



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118678964 A

(43) 申请公布日 2024. 09. 20

(21) 申请号 202280091480.X
(22) 申请日 2022.12.13
(30) 优先权数据
63/288,782 2021.12.13 US
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2024.08.12
(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/IL2022/051321 2022.12.13
(87) PCT国际申请的公布数据
W02023/112028 EN 2023.06.22
(71) 申请人 卡努佩免疫治疗公司
地址 以色列米伽迪姆
(72) 发明人 K·奥维德 G·登克贝格
S·里夫 Y·皮祖尔

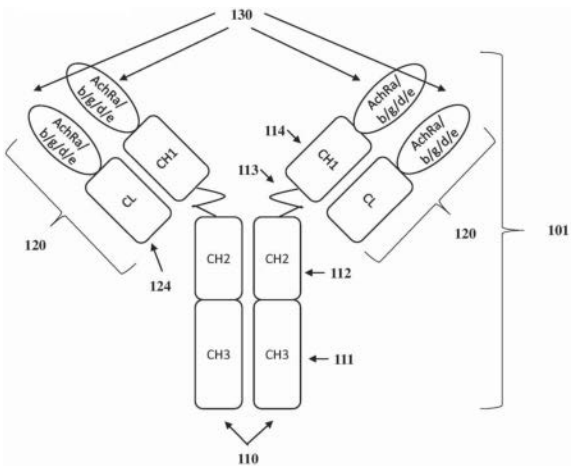
(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245
专利代理师 王永伟

(51) Int.Cl.
A61K 38/17 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

权利要求书7页 说明书64页
序列表（电子公布） 附图58页

(54) 发明名称
Ig样融合蛋白及其用途

(57) 摘要
提供组合物,其包括:重症肌无力自身抗体的第一人受体靶标的片段或其类似物或衍生物;和重症肌无力自身抗体的第二人蛋白质受体的片段或其类似物或衍生物。还提供包括所述组合物的药物组合物、编码所述组合物的多肽的核酸系统以及使用所述组合物治疗和确定治疗的适合性的方法;以及产生所述组合物的方法。



1. 组合物,其包括:第一人乙酰胆碱受体亚基的片段或其类似物或衍生物,和第二人乙酰胆碱受体亚基的片段或其类似物或衍生物,并且其中所述第一和第二亚基是不同的亚基。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述片段是所述乙酰胆碱受体亚基的胞外结构域的片段。

3. 根据权利要求1或2所述的组合物,其中所述第一和第二乙酰胆碱受体亚基选自乙酰胆碱受体亚基 α (ACHRA)、乙酰胆碱受体亚基 β (ACHRB)、乙酰胆碱受体亚基 γ (ACHRG)、乙酰胆碱受体亚基 δ (ACHRD)和乙酰胆碱受体亚基 ϵ (ACHRE)。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的组合物,其包括蛋白质复合物,所述蛋白质复合物包括

a. 第一多肽链,其包括第一人乙酰胆碱受体亚基的所述片段或其类似物或衍生物以及第一二聚化结构域;和

b. 第二多肽链,其包括第二人乙酰胆碱受体亚基的所述片段或其类似物或衍生物以及第二二聚化结构域;

其中所述第一和第二二聚化结构域被配置成彼此二聚化。

5. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述二聚化包括在所述第一二聚化结构域和所述第二二聚化结构域之间形成共价键。

6. 根据权利要求4或5所述的组合物,其中所述蛋白质复合物包括免疫球蛋白支架。

7. 根据权利要求4至6中任一项所述的组合物,其中

a. 所述第一二聚化结构域包括免疫球蛋白的重链的第一铰链结构域,并且所述第二二聚化结构域包括重链的第二铰链结构域,并且所述第一和所述第二二聚化结构域通过二硫键二聚化;或

b. 所述第一和第二二聚化结构域各自包括结构域,所述结构域选自免疫球蛋白的重链的CH1结构域和免疫球蛋白的轻链的CL结构域,并通过二硫键二聚化,并且其中所述第一和第二二聚化结构域不同时包括所述CH1结构域和所述CL结构域。

8. 根据权利要求4至7中任一项所述的组合物,其中所述第一、第二或这两个多肽链的所述片段和所述二聚化结构域通过连接体分隔。

9. 根据权利要求4至8中任一项所述的组合物,其中所述第一多肽链、所述第二多肽链或两者进一步包括人抗体重链的Fc区。

10. 根据权利要求9所述的组合物,其中所述Fc区能够引发针对结合所述蛋白质复合物的细胞的细胞毒性。

11. 根据权利要求9或10所述的组合物,其中所述第一多肽链包括免疫球蛋白的重链的第一CH3结构域、免疫球蛋白的重链的第一CH2结构域或两者,并且所述第二多肽链包括免疫球蛋白的重链的第二CH3结构域、免疫球蛋白的重链的第二CH2结构域或两者。

12. 根据权利要求11所述的组合物,其中所述第一CH3结构域、所述第一CH2结构域或两者包括至少第一突变,并且所述第二CH3结构域、所述第二CH2结构域或两者包括至少第二突变,并且其中所述突变允许所述第一和第二多肽链的异二聚化并抑制所述第一多肽链的同二聚化和所述第二多肽链的同二聚化。

13. 根据权利要求12所述的组合物,其中所述第一突变选自表1中提供的突变,并且所

述第二突变提供于表1中并且是所述第一突变的相应突变。

14. 根据权利要求9至13中任一项所述的组合物,其中所述Fc来自IgG2或IgG4或包括降低效应子功能的至少一个突变。

15. 根据权利要求9至14中任一项所述的组合物,其中所述第一、第二或这两个多肽链的所述Fc区通过连接体与所述片段或所述二聚化结构域分隔。

16. 根据权利要求9至15中任一项所述的组合物,其中所述第一、第二或这两个多肽链的所述二聚化结构域在所述片段的C-末端或在所述片段的N-末端。

17. 根据权利要求1至16中任一项所述的组合物,其不含抗体可变结构域。

18. 根据权利要求4至17中任一项所述的组合物,其进一步包括第三多肽,所述第三多肽包括第三人乙酰胆碱受体亚基的片段或其类似物或衍生物以及第三二聚化结构域,其中所述第一多肽进一步包括第四二聚化结构域,并且所述第三和第四二聚化结构域能够彼此二聚化。

19. 根据权利要求18所述的组合物,其中

a. 所述第三二聚化结构域包括免疫球蛋白的重链的第一铰链结构域,并且所述第四二聚化结构域包括重链的第二铰链结构域,并且所述第一和所述第二二聚化结构域通过二硫键二聚化;或

b. 所述第三和第四二聚化结构域各自包括结构域,所述结构域选自免疫球蛋白的重链的CH1结构域和免疫球蛋白的轻链的CL结构域,并通过二硫键二聚化,并且其中所述第一和第三多肽不同时包括所述CH1结构域和所述CL结构域。

20. 根据权利要求18或19所述的组合物,其进一步包括第四多肽,所述第四多肽包括第四人乙酰胆碱受体亚基的片段或其类似物或衍生物以及第五二聚化结构域,其中所述第二多肽进一步包括第六二聚化结构域,并且所述第五和第六二聚化结构域能够彼此二聚化。

21. 根据权利要求20所述的组合物,其中

a. 所述第五二聚化结构域包括免疫球蛋白的重链的第一铰链结构域,并且所述第六二聚化结构域包括重链的第二铰链结构域,并且所述第一和所述第二二聚化结构域通过二硫键二聚化;或

b. 所述第五和第六二聚化结构域各自包括结构域,所述结构域选自免疫球蛋白的重链的CH1结构域和免疫球蛋白的轻链的CL结构域,并通过二硫键二聚化,并且其中所述第一和第三多肽不同时包括所述CH1结构域和所述CL结构域。

22. 根据权利要求1至21中任一项所述的组合物,其包括单个多肽链,所述单个多肽链包括:第一人乙酰胆碱受体亚基的所述片段或其类似物或衍生物;和第三人乙酰胆碱受体亚基的所述片段或其类似物或衍生物。

23. 根据权利要求22所述的组合物,其中所述单个多肽链进一步包括:第三人乙酰胆碱受体亚基的片段或其类似物或衍生物;和任选地第四人乙酰胆碱受体亚基的片段或其类似物或衍生物。

24. 根据权利要求22或23所述的组合物,其中所述片段被氨基酸连接体分隔,任选地其中所述连接体是柔性GS连接体,或其中所述连接体是刚性连接体。

25. 根据权利要求22至24中任一项所述的组合物,其中所述多肽链进一步包括人抗体重链的Fc区,并且第二多肽链包括第三人乙酰胆碱受体亚基或其类似物或衍生物以及人抗

体重链的Fc区,任选地其中所述第二多肽链进一步包括第四人乙酰胆碱受体亚基。

26.根据权利要求22至24中任一项所述的组合物,其进一步包括第二多肽链,所述第二多肽链包括第三人乙酰胆碱受体亚基或其类似物或衍生物,任选地其中所述第二多肽链进一步包括第四人乙酰胆碱受体亚基。

27.根据权利要求1至26中任一项所述的组合物,其中所述复合物包括选自SEQ ID NO: 64至69的至少一个氨基酸序列或包括与其至少80%同一性的其衍生物。

28.根据权利要求1至27中任一项所述的组合物,其中所述片段中的至少一个包括增加所述片段的稳定性或溶解性的突变。

29.根据权利要求28所述的组合物,其中所述突变包括用CDVSGVDTESGATNC (SEQ ID NO:44) 置换乙酰胆碱受体亚基内的cys环。

30.根据权利要求28或29所述的组合物,其中所述乙酰胆碱受体亚基选自:包括SEQ ID NO:131中提供的氨基酸序列的 α 亚基、包括SEQ ID NO:132中提供的氨基酸序列的 β 亚基、包括SEQ ID NO:133中提供的氨基酸序列的 γ 亚基、包括SEQ ID NO:134中提供的氨基酸序列的 δ 亚基和包括SEQ ID NO:135中提供的氨基酸序列的 ϵ 亚基。

31.根据权利要求1至30中任一项所述的组合物,其中其类似物或衍生物包括与所述人蛋白质至少85%同一性。

32.根据权利要求1至31中任一项所述的组合物,其中所述片段包括来自所述蛋白质的至少20个连续氨基酸。

33.根据权利要求1至32中任一项所述的组合物,其中所述片段包括所述自身抗体的至少一个B细胞受体 (BCR) 特异性表位靶标。

34.根据权利要求1至33中任一项所述的组合物,其中所述片段包括减少所述片段聚集的至少一个突变。

35.根据权利要求34所述的组合物,其中所述片段选自:

a.ACHRA的片段并且在包括SEQ ID NO:1的野生型AChRa或包括SEQ ID NO:131的溶解性增加的AChRa内包括选自下列的突变:N141的缺失;F100G;W149R;V155A;Y93F;Y93H;Y93R;及其组合;

b.ACHRG的片段并且在包括SEQ ID NO:6的野生型AChRa或包括SEQ ID NO:133的溶解性增加的AChRa内包括选自下列的突变:M84S;Y105E;Y117E;Y117R;及其组合;和

c.ACHRD的片段并且在包括SEQ ID NO:8的野生型AChRa或包括SEQ ID NO:134的溶解性增加的AChRa内包括选自下列的突变:C108A;C108I;Y119R;N141的缺失;L151E;及其组合。

36.根据权利要求4至35中任一项所述的组合物,其中所述第一多肽链和所述第二多肽链选自:SEQ ID NO:92和SEQ ID NO:93;SEQ ID NO:95和SEQ ID NO:96;SEQ ID NO:97和SEQ ID NO:98;SEQ ID NO:99和SEQ ID NO:100;SEQ ID NO:92和SEQ ID NO:102;SEQ ID NO:103和SEQ ID NO:100;SEQ ID NO:105和SEQ ID NO:130;SEQ ID NO:105和SEQ ID NO:106;以及SEQ ID NO:105和SEQ ID NO:107。

37.根据权利要求22至35中任一项所述的组合物,其中所述单个多肽链选自:SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:104和SEQ ID NO:108-129。

38.多肽,其包括第一人乙酰胆碱受体亚基的片段,所述片段包括减少所述片段聚集的

至少一个突变,其中所述片段选自:

a. ACHRA的片段并且在包括SEQ ID NO:1的野生型AChRa或包括SEQ ID NO:131的溶解性增加的AChRa内包括选自下列的突变:N141的缺失;F100G;W149R;V155A;Y93F;Y93H;Y93R;及其组合;

b. ACHRG的片段并且在包括SEQ ID NO:6的野生型AChRa或包括SEQ ID NO:133的溶解性增加的AChRa内包括选自下列的突变:M84S;Y105E;Y117E;Y117R;及其组合;和

c. ACHRD的片段并且在包括SEQ ID NO:8的野生型AChRa或包括SEQ ID NO:134的溶解性增加的AChRa内包括选自下列的突变:C108A;C108I;Y119R;N141的缺失;L151E;及其组合。

39. 根据权利要求38所述的多肽,其进一步包括用CDVSGVDTESGATNC (SEQ ID NO:44) 置换乙酰胆碱受体亚基内的cys环,并且其中所述亚基是ACHRA并且所述cys环由CEIIVTHFPFDEQNC (SEQ ID NO:39) 组成,所述亚基是ACHRG并且所述cys环由CSISVTYFPFDWQNC (SEQ ID NO:41) 组成,或所述亚基是ACHRD并且所述cys环由CPISVTYFPFDWQNC (SEQ ID NO:42) 组成。

40. 根据权利要求38或39所述的多肽,其进一步包括第二乙酰胆碱受体亚基的第二片段,所述第二片段通过氨基酸连接体与所述第一片段连接;并且任选地进一步包括来自第三、第四或第五乙酰胆碱受体亚基的片段。

41. 根据权利要求38至40中任一项所述的多肽,其进一步包括人抗体重链的Fc区,任选地其中所述Fc区通过氨基酸连接体与所述片段分隔。

42. 根据权利要求38至41中任一项所述的多肽,其包括选自SEQ ID NO:72-91的序列。

43. 药物组合物,其包括根据权利要求1至37中任一项所述的组合物或根据权利要求38至42中任一项所述的多肽以及药学上可接受的载剂、赋形剂或佐剂;任选地其中所述药物组合物被配制用于向对象全身施用。

44. 治疗有需要的对象的重症肌无力的方法,所述方法包括向所述对象施用根据权利要求1至37中任一项所述的组合物、根据权利要求38至42中任一项所述的多肽或根据权利要求43所述的药物组合物,从而治疗重症肌无力。

45. 根据权利要求44所述的方法,其进一步包括在所述施用之前降低所述对象中针对至少所述第一人乙酰胆碱受体亚基的循环抗体的水平。

46. 根据权利要求44或45所述的方法,其进一步包括降低所述对象中针对蛋白质复合物内人乙酰胆碱受体亚基的循环抗体的水平,所述蛋白质复合物包括所述第一人乙酰胆碱受体亚基或所述第二人乙酰胆碱受体亚基。

47. 根据权利要求44至46中任一项所述的方法,其中所述治疗包括降低针对所述人乙酰胆碱受体亚基的循环自身抗体的浓度。

48. 根据权利要求44至47中任一项所述的方法,其中所述治疗包括杀伤产生所述自身抗体的B细胞。

49. 根据权利要求48所述的方法,其中所述B细胞是产生针对所述组合物或多肽的片段的自身抗体的自身反应性B细胞。

50. 核酸系统,其包括核酸分子,其中第一核酸分子编码根据权利要求4至23和28至37中任一项所述的组合物的所述第一多肽链,并且第二核酸分子编码根据权利要求4至21和

26至37中任一项所述的组合物的所述第二多肽链,或所述核酸分子编码根据权利要求22至37中任一项所述的组合物的单个多肽链或根据权利要求38至42中任一项所述的多肽。

51.根据权利要求50所述的核酸系统,其进一步包括:第三核酸分子,其编码根据权利要求18至23和28至37中任一项所述的组合物的所述第三多肽链;第四核酸分子,其编码根据权利要求20至23和28至37中任一项所述的组合物的所述第四多肽链;或两者。

52.产生根据权利要求1至37中任一项所述的组合物或根据权利要求38至42中任一项所述的多肽的方法,所述方法包括在细胞中表达根据权利要求50或51所述的核酸系统,其中所述核酸系统被配置成在所述细胞中产生所述编码的多肽,从而产生根据权利要求1至37中任一项所述的组合物或根据权利要求38至42中任一项所述的多肽。

53.产生蛋白质的方法,所述方法包括:

获得第一人乙酰胆碱受体亚基的胞外结构域的第一片段或其类似物或衍生物,和第二人乙酰胆碱受体亚基的胞外结构域的第二片段或其类似物或衍生物,其中所述第一和第二人乙酰胆碱受体亚基是不同的蛋白质,并且将所述第一片段与所述第二片段连接以产生单个多肽链;或

培养宿主细胞,所述宿主细胞包括一个或多个载体,所述载体包括编码单个多肽链的核酸序列,其中所述单个多肽链通过下列产生:

i.获得第一人乙酰胆碱受体亚基的胞外结构域的第一片段或其类似物或衍生物,和第二人乙酰胆碱受体亚基的胞外结构域的第二片段或其类似物或衍生物,其中所述第一和第二人乙酰胆碱受体亚基是不同的蛋白质;和

ii.将所述第一片段与所述第二片段连接以产生单个多肽链;
从而产生蛋白质。

54.产生蛋白质复合物的方法,所述方法包括:

获得第一人乙酰胆碱受体亚基的胞外结构域的第一片段或其类似物或衍生物,和第二人乙酰胆碱受体亚基的胞外结构域的第二片段或其类似物或衍生物,其中所述第一和第二人乙酰胆碱受体亚基是不同的蛋白质;将所述第一片段与第一二聚化结构域连接以产生第一多肽链以及将所述第二片段与第二二聚化结构域连接以产生第二多肽链,其中所述第一和第二二聚化结构域能够彼此二聚化;和在足以引发所述二聚化的条件下使所述第一多肽和所述第二多肽接触;或

培养宿主细胞,所述宿主细胞包括一个或多个载体,所述载体包括编码至少两个多肽链的核酸序列,其中所述两个多肽链通过下列产生:

i.获得第一人乙酰胆碱受体亚基的胞外结构域的第一片段或其类似物或衍生物,和第二人乙酰胆碱受体亚基的胞外结构域的第二片段或其类似物或衍生物,其中所述第一和第二人乙酰胆碱受体亚基是不同的蛋白质;和

ii.将所述第一片段与第一二聚化结构域连接以产生第一多肽链以及将所述第二片段与第二二聚化结构域连接以产生第二多肽链,其中所述第一和第二二聚化结构域能够彼此二聚化;

从而产生蛋白质复合物。

55.根据权利要求53所述的方法,其中所述蛋白质是根据权利要求22至37中任一项所述的组合物的单个多肽链。

56. 根据权利要求54所述的方法, 其中所述蛋白质复合物是根据权利要求4至21和26至37中任一项所述的组合物的蛋白质复合物。

57. 根据权利要求54或56所述的方法, 其进一步包括

a. 将第三二聚化结构域与所述第一多肽链内的所述第一二聚化结构域或第一片段连接; 获得第三人乙酰胆碱受体亚基的胞外结构域的第三片段或其类似物或衍生物, 并将所述第三片段与第四二聚化结构域连接以产生第三多肽链, 其中所述第三二聚化结构域和所述第四二聚化结构域能够彼此二聚化; 和在足以引发所述二聚化的条件下使所述第一、第二和第三多肽接触; 或

b. 在所述宿主细胞中表达编码第三多肽链的核酸序列, 所述第三多肽链通过下列产生:

i. 获得第三人乙酰胆碱受体亚基的胞外结构域的第三片段或其类似物或衍生物; 和

ii. 将所述第三片段与第四二聚化结构域连接以产生第三多肽链;

其中所述第一多肽链进一步包括第三二聚化结构域, 并且其中所述第三二聚化结构域和所述第四二聚化结构域能够彼此二聚化。

58. 根据权利要求57所述的方法, 进一步包括

a. 将第六二聚化结构域与所述第二多肽链内的所述第二二聚化结构域或第二片段连接; 获得第四人乙酰胆碱受体亚基的胞外结构域的第四片段或其类似物或衍生物, 并将所述第四片段与第五二聚化结构域连接以产生第四多肽链, 其中所述第五二聚化结构域和所述第六二聚化结构域能够彼此二聚化; 和在足以引发所述二聚化的条件下使所述第一、第二、第三和第四多肽接触; 或

b. 在所述宿主细胞中表达编码第四多肽链的核酸序列, 所述第四多肽链通过下列产生:

i. 获得第四人乙酰胆碱受体亚基的胞外结构域的第四片段或其类似物或衍生物; 和

ii. 将所述第四片段与第五二聚化结构域连接以产生第四多肽链;

其中所述第二多肽链进一步包括第六二聚化结构域, 并且其中所述第五二聚化结构域和所述第六二聚化结构域能够彼此二聚化。

59. 产生多肽的方法, 所述方法包括:

a. 获得第一人乙酰胆碱受体亚基的胞外结构域的第一片段或其类似物或衍生物; 和

b. 在所述第一片段中生成减少所述第一片段聚集的至少一个突变, 以产生突变的第一片段;

从而产生多肽。

60. 根据权利要求59所述的方法, 其进一步包括确认所述突变的第一片段的聚集减少。

61. 根据权利要求59或60所述的方法, 其进一步包括确认所述至少一个突变不大幅降低所述第一片段与针对所述第一片段的自身抗体的结合。

62. 根据权利要求59至61中任一项所述的方法, 其进一步包括将所述突变的第一片段与人抗体重链的Fc区连接, 与第二人乙酰胆碱受体亚基的胞外结构域的第二片段或其类似物或衍生物连接, 或两者; 任选地其中所述第二片段包括减少所述第二片段聚集的至少一个突变。

63. 根据权利要求53至62中任一项所述的方法, 其中其类似物或衍生物包括与所述人

蛋白质至少85%同一性。

64. 蛋白质复合物或蛋白质,其通过根据权利要求53至63中任一项所述的方法产生。

65. 确定有需要的待通过根据权利要求44至49中任一项所述的方法治疗的对象的适合性的方法,所述方法包括从所述对象接收样品,使所述样品与根据权利要求1至37中任一项所述的组合物或根据权利要求38至42中任一项所述的多肽接触,并确定所述样品内针对AChR的自身抗体与所述组合物或所述多肽的结合,其中针对AChR的自身抗体与所述组合物或多肽的结合指示所述对象适合通过根据权利要求44至49中任一项所述的方法治疗,从而确定所述待治疗对象的适合性。

66. 根据权利要求65所述的方法,其中所述样品中至少20%的针对AChR的自身抗体与所述组合物或多肽的结合指示所述对象适合通过根据权利要求44至49中任一项所述的方法治疗。

Ig样融合蛋白及其用途

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求2021年12月13日提交的美国临时专利申请号63/288,782的优先权权益,其内容通过引用以其整体并入本文。

电子序列表参考

[0002] 电子序列表(CNPY-P-002-PCT.xml;大小:170,370字节;以及创建日期:2022年12月12日)的内容通过引用以其整体并入本文。

技术领域

[0003] 本发明属于融合蛋白生成和重症肌无力治疗领域。

背景技术

[0004] 重症肌无力(MG)是最常见的神经肌肉传递障碍。发病年龄呈双峰型,第一峰出现在第二和第三个十年(女性为主),而第二峰出现在第六至第八个十年(男性为主)。MG是一种自身免疫性疾病,其特征是由于神经肌肉连接体功能的破坏而导致的骨骼肌无力。约85%的MG患者血清中有乙酰胆碱受体(AChR)特异性抗体,其作为AChR拮抗剂,引起受体聚集和内化,并募集补体,随后引起组织损伤。每个患者都有混合的不同抗AChR抗体。一些AChR抗体阳性MG患者也有胸腺异常,大约三分之二伴有增生,10%伴有胸腺瘤。MG的主要临床特征是波动性骨骼肌无力,常伴有真正的肌肉疲劳。

[0005] 重症肌无力有两种临床形式:眼肌型和全身型。在眼肌型肌无力中,无力仅限于眼睑和眼外肌。在全身型疾病中,无力也可能影响眼肌,但它也涉及眼球肌、肢体肌和呼吸肌的可变组合。感染、手术、怀孕、分娩、用药、免疫抑制用药逐渐减量(tapering)或作为疾病自然进展的一部分,都可能引发病状的瞬时恶化。呼吸肌受累(involverment)是重症肌无力最严重的症状,可能导致呼吸功能不全和即将发生的呼吸衰竭,被称为“肌无力危象”。还有一长串的药物必须避免用于MG患者,包括氟喹诺酮(fluoroquinolone)、氨基糖苷、硫酸镁、羟氯喹、青霉胺和肉毒杆菌毒素。如果可能,还应避免使用 β 受体阻滞剂、普鲁卡因酰胺、奎尼丁和奎宁。MG的疗法包括乙酰胆碱酯酶抑制剂(吡啶斯的明(pyridostigmine))、慢性免疫抑制疗法、快速和瞬时免疫调节疗法(例如,血浆交换和静脉免疫球蛋白-IVIG)以及胸腺切除术。治疗目标是使患者的症状最小,同时药物相关副作用最小;然而,并无有效的治愈。MG患者的初始对症疗法基于乙酰胆碱酯酶抑制剂(例如,吡啶斯的明)。吡啶斯的明的胆碱能不良效果在很多患者中都可能是剂量限制的,并且包括腹部绞痛和腹泻。大多数全身型MG患者都需要糖皮质激素和/或其它免疫抑制药物另行治疗,尽管这是二线疗法。治疗性血浆交换(血浆置换)和IVIG有迅速的效果,但持续时间短。非常需要治疗MG的新方法,尤其是具有长效作用的方法。具体地,需要靶向引起MG的自身抗体的疗法,除此之外,还非常需要能够直接靶向作为这些自身抗体来源的自身反应性B细胞/浆细胞并且可能会治愈这些状况的药物。

发明内容

[0006] 本发明提供组合物,其包括第一人乙酰胆碱受体亚基的片段和第二人乙酰胆碱受体亚基的片段。

[0007] 根据第一方面,提供组合物,其包括:第一人乙酰胆碱受体亚基的片段或其类似物或衍生物,和第二人乙酰胆碱受体亚基的片段或其类似物或衍生物,并且其中所述第一和第二亚基是不同的亚基。

[0008] 根据另一方面,提供组合物,其包括:第一人乙酰胆碱受体亚基的片段或其类似物或衍生物,和第二人乙酰胆碱受体亚基的片段或其类似物或衍生物,并且其中所述第一和第二亚基是不同的亚基。

[0009] 根据另一方面,提供多肽,其包括第一人乙酰胆碱受体亚基的片段,所述片段包括减少所述片段聚集的至少一个突变,其中所述片段选自:

- a. ACHRA的片段并且在包括SEQ ID NO:1的野生型AChRa或包括SEQ ID NO:131的溶解性增加的AChRa内包括选自下列的突变:N141的缺失; F100G; W149R; V155A; Y93F; Y93H; Y93R; 及其组合;
- b. ACHRG的片段并且在包括SEQ ID NO:6的野生型AChRa或包括SEQ ID NO:133的溶解性增加的AChRa内包括选自下列的突变:M84S; Y105E; Y117E; Y117R; 及其组合; 和
- c. ACHRD的片段并且在包括SEQ ID NO:8的野生型AChRa或包括SEQ ID NO:134的溶解性增加的AChRa内包括选自下列的突变:C108A; C108I; Y119R; N141的缺失; L151E; 及其组合。

[0010] 根据一些实施方式,所述第一人蛋白质、所述第二人蛋白质或两者是细胞表面受体,并且所述片段是所述受体的胞外结构域的片段。

[0011] 根据一些实施方式,所述片段是所述乙酰胆碱受体亚基的胞外结构域的片段。

[0012] 根据一些实施方式,所述第一和第二乙酰胆碱受体亚基选自乙酰胆碱受体亚基 α (ACHRA)、乙酰胆碱受体亚基 β (ACHRB)、乙酰胆碱受体亚基 γ (ACHRG)、乙酰胆碱受体亚基 δ (ACHRD)和乙酰胆碱受体亚基 ϵ (ACHRE)。

[0013] 根据一些实施方式,第一人蛋白质的所述片段和第二人蛋白质的所述片段包括不同的序列。

[0014] 根据一些实施方式,本发明的组合物包括蛋白质复合物,所述蛋白质复合物包括:

a. 第一多肽链,其包括第一人乙酰胆碱受体亚基的所述片段或其类似物或衍生物以及第一二聚化结构域;和

b. 第二多肽链,其包括第二人乙酰胆碱受体亚基的所述片段或其类似物或衍生物以及第二二聚化结构域;

其中所述第一和第二二聚化结构域被配置成彼此二聚化。

[0015] 根据一些实施方式,本发明的组合物包括蛋白质复合物,所述蛋白质复合物包括:

a. 第一多肽链,其包括第一人乙酰胆碱受体亚基的所述片段或其类似物或衍生物以及第一二聚化结构域;和

b. 第二多肽链,其包括第二人乙酰胆碱受体亚基的所述片段或其类似物或衍生物以及第二二聚化结构域;

其中所述第一和第二二聚化结构域被配置成彼此二聚化。

[0016] 根据一些实施方式,所述二聚化包括在所述第一二聚化结构域和所述第二二聚化结构域之间形成共价键。

[0017] 根据一些实施方式,所述蛋白质复合物包括免疫球蛋白支架(scaffold)。

[0018] 根据一些实施方式,

a.所述一二聚化结构域包括免疫球蛋白的重链的第一铰链结构域,并且所述第二二聚化结构域包括重链的第二铰链结构域,并且所述第一和所述第二二聚化结构域通过二硫键二聚化;或

b.所述第一和第二二聚化结构域各自包括结构域,所述结构域选自免疫球蛋白的重链的CH1结构域和免疫球蛋白的轻链的CL结构域,并通过二硫键二聚化,并且其中所述第一和第二二聚化结构域不同时包括所述CH1结构域和所述CL结构域。

[0019] 根据一些实施方式,所述第一、第二或这两个多肽链的所述片段和所述二聚化结构域通过连接体分隔。

[0020] 根据一些实施方式,所述第一多肽链、所述第二多肽链或两者进一步包括人抗体重链的Fc区。

[0021] 根据一些实施方式,所述Fc区能够引发针对结合所述蛋白质复合物的细胞的细胞毒性。

[0022] 根据一些实施方式,所述第一多肽链包括免疫球蛋白的重链的第一CH3结构域、免疫球蛋白的重链的第一CH2结构域或两者,并且所述第二多肽链包括免疫球蛋白的重链的第二CH3结构域、免疫球蛋白的重链的第二CH2结构域或两者。

[0023] 根据一些实施方式,所述第一CH3结构域包括至少第一突变,并且所述第二CH3结构域包括至少第二突变,并且其中所述突变允许所述第一和第二多肽链的异二聚化并抑制所述第一多肽链的同二聚化和所述第二多肽链的同二聚化。

[0024] 根据一些实施方式,所述第一CH2结构域包括至少第一突变,并且所述第二CH2结构域包括至少第二突变,并且其中所述突变允许所述第一和第二多肽链的异二聚化并抑制所述第一多肽链的同二聚化和所述第二多肽链的同二聚化。

[0025] 根据一些实施方式,所述第一突变选自表1中提供的突变,并且所述第二突变提供于表1中并且是所述第一突变的相应突变。

[0026] 根据一些实施方式,所述Fc来自IgG2或IgG4或包括降低效应子功能的至少一个突变。

[0027] 根据一些实施方式,所述第一、第二或这两个多肽链的所述Fc区通过连接体与所述片段或所述二聚化结构域分隔。

[0028] 根据一些实施方式,所述第一、第二或这两个多肽链的所述二聚化结构域在所述片段的C-末端和在所述Fc区的N-末端。根据一些实施方式,所述第一、第二或这两个多肽链的所述二聚化结构域在所述片段的C-末端。根据一些实施方式,所述第一、第二或这两个多肽链的所述二聚化结构域在所述片段的N-末端。

[0029] 根据一些实施方式,本发明的组合物不含抗体可变结构域。

[0030] 根据一些实施方式,本发明的组合物进一步包括第三多肽,所述第三多肽包括第三人乙酰胆碱受体亚基的片段或其类似物或衍生物以及第三二聚化结构域,其中所述第一

多肽进一步包括第四二聚化结构域,并且所述第三和第四二聚化结构域能够彼此二聚化。

[0031] 根据一些实施方式,本发明的组合物进一步包括第三多肽,所述第三多肽包括第三人乙酰胆碱受体亚基的片段或其类似物或衍生物以及第三二聚化结构域,其中所述第一多肽进一步包括第四二聚化结构域,并且所述第三和第四二聚化结构域能够彼此二聚化。

[0032] 根据一些实施方式,

a.所述第三二聚化结构域包括免疫球蛋白的重链的第一铰链结构域,并且所述第四二聚化结构域包括重链的第二铰链结构域,并且所述第一和所述第二二聚化结构域通过二硫键二聚化;或

b.所述第三和第四二聚化结构域各自包括结构域,所述结构域选自免疫球蛋白的重链的CH1结构域和免疫球蛋白的轻链的CL结构域,并通过二硫键二聚化,并且其中所述第一和第三多肽不同时包括所述CH1结构域和所述CL结构域。

[0033] 根据一些实施方式,本发明的组合物进一步包括第四多肽,所述第四多肽包括第四人乙酰胆碱受体亚基的片段或其类似物或衍生物以及第五二聚化结构域,其中所述第二多肽进一步包括第六二聚化结构域,并且所述第五和第六二聚化结构域能够彼此二聚化。

[0034] 根据一些实施方式,本发明的组合物进一步包括第四多肽,所述第四多肽包括第四人乙酰胆碱受体亚基的片段或其类似物或衍生物以及第五二聚化结构域,其中所述第二多肽进一步包括第六二聚化结构域,并且所述第五和第六二聚化结构域能够彼此二聚化。

[0035] 根据一些实施方式,

a.所述第五二聚化结构域包括免疫球蛋白的重链的第一铰链结构域,并且所述第六二聚化结构域包括重链的第二铰链结构域,并且所述第一和所述第二二聚化结构域通过二硫键二聚化;或

b.所述第五和第六二聚化结构域各自包括结构域,所述结构域选自免疫球蛋白的重链的CH1结构域和免疫球蛋白的轻链的CL结构域,并通过二硫键二聚化,并且其中所述第一和第三多肽不同时包括所述CH1结构域和所述CL结构域。

[0036] 根据一些实施方式,所述第一多肽和所述第二多肽不同时包括CH1结构域或不同时包括CL结构域。

[0037] 根据一些实施方式,所述第三和第四二聚化结构域或所述第五和第六二聚化结构域包括突变,所述突变允许所述第三和第四二聚化结构域以及所述第五和第六二聚化结构域的二聚化,并抑制所述第三二聚化结构域与所述第五或第六二聚化结构域以及所述第六二聚化结构域与所述第三或第四二聚化结构域二聚化。

[0038] 根据一些实施方式,本发明的组合物包括单个多肽链,所述多肽链包括第一人乙酰胆碱受体亚基的所述片段或其类似物或衍生物和第三人乙酰胆碱受体亚基的所述片段或其类似物或衍生物。

[0039] 根据一些实施方式,本发明的组合物包括单个多肽链,所述多肽链包括第一人乙酰胆碱受体亚基的所述片段或其类似物或衍生物和第三人乙酰胆碱受体亚基的所述片段或其类似物或衍生物。

[0040] 根据一些实施方式,所述单个多肽链进一步包括第三乙酰胆碱受体亚基的片段或其类似物或衍生物和任选地第四乙酰胆碱受体亚基的片段或其类似物或衍生物。

[0041] 根据一些实施方式,所述单个多肽链进一步包括第三乙酰胆碱受体亚基的片段或

其类似物或衍生物和任选地第四乙酰胆碱受体亚基的片段或其类似物或衍生物。

[0042] 根据一些实施方式,所述片段通过氨基酸连接体分隔。

[0043] 根据一些实施方式,所述连接体是柔性连接体。根据一些实施方式,所述柔性连接体是GS连接体。根据一些实施方式,所述连接体是刚性连接体。

[0044] 根据一些实施方式,所述多肽链进一步包括人抗体重链的Fc区。

[0045] 根据一些实施方式,第二多肽链包括第三人乙酰胆碱受体亚基或其类似物或衍生物和人抗体重链的Fc区。

[0046] 根据一些实施方式,所述第二多肽链进一步包括第四人乙酰胆碱受体亚基。

[0047] 根据一些实施方式,本发明的组合物进一步包括第二多肽链,所述第二多肽链包括第三人乙酰胆碱受体亚基或其类似物或衍生物,任选地其中所述第二多肽链进一步包括第四人乙酰胆碱受体亚基。

[0048] 根据一些实施方式,所述自身抗体针对跨越所述片段中的至少两个的表位。

[0049] 根据一些实施方式,所述第一、第二和任选地所述第三和第四人蛋白质的所述片段选自人受体的胞外结构域的片段,所述人受体选自:乙酰胆碱受体 (AChR) α 、AChR β 、AChR γ 、AChR δ 和AChR ϵ 。

[0050] 根据一些实施方式,所述复合物包括选自SEQ ID NO:64至69的至少一个氨基酸序列或包括与其至少80%同一性的其衍生物。在一些实施方式中,至少80%是至少85%。

[0051] 根据一些实施方式,所述第一、第二、第三和第四人蛋白质的所述片段包括不同的序列。

[0052] 根据一些实施方式,所述第一、第二和任选地所述第三和第四蛋白质是人类中单个蛋白质复合物的一部分。

[0053] 根据一些实施方式,所述片段中的至少一个包括配体结合结构域中的突变,并且其中所述突变减少与所述配体的结合。

[0054] 根据一些实施方式,所述片段中的至少一个包括增加所述片段的稳定性或溶解性的突变。

[0055] 根据一些实施方式,所述突变包括用CDVSGVDTESGATNC (SEQ ID NO:44) 置换乙酰胆碱受体亚基内的cys环。

[0056] 根据一些实施方式,所述乙酰胆碱受体亚基选自:包括SEQ ID NO:131中提供的氨基酸序列的 α 亚基、包括SEQ ID NO:132中提供的氨基酸序列的 β 亚基、包括SEQ ID NO:133中提供的氨基酸序列的 γ 亚基、包括SEQ ID NO:134中提供的氨基酸序列的 δ 亚基和包括SEQ ID NO:135中提供的氨基酸序列的 ϵ 亚基。

[0057] 根据一些实施方式,其类似物或衍生物包括与所述人蛋白质至少85%同一性。在一些实施方式中,至少80%是至少85%。

[0058] 根据一些实施方式,所述片段包括来自所述蛋白质的至少20个连续氨基酸。

[0059] 根据一些实施方式,所述片段包括所述自身抗体的至少一个B细胞受体 (BCR) 特异性表位靶标。

[0060] 根据一些实施方式,所述片段包括减少所述片段聚集的至少一个突变。

[0061] 根据一些实施方式,所述片段选自:

a. ACHRA的片段并且在包括SEQ ID NO:1的野生型AChRa或包括SEQ ID

NO:131的溶解性增加的AChRa内包括选自下列的突变:N141的缺失;
F100G;W149R;V155A;Y93F;Y93H;Y93R;及其组合;
b.ACHRG的片段并且在包括SEQ ID NO:6的野生型AChRa或包括SEQ ID
NO:133的溶解性增加的AChRa内包括选自下列的突变:M84S;Y105E;
Y117E;Y117R;及其组合;和
c.ACHRD的片段并且在包括SEQ ID NO:8的野生型AChRa或包括SEQ
ID NO:134的溶解性增加的AChRa内包括选自下列的突变:C108A;
C108I;Y119R;N141的缺失;L151E;及其组合。

[0062] 根据一些实施方式,所述第一多肽链和所述第二多肽链选自:SEQ ID NO:92和SEQ ID NO:93;SEQ ID NO:95和SEQ ID NO:96;SEQ ID NO:97和SEQ ID NO:98、SEQ ID NO:99和SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:92和SEQ ID NO:102;SEQ ID NO:103和SEQ ID NO:100;SEQ ID NO:105和SEQ ID NO:130;SEQ ID NO:105和SEQ ID NO:106;以及SEQ ID NO:105和SEQ ID NO:107。

[0063] 根据一些实施方式,所述单个多肽链选自:SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:104和SEQ ID NO:108-129。

[0064] 根据一些实施方式,所述多肽进一步包括用CDVSGVDTESGATNC (SEQ ID NO:44) 置换乙酰胆碱受体亚基内的cys环,并且其中所述亚基是ACHRA并且所述cys环由CEIIVTHFPFDEQNC (SEQ ID NO:39) 组成,所述亚基是ACHRG并且所述cys环由CSISVTYFPFDWQNC (SEQ ID NO:41) 组成,或所述亚基是ACHRD,并且所述cys环由CPISVTYFPFDWQNC (SEQ ID NO:42) 组成。

[0065] 根据一些实施方式,所述多肽进一步包括第二乙酰胆碱受体亚基的第二片段,所述第二片段通过氨基酸连接体与所述第一片段连接。根据一些实施方式,所述多肽进一步包括来自第三、第四或第五乙酰胆碱受体亚基的片段。

[0066] 根据一些实施方式,所述多肽进一步包括人抗体重链的Fc区。根据一些实施方式,所述Fc区通过氨基酸连接体与所述片段分隔。

[0067] 根据一些实施方式,所述多肽包括选自SEQ ID NO:72-91的序列。

[0068] 根据另一方面,提供药物组合物,其包括本发明的组合物和药学上可接受的载剂、赋形剂或佐剂。

[0069] 根据另一方面,提供药物组合物,其包括本发明的多肽和药学上可接受的载剂、赋形剂或佐剂。

[0070] 根据另一方面,提供治疗有需要的对象的重症肌无力的方法,所述方法包括向所述对象施用本发明的组合物或本发明的药物组合物,从而治疗重症肌无力。

[0071] 根据一些实施方式,本发明的方法进一步包括在所述施用之前降低所述对象中针对至少所述第一人乙酰胆碱受体亚基的循环抗体的水平。

[0072] 根据一些实施方式,本发明的方法进一步包括降低所述对象中针对蛋白质复合物内人乙酰胆碱受体亚基的循环抗体的水平,所述蛋白质复合物包括所述第一人乙酰胆碱受体亚基或所述第二人乙酰胆碱受体亚基。

[0073] 根据一些实施方式,所述治疗包括降低针对所述人乙酰胆碱受体亚基的循环自身抗体的浓度。

[0074] 根据一些实施方式,所述治疗包括杀伤产生所述自身抗体的B细胞。

[0075] 根据一些实施方式,所述组合物包括所述Fc区,并且所述治疗包括杀伤产生所述自身抗体的B细胞。

[0076] 根据一些实施方式,所述B细胞是产生针对所述组合物或多肽的片段的自身抗体的自身反应性B细胞。

[0077] 根据另一方面,提供核酸系统,其包括核酸分子,其中第一核酸分子编码本发明的组合物的所述第一多肽链,并且第二核酸分子编码本发明的组合物的所述第二多肽链。

[0078] 根据另一方面,提供核酸系统,其包括编码本发明的多肽的核酸分子。

[0079] 根据一些实施方式,本发明的核酸系统进一步包括编码本发明的组合物的所述第三多肽链的第三核酸分子,编码本发明的组合物的所述第四多肽链的第四核酸分子,或两者。

[0080] 根据另一方面,提供核酸分子,其编码本发明的组合物的单个多肽链,所述多肽链包括第一人乙酰胆碱受体亚基的片段或其类似物或衍生物和第二人乙酰胆碱受体亚基的片段或其类似物或衍生物。

[0081] 根据另一方面,提供产生本发明的组合物的方法,所述方法包括在细胞中表达本发明的核酸系统或本发明的核酸分子,其中所述核酸系统被配置成在所述细胞中产生编码的多肽,从而产生本发明的组合物。

[0082] 根据另一方面,提供产生本发明的多肽的方法,所述方法包括在细胞中表达本发明的核酸系统,其中所述核酸系统被配置成在所述细胞中产生编码的多肽,从而产生本发明的组合物。

[0083] 根据另一方面,提供产生蛋白质的方法,所述方法包括:

获得第一人乙酰胆碱受体亚基的胞外结构域的第一片段或其类似物或衍生物,和第二人乙酰胆碱受体亚基的胞外结构域的第二片段或其类似物或衍生物,其中所述第一和第二人乙酰胆碱受体亚基是不同的蛋白质,并且将所述第一片段与所述第二片段连接以产生单个多肽链;或

培养宿主细胞,所述宿主细胞包括一个或多个载体,所述载体包括编码单个多肽链的核酸序列,其中所述单个多肽链通过下列产生:

i. 获得第一人乙酰胆碱受体亚基的胞外结构域的第一片段或其类似物或衍生物,和第二人乙酰胆碱受体亚基的胞外结构域的第二片段或其类似物或衍生物,其中所述第一和第二人乙酰胆碱受体亚基是不同的蛋白质;和

ii. 将所述第一片段与所述第二片段连接以产生单个多肽链;
从而产生蛋白质。

[0084] 根据另一方面,提供产生蛋白质复合物的方法,所述方法包括:

获得第一人乙酰胆碱受体亚基的胞外结构域的第一片段或其类似物或衍生物,和第二人乙酰胆碱受体亚基的胞外结构域的第二片段或其类似物或衍生物,其中所述第一和第二人乙酰胆碱受体亚基是不同的蛋白质;将所述第一片段与第一二聚化结构域连接以产生第一多肽链以及将所述第二片段与第二二聚化结构域连接以产生第二多肽链,其中所述第一和第二二聚化结构域能够彼此二聚化;和在足以引发所述二聚化的条件下使所述第一多肽和所述第二多肽接触;或

培养宿主细胞,所述宿主细胞包括一个或多个载体,所述载体包括编码至少两个多肽链的核酸序列,其中所述两个多肽链通过下列产生:

i. 获得第一人乙酰胆碱受体亚基的胞外结构域的第一片段或其类似物或衍生物,和第三人乙酰胆碱受体亚基的胞外结构域的第二片段或其类似物或衍生物,其中所述第一和第三人乙酰胆碱受体亚基是不同的亚基;和

ii. 将所述第一片段与第一二聚化结构域连接以产生第一多肽链以及将所述第二片段与第二二聚化结构域连接以产生第二多肽链,其中所述第一和第二二聚化结构域能够彼此二聚化;

从而产生蛋白质复合物。

[0085] 根据一些实施方式,所述蛋白质是本发明组合物的单个多肽链。

[0086] 根据一些实施方式,所述蛋白质复合物是本发明的组合物的蛋白质复合物。

[0087] 根据一些实施方式,所述方法进一步包括

a. 将第三二聚化结构域与所述第一多肽链内的所述第一二聚化结构域或第一片段连接;获得第三人乙酰胆碱受体亚基的胞外结构域的第三片段或其类似物或衍生物,并将所述第三片段与第四二聚化结构域连接以产生第三多肽链,其中所述第三二聚化结构域和所述第四二聚化结构域能够彼此二聚化;和在足以引发所述二聚化的条件下使所述第一、第二和第三多肽接触;或

b. 在所述宿主细胞中表达编码第三多肽链的核酸序列,所述第三多肽链通过下列产生:

i. 获得第三人乙酰胆碱受体亚基的胞外结构域的第三片段或其类似物或衍生物;和

ii. 将所述第三片段与第四二聚化结构域连接以产生第三多肽链;

其中所述第一多肽链进一步包括第三二聚化结构域,并且其中所述第三二聚化结构域和所述第四二聚化结构域能够彼此二聚化。

[0088] 根据一些实施方式,所述方法进一步包括

a. 将第六二聚化结构域与所述第二多肽链内的所述第二二聚化结构域或第二片段连接;获得第四人乙酰胆碱受体亚基的胞外结构域的第四片段或其类似物或衍生物,并将所述第四片段与第五二聚化结构域连接以产生第四多肽链,其中所述第五二聚化结构域和所述第六二聚化结构域能够彼此二聚化;和在足以引发所述二聚化的条件下使所述第一、第二、第三和第四多肽接触;或

b. 在所述宿主细胞中表达编码第四多肽链的核酸序列,所述第四多肽链通过下列产生:

i. 获得第四人乙酰胆碱受体亚基的胞外结构域的第四片段或其类似物或衍生物;和

ii. 将所述第四片段与第五二聚化结构域连接以产生第四多肽链;

其中所述第二多肽链进一步包括第六二聚化结构域,并且其中所述第五二聚化结构域和所述第六二聚化结构域能够彼此二聚化。

[0089] 根据另一方面,提供产生多肽的方法,所述方法包括:

a. 获得第一人乙酰胆碱受体亚基的胞外结构域的第一片段或其类似物或衍生物;

和

b. 在所述第一片段中生成减少所述第一片段聚集的至少一个突变,以产生突变的第一片段;

从而产生多肽。

[0090] 根据一些实施方式,所述方法进一步包括确认所述突变的第一片段的聚集减少。

[0091] 根据一些实施方式,所述方法进一步包括确认所述至少一个突变不大幅降低所述第一片段与针对所述第一片段的自身抗体的结合。

[0092] 根据一些实施方式,所述方法进一步包括将所述突变的第一片段与人抗体重链的Fc区连接,与第二人乙酰胆碱受体亚基的胞外结构域的第二片段或其类似物或衍生物连接,或两者。根据一些实施方式,所述第二片段包括减少所述第二片段聚集的至少一个突变。

[0093] 根据一些实施方式,其类似物或衍生物包括与所述人蛋白质至少80%同一性。

[0094] 根据另一方面,提供蛋白质复合物或蛋白质,其通过本发明的方法产生。

[0095] 根据另一方面,提供确定有需要的待通过本发明的方法治疗的对象的适合性的方法,所述方法包括从所述对象接收样品,使所述样品与本发明的组合物接触,以及确定所述样品内针对AChR的自身抗体与所述组合物的结合,其中针对AChR的自身抗体与所述组合物的结合指示所述对象适合通过本发明的方法治疗,从而确定待治疗的所述对象的适合性。

[0096] 根据另一方面,提供确定有需要的待通过本发明的方法治疗的对象的适合性的方法,所述方法包括从所述对象接收样品,使所述样品与本发明的多肽接触,以及确定所述样品内针对AChR的自身抗体与所述多肽的结合,其中针对AChR的自身抗体与所述多肽的结合指示所述对象适合通过本发明的方法治疗,从而确定待治疗的所述对象的适合性。

[0097] 根据一些实施方式,所述样品中至少20%的针对AChR的自身抗体与本发明的组合物或本发明的多肽的结合指示所述对象适合通过本发明的方法治疗。

[0098] 通过下文给出的详细描述,本发明的其它实施方式和全部适用范围将变得显而易见。然而,应理解的是,详细描述和具体实例虽然指示出本发明的优选实施方式,但仅作为说明给出,因为通过此详细描述,落入本发明的精神和范围内的各种变化和修改对于本领域技术人员来说都将变得显而易见。

附图说明

[0099] 图1A-1G: (1A) 在抗AChR血清学ELISA测定中,用 α 1ECD耗竭和不耗竭血清时所测量的耗竭%结果条形图。该图显示335名随机选择的MG患者的结果,其中y轴显示耗竭%(其被定义为 $[100\% - \{\text{抗AChR浓度(先前经过}\alpha\text{-ECD耗竭)} / \text{抗AChR浓度(未经处理)}\}]$),而x轴表示不同的患者样品。(1B-1D) 显示(1B) 示例性高度耗竭样品、(1C) 示例性中度耗竭样品和(1D) 示例性非耗竭样品中的剂量依赖性耗竭的线图。y轴表示样品中游离抗AChR抗体的浓度,单位为nM,而x轴显示用于耗竭样品的 α -ECD的浓度,单位为nM。(1E) 1A中使用的血清样品中总抗体浓度的条形图。灰线指示出疾病的临床截止(clinical cutoff)。(1F) 利用耗竭测定确定样品中存在的AChR片段特异性抗体百分比的方法图。(1G) 显示 α 结合%与抗AChR滴度之间的相关性的点图。

[0100] 图2A-2B: (2A) 显示在41名MG患者的每个血清样品中针对每个AChR亚基($\epsilon/\delta/\gamma$ /

β/α) 所检测到的相对抗AChR抗体的百分比的等高线图。(2B) 80名随机测试的MG患者血清样品中各种亚基或亚基组合的阻断百分比条形图。除平均耗竭%外,该图还显示每个亚基或其组合中将有至少50%或至少75%耗竭的患者的百分比。

[0101] 图3A-3J:本发明的四链治疗剂的五个可能实施方式的图:(3A) 显示用于治疗AChR阳性MG的分子的一般实施方式,(3B) 显示四个链各自包括不同蛋白质片段的实施方式,(3C) 显示四个蛋白质片段全都相同的实施方式,(3D) 显示两个重链相同且两个轻链相同的实施方式,(3E) 显示两个重链不同且两个轻链相同的实施方式,以及(3F) 显示两个重链包含相同的蛋白质片段且两个轻链包含不同的蛋白质片段的实施方式。(3G) 接种抗AChR抗体,然后用各种剂量的本发明分子处理的大鼠中临床评分的线图。(3H) 接种抗AChR抗体,然后用各种剂量的本发明分子处理的大鼠的Kaplan Meier存活曲线。(3I) 接种抗AChR抗体,然后用本发明分子处理的大鼠中临床评分的线图。(3J) 接种抗AChR抗体,然后用本发明分子或NS-Fcs处理的大鼠的Kaplan Meier存活曲线。

[0102] 图4A-4S:本发明的双链治疗剂的可能实施方式的图:(4A) 显示用于治疗AChR阳性MG的含两个重链的分子的一般实施方式,(4B) 显示CH1、CH2或CH3结构域中至少一个被排除的实施方式,(4C) 显示两个蛋白质片段相同的实施方式,(4D) 显示两个蛋白质片段不同的实施方式,(4E) 显示两个串联片段被包括在每个重链中的一般实施方式,(4F) 显示所有亚基都相同的串联片段构型,(4G) 显示每个重链都包含相同的两个不同片段的串联片段构型,(4H) 显示两个重链包含并不相同的不同片段的串联片段构型,(4I) 显示两个串联片段被包括在一个重链中而另一个重链仅包括一个片段的一般实施方式,(4J) 显示两个串联片段被包括在一个重链中而另一个重链不含片段的一般实施方式,(4K) 显示所有三个亚基都相同的串联构型,(4L) 显示三个亚基中两个相同的串联构型,(4M) 显示所有三个亚基都不同的串联构型,(4N) 显示每个重链中都包括三个串联片段的一般实施方式,(4O) 显示所有六个亚基都相同的串联构型,(4P) 显示链上所有三个亚基都不同但两个链相同的串联构型,(4Q) 显示链上所有三个亚基都不同且两个链不同的串联构型,(4R) 显示三个串联片段被包括在一个重链中且另一个重链包括2、1或0个片段的一般实施方式,以及(4S) 显示含一个重链和一个轻链的分子的一般实施方式。

[0103] 图5A-5D:本发明的三链治疗剂的四个可能实施方式的图:(5A) 显示含两个重链和一个轻链的分子的一般实施方式,(5B) 显示三个蛋白质片段相同的实施方式,(5C) 显示每个蛋白质片段都不同的实施方式,(5D) 显示其中两个蛋白质片段相同而第三个蛋白质片段不同的实施方式。

[0104] 图6:类似于图3所示本发明用于治疗AChR阳性MG的四链治疗剂的实施方式的图,但是其中四个链各自包括不同的蛋白质片段和促进四链分子形成的不同免疫球蛋白支架。

[0105] 图7A-7B:(7A-7B) 本发明的四链治疗剂的一般实施方式的图:(7A) 显示四个链的一般实施方式,其中两个链包含两个二聚化结构域,两个链包含单个二聚化结构域,以及(7B) 显示含分隔各种结构域和片段的任意的连接体的实施方式。

[0106] 图8A-8E:本发明的单链治疗剂的图:(8A) 显示包含来自两种不同AChR亚基的片段的单链分子的实施方式,(8B) 显示包含来自三种不同AChR亚基的片段的单链分子的实施方式,(8C) 显示包含来自四种不同AChR亚基的片段的单链分子的实施方式,(8D) 显示包含来自两种不同AChR亚基的片段以及重链恒定区的单链分子的实施方式,以及(8E) 显示含分隔

各种结构域的氨基酸(AA)连接体的8A-8D的单链分子。

[0107] 图9:来自与本发明的各种分子接触的MG血清的AChR特异性自身抗体的平均耗竭百分比条形图。无关胞外结构域构建体(CRD-239和CRD-241)用作阴性对照。每个分子都与至少17个不同的患者血清样品接触。

[0108] 图10A-10D:比较成对分子产生的耗竭率的点图:(10A)CRD-101和CRD-269,(10B)CRD-101和CRD-642,(10C)CRD-104和CRD-391,以及(10D)CRD-103和CRD-382。

[0109] 图11:指示ECD四聚体与杂交瘤细胞结合的荧光增加的条形图。通过将任意杂交瘤的ECD四聚体结合MFI除以阴性对照背景MFI,计算出相对于背景值的MFI倍数变化。杂交瘤204-4用作阴性对照,而四聚体CRD-233和CRD-242也用作阴性对照。

[0110] 图12:ECD四聚体与阴性对照B细胞杂交瘤系结合的直方图。

[0111] 图13A-13C: α - γ 组合分子四聚体与各种B细胞杂交瘤细胞系结合的条形图:(13A)CRD-506与抗 α 杂交瘤和抗 γ 杂交瘤的结合,(13B)CRD-509和CRD-600与抗 α 杂交瘤的结合,以及(13C)CRD-509和CRD-600与抗 γ 杂交瘤和与阴性对照杂交瘤的结合。

[0112] 图14:各种含 α 亚基分子与抗 α 杂交瘤结合的条形图。

[0113] 图15A-15C:(15A) α - γ 分子、(15B) γ - δ 分子和(15C)含IgG4 Fc的 α - γ 分子与各种杂交瘤结合的条形图。

具体实施方式

[0114] 本发明在一些实施方式中提供组合物,其包括:重症肌无力自身抗体的第一人受体靶标的片段或其类似物或衍生物;和重症肌无力自身抗体的第二人蛋白质受体的片段或其类似物或衍生物。还提供蛋白质复合物,其包括至少两个多肽链,其中第一链包括重症肌无力自身抗体的第一人蛋白质靶标的片段或其类似物或衍生物以及第一二聚化结构域,并且第二链包括重症肌无力自身抗体的第二人蛋白质靶标的片段或其类似物或衍生物以及能够与第一二聚化结构域二聚化的第二二聚化结构域。本发明还涉及包括组合物和/或蛋白质复合物的药物组合物、编码组合物和/或蛋白质复合物的多肽的核酸以及使用组合物和/或蛋白质复合物治疗和确定治疗的适合性的方法;以及产生组合物和/或蛋白质复合物的方法。

[0115] 第一方面,提供蛋白质,其包括重症肌无力自身抗体的第一蛋白质靶标或其类似物或衍生物。

[0116] 另一方面,提供组合物,其包括:重症肌无力自身抗体的第一蛋白质靶标的片段或其类似物或衍生物;和重症肌无力自身抗体的第二蛋白质靶标的片段或其类似物或衍生物。

[0117] 另一方面,提供蛋白质,其包括:重症肌无力自身抗体的第一蛋白质靶标的片段或其类似物或衍生物;和重症肌无力自身抗体的第二蛋白质靶标的片段或其类似物或衍生物。

[0118] 另一方面,提供蛋白质复合物,其包括至少两个多肽链,其中第一多肽链包括重症肌无力自身抗体的第一蛋白质靶标的片段或其类似物或衍生物以及第一二聚化结构域,并且第二多肽链包括重症肌无力自身抗体的第二蛋白质靶标的片段或其类似物或衍生物以及第二二聚化结构域。

[0119] 在一些实施方式中,蛋白质用于治疗重症肌无力。在一些实施方式中,多肽用于治疗重症肌无力。在一些实施方式中,多肽链用于治疗重症肌无力。在一些实施方式中,蛋白质复合物用于治疗重症肌无力。在一些实施方式中,组合物用于治疗重症肌无力。在一些实施方式中,蛋白质是治疗剂。在一些实施方式中,多肽是治疗剂。在一些实施方式中,多肽链是治疗剂。在一些实施方式中,蛋白质复合物是治疗剂。

[0120] 在一些实施方式中,组合物包括蛋白质复合物,蛋白质复合物包括至少两个多肽链,其中第一多肽链包括重症肌无力自身抗体的第一蛋白质靶标的片段或其类似物或衍生物以及第一二聚化结构域,并且第二多肽链包括重症肌无力自身抗体的第二蛋白质靶标的片段或其类似物或衍生物以及第二二聚化结构域。在一些实施方式中,组合物包括本发明的蛋白质复合物。在一些实施方式中,组合物包括本发明的蛋白质。在一些实施方式中,蛋白质是重组蛋白。在一些实施方式中,蛋白质是融合蛋白。

[0121] 如本文所用,术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”可互换使用以指代氨基酸残基的聚合物。在另一个实施方式中,如本文所用的术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”涵盖天然肽、肽模拟物(peptidomimetics)(一般包括非肽键或其它合成修饰)和肽类似物拟肽和半拟肽或其任意组合。在另一个实施方式中,所描述的肽、多肽和蛋白质具有修饰,使得它们在体内时更稳定或更能够穿透进入细胞。在一个实施方式中,术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”适用于天然存在的氨基酸聚合物。在另一个实施方式中,术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”适用于一个或多个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的人工化学类似物的氨基酸聚合物。

[0122] 在一些实施方式中,蛋白质复合物是免疫球蛋白(Ig)样复合物。在一些实施方式中,蛋白质复合物包括Ig样支架。在一些实施方式中,蛋白质复合物包括Ig样骨架。在一些实施方式中,蛋白质复合物是Ig Fc融合复合物。在一些实施方式中,组合物不含抗体可变结构域。在一些实施方式中,蛋白质复合物不含抗体可变结构域。在一些实施方式中,组合物不含可变结构域。在一些实施方式中,蛋白质复合物不含可变结构域。在一些实施方式中,第一链不含可变结构域。在一些实施方式中,第二链不含可变结构域。在一些实施方式中,蛋白质复合物是多链复合物。在一些实施方式中,组合物是治疗组合物。在一些实施方式中,蛋白质复合物是治疗复合物。在一些实施方式中,组合物用于治疗。在一些实施方式中,蛋白质复合物用于治疗。在一些实施方式中,组合物用于产生药物。在一些实施方式中,蛋白质复合物用于产生药物。在一些实施方式中,组合物用于治疗重症肌无力。在一些实施方式中,蛋白质复合物用于治疗重症肌无力。在一些实施方式中,蛋白质复合物用于诊断重症肌无力。在一些实施方式中,蛋白质复合物用于确定重症肌无力的适当治疗。在一些实施方式中,蛋白质复合物用于表征重症肌无力的血清学应答。在一些实施方式中,蛋白质复合物用于确定重症肌无力中的AChR抗体滴度。

[0123] 如本文所用,术语“多肽链”是指通过肽键从氨基末端(N-末端)到羧基末端(C-末端)连接的氨基酸的聚合物。在一些实施方式中,多肽链是重组多肽。在一些实施方式中,多肽链包括至少5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、100、150、200、250、300、350、400、450或500个氨基酸。每种可能性代表本发明的单独的实施方式。在一些实施方式中,多肽链包括至多300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1250、1500、1750、2000、2250、2500、2750、3000、3250、3500、3750、4000、4250、4500、4750或5000个氨基酸。每种可能性代表本发明的单独的实施方式。

[0124] 如本文所用,术语“重组多肽”是指由重组DNA编码的蛋白质,因此不是天然存在的。在一些实施方式中,蛋白质复合物不是天然存在的。在一些实施方式中,多肽链不是天然存在的。在一些实施方式中,重组多肽是合成多肽。术语“重组DNA”是指通过实验室方法形成的DNA分子。通常,此重组DNA呈用于在细胞中表达重组蛋白的载体、质粒或病毒的形式。通过细胞表达产生重组蛋白是本领域公知的,并且任何重组蛋白表达方法都可用于产生本发明的多肽。也可使用用于重组蛋白产生的无细胞表达系统。

[0125] 如本文所用的术语“表达”是指基因产物的生物合成,包括所述基因产物的转录和/或翻译。因此,核酸分子的表达可以指核酸片段的转录(例如,产生mRNA或其它功能性RNA的转录)和/或RNA翻译成前体或成熟蛋白质(多肽)。在一些实施方式中,本发明的核酸分子在细胞中表达以产生本发明的多肽。在一些实施方式中,本发明的核酸复合物在细胞中表达以产生本发明的蛋白质复合物。在一些实施方式中,RNA是载体。

[0126] 细胞内DNA序列或RNA的表达是本领域技术人员公知的。在多种方法当中,可通过转染、病毒感染或直接改变细胞的基因组来进行。在一些实施方式中,DNA序列在表达载体如质粒或病毒载体中。在一些实施方式中,Kozak序列被插入到转录起始密码子的上游。在一些实施方式中,Kozak序列增强蛋白质表达的量。

[0127] 在一些实施方式中,蛋白质复合物包括至少两个多肽链。在一些实施方式中,蛋白质复合物包括至少三个多肽链。在一些实施方式中,蛋白质复合物包括至少四个多肽链。在一些实施方式中,蛋白质复合物包括两个多肽链或由两个多肽链组成。在一些实施方式中,蛋白质复合物包括三个多肽链或由三个多肽链组成。在一些实施方式中,蛋白质复合物包括四个链或由四个链组成。在一些实施方式中,多肽链是相同的。在一些实施方式中,多肽链是不同的。在一些实施方式中,多肽链中至少两个是相同的。在一些实施方式中,多肽链中至少两个是不同的。

[0128] 本领域技术人员将理解,各种亚基的ECD相互作用形成完整受体,因此即使不含二聚化结构域,也能形成蛋白质复合物。在一些实施方式中,蛋白质复合物包括至少两个蛋白质。在一些实施方式中,蛋白质复合物包括至少三个蛋白质。在一些实施方式中,蛋白质复合物包括至少四个蛋白质。

蛋白质

[0129] 在一些实施方式中,蛋白质是哺乳动物蛋白质。在一些实施方式中,哺乳动物是人。在一些实施方式中,蛋白质是跨膜蛋白。在一些实施方式中,蛋白质是细胞表面蛋白质。在一些实施方式中,蛋白质是受体。在一些实施方式中,蛋白质是受体中的亚基。在一些实施方式中,蛋白质是细胞表面蛋白。在一些实施方式中,细胞表面蛋白是整合膜蛋白。在一些实施方式中,细胞表面蛋白是质膜包埋蛋白。在一些实施方式中,细胞表面蛋白是膜锚定蛋白。在一些实施方式中,蛋白质是重症肌无力相关蛋白。在一些实施方式中,蛋白质是合成蛋白。在一些实施方式中,蛋白质是天然存在的蛋白质。在一些实施方式中,蛋白质是重症肌无力自身抗体的靶标。在一些实施方式中,蛋白质选自AChRa、AChRb、AChRg、AChRd和AChRe。

[0130] 如本文所用,术语“受体”是指细胞表面上表达的能够结合配体的蛋白质。在一些实施方式中,受体是能够将信号传导至细胞的细胞质的蛋白质。在一些实施方式中,受体包括配体结合结构域。在一些实施方式中,受体包括跨膜结构域。在一些实施方式中,受体包

括胞内结构域。

[0131] 在一些实施方式中,片段包括蛋白质的胞外结构域(ECD)。在一些实施方式中,片段包括整个胞外结构域或其变体。在一些实施方式中,片段由整个胞外结构域或其变体组成。在一些实施方式中,变体是突变体。在一些实施方式中,变体包括胞外结构域的一部分的置换。在一些实施方式中,片段包括蛋白质的胞外结构域的片段。在一些实施方式中,片段由蛋白质的胞外结构域组成。在一些实施方式中,片段由蛋白质的胞外结构域的片段组成。在一些实施方式中,片段包括蛋白质的跨膜结构域。在一些实施方式中,片段不含蛋白质的跨膜结构域。在一些实施方式中,片段不含蛋白质的胞内结构域。在一些实施方式中,链不含跨膜结构域。在一些实施方式中,链不含胞内结构域。在一些实施方式中,片段包括来自同源人蛋白质的序列。在一些实施方式中,片段包括来自同源非人蛋白质的序列。在一些实施方式中,片段包括人蛋白质中的突变。

[0132] 在一些实施方式中,片段包括蛋白质的至少5个氨基酸。在一些实施方式中,片段包括蛋白质的至少10个氨基酸。在一些实施方式中,片段包括至少5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100个氨基酸。每种可能性代表本发明的单独的实施方式。在一些实施方式中,蛋白质的氨基酸是蛋白质的连续氨基酸。在一些实施方式中,片段包括少于100%的蛋白质。在一些实施方式中,片段包括少于100%的蛋白质胞外结构域。在一些实施方式中,片段包括少于100、99、97、95、90、85、80、75、70、65、60、55或50%的蛋白质。每种可能性代表本发明的单独的实施方式。在一些实施方式中,片段包括少于100、99、97、95、90、85、80、75、70、65、60、55或50%的蛋白质胞外结构域。每种可能性代表本发明的单独的实施方式。在一些实施方式中,片段包括5-500、5-250、5-100、5-50、10-500、10-250、10-100、10-50、20-500、20-250、20-200、20-50、25-500、25-250、25-100、25-50、50-500、50-250、50-100、100-500或100-250个氨基酸。每种可能性代表本发明的单独的实施方式。在一些实施方式中,片段包括至多20、30、40、50、60、70、75、80、90、100、110、120、125、130、140、150、160、170、175、180、190、200、210、220、225、230、240、250、260、270、275、280、290、300、310、320、325、330、340、350、360、370、375、380、390、400、410、420、425、430、440、450、460、470、475、480、490、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950或1000个氨基酸。每种可能性代表本发明的单独的实施方式。

[0133] 在一些实施方式中,变体包括至少70、75、80、85、90、92、95、97或99%同源性或同一性。每种可能性代表本发明的单独的实施方式。在一些实施方式中,变体包括至少85%同源性或同一性。在一些实施方式中,变体包括至少90%同源性或同一性。在一些实施方式中,变体包括至少92%同源性或同一性。在一些实施方式中,变体包括至少95%同源性或同一性。在一些实施方式中,变体包括至少97%同源性或同一性。在一些实施方式中,变体包括至少99%同源性或同一性。在一些实施方式中,变体是突变体。

[0134] 在一些实施方式中,链包括至少一个片段。在一些实施方式中,链包括至少两个片段。在一些实施方式中,片段通过连接体分隔。在一些实施方式中,连接体是氨基酸连接体。在一些实施方式中,连接体包括至少一个氨基酸。在一些实施方式中,连接体是柔性连接体。在一些实施方式中,与从链中排除的蛋白质区域相比,连接体包括增加的溶解性。在一些实施方式中,蛋白质区域被并非该蛋白质的蛋白质区域置换。在一些实施方式中,与已被置换的蛋白质区域相比,置换区域包括增加的溶解性。在一些实施方式中,与已被置换的蛋

白质区域相比,置换区域包括增加的蛋白质稳定性。

[0135] 在一些实施方式中,蛋白质是抗体的靶标。如本文所用,术语“抗体”包括IgA、IgD、IgE、IgG和IgM所有类别,并且还包括其所有亚类。在一些实施方式中,抗体是循环抗体。在一些实施方式中,抗体是天然存在的抗体。在一些实施方式中,抗体是自身抗体。

[0136] 如本文所用,术语“自身抗体”是指由对象自身免疫系统生成的抗其中至少一种对象自身蛋白质的抗体。在一些实施方式中,自身抗体是自身反应性抗体。在一些实施方式中,自身抗体靶向自身抗原(self-antigens)。自身抗原也称为自身抗原(autoantigens)。在一些实施方式中,自身抗体与重症肌无力相关。在一些实施方式中,自身抗体表征重症肌无力。在一些实施方式中,自身抗体是重症肌无力的自身抗体。在一些实施方式中,自身抗体由自身反应性B细胞生成。在一些实施方式中,蛋白质是抗体的抗原。在一些实施方式中,片段包括抗体的抗原。在一些实施方式中,片段包括抗体的至少一种抗原。在一些实施方式中,片段包括抗体的至少两种抗原。在一些实施方式中,片段包括抗体的至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10种抗原。每种可能性代表本发明的单独的实施方式。在一些实施方式中,抗体的抗原是自身抗原。在一些实施方式中,抗原是表位。在一些实施方式中,抗原包括至少一个表位。在一些实施方式中,表位包括至少5个氨基酸。在一些实施方式中,表位包括5-6个氨基酸。在一些实施方式中,表位包括5-10个氨基酸。在一些实施方式中,表位是简单表位。在一些实施方式中,简单表位是线性表位。在一些实施方式中,表位是复杂表位。在一些实施方式中,复合表位是3D表位。在一些实施方式中,复杂表位是不连续表位。在一些实施方式中,不连续表位包括至少两个不连续的结合形成表位的氨基酸区段。在一些实施方式中,连接体序列在表位的两个区段之间。

[0137] 如本文所用,术语“类似物”包括具有与蛋白质的序列基本相同的氨基酸序列,但其中一个或多个残基已被功能相似的残基保守取代的任何肽。在一些实施方式中,类似物显示出与原始蛋白质相似的功能性。保守取代的实例包括:一个非极性(疏水)残基如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸或甲硫氨酸取代另一个残基;一个极性(亲水)残基取代另一个残基,如精氨酸和赖氨酸之间、谷氨酰胺和天冬酰胺之间、甘氨酸和丝氨酸之间;一个碱性残基如赖氨酸、精氨酸或组氨酸取代另一个残基;或一个酸性残基如天冬氨酸或谷氨酸取代另一个残基。每种可能性代表本发明的单独的实施方式。在一些实施方式中,取代在蛋白质的抗原区域之外。在一些实施方式中,取代在抗体的表位之外。在一些实施方式中,类似物仍然是抗体的靶标。在一些实施方式中,类似物保留自身抗体的结合。类似物可具有导致氨基酸序列不同于蛋白质的典型氨基酸序列的缺失或突变。此外,类似物还可类似于蛋白质的片段,然而,在这种情况下,片段必须包括蛋白质的至少50个连续氨基酸或抗体的至少一个表位。在一些实施方式中,类似物是蛋白质的典型序列的类似物。

[0138] 在一些实施方式中,蛋白质的类似物包括与蛋白质的典型氨基酸序列具有至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%同源性的氨基酸序列。每种可能性代表本发明的单独的实施方式。在一些实施方式中,蛋白质的类似物包括与蛋白质的典型氨基酸序列具有至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%同一性的氨基酸序列。每种可能性代表本发明的单独的实施方式。在一些实施方式中,类似物包括至少一个取代。在一些实施方式中,类似物包括至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个取代。每种可能性代表本发明的单独

的实施方式。在一些实施方式中,取代是典型序列的突变。

[0139] 如本文所用的术语“衍生物”是指基于蛋白质,并且仍然包括、保留抗体的结合的任意多肽。衍生物不仅仅是蛋白质的片段,也没有氨基酸被置换或去除(类似物),确切地说,其可具有对蛋白质的另外的修饰,如翻译后修饰。此外,衍生物还可以是蛋白质的片段的衍生物,然而,在这种情况下,片段必须包括蛋白质的至少50个连续氨基酸或抗体的至少一个表位。在一些实施方式中,衍生物是蛋白质的典型序列的衍生物。

[0140] 在一些实施方式中,蛋白质的衍生物包括与蛋白质的典型氨基酸序列具有至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%同源性的氨基酸序列。每种可能性代表本发明的单独的实施方式。在一些实施方式中,蛋白质的衍生物包括与蛋白质的典型氨基酸序列具有至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%同一性的氨基酸序列。每种可能性代表本发明的单独的实施方式。

[0141] 已知蛋白质的典型氨基酸序列是本领域公知的。它们可在各种数据库中找到,包括UniProt、NCBI和UCSC基因组浏览器。可使用任何作为典型序列而被接受的序列。作为非限制性实例,人乙酰胆碱受体亚基 α 由CHRNA1基因编码,其典型核酸序列可见于Entrez基因1134,其典型蛋白质编码mRNA序列可见于NM_001039523和NM_000079,其典型氨基酸序列可见于NP_000070和NP_031415以及UniProt编号P02708。在一些实施方式中,典型序列是与至少50、60、70、75、80、90、95、97或99%的群体中存在的序列相同的序列。每种可能性代表本发明的单独的实施方式。在一些实施方式中,典型序列是与群体中存在的最普遍的序列相同的序列。在一些实施方式中,群体是疾病群体。在一些实施方式中,群体是患有自身免疫性疾病的群体。

[0142] 在一些实施方式中,蛋白质是乙酰胆碱受体(AChR)。在一些实施方式中,蛋白质是乙酰胆碱受体亚基。在一些实施方式中,亚基是 α 亚基。在一些实施方式中,亚基是 β 亚基。在一些实施方式中,亚基是 γ 亚基。在一些实施方式中,亚基是 δ 亚基。在一些实施方式中,亚基是 ϵ 亚基。在一些实施方式中,亚基选自 α 、 β 、 γ 、 δ 和 ϵ 亚基。

[0143] 在一些实施方式中,蛋白质是乙酰胆碱受体 α 亚基(AChRa)。在一些实施方式中,AChRa由基因CHRNA1编码。在一些实施方式中,AChRa是人AChRa。在一些实施方式中,CHRNA1由Entrez基因#1134标识。在一些实施方式中,AChRa由UniProt ID P02708标识。在一些实施方式中,AChRa由UniProt ID P02708.1或P02708.2标识。在一些实施方式中,AChRa由UniProt ID P02708.1标识。在一些实施方式中,AChRa由UniProt ID P02708.2标识。在一些实施方式中,CHRNA1包括下列或由下列组成:NM_001039523或NM_000079中提供的核苷酸序列。在一些实施方式中,AChRa包括下列或由下列组成:NP_000070或NP_001034612中提供的氨基酸序列。在一些实施方式中,AChRa的胞外结构域的典型氨基酸序列包括下列或由下列组成:SEHETRLVAKLFKDYSSVVRPVEDHRQVVEVTVGLQLIQLINVDEVNQIVTTNVRLLKQQWVDYNLKNPDDYGGVKKIHIPSEKIWRPDLVLYNNADGDFAIVKFTKVLLQYTGHTWTPPAIFKSYCEIIVTHFPFDEQNCSMKLGTWTYDGSVVAINPESDQPDLSNFMESGEWIKESRGWKHSVTYSCCPDTPYLDITYHFVMQRLP(SEQ ID NO:1)。在一些实施方式中,AChRa胞外结构域的典型氨基酸序列包括下列或由下列组成:SEHETRLVAKLFKDYSSVVRPVEDHRQVVEVTVGLQLIQLINVDEVNQIVTTNVRLLKQGMVDLPRPSCVTLGVPLF SHLQNEQWVDYNLKNPDDYGGVKKIHIPSEKIWRPDLVLYNNADGDFAIVKFTKVLLQYTGHTWTPPAIFKSYC

EIIIVTHFPFDEQNCSEMKLGTWYDGSVVAINPESDQPDLSNFMESGEWVIKESRGWKHSVTYSCCPDTPYLDITYH FVMQRLP (SEQ ID NO:2)。在一些实施方式中,胞外结构域不含信号肽。在一些实施方式中,胞外结构域还包括信号肽。在一些实施方式中,AChRa信号肽包括下列或由下列组成:MEPWLLLLLSLCSAGLVLG (SEQ ID NO:3)。在一些实施方式中,AChRa信号肽包括下列或由下列组成:MFMCLEGGKNTVLVSSAVSAGLVLG (SEQ ID NO:61)。

[0144] 在一些实施方式中,蛋白质是乙酰胆碱受体 β 亚基(AChRb)。在一些实施方式中,AChRb由基因CHRNA1编码。在一些实施方式中,AChRb是人AChRb。在一些实施方式中,CHRNA1由Entrez基因#1140标识。在一些实施方式中,AChRb由UniProt ID P11230标识。在一些实施方式中,CHRNA1包括下列或由下列组成:NM_000747中提供的核苷酸序列。在一些实施方式中,AChRb包括下列或由下列组成:NP_000738中提供的氨基酸序列。在一些实施方式中,AChRb的胞外结构域的典型氨基酸序列包括下列或由下列组成:SEAEGRLREKLFSGYDSSVRPA REVGDRVRVSVGLILAQLISLNEKDEEMSTKVYLDLEWTDYRLSWDPAEHDGIDSLRITAESVWLPDVLLNNNDG NFDVALDISVVVSSDGSVRWQPPGIYRSSCSIQVTYFPFDWQNTMVFSSYSYDSSEVSLQTGLPGDQGQHEIHI HEGTFIENGQWEIIHKPSRLIQPPGDPRGGREGQRQEVIFYLIIRRK (SEQ ID NO:4)。在一些实施方式中,胞外结构域不含信号肽。在一些实施方式中,胞外结构域还包括信号肽。在一些实施方式中,AChRb信号肽包括下列或由下列组成:MTPGALLMLLGALGAPLAPGVRG (SEQ ID NO:5)。

[0145] 在一些实施方式中,蛋白质是乙酰胆碱受体 γ 亚基(AChRg)。在一些实施方式中,AChRg由基因CHRNA1编码。在一些实施方式中,AChRg是人AChRg。在一些实施方式中,CHRNA1由Entrez基因#1146标识。在一些实施方式中,AChRg由UniProt ID P07510标识。在一些实施方式中,CHRNA1包括下列或由下列组成:NM_005199中提供的核苷酸序列。在一些实施方式中,AChRg包括下列或由下列组成:NP_005190中提供的氨基酸序列。在一些实施方式中,AChRg的胞外结构域的典型氨基酸序列包括下列或由下列组成:RNQEERLLADLMQNYDPNLRPA ERSDVNVNLSKLTLTNLISLNEREEALTTNVWIEHQWCDYRLRWDPDYEGLWVLRVPSTMVWRPDIVLENNVDG VFEVALYCNVLVSPDGCYWLPPAIFRSACISVTYFPFDWQNCSLIFQSQTYSTNEIDLQLSQEDGQTIEWIFID PEAFTENGWEAIQHRPAKMLDPAAPAEAGHQKVVFYLLIQRKP (SEQ ID NO:6)。在一些实施方式中,胞外结构域不含信号肽。在一些实施方式中,胞外结构域还包括信号肽。在一些实施方式中,AChRg信号肽包括下列或由下列组成:MHGGQGPLLLLLLLAVCLGAQG (SEQ ID NO:7)。

[0146] 在一些实施方式中,蛋白质是乙酰胆碱受体 δ 亚基(AChRd)。在一些实施方式中,AChRd由基因CHRNA1编码。在一些实施方式中,AChRd是人AChRd。在一些实施方式中,CHRNA1由Entrez基因#1144标识。在一些实施方式中,AChRd由UniProt ID Q07001标识。在一些实施方式中,CHRNA1包括下列或由下列组成:NM_000751、NM_001256657、NM_001311195或NM_001311196中提供的核苷酸序列。在一些实施方式中,AChRd包括下列或由下列组成:NP_000742、NP_001243586、NP_001298124或NP_001298125中提供的氨基酸序列。在一些实施方式中,AChRd的胞外结构域的典型氨基酸序列包括下列或由下列组成:LNEEERLIRHLFQEKGY NKELRPVAHKEESVDVALALTLNLISLKEVEETLTNVWIEHGWDNRKWNAAEEFGNISVLRPLPPDMVWLPEIV LENNDGSFQISYSCNVLVYHYGFVYWLPPAIFRSSCPISVTYFPFDWQNCSLKFSSLYTAKEITLSLKQDAKEN RTYPVEWIIIDPEGFTENGWEIVHRPARVNVDPRAPLDSPSRQDITFYLIIRRK (SEQ ID NO:8)。在一些实施方式中,胞外结构域不含信号肽。在一些实施方式中,胞外结构域还包括信号肽。在一些实施方式中,AChRd信号肽包括下列或由下列组成:MEGPVLTGLLAALAVCGSWG (SEQ ID NO:

9)。

[0147] 在一些实施方式中,蛋白质是乙酰胆碱受体 ϵ 亚基(AChRe)。在一些实施方式中,AChRe由基因CHRNE编码。在一些实施方式中,AChRe是人AChRe。在一些实施方式中,CHRNE由Entrez基因#1145标识。在一些实施方式中,AChRe由UniProt ID Q04844标识。在一些实施方式中,CHRNE包括下列或由下列组成:NM_000080中提供的核苷酸序列。在一些实施方式中,AChRe包括下列或由下列组成:NP_000071中提供的氨基酸序列。在一些实施方式中,AChRe的胞外结构域的典型氨基酸序列包括下列或由下列组成:KNEELRLYHHLFNNYDPGSRPV REPEDTVTISLKVTLTNLISLNEKEETLTTSVWIGIDWQDYRLNYSKDDFGGIETLRVPSELVWLPEIVLENNIDG QFGVAYDANVLVYEGGSVTWLPPAIYRSVCAVEVTYFPFDWQNC SLIFRSQTYNAEEVEFTFAVDNDGKTINKIDI DTEAYTENGEWAIDFCPGVIRRHGGATDGPGETDVIYSLIIRRK(P (SEQ ID NO:10)。在一些实施方式中,胞外结构域不含信号肽。在一些实施方式中,胞外结构域还包括信号肽。在一些实施方式中,AChRe信号肽包括下列或由下列组成:MARAPLGVL LLLGLLGRGVG (SEQ ID NO:11)。

[0148] 在一些实施方式中,信号肽是抗体链的信号肽。在一些实施方式中,信号肽是抗体重链的信号肽。在一些实施方式中,信号肽是抗体轻链的信号肽。在一些实施方式中,信号肽是 κ 轻链的信号肽。在一些实施方式中,信号肽是 λ 轻链的信号肽。在一些实施方式中,重链信号肽包括MEWSWVFLFFLSVTTGVHS (SEQ ID NO:70)。在一些实施方式中,重链信号肽由SEQ ID NO:70组成。在一些实施方式中,重链信号肽包括MEFGLSWFLVAILKGVQC (SEQ ID NO:14)。在一些实施方式中,重链信号肽由SEQ ID NO:14组成。在一些实施方式中,轻链信号肽包括MSVPTQVLG LLLLWLTDARC (SEQ ID NO:71)。在一些实施方式中,轻链信号肽由SEQ ID NO:71组成。在一些实施方式中,重链信号肽是小鼠重链信号肽,并且包括MGWSCIIILFLVATATGVHS (SEQ ID NO:15)。在一些实施方式中,重链信号肽由SEQ ID NO:15组成。

[0149] 在一些实施方式中,第一蛋白质和第二蛋白质是相同的蛋白质。在一些实施方式中,第一和第二蛋白质是相同的蛋白质,并且片段是不同的片段。在一些实施方式中,片段是不同的片段。在一些实施方式中,片段包括不同的序列或由不同的序列组成。在一些实施方式中,第一和第二蛋白质是不同的蛋白质。

[0150] 在一些实施方式中,蛋白质或片段包括增加溶解性的突变。在一些实施方式中,蛋白质或片段包括增加蛋白质或片段的稳定性的突变。在一些实施方式中,突变是插入。在一些实施方式中,蛋白质是表面蛋白并且包括增加溶解性的突变。在一些实施方式中,片段是表面蛋白的胞外结构域并且包括增加溶解性的插入。在一些实施方式中,插入代替蛋白质或片段的区域。在一些实施方式中,蛋白质的环被溶解性更高的环置换。在一些实施方式中,AChRa的环包括下列或由下列组成:CEIIVTHFPFDEQNC (SEQ ID NO:39)。在一些实施方式中,AChRb的环包括下列或由下列组成:CSIQVTYFPFDWQNC (SEQ ID NO:40)。在一些实施方式中,AChRg的环包括下列或由下列组成:CSISVTYFPFDWQNC (SEQ ID NO:41)。在一些实施方式中,AChRd的环包括下列或由下列组成:CPISVTYFPFDWQNC (SEQ ID NO:42)。在一些实施方式中,AChRe的环包括下列或由下列组成:CAVEVTYFPFDWQNC (SEQ ID NO:43)。在一些实施方式中,溶解性更高的环包括下列或由下列组成:CDVSGVDTESGATNC (SEQ ID NO:44)。在一些实施方式中,溶解性更高的插入片段(insert)包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:44。在一些实施方式中,溶解性更高的插入片段包括下列或由下列组成:DVSGVDTESGAT (SEQ ID NO:

63)。在一些实施方式中,AChR经突变以增加溶解性和稳定性。在一些实施方式中,突变选自V8E、W149R和V155A。在一些实施方式中,突变是V8E、W149R和V155A中至少两种的突变。在一些实施方式中,突变是V8E、W149R和V155A中全部三种的突变。在一些实施方式中,AChRa包括突变。在一些实施方式中,非AChRa乙酰胆碱受体亚基包括平行突变。在一些实施方式中,平行突变是对具有同源性的氨基酸的突变。

[0151] 在一些实施方式中,产生突变的 α 亚基胞外结构域包括下列或由下列组成:SEHETRLVAKLFKDYSSVVRPVEDHRQVVEVTVGLQLIQLINVDEVNQIVTTNVRKQQWVDYNLKWNPDDYGGVKKIHIPSEKIWRPDLVLYNNADGDFAIKFTKVLLQYTGHTWTPPAIFKSYCDVSGVDTEGATNCSMKLGTWTYDGSVVAINPESDQPDLSNFMESGEWVIKESRGWKHSVTYSCCPDTPYLDITYHFVMQRLP (SEQ ID NO:131)。在一些实施方式中,产生突变的 β 亚基胞外结构域包括下列或由下列组成:SEAEGRLREKLFSGYDSSVRPAREVGDRVRVSVGLILAQLISLNEKDEEMSTKVYLDLEWTDYRLSWDPAEHDGIDSLRITAESVWLPDVLNNNDGNFDVALDISVVVSSDGSV RWQPPGIYRSSCDVSGVDTEGATNCTMFSSYSYDSSEVSLQTGLGPDGQGHQEIHIHEGTFIENGQWEIIHKPSRLIQPPGDPGRGREGQRQEVIFYLIIRRK (SEQ ID NO:132)。在一些实施方式中,产生突变的 γ 亚基胞外结构域包括下列或由下列组成:RNQEERLLADLMQNYDPNLRPAERDSDVVNVSLKLTNLISLNEREEALTTNVWIEMQWCDYRLRWDPRDYEGWVLRVPSTMVWRPDIVLENNVDGVFEVALYCNVLVSPDGCYWLPPAIFRSACDVSGVDTEGATNCSLIFQSQTYSTNEIDLQLSQEDGQTIEWIFIDPEAFTENGWEWAIQHRPAKMLLDPAAPAQEAGHQKVVFYLLIQRKP (SEQ ID NO:133)。在一些实施方式中,产生突变的 δ 亚基胞外结构域包括下列或由下列组成:LNEEERLIRHLFQEKGYNKELRPVAHKEESVDVALALTLNLISLKEVEETLTNVWIEHGWDNRLKWNAAEEFGNISVLRLLPPDMVWLPEIVLENNNDGSFQISYSCNVLVYHYGFVYWLPPAIFRSSCDVSGVDTEGATNCSLKFFSSLKYTAKEITLSLKQDAKENRTYPVEWIIIDPEGFTENGWEWIVHRPARVNVDPRAPLDSPSRQDITFYLIIRRK (SEQ ID NO:134)。在一些实施方式中,产生突变的 ϵ 亚基胞外结构域包括下列或由下列组成:KNEELRLYHHLFNNDPGSRPVREPEDTVTISLKVTLNLISLNEKEETLTTSVWIGIDWQDYRLNYSKDDFGGIETLRVPSELVWLPEIVLENNIDGQFGVAYDANVLVYEGGSVTWLPPAIYRSVCDVSGVDTEGATNCSLIFRSQTYNAEEVEFTFAVDNDGKTINKIDIDTEAYTENGEWAIDFCPGVIRRHGGATDGPGETDVIYSLIIRRK (SEQ ID NO:135)。

[0152] 另一方面,提供蛋白质,其包括SEQ ID NO:131-135中的任一个。

[0153] 在一些实施方式中,蛋白质包括SEQ ID NO:131。在一些实施方式中,蛋白质包括SEQ ID NO:132。在一些实施方式中,蛋白质包括SEQ ID NO:133。在一些实施方式中,蛋白质包括SEQ ID NO:134。在一些实施方式中,蛋白质包括SEQ ID NO:135。在一些实施方式中,蛋白质包括选自SEQ ID NO:131-135的多个序列。在一些实施方式中,本发明的复合物包括第一链,第一链包括选自SEQ ID NO:131-135的序列。在一些实施方式中,本发明的复合物包括第二链,第二链包括选自SEQ ID NO:131-135的序列。在一些实施方式中,本发明的复合物包括第三链,第三链包括选自SEQ ID NO:131-135的序列。在一些实施方式中,本发明的复合物包括第四链,第四链包括选自SEQ ID NO:131-135的序列。在一些实施方式中,胞外结构域片段选自SEQ ID NO:131-135。在一些实施方式中,胞外结构域变体选自SEQ ID NO:131-135。

[0154] 在一些实施方式中,片段包括配体结合结构域,并且还包括抑制配体结合的突变。在一些实施方式中,突变在配体结合结构域中。本领域技术人员将理解,由于本发明的蛋白质复合物意在结合抗体和B细胞,因此这将会是有利的:其不结合对象中存在的内源性配

体,从而留有可供结合内源性受体的正常配体水平。在一些实施方式中,蛋白质是AChRa,并且突变是SEQ ID NO:1的酪氨酸190或SEQ ID NO:2的酪氨酸215突变为苯丙氨酸。在一些实施方式中,蛋白质是AChRa,并且突变是SEQ ID NO:1的酪氨酸190突变为苯丙氨酸。在一些实施方式中,蛋白质是AChRa,并且突变是SEQ ID NO:2的酪氨酸215突变为苯丙氨酸。

[0155] 另一方面,提供蛋白质,其包括乙酰胆碱受体亚基的胞外结构域,乙酰胆碱受体亚基的胞外结构域包括减少聚集的至少一个突变。

[0156] 在一些实施方式中,片段包括减少聚集的突变。在一些实施方式中,聚集包括自身二聚化。在一些实施方式中,聚集包括多聚化。在一些实施方式中,乙酰胆碱受体亚基的胞外结构域是蛋白质。在一些实施方式中,突变是多个突变。在一些实施方式中,多个是2个。在一些实施方式中,多个是3个。

[0157] 在一些实施方式中,蛋白质是AChRa,并且突变是N141的缺失。在一些实施方式中,N141在SEQ ID NO:1之内。在一些实施方式中,N141在SEQ ID NO:131之内。在一些实施方式中,蛋白质是AChRa,并且突变是苯丙氨酸100的突变。在一些实施方式中,苯丙氨酸100突变为甘氨酸(F100G)。在一些实施方式中,苯丙氨酸100突变为酪氨酸(F100Y)。在一些实施方式中,苯丙氨酸100突变为异亮氨酸(F100I)。在一些实施方式中,F100在SEQ ID NO:1之内。在一些实施方式中,F100在SEQ ID NO:131之内。在一些实施方式中,蛋白质是AChRa,并且突变是色氨酸149的突变。在一些实施方式中,色氨酸149突变为带电的氨基酸。在一些实施方式中,色氨酸149突变为带负电的氨基酸。在一些实施方式中,色氨酸149突变为谷氨酸(W149E)。在一些实施方式中,色氨酸149突变为天冬氨酸(W149D)。在一些实施方式中,色氨酸149突变为带正电的氨基酸。在一些实施方式中,色氨酸149突变为赖氨酸(W149K)。在一些实施方式中,色氨酸149突变为精氨酸(W149R)。在一些实施方式中,色氨酸149突变为组氨酸(W149H)。在一些实施方式中,色氨酸149突变为谷氨酰胺(W149Q)。在一些实施方式中,W149在SEQ ID NO:1之内。在一些实施方式中,W149在SEQ ID NO:131之内。在一些实施方式中,蛋白质是AChRa,并且突变是缬氨酸155的突变。在一些实施方式中,缬氨酸155突变为丙氨酸(V155A)。在一些实施方式中,缬氨酸155突变为异亮氨酸(V155I)。在一些实施方式中,缬氨酸155突变为亮氨酸(V155L)。在一些实施方式中,V155在SEQ ID NO:1之内。在一些实施方式中,V155在SEQ ID NO:131内。在一些实施方式中,蛋白质是AChRa,并且突变是酪氨酸93的突变。在一些实施方式中,酪氨酸93的突变减少 α - γ 相互作用。在一些实施方式中,酪氨酸93突变为减少 α 与 γ 相互作用的任意氨基酸。在一些实施方式中,酪氨酸93突变为苯丙氨酸(Y93F)。在一些实施方式中,酪氨酸93突变为带正电的氨基酸。在一些实施方式中,酪氨酸93突变为组氨酸(Y93H)。在一些实施方式中,酪氨酸93突变为精氨酸(Y93R)。在一些实施方式中,酪氨酸93突变为赖氨酸(Y93K)。在一些实施方式中,Y93在SEQ ID NO:1之内。在一些实施方式中,Y93在SEQ ID NO:131之内。

[0158] 在一些实施方式中,突变减少蛋白质的氧化。在一些实施方式中,蛋白质是AChRg,并且突变是甲硫氨酸84的突变。产生突变至少部分是为了减少甲硫氨酸氧化并延长保质期。任意氨基酸的突变都会产生此结果。在一些实施方式中,甲硫氨酸84的突变减少 α - γ 相互作用。在一些实施方式中,甲硫氨酸84突变为减少 α 与 γ 相互作用的任意氨基酸。在一些实施方式中,甲硫氨酸84缺失。在一些实施方式中,甲硫氨酸84突变为丝氨酸(M84S)。在一些实施方式中,M84在SEQ ID NO:6之内。在一些实施方式中,M84在SEQ ID NO:133之内。在

一些实施方式中,蛋白质是AChRg,并且突变是酪氨酸105的突变。在一些实施方式中,酪氨酸105的突变减少 α - γ 相互作用。在一些实施方式中,酪氨酸105突变为减少 α 与 γ 相互作用的任意氨基酸。在一些实施方式中,酪氨酸105突变为带电的氨基酸。在一些实施方式中,酪氨酸105突变为带负电的氨基酸。在一些实施方式中,酪氨酸105突变为谷氨酸(Y105E)。在一些实施方式中,酪氨酸105突变为天冬氨酸(Y105D)。在一些实施方式中,酪氨酸105突变为带正电的氨基酸。在一些实施方式中,酪氨酸105突变为精氨酸(Y105R)。在一些实施方式中,酪氨酸105突变为赖氨酸(Y105K)。在一些实施方式中,酪氨酸105突变为组氨酸(Y105H)。在一些实施方式中,Y105在SEQ ID NO:6之内。在一些实施方式中,Y105在SEQ ID NO:133之内。在一些实施方式中,蛋白质是AChRg,并且突变是酪氨酸117的突变。在一些实施方式中,酪氨酸117的突变减少 α - γ 相互作用。在一些实施方式中,酪氨酸117突变为减少 α 与 γ 相互作用的任意氨基酸。在一些实施方式中,酪氨酸117突变为带电的氨基酸。在一些实施方式中,酪氨酸117突变为带负电的氨基酸。在一些实施方式中,酪氨酸117突变为谷氨酸(Y117E)。在一些实施方式中,酪氨酸117突变为天冬氨酸(Y117D)。在一些实施方式中,酪氨酸117突变为带正电的氨基酸。在一些实施方式中,酪氨酸117突变为精氨酸(Y117R)。在一些实施方式中,酪氨酸117突变为赖氨酸(Y117K)。在一些实施方式中,酪氨酸117突变为组氨酸(Y117H)。在一些实施方式中,Y117在SEQ ID NO:6之内。在一些实施方式中,Y117在SEQ ID NO:133之内。在一些实施方式中,突变是多个突变并且包括选自M84S、Y105E和Y117E的至少两个突变。在一些实施方式中,突变是多个突变并且包括选自M84S、Y105E和Y117R的至少两个突变。在一些实施方式中,突变是多个突变并且包括M84S、Y105E和Y117R全部。在一些实施方式中,突变是多个突变并且包括M84S、Y105E和Y117R全部。在一些实施方式中,突变是两个突变并且包括M84S和Y105E。在一些实施方式中,突变是两个突变并且包括Y117E和Y105E。在一些实施方式中,突变是两个突变并且包括Y117R和Y105E。

[0159] 在一些实施方式中,蛋白质是AChRd,并且突变是半胱氨酸108的突变。在一些实施方式中,半胱氨酸108突变为任意其它氨基酸。在一些实施方式中,半胱氨酸108缺失。本领域技术人员将理解,期望则是通过去除可能已经形成二硫键的游离半胱氨酸来减少聚集。因此,任意突变都是可能的。在一些实施方式中,半胱氨酸108突变为丙氨酸(C108A)。在一些实施方式中,半胱氨酸108突变为异亮氨酸(C108I)。在一些实施方式中,C108在SEQ ID NO:8之内。在一些实施方式中,C108在SEQ ID NO:134之内。在一些实施方式中,蛋白质是AChRd并且突变是酪氨酸119的突变。在一些实施方式中,酪氨酸119的突变降低 δ 疏水性。在一些实施方式中,酪氨酸119突变为降低 δ 疏水性的任意氨基酸。在一些实施方式中,酪氨酸119突变为带正电的氨基酸。在一些实施方式中,酪氨酸119突变为精氨酸(Y119R)。在一些实施方式中,酪氨酸119突变为赖氨酸(Y119K)。在一些实施方式中,酪氨酸119突变为组氨酸(Y119H)。在一些实施方式中,酪氨酸119突变为带负电的氨基酸。在一些实施方式中,酪氨酸119突变为谷氨酸(Y119E)。在一些实施方式中,酪氨酸119突变为天冬氨酸(Y119D)。在一些实施方式中,Y119在SEQ ID NO:8之内。在一些实施方式中,Y119在SEQ ID NO:134之内。在一些实施方式中,蛋白质是AChRa并且突变是N141的缺失。在一些实施方式中,N141在SEQ ID NO:8之内。在一些实施方式中,N141在SEQ ID NO:134之内。在一些实施方式中,蛋白质是AChRd并且突变是亮氨酸151的突变。在一些实施方式中,亮氨酸151的突变减少亚基

相互作用。在一些实施方式中,亮氨酸151突变为减少亚基相互作用的任意氨基酸。在一些实施方式中,亮氨酸151缺失。在一些实施方式中,亮氨酸151突变为带电的氨基酸。在一些实施方式中,亮氨酸151突变为带正电的氨基酸。在一些实施方式中,亮氨酸151突变为不带正电的氨基酸。在一些实施方式中,亮氨酸151突变为带负电的氨基酸。在一些实施方式中,亮氨酸151突变为谷氨酸(L151E)。在一些实施方式中,亮氨酸151是突变的天冬氨酸(L151D)。在一些实施方式中,L151在SEQ ID NO:8之内。在一些实施方式中,L151在SEQ ID NO:134之内。在一些实施方式中,突变是选自下列的多个突变:C108、Y119、L151的突变;和N141的缺失。在一些实施方式中,突变是选自下列的多个突变:C108A、Y119R、L151E的突变;和N141缺失。在一些实施方式中,突变是两个突变并且包括C108A和Y119R。在一些实施方式中,突变是两个突变并且包括C108A和L151E。在一些实施方式中,突变是两个突变并且包括:C108A;和N141的缺失。在一些实施方式中,突变是三个突变并且包括C108A、Y119R和L151E。在一些实施方式中,突变是三个突变并且包括:C108A、Y119R;和N141的缺失。

二聚化结构域

[0160] 在一些实施方式中,二聚化结构域能够彼此二聚化。在一些实施方式中,第一二聚化结构域能够与第二二聚化结构域二聚化。在一些实施方式中,第一和第二二聚化结构域能够彼此二聚化。在一些实施方式中,能够二聚化被配置成二聚化。在一些实施方式中,二聚化在生理条件下。在一些实施方式中,二聚化在体液中。在一些实施方式中,体液是血液。在一些实施方式中,体液是血浆。在一些实施方式中,体液是血清。在一些实施方式中,二聚化在对象体内。在一些实施方式中,二聚化在体内。在一些实施方式中,二聚化在体外。

[0161] 如本文所用,术语“二聚化结构域”是指这样的氨基酸序列:在与其它氨基酸序列(另一个二聚化结构域)接触时与其结合形成二聚体。二聚化结构域是本领域公知的,因为已知多个蛋白质序列彼此结合。在一些实施方式中,二聚化包括在二聚化结构域之间形成共价键。在一些实施方式中,二聚化包括静电结合。在一些实施方式中,二聚化不包括静电结合。在一些实施方式中,二聚化是可逆的。在一些实施方式中,二聚化是不可逆的。在一些实施方式中,二聚化包括在二聚化结构域之间形成的键。在一些实施方式中,键是化学键。在一些实施方式中,键是二硫键。在一些实施方式中,键是肽键。二聚化结构域的实例包括抗体重链的铰链结构域、抗体重链/轻链的CH1/CL结构域以及TCR α/β 的ECD结构域等。此外,上铰链结构域可用对丝氨酸进行半胱氨酸取代/突变来改造以防止二聚化。在一些实施方式中,二聚化结构域包括下列或由下列组成:EPKSSDKTHTCPPCP(SEQ ID NO:63)。

[0162] 在一些实施方式中,二聚化结构域包括下列或由下列组成:免疫球蛋白(Ig)铰链结构域。在一些实施方式中,Ig铰链结构域是重链铰链结构域。在一些实施方式中,Ig是人Ig。在一些实施方式中,免疫球蛋白选自IgA、IgD、IgE、IgG和IgM。在一些实施方式中,免疫球蛋白是IgG。在一些实施方式中,IgG是IgG1。在一些实施方式中,IgG是IgG2。在一些实施方式中,IgG是IgG3。在一些实施方式中,IgG选自IgG1和IgG3。在一些实施方式中,IgG是IgG4。在一些实施方式中,第一和第二二聚化结构域同时是Ig铰链结构域。在一些实施方式中,第一和第二二聚化结构域是同一的。在一些实施方式中,第一和第二二聚化结构域至少95%同一。在一些实施方式中,第一和第二二聚化结构域至少50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、97、99或100%同一。每种可能性代表本发明的单独的实施方式。

[0163] 在一些实施方式中,铰链结构域包括氨基酸序列EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ

ID NO:16)。在一些实施方式中,铰链结构域由SEQ ID NO:16的氨基酸序列组成。在一些实施方式中,IgG1铰链包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:16。在一些实施方式中,铰链结构域包括氨基酸序列EPKCCVECPPCAPPAAA (SEQ ID NO:17)。在一些实施方式中,铰链结构域由SEQ ID NO:17的氨基酸序列组成。在一些实施方式中,IgG2铰链包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:17。在一些实施方式中,铰链结构域包括氨基酸序列ESKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO:18)。在一些实施方式中,铰链结构域由SEQ ID NO:18的氨基酸序列组成。在一些实施方式中,IgG4铰链包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:18。在一些实施方式中,铰链结构域包括氨基酸序列ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGP (SEQ ID NO:19)。在一些实施方式中,铰链结构域由SEQ ID NO:19的氨基酸序列组成。在一些实施方式中,IgG3铰链包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:19。在一些实施方式中,铰链结构域包括CPXCP (SEQ ID NO:20) 基序。在一些实施方式中,SEQ ID NO:20中的X选自P和R。在一些实施方式中,SEQ ID NO:20是CPPCP (SEQ ID NO:21)。在一些实施方式中,SEQ ID NO:20是CPRCP (SEQ ID NO:22)。在一些实施方式中,铰链结构域包括EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:37)。因此,将理解的是铰链区可被认为在CPXCP基序之后结束。

[0164] 在一些实施方式中,二聚化结构域包括下列或由下列组成:Ig CH1结构域。在一些实施方式中,二聚化结构域包括下列或由下列组成:Ig重链CH1结构域。在一些实施方式中,二聚化结构域包括下列或由下列组成:Ig轻链。在一些实施方式中,二聚化结构域包括下列或由下列组成:轻链CL结构域。在一些实施方式中,CL结构域是CL κ 结构域。在一些实施方式中,CL结构域是CL λ 结构域。本领域公知Ig重链的CH1结构域与轻链CL结构域二聚化。在一些实施方式中,第一二聚化结构域包括下列或由下列组成:CH1结构域;并且第二二聚化结构域包括下列或由下列组成:CL结构域。在一些实施方式中,第一和第二二聚化结构域同时包括铰链结构域。在一些实施方式中,第一和第二二聚化结构域不同时包括CH1结构域。在一些实施方式中,第一和第二二聚化结构域不同时包括CL结构域。在一些实施方式中,第一和第二多肽链不同时包括CH1结构域。在一些实施方式中,第一和第二多肽链不同时包括CL结构域。

[0165] 在一些实施方式中,Ig CH1结构域包括氨基酸序列ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV (SEQ ID NO:23)。在一些实施方式中,Ig CH1结构域由SEQ ID NO:23组成。在一些实施方式中,SEQ ID NO:23是IgG1 CH1结构域。在一些实施方式中,Ig CH1结构域包括氨基酸序列ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV (SEQ ID NO:24)。在一些实施方式中,Ig CH1结构域由SEQ ID NO:24组成。在一些实施方式中,SEQ ID NO:24是IgG2 CH1结构域。在一些实施方式中,Ig CH1结构域包括氨基酸序列ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRV (SEQ ID NO:25)。在一些实施方式中,Ig CH1结构域由SEQ ID NO:25组成。在一些实施方式中,SEQ ID NO:25是IgG3 CH1结构域。在一些实施方式中,Ig CH1结构域包括氨基酸序列ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRV (SEQ ID NO:26)。在一些实施方式中,Ig CH1结构域由SEQ ID NO:26组成。在一些实施方式中,SEQ

ID NO:26是IgG4 CH1结构域。

[0166] 在一些实施方式中,Ig CL κ 结构域包括氨基酸序列AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEK (SEQ ID NO:27)。在一些实施方式中,Ig CL κ 结构域由SEQ ID NO:27组成。在一些实施方式中,Ig CL λ 结构域包括氨基酸序列GQPKANPTVTLPSPSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWK ADGSPVKAGVETTKP SKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO:28)。在一些实施方式中,Ig CL λ 结构域由SEQ ID NO:28组成。

Fc区

[0167] 在一些实施方式中,组合物包括Fc区。在一些实施方式中,Fc区是Fc结构域。在一些实施方式中,Fc区是Fc片段。在一些实施方式中,第一多肽链包括Fc区。在一些实施方式中,第二多肽链包括Fc区。在一些实施方式中,第一和第二多肽链同时包括Fc区。在一些实施方式中,Fc区是抗体重链的Fc区。在一些实施方式中,抗体重链是人抗体重链。在一些实施方式中,重链是IgG重链。在一些实施方式中,IgG选自IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。在一些实施方式中,IgG选自IgG1和IgG3。在一些实施方式中,IgG是IgG1。在一些实施方式中,IgG是IgG2。在一些实施方式中,IgG是IgG3。在一些实施方式中,IgG是IgG4。

[0168] 在一些实施方式中,Fc区能够引发细胞毒性作用。在一些实施方式中,Fc结构域包括DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:12)。在一些实施方式中,Fc结构域由SEQ ID NO:12组成。在一些实施方式中,IgG1的Fc结构域包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:12。在一些实施方式中,Fc结构域包括下列或由下列组成:与SEQ ID NO:12具有至少70、75、80、85、90、93、95、97或99%同源性的序列。每种可能性代表本发明的单独的实施方式。在一些实施方式中,Fc区被配置成引发细胞毒性作用。在一些实施方式中,细胞毒性作用针对的是靶细胞。在一些实施方式中,细胞毒性作用是在结合后。在一些实施方式中,细胞毒性作用针对的是蛋白质复合物所结合的细胞。在一些实施方式中,细胞毒性作用是针对的是结合蛋白质复合物的细胞。在一些实施方式中,细胞毒性作用是通过免疫细胞结合Fc区介导的。在一些实施方式中,细胞毒性作用是通过Fc区造成免疫细胞活化介导的。在一些实施方式中,细胞毒性作用是通过Fc区造成免疫细胞募集介导的。在一些实施方式中,免疫细胞是T细胞。在一些实施方式中,免疫细胞是自然杀伤(NK)细胞。在一些实施方式中,免疫细胞是巨噬细胞。在一些实施方式中,T细胞是细胞毒性T细胞。在一些实施方式中,T细胞是CD8阳性T细胞。在一些实施方式中,Fc区引发抗体依赖性细胞细胞毒性(ADCC)。在一些实施方式中,Fc区引发补体依赖性细胞毒性(CDC)。

[0169] 在一些实施方式中,Fc区包括Ig CH2结构域。在一些实施方式中,Fc区包括Ig重链CH2结构域。在一些实施方式中,Fc区包括Ig CH3结构域。在一些实施方式中,Fc区包括Ig重链CH3结构域。在一些实施方式中,Fc区包括下列或由下列组成:Ig CH2结构域和Ig CH3结构域两者。在一些实施方式中,Fc区包括下列或由下列组成:Ig重链CH2和Ig重链CH3结构域两者。在一些实施方式中,第一链包括Fc区的第一部分,并且第二链包括Fc区的第二部分。在一些实施方式中,第一部分包括CH2结构域、CH3结构域或两者。在一些实施方式中,第二

部分包括CH2结构域、CH3结构域或两者。在一些实施方式中,Fc区的第一部分和Fc区的第二部分的界面(interface)产生功能性Fc区。在一些实施方式中,界面包括接触。在一些实施方式中,界面包括相邻定位。在一些实施方式中,界面包括本发明蛋白质复合物的形成。在一些实施方式中,界面包括第一和第二二聚化结构域的二聚化。在一些实施方式中,CH2结构域是Ig CH2结构域。在一些实施方式中,CH2结构域是重链CH2结构域。在一些实施方式中,CH3结构域是Ig CH3结构域。在一些实施方式中,CH3结构域是重链CH3结构域。

[0170] 在一些实施方式中,CH2结构域包括氨基酸序列SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK (SEQ ID NO:29)。在一些实施方式中,CH2结构域包括氨基酸序列DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK (SEQ ID NO:13)。在一些实施方式中,CH2结构域由SEQ ID NO:29组成。在一些实施方式中,SEQ ID NO:29是IgG1 CH2结构域。在一些实施方式中,CH2结构域包括氨基酸序列SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK (SEQ ID NO:30)。在一些实施方式中,CH2结构域由SEQ ID NO:30组成。在一些实施方式中,SEQ ID NO:30是IgG2 CH2结构域。在一些实施方式中,CH2结构域包括氨基酸序列SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK (SEQ ID NO:31)。在一些实施方式中,CH2结构域由SEQ ID NO:31组成。在一些实施方式中,SEQ ID NO:31是IgG4 CH2结构域。在一些实施方式中,CH2结构域包括氨基酸序列SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTK (SEQ ID NO:32)。在一些实施方式中,CH2结构域由SEQ ID NO:32组成。在一些实施方式中,SEQ ID NO:32是IgG3 CH2结构域。

[0171] 在一些实施方式中,CH3结构域包括氨基酸序列GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:33)。在一些实施方式中,CH3结构域包括氨基酸序列GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:62)。在一些实施方式中,CH3结构域由SEQ ID NO:33组成。在一些实施方式中,CH3结构域由SEQ ID NO:62组成。在一些实施方式中,SEQ ID NO:33是IgG1 CH3结构域。在一些实施方式中,SEQ ID NO:62是IgG1 CH3结构域。在一些实施方式中,SEQ ID NO:33序列是主要存在于欧洲和美洲血统的人中的序列。在一些实施方式中,SEQ ID NO:62是主要存在于亚洲血统的人中的序列。在一些实施方式中,CH3结构域包括氨基酸序列GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTTPML DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:34)。在一些实施方式中,CH3结构域由SEQ ID NO:34组成。在一些实施方式中,SEQ ID NO:34是IgG2 CH3结构域。在一些实施方式中,CH3结构域包括氨基酸序列GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:35)。在一些实施方式中,CH3结构域由SEQ ID NO:35组成。在一些实施方式中,SEQ ID NO:35是IgG4 CH3结构域。在一些实施方式中,CH3结构域包括氨基酸序列GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPML DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEAL

HNRFTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:36)。在一些实施方式中,CH3结构域由SEQ ID NO:36组成。在一些实施方式中,SEQ ID NO:36是IgG3 CH3结构域。

[0172] 在一些实施方式中,Fc包括突变。在一些实施方式中,CH3结构域包括突变。在一些实施方式中,第一CH3结构域包括第一突变。在一些实施方式中,第二CH3结构域包括第二突变。在一些实施方式中,CH2结构域包括突变。在一些实施方式中,第一CH2结构域包括第一突变。在一些实施方式中,第二CH2结构域包括第二突变。在一些实施方式中,CH2和CH3结构域同时包括突变。在一些实施方式中,第一CH2结构域和第一CH3结构域各自包括第一突变。在一些实施方式中,第二CH2结构域和第二CH3结构域各自包括第二突变。在一些实施方式中,突变抑制第一多肽链的同二聚化。在一些实施方式中,第一突变抑制第一多肽链的同二聚化。在一些实施方式中,突变抑制第二多肽链的同二聚化。在一些实施方式中,第二突变抑制第二多肽链的同二聚化。在一些实施方式中,突变允许异二聚化。在一些实施方式中,突变允许第一和第二链的异二聚化。在某些实施方式中,允许是促进。在一些实施方式中,允许是增强。

[0173] 促进重链异二聚化和/或抑制同二聚化的突变是本领域公知的。任何这样的突变或改变都可用于构建本发明的多肽。在一些实施方式中,来自IgG的区域被来自IgA的区域置换。在一些实施方式中,来自TCRa的区域被插入第一CH3结构域,并且来自TCRb的区域被插入第二CH3结构域。在一些实施方式中,突变是来自TCR的区域的插入。在一些实施方式中,TCR选自TCRa和TCRb。在一些实施方式中,突变是来自不同Ig的区域的插入。这些突变的实例可见于表1。在一些实施方式中,突变选自表1中的突变。在一些实施方式中,第一突变选自表1的行和第二列中提供的突变组,并且第二突变是表1的同一行第三列中提供的突变组。除非另有说明,表1中的突变提供有IgG1的Kabat编号;相应突变可在其它IG中产生,并且具体是在其它IgG中。在一些实施方式中,第一突变是T366Y,并且第二突变是Y407T。在一些实施方式中,第一突变是S354C和T366W,并且第二突变是Y349C、T366S、L368A以及Y407V。在一些实施方式中,第一突变是S364H和F405A,并且第二突变是Y349T和T392F。在一些实施方式中,第一突变是T350V, L351Y, F405A, 以及Y407V, 并且第二突变是T350V, T366L, K392L, 以及T394W。在一些实施方式中,第一突变是K392D, 以及K409D, 并且第二突变是E356K, 以及D399K。在一些实施方式中,第一突变是D221E, P228E, 以及L368E, 并且第二突变是D221R, P228R, 以及K409R。在一些实施方式中,第一突变是K360E, 以及K409W, 并且第二突变是Q347R, D399V, 以及F405T。在一些实施方式中,第一突变是K360E, K409W, 以及Y349C, 并且第二突变是Q347R, D399V, F405T, 以及S354C。在一些实施方式中,第一突变是F405L, 并且第二突变是K409R。在一些实施方式中,第一突变是K360D, D399M, 以及Y407A, 并且第二突变是E345R, Q347R, T366V, 以及K409V。在一些实施方式中,第一突变是Y349S, K370Y, T366M, 以及K409V, 并且第二突变是E356G, E357D, S364Q, 以及Y407A。在一些实施方式中,第一突变是T366K, 并且第二突变选自C351D, Y349E, Y349D, L368E, L368D, Y349E和R355E, Y349E和R355D, Y349D和R355E, 以及Y349D和R355D。在一些实施方式中,第一突变是T366K和C351K, 并且第二突变选自C351D, Y349E, Y349D, L368E, L368D, Y349E和R355E, Y349E和R355D, Y349D和R355E, 以及Y349D和R355D。在一些实施方式中,第一突变是L351D和L368E, 并且第二突变是L351K和T366K。在一些实施方式中,第一突变是L368D和K370S, 并且第二突变是E357Q和S364K。在一些实施方式中,第一突变是T366W, 并且第二突变是T366S, L368A, 以及Y407V。在

一些实施方式中,Ig是IgG2,并且第一突变是C223E,P228E,以及L368E,并且第二突变是C223R,E225R,P228R,以及K409R。在一些实施方式中,第一突变是S354C或T366W,并且第二突变是Y349C,T366S,L368A,或Y407V。在一些实施方式中,第一突变是S364H或F405A,并且第二突变是Y349T或T392F。在一些实施方式中,第一突变是T350V,L351Y,F405A,或Y407V,并且第二突变是T350V,T366L,K392L,或T394W。在一些实施方式中,第一突变是K392D或K409D,并且第二突变是E356K或D399K。在一些实施方式中,第一突变是D221E,P228E,或L368E,并且第二突变是D221R,P228R,或K409R。在一些实施方式中,第一突变是K360E,或K409W,并且第二突变是Q347R,D399V,或F405T。在一些实施方式中,第一突变是K360E,K409W,或Y349C,并且第二突变是Q347R,D399V,F405T,或S354C。在一些实施方式中,第一突变是K360D,D399M,或Y407A,并且第二突变是E345R,Q347R,T366V,或K409V。在一些实施方式中,第一突变是Y349S,K370Y,T366M,或K409V,并且第二突变是E356G,E357D,S364Q,或Y407A。在一些实施方式中,第一突变是L351D或L368E,并且第二突变是L351K或T366K。在一些实施方式中,第一突变是L368D或K370S,并且第二突变是E357Q或S364K。在一些实施方式中,第一突变是T366W,并且第二突变是T366S,L368A,或Y407V。在一些实施方式中,Ig是IgG2,并且第一突变是C223E,P228E,或L368E,并且第二突变是C223R,E225R,P228R,或K409R。在一些实施方式中,CH3结构域包括下列或由下列组成:GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:46)。在一些实施方式中,CH3结构域包括下列或由下列组成:GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:47)。在一些实施方式中,CH3结构域包括下列或由下列组成:GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLYCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:48)。在一些实施方式中,CH3结构域包括下列或由下列组成:GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSLKTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:49)。

[0174] 表1:增强CH3结构域异二聚化并抑制同二聚化的突变。

	类别	CH3 结构域链 1	CH3 结构域链 2
1	杵 臼 结 构 (Knobs-into-holes) (Y-T)	T366Y	Y407T
2	杵臼结构 (CW-CSAV)	S354C, T366W	Y349C, T366S, L368A, Y407V
3	HA-TF	S364H, F405A	Y349T, T394F
4	ZW1 (VYAV-VLLW)	T350V, L351Y, F405A, Y407V	T350V, T366L, K392L, T394W
5	CH3 电荷对 (DD-KK)	K392D, K409D	E356K, D399K
6	铰 链 /CH3 电 荷 (EEE-RRR)	D221E, P228E, L368E	D221R, P228R, K409R
7	EW-RVT	K360E, K409W,	Q347R, D399V, F405T
8	EW-RVTS-S	K360E, K409W, Y349C	Q347R, D399V, F405T, S354C
9	(L-R)	F405L	K409R
10	7.8.60 (DMA-RRVV)	K360D, D399M, Y407A	E345R, Q347R, T366V, K409V
11	20.8.34 (SYMV-GDQA)	Y349S, K370Y, T366M, K409V	E356G, E357D, S364Q, Y407A
12	静电转向效应(Electrostatic steering effects)	366K 或 366K+ C351K	C351D 或 E 或 D——在 349, 368, 349, 或 349 +355 处
13	“DEKK”	L351D 和 L368E	L351K 和 T366K
14	XmAb	L368D/K370S	E357Q/S364K
15	KiH	T366W	T366S/L368A/Y407V
16	IgG2 铰 链 /CH3 电 荷 (EEE-RRRR)	IgG2: C223E, P228E, L368E	IgG2: C223R, E225R, P228R, K409R
17	SEED 体	IgG/A 嵌合体	IgG/A 嵌合体
18	BEAT	来自 TCRa 界面的残基	来自 TCRb 界面的残基

[0175] 在一些实施方式中,突变降低效应子功能。在一些实施方式中,效应子功能包括ADCC、CDC或两者。在一些实施方式中,降低的效应子功能包括降低的细胞毒性。在一些实施方式中,降低是废除。在一些实施方式中,Fc来自IgG1或IgG3,并且突变降低效应子功能。在一些实施方式中,Fc来自IgG1,并且包括降低效应子功能的至少一个突变。降低效应子功能的突变是本领域公知的,并且可使用任意此类突变。此类突变的实例可在Saunders, 2019,

“Conceptual approaches to modulating antibody effector functions and circulation half-life”Front Immunol., Jun 7;10:1296 (通过引用以其整体并入本文)中找到。

[0176] 本领域技术人员将会知晓IgG2和IgG4具有大大降低的效应子功能,并且本质上总体无细胞毒性。此外,还已知IgG4中S228P和L235E等突变甚至会将效应子功能降低得更多。此外,降低IgG1和IgG3的细胞毒性/效应子功能的突变也是本领域公知的。在一些实施方式中,IgG包括至少一个突变。在一些实施方式中,突变是多个突变。在一些实施方式中,突变降低细胞毒性。在一些实施方式中,突变增加稳定性。在一些实施方式中,突变减少聚集。在一些实施方式中,降低细胞毒性的多个突变包括LALA突变。在一些实施方式中,降低细胞毒性的多个突变包括PG-LALA突变。在一些实施方式中,突变是IgG1人重链的脯氨酸329突变为甘氨酸(P329G)。在一些实施方式中,P向G突变是SEQ ID NO:12的P109向G的突变。在一些实施方式中,突变是IgG1人重链的亮氨酸234向丙氨酸的突变(L234A)。在一些实施方式中,L向A突变是SEQ ID NO:12的L14向A的突变。在一些实施方式中,突变是IgG1人重链的亮氨酸235向丙氨酸的突变(L235A)。在一些实施方式中,L向A突变是SEQ ID NO:12的L15向A的突变。在一些实施方式中,多个突变包括SEQ ID NO:12的P109G、L14A和L15A。在一些实施方式中,多个突变包括SEQ ID NO:12的L14A和L15A。在一些实施方式中,多个突变包括IgG1人重链的P329G、L234A和L235A。在一些实施方式中,多个突变包括IgG1人重链的L234A和L235A。本领域技术人员将理解,平行突变也可在IgG3重链或非人IgG1的重链中进行。在一些实施方式中,降低细胞毒性的多个突变包括YTE突变。在一些实施方式中,突变是IgG1人重链的甲硫氨酸252向酪氨酸的突变(M252Y)。在一些实施方式中,M向Y突变是SEQ ID NO:12的M32向Y的突变。在一些实施方式中,突变是IgG1人重链的丝氨酸254向苏氨酸的突变(S254T)。在一些实施方式中,S向T突变是SEQ ID NO:12的S34向T的突变。在一些实施方式中,突变是IgG1人重链的苏氨酸256向谷氨酸的突变(T256E)。在一些实施方式中,T向E突变是SEQ ID NO:12的T36向E的突变。在一些实施方式中,多个突变包括SEQ ID NO:12的M32Y、S34T和T36E。在一些实施方式中,多个突变包括IgG1人重链的M252Y、S254T和T256E。在一些实施方式中,突变是IgG1人重链的天冬酰胺297(N297)的突变。在一些实施方式中,天冬酰胺突变为丙氨酸(N297A)。在一些实施方式中,天冬酰胺突变为谷氨酰胺(N297Q)。在一些实施方式中,天冬酰胺是SEQ ID NO:12的N77(N77A或N77Q)。本领域技术人员将理解,平行突变也可在IgG3重链或非人IgG1的重链中进行。将理解的是,本文给出的数字参考的是包括可变结构域的全长IgG。这些数字可进行移位,从而对应于这些氨基酸在IgG的Fc部分内的位置。

第三和第四链

[0177] 在一些实施方式中,蛋白质复合物还包括第三多肽链。在一些实施方式中,第三多肽链包括重症肌无力自身抗体的蛋白质靶标的第三片段。在一些实施方式中,第三片段不同于第一片段。在一些实施方式中,第三片段不同于第二片段。在一些实施方式中,第三片段与第一片段相同。在一些实施方式中,第一片段与第二片段相同。在一些实施方式中,第三片段与第一和第二片段相同。在一些实施方式中,相同是相同的序列。在一些实施方式中,不同是不同的序列。

[0178] 在一些实施方式中,第三多肽还包括第三二聚化结构域。在一些实施方式中,第一

多肽还包括第四二聚化结构域。在一些实施方式中,第三和第四二聚化结构域能够彼此二聚化。在一些实施方式中,第三和第四二聚化结构域被配置成彼此二聚化。在一些实施方式中,第三二聚化结构域不被配置成与第一二聚化结构域二聚化。在一些实施方式中,第三二聚化结构域不被配置成与第二二聚化结构域二聚化。在一些实施方式中,第四二聚化结构域不被配置成与第一二聚化结构域二聚化。在一些实施方式中,第四二聚化结构域不被配置成与第二二聚化结构域二聚化。在一些实施方式中,被配置成二聚化是能够二聚化。在一些实施方式中,第三和第四二聚化结构域不同于第一和第二二聚化结构域。在一些实施方式中,第一和第二二聚化结构域是铰链结构域,并且第三和第四二聚化结构域是CH1/CL结构域。在一些实施方式中,第一和第二二聚化结构域是CH1/CL结构域,并且第三和第四二聚化结构域是铰链结构域。

[0179] 在一些实施方式中,蛋白质复合物还包括第四多肽链。在一些实施方式中,第四多肽链包括重症肌无力自身抗体的蛋白质靶标的第四片段。在一些实施方式中,第四片段不同于第一片段。在一些实施方式中,第四片段不同于第二片段。在一些实施方式中,第四片段不同于第三片段。在一些实施方式中,第四片段与第一片段相同。在一些实施方式中,第四片段与第二片段相同。在一些实施方式中,第四片段与第三片段相同。在一些实施方式中,第四片段与第一、第二和第三片段相同。在一些实施方式中,第一、第二和第三片段都相同。在一些实施方式中,第一、第二、第三和第四片段都不同。在一些实施方式中,相同的是相同的序列。在一些实施方式中,不同是不同的序列。在一些实施方式中,不同是来自不同的蛋白质。在一些实施方式中,不同是来自相同的蛋白质但包括不同的序列。在一些实施方式中,不同是来自相同的蛋白质但来自蛋白质的不同区域。在一些实施方式中,第一、第二、第三和第四蛋白质中的至少两个是单个蛋白质复合物的一部分。在一些实施方式中,蛋白质复合物是哺乳动物中的复合物。在一些实施方式中,蛋白质复合物是人类中的复合物。

[0180] 在一些实施方式中,第四多肽还包括第五二聚化结构域。在一些实施方式中,第二多肽还包括第六二聚化结构域。在一些实施方式中,第五和第六二聚化结构域能够彼此二聚化。在一些实施方式中,第五和第六二聚化结构域被配置成彼此二聚化。在一些实施方式中,第五二聚化结构域不被配置成与第一二聚化结构域二聚化。在一些实施方式中,第五二聚化结构域不被配置成与第二二聚化结构域二聚化。在一些实施方式中,第五二聚化结构域不被配置成与第三二聚化结构域二聚化。在一些实施方式中,第五二聚化结构域不被配置成与第四二聚化结构域二聚化。在一些实施方式中,第六二聚化结构域不被配置成与第一二聚化结构域二聚化。在一些实施方式中,第六二聚化结构域不被配置成与第二二聚化结构域二聚化。在一些实施方式中,第六二聚化结构域不被配置成与第三二聚化结构域二聚化。在一些实施方式中,第六二聚化结构域不被配置成与第四二聚化结构域二聚化。在一些实施方式中,第五和第六二聚化结构域不同于第一和第二二聚化结构域。在一些实施方式中,第五和第六二聚化结构域不同于第三和第四二聚化结构域。在一些实施方式中,第一和第二二聚化结构域是铰链结构域,并且第三和第四二聚化结构域是CH1/CL结构域,并且第五和第六二聚化结构域是CH1/CL结构域。在一些实施方式中,第一和第二二聚化结构域是CH1/CL结构域,第三和第四二聚化结构域是铰链结构域,并且第五和第六二聚化结构域是铰链结构域。在一些实施方式中,第一多肽和第二多肽不同时包括CH1结构域。在一些实施方式中,第一多肽和第二多肽同时包括CH1结构域。第一多肽和第二多肽同时包括CL结构

域。在一些实施方式中,第一多肽和第二多肽不同时包括CL结构域。在一些实施方式中,第一多肽包括CH1结构域,并且第二多肽包括CL结构域。在一些实施方式中,第三多肽包括CL结构域,并且第四多肽包括CH1结构域。在一些实施方式中,第一多肽包括CL结构域,并且第二多肽包括CH1结构域。在一些实施方式中,第三多肽包括CH1结构域,并且第四多肽包括CL结构域。

[0181] 在一些实施方式中,第三和第四二聚化结构域包括允许第三和第四二聚化结构域二聚化并抑制第三二聚化结构域与第五、第六或这两个二聚化结构域二聚化的突变。在一些实施方式中,第三和第四二聚化结构域包括允许第三和第四二聚化结构域二聚化并抑制第四二聚化结构域与第五、第六或这两个二聚化结构域二聚化的突变。在一些实施方式中,第五和第六二聚化结构域包括允许第五和第六二聚化结构域二聚化并抑制第五二聚化结构域与第三、第四或这两个二聚化结构域二聚化的突变。在一些实施方式中,第五和第六二聚化结构域包括允许第五和第六二聚化结构域二聚化并抑制第六二聚化结构域与第三、第六或这两个二聚化结构域二聚化的突变。

可选构型

[0182] 在一些实施方式中,组合物包括多肽链,多肽链包括:重症肌无力自身抗体的第一蛋白质靶标的片段或其类似物或衍生物;和重症肌无力自身抗体的第二蛋白质靶标的片段或其类似物或衍生物。在一些实施方式中,多肽链是单个多肽链。在一些实施方式中,单链包括第一蛋白质的片段和第二蛋白质的片段。在一些实施方式中,多肽链还包括重症肌无力自身抗体的第三蛋白质靶标的片段或其类似物或衍生物。在一些实施方式中,多肽链还包括重症肌无力自身抗体的第四蛋白质靶标的片段或其类似物或衍生物。在一些实施方式中,多肽链还包括Fc区。

[0183] 在一些实施方式中,重症肌无力自身抗体的第一蛋白质靶标的片段或其类似物或衍生物通过连接体与重症肌无力自身抗体的第二蛋白质靶标的片段或其类似物或衍生物分隔。在一些实施方式中,重症肌无力自身抗体的第三蛋白质靶标的片段或其类似物或衍生物通过连接体与重症肌无力自身抗体的第一或第二蛋白质靶标的片段或其类似物或衍生物分隔。在一些实施方式中,重症肌无力自身抗体的第四蛋白质靶标的片段或其类似物或衍生物通过连接体与重症肌无力自身抗体的第一、第二或第三蛋白质靶标的片段或其类似物或衍生物分隔。在一些实施方式中,片段通过连接体与Fc区分隔。

[0184] 在一些实施方式中,片段和二聚化结构域通过连接体分隔。在一些实施方式中,二聚化结构域和Fc区通过连接体分隔。在一些实施方式中,片段和Fc区通过连接体分隔。在一些实施方式中,连接体是氨基酸连接体。在一些实施方式中,连接体是化学连接体。在一些实施方式中,连接体是肽连接体。在一些实施方式中,连接体是键。在一些实施方式中,键是肽键。在一些实施方式中,键是氨基酸键。在一些实施方式中,连接体是柔性连接体。连接体是本领域公知的,并且可使用任意连接体。在一些实施方式中,连接体是化学连接体。

[0185] 在一些实施方式中,缀合是连接。在一些实施方式中,缀合是通过键缀合。在一些实施方式中,缀合物是直接缀合的。在一些实施方式中,缀合物通过连接体缀合。

[0186] 在一些实施方式中,连接体的长度足以抑制链的不同区段之间的空间位阻。在一些实施方式中,连接体的长度足以抑制缀合物的不同区段之间的空间位阻。在一些实施方式中,连接体的长度足以允许抗体与片段结合而不存在来自链的其它区段的空间位阻。在

一些实施方式中,连接体的长度足以允许抗体与片段结合而不存在来自缀合物的其它区段的空间位阻。在一些实施方式中,连接体的长度足以允许细胞与片段结合而不存在来自链的其它区段的空间位阻。在一些实施方式中,连接体的长度足以允许细胞与片段结合而不存在来自缀合物的其它区段的空间位阻。在一些实施方式中,连接体的长度为至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个氨基酸。每种可能性代表本发明的单独的实施方式。在一些实施方式中,连接体的长度为至少1个氨基酸。在一些实施方式中,连接体的长度为至少5个氨基酸。在一些实施方式中,连接体的长度为至少10个氨基酸。在一些实施方式中,连接体的长度为至少15个氨基酸。在一些实施方式中,连接体的长度为至多10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90或100个氨基酸。每种可能性代表本发明的单独的实施方式。在一些实施方式中,连接体的长度为至多10个氨基酸。在一些实施方式中,连接体的长度为至多20个氨基酸。在一些实施方式中,连接体的长度为至多50个氨基酸。在一些实施方式中,连接体的长度为至多100个氨基酸。

[0187] 在一些实施方式中,连接体是柔性连接体。在一些实施方式中,连接体是GS连接体。在一些实施方式中,连接体是含甘氨酸-丝氨酸的连接体。在一些实施方式中,连接体由甘氨酸和丝氨酸残基组成。在一些实施方式中,连接体包括GGGS (SEQ ID NO:38)。在一些实施方式中,连接体包括GGGGS (SEQ ID NO:136)。在一些实施方式中,连接体由SEQ ID NO:38组成。在一些实施方式中,连接体由SEQ ID NO:136组成。在一些实施方式中,连接体包括(GGGS) n ,其中 n 是整数。在一些实施方式中,连接体包括(GGGGS) n ,其中 n 是整数。在一些实施方式中,连接体由(GGGS) n 组成,其中 n 是整数。在一些实施方式中,连接体由(GGGGS) n 组成,其中 n 是整数。在一些实施方式中,连接体包括GSAGSAAGSGEF (SEQ ID NO:45)。在一些实施方式中,连接体包括(GGGS) n GS或由其组成,其中 n 是整数。在一些实施方式中, n 选自1、2、3、4、5和6。每种可能性代表本发明的单独的实施方式。在一些实施方式中, n 是6。在一些实施方式中,连接体是刚性连接体。在一些实施方式中,刚性连接体包括EAAAK (SEQ ID NO:137)。在一些实施方式中,刚性连接体由SEQ ID NO:137组成。在一些实施方式中,刚性连接体包括(EAAAK) n ,其中 n 是整数。在一些实施方式中,刚性连接体由(EAAAK) n 组成,其中 n 是整数。在一些实施方式中,刚性连接体包括(EAAAK) n GS,其中 n 是整数。在一些实施方式中,刚性连接体由(EAAAK) n GS组成,其中 n 是整数。在一些实施方式中,刚性连接体包括(EAAAK) n GGGS,其中 n 是整数。在一些实施方式中,刚性连接体由(EAAAK) n GGGS组成,其中 n 是整数。在一些实施方式中, n 选自1、2、3、4、5、6、7、8、9和10。每种可能性代表本发明的单独的实施方式。在一些实施方式中, n 是2。在一些实施方式中, n 是3。在一些实施方式中, n 是4。在一些实施方式中, n 是5。

[0188] 在一些实施方式中,二聚化结构域在片段的C-末端。在一些实施方式中,片段在二聚化结构域的C-末端。在一些实施方式中,Fc区在片段的C-末端。在一些实施方式中,片段在Fc区的C-末端。在一些实施方式中,二聚化结构域在Fc区的C-末端。在一些实施方式中,Fc区在二聚化结构域的C-末端。在一些实施方式中,二聚化结构域在片段的N-末端。在一些实施方式中,片段在二聚化结构域的N-末端。在一些实施方式中,Fc区在片段的N-末端。在一些实施方式中,片段在Fc区的N-末端。在一些实施方式中,二聚化结构域在Fc区的N-末端。在一些实施方式中,Fc区在二聚化结构域的N-末端。

[0189] 在一些实施方式中,表位跨越至少两个片段。在一些实施方式中,表位跨越第一和

第二片段。在一些实施方式中,表位跨越第一和第三片段。在一些实施方式中,表位跨越第一和第四片段。在一些实施方式中,表位跨越第二和第三片段。在一些实施方式中,表位跨越第二和第四片段。在一些实施方式中,表位跨越第三和第四片段。在一些实施方式中,表位跨越两个蛋白质。在一些实施方式中,表位跨越蛋白质复合物中的两个蛋白质。在一些实施方式中,表位跨越三个片段。在一些实施方式中,表位跨越三个蛋白质。在一些实施方式中,表位跨越四个片段。在一些实施方式中,表位跨越四个蛋白质。在一些实施方式中,表位是复合表位。在一些实施方式中,表位是B细胞受体 (BCR) 特异性表位。

[0190] 在一些实施方式中,所有三个片段均来自AChRa。在一些实施方式中,所有三个片段均来自AChRb。在一些实施方式中,所有三个片段均来自AChRg。在一些实施方式中,所有三个片段均来自AChRd。在一些实施方式中,所有三个片段均来自AChRe。在一些实施方式中,三个片段选自AChRa、AChRb、AChRg、AChRd和AChRe。在一些实施方式中,三个片段包括来自AChRa、AChRb、AChRg、AChRd和AChRe的两种不同的蛋白质。在一些实施方式中,三个片段包括来自AChRa、AChRb、AChRg、AChRd和AChRe的三种不同蛋白质。

[0191] 在一些实施方式中,所有四个片段均来自AChRa。在一些实施方式中,所有四个片段均来自AChRb。在一些实施方式中,所有四个片段均来自AChRg。在一些实施方式中,所有四个片段均来自AChRd。在一些实施方式中,所有四个片段均来自AChRe。在一些实施方式中,四个片段选自AChRa、AChRb、AChRg、AChRd和AChRe。在一些实施方式中,四个片段包括来自AChRa、AChRb、AChRg、AChRd和AChRe的两种不同的蛋白质。在一些实施方式中,四个片段包括来自AChRa、AChRb、AChRg、AChRd和AChRe的三种不同的蛋白质。在一些实施方式中,四个片段包括来自AChRa、AChRb、AChRg、AChRd和AChRe的四种不同的蛋白质。

[0192] 在一些实施方式中,第一多肽包括与ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 50) 连接的片段。在一些实施方式中,第二多肽包括与SEQ ID NO: 50连接的片段。在一些实施方式中,第一和第二多肽同时包括与SEQ ID NO: 50连接的片段。

[0193] 在一些实施方式中,第一多肽包括与ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 51) 连接的片段。在一些实施方式中,第二多肽包括与SEQ ID NO: 51连接的片段。在一些实施方式中,第一和第二多肽同时包括与SEQ ID NO: 51连接的片段。

[0194] 在一些实施方式中,第一多肽包括与ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:

52) 连接的片段。在一些实施方式中,第二多肽包括与SEQ ID NO:52连接的片段。在一些实施方式中,第一和第二多肽同时包括与SEQ ID NO:52连接的片段。

[0195] 在一些实施方式中,第一多肽包括与ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLYCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 53) 连接的片段。在一些实施方式中,第二多肽包括与SEQ ID NO:53连接的片段。在一些实施方式中,第一和第二多肽同时包括与SEQ ID NO:53连接的片段。

[0196] 在一些实施方式中,第一多肽包括与ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFLTSLKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 54) 连接的片段。在一些实施方式中,第二多肽包括与SEQ ID NO:54连接的片段。在一些实施方式中,第一和第二多肽同时包括与SEQ ID NO:54连接的片段。

[0197] 在一些实施方式中,第一多肽包括与AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 55) 连接的片段。在一些实施方式中,第二多肽包括与SEQ ID NO:55连接的片段。在一些实施方式中,第一和第二多肽同时包括与SEQ ID NO:55连接的片段。

[0198] 在一些实施方式中,第一多肽包括与GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 56) 连接的片段。在一些实施方式中,第二多肽包括与SEQ ID NO:56连接的片段。在一些实施方式中,第一和第二多肽同时包括与SEQ ID NO:56连接的片段。

[0199] 在一些实施方式中,第一多肽包括与AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFLVSLKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 57) 连接的片段。在一些实施方式中,第二多肽包括与SEQ ID NO:57连接的片段。在一些实施方式中,第一和第二多肽同时包括与SEQ ID NO:57连接的片段。

[0200] 在一些实施方式中,第一多肽包括与AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPPC

PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 58) 连接的片段。在一些实施方式中,第二多肽包括与SEQ ID NO:58连接的片段。在一些实施方式中,第一和第二多肽同时包括与SEQ ID NO:58连接的片段。

[0201] 在一些实施方式中,第一多肽包括与GQPKANPTVTFLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECSDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:59) 连接的片段。在一些实施方式中,第二多肽包括与SEQ ID NO:59连接的片段。在一些实施方式中,第一和第二多肽同时包括与SEQ ID NO:59连接的片段。

[0202] 在一些实施方式中,第一多肽包括与GQPKANPTVTFLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECSDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:60) 连接的片段。在一些实施方式中,第二多肽包括与SEQ ID NO:60连接的片段。在一些实施方式中,第一和第二多肽同时包括与SEQ ID NO:60连接的片段。

[0203] 在一些实施方式中,第三多肽包括与SEQ ID NO:23连接的片段。在一些实施方式中,第三多肽包括与SEQ ID NO:24连接的片段。在一些实施方式中,第三多肽包括与SEQ ID NO:25连接的片段。在一些实施方式中,第三多肽包括与SEQ ID NO:26连接的片段。在一些实施方式中,第三多肽包括与SEQ ID NO:27连接的片段。在一些实施方式中,第三多肽包括与SEQ ID NO:28连接的片段。在一些实施方式中,第四多肽包括与SEQ ID NO:23连接的片段。在一些实施方式中,第四多肽包括与SEQ ID NO:24连接的片段。在一些实施方式中,第四多肽包括与SEQ ID NO:25连接的片段。在一些实施方式中,第四多肽包括与SEQ ID NO:26连接的片段。在一些实施方式中,第四多肽包括与SEQ ID NO:27连接的片段。在一些实施方式中,第四多肽包括与SEQ ID NO:28连接的片段。

[0204] 在一些实施方式中,多肽链包括:包括增加溶解性的突变并通过连接体与轻链CL κ 结构域连接的AChRa的片段。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:氨基酸序列 SEHETRLVAKLFKDYSSVVRPVEDHRQVVEVTGLQLIQLINVDEVNQIVTTNVRKQQWVDYNLKNPDDYGGVK KIHIPSEKIWRPDLVLNNADGDFAIKFTKVLLQYTGHITWTPPAIFKSYCDVSGVDTESGATNCSMKLGTWTYD GSVVAINPESDQPDLSNFMESGEWVIKESRGWKHSVTYSCCPDTPYLDITYHFVMQRLPGGGGSGGGGSGGGGSAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:64)。

[0205] 在一些实施方式中,多肽链包括:包括增加溶解性的突变并通过连接体与包括CH2和CH3结构域的重链连接的AChRa的片段,其中CH3结构域包括抑制多肽链同二聚化的突变。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:92的氨基酸序列。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:95的氨基酸序列。在一些实施方式中,多

肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:97的氨基酸序列。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:98的氨基酸序列。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:99的氨基酸序列。将理解的是,除非另有明确说明,上述CH2和CH3结构域以及所有其它CH2/CH3结构域均来自IgG1。

[0206] 在一些实施方式中,多肽链包括:包括增加溶解性的突变并通过连接体与包括CH1、CH2和CH3结构域的重链连接的AChRb的片段。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:氨基酸序列SEAEGRLREKLFSGYDSSVRPAREVGDRVRVSVGLILAQLISLNEKDEEMSTKVYLDLEWTDYRLSWDPAEHDGIDSLRITAESVWLPDVLLNNNDGNFDVALDISVVVSSDGSVRWQPPGIYRSSCDVSGVDTESGATNCTMFSSYSYDSSEVSLQTGLGPDGQGHQEIHIHEGTFIENGQWEIIHKPSRLIQPPGDPGRGGREGQRQEVIFYLIIRRKPGGGGSGGGGSGGGGSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:65)。

[0207] 在一些实施方式中,多肽链包括:包括增加溶解性的突变并通过连接体与包括CH1、铰链、CH2和CH3结构域的重链连接的AChRb的片段。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:氨基酸序列SEQ ID NO:65。

[0208] 在一些实施方式中,蛋白质复合物包括两种多肽,各自包括SEQ ID NO:65。在一些实施方式中,蛋白质复合物包括两种多肽,各自由SEQ ID NO:65组成。在一些实施方式中,蛋白质复合物包括:第一多肽链,其包括或由SEQ ID NO:65组成;和第二多肽链,其包括或由SEQ ID NO:64组成。在一些实施方式中,蛋白质复合物还包括:第三多肽链,其包括或由SEQ ID NO:65组成。在一些实施方式中,蛋白质复合物还包括:第四多肽链,其包括或由SEQ ID NO:64组成。

[0209] 在一些实施方式中,多肽链包括:包括增加溶解性的突变并通过连接体与包括CH1、铰链、CH2和CH3结构域的重链连接的AChRb的片段,其中CH3结构域包括抑制多肽链同二聚化的突变。在一些实施方式中,抑制同二聚化的突变是T366W。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:氨基酸序列SEAEGRLREKLFSGYDSSVRPAREVGDRVRVSVGLILAQLISLNEKDEEMSTKVYLDLEWTDYRLSWDPAEHDGIDSLRITAESVWLPDVLLNNNDGNFDVALDISVVVSSDGSVRWQPPGIYRSSCDVSGVDTESGATNCTMFSSYSYDSSEVSLQTGLGPDGQGHQEIHIHEGTFIENGQWEIIHKPSRLIQPPGDPGRGGREGQRQEVIFYLIIRRKPGGGGSGGGGSGGGGSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:66)。

[0210] 在一些实施方式中,多肽链包括:包括增加溶解性的突变并通过连接体与包括CH1、铰链、CH2和CH3结构域的重链连接的AChRg的片段,其中CH3结构域包括抑制多肽链同二聚化的突变。在一些实施方式中,抑制同二聚化的突变是T366S、L368A和Y407V。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:氨基酸序列RNQEERLLADLMQNYDPNLRPAERDSQVNVN

LKLTLTNLISLNEREEALTTNVWIEMQWCDYRLRWDPRDYEGWLVRVPSTMVWRPDIVLENNVDGVFEVALYCNV
LVSPDGCIIYWLPPAIFRSACDVSGVDTESGATNCSLIFQSQTYSTNEIDLQLSQEDGQTIEWIFIDPEAFTENGEW
AIQHRPAKMLLDPAAPAQEAGHQKVVFYLLIQRKPGGGGSGGGGSGGGGSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(SEQ ID NO:67)。

[0211] 在一些实施方式中,多肽链包括:包括增加溶解性的突变和减少聚集的至少一个突变并通过连接体与包括CH2和CH3结构域的重链连接的AChRg的片段,其中CH3结构域包括抑制多肽链同二聚化的突变。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:93的氨基酸序列。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:100的氨基酸序列。

[0212] 在一些实施方式中,多肽链包括:包括增加溶解性的突变和减少聚集的至少一个突变并通过连接体与包括CH2和CH3结构域的重链连接的AChRd的片段,其中CH3结构域包括抑制多肽链同二聚化的突变。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:98的氨基酸序列。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:102的氨基酸序列。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:103的氨基酸序列。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:106的氨基酸序列。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:107的氨基酸序列。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:130的氨基酸序列。在一些实施方式中,组合物包括:第一链,其包括或由SEQ ID NO:92组成;和第二链,其包括或由SEQ ID NO:93组成。在一些实施方式中,组合物包括:第一链,其包括或由SEQ ID NO:92组成;和第二链,其包括或由SEQ ID NO:102组成。在一些实施方式中,组合物包括:第一链,包括或由SEQ ID NO:103组成;和第二链,其包括或由SEQ ID NO:102组成。本领域技术人员将理解,在此实施方式中第一多肽包括T366W突变,并且第二多肽包括T366S/L368A/Y407V突变,但是突变可转换到相对链,而该分子仍然是可操作的。

[0213] 在一些实施方式中,多肽链包括:包括增加溶解性的突变的AChRa的片段,通过GS连接体,与AChRg连接,AChRg包括增加溶解性的突变和减少聚集的至少一个突变并通过连接体与包括CH2和CH3结构域的重链连接。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:94的氨基酸序列。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:104的氨基酸序列。

[0214] 在一些实施方式中,多肽链包括:包括增加溶解性的突变的AChRa的片段,通过GS连接体,与AChRg连接,AChRg包括增加溶解性的突变和减少聚集的至少一个突变并通过连接体与包括CH2和CH3结构域的重链连接,其中CH3结构域包括抑制多肽链同二聚化的突变。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:95的氨基酸序列。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:105的氨基酸序列。

[0215] 在一些实施方式中,多肽链包括:包括增加溶解性的突变的AChRa的片段,通过GS连接体,与AChRd连接,AChRd包括增加溶解性的突变和减少聚集的至少一个突变并通过连

接体与包括CH2和CH3结构域的重链连接,其中CH3结构域包括抑制多肽链同二聚化的突变。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:96的氨基酸序列。在一些实施方式中,组合物包括:第一链,其包括或由SEQ ID NO:95组成;和第二链,其包括或由SEQ ID NO:96组成。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:106的氨基酸序列。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:107的氨基酸序列。在一些实施方式中,组合物包括:第一链,其包括或由SEQ ID NO:105组成;和第二链,其包括或由SEQ ID NO:106组成。在一些实施方式中,组合物包括:第一链,其包括或由SEQ ID NO:105组成;和第二链,其包括或由SEQ ID NO:107组成。本领域技术人员将理解,在此实施方式中第一多肽包括T366W突变,并且第二多肽包括T366S/L368A/Y407V突变,但突变可转换到相对链,而该分子仍然是可操作的。

[0216] 在一些实施方式中,多肽链包括:包括增加溶解性的突变和减少聚集的突变的AChRa的片段,通过GS连接体,与AChRg连接,AChRg包括增加溶解性的突变和减少聚集的至少一个突变并通过连接体与包括CH2和CH3结构域的重链连接,其中CH3结构域包括抑制多肽链同二聚化的突变。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:97的氨基酸序列。在一些实施方式中,多肽链包括:AChRa的片段,其包括增加溶解性的突变和减少聚集的突变,通过GS连接体与AChRg连接,AChRg包括增加溶解性的突变和减少聚集的至少一个突变并通过连接体与包括CH2和CH3结构域的重链连接。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:114的氨基酸序列。

[0217] 在一些实施方式中,多肽链包括:包括增加溶解性的突变和减少聚集的至少一个突变并通过连接体与包括CH2和CH3结构域的重链连接的AChRd的片段,其中CH3结构域包括抑制多肽链同二聚化的突变。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:99的氨基酸序列。在一些实施方式中,组合物包括:第一链,其包括或由SEQ ID NO:97组成;和第二链,其包括或由SEQ ID NO:98组成。本领域技术人员将理解,在此实施方式中第一多肽包括T366W突变,并且第二多肽包括T366S/L368A/Y407V突变,但突变可转换到相对链,并且该分子仍然是可操作的。

[0218] 在一些实施方式中,多肽链包括:包括增加溶解性的突变和减少聚集的突变的AChRa的片段,通过GS连接体,与AChRd连接,AChRd包括增加溶解性的突变和减少聚集的至少一个突变并通过连接体与包括CH2和CH3结构域的重链连接,其中CH3结构域包括抑制多肽链同二聚化的突变。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:99的氨基酸序列。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:106的氨基酸序列。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:107的氨基酸序列。

[0219] 在一些实施方式中,多肽链包括:包括增加溶解性的突变和减少聚集的至少一个突变并通过连接体与包括CH2和CH3结构域的重链连接的AChRg的片段,其中CH3结构域包括抑制多肽链同二聚化的突变。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:100的氨基酸序列。在一些实施方式中,组合物包括:第一链,其包括或由SEQ ID NO:99组成;和第二链,其包括或由SEQ ID NO:100组成。在一些实施方式中,组合物包括:第一链,其包括或由SEQ ID NO:92组成;和第二链,其包括或由SEQ ID NO:102组成。在一些实施方式中,组合物包括:第一链,其包括或由SEQ ID NO:103组成;和第二链,其包括或由SEQ ID NO:100组成。在一些实施方式中,组合物包括:第一链,其包括或由SEQ ID NO:105组成;和

第二链,其包括或由SEQ ID NO:130组成。在一些实施方式中,组合物包括:第一链,其包括或由SEQ ID NO:105组成;和第二链,其包括或由SEQ ID NO:106组成。在一些实施方式中,组合物包括:第一链,其包括或由SEQ ID NO:105组成;和第二链,其包括或由SEQ ID NO:107组成。本领域技术人员将理解,在此实施方式中第一多肽包括T366W突变,并且第二多肽包括T366S/L368A/Y407V突变,但突变可转换到相对链,而该分子仍然是可操作的。

[0220] 在一些实施方式中,多肽链包括:包括增加溶解性的突变和减少聚集的至少一个突变的AChRg的片段,通过GS连接体,与包括增加溶解性的突变的AChRa连接,AChRa通过GS连接体,与AChRd连接,AChRd包括增加溶解性的突变和减少聚集的至少一个突变并通过连接体与包括CH2和CH3结构域的重链连接。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:108的氨基酸序列。在一些实施方式中,多肽链包括这样的片段:包括增加溶解性的突变和减少聚集的至少一个突变的AChRg,通过GS连接体,与包括增加溶解性的突变的AChRa连接,通过GS连接体,与包括增加溶解性的突变和减少聚集的至少一个突变的AChRg连接,并通过连接体与包括CH2和CH3结构域的重链连接。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:109的氨基酸序列。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:116的氨基酸序列。

[0221] 在一些实施方式中,多肽链包括:包括增加溶解性的突变和减少聚集的至少一个突变的AChRg的片段,通过GS连接体,与包括增加溶解性的突变和减少聚集的突变的AChRa连接,AChRa通过GS连接体,与包括增加溶解性的突变和减少聚集的至少一个突变并通过连接体与包括CH2和CH3结构域的重链连接的AChRg连接。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:115的氨基酸序列。

[0222] 在一些实施方式中,多肽链包括:包括增加溶解性的突变和减少溶解性的突变的AChRa的片段,通过GS连接体,与包括增加溶解性的突变和减少聚集的至少一个突变并通过连接体与包括CH2和CH3结构域的重链连接的AChRg连接。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:110的氨基酸序列。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:111的氨基酸序列。本领域技术人员将理解,在通过连接体分隔串联亚基的情况下,亚基的次序可如上文叙述那样或者可以转换。

[0223] 在一些实施方式中,多肽链包括:包括增加溶解性的突变的AChRa的片段,通过GS连接体,与包括增加溶解性的突变和减少聚集的至少一个突变并通过连接体与包括来自IgG4的CH2和CH3结构域的重链连接的AChRg连接。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:112的氨基酸序列。在一些实施方式中,在SEQ ID NO:92-111、114-116和124-126中的任一个中,来自IgG1的CH2和CH3结构域被来自IgG4的CH2和CH3结构域置换。将理解的是,所存在减少同二聚化的任何突变都将是保守的,并且也存在于IgG4 CH3中。

[0224] 在一些实施方式中,多肽链包括:包括增加溶解性的突变的AChRa的片段,通过GS连接体,与包括增加溶解性的突变和减少聚集的至少一个突变并通过连接体与包括包含降低效应子功能的突变的CH2和CH3的重链连接的AChRg连接。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:113的氨基酸序列。在一些实施方式中,在SEQ ID NO:92-111、114-116和124-126中的任一个中,CH2和CH3可包含降低效应子功能的突变。

[0225] 将理解的是,尽管在上述分子中提供了具体的连接体,但是可以使用任意连接体。在一些实施方式中,可以使用任意柔性连接体。在一些实施方式中,连接体是(GGGGS)₆连接

体。在一些实施方式中,两个亚基之间的连接体是(GGGGS)6连接体。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:117的氨基酸序列。在一些实施方式中,连接体是(GGGGS)3连接体。在一些实施方式中,CH2结构域的连接体是(GGGGS)3连接体。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:118的氨基酸序列。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:127的氨基酸序列。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:128的氨基酸序列。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:129的氨基酸序列。在一些实施方式中,连接体是(GGGGS)6GS连接体。在一些实施方式中,两个亚基之间的连接体是(GGGGS)6GS连接体。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:119的氨基酸序列。在一些实施方式中,可以使用任意柔性连接体。在一些实施方式中,连接体是(GGGGS)5连接体。在一些实施方式中,两个亚基之间的连接体是(GGGGS)5连接体。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:120的氨基酸序列。

[0226] 在一些实施方式中,连接体是刚性连接体。在一些实施方式中,两个亚基之间的连接体是刚性连接体。在一些实施方式中,连接体是(EAAAK)2GGGS连接体。在一些实施方式中,两个亚基之间的连接体是(EAAAK)2GGGS连接体。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:121的氨基酸序列。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:122的氨基酸序列。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:123的氨基酸序列。

[0227] 在一些实施方式中,多肽链包括CH2和CH3结构域,其通过GS连接体,与AChRg的片段连接,AChRg的片段包括增加溶解性的突变和减少聚集的至少一个突变并通过GS连接体与包括增加溶解性的突变和减少聚集的至少一个突变的AChRa连接。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:124的氨基酸序列。在一些实施方式中,多肽链包括CH2和CH3结构域,其通过GS连接体,与包括增加溶解性的突变和减少聚集的至少一个突变并通过GS连接体与包括增加溶解性的突变和减少聚集的至少一个突变的AChRg连接的AChRa的片段连接。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:SEQ ID NO:125的氨基酸序列。

[0228] 在一些实施方式中,蛋白质复合物包括:第一多肽,其包括或由SEQ ID NO:66组成;和第二多肽,其包括或由SEQ ID NO:67组成。本领域技术人员将理解,在此实施方式中包括AChRb的多肽包含T366W突变,并且包括AChRg的多肽包含T366S/L368A/Y407V,但突变可以转换到相对链,而该分子仍然是可操作的(参见例如SEQ ID NO:69)。在一些实施方式中,蛋白质复合物包括:第一多肽链,其包括或由SEQ ID NO:66组成;和第二多肽链,其包括或由SEQ ID NO:64组成。在一些实施方式中,蛋白质复合物包括:第一多肽链,其包括或由SEQ ID NO:67组成;和第二多肽链,其包括或由SEQ ID NO:64组成。在一些实施方式中,蛋白质复合物还包括:第一多肽,其包括或由SEQ ID NO:66组成;第二多肽,其包括或由SEQ ID NO:67组成;和第三多肽链,其包括或由SEQ ID NO:64组成。在一些实施方式中,蛋白质复合物还包括:第四多肽链,其包括或由SEQ ID NO:64组成。

[0229] 在一些实施方式中,多肽链包括:包括增加溶解性的突变并通过连接体与包括CH1、铰链、CH2和CH3结构域的重链连接的AChRe的片段,其中CH3结构域包括抑制多肽链同二聚化的突变。在一些实施方式中,抑制同二聚化的突变是T366S、L368A和Y407V。在一些实

施方式中,多肽包括下列或由下列组成:氨基酸序列KNEELRLYHHLFNNYDPGSRPVREPEDTVTIS LKVTLTNLISLNEKEETLTTSVWIGIDWQDYRLNYSKDDFGGIETLRVPSELVWLPEIVLENNIDGQFGVAYDANV LVYEGGSVTWLPPAIYRSVCDVSGVDTEGATNCSLIFRSQTYNAEEVEFTFAVDNDGKTINKIDIDTEAYTENGE WAIDFCPGVIRRHGGATDGPGETDVIYSLIIRRKPGGGGSGGGGSGGGGSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:68)。

[0230] 在一些实施方式中,蛋白质复合物包括:第一多肽,其包括或由SEQ ID NO:66组成;和第二多肽,其包括或由SEQ ID NO:68组成。本领域技术人员将理解,在此实施方式中包括AChRb的多肽包含T366W突变,并且包括AChRe的多肽包含T366S/L368A/Y407V,但是突变可以转换到相对链,而该分子仍然是可操作的。在一些实施方式中,蛋白质复合物包括:第一多肽链,其包括或由SEQ ID NO:68组成;和第二多肽链,其包括或由SEQ ID NO:64组成。在一些实施方式中,蛋白质复合物还包括:第一多肽,其包括或由SEQ ID NO:66组成;第二多肽,其包括或由SEQ ID NO:68组成;和第三多肽链,其包括或由SEQ ID NO:64组成。在一些实施方式中,蛋白质复合物还包括:第四多肽链,其包括或由SEQ ID NO:64组成。

[0231] 在一些实施方式中,多肽链包括:包括增加溶解性的突变并通过连接体与包括CH1、铰链、CH2和CH3结构域的重链连接的AChRg的片段,其中CH3结构域包括抑制多肽链同二聚化的突变。在一些实施方式中,抑制同二聚化的突变是T366W。在一些实施方式中,多肽包括下列或由下列组成:氨基酸序列RNQEERLLADLMQNYDPNLRPAERDSDVVNVSCLKLTNLISLNE REEALTTNVWIEMQWCDYRLRWDPRDYEGLWVLRVPSTMVWRPDIVLENNVDGVFEVALYCNVLVSPDGCIYWLPP AIFRSACDVSGVDTEGATNCSLIFQSQTYSTNEIDLQLSQEDGQTIEWIFID PEAFTENGWAIQHRPAKMLLD PAAPAEAGHQKVVFYLLIQRKPGGGGSGGGGSGGGGSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 69)。

[0232] 在一些实施方式中,蛋白质复合物包括:第一多肽,其包括或由SEQ ID NO:67组成;和第二多肽,其包括或由SEQ ID NO:69组成。本领域技术人员将理解,这样的分子也可用CH3结构域制备,而不含抑制同二聚化的突变。在这种情况下,将只需要单个多肽链,因为它会同二聚化。此多肽与SEQ ID NO:65相似,但将包括AChRg片段来代替AChRb片段。

[0233] 在一些实施方式中,蛋白质复合物包括:第一多肽,其包括或由SEQ ID NO:69组成;和第二多肽,其包括或由SEQ ID NO:68组成。本领域技术人员将理解,在此实施方式中包括AChRg的多肽包含T366W突变,并且包括AChRe的多肽包含T366S/L368A/Y407V,但是突变可以转换到相对链,而该分子仍然是可操作的。在一些实施方式中,蛋白质复合物包括:第一多肽链,其包括或由SEQ ID NO:69组成;和第二多肽链,其包括或由SEQ ID NO:64组成。在一些实施方式中,蛋白质复合物还包括:第一多肽,其包括或由SEQ ID NO:69组成;第

二多肽,其包括或由SEQ ID NO:68组成;和第三多肽链,其包括或由SEQ ID NO:64组成。在一些实施方式中,蛋白质复合物还包括:第四多肽链,其包括或由SEQ ID NO:64组成。

[0234] 在一些实施方式中,多肽链包括下列或由下列组成:与本文提供的序列具有至少70%同一性的序列。在一些实施方式中,多肽链包括下列或由下列组成:与本文提供的序列具有至少75%同一性的序列。在一些实施方式中,多肽链包括下列或由下列组成:与本文提供的序列具有至少80%同一性的序列。在一些实施方式中,多肽链包括下列或由下列组成:与本文提供的序列具有至少85%同一性的序列。在一些实施方式中,多肽链包括下列或由下列组成:与本文提供的序列具有至少90%同一性的序列。在一些实施方式中,多肽链包括下列或由下列组成:与本文提供的序列具有至少95%同一性的序列。在一些实施方式中,多肽链包括下列或由下列组成:与本文提供的序列具有至少97%同一性的序列。在一些实施方式中,多肽链包括下列或由下列组成:与本文提供的序列具有至少99%同一性的序列。

[0235] 在一些实施方式中,蛋白质选自SEQ ID NO:72-91中的任一个。在一些实施方式中,多肽选自SEQ ID NO:72-91中的任一个。在一些实施方式中,多肽选自SEQ ID NO:92-100和102-130中的任一个。在一些实施方式中,多肽选自SEQ ID NO:72-100和102-130中的任一个。在一些实施方式中,多肽选自SEQ ID NO:94、104和108-129中的任一个。

药物组合物

[0236] 另一方面,提供药物组合物,其包括本发明的蛋白质。

[0237] 另一方面,提供药物组合物,其包括本发明的多肽链。

[0238] 另一方面,提供药物组合物,其包括本发明的蛋白质复合物。

[0239] 另一方面,提供药物组合物,其包括本发明的组合物。

[0240] 在一些实施方式中,药物组合物包括药学上可接受的载剂、赋形剂或佐剂。如本文所用,术语“载剂”、“佐剂”或“赋形剂”是指药物组合物的不是活性剂的任何组分。如本文所用,术语“药学上可接受的载剂”是指无毒的惰性固体、半固体、液体填料、稀释剂、包封材料、任意类型的配制助剂,或者只是无菌水性介质,如盐水。可用作药学上可接受的载剂的材料的一些实例是糖类,如乳糖、葡萄糖和蔗糖,淀粉类,如玉米淀粉和马铃薯淀粉,纤维素及其衍生物,如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素;粉末状黄芪胶;麦芽、明胶、滑石;赋形剂,如可可脂和栓剂蜡;油类,如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;二醇类,如丙二醇;多元醇类,如甘油、山梨糖醇、甘露糖醇和聚乙二醇;酯类,如油酸乙酯和月桂酸乙酯、琼脂;缓冲剂,如氢氧化镁和氢氧化铝;海藻酸;无热原水;等渗盐水、林格氏溶液;乙醇溶液和磷酸盐缓冲溶液,以及药物制剂中使用的其它无毒相容性物质。在本文中可用作载剂的物质的一些非限制性实例包括糖、淀粉、纤维素及其衍生物、粉末状黄芪胶、麦芽、明胶、滑石、硬脂酸、硬脂酸镁、硫酸钙、植物油、多元醇类、海藻酸、无热原水、等渗盐水、磷酸盐缓冲溶液、可可脂(栓剂基质)、乳化剂,以及用于其它药物制剂中的其它无毒药学上相容性物质。也可以存在润湿剂和润滑剂如十二烷基硫酸钠,以及着色剂、调味剂、赋形剂、稳定剂、抗氧化剂和防腐剂。任何无毒、惰性且有效的载剂均可用于配制本文考虑的组合物。在这方面,适合的药学上可接受的载剂、赋形剂和稀释剂是本领域技术人员公知的,诸如在The Merck Index,第十三版,Budavari et al.,Eds.,Merck&Co.,Inc., Rahway,N.J. (2001);CTFA (Cosmetic,Toiletry,and Fragrance Association) International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook,第十版(2004);以及

“Inactive Ingredient Guide,” U.S. Food and Drug Administration (FDA) Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Office of Management (其全部内容特此通过引用以其整体并入) 中描述的那些。用于本组合物中的药学上可接受的赋形剂、载剂和稀释剂的实例包括蒸馏水、生理盐水、林格氏溶液、葡萄糖溶液、Hank's 溶液和 DMSO。这些另外的非活性组分以及有效的制剂和施用程序是本领域公知的, 并在标准教科书中进行了描述, 如 Goodman and Gillman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8th Ed., Gilman et al. Eds. Pergamon Press (1990); Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa. (1990); 以及 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa., (2005) (其每一个均通过引用以其整体并入本文)。本文描述的组合物也可以包含在人工创建的结构如脂质体、ISCOMS、缓慢释放颗粒和其它增加血清中肽或多肽半衰期的媒剂中。脂质体包括乳液、泡沫、胶束、不溶性单层、液晶、磷脂分散体、层状层等。与本文描述的肽一起使用的脂质体由标准的形成囊泡的脂质形成, 这种脂质通常包括中性和带负电的磷脂和固醇, 如胆固醇。脂质的选择通常取决于诸如血液中脂质体大小和稳定性的考虑。例如, Coligan, J.E. et al, Current Protocols in Protein Science, 1999, John Wiley & Sons, Inc., New York 综述了可用于制备脂质体的各种方法, 以及还参见美国专利号 4,235,871、4,501,728、4,837,028 和 5,019,369。

[0241] 载剂可总共占本文提出的药物组合物重量的约 0.1% 至约 99.99999%。

[0242] 在一些实施方式中, 药物组合物用于治疗重症肌无力。在一些实施方式中, 药物组合物包括治疗有效量的本发明的蛋白质复合物。在一些实施方式中, 药物组合物包括治疗有效量的本发明的缀合物。术语“治疗有效量”是指有效治疗哺乳动物的疾病或障碍的药物的量。在一些实施方式中, 治疗有效量是以必要的剂量并持续必要的时间段而有效实现所需治疗或预防结果的量。确切的剂型和方案将由医师根据患者的状况确定。在一些实施方式中, 有效量是足以治疗疾病的至少一种症状的量。在一些实施方式中, 疾病是重症肌无力。在一些实施方式中, 重症肌无力的特征在于针对蛋白质的自身抗体。

[0243] 如本文所用, 术语疾病、障碍或状况的“治疗 (treatment)”或“治疗 (treating)”涵盖减轻其至少一种症状、减少其严重性或抑制其进展。治疗不一定意味着疾病、障碍或状况完全治愈。为了成为有效的治疗, 本文中有用的组合物或方法仅需要降低疾病、障碍或状况的严重性, 降低与其相关的症状的严重性, 或改善患者或对象的生活质量。重症肌无力的治疗是本领域公知的, 并且可包括用于评估重症肌无力症状改善的任意可接受的措施。这可以包括: 肌肉控制改善; 肌肉下垂、搭接 (lapping) 或沉重减少; 呼吸改善; 自身抗体滴度降低; 突触功能改善; 或任意其它改善措施。

[0244] 在一些实施方式中, 药物组合物被配制用于全身施用。在一些实施方式中, 药物组合物被配制用于向对象施用。在一些实施方式中, 药物组合物被配制用于向人施用。在一些实施方式中, 药物组合物被配制用于静脉内施用。

[0245] 如本文所用, 术语“施用 (administering)”、“施用 (administration)”和类似术语是指在合理的医疗实践中以提供治疗效果的方式将含有活性剂的组合物递送至对象的任何方法。本主题的一个方面提供将治疗有效量的本主题的组合物静脉内施用于有需要的患者。其它合适的施用途径可包括肠胃外、皮下、口服、肌内或腹膜内。在一些实施方式中, 施

用是静脉内施用。在一些实施方式中,施用选自口服、静脉内、肌内、腹膜内、瘤间、局部或皮下施用。在一些实施方式中,施用是向疾病部位施用。

[0246] 施用剂量将取决于接受者的年龄、健康状况和体重、同时治疗的类型(如有)、治疗频率和所需效果的性质。

治疗方法

[0247] 另一方面,提供治疗有需要的对象的重症肌无力的方法,方法包括向对象施用本发明的蛋白质,从而治疗对象的重症肌无力。

[0248] 另一方面,提供治疗有需要的对象的重症肌无力的方法,方法包括向对象施用本发明的多肽链,从而治疗对象的重症肌无力。

[0249] 另一方面,提供治疗有需要的对象的重症肌无力的方法,方法包括向对象施用本发明的蛋白质复合物,从而治疗对象的重症肌无力。

[0250] 另一方面,提供治疗有需要的对象的重症肌无力的方法,方法包括向对象施用本发明的组合物,从而治疗对象的重症肌无力。

[0251] 在一些实施方式中,施用是施用本发明的药物组合物。在一些实施方式中,重症肌无力的特征在于针对蛋白质的抗体。在一些实施方式中,蛋白质是重症肌无力抗体的靶标。本领域技术人员将理解,蛋白质复合物将用对象中重症肌无力抗体所靶向的蛋白质的片段来设计。在一些实施方式中,抗体是自身抗体。

[0252] 在一些实施方式中,治疗包括降低抗体浓度。在一些实施方式中,治疗包括降低抗体数量。在一些实施方式中,抗体浓度是循环抗体浓度。在一些实施方式中,治疗包括耗竭抗体。在一些实施方式中,治疗包括螯合抗体。在一些实施方式中,抗体与本发明分子的结合导致抗体的螯合。在一些实施方式中,治疗包括杀伤B细胞。在一些实施方式中,B细胞是自身反应性B细胞。在一些实施方式中,杀伤B细胞是特异性B细胞杀伤。在一些实施方式中,治疗包括杀伤产生抗体的B细胞。在一些实施方式中,治疗包括杀伤产生抗体的B细胞,而基本上不杀伤其它B细胞。在一些实施方式中,治疗包括杀伤产生针对蛋白质复合物的抗体的B细胞。在一些实施方式中,治疗包括杀伤产生针对片段的抗体的B细胞。在一些实施方式中,治疗包括杀伤产生针对蛋白质复合物的片段的抗体的B细胞。

[0253] 在一些实施方式中,降低抗体包括结合抗体。在一些实施方式中,降低是去除至少10、20、25、30、40、50、60、70、75、80、90、95、97、99或100%的抗体。每种可能性代表本发明的单独的实施方式。在一些实施方式中,抗体是自身抗体。在一些实施方式中,抗体是对象中的抗体中。在一些实施方式中,抗体是循环抗体。在一些实施方式中,自身抗体是针对蛋白质或片段的自身抗体。在一些实施方式中,自身抗体是细胞毒性自身抗体。在一些实施方式中,自身抗体包括IgG1自身抗体。在一些实施方式中,自身抗体包括IgG3。在一些实施方式中,自身抗体包括IgG1和IgG3自身抗体。在一些实施方式中,自身抗体包括IgG1、IgG2和IgG3自身抗体。在一些实施方式中,自身抗体包括IgG1、IgG3和IgG4自身抗体。在一些实施方式中,自身抗体包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4自身抗体。在一些实施方式中,降低是去除至少25%的抗体。在一些实施方式中,降低是去除至少50%的抗体。在一些实施方式中,降低是去除至少70%的抗体。在一些实施方式中,降低是去除至少75%的抗体。在一些实施方式中,抗体的百分比是自身抗体的百分比。在一些实施方式中,抗体的百分比是针对蛋白质或片段的抗体的百分比。在一些实施方式中,抗体的百分比是与疾病相关的抗体的百分比。

[0254] 在一些实施方式中,方法还包括减少对象中的抗体。在一些实施方式中,减少是在施用之前。在一些实施方式中,减少抗体是减少循环抗体。在一些实施方式中,抗体是自身抗体。在一些实施方式中,抗体针对蛋白质。在一些实施方式中,抗体针对蛋白质,片段来自该蛋白质。在一些实施方式中,抗体针对蛋白质,片段中的至少一个来自该蛋白质。在一些实施方式中,减少是减少针对所有蛋白质的抗体,片段中的至少一个来自这些蛋白质。在一些实施方式中,抗体针对蛋白质复合物。减少抗体的方法是本领域公知的,并且包括例如血浆置换、静脉内Ig (IVIg)、抗体过滤和B细胞靶向疗法,其中任意一种都可使用。在一些实施方式中,方法包括施用前抗体的血浆置换。在一些实施方式中,方法包括在施用本发明的治疗剂之前施用B细胞靶向疗法。在一些实施方式中,B细胞靶向疗法是抗B细胞治疗。在一些实施方式中,B细胞靶向疗法是B细胞致死治疗。在一些实施方式中,B细胞靶向疗法是泛B细胞治疗。在一些实施方式中,B细胞靶向疗法不是靶向疗法。如本文所用,“靶向B细胞疗法”是仅靶向产生特定抗体的特异性B细胞克隆的疗法。在一些实施方式中,抗B细胞疗法是抗B细胞抗体。B细胞靶向抗体是本领域已知的,并且包括但不限于例如抗CD20抗体。抗CD20治疗性抗体是本领域公知的,并且包括但不限于利妥昔单抗(rituximab)、奥瑞利珠单抗(ocrelizumab)、奥妥珠单抗(obinutuzumab)、奥法木单抗(ofatumumab)、替伊莫单抗(ibritumomab,tiuxetan)、托西莫单抗(tositumomab)和乌妥昔单抗(ublrituximab)。在一些实施方式中,B细胞靶向疗法是利妥昔单抗。

核酸

[0255] 另一方面,提供核酸分子,其编码本发明的蛋白质。

[0256] 另一方面,提供核酸系统,其包括至少两个核酸分子,其中第一核酸分子编码本发明蛋白质复合物的第一多肽链,并且第二核酸分子编码本发明蛋白质复合物的第二多肽链。

[0257] 另一方面,提供核酸系统,其包括至少两个核酸分子,其中第一核酸分子编码:第一多肽链,其包括重症肌无力自身抗体的第一人蛋白质靶标的片段或其类似物或衍生物以及第一二聚化结构域;并且第二核酸分子编码:第二多肽链,其包括重症肌无力自身抗体的第二人蛋白质靶标的片段或其类似物或衍生物以及第二二聚化结构域。

[0258] 另一方面,提供核酸分子,其编码本发明的组合物的多肽链。

[0259] 另一方面,提供核酸分子,其编码本发明的组合物。

[0260] 另一方面,提供核酸分子,其编码:重症肌无力自身抗体的第一蛋白质靶标的片段或其类似物或衍生物;和重症肌无力自身抗体的第二人蛋白质靶标的片段或其类似物或衍生物。

[0261] 在一些实施方式中,核酸分子用于治疗重症肌无力。在一些实施方式中,核酸系统用于治疗重症肌无力。

[0262] 在一些实施方式中,核酸系统还包括编码本发明蛋白质复合物的第三多肽的第三核酸分子。在一些实施方式中,核酸系统还包括编码本发明蛋白质复合物的第四多肽的第四核酸分子。在一些实施方式中,第一核酸分子编码本发明的第一多肽。在一些实施方式中,第二核酸分子编码本发明的第二多肽。在一些实施方式中,第三核酸分子编码本发明的第三多肽。在一些实施方式中,第四核酸分子编码第四多肽。

[0263] 在一些实施方式中,核酸分子是载体。在一些实施方式中,载体是表达载体。在一

些实施方式中,核酸分子包括编码多肽链的开放阅读框。在细胞内表达开放阅读框是本领域技术人员公知的。在多种方法当中,其可通过转染、病毒感染或直接改变细胞的基因组来进行。表达载体是本领域公知的,并且可使用与其中表达本发明蛋白质复合物的靶细胞相容的任意载体。

[0264] 载体核酸序列总体上包含用于在细胞中繁殖的至少一个复制起点以及任选地另外的元件,如异源多核苷酸序列、表达控制元件(例如,启动子、增强子)、选择标记(例如,抗生素抗性)、聚腺嘌呤序列。在一些实施方式中,载体包括启动子。在一些实施方式中,启动子被配置用于在其中表达本发明蛋白质复合物的靶细胞中表达。

[0265] 载体可以是经由非病毒方法或经由病毒方法递送的DNA质粒。病毒载体可以是逆转录病毒载体、疱疹病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体或痘病毒载体。启动子在哺乳动物细胞中可具有活性。启动子可以是病毒启动子。启动子在细菌细胞中可具有活性。启动子在人细胞中可具有活性。启动子在成纤维细胞中可具有活性。如本文所用的术语“启动子”是指一组转录控制模块,它们聚集在RNA聚合酶(即RNA聚合酶II)的起始位点周围。启动子由离散的功能模块组成,每个功能模块由大约7-20bp的DNA组成,并包含一个或多个转录激活因子或阻遏蛋白的识别位点。

[0266] 在一些实施方式中,开放阅读框与启动子可操作地连接。术语“可操作地连接”是指感兴趣的核苷酸序列以允许核苷酸序列表达的方式(例如在体外转录/翻译系统中或当载体被导入宿主细胞时在宿主细胞中)与一个或多个调节元件连接。

[0267] 在一些实施方式中,载体通过标准方法被导入细胞中,包括电穿孔(例如,如From et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 5824 (1985) 中描述的)、热激、病毒载体的感染、通过在小珠或小颗粒阵列内或表面上具有核酸的小颗粒的高速弹道穿透(Klein et al., Nature 327, 70-73 (1987)) 和/或类似方法。

[0268] 在一些实施方式中,核酸序列由RNA聚合酶II (RNAP II和Pol II) 转录。RNAP II是存在于在真核细胞中的酶。它催化DNA的转录以合成mRNA的前体以及大多数snRNA和微小RNA。

[0269] 在一些实施方式中,哺乳动物表达载体包括但不限于:可购自Invitrogen的pcDNA3、pcDNA3.1(±)、pGL3、pZeoSV2(±)、pSecTag2、pDisplay、pEF/myc/cyto、pCMV/myc/cyto、pCR3.1、pSinRep5、DH26S、DHBB、pNMT1、pNMT41、pNMT81;可购自Promega的pCI;可购自Stratagene的pMbac、pPbac、pBK-RSV和pBK-CMV;可购自Clontech的pTRES,及它们的衍生物。

[0270] 在一些实施方式中,本发明使用包含来自真核病毒(如逆转录病毒)的调控元件的表达载体。SV40载体包括pSVT7和pMT2。在一些实施方式中,衍生自牛乳头瘤病毒的载体包括pBV-1MTHA,以及衍生自埃巴病毒的载体包括pHEB0,以及p205。其它示例性载体包括pMSG、pAV009/A+、pMT010/A+、pMAMneo-5、杆状病毒pDSVE,以及在SV-40早期启动子、SV-40晚期启动子、金属硫蛋白启动子、鼠乳腺肿瘤病毒启动子、劳斯肉瘤病毒启动子、多角体蛋白启动子或其它的在真核细胞中显示有效表达的启动子的指导下允许蛋白质表达的载体。

[0271] 在一些实施方式中,提供诸如横向感染和靶向特异性的优点的重组病毒载体用于体内表达。在一个实施方式中,横向感染是例如逆转录病毒的生命周期中固有的,并且是单个感染细胞产生多个子代病毒体的过程,该子代病毒体萌发并感染相邻的细胞。在一个实

施方式中,结果是大量被迅速感染,其中大部分最初并未被原始病毒颗粒感染。在一个实施方式中,产生不能横向扩散的病毒载体。在一个实施方式中,如果期望的目的是仅将特定基因导入局部数量的靶细胞中,则此特性会有用的。

[0272] 可使用各种方法将本发明的表达载体导入细胞中。这样的方法在Sambrook et al.,*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989, 1992), in Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang et al., *Somatic Gene Therapy*, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega et al., *Gene Targeting*, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Butterworths, Boston Mass. (1988) and Gilboa et al. [*Biotechniques* 4(6):504-512, 1986]中进行了大致的描述,并且包括例如稳定转染或瞬时转染、脂质转染、电穿孔和用重组病毒载体感染。另外,参见美国专利号5,464,764和5,487,992的阳性和阴性选择法。

[0273] 在一个实施方式中,使用植物表达载体。在一个实施方式中,多肽编码序列的表达由多个启动子驱动。在一些实施方式中,使用病毒启动子,如CaMV的35S RNA和19S RNA启动子[Brisson et al., *Nature* 310:511-514 (1984)],或TMV的外壳蛋白启动子[Takamatsu et al., *EMBO J.* 6:307-311 (1987)]。在另一个实施方式中,使用植物启动子,如RUBISCO的小亚基[Coruzzi et al., *EMBO J.* 3:1671-1680 (1984);和Brogli et al., *Science* 224:838-843 (1984)]或热休克启动子,例如大豆hsp17.5-E或hsp17.3-B[Gurley et al., *Mol. Cell. Biol.* 6:559-565 (1986)]。在一个实施方式中,使用Ti质粒、Ri质粒、植物病毒载体、直接DNA转化、显微注射、电穿孔和本领域技术人员公知的其它技术将构建体导入植物细胞。参见,例如,Weissbach & Weissbach [*Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, NY, 第VIII部分, pp 421-463 (1988)]。本发明也可使用本领域公知的其它表达系统如昆虫和哺乳动物宿主细胞系统。

[0274] 将理解的是,除了包含所插入的编码序列(其编码多肽)的转录和翻译所必需的元件之外,本发明的表达构建体还可包括经改造以优化所表达多肽的稳定性、产量、纯化、产率或活性的序列。

[0275] 在一些实施方式中,核酸分子是单个核酸分子。在一些实施方式中,第一和第二核酸分子是不同的分子。在一些实施方式中,第一和第二核酸分子是相同的分子。在一些实施方式中,第一、第二、第三和第四核酸分子中的任意两个是不同的分子。在一些实施方式中,第一、第二、第三和第四核酸分子中的任意两个是相同的分子。在一些实施方式中,第一、第二和第三核酸分子是不同的分子。在一些实施方式中,第一、第二、第三和第四核酸分子中的任意三个是不同的分子。在一些实施方式中,第一、第二、第三和第四核酸分子中的任意三个是相同的分子。在一些实施方式中,第一、第二、第三和第四核酸分子全部都是不同的分子。在一些实施方式中,第一、第二、第三和第四核酸分子全部都是相同的分子。

产生方法

[0276] 另一方面,提供产生蛋白质的方法,方法包括:

获得第一人受体的胞外结构域的第一片段或其类似物或衍生物,和第三人受体的胞外结构域的第二片段或其类似物或衍生物,其中第一和第三人受体是重症肌无力

自身抗体的靶标并且是不同的蛋白质;和将第一片段与第二片段连接以产生单

个多肽链；
从而产生蛋白质。

[0277] 另一方面,提供产生蛋白质的方法,方法包括:
获得重症肌无力自身抗体的人受体靶标的第一片段和在第一片段中生成减少第

一

片段的聚集的至少一个突变;
从而产生蛋白质。

[0278] 另一方面,提供产生蛋白质复合物的方法,方法包括:
获得重症肌无力自身抗体的第一蛋白质靶标的第一片段或其类似物或衍生物,和
重症肌无力自身抗体的第二蛋白质靶标的第二片段或其类似物或衍生物;将第一
片段与第一二聚化结构域连接以产生第一多肽;和将第二片段与第二二聚化结构
域连接以产生第二多肽链;
从而产生蛋白质复合物。

[0279] 另一方面,提供产生蛋白质的方法,方法包括:
培养包括一个或多个载体的宿主细胞,载体包括编码单个多肽链的核酸序列,其
中单个多肽链通过下列产生:

- i. 获得重症肌无力自身抗体的人受体靶标的第一片段;和
- ii. 在第一片段中生成减少第一片段的聚集的至少一个突变;
从而产生蛋白质。

[0280] 另一方面,提供产生蛋白质的方法,方法包括:
培养包括一个或多个载体的宿主细胞,载体包括编码单个多肽链的核酸序列,其
中单个多肽链通过下列产生:

- i. 获得第一人受体的胞外结构域的第一片段或其类似物或衍生物,
和第二人受体的胞外结构域的第二片段或其类似物或衍生物,其中第一人受体和
第二人受体是重症肌无力自身抗体的靶标并且是不同的蛋白质;和
- ii. 将第一片段与第二片段连接以产生单个多肽链;
从而产生蛋白质。

[0281] 另一方面,提供产生蛋白质复合物的方法,方法包括:
培养包括一个或多个载体的宿主细胞,载体包括编码至少两个多肽链的核酸序
列,其中两个多肽链通过下列产生:

- i. 获得重症肌无力自身抗体的第一蛋白质靶标的第一片段或其类似物或衍生物,
和重症肌无力自身抗体的第二蛋白质靶标的第二片段或其类似物或衍生物;和
- ii. 将第一片段与第一二聚化结构域连接以产生第一多肽链,和将第二片段与第
二二聚化结构域连接以产生第二多肽链;
从而产生蛋白质复合物。

[0282] 在一些实施方式中,蛋白质是多肽。在一些实施方式中,蛋白质复合物是本发明的
蛋白质复合物。在一些实施方式中,蛋白质组合物是本发明的组合物。在一些实施方式中,
蛋白质是本发明的蛋白质。在一些实施方式中,蛋白质是本发明的多肽链。在一些实施方式
中,片段是本发明的片段。在一些实施方式中,衍生物是本发明的衍生物。在一些实施方式

中,类似物是本发明的类似物。在一些实施方式中,二聚化结构域是本发明的二聚化结构域。在一些实施方式中,组合物、蛋白质复合物、蛋白质、片段、类似物、衍生物或二聚化结构域如上文所述。

[0283] 在一些实施方式中,蛋白质是人蛋白质。在一些实施方式中,蛋白质是细胞表面蛋白。在一些实施方式中,第一和第二蛋白质是相同的蛋白质。在一些实施方式中,第一和第二蛋白质是不同的蛋白质。在一些实施方式中,第一和第二蛋白质是重症肌无力自身抗体的靶标。在一些实施方式中,第一和第二蛋白质是与重症肌无力相关的自身抗体的靶标。在一些实施方式中,重症肌无力的特征在于针对第一和第二蛋白质的自身抗体。在一些实施方式中,蛋白质是受体,并且片段是胞外结构域的片段。在一些实施方式中,片段包括胞外结构域的片段。在一些实施方式中,片段由胞外结构域组成。

[0284] 在一些实施方式中,第一和第二二聚化结构域能够彼此二聚化。在一些实施方式中,第一和第二二聚化结构域被配置成彼此二聚化。在一些实施方式中,方法还包括使第一和第二多肽接触。在一些实施方式中,接触包括将多肽一起温育。在一些实施方式中,接触是在细胞中。在一些实施方式中,接触是在体外。在一些实施方式中,接触是在足以允许二聚化的条件下。在一些实施方式中,允许是引发。在一些实施方式中,条件足以允许多肽的二聚化。在一些实施方式中,条件是生理条件。

[0285] 在一些实施方式中,方法还包括将第三二聚化结构域插入第一多肽中。在一些实施方式中,插入是连接。在一些实施方式中,插入是将编码第三二聚化结构域的核酸序列插入编码第一多肽的核酸分子或载体中。在一些实施方式中,连接是将第三二聚化结构域与第一二聚化结构域连接。在一些实施方式中,连接是将第三二聚化结构域与第一片段连接。

[0286] 在一些实施方式中,方法还包括:获得重症肌无力自身抗体的第三蛋白质靶标的第三片段或其类似物或衍生物;和将其与第四二聚化结构域连接以产生第三多肽链。在一些实施方式中,第三和第四二聚化结构域能够彼此二聚化。在一些实施方式中,第三和第四二聚化结构域被配置成彼此二聚化。在一些实施方式中,方法还包括使第一、第二和第三多肽链接触。在一些实施方式中,方法还包括在宿主细胞中表达编码第三多肽链的核酸序列。在一些实施方式中,第三多肽链是通过下列产生的:获得第三蛋白质的第三片段并将其与第四二聚化结构域连接以产生第三多肽链。在一些实施方式中,方法包括在细胞中表达第一、第二和第三多肽链。

[0287] 在一些实施方式中,方法还包括将第五二聚化结构域插入第二多肽中。在一些实施方式中,插入是连接。在一些实施方式中,插入是将编码第五二聚化结构域的核酸序列插入编码第二多肽的核酸分子或载体中。在一些实施方式中,连接是将第五二聚化结构域与第二二聚化结构域连接。在一些实施方式中,连接是将第五二聚化结构域与第二片段连接。

[0288] 在一些实施方式中,方法还包括:获得重症肌无力自身抗体的第四蛋白质靶标的第四片段或其类似物或衍生物;和将其与第六二聚化结构域连接以产生第四多肽链。在一些实施方式中,第五和第六二聚化结构域能够彼此二聚化。在一些实施方式中,第五和第六二聚化结构域被配置成彼此二聚化。在一些实施方式中,方法还包括使第一、第二、第三和第四多肽链接触。在一些实施方式中,方法还包括在宿主细胞中表达编码第四多肽链的核酸序列。在一些实施方式中,第四多肽链是通过下列获得的:获得第四蛋白质的第四片段并将其与第六二聚化结构域连接以产生第四多肽链。在一些实施方式中,方法包括在细胞中

表达第一、第二、第三和第四多肽链。

[0289] 在一些实施方式中,方法还包括将Fc区插入第一链。在一些实施方式中,方法还包括将Fc区插入第二链。在一些实施方式中,方法还包括将Fc区插入第三链。在一些实施方式中,方法还包括将Fc区插入第四链。在一些实施方式中,方法还包括将Fc区的一部分插入第一链和将Fc区的一部分插入第二链,其中这两部分的界面产生完整的Fc区。

[0290] 在一些实施方式中,Fc区在二聚化结构域的C-末端插入。在一些实施方式中,Fc区在片段的C-末端插入。在一些实施方式中,Fc区在二聚化结构域的N-末端插入。在一些实施方式中,Fc区在片段的N-末端插入。在一些实施方式中,片段在二聚化结构域的C-末端插入或连接。在一些实施方式中,片段在二聚化结构域的N-末端插入或连接。

[0291] 在一些实施方式中,方法还包括在多肽链的至少两个区段之间插入连接体。在一些实施方式中,在片段和二聚化结构域之间插入连接体。在一些实施方式中,在片段和Fc区之间插入连接体。在一些实施方式中,在Fc区和二聚化结构域之间插入连接体。在一些实施方式中,在二聚化结构域和另一个二聚化结构域之间插入连接体。在一些实施方式中,在片段和另一个片段之间插入连接体。在一些实施方式中,在第一蛋白质的片段和第二蛋白质的片段之间插入连接体。

[0292] 在一些实施方式中,方法还包括在片段中产生增加片段的溶解性的至少一个突变。在一些实施方式中,方法还包括测量突变片段的溶解性。在一些实施方式中,方法还包括选择溶解性增加的突变片段。在一些实施方式中,增加是增加至少预定的阈值。在一些实施方式中,增加是显著增加。在一些实施方式中,增加是增加至少10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、250、300、350、400、450或500%。每种可能性代表本发明的单独的实施方式。在一些实施方式中,增加是增加至少25%。在一些实施方式中,增加是增加至少50%。

[0293] 在一些实施方式中,方法还包括在片段中产生减少片段的聚集的至少一个突变。在一些实施方式中,方法还包括测量突变片段的聚集。在一些实施方式中,方法还包括选择溶解性降低的突变片段。在一些实施方式中,减少是减少至少预定的阈值。在一些实施方式中,减少是显著减少。在一些实施方式中,减少是减少至少10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、250、300、350、400、450或500%。每种可能性代表本发明的单独的实施方式。在一些实施方式中,减少是减少至少25%。在一些实施方式中,减少是减少至少50%。

[0294] 在一些实施方式中,方法还包括确认至少一个突变不大幅降低第一片段与针对第一片段的自身抗体的结合。在一些实施方式中,方法进一步测量自身抗体与突变的第一片段的结合。在一些实施方式中,方法包括选择包括基本上相同或更多自身抗体结合的突变片段。在一些实施方式中,自身抗体是重症肌无力自身抗体。在一些实施方式中,自身抗体是存在于重症肌无力对象中的自身抗体。在一些实施方式中,确认或测量包括使突变片段与来自患有重症肌无力的对象的样品接触,并测量样品中自身抗体与突变片段的结合。在一些实施方式中,样品是血液。在一些实施方式中,样品是血清。在一些实施方式中,样品包括分离的自身抗体。在一些实施方式中,确认或测量包括使未突变片段与来自患有重症肌无力的对象的样品接触,并测量样品中自身抗体与突变片段的结合。在一些实施方式中,确认或测量包括比较未突变片段与突变片段的结合,并选择不具有大大更少的自身抗体结合

的突变片段。在一些实施方式中,大大更少是显著更少。在一些实施方式中,大大更少是更少。在一些实施方式中,大大更少是结合更少超过5、10、15、20、25、30、35、40、45或50%。每种可能性代表本发明的单独的实施方式。在一些实施方式中,大大更少是结合更少超过10%。

[0295] 另一方面,提供蛋白质复合物,其通过本发明的方法产生。

[0296] 另一方面,提供蛋白质,其通过本发明的方法产生。

[0297] 另一方面,提供组合物,其通过本发明的方法产生。

患者选择

[0298] 另一方面,提供确定待通过本发明的方法治疗的对象的适合性的方法,方法包括从对象接收样品,使样品与本发明的组合物接触,并确定样品中抗体与组合物的结合,其中抗体与组合物的结合指示对象适合通过本发明的方法治疗,从而确定待治疗对象的适合性。

[0299] 另一方面,提供确定待通过本发明的方法治疗的对象的适合性的方法,方法包括从对象接收样品,使样品与本发明的蛋白质复合物接触,并确定样品中抗体与蛋白质复合物的结合,其中抗体与蛋白质复合物的结合指示对象适合通过本发明的方法治疗,从而确定待治疗对象的适合性。

[0300] 另一方面,提供确定待通过本发明的方法治疗的对象的适合性的方法,方法包括从对象接收样品,使样品与本发明的蛋白质接触,并确定样品中抗体与蛋白质的结合,其中抗体与蛋白质的结合指示对象适合通过本发明的方法治疗,从而确定待治疗对象的适合性。

[0301] 在一些实施方式中,对象是有需要的对象。在一些实施方式中,对象是诸如上文所述的对象。在一些实施方式中,对象患有重症肌无力。在一些实施方式中,已知对象对与重症肌无力相关的自身抗体呈阳性。在一些实施方式中,对象为血清反应阳性。在一些实施方式中,对象为血清反应阴性。在一些实施方式中,对象对治疗是幼稚的。在一些实施方式中,治疗是对重症肌无力的治疗。在一些实施方式中,对象接受过治疗并且已复发。

[0302] 在一些实施方式中,方法包括从对象获得样品。在一些实施方式中,样品包括组织。在一些实施方式中,样品是活组织检查。在一些实施方式中,样品是体液。在一些实施方式中,体液是血液。在一些实施方式中,体液是血清。在一些实施方式中,体液是血浆。在一些实施方式中,体液是包括抗体的流体。在一些实施方式中,体液选自下列中的至少一种:血液、血清、血浆、肠液、唾液、肿瘤液、尿液、间质液、脑脊液和粪便。

[0303] 在一些实施方式中,自身抗体是重症肌无力自身抗体。在一些实施方式中,自身抗体针对AChR。在一些实施方式中,自身抗体是针对AChR的抗体。在一些实施方式中,自身抗体是针对AChR亚基的抗体。在一些实施方式中,自身抗体针对AChR亚基。在一些实施方式中,自身抗体是病理性自身抗体。在一些实施方式中,自身抗体是引起疾病的自身抗体。

[0304] 在一些实施方式中,接触是温育。在一些实施方式中,接触是在足以使抗体与蛋白质复合物结合的条件下。在一些实施方式中,条件包括足以使抗体与蛋白质复合物结合的时间。在一些实施方式中,状况包括生理状况。在一些实施方式中,蛋白质复合物被加入到样品中。在一些实施方式中,蛋白质复合物被溶解在体液中。在一些实施方式中,抗体是自身抗体。在一些实施方式中,抗体是针对蛋白质的抗体。

[0305] 在一些实施方式中,至少阈值量的抗体与蛋白质或蛋白质复合物的结合指示对象适合治疗。在一些实施方式中,超过阈值量的抗体与蛋白质或蛋白质复合物的结合指示对象适合治疗。在一些实施方式中,抗体的量是抗体的数量。在一些实施方式中,抗体的量是抗体的百分比。在一些实施方式中,百分比是样品中抗体的百分比。在一些实施方式中,阈值是样品中抗体的10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70或75%。每种可能性代表本发明的单独的实施方式。在一些实施方式中,阈值是20%。在一些实施方式中,阈值是25%。在一些实施方式中,阈值是50%。在一些实施方式中,阈值是70%。在一些实施方式中,阈值是75%。

[0306] 在一些实施方式中,组合物还包括可检测部分。在一些实施方式中,蛋白质复合物还包括可检测部分。在一些实施方式中,蛋白质还包括可检测部分。在一些实施方式中,方法还包括使组合物、复合物和/或蛋白质与包括可检测部分的肽接触。在一些实施方式中,肽被配置成结合组合物、蛋白质和/或复合物。在一些实施方式中,肽对组合物、蛋白质和/或复合物是特异性的。如本文所用,术语“特异性结合”是指与特定分子结合而排除其它分子。在一些实施方式中,肽对组合物、蛋白质和/或复合物是特异性的,而排除样品中的其它蛋白质。在一些实施方式中,肽对组合物、蛋白质和/或复合物是特异性的,而排除样品中天然存在的抗体。在一些实施方式中,肽对组合物、蛋白质和/或复合物是特异性,而排除样品中的抗体。在一些实施方式中,确定结合包括检测部分。在一些实施方式中,确定包括分离蛋白质复合物。在一些实施方式中,确定包括从复合物中洗脱抗体。蛋白质鉴定的方法是本领域公知的,并且可使用任意这样的方法。这样的方法的实例包括蛋白质印迹、ELISA、FACS分析和蛋白质测序(如通过质谱分析法)。在一些实施方式中,确定包括ELISA。在一些实施方式中,ELISA是竞争性ELISA。在一些实施方式中,竞争性ELISA包括与抗体的竞争。在一些实施方式中,抗体是与疾病相关的抗体。

[0307] 在一些实施方式中,结合是阳性结合。在一些实施方式中,结合是预定阈值以上的结合。在一些实施方式中,结合是特异性结合。在一些实施方式中,结合是结合蛋白质复合物的其中至少一个片段。在一些实施方式中,结合是结合蛋白质复合物的其中至少两个片段。在一些实施方式中,结合是结合蛋白质复合物的其中至少三个片段。在一些实施方式中,结合是结合蛋白质复合物的其中至少四个片段。在一些实施方式中,样品中至少10、20、25、30、40、50、60、70、75、80、90、95、97、99或100%的抗体结合。每种可能性代表本发明的单独的实施方式。在一些实施方式中,样品中至少50%的抗体结合。在一些实施方式中,样品中至少70%的抗体结合。在一些实施方式中,样品中至少75%的抗体结合。在一些实施方式中,抗体的百分比是自身抗体的百分比。在一些实施方式中,抗体的百分比是针对蛋白质的抗体的百分比。在一些实施方式中,抗体的百分比是与疾病相关的抗体的百分比。

[0308] 如本文所用,术语“约”当与值组合时,是指参考值的正负10%。例如,约1000纳米(nm)的长度是指1000nm $\pm$ 100nm的长度。

[0309] 应注意,如本文和所附权利要求中使用的,单数形式“一”、“一个/种”和“该/所述”包括复数指代,除非上下文另外明确指出。因此,例如,对“多核苷酸”的提及包括多个这样的多核苷酸,而对“多肽”的提及包括本领域技术人员已知的一个或多个多肽及其等同物,以此类推。还应注意,权利要求可撰写为排除任意任选的要素。由此,此声明旨在充当诸如“仅仅”、“只有”等排他性术语与权利要求要素的限定结合使用,或“负”限制的使用的先行

基础。

[0310] 在那些使用类似于“A、B和C等中的至少一个”的协定的情况下,这样的结构通常意图是在本领域技术人员会理解该协定的意义上(例如,“具有A、B和C中至少一个的系统”将包括但不限于仅具有A、仅具有B、仅具有C、具有A和B一起、具有A和C一起、具有B和C一起和/或具有A、B和C一起等的系统)。本领域技术人员将进一步理解,实际上无论是在说明书、权利要求书还是附图中,呈现两个或更多个可选术语的任何反意连接词和/或短语都应理解为考虑了包括术语中的一个、术语中的任一个或这两个术语的可能。例如,短语“A或B”将被理解为包括“A”或“B”或“A和B”的可能。

[0311] 应当理解,为清楚起见,在单独的实施方式的环境下描述的本发明的某些特征也可在单个实施方式中组合提供。相反,为简洁起见,在单个实施方式的环境下描述的本发明的各种特征也可单独地或以任意适合的子组合来提供。与本发明有关的实施方式的所有组合都被本发明具体地涵盖并在本文中公开,就像每一个组合都被单独地并且明确地公开一样。另外,各种实施方式及其要素的所有子组合也被本发明具体地涵盖并在本文中被公开,就像每一个这样的子组合在本文中被单独地并且明确地公开一样。

[0312] 在考查以下实施例后,本发明的其它目的、优点和新颖特征对于本领域普通技术人员将变得显而易见,而这些实施例并非旨在进行限制。另外,如上文所述和如以下权利要求部分中所要求保护的,本发明的各种实施方式和方面中的每一个在以下实施例中均得到实验支持。

[0313] 如上文所述和如以下权利要求部分所要求保护的本发明的各种实施方式和方面在以下实施例中均得到实验支持。

实施例

[0314] 总体上,本文所用的命名法和本发明中所用的实验室程序包括分子、生化、微生物学和重组DNA技术。文献中对这样的技术进行了详尽的解释。参见,例如,“Molecular Cloning:A laboratory Manual”Sambrook et al.,(1989);“Current Protocols in Molecular Biology”第I-III卷Ausubel,R.M.,ed.(1994);Ausubel et al.,“Current Protocols in Molecular Biology”,John Wiley and Sons,Baltimore,Maryland(1989);Perbal,“A Practical Guide to Molecular Cloning”,John Wiley&Sons,New York(1988);Watson et al.,“Recombinant DNA”,Scientific American Books,New York;Birren et al.(eds)“Genome Analysis:A Laboratory Manual Series”,Vols.1-4,Cold Spring Harbor Laboratory Press,New York(1998);美国专利号4,666,828;4,683,202;4,801,531;5,192,659和5,272,057中阐述的方法学;“Cell Biology:A Laboratory Handbook”,第I-III卷Cellis,J.E.,ed.(1994);“Culture of Animal Cells-A Manual of Basic Technique”by Freshney,Wiley-Liss,N.Y.(1994),第三版;“Current Protocols in Immunology”第I-III卷Coligan J.E.,ed.(1994);Stites et al.(eds),“Basic and Clinical Immunology”(8th Edition),Appleton&Lange,Norwalk,CT(1994);Mishell和Shiigi(eds),“Strategies for Protein Purification and Characterization-A Laboratory Course Manual”CSHL Press(1996);所有这些均通过引用并入。贯穿本文件提供了其它一般性参考。

实施例1:

[0315] 发现80%至90%的重症肌无力(MG)患者具有针对乙酰胆碱受体(AChR)的自身抗体。然而,乙酰胆碱受体复合物由五种亚基(α 1、 β 1、 γ 、 δ 和 ϵ)组成。MG患者的诊断评估通常并不对抗体在针对一种亚基还是另一种亚基之间进行区分。然而,大多数生成MG治疗剂的抗原特异性尝试都聚焦于AChR的 α 亚基(AChR α)和靶向针对此分子的自身抗体的治疗剂。

[0316] 为了确定实际患有抗AChR α 1的重症肌无力群体的百分比,从335名AChR血清反应阳性MG患者中收集血清样品。用顺式环修饰的AChR α 1胞外结构域(ECD, SEQ ID NO:131)作为诱饵耗竭分子,在直接ELISA测定中测试样品(该过程的实例描述于图1F中)。在这项测定中,完整的AChR复合物及其所有亚基被用作诱饵来结合血清中的自身抗体。在存在或不存在增加浓度的固相结合AChR α 1的情况下进行此项结合确定,并测量每个样品的结合减少百分比(图1A)。AChR受体结合的减少与存在的针对AChR α 1的自身抗体的浓度成正比。令人惊讶的是,尽管一些对象具有非常高的抑制水平,表明存在主要是针对AChR α 1的自身抗体(图1A,最左侧样品;和图1B),但其它对象仅表现出中等水平的抑制,表明大多数自身抗体不是针对 α 亚基的(图1C),还有一些对象不存在大幅抑制,表明尽管他们针对AChR的自身抗体呈阳性,但不超过10%的自身抗体是针对AChR α 1的(图1D)。重要的是,当测量总AChR结合时(图1E),总抗体浓度和抗AChR α 1的抗体的百分比之间不存在相关性(图1G),总抗体滴度最高的其中几个样品的抗AChR α 1自身抗体很低或不存在。

实施例2:

[0317] 为了更好地了解大多数MG患者的自身抗体库,对Zisimopoulou et al., 2008, “Antigen-specific apheresis of human anti-acetylcholine receptor autoantibodies from myasthenia gravis patients’ sera using Escherichia coli-expressed receptor domains”中提供的数据进行了分析。基于针对各个AChR亚基的自身抗体对总抗AChR自身抗体库的贡献,绘制41个受试患者样品图(图2A)。由此可见,尽管针对 α 亚基的自身抗体的贡献对象很多,但很多其它对象也具有主要针对其它亚基的自身抗体,并且实际上绝大多数对象都具有靶向不同亚基的自身抗体的组合。因此,绘制一张图来显示通过与单个AChR亚基或亚基组合接触而将会得到至少50%或75%抑制的对象的百分比(图2B)。令人惊讶的是,单独 α 亚基,事实上单独任何亚基,在任何受试患者中都罕见产生75%的阻断。事实上,单独 α 亚基仅在约20%的患者中产生大于50%的抑制。

[0318] 为使MG治疗剂能够治疗至少50%的目标人群,并中和超过50%,理想地超过75%的自身抗体,将需要 $\alpha/\beta/\gamma/\delta/\epsilon$ 的组合(图2B)。虽然自身抗体水平的任何潜在降低都是有益的,但要产生一种能够实现大大降低并对大多数MG群体有效的治疗,则需要靶向多种AChR亚基。这也可通过这些亚基的双重和三重组合来实现。

实施例3:

[0319] MG患者的长期缓解需要去除产生自身抗体池的大部分自身反应性B细胞。单就从循环中去除自身抗体而言,虽然可能对治疗MG的症状有效,但在对象的余生中则需要重复治疗,因为长寿命B细胞将永久持续产生新的自身抗体。重要的是,产生自身抗体的B细胞在其表面上表达与自身抗体相同的B细胞受体(BCR)。这使得B细胞本身能够被包含BCR- (以及自身抗体) 特异性表位的治疗剂靶向。通过将靶表位偶联到抗体重链的Fc区,治疗剂能够直接特异性杀伤产生自身抗体的B细胞。这种方法对于特定亚群的潜在逃逸——其发生在使用靶向细胞表面上的特异性分化标记物(例如,CD19、CD38、BCMA)的剂之时——也是稳健

的,因为携带自身反应性BCR的每个细胞都将被靶向,而不管其分化状态如何。这种方法也有益于保护和保存非自身反应亚群——其受到靶向非特异性分化标记物(例如,CD19、CD38、BCMA)的治疗的损害而不管它们是否携带自身反应性BCR。

[0320] 图3A显示本发明治疗剂的一个实施方式。免疫球蛋白(Ig)样蛋白质复合物101包括四个多肽链:两个重链样多肽110和两个轻链样多肽120。链110能够通过它们之间的二硫键二聚化。此外,链110还可包括CH3结构域111、CH2结构域112、铰链区113和CH1结构域114中的任一个或全部。在此实施方式中,铰链区113包括二硫键并充当二聚化结构域,但使用其它二聚化结构域也是可能的。这些结构域在本领域中是公知的,并且可选自例如人IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE和IgD结构域中的任一种。本领域技术人员将理解,并入链110中的IgG1和IgG3的Fc部分将允许该分子引发抗体依赖性细胞细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)。链120能够通过CH1结构域114和CL结构域124中存在的二硫键与链110二聚化。

[0321] 链110和120不含可变区,不同于天然存在的或人造的抗体。代替可变区,每个链都具有来自人乙酰胆碱受体胞外部分的片段130。生成的每个链都可具有相同的AChR亚基或不同的亚基。实际上,如图3B所示,两个重链115和116可单独改造使得链115包含例如 β 亚基131,而链116包含 γ 亚基132。轻链125和126也是如此,例如,它们可包含 α 133和 ϵ 134亚基。因此,治疗分子可设计有单种亚基四个拷贝(图3C),两种不同亚基各两个拷贝(图3D),或四种不同亚基各一个拷贝(图3B),或其任意其它组合。事实上,该分子是足够模块化的,其可改造有一种亚基三个拷贝而另一种亚基一个拷贝,或一种亚基两个拷贝而其它两种亚基一个拷贝。图3E显示两个轻链相同但两个重链不同的实施方式。而图3F显示两个重链相同而两个轻链不同的实施方式。重要的是,治疗分子可被改造成包括五种不同AChR亚基中的四种,如上说明的,其可在至少50%的AChR阳性患者中引发超过50%的抑制,并且可在所有受试患者中引发至少40%的抑制。本领域技术人员将理解,任何链都可包括任意亚基,而图3A-3F中描绘的链和亚基的组合只是说明性而非限制性的。

[0322] 图4A-4F显示本发明的一些实施方式,其中仅组合两个链。在图4A-4E中,蛋白质复合物201包括2个多肽链,具体为两个重链。重链215和216可任选地包括CH2 212、CH3 211和/或CH1 214结构域。在此实施方式中,二聚化结构域是通过二硫键二聚化的重链铰链213,但也设想到了其它二聚化结构域。图4B显示无CH2结构域212或CH3结构域211或CH1结构域214的分子。也设想到了缺少这些结构域中的两个的组合(图4B)。代替可变区,每个链都具有来自人乙酰胆碱受体胞外部分的片段230。生成的每个链都可具有相同的AChR亚基(图4C)或不同的亚基(图4D)。当使用两种不同的亚基时,将分子设计使得形成主要是215和216的异二聚体而非同二聚体是有利的。形成图3中链115和链116的异二聚体也是如此。本领域已知存在多种技术用于设计CH3/CH2结构域中的突变,如杵臼结构、DuoBodies等,其抑制同二聚化并促进异二聚化。可采用任意这样的技术。

[0323] 在图4E中,显示了包括两个重链的可选构型。使用两个串联片段230,而非包含单个片段230来代替可变区。这些片段可通过任选的连接体290分隔。此构型在结构上类似于可变重链和轻链位于单个肽上的单链抗体,并且基本上等同于图3D所示的分子。重链215和216可任选地包括CH2 212、CH3 211和/或CH1 214结构域。在此实施方式中,二聚化结构域是通过二硫键二聚化的重链铰链213,但也设想到了其它二聚化结构域。为简洁起见,显示

了包括全部三个CH结构域的实例,以及缺少CH1结构域的实例。也设想到了缺少CH2或CH3结构域或缺少这些结构域中的任意两个的分子。将理解的是,片段230可来自任意AChR亚基。因此,相同亚基中的两个的重复段(repeat)可插入到单个链上(图4F,两个AChRg亚基232),或两个不同的亚基可组合在一个链上(图4G,一个AChRg亚基232,一个AChRa亚基233)。当然,重链不必相同,因为可使用各种技术来促进异二聚化而不是同二聚化(图4H,一个链上AChRg亚基232和AChRa亚基233,另一个链上AChRd亚基234和AChRb亚基231)。

[0324] 当然,如果两个重链不相同,则该分子可设计成其中一个重链包含两个串联片段230,另一个重链包含单个片段230(图4I)或不含片段(图4J)。两链上可以全部位置包括的都是相同的片段(图4K,一个链上两个AChRg亚基232,另一个链上单个AChRg亚基232),相同的片段被包括在两链上但串联位置具有不同的亚基(图4L,一个链上AChRg亚基232和AChRa亚基233,另一个链上单个AChRg亚基232),或全部三个片段都可以是不同的(图4M,一个链上AChRg亚基232和AChRa亚基233,另一个链上单个AChRb亚基231)。

[0325] 在图4N中,显示了包括两个重链的可选构型,其中两链上使用三个串联片段230。这些片段可通过任意的连接体290分隔。与两个串联片段一样,其中片段相同(图4O)或不同(图4P)的构型也是可能的。此外,两个链无需包含相同的片段(图4Q)或甚至相同数量的片段(图4R)。将理解的是,尽管图4F-4R显示仅有CH2 212和CH3 213结构域的分子,但是它们也可被构建为包括CH1结构域214或甚至仅包括其中一个结构域(CH1、CH2或CH3)。

[0326] 在图4S中,蛋白质复合物201包括2个多肽链,具体为重链215和轻链220。在这样的实施方式中,二聚化结构域是CH1结构域214和CL结构域224。重链215可任选地包括CH3结构域211、CH2结构域212和/或铰链区213。铰链结构域不存在,是消除两个重链215同二聚化的一种选择。可选地,可将半胱氨酸取代/突变(例如丝氨酸或谷氨酰胺)导入铰链,或可采用在CH2/CH3区域中促进异二聚化并抑制同二聚化的突变之一。代替可变区,每个链都具有来自任意人乙酰胆碱受体亚基的胞外部分的片段230。

[0327] 还设想到了蛋白质复合物301的创建,其具有三个链,重链315、重链316和轻链320(图5A-5D)。图5A显示一个可能的实施方式,其中重链316包括CL结构域364来代替CH1结构域。可采用上述确保315/316异二聚体的方法。重链315和316可任选地包括CH3结构域311、CH2结构域312和/或铰链区313,也可使用不同的二聚化结构域。轻链320内的CL结构域324只能与重链315内的CH1结构域314二聚化。代替可变区,每个链都具有来自任意人乙酰胆碱受体亚基的胞外部分的片段330。三个链可以都包含相同的片段(例如AChRg片段332,图5B),全部三个链可以都包含不同的片段(例如AChRb片段331、AChRg片段332和AChRa片段333,图5C),或三个链可以包含两个不同的片段,其中一个是重复的(例如AChRg片段332和AChRa片段333,图5D)。本领域技术人员将理解,图5D也可以这两个相同的片段为轻链并且有任一个重链,因此,此实施方式有3种不同的构型。

[0328] 此构型——其中一个重链包括CL结构域来代替CH1结构域——也可允许形成具有四个不同片段的蛋白质复合物。类似于图3B的蛋白质复合物,图6中描绘的蛋白质复合物401具有四个不同的片段在每个链上。在此实施方式中,使用片段AChRa 433、AChRb 431、AChRg 432和AChRe 434,但本领域技术人员将理解,可以使用任意四个片段。对于MG的治疗,可以使用AChRa、AChRb、AChRg、AChRd和AChRe中的任意四种。还设想到了来自相同蛋白质的不同片段可以在不同链上的实施方式。在此实施方式中,第二轻链426包含CH1结构域

474使得它可与重链416中的CL结构域464二聚化。重链415将包含CH1结构域414,而轻链425将包含CL结构域424。这确保链425只能与链415二聚化,而链426只能与链416二聚化。如上所述,任选的CH2结构域412和CH3结构域413中的突变可用于促进链415和416的异二聚化。铰链区413在这里用作两个重链之间的二聚化结构域,但可以使用任意二聚化结构域(CH1/CL除外)。

[0329] 在上述实施方式中,描绘和描述了免疫球蛋白骨架,但是本领域技术人员将理解,通过选择其它二聚化结构域类似的分子。图7A-7D显示通用蛋白质复合物501。在图7A中,第一链515包含第一二聚化结构域(DD1)563,其可与第二链516的第二二聚化结构域(DD2)573特异性二聚化。链515还包括第三二聚化结构域(DD3)514,其可与第三链525的第四二聚化结构域(DD4)524特异性二聚化。链516还包括第五二聚化结构域(DD5)564,其可与第四链526的第六二聚化结构域(DD6)574特异性二聚化。四个链中的每一个还包括重症肌无力自身抗体的人蛋白质靶标的片段530。如上讨论的,这些靶标包括AChRa、AChRb、AChRg、AChRd和AChRe。这些可以是含相同氨基酸序列的相同片段,它们也可以是不同的序列(来自相同蛋白质或来自不同蛋白质)。

[0330] 图7B显示图7A的可选实施方式,其中每个不同的结构域都被连接体分隔。本领域技术人员将理解,所有这些连接体都是任选的,并且设想到了连接体的组合。还将理解的是,图7B的构型也可在各种结构域/片段中的任一个或全部之间使用连接体。

[0331] 在图8A-8E中,描绘了本发明的单链实施方式。图8A显示包含第一乙酰胆碱受体亚基的片段(AChRa,633)和第二乙酰胆碱受体亚基的片段(AChRg,632)的单链融合蛋白601。当然将理解的是,可使用两个不同片段的任意排列。具体地,可使用来自两种不同蛋白质的片段。图8B和图8C显示类似的实施方式,但分别包含来自不同蛋白质的3个和4个片段。如图8D所示,单链还可包含重链恒定区,其具有至少CH3结构域611和任选的CH1结构域614、铰链区613和/或CH2结构域612。最后,氨基酸连接体可用于分隔单链的其中任意结构域。图8E描绘了2、3或4个片段都被连接体690分隔的实施方式,以及片段633和632被连接体690分隔并且连接体690也将C-末端片段632与CH1结构域614分隔的实施方式。尽管并未描述将CH1结构域614、铰链区613、CH2结构域612和CH3结构域611分隔的连接体,但是本领域技术人员将理解的是,这些结构域中的任一个或全部都可通过连接体分隔。此外,将理解的是,这些各种连接体可以全都包含相同的序列,也可由不同的氨基酸序列构成。此外,将理解的是,还设想到了仅用1个或全部5个片段的排列。

[0332] 尽管在图4-图8中并未描述,但乙酰胆碱受体亚基可能包含突变。此类突变可增加溶解性,如上文所述的那样。此类突变可抑制配体结合,如上文所述的那样。此类突变可减少聚集,如上文所述的那样。上述以及图4-图8所示的任意构建体都可在其中一个或多个片段中包括此类突变。

[0333] 上述各种分子以各种形式生成。溶解性增加的环置换亚基(Loop replaced subunit)ECD(SEQ ID NO:131-135)(如Lazaridis et al.,2014,“Expression of human AChR extracellular domain mutants with improved characteristics”,Int J Biol Macromol.2014Feb;63:210-7(特此通过引用以其整体并入)中公开的)用于生成这些分子,因为由于溶解性的增加,能够产生远远更高的蛋白质产率。

实施例4:

[0334] 为进一步测试治疗大部分MG群体的能力,在更大的同龄组(队列,cohort)中重复上文所述的体外耗竭测定。根据至少50%的群体中,中和抗AChR抗体的能力,确定来自下列五种ECD环置换亚基的AChR亚基的最佳组合: α -1、 β -1、 γ 、 δ 和 ϵ 。然后将本发明的下列分子(蛋白质复合物):1) 1-CL/1-CH1-CH2-CH3(图3D);2)

1-CL/1-CH1-CH2-CH3/-CH1-CH2-CH3(图3E)或3) 1-CL/

1-CH1-CH2-CH3/-CH1-CH2-CH3(图3E)用于测定中,显示其产生这种升高水平的阻断。

大鼠MG模型的引发及临床评估

[0335] 被动转移MG模型:向雌性Lewis大鼠腹膜内或皮下注射针对AChR亚基的抗体以引发MG,并按照Losen等人的方法(Experimental Neurology 270,2015,其通过引用以其整体并入本文)评估EAMG临床评分的变化。在抗AChR亚基抗体施用后以不同剂量和在不同时间点静脉内或皮下施用本发明的分子,并确定本发明的分子降低自身反应性抗体的滴度、降低MG临床评分和与对照相比处理组总存活率增加的能力。为检查 α -1AChR亚基,在mAb35抗 α -1单克隆抗体施用后以不同剂量和在不同时间点静脉内施用本发明的分子1-CL/1-CH1-CH2-CH3(图3D)。 $\#1$ 组大鼠($n=12$)接受PBS作为阴性对照。 $\#2$ 组大鼠($n=10$)接受四剂10mg/kg本发明分子。在抗体施用后4、12、24和32小时给予各剂。 $\#3$ 组大鼠($n=6$) 在抗体施用后7小时接受1剂40mg/kg。 $\#4$ 组大鼠($n=6$) 在抗体施用后7小时接受1剂20mg/kg。 $\#6$ 组大鼠($n=6$) 在抗体施用后7小时接受1剂6mg/kg。 $\#5$ 组大鼠($n=6$) 同样在抗体施用后7小时接受1剂20mg/kg,但此施用是皮下施用。不管剂量多少或施用途径如何,本发明的分子始终如一地降低抗体处理的大鼠的MG临床评分(图3G)。此外,还观察到剂量依赖性,因为1剂20或40mg/kg略优于单剂6mg/kg。有趣的是,4剂10mg/kg显示出最佳临床效果。皮下施用显示,与PBS对照相比有所改善,但明显不如I.V.施用。还测量了大鼠的总体存活率(图3H)。在存活率方面,未观察到处理之间有何微小差异,因为所有I.V.注射均在超过5天后导致100%存活率。同样,皮下施用效果降低。

[0336] 接下来,测试本发明分子(1-CL/1-CH1-CH2-CH3)与IVIG等同物的比较。IVIG可能治疗MG的机制是通过用非特异性抗体使身体饱和来减少总抗体产生。此外,饱和水平的Fc的存在会竞争全身的Fc受体。为模拟这种情况,使被动MG大鼠经1剂20mg/kg的该分子静脉施用处理,或经相同剂量的两种不同的无关蛋白处理,每种蛋白均与Fc连接。这些非特异性Fc本质上等同于IVIG。从图3I中可看出,正如预期的,本发明的分子对临床评分具有显著影响(也参见图3G)。非特异性Fc具有非常温和的阳性作用,但明显比特异性分子差。当观察小鼠存活时观察到类似的结果(图3J),本发明的分子导致100%存活率,而非特异性分子仅产生适度的改善。

[0337] 使用表面等离子体共振(SPR)的亲和力分析:使用SPR装置测量1-ECD单体和1-CL/1-CH1-CH2-CH3(图3C)四聚体或1-CH2-CH3(图4B)二聚体对mAb35抗体的亲和力(affinity) vs 亲合力(avidity)。mAb35作为配体被固定在传感器芯片上。使不同浓度的1-单体、1-CL/1-CH1-CH2-CH3四聚体(图3C)和1-CH2-CH3二聚体(图4B)作为分析物反应。可选地,1-单体、1-CL/1-CH1-CH2-CH3四聚体(图3C)和/或1-CH2-CH3二聚体(图4B)作为配体被固定在传感器芯片上。使不同浓度的mAb35抗体作为分析物反应。使用SPR评估软件,采用全局拟合法对所获得的传感器图进行分析。确定上述1-ECD二聚体和四聚体分子与1-单体(亲和力)相比

增加与mAb35抗体的结合强度(亲和力)的能力。

实施例5:减少亚基聚集的突变

[0338] ACHR亚基意图复合在一起形成活性受体。然而,观察到当亚基各自独立表达时,也有大量的自相互作用导致高水平的聚集。因此,在假设负责聚集的各种亚基的区域中生成突变。具体地,废除可导致二硫键合的游离胞嘧啶。亚基上的双相互作用表面被破坏,疏水表面变得更亲水。这些突变体旨在减少聚集,而不显著破坏自身抗体表位和抗体结合。环置换亚基被用作突变的基础。

[0339] 表2-表4提供在 α 、 γ 和 δ 亚基中产生的突变。 β 亚基未表现出大幅聚集,因此并未针对其设计突变体。在CHO细胞中通过瞬时表达使这些分子表达,并在镍柱上通过亲和层析纯化这些蛋白质。出于纯化目的,在每个亚基的C-末端添加刚性连接体,之后添加His-Avi标签(HHHHHHHHPGSLNDFEFAQKIEWHE,SEQ ID NO:138)。在还原和非还原SDS page两者上使蛋白质可视化,从而使聚集可视化,并使用蛋白质印迹证实条带确实是所表达的亚基的聚集体。最后,通过SEC-HPLC检查所产生的蛋白质。由于所有亚基(WT和突变体)的大小相同,因此它们应当在同一时间点洗脱。预期亚基的单体将最后洗脱。最后一个峰下的面积被认为代表单体亚基,并由此计算出以单体形式存在的分子的百分比并在表中提供。

[0340] 表2: α 亚基突变体

CRD#	SEQ ID NO:	分子描述	%单体	产率 (mg/L)
CRD-350	131	ECD α	22.09	88.8
CRD-412	72	ECD α (w/o N141)	32.86	51
CRD-640	73	ECD α (F100G)	39.52	48
CRD-642	74	ECD α (W149R)	59.23	42
CRD-643	75	ECD α (V155A)	47.18	48
CRD-761	76	ECD α (Y93F)	42.8	38
CRD-762	77	ECD α (Y93H)	50.5	48
CRD-763	78	ECD α (Y93R)	44.72	16

[0341] 表3: γ 亚基突变体

CRD#	SEQ ID NO:	分子描述	%单体	产率 (mg/L)
CRD-370	133	ECD γ	28.77	54.5
CRD 375	79	ECD γ M84S	25.82	48.4
CRD 376	80	ECD γ Y105E	34.44	127.9
CRD 378	81	ECD γ Y117R	32.15	75.7
CRD 380	82	ECD γ M84S/Y105E	30.8	123.2
CRD 381	83	ECD γ M84S/Y105E/Y117E	42.66	118.5
CRD 382	84	ECD γ M84S/Y105E/Y117R	50.99	139.2
CRD 383	85	ECD γ Y105E/Y117E	52.48	125.8
CRD-510	86	ECD γ Y105E/Y117R	43.7	279.2

[0342] 表4: δ 亚基突变体

CRD#	SEQ ID NO:	分子描述	%单体	产率 (mg/L)
CRD-390	134	ECD δ	5.19	15.6
CRD 391	87	ECD δ C108A	19.55	86.2
CRD 392	88	ECD δ C108I	17.84	74.4
CRD 396	89	ECD δ Y119R	10.04	127.5
CRD-574	90	ECD δ C108A, Y119R, w/o N141	35.14	25
CRD-638	91	ECD δ C108A, Y119R, L151E	24.18	116

[0343] 除 γ 亚基中的M84S突变之外,所有生成的突变体确实减少聚集并增加单体产生量。在很多情况下,所产生的蛋白质的总产率也大大提高。虽然M84S突变不降低聚集,但也不大幅增加聚集或影响产率,而且此突变还有一个额外的益处是防止暴露的甲硫氨酸在分子保质期内氧化。其中一些 δ 突变仅产生适度的单体增加,然而注意到随着分子量聚集得更高,二聚体也会增加。这也是一个有益的结果,二聚体虽然不如单体理想,但优于大的聚集体。

[0344] 接下来,测试各种分子从人MG血清(滴度 $>0.5\text{nM}$)中耗竭亚基特异性抗AChR IgG抗体的能力。为此,用包含本发明分子的c-末端生物素化ECD修饰亲和素包被的琼脂糖凝胶珠。然后在室温、摇晃(400RPM,轨道式)下使MG血清样品与分子包被珠或不与分子包被珠($0.57\mu\text{M}$)一起温育1小时。离心($3,200\times g$,5分钟)后,收集上清液并使用Euroimmun ELISA测试抗AChR IgG浓度。耗竭率如上计算。将突变的ECD的耗竭情况与WT对应物的耗竭情况进行比较。

[0345] 图9通过显示多个血清样品的平均耗竭,汇总出耗竭研究的结果。包含对 α 亚基的cys环的置换以增加溶解性的CRD-101与同Fc片段融合的野生型 α 亚基(CRD-269,SEQ ID NO:101)一样有效。CRD-642——包含带W149R突变的 α 亚基(以及包括在所有下列分子中的环置换)——与CRD-101一样有效。CRD-382——在 γ 亚基中包含三重突变M84S/Y105E/Y117R——与野生型 γ 亚基(CRD103)一样有效。类似地,CRD-391——包含带C108A突变的 δ 亚基——与野生型 δ (CRD-104)一样有效。

[0346] 当检查单个血清样品时,发现其中很多突变体ECD实际上优于其未突变的对应物。直接将CRD-101(Cys环置换的 α 亚基)与CRD-269(与Fc融合的WT α)进行比较,发现其耗竭增加约17%,在统计学上显著($p<0.0001$)(图10A)。除通过置换cys环产生的增加之外,还发现添加W149R突变使耗竭增加约13%($p<0.0001$)(图10B)。C108A突变添加到 δ 亚基中使耗竭增加约15%($p<0.0001$)(图10C)。然而, γ 亚基中的三重突变并未引起耗竭增加,但它也未减少耗竭(图10D)。

实施例6:ECD结合B细胞的能力

[0347] 接下来,测试本发明的分子与表达MG自身抗体的B细胞杂交瘤结合的能力。将荧光标记的链霉亲和素分子与C-末端标记有生物素的各种突变的ECD分子一起温育。每个链霉亲和素分子结合四个生物素分子,因此所得的分子实际上是ECD四聚体。培养表达针对不同AChR亚基的BCR的各种杂交瘤。其中四个杂交瘤表达抗 α 亚基抗体(Mab35、a-192、a-195和a-198),一个表达抗 β 抗体(b-73),两个表达抗 γ 抗体(g-66和g-67),三个表达抗 δ 抗体(43-E4-B4、69-G11-D5-F7和23-F3-H1)。产生无关靶标抗体的各种杂交瘤用作阴性对照。杂交瘤细胞与ECD四聚体温育后,将细胞洗涤(DPBS+1% FBS)两次,并通过流式细胞仪分析细胞表

面上的荧光(CytoFlex, Beckman Coulter)。从图11中可以看出,每个亚基四聚体特异性结合表达针对该四聚体的抗体的杂交瘤细胞。与其它杂交瘤的非特异性结合类似于与阴性对照的结合。这表明本发明的分子不仅能结合血清中的MG自身抗体,还能结合(并杀伤)产生自身抗体的B细胞而不伤害其它B细胞。

[0348] 测试产生无关靶标抗体的17种不同的杂交瘤细胞系以确定非特异性/背景结合。这些靶标包括:其它自身免疫性疾病的蛋白质靶标(3个杂交瘤)、整合素 $\beta 3$ (2个杂交瘤)、病原剂(9个杂交瘤,包括病毒和细菌)和3个人表面蛋白(3个杂交瘤)。令人惊讶地发现,包括未突变 α 亚基的四聚体(CRD-101,但包含cys环取代)非特异性地结合至少一个阴性对照杂交瘤(AP-3,针对整联蛋白 $\beta 3$ 的抗体,图12)。然而,CRD-642并未显示这种非特异性结合,因此显示出出乎意料的提高的特异性。

实施例7:包括ECD组合的分子

[0349] 接下来,生成突变体胞外结构域的各种组合。使用IgG Fc的CH2和CH3结构域生成三组不同的组合分子(除非另有明确说明,使用的则是WT IgG1)。在第一批(表5)中,一个具有野生型 α 亚基,另一个具有突变 γ 的重链组合产生惊人的高产率。将 α 亚基和突变体 γ 放在同一个链上但用GS柔性连接体隔开,也产生良好的蛋白质产率。一个链上野生型 α 与另一个链上突变体 δ 的组合,以及具有突变体 δ 的链与具有突变体 γ 的第二链的组合都产生惊人的高产率。还用突变体 α 、突变体 γ 和突变体 δ 生成三重组合。这两种分子(一种在其自身的重链上具有 δ ,一种在其自身的重链上具有 γ)都未表现出差的产率。分选酶标签(LPETG, SEQ ID NO:139)被添加到其中一些链的C-末端。

[0350] 表5:组合分子

CRD#	SEQ ID NO:	分子描述	产率 (mg/L)
CRD-506	92; 93	α ECD-CH2-CH3 杵臼结构 (KiH); γ (Y105E/Y117R) ECD-CH2-CH3 KiH	524
CRD-509	94	α ECD-GS 连接体- γ (Y105E/Y117R) ECD-CH2-CH3	206.8
CRD-521	95; 96	α ECD-GS 连接体- γ (Y105E/Y117R) ECD-CH2-CH3 KiH; α ECD-GS 连接体- δ (C108A) ECD-CH2-CH3 KiH	90
CRD-570	97; 98	α (w/o N141) ECD-GS 连接体- γ (M84S/Y105E/Y117R) ECD-CH2-CH3 KiH; δ (C108A, w/o N141) ECD-CH2-CH3 KiH	76.5
CRD-571	99; 100	α (w/o N141) ECD-GS 连接体- δ (C108A, w/o N141) ECD-CH2-CH3 KiH; γ (M84S/Y105E/Y117R) ECD-CH2-CH3 KiH	138.5
CRD-585	92; 102	α ECD-CH2-CH3 KiH; δ (C108A) ECD-CH2-CH3 KiH	338.5
CRD-586	103; 100	Δ (C108A) ECD-CH2-CH3 KiH; γ (M84S/Y105E/Y117R) ECD-CH2-CH3 KiH	368.5

[0351] 在第二批(表6)中,测试其它组合。两个不同重链的组合(通过杵臼结构修饰)和通过连接体在单链上的组合都产生足够的产率。测试的最后一批分子(表7)测试各种其它连接体(较长的柔性连接体和刚性连接体)以及Fc区的变化,如降低细胞毒性的变化。同样,产生足够的产率。因此,所有产生的分子作为治疗剂都是可行的。

[0352] 表6:其它组合分子

CRD#	SEQ ID NO:	分子描述	产率 (mg/L)
CRD-509	94	α ECD-GS 连接体- γ (Y105E/Y117R) ECD-CH2-CH3	93
CRD-600	104	α ECD-GS 连接体- γ (M84S/Y105E/Y117R) ECD-CH2-CH3	100.5
CRD-604	105; 130	α ECD-GS 连接体- γ (M84S/Y105E/Y117R) ECD-CH2-CH3 KiH; α ECD-GS 连接体- δ (C108A)	57
		ECD-CH2-CH3 KiH	
CRD-615	105; 106	α ECD-GS 连接体- γ (M84S/Y105E/Y117R) ECD-CH2-CH3 KiH; α ECD-GS 连接体- δ (C108A/Y119R) ECD-CH2-CH3 KiH	79.5
CRD-616	105; 107	α ECD-GS 连接体- γ (M84S/Y105E/Y117R) ECD-CH2-CH3 KiH; α ECD-GS 连接体- δ (C108A/L151E) ECD-CH2-CH3 KiH	49.5
CRD-624	108	γ (M84S/Y105E/Y117R) ECD-GS 连接体- α ECD-GS 连接体- δ (C108A) ECD-CH2-CH3	52.5
CRD-625	109	γ (M84S/Y105E/Y117R) ECD-GS 连接体- α ECD-GS 连接体- γ (M84S/Y105E/Y117R) ECD-CH2-CH3	49.5
CRD-766	110	α (Y93H) ECD-GS 连接体- γ (M84S/Y105E/Y117R) ECD-CH2-CH3	30
CRD-767	111	α (W149R/Y93H) ECD-GS 连接体- γ (M84S/Y105E/Y117R) ECD-CH2-CH3	67.5
CRD-768	112	α ECD-GS 连接体- γ (M84S/Y105E/Y117R) ECD-CH2-CH3 (IgG4)	27.5
CRD-769	113	α ECD-GS 连接体- γ (M84S/Y105E/Y117R) ECD-CH2-CH3 (LALA)	32.5
CRD-770	103/102	Δ (C108A) ECD-CH2-CH3 KiH; δ (C108A) ECD-CH2-CH3 KiH	616
CRD-850	114	α (W149R) ECD-GS 连接体- γ (M84S/Y105E/Y117R) ECD-CH2-CH3	230.8
CRD-859	115	γ (M84S/Y105E/Y117R) ECD-GS 连接体- α (W149R) ECD-GS 连接体- γ (M84S/Y105E/Y117R) ECD-CH2-CH3	88.1
CRD-860	116	γ (M84S/Y105E/Y117R) ECD-GS 连接体- α ECD-GS 连接体- γ (M84S/Y105E/Y117R) ECD-CH2-CH3 KiH	47

[0353] 表7:含改变的连接体或Fc修饰的组合分子

CRD#	SEQ ID NO:	分子描述	产率 (mg/L)
CRD-850	114	α (W149R) ECD-(GGGS)6- γ (M84S/Y105E/Y117R) ECD-CH2-CH3	170
CRD-509	94	α ECD-(GGGS)6- γ (Y105E/Y117R) ECD-CH2-CH3	112.5
CRD-900	117	α (W149R) ECD-(GGGS)6, γ (M84S/Y105E/Y117R) ECD-CH2-CH3 (LALA)	185
CRD-901	118	α (W149R) ECD-(GGGS)6- γ (M84S/Y105E/Y117R)-(GGGS)3-CH2-CH3 (LALA)	202.5
CRD-902	119	α (W149R) ECD-(GGGS)6-GS- γ (M84S/Y105E/Y117R) ECD-(GGGS)3-CH2-CH3 (LALA)	197.5
CRD-903	120	α (W149R) ECD-(GGGS)5-GS- γ (M84S/Y105E/Y117R) ECD-(GGGS)3-CH2-CH3 (LALA)	172.5
CRD-904	121	α (W149R) ECD-EAAAKEAAAKGGS- γ (M84S/Y105E/Y117R) ECD-(GGGS)3-CH2-CH3 (LALA)	197.5
CRD-905	122	α ECD-EAAAKEAAAKGGS- γ (M84S/Y105E/Y117R) ECD-(GGGS)3-CH2-CH3 (LALA)	98
CRD-906	123	α ECD-EAAAKEAAAKGGS- γ ECD-(GGGS)3-CH2-CH3 (LALA)	42
CRD-913	124	CH2-CH3 (LALA)-(GGGS)3- γ (M84S/Y105E/Y117R) ECD-(GGGS)6- α (W149R) ECD	88
CRD-914	125	CH2-CH3 (LALA)-(GGGS)3- α (W149R) ECD-(GGGS)6- γ (M84S/Y105E/Y117R) ECD	90
CRD-915	126	CH2CH3 (LALA), (GGGS)3, γ (M84S/Y105E/Y117R), (GGGS)5, α (W149R)	74
CRD-927	127	α ECD-(GGGS)6- γ (M84S/Y105E/Y117R) ECD-(GGGS)3-CH2-CH3 (LALA/N297A)	84
CRD-928	128	α ECD-(GGGS)6- γ (M84S/Y105E/Y117R) ECD-(GGGS)3-CH2-CH3 (LALA/N297Q)	74
CRD-929	129	α ECD-(GGGS)6- γ (M84S/Y105E/Y117R) ECD-(GGGS)3-CH2-CH3 (LALA)	90

[0354] 在与单独对ECD进行的相同测定中,测试所产生的分子的耗竭能力。双亚基和三亚基分子似乎产生接近加性的效应,表明当包括在分子中时,所有存在的亚基仍然结合其靶标自身抗体(图9)。

[0355] 还使用组合分子进行杂交瘤结合测定。在此测定中,使用PE标记的抗人FC多克隆抗体,通过FACS检测杂交瘤上的分子结合。将包括一个拷贝的cys环置换 α 亚基和一个拷贝的突变 γ 亚基(也是环置换的)的CRD-506与三个抗 α 杂交瘤系、一个抗 β 系、一个抗 γ 系和产生无关蛋白抗体的三个阴性对照系一起温育。从图13A可以看出,组合分子与所有 α 和 γ 杂交瘤都强结合,但不与 β 或阴性对照杂交瘤结合。这表明组合分子的特异性和功能性。

[0356] 还测试了另外两种 α - γ 分子。CRD-509包括两个重链,每个重链具有由连接体分隔的串联 α 和 γ 亚基。 γ 亚基是双突变的。CRD-600是一个类似的分子,但有一个三重突变。两种分子都只与抗 α 杂交瘤细胞结合,而不与阴性对照杂交瘤结合(图13B)。类似地,两种分子都与抗 γ 杂交瘤结合(图13C)。有趣的是,测试5种不同的阴性对照杂交瘤系,虽然两种分子

都显示出非常少的非特异性结合,但三重突变体相比双突变体显示出的非特异性结合要更少,这表明出乎意料的优越性。这些结果强化了这一结论:即使不同的ECD位于同一个链,这些ECD的组合也不会废除其结合能力。

[0357] 针对仅含野生型 α 亚基的重链同型二聚体 (CRD-269) 测试其中几种组合分子。出乎意料的是,这些分子尽管仅具有一个拷贝的 α 亚基,但实际上是优于抗 α 杂交瘤的结合剂 (图14)。这可能是由于 α 亚基中cys环的置换。

[0358] 对 α - δ 双分子 (CRD-585) 的测试显示仅与抗 α 和抗 δ 杂交瘤特异性结合 (图15A)。类似地, γ - δ 双分子 (CRD-586) 仅显示与抗 γ 和抗 δ 杂交瘤的特异性结合 (图15B)。包括IgG4 Fc而非IgG1不会对结合产生负面影响 (图15C)。类似地,IgG1 Fc中降低效应子功能的突变不会对结合产生负面影响。

[0359] 尽管结合本发明的具体实施方式描述了本发明,但显然多种可选方案、修改和变型对于本领域技术人员将是显而易见的。因此,旨在涵盖落入所附权利要求的精神和广泛范围内的所有这样的可选方案、修改和变型。

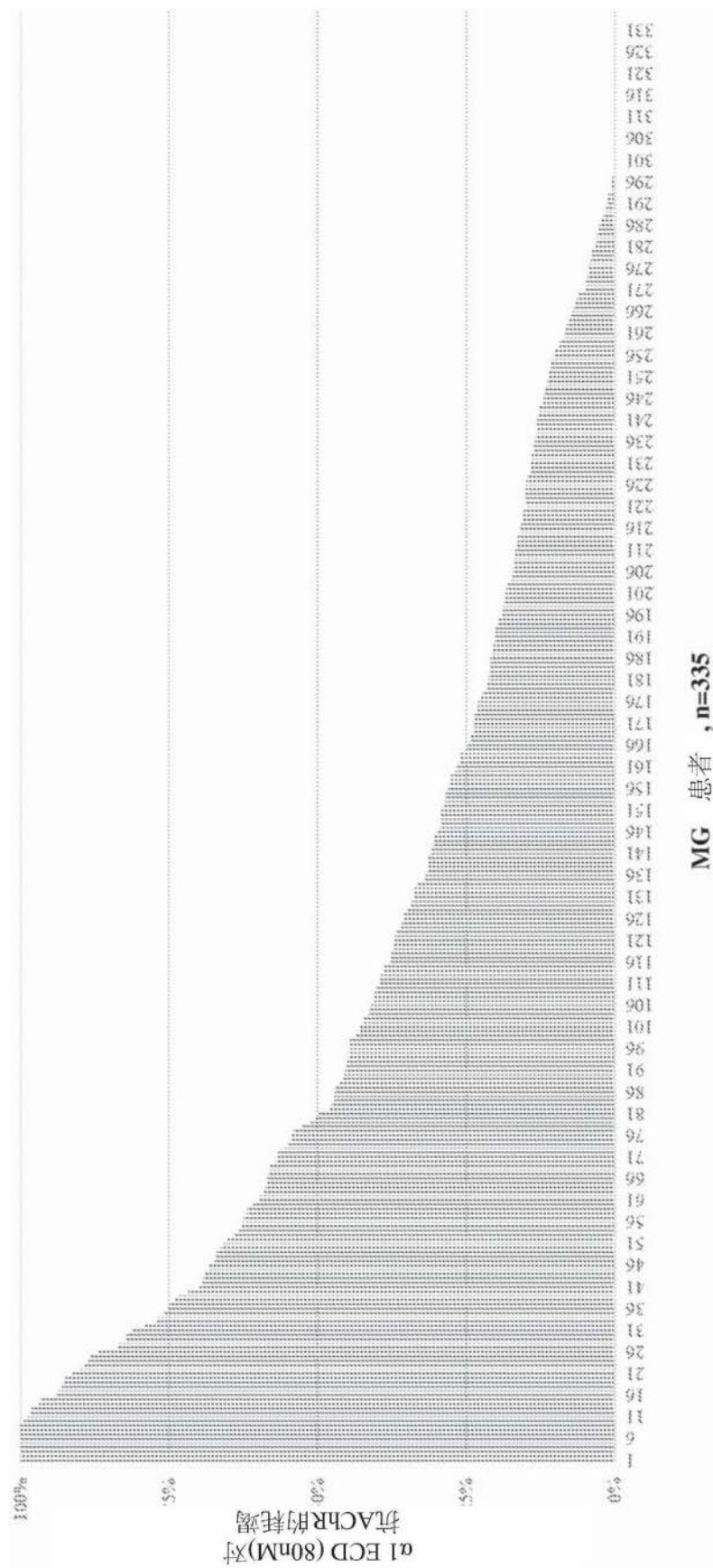


图1A

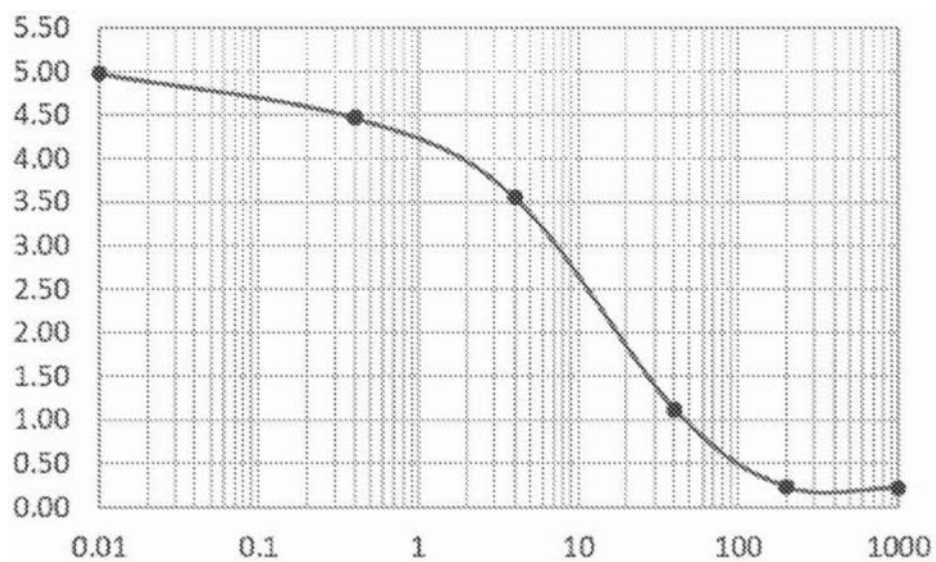


图1B

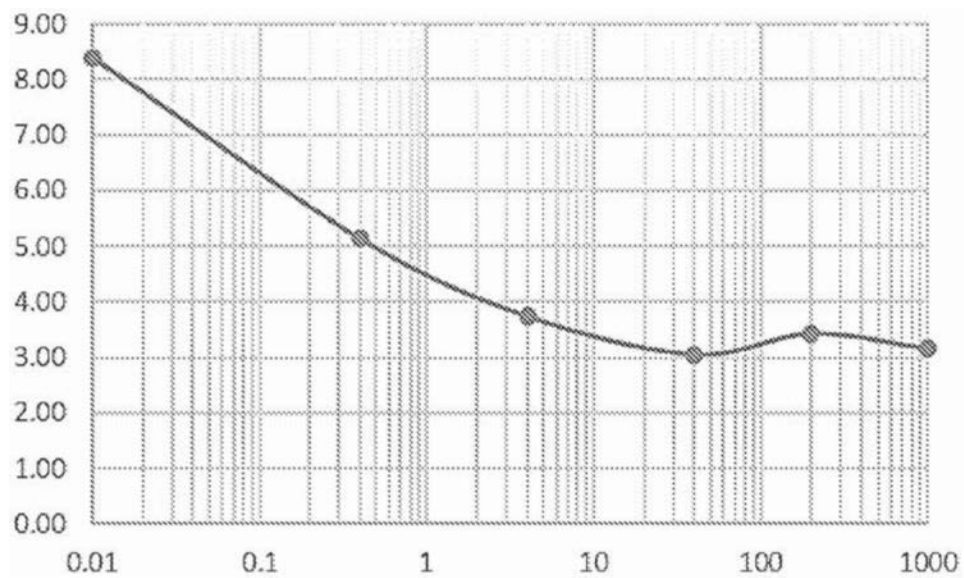


图1C

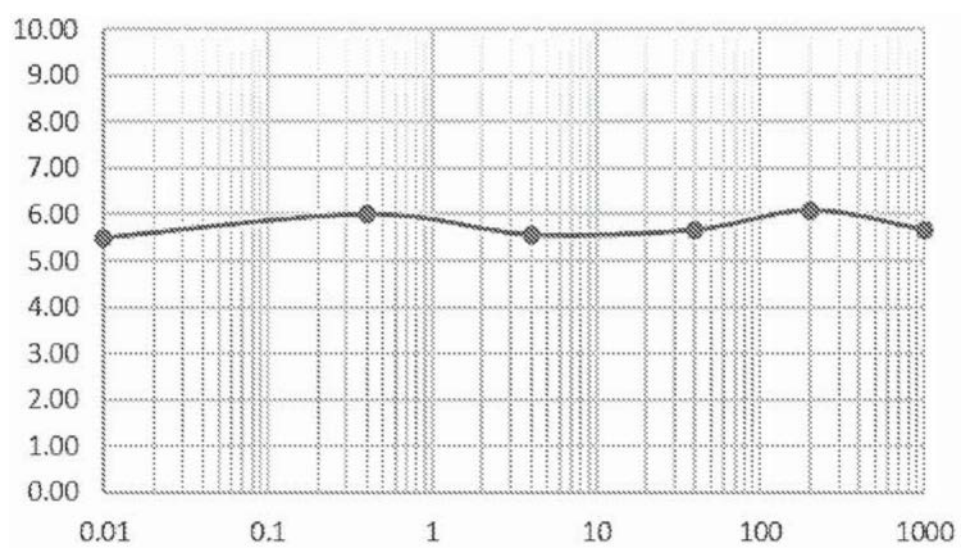


图1D

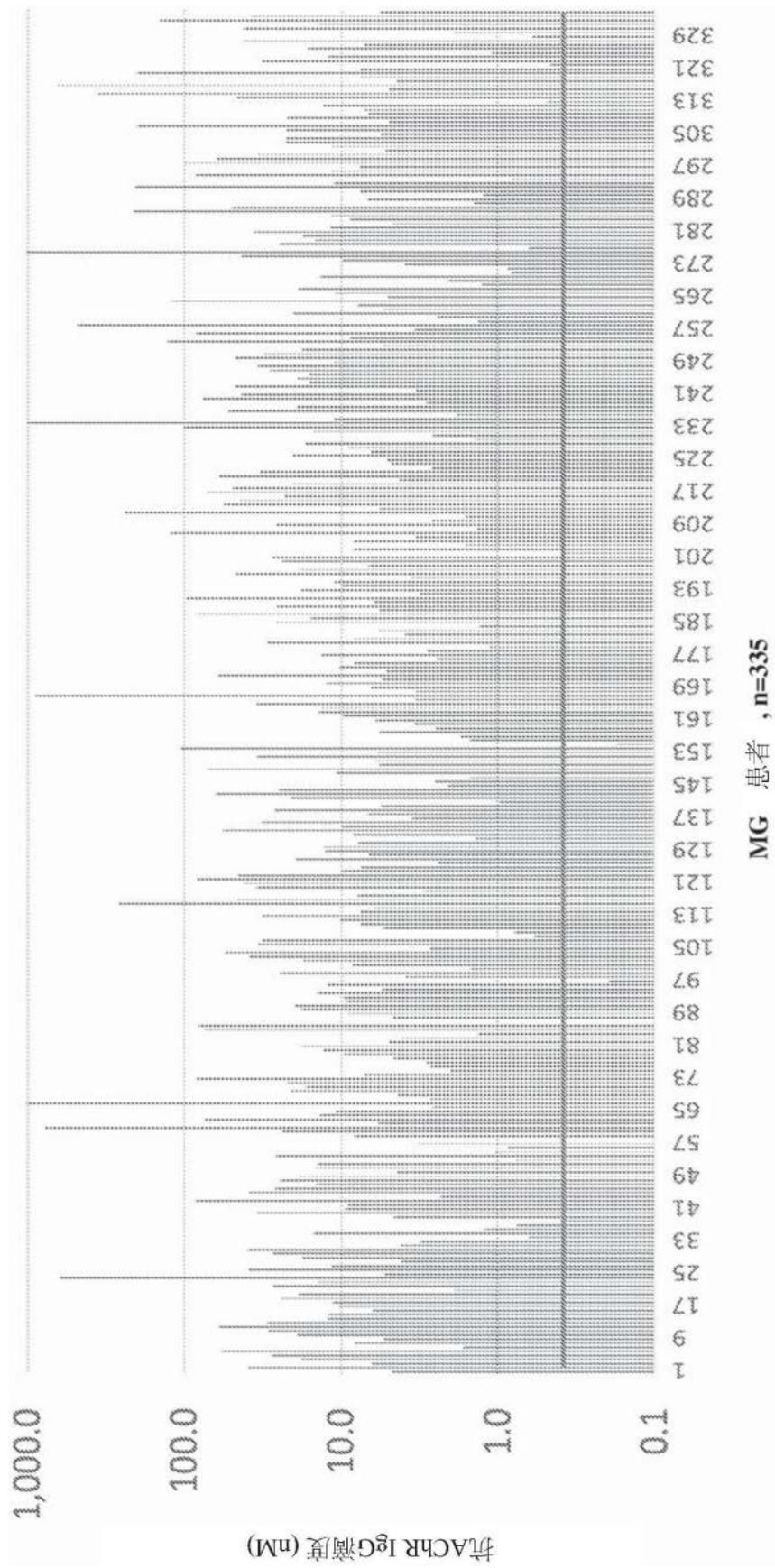


图1E

利用耗竭测定 确定AChR片段特异性抗体的%

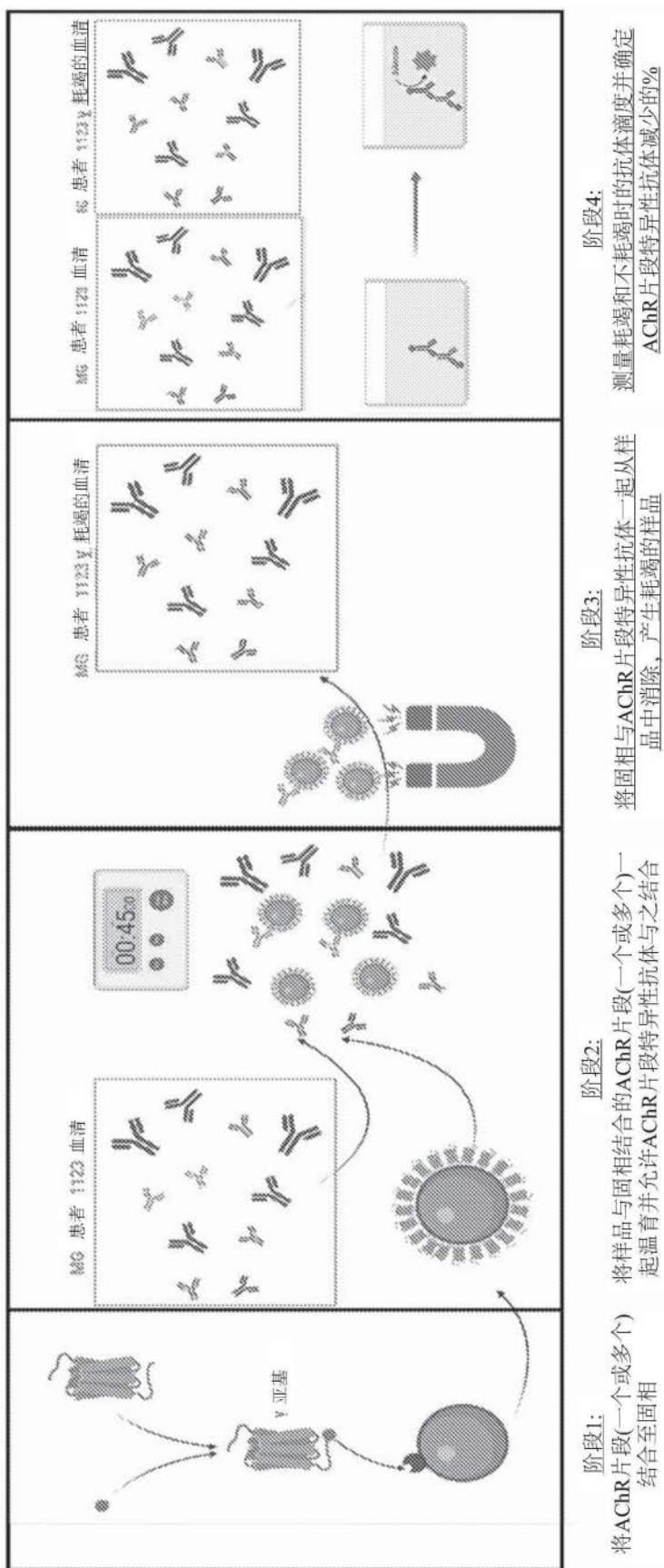


图1F

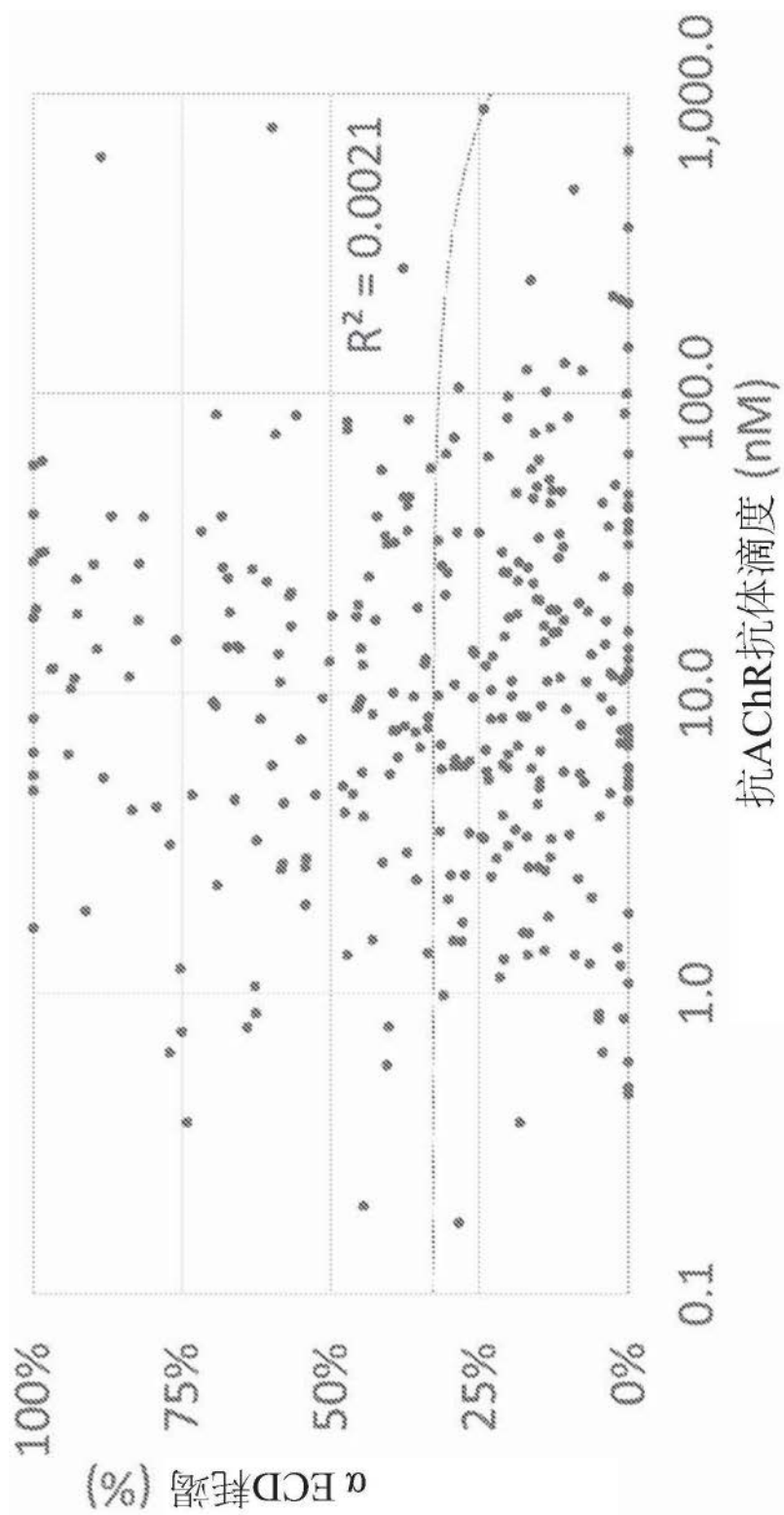


图1G

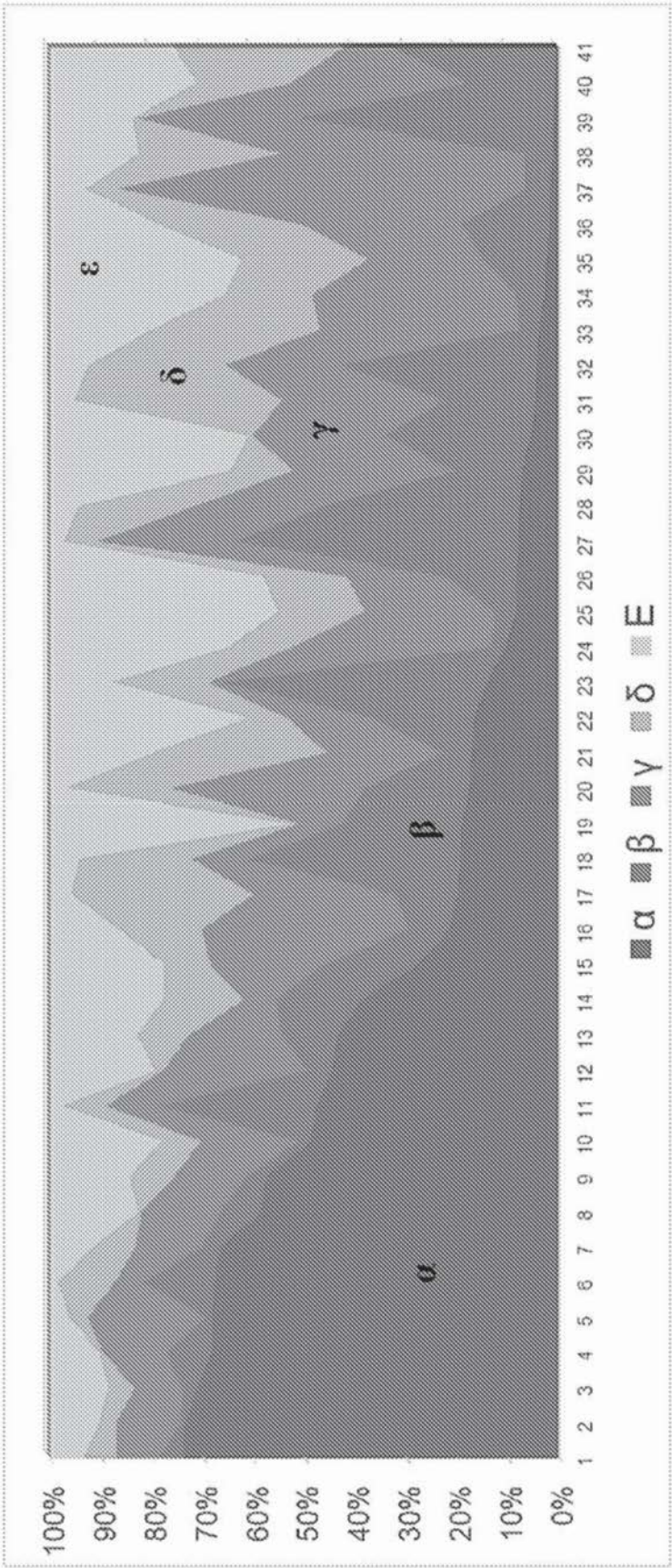


图2A

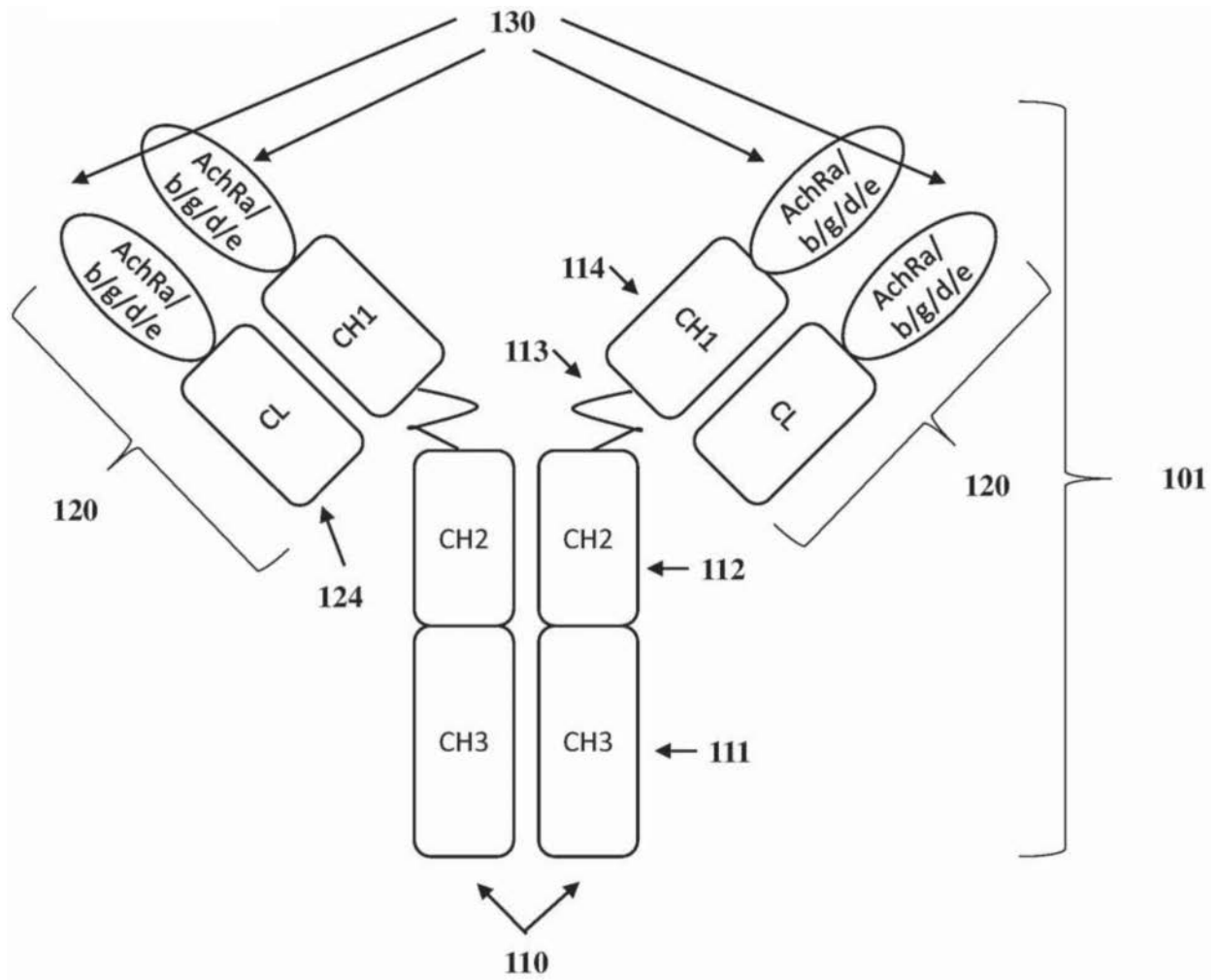


图3A

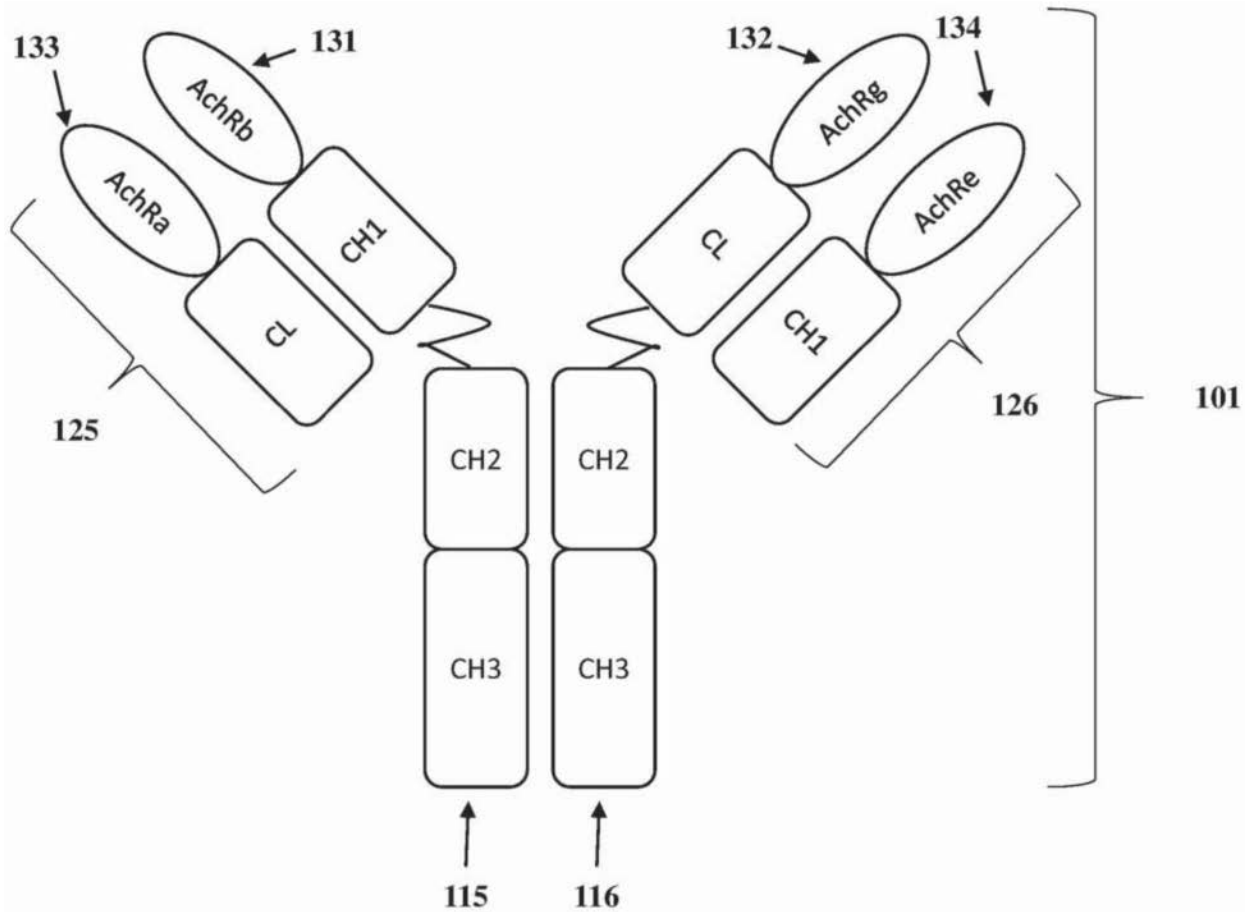


图3B

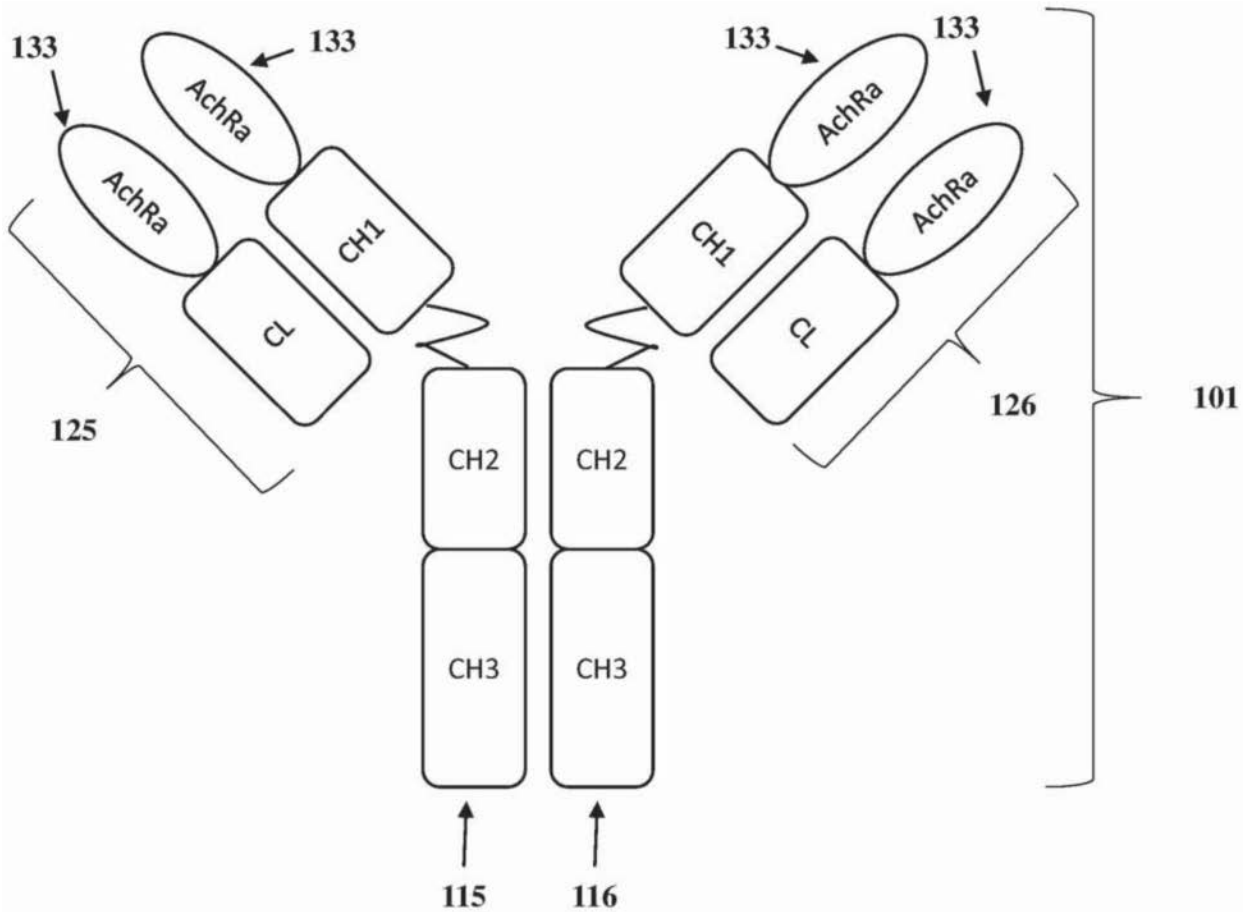


图3C

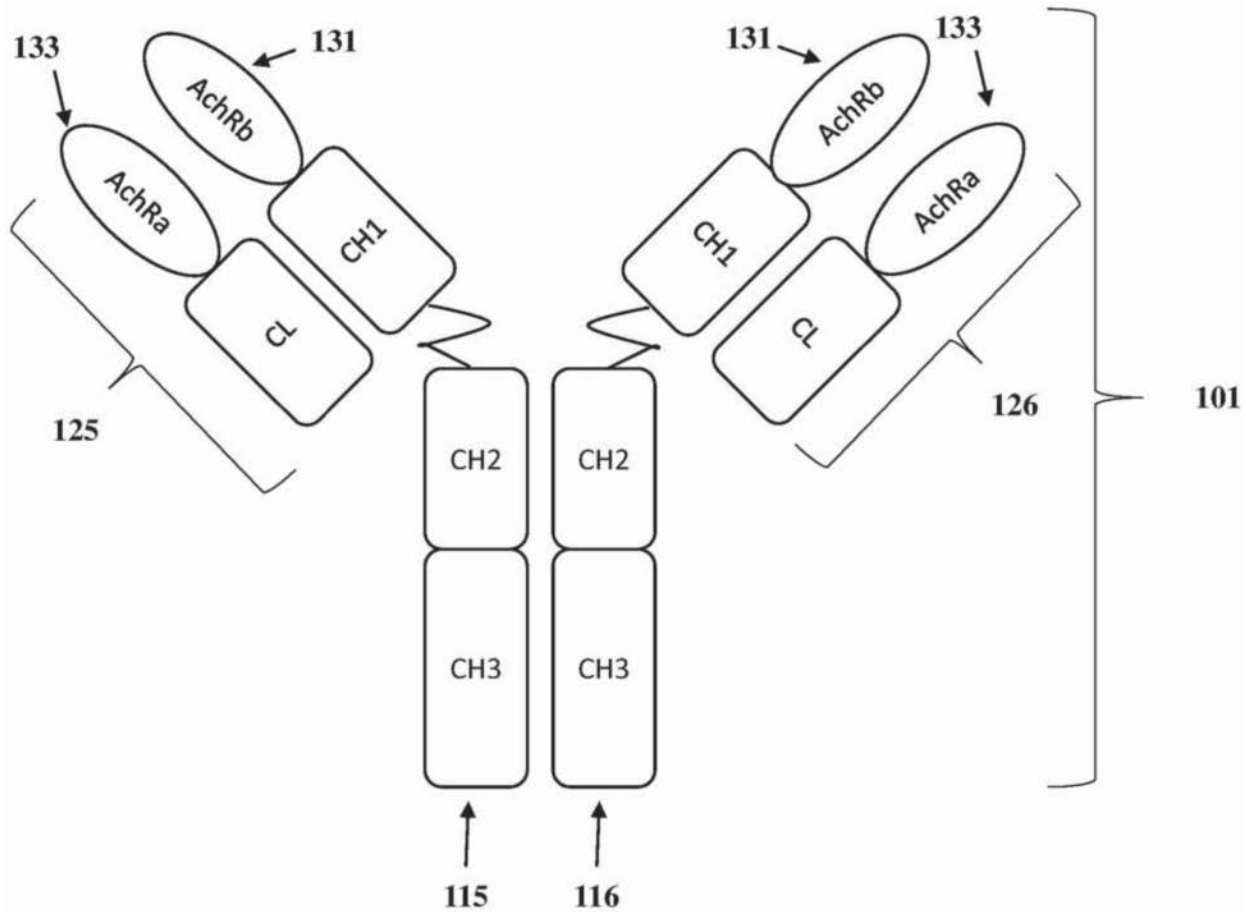


图3D

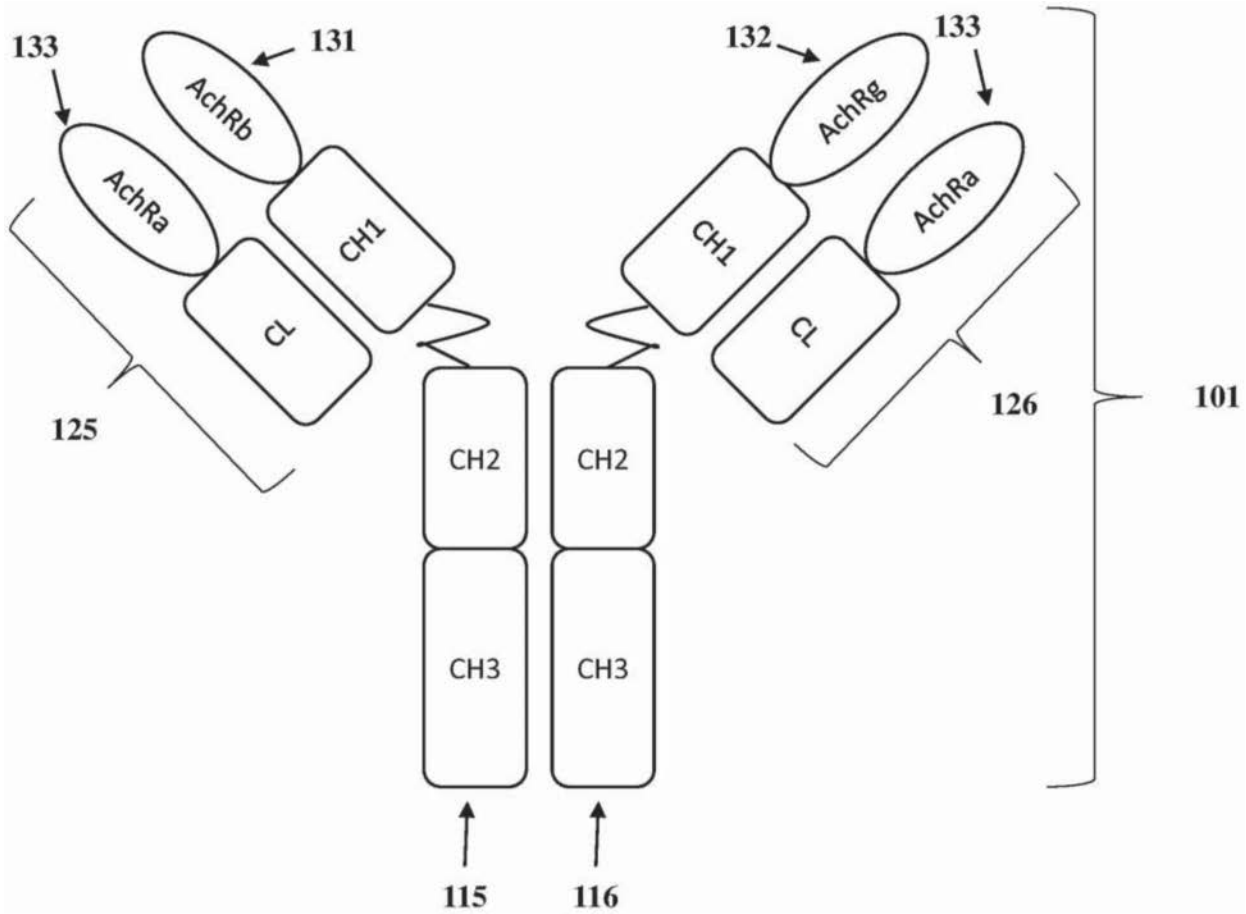


图3E

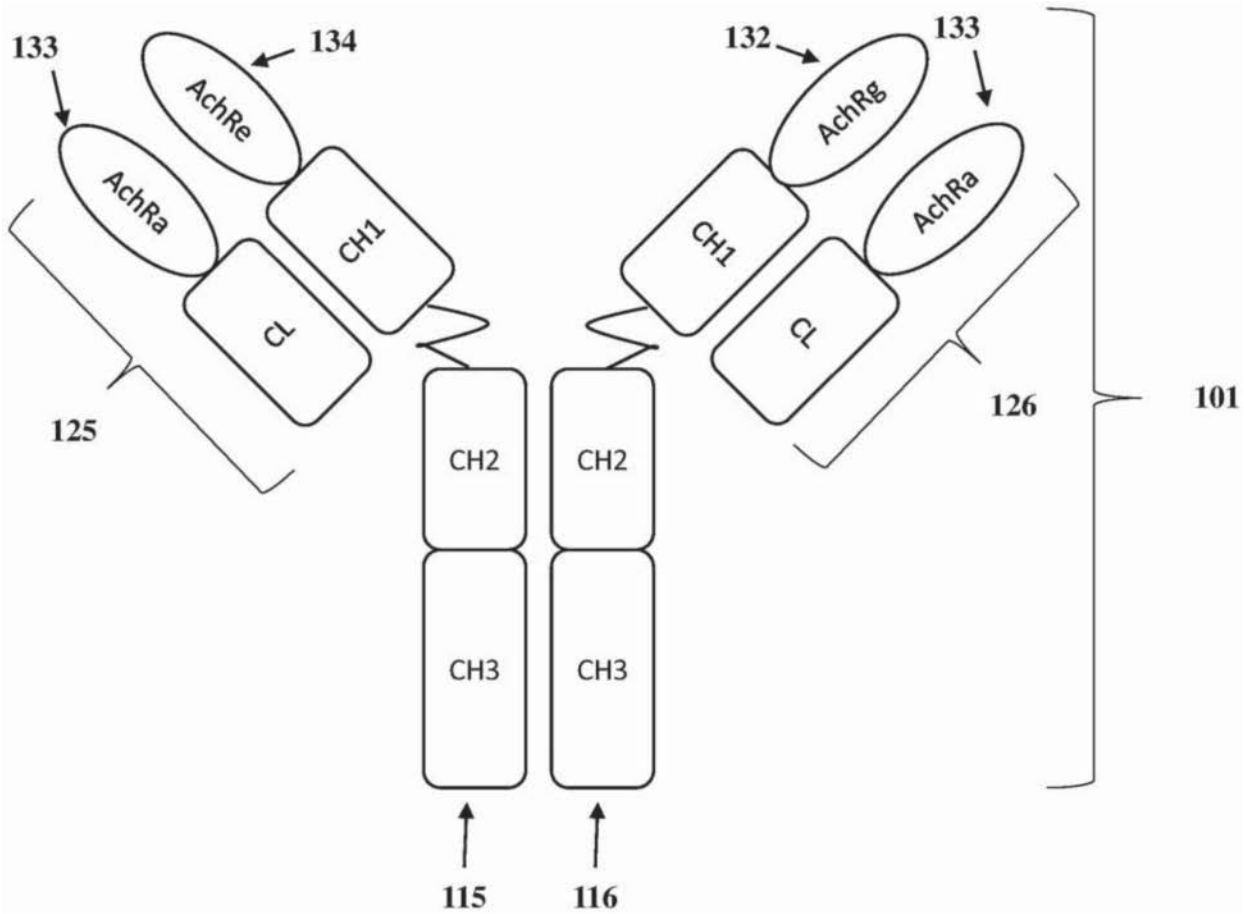


图3E续

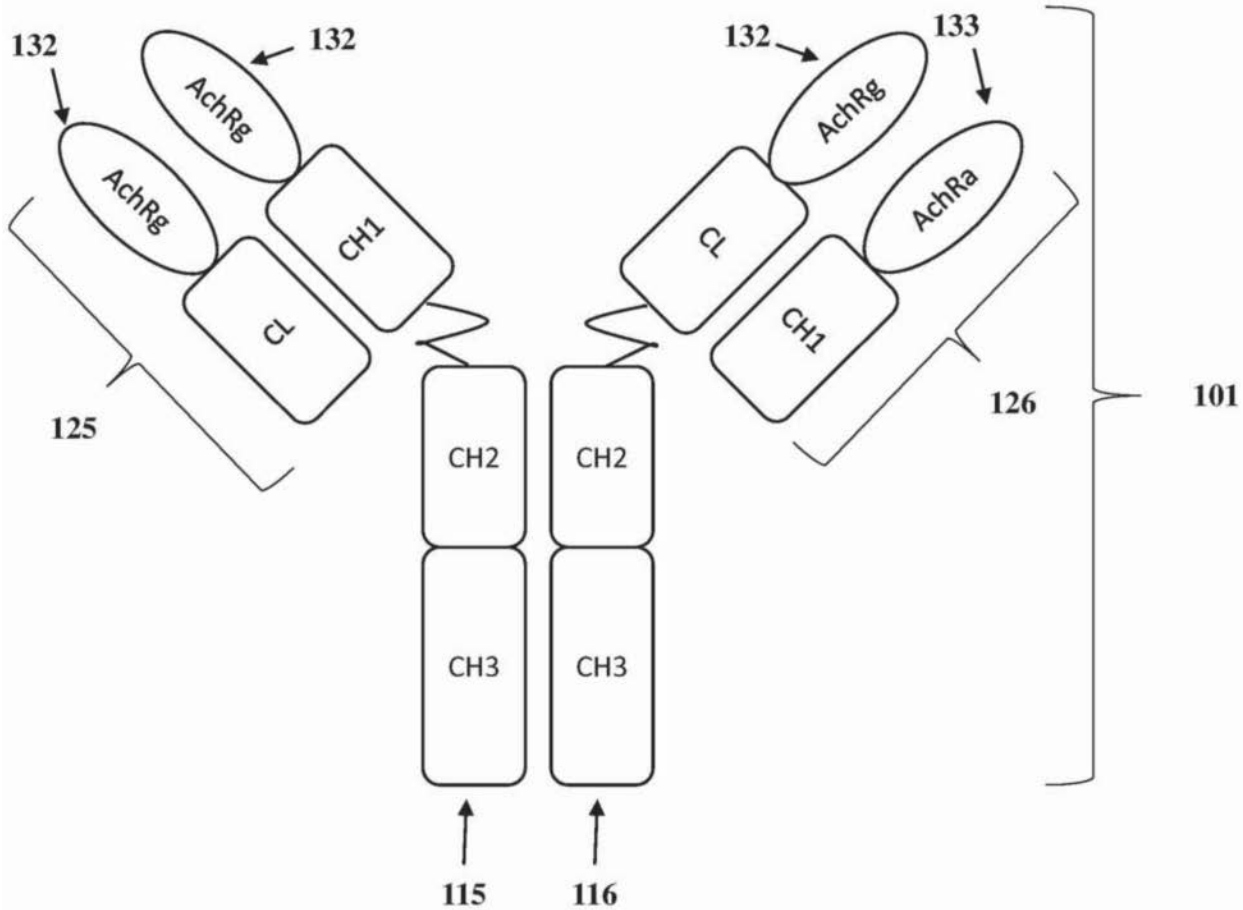


图3F

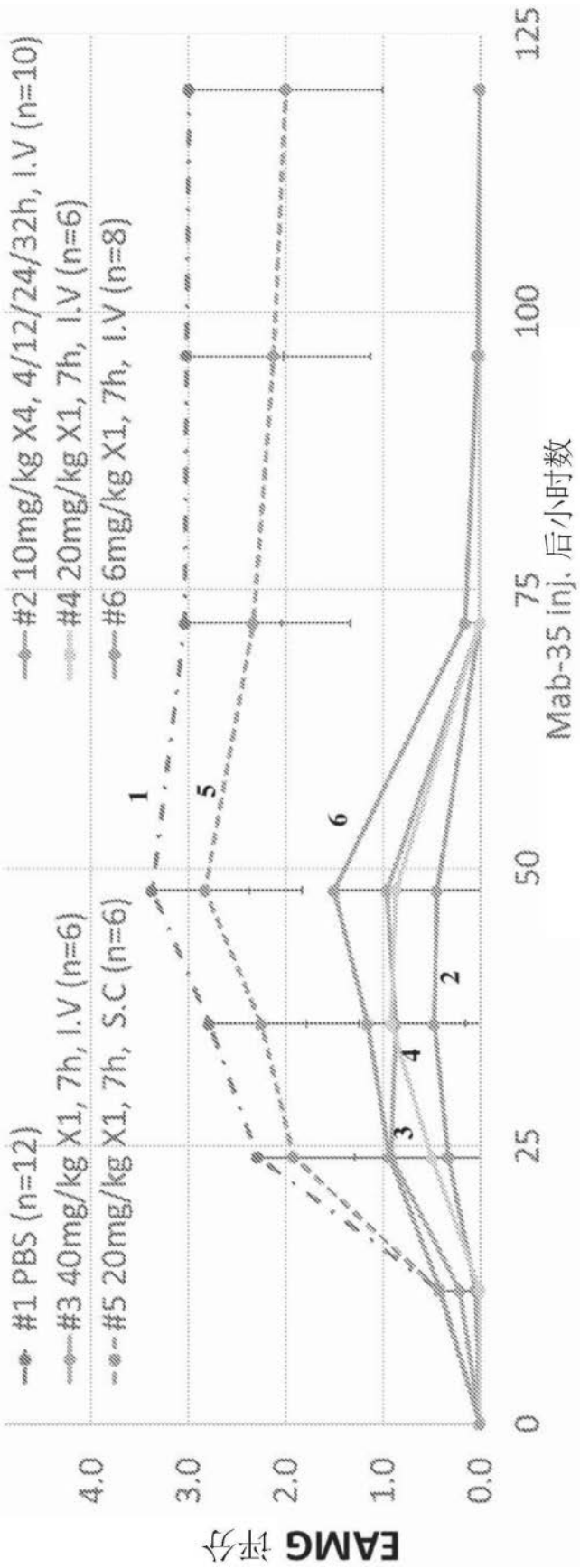


图3G

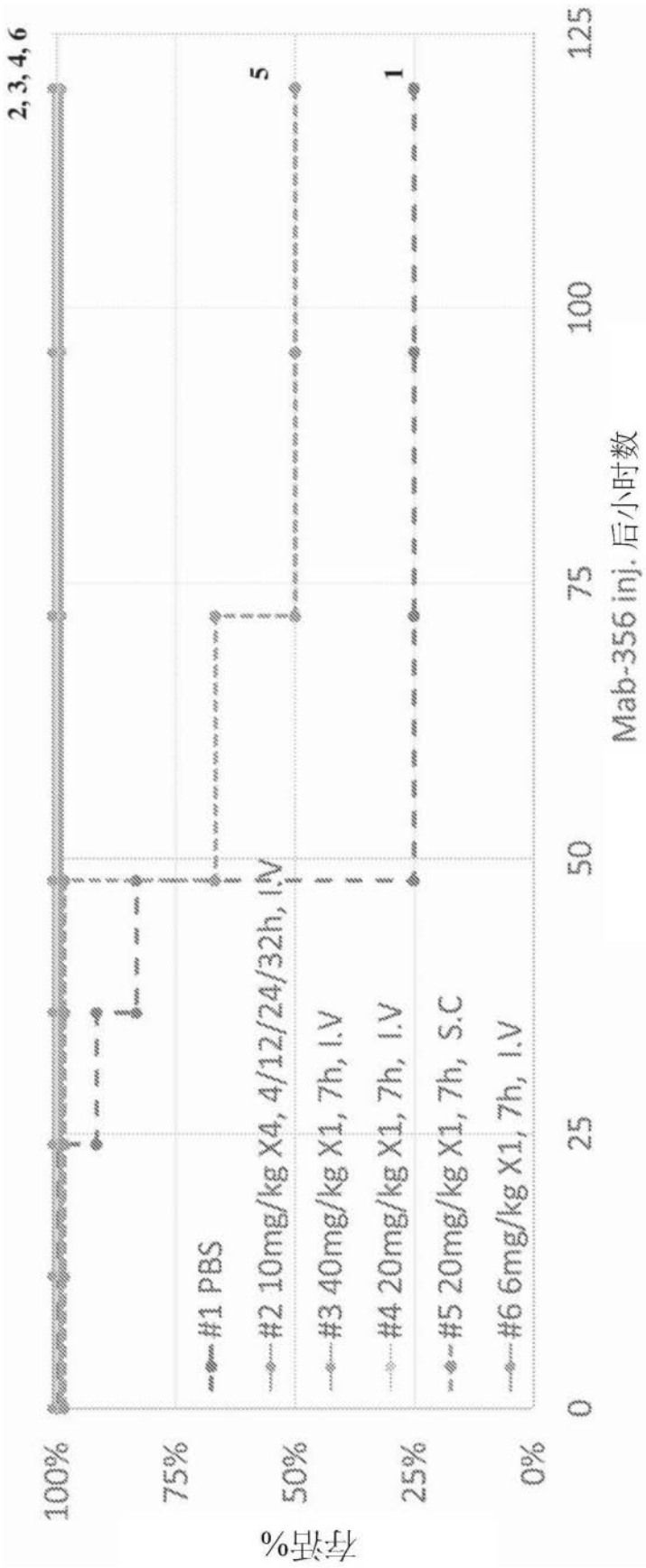


图3H

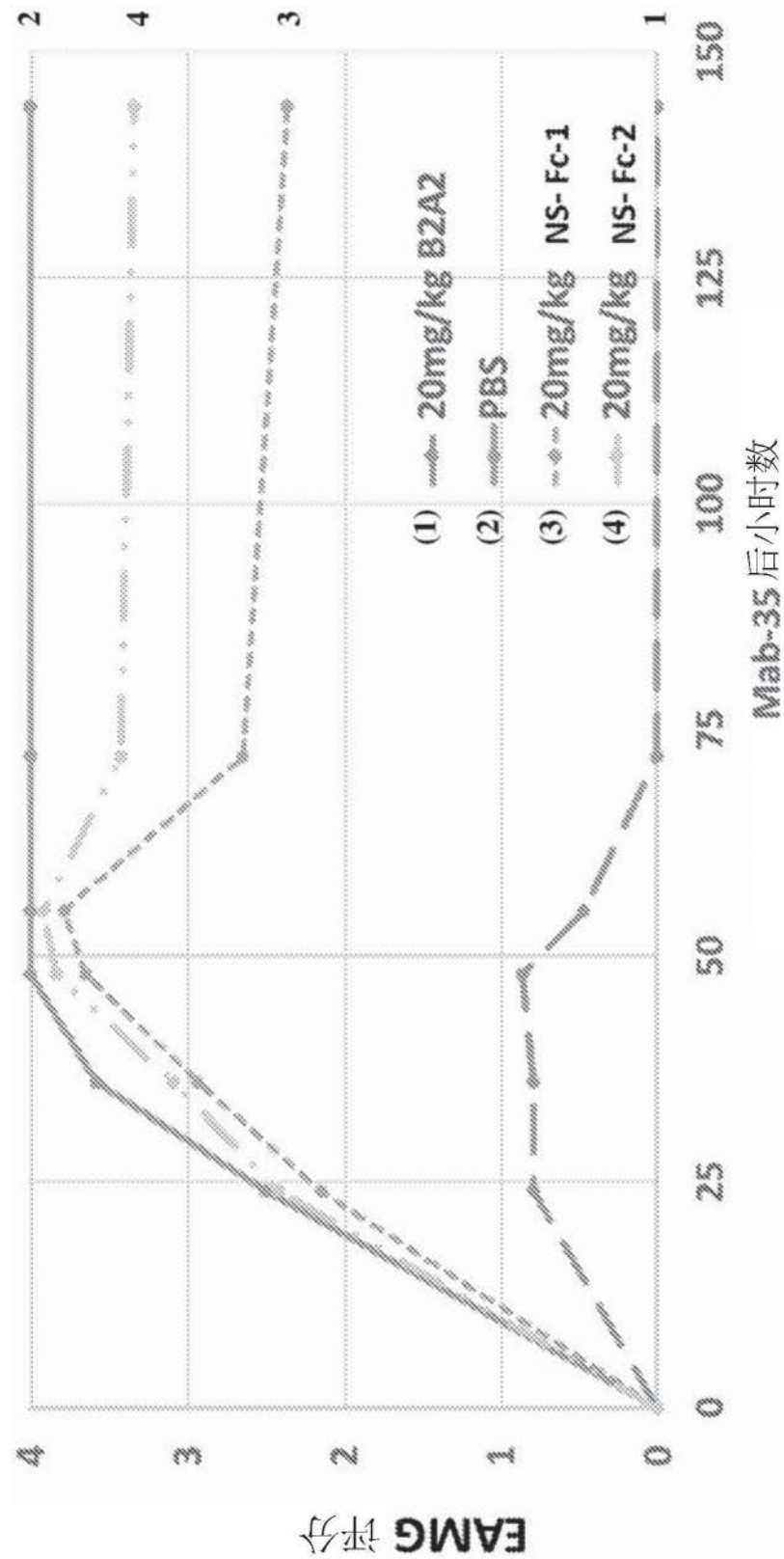


图3I

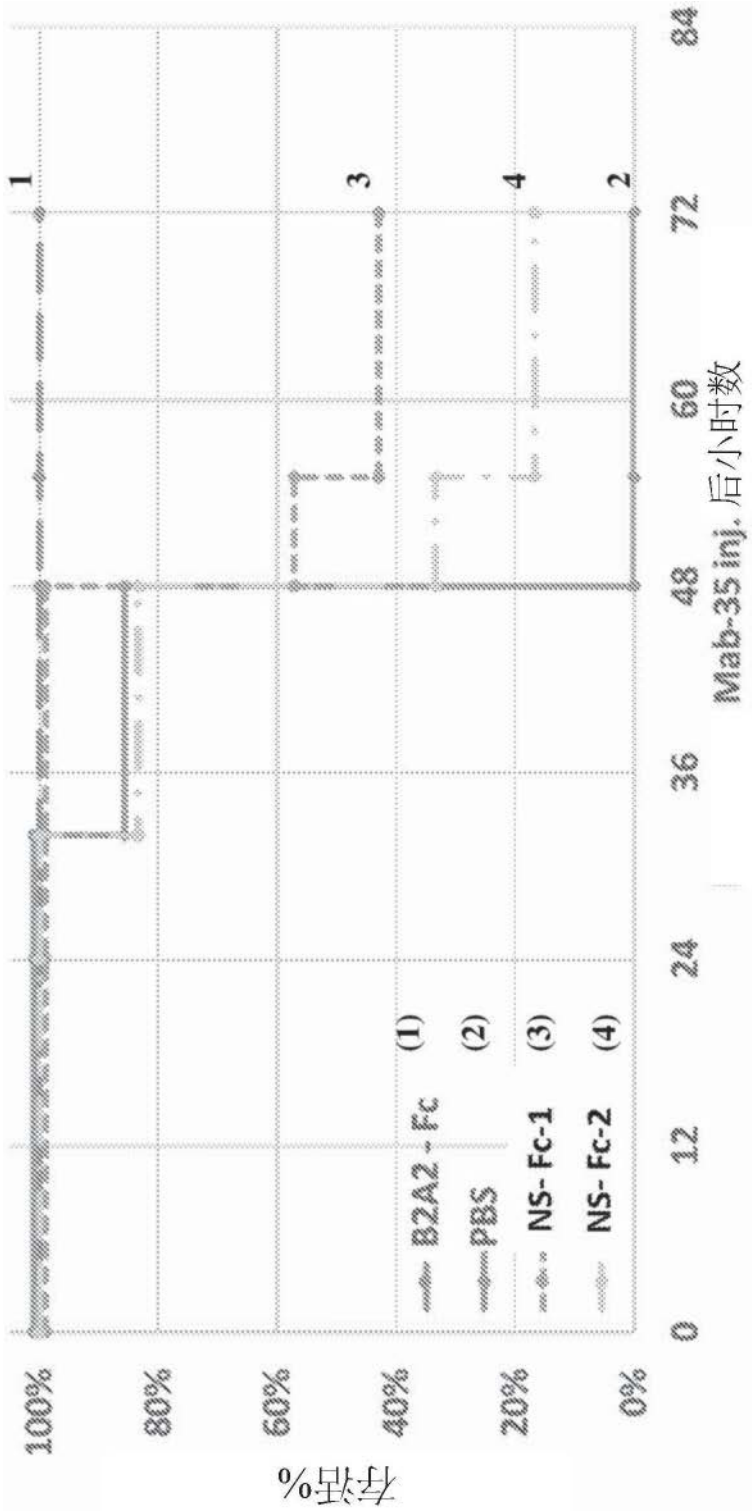


图3J

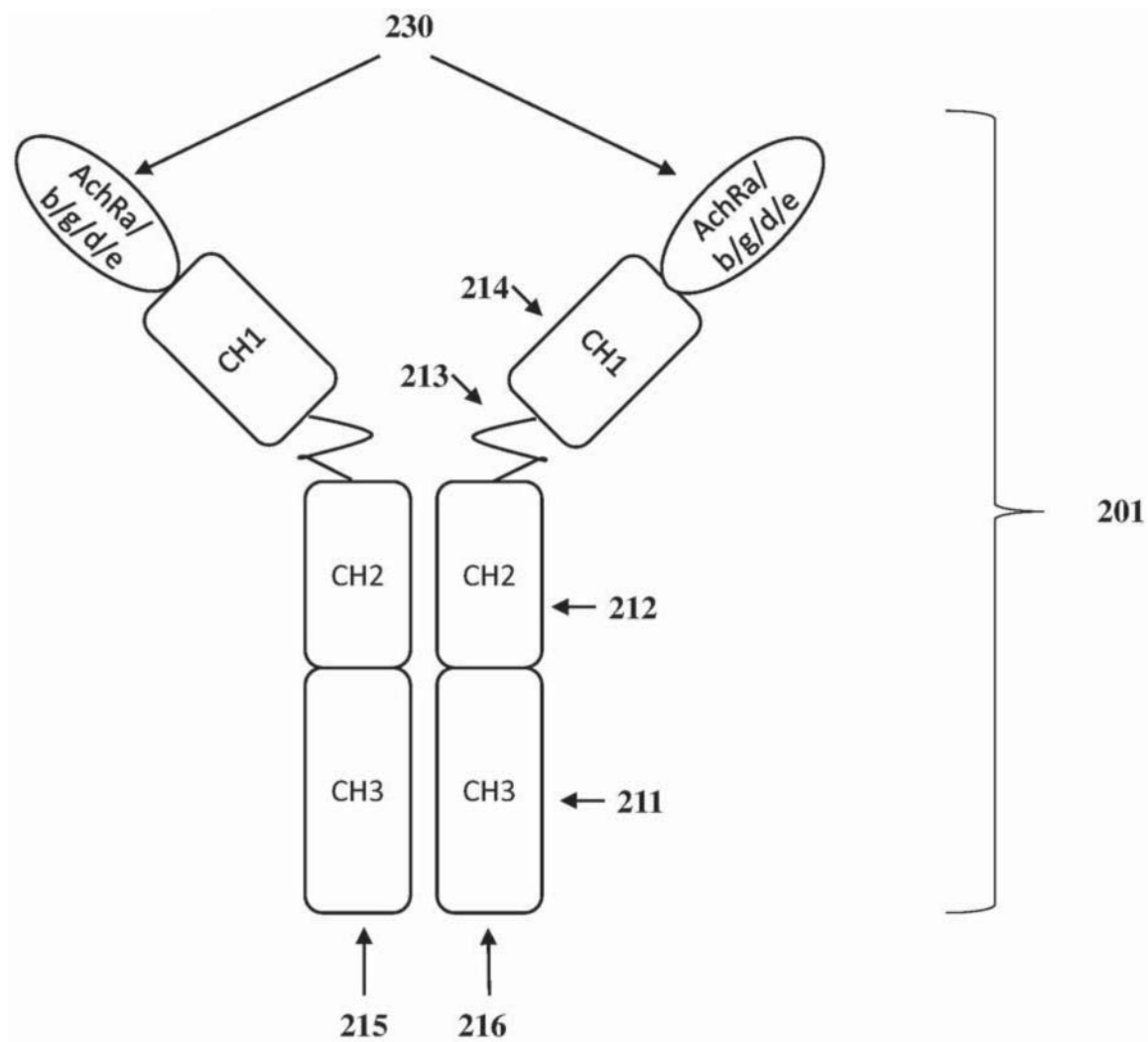


图4A

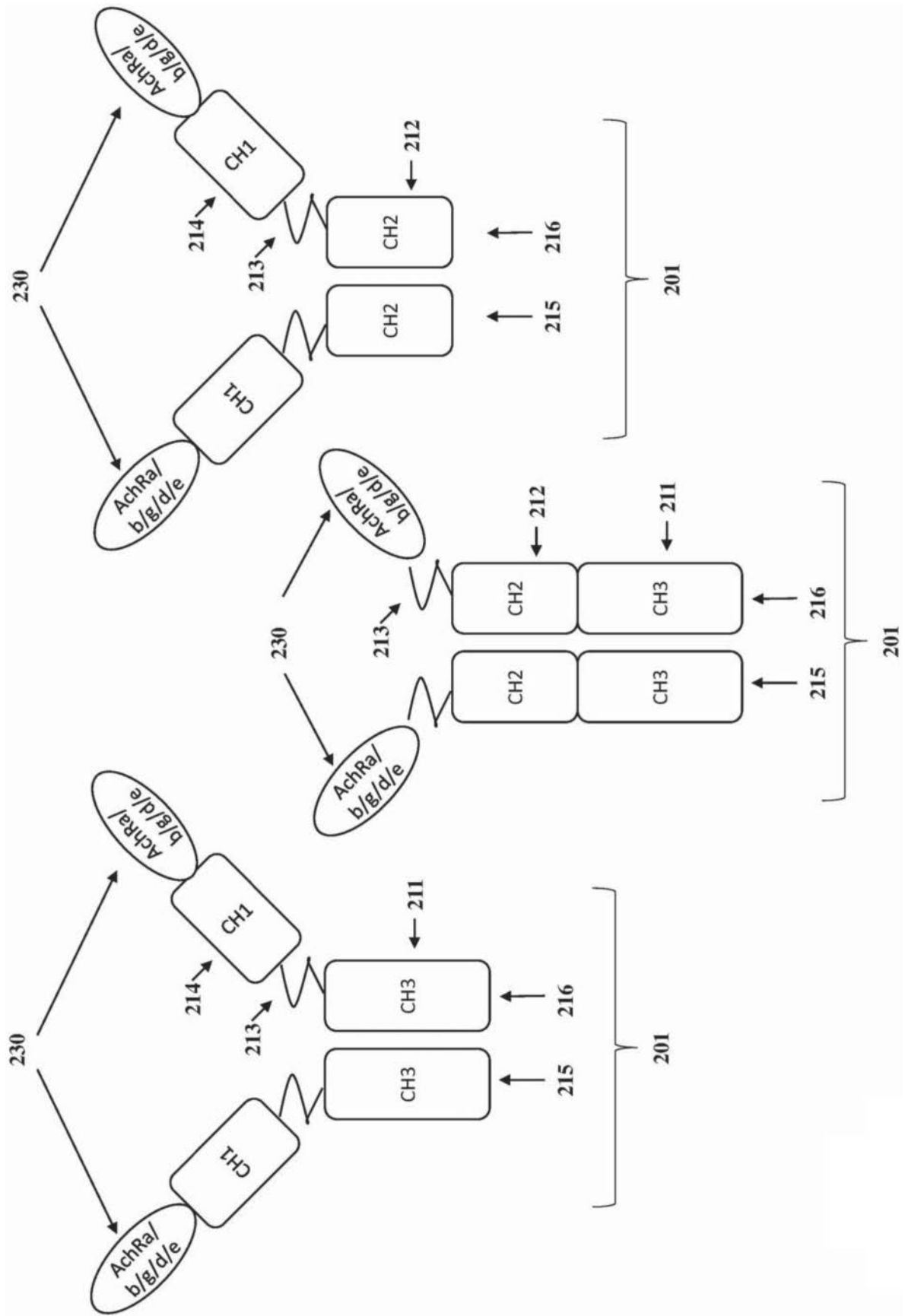


图4B

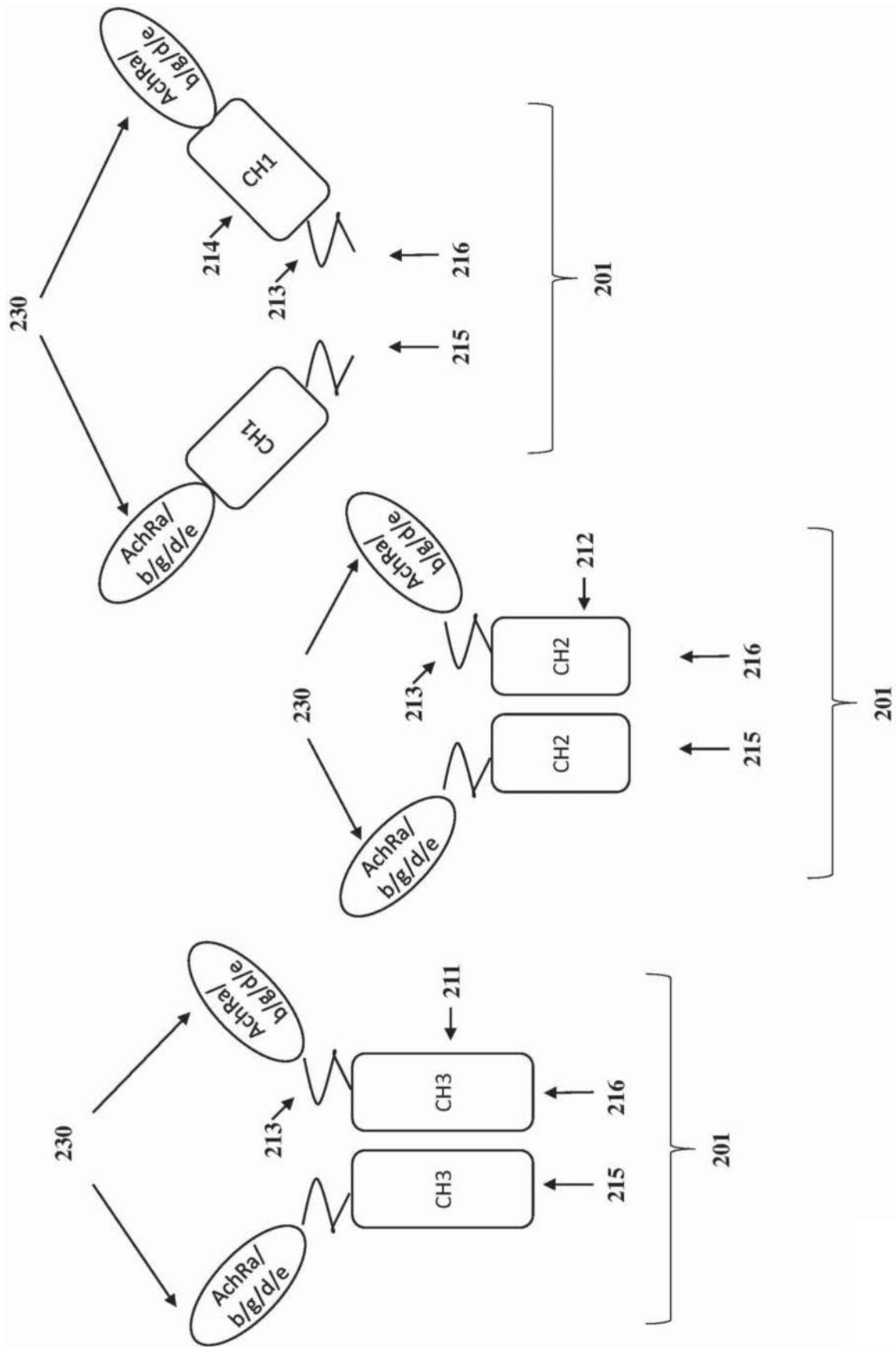


图4B续

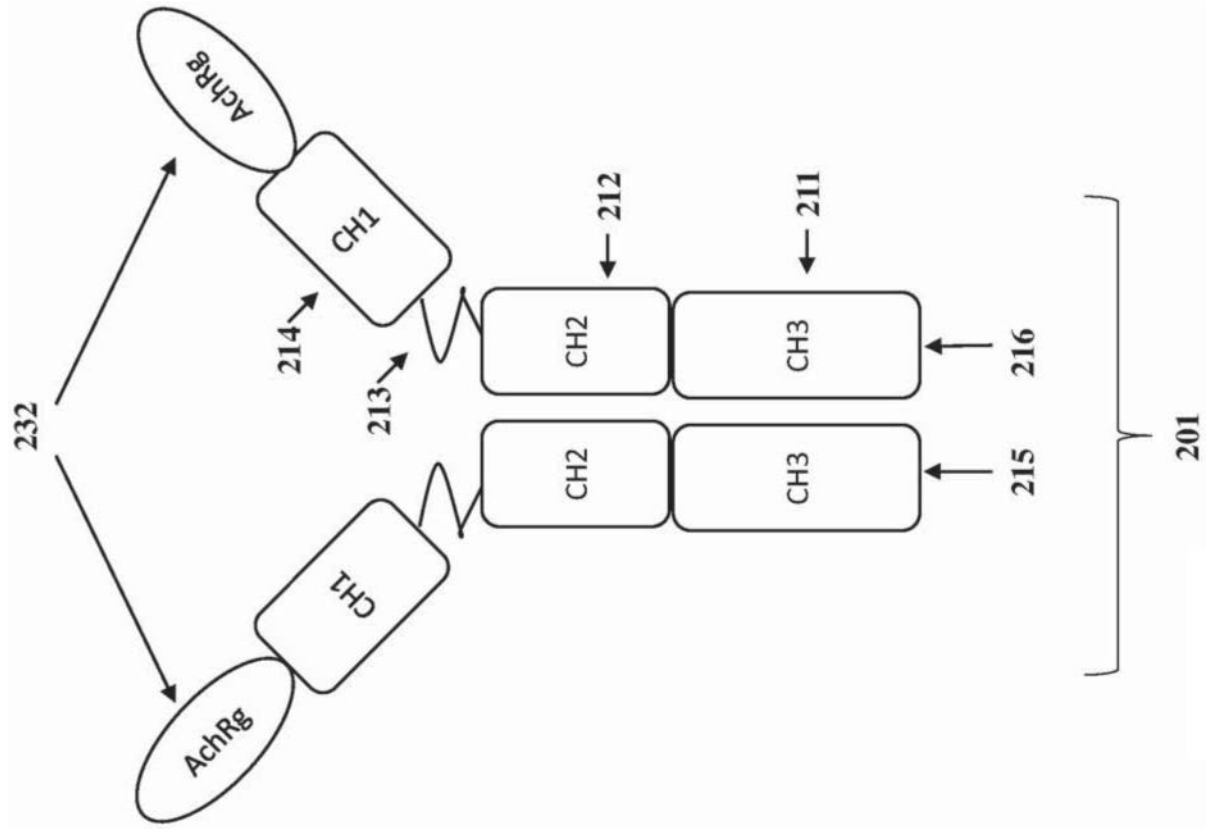


图4C

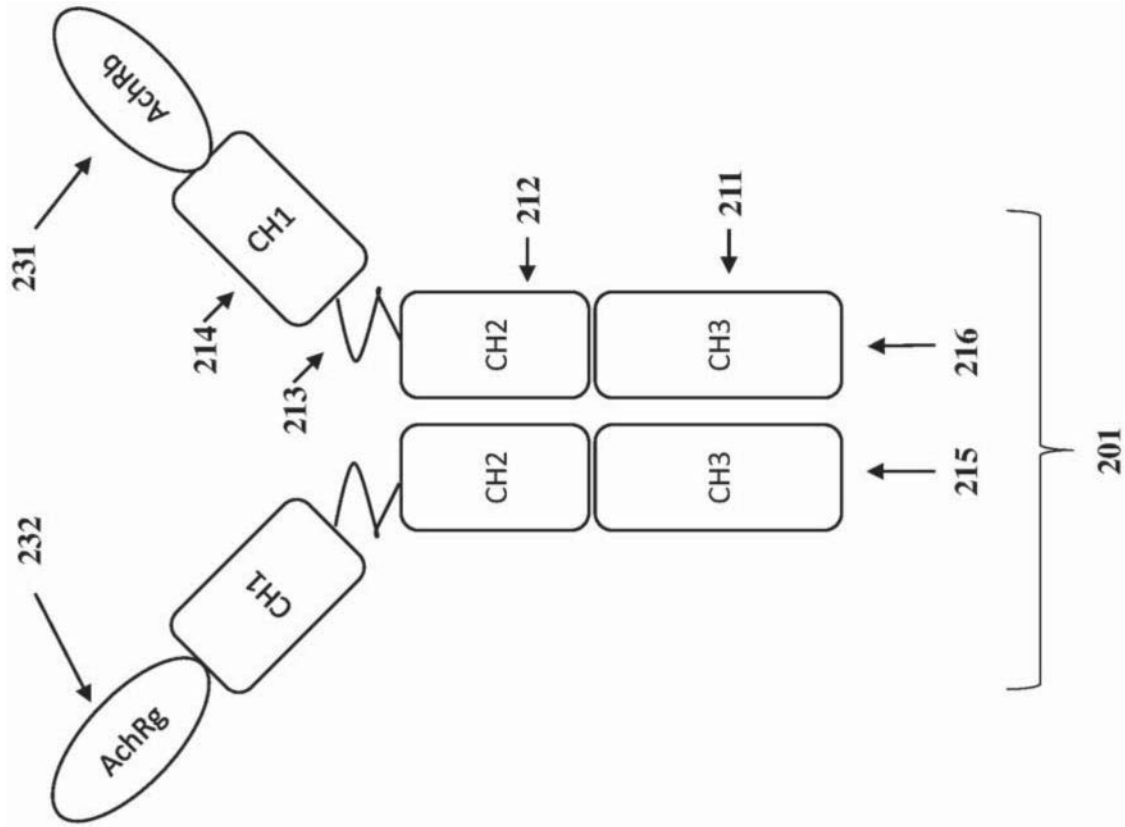


图4D

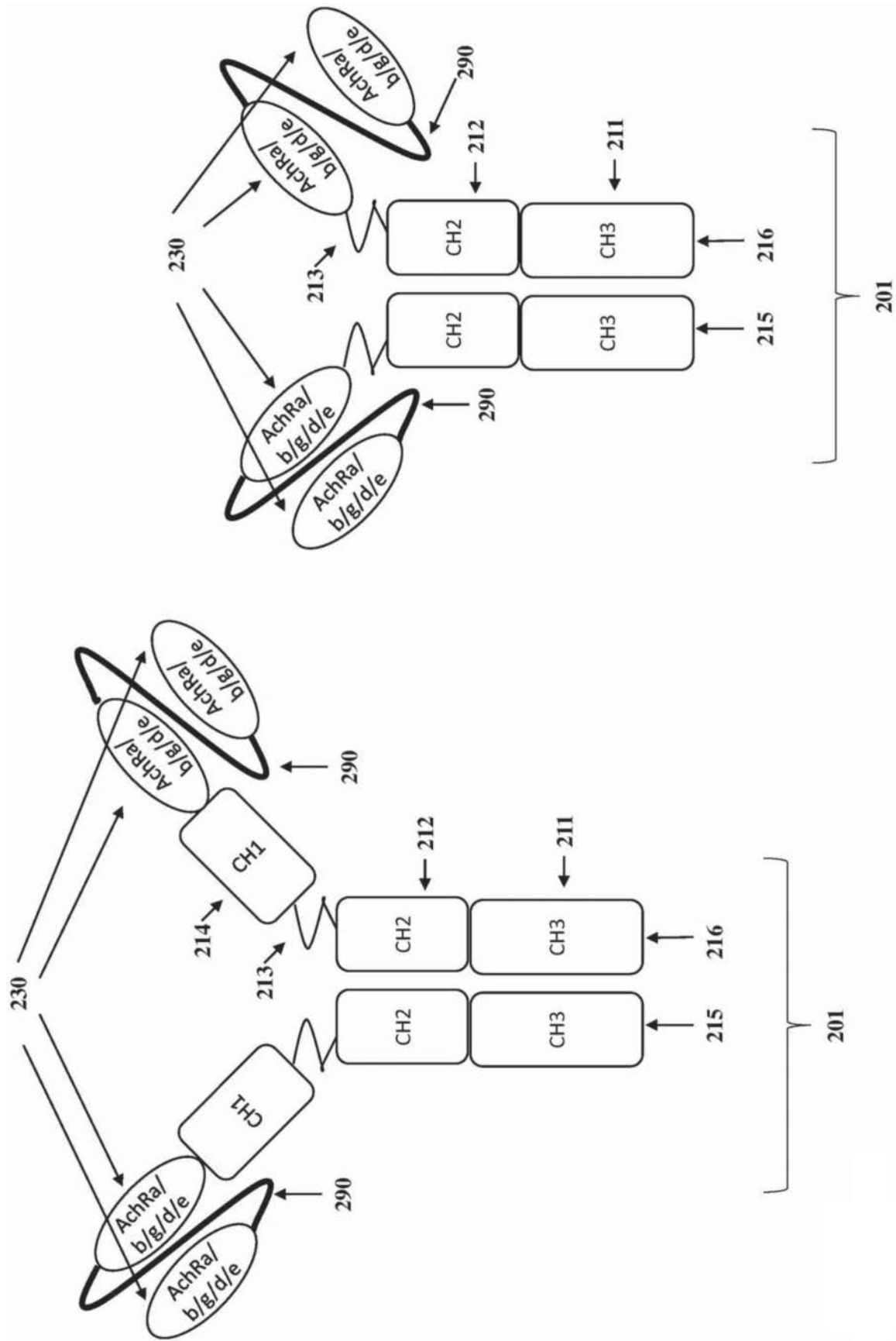


图4E

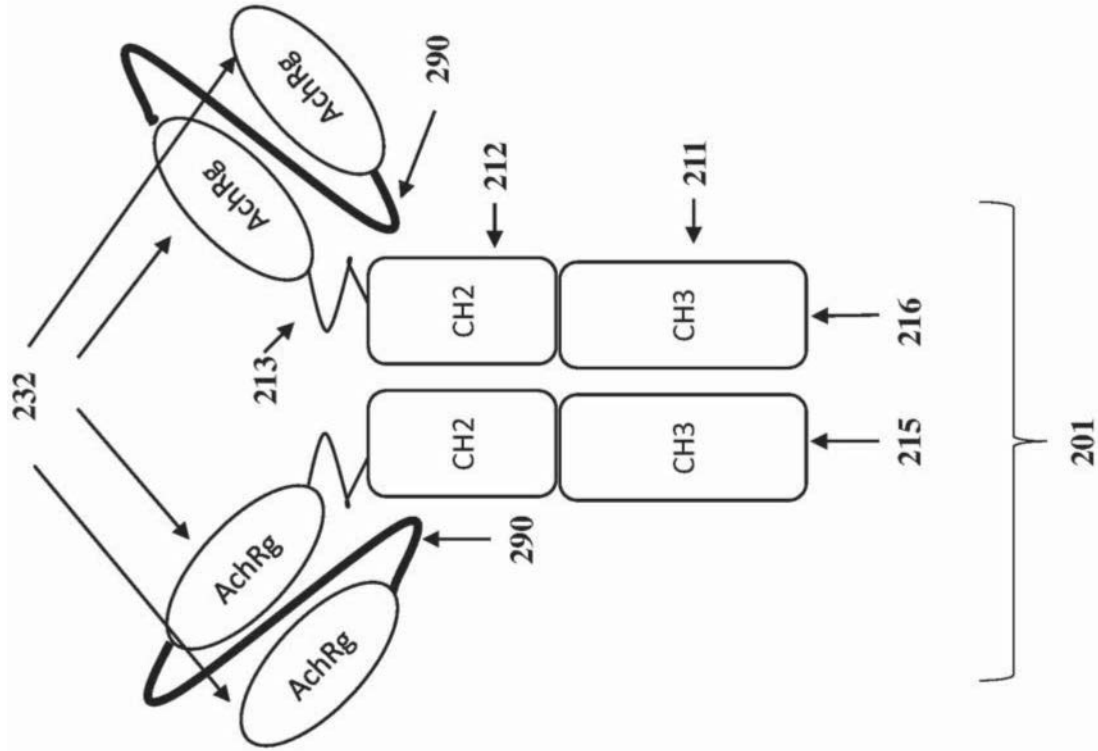


图4F

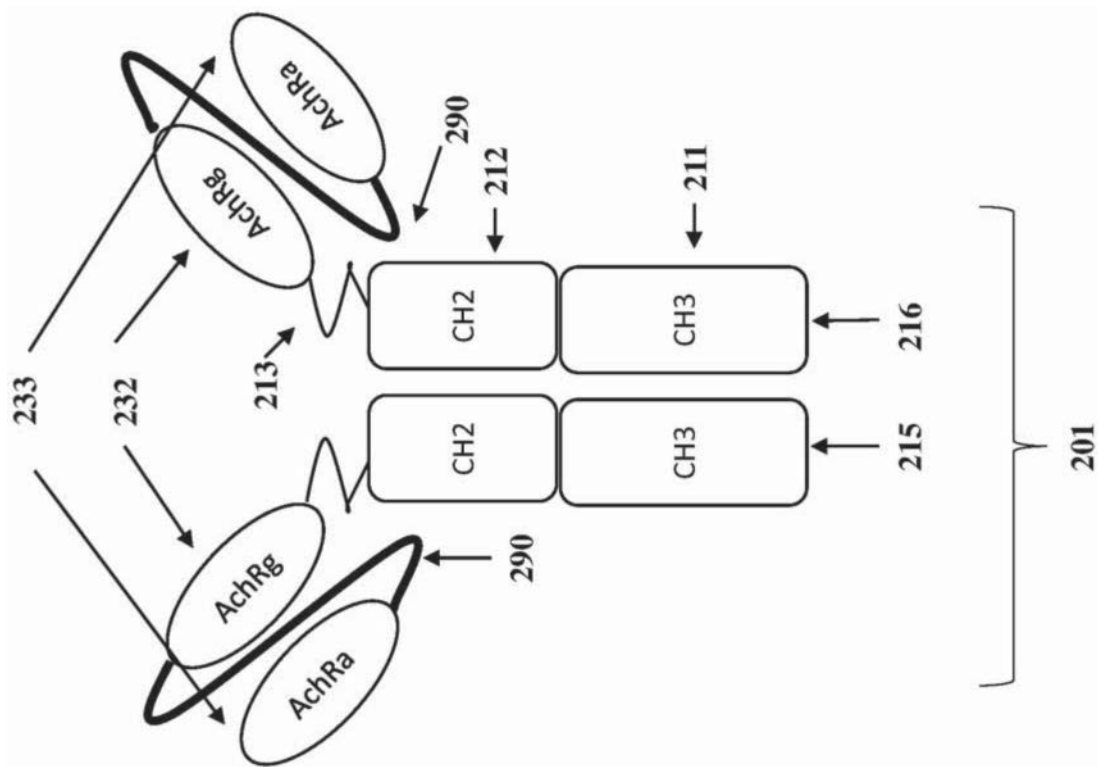


图4G

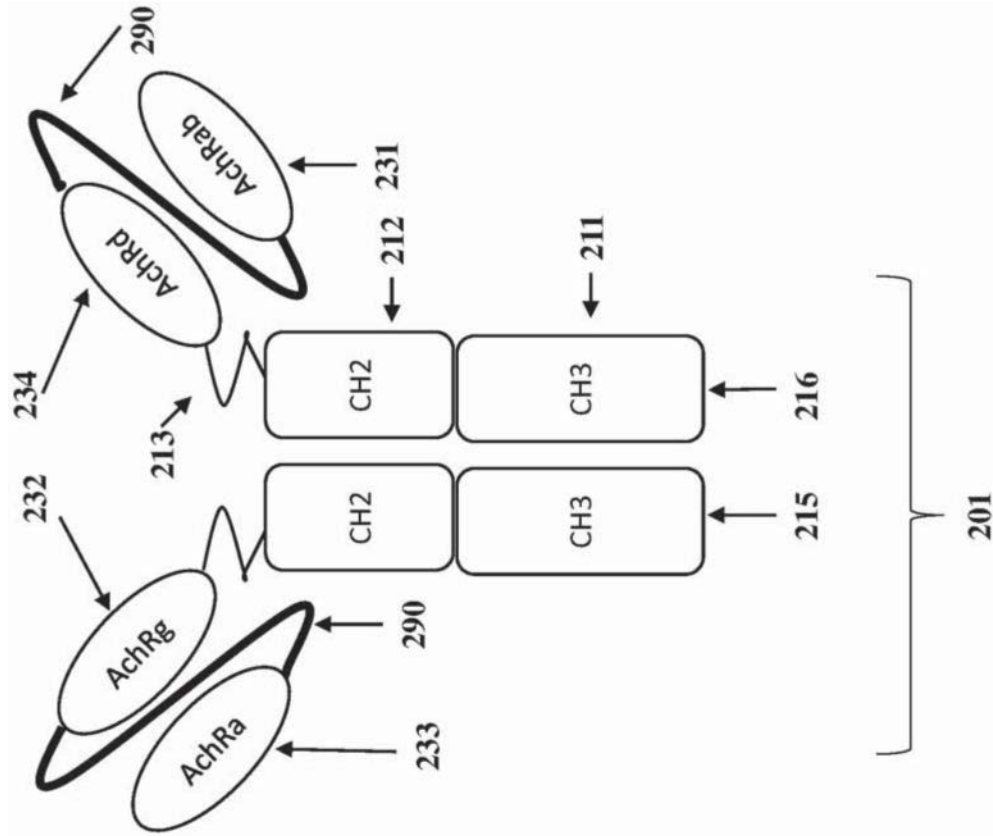


图4H

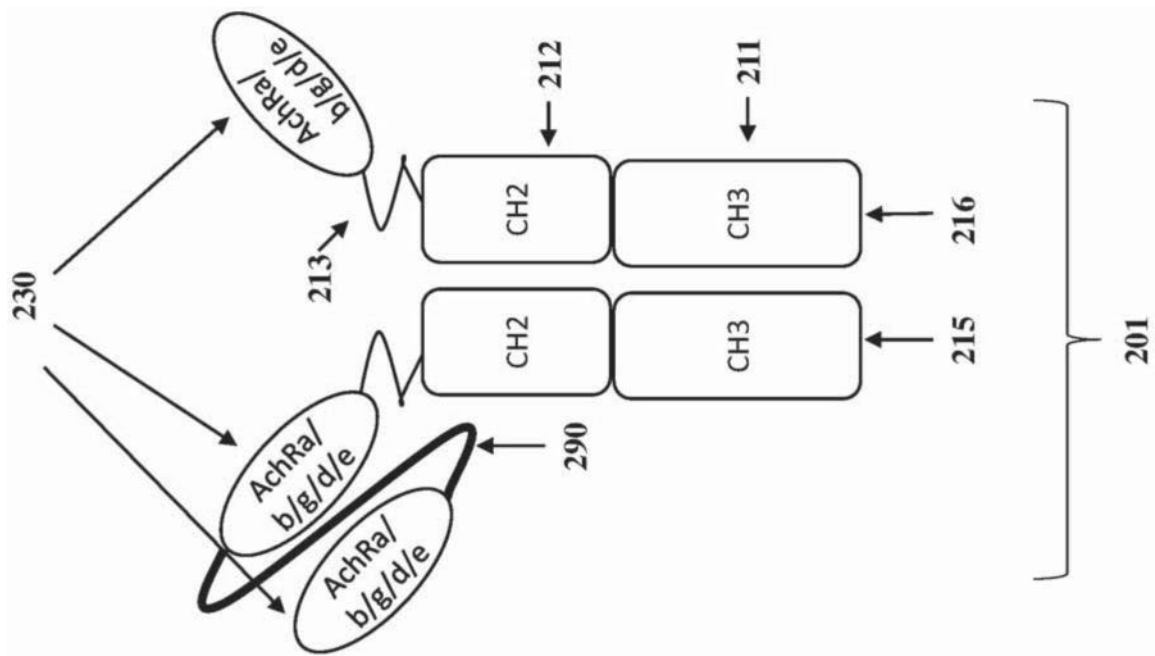


图4I

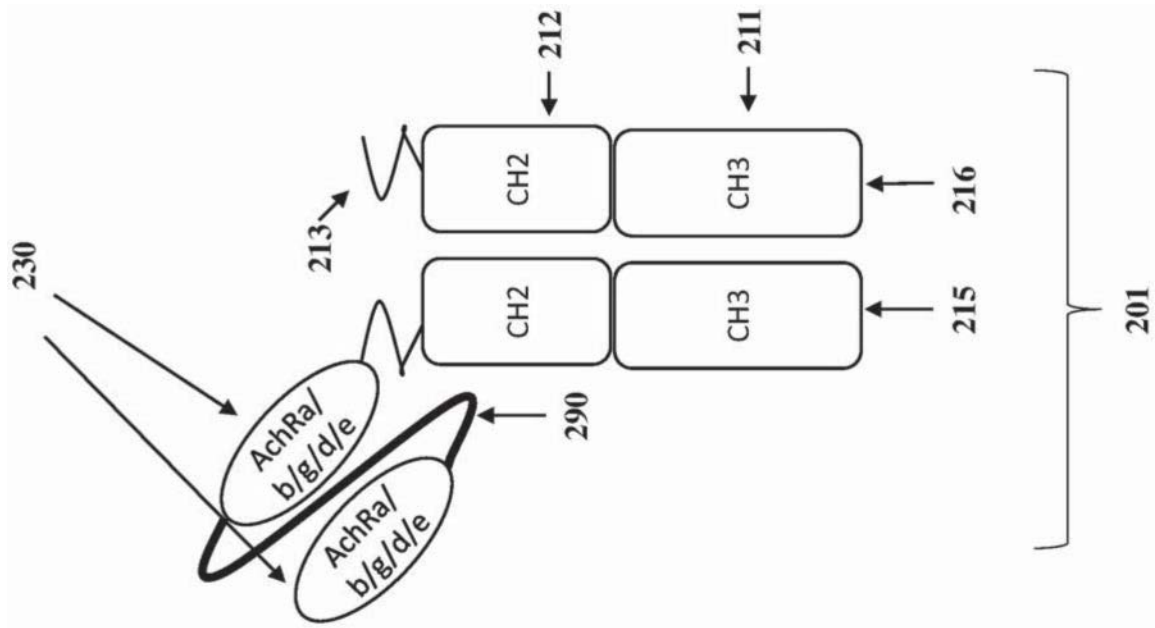


图4J

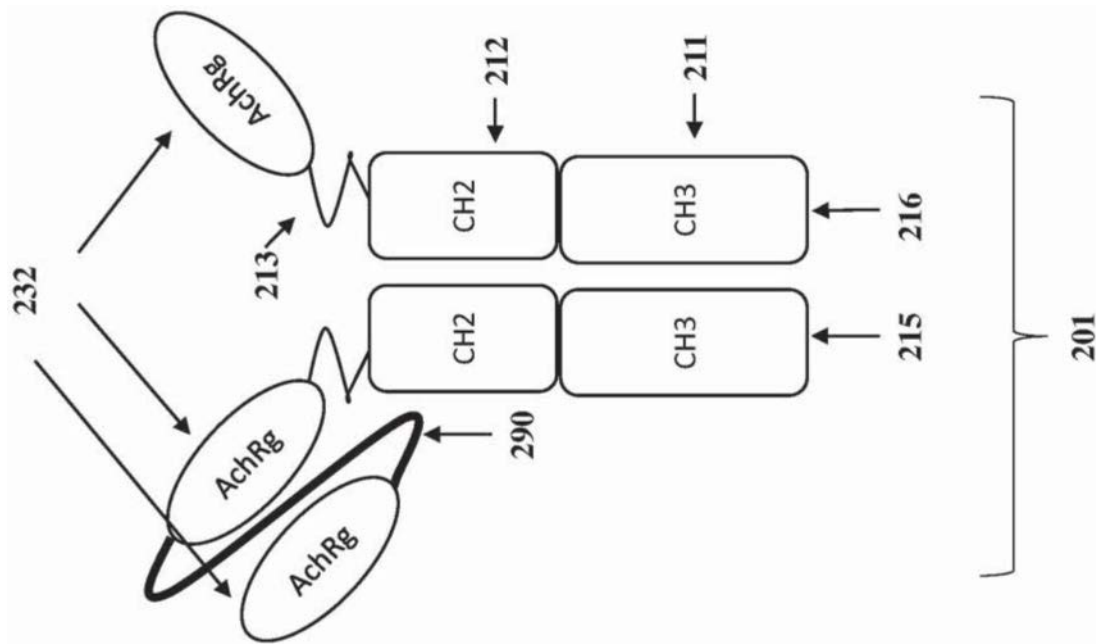


图4K

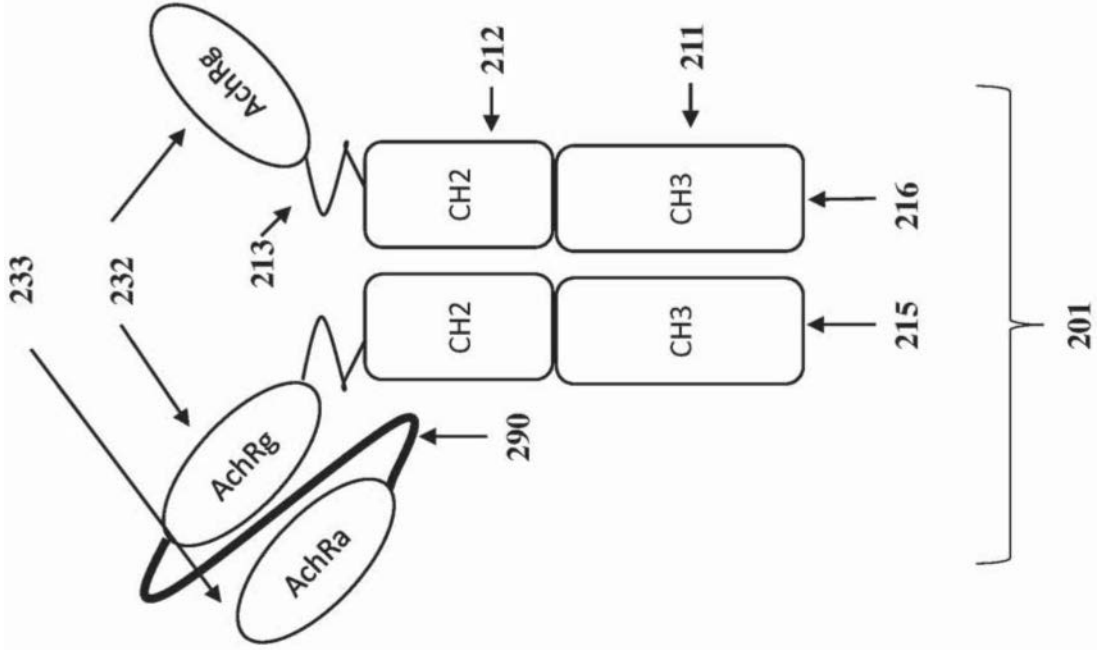


图4L

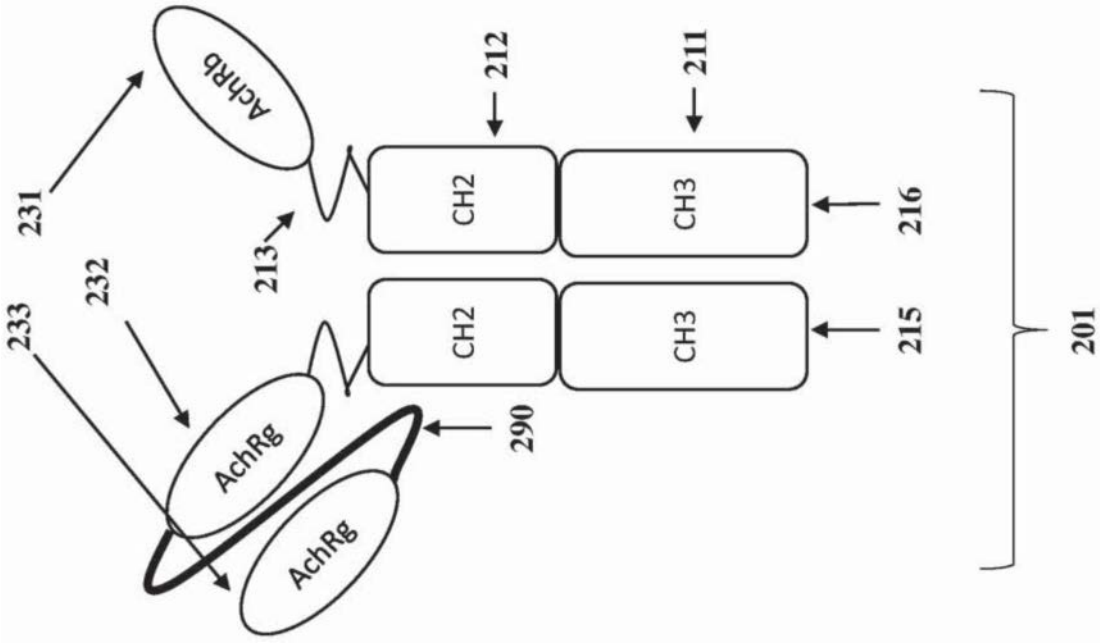


图4M

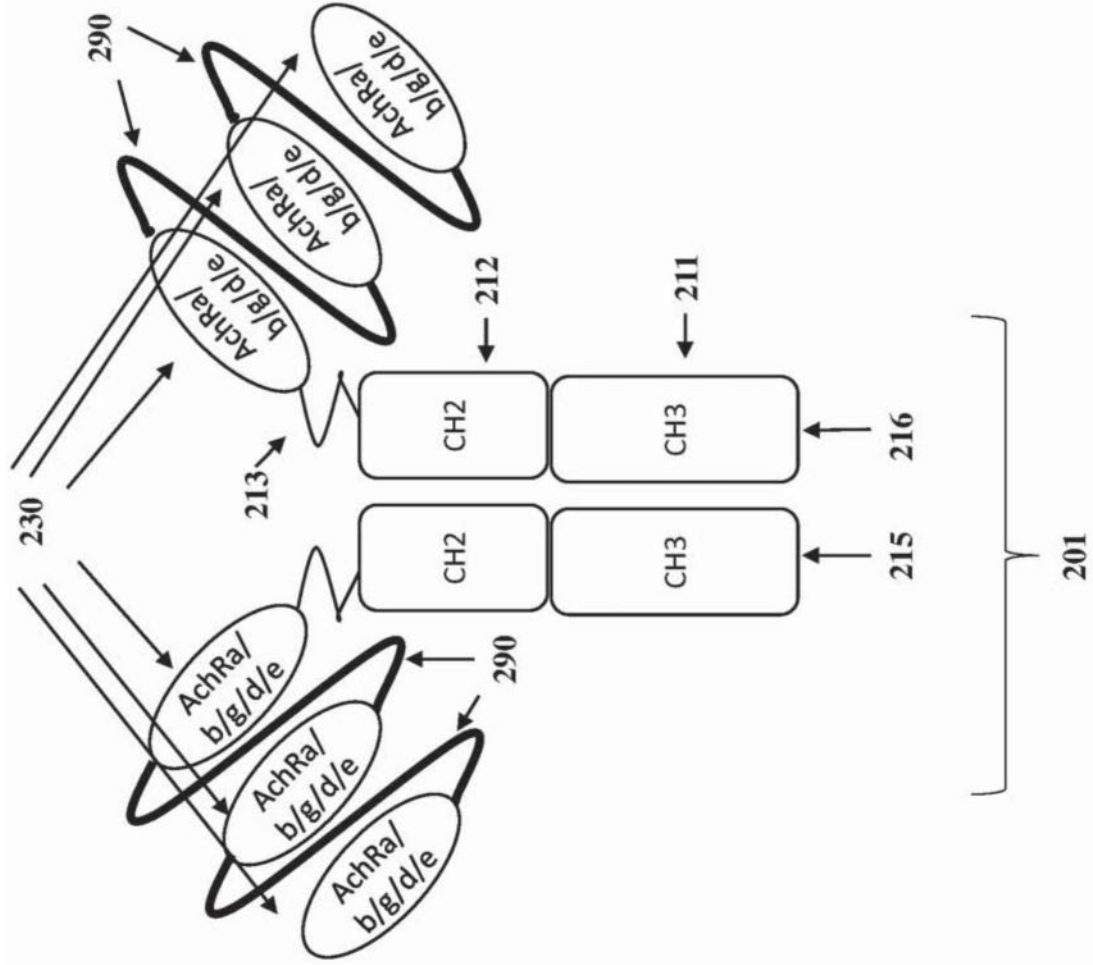


图4N

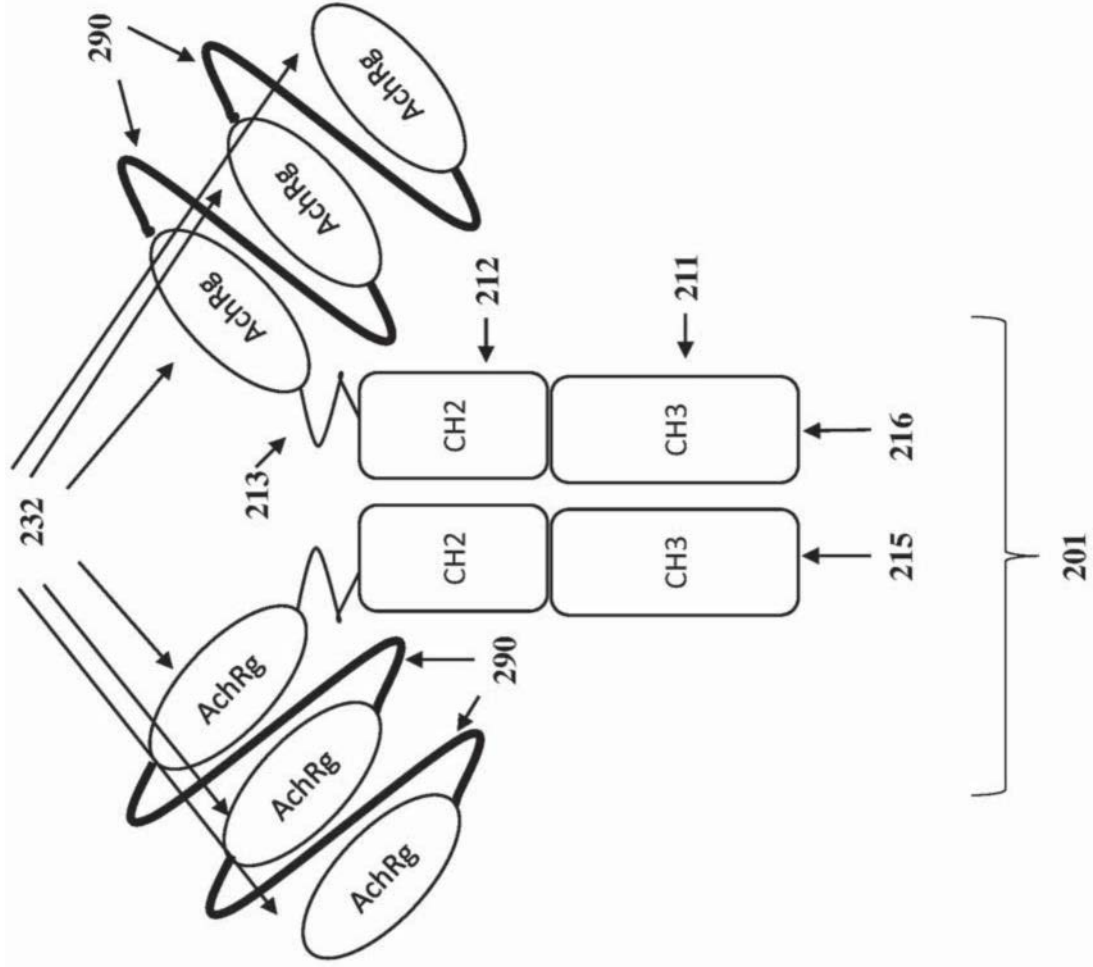


图40

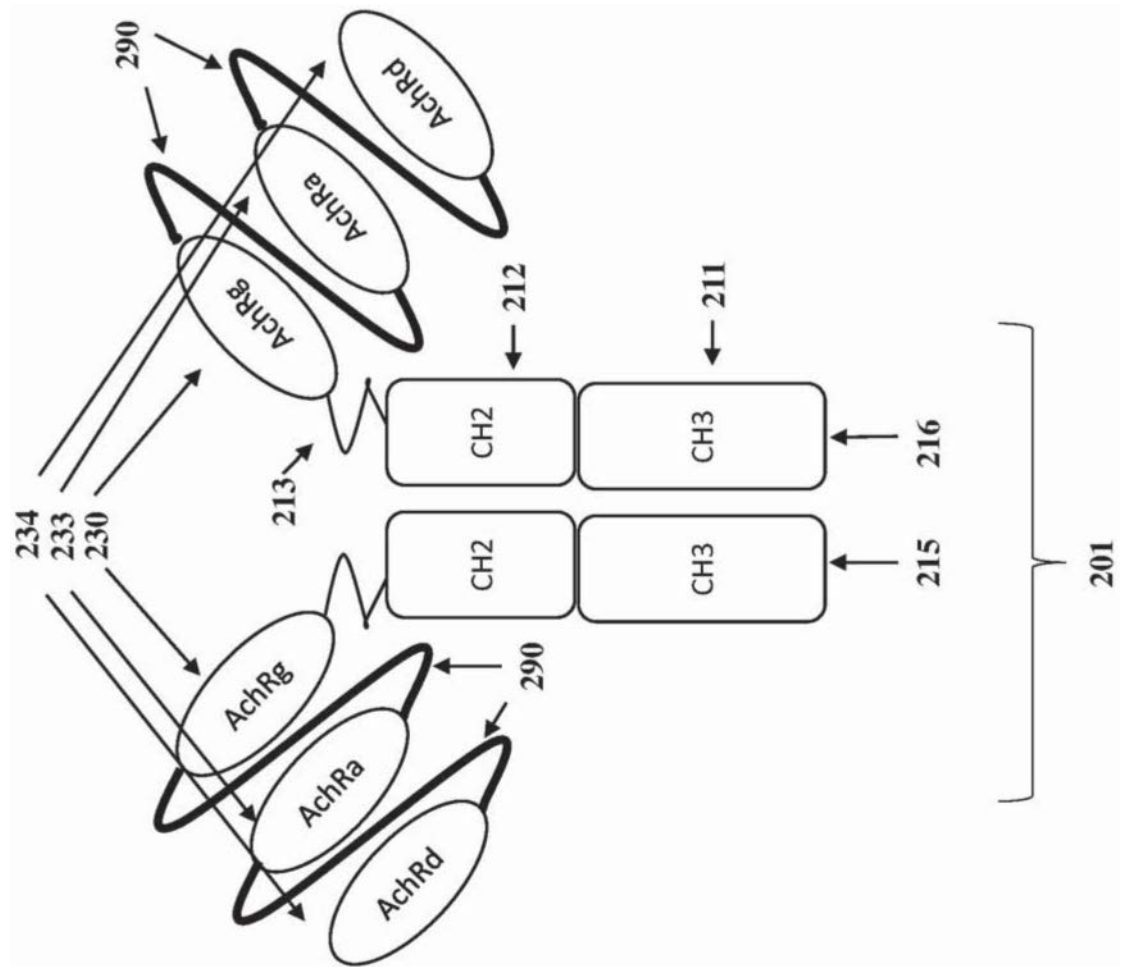


图4P

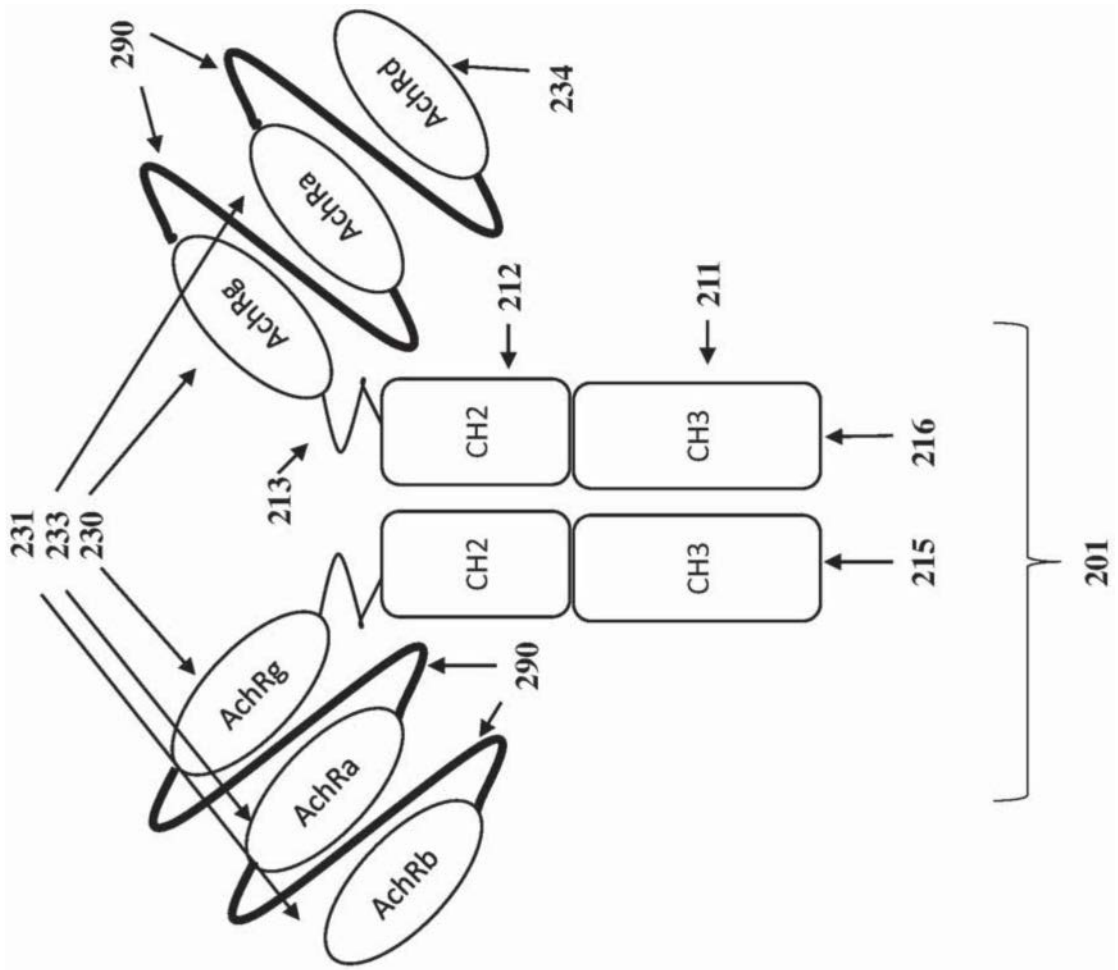


图4Q

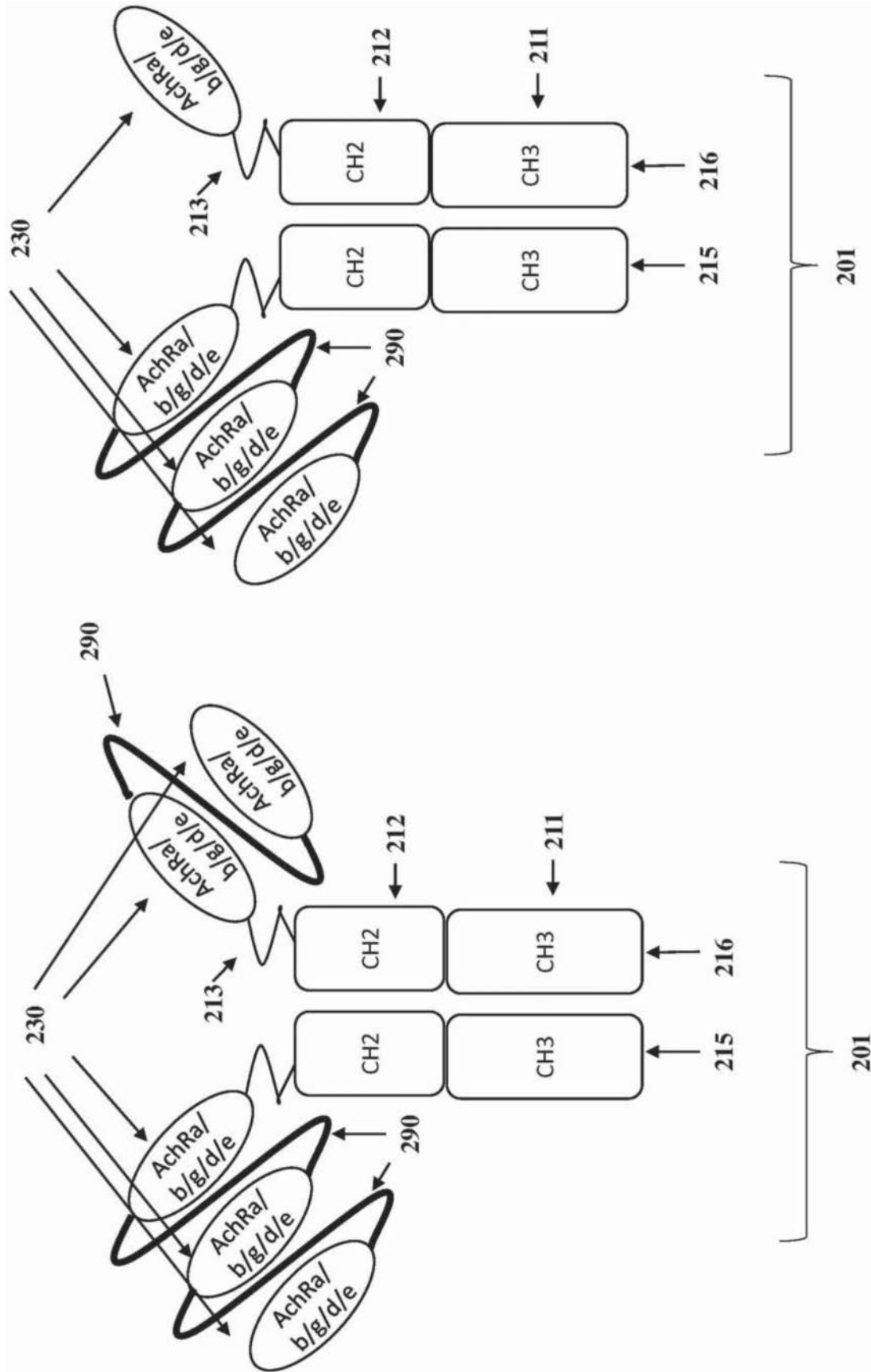


图4R

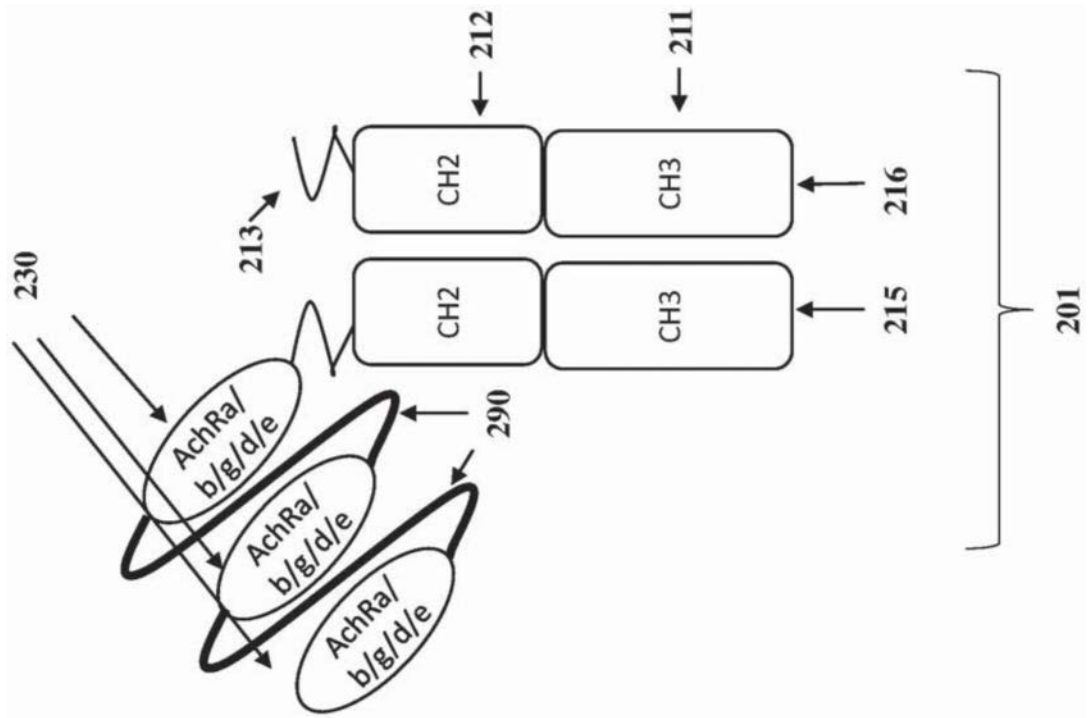


图4R续

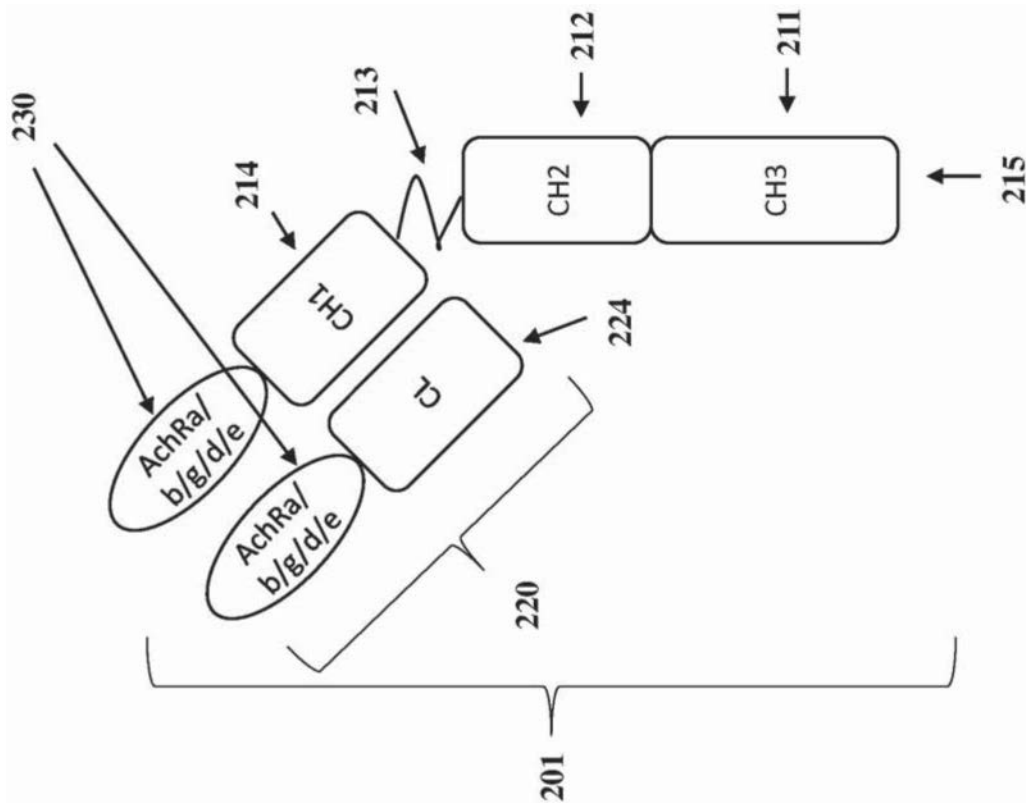


图4S

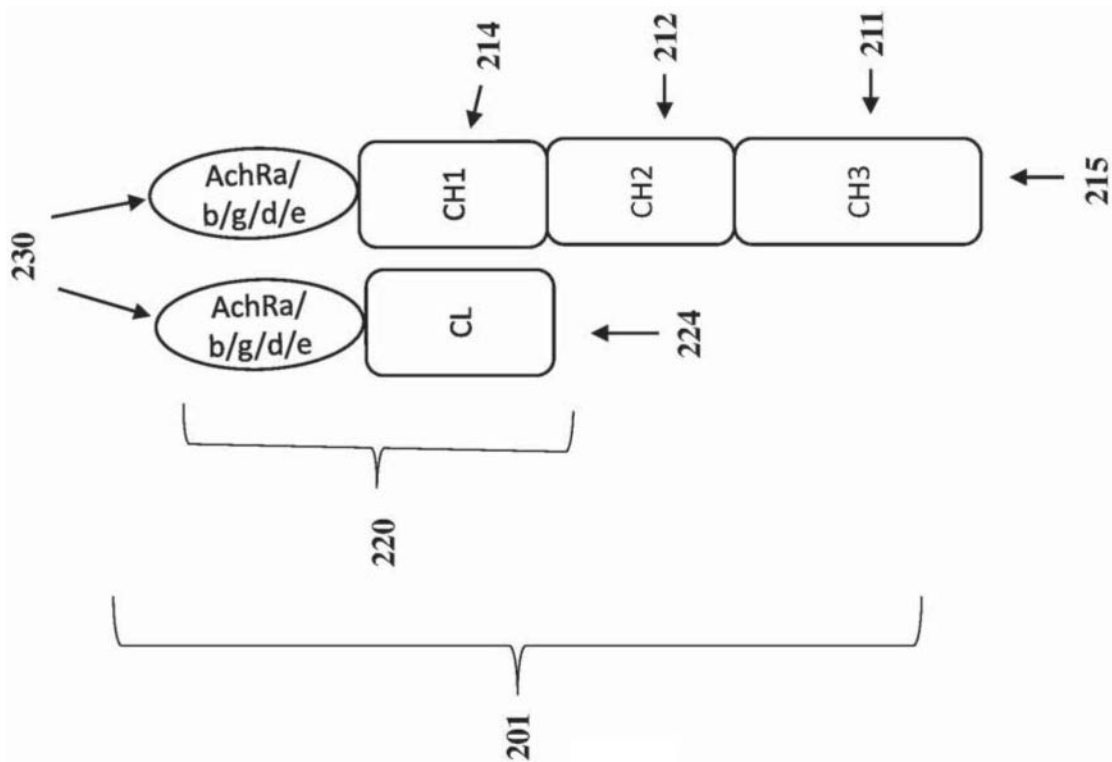


图4S续

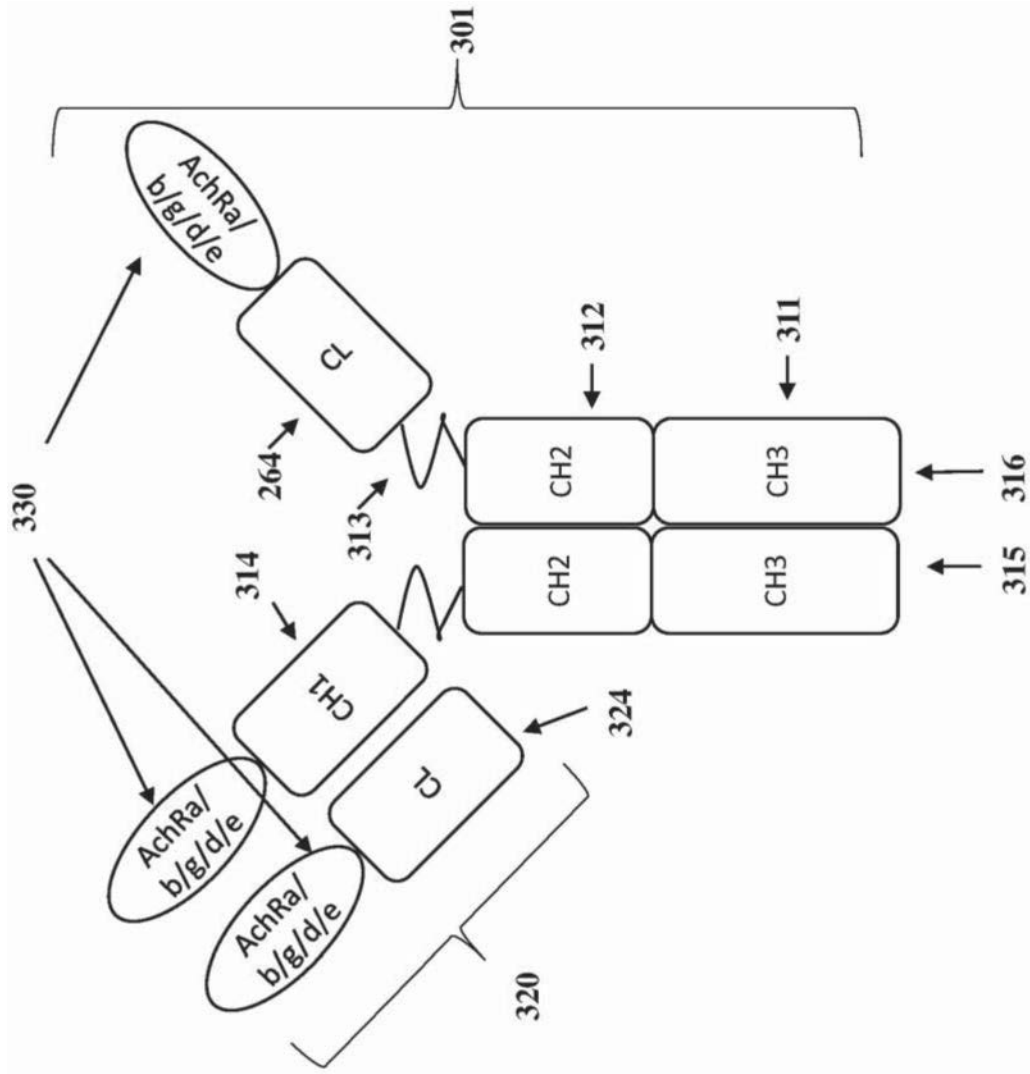


图5A

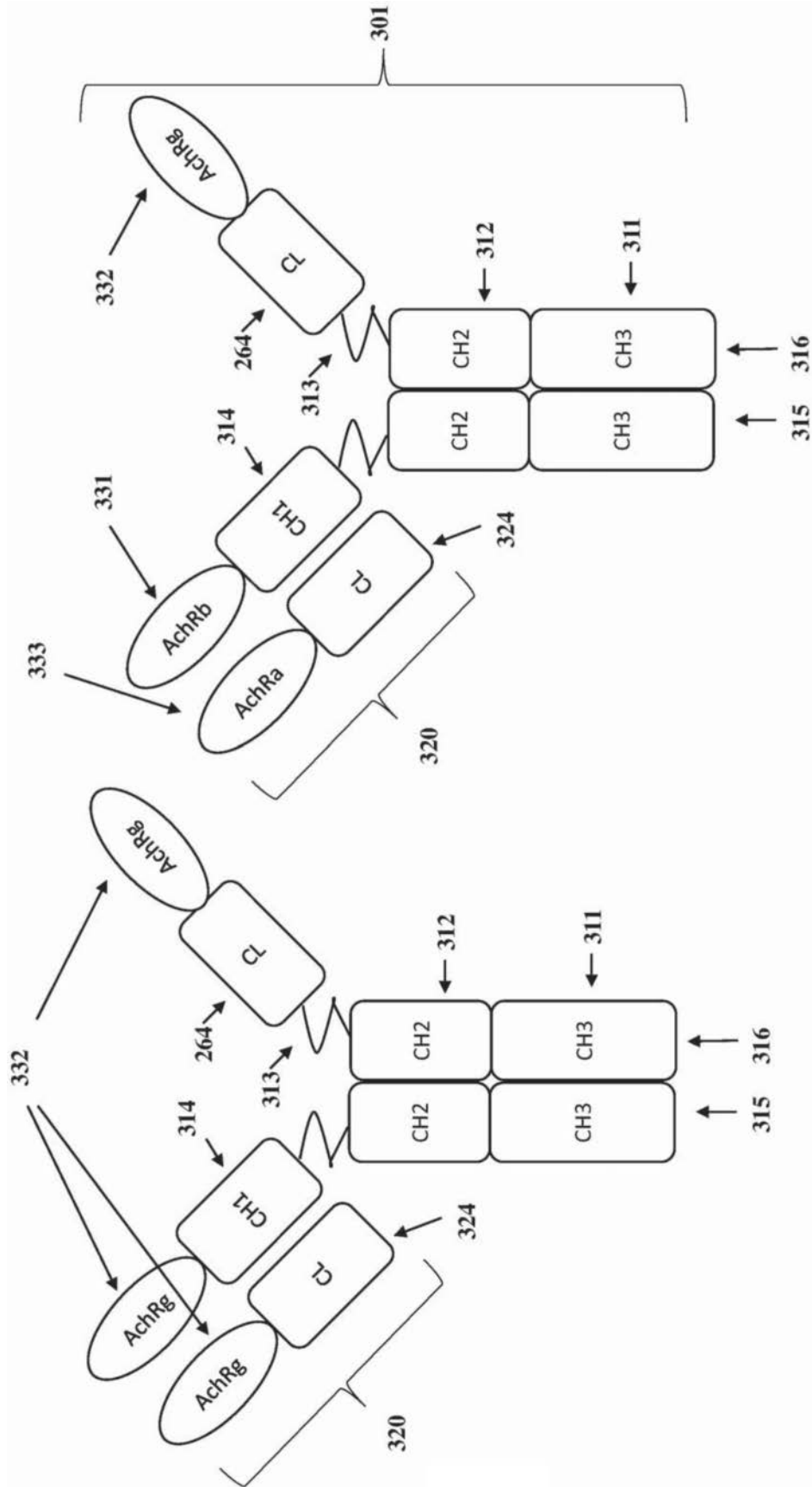


图5C

图5B

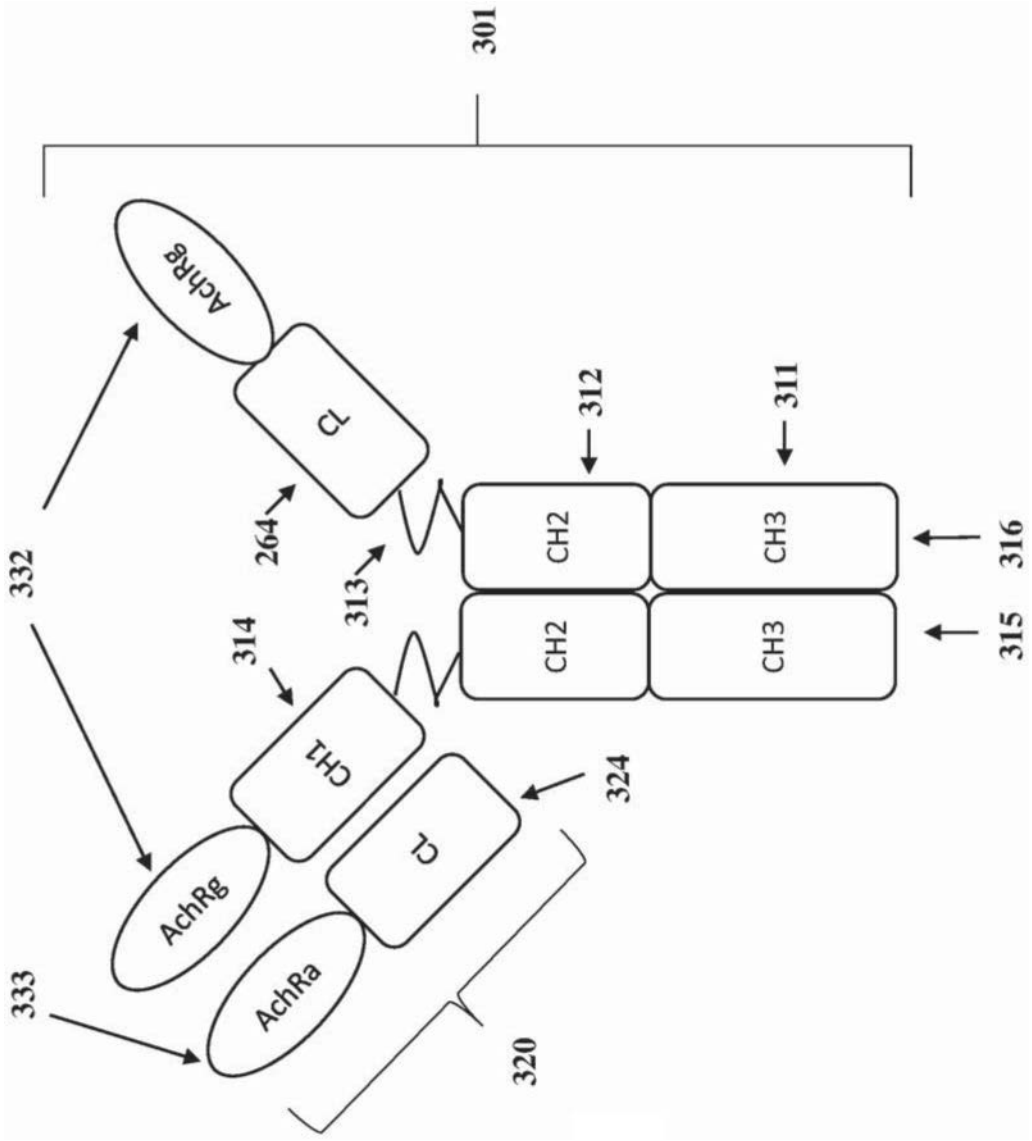


图5D

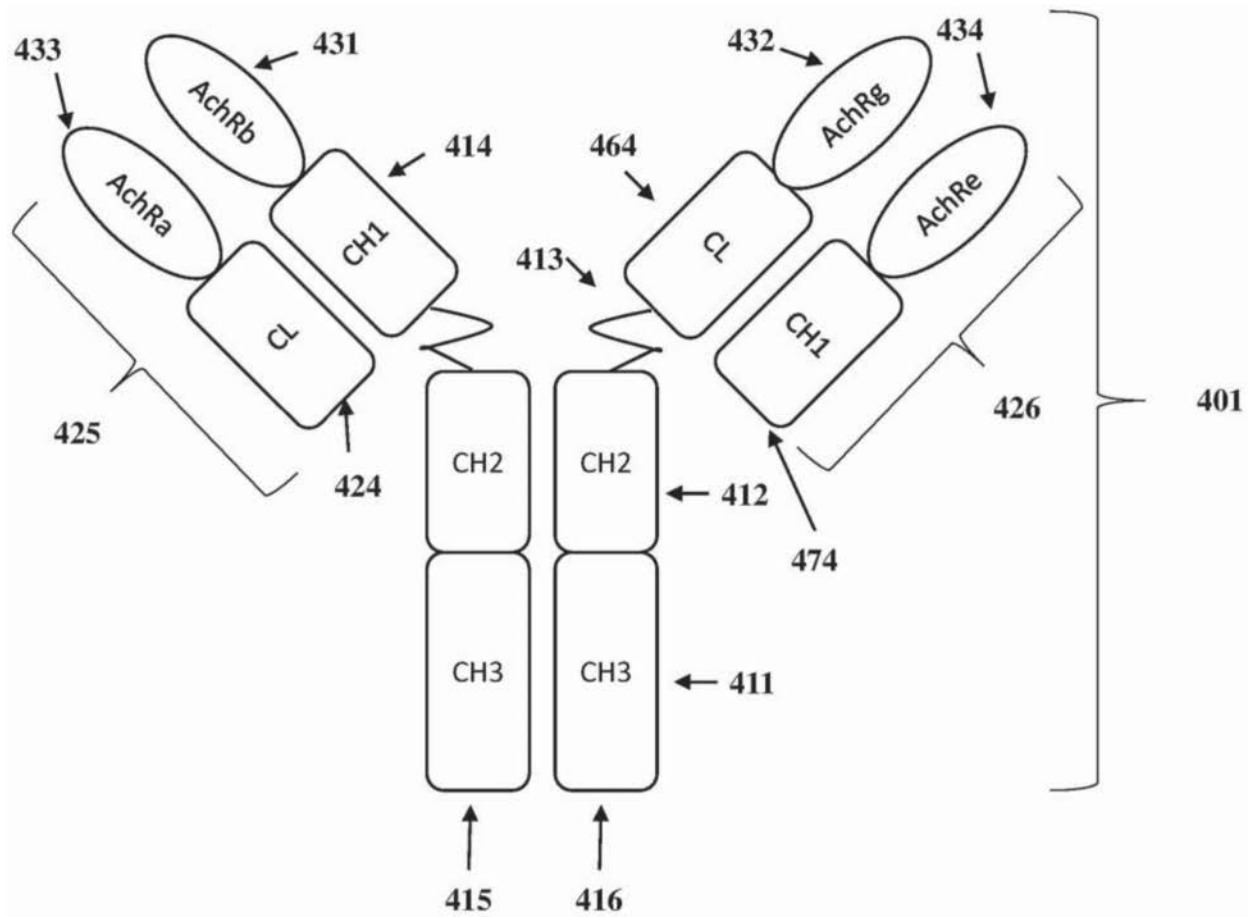


图6

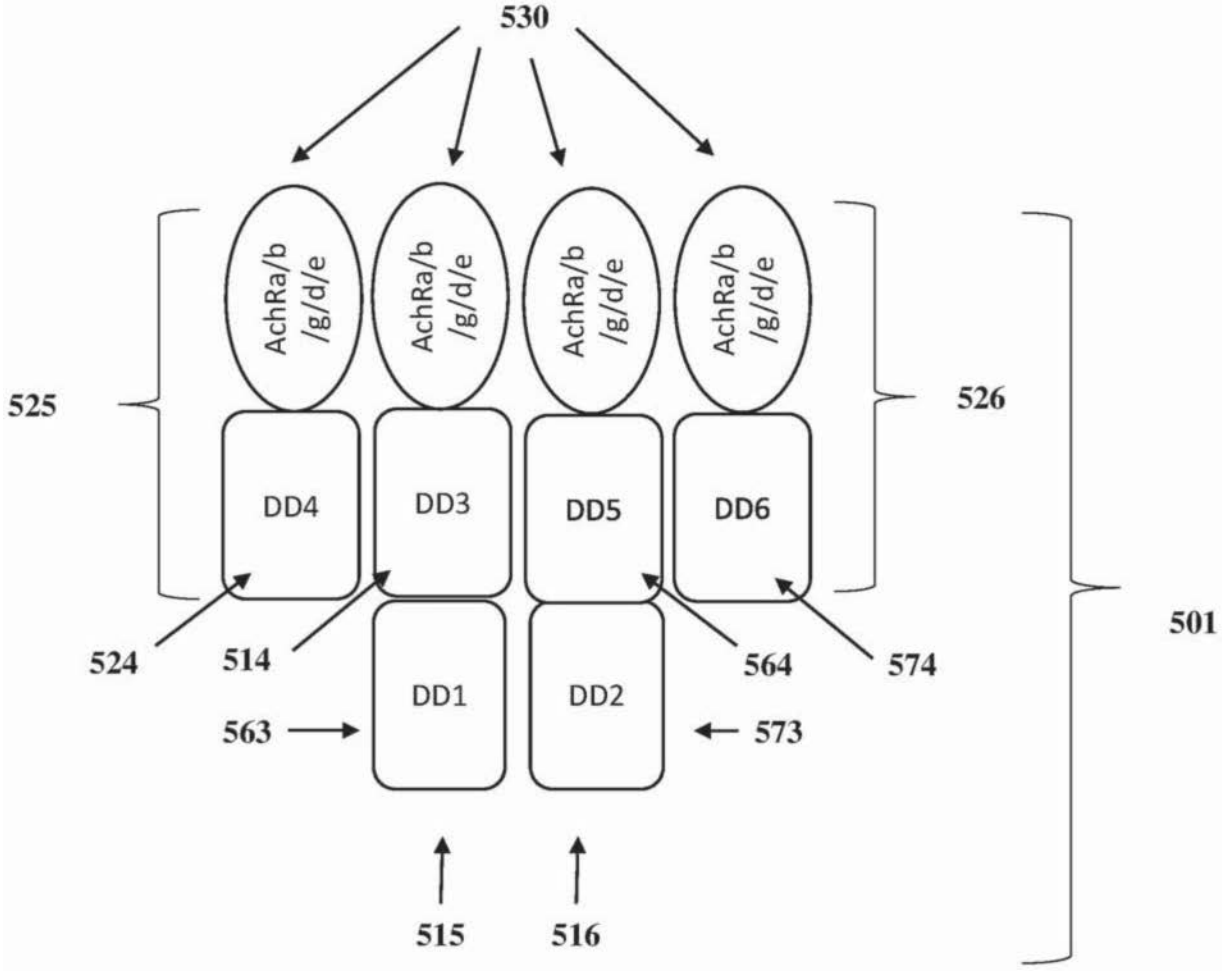


图7A

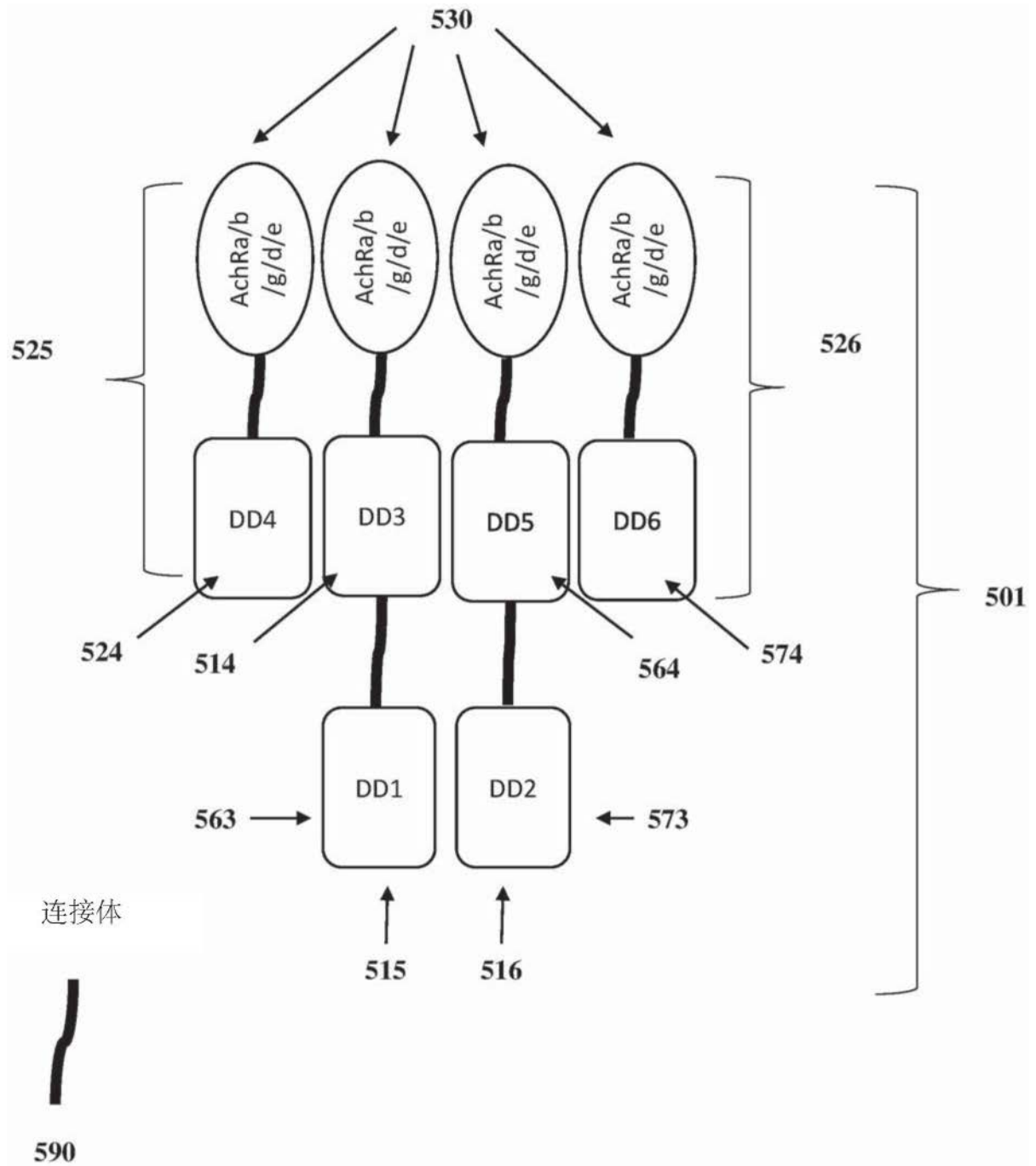


图7B

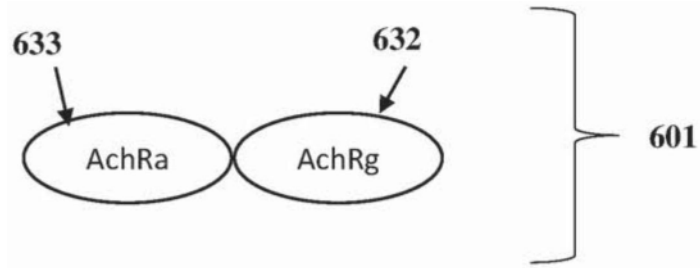


图8A

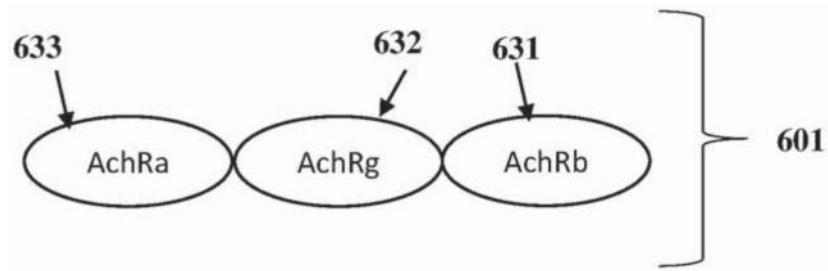


图8B

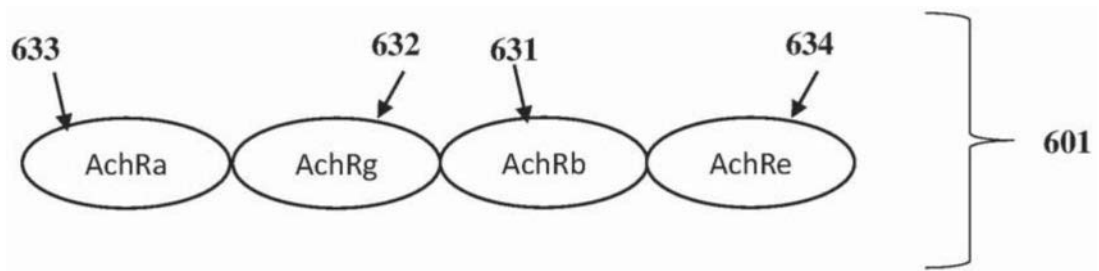


图8C

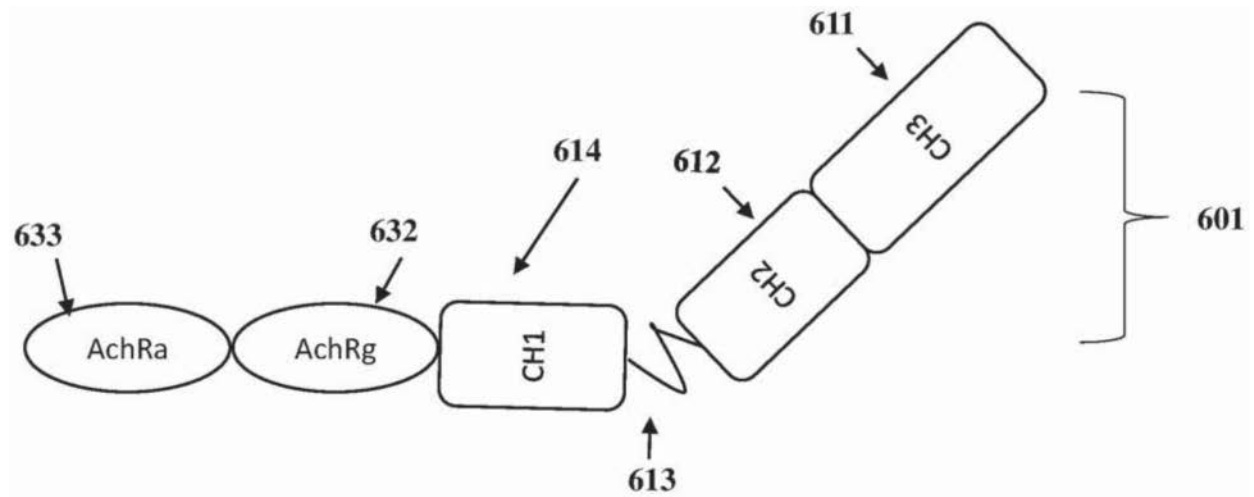


图8D

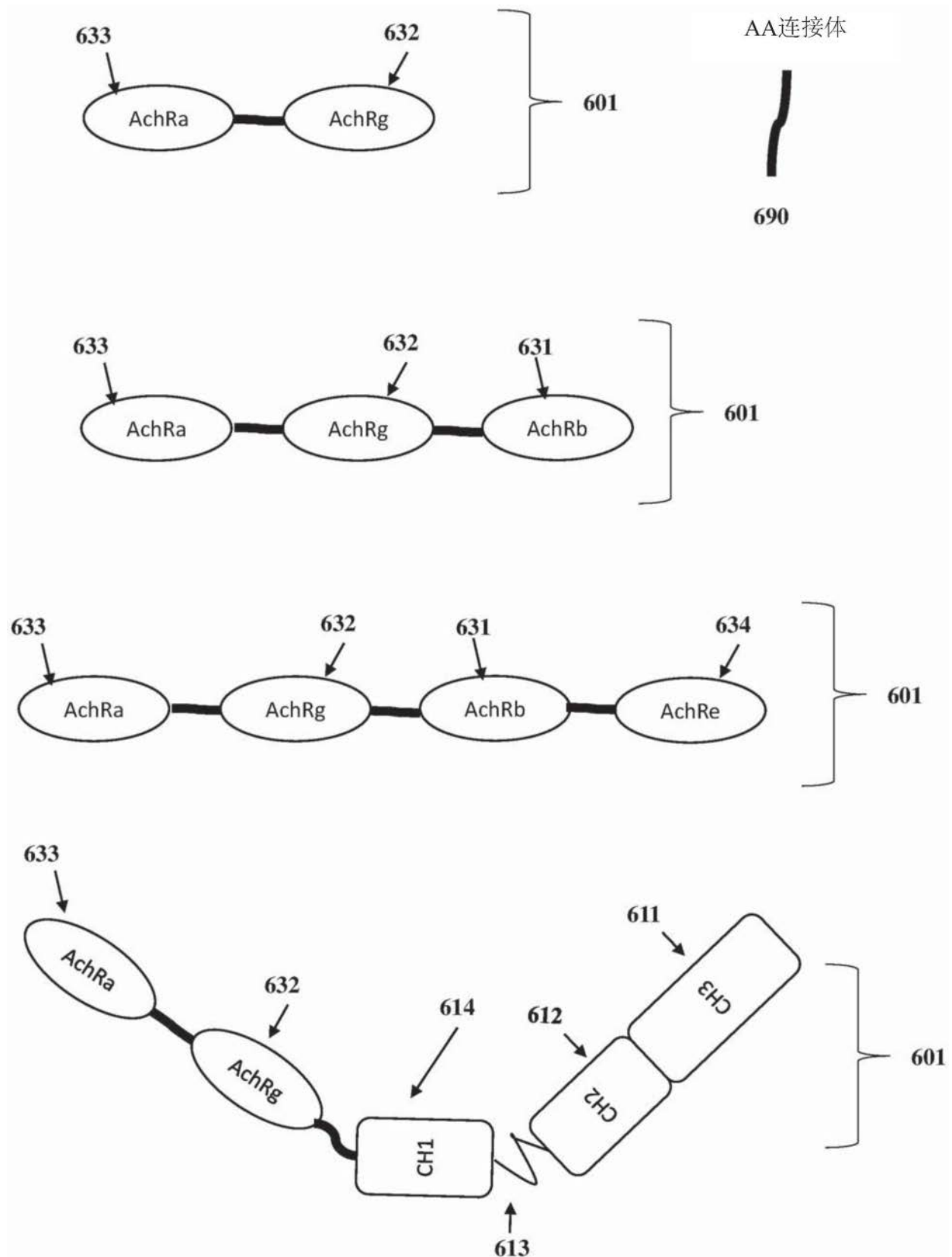


图8E

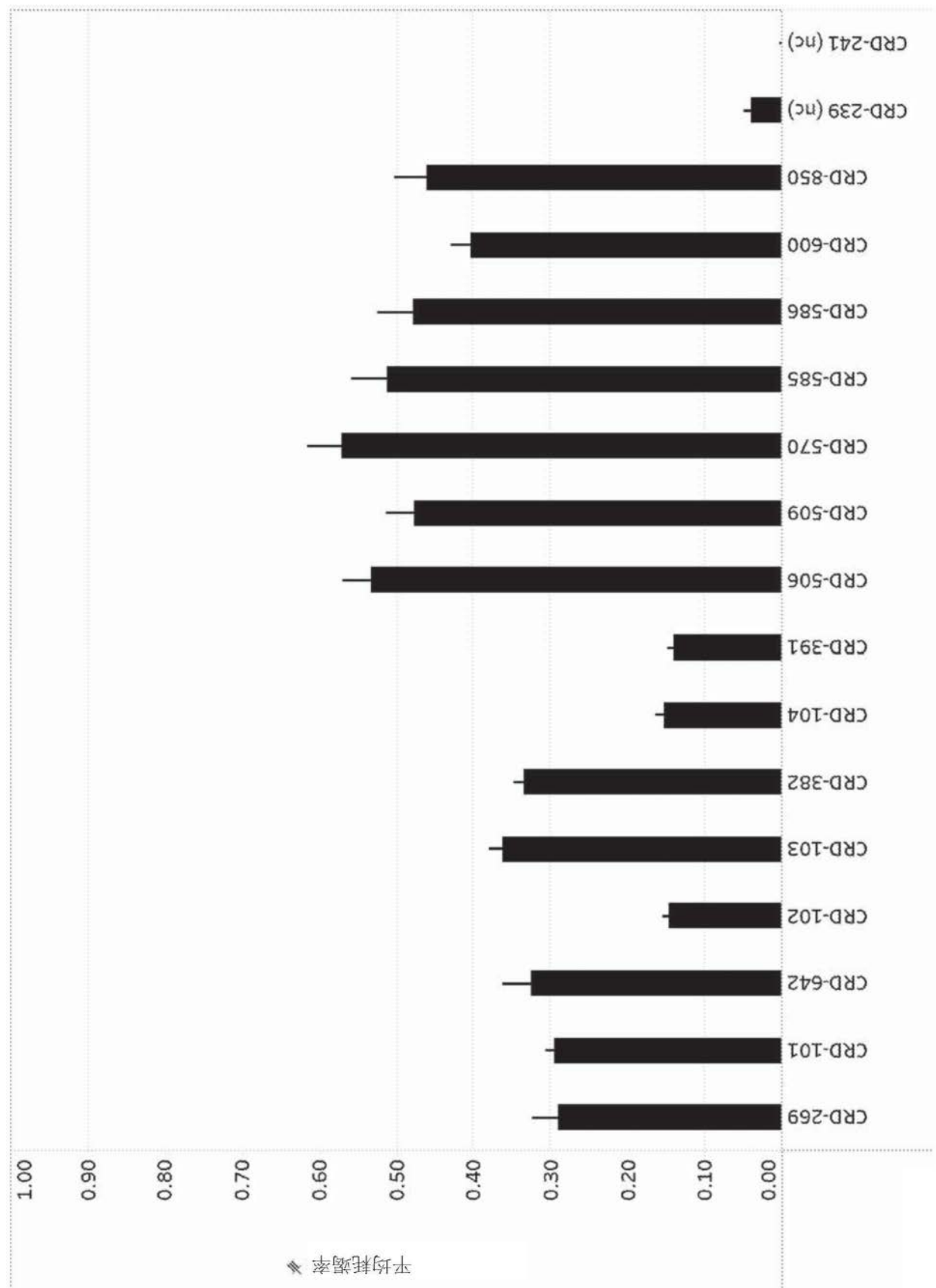


图9

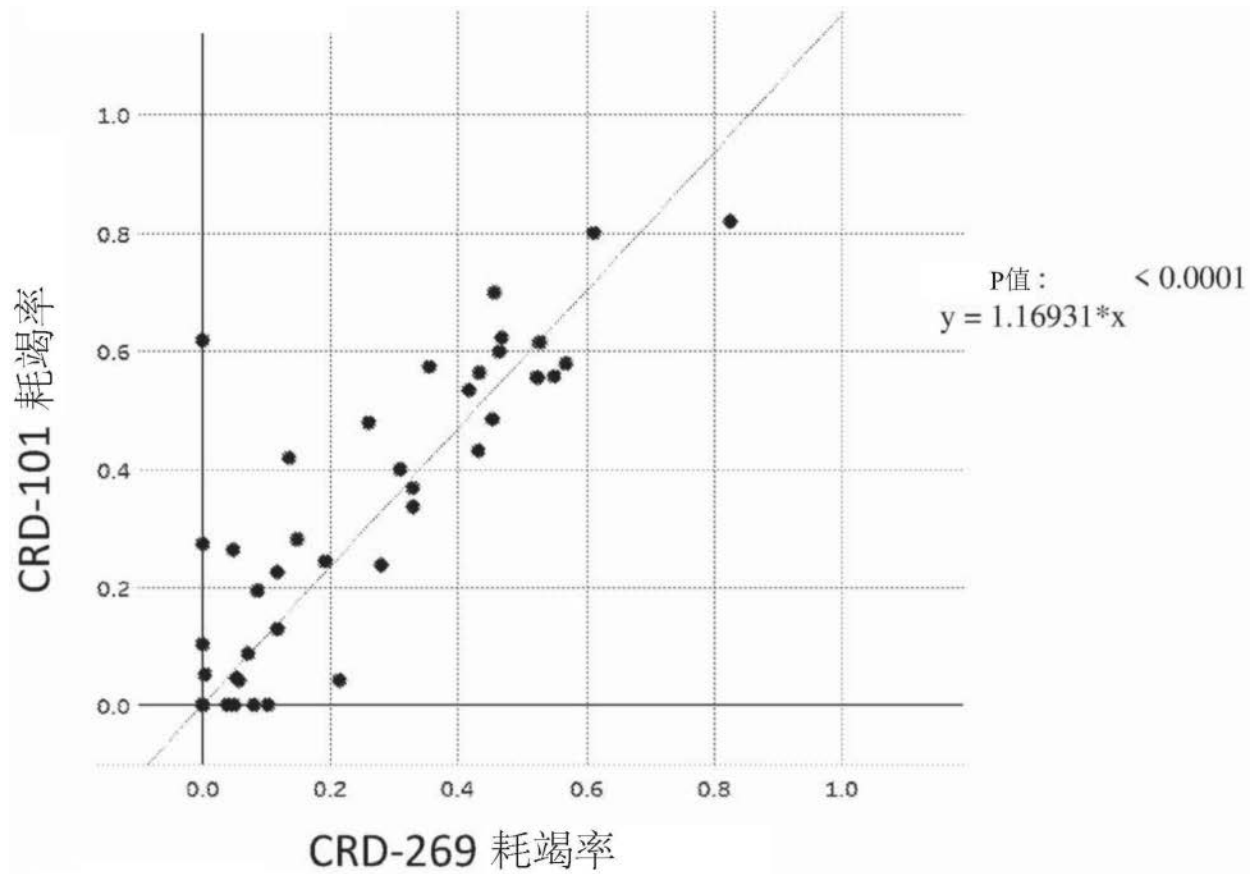


图10A

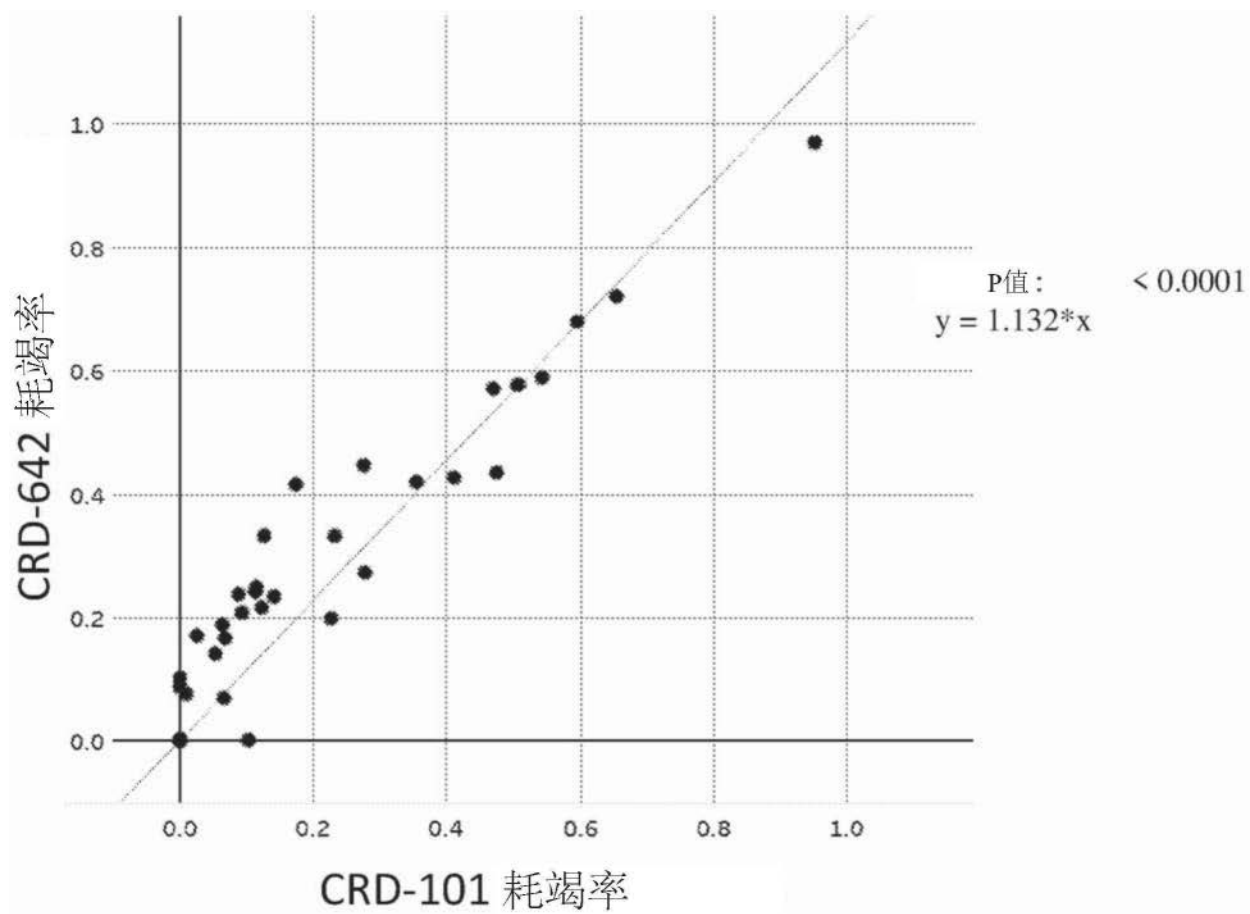


图10B

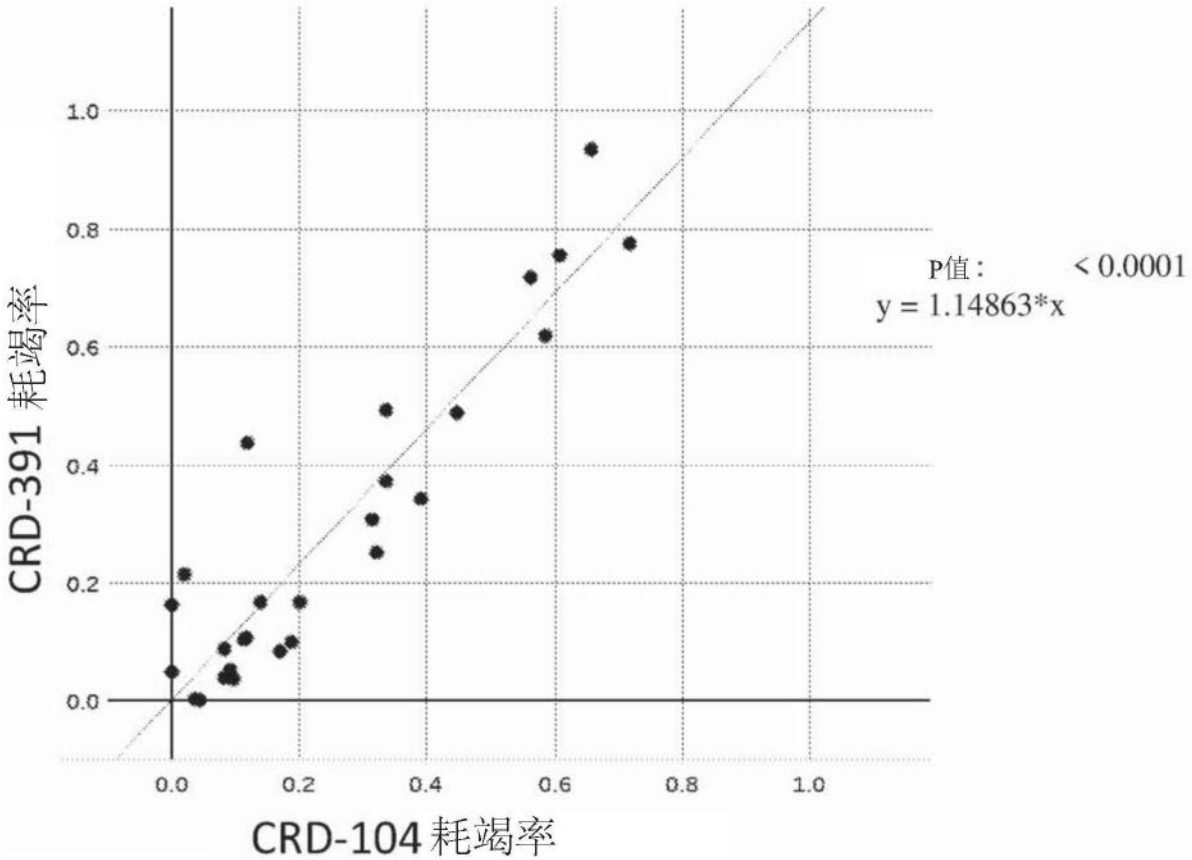


图10C

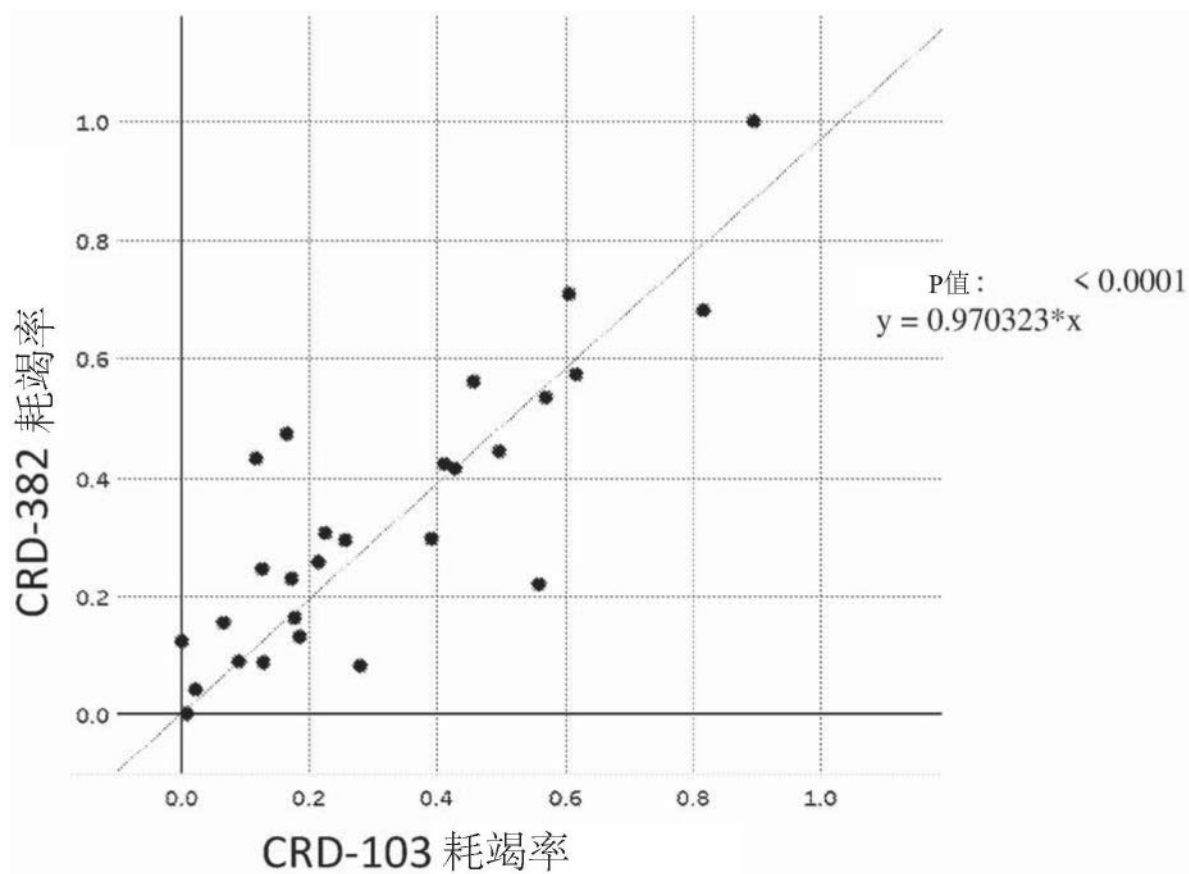


图10D

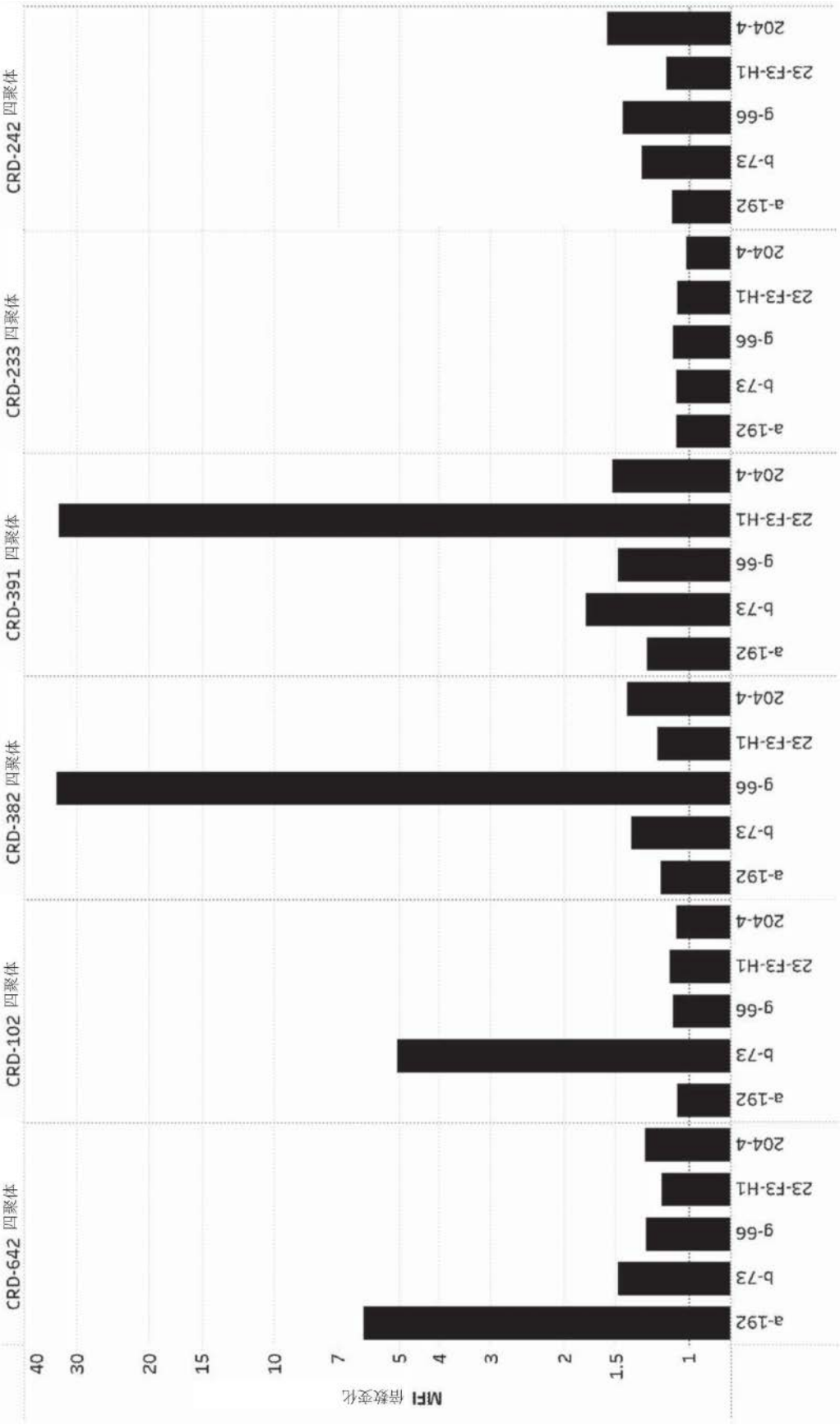


图11

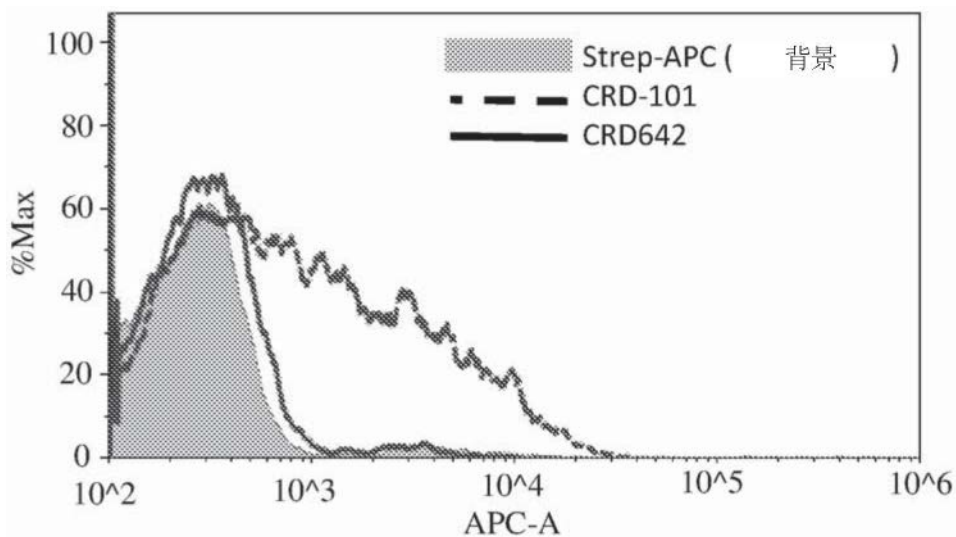


图12

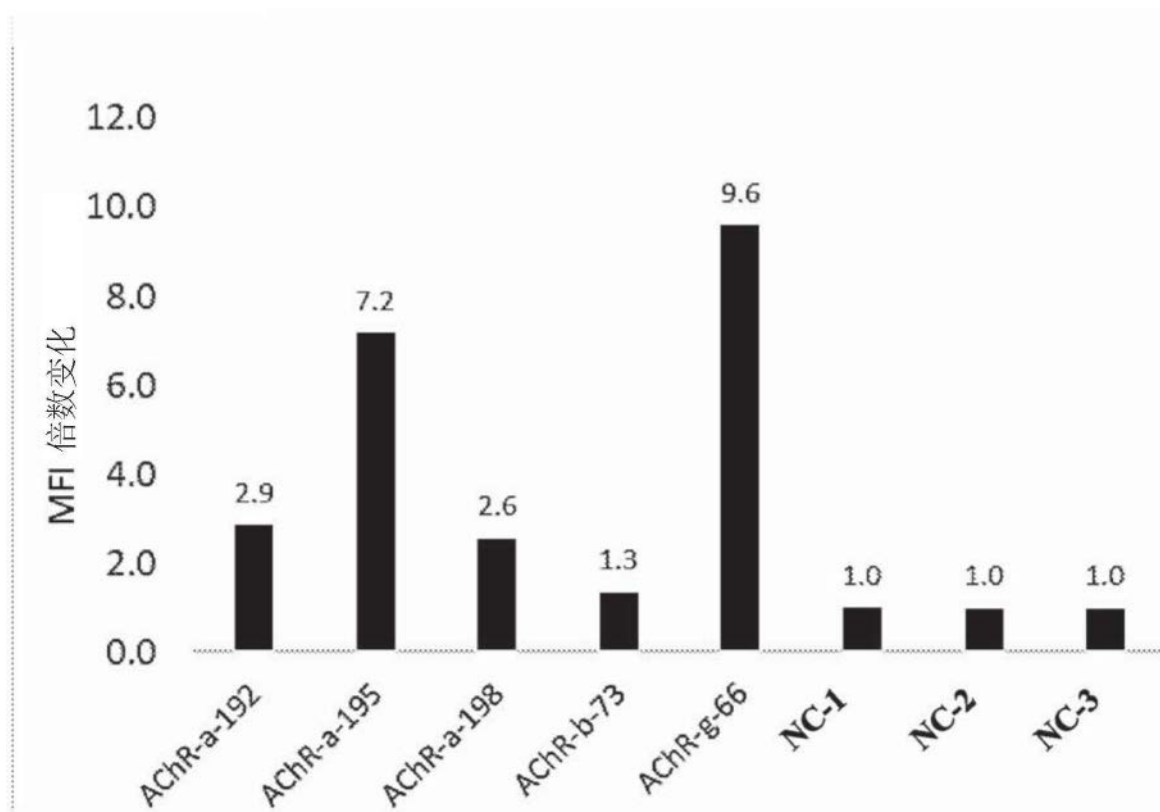


图13A

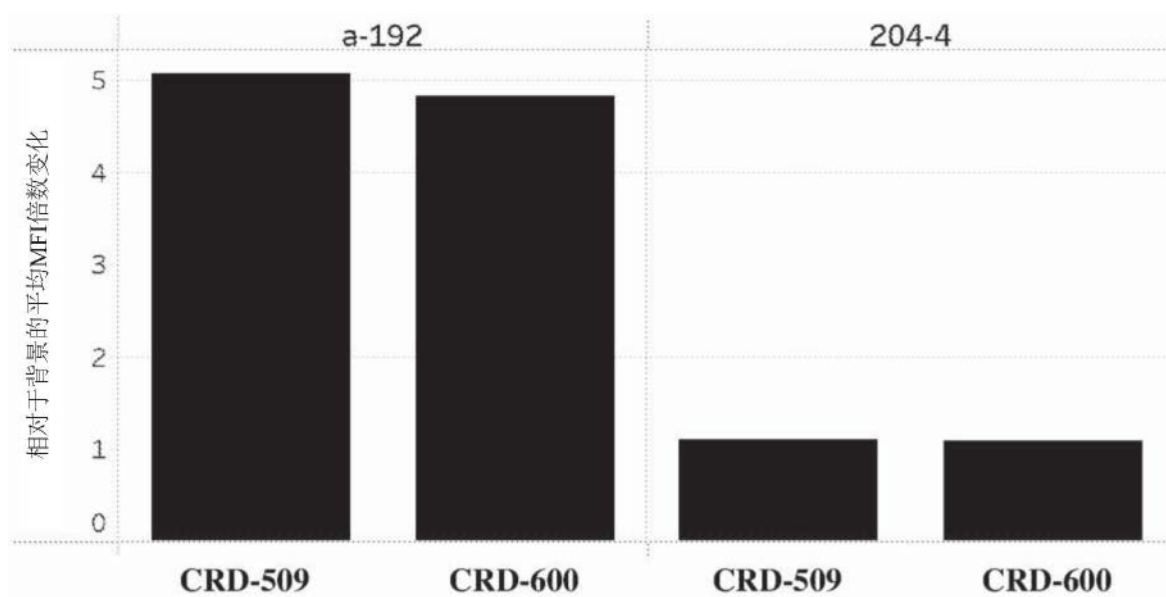


图13B

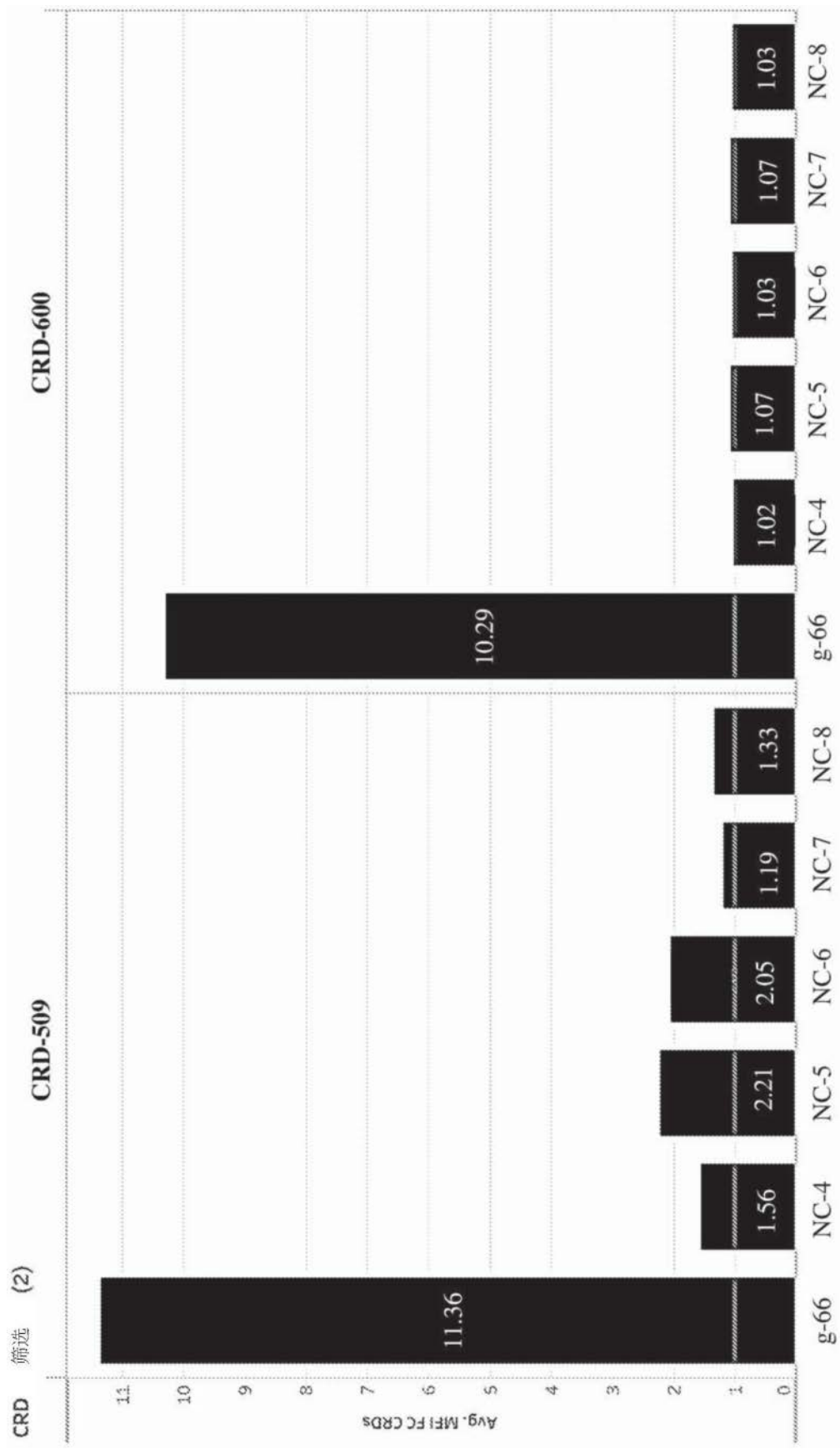


图13C

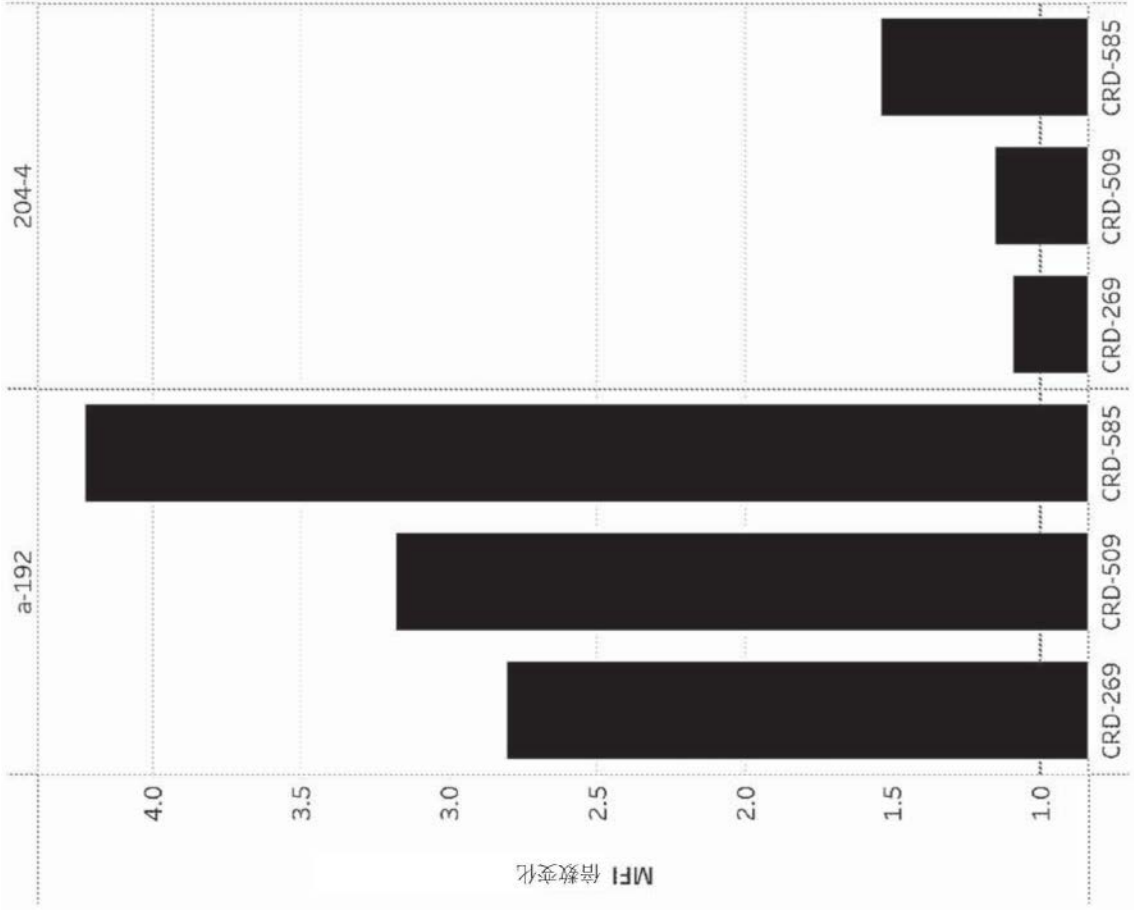


图14

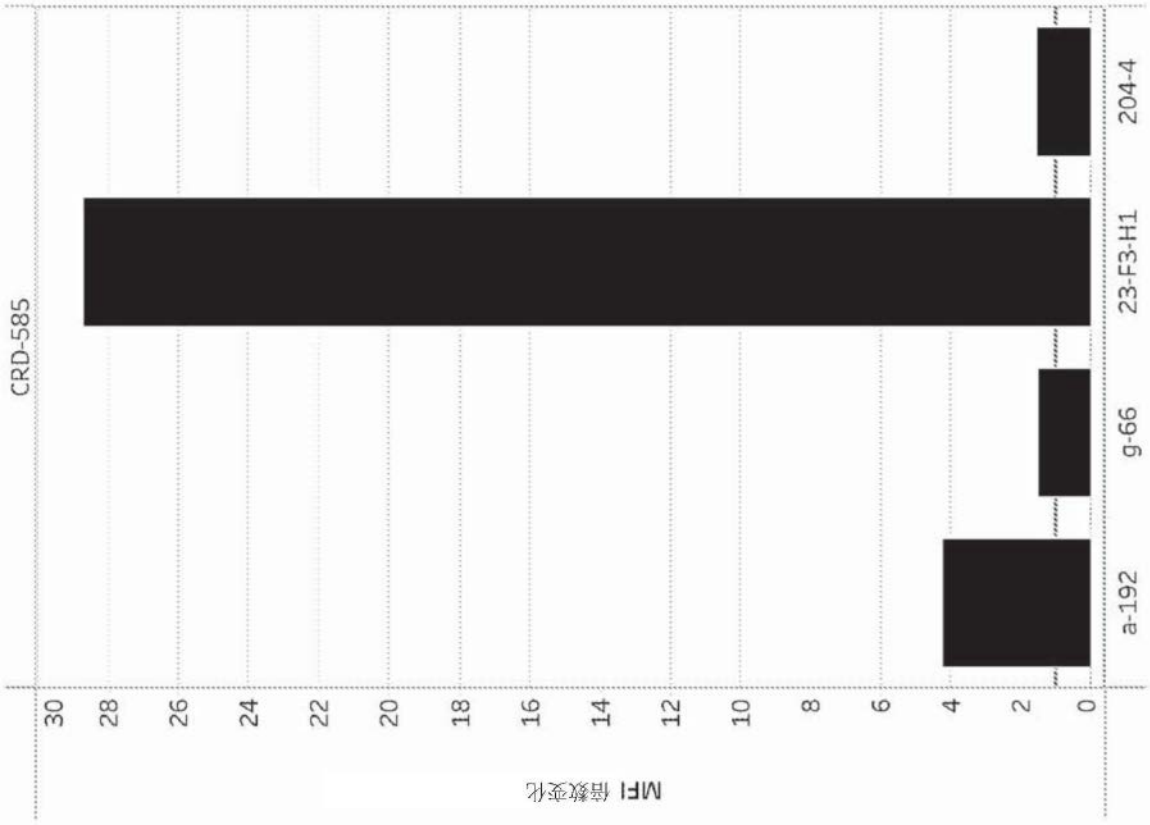


图15A

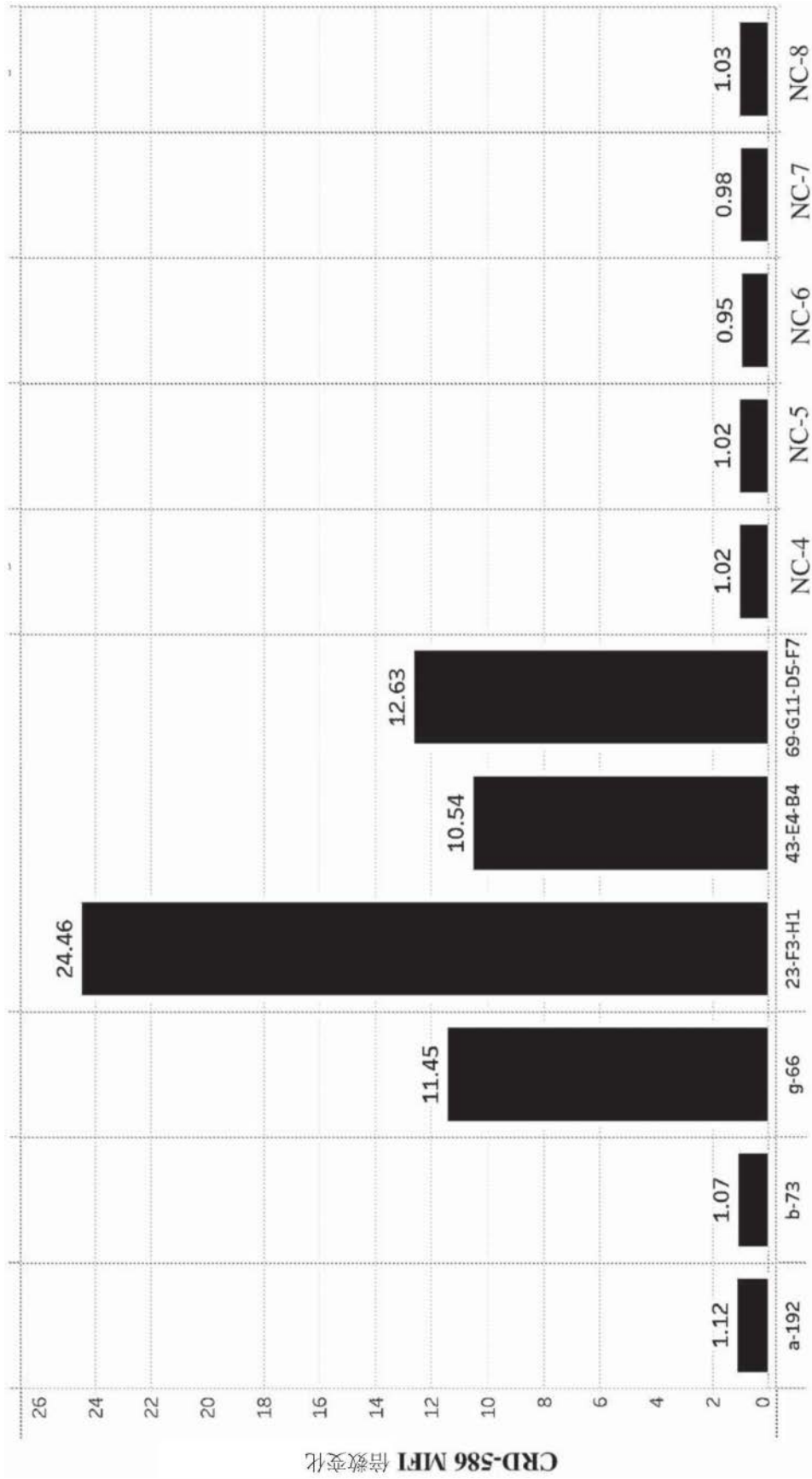


图15B

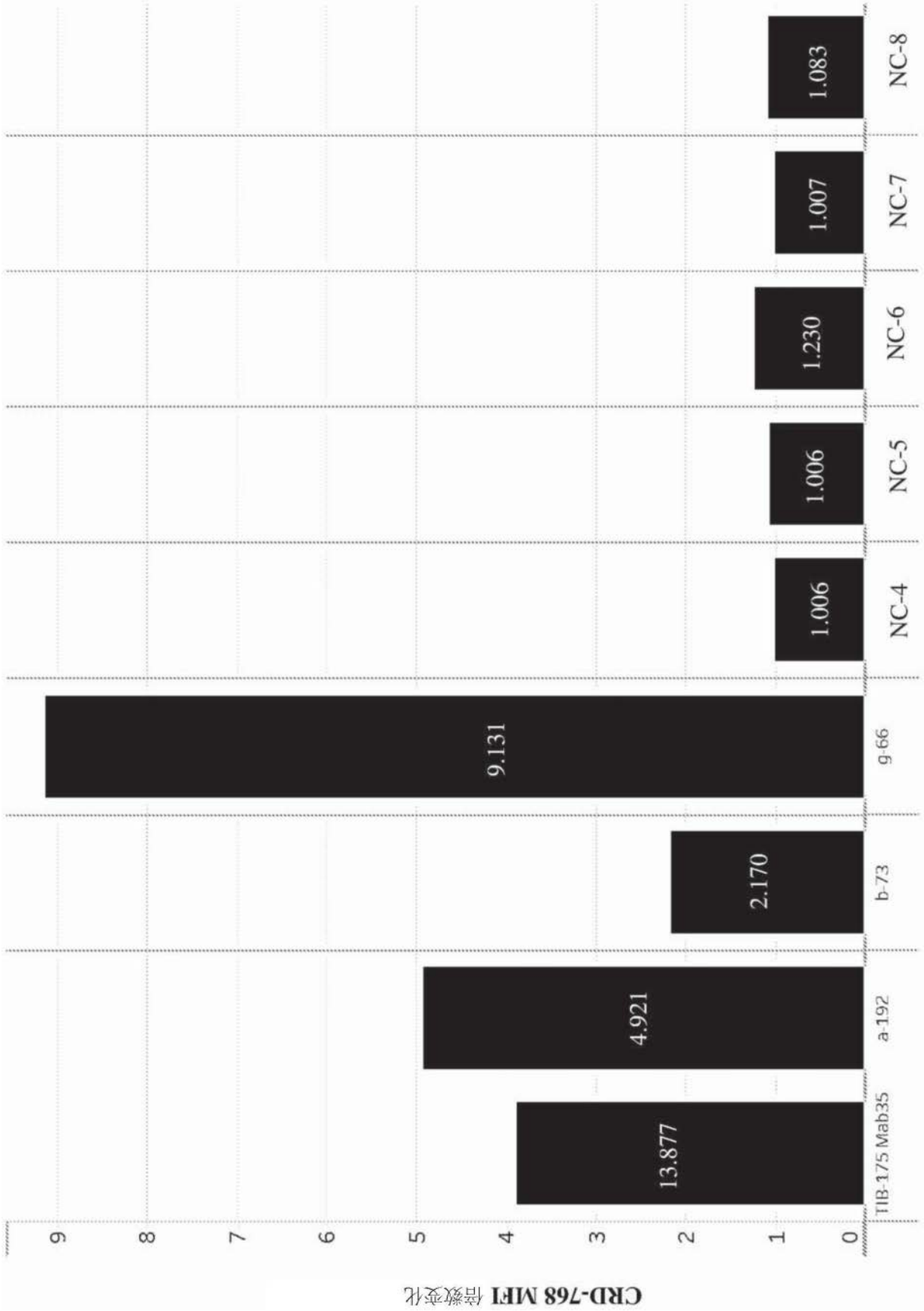


图15C