体包含互补的二聚化选择性模块,所述模块促进第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体之间的二聚化。在一些实施方案中,第三Fc结构域单体和第四Fc结构域单体包含互补的二聚化选择性模块,所述模块促进第三Fc结构域单体和第四Fc结构域单体之间的二聚化。

[0104] 在另一个方面,本公开提供Fc构建体,所述Fc构建体包含(i)第一Fc结构域,所述第一Fc结构域包含第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体,以及(ii)第二Fc结构域,所述第二Fc结构域包含第三Fc结构域单体和第四Fc结构域单体,其中至少一个Fc结构域包含位置R292处的氨基酸修饰。在另一个方面,本公开提供Fc构建体,所述Fc构建体包含(i)第一Fc结构域,所述第一Fc结构域包含第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体,以及(ii)第二Fc结构域,所述第二Fc结构域包含第三Fc结构域单体和第四Fc结构域单体,其中至少一个Fc结构域单体包含位置R292处的氨基酸置换。在一些实施方案中,位置R292处的每种氨基酸修饰(例如,置换)独立地选自R292D、R292E、R292L、R292P、R292Q、R292R、R292T和R292Y。在一些实施方案中,位置R292处的氨基酸修饰(例如,置换)为R292P。在一些实施方案中,第一Fc结构域单体和第三Fc结构域单体通过接头来连接。

[0105] 在一些实施方案中,第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体通过接头来连接。在一些实施方案中,每种接头独立地选自具有以下序列的多肽:GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:23)、GGGGS (SEQ ID NO:1)、GGSG (SEQ ID NO:2)、SGGG (SEQ ID NO:3)、GSGS (SEQ ID NO:4)、GSGSGS (SEQ ID NO:5)、GSGSGSGS (SEQ ID NO:6)、GSGSGSGSGS (SEQ ID NO:7)、GSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO:8)、GGSGGS (SEQ ID NO:9)、GGSGGSGGS (SEQ ID NO:10)、GGSGGSGGSGGS (SEQ ID NO:11)、GGSGGGSG (SEQ ID NO:12)、GGSGGGSGGGSG (SEQ ID NO:13)、GGSGGGSGGGSGGGSG (SEQ ID NO:14)、GGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSG (SEQ ID NO:15)、GENLYFQSGG (SEQ ID NO:28)、SACYCELS (SEQ ID NO:29)、RSIAT (SEQ ID NO:30)、RPACKIPNDLKQKVMNH (SEQ ID NO:31)、GGSAGGSGSGSSGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG (SEQ ID NO:32)、AAANSSIDLISVPVDSR (SEQ ID NO:33)、GGSGGGSEGGSEGGSEGGSEGGSEGGSGGG (SEQ ID NO:34)、GGGSGGGGSGGG (SEQ ID NO:35)、SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG (SEQ ID NO:18)、GGSGGGSGGGSGGGSGGS (SEQ ID NO:36)、GGGG (SEQ ID NO:19)、GGGGGGGG (SEQ ID NO:20)、GGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:21)或GGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:22)。在一些实施方案中,接头为GGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:23)。

[0106] 在一些实施方案中,第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体包含互补的二聚化选择性模块,所述模块促进第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体之间的二聚化。在一些实施方案中,第三Fc结构域单体和第四Fc结构域单体包含互补的二聚化选择性模块,所述模块促进第三Fc结构域单体和第四Fc结构域单体之间的二聚化。

[0107] 在另一个方面,本公开的特征在于制备本文所述的Fc构建体的方法。该方法包括:a)提供包括编码本公开的多肽的多核苷酸的宿主细胞;b)在允许Fc构建体形成的条件下,在宿主细胞中表达多肽;并且c)回收Fc构建体。

[0108] 在另一个方面,本公开提供Fc构建体,所述Fc构建体包含:a)第一多肽,所述第一多肽包含i).第一Fc结构域单体;ii).第二Fc结构域单体;以及iii).将第一Fc结构域单体连接至第二Fc结构域单体的接头;b)第二多肽,所述第二多肽包含i).第三Fc结构域单体;

ii).第四Fc结构域单体;以及iii).将第三Fc结构域单体连接至第四Fc结构域单体的接头;c).第三多肽,所述第三多肽包含第五Fc结构域单体;以及d).第四多肽,所述第四多肽包含第六Fc结构域单体;其中第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体组合形成第一Fc结构域,第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体组合形成第二Fc结构域,并且第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体组合形成第三Fc结构域,并且其中至少一个Fc结构域包含位置I253处的氨基酸修饰;其中第一多肽和第二多肽中的每个包含以下序列

[0109] DKTHCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPPEEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLTKNQVS  
LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS  
LSLSPGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH  
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE  
PVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGN  
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSPG (SEQ ID NO:78), 并且第三多肽和第四多肽中的每个包含以  
下序列

[0110] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAGQPREPVQVCTLPPSRDELTKNQVS  
LSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS  
LSLSPG (SEQ ID NO:73)。在另一个方面,本公开提供Fc构建体,所述Fc构建体包含:a) 第一  
多肽,所述第一多肽包含i).第一Fc结构域单体;ii).第二Fc结构域单体;以及iii).将第一  
Fc结构域单体连接至第二Fc结构域单体的接头;b) 第二多肽,所述第二多肽包含i).第三  
Fc结构域单体;ii).第四Fc结构域单体;以及iii).将第三Fc结构域单体连接至第四Fc结构  
域单体的接头;c) 第三多肽,所述第三多肽包含第五Fc结构域单体;以及d) 第四多肽,所  
述第四多肽包含第六Fc结构域单体;其中第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体组合形成  
第一Fc结构域,第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体组合形成第二Fc结构域,并且第三  
Fc结构域单体和第六Fc结构域单体组合形成第三Fc结构域,并且其中第一多肽和第二多肽  
中的每个包含以下序列

[0111] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVS  
LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKS  
LSLSPGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE  
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE  
PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGN  
VFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:78), 并且第三多肽和第四多肽中的每个包含以  
下序列

[0112] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:73)。

[0113] 在另一个方面,本公开提供Fc构建体,所述Fc构建体包含a)第一多肽,所述第一多

肽包含i) . 第一Fc结构域单体; ii) . 第二Fc结构域单体; 以及 iii) . 将第一Fc结构域单体连接至第二Fc结构域单体的接头; b) . 第二多肽, 所述第二多肽包含i) . 第三Fc结构域单体; ii) . 第四Fc结构域单体; 以及 iii) . 将第三Fc结构域单体连接至第四Fc结构域单体的接头; c) . 第三多肽, 所述第三多肽包含第五Fc结构域单体; 以及 d) . 第四多肽, 所述第四多肽包含第六Fc结构域单体; 其中第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体组合形成第一Fc结构域, 第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体组合形成第二Fc结构域, 并且第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体组合形成第三Fc结构域, 并且其中至少一个Fc结构域包含位置I253处的氨基酸修饰; 其中第一多肽和第二多肽中的每个包含以下序列

[0114] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWFYVDGVEVHNAK  
TKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVS  
LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKS  
LSLSPGKGKGKGKGKGKGKGKGKGDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWFYVDGVEVHNAK  
DPEVKFNWFYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT  
KQSVSLSLSPG (SEQ ID NO:79), 并且第三多肽和第四多肽中的每个包含以下序列

[0115] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWFYVDGVEVHNAK  
TKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT  
KQSVSLSLSPG (SEQ ID NO:73)。在另一个方面, 本公开提供Fc构建体, 所述Fc构建体包含a) 第一多肽, 所述第一多肽包含i) . 第一Fc结构域单体; ii) . 第二Fc结构域单体; 以及 iii) . 将第一Fc结构域单体连接至第二Fc结构域单体的接头; b) . 第二多肽, 所述第二多肽包含i) . 第三Fc结构域单体; ii) . 第四Fc结构域单体; 以及 iii) . 将第三Fc结构域单体连接至第四Fc结构域单体的接头; c) . 第三多肽, 所述第三多肽包含第五Fc结构域单体; 以及 d) . 第四多肽, 所述第四多肽包含第六Fc结构域单体; 其中第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体组合形成第一Fc结构域, 第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体组合形成第二Fc结构域, 并且第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体组合形成第三Fc结构域, 并且其中第一多肽和第二多肽中的每个包含以下序列

[0116] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWFYVDGVEVHNAK  
TKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVS  
LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKS  
LSLSPGKGKGKGKGKGKGKGKGKGDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWFYVDGVEVHNAK  
DPEVKFNWFYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT  
KQSVSLSLSPG (SEQ ID NO:79), 并且第三多肽和第四多肽中的每个包含以下序列

[0117] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWFYVDGVEVHNAK  
TKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT  
KQSVSLSLSPG (SEQ ID NO:73)。在另一个方面, 本公开提供Fc构建体, 所述Fc构建体包含a) 第一多肽, 所述第一多肽包含i) . 第一Fc结构域单体; ii) . 第二Fc结构域单体; 以及 iii) . 将第一Fc结构域单体连接至第二Fc结构域单体的接头; b) . 第二多肽, 所述第二多肽包含i) . 第三Fc结构域单体; ii) . 第四Fc结构域单体; 以及 iii) . 将第三Fc结构域单体连接至第四Fc结构域单体的接头; c) . 第三多肽, 所述第三多肽包含第五Fc结构域单体; 以及 d) . 第四多肽, 所述第四多肽包含第六Fc结构域单体; 其中第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体组合形成第一Fc结构域, 第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体组合形成第二Fc结构域, 并且第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体组合形成第三Fc结构域, 并且其中第一多肽和第二多肽中的每个包含以下序列

LSLSPG (SEQ ID NO:73)。

[0118] 在另一个方面,本公开提供Fc构建体,所述Fc构建体包含a)第一多肽,所述第一多肽包含i).第一Fc结构域单体;ii).第二Fc结构域单体;以及iii).将第一Fc结构域单体连接至第二Fc结构域单体的接头;b).第二多肽,所述第二多肽包含i).第三Fc结构域单体;ii).第四Fc结构域单体;以及iii).将第三Fc结构域单体连接至第四Fc结构域单体的接头;c).第三多肽,所述第三多肽包含第五Fc结构域单体;以及d).第四多肽,所述第四多肽包含第六Fc结构域单体;其中第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体组合形成第一Fc结构域,第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体组合形成第二Fc结构域,并且第三Fc结构域单体和第六Fc结构域单体组合形成第三Fc结构域,并且其中至少一个Fc结构域包含位置R292处的氨基酸修饰;其中第一多肽和第二多肽中的每个包含以下序列

[0119] DKTHCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPPEEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLTKNQVS  
LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS  
LSLSPGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGKGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH  
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE  
PVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGN  
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSPG (SEQ ID NO: 76), 并且第三多肽和第四多肽中的每个包含以  
下序列

[0120] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAGQPREPVQVCTLPPSRDELTKNQVS  
LSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS  
LSLSPG (SEQ ID NO:70)。在另一个方面,本公开提供Fc构建体,所述Fc构建体包含a)第一多  
肽,所述第一多肽包含i).第一Fc结构域单体;ii).第二Fc结构域单体;以及iii).将第一Fc  
结构域单体连接至第二Fc结构域单体的接头;b).第二多肽,所述第二多肽包含i).第三Fc  
结构域单体;ii).第四Fc结构域单体;以及iii).将第三Fc结构域单体连接至第四Fc结构域  
单体的接头;c).第三多肽,所述第三多肽包含第五Fc结构域单体;以及d).第四多肽,所述  
第四多肽包含第六Fc结构域单体;其中第一Fc结构域单体和第五Fc结构域单体组合形成第  
一Fc结构域,第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体组合形成第二Fc结构域,并且第三Fc  
结构域单体和第六Fc结构域单体组合形成第三Fc结构域,并且其中第一多肽和第二多肽中  
的每个包含以下序列

[0121] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEYQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGCGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEYQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 76), 并且第三多肽和第四多肽中的每个包含以下序列

[0122] DKTHTCPVCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK

TKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQLPPSRDELTQNQVS  
LSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS  
LSLSPG (SEQ ID NO:70)。

[0123] 在本文描述的Fc构建体中的任一者的一些实施方案中,每个Fc结构域独立地为IgG1 Fc结构域、IgG2 Fc结构域、IgG3 Fc结构域、IgG4 Fc结构域或它们的组合。在本文描述的Fc构建体中的任一者的一些实施方案中,每个Fc结构域独立地为具有最多10个(例如,最多1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个)单一氨基酸修饰的IgG1 Fc结构域、IgG2 Fc结构域、IgG3 Fc结构域、IgG4 Fc结构域或它们的组合。在一些实施方案中,每个Fc结构域为IgG1 Fc结构域。在一些实施方案中,每个Fc结构域为IgG2 Fc结构域。在一些实施方案中,每个Fc结构域为IgG3 Fc结构域。在一些实施方案中,第一Fc结构域、第二Fc结构域和第三Fc结构域中的每个为IgG1 Fc结构域。在一些实施方案中,每个Fc结构域为人IgG1 Fc结构域。在一些实施方案中,每个Fc结构域包含具有最多10个(例如,不超过1个、不超过2个、不超过3个、不超过4个、不超过5个、不超过6个、不超过7个、不超过8个、不超过9个)单一氨基酸修饰的SEQ ID NO:42。

[0124] 在本文描述的Fc构建体中的任一者的一些实施方案中,Fc结构域单体中的一者或多者为具有最多十个(例如,最多1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个)氨基酸修饰的人IgG Fc结构域单体。在本文描述的Fc构建体中的任一者的一些实施方案中,每个Fc结构域单体具有不超过十个(例如,不超过1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个)氨基酸修饰。在本文描述的Fc构建体中的任一者的一些实施方案中,每个Fc单体包含具有不超过十个(例如,不超过1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个)氨基酸修饰的SEQ ID NO:42的序列。在本文描述的Fc构建体中的任一者的一些实施方案中,每个Fc单体包含具有5个氨基酸修饰的SEQ ID NO:42的序列。在本文描述的Fc构建体中的任一者的一些实施方案中,每个Fc单体包含具有10个氨基酸修饰的SEQ ID NO:42的序列。在本文描述的Fc构建体中的任一者的一些实施方案中,每个Fc单体包含具有8个氨基酸修饰的SEQ ID NO:42的序列。在每种情况下,修饰可能包括氨基酸置换I253A和R292P中的一者或两者。

[0125] 在另一个方面,本公开的特征在于表达本文所述的Fc构建体的宿主细胞。宿主细胞包括编码本公开的多肽的多核苷酸,其中所述多核苷酸在宿主细胞中表达。

[0126] 在另一个方面,本公开提供包含选自SEQ ID NO:43-79的氨基酸序列的多肽。在另一个方面,本公开提供包含选自SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:61-79的氨基酸序列的多肽。

[0127] 在另一个方面,本公开提供包含序列:SEQ ID NO:78或由该序列组成的组合物以及包含序列:SEQ ID NO:73或由该序列组成的多肽。在另一个方面,本公开提供包含序列:SEQ ID NO:49或由该序列组成的组合物以及包含序列:SEQ ID NO:61或由该序列组成的多肽。在另一个方面,本公开提供包含序列:SEQ ID NO:62或由该序列组成的组合物以及包含序列:SEQ ID NO:61或由该序列组成的多肽。在另一个方面,本公开提供包含序列:SEQ ID NO:64或由该序列组成的组合物以及包含序列:SEQ ID NO:63或由该序列组成的多肽。在另一个方面,本公开提供包含序列:SEQ ID NO:65或由该序列组成的组合物以及包含序列:SEQ ID NO:63或由该序列组成的多肽。在另一个方面,本公开提供包含序列:SEQ ID NO:67或由该序列组成的组合物以及包含序列:SEQ ID NO:61或由该序列组成的多肽。在另一个方面,本公开提供包含序列:SEQ ID NO:68或由该序列组成的组合物以及包含序列:SEQ ID

NO:63或由该序列组成的多肽。在另一个方面,本公开提供包含序列:SEQ ID NO:69或由该序列组成的组合物以及包含序列:SEQ ID NO:63或由该序列组成的多肽。在另一个方面,本公开提供包含序列:SEQ ID NO:72或由该序列组成的组合物以及包含序列:SEQ ID NO:70或由该序列组成的多肽。在另一个方面,本公开提供包含序列:SEQ ID NO:74或由该序列组成的组合物以及包含序列:SEQ ID NO:73或由该序列组成的多肽。在另一个方面,本公开提供包含序列:SEQ ID NO:75或由该序列组成的组合物以及包含序列:SEQ ID NO:73或由该序列组成的多肽。在另一个方面,本公开提供包含序列:SEQ ID NO:77或由该序列组成的组合物以及包含序列:SEQ ID NO:70或由该序列组成的多肽。在另一个方面,本公开提供包含序列:SEQ ID NO:79或由该序列组成的组合物以及包含序列:SEQ ID NO:73或由该序列组成的多肽。在另一个方面,本公开提供包含序列:SEQ ID NO:76或由该序列组成的组合物以及包含序列:SEQ ID NO:70或由该序列组成的多肽。

[0128] 在一些实施方案中,组合物包含所列出的第一多肽和第二多肽,所述第一多肽和第二多肽以1.1:1和1:1.1之间的摩尔比存在。

[0129] 在另一个方面,本公开提供治疗患者的方法,其包括将本文描述的组合物中的任一种施用于患者。

[0130] 在另一个方面,本公开的特征在于包含本文描述的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)基本上同质的(例如,至少85%、90%、95%、97%、98%、99%同质)群体的药物组合物,或包含本文描述的Fc构建体的基本上同质群体的组合物(例如,包含具有三个Fc结构域的Fc构建体的基本上同质群体的组合物)以及一种或多种药学上可接受的载剂或赋形剂。可以在没有Fc构建体的基本聚集或不需要的多聚化的情况下产生此类药物组合物。

[0131] 在一些方面,本公开提供包含含有SEQ ID NO:76的多肽和包含SEQ ID NO:70的多肽的组合物。在一些方面,本公开提供包含含有SEQ ID NO:78的多肽和包含SEQ ID NO:73的多肽的组合物。在一些方面,本公开提供包含含有SEQ ID NO:79的多肽和包含SEQ ID NO:73的多肽的组合物。

[0132] 在一些方面,本公开提供治疗患者的方法,其包括将本文描述的组合物中的任一种施用于患者。

[0133] 在一些方面,本公开提供包含编码SEQ ID NO:76的核酸序列和编码SEQ ID NO:70的核酸序列的细胞。在一些方面,本公开提供包含编码SEQ ID NO:78的核酸序列和编码SEQ ID NO:73的核酸序列的细胞。在一些方面,本公开提供包含编码SEQ ID NO:79的核酸序列和编码SEQ ID NO:73的核酸序列的细胞。在一些方面,本公开提供包含编码本文描述的Fc构建体中的任一种的核酸序列的细胞。

[0134] 在另一个方面,本公开的特征在于减少受试者中免疫应答的免疫细胞活化的方法,所述方法包括向受试者施用本文所述的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)、或包括本文所述的Fc构建体的基本上同质群体的组合物(例如,包括具有三个Fc结构域的Fc构建体的基本上同质群体的组合物)。在一些实施方案中,受试者患有自身免疫疾病。

[0135] 在另一个方面,本公开的特征在于治疗受试者中的炎症或炎性疾病的方法,其包括向受试者施用本文所述的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)、或包括本文

所述的Fc构建体的基本上同质群体的组合物(例如,包括具有三个Fc结构域的Fc构建体的基本上同质群体的组合物)。

[0136] 在另一个方面,本公开的特征在于促进受试者中的自身抗体清除和/或压制抗原呈递的方法,其包括向受试者施用本文所述的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)、或包括本文所述的Fc构建体的基本上同质群体的组合物(例如,包括具有三个Fc结构域的Fc构建体的基本上同质群体的组合物)。

[0137] 在一些实施方案中,可以通过施用本文所述的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)治疗的示例性疾病包括:类风湿性关节炎(RA);全身性红斑狼疮(SLE);ANCA相关性血管炎;抗磷脂抗体综合征;自身免疫性溶血性贫血;慢性炎症性脱髓鞘性神经病;移植中抗allo(anti-allo)的清除,GVHD中的抗自身,抗替代,IgG治疗,IgG副蛋白;皮肌炎;古德巴斯捷氏综合征(Goodpasture's Syndrome);通过抗体依赖性细胞介导的细胞毒性介导的器官系统靶向的II型超敏综合征,例如格巴二氏综合征、CIDP、皮肌炎、费尔蒂综合征、抗体介导的排斥、自身免疫性甲状腺疾病、溃疡性结肠炎、自身免疫性肝病;特发性血小板减少性紫癜;重症肌无力,视神经脊髓炎;天疱疮及其他自身免疫性水疱病症;干燥综合征;自身免疫性血细胞减少症和通过抗体依赖性吞噬作用介导的其他病症;其他FcR依赖性炎性综合征,例如滑膜炎、皮肌炎、系统性血管炎、肾小球炎和血管炎。

[0138] 在一些实施方案中,本文所述的Fc构建体不包括抗原识别区,例如可变结构域或互补决定区(CDR)。在一些实施方案中,Fc构建体(或Fc构建体内的Fc结构域)完全或部分地由存在于不同多肽中的Fc结构域单体的结合形成。在一些实施方案中,本文所述的Fc构建体包括抗原识别区,例如可变结构域或CDR。在某些实施方案中,Fc构建体不包括促进两种多肽结合的另外的结构域(例如,IgM尾端(tailpiece)或IgA尾端)。在其他实施方案中,共价键合仅在连接以形成Fc结构域的两个Fc结构域单体之间存在于Fc构建体中。在其他实施方案中,Fc构建体不包括Fc结构域之间的共价键合。在另外其他实施方案中,Fc构建体提供足够的结构柔性,使得Fc构建体中的所有或基本上所有Fc结构域能够同时与细胞表面上的Fc受体相互作用。在一个实施方案中,结构域单体在一级序列中与野生型或彼此不同,因为它们具有二聚化选择性模块。

[0139] 构建体的Fc结构域的Fc结构域单体可以具有相同的一级氨基酸序列。例如,Fc结构域的两个Fc结构域单体均可以具有相同的二聚化选择性模块,例如,Fc结构域的两个Fc结构域单体均可以在C<sub>H</sub>3结构域之间的界面处的荷电残基环内的至少两个位置中具有相同的反向电荷突变。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽具有相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,第三多肽和第四多肽具有相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,第一Fc结构域单体的序列与第五Fc结构域单体的序列不同。在一些实施方案中,第三Fc结构域单体的序列与第六Fc结构域单体的序列不同。在一些实施方案中,第二Fc结构域单体的序列与第四Fc结构域单体的序列相同。

[0140] 在本文所述的任何Fc构建体中,构建体的Fc结构域的Fc结构域单体可以具有不同的序列,例如,在两个Fc结构域单体之间(即,在Fc构建体的Fc结构域单体和另一个单体之间)相差不超过20个氨基酸(例如,不超过15、10个氨基酸),例如不超过20、15、10、8、7、6、5、4、3或2个氨基酸的序列。例如,本文描述的构建体的Fc结构域单体序列可以是不同的,因为任何Fc构建体的互补的二聚化选择性模块可以包括在一个结构域单体的C<sub>H</sub>3抗体恒定结构

域中的经工程改造的空腔、以及在另一个Fc结构域单体的C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中的经工程改造的突起,其中所述经工程改造的空腔和所述经工程改造的突起被定位为形成Fc结构域单体的突起进入空腔对。在一些实施方案中,Fc构建体在C<sub>H</sub>3结构域中包含氨基酸修饰。在一些实施方案中,Fc构建体在Fc结构域单体(Fc结构域单体中的一者或者)的C<sub>H</sub>3结构域中包含用于选择性二聚化的氨基酸修饰。示例性经工程改造的空腔和突起显示于表1中。在其他实施方案中,互补的二聚化选择性模块包括在一个结构域单体的C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中的经工程改造的(置换的)带负电荷的氨基酸、以及在另一个Fc结构域单体中的C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中的经工程改造的(置换的)带正电荷的氨基酸,其中所述带负电荷的氨基酸和所述带正电荷的氨基酸被定位为促进互补结构域单体之间Fc结构域的形成。示例性互补的氨基酸变化显示于表2A-2C中。在一些实施方案中,Fc结构域单体中的一者或者具有相同的序列。在一些实施方案中,Fc结构域单体中的一者或者具有相同的修饰。在一些实施方案中,Fc结构域单体中的仅一者、两者、三者或四者具有相同的修饰。

[0141] 在一些情况下,Fc结构域包含至少一个氨基酸修饰,其中所述氨基酸修饰改变以下中的一者或者:(i)对一种或多种Fc受体的结合亲和力、(ii)效应子功能、(iii)Fc结构域硫酸化水平、(iv)半衰期、(v)蛋白酶耐受性、(vi)Fc结构域稳定性、和/或(vii)对降解的敏感性(例如,当与未经修饰的Fc结构域进行比较时)。在一些情况下,Fc结构域包含不超过16个氨基酸修饰(例如,不超过2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个或16个氨基酸修饰)。在一些情况下,Fc结构域包括不超过16个氨基酸修饰(例如,CH3结构域中不超过2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16个氨基酸修饰)。

[0142] 本公开的特征还在于药物组合物,其包括本文所述的任何Fc构建体的基本上同质的群体。在一个实施方案中,对于药学用途合格的无菌注射器或小瓶含有药物组合物,其中唯一或主要活性成分是本文所述的任何一种Fc构建体的基本上同质的群体。药物组合物可以包括一种或多种非活性成分,例如选自盐、去污剂、表面活性剂、填充剂、聚合物、防腐剂和其他药物赋形剂。

[0143] 在一些实施方案中,Fc构建体至少部分地通过存在于不同多肽中的Fc结构域单体的结合而形成。在某些实施方案中,Fc构建体通过存在于不同多肽中的Fc结构域单体的结合而形成。在这些实施方案中,Fc构建体不包括促进两种多肽(例如IgM尾端或IgA尾端)结合的另外结构域。在其他实施方案中,共价键合(例如,二硫桥)仅存在于连接以形成Fc结构域的两个Fc结构域单体之间。在其他实施方案中,Fc构建体不包括Fc结构域之间的共价键合(例如,二硫桥)。在另外其他实施方案中,Fc构建体提供足够的结构柔性,使得Fc构建体中的所有或基本上所有Fc结构域能够同时与细胞表面上的Fc受体相互作用。在任何这些实施方案的某些实例中,Fc构建体包括通过接头连接的至少两个Fc结构域(例如,柔性氨基酸间隔物)。

[0144] 在另一个方面,本公开的特征在于用于促进Fc结构域单体的选择性二聚化的组合物和方法。本公开包括Fc结构域,其中所述Fc结构域的两个Fc结构域单体包括在C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域之间的界面处的荷电残基环内的至少两个位置中的相同突变。本公开还包括制备此类Fc结构域的方法,其包括在C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域之间的界面处的荷电残基环内的至少两个位置中,引入在两个Fc结构域单体序列中具有相同突变的互补的二聚化选择性模块。C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域之间的界面由被荷电残基环包围的疏水性贴片组成。当一个C<sub>H</sub>3抗体恒

定结构域与另一个结合在一起时,这些荷电残基与相反电荷的残基配对。通过逆转两个或更多个互补残基对的两个成员的电荷,突变的Fc结构域单体保持与相同突变序列的Fc结构域单体互补,但与不含那些突变的Fc结构域单体具有更低的互补性。在该实施方案中,相同的二聚化选择性模块促进同源二聚化。此类Fc结构域包括含有双重突变体K409D/D399K、K392D/D399K、E357K/K370E、D356K/K439D、K409E/D399K、K392E/D399K、E357K/K370D或D356K/K439E的Fc结构域单体。在另一个实施方案中,Fc结构域包括Fc结构域单体,其包括组合任何一对双重突变体的四重突变体,例如K409D/D399K/E357K/K370E。

[0145] 在另一个实施方案中,除相同的二聚化选择性模块之外,Fc结构域的Fc结构域单体还包括具有促进特异性结合的非相同突变的互补的二聚化选择性模块(例如,经工程改造的空腔和突起)。因此,两个Fc结构域单体包括两个二聚化选择性模块并且彼此保持互补,但与其他Fc结构域单体具有降低的互补性。该实施方案促进含空腔的Fc结构域和含突起的Fc结构域单体之间的异源二聚化。在一个实例中,在两个Fc结构域单体的荷电对残基中具有不相同突变的互补的二聚化选择性模块与一个Fc结构域单体上的突起和另一个Fc结构域单体上的空腔组合。

[0146] 在本文所述的任何Fc构建体中,应理解Fc结构域单体的次序是可互换的。例如,在其中第一Fc结构域单体通过接头连接至第二Fc结构域单体的多肽中,第一Fc结构域单体的羧基末端可以连接至接头的氨基末端,继而所述接头在其羧基末端连接至第二Fc结构域单体的氨基末端。或者,第二Fc结构域单体的羧基末端可以连接至接头的氨基末端,继而所述接头在其羧基末端连接至第一Fc结构域单体的氨基末端。本公开涵盖这两种构型。

[0147] 定义:

[0148] 如本文所用,术语“Fc结构域单体”是指包含至少铰链结构域(或其部分)以及第二抗体恒定结构域和第三抗体恒定结构域( $C_{H}2$ 和 $C_{H}3$ )或其功能片段(例如,能够(i)与另一个Fc结构域单体一起二聚化以形成Fc结构域,以及(ii)结合至Fc受体的片段)的多肽链。Fc结构域单体可以具有不同的来源,例如人、小鼠或大鼠。Fc结构域单体可以是任何免疫球蛋白抗体同种型,包括IgG、IgE、IgM、IgA或IgD(例如IgG)。另外,Fc结构域单体可以是IgG亚型(例如,IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3或IgG4)(例如,IgG1)。Fc结构域单体不包括能够充当抗原识别区域的免疫球蛋白的任何部分,例如可变结构域或互补决定区(CDR)。Fc结构域单体可以含有来自野生型Fc结构域单体序列的多达十种变化(例如,单一氨基酸修饰)(例如,1-10个、1-8个、1-6个、1-4个氨基酸置换、添加或缺失),所述变化改变Fc结构域和Fc受体之间的相互作用。合适变化的实例是本领域已知的。

[0149] 如本文使用的,术语“Fc结构域”指能够结合Fc受体的两个Fc结构域单体的二聚体。在野生型Fc结构域中,两个Fc结构域单体通过两个 $C_{H}3$ 抗体恒定结构域之间的相互作用,以及在两个二聚化Fc结构域单体的铰链结构域之间形成的一个或多个二硫键而二聚化。

[0150] 在本公开中,术语“Fc构建体”指形成如本文所述的Fc结构域的相关多肽链(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)。本文描述的Fc构建体可以包括具有相同或不同序列的Fc结构域单体。例如,Fc构建体可以具有三个Fc结构域,其中两个包括IgG1或IgG1衍生的Fc结构域单体,并且第三个包括IgG2或IgG2衍生的Fc结构域单体。在另一个实例中,Fc构建体可以具有三个Fc结构域,其中两个包括“突起进入空腔内对(protuberance-into-cavity)”,

并且第二个不包括“突起进入空腔内对”。在本公开中,Fc结构域不包括抗体的可变区,例如V<sub>H</sub>、V<sub>L</sub>、CDR或HVR。Fc结构域形成与Fc受体结合的最小结构,所述Fc受体例如Fc  $\gamma$  RI、Fc  $\gamma$  RIIa、Fc  $\gamma$  RIIb、Fc  $\gamma$  IIIa、Fc  $\gamma$  IIIb、Fc  $\gamma$  RIV。在一些实施方案中,本文所述的Fc构建体不包括抗原识别区,例如可变结构域或互补决定区(CDR)。在一些实施方案中,本文所述的Fc构建体包括抗原识别区,例如可变结构域或CDR。

[0151] 如本文使用的,术语“抗体恒定结构域”指对应于抗体的恒定区结构域的多肽(例如,C<sub>L</sub>抗体恒定结构域、C<sub>H</sub>1抗体恒定结构域、C<sub>H</sub>2抗体恒定结构域或C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域)。

[0152] 如本文使用的,术语“促进”意指支持且有利于,例如有利于从两个Fc结构域单体形成Fc结构域,所述两个Fc结构域单体对于彼此具有的结合亲和力比对于其他不同的Fc结构域单体更高。如本文所述,组合以形成Fc结构域的两个Fc结构域单体可以在其各自的C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域的界面处具有相容的氨基酸修饰(例如,经工程改造的突起和经工程改造的空腔)。相对于缺乏此类氨基酸修饰或具有不相容的氨基酸修饰的其他Fc结构域单体,相容的氨基酸修饰促进或有利于此类Fc结构域单体与彼此的选择性相互作用。这因为以下而发生:由于在两个相互作用的C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域的界面处的氨基酸修饰,Fc结构域单体针对彼此具有的亲和力比缺乏氨基酸修饰的其他Fc结构域单体更高。

[0153] 如本文使用的,术语“二聚化选择性模块”指Fc结构域单体的序列,其促进两个Fc结构域单体之间的有利配对。“互补的”二聚化选择性模块是二聚化选择性模块,其促进或有利于两个Fc结构域单体彼此的选择性相互作用。互补的二聚化选择性模块可以具有相同或不同的序列。本文描述了示例性的互补的二聚化选择性模块。

[0154] 如本文使用的,术语“经工程改造的空腔”指用不同的氨基酸残基(其具有比原始氨基酸残基更小的侧链体积)置换C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中的至少一个原始氨基酸残基,因此在C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中产生三维空腔。术语“原始氨基酸残基”指由野生型C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域的遗传密码编码的天然存在的氨基酸残基。

[0155] 如本文使用的,术语“经工程改造的突起”指用不同的氨基酸残基(其具有比原始氨基酸残基更大的侧链体积)置换C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中的至少一个原始氨基酸残基,因此在C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中产生三维突起。术语“原始氨基酸残基”指由野生型C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域的遗传密码编码的天然存在的氨基酸残基。

[0156] 如本文使用的,术语“突起进入空腔内对”描述包括两个Fc结构域单体的Fc结构域,其中第一Fc结构域单体包括在其C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中的经工程改造的空腔,并且第二Fc结构域单体包括在其C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中的经工程改造的突起。在突起进入空腔内对中,第一Fc结构域单体的C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中的经工程改造的突起这样定位,使得它与第二Fc结构域单体的C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域的经工程改造的空腔相互作用,而不显著扰乱在C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域间界面处的二聚体的正常结合。

[0157] 如本文使用的,术语“异二聚体Fc结构域”指通过两个Fc结构域单体的异二聚化形成的Fc结构域,其中所述两个Fc结构域单体含有不同的反向电荷突变(参见例如,表2A中的突变),其促进这两个Fc结构域单体的有利形成。如图1和2中所示,在具有三个Fc结构域-一个羧基末端“茎”Fc结构域和两个氨基末端“分支”Fc结构域的Fc构建体中-每个氨基末端“分支”Fc结构域可以是异二聚体Fc结构域(也称为“分支异二聚体Fc结构域”) (例如,由图1中的Fc结构域单体106和114或Fc结构域单体112和116形成的异二聚体Fc结构域;由图2中

的Fc结构域单体206和214或Fc结构域单体212和216形成的异二聚体Fc结构域)。

[0158] 如本文使用的,术语“同二聚体Fc结构域”指通过两个Fc结构域单体的同二聚化形成的Fc结构域,其中所述两个Fc结构域单体含有相同的反向电荷突变(参见例如,表2B和表2C中的突变)。如图1和2中所示,在具有三个Fc结构域-一个羧基末端“茎”Fc结构域和两个氨基末端“分支”Fc结构域的Fc构建体中-羧基末端“茎”Fc结构域可以是同二聚体Fc结构域(也称为“茎同二聚体Fc结构域”) (例如,由图1中的Fc结构域单体104和110形成的同二聚体Fc结构域;由图2中的Fc结构域单体204和210形成的同二聚体Fc结构域)。

[0159] 如本文使用的,术语“异二聚化选择性模块”指经工程改造的突起、经工程改造的空腔和某些反向电荷氨基酸置换,其可以在Fc结构域单体的C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中进行,以便促进具有相容的异二聚化选择性模块的两个Fc结构域单体的有利的异二聚化。含有异二聚化选择性模块的Fc结构域单体可以组合,以形成异二聚体Fc结构域。异二聚化选择性模块的实例显示于表1和2A中。

[0160] 如本文使用的,术语“同二聚化选择性模块”指在C<sub>H</sub>3结构域之间的界面处的荷电残基环内的至少两个位置中的Fc结构域单体中的反向电荷突变,其促进Fc结构域单体的同二聚化以形成同二聚体Fc结构域。同二聚化选择性模块的实例显示于表2A和2B中。

[0161] 如本文使用的,术语“连接”用于描述通过手段包括化学缀合、重组手段和化学键,例如二硫键和酰胺键,两种或更多种元件、组分或蛋白质结构域(例如多肽)的组合或附着。例如,可以通过化学缀合、化学键、肽接头或任何其他共价键合手段,将两种单一多肽连接以形成一个连续的蛋白质结构。在一些实施方案中,第一Fc结构域单体通过肽接头连接至第二Fc结构域单体,其中所述肽接头的N末端通过化学键例如肽键连接至第一Fc结构域单体的C末端,并且肽接头的C末端通过化学键例如肽键连接至第二Fc结构域单体的N末端。在其他实施方案中,白蛋白结合肽的N末端通过接头以与上述相同的方式连接至Fc结构域单体的C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域的C末端。

[0162] 如本文使用的,术语“结合”用于描述多肽(或一种单一多肽内的序列)之间的相互作用,例如氢键合、疏水相互作用或离子相互作用,使得多肽(或一种单一多肽内的序列)定位为形成本文所述的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)。例如,在一些实施方案中,四种多肽(例如各自包括两个Fc结构域单体的两种多肽和各自包含一个Fc结构域单体的两种多肽)组合,以形成具有三个Fc结构域的Fc构建体(例如,如图1和2中所示)。四种多肽可以通过其各自的Fc结构域单体结合。多肽之间的结合不包括共价相互作用。

[0163] 如本文使用的,术语“接头”指两个元件(例如蛋白质结构域)之间的键合。接头可以是共价键或间隔物。术语“键”指化学键,例如酰胺键或二硫键,或由化学反应产生的任何种类的键,例如化学缀合。术语“间隔物”指在两种多肽或多肽结构域之间出现的部分(例如,聚乙二醇(PEG)聚合物)或氨基酸序列(例如,3-200个氨基酸、3-150个氨基酸、3-100个氨基酸、3-60个氨基酸、3-50个氨基酸、3-40个氨基酸、3-30个氨基酸、3-20个氨基酸、3-10个氨基酸、3-8个氨基酸、3-5个氨基酸、4-30个氨基酸、5-30个氨基酸、6-30个氨基酸、8-30个氨基酸、10-20个氨基酸、10-30个氨基酸、12-30个氨基酸、14-30个氨基酸、20-30个氨基酸、15-25个氨基酸、15-30个氨基酸、18-22个氨基酸和20-30个氨基酸序列),以在两种多肽或多肽结构域之间提供空间和/或柔性。氨基酸间隔物是多肽一级序列的部分(例如,经由多肽主链与间隔的多肽或多肽结构域连接)。例如在两个铰链区或形成Fc结构域的两个Fc

结构域单体之间的二硫键形成不视为接头。

[0164] 如本文使用的,术语“甘氨酸间隔物”指仅含有以串联系列连接两个Fc结构域单体的甘氨酸的接头。甘氨酸间隔物可以含有至少4、8、12、14、16、18或20个甘氨酸(例如,4-30、8-30、12-30、12-50、12-100或12-200个甘氨酸;例如,12-30、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个甘氨酸)。在一些实施方案中,甘氨酸间隔物包含序列GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:27),由该序列组成或基本上由该序列组成。

[0165] 如本文使用的,术语“白蛋白结合肽”指12至16个氨基酸的氨基酸序列,其对于血清白蛋白具有亲和力且作用于结合血清白蛋白。白蛋白结合肽可以具有不同起源,例如人、小鼠或大鼠。在本公开的一些实施方案中,白蛋白结合肽与Fc结构域单体的C末端融合,以增加Fc构建体的血清半衰期。白蛋白结合肽可以直接或通过接头与Fc结构域单体的N末端或C末端融合。

[0166] 如本文使用的,术语“纯化肽”指可以用于纯化、分离或鉴定多肽的任何长度的肽。纯化肽可以与多肽连接以帮助从例如细胞裂解产物混合物中纯化多肽和/或分离多肽。在一些实施方案中,纯化肽结合对于纯化肽具有特异性亲和力的另一部分。在一些实施方案中,将与纯化肽特异性结合的此类部分附着至固体支持物,例如基质、树脂或琼脂糖珠。可以与Fc构建体连接的纯化肽的实例在本文中进一步详细描述。

[0167] 如本文使用的,术语“多聚体”指包括本文所述的至少两个结合的Fc构建体的分子。

[0168] 如本文使用的,术语“抗原识别区”指抗体的轻链和重链的部分,其负责识别抗体并将抗体与抗原结合。抗原识别区域包括轻链和重链的可变结构域(Fab),其包括互补决定区(CDR,例如CDR L1、CDR L2、CDR L3、CDRH1、CDRH2和CDRH3)和构架区(FR)。

[0169] 如本文使用的,短语“免疫应答的免疫细胞活化”指通过免疫复合物或Fc构建体与细胞(例如,免疫细胞(例如,单核细胞))上的Fc  $\gamma$  受体(Fc  $\gamma$  R)(例如,活化Fc  $\gamma$  R,例如,Fc  $\gamma$  RI、Fc  $\gamma$  RIIa、Fc  $\gamma$  RIIc、Fc  $\gamma$  RIIIa或Fc  $\gamma$  RIIIb)的结合诱导或活化的免疫应答。免疫复合物是由抗体与抗原组合而形成的抗原-抗体复合物。免疫复合物经常具有多个Fc结构域,其聚集Fc  $\gamma$  R并抑制或活化在炎症、感染及其他疾病中起关键作用的细胞过程。在一些实施方案中,本公开的Fc构建体能够结合Fc  $\gamma$  R,并且诱导免疫细胞(例如单核细胞)上的活化Fc  $\gamma$  R(例如,Fc  $\gamma$  RI、Fc  $\gamma$  RIIa、Fc  $\gamma$  RIIc、Fc  $\gamma$  RIIIa或Fc  $\gamma$  RIIIb)信号传导。在Fc  $\gamma$  R表达细胞中的某些下游信号传导事件,例如激酶磷酸化(例如,Syk磷酸化)和钙流入的测量,可以用于检测由免疫复合物或Fc构建体的结合引起的免疫应答的免疫细胞活化。例如,如果激酶磷酸化(例如,Syk磷酸化)水平或细胞的钙流入水平比没有通过免疫复合物或Fc构建体的任何活化的细胞的激酶磷酸化(例如,Syk磷酸化)或细胞的钙流入水平高至少5倍,例如5-100倍(例如,5-100、10-95、15-90、20-85、25-80、30-75、35-70、40-65、45-60或50-55倍;例如,5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100倍),则诱导免疫应答的免疫细胞活化。

[0170] 如本文使用的,术语“吞噬作用”指内吞作用的一种形式,其中细胞(通常是吞噬细胞(例如单核细胞))吞噬另一种细胞、颗粒或病原体(例如,微生物或寄生虫),以形成吞噬体。在免疫系统中,吞噬作用是用于去除患病细胞(例如,癌细胞、受感染细胞或死细胞)、病原体和细胞碎片的主要机制。靶向被另一种细胞(例如吞噬细胞(例如,单核细胞))吞噬的细胞被称为靶细胞。例如,通过本公开的Fc构建体与免疫细胞上的Fc  $\gamma$  R(例如,Fc  $\gamma$  RI、Fc  $\gamma$  RIIa、Fc  $\gamma$  RIIc、Fc  $\gamma$  RIIIa或Fc  $\gamma$  RIIIb)的结合而活化的免疫细胞(例如,单核细胞)可以吞噬靶细胞,其可以是受试者中的癌细胞或受感染细胞。

[0171] 如本文使用的,“增加(increase)”或“增加(increasing)”靶细胞的吞噬作用指相对于没有Fc构建体诱导时发生的吞噬作用水平,由本公开的Fc构建体与免疫细胞(例如单核细胞)上的Fc  $\gamma$  R(例如,Fc  $\gamma$  RI、Fc  $\gamma$  RIIa、Fc  $\gamma$  RIIc、Fc  $\gamma$  RIIIa或Fc  $\gamma$  RIIIb)结合诱导的吞噬作用中的增加。例如,如果吞噬作用的水平比没有Fc构建体诱导时发生的吞噬作用水平高至少10%,例如10-100%(例如,10-100%、15-95%、20-90%、25-85%、30-80%、35-75%、40-70%、45-65%或50-60%;例如,10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%),则靶细胞的吞噬作用增加。

[0172] 如本文使用的,术语“治疗癌症”指受试者中癌症的治疗性处理。治疗性处理减缓癌症的进展,改善受试者的结果,和/或消除癌症。

[0173] 如本文使用的,术语“治疗感染”指受试者中感染的治疗性处理。治疗性处理减缓感染的进展,改善受试者的结果,和/或消除感染。

[0174] 如本文使用的,术语“感染”指受试者的细胞、组织和/或器官被病原体侵入,所述病原体例如细菌、病毒、真菌、蠕虫、原生动物、节肢动物及其他微生物、寄生虫和肠虫。在一些实施方案中,病原体可以在受试者的细胞、组织和/或器官中生长、繁殖和/或产生毒素。在一些实施方案中,受试者可以发展针对病原体的阴性反应(即,过敏反应或免疫应答)。感染的实例包括但不限于细菌感染、病毒感染、真菌感染、蠕虫感染和原生动物感染。

[0175] 如本文使用的,术语“细菌感染”指由一种或多种细菌引起的感染。引起感染的细菌的实例是本领域众所周知的,包括但不限于链球菌属(*Streptococcus*)中的细菌(例如酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*))、埃希氏菌属(*Escherichia*)中的细菌(例如大肠杆菌(*Escherichia coli*))、弧菌属(*Vibrio*)中的细菌(例如霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*))、肠炎属(*Enteritis*)中的细菌(例如肠炎沙门氏菌(*Enteritissalmonella*))、以及沙门氏菌属(*Salmonella*)中的细菌(例如伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*))。

[0176] 如本文使用的,术语“病毒感染”指由一种或多种病毒引起的感染。引起感染的病毒的实例是本领域众所周知的,包括但不限于逆转录病毒科中的病毒(例如人免疫缺陷病毒(HIV))、腺病毒科中的病毒(例如腺病毒)、疱疹病毒科中的病毒(例如1型和2型单纯疱疹病毒)、乳头状瘤病毒科中的病毒(例如人乳头状瘤病毒(HPV))、痘病毒科中的病毒(例如天花)、微小核糖核酸病毒科中的病毒(例如甲型肝炎病毒、脊髓灰质炎病毒、鼻病毒)、嗜肝

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

[0177] 如本文使用的,术语“真菌感染”指由一种或多种真菌引起的感染。引起感染的真菌的实例是本领域众所周知的,包括但不限于曲霉属(*Aspergillus*)中的真菌(例如烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)、黄曲霉(*A. flavus*)、土曲霉(*A. terreus*)、黑曲霉(*A. niger*)、白曲霉(*A. candidus*)、棒曲霉(*A. clavatus*)、赭曲霉(*A. ochraceus*))、念珠菌属(*Candida*)中的真菌(例如白色念珠菌(*Candida albicans*)、近平滑念珠菌(*C. parapsilosis*)、光滑念珠菌(*C. glabrata*)、高里念珠菌(*C. guilliermondii*)、克柔念珠菌(*C. krusei*)、鲁希特念珠菌(*C. lusitaniae*)、热带念珠菌(*C. tropicalis*))、隐球菌属(*Cryptococcus*)中的真菌(例如新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*))、以及镰刀菌属(*Fusarium*)中的真菌(例如茄病镰刀菌(*Fusarium solani*)、串株镰刀菌(*F. verticillioides*)、尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*))。

[0178] 如本文使用的,术语“蠕虫感染”指由一种或多种蠕虫引起的感染。蠕虫的实例包括但不限于绦虫(tapeworm)(绦虫(cestode))、圆虫(线虫)、吸虫(fluke)(吸虫(trematode))和单殖亚纲动物。

[0179] 如本文使用的,术语“原生动物感染”指由一种或多种原生动物引起的感染。原生动物的实例包括但不限于内阿米巴属(*Entamoeba*)中的原生动物(例如溶组织内阿米巴(*Entamoeba histolytica*))、疟原虫属(*Plasmodium*)中的原生动物(例如恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)、三日疟原虫(*P. malariae*))、贾第虫属(*Giardia*)中的原生动物(例如兰伯贾第虫(*Giardia lamblia*))、以及锥虫属(*Trypanosoma*)中的原生动物(例如布氏锥虫(*Trypanosoma brucei*))。

[0180] 如本文使用的,术语“多核苷酸”指寡核苷酸、或核苷酸、及其片段或部分、以及基因组或合成起源的DNA或RNA,其可以是单链或双链的,并且代表有义链或反义链。单个多核苷酸被翻译成单一多肽。

[0181] 如本文使用的,术语“多肽”描述单一聚合物,其中单体是通过酰胺键连接在一起的氨基酸残基。多肽预期涵盖天然存在、重组或合成产生的任何氨基酸序列。

[0182] 如本文使用的,术语“氨基酸位置”指蛋白质或蛋白质结构域中氨基酸的位置编号。使用Kabat编号系统(Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, Bethesda, Md., ed 5, 1991), 对抗体或Fc构建体的氨基酸位置进行编号。

[0183] 如本文所用,术语“氨基酸突变”、“氨基酸变化”和“氨基酸修饰”可互换使用,是指与参考Fc结构域多肽(例如,野生型、未突变的或未经修饰的Fc序列)比较时Fc结构域多肽的改变。参考Fc结构域多肽可以是野生型人IgG1 Fc结构域多肽。氨基酸修饰包括氨基酸置换、缺失和/或插入。在一些实施方案中,氨基酸修饰是单个氨基酸的修饰。在其他实施方案中,氨基酸修饰是多个(例如,多于一个)氨基酸的修饰。氨基酸修饰可以包含氨基酸置换、缺失和/或插入的组合。在氨基酸修饰的描述中包括的是编码Fc多肽的核苷酸序列的遗传(即DNA和RNA)改变,例如点突变(例如,单个核苷酸与另一个核苷酸的交换)、插入和缺失

(例如,一个或多个核苷酸的添加和/或去除)。除非另有说明,否则插入是在指定发生插入的氨基酸位置之后的一个或多个氨基酸的添加。除非另有说明,否则氨基酸修饰(例如,置换、插入和/或缺失)被掺入组成Fc结构域的两个Fc结构域单体中。在其他实施方案中,具有第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的Fc结构域可以包含例如第一Fc结构域单体中的一个或多个(例如,1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多个)氨基酸修饰,所述氨基酸修饰与第二Fc结构域单体中的一个或多个(例如,1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多个)氨基酸修饰不同。在一些实施方案中,Fc结构域可以包含具有同质的氨基酸修饰(例如,在氨基酸位置I253和/或R292处)的Fc结构域单体(例如,第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体)。在其他实施方案中,Fc结构域可以包含具有异质的氨基酸修饰(例如,在氨基酸位置I253和/或R292处)的Fc结构域单体(例如,第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体)。在某些实施方案中,Fc构建体内的至少一个(例如,1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多个)Fc结构域包含氨基酸修饰。在一些情况下,至少一个Fc结构域包含一个或多个(例如,1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多个)单一氨基酸修饰。在一些情况下,Fc结构域包含不超过十六个单一氨基酸修饰(例如,不超过一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四、十五个或十六个氨基酸修饰)。在一些情况下,Fc结构域单体包含不超过十个单一氨基酸修饰。在一些情况下,Fc结构域单体包含不超过12个单一氨基酸修饰。在一些情况下,Fc结构域单体包含不超过14个单一氨基酸修饰。

[0184] 在某些实施方案中,Fc构建体内的至少一个(例如,一个、两个或三个)Fc结构域包括氨基酸修饰。在一些情况下,至少一个Fc结构域包括一个或多个(例如,两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或二十个或更多个)氨基酸修饰。在一些情况下,至少一个Fc结构域包含不超过十个单一氨基酸修饰。

[0185] 如本文所用,术语“同一性百分比(%)”是指在比对序列以及引入缺口(如有需要)以实现最大同一性百分比之后(即,对于最佳比对,可以在候选序列和参考序列中的一者或两者中引入缺口,并且出于比较目的,可以忽略非同源序列),与参考序列(例如,野生型Fc结构域单体的序列)的氨基酸(或核酸)残基相同的候选序列(例如,本文描述的Fc构建体中的Fc结构域单体的序列)的氨基酸(或核酸)残基的百分比。用于确定同一性百分比目的的比对可以在本领域技术范围内的各种方式实现,例如,使用可公开获得的计算机软件,例如BLAST、ALIGN或Megaalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可确定用于测量比对的适当参数,包括在待比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。在一些实施方案中,如下计算给定候选序列和、与或针对给定参考序列的氨基酸(或核酸)序列同一性百分比(其可以可替代地表达为和、与或针对给定参考序列具有或包括一定氨基酸(或核酸)序列同一性百分比)：

[0186]  $100 \times (A/B)$  的分数)

[0187] 其中A是在候选序列和参考序列的比对中评分为相同的氨基酸(或核酸)残基的数目,并且其中B是参考序列中氨基酸(或核酸)残基的总数。在其中候选序列的长度不等于参考序列的长度的一些实施方案中,候选序列与参考序列的氨基酸(或核酸)序列同一性百分比不等于参考序列与候选序列的氨基酸(或核酸)序列同一性百分比。

[0188] 在特定实施方案中,用于与候选序列比较而比对的参考序列可以显示,跨越候选

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

[0189] 在一些实施方案中,本文描述的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)中的Fc结构域单体可以包含与野生型Fc结构域单体的序列(例如,SEQ ID NO:42)至少95%相同(例如,至少97%、99%或99.5%相同)的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,本文描述的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)中的Fc结构域单体可以包含与SEQ ID NO:44、46、48和50-53中的任一者的序列至少95%相同(例如,至少97%、99%或99.5%相同)的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成。在某些实施方案中,Fc构建体中的Fc结构域单体可以包含与序列SEQ ID NO:48、52和53至少95%相同(例如,至少97%、99%或99.5%相同)的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成。

[0190] 在一些情况下,本文描述的Fc构建体中的Fc结构域单体可以包含与本文描述的序列中的任一者至少95%相同(例如,至少97%、99%或99.5%相同)的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些情况下,本文描述的Fc构建体中的Fc结构域单体可以包含具有最多10个(例如,最多9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的本文描述的序列中的任一者的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成。

[0191] 在一些实施方案中,本文描述的Fc构建体中具有两个Fc结构域单体的多肽(例如,图1中的多肽102和多肽108;图2中的多肽202和多肽208)可以包含与SEQ ID NO:43、45、47和49中的任一者的序列至少95%相同(例如,至少97%、99%或99.5%相同)的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成。在某些实施方案中,本文描述的Fc构建体中具有两个Fc结构域单体的多肽可以包含与序列SEQ ID NO:49至少95%相同(例如,至少97%、99%或99.5%相同)的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成。

[0192] 在一些实施方案中,两个Fc结构域单体之间的间隔物可以包含与本文进一步描述的SEQ ID NO:1-36(例如,SEQ ID NO:17、18、26和27)中的任一者的序列至少75%相同(例如,75%、77%、79%、81%、83%、85%、87%、89%、91%、93%、95%、97%、99%、99.5%或100%相同)的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成。

[0193] 如本文使用的,术语“宿主细胞”指包括从其相应核酸表达蛋白质所需的必要细胞组分(例如细胞器)的媒介物。核酸通常包括在核酸载体中,所述核酸载体可以通过本领域已知的常规技术(转化、转染、电穿孔、磷酸钙沉淀、直接显微注射等)引入宿主细胞内。宿主细胞可以是原核细胞例如细菌细胞,或真核细胞例如哺乳动物细胞(例如CHO细胞)。如本文所述,宿主细胞用于表达编码所需结构域的一种或多种多肽,然后可以将其组合以形成所需的Fc构建体。

[0194] 如本文使用的,术语“药物组合物”指医学或药物制剂,其含有活性成分以及一种或多种赋形剂和稀释剂,以致使活性成分适合于施用方法。本公开的药物组合物包括与Fc构建体相容的药学可接受的组分。药物组合物通常为用于静脉内或皮下施用的水性形式。

[0195] 如本文使用的,多肽或Fc构建体的“基本上同质的群体”是组合物(例如,细胞培养基或药物组合物)中至少50%的多肽或Fc构建体具有相同数目的Fc结构域,如通过非还原SDS凝胶电泳或尺寸排阻层析测定的。多肽或Fc构建体的基本上同质的群体可以在纯化之前、或在蛋白A或蛋白G纯化之后、或在只进行任何Fab或Fc特异性亲和色谱之后获得。在各种实施方案中,组合物中至少55%、60%、65%、70%、75%、80%或85%的多肽或Fc构建体具有相同数目的Fc结构域。在其他实施方案中,组合物中至多85%、90%、92%或95%的多肽或Fc构建体具有相同数目的Fc结构域。基本上同质的群体或组合物是至少85%同质的(例如,至少85%、90%或95%同质的)。

[0196] 如本文使用的,术语“药学可接受的载体”指药物组合物中的赋形剂或稀释剂。药学可接受的载体必须与制剂的其他成分相容并且对接受者无害。在本公开中,药学可接受的载体必须为Fc构建体提供足够的药物稳定性。载体的性质因施用模式而异。例如,对于经口施用,固体载体是优选的;对于静脉内施用,一般使用水性溶液载体(例如,WFI和/或缓冲溶液)。

[0197] 如本文使用的,“治疗有效量”指有效诱导受试者或患者中的所需生物效应或者有效治疗患有本文所述状况或病症的患者的量,例如药物剂量。本文还应理解,“治疗有效量”可以解释为给予所需疗效的量,以单个剂量或任何剂量或途径服用,单独服用或与其他治疗剂组合服用。

## 附图说明

[0198] 图1是含有由四种多肽形成的三个Fc结构域的Fc构建体(Fc构建体1、Fc构建体2或Fc构建体3)的图示。第一多肽(102)含有与含突起的Fc结构域单体(106)串联连接的一个Fc结构域单体(104),其在C<sub>H</sub>3-C<sub>H</sub>3界面处含有与野生型Fc结构域单体序列不同的荷电氨基酸。第二多肽(108)含有与含突起的Fc结构域单体(112)串联连接的另一个Fc结构域单体(110),其在C<sub>H</sub>3-C<sub>H</sub>3界面处含有与野生型Fc结构域单体序列不同的荷电氨基酸。第三多肽和第四多肽(分别为114和116)各自含有含空腔的Fc结构域单体。

[0199] 图2是含有由四种多肽形成的三个Fc结构域的Fc构建体(Fc构建体4)的图示。第一多肽(202)含有与含不同荷电氨基酸和突起的Fc结构域单体(206)串联连接的一个Fc结构域单体(204),其在C<sub>H</sub>3-C<sub>H</sub>3界面处含有与野生型Fc结构域单体序列不同的荷电氨基酸。第二多肽(208)含有与含不同荷电氨基酸和突起的Fc结构域单体(212)串联连接的另一个Fc结构域单体(210),其在C<sub>H</sub>3-C<sub>H</sub>3界面处含有与野生型Fc结构域单体序列不同的荷电氨基酸。第三多肽和第四多肽(分别为214和216)各自包含含有不同荷电氨基酸和空腔的Fc结构域单体。

[0200] 图3显示了通过LC-MS/MS来进行的Fc构建体2接头(SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG (SEQ ID NO:18))中的O-木糖基化Ser的鉴定。

[0201] 图4显示了如通过LC-MS/MS测定的,具有两个Fc结构域的Fc构建体(图13中所示的Fc构建体)中接头O-木糖基化的丰度。

[0202] 图5显示了如通过CE-SDS测定的,在45°C下贮存后,来自Fc构建体2和4的单体Fc种类的形成。

[0203] 图6显示了如通过CE-SDS测定的,在45°C下贮存两周后,Fc构建体2的蛋白水解产

物。

[0204] 图7显示了如通过CE-SDS测定的,在45℃下贮存两周后,Fc构建体4的蛋白水解产物。

[0205] 图8显示了通过具有不同接头长度的Fc构建体2对通过THP-1细胞的IL-8释放的抑制。

[0206] 图9显示了通过具有不同接头长度的Fc构建体2对嗜中性粒细胞中的钙通量的抑制。

[0207] 图10显示了通过在未纯化的培养基中的Fc构建体2和Fc构建体4的非还原SDS-PAGE的大小分布。

[0208] 图11显示了Fc构建体2(“具有静电转向”)和另一个具有三个Fc结构域但在“茎”亚基中没有静电转向突变的Fc构建体(“无静电转向”)的表达和组装。

[0209] 图12显示了去除C末端赖氨酸以生成Fc构建体2在体外不诱导补体依赖性细胞毒性(CDC)。

[0210] 图13是含有由三种多肽形成的两个Fc结构域的Fc构建体的图示。

[0211] 图14是含有由六种多肽形成的五个Fc结构域的Fc构建体(Fc5X)的图示。

[0212] 图15是含有由六种多肽形成的五个Fc结构域的Fc构建体(Fc5Y)的图示。

[0213] 图16是含有由六种多肽形成的五个Fc结构域的Fc构建体(Fc5Y-反转)的图示。

[0214] 图17是含有由两种多肽形成的三个Fc结构域的Fc构建体的图示。

[0215] 图18A是含有由四种多肽形成的三个Fc结构域的Fc构建体(构建体5)的图示。第一多肽(502)和第二多肽(508)中的每个含有一个Fc结构域单体,与野生型序列(分别为506和512)相比,所述Fc结构域单体在C<sub>H</sub>3-C<sub>H</sub>3界面处含有荷电氨基酸,所述野生型序列通过接头连接至含突起的Fc结构域单体(分别为504和510)。第三多肽和第四多肽(分别为514和516)各自含有含空腔的Fc结构域单体。第一多肽(502)和第二多肽(508)中的每个还含有静电转向的突变,例如E357K。类似地,第三多肽和第四多肽(分别为514和516)各自含有静电转向的突变,例如K370D。506和512各自含有氨基酸修饰I253A,该修饰以星号表示。502和508各自具有SEQ ID NO:62的氨基酸序列。514和516各自具有SEQ ID NO:61的氨基酸序列。

[0216] 图18B是含有由四种多肽形成的三个Fc结构域的Fc构建体(构建体6)的图示。第一多肽(602)和第二多肽(608)中的每个含有一个Fc结构域单体,与野生型序列(分别为606和612)相比,所述Fc结构域单体在C<sub>H</sub>3-C<sub>H</sub>3界面处含有荷电氨基酸,所述野生型序列通过接头连接至含突起的Fc结构域单体(分别为604和610)。第三多肽和第四多肽(分别为614和616)各自含有含空腔的Fc结构域单体。第一多肽(602)和第二多肽(608)中的每个还含有静电转向的突变,例如E357K。类似地,第三多肽和第四多肽(分别为614和616)各自含有静电转向的突变,例如K370D。604、610、614和616各自含有氨基酸修饰I253A,该修饰以星号表示。602和608各自具有SEQ ID NO:64的氨基酸序列。614和616各自具有SEQ ID NO:63的氨基酸序列。

[0217] 图18C是含有由四种多肽形成的三个Fc结构域的Fc构建体(构建体7)的图示。第一多肽(702)和第二多肽(708)中的每个含有一个Fc结构域单体,与野生型序列(分别为706和712)相比,所述Fc结构域单体在C<sub>H</sub>3-C<sub>H</sub>3界面处含有荷电氨基酸,所述野生型序列通过接头连接至含突起的Fc结构域单体(分别为704和710)。第三多肽和第四多肽(分别为714和716)

各自含有含空腔的Fc结构域单体。第一多肽(702)和第二多肽(708)中的每个还含有静电转向的突变,例如E357K。类似地,第三多肽和第四多肽(分别为714和716)各自含有静电转向的突变,例如K370D。704、706、710、712、714和716各自含有氨基酸修饰I253A,该修饰以星号表示。702和708各自具有SEQ ID NO:65的氨基酸序列。714和716各自具有SEQ ID NO:63的氨基酸序列。

[0218] 图18D是含有由四种多肽形成的三个Fc结构域的Fc构建体(构建体8)的图示。第一多肽(802)和第二多肽(808)中的每个含有一个Fc结构域单体,与野生型序列(分别为806和812)相比,所述Fc结构域单体在C<sub>H</sub>3-C<sub>H</sub>3界面处含有荷电氨基酸,所述野生型序列通过接头连接至含突起的Fc结构域单体(分别为804和810)。第三多肽和第四多肽(分别为814和816)各自含有含空腔的Fc结构域单体。第一多肽(802)和第二多肽(808)中的每个还含有静电转向的突变,例如E357K。类似地,第三多肽和第四多肽(分别为814和816)各自含有静电转向的突变,例如K370D。806和812各自含有氨基酸修饰R292P,该修饰以菱形表示。802和808各自具有SEQ ID NO:66的氨基酸序列。814和816各自具有SEQ ID NO:61的氨基酸序列。

[0219] 图18E是含有由四种多肽形成的三个Fc结构域的Fc构建体(构建体9)的图示。第一多肽(902)和第二多肽(908)中的每个含有一个Fc结构域单体,与野生型序列(分别为906和912)相比,所述Fc结构域单体在C<sub>H</sub>3-C<sub>H</sub>3界面处含有荷电氨基酸,所述野生型序列通过接头连接至含突起的Fc结构域单体(分别为904和910)。第三多肽和第四多肽(分别为914和916)各自含有含空腔的Fc结构域单体。第一多肽(902)和第二多肽(908)中的每个还含有静电转向的突变,例如E357K。类似地,第三多肽和第四多肽(分别为914和916)各自含有静电转向的突变,例如K370D。906和912各自含有氨基酸修饰I253A(该修饰以星号表示)和R292P(该修饰以菱形表示)。902和908各自具有SEQ ID NO:67的氨基酸序列。914和916各自具有SEQ ID NO:61的氨基酸序列。

[0220] 图18F是含有由四种多肽形成的三个Fc结构域的Fc构建体(构建体10)的图示。第一多肽(1002)和第二多肽(1008)中的每个含有一个Fc结构域单体,与野生型序列(分别为1006和1012)相比,所述Fc结构域单体在C<sub>H</sub>3-C<sub>H</sub>3界面处含有荷电氨基酸,所述野生型序列通过接头连接至含突起的Fc结构域单体(分别为1004和1010)。第三多肽和第四多肽(分别为1014和1016)各自含有含空腔的Fc结构域单体。第一多肽(1002)和第二多肽(1008)中的每个还含有静电转向的突变,例如E357K。类似地,第三多肽和第四多肽(分别为1014和1016)各自含有静电转向的突变,例如K370D。1006和1012各自含有氨基酸修饰R292P,该修饰以菱形表示,并且1004、1010、1014和1016各自含有氨基酸修饰I253A,该修饰以星号表示。1002和1008各自具有SEQ ID NO:68的氨基酸序列。1014和1016各自具有SEQ ID NO:63的氨基酸序列。

[0221] 图18G是含有由四种多肽形成的三个Fc结构域的Fc构建体(构建体11)的图示。第一多肽(1102)和第二多肽(1108)中的每个含有一个Fc结构域单体,与野生型序列(分别为1106和1112)相比,所述Fc结构域单体在C<sub>H</sub>3-C<sub>H</sub>3界面处含有荷电氨基酸,所述野生型序列通过接头连接至含突起的Fc结构域单体(分别为1104和1110)。第三多肽和第四多肽(分别为1114和1116)各自含有含空腔的Fc结构域单体。第一多肽(1102)和第二多肽(1108)中的每个还含有静电转向的突变,例如E357K。类似地,第三多肽和第四多肽(分别为1114和1116)各自含有静电转向的突变,例如K370D。1106和1112各自含有氨基酸修饰R292P,该修饰以菱

形表示,并且1104、1110、1114和1116各自含有氨基酸修饰I253A,该修饰以星号表示。1102和1108各自具有SEQ ID NO:69的氨基酸序列。1114和1116各自具有SEQ ID NO:63的氨基酸序列。

[0222] 图18H是含有由四种多肽形成的三个Fc结构域的Fc构建体(构建体12)的图示。第一多肽(1202)和第二多肽(1208)中的每个含有一个Fc结构域单体,与野生型序列(分别为1206和1212)相比,所述Fc结构域单体在C<sub>H</sub>3-C<sub>H</sub>3界面处含有荷电氨基酸,所述野生型序列通过接头连接至含突起的Fc结构域单体(分别为1204和1210)。第三多肽和第四多肽(分别为1214和1216)各自含有含空腔的Fc结构域单体。第一多肽(1202)和第二多肽(1208)中的每个还含有静电转向的突变,例如E357K。类似地,第三多肽和第四多肽(分别为1214和1216)各自含有静电转向的突变,例如K370D。1204、1210、1214和1216各自含有氨基酸修饰R292P,该修饰以菱形表示。1202和1208各自具有SEQ ID NO:71的氨基酸序列。1214和1216各自具有SEQ ID NO:70的氨基酸序列。

[0223] 图18I是含有由四种多肽形成的三个Fc结构域的Fc构建体(构建体13)的图示。第一多肽(1302)和第二多肽(1308)中的每个含有一个Fc结构域单体,与野生型序列(分别为1306和1312)相比,所述Fc结构域单体在C<sub>H</sub>3-C<sub>H</sub>3界面处含有荷电氨基酸,所述野生型序列通过接头连接至含突起的Fc结构域单体(分别为1304和1310)。第三多肽和第四多肽(分别为1314和1316)各自含有含空腔的Fc结构域单体。第一多肽(1302)和第二多肽(1308)中的每个还含有静电转向的突变,例如E357K。类似地,第三多肽和第四多肽(分别为1314和1316)各自含有静电转向的突变,例如K370D。1304、1310、1314和1316各自含有氨基酸修饰R292P,该修饰以菱形表示,并且1306和1312各自含有氨基酸修饰I253A,该修饰以星号表示。1302和1308各自具有SEQ ID NO:72的氨基酸序列。1314和1316各自具有SEQ ID NO:70的氨基酸序列。

[0224] 图18J是含有由四种多肽形成的三个Fc结构域的Fc构建体(构建体14)的图示。第一多肽(1402)和第二多肽(1408)中的每个含有一个Fc结构域单体,与野生型序列(分别为1406和1412)相比,所述Fc结构域单体在C<sub>H</sub>3-C<sub>H</sub>3界面处含有荷电氨基酸,所述野生型序列通过接头连接至含突起的Fc结构域单体(分别为1404和1410)。第三多肽和第四多肽(分别为1414和1416)各自含有含空腔的Fc结构域单体。第一多肽(1402)和第二多肽(1408)中的每个还含有静电转向的突变,例如E357K。类似地,第三多肽和第四多肽(分别为1414和1416)各自含有静电转向的突变,例如K370D。1404、1410、1414和1416各自含有氨基酸修饰R292P(该修饰以菱形表示)和I253A(该修饰以星号表示)。1402和1408各自具有SEQ ID NO:74的氨基酸序列。1414和1416各自具有SEQ ID NO:73的氨基酸序列。

[0225] 图18K是含有由四种多肽形成的三个Fc结构域的Fc构建体(构建体15)的图示。第一多肽(1502)和第二多肽(1508)中的每个含有一个Fc结构域单体,与野生型序列(分别为1506和1512)相比,所述Fc结构域单体在C<sub>H</sub>3-C<sub>H</sub>3界面处含有荷电氨基酸,所述野生型序列通过接头连接至含突起的Fc结构域单体(分别为1504和1510)。第三多肽和第四多肽(分别为1514和1516)各自含有含空腔的Fc结构域单体。第一多肽(1502)和第二多肽(1508)中的每个还含有静电转向的突变,例如E357K。类似地,第三多肽和第四多肽(分别为1514和1516)各自含有静电转向的突变,例如K370D。1504、1510、1514和1516各自含有氨基酸修饰R292P,该修饰以菱形表示,并且1506和1512各自含有氨基酸修饰I253A,该修饰以星号表示。1502

和1508各自具有SEQ ID NO:75的氨基酸序列。1514和1516各自具有SEQ ID NO:73的氨基酸序列。

[0226] 图18L是含有由四种多肽形成的三个Fc结构域的Fc构建体(构建体16)的图示。第一多肽(1602)和第二多肽(1608)中的每个含有一个Fc结构域单体,与野生型序列(分别为1606和1612)相比,所述Fc结构域单体在C<sub>H</sub>3-C<sub>H</sub>3界面处含有荷电氨基酸,所述野生型序列通过接头连接至含突起的Fc结构域单体(分别为1604和1610)。第三多肽和第四多肽(分别为1614和1616)各自含有含空腔的Fc结构域单体。第一多肽(1602)和第二多肽(1608)中的每个还含有静电转向的突变,例如E357K。类似地,第三多肽和第四多肽(分别为1614和1616)各自含有静电转向的突变,例如K370D。1604、1606、1610、1612、1614和1616各自含有氨基酸修饰R292P,该修饰以菱形表示。1602和1608各自具有SEQ ID NO:76的氨基酸序列。1614和1616各自具有SEQ ID NO:70的氨基酸序列。

[0227] 图18M是含有由四种多肽形成的三个Fc结构域的Fc构建体(Fc构建体17)的图示。第一多肽(1702)和第二多肽(1708)中的每个含有一个Fc结构域单体,与野生型序列(分别为1706和1712)相比,所述Fc结构域单体在C<sub>H</sub>3-C<sub>H</sub>3界面处含有荷电氨基酸,所述野生型序列通过接头连接至含突起的Fc结构域单体(分别为1704和1710)。第三多肽和第四多肽(分别为1714和1716)各自含有含空腔的Fc结构域单体。第一多肽(1702)和第二多肽(1708)中的每个还含有静电转向的突变,例如E357K。类似地,第三多肽和第四多肽(分别为1714和1716)各自含有静电转向的突变,例如K370D。1704、1706、1710、1712、1714和1716各自含有氨基酸修饰R292P,该修饰以菱形表示,并且1706和1712各自含有氨基酸修饰I253A,该修饰以星号表示。1702和1708各自具有SEQ ID NO:77的氨基酸序列。1714和1716各自具有SEQ ID NO:70的氨基酸序列。

[0228] 图18N是含有由四种多肽形成的三个Fc结构域的Fc构建体(构建体18)的图示。第一多肽(1802)和第二多肽(1808)中的每个含有一个Fc结构域单体,与野生型序列(分别为1806和1812)相比,所述Fc结构域单体在C<sub>H</sub>3-C<sub>H</sub>3界面处含有荷电氨基酸,所述野生型序列通过接头连接至含突起的Fc结构域单体(分别为1804和1810)。第三多肽和第四多肽(分别为1814和1816)各自含有含空腔的Fc结构域单体。第一多肽(1802)和第二多肽(1808)中的每个还含有静电转向的突变,例如E357K。类似地,第三多肽和第四多肽(分别为1814和1816)各自含有静电转向的突变,例如K370D。1804、1806、1810、1812、1814和1816各自含有氨基酸修饰R292P,该修饰以菱形表示,并且1804、1810、1814和1816各自含有氨基酸修饰I253A,该修饰以星号表示。1802和1808各自具有SEQ ID NO:78的氨基酸序列。1814和1816各自具有SEQ ID NO:73的氨基酸序列。

[0229] 图18O是含有由四种多肽形成的三个Fc结构域的Fc构建体(构建体19)的图示。第一多肽(1902)和第二多肽(1908)中的每个含有一个Fc结构域单体,与野生型序列(分别为1906和1912)相比,所述Fc结构域单体在C<sub>H</sub>3-C<sub>H</sub>3界面处含有荷电氨基酸,所述野生型序列通过接头连接至含突起的Fc结构域单体(分别为1904和1910)。第三多肽和第四多肽(分别为1914和1916)各自含有含空腔的Fc结构域单体。第一多肽(1902)和第二多肽(1908)中的每个还含有静电转向的突变,例如E357K。类似地,第三多肽和第四多肽(分别为1914和1916)各自含有静电转向的突变,例如K370D。1904、1906、1910、1912、1914和1916各自含有氨基酸修饰R292P(该修饰以菱形表示)和I253A(该修饰以星号表示)。1902和1908各自具有SEQ ID

NO:79的氨基酸序列。1914和1916各自具有SEQ ID NO:73的氨基酸序列。

[0230] 图18P是显示构建体4、构建体5和构建体7的表达的蛋白质印迹。

[0231] 图19A是显示IgG1以及构建体4、构建体6、构建体16和构建体18通过TR-FRET结合至Fc $\gamma$ RIIb的细胞结合的图(显示了3-8次重复的平均值±标准偏差)。

[0232] 图19B是显示IgG1以及构建体4、构建体6、构建体16和构建体18通过TR-FRET结合至Fc $\gamma$ RI的细胞结合的图(显示了3-8次重复的平均值±标准偏差)。

[0233] 图19C是显示IgG1以及构建体4、构建体6、构建体16和构建体18通过TR-FRET结合至FcR $\gamma$ IIa的细胞结合的图(显示了3-8次重复的平均值±标准偏差)。

[0234] 图19D是显示IgG1以及构建体4、构建体6、构建体16和构建体18通过TR-FRET结合至Fc $\gamma$ RIIIa的细胞结合的图(显示了3-8次重复的平均值±标准偏差)。

[0235] 图20是显示构建体4、构建体7、构建体6、构建体16、构建体18和构建体19在pH6.0下通过表面等离子共振(SPR)结合至FcRn的图。归一化的最大结合水平与以结合FcRn为功能的结构域的数量成比例。

[0236] 图21是比较构建体4、构建体6、构建体16和IVIg在小鼠中的药代动力学的图。

[0237] 图22是比较构建体4、构建体5、构建体6和构建体7在小鼠中的药代动力学,以评估具有减少的FcRn结合(例如,I253A突变)的结构域的数量对药代动力学的影响的图。

[0238] 图23是比较构建体20(构建体4)、构建体16、构建体18和构建体19在小鼠中的药代动力学的图。

[0239] 图24是比较IVIg、构建体4、构建体6、构建体16和构建体18诱导的THP-1细胞中的吞噬作用的抑制的图。

[0240] 图25是比较太平洋蓝(pacific-blue)标记的IgG1、构建体4、构建体6、构建体16和构建体18诱导的单核细胞中的IL-8释放的抑制的图。

[0241] 图26是比较构建体4、构建体5、构建体6、构建体7、构建体16、构建体18和构建体19诱导的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的抑制的图。

[0242] 图27是比较通过第12天临床评分测量的各种浓度的构建体4、构建体6、构建体16和构建体18在胶原抗体诱导型关节炎(CAIA)模型中的功效的图。

[0243] 图28是比较通过临床评分测量的构建体4和构建体18在第1天预防性给药的CAIA模型中的功效的图。

[0244] 图29是比较通过临床评分测量的构建体4和构建体18在第-3天预防性给药的CAIA模型中的功效的图。

[0245] 图30是比较通过临床评分测量的构建体4和构建体18在第-7天预防性给药的CAIA模型中的功效的图。

[0246] 图31是比较通过临床评分测量的构建体4和构建体18在第-10天预防性给药的CAIA模型中的功效的图。

[0247] 图32是比较在胶原抗体诱导型关节炎(CAIA)模型中在第1天以100mg/kg给予的构建体4(AA:黑色方块,实线)、构建体18(Q1:黑色三角形,虚线)、构建体19(Q2:黑色菱形,点线)或盐水(灰色圆圈,点划线)的功效的图。在第1天时给予等价体积的盐水(灰色圆圈,点划线)。显示了每个时间点的平均值和平均值的标准误。

[0248] 图33是比较在胶原抗体诱导型关节炎(CAIA)模型中在第-3天以100mg/kg给予的

构建体4(AA:黑色方块,实线)、构建体18(Q1:黑色三角形,虚线)或构建体19(Q2:黑色菱形,点线)的功效的图。在第1天时给予等价体积的盐水(灰色圆圈,点划线)。显示了每个时间点的平均值和平均值的标准误。

[0249] 图34是比较在胶原抗体诱导型关节炎(CAIA)模型中在第-7天以100mg/kg给予的构建体4(AA:黑色方块,实线)、构建体18(Q1:黑色三角形,虚线)或构建体19(Q2:黑色菱形,点线)的功效的图。在第1天时给予等价体积的盐水(灰色圆圈,点划线)。显示了每个时间点的平均值和平均值的标准误。

[0250] 图35是比较在胶原抗体诱导型关节炎(CAIA)模型中在第-10天以100mg/kg给予的构建体4(AA:黑色方块,实线)、构建体18(Q1:黑色三角形,虚线)或构建体19(Q2:黑色菱形,点线)的功效的图。在第1天时给予等价体积的盐水(灰色圆圈,点划线)。显示了每个时间点的平均值和平均值的标准误。

[0251] 图36是比较归一化为峰值最大值的纯化的构建体X1(灰色)和X2(黑色)的尺寸排阻色谱特征曲线的图。

[0252] 图37是纯化的构建体X1(右)、纯化的构建体X2(中)和分子量标准(右)的非还原性十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳结果的图。添加等质量的两种构建体。

[0253] 图38是比较构建体X1(野生型Fc多聚体)(黑色圆圈,实线)和构建体X2(具有I253A/R292P突变的多聚体)(三角形,虚线)的药代动力学以评估减少的FcRn和Fc $\gamma$ RIIb结合对药代动力学的影响的图。显示了每个时间点的平均值和标准偏差。

[0254] 图39是显示以10mg/kg给予的构建体6(圆圈;SEQ ID N0:64和63)、构建体16(三角形;SEQ ID N0:76/70)和构建体18(方块;SEQ ID No:78和73)在食蟹猕猴中的药代动力学的图。在食蟹猕猴中以20mg/kg给予构建体4(倒三角形;SEQ ID No:49和48)。

[0255] 图40是显示以30mg/kg给予的构建体6(灰色圆圈;SEQ ID N0:64和63)、构建体16(菱形;SEQ ID N0:76和70)和构建体18(倒三角形;SEQ ID No:78和73)在食蟹猕猴中的药代动力学的图。在食蟹猕猴中以20mg/kg(方块)、30mg/kg(圆圈)和50mg/kg(三角形)给予构建体4(SEQ ID No:49和48)。

## 具体实施方式

[0256] 包括IgG的Fc结构域的治疗性蛋白质可以用于治疗炎症以及免疫疾病和炎性疾病、癌症和感染。本公开的特征在于用于制备含有Fc结构域的Fc构建体(例如,具有2-10个Fc结构域的Fc构建体,例如具有2、3、4、5、6、7、8、9或10个Fc结构域的Fc构建体)的组合物和方法。本文所述的Fc构建体通过掺入显著改善制造结果的结构特征(例如,甘氨酸间隔物)而促进同质药物组合物的制备。

[0257] 相应地,本公开的特征在于药物组合物,其包括本文所述的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)的基本上同质的群体。同质性是药物组合物的重要方面,因为它影响组合物的药代动力学和体内性能。传统上,在药物产品的制造中,存在产品异质性的问题,这可能由几个因素引起,取决于产品如何进行生产。例如,药物产品可以经历随机产物切割、蛋白水解、降解和/或聚集,亚基的脱靶结合和/或无效的蛋白质折叠。具有不同生物合成过程的不同生物或用于生产药物产品的细胞机制也可能引起产品中的异质性。通常,含有所需药物产品的初始培养物需要经过严格的纯化过程,以产生含有药物产品的较少异

质性的组合物。

[0258] 在一个方面,本公开的特征在于具有结构特征的Fc构建体,所述结构特征显著改善Fc构建体的折叠效率且使亚基的脱靶结合降到最低,因此导致含有这些Fc构建体的药物组合物具有高同质性。具有高度同质性确保了药物组合物的安全性、功效、均匀性和可靠性。具有高度同质性还使由不需要的材料(例如,降解产物和/或聚集产物或多聚体)引起的药物产品的潜在聚集或降解降到最低,以及限制由不需要的材料引起的脱靶效应和不良副作用。

[0259] 如本文详细描述的,本公开的特征在于含有Fc构建体的基本上同质的组合物,所述Fc构建体都具有相同数目的Fc结构域,以及制备此类基本上同质的组合物的方法。

[0260] 本文所述的Fc构建体包括Fc结构域之间的甘氨酸间隔物。如本领域众所周知的,含有丝氨酸和甘氨酸两者的接头在蛋白质中提供结构灵活性,并且通常用于连接两种多肽。我们通过实验(参见实施例4)已观察到,含有丝氨酸和甘氨酸两者的接头经历在接头中的多个丝氨酸处的O-糖基化(例如O-木糖基化),以及在丝氨酸的N末端侧处的蛋白水解。我们旨在优化接头序列和长度,以进一步改善Fc构建体的同质性。我们制备了Fc构建体,其中构建体内的所有接头都是仅具有甘氨酸的甘氨酸间隔物(例如,至少12个甘氨酸,例如,12-30个甘氨酸;SEQ ID NO:27)。通过去除在丝氨酸处的O-糖基化并且还降低构建体的蛋白水解速率,在Fc构建体中具有所有甘氨酸间隔物进一步改善了Fc构建体的同质性(参见实施例4)。因此,通过使用Fc构建体中的所有甘氨酸间隔物,我们能够获得Fc构建体的更基本上同质的群体。

[0261] 同质性是Fc构建体组分的结果。例如,在第一种方法(“方法(a)”)中,可以利用仅含有甘氨酸的接头的掺入以连接Fc结构域单体。如我们通过实验所观察,Fc构建体中的所有甘氨酸间隔物(例如,至少12个甘氨酸,例如,12-30个甘氨酸;SEQ ID NO:27)不经历O-糖基化,并且与包含丝氨酸和甘氨酸的传统接头相比,较不易受蛋白酶解的影响(参见实施例4)。

[0262] 另外,在另一种方法(“方法(b)”)中,通过去除C末端赖氨酸改善了含有本文所述的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)的组合物的同质性。此类C末端赖氨酸残基在跨越许多物种的免疫球蛋白中是高度保守的,并且可以在蛋白质生产过程中被细胞机制完全或部分去除。去除本公开的Fc构建体中的C末端赖氨酸改善了所得到的组合物的均匀性,并且实现了更同质的Fc构建体制备(参见实施例8)。例如,在本文所述的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)的一些实施方案中,去除C末端赖氨酸的密码子,因此生成具有不含C末端赖氨酸残基的多肽的Fc构建体和所得的同质群体。

[0263] 改善含有本文所述的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)的组合物的同质性的进一步方法(“方法(c)”),利用两组异二聚化选择性模块:(i)具有不同反向电荷突变的异二聚化选择性模块和(ii)具有经工程改造的空腔和突起的异二聚化选择性模块。我们已通过实验观察到,例如,参见实施例6,当尝试在Fc构建体中形成异二聚体Fc结构域时,具有(i)和(ii)两者进一步改善通过减少Fc结构域单体的不受控制的结合,以及因此不期望的低聚物和多聚体而产生的药物组合物的同质性。在具体实例中,可以产生含有(i)至少一个反向电荷突变和(ii)至少一个经工程改造的空腔或至少一个经工程改造的突起的Fc结构域单体,并且将选择性地与另一个含有(i)至少一个反向电荷突变和(ii)至少一个

经工程改造的突起或至少一个经工程改造的空腔的Fc结构域单体组合,以形成Fc结构域。在另一个实例中,可以产生含有反向电荷突变K370D与经工程改造的空腔Y349C、T366S、L368A和Y407V的Fc结构域单体,以及另一个含有反向电荷突变E357K与经工程改造的突起S354C和T366W的Fc结构域单体,并且将选择性地组合以形成Fc结构域。

[0264] 如本文详细描述的,含有本公开的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)的基本上同质的组合物可以通过以下来实现:使用Fc构建体中的两个Fc结构域单体之间的全甘氨酸间隔物(方法(a)),使用在Fc构建体中缺乏C末端赖氨酸的多肽(方法(b)),和/或使用两组异二聚化选择性模块((i)具有不同反向电荷突变的异二聚化选择性模块和(ii)具有经工程改造的空腔和突起的异二聚化选择性模块),以促进通过Fc构建体中的一些Fc结构域单体的异二聚体Fc结构域形成(方法(c))。

[0265] 在一些实施方案中,可以通过方法(a)实现含有本文所述的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)的基本上同质的组合物。

[0266] 在一些实施方案中,可以通过方法(b)实现含有本文所述的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)的基本上同质的组合物。

[0267] 在一些实施方案中,可以通过方法(c)实现含有本文所述的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)的基本上同质的组合物。

[0268] 在一些实施方案中,可以通过方法(a)和(b)的组合实现含有本文所述的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)的基本上同质的组合物。

[0269] 在一些实施方案中,可以通过方法(a)和(c)的组合实现含有本文所述的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)的基本上同质的组合物。

[0270] 在一些实施方案中,可以通过方法(b)和(c)的组合实现含有本文所述的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)的基本上同质的组合物。

[0271] 在一些实施方案中,可以通过方法(a)、(b)和(c)的组合实现含有本文所述的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)的基本上同质的组合物。

[0272] 在一些实施方案中,为了进一步改善含有本文所述的Fc构建体的药物组合物的同质性,将组合物中的Fc构建体中的一种或多种多肽中的N末端Asp突变为Gln。在包括本文所述的Fc构建体的基本上同质群体的组合物的一些实施方案中,组合物中的Fc构建体的每种多肽中的N末端Asp突变为Gln。

[0273] 此外,在本公开的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)中,连接Fc结构域单体的接头的长度影响Fc构建体的折叠效率。在一些实施方案中,具有至少4、8或12个甘氨酸(例如,4-30、8-30、12-30个甘氨酸;SEQ ID NO:26和27)的接头可以用于连接本公开的Fc构建体中的Fc结构域单体。

[0274] I.Fc结构域单体

[0275] Fc结构域单体包括铰链结构域、C<sub>H</sub>2抗体恒定结构域和C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域。Fc结构域单体可以具有不同的来源,例如人、小鼠或大鼠。Fc结构域单体可以具有免疫球蛋白抗体同种型IgG、IgE、IgM、IgA或IgD。Fc结构域单体也可以具有任何免疫球蛋白抗体同种型(例如,IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3或IgG4)。Fc结构域单体也可以是杂合体,例如,具有来自IgG1的铰链和C<sub>H</sub>2与来自IgA的C<sub>H</sub>3,或具有来自IgG1的铰链和C<sub>H</sub>2,但来自IgG3的C<sub>H</sub>3。Fc结构域单体的二聚体是Fc结构域(本文进一步定义),其可以结合Fc受体,例如Fc<sub>γ</sub> RIIIa,其是位于

白细胞的表面上的受体。在本公开中,Fc结构域单体的C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域可以在C<sub>H</sub>3-C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域的界面处含有氨基酸置换,以促进它们彼此的结合。在其他实施方案中,Fc结构域单体包括附着至N末端或C末端的另外部分,例如白蛋白结合肽或纯化肽。在本公开中,Fc结构域单体不包含任何类型的抗体可变区,例如V<sub>H</sub>、V<sub>L</sub>、互补决定区(CDR)或高变区(HVR)。

[0276] 在一些实施方案中,本文描述的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)中的Fc结构域单体可以包含与野生型Fc结构域单体的序列(SEQ ID NO:42)至少95%相同(例如,至少97%、99%或99.5%相同)的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,本文描述的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)中的Fc结构域单体可以包含具有最多10个(9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的野生型Fc结构域单体(SEQ ID NO:42)的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,本文描述的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)中的Fc结构域单体可以包含与SEQ ID NO:44、46、48和50-53(参见实施例1、表4和表5)中任一者的序列至少95%相同(例如,至少97%、99%或99.5%相同)的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,本文描述的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)中的Fc结构域单体可以包含具有最多10个(9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的SEQ ID NO:44、46、48和50-53(参见实施例1、表4和表5)中的任一者的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些情况下,除改变之外,这些氨基酸修饰还在甘氨酸间隔物的长度中,即除变化之外,最多10个(9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰还在所有甘氨酸间隔物(SEQ ID NO:23)的长度中。在某些实施方案中,Fc构建体中的Fc结构域单体可以包含与SEQ ID NO:48、52和53中的任一者的序列至少95%相同(例如,至少97%、99%或99.5%相同)的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成。在某些实施方案中,Fc构建体中的Fc结构域单体可以包含具有至多10个(9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的SEQ ID NO:48、52和53中的任一者的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成。

[0277] SEQ ID NO:42:野生型人IgG1 Fc结构域单体氨基酸序列

[0278] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTQNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0279] SEQ ID NO:44

[0280] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTQNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0281] SEQ ID NO:46

[0282] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTQNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL

SPG

[0283] SEQ ID NO:48

[0284] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT  
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVTLPPSRDELTQNQVSL  
CAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL  
SPG

[0285] SEQ ID NO:50

[0286] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT  
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVTLPPCRDELTQNQVSLW  
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL  
SPGK

[0287] SEQ ID NO:51

[0288] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT  
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVTLPPSRDELTQNQVSLT  
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL  
SPGK

[0289] SEQ ID NO:52

[0290] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT  
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVTLPPSRDELTQNQVSLT  
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL  
SPG

[0291] SEQ ID NO:53

[0292] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT  
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVTLPPCRDKLTQNQVSLW  
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL  
SPGK

[0293] II.Fc结构域

[0294] 如本文定义的,Fc结构域包括两个Fc结构域单体,其通过C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域之间的相互作用而二聚化。在本公开中,Fc结构域不包括抗体的可变区,例如V<sub>H</sub>、V<sub>L</sub>、CDR或HVR。Fc结构域形成与Fc受体结合的最小结构,所述Fc受体例如Fc-γ受体(即Fc γ受体(Fc γ R))、Fc-α受体(即Fcα受体(FcαR))、Fc-ε受体(即Fcε受体(FcεR))和/或新生儿Fc受体(FcRn)。在一些实施方案中,本公开的Fc结构域结合Fc γ受体(例如,Fc γ RI (CD64)、Fc γ RIIa (CD32)、Fc γ RIIb (CD32)、Fc γ RIIIa (CD16a)、Fc γ RIIIb (CD16b))和/或Fc γ RIV和/或新生儿Fc受体(FcRn)。

[0295] III.Fc结构域修饰

[0296] 未经修饰的Fc结构域单体可以是天然存在的人Fc结构域单体或WT人Fc结构域单体。Fc结构域单体可以是天然存在的人Fc结构域单体,其包含铰链、CH2结构域和CH3结构域;或其具有至多16个(例如,至多2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16个)氨基酸修饰(例如,单一氨基酸修饰)以适应或促进定向二聚化的变体。Fc结构域单体可以是IgG1 Fc

结构域、IgG2Fc结构域、IgG3 Fc结构域、IgG4 Fc结构域或它们的组合。Fc结构域单体可以是具有最多10个(9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的IgG1 Fc结构域、IgG2Fc结构域、IgG3 Fc结构域、IgG4 Fc结构域或它们的组合。在一些情况下,Fc结构域单体是具有最多十个氨基酸修饰(例如,不超过2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个或16个氨基酸修饰)的人IgG Fc结构域单体。在一些情况下,Fc结构域单体包含具有不超过十个氨基酸修饰(例如,不超过2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个或16个氨基酸修饰)的SEQ ID NO:42的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些情况下,Fc结构域包括至少一个氨基酸修饰,其中所述氨基酸修饰改变以下中的一种或多种:(i)对一种或多种Fc受体的结合亲和力、(ii)效应子功能、(iii)Fc结构域硫酸盐化水平、(iv)半衰期、(v)蛋白酶抗性、(vi)Fc结构域稳定性、和/或(vii)对降解的敏感性。在一些情况下,Fc结构域包括不超过16个氨基酸修饰(例如,CH3结构域中不超过2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16个氨基酸修饰)。

[0297] 本公开的Fc构建体的至少一个Fc结构域包含位置I253处的氨基酸修饰(例如,I253A、I253C、I253D、I253E、I253F、I253G、I253H、I253I、I253K、I253L、I253M、I253N、I253P、I253Q、I253R、I253S、I253T、I253V、I253W或I253Y)和/或位置R292处的氨基酸修饰(例如,R292P、R292D、R292E、R292L、R292Q、R292R、R292T和R292Y)。在一些情况下,至少一个Fc结构域包含位置I253处的氨基酸修饰,例如I253A。在一些情况下,至少一个Fc结构域包含位置R292处的氨基酸修饰,例如R292P。Fc结构域可以包含位置I253处的氨基酸修饰(例如,I253A)和位置R292处的氨基酸修饰(例如,R292P)两者。例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体可以包含在一个、两个或全部三个Fc结构域中的位置I253处的氨基酸修饰(例如,I253A),并且可以另外地或可替代地包含在一个、两个或全部三个Fc结构域中的位置R292处的氨基酸修饰(例如,R292P)。具有I253A和/或R292P氨基酸修饰的示例性Fc构建体如图2和图18B-图180所示。

[0298] 在一些实施方案中,改变半衰期的Fc结构域修饰可以减少经修饰的Fc结构域与FcRn的结合,例如通过位置I253处的Fc结构域的修饰来减少该结合。位置I253处的修饰可以包括氨基酸置换,其中位置I253处的氨基酸被天然或非天然氨基酸置换;位置I253处的氨基酸的缺失;或在Fc结构域的位置I253处的一个或多个氨基酸残基的插入。氨基酸I253的修饰可以作为包含多个修饰(例如,在其他残基位置处,例如,R292)的组合(例如,一个或多个氨基酸置换、缺失和/或插入的组合)的一部分。在特定实施方案中,Fc构建体可以含有例如三个Fc结构域,其中至少一个Fc结构域含有位置I253处的修饰。例如,位置I253处的野生型氨基酸残基(例如,异亮氨酸(I))可以置换天然或非天然氨基酸(例如,丙氨酸(A))。在一些情况下,位置I253处的每种氨基酸修饰独立地选自例如I253A、I253C、I253D、I253E、I253F、I253G、I253H、I253I、I253K、I253L、I253M、I253N、I253P、I253Q、I253R、I253S、I253T、I253V、I253W和I253Y。

[0299] 在其他实施方案中,改变半衰期的Fc结构域修饰可以改变经修饰的Fc结构域与Fc $\gamma$ RIIb的结合,例如通过位置R292处的Fc结构域的修饰来减少该结合。位置R292处的修饰可以包括氨基酸置换,其中位置R292处的氨基酸被天然或非天然氨基酸置换;位置R292处的氨基酸的缺失;或在Fc结构域的位置R292处的一个或多个氨基酸残基的插入。氨基酸292

的修饰可以作为包含多个修饰(例如,在其他残基位置处,例如,I253)的组合(例如,一个或多个氨基酸置换、缺失和/或插入的组合)的一部分。在特定实施方案中,Fc构建体可以含有例如三个Fc结构域,其中至少一个Fc结构域含有位置R292处的修饰。例如,位置292处的野生型氨基酸残基(例如,精氨酸(R))可以置换天然或非天然氨基酸(例如,脯氨酸(P))。在一些情况下,位置R292处的每种氨基酸修饰独立地选自例如R292P、R292D、R292E、R292L、R292Q、R292R、R292T和R292Y。

[0300] 对Fc受体具有改变的结合亲和力的示例性Fc结构域包括含有双重突变体S267E/L328F的Fc单体。此前已显示S267E/L328F突变显著且特异性地增强IgG1与Fc  $\gamma$  RIIb受体的结合(Chu等人Molecular Immunology 45:2008)。

[0301] 位置I253处的氨基酸修饰(例如,改变半衰期)(例如,I253A)可以出现在Fc构建体(例如,构建体4(图2))的至少一个(例如,1个、2个、3个、4个或5个)Fc结构域中。在其他实施方案中,位置R292处的氨基酸修饰(例如,R292P)可以出现在Fc构建体(例如,构建体4(图2))的至少一个(例如,1个、2个、3个、4个或5个)Fc结构域中。例如,在一些实施方案中,氨基酸修饰可以出现在位置I253(例如,I253A)和位置R292(例如,R292P)两者。例如,Fc构建体(例如,构建体4(图2))可以含有具有I253处的氨基酸修饰(例如,I253A)的一个Fc结构域,并且含有具有R292处的氨基酸修饰(例如,R292P)的至少一个(例如,1个、2个或3个)Fc结构域。在另一个实施方案中,Fc构建体(例如,构建体4(图2))可以含有具有I253处的氨基酸修饰(例如,I293A)的两个Fc结构域,并且含有具有R292处的氨基酸修饰(例如,R292P)的至少一个(例如,1个、2个或3个)Fc结构域。在又一个实施方案中,Fc构建体(例如,构建体4)可以含有具有I253处的氨基酸修饰(例如,I293A)的三个Fc结构域,并且含有具有R292处的氨基酸修饰(例如,R292P)的至少一个(例如,1个、2个或3个)Fc结构域。具有在氨基酸位置I253和/或R292处的修饰(例如,分别为I293A和/或R292P)的示例性Fc构建体如图18A-图18O所示。图18A-图18O中未示出,但是本公开设想了具有Fc结构域单体(所述Fc结构域单体组成Fc结构域)内的氨基酸修饰(在氨基酸位置I253和/或R292处)的异质组合的Fc构建体。

[0302] IV.二聚化选择性模块

[0303] 在本公开中,二聚化选择性模块是Fc结构域单体的部分,其促进两个Fc结构域单体的优先配对以形成Fc结构域。具体地,二聚化选择性模块是Fc结构域单体的C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域的部分,其包括位于两个Fc结构域单体的相互作用的C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域之间的界面处的氨基酸置换。在二聚化选择性模块中,由于为了那些置换选择的氨基酸的相容性,氨基酸置换使得两个C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域的二聚化变得有利。有利的Fc结构域的最终形成选择性超过其他Fc结构域,所述其他Fc结构域由缺少二聚化选择性模块的Fc结构域单体形成或在二聚化选择性模块中具有不相容的氨基酸置换。这种类型的氨基酸置换可以使用本领域众所周知的常规分子克隆技术,例如QuikChange<sup>®</sup>诱变进行制备。

[0304] 在一些实施方案中,二聚化选择性模块包括C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中的经工程改造的空腔(在本文中进一步描述)。在其他实施方案中,二聚化选择性模块包括C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中的经工程改造的突起(在本文中进一步描述)。为了选择性地形成Fc结构域,具有相容的二聚化选择性模块的两个Fc结构域单体,例如,含有经工程改造的空腔的一个C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域和含有经工程改造的突起的另一个C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域,组合以形成Fc结构域单体的突起进入空腔内对。经工程改造的突起和经工程改造的空腔是异二聚化选择性模块

的实例,其可以在Fc结构域单体的C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中制备,以便促进具有相容的异二聚化选择性模块的两个Fc结构域单体的有利的异二聚化。

[0305] 在其他实施方案中,具有带正电荷的氨基酸置换的二聚化选择性模块的Fc结构域单体和具有带负电荷的氨基酸置换的二聚化选择性模块的Fc结构域单体,可以通过荷电氨基酸的有利的静电转向(在本文中进一步描述)选择性地组合,以形成Fc结构域。在一些实施方案中,Fc结构域单体可以包括下述带正电荷和带负电荷的氨基酸置换之一:K392D、K392E、D399K、K409D、K409E、K439D和K439E。在一个实例中,含有带正电荷的氨基酸置换例如D356K或E357K的Fc结构域单体、以及含有带负电荷的氨基酸置换例如K370D或K370E的Fc结构域单体,可以通过荷电氨基酸的有利的静电转向选择性地组合,以形成Fc结构域。在另一个实例中,含有E357K的Fc结构域单体和含有K370D的Fc结构域单体,可以通过荷电氨基酸的有利的静电转向选择性地组合,以形成Fc结构域。在一些实施方案中,反向电荷氨基酸置换可以用作异二聚化选择性模块,其中含有不同但相容的反向电荷氨基酸置换的两个Fc结构域单体组合,以形成异二聚体Fc结构域。在下文进一步描述的表1和2A中进一步列出了特定的二聚化选择性模块,但不限于此。

[0306] 在其他实施方案中,两个Fc结构域单体包括同二聚化选择性模块,其在C<sub>H</sub>3结构域之间的界面处的荷电残基环内的至少两个位置含有相同的反向电荷突变。同二聚体选择性模块是反向电荷氨基酸置换,其促进Fc结构域单体的同二聚化,以形成同二聚体Fc结构域。通过逆转两个Fc结构域单体中的两个或更多个互补残基对的两个成员的电荷,突变的Fc结构域单体保持与相同突变序列的Fc结构域单体互补,但与不含那些突变的Fc结构域单体具有更低的互补性。在一个实施方案中,Fc结构域包括Fc结构域单体,其包括双重突变体K409D/D399K、K392D/D399K、E357K/K370E、D356K/K439D、K409E/D399K、K392E/D399K、E357K/K370D或D356K/K439E。在另一个实施方案中,Fc结构域包括Fc结构域单体,其包括组合任何一对双重突变体的四重突变体,例如K409D/D399K/E357K/K370E。同二聚化选择性模块的实例进一步显示于表2B和2C中。

[0307] 在进一步的实施方案中,含有(i)至少一个反向电荷突变和(ii)至少一个经工程改造的空腔或至少一个经工程改造的突起的Fc结构域单体,可以与另一个含有(i)至少一个反向电荷突变和(ii)至少一个经工程改造的突起或至少一个经工程改造的空腔的Fc结构域单体选择性地组合,以形成Fc结构域。例如,含有反向电荷突变K370D与经工程改造的空腔Y349C、T366S、L368A和Y407V的Fc结构域单体、以及另一个含有反向电荷突变E357K与经工程改造的突起S354C和T366W的Fc结构域单体,可以选择性地组合以形成Fc结构域。

[0308] 通过C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中相容的氨基酸置换促进此类Fc结构域的形成。含有不相容的氨基酸置换的两个二聚化选择性模块,例如两者均含有经工程改造的空腔、两者均含有经工程改造的突起、或两者均在C<sub>H</sub>3-C<sub>H</sub>3界面处含有相同的荷电氨基酸,不促进异二聚体Fc结构域的形成。

[0309] 此外,用于促进具有确定的Fc结构域单体的Fc结构域形成的其他方法包括但不限于LUZ-Y方法(美国专利申请公开号W02011034605),其包括亮氨酸拉链的单体 $\alpha$ -螺旋与每个Fc结构域单体的C末端融合,以允许异二聚体形成,以及链交换工程改造的结构域(SEED)主体方法(Davis等人,Protein EngDes Sel. 23:195-202,2010),其生成具有异二聚体Fc结构域单体的Fc结构域,所述异二聚体Fc结构域单体各自包括IgA和IgG C<sub>H</sub>3序列的交替区

段。

[0310] V. 经工程改造的空腔和经工程改造的突起

[0311] 通过Carter和同事(Ridgway等人,Protein Eng.9:617-612,1996;Atwell等人, J Mol Biol.270:26-35,1997;Merchant等人,Nat Biotechnol.16:677-681,1998)描述了经工程改造的空腔和经工程改造的突起(或“旋钮进洞(knob-into-hole)”策略)的使用。旋钮和洞相互作用有利于异二聚体的形成,而由于空间碰撞和有利相互作用的缺失,旋钮-旋钮和洞-动相互作用阻碍了同二聚体形成。在美国专利号5,731,168中也公开了“旋钮进洞”技术。

[0312] 在本公开中,经工程改造的空腔和经工程改造的突起用于制备本文所述的Fc构建体。经工程改造的空腔是当蛋白质中的原始氨基酸替换为具有较小侧链体积的不同氨基酸时产生的空隙。经工程改造的突起是当蛋白质中的原始氨基酸替换为具有较大侧链体积的不同氨基酸时产生的突起。具体地,待替换的氨基酸位于Fc结构域单体的C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中,并且涉及两个Fc结构域单体的二聚化。在一些实施方案中,产生一个C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中的经工程改造的空腔,以容纳另一个C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中的经工程改造的突起,使得两个C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域均充当促进或有利于两个Fc结构域单体的二聚化的二聚化选择性模块(例如,异二聚化选择性模块)(上文描述的)。在其他实施方案中,产生一个C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中的经工程改造的空腔,以更好地容纳另一个C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中的原始氨基酸。在另外其他实施方案中,产生一个C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中的经工程改造的突起,以与另一个C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中的原始氨基酸形成另外的相互作用。

[0313] 可以通过用含有较小侧链的氨基酸(例如丙氨酸、缬氨酸或苏氨酸)替换含有较大侧链(例如酪氨酸或色氨酸)的氨基酸来构建经工程改造的空腔。具体地,一些二聚化选择性模块(例如,异二聚化选择性模块)(上文进一步描述)含有经工程改造的空腔,例如C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中的Y407V突变。类似地,可以通过用含有较大侧链的氨基酸替换含有较小侧链的氨基酸来构建经工程改造的突起。具体地,一些二聚化选择性模块(例如,异二聚化选择性模块)(上文进一步描述)含有经工程改造的突起,例如C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中的T366W突变。在本公开中,经工程改造的空腔和经工程改造的突起也与C<sub>H</sub>3结构域间二硫键工程改造组合,以增强异二聚体形成。在一个实例中,含有经工程改造的空腔Y349C、T366S、L368A和Y407V的Fc结构域单体,可以与另一个含有经工程改造的突起S354C和T366W的Fc结构域单体选择性地组合,以形成Fc结构域。在另一个实例中,含有经工程改造的空腔Y349C的Fc结构域单体和含有经工程改造的突起S354C的Fc结构域单体,可以选择性地组合以形成Fc结构域。与二硫键工程改造或结构计算(混合HA-TF)组合的其他经工程改造的空腔和经工程改造的突起包括但不限于表1。

[0314] 表1

策略	Fc 结构域单体 1 的 CH <sub>3</sub> 抗体 恒定结构域	Fc 结构域单体 2 的 CH <sub>3</sub> 抗体 恒定结构域	参考文献
[0315]	Y407T	T366Y	US 8,216,805
	Y407A	T366W	US 8,216,805
	F405A	T394W	US 8,216,805
	Y407T	T366Y	US 8,216,805
	T394S	F405W	US 8,216,805
	T394W:Y407T	T366Y:F405A	US 8,216,805
	T394S:Y407A	T366W:F405W	US 8,216,805
	T366W:T394S	F405W:Y407A	US 8,216,805
经工程改 造的空腔 和突起 ("旋钮进 洞")， S-S 工程改造	T366S:L368A:Y407V:Y349C	T366W:S354C	Zeidler 等人, <i>J Immunol.</i> 163:1246-52, 1999
混合的	S346H:F405A	Y349T:T394F	WO2006106905

[0316]	HA-TF		
--------	-------	--	--

[0317] 用不同的氨基酸残基替换C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中的原始氨基酸残基可以通过改变编码原始氨基酸残基的核酸来实现。可以替换的原始氨基酸残基数目的上限是C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域的界面中残基的总数目,假定仍维持在界面处的充分相互作用。在一些情况下,CH3抗体恒定结构域具有不超过16个(例如,不超过2个、4个、6个、8个、10个、12个、14个或16个)单一氨基酸修饰。

[0318] VI. 静电转向

[0319] 静电转向是利用肽、蛋白质结构域和蛋白质中带相反电荷的氨基酸之间的有利静电相互作用来控制更高级蛋白质分子的形成。在美国专利申请公开号2014-0024111中公开了使用静电转向效应来改变抗体结构域的相互作用以减少同二聚体形成的方法,有利于在双特异性抗体的生成中的异二聚体形成。

[0320] 在本公开中,静电转向用于控制Fc结构域单体的二聚化和Fc构建体的形成。特别地,为了使用静电控制来控制Fc结构域单体的二聚化,构成C<sub>H</sub>3-C<sub>H</sub>3界面的一个或多个氨基酸残基替换为带正电荷或带负电荷的氨基酸残基,使得相互作用变得具有静电有利或不利,取决于引入的具体荷电氨基酸。在一些实施方案中,界面中的带正电荷的氨基酸例如赖氨酸、精氨酸或组氨酸,替换为带负电荷的氨基酸例如天冬氨酸或谷氨酸。在其他实施方案中,界面中的带负电荷的氨基酸替换为带正电荷的氨基酸。荷电氨基酸可以引入相互作用的C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域之一或两者。通过将荷电氨基酸引入相互作用的C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域,

产生二聚化选择性模块(上文进一步描述的),其可以选择性地形成Fc结构域单体的二聚体,如受来源于荷电氨基酸之间的相互作用的静电转向效应控制的。

[0321] 在一些实施方案中,为了产生包括反向电荷的二聚化选择性模块,其可以如通过静电转向效应控制的选择性地形成Fc结构域单体的二聚体,可以通过异二聚化或同二聚化选择性地形成两个Fc结构域单体。

[0322] Fc结构域单体的异二聚化

[0323] Fc结构域单体的异二聚化可以通过在两个Fc结构域单体中引入不同但相容的突变得到促进,例如包括但不限于表2A中的电荷残基对。在一些实施方案中,Fc结构域单体可以包括下述带正电荷和带负电荷的氨基酸置换之一:D356K、D356R、E357K、E357R、K370D、K370E、K392D、K392E、D399K、K409D、K409E、K439D和K439E。在一个实例中,含有带正电荷的氨基酸置换例如D356K或E357K的Fc结构域单体、以及含有带负电荷的氨基酸置换例如K370D或K370E的Fc结构域单体,可以通过荷电氨基酸的有利的静电转向选择性地组合,以形成Fc结构域。在另一个实例中,含有E357K的Fc结构域单体和含有K370D的Fc结构域单体,可以通过荷电氨基酸的有利的静电转向选择性地组合,以形成Fc结构域。

[0324] 例如,在具有三个Fc结构域的Fc构建体中,三个Fc结构域中的两个可以通过两个Fc结构域单体的异二聚化形成,如通过静电转向效应所促进的。“异二聚体Fc结构域”指通过两个Fc结构域单体的异二聚化形成的Fc结构域,其中所述两个Fc结构域单体含有不同的反向电荷突变(异二聚化选择性模块)(参见例如,表2A中的突变),其促进这两个Fc结构域单体的有利形成。如图1和2中所示,在具有三个Fc结构域-一个羧基末端“茎”Fc结构域和两个氨基末端“分支”Fc结构域的Fc构建体中-每个氨基末端“分支”Fc结构域可以是异二聚体Fc结构域(也称为“分支异二聚体Fc结构域”)(例如,由图1中的Fc结构域单体106和114或Fc结构域单体112和116形成的异二聚体Fc结构域;由图2中的Fc结构域单体206和214或Fc结构域单体212和216形成的异二聚体Fc结构域)。分支异二聚体Fc结构域可以由含有E357K的Fc结构域单体和另一个含有K370D的Fc结构域单体形成。

[0325] 表2A

	Fc 结构域单体 1 的 C <sub>H</sub> 3 抗体恒定结构域中的反向电荷突变	Fc 结构域单体 2 的 C <sub>H</sub> 3 抗体恒定结构域中的反向电荷突变
[0326]	K409D	D399K
	K409D	D399R
	K409E	D399K
	K409E	D399R
	K392D	D399K
	K392D	D399R
	K392E	D399K
	K392E	D399R
	K370D	E357K
	K370D	E357R
[0327]	Fc 结构域单体 1 的 C <sub>H</sub> 3 抗体恒定结构域中的反向电荷突变	Fc 结构域单体 2 的 C <sub>H</sub> 3 抗体恒定结构域中的反向电荷突变
	K370E	E357K
	K370E	E357R
	K370D	D356K
	K370D	D356R
	K370E	D356K
	K370E	D356R
[0328]	K409D, K392D	D399K, E356K
	K370E, K409D, K439E	E356K, E357K, D399K

[0328] Fc结构域单体的同二聚化

[0329] 通过以对称方式在两个Fc结构域单体中引入相同的静电转向突变(同二聚化选择性模块),可以促进Fc结构域单体的同二聚化。在一些实施方案中,两个Fc结构域单体包括同二聚体选择性模块,其在C<sub>H</sub>3结构域之间的界面处的荷电残基环内的至少两个位置含有

相同的反向电荷突变。通过逆转两个Fc结构域单体中的两个或更多个互补残基对的两个成员的电荷,突变的Fc结构域单体保持与相同突变序列的Fc结构域单体互补,但与不含那些突变的Fc结构域单体具有更低的互补性。可以引入Fc结构域单体内以促进其同二聚化的静电转向突变显示于表2B和2C中,但不限于此。在一个实施方案中,Fc结构域包括两个Fc结构域单体,每个单体包括双重反向电荷突变体(表2B),例如K409D/D399K。在另一个实施方案中,Fc结构域包括两个Fc结构域单体,每个单体包括四重反向突变体(表2C),例如K409D/D399K/K370D/E357K。

[0330] 例如,在具有三个Fc结构域的Fc构建体中,三个Fc结构域之一可以通过两个Fc结构域单体的同二聚化形成,如通过静电转向效应所促进的。“同二聚体Fc结构域”指通过两个Fc结构域单体的同二聚化形成的Fc结构域,其中所述两个Fc结构域单体含有相同的反向电荷突变(参见例如,表2B和表2C中的突变)。如图1和2中所示,在具有三个Fc结构域-一个羧基末端“茎”Fc结构域和两个氨基末端“分支”Fc结构域的Fc构建体中-羧基末端“茎”Fc结构域可以是同二聚体Fc结构域(也称为“茎同二聚体Fc结构域”) (例如,由图1中的Fc结构域单体104和110形成的同二聚体Fc结构域;由图2中的Fc结构域单体204和210形成的同二聚体Fc结构域)。茎同二聚体Fc结构域可以由两个Fc结构域单体形成,每个Fc结构域单体含有双重突变体K409D/D399K。

[0331] 表2B

[0332]

在同二聚体 Fc 结构域中的两个 Fc 结构域单体各自的 C <sub>H</sub> 3 抗体恒定结构域中的反向电荷突变
K409D/D399K
K409D/D399R
K409E/D399K
K409E/D399R
K392D/D399K
K392D/D399R
K392E/D399K
K392E/D399R
K370D/E357K
K370D/E357R
K370E/E357K
K370E/E357R
K370D/D356K
K370D/D356R
K370E/D356K
K370E/D356R

[0333] 表2C

[0334]

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

[0335]

在同二聚体 Fc 结构域中的两个 Fc 结构域单体各自的 C <sub>H3</sub> 抗体恒定结构域中的反向电荷突变	在同二聚体 Fc 结构域中的两个 Fc 结构域单体各自的 C <sub>H3</sub> 抗体恒定结构域中的反向电荷突变
K409D/D399K/K370D/E357K	K392D/D399K/K370D/E357K
K409D/D399K/K370D/E357R	K392D/D399K/K370D/E357R
K409D/D399K/K370E/E357K	K392D/D399K/K370E/E357K
K409D/D399K/K370E/E357R	K392D/D399K/K370E/E357R
K409D/D399K/K370D/D356K	K392D/D399K/K370D/D356K
K409D/D399K/K370D/D356R	K392D/D399K/K370D/D356R
K409D/D399K/K370E/D356K	K392D/D399K/K370E/D356K
K409D/D399K/K370E/D356R	K392D/D399K/K370E/D356R
K409D/D399R/K370D/E357K	K392D/D399R/K370D/E357K
K409D/D399R/K370D/E357R	K392D/D399R/K370D/E357R
K409D/D399R/K370E/E357K	K392D/D399R/K370E/E357K
K409D/D399R/K370E/E357R	K392D/D399R/K370E/E357R
K409D/D399R/K370D/D356K	K392D/D399R/K370D/D356K
K409D/D399R/K370D/D356R	K392D/D399R/K370D/D356R
K409D/D399R/K370E/D356K	K392D/D399R/K370E/D356K
K409D/D399R/K370E/D356R	K392D/D399R/K370E/D356R
K409E/D399K/K370D/E357K	K392E/D399K/K370D/E357K
K409E/D399K/K370D/E357R	K392E/D399K/K370D/E357R
K409E/D399K/K370E/E357K	K392E/D399K/K370E/E357K
K409E/D399K/K370E/E357R	K392E/D399K/K370E/E357R
K409E/D399K/K370D/D356K	K392E/D399K/K370D/D356K
K409E/D399K/K370D/D356R	K392E/D399K/K370D/D356R
K409E/D399K/K370E/D356K	K392E/D399K/K370E/D356K

在同二聚体 Fc 结构域中的两个 Fc 结构域单体各自的 C <sub>H</sub> 3 抗体恒定结构域中的反向电荷突变		在同二聚体 Fc 结构域中的两个 Fc 结构域单体各自的 C <sub>H</sub> 3 抗体恒定结构域中的反向电荷突变
[0336]	K409E/D399K/K370E/D356R	K392E/D399K/K370E/D356R
	K409E/D399R/K370D/E357K	K392E/D399R/K370D/E357K
	K409E/D399R/K370D/E357R	K392E/D399R/K370D/E357R
	K409E/D399R/K370E/E357K	K392E/D399R/K370E/E357K
	K409E/D399R/K370E/E357R	K392E/D399R/K370E/E357R
	K409E/D399R/K370D/D356K	K392E/D399R/K370D/D356K
	K409E/D399R/K370D/D356R	K392E/D399R/K370D/D356R
	K409E/D399R/K370E/D356K	K392E/D399R/K370E/D356K
	K409E/D399R/K370E/D356R	K392E/D399R/K370E/D356R

[0337] 用不同的氨基酸残基替换C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中的原始氨基酸残基可以通过改变编码原始氨基酸残基的核酸来实现。可以替换的原始氨基酸残基数目的上限是C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域的界面中残基的总数目,假定仍维持在界面处的充分相互作用。在一些情况下,CH3抗体恒定结构域具有不超过16个(例如,不超过2个、4个、6个、8个、10个、12个、14个或16个)单一氨基酸修饰。

[0338] VII.接头

[0339] 在本公开中,接头用于描述多肽或蛋白质结构域和/或结合的非蛋白质部分之间的键合或连接。在一些实施方案中,接头是至少两个Fc结构域单体之间的键合或连接,对于其接头将第一Fc结构域单体的C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域的C末端连接至第二Fc结构域单体的铰链结构域的N末端,使得两个Fc结构域单体以串联形式彼此连接。在其他实施方案中,接头是Fc结构域单体和与其附着的任何其他蛋白质结构域之间的键合。例如,接头可以将Fc结构域单体的C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域的C末端附着至白蛋白结合肽的N末端。

[0340] 接头可以是简单的共价键例如肽键,合成聚合物例如聚乙二醇(PEG)聚合物,或由化学反应例如化学缀合产生的任何种类的键。在接头是肽键的情况下,在一个蛋白质结构域的C末端处的羧酸基团可以在缩合反应中与另一个蛋白质结构域的N末端的氨基反应,以形成肽键。具体地,肽键可以通过本领域众所周知的常规有机化学反应由合成手段形成,或通过天然产生由宿主细胞形成,其中编码以串联形式的两种蛋白质的DNA序列的多核苷酸序列,例如两个Fc结构域的单体,可以通过宿主细胞中的必需分子机器,例如DNA聚合酶和核糖体,直接转录且翻译成编码两种蛋白质的连续多肽。

[0341] 在接头是合成聚合物例如PEG聚合物的情况下,聚合物可以在每个末端处用反应性化学官能团官能化,以与在两个蛋白质的连接末端处的末端氨基酸反应。

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

和另一种蛋白质的N末端。然后两个官能团可以通过合成化学手段反应,以形成化学键,因此将两种蛋白质连接在一起。此类化学缀合程序对于本领域技术人员是常规的。

[0343] 间隔物

[0344] 在本公开中,两个Fc结构域单体之间的接头可以是包含3-200个氨基酸(例如,3-200、3-180、3-160、3-140、3-120、3-100、3-90、3-80、3-70、3-60、3-50、3-45、3-40、3-35、3-30、3-25、3-20、3-15、3-10、3-9、3-8、3-7、3-6、3-5、3-4、4-200、5-200、6-200、7-200、8-200、9-200、10-200、15-200、20-200、25-200、30-200、35-200、40-200、45-200、50-200、60-200、70-200、80-200、90-200、100-200、120-200、140-200、160-200或180-200个氨基酸)(例如,3-150、3-100、3-60、3-50、3-40、3-30、3-20、3-10、3-8、3-5、4-30、5-30、6-30、8-30、10-20、10-30、12-30、14-30、20-30、15-25、15-30、18-22和20-30个氨基酸)的氨基酸间隔物。在一些实施方案中,两个Fc结构域单体之间的接头是含有至少12个氨基酸,诸如12-200个氨基酸(例如,12-200、12-180、12-160、12-140、12-120、12-100、12-90、12-80、12-70、12-60、12-50、12-40、12-30、12-20、12-19、12-18、12-17、12-16、12-15、12-14或12-13个氨基酸)(例如,14-200、16-200、18-200、20-200、30-200、40-200、50-200、60-200、70-200、80-200、90-200、100-200、120-200、140-200、160-200、180-200或190-200个氨基酸)的氨基酸间隔物。在一些实施方案中,两个Fc结构域单体之间的接头是含有12-30个氨基酸(例如,12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个氨基酸)的氨基酸间隔物。合适的肽间隔物是本领域已知的,并且包括例如含有柔性氨基酸残基(例如甘氨酸和丝氨酸)的肽接头。在某些实施方案中,间隔物可以含有GS、GGS、GGGGS (SEQ ID N0:1)、GGSG (SEQ ID N0:2) 或SGGG (SEQ ID N0:3) 的基序,例如多个或重复基序。在某些实施方案中,间隔物可以含有2至12个氨基酸,所述氨基酸包含GS的基序,例如GS、GSGS (SEQ ID N0:4)、GSGSGS (SEQ ID N0:5)、GSGSGSGS (SEQ ID N0:6)、GSGSGSGSGS (SEQ ID N0:7) 或GSGSGSGSGSGS (SEQ ID N0:8)。在某些其他实施方案中,间隔物可以含有3至12个氨基酸,所述氨基酸包含GGS的基序,例如GGS、GGSGGS (SEQ ID N0:9)、GGSGGSGGGS (SEQ ID N0:10) 和GGSGGGSGGGSGGS (SEQ ID N0:11)。在另外其他实施方案中,间隔物可以含有4至20个氨基酸,所述氨基酸包含GGSG (SEQ ID N0:2) 的基序,例如GGSGGGSG (SEQ ID N0:12)、GGSGGGSGGGSG (SEQ ID N0:13)、GGSGGGSGGGSGGGSG (SEQ ID N0:14) 或GGSGGGSGGGSGGGSGGGSG (SEQ ID N0:15)。在其他实施方案中,间隔物可以含有GGGGS (SEQ ID N0:1) 的基序,例如GGGGSGGGGS (SEQ ID N0:16) 或GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID N0:17)。在某些实施方案中,间隔物是SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG (SEQ ID N0:18)。

[0345] 在一些实施方案中,两个Fc结构域单体之间的间隔物仅含有甘氨酸残基,例如至少4个甘氨酸残基(例如,4-200、4-180、4-160、4-140、4-40、4-100、4-90、4-80、4-70、4-60、4-50、4-40、4-30、4-20、4-19、4-18、4-17、4-16、4-15、4-14、4-13、4-12、4-11、4-10、4-9、4-8、4-7、4-6或4-5个甘氨酸残基)(例如,4-200、6-200、8-200、10-200、12-200、14-200、16-200、18-200、20-200、30-200、40-200、50-200、60-200、70-200、80-200、90-200、100-200、120-200、140-200、160-200、180-200或190-200个甘氨酸残基)。在某些实施方案中,间隔物具有4-30个甘氨酸残基(例如,4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个甘氨酸残基)。在一些实施方案中,仅含有甘氨酸残基的间隔物可以不是糖基化的(例如,0-连接糖基化,也称为0-糖基化),或与例如含有一个或多个丝

氨酸残基的间隔物(例如,SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG(SEQ ID NO:18))相比,可以具有降低水平的糖基化(例如,降低水平的0-糖基化)(例如,降低水平的使用聚糖(诸如木糖、甘露糖、唾液酸、岩藻糖(Fuc)和/或半乳糖(Gal)(例如,木糖)进行的0-糖基化)(参见实施例4)。

[0346] 在一些实施方案中,仅含有甘氨酸残基的间隔物可以不是0-糖基化的(例如,0-木糖基化),或与例如含有一个或多个丝氨酸残基的间隔物(例如,SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG(SEQ ID NO:18))相比,可以具有降低水平的0-糖基化(例如,降低水平的0-木糖基化)。

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

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

[0349] 在其他实施方案中,间隔物还可以含有除甘氨酸和丝氨酸之外的氨基酸,例如GENLYFQSGG(SEQ ID NO:28)、SACYCELS(SEQ ID NO:29)、RSIAT(SEQ ID NO:30)、RPACKIPNDLKQKVMNH(SEQ ID NO:31)、GGSAGGSGSGSSGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG(SEQ ID NO:32)、AAANSSIDLISVPVDSR(SEQ ID NO:33)或GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGS(SEQ ID NO:34)。

[0350] 在本公开的某些实施方案中,12或20氨基酸肽间隔物被用于连接串联形式的两个Fc结构域单体(例如,图1中的多肽102和多肽108;图2中的多肽202和多肽208),所述12和20氨基酸肽间隔物分别由序列GGGSGGGSGGGS(SEQ ID NO:35)和SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG(SEQ ID NO:18)组成。在其他实施方案中,可以使用由序列GGSGGGSGGGSGGGSGGS(SEQ ID NO:36)组成的18氨基酸肽间隔物。

[0351] 在一些实施方案中,两个Fc结构域单体之间的间隔物可以包含与上述SEQ ID NO:1-36中的任一者的序列至少75%相同(例如,至少77%、79%、81%、83%、85%、87%、89%、91%、93%、95%、97%、99%或99.5%相同)的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,两个Fc结构域单体之间的间隔物可以包含具有最多10个(9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的上述SEQ ID NO:1-36中的任一者的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成。在某些实施方案中,两个Fc结构域单体之间的间隔物可以包含与SEQ ID NO:17、18、26和27中的任一者的序列至少80%相同(例如,至少82%、85%、87%、90%、92%、95%、97%、99%或99.5%相同)的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成。在某些实施方案中,两个Fc结构域单体之间的间隔物可以包含具有最多10个(9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的SEQ ID NO:17、18、26和27中的任一者的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成。在某些实施方案中,两个Fc结构域单体之间的间隔物可以包含与序列SEQ ID NO:18或27至少80%(例如,至少82%、85%、87%、90%、92%、95%、97%、99%或99.5%)相同的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成。在某些实施方案中,两个Fc结构域单体之间的间隔物可以包含具有最多10个(9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的SEQ ID NO:17、18、26和27中的任一者的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成。

个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID NO:18或27的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成。

[0352] VIII. 血清蛋白结合肽

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

[0354] 作为一个实例,可以用于本文所述的方法和组合物中的白蛋白结合肽是本领域一般已知的。在一个实施方案中,白蛋白结合肽包含序列D1CLPRWGCLW (SEQ ID NO:37)。在一些实施方案中,白蛋白结合肽包含与序列SEQ ID NO:37至少80%相同(例如,80%、90%或100%相同)的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成。在一些实施方案中,白蛋白结合肽包含具有最多10个(9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个)单一氨基酸修饰(例如,置换(例如,保守置换))的序列SEQ ID NO:37的序列,由该序列组成或基本上由该序列组成。

[0355] 在本公开中,白蛋白结合肽可以附着至Fc构建体中某些多肽的N或C末端。在一个实施方案中,白蛋白结合肽可以附着至构建体1-4中的一种或多种多肽的C末端(图1和2)。在另一个实施方案中,白蛋白结合肽可以融合至编码在Fc构建体1-4中以串联连接的两个Fc结构域单体的多肽(例如,图1中的多肽102和108以及图2中的多肽202和208)的C末端。在另外一个实施方案中,白蛋白结合肽可以附着至Fc结构域单体(例如,图1中的Fc结构域单体114和116;图2中的Fc结构域单体214和216)的C末端,其连接至编码以串联连接的两个Fc结构域单体的多肽中的第二Fc结构域单体。白蛋白结合肽可以与Fc构建体遗传融合或通过化学手段例如化学缀合与Fc构建体附着。如果需要,则可以在Fc构建体和白蛋白结合肽之间插入间隔物。不受理论束缚,预期在本公开的Fc构建体中包括白蛋白结合肽可以通过其与血清白蛋白的结合导致治疗性蛋白质的延长保留。

[0356] IX. Fc构建体

[0357] 一般而言,本公开的特征在于具有Fc结构域的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc构建体)。对于Fc受体,例如Fc  $\gamma$  RIIIa,这些可以具有比单个野生型Fc结构域更高的结合亲和力和/或亲合力。本公开公开了工程改造在两个相互作用的C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域的界面处的氨基酸的方法,使得Fc结构域的两个Fc结构域单体彼此选择性地形成二聚体,因此阻止不需要的多聚体或聚集体的形成。Fc构建体包括偶数数目的Fc结构域单体,其中每对Fc结构域单体形成Fc结构域。Fc构建体最低限度包括由两个Fc结构域单体的二聚体形成的一个功能性Fc结构域。在一些实施方案中,本文所述的Fc构建体不包括抗原识别区,例如可变结构域(例如,V<sub>H</sub>、V<sub>L</sub>、高变区(HVR))或互补决定区(CDR)。在一些实施方案中,本文所述的Fc构建体包括抗原识别区,例如可变结构域(例如,V<sub>H</sub>、V<sub>L</sub>、HVR)或CDR。

[0358] 含有三个Fc结构域的Fc构建体可以由四种多肽形成(图1和2)。第一多肽和第二多肽(例如,图1中的多肽102和108;图2中的多肽202和208)可以相同或不同,如第三多肽和第四多肽(例如,图1中的多肽114和116;图2中的多肽214和216)一样。在图1中,第一多肽和第二多肽均编码以串联连接通过接头连接的两个Fc结构域单体(例如,Fc结构域单体104、106、110和112),其中一个Fc结构域单体含有在C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中的荷电氨基酸置换(例如,Fc结构域单体104和110),而另一个Fc结构域单体含有在C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中的突起(例如,Fc结构域单体106和112)。第三多肽和第四多肽均编码具有空腔的Fc结构域单体

(例如,Fc结构域单体114和116)。可以通过组合Fc结构域单体104和110来形成茎同二聚体Fc结构域,所述Fc结构域单体各自在其C<sub>H</sub>3抗体恒定结构域中含有相同的反向电荷突变(例如,Fc结构域单体104和110各自含有D399K和K409D。可以通过组合Fc结构域单体106和114(例如,Fc结构域单体106含有经工程改造的突起S354C和T366W,并且Fc结构域单体114含有经工程改造的空腔Y349C、T366S、L368A和Y409V),来形成第一分支异二聚体Fc结构域。可以通过组合Fc结构域单体112和116(例如,Fc结构域单体112含有经工程改造的突起S354C和T366W,并且Fc结构域单体116含有经工程改造的空腔Y349C、T366S、L368A和Y409V),来形成第二分支异二聚体Fc结构域。

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

[0360] 在进一步的实施方案中,含有(i)至少一个反向电荷突变和(ii)至少一个经工程改造的空腔或至少一个经工程改造的突起的Fc结构域单体,可以与另一个含有(i)至少一个反向电荷突变和(ii)至少一个经工程改造的突起或至少一个经工程改造的空腔的Fc结构域单体选择性地组合,以形成Fc结构域。例如,含有反向电荷突变K370D与经工程改造的空腔Y349C、T366S、L368A和Y407V的Fc结构域单体、以及另一个含有反向电荷突变E357K与经工程改造的突起S354C和T366W的Fc结构域单体,可以选择性地组合以形成Fc结构域。

[0361] 在一些实施方案中,在包括以下的Fc构建体中:a)具有式A-L-B的第一多肽;其中i)A包括第一Fc结构域单体;ii)L是接头;且iii)B包括第二Fc结构域单体;b)具有式A'-L'-B'的第二多肽;其中i)A'包括第三Fc结构域单体;ii)L'是接头;且iii)B'包括第四Fc结构域单体;c)包括第五Fc结构域单体的第三多肽;以及d)包括第六Fc结构域单体的第四多肽;其中B和B'组合以形成第一Fc结构域,A和第五Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,并且A'和第六Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域,可以掺入Fc构建体中的Fc结构域单体内的一些氨基酸突变的实例显示于表3A-3D中。在一些实施方案中,Fc构建体中的第一多肽、第二多肽、第三多肽和第四多肽各自缺乏C端赖氨酸。在一些实施方案中,Fc构建体中的第一多肽、第二多肽、第三多肽和第四多肽各自中的N末端Asp突变为Gln。在一些实施方案中,L和L'中的每个包含序列GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:27),由该序列组成或基本上由该序列组成。

(Fc 构建体 1、2 和 3)

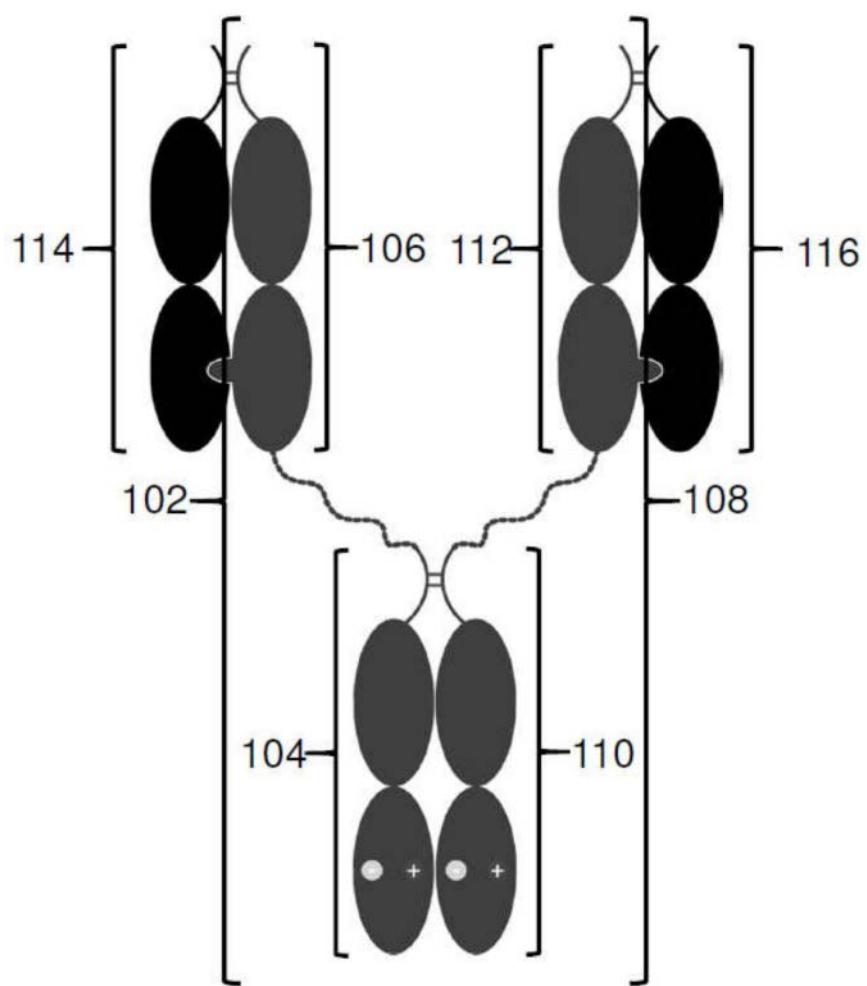


图1

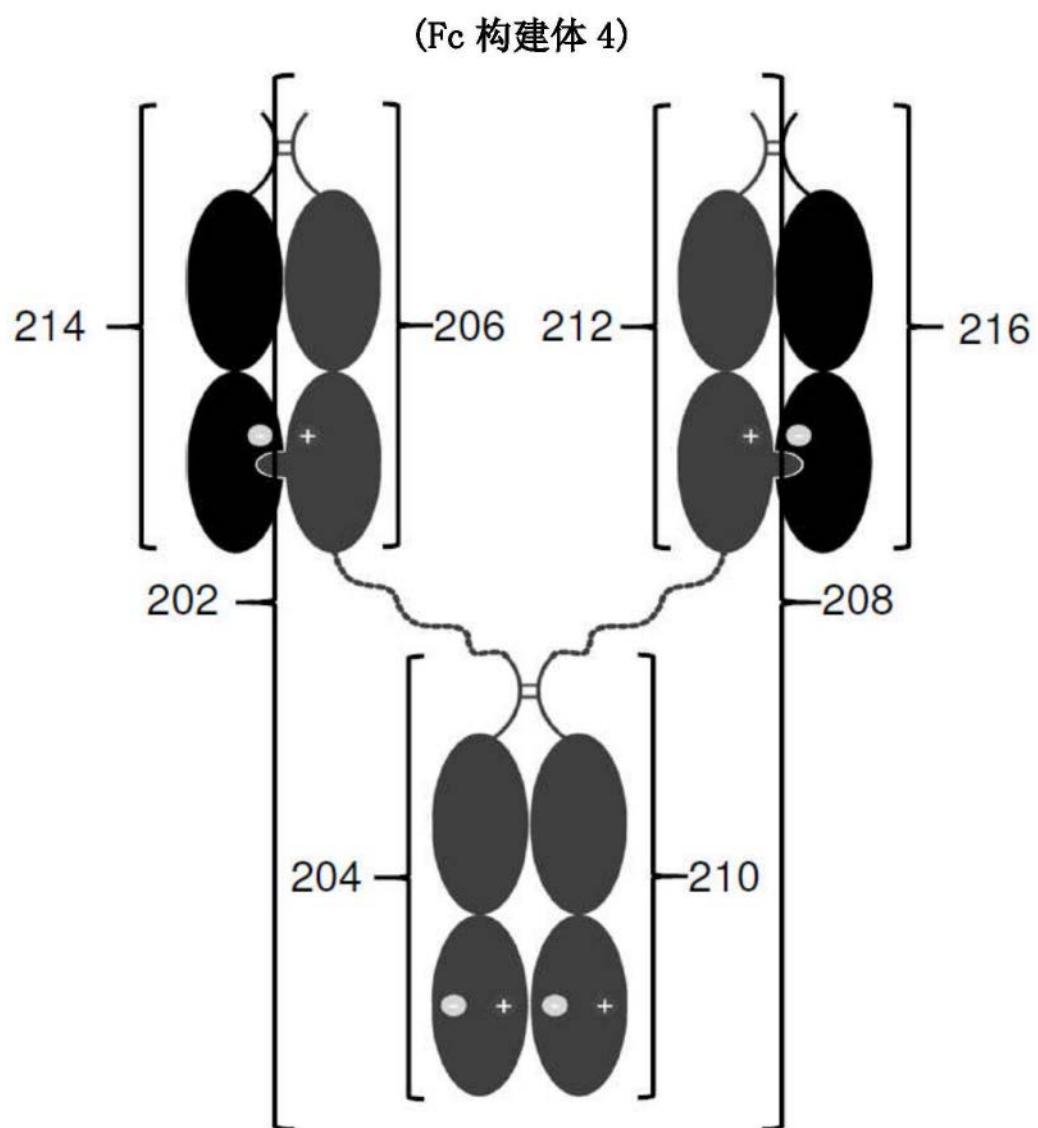


图2

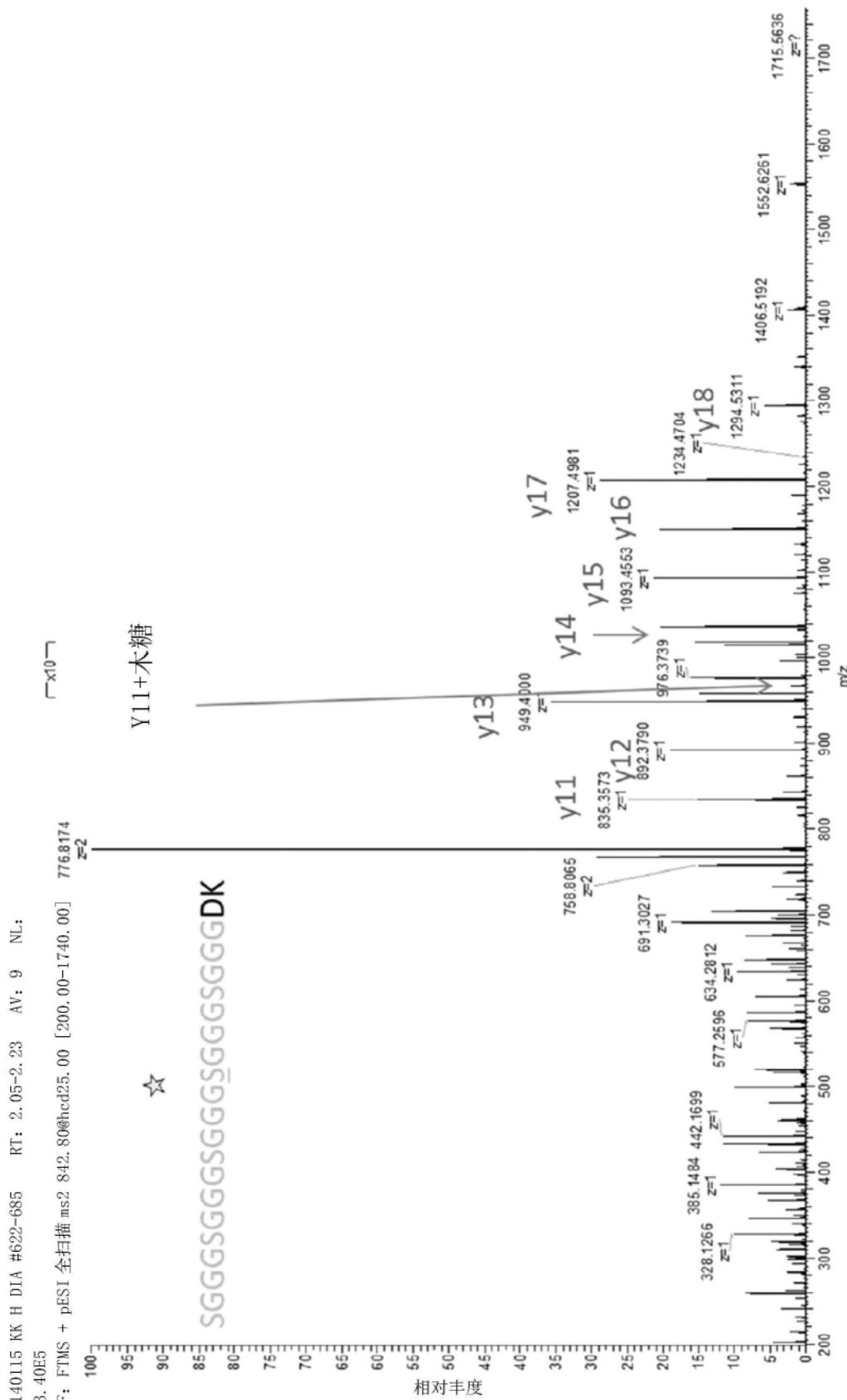


图3

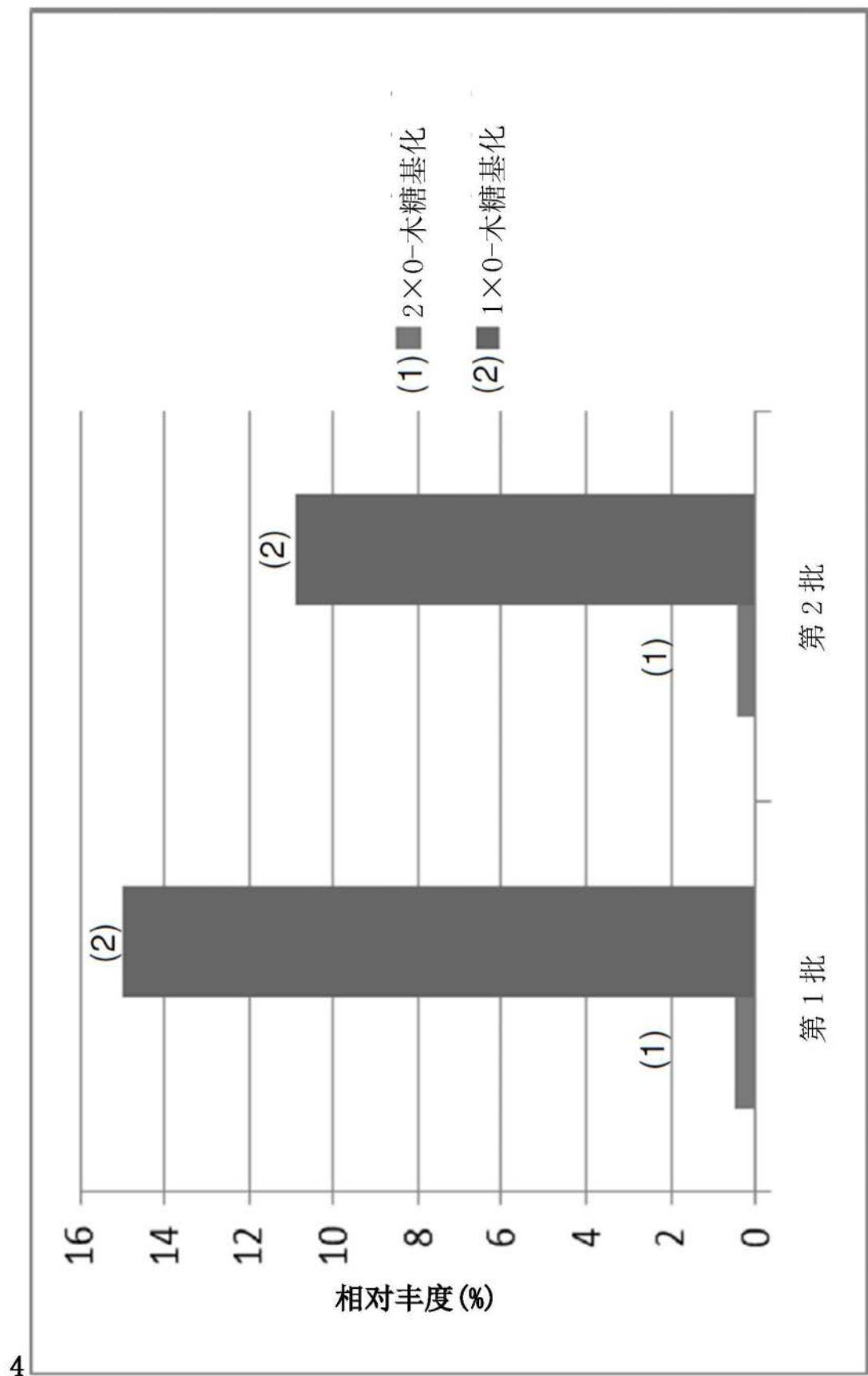


图4

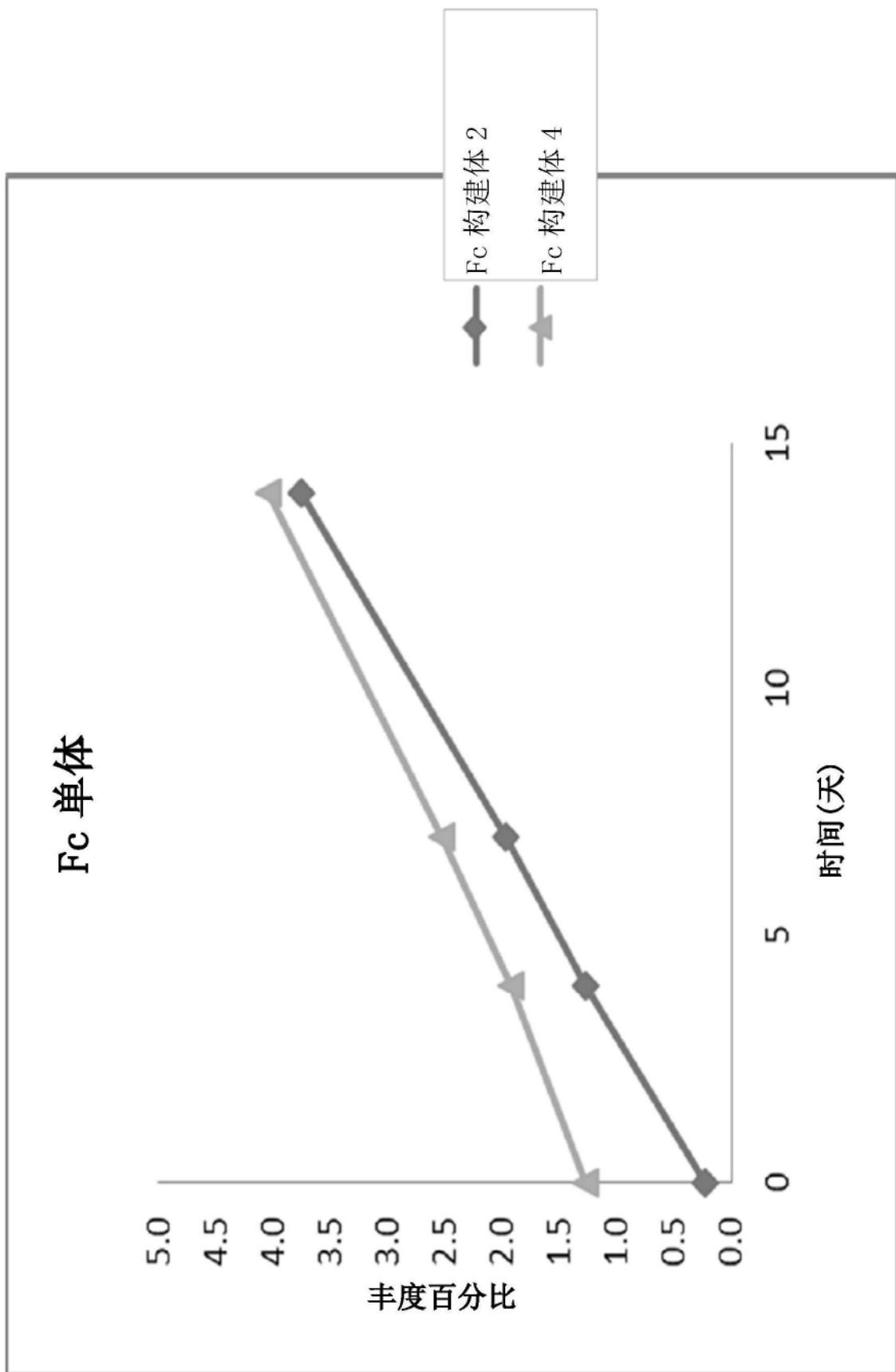


图5

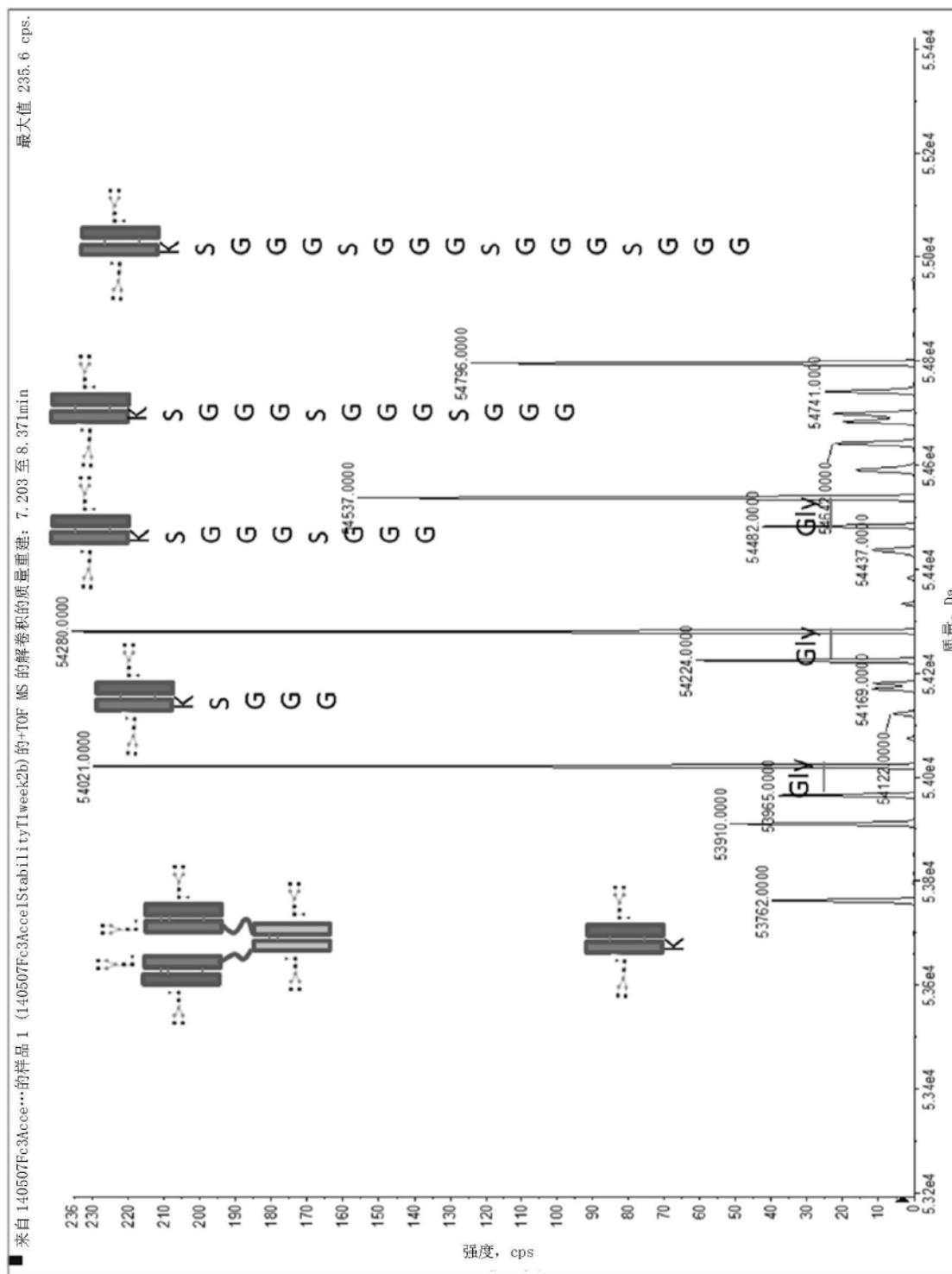


图6

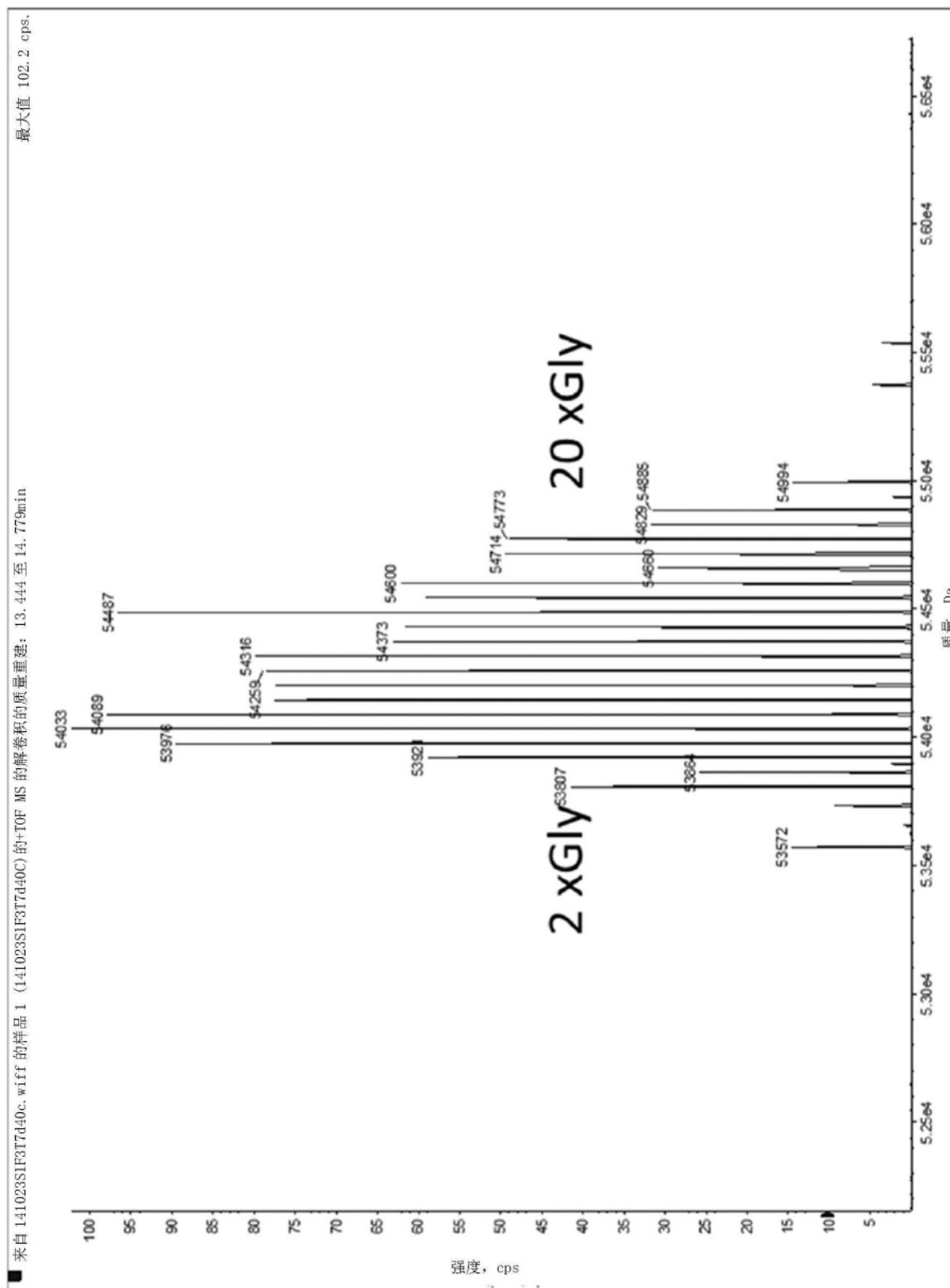


图7

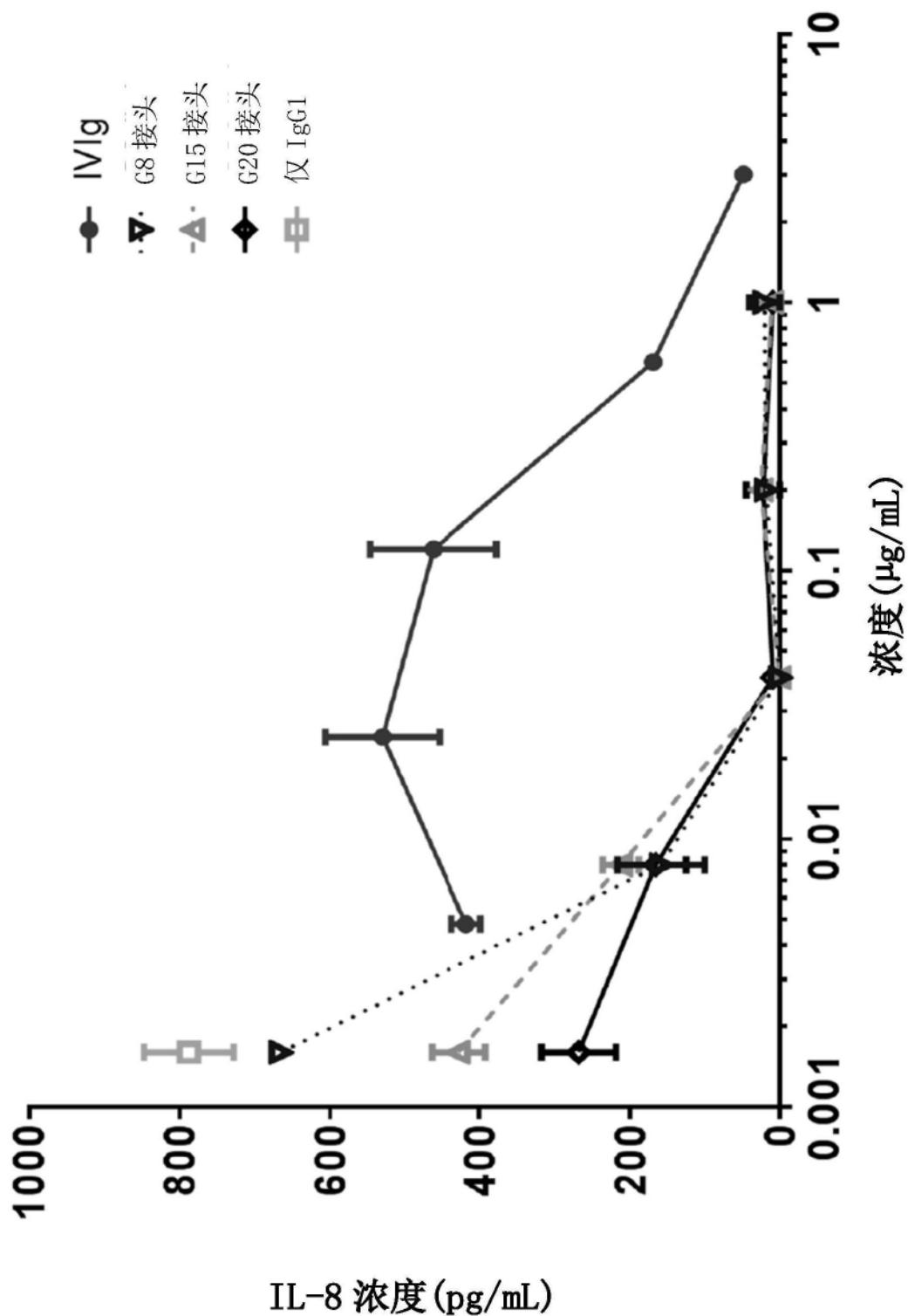


图8

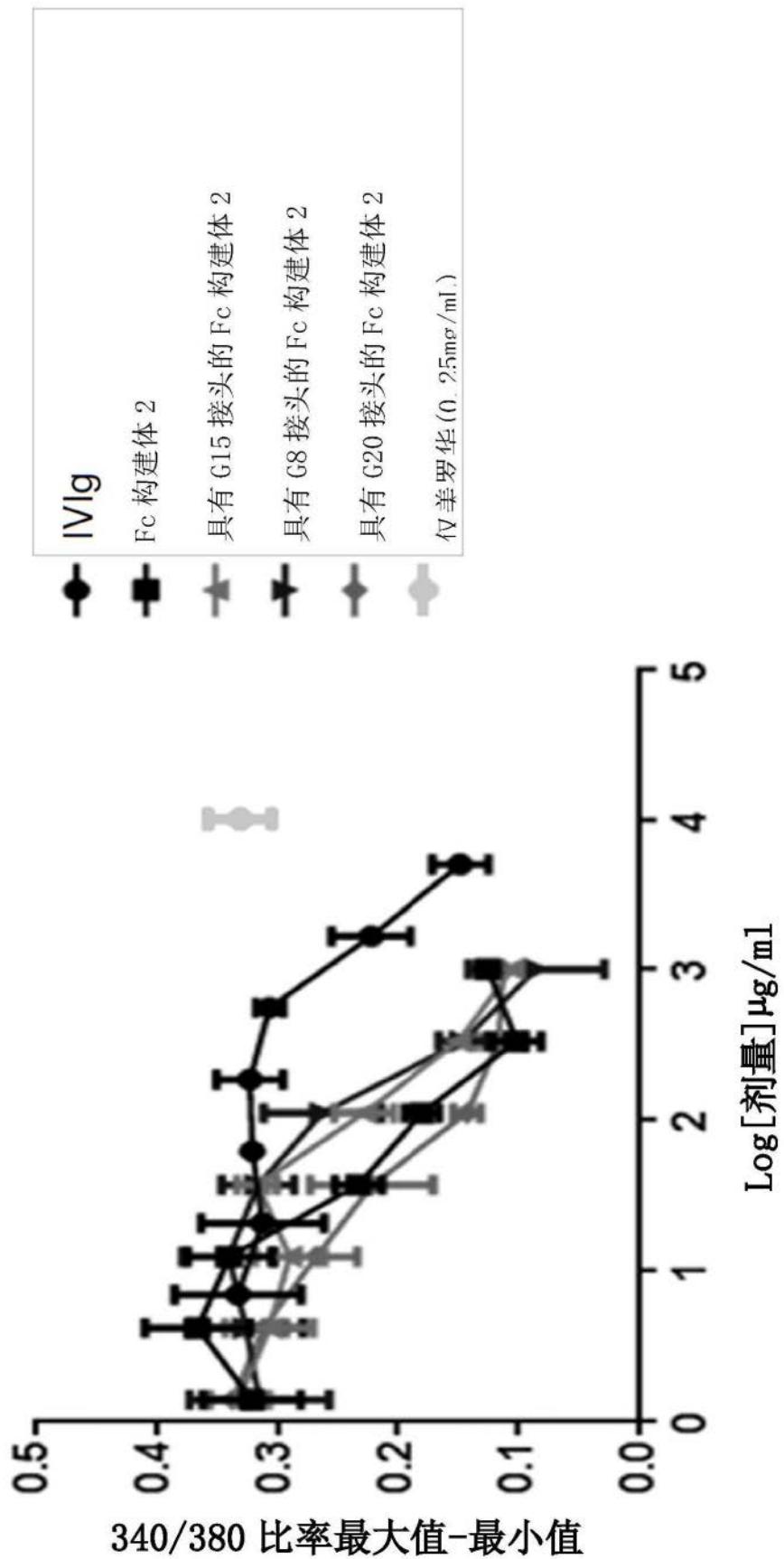


图9

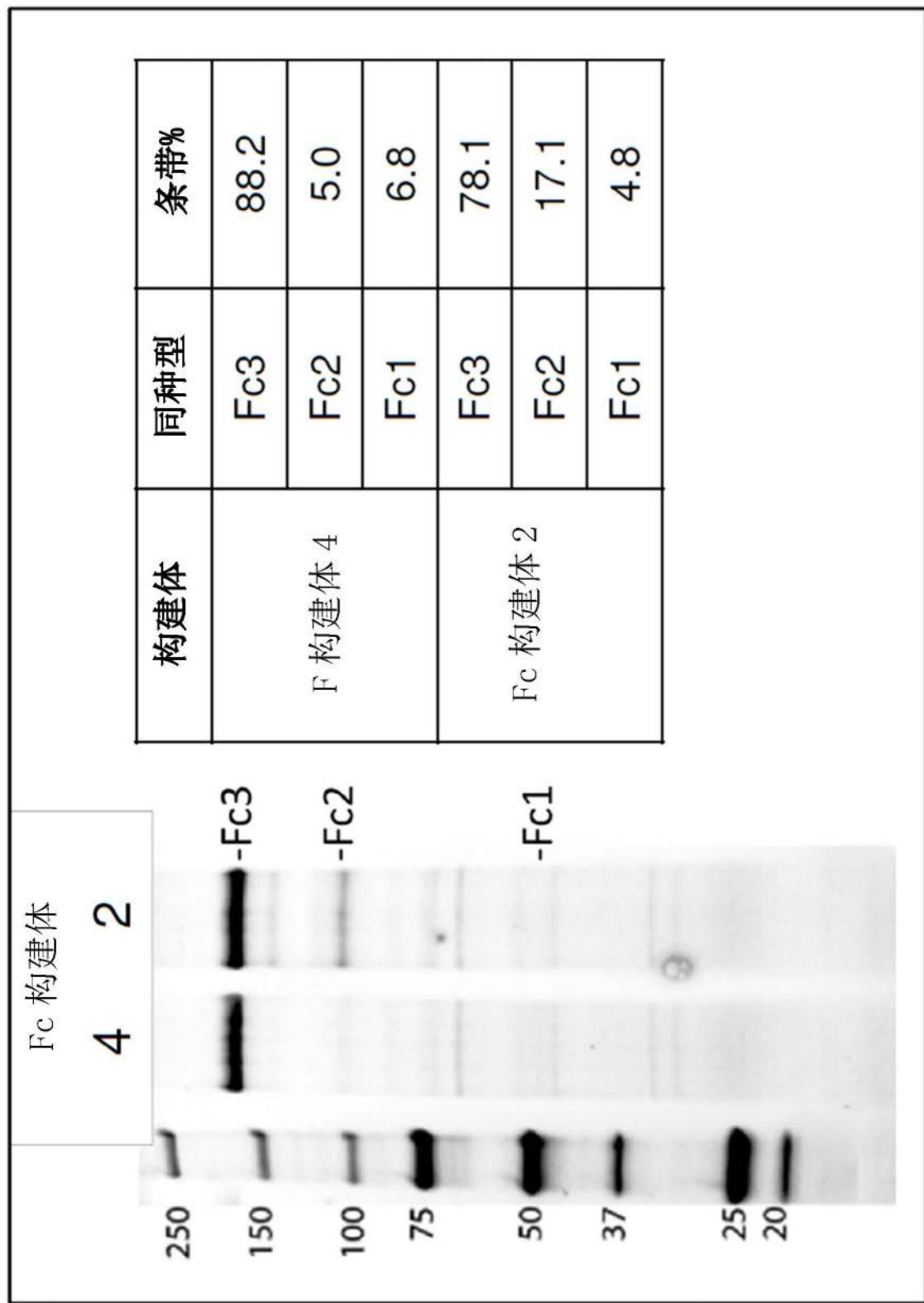


图10

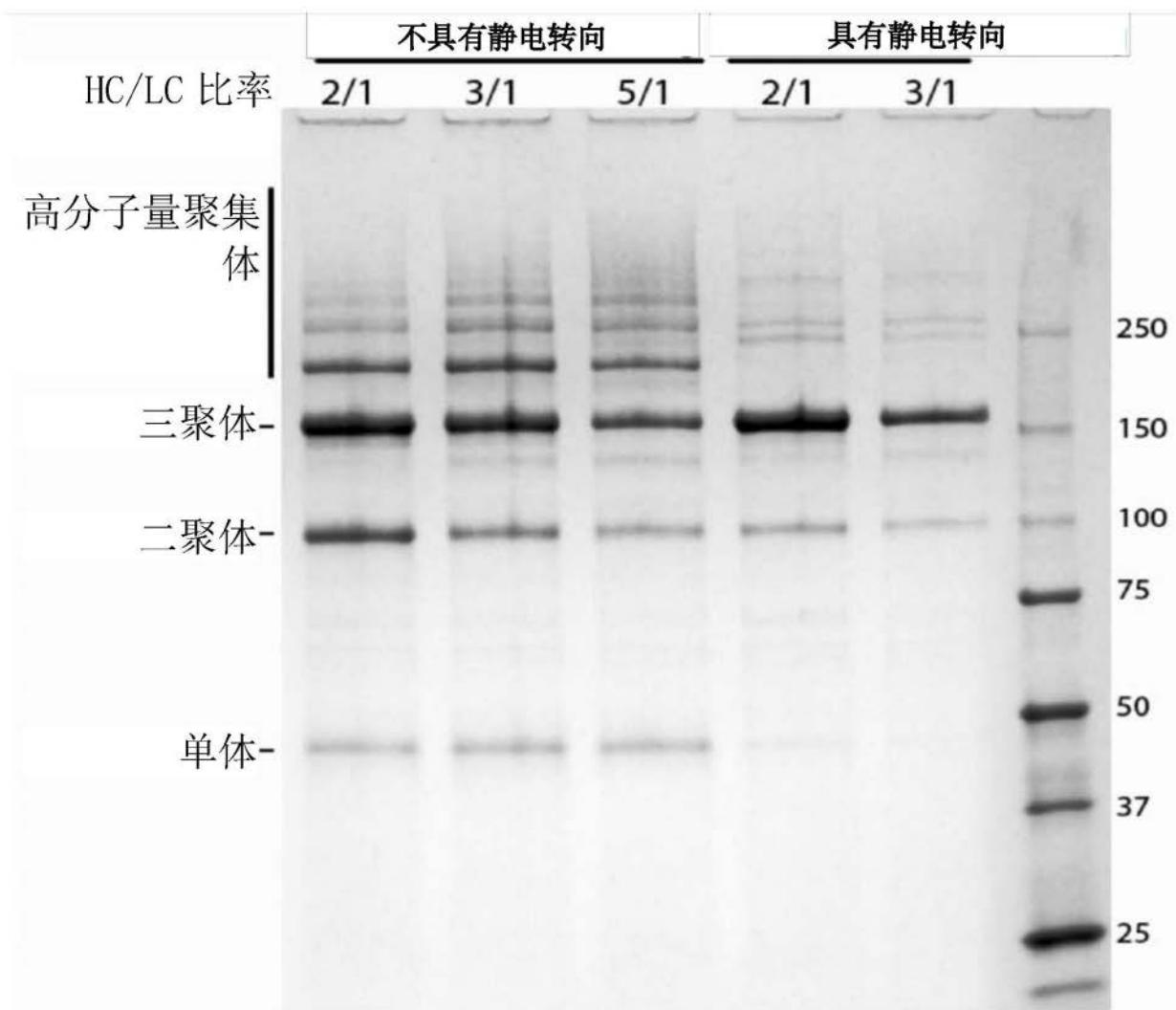


图11

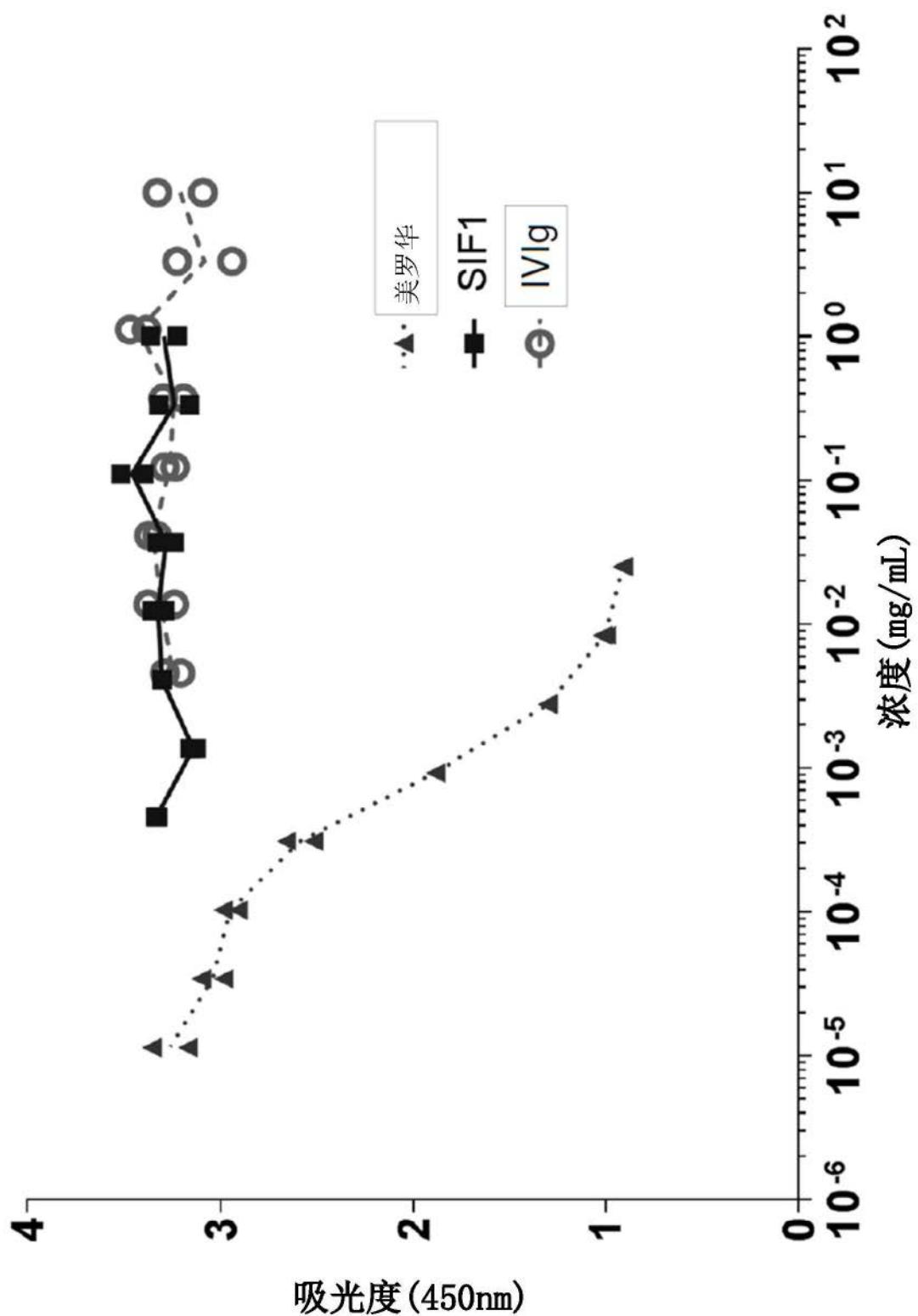


图12

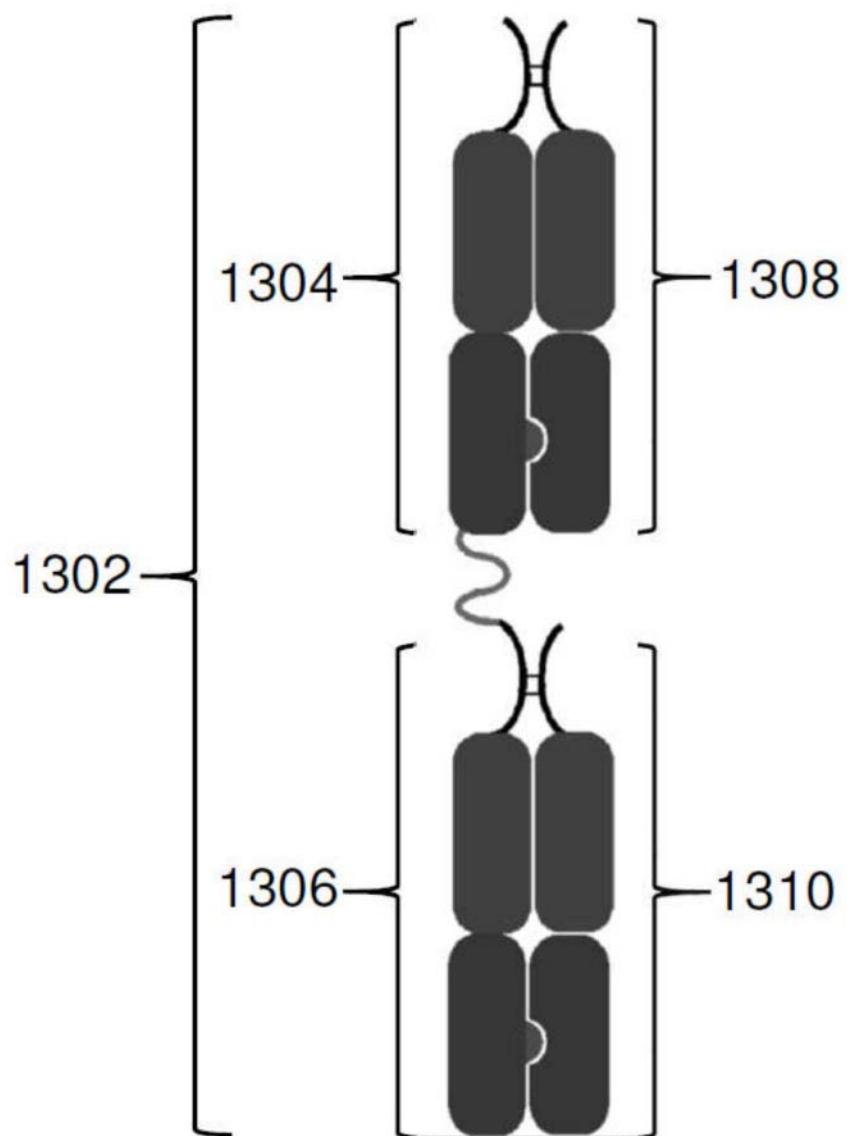


图13

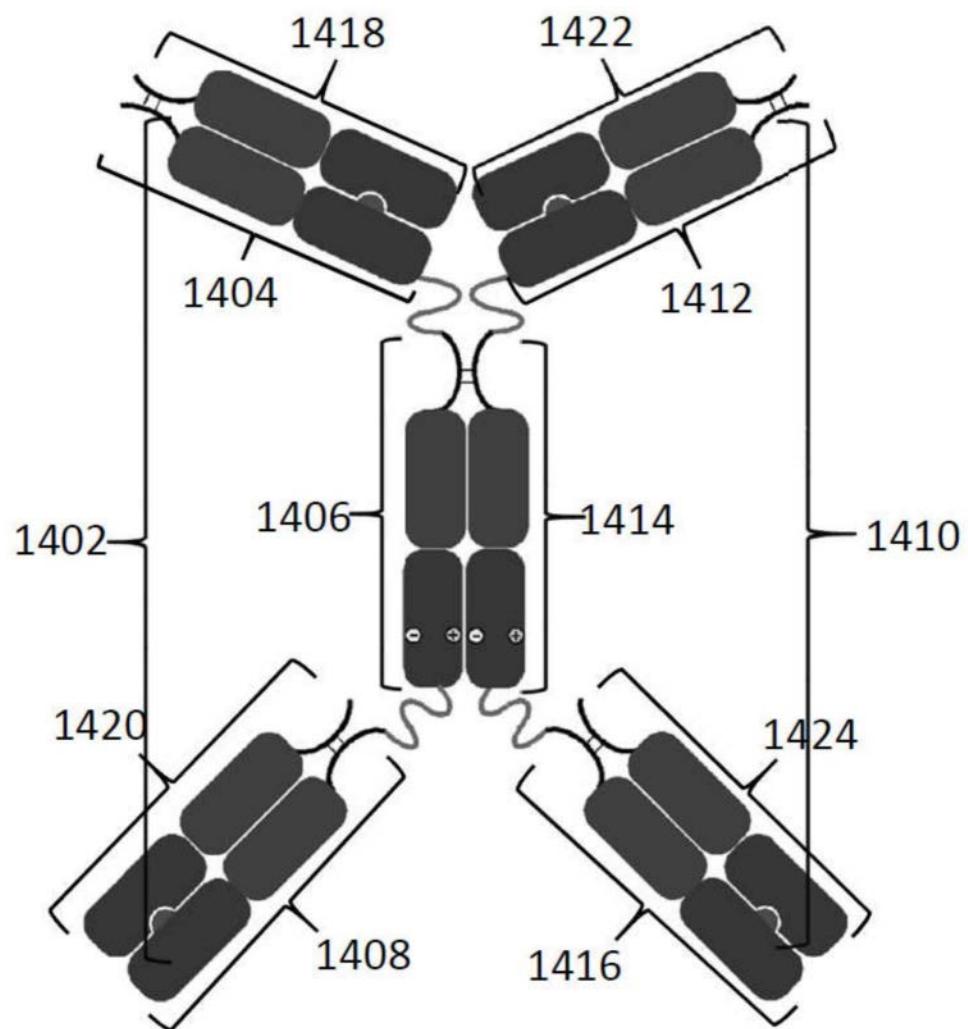


图14

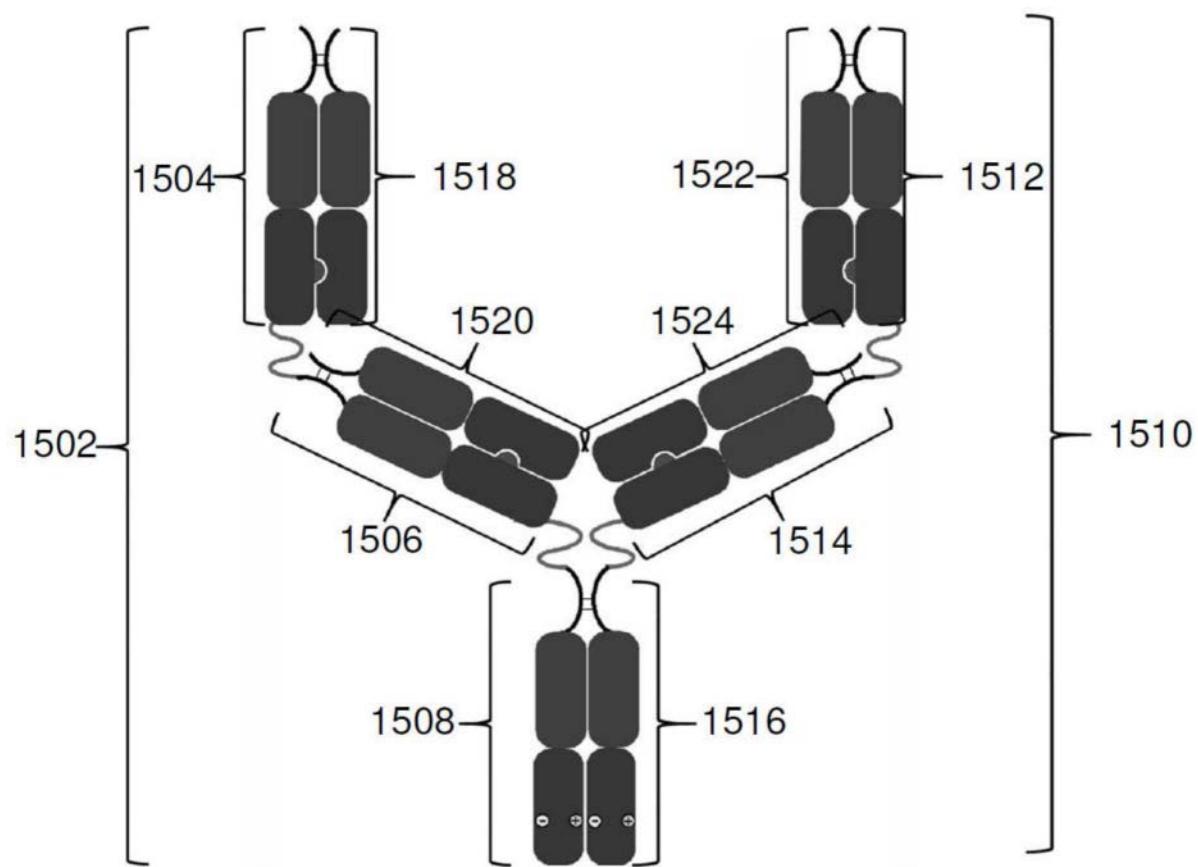


图15

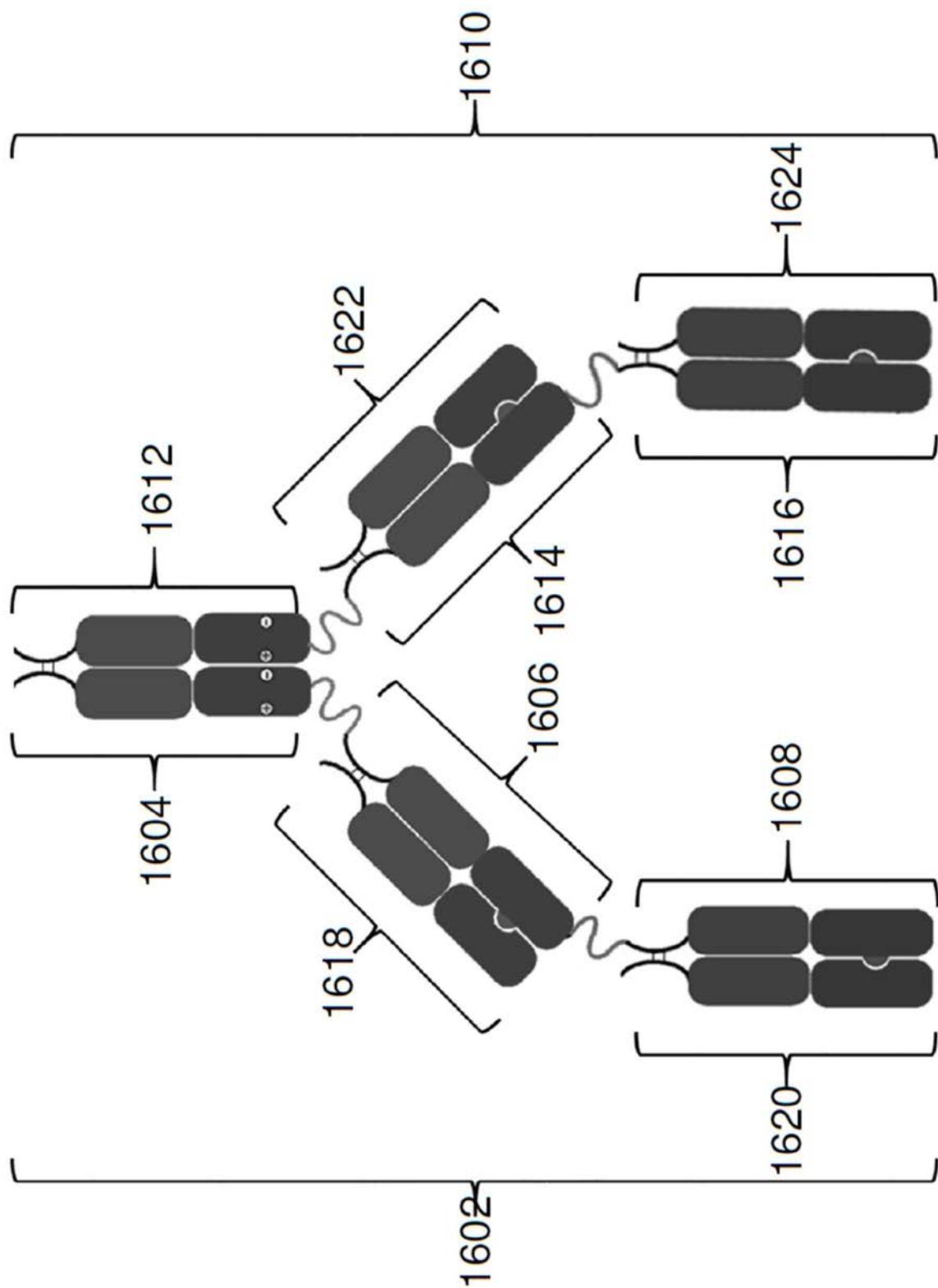


图16

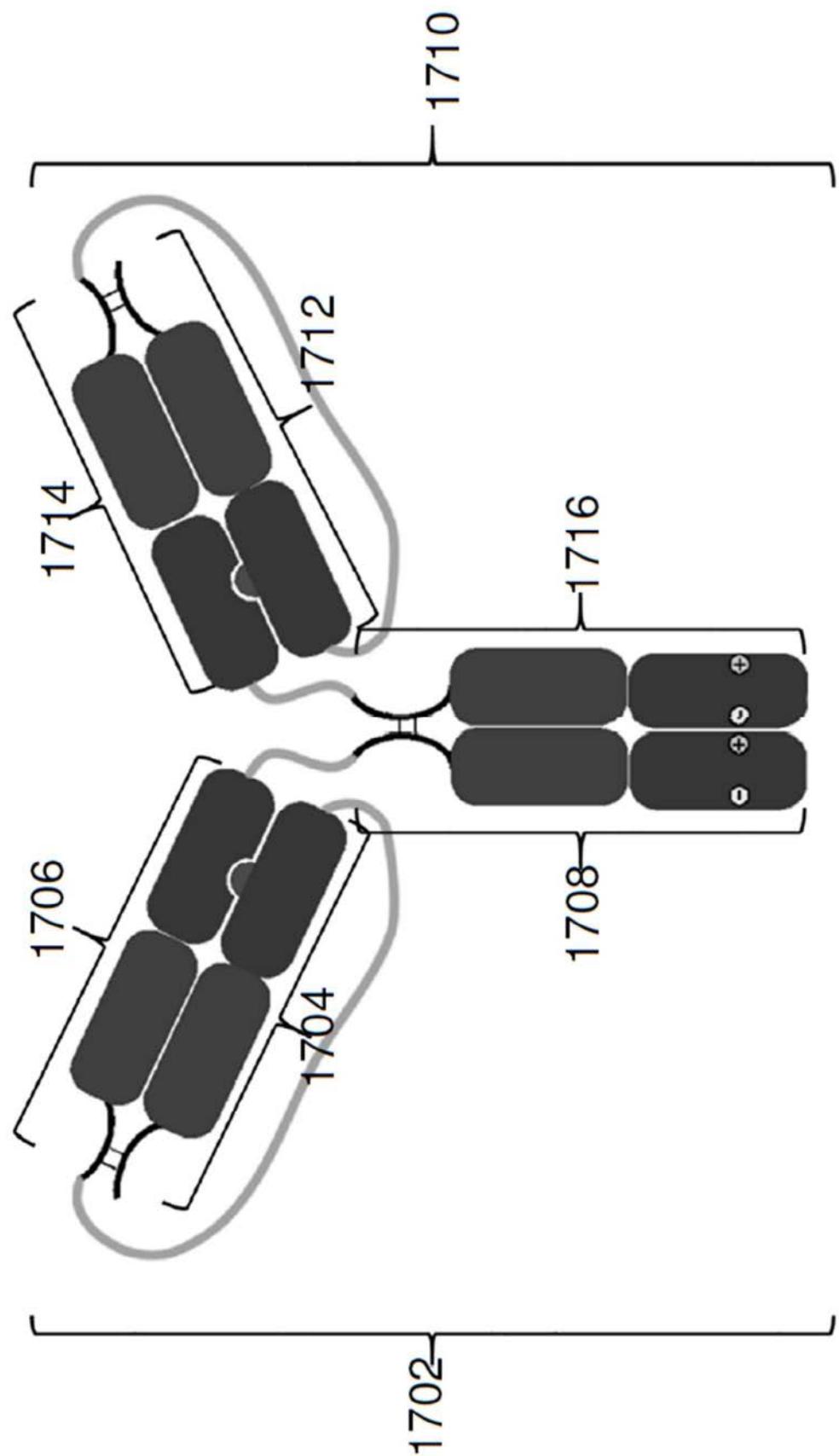


图17

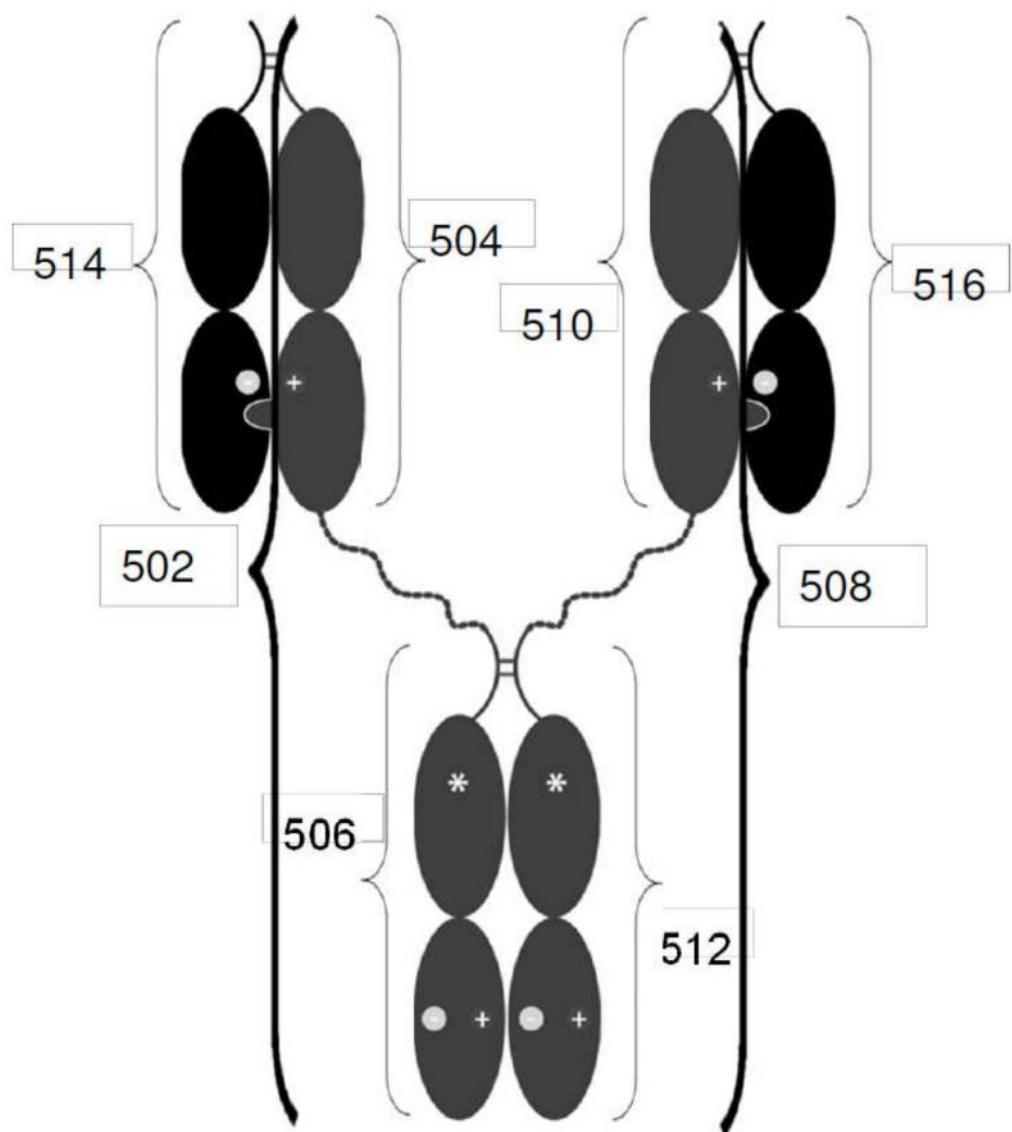


图18A

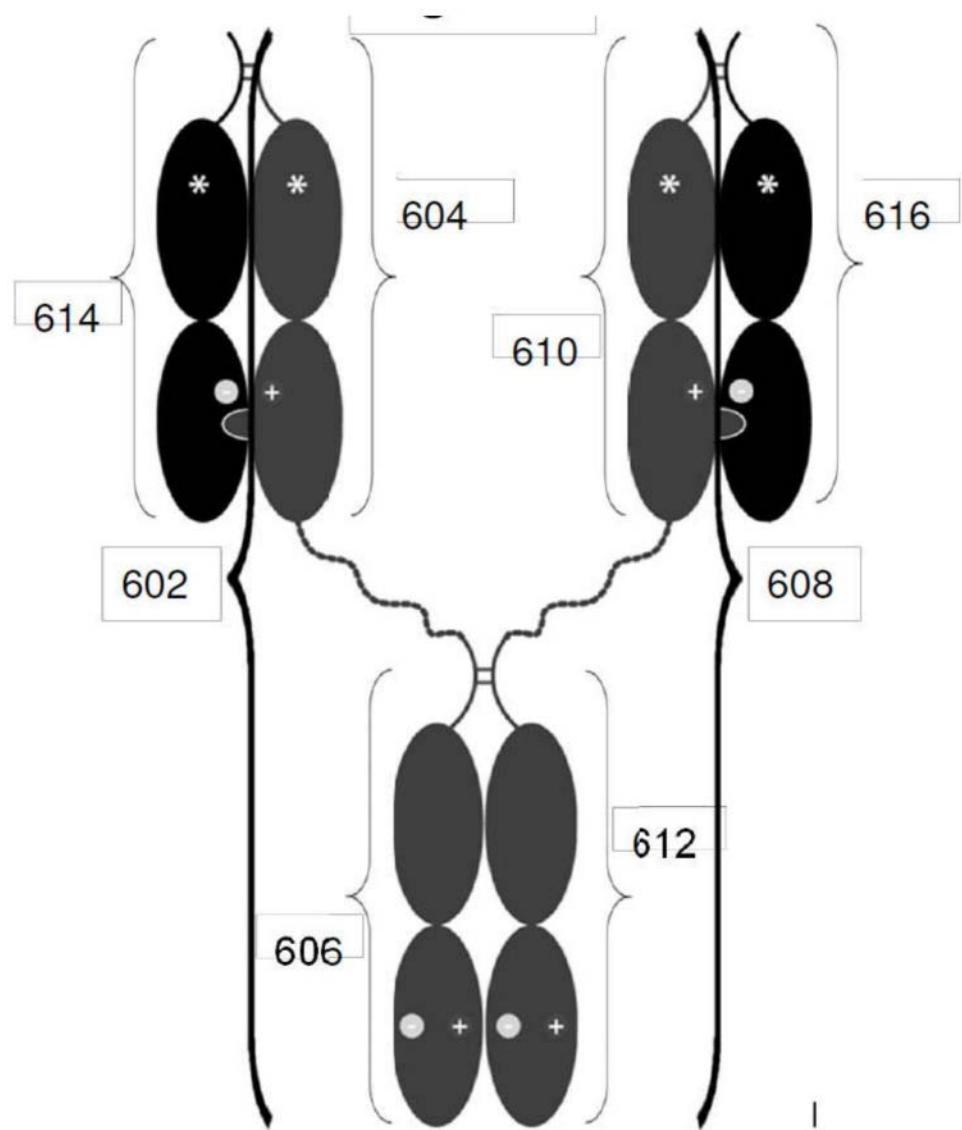


图18B

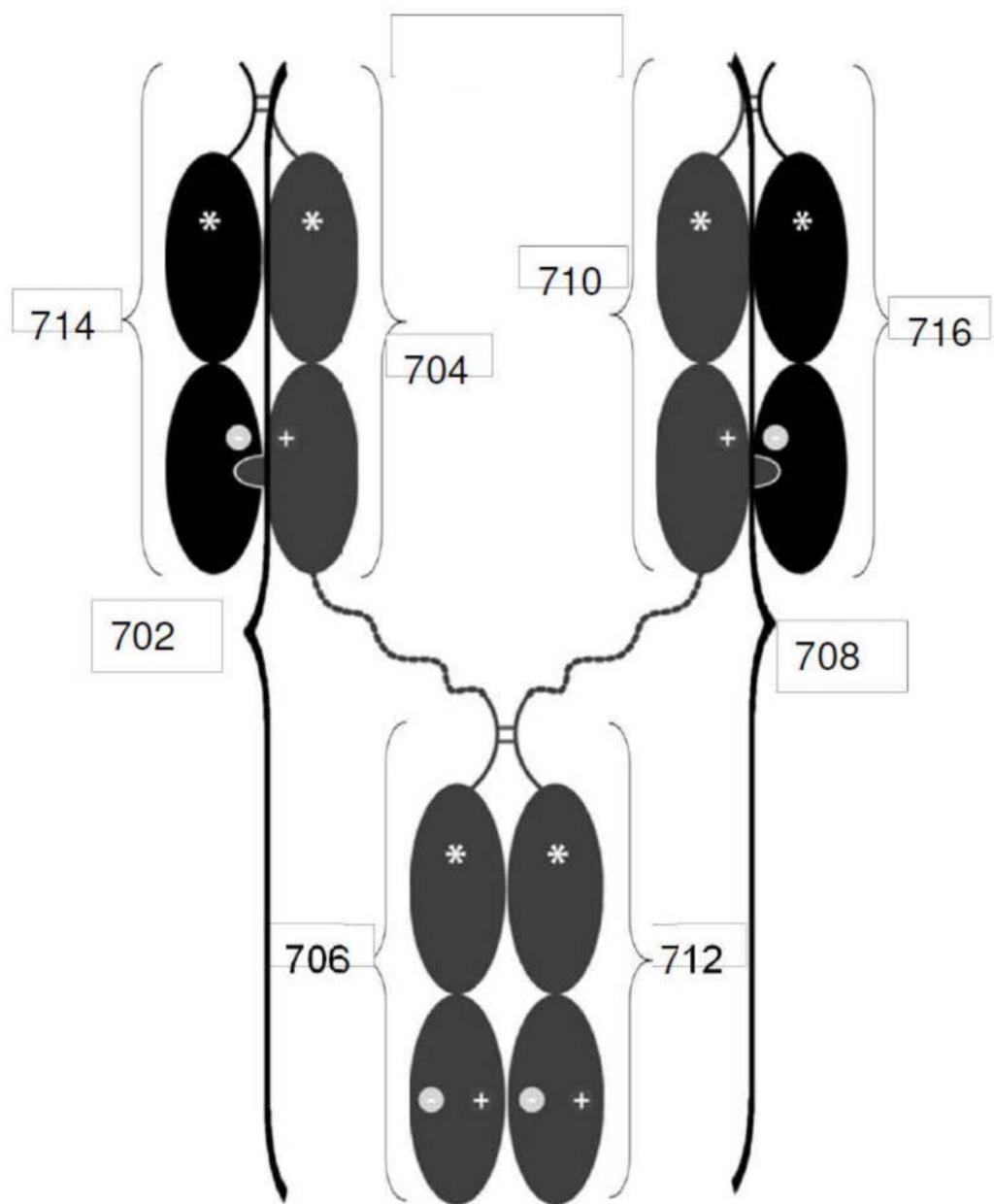


图18C

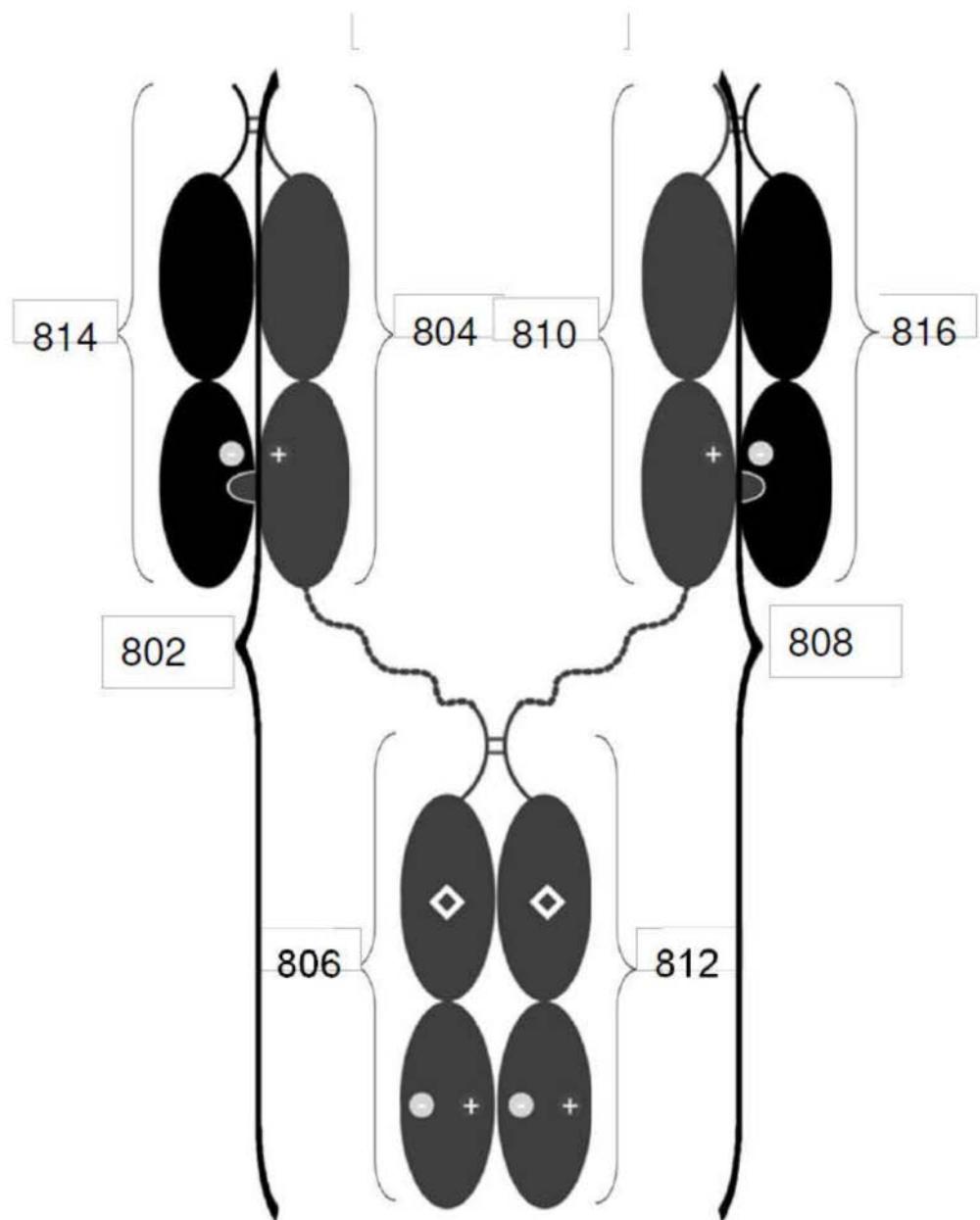


图18D

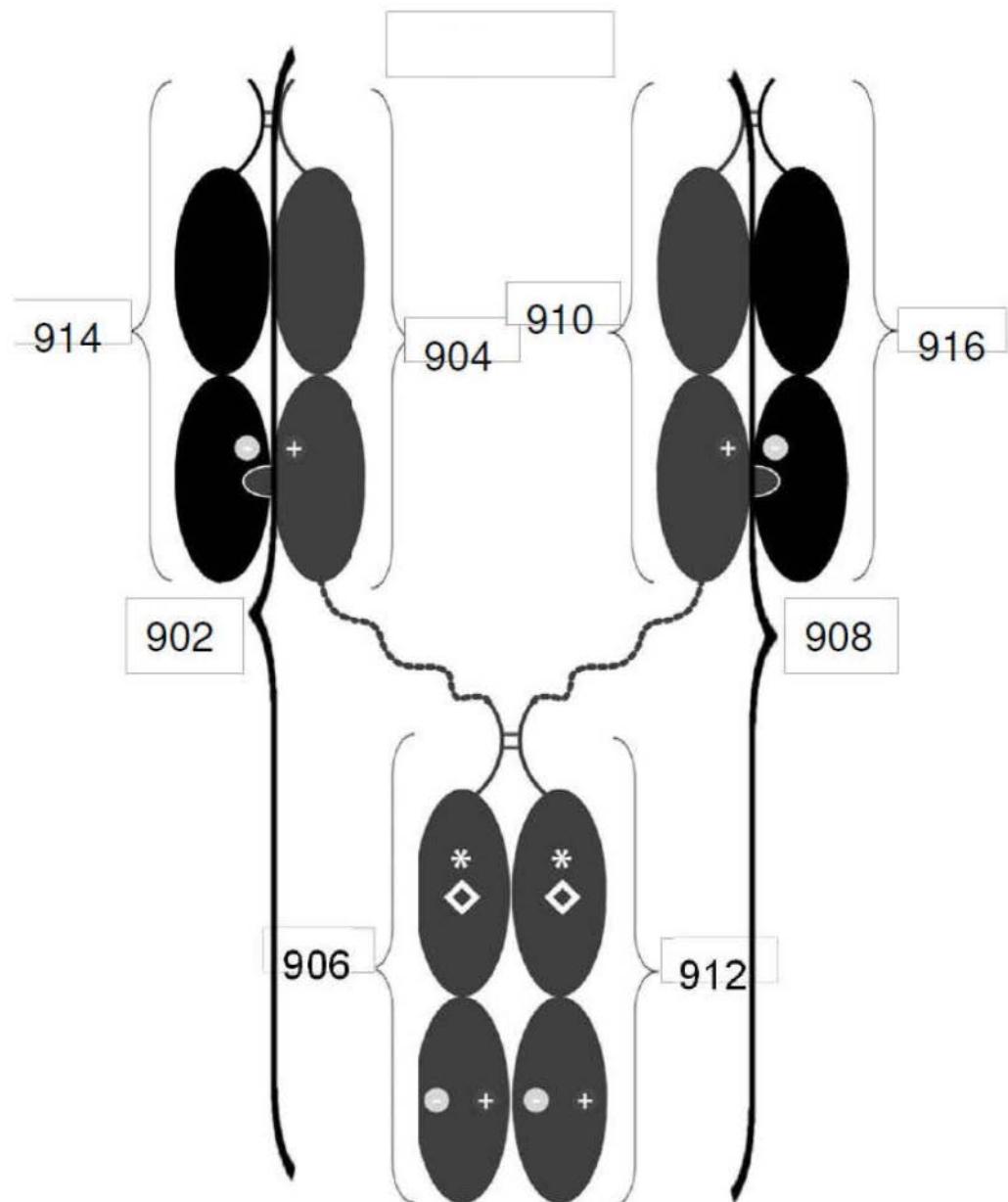


图18E

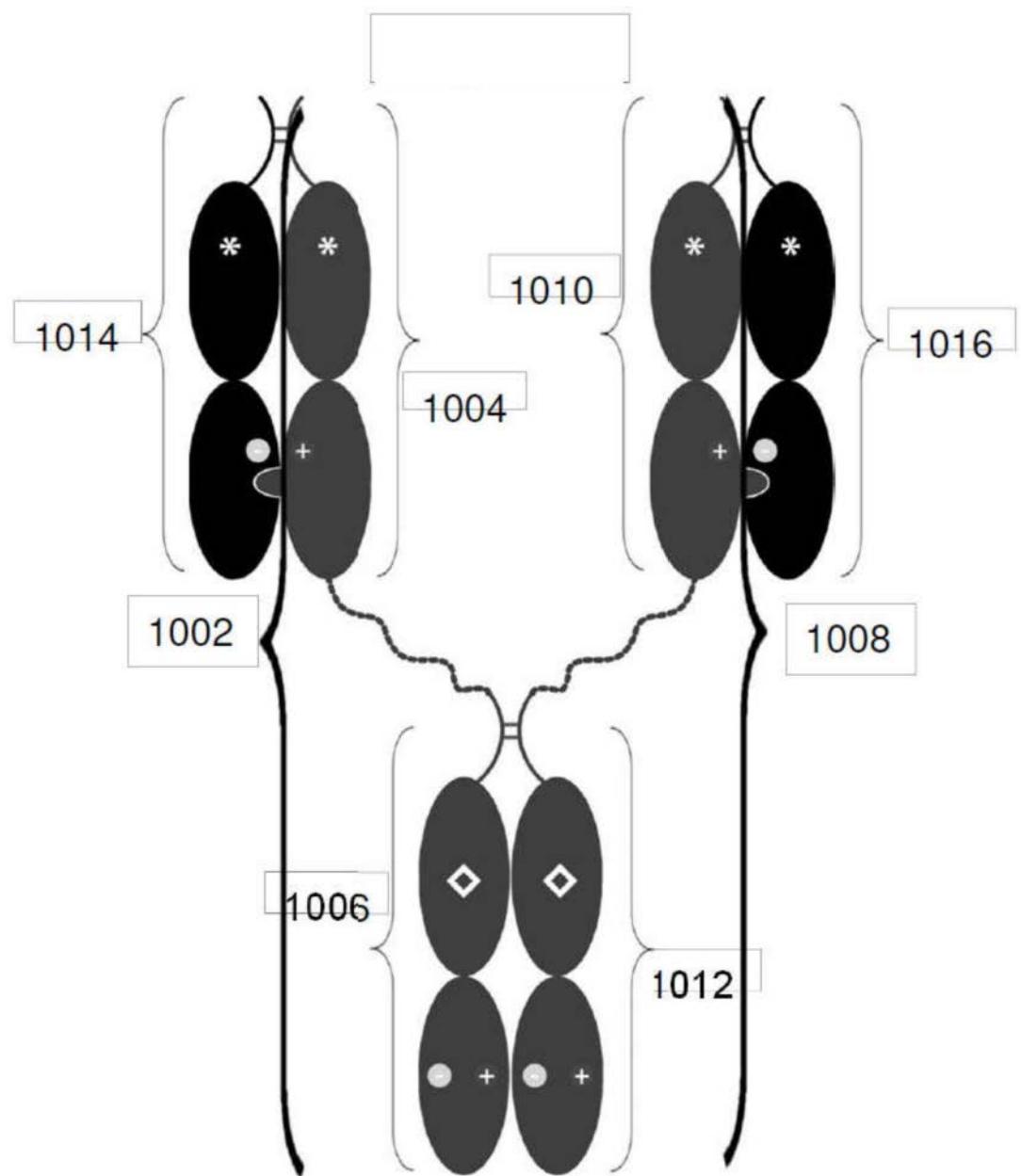


图18F

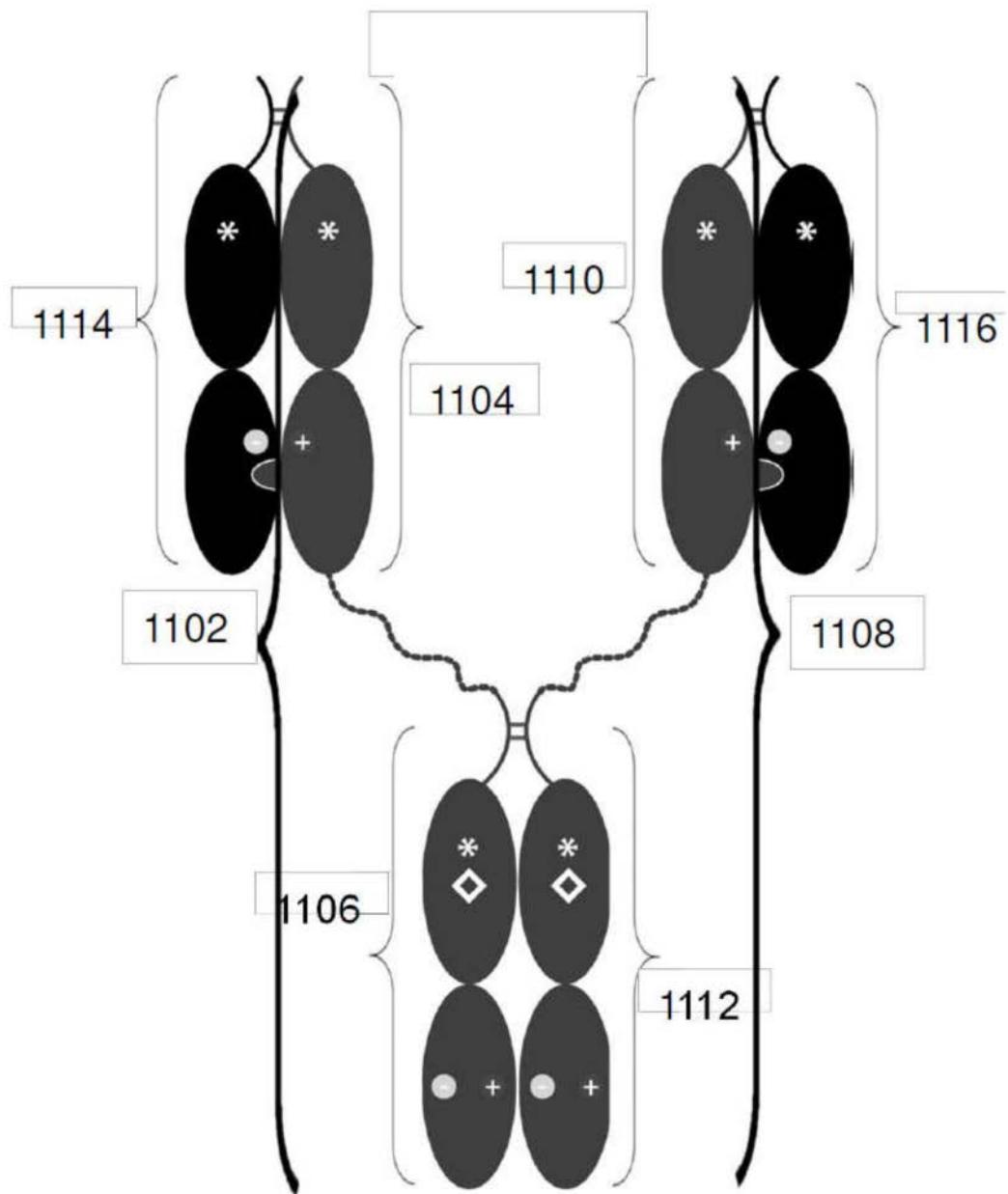


图18G

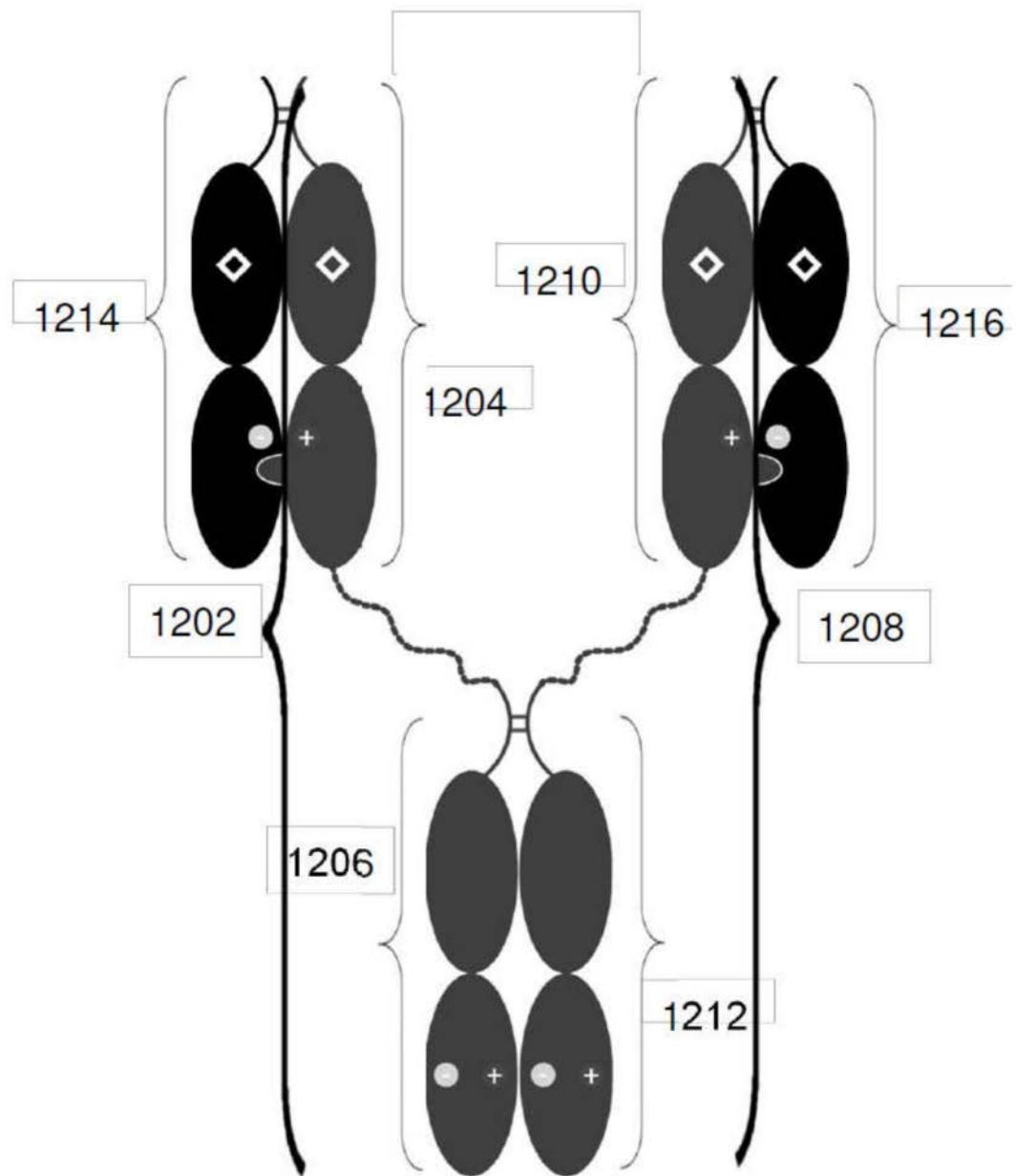


图18H

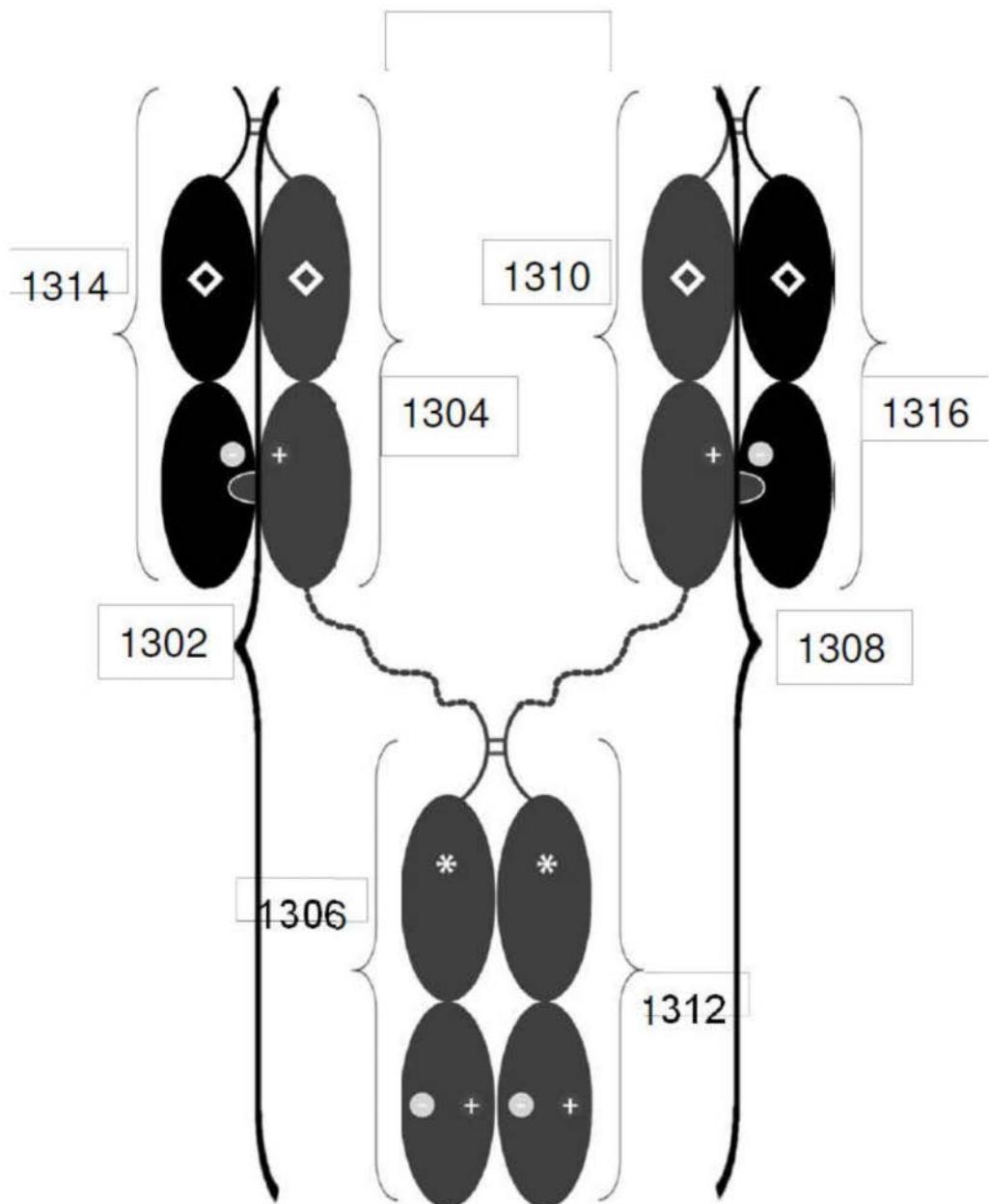


图18I

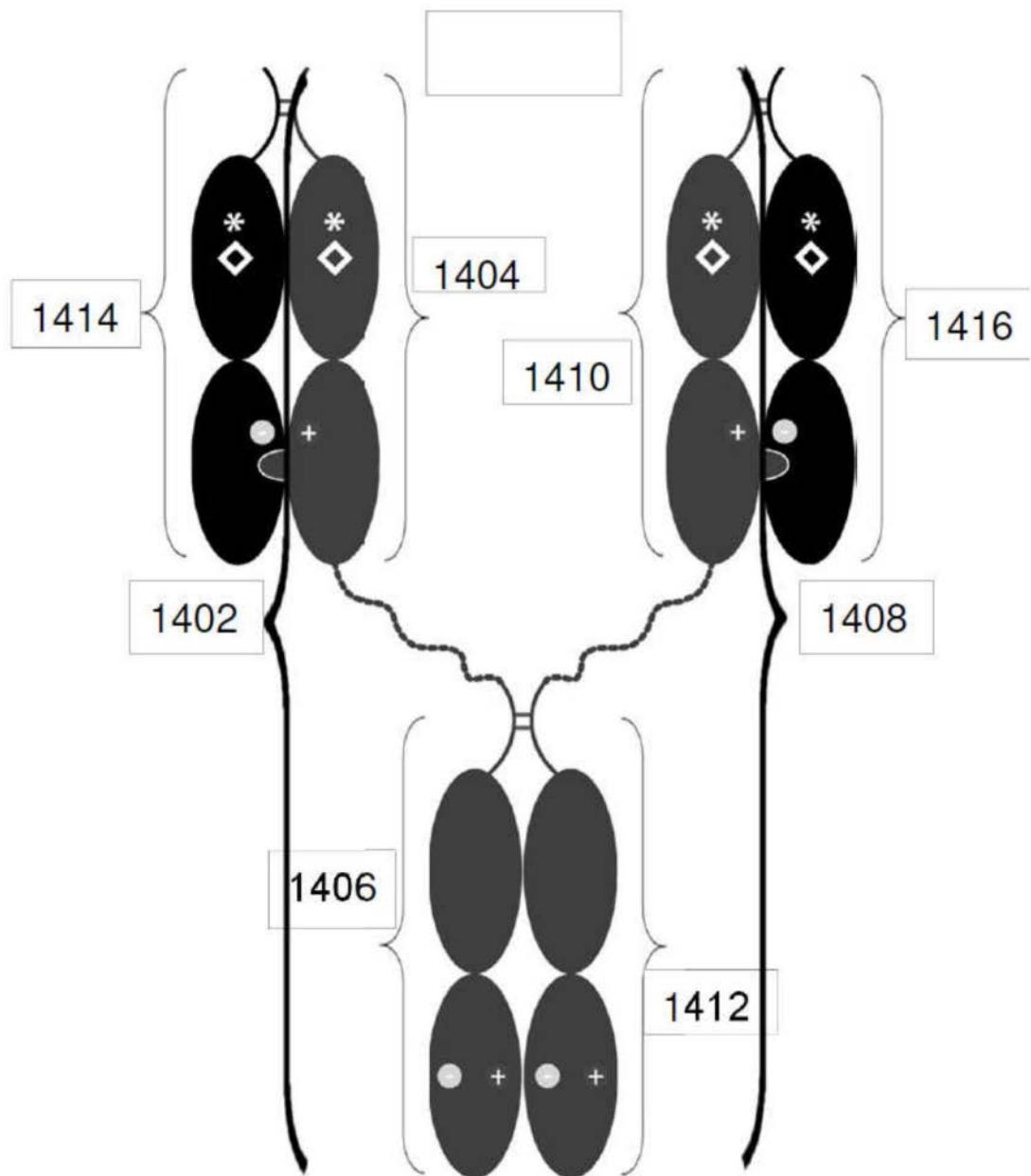


图18J

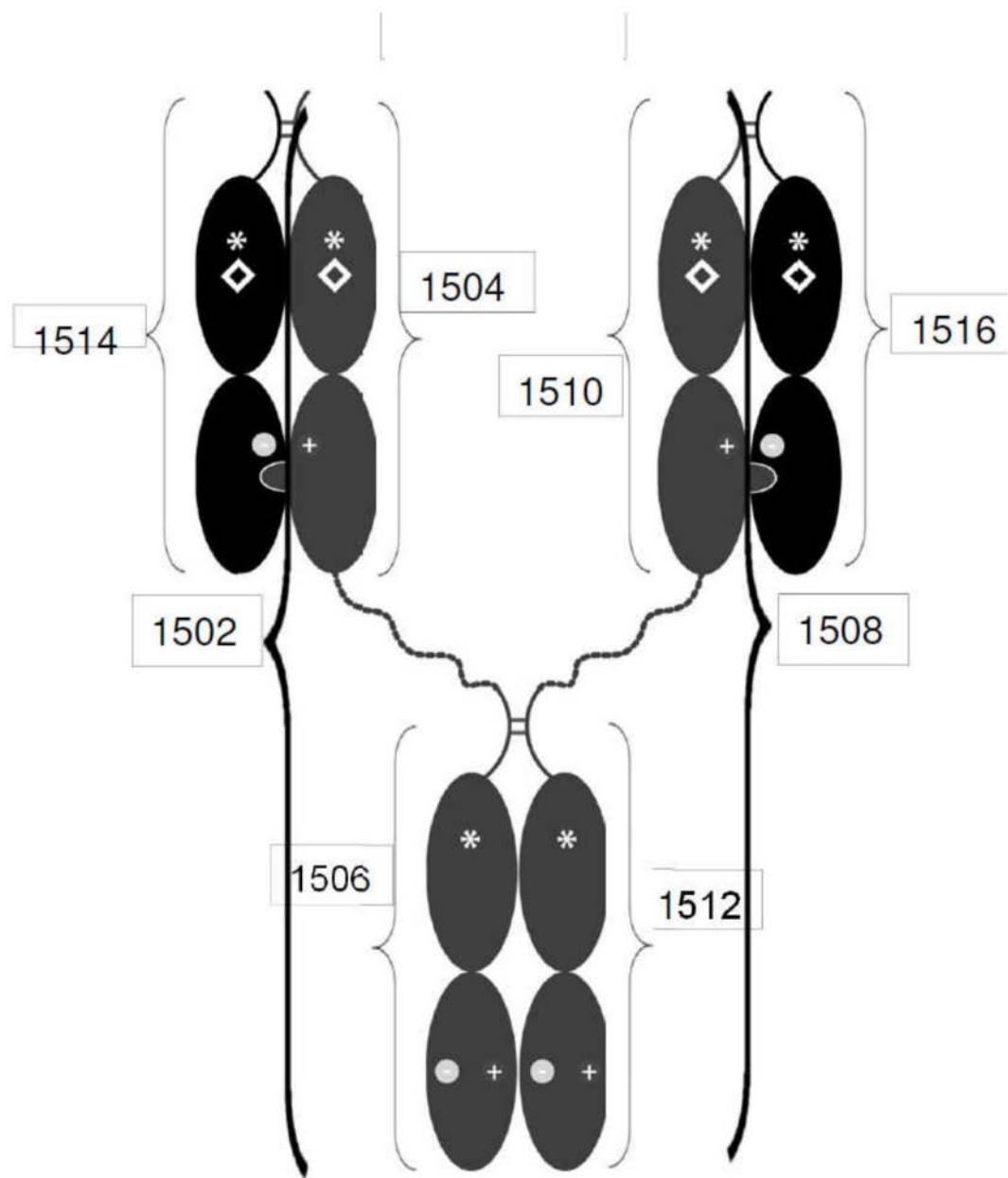


图18K

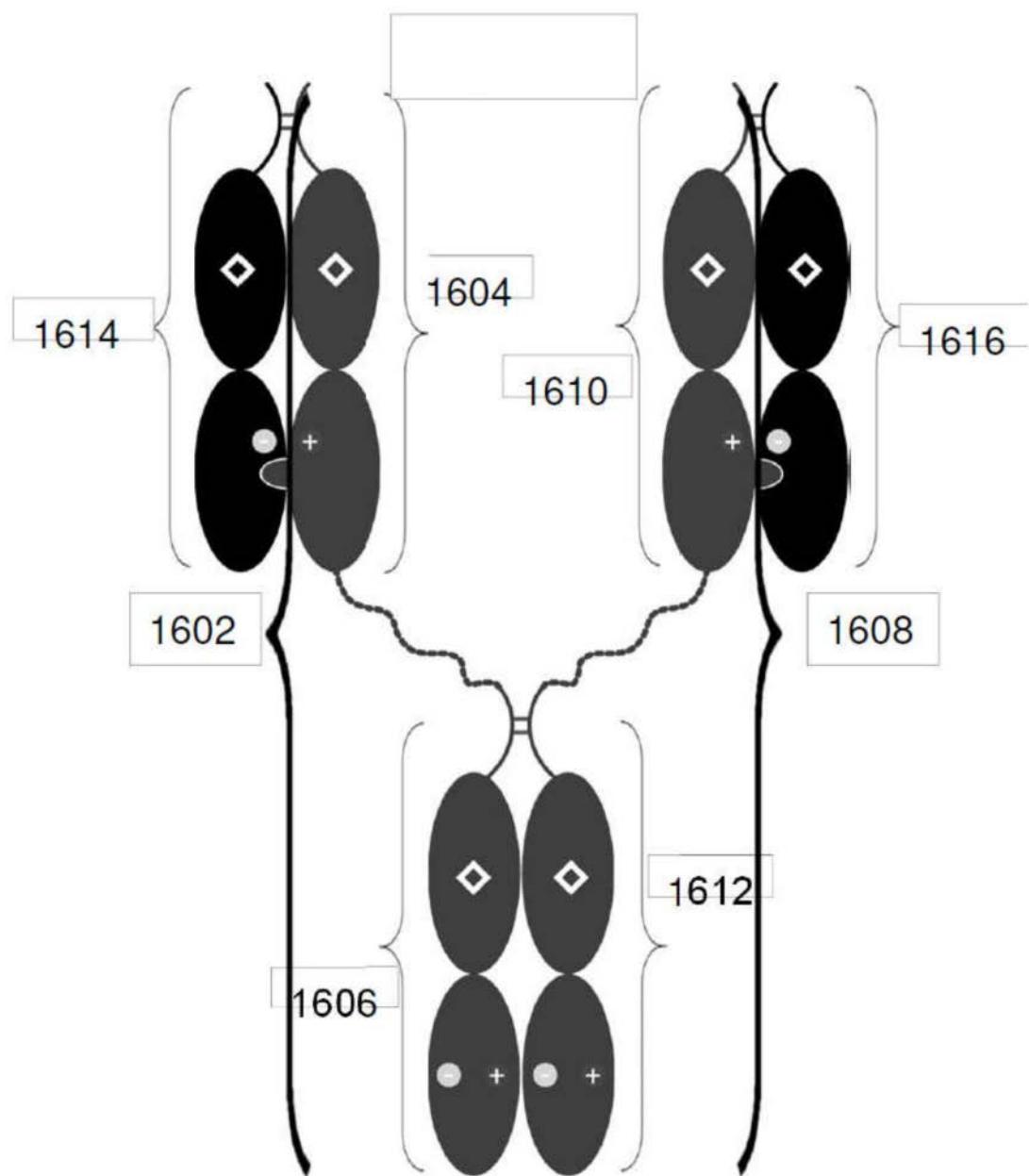


图18L

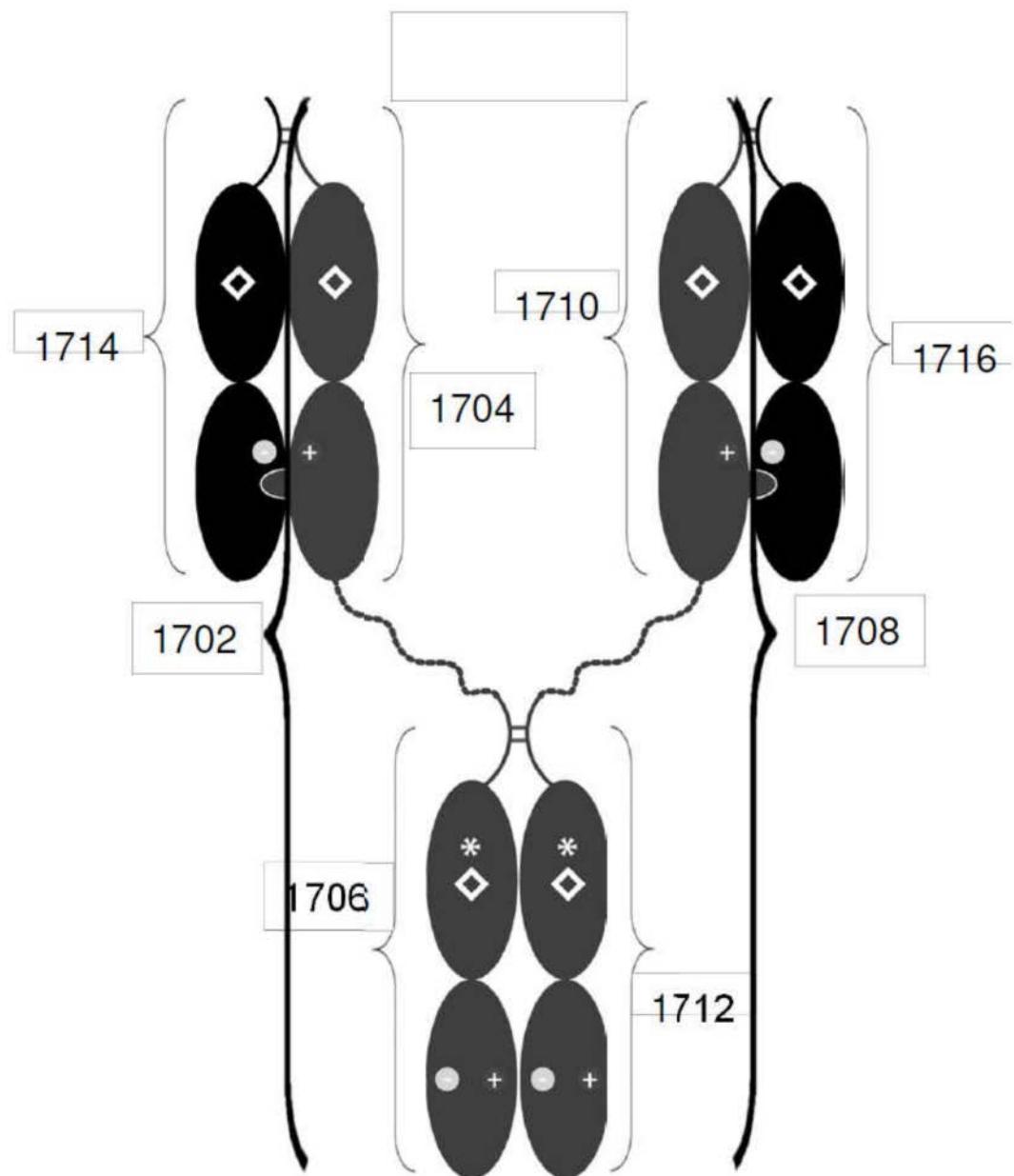


图18M

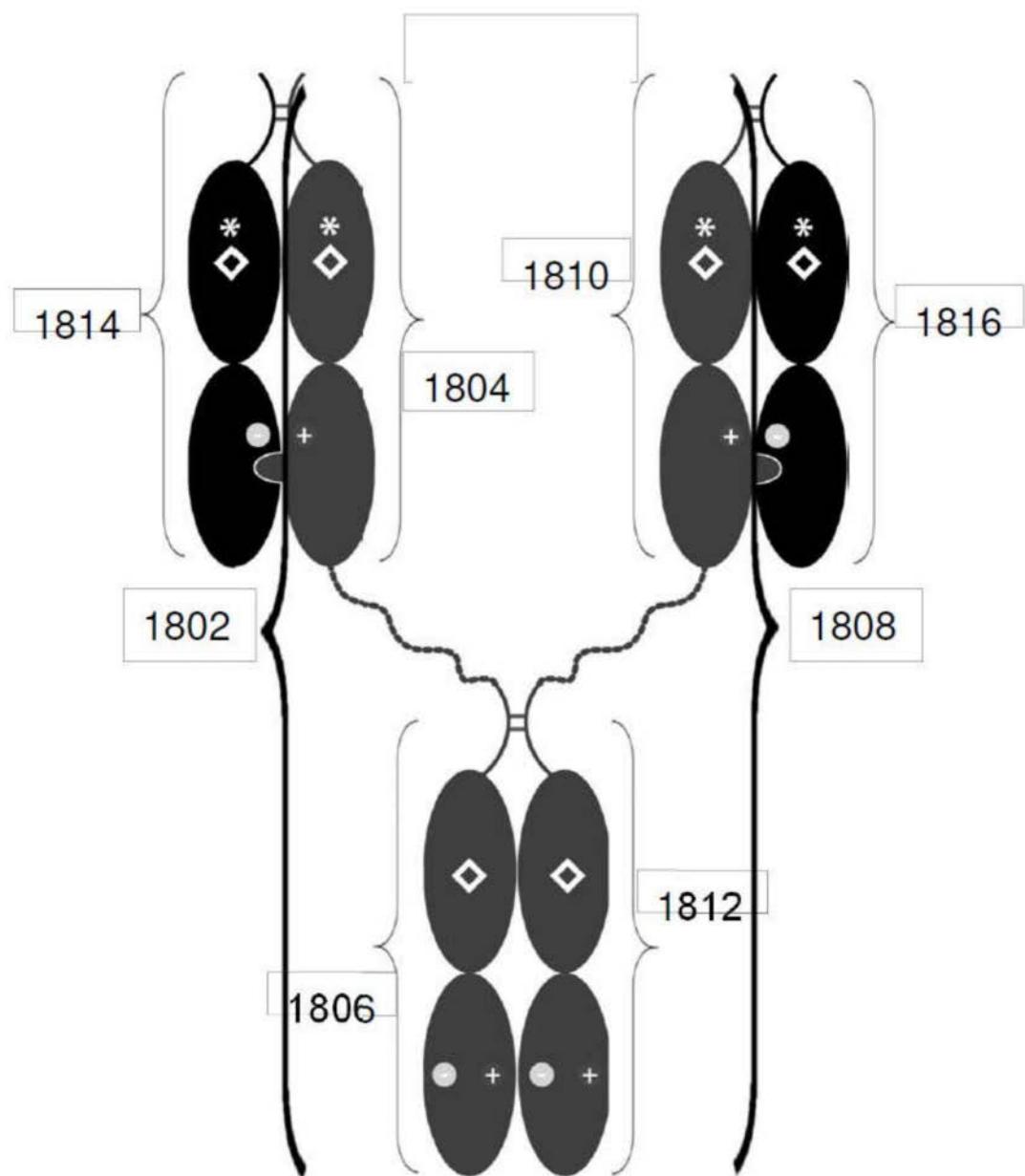


图18N

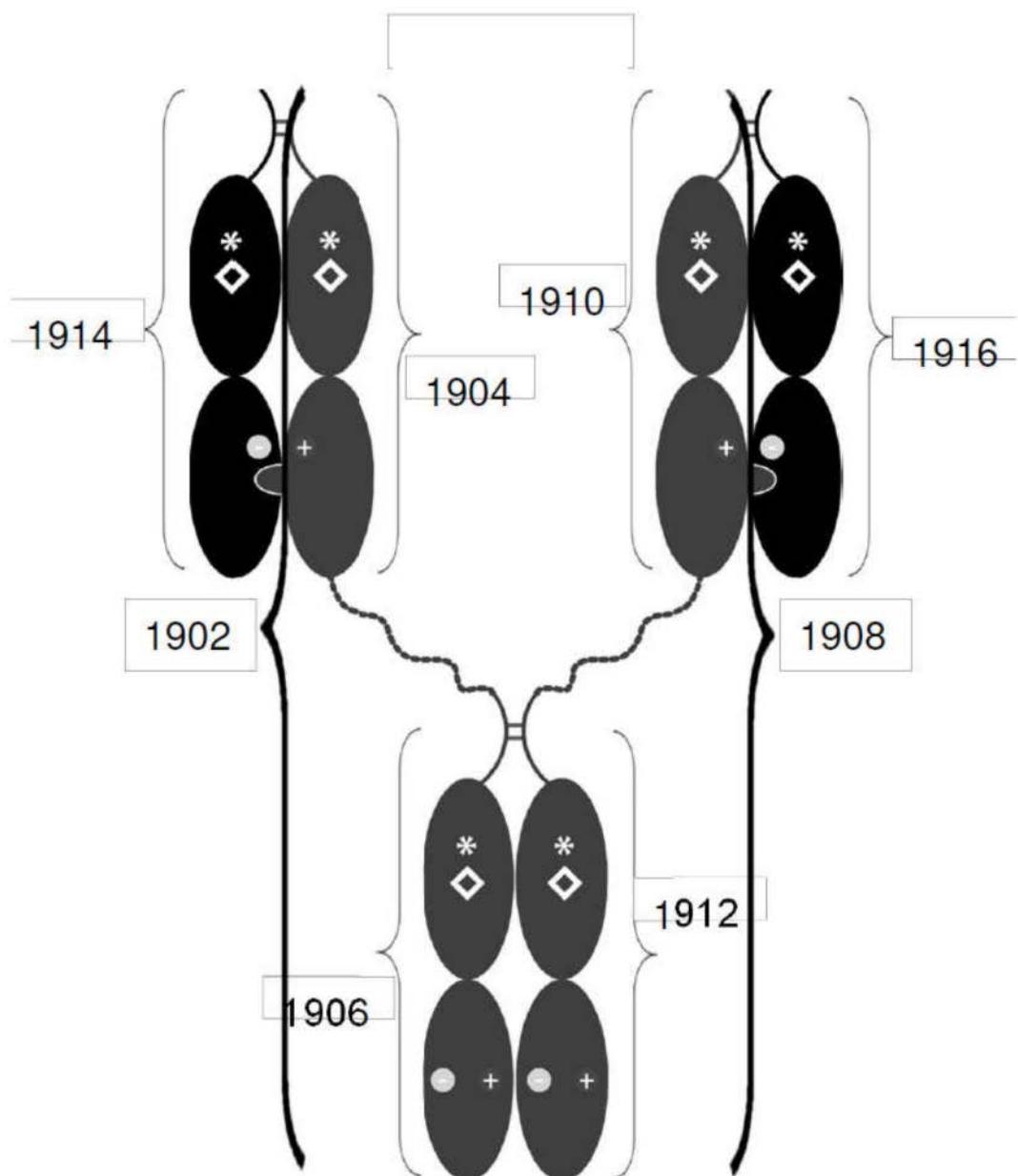


图180

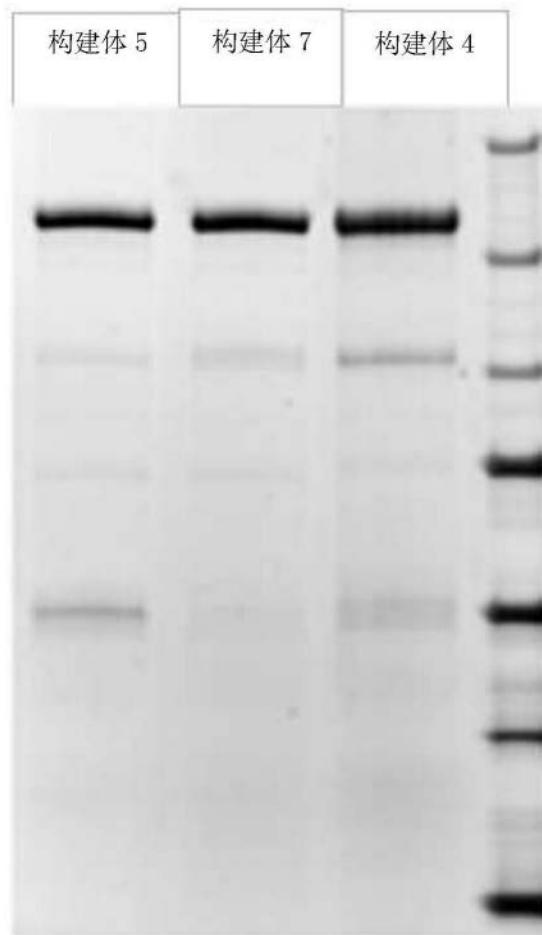


图18P

图 19A

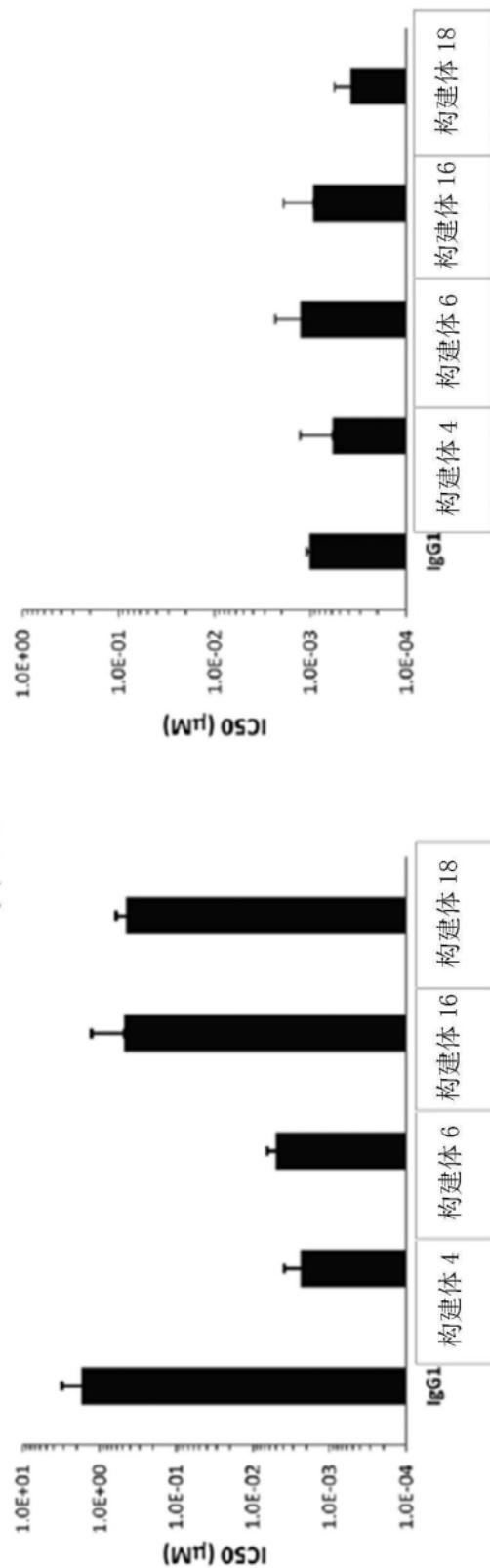


图 19B

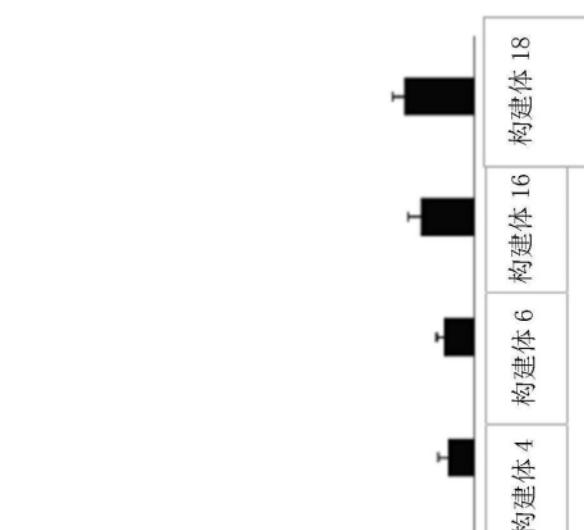


图 19D

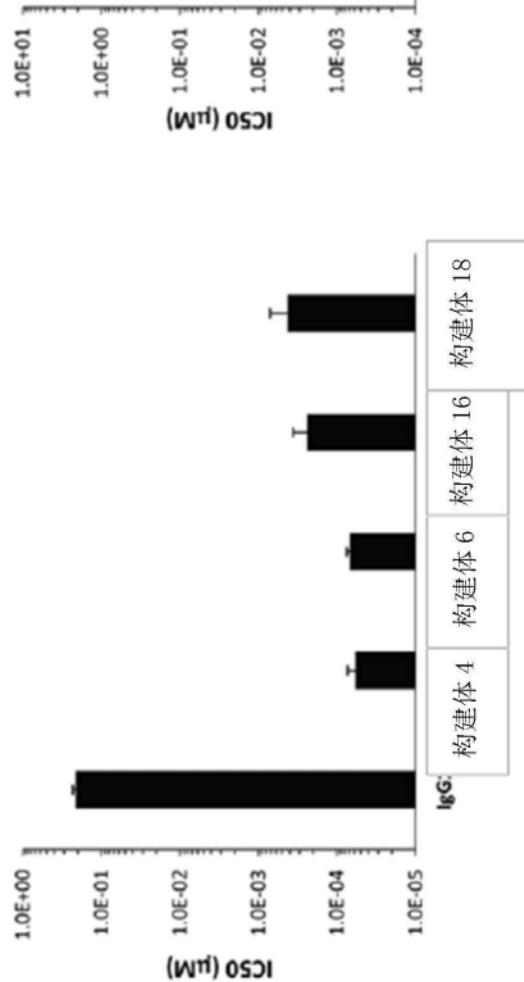


图 19

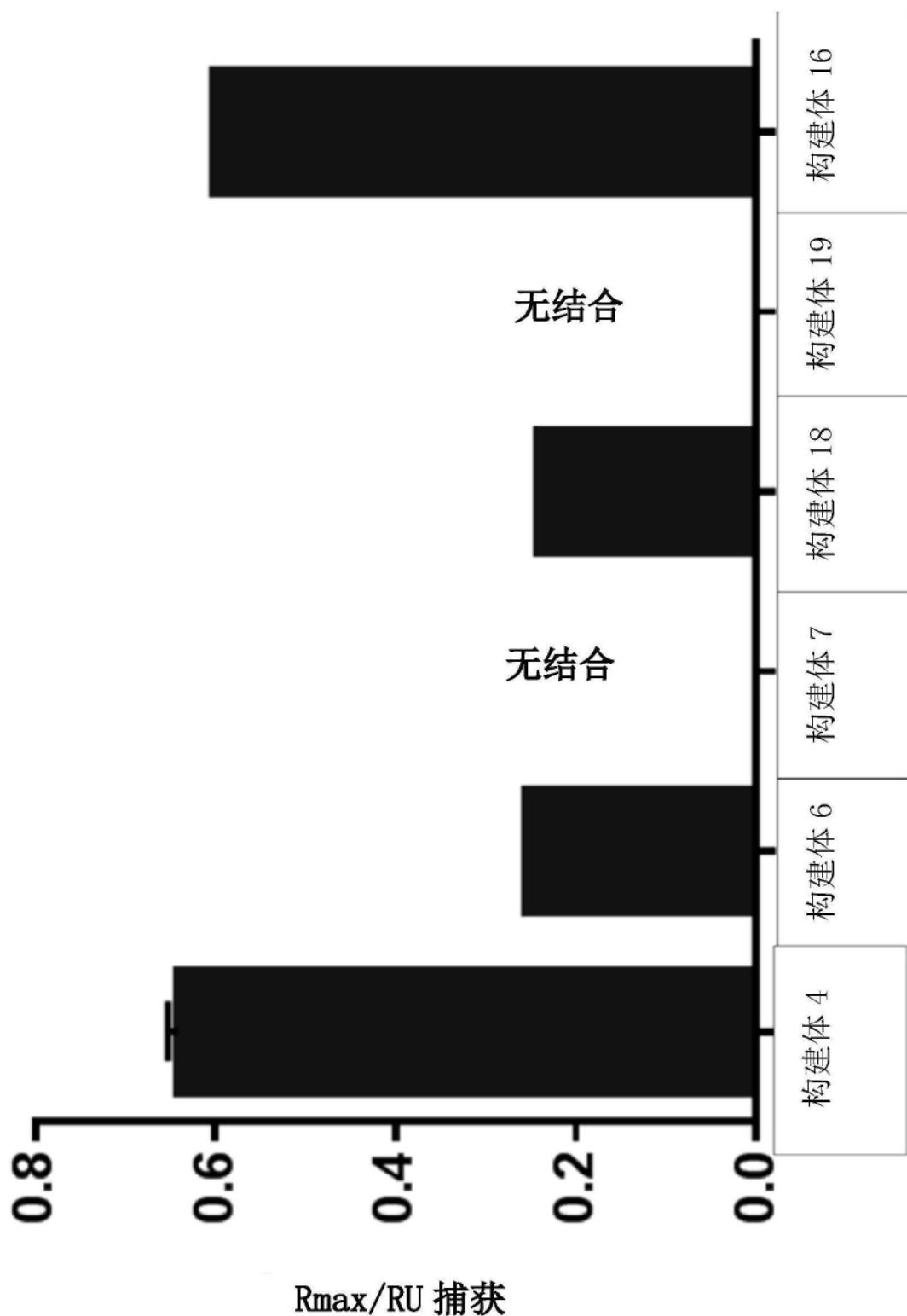


图20

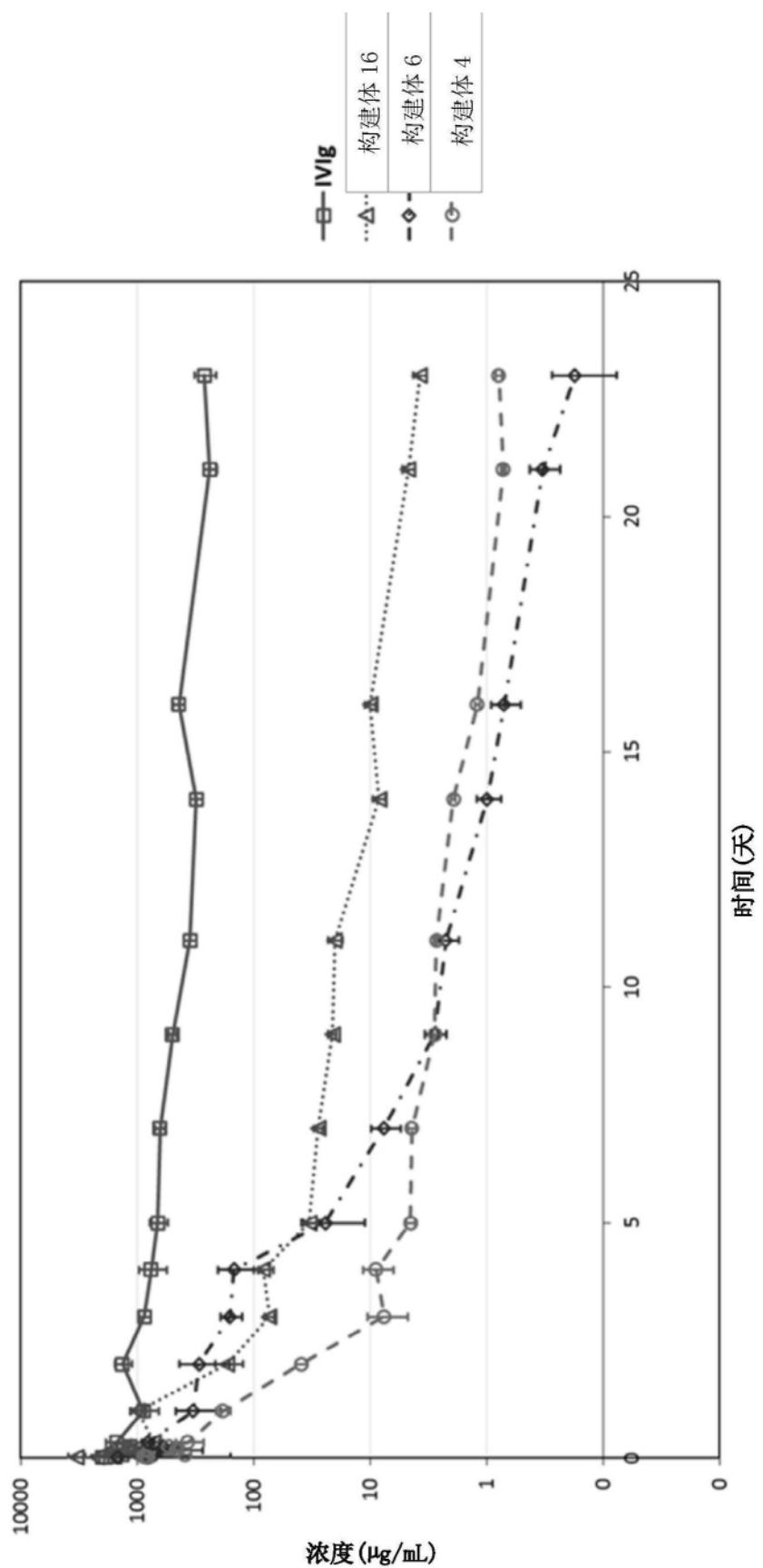


图21

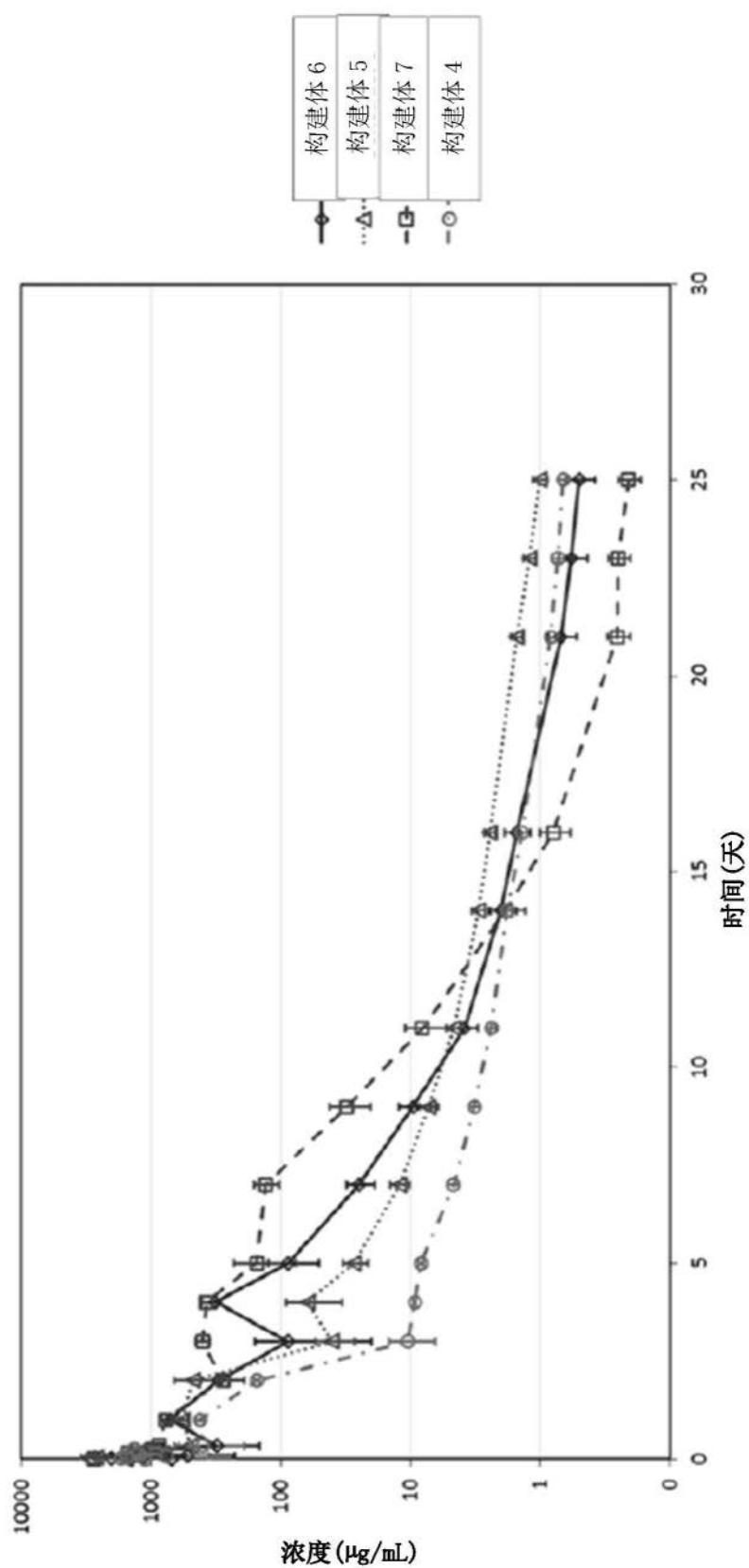


图22

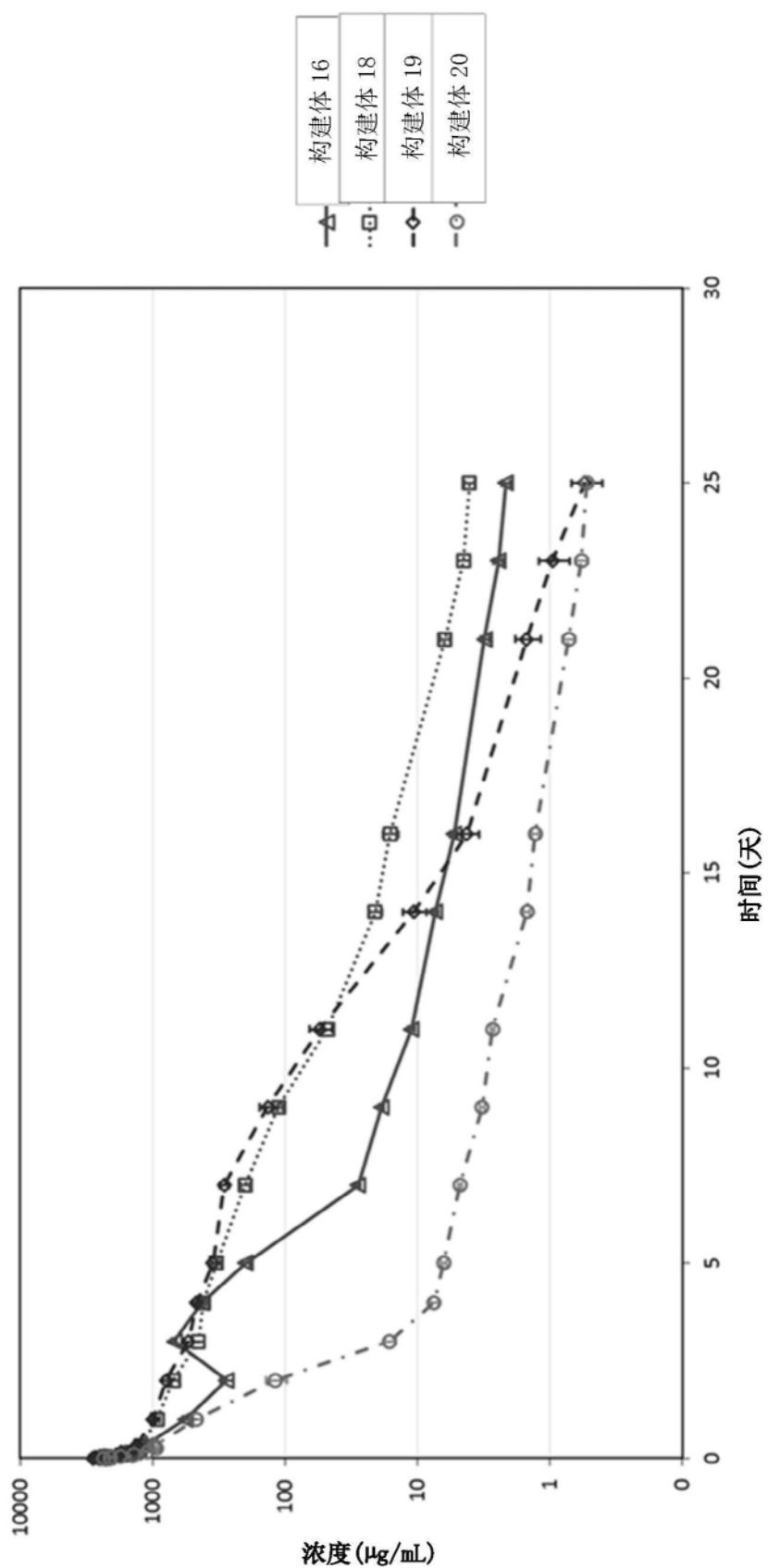


图23

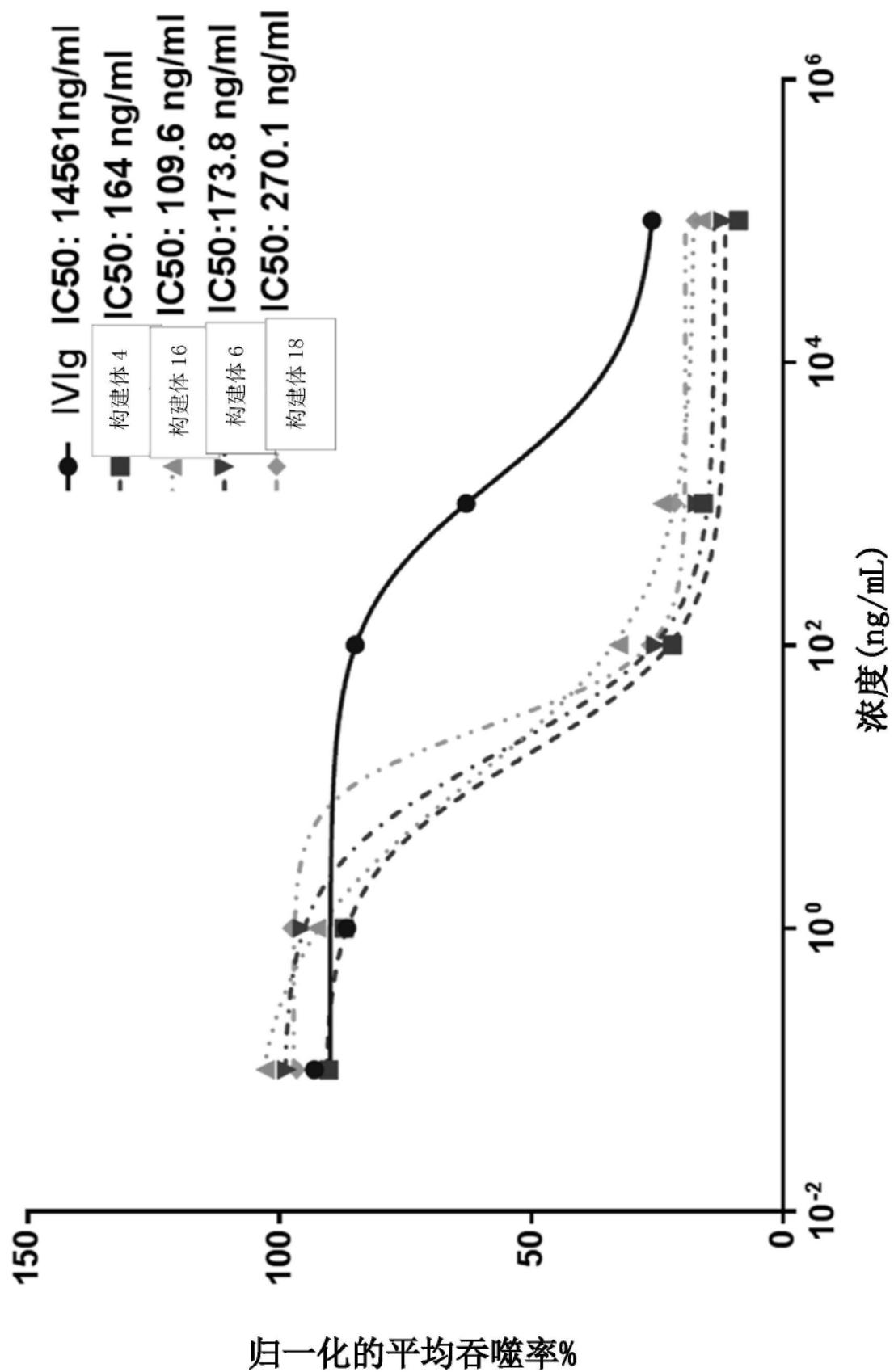


图24

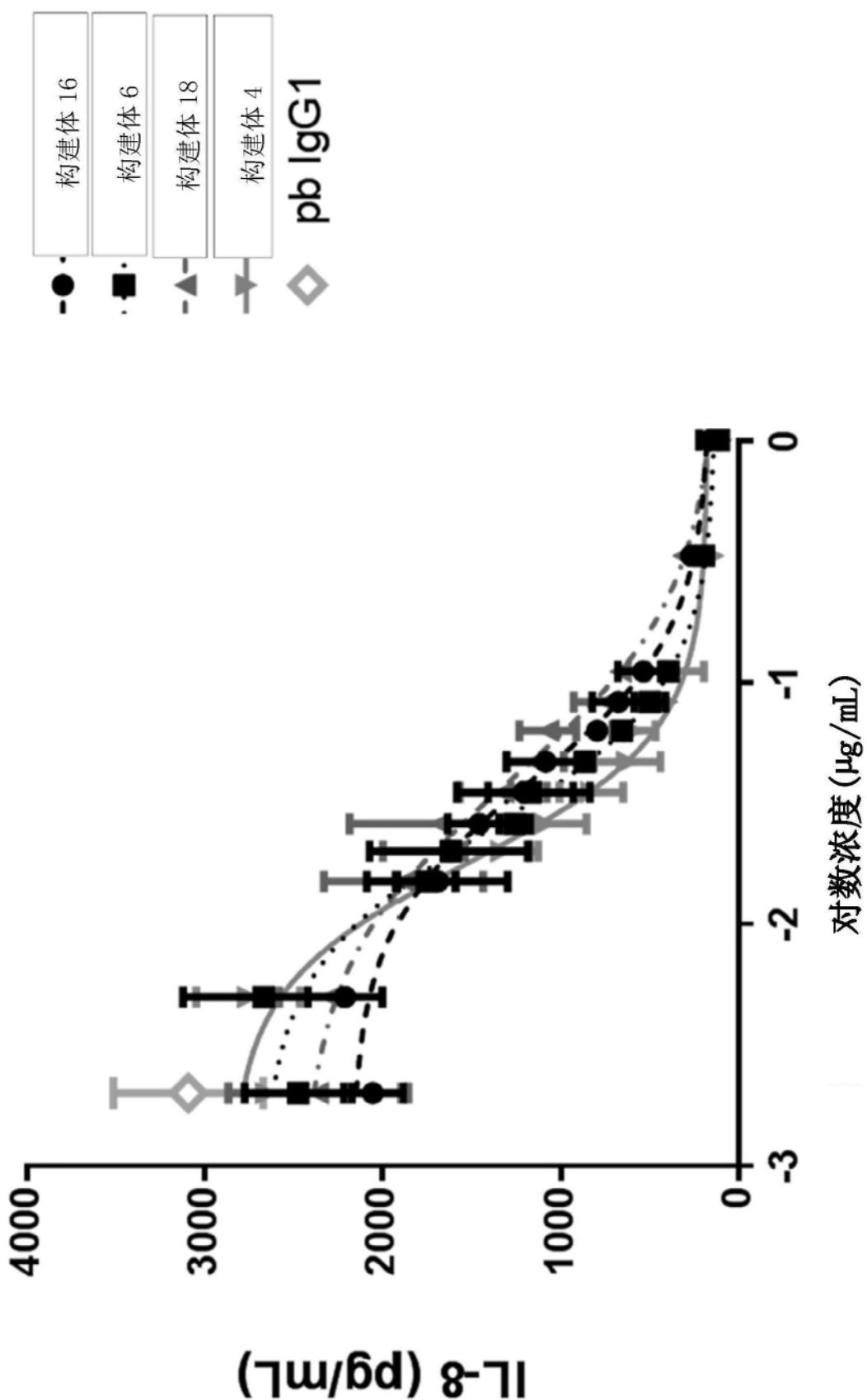


图25

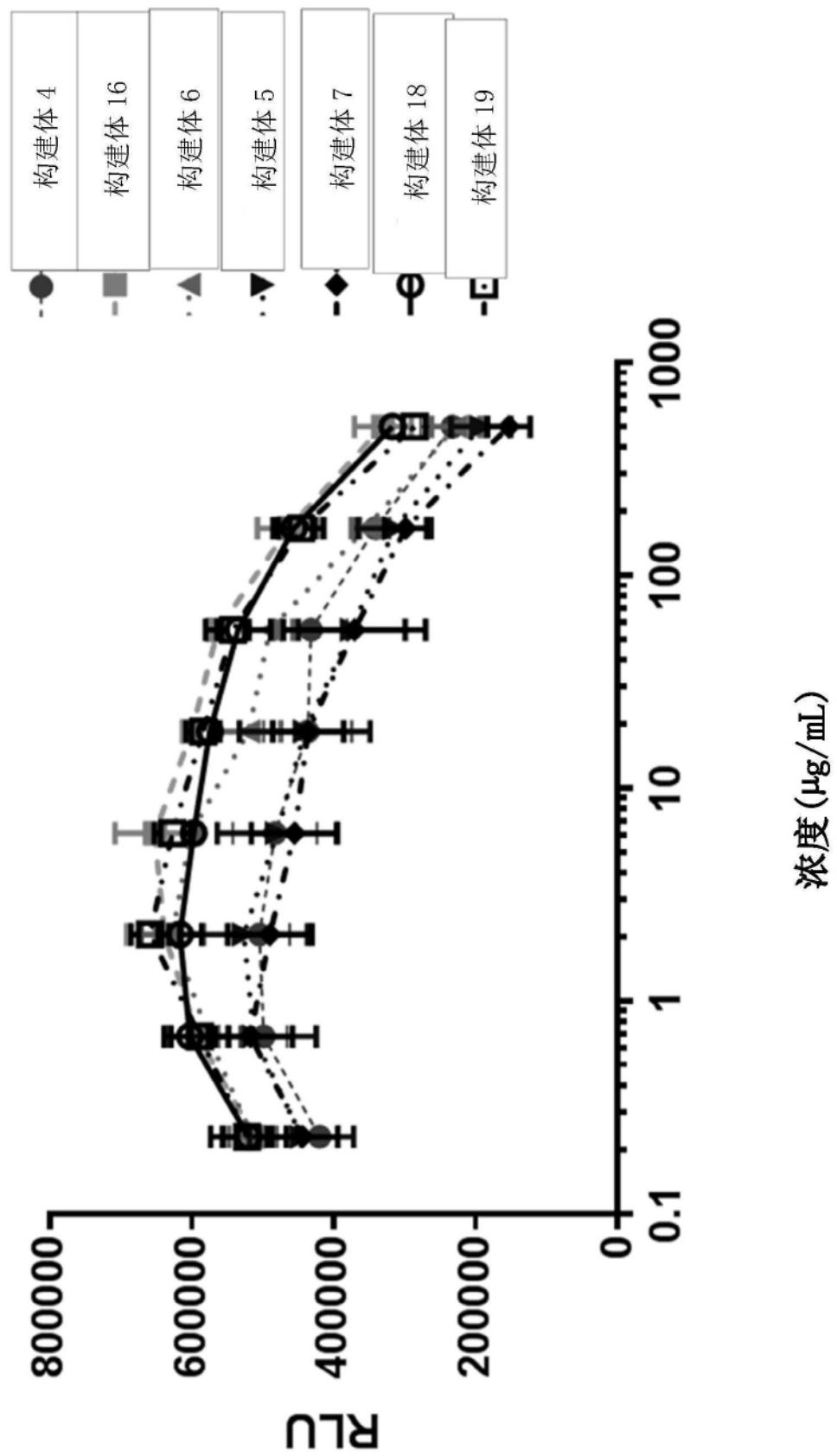


图26

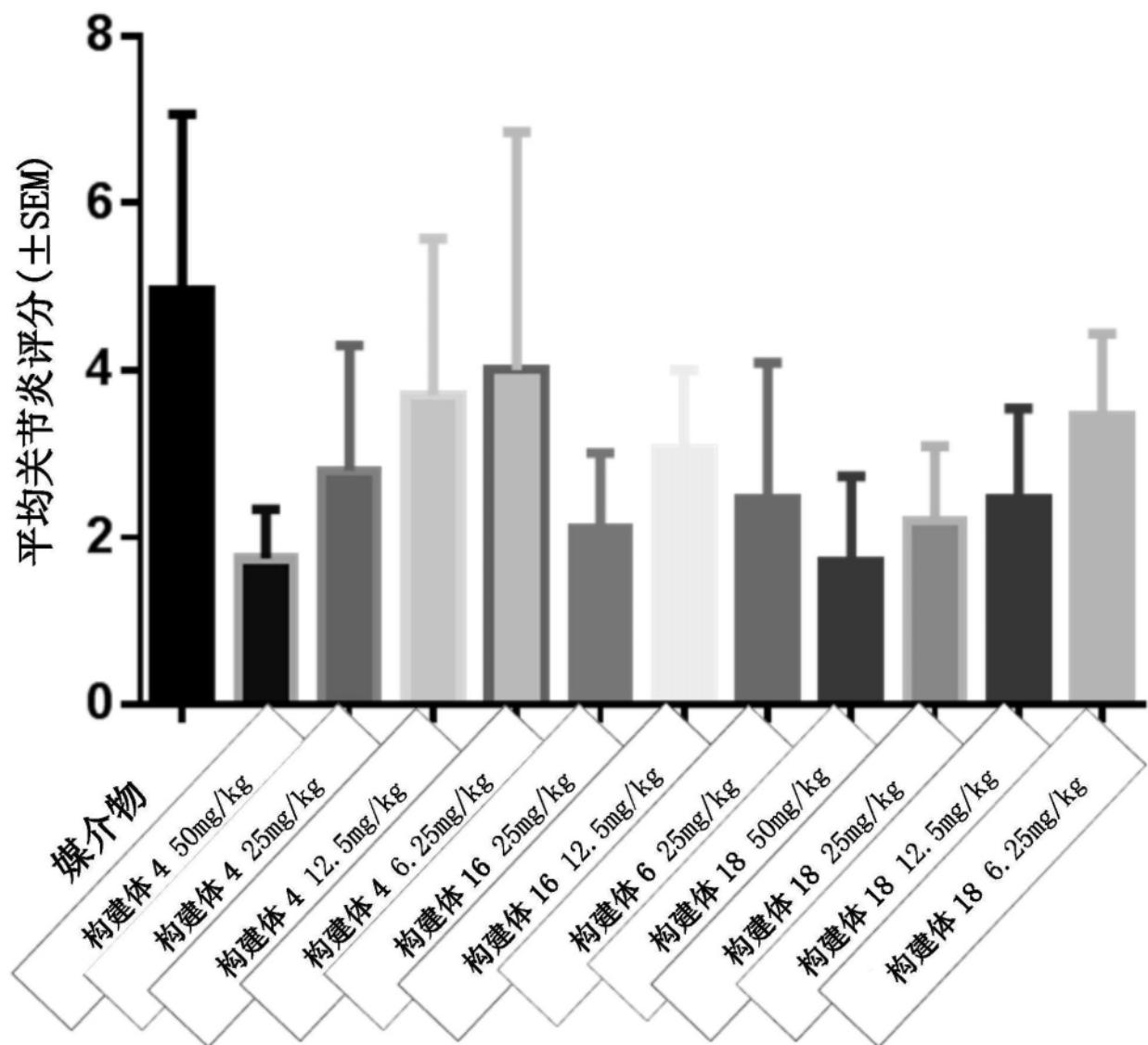


图27

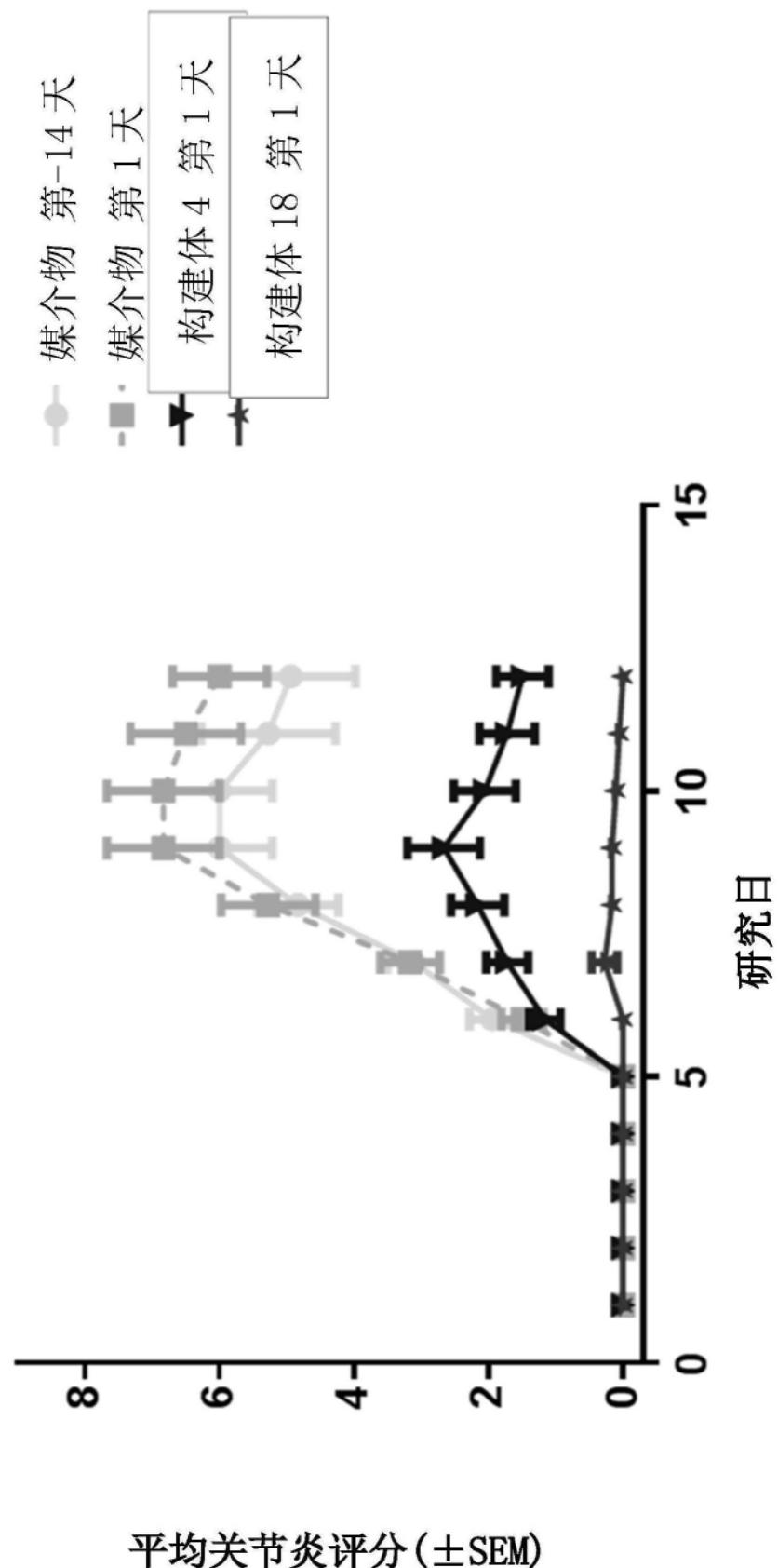


图28

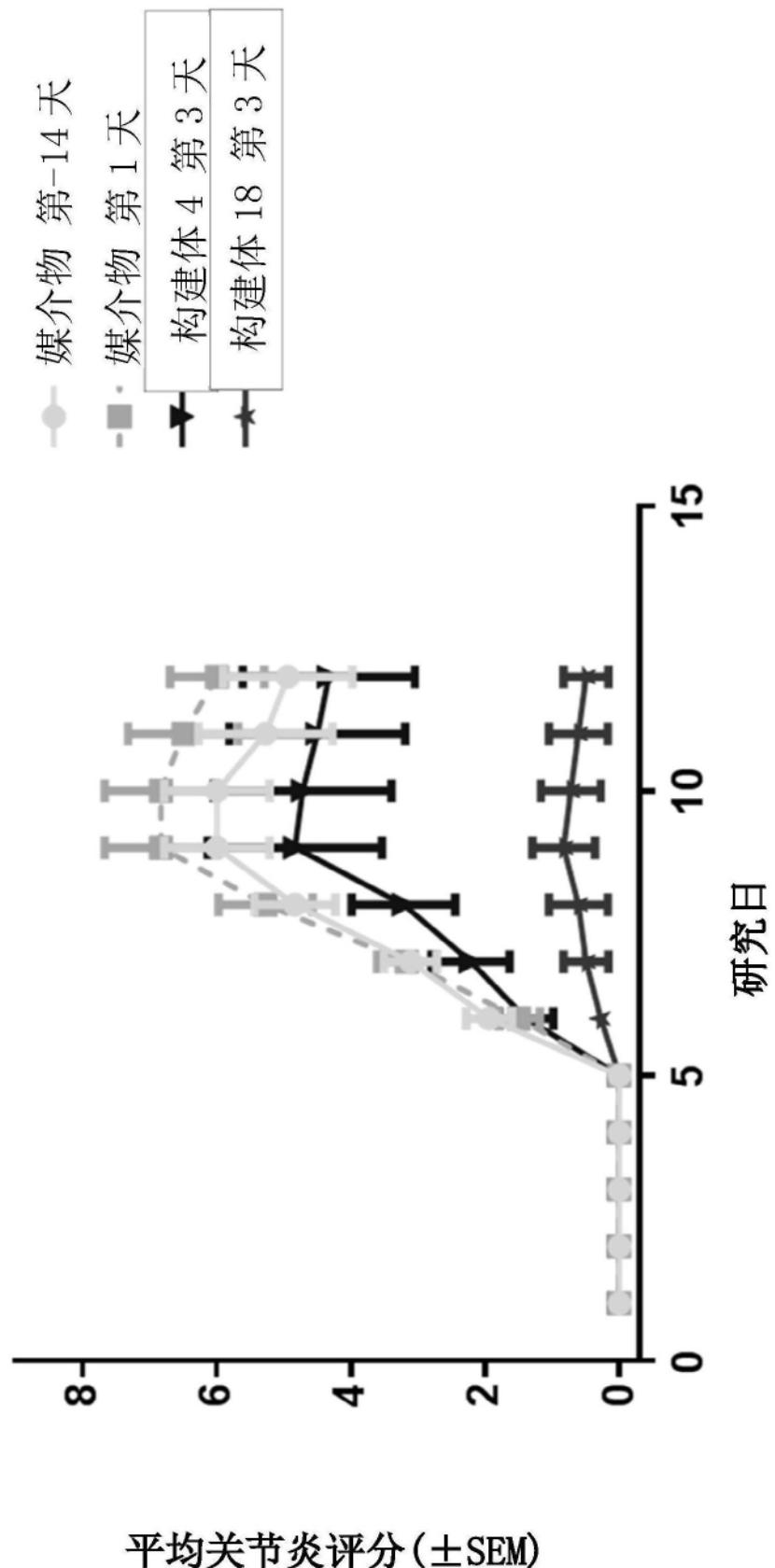


图29

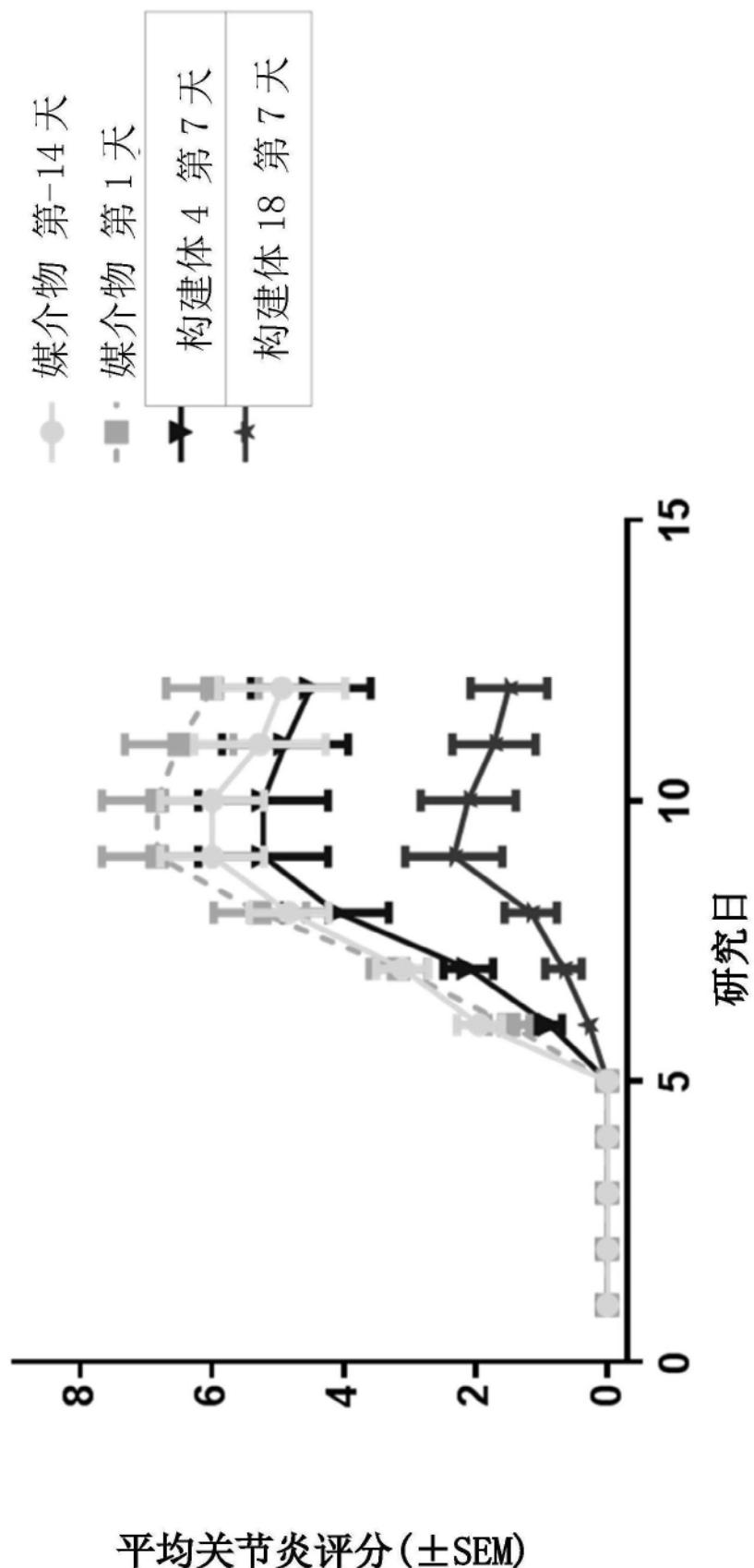


图30

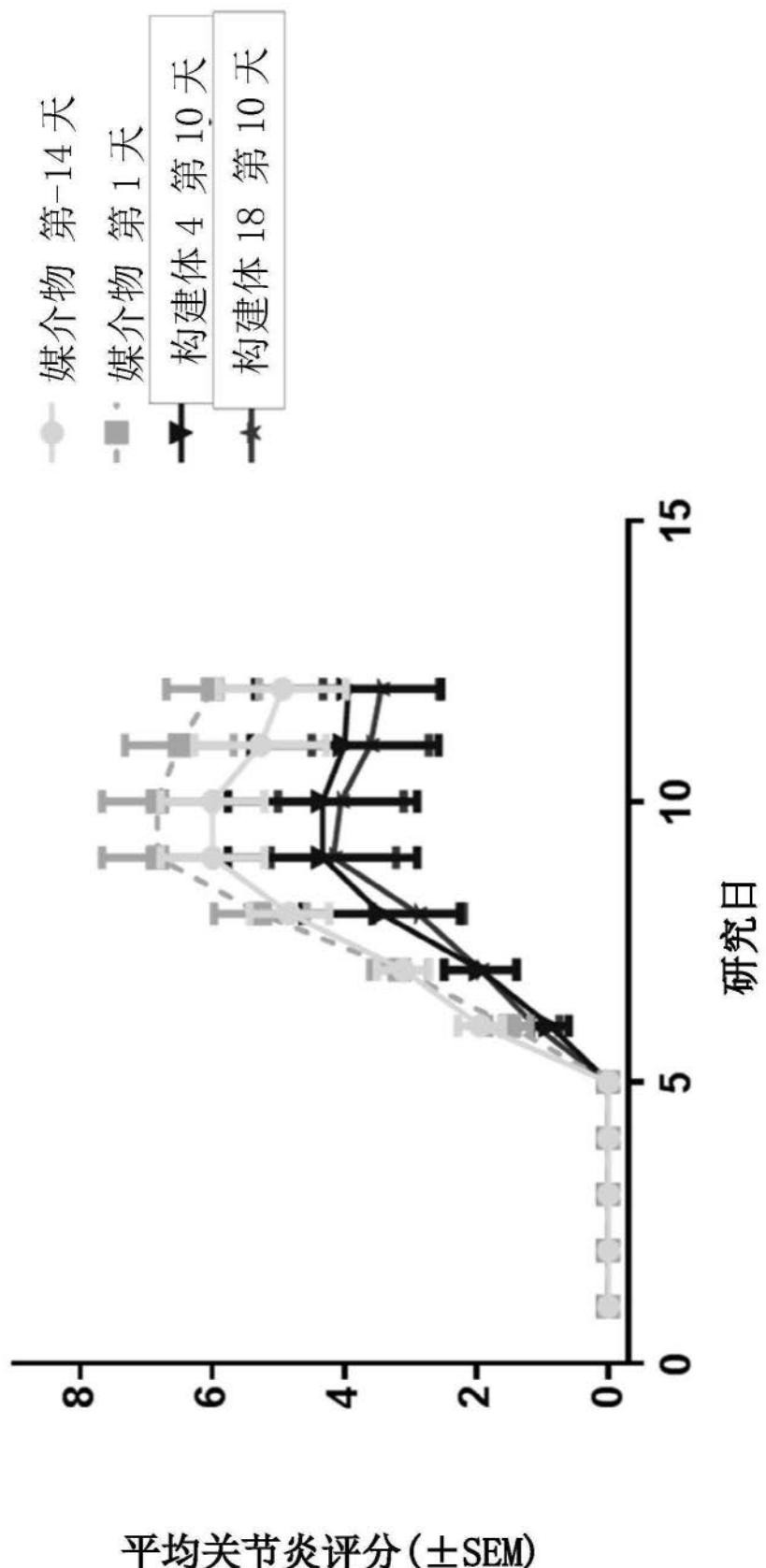


图31

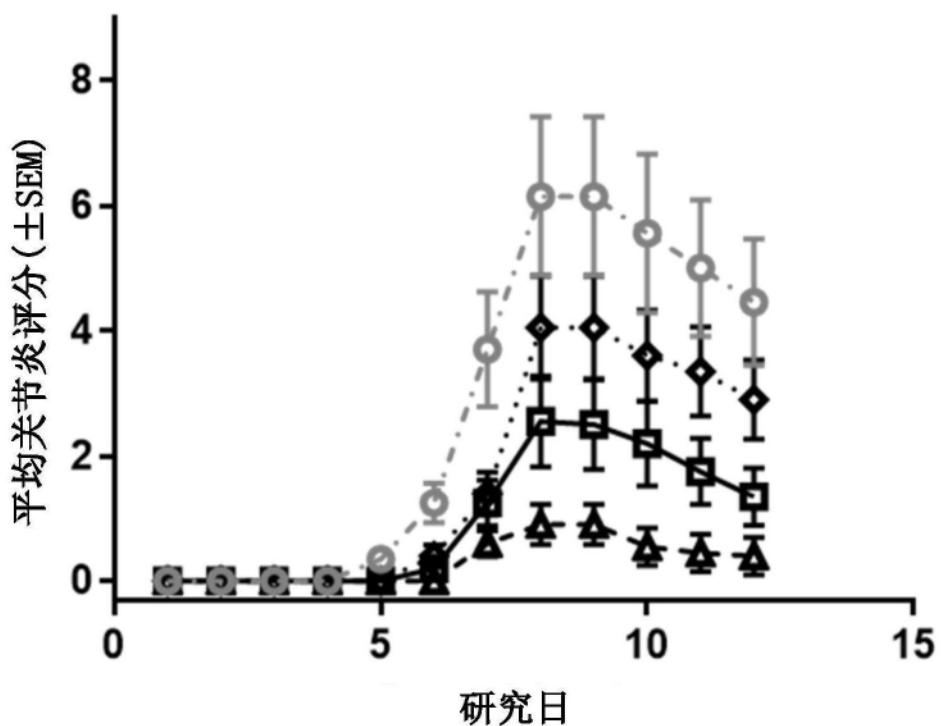


图32

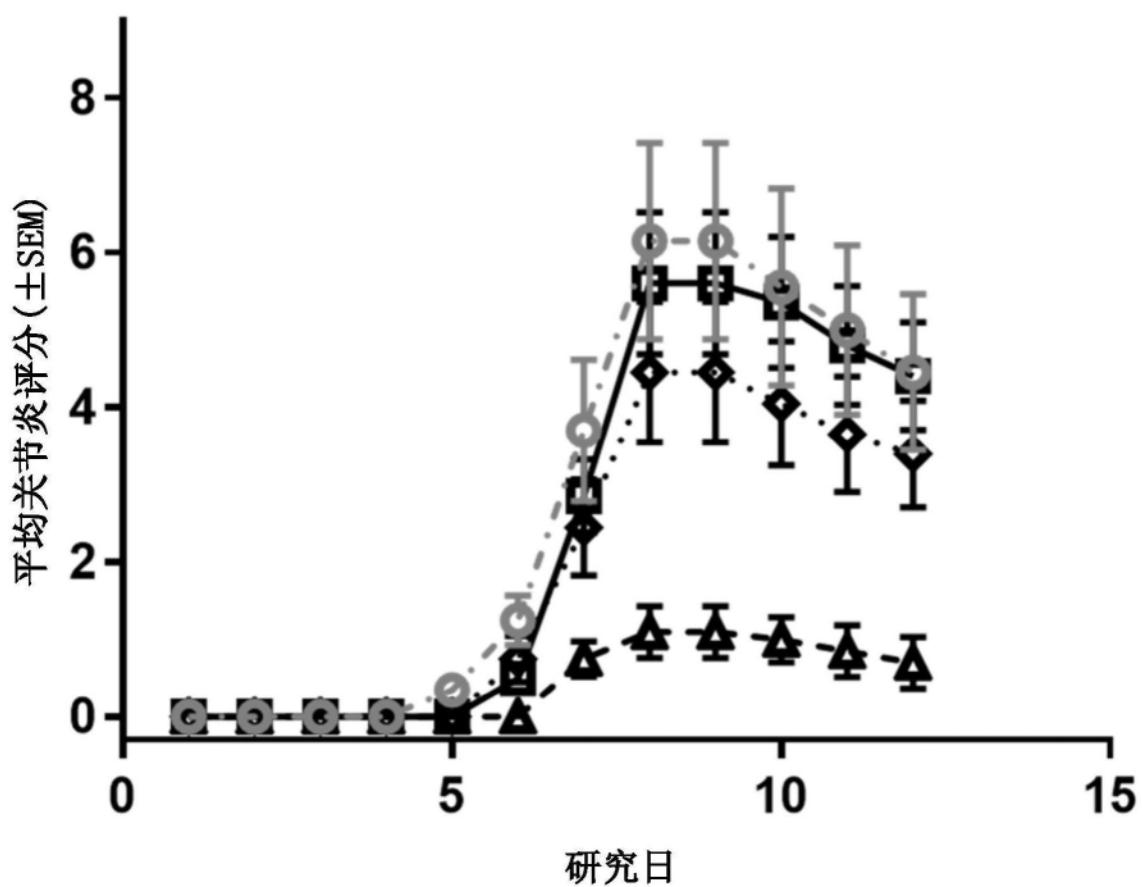


图33

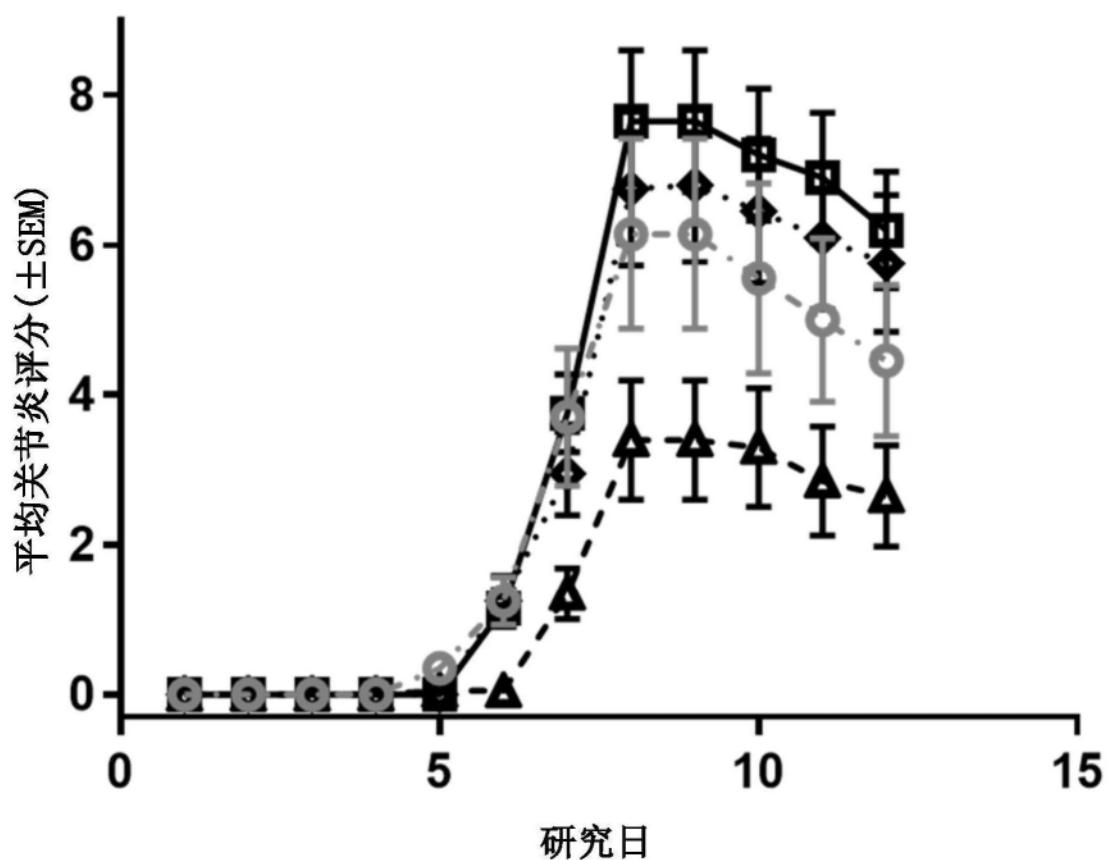


图34

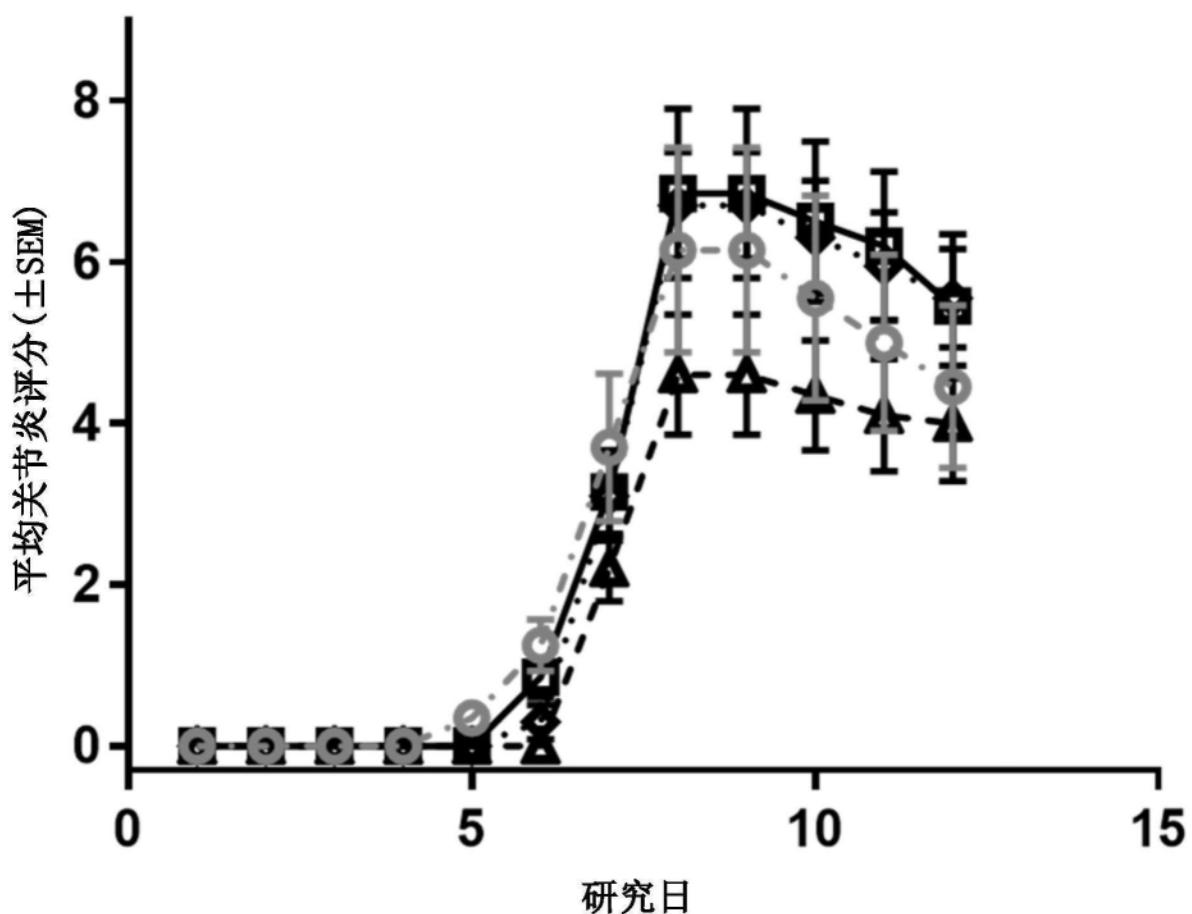


图35

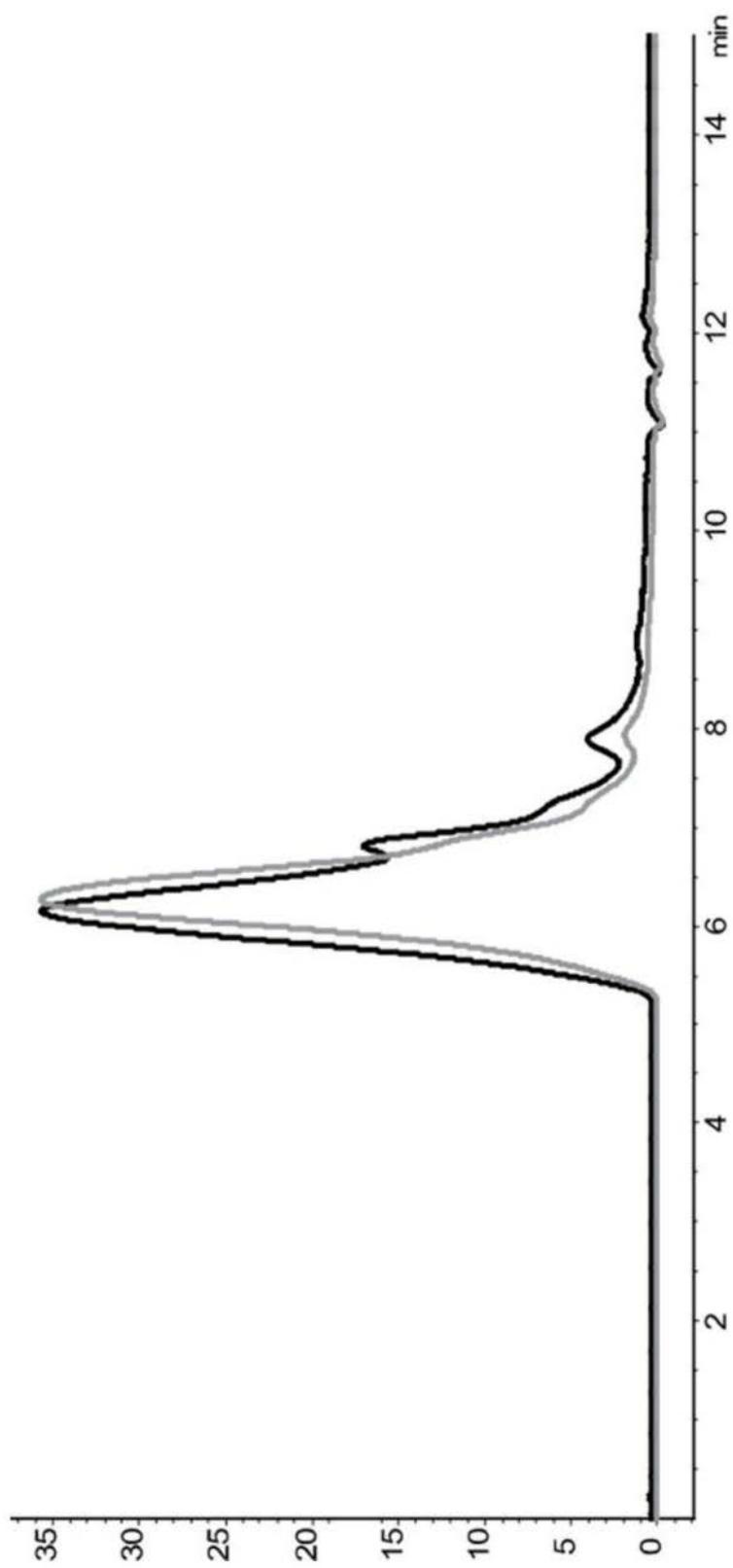


图36

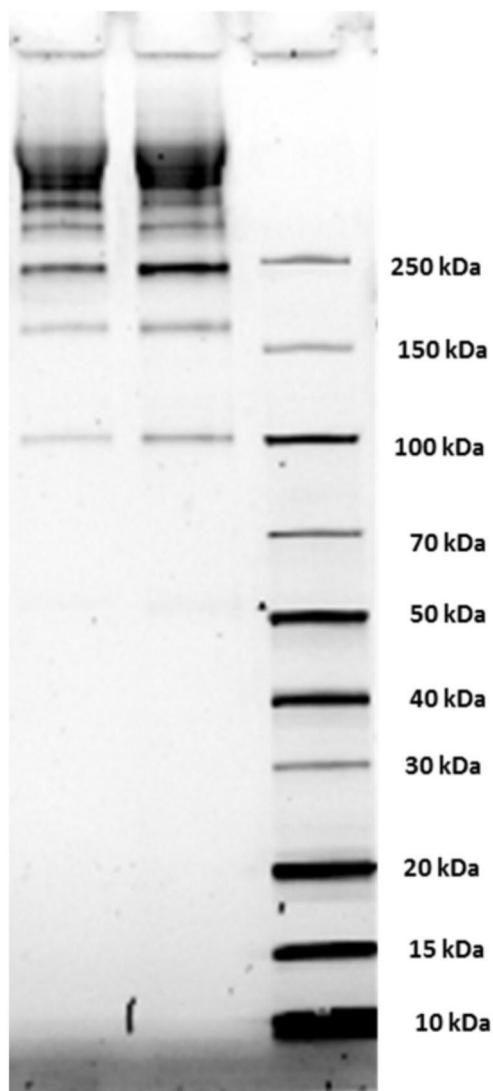


图37

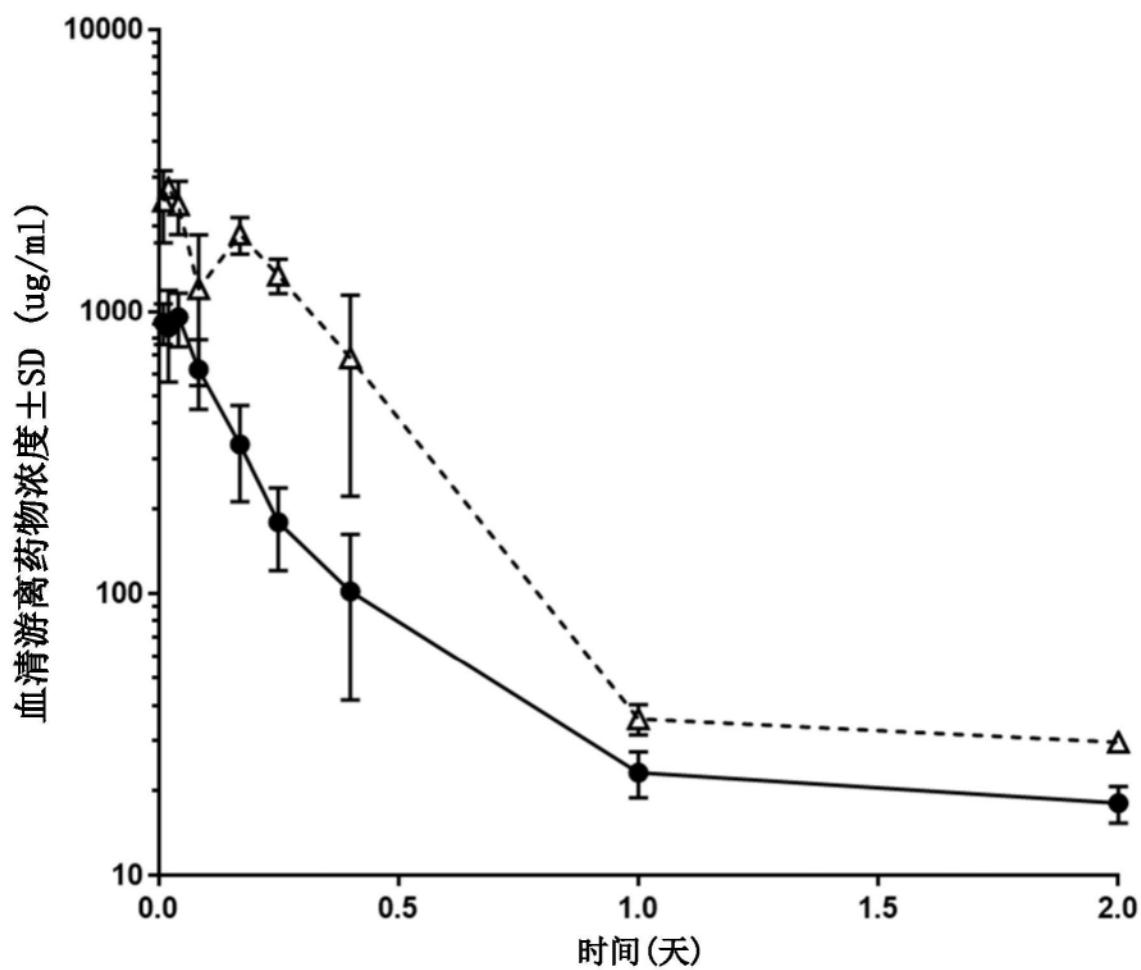


图38

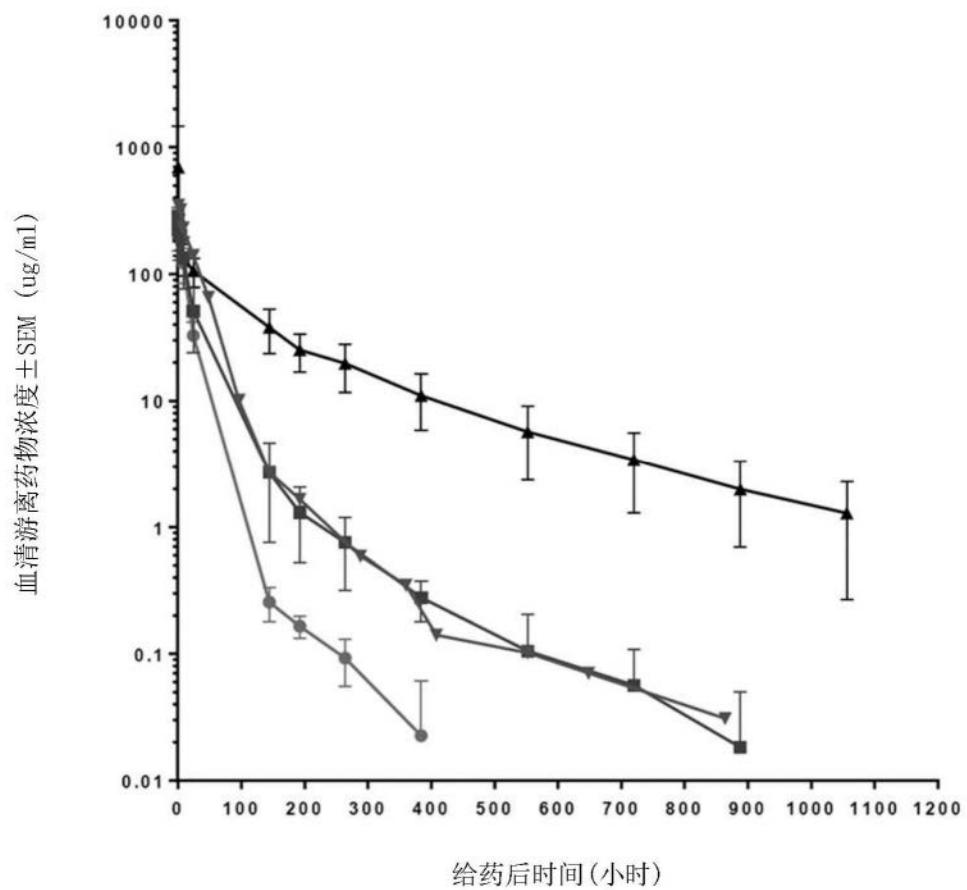


图39

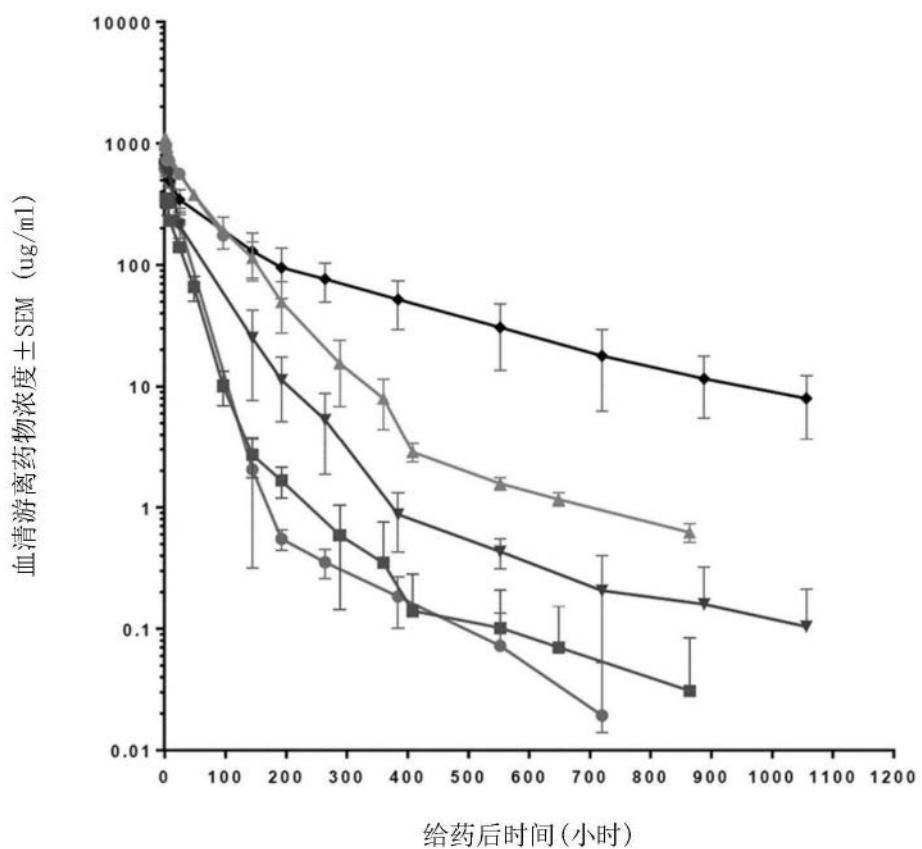


图40