



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113164592 A

(43) 申请公布日 2021.07.23

(21) 申请号 201980059596.3

(22) 申请日 2019.07.11

(30) 优先权数据

62/696708 2018.07.11 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.03.11

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/041492 2019.07.11

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/014545 EN 2020.01.16

(71) 申请人 动量制药公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 J·C·兰辛 D·奥尔蒂斯

A·古普塔

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 李志强 黄希贵

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

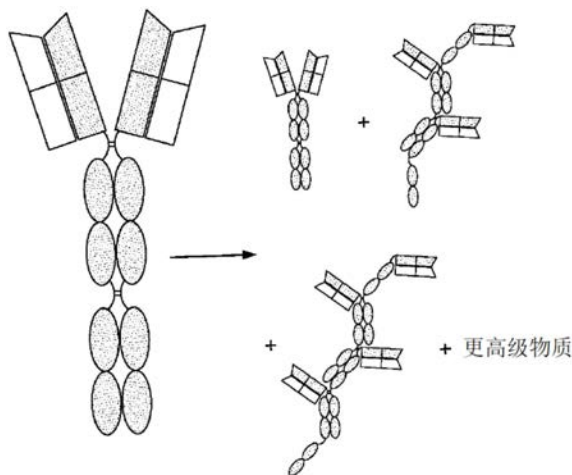
权利要求书18页 说明书88页 附图23页

(54) 发明名称

与工程化Fc-抗原结合结构域构建体有关的组合物和方法

(57) 摘要

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



1. 一种多肽,其包含:抗原结合结构域;接头;第一IgG1 Fc结构域单体,其包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域;第二接头;第二IgG1Fc结构域单体,其包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域;任选的第三接头;以及任选的第三IgG1 Fc结构域单体,其包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域,

其中至少一个Fc结构域单体包含形成工程化突起的突变,

并且其中至少一个其他Fc结构域单体包含至少一个、两个或三个反向电荷突变。

2. 如权利要求1所述的多肽,其中所述抗原结合结构域包含抗体重链可变结构域。

3. 如权利要求1所述的多肽,其中所述抗原结合结构域包含抗体轻链可变结构域。

4. 如权利要求1所述的多肽,其中所述第一IgG1 Fc结构域单体包含形成工程化突起的突变,并且所述第二IgG1 Fc结构域单体包含至少两个反向电荷突变。

5. 如权利要求1所述的多肽,其中所述第一IgG1 Fc结构域单体包含至少两个反向电荷突变,并且所述第二IgG1 Fc结构域单体包含形成工程化突起的突变。

6. 如权利要求1所述的多肽,其中所述第一IgG1 Fc结构域单体和所述第二IgG1 Fc结构域单体均包含形成工程化突起的突变。

7. 如权利要求1所述的多肽,其中所述第一IgG1 Fc结构域单体和所述第二IgG1 Fc结构域单体均包含至少两个反向电荷突变。

8. 如权利要求1所述的多肽,其包含第三接头和第三IgG1 Fc结构域单体,其中所述第一IgG1 Fc结构域单体包含形成工程化突起的突变。

9. 如权利要求1所述的多肽,其包含第三接头和第三IgG1 Fc结构域单体,其中所述第一IgG1 Fc结构域单体包含至少两个反向电荷突变。

10. 如权利要求1所述的多肽,其包含第三接头和第三IgG1 Fc结构域单体,其中所述第一IgG1 Fc结构域单体包含形成工程化突起的突变,并且所述第二IgG1 Fc结构域单体和所述第三IgG1 Fc结构域单体各自均包含至少两个反向电荷突变。

11. 如权利要求1所述的多肽,其包含第三接头和第三IgG1 Fc结构域单体,其中所述第一IgG1 Fc结构域单体和所述第二IgG1 Fc结构域单体各自均包含形成工程化突起的突变,并且所述第三IgG1结构域单体包含至少两个反向电荷突变。

12. 如权利要求1-11中任一项所述的多肽,其中所述多肽的包含形成工程化突起的突变的IgG1 Fc结构域单体各自具有相同的形成突起的突变。

13. 如权利要求1-12中任一项所述的多肽,其中所述多肽的包含反向电荷突变的所述IgG1 Fc结构域单体各自具有相同的反向电荷突变。

14. 如权利要求1-12中任一项所述的多肽,其中所述多肽的包含形成工程化突起的突变的所述IgG1 Fc结构域单体还包含至少一个反向电荷突变。

15. 如权利要求14所述的多肽,其中所述多肽的包含形成工程化突起的突变和至少一个反向电荷突变的所述IgG1 Fc结构域单体包含与所述多肽的包含反向电荷突变但不包含突起形成突变的所述IgG1 Fc结构域单体的所述反向电荷突变不同的反向电荷突变。

16. 如权利要求1-15中任一项所述的多肽,其中所述形成工程化突起的突变和所述反向电荷突变在所述CH3结构域中。

17. 如权利要求16所述的多肽,其中所述突变在从EU位置G341到EU位置K447的序列内,包括端点。

酸缺失或置换。

34. 如权利要求1-32中任一项所述的多肽,其中每个Fc结构域单体的所述CH2结构域是相同的并且包含以下氨基酸序列:GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK,其具有不超过两个单一氨基酸缺失或置换。

35. 如权利要求1-32中任一项所述的多肽,其中每个Fc结构域单体的所述CH2结构域是相同的并且包含以下氨基酸序列:GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK,其具有不超过两个单一氨基酸置换。

36. 如权利要求1-32中任一项所述的多肽,其中每个Fc结构域单体的所述CH2结构域是相同的并且包含以下氨基酸序列:GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK。

37. 如权利要求1-32中任一项所述的多肽,其中每个Fc结构域单体的所述CH3结构域独立地包含以下氨基酸序列:GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSGDSFFLYSK

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

38. 如权利要求1-32中任一项所述的多肽,其中每个Fc结构域单体的所述CH3结构域独立地包含以下氨基酸序列:GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSGDSFFLYSK

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

39. 如权利要求1-32中任一项所述的多肽,其中每个Fc结构域单体的所述CH3结构域独立地包含以下氨基酸序列:GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSGDSFFLYSK

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

40. 如权利要求1-32中任一项所述的多肽,其中每个Fc结构域单体的所述CH3结构域独立地包含以下氨基酸序列:GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSGDSFFLYSK

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

41. 如权利要求33-40中任一项所述的多肽,其中所述单一氨基酸置换选自以下项组成的组:S354C、T366Y、T366W、T394W、T394Y、F405W、F405A、Y407A、S354C、Y349T、T394F、K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R和D356K。

42. 如权利要求1-32中任一项所述的多肽,其中每个所述Fc结构域单体独立地包含SEQ ID NO:42、43、45和47中任一者具有多至10个单一氨基酸置换的氨基酸序列。

43. 如权利要求42所述的多肽,其中多至6个所述单一氨基酸置换是所述CH3结构域中的反向电荷突变或是形成工程化突起的突变。

44. 如权利要求42所述的多肽,其中所述单一氨基酸置换在从EU位置G341到EU位置K447的序列内,包括端点。

45. 如权利要求1所述的多肽,其中至少一个所述形成工程化突起的突变选自以下项组成的组:S354C、T366Y、T366W、T394W、T394Y、F405W、S354C、Y349T和T394F。

46. 如权利要求1、4-16中任一项所述的多肽,其中至少一个反向电荷突变选自:K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R和D356K。

47. 如权利要求1-46中任一项所述的多肽,其中所述抗原结合结构域是scFv。

48. 如权利要求1-46中任一项所述的多肽,其中所述抗原结合结构域包含VH结构域和CH1结构域。

49. 如权利要求48所述的多肽,其中所述抗原结合结构域还包含VL结构域。

50. 如权利要求48所述的多肽,其中所述VH结构域包含表1A和表1B中列出的一组CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列。

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

52. 如权利要求48所述的多肽,其中所述VH结构域包含表2中列出的抗体的VH序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,并且所述VH序列不包括所述CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列时与表2中列出的抗体的所述VH序列具有至少95%或98%的同一性。

53. 如权利要求48所述的多肽,其中所述VH结构域包含表2中列出的抗体的VH序列。

54. 如权利要求48所述的多肽,其中所述抗原结合结构域包含表1A和表1B中列出的一组CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列。

55. 如权利要求48所述的多肽,其中所述抗原结合结构域包含来自表2中列出的抗体的一组VH和VL序列的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列。

56. 如权利要求48所述的多肽,其中所述抗原结合结构域包含VH结构域和VL结构域,所述VH结构域包含表2中列出的抗体的VH序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,并且所述VL结构域包含表2中列出的抗体的VL序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,其中所述VH结构域和所述VL结构域序列不包括所述CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列时与表2中列出的抗体的所述VH序列和所述VL序列具有至少95%或98%的同一性。

57. 如权利要求48所述的多肽,其中所述抗原结合结构域包含表2中列出的抗体的一组VH和VL序列。

58. 如权利要求1-46所述的多肽,其中所述抗原结合结构域包含IgG CL抗体恒定结构域和IgG CH1抗体恒定结构域。

59. 如权利要求1-46所述的多肽,其中所述抗原结合结构域包含VH结构域和CH1结构域,并且可以与包含VL结构域和CL结构域的多肽结合以形成Fab。

60. 一种多肽复合物,其包含与第二多肽连接的如权利要求1-59中任一项所述的多肽,所述第二多肽包含IgG1 Fc结构域单体,所述IgG1 Fc结构域单体包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域,其中所述多肽和所述第二多肽通过所述多肽的第一IgG1 Fc结构域单体、第二IgG1 Fc结构域单体或第三IgG1 Fc结构域单体的所述铰链结构域内的半胱氨酸残基与所述第二多肽的所述铰链结构域内的半胱氨酸残基之间的二硫键连接。

61. 如权利要求60所述的多肽复合物,其中所述第二多肽单体包含形成工程化空腔的突变。

62. 如权利要求61所述的多肽复合物,其中所述形成工程化空腔的突变选自以下项组成的组:Y407T、Y407A、F405A、T394S、T394W/Y407A、T366W/T394S、T366S/L368A/Y407V/Y349C、S364H/F405A。

63. 如权利要求61所述的多肽复合物,其中所述第二多肽单体还包含至少一个反向电荷突变。

64. 如权利要求63所述的多肽复合物,其中所述至少一个反向电荷突变选自:K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R和D356K。

65. 如权利要求60-64中任一项所述的多肽复合物,其中所述多肽复合物还与第三多肽连接,所述第三多肽包含IgG1 Fc结构域单体,所述IgG1Fc结构域单体包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域,其中所述多肽和所述第三多肽通过所述多肽的第一IgG1 Fc结构域单体、第二IgG1 Fc结构域单体或第三IgG1 Fc结构域单体的所述铰链结构域内的半胱氨酸残基与所述第三多肽的所述铰链结构域内的半胱氨酸残基之间的二硫键连接,其中所述第二多肽和所述第三多肽与所述多肽的不同IgG1 Fc结构域单体连接。

66. 如权利要求65所述的多肽复合物,其中所述第三多肽单体包含至少两个反向电荷突变。

67. 如权利要求66所述的多肽复合物,其中所述至少两个反向电荷突变选自:K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R和D356K。

68. 如权利要求65所述的多肽,其中所述第二多肽单体包含选自由以下项组成的组的至少一个反向电荷突变:K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R和D356K,并且所述第三多肽单体包含选自由以下项组成的组的至少两个反向电荷突变:K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R和D356K,其中所述第二多肽单体和所述第三多肽单体包含不同的反向电荷突变。

69. 如权利要求60-68中任一项所述的多肽复合物,其中所述第二多肽包含SEQ ID NO: 42、43、45和47中任一者具有多至10个单一氨基酸置换的氨基酸序列。

70. 如权利要求65-69中任一项所述的多肽复合物,其中所述第三多肽包含SEQ ID NO: 42、43、45和47中任一者具有多至10个单一氨基酸置换的氨基酸序列。

71. 如权利要求60-69中任一项所述的多肽复合物,其中所述多肽包含至少一个包含S354C和T366W突变的Fc单体和至少一个包含D356K和D399K突变的Fc单体。

72. 如权利要求71所述的多肽复合物,其中所述至少一个包含S354C和T366W突变的Fc单体还包含E357K突变。

73. 如权利要求65-67中任一项所述的多肽复合物,其中所述第二多肽单体包含Y349C、T366S、L368A和Y407V突变。

74. 如权利要求73所述的多肽复合物,其中所述第二多肽还包含K370D突变。

75. 如权利要求65-67中任一项所述的多肽复合物,其中所述第三多肽单体包含K392D和K409D突变。

76. 如权利要求65-67中任一项所述的多肽复合物,其中所述第二多肽单体包含Y349C、T366S、L368A、Y407V和K370D突变,并且所述第三多肽单体包含K392D和K409D突变。

77. 如权利要求60-76中任一项所述的多肽复合物,其相对于具有单个Fc结构域和至少一个抗原结合结构域的多肽复合物在抗体依赖性细胞毒性(ADCC)测定、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)测定中包含增强的效应子功能。

78. 一种多肽,其包含:第一IgG1 Fc结构域单体,其包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域;第一接头;第二IgG1 Fc结构域单体,其包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域;

任选的第二接头;以及任选的第三IgG1 Fc结构域单体,其包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域,

其中至少一个Fc结构域单体包含形成工程化突起的突变,

并且其中至少一个其他Fc结构域单体包含至少一个、两个或三个反向电荷突变。

79. 如权利要求78所述的多肽, 其中所述第一IgG1 Fc结构域单体包含形成工程化突起的突变, 并且所述第二IgG1 Fc结构域单体包含至少两个反向电荷突变。

80. 如权利要求78所述的多肽, 其中所述第一IgG1 Fc结构域单体包含至少两个反向电荷突变, 并且所述第二IgG1 Fc结构域单体包含形成工程化突起的突变。

81.如权利要求78所述的多肽,其中所述第一IgG1 Fc结构域单体和所述第二IgG1 Fc结构域单体均包含形成工程化突起的突变。

82.如权利要求78所述的多肽,其中所述第一IgG1 Fc结构域单体和所述第二IgG1 Fc结构域单体均包含至少两个反向电荷突变。

83. 如权利要求78所述的多肽,其包含第二接头和第三IgG1 Fc结构域单体,其中所述第一IgG1 Fc结构域单体包含形成工程化突起的突变。

84.如权利要求78所述的多肽,其包含第二接头和第三IgG1 Fc结构域单体,其中所述第一IgG1 Fc结构域单体包含至少两个反向电荷突变。

85. 如权利要求78所述的多肽,其包含第二接头和第三IgG1 Fc结构域单体,其中所述第一IgG1 Fc结构域单体包含形成工程化突起的突变,并且所述第二IgG1 Fc结构域单体和所述第三IgG1 Fc结构域单体各自均包含至少两个反向电荷突变。

86. 如权利要求78所述的多肽,其包含第二接头和第三IgG1 Fc结构域单体,其中所述第一IgG1 Fc结构域单体和所述第二IgG1 Fc结构域单体各自均包含形成工程化突起的突变,并且所述第三IgG1结构域单体包含至少两个反向电荷突变。

87.如权利要求78-86中任一项所述的多肽,其中所述多肽的包含形成工程化突起的突变的IgG1 Fc结构域单体各自具有相同的形成突起的突变。

88.如权利要求78-87中任一项所述的多肽,其中所述多肽的包含反向电荷突变的所述IgG1 Fc结构域单体各自具有相同的反向电荷突变。

89. 如权利要求78-88中任一项所述的多肽,其中所述多肽的包含形成工程化突起的突变的所述IgG1 Fc结构域单体还包含至少一个反向电荷突变。

90. 如权利要求14所述的多肽,其中所述多肽的包含形成工程化突起的突变和至少一个反向电荷突变的所述IgG1 Fc结构域单体包含与所述多肽的包含反向电荷突变但不包含突起形成突变的所述IgG1 Fc结构域单体的所述反向电荷突变不同的反向电荷突变。

91. 如权利要求78-90中任一项所述的多肽,其中所述形成工程化突起的突变和所述反向电荷突变在所述CH3结构域中。

92.如权利要求91所述的多肽,其中所述突变在从EU位置G341到EU位置K447的序列内,包括端点。

93. 如权利要求78-92中任一项所述的多肽,其中所述突变是单一氨基酸变化。

94.如权利要求78所述的多肽,其中所述第一接头和所述任选的第二接头包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列或由这些氨基酸序列组成:

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

GSGSGSGSGSGS、GGS GGS、GGS GGS GGS、GGS GGS GGS GGS、GGS G、GGS G、GGS GGG SG、GGS GGG SGG SGG
GGS GGG SGG GGS GGG GS、GENLYFQSGG、SACYCELS、RSIAT、RPACKIPNDLKQKVMNH、GGSAGGSGSGSSG
GSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG、AAANSSIDLISVPVDSR、GGS GGG SEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGG
GS、GGGS GGG SGG GS、SGGSGGGSGGSGGGSGGG、GGS GGGSGGSGGGSGGS、GGGG、GGGGGGGG、
GGGGGGGGGGGG和GGGGGGGGGGGGGGGGGG。

95. 如权利要求78所述的多肽, 其中所述第一接头和所述任选的第二接头是甘氨酸间隔物。

96. 如权利要求78所述的多肽, 其中所述第一接头和所述任选的第二接头独立地由4至30、4至20、8至30、8至20、12至20或12至30个甘氨酸残基组成。

97.如权利要求78所述的多肽,其中所述第一接头和所述任选的第二接头由20个甘氨酸残基组成。

98. 如权利要求78-97所述的多肽, 其中至少一个所述Fc结构域单体在EU位置I253处包含单一氨基酸突变。

100. 如权利要求98所述的多肽, 其中EU位置I253处的每个氨基酸突变独立地选自由以下项组成的组: I253A、I253C、I253D、I253E、I253F、I253G、I253H、I253I、I253K、I253L、I253M、I253N、I253P、I253Q、I253R、I253S、I253T、I253V、I253W和I253Y。

101. 如权利要求100所述的多肽,其中位置I253处的每个氨基酸突变是I253A。

102. 如权利要求78-101中任一项所述的多肽,其中至少一个所述Fc结构域单体在EU位置R292处包含单一氨基酸突变。

103. 如权利要求102所述的多肽, 其中EU位置R292处的每个氨基酸突变独立地选自由以下项组成的组: R292D、R292E、R292L、R292P、R292Q、R292R、R292T和R292Y。

104. 如权利要求103所述的多肽,其中R292位置处的每个氨基酸突变是R292P。

105. 如权利要求78-104中任一项所述的多肽, 其中每个Fc结构域单体的所述铰链独立地包含选自以下项组成的组的氨基酸序列或由这些氨基酸序列组成: EPKSCDKTHTCPPCPAPELL和DKTHTCPPCPAPELL。

106. 如权利要求106所述的多肽, 其中所述第二Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体的所述铰链部分具有氨基酸序列DKTHTCPPCPAPELL。

107. 如权利要求106所述的多肽,其中所述第一Fc结构域单体的所述铰链部分具有氨基酸序列DKTHTCPPCPAPELL。

108. 如权利

要求106所述的多肽,其中所述第一Fc结构域单体、所述第二Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体的所述铰链部分具有氨基酸序列DKHTHCPPCPAPELL。

109. 如权利要求78-108中任一项所述的多肽,其中每个Fc结构域单体的所述CH2结构域独立地包含以下氨基酸序列:GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK,其具有不超过两个单一氨基酸缺失或置换。

110. 如权利要求78-108中任一项所述的多肽,其中每个Fc结构域单体的所述CH2结构域是相同的并且包含以下氨基酸序列:GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK,其具有不超过两

个单一氨基酸缺失或置换。

111. 如权利要求78-108中任一项所述的多肽, 其中每个Fc结构域单体的所述CH2结构域是相同的并且包含以下氨基酸序列:GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK, 其具有不超过两个单一氨基酸置换。

112. 如权利要求78-108中任一项所述的多肽, 其中每个Fc结构域单体的所述CH2结构域是相同的并且包含以下氨基酸序列:GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK。

113. 如权利要求78-108中任一项所述的多肽, 其中每个Fc结构域单体的所述CH3结构域独立地包含以下氨基酸序列:GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK

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

114. 如权利要求78-108中任一项所述的多肽, 其中每个Fc结构域单体的所述CH3结构域独立地包含以下氨基酸序列:GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK

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

115. 如权利要求78-108中任一项所述的多肽, 其中每个Fc结构域单体的所述CH3结构域独立地包含以下氨基酸序列:GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK

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

116. 如权利要求78-108中任一项所述的多肽, 其中每个Fc结构域单体的所述CH3结构域独立地包含以下氨基酸序列:GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK

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

117. 如权利要求109-116中任一项所述的多肽, 其中所述单一氨基酸置换选自以下项组成的组:S354C、T366Y、T366W、T394W、T394Y、F405W、F405A、Y407A、S354C、Y349T、T394F、K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R和D356K。

118. 如权利要求78-108中任一项所述的多肽, 其中每个所述Fc结构域单体独立地包含SEQ ID NO:42、43、45和47中任一者具有多至10个单一氨基酸置换的氨基酸序列。

119. 如权利要求118所述的多肽, 其中多至6个所述单一氨基酸置换是所述CH3结构域中的反向电荷突变或是形成工程化突起的突变。

120. 如权利要求118所述的多肽, 其中所述单一氨基酸置换在从EU位置G341到EU位置K447的序列内, 包括端点。

121. 如权利要求78所述的多肽, 其中至少一个所述形成工程化突起的突变选自以下项组成的组:S354C、T366Y、T366W、T394W、T394Y、F405W、S354C、Y349T和T394F。

122. 如权利要求78-91中任一项所述的多肽, 其中至少一个反向电荷突变选自:K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R和D356K。

123. 一种多肽复合物, 其包含与第二多肽连接的如权利要求78-122中任一项所述的多肽, 所述第二多肽包含IgG1 Fc结构域单体, 所述IgG1 Fc结构域单体包含铰链结构域、CH2

结构域和CH3结构域,其中所述多肽和所述第二多肽通过所述多肽的第一IgG1 Fc结构域单体、第二IgG1 Fc结构域单体或第三IgG1 Fc结构域单体的所述铰链结构域内的半胱氨酸残基与所述第二多肽的所述铰链结构域内的半胱氨酸残基之间的二硫键连接。

124.如权利要求123所述的多肽复合物,其中所述第二多肽单体包含形成工程化空腔的突变。

125.如权利要求124所述的多肽复合物,其中所述形成工程化空腔的突变选自以下项组成的组:Y407T、Y407A、F405A、T394S、T394W/Y407A、T366W/T394S、T366S/L368A/Y407V/Y349C、S364H/F405A。

126.如权利要求124所述的多肽复合物,其中所述第二多肽单体还包含至少一个反向电荷突变。

127.如权利要求126所述的多肽复合物,其中所述至少一个反向电荷突变选自:K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R和D356K。

128.如权利要求123-127中任一项所述的多肽复合物,其中所述多肽复合物还与第三多肽连接,所述第三多肽包含IgG1 Fc结构域单体,所述IgG1 Fc结构域单体包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域,其中所述多肽和所述第三多肽通过所述多肽的第一IgG1 Fc结构域单体、第二IgG1 Fc结构域单体或第三IgG1 Fc结构域单体的所述铰链结构域内的半胱氨酸残基与所述第三多肽的所述铰链结构域内的半胱氨酸残基之间的二硫键连接,其中所述第二多肽和所述第三多肽与所述多肽的不同IgG1 Fc结构域单体连接。

129.如权利要求128所述的多肽复合物,其中所述第三多肽单体包含至少两个反向电荷突变。

130.如权利要求129所述的多肽复合物,其中所述至少两个反向电荷突变选自:K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R和D356K。

131.如权利要求128所述的多肽,其中所述第二多肽单体包含选自以下项组成的组的至少一个反向电荷突变:K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R和D356K,并且所述第三多肽单体包含选自以下项组成的组的至少两个反向电荷突变:K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R和D356K,其中所述第二多肽单体和所述第三多肽单体包含不同的反向电荷突变。

132.如权利要求123-131中任一项所述的多肽复合物,其中所述第二多肽包含SEQ ID NO:42、43、45和47中任一者具有多至10个单一氨基酸置换的氨基酸序列。

133.如权利要求128-132中任一项所述的多肽复合物,其中所述第三多肽包含SEQ ID NO:42、43、45和47中任一者具有多至10个单一氨基酸置换的氨基酸序列。

134.如权利要求123-132中任一项所述的多肽复合物,其中所述多肽包含至少一个包含S354C和T366W突变的Fc单体和至少一个包含D356K和D399K突变的Fc单体。

135.如权利要求134所述的多肽复合物,其中所述至少一个包含S354C和T366W突变的Fc单体还包含E357K突变。

136.如权利要求128-130中任一项所述的多肽复合物,其中所述第二多肽单体包含Y349C、T366S、L368A和Y407V突变。

137.如权利要求136所述的多肽复合物,其中所述第二多肽还包含K370D突变。

138.如权利要求128-130中任一项所述的多肽复合物,其中所述第三多肽单体包含

K392D和K409D突变。

139. 如权利要求128-130中任一项所述的多肽复合物,其中所述第二多肽单体包含Y349C、T366S、L368A、Y407V和K370D突变,并且所述第三多肽单体包含K392D和K409D突变。

140. 如权利要求128-139中任一项所述的多肽复合物,其中所述第二多肽还包含抗原结合结构域。

141. 如权利要求128-139中任一项所述的多肽复合物,其中所述第三多肽还包含抗原结合结构域。

142. 如权利要求140或141所述的多肽复合物,其中所述抗原结合结构域包含抗体重链可变结构域。

143. 如权利要求140或141所述的多肽复合物,其中所述抗原结合结构域包含抗体轻链可变结构域。

144. 如权利要求140或141所述的多肽复合物,其中所述抗原结合结构域是scFv。

145. 如权利要求140或141所述的多肽复合物,其中所述抗原结合结构域包含VH结构域和CH1结构域。

146. 如权利要求145所述的多肽复合物,其中所述抗原结合结构域还包含VL结构域。

147. 如权利要求145所述的多肽复合物,其中所述VH结构域包含表1A和表1B中列出的一组CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列。

148. 如权利要求145所述的多肽复合物,其中所述VH结构域包含含有表2中列出的抗体的序列的VH结构域的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3。

149. 如权利要求145所述的多肽复合物,其中所述VH结构域包含表2中列出的抗体的VH序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,并且所述VH序列不包括所述CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列时与表2中列出的抗体的所述VH序列具有至少95%或98%的同一性。

150. 如权利要求145所述的多肽复合物,其中所述VH结构域包含表2中列出的抗体的VH序列。

151. 如权利要求145所述的多肽复合物,其中所述抗原结合结构域包含表1A和表1B中列出的一组CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列。

152. 如权利要求145所述的多肽复合物,其中所述抗原结合结构域包含来自表2中列出的抗体的一组VH和VL序列的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列。

153. 如权利要求145所述的多肽复合物,其中所述抗原结合结构域包含VH结构域和VL结构域,所述VH结构域包含表2中列出的抗体的VH序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,并且所述VL结构域包含表2中列出的抗体的VL序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,其中所述VH结构域和所述VL结构域序列不包括所述CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列时与表2中列出的抗体的所述VH序列和所述VL序列具有至少95%或98%的同一性。

154. 如权利要求145所述的多肽复合物,其中所述抗原结合结构域包含表2中列出的抗体的一组VH和VL序列。

155. 如权利要求140或141所述的多肽复合物,其中所述抗原结合结构域包含IgG CL抗体恒定结构域和IgG CH1抗体恒定结构域。

156. 如权利要求140或141所述的多肽复合物,其中所述抗原结合结构域包含VH结构域和CH1结构域,并且可以与包含VL结构域和CL结构域的多肽结合以形成Fab。

157. 如权利要求123-139中任一项所述的多肽复合物,其中所述第二多肽还包含第一抗原结合结构域,并且所述第三多肽还包含第二抗原结合结构域。

158. 如权利要求123-157中任一项所述的多肽复合物,其相对于具有单个Fc结构域和至少一个抗原结合结构域的多肽复合物在抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 测定、抗体依赖性细胞吞噬作用 (ADCP) 和/或补体依赖性细胞毒性 (CDC) 测定中包含增强的效应子功能。

159. 一种核酸分子,其编码如权利要求1-158中任一项所述的多肽。

160. 一种表达载体,其包含如权利要求159所述的核酸分子。

161. 一种宿主细胞,其包含如权利要求159所述的核酸分子。

162. 一种宿主细胞,其包含如权利要求160所述的表达载体。

163. 一种产生如权利要求1-158中任一项所述的多肽的方法,其包括在表达所述多肽的条件下培养如权利要求161或权利要求162所述的宿主细胞。

164. 如权利要求161所述的宿主细胞,其还包含编码包含抗体VL结构域的多肽的核酸分子。

165. 如权利要求162所述的宿主细胞,其还包含编码包含抗体VL结构域的多肽的核酸分子。

166. 如权利要求161所述的宿主细胞,其还包含编码包含抗体VL结构域和抗体CL结构域的多肽的核酸分子。

167. 如权利要求162所述的宿主细胞,其还包含编码包含抗体VL结构域和抗体CL结构域的多肽的核酸分子。

168. 如权利要求161所述的宿主细胞,其还包含编码包含具有不超过10个单一氨基酸突变的IgG1 Fc结构域单体的多肽的核酸分子。

169. 如权利要求162所述的宿主细胞,其还包含编码包含具有不超过10个单一氨基酸突变的IgG1 Fc结构域单体的多肽的核酸分子。

170. 如权利要求168或169所述的宿主细胞,其中所述IgG1 Fc结构域单体在所述CH3结构域中包含SEQ ID No:42、43、45和47中任一者具有不超过10、8、6或4个单一氨基酸突变的氨基酸序列。

171. 一种药物组合物,其包含如权利要求1-158中任一项所述的多肽。

172. 如权利要求171所述的药物组合物,其中少于40%、30%、20%、10%、5%、2%的所述多肽在Fc结构域单体上具有至少一个岩藻糖修饰。

173. 一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包含:

a) 第一多肽,其包含

i) 第一Fc结构域单体;

ii) 第二Fc结构域单体,

iii) 第三Fc结构域单体,

iii) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的接头;以及

iv) 连接所述第二Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体的接头;

b) 第二多肽,其包含第四Fc结构域单体;

c) 第三多肽,其包含第五Fc结构域单体;以及

d) 抗原结合结构域,其与所述第一多肽和所述第三多肽连接;

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

174. 如权利要求173所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述接头包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列或由这些氨基酸序列组成:

GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG、GGGS、GSG、SGG、SGS、SGSGS、SGSGSGS、SGSGSGSGS、
SGSGSGSGSGS、GSGGS、GSGGSGGS、GSGGSGGSGGS、GSG、GSG、GSGGGSG、GSGGGSGGGSGG
GSGGGGSGGGSGGGGS、GENLYFQSGG、SACYCELS、RSIAT、RPACKIPNDLKQKVMNH、GGSAGGSGSGSSG
GSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG、AAANSSIDLISVPVDSR、GSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGG
GS、GGGSGGGSGGGG、SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG、GSGGGSGGGSGGGSGGS、GGGG、GGGGGGGG、
GGGGGGGGGGGG和GGGGGGGGGGGGGGGGGG。

175. 如权利要求173所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体包含形成工程化突起的突变,并且所述第三Fc结构域单体包含至少两个反向电荷突变。

176. 如权利要求175所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体还包含至少一个反向电荷突变。

177. 如权利要求175和176所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述突变是单一氨基酸变化。

178. 如权利要求175和176所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中每个所述Fc结构域单体独立地包含SEQ ID NO:42、43、45和47中任一者具有多至10个单一氨基酸置换的氨基酸序列。

179. 如权利要求178所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中多至6个所述单一氨基酸置换是所述CH3结构域中的反向电荷突变或是形成工程化突起的突变。

180. 如权利要求179所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述单一氨基酸置换在从EU位置G341到EU位置K447的序列内,包括端点。

181. 如权利要求175和176所述的Fc-抗原结合结构域构建体, 其中至少一个所述形成工程化突起的突变选自以下项组成的组: S354C、T366Y、T366W、T394W、T394Y、F405W、S354C、Y349T和T394F。

182. 如权利要求175和176所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中至少一个反向电荷突变选自:K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R和D356K。

183. 如权利要求175-182中任一项所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体各自包含S354C、T366W和E357K突变,并且所述第三Fc结构域单体包含D356K和D399K突变。

184. 如权利要求175-183中任一项所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述第四Fc结构域单体包含Y349C、T366S、L368A、Y407V和K370D突变。

185. 如权利要求175-184中任一项所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述第五Fc结构域单体包含K392D和K409D突变。

186. 如权利要求173-185中任一项所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述抗原结合结构域是Fab。

所述第二Fc结构域单体各自包含形成工程化突起的突变,并且所述第三Fc结构域单体包含至少两个反向电荷突变。

198.如权利要求197所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体还包含至少一个反向电荷突变。

199.如权利要求197和198所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述突变是单一氨基酸变化。

200.如权利要求197和198所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中每个所述Fc结构域单体独立地包含SEQ ID NO:42、43、45和47中任一者具有多至10个单一氨基酸置换的氨基酸序列。

201.如权利要求200所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中多至6个所述单一氨基酸置换是所述CH3结构域中的反向电荷突变或是形成工程化突起的突变。

202.如权利要求201所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述单一氨基酸置换在从EU位置G341到EU位置K447的序列内,包括端点。

203.如权利要求197和198所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中至少一个所述形成工程化突起的突变选自以下项组成的组:S354C、T366Y、T366W、T394W、T394Y、F405W、S354C、Y349T和T394F。

204.如权利要求197和198所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中至少一个反向电荷突变选自:K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R和D356K。

205.如权利要求195-204中任一项所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体各自包含S354C、T366W和E357K突变,并且所述第三Fc结构域单体包含D356K和D399K突变。

206.如权利要求195-205中任一项所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述第四Fc结构域单体包含Y349C、T366S、L368A、Y407V和K370D突变。

207.如权利要求195-206中任一项所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述第五Fc结构域单体包含K392D和K409D突变。

208.如权利要求195-207中任一项所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述抗原结合结构域是Fab。

209.如权利要求195-207中任一项所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述抗原结合结构域是scFv。

210.如权利要求195-207中任一项所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述抗原结合结构域包含VH结构域和CH1结构域。

211.如权利要求210所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述抗原结合结构域还包含VL结构域。

212.如权利要求210所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述Fc-抗原结合结构域构建体包含第四多肽,所述第四多肽包含所述VL结构域。

213.如权利要求210所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述VH结构域包含表1A和表1B中列出的一组CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列。

214.如权利要求210所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述VH结构域包含含有表2中列出的抗体的序列的VH结构域的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3。

215. 如权利要求210所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述VH结构域包含表2中列出的抗体的VH序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,并且所述VH序列不包括所述CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列时与表2中列出的抗体的所述VH序列具有至少95%的同一性。

216. 如权利要求210所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述VH结构域包含表2中列出的抗体的VH序列。

217. 一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包含:

a) 第一多肽,其包含

i) 第一Fc结构域单体:

ii) 第二Fc结构域单体,

iii) 第三Fc结构域单体,

iii) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的接头; 以及

iv) 连接所述第二Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体的接头;

b) 第二多肽,其包含第四Fc结构域单体:

c) 第三多肽,其包含第五Fc结构域单体;以及

d) 抗原结合结构域, 其与所述第三多肽连接;

其中所述第一Fc结构域单体和所述第四Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域；

其中所述第二Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域;并且,

其中所述第三Fc结构域单体和所述第五Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域。

218. 如权利要求217所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述接头包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列或由这些氨基酸序列组成:

GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG、GGGS、GSGS、SGGS、GSGS、GSGSGS、GSGSGSGS、GSGSGSGSGS、
GSGSGSGSGSGS、GSGGS、GSGSGSGS、GSGSGSGSGS、GSGS、GSGS、GSGGGSG、GSGGGSGGGSGG
GSGGGSGGGSGGGGS、GENLYFQSGG、SACYCELS、RSIAT、RPACKIPNDLKQKVMNH、GGSAGGSGSGSSG
GSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG、AAANSSIDLISVPVDSR、GSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGG
GS、GGGSGGGSGGGS、SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG、GSGGGSGGGSGGGSGGS、GGGG、GGGGGGGG、
GGGGGGGGGGGG和GGGGGGGGGGGGGGGGGG。

219. 如权利要求217所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述第一Fc结构域单体包含形成工程化突起的突变,并且所述第二Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体各自包含至少两个反向电荷突变。

220. 如权利要求219所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述第一Fc结构域单体还包含至少一个反向电荷突变。

221. 如权利要求219和220所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述突变是单一氨基酸变化。

222. 如权利要求219和220所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中每个所述Fc结构域单体独立地包含SEQ ID NO:42、43、45和47中任一者具有多至10个单一氨基酸置换的氨基酸序列。

223. 如权利要求222所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中多至6个所述单一氨基酸置换是所述CH3结构域中的反向电荷突变或是形成工程化突起的突变。

224. 如权利要求223所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述单一氨基酸置换在从

EU位置G341到EU位置K447的序列内,包括端点。

225. 如权利要求219和220所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中至少一个所述形成工程化突起的突变选自以下项组成的组:S354C、T366Y、T366W、T394W、T394Y、F405W、S354C、Y349T和T394F。

226. 如权利要求219和220所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中至少一个反向电荷突变选自:K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R和D356K。

227. 如权利要求219-226中任一项所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述第一Fc结构域单体包含S354C、T366W和E357K突变,并且所述第二Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体各自包含D356K和D399K突变。

228. 如权利要求219-227中任一项所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述第四Fc结构域单体包含Y349C、T366S、L368A、Y407V和K370D突变。

229. 如权利要求219-228中任一项所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述第五Fc结构域单体包含K392D和K409D突变。

230. 如权利要求217-229中任一项所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述抗原结合结构域是Fab。

231. 如权利要求217-229中任一项所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述抗原结合结构域是scFv。

232. 如权利要求217-229中任一项所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述抗原结合结构域包含V_H结构域和C_H1结构域。

233. 如权利要求232所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述抗原结合结构域还包含V_L结构域。

234. 如权利要求232所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述Fc-抗原结合结构域构建体包含第四多肽,所述第四多肽包含所述V_L结构域。

235. 如权利要求232所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述V_H结构域包含表1A和表1B中列出的一组CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列。

236. 如权利要求232所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述V_H结构域包含含有表2中列出的抗体的序列的VH结构域的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3。

237. 如权利要求232所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述V_H结构域包含表2中列出的抗体的V_H序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,并且所述V_H序列不包括所述CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列时与表2中列出的抗体的所述V_H序列具有至少95%的同一性。

238. 如权利要求232所述的Fc-抗原结合结构域构建体,其中所述V_H结构域包含表2中列出的抗体的V_H序列。

239. 一种制造Fc-抗原结合结构域构建体的方法,所述方法包括:

a) 培养表达以下项的宿主细胞:

(1) 第一多肽,其包含

i) 第一Fc结构域单体;

ii) 第二Fc结构域单体,

iii) 第三Fc结构域单体,

iv) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的接头;

- v) 连接所述第二Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体的接头;
- (2) 第二多肽,其包含第四Fc结构域单体;
- (3) 第三多肽,其包含第五Fc结构域单体;以及
- (4) 抗原结合结构域;

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

其中所述抗原结合结构域与所述第一多肽和所述第三多肽连接,从而形成Fc-抗原结合结构域构建体;以及

- b) 从所述细胞培养上清液中纯化所述Fc-抗原结合结构域构建体。

240. 如权利要求239所述的方法,其中以摩尔为基础,所述细胞培养上清液中至少50%的所述Fc-抗原结合结构域构建体在结构上是相同的。

241. 一种制造Fc-抗原结合结构域构建体的方法,所述方法包括:

- a) 培养表达以下项的宿主细胞:

- (1) 第一多肽,其包含
 - i) 第一Fc结构域单体;
 - ii) 第二Fc结构域单体,
 - iii) 第三Fc结构域单体,
 - iv) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的接头;
- v) 连接所述第二Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体的接头;
- (2) 第二多肽,其包含第四Fc结构域单体;
- (3) 第三多肽,其包含第五Fc结构域单体;以及
- (4) 抗原结合结构域;

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

其中所述抗原结合结构域与所述第一多肽和所述第二多肽连接,从而形成Fc-抗原结合结构域构建体;以及

- b) 从所述细胞培养上清液中纯化所述Fc-抗原结合结构域构建体。

242. 如权利要求241所述的方法,其中以摩尔为基础,所述细胞培养上清液中至少50%的所述Fc-抗原结合结构域构建体在结构上是相同的。

243. 一种制造Fc-抗原结合结构域构建体的方法,所述方法包括:

- a) 培养表达以下项的宿主细胞:

- (1) 第一多肽,其包含
 - i) 第一Fc结构域单体;
 - ii) 第二Fc结构域单体,
 - iii) 第三Fc结构域单体,
 - iv) 连接所述第一Fc结构域单体和所述第二Fc结构域单体的接头;
- v) 连接所述第二Fc结构域单体和所述第三Fc结构域单体的接头;

- (2) 第二多肽,其包含第四Fc结构域单体;
- (3) 第三多肽,其包含第五Fc结构域单体;以及
- (4) 抗原结合结构域;

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

其中所述抗原结合结构域与所述第三多肽连接,从而形成Fc-抗原结合结构域构建体;以及

- b) 从所述细胞培养上清液中纯化所述Fc-抗原结合结构域构建体。

244. 如权利要求243所述的方法,其中以摩尔为基础,所述细胞培养上清液中至少50%的所述Fc-抗原结合结构域构建体在结构上是相同的。

与工程化Fc-抗原结合结构域构建体有关的组合物和方法

背景技术

[0001] 许多治疗性抗体通过Fc结构域的效应子功能(诸如抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)和补体依赖性细胞毒性(CDC))募集先天免疫系统的元件而发挥作用。一直需要改进的治疗性蛋白质。

发明内容

[0002] 本公开的特征在于用于将抗原结合结构域的靶特异性与至少两个Fc结构域组合以产生具有独特生物活性的新治疗剂的组合物和方法。本文所述的组合物和方法允许由多个多肽链构建具有多个抗原结合结构域和多个Fc结构域的蛋白质。可以调节抗原结合结构域的数量和间隔以改变蛋白质复合物对靶抗原的结合特性(例如,结合亲和力),并且可以调节Fc结构域的数量以控制效应子功能杀死抗原结合细胞的强度。将突变(即,如本文所述的异二聚和/或同二聚突变)引入多肽中,以减少产生的不期望的、可另选地组装的蛋白质的数量。在一些情况下,将异二聚化和/或同二聚化突变引入Fc结构域单体中,并且将差异突变的Fc结构域单体置于组装成蛋白质的不同多肽链之间,以便控制多肽链组装成期望的蛋白质结构。这些突变选择性地使某些Fc结构域单体的期望配对稳定,并且选择性地使其他Fc结构域单体的不期望配对不稳定。在一些情况下,Fc-抗原结合结构域构建体是由包含多个Fc结构域单体(其中至少两个Fc单体包含不同的异二聚化突变(因此在序列上彼此不同))的第一多肽(例如,较长多肽,具有两个或更多个具有不同异二聚化突变的Fc单体)和各自包含至少一个Fc单体的至少两个附加多肽(其中附加多肽的Fc单体包含彼此不同的异二聚化突变(因此包含不同的序列))(例如,两个较短多肽,各自包含单个具有不同异二聚化突变的Fc结构域单体)形成的“正交”Fc-抗原结合结构域构建体。附加多肽的异二聚化突变与第一多肽的至少Fc单体的异二聚化突变相容。

[0003] 在一些情况下,本公开设想将具有Fc结构域的治疗性蛋白质(例如,已知的治疗性抗体)的抗原结合结构域与至少两个Fc结构域组合以产生新型治疗性构建体。。为了产生此类构建体,本公开提供了用于组装具有至少两个(例如,多个)Fc结构域的构建体的各种方法,并且为了控制此类构建体的同二聚化和异二聚化,本公开提供了用于由有限数量的多肽链组装不同大小的分子的各种方法,所述多肽也是本公开的主题。这些构建体的特性允许有效产生基本上同质的药物组合物。药物组合物中的此类同质性是期望的,以便确保药物组合物的安全性、功效、均匀性和可靠性。在一些实施方案中,本文所述的具有至少两个Fc结构域的新型治疗性构建体具有比具有单个Fc结构域的治疗性蛋白质更大的生物活性。

[0004] 在第一方面,本公开的特征在于包括至少一个抗原结合结构域和通过接头与第二Fc结构域连接的第一Fc结构域的Fc-抗原结合结构域构建体。在一些实施方案中,Fc-抗原结合构建体包括增强的效应子功能,其中Fc-抗原结合结构域构建体包括至少一个抗原结合结构域和通过接头与第二Fc结构域连接的第一Fc结构域,其中Fc-抗原结合结构域构建体相对于具有单个Fc结构域和抗原结合结构域的构建体在抗体依赖性细胞毒性(ADCC)测定、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)测定中具有增强的效

GSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG、AAANSSIDLISVPVDSR、GSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGS、GGGSGGGSGGGGS、SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG、GSGGGSGGGSGGGSGGS、GGGG、GGGGGGGG、GGGGGGGGGGGG和GGGGGGGGGGGGGGGGGG。在一些实施方案中,第二接头和任选的第三接头是甘氨酸间隔物。在一些实施方案中,第二接头和任选的第三接头独立地由4至30、4至20、8至30、8至20、12至20或12至30个甘氨酸残基组成。在一些实施方案中,第二接头和任选的第三接头由20个甘氨酸残基组成。

[0016] 在一些实施方案中,至少一个Fc结构域单体在EU位置I253处包含单一氨基酸突变。在一些实施方案中,EU位置I253处的每个氨基酸突变独立地选自由以下项组成的组:I253A、I253C、I253D、I253E、I253F、I253G、I253H、I253I、I253K、I253L、I253M、I253N、I253P、I253Q、I253R、I253S、I253T、I253V、I253W和I253Y。在一些实施方案中,位置I253处的每个氨基酸突变是I253A。

[0017] 在一些实施方案中,至少一个Fc结构域单体在EU位置R292处包含单一氨基酸突变。在一些实施方案中,EU位置R292处的每个氨基酸突变独立地选自由以下项组成的组:R292D、R292E、R292L、R292P、R292Q、R292R、R292T和R292Y。在一些实施方案中,位置R292处的每个氨基酸突变是R292P。

[0018] 在一些实施方案中,每个Fc结构域单体的铰链独立地包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列或由这些氨基酸序列组成:EPKSCDKTHTCPPCPAPELL和DKTHTCPPCPAPELL。在一些实施方案中,第二Fc结构域单体和第三Fc结构域单体的铰链部分具有氨基酸序列DKTHTCPPCPAPELL。在一些实施方案中,第一Fc结构域单体的铰链部分具有氨基酸序列EPKSCDKTHTCPPCPAPEL。在一些实施方案中,第一Fc结构域单体的铰链部分具有氨基酸序列EPKSCDKTHTCPPCPAPEL,并且第二Fc结构域单体和第三Fc结构域单体的铰链部分具有氨基酸序列DKTHTCPPCPAPELL。

[0019] 在一些实施方案中,每个Fc结构域单体的CH2结构域独立地包含以下氨基酸序列:GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK,其具有不超过两个单一氨基酸缺失或置换。在一些实施方案中,每个Fc结构域单体的CH2结构域是相同的并且包含以下氨基酸序列:GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK,其具有不超过两个单一氨基酸缺失或置换。在一些实施方案中,每个Fc结构域单体的CH2结构域是相同的并且包含以下氨基酸序列:GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK,其具有不超过两个单一氨基酸置换。在一些实施方案中,每个Fc结构域单体的CH2结构域是相同的并且包含以下氨基酸序列:GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK。

[0020] 在一些实施方案中,每个Fc结构域单体的CH3结构域独立地包含以下氨基酸序列:GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK

[0021] LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG,其具有不超过10个单一氨基酸置换。在一些实施方案中,每个Fc结构域单体的CH3结构域独立地包含以下氨基酸序列:GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK

[0022] LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG,其具有不超过8个单一氨基酸置换。

在一些实施方案中,每个Fc结构域单体的CH3结构域独立地包含以下氨基酸序列:GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK

[0023] LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG,其具有不超过6个单一氨基酸置换。

在一些实施方案中,每个Fc结构域单体的CH3结构域独立地包含以下氨基酸序列:GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK

[0024] LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG,其具有不超过5个单一氨基酸置换。

[0025] 在一些实施方案中,单一氨基酸置换选自以下项组成的组:S354C、T366Y、T366W、T394W、T394Y、F405W、F405A、Y407A、S354C、Y349T、T394F、K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R和D356K。在一些实施方案中,每个Fc结构域单体独立地包含SEQ ID NO:42、43、45和47中任一者具有多至10个单一氨基酸置换的氨基酸序列。在一些实施方案中,多至6个单一氨基酸置换是CH3结构域中的反向电荷突变或是形成工程化突起的突变。在一些实施方案中,单一氨基酸置换在从Eu位置G341到Eu位置K447的序列内,包括端点。在一些实施方案中,至少一个形成工程化突起的突变选自以下项组成的组:S354C、T366Y、T366W、T394W、T394Y、F405W、F405A、Y407A、S354C、Y349T和T394F。在一些实施方案中,至少一个反向电荷突变选自:K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R和D356K。

[0026] 在一些实施方案中,抗原结合结构域是scFv。在一些实施方案中,抗原结合结构域包含VH结构域和CH1结构域。在一些实施方案中,抗原结合结构域还包含VL结构域。在一些实施方案中,VH结构域包含表1A和表1B中列出的一组CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列。在一些实施方案中,VH结构域包含含有表2中列出的抗体的序列的VH结构域的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3。在一些实施方案中,VH结构域包含表2中列出的抗体的VH序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,并且该VH序列不包括CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列时与表2中列出的抗体的VH序列具有至少95%或98%的同源性。在一些实施方案中,VH结构域包含表2中列出的抗体的VH序列。在一些实施方案中,抗原结合结构域包含表1A和表1B中列出的一组CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列。在一些实施方案中,抗原结合结构域包含来自表2中列出的抗体的一组VH和VL序列的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列。在一些实施方案中,抗原结合结构域包含VH结构域和VL结构域,该VH结构域包含表2中列出的抗体的VH序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,并且该VL结构域包含表2中列出的抗体的VL序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,其中VH结构域和VL结构域序列不包括CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列时与表2中列出的抗体的VH和VL序列具有至少95%或98%的同源性。在一些实施方案中,抗原结合结构域包含表2中列出的抗体的一组VH和VL序列。在一些实施方案中,抗原结合结构域包含IgG CL抗体恒定结构域和IgG CH1抗体恒定结构域。在一些实施方案中,抗原结合结构域包含VH结构域和CH1结构域,并且可以与包含VL结构域和CL结构域的多肽结合以形成Fab。

[0027] 在一些实施方案中,本公开涉及一种多肽复合物,该多肽复合物包含与第二多肽连接的任何前述多肽,该第二多肽包含IgG1 Fc结构域单体,该IgG1 Fc结构域单体包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域,其中多肽和第二多肽通过多肽的第一IgG1 Fc结构域单体、第二IgG1 Fc结构域单体或第三IgG1 Fc结构域单体的铰链结构域内的半胱氨酸残基与第二多肽的铰链结构域内的半胱氨酸残基之间的二硫键连接。在一些实施方案中,第二多

肽单体包含形成工程化空腔的突变。在一些实施方案中,形成工程化空腔的突变选自以下项组成的组:Y407T、Y407A、F405A、T394S、T394W/Y407A、T366W/T394S、T366S/L368A/Y407V/Y349C、S364H/F405A。在一些实施方案中,第二多肽单体还包含至少一个反向电荷突变。在一些实施方案中,至少一个反向电荷突变选自:K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R和D356K。

[0028] 在一些实施方案中,多肽复合物还与第三多肽连接,该第三多肽包含IgG1 Fc结构域单体,该IgG1 Fc结构域单体包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域,其中多肽和第三多肽通过多肽的第一IgG1 Fc结构域单体、第二IgG1 Fc结构域单体或第三IgG1 Fc结构域单体的铰链结构域内的半胱氨酸残基与第三多肽的铰链结构域内的半胱氨酸残基之间的二硫键连接,其中第二多肽和第三多肽与多肽的不同IgG1 Fc结构域单体连接。在一些实施方案中,第三多肽单体包含至少两个反向电荷突变。在一些实施方案中,至少两个反向电荷突变选自:K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R和D356K。

[0029] 在一些实施方案中,第二多肽单体包含选自以下项组成的组的至少一个反向电荷突变:K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R和D356K,并且第三多肽单体包含选自以下项组成的组的至少两个反向电荷突变:K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R和D356K,其中第二多肽单体和第三多肽单体包含不同的反向电荷突变。

[0030] 在一些实施方案中,第二多肽包含SEQ ID NO:42、43、45和47中任一者具有多至10个单一氨基酸置换的氨基酸序列。在一些实施方案中,第三多肽包含SEQ ID NO:42、43、45和47中任一者具有多至10个单一氨基酸置换的氨基酸序列。

[0031] 在一些实施方案中,该多肽包含至少一个包含S354C和T366W突变的Fc单体和至少一个包含D356K和D399K突变的Fc单体。在一些实施方案中,至少一个包含S354C和T366W突变的Fc单体还包含E357K突变。在一些实施方案中,第二多肽单体包含Y349C、T366S、L368A和Y407V突变。在一些实施方案中,第二多肽还包含K370D突变。在一些实施方案中,第三多肽单体包含K392D和K409D突变。在一些实施方案中,第二多肽单体包含Y349C、T366S、L368A、Y407V和K370D突变,并且第三多肽单体包含K392D和K409D突变。

[0032] 在一些实施方案中,多肽复合物相对于具有单个Fc结构域和至少一个抗原结合结构域的多肽复合物在抗体依赖性细胞毒性(ADCC)测定、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)测定中包含增强的效应子功能。

[0033] 在另一方面,本发明涉及一种多肽,该多肽包含:第一IgG1 Fc结构域单体,其包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域;第一接头;第二IgG1 Fc结构域单体,其包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域;任选的第二接头;以及任选的第三IgG1 Fc结构域单体,其包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域,其中至少一个Fc结构域单体包含形成工程化突起的突变,并且其中至少一个其他Fc结构域单体包含至少一个、两个或三个反向电荷突变。

[0034] 在一些实施方案中,第一IgG1 Fc结构域单体包含形成工程化突起的突变,并且第二IgG1 Fc结构域单体包含至少两个反向电荷突变。在一些实施方案中,第一IgG1 Fc结构域单体包含至少两个反向电荷突变,并且第二IgG1 Fc结构域单体包含形成工程化突起的突变。在一些实施方案中,第一IgG1 Fc结构域单体和第二IgG1 Fc结构域单体均包含形成工程化突起的突变。在一些实施方案中,第一IgG1 Fc结构域单体和第二IgG1 Fc结构域单

R292D、R292E、R292L、R292P、R292Q、R292R、R292T和R292Y。在一些实施方案中，位置R292处的每个氨基酸突变是R292P。

[0045] 在一些实施方案中，每个Fc结构域单体的铰链独立地包含选自以下项组成的组的氨基酸序列或由这些氨基酸序列组成：EPKSCDKTHTCPPCPAPELL和DKTHTCPPCPAPELL。在一些实施方案中，第二Fc结构域单体和第三Fc结构域单体的铰链部分具有氨基酸序列DKTHTCPPCPAPELL。在一些实施方案中，第一Fc结构域单体的铰链部分具有氨基酸序列DKTHTCPPCPAPELL。在一些实施方案中，第一Fc结构域单体、第二Fc结构域单体和第三Fc结构域单体的铰链部分具有氨基酸序列DKTHTCPPCPAPELL。

[0046] 在一些实施方案中，每个Fc结构域单体的CH2结构域独立地包含以下氨基酸序列：GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK，其具有不超过两个单一氨基酸缺失或置换。在一些实施方案中，每个Fc结构域单体的CH2结构域是相同的并且包含以下氨基酸序列：GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK，其具有不超过两个单一氨基酸缺失或置换。在一些实施方案中，每个Fc结构域单体的CH2结构域是相同的并且包含以下氨基酸序列：GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK，其具有不超过两个单一氨基酸置换。在一些实施方案中，每个Fc结构域单体的CH2结构域是相同的并且包含以下氨基酸序列：GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK。

[0047] 在一些实施方案中，每个Fc结构域单体的CH3结构域独立地包含以下氨基酸序列：GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSK

[0048] LTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG，其具有不超过10个单一氨基酸置换。在一些实施方案中，每个Fc结构域单体的CH3结构域独立地包含以下氨基酸序列：GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSK

[0049] LTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG，其具有不超过8个单一氨基酸置换。在一些实施方案中，每个Fc结构域单体的CH3结构域独立地包含以下氨基酸序列：GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSK

[0050] LTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG，其具有不超过6个单一氨基酸置换。在一些实施方案中，每个Fc结构域单体的CH3结构域独立地包含以下氨基酸序列：GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSK

[0051] LTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG，其具有不超过5个单一氨基酸置换。

[0052] 在一些实施方案中，单一氨基酸置换选自以下项组成的组：S354C、T366Y、T366W、T394W、T394Y、F405W、F405A、Y407A、S354C、Y349T、T394F、K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R和D356K。在一些实施方案中，每个Fc结构域单体独立地包含SEQ ID NO: 42、43、45和47中任一者具有多至10个单一氨基酸置换的氨基酸序列。在一些实施方案中，多至6个单一氨基酸置换是CH3结构域中的反向电荷突变或是形成工程化突起的突变。在一些实施方案中，单一氨基酸置换在从Eu位置G341到Eu位置K447的序列内，包括端点。在一些实施方案中，至少一个形成工程化突起的突变选自以下项组成的组：S354C、T366Y、T366W、T394W、T394Y、F405W、F405A、Y407A、S354C、Y349T和

T394F。在一些实施方案中,至少一个反向电荷突变选自:K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R和D356K。

[0053] 在一些实施方案中,本公开涉及一种多肽复合物,该多肽复合物包含与第二多肽连接的任何前述多肽,该第二多肽包含IgG1 Fc结构域单体,该IgG1 Fc结构域单体包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域,其中多肽和第二多肽通过多肽的第一IgG1 Fc结构域单体、第二IgG1 Fc结构域单体或第三IgG1 Fc结构域单体的铰链结构域内的半胱氨酸残基与第二多肽的铰链结构域内的半胱氨酸残基之间的二硫键连接。

[0054] 在一些实施方案中,第二多肽单体包含形成工程化空腔的突变。在一些实施方案中,形成工程化空腔的突变选自由以下项组成的组:Y407T、Y407A、F405A、T394S、T394W/Y407A、T366W/T394S、T366S/L368A/Y407V/Y349C、S364H/F405A。在一些实施方案中,第二多肽单体还包含至少一个反向电荷突变。在一些实施方案中,至少一个反向电荷突变选自:K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R和D356K。

[0055] 在一些实施方案中,多肽复合物还与第三多肽连接,该第三多肽包含IgG1 Fc结构域单体,该IgG1 Fc结构域单体包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域,其中多肽和第三多肽通过多肽的第一IgG1 Fc结构域单体、第二IgG1 Fc结构域单体或第三IgG1 Fc结构域单体的铰链结构域内的半胱氨酸残基与第三多肽的铰链结构域内的半胱氨酸残基之间的二硫键连接,其中第二多肽和第三多肽与多肽的不同IgG1 Fc结构域单体连接。

[0056] 在一些实施方案中,第三多肽单体包含至少两个反向电荷突变。在一些实施方案中,至少两个反向电荷突变选自:K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R和D356K。

[0057] 在一些实施方案中,第二多肽单体包含选自由以下项组成的组的至少一个反向电荷突变:K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R和D356K,并且第三多肽单体包含选自由以下项组成的组的至少两个反向电荷突变:K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R和D356K,其中第二多肽单体和第三多肽单体包含不同的反向电荷突变。

[0058] 在一些实施方案中,第二多肽包含SEQ ID NO:42、43、45和47中任一者具有多至10个单一氨基酸置换的氨基酸序列。在一些实施方案中,第三多肽包含SEQ ID NO:42、43、45和47中任一者具有多至10个单一氨基酸置换的氨基酸序列。

[0059] 在一些实施方案中,该多肽包含至少一个包含S354C和T366W突变的Fc单体和至少一个包含D356K和D399K突变的Fc单体。在一些实施方案中,至少一个包含S354C和T366W突变的Fc单体还包含E357K突变。在一些实施方案中,第二多肽单体包含Y349C、T366S、L368A和Y407V突变。在一些实施方案中,第二多肽还包含K370D突变。在一些实施方案中,第三多肽单体包含K392D和K409D突变。在一些实施方案中,第二多肽单体包含Y349C、T366S、L368A、Y407V和K370D突变,并且第三多肽单体包含K392D和K409D突变。

[0060] 在一些实施方案中,第二多肽还包含抗原结合结构域。在一些实施方案中,第三多肽还包含抗原结合结构域。在一些实施方案中,抗原结合结构域包含抗体重链可变结构域。在一些实施方案中,抗原结合结构域包含抗体轻链可变结构域。在一些实施方案中,抗原结合结构域是scFv。在一些实施方案中,抗原结合结构域包含VH结构域和CH1结构域。在一些实施方案中,抗原结合结构域还包含VL结构域。在一些实施方案中,VH结构域包含表1A和表

1B中列出的一组CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列。在一些实施方案中，VH结构域包含含有表2中列出的抗体的序列的VH结构域的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3。在一些实施方案中，VH结构域包含表2中列出的抗体的VH序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3，并且该VH序列不包括CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列时与表2中列出的抗体的VH序列具有至少95%或98%的同一性。在一些实施方案中，VH结构域包含表2中列出的抗体的VH序列。在一些实施方案中，抗原结合结构域包含表1A和表1B中列出的一组CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列。在一些实施方案中，抗原结合结构域包含来自表2中列出的抗体的一组VH和VL序列的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列。在一些实施方案中，抗原结合结构域包含VH结构域和VL结构域，该VH结构域包含表2中列出的抗体的VH序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3，并且该VL结构域包含表2中列出的抗体的VL序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3，其中VH结构域和VL结构域序列不包括CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列时与表2中列出的抗体的VH和VL序列具有至少95%或98%的同一性。在一些实施方案中，抗原结合结构域包含表2中列出的抗体的一组VH和VL序列。在一些实施方案中，抗原结合结构域包含IgG CL抗体恒定结构域和IgG CH1抗体恒定结构域。在一些实施方案中，抗原结合结构域包含VH结构域和CH1结构域，并且可以与包含VL结构域和CL结构域的多肽结合以形成Fab。在一些实施方案中，第二多肽还包含第一抗原结合结构域，并且第三多肽还包含第二抗原结合结构域。

[0061] 在一些实施方案中，多肽复合物相对于具有单个Fc结构域和至少一个抗原结合结构域的多肽复合物在抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 测定、抗体依赖性细胞吞噬作用 (ADCP) 和/或补体依赖性细胞毒性 (CDC) 测定中包含增强的效应子功能。

[0062] 在另一方面，本公开涉及一种核酸分子，其编码任何前述多肽。

[0063] 在另一方面，本公开涉及一种表达载体，其包含该核酸分子。

[0064] 在另一方面，本公开涉及一种宿主细胞，其包含该核酸分子。

[0065] 在另一方面，本公开涉及一种宿主细胞，其包含该表达载体。

[0066] 在另一方面，本公开涉及一种产生任何前述多肽的方法，其包括在表达该多肽的条件下培养前述实施方案的宿主细胞。

[0067] 在一些实施方案中，该宿主细胞还包含编码包含抗体VL结构域的多肽的核酸分子。在一些实施方案中，该宿主细胞还包含编码包含抗体VL结构域的多肽的核酸分子。在一些实施方案中，该宿主细胞还包含编码包含抗体VL结构域和抗体CL结构域的多肽的核酸分子。在一些实施方案中，该宿主细胞还包含编码包含抗体VL结构域和抗体CL结构域的多肽的核酸分子。在一些实施方案中，该宿主细胞还包含编码具有不超过10个单一氨基酸突变的IgG1 Fc结构域单体的多肽的核酸分子。在一些实施方案中，该宿主细胞还包含编码包含具有不超过10个单一氨基酸突变的IgG1 Fc结构域单体的多肽的核酸分子。在一些实施方案中，IgG1 Fc结构域单体在CH3结构域中包含SEQ ID No: 42、43、45和47中任一者具有不超过10、8、6或4个单一氨基酸突变的氨基酸序列。

[0068] 在另一方面，本公开涉及一种药物组合物，其包含任何前述多肽。

[0069] 在一些实施方案中，该药物组合物的少于40%、30%、20%、10%、5%、2%的多肽在Fc结构域单体上具有至少一个岩藻糖修饰。

[0070] 在另一方面，本公开涉及一种Fc-抗原结合结构域构建体，其包含：

[0078] 在另一方面,本公开涉及一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包含:a)第一多肽,其包含i)第一Fc结构域单体,ii)第二Fc结构域单体,iii)第三Fc结构域单体,iii)连接第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的接头;以及iv)连接第二Fc结构域单体和第三Fc结构域单体的接头;b)第二多肽,其包含第四Fc结构域单体;c)第三多肽,其包含第五Fc结构域单体;以及d)抗原结合结构域,其与第一多肽和第二多肽连接;其中第一Fc结构域单体和第四Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域;其中第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域;并且其中第三Fc结构域单体和第五Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域。

[illegible]

[0080] 在一些实施方案中,第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体各自包含形成工程化突起的突变,并且第三Fc结构域单体包含至少两个反向电荷突变。在一些实施方案中,第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体还包含至少一个反向电荷突变。

[0081] 在一些实施方案中,突变是单一氨基酸变化。在一些实施方案中,每个Fc结构域单体独立地包含SEQ ID NO:42、43、45和47中任一者具有多至10个单一氨基酸置换的氨基酸序列。在一些实施方案中,多至6个单一氨基酸置换是CH3结构域中的反向电荷突变或是形成工程化突起的突变。在一些实施方案中,单一氨基酸置换在从EU位置G341到EU位置K447的序列内,包括端点。

[0082] 在一些实施方案中,至少一个形成工程化突起的突变选自由以下项组成的组:S354C、T366Y、T366W、T394W、T394Y、F405W、F405A、Y407A、S354C、Y349T和T394F。在一些实施方案中,至少一个反向电荷突变选自:K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R和D356K。在一些实施方案中,第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体各自包含S354C、T366W和E357K突变,并且第三Fc结构域单体包含D356K和D399K突变。在一些实施方案中,第四Fc结构域单体包含Y349C、T366S、L368A、Y407V和K370D突变。在一些实施方案中,第五Fc结构域单体包含K392D和K409D突变。

[0083] 在一些实施方案中,抗原结合结构域是Fab。在一些实施方案中,抗原结合结构域是scFv。在一些实施方案中,抗原结合结构域包含VH结构域和CH1结构域。在一些实施方案中,抗原结合结构域还包含VL结构域。在一些实施方案中,Fc-抗原结合结构域构建体包含第四多肽,该第四多肽包含VL结构域。在一些实施方案中,VH结构域包含表1A和表1B中列出的一组CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列。在一些实施方案中,VH结构域包含含有表2中列出的抗体的序列的VH结构域的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3。在一些实施方案中,VH结构域包含表2中列出的抗体的VH序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,并且该VH序列不包括CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列时与表2中列出的抗体的VH序列具有至少95%的同一性。在一些实施方案中,VH结构域包含表2中列出的抗体的VH序列。

[0084] 在另一方面,本公开涉及一种Fc-抗原结合结构域构建体,其包含:a)第一多肽,其包含i)第一Fc结构域单体,ii)第二Fc结构域单体,iii)第三Fc结构域单体,iv)连接第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的接头;以及v)连接第二Fc结构域单体和第三Fc结构域单体的接头;b)第二多肽,其包含第四Fc结构域单体;c)第三多肽,其包含第五Fc结构域单体;以及d)抗原结合结构域,其与第三多肽连接;其中第一Fc结构域单体和第四Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域;其中第二Fc结构域单体和第五Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域;并且其中第三Fc结构域单体和第五Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域。

[illegible]

[0086] 在一些实施方案中,第一Fc结构域单体包含形成工程化突起的突变,并且第二Fc结构域单体和第三Fc结构域单体各自包含至少两个反向电荷突变。在一些实施方案中,第一Fc结构域单体还包含至少一个反向电荷突变。

[0087] 在一些实施方案中,突变是单一氨基酸变化。在一些实施方案中,每个Fc结构域单体独立地包含SEQ ID NO:42、43、45和47中任一者具有多至10个单一氨基酸置换的氨基酸序列。在一些实施方案中,多至6个单一氨基酸置换是CH3结构域中的反向电荷突变或是形成工程化突起的突变。在一些实施方案中,单一氨基酸置换在从EU位置G341到EU位置K447的序列内,包括端点。

[0088] 在一些实施方案中,至少一个形成工程化突起的突变选自由以下项组成的组:S354C、T366Y、T366W、T394W、T394Y、F405W、F405A、Y407A、S354C、Y349T和T394F。在一些实施方案中,至少一个反向电荷突变选自:K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R和D356K。在一些实施方案中,第一Fc结构域单体包含S354C、T366W和E357K突变,并且第二Fc结构域单体和第三Fc结构域单体各自包含D356K和D399K突变。在一些实施方案中,第四Fc结构域单体包含Y349C、T366S、L368A、Y407V和K370D突变。在一些实施方案中,第五Fc结构域单体包含K392D和K409D突变。

[0089] 在一些实施方案中,抗原结合结构域是Fab。在一些实施方案中,抗原结合结构域是scFv。在一些实施方案中,抗原结合结构域包含V_H结构域和C_H1结构域。在一些实施方案中,抗原结合结构域还包含V_L结构域。在一些实施方案中,Fc-抗原结合结构域构建体包含第四多肽,该第四多肽包含V_L结构域。在一些实施方案中,V_H结构域包含表1A和表1B中列出的一组CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列。在一些实施方案中,V_H结构域包含含有表2中列出的抗体的序列的VH结构域的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3。在一些实施方案中,V_H结构域包含表2中列出的抗体的V_H序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,并且该V_H序列不包括CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列时与表2中列出的抗体的V_H序列具有至少95%的同一性。在一些实施方案中,V_H结构域包含表2中列出的抗体的V_H序列。

[0090] 在另一方面,本公开涉及一种制造Fc-抗原结合结构域构建体的方法,该方法包

括:a)培养表达以下项的宿主细胞:(1)第一多肽,其包含i)第一Fc结构域单体,ii)第二Fc结构域单体,iii)第三Fc结构域单体,iv)连接第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的接头;v)连接第二Fc结构域单体和第三Fc结构域单体的接头;(2)第二多肽,其包含第四Fc结构域单体;(3)第三多肽,其包含第五Fc结构域单体;以及(4)抗原结合结构域;其中第一Fc结构域单体和第四Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,并且第三Fc结构域单体和第五Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域;其中抗原结合结构域与第一多肽和第三多肽连接,从而形成Fc-抗原结合结构域构建体;以及b)从细胞培养上清液中纯化Fc-抗原结合结构域构建体。

[0091] 在一些实施方案中,以摩尔为基础,细胞培养上清液中至少50%的Fc-抗原结合结构域构建体在结构上是相同的。

[0092] 在另一方面,本公开涉及一种制造Fc-抗原结合结构域构建体的方法,该方法包括:a)培养表达以下项的宿主细胞:(1)第一多肽,其包含i)第一Fc结构域单体,ii)第二Fc结构域单体,iii)第三Fc结构域单体,iv)连接第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的接头;v)连接第二Fc结构域单体和第三Fc结构域单体的接头;(2)第二多肽,其包含第四Fc结构域单体;(3)第三多肽,其包含第五Fc结构域单体;以及(4)抗原结合结构域;其中第一Fc结构域单体和第四Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,第二Fc结构域单体和第四Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,并且第三Fc结构域单体和第五Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域;其中抗原结合结构域与第一多肽和第二多肽连接,从而形成Fc-抗原结合结构域构建体;以及b)从细胞培养上清液中纯化Fc-抗原结合结构域构建体。

[0093] 在一些实施方案中,以摩尔为基础,细胞培养上清液中至少50%的Fc-抗原结合结构域构建体在结构上是相同的。

[0094] 在另一方面,本公开涉及一种制造Fc-抗原结合结构域构建体的方法,该方法包括:a)培养表达以下项的宿主细胞:(1)第一多肽,其包含i)第一Fc结构域单体,ii)第二Fc结构域单体,iii)第三Fc结构域单体,iv)连接第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体的接头;v)连接第二Fc结构域单体和第三Fc结构域单体的接头;(2)第二多肽,其包含第四Fc结构域单体;(3)第三多肽,其包含第五Fc结构域单体;以及(4)抗原结合结构域;其中第一Fc结构域单体和第四Fc结构域单体组合以形成第一Fc结构域,第二Fc结构域单体和第五Fc结构域单体组合以形成第二Fc结构域,并且第三Fc结构域单体和第五Fc结构域单体组合以形成第三Fc结构域;其中抗原结合结构域与第三多肽连接,从而形成Fc-抗原结合结构域构建体;以及b)从细胞培养上清液中纯化Fc-抗原结合结构域构建体。

[0095] 在一些实施方案中,以摩尔为基础,细胞培养上清液中至少50%的Fc-抗原结合结构域构建体在结构上是相同的。

[0096] 在本公开的所有方面,一些或全部Fc结构域单体(例如,包含SEQ ID No:42、43、45和47中任一者具有不超过10、8、6或4个单一氨基酸置换(例如,仅在CH3域中)的氨基酸序列的Fc结构域单体)除了具有其他氨基酸置换或修饰之外,还可以具有E345K和E43G氨基酸置换中的一者或两者。E345K和E43G氨基酸置换可以增加Fc结构域多聚化。

[0097] 定义:

[0098] 如本文所用,术语“Fc结构域单体”是指包括至少铰链结构域以及第二抗体恒定结构域和第三抗体恒定结构域(C_H2和C_H3)或它们的功能片段(例如,至少铰链结构域或其功能

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

[0099] 如本文所用,术语“Fc结构域”是指能够结合Fc受体的两个Fc结构域单体的二聚体。在野生型Fc结构域中,两个Fc结构域单体通过两个C_H3抗体恒定结构域之间的相互作用以及在两个二聚化Fc结构域单体的铰链结构域之间形成的一个或多个二硫键而二聚化。

[0100] 在本公开中,术语“Fc-抗原结合结构域构建体”是指形成至少两个如本文所述的Fc结构域并且包括至少一个“抗原结合结构域”的缔合多肽链。本文所述的Fc-抗原结合结构域构建体可以包括具有相同或不同序列的Fc结构域单体。例如,Fc-抗原结合结构域构建体可以具有三个Fc结构域,其中两个包括IgG1或IgG1衍生的Fc结构域单体,并且第三个包括IgG2或IgG2衍生的Fc结构域单体。在另一个非限制性实例中,Fc-抗原结合结构域构建体可以具有三个Fc结构域,其中两个包括“突起-进入-空腔对”(也称为“旋钮-进入-孔洞对”),并且第三个不包括“突起-进入-空腔对”,例如,第三Fc结构域包括一个或多个静电转向突变而不是突起-进入-空腔对,或者第三Fc结构域具有野生型序列(即,不包括突变)。Fc结构域形成与Fc受体(例如,Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIa、Fc γ RIIIb或Fc γ RIV)结合的最小结构。在一些情况下,Fc-抗原结合结构域构建体是通过将包含多个Fc结构域单体(其中至少两个Fc单体包含不同的异二聚化突变(即,Fc单体各自具有不同的突起形

成突变或各自具有不同的静电转向突变,或者一个单体具有突起形成突变,而一个单体具有静电转向突变))的第一多肽与各自包含至少一个Fc单体的至少两个附加多肽(其中附加多肽的Fc单体包含彼此不同的异二聚化突变(即,附加多肽的Fc单体具有不同的突起形成突变或具有不同的静电转向突变,或者一个单体具有突起形成突变,而一个单体具有静电转向突变))连接而形成的“正交”Fc-抗原结合结构域构建体。附加多肽的异二聚化突变与第一多肽的至少Fc单体的异二聚化突变相容地缔合。

[0101] 如本文所用,术语“抗原结合结构域”是指能够特异性结合靶分子的肽、多肽或一组缔合多肽。在一些实施方案中,“抗原结合结构域”是抗体的与抗体所结合的抗原特异性结合的最小序列。表面等离子共振 (SPR) 或本领域已知的各种免疫测定 (例如,Western印迹或ELISA) 可以用于评估抗体对抗原的特异性。在一些实施方案中,“抗原结合结构域”包括抗体的可变结构域或互补决定区 (CDR),例如表1中列出的抗体的一个或多个CDR、表2中列出的抗体的一个或多个CDR或者表2中列出的抗体的VH和/或VL结构域。在一些实施方案中,CD38结合结构域可以包括VH结构域和CH1结构域,任选地具有VL结构域。在其他实施方案中,抗原(例如,CD38)结合结构域是抗体或scFv的Fab片段。因此,CD38结合结构域可以包括包含VH结构域和CH1结构域或由这些结构域组成的“CD38重链结合结构域”以及包含VL结构域和CL结构域或由这些结构域组成的“CD38轻链结合结构域”。CD38结合结构域也可以是特异性结合靶标的合成工程化肽,诸如基于纤连蛋白的结合蛋白(例如,纤连蛋白III型结构域(FN3)单体)。

[0102] 如本文所用,术语“互补决定区”(CDR)是指抗体可变结构域的氨基酸残基,其存在对于抗原结合是必需的。每个可变结构域通常具有三个CDR区,被标识为CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,以及CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3。每个互补决定区可包括来自由Kabat定义的“互补决定区”的氨基酸残基(即,大约轻链可变结构域中的残基24-34(CDR-L1)、50-56(CDR-L2)和89-97(CDR-L3)以及重链可变结构域中的残基31-35(CDR-H1)、50-65(CDR-H2)和95-102(CDR-H3);Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991))和/或来自“高变环”的那些残基(即,大约轻链可变结构域中的残基26-32(CDR-L1)、50-52(CDR-L2)和91-96(CDR-L3)以及重链可变结构域中的残基26-32(CDR-H1)、53-55(CDR-H2)和96-101(CDR-H3);Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917(1987))。在一些情况下,互补决定区可以包括来自根据Kabat定义的CDR区以及高变环两者的氨基酸。

[0103] “骨架区”(下文称为FR)是除CDR残基以外的那些可变结构域残基。每个可变结构域通常具有四个FR,被标识为FR1、FR2、FR3和FR4。如果CDR是根据Kabat定义的,则轻链FR残基位于大约残基1-23(LCFR1)、35-49(LCFR2)、57-88(LCFR3)和98-107(LCFR4)处,并且重链FR残基位于大约重链残基中的残基1-30(HCFR1)、36-49(HCFR2)、66-94(HCFR3)和103-113(HCFR4)处。如果CDR包含来自高变环的氨基酸残基,则轻链FR残基位于大约轻链中的残基1-25(LCFR1)、33-49(LCFR2)、53-90(LCFR3)和97-107(LCFR4)处,并且重链FR残基位于大约重链残基中的残基1-25(HCFR1)、33-52(HCFR2)、56-95(HCFR3)和102-113(HCFR4)处。在一些情况下,当CDR包括来自如由Kabat定义的CDR以及高变环的CDR两者的氨基酸时,将相应地调节FR残基。

[0104] “Fv”片段是包含完整抗原识别和结合位点的抗体片段。该区域由紧密缔合的一个

重链可变结构域和一个轻链可变结构域的二聚体组成,该二聚体在性质上可以是共价的,例如在scFv中。在这种构型中,每个可变结构域的三个CDR相互作用以在 V_H - V_L 二聚体的表面上限定抗原结合位点。

[0105] “Fab”片段包含轻链的可变结构域和恒定结构域以及重链的可变结构域和第一恒定结构域(C_H1)。F(ab')₂抗体片段包括一对Fab片段,它们通常在其羧基末端附近通过铰链半胱氨酸共价连接。

[0106] “单链Fv”或“scFv”抗体片段在单个多肽链中包括抗体的 V_H 和 V_L 结构域。通常,scFv多肽还包括在 V_H 与 V_L 结构域之间的多肽接头,该接头使得scFv能够形成抗原结合所需的结构。

[0107] 如本文所用,术语“抗体恒定结构域”是指对应于抗体的恒定区结构域的多肽(例如, C_L 抗体恒定结构域、 C_H1 抗体恒定结构域、 C_H2 抗体恒定结构域或 C_H3 抗体恒定结构域)。

[0108] 如本文所用,术语“促进”意指支持且有利于,例如有利于由彼此的结合亲和力比其他不同的Fc结构域单体更高的两个Fc结构域单体形成Fc结构域。如本文所述,组合以形成Fc结构域的两个Fc结构域单体可以在其各自的 C_H3 抗体恒定结构域的界面处具有相容氨基酸修饰(例如,工程化突起和工程化空腔,以及/或者静电转向突变)。相容氨基酸修饰促进或有利于此类Fc结构域单体相对于与缺乏此类氨基酸修饰或具有不相容氨基酸修饰的其他Fc结构域单体彼此的选择性相互作用。这是因为,由于两个相互作用的 C_H3 抗体恒定结构域的界面处的氨基酸修饰,Fc结构域单体对彼此的亲和力比对缺乏氨基酸修饰的其他Fc结构域单体更高。

[0109] 如本文所用,术语“二聚化选择性模块”是指Fc结构域单体的促进两个Fc结构域单体之间的有利配对的序列。“互补”二聚化选择性模块是促进或有利于两个Fc结构域单体彼此的选择性相互作用的二聚化选择性模块。互补二聚化选择性模块可以具有相同或不同的序列。本文描述了示例性互补二聚化选择性模块,并且可以包括选自表3的工程化突起形成和空腔形成突变或表4的静电转向突变的互补突变。

[0110] 如本文所用,术语“工程化空腔”是指用侧链体积比原始氨基酸残基更小的不同氨基酸残基置换 C_H3 抗体恒定结构域中的至少一个原始氨基酸残基,从而在 C_H3 抗体恒定结构域中产生三维空腔。术语“原始氨基酸残基”是指由野生型 C_H3 抗体恒定结构域的遗传密码编码的天然存在的氨基酸残基。可以通过例如表3的任何一个或多个空腔形成置换突变来形成工程化空腔。

[0111] 如本文所用,术语“工程化突起”是指用侧链体积比原始氨基酸残基更大的不同氨基酸残基置换 C_H3 抗体恒定结构域中的至少一个原始氨基酸残基,从而在 C_H3 抗体恒定结构域中产生三维突起。术语“原始氨基酸残基”是指由野生型 C_H3 抗体恒定结构域的遗传密码编码的天然存在的氨基酸残基。可以通过例如表3的任何一个或多个突起形成置换突变来形成工程化突起。

[0112] 如本文所用,术语“突起-进入-空腔对”描述了包括两个Fc结构域单体的Fc结构域,其中第一Fc结构域单体在其 C_H3 抗体恒定结构域中包括工程化空腔,而第二Fc结构域单体在其 C_H3 抗体恒定结构域中包括工程化突起。在突起-进入-空腔对中,第一Fc结构域单体的 C_H3 抗体恒定结构域中的工程化突起被定位成使得其与第二Fc结构域单体的 C_H3 抗体恒定结构域的工程化空腔相互作用,而不显著扰乱二聚体在 C_H3 抗体恒定结构域间界面处的正

常缔合。突起-进入-空腔对可以包括例如表3的任何一个或多个空腔形成置换突变和任何一个或多个突起形成置换突变的互补对。

[0113] 如本文所用,术语“异二聚体Fc结构域”是指通过两个Fc结构域单体的异二聚化形成的Fc结构域,其中所述两个Fc结构域单体含有促进这两个Fc结构域单体的有利形成的不同反向电荷突变(参见例如,表4中的突变)。

[0114] 如本文所用,关于Fc-抗原结合结构域构建体群体的术语“在结构上相同”是指以相同比率和构型组装相同多肽序列的构建体,但不指任何翻译后修饰,诸如糖基化。

[0115] 如本文所用,术语“同二聚体Fc结构域”指通过两个Fc结构域单体的同二聚化形成的Fc结构域,其中所述两个Fc结构域单体含有相同的反向电荷突变(参见例如,表5和表6中的突变)。

[0116] 如本文所用,术语“异二聚化选择性模块”是指可以在Fc结构域单体的C_H3抗体恒定结构域中产生的工程化突起、工程化空腔和某些反向电荷氨基酸置换,以便促进具有相容异二聚化选择性模块的两个Fc结构域单体的有利异二聚化。含有异二聚化选择性模块的Fc结构域单体可组合以形成异二聚体Fc结构域。异二聚化选择性模块的实例在表3和表4中示出。

[0117] 如本文所用,术语“同二聚化选择性模块”是指C_H3结构域之间的界面处的带电残基环内至少两个位置中的Fc结构域单体中的促进Fc结构域单体的同二聚化以形成同二聚体Fc结构域的反向电荷突变。例如,形成同二聚化选择性模块的反向电荷突变可以在位置357、370、399和/或409(通过EU编号)中的至少两个氨基酸中,所述至少两个氨基酸在CH3结构域之间的界面处的带电残基环内。同二聚化选择性模块的实例在表4和表5中示出。

[0118] 如本文所用,术语“连接”用于描述通过包括化学缀合、重组手段和化学键(例如,肽键、二硫键和酰胺键)在内的手段来组合或附接两种或更多种元件、组分或蛋白质结构域(例如,多肽)。例如,可以通过化学缀合、化学键、肽接头或任何其他共价键合手段来连接两种单个多肽以形成一个连续的蛋白质结构。在一些实施方案中,通过从编码抗原结合结构域和Fc结构域单体两者的连续核酸序列表达来将抗原结合结构域与Fc结构域单体连接。在其他实施方案中,通过肽接头将抗原结合结构域与Fc结构域单体连接,其中通过化学键(例如,肽键)将肽接头的N末端与抗原结合结构域的C末端连接,并且通过化学键(例如,肽键)将肽接头的C末端与Fc结构域单体的N末端连接。

[0119] 如本文所用,术语“缔合”用于描述多肽(或一种单一多肽内的序列)之间的相互作用,例如氢键合、疏水相互作用或离子相互作用,使得多肽(或一种单一多肽内的序列)被定位为形成本文所述的Fc-抗原结合结构域构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc-抗原结合结构域构建体)。例如,在一些实施方案中,四种多肽(例如,各自包括两个Fc结构域单体的两种多肽和各自包括一个Fc结构域单体的两种多肽)缔合以形成具有三个Fc结构域的Fc构建体(例如,如图50和图51所描绘)。四种多肽可以通过其各自的Fc结构域单体缔合。多肽之间的缔合不包括共价相互作用。

[0120] 如本文所用,术语“接头”是指两个元件(例如,蛋白质结构域)之间的键合。接头可以是共价键或间隔物。术语“键”是指化学键(例如,酰胺键或二硫键)或由化学反应产生(例如,化学缀合)的任何种类的键。术语“间隔物”是指存在于两个多肽或多肽结构域之间以在两个多肽或多肽结构域之间提供空间和/或灵活性的部分(例如,聚乙二醇(PEG)聚合物)或

氨基酸序列(例如,3-200个氨基酸、3-150个氨基酸或3-100个氨基酸序列)。氨基酸间隔物是多肽一级序列的部分(例如,经由多肽主链与间隔的多肽或多肽结构域连接)。例如在两个铰链区或形成Fc结构域的两个Fc结构域单体之间形成的二硫键不被认为是接头。

[0121] 如本文所用,术语“甘氨酸间隔物”是指串联连接两个Fc结构域单体的仅含有甘氨酸的接头。甘氨酸间隔物可含有至少4、8或12个甘氨酸(例如,4-30、8-30或12-30个甘氨酸;例如,12-30、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个甘氨酸)。在一些实施方案中,甘氨酸间隔物具有序列GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:27)。如本文所用,术语“白蛋白结合肽”是指对血清白蛋白具有亲和力并且具有结合血清白蛋白的功能的12至16个氨基酸的氨基酸序列。白蛋白结合肽可以具有不同起源,例如人、小鼠或大鼠。在本公开的一些实施方案中,将白蛋白结合肽与Fc结构域单体的C末端融合,以增加Fc-抗原结合结构域构建体的血清半衰期。可以直接或通过接头将白蛋白结合肽与Fc结构域单体的N末端或C末端融合。

[0122] 如本文所用,术语“纯化肽”是指可以用于纯化、分离或鉴定多肽的任何长度的肽。可以将纯化肽与多肽连接以帮助从例如细胞裂解产物混合物中纯化多肽和/或分离多肽。在一些实施方案中,纯化肽结合对纯化肽具有特异性亲和力的另一部分。在一些实施方案中,将与纯化肽特异性结合的此类部分附接到固体支持物,诸如基质、树脂或琼脂糖珠。可与Fc-抗原结合结构域构建体连接的纯化肽的实例在本文中进一步详细描述。

[0123] 如本文所用,术语“多聚体”是指包括至少两个本文所述的缔合Fc构建体或Fc-抗原结合结构域构建体的分子。

[0124] 如本文所用,术语“多核苷酸”是指寡核苷酸或核苷酸以及它们的片段或部分,并且是指基因组或合成起源的DNA或RNA,它们可以是单链或双链的,并且代表有义链或反义链。单个多核苷酸被翻译成单个多肽。

[0125] 如本文所用,术语“多肽”描述了其中单体是通过酰胺键连接在一起的氨基酸残基的单个聚合物。多肽旨在涵盖天然存在、重组或合成产生的任何氨基酸序列。

[0126] 如本文所用,术语“氨基酸位置”是指蛋白质或蛋白质结构域中氨基酸的位置编号。在标出地方(例如,对于CDR和FR区)使用Kabat编号系统(Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,National Institutes of Health,Bethesda, Md.,第5版,1991)对氨基酸位置进行编号,否则使用EU编号。

[0127] 图17A-17D描绘了使用EU编号系统编号的人IgG1 Fc结构域。

[0128] 如本文所用,术语“氨基酸修饰”是指与参考序列(例如,野生型、未突变或未修饰Fc序列)相比可对以下项有影响并且可促进改善治疗免疫和炎性疾病的功效的Fc结构域多肽序列的改变:Fc构建体的药代动力学(PK)和/或药效动力学(PD)特性、血清半衰期、效应子功能(例如,细胞裂解(例如,抗体依赖性细胞介导的毒性(ADCC)和/或补体依赖性细胞毒性活性(CDC))、吞噬作用(例如,抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)和/或补体依赖性细胞毒性(CDCC))、免疫激活和T细胞激活)、对Fc受体(例如,Fc- γ 受体(Fc γ R)(例如,Fc γ RI(CD64)、Fc γ RIIa(CD32)、Fc γ RIIb(CD32)、Fc γ RIIIa(CD16a)和/或Fc γ RIIIb(CD16b))、Fc- α 受体(Fc α R)、Fc- ϵ 受体(Fc ϵ R)和/或新生儿Fc受体(FcRn))的亲和力、对参与补体级联的蛋白质(例如,C1q)的亲和力、翻译后修饰(例如,糖基化、唾液酸化)、聚合特性(例如,形成二聚体(例如,同二聚体和/或异二聚体)和/或多聚体的能力)以及生物物理特性(例如,

改变 C_H1 与 C_L 之间的相互作用、改变稳定性和/或改变对温度和/或pH的敏感性)。氨基酸修饰包括氨基酸置换、缺失和/或插入。在一些实施方案中,氨基酸修饰是单一氨基酸的修饰。在其他实施方案中,氨基酸修饰是多个(例如,多于一个)氨基酸的修饰。氨基酸修饰可包括氨基酸置换、缺失和/或插入的组合。包括在氨基酸修饰的描述中的是编码Fc多肽的核苷酸序列的遗传(即DNA和RNA)改变,诸如点突变(例如,单个核苷酸与另一个核苷酸的交换)、插入和缺失(例如,一个或多个核苷酸的添加和/或移除)。

[0129] 在某些实施方案中,Fc构建体或Fc-抗原结合结构域构建体内的至少一个(例如,一个、两个或三个)Fc结构域包括氨基酸修饰。在一些情况下,至少一个Fc结构域包括一个或多个(例如,两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或二十个或更多个)氨基酸修饰。

[0130] 在某些实施方案中,Fc构建体或Fc-抗原结合结构域构建体内的至少一个(例如,一个、两个或三个)Fc结构域单体包括氨基酸修饰(例如,置换)。在一些情况下,至少一个Fc结构域单体包括一个或多个(例如,不超过两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或二十个)氨基酸修饰(例如,置换)。

[0131] 如本文所用,术语“同一性百分比(%)”是指在比对序列并引入缺口(如有需要)以实现最大同一性百分比(即,可以在候选序列和参考序列中的一者或两者中引入缺口以用于最佳比对,并且可以忽略非同源序列以用于比较目的)之后,候选序列(例如,本文所述的Fc-抗原结合结构域构建体中的Fc结构域单体的序列)的氨基酸(或核酸)残基与参考序列(例如,野生型Fc结构域单体的序列)的氨基酸(或核酸)残基相同的百分比。比对以用于确定同一性百分比的目的可以在本领域技术范围内的各种方式实现,例如使用可公开获得的计算机软件,诸如BLAST、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可以确定用于测量比对的适当参数,包括在待比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。在一些实施方案中,如下计算给定候选序列和、与或相对于给定参考序列的氨基酸(或核酸)序列同一性百分比(其可以另选地表达为给定候选序列和、与或相对于给定参考序列具有或包括一定氨基酸(或核酸)序列同一性百分比):

[0132] $100 \times (A/B \text{ 的分数})$

[0133] 其中A是在候选序列和参考序列的比对中评分为相同的氨基酸(或核酸)残基的数目,并且其中B是参考序列中氨基酸(或核酸)残基的总数。在其中候选序列的长度不等于参考序列的长度的一些实施方案中,候选序列与参考序列的氨基酸(或核酸)序列同一性百分比不等于参考序列与候选序列的氨基酸(或核酸)序列同一性百分比。

[0134] 在一些实施方案中,本文所述的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc-抗原结合结构域构建体)中的Fc结构域单体可具有与野生型Fc结构域单体的序列(例如,SEQ ID NO:42)具有至少95%同一性(至少97%、99%或99.5%同一性)的序列。在一些实施方案中,本文所述的Fc构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc-抗原结合结构域构建体)中的Fc结构域单体可具有与SEQ ID NO:43-48和50-53中任一者的序列具有至少95%同一性(至少97%、99%或99.5%同一性)的序列。在某些实施方案中,Fc构建体中的Fc结构域单体可具有与SEQ ID NO:48、52和53的序列具有至少95%同一性(至少97%、99%或99.5%同一性)的序列。

[0135] 在一些实施方案中,两个Fc结构域单体之间的间隔物可具有与本文进一步描述的

SEQ ID NO:1-36 (例如,SEQ ID NO:17、18、26和27) 中任一者的序列具有至少75%同一性(至少75%、77%、79%、81%、83%、85%、87%、89%、91%、93%、95%、97%、99%、99.5%或100%同一性)的序列。

[0136] 在一些实施方案中,Fc构建体中的Fc结构域单体可具有与SEQ ID NO:42-48和50-53中任一者的序列相差多至10个氨基酸(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸)的序列。在一些实施方案中,Fc构建体中的Fc结构域单体相对于SEQ ID NO:42-48和50-53中任一者的序列具有多至10个氨基酸置换,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸置换。

[0137] 如本文所用,术语“宿主细胞”是指包括从其对应的核酸表达蛋白质所需的必要细胞组分(例如,细胞器)的媒介物。核酸通常包括在核酸载体中,可以通过本领域已知的常规技术(转化、转染、电穿孔、磷酸钙沉淀、直接显微注射等)将所述核酸载体引入宿主细胞中。宿主细胞可以是原核细胞(例如,细菌细胞)或真核细胞(例如,哺乳动物细胞(例如,CHO细胞))。如本文所述,宿主细胞用于表达编码所需结构域的一种或多种多肽,然后将所述结构域组合以形成所需Fc-抗原结合结构域构建体。

[0138] 如本文所用,术语“药物组合物”是指含有活性成分以及一种或多种赋形剂和稀释剂以使活性成分能够适合于施用方法的医学或药物制剂。本公开的药物组合物包括与Fc-抗原结合结构域构建体相容的药理学上可接受的组分。药物组合物通常为用于静脉内或皮下施用的水性形式。

[0139] 如本文所用,多肽或Fc构建体的“基本上同质的群体”是指组合物(例如,细胞培养基或药物组合物)中至少50%的多肽或Fc构建体具有相同数量的Fc结构域,如通过非还原SDS凝胶电泳或尺寸排阻色谱测定的。多肽或Fc构建体的基本上同质的群体可在纯化之前或者在蛋白A或蛋白G纯化之后或者在只进行任何Fab或Fc特异性亲和色谱之后获得。在各种实施方案中,组合物中至少55%、60%、65%、70%、75%、80%或85%的多肽或Fc构建体具有相同数量的Fc结构域。在其他实施方案中,组合物中至多85%、90%、92%或95%的多肽或Fc构建体具有相同数量的Fc结构域。

[0140] 如本文所用,术语“药学可接受的载体”是指药物组合物中的赋形剂或稀释剂。药学可接受的载体必须与制剂的其他成分相容并且对接受者无害。在本公开中,药学上可接受的载体必须为Fc-抗原结合结构域构建体提供足够的药物稳定性。载体的性质因施用模式而异。例如,对于经口施用,固体载体是优选的;对于静脉内施用,一般使用水性溶液载体(例如,WFI和/或缓冲溶液)。

[0141] 如本文所用,“治疗有效量”是指有效诱导受试者或患者中的所需生物效应或者有效治疗患有本文所述病症或障碍的患者的量,例如药物剂量。本文还应理解,“治疗有效量”可被解释为以一个剂量或以任何剂量或途径服用、单独或与其他治疗剂组合服用的给予所需治疗效果的量。

[0142] 如本文所用,术语“片段”和术语“部分”可以互换使用。

附图说明

[0143] 图1是示出具有两个Fc结构域(通过将相同的多肽链连接在一起形成)的串联构建体和通过串联Fc序列的错配缔合产生的一些所得物质的示意图。Fab部分的可变结构域(VH+VL)被描绘为平行四边形,Fab部分的恒定结构域(CH1+CL)被描绘为矩形,Fc部分的结构域

(CH2和CH3)被描绘为椭圆,并且铰链二硫化物被描绘为平行线对。

[0144] 图2是示出具有通过肽接头连接的三个Fc结构域(通过将相同的多肽链连接在一起形成)的串联构建体和通过串联Fc序列的非寄存器缔合产生的一些所得物质的示意图。Fab部分的可变结构域(VH+VL)被描绘为平行四边形,Fab部分的恒定结构域(CH1+CL)被描绘为矩形,Fc部分的结构域(CH2和CH3)被描绘为椭圆,并且铰链二硫化物被描绘为平行线对。

[0145] 图3A和图3B是具有通过接头连接并使用正交异二聚化结构域组装的两个Fc结构域(图3A)或三个Fc结构域(图3B)的Fc构建体的示意图。每个独特的多肽链用不同的阴影表示。Fab部分的可变结构域(VH+VL)被描绘为平行四边形,Fab部分的恒定结构域(CH1+CL)被描绘为矩形,Fc部分的结构域(CH2和CH3)被描绘为椭圆,接头被示出为虚线,并且铰链二硫化物被描绘为平行线对。CH3椭圆被示出为具有突起用于描绘旋钮-进入-孔洞对的旋钮,并且具有空腔用于描绘孔洞。加号和/或减号用于描绘CH3结构域中的静电转向突变。

[0146] 图4A-H是使用正交异二聚化结构域组装的具有串联的多个Fc结构域的Fc构建体的示意图。每个独特的多肽链用不同的阴影表示。Fab部分的可变结构域(VH+VL)被描绘为平行四边形,Fab部分的恒定结构域(CH1+CL)被描绘为矩形,Fc部分的结构域(CH2和CH3)被描绘为椭圆,接头被示出为虚线,并且铰链二硫化物被描绘为平行线对。在结构域的Fc单体中利用第一组异二聚化突变的Fc结构域表示为A和B。在结构域的Fc单体中利用第二组异二聚化突变的Fc结构域表示为C和D。

[0147] 图5A-F是具有多个对称分布的Fc结构域的分支Fc构建体的示意图,这些Fc结构域通过使用正交异二聚化结构域不对称排列多肽链进行组装。每个独特的多肽链用不同的阴影表示。Fab部分的可变结构域(VH+VL)被描绘为平行四边形,Fab部分的恒定结构域(CH1+CL)被描绘为矩形,Fc部分的结构域(CH2和CH3)被描绘为椭圆,接头被示出为虚线,并且铰链二硫化物被描绘为平行线对。在结构域的Fc单体中利用第一组异二聚化突变的Fc结构域表示为A和B。在结构域的Fc单体中利用第二组异二聚化突变的Fc结构域表示为C和D。

[0148] 图6A-F是具有多个不对称分布的Fc结构域的分支Fc构建体的示意图,这些Fc结构域通过使用正交异二聚化结构域不对称排列多肽链进行组装。每个独特的多肽链用不同的阴影表示。Fab部分的可变结构域(VH+VL)被描绘为平行四边形,Fab部分的恒定结构域(CH1+CL)被描绘为矩形,Fc部分的结构域(CH2和CH3)被描绘为椭圆,接头被示出为虚线,并且铰链二硫化物被描绘为平行线对。在结构域的Fc单体中利用第一组异二聚化突变的Fc结构域表示为A和B。在结构域的Fc单体中利用第二组异二聚化突变的Fc结构域表示为C和D。

[0149] 图7A-D是具有对称分布的Fc结构域和不对称分布的Fab的分支Fc构建体的示意图,这些Fc结构域和Fab通过使用正交异二聚化结构域不对称排列多肽链进行组装。每个独特的多肽链用不同的阴影表示。Fab部分的可变结构域(VH+VL)被描绘为平行四边形,Fab部分的恒定结构域(CH1+CL)被描绘为矩形,Fc部分的结构域(CH2和CH3)被描绘为椭圆,接头被示出为虚线,并且铰链二硫化物被描绘为平行线对。在结构域的Fc单体中利用第一组异二聚化突变的Fc结构域表示为A和B。在结构域的Fc单体中利用第二组异二聚化突变的Fc结构域表示为C和D。

[0150] 图8是用于证明不对称分支Fc构建体的表达的具有单个不对称分布的Fab的分支抗CD20构建体的示意图。

[0151] 图9是用于证明不对称分支Fc构建体的表达的具有单个不对称分布的Fab的分支抗CD20构建体的示意图。

[0152] 图10示出了用编码组装成图8的Fc构建体的多肽的基因转染的细胞的SDS-PAGE分析结果。最左侧泳道(泳道1)中存在200kDa条带证明了形成了预期的Fc构建体。

[0153] 图11示出了用编码组装成图9的Fc构建体的多肽的基因转染的细胞的SDS-PAGE分析结果。最左侧泳道(泳道1)中存在分子量略高于200kDa的条带证明了形成了预期的Fc构建体。

[0154] 图12是包含三个Fc结构域和两个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体(构建体45)的图示。该构建体由四个含有Fc结构域单体的多肽形成。第一多肽(4502)包含具有第一组 C_H3 带电氨基酸置换的一个Fc结构域单体(4510)以及任选地具有第二组 C_H3 带电氨基酸置换的各自具有相同的突起形成氨基酸置换的两个Fc结构域单体(4508和4506),这些Fc结构域单体通过间隔物与在N末端包含 V_H 结构域的抗原结合结构域(4512)串联连接。第二多肽(4524)包含具有一组带电氨基酸置换的一个Fc结构域单体(4522),该组带电氨基酸置换促进与第一多肽的具有第一组带电氨基酸置换的Fc结构域单体(4510)的有利静电相互作用,该Fc结构域单体与在N末端包含 V_H 结构域的抗原结合结构域(4518)串联连接。第三多肽和第四多肽(4516和4514)各自包含任选地具有一组 C_H3 带电氨基酸置换的具有空腔形成氨基酸置换的一个Fc结构域单体,该组带电氨基酸置换促进与第一多肽的具有第二组带电氨基酸置换的Fc结构域单体(4508和4506)的有利静电相互作用。包含 V_L 的结构域(4504和4520)与每个 V_H 结构域连接。

[0155] 图13是包含三个Fc结构域和两个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体(构建体46)的图示。该构建体由四个含有Fc结构域单体的多肽形成。第一多肽(4602)包含具有第一组 C_H3 带电氨基酸置换的一个Fc结构域单体(4608)以及任选地具有第二组 C_H3 带电氨基酸置换的各自具有相同的突起形成氨基酸置换的两个Fc结构域单体(4606和4604),这些Fc结构域单体通过间隔物串联连接。第二多肽(4618)包含具有一组带电氨基酸置换的一个Fc结构域单体,该组带电氨基酸置换促进与第一多肽的具有第一组带电氨基酸置换的Fc结构域单体(4608)的有利静电相互作用。第三多肽和第四多肽(4626和4624)各自包含任选地具有一组 C_H3 带电氨基酸置换的具有空腔形成氨基酸置换的一个Fc结构域单体,该组带电氨基酸置换促进与第一多肽的具有第二组带电氨基酸置换的Fc结构域单体(4606和4604)的有利静电相互作用,该Fc结构域单体与在N末端包含 V_H 结构域的抗原结合结构域(4622和4620)串联连接。包含 V_L 的结构域(4614和4610)与每个 V_H 结构域连接。

[0156] 图14是包含三个Fc结构域和两个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体(构建体47)的图示。该构建体由四个含有Fc结构域单体的多肽形成。第一多肽(4702)包含各自具有第一组 C_H3 带电氨基酸置换的两个Fc结构域单体(4708和4706)以及任选地具有第二组 C_H3 带电氨基酸置换的具有突起形成氨基酸置换的一个Fc结构域单体(4704),这些Fc结构域单体通过间隔物串联连接。第二多肽和第三多肽(4726和4724)各自包含具有一组带电氨基酸置换的一个Fc结构域单体,该组带电氨基酸置换促进与第一多肽的具有第一组带电氨基酸置换的Fc结构域单体(4708和4706)的有利静电相互作用,该Fc结构域单体与在N末端包含 V_H 结构域的抗原结合结构域(4722和4720)串联连接。第四多肽(4710)包含任选地具有一组 C_H3 带电氨基酸置换的具有空腔形成氨基酸置换的一个Fc结构域单体,该组带电

氨基酸置换促进与第一多肽的具有第二组带电氨基酸置换的Fc结构域单体(4704)的有利静电相互作用。包含 V_L 的结构域(4712和4716)与每个 V_H 结构域连接。

[0157] 图15是包含五个Fc结构域和四个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体(构建体48)的图示。该构建体由六个包含Fc结构域单体的多肽形成。第一多肽(4802)包含各自任选地具有第一组 C_H3 带电氨基酸置换的具有相同的突起形成氨基酸置换的四个Fc结构域单体(4812、4810、4808和4806),以及具有第二组 C_H3 带电氨基酸置换的一个Fc结构域单体(4804),这些Fc结构域单体通过间隔物串联连接。第二多肽、第三多肽、第四多肽和第五多肽(4846、4844、4842和4840)各自包含任选地具有一组 $CH3$ 带电氨基酸置换的具有空腔形成氨基酸置换的一个Fc结构域单体(4830、4826、4822和4818),该组带电氨基酸置换促进与第一多肽的具有第一组带电氨基酸置换的Fc结构域单体(4812、4810、4808和4806)的有利静电相互作用,该Fc结构域单体与在N末端包含 V_H 结构域的抗原结合结构域(4838、4836、4834和4832)串联连接。第六多肽(4814)包含具有一组带电氨基酸置换的一个Fc结构域单体,该组带电氨基酸置换促进与第一多肽的具有第二组带电氨基酸置换的Fc结构域单体(4804)的有利静电相互作用。包含 V_L 的结构域(4816、4820、4824和4828)与每个 V_H 结构域连接。

[0158] 图16A-C是可以将抗原结合结构域与Fc构建体的Fc结构域连接的三种示例性方式的示意性表示。图16A示出了抗原结合结构域的重链组分可以表达为Fc链的融合蛋白,并且轻链组分可以表达为单独的多肽。图16B示出了表达为长Fc链的融合蛋白的scFv。图16C示出了单独表达并且外源添加到Fc-抗原结合结构域构建体中并利用化学键与Fc-抗原结合结构域构建体连接的重链_和轻链组分。

[0159] 图17A描绘了具有EU编号的人IgG1的氨基酸序列(SEQ ID NO:43)。铰链区用双下划线标出,CH2结构域未用下划线标出,而CH3区用下划线标出。

[0160] 图17B描绘了具有EU编号的人IgG1的氨基酸序列(SEQ ID NO:45)。缺少E216-C220(包括端点)的铰链区用双下划线标出,CH2结构域未用下划线标出,而CH3区用下划线标出并且缺少K447。

[0161] 图17C描绘了具有EU编号的人IgG1的氨基酸序列(SEQ ID NO:47)。铰链区用双下划线标出,CH2结构域未用下划线标出,而CH3区用下划线标出并且缺少447K。

[0162] 图17D描绘了具有EU编号的人IgG1的氨基酸序列(SEQ ID NO:42)。缺少E216-C220(包括端点)的铰链区用双下划线标出,CH2结构域未用下划线标出,而CH3区用下划线标出。

[0163] 图18是用于证明不对称分支Fc构建体的表达的具有单个不对称分布的Fab的分支替代抗CD20构建体的示意图。

[0164] 图19是用于证明不对称分支Fc构建体的表达的具有单个不对称分布的Fab的分支替代抗CD20构建体的示意图。

[0165] 图20描绘了可以用于产生具有单个不对称分布的Fab的分支替代抗CD20构建体(诸如图18所示)的多肽的氨基酸序列。

[0166] 图21描绘了可以用于产生具有单个不对称分布的Fab的分支替代抗CD20构建体(诸如图18所示)的多肽的氨基酸序列。

具体实施方式

[0167] 许多治疗性抗体通过Fc结构域的效应子功能(诸如抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)和补体依赖性细胞毒性(CDC))募集先天免疫系统的元件而发挥作用。在一些情况下,本公开内容设想将抗原结合结构域与至少两个Fc结构域组合以产生新型治疗剂。在一些情况下,本公开设想将含单个Fc结构域的治疗剂(例如,已知治疗性抗体)的抗原结合结构域与至少两个Fc结构域组合以产生具有独特生物活性的新型治疗剂。在一些情况下,本文公开的新型治疗剂具有比含单个Fc结构域的治疗剂(例如,已知治疗性抗体)更大的生物活性。至少两个Fc结构域的存在可以增强效应子功能并激活多种效应子功能,诸如ADCC结合ADCP和/或CDC,从而提高治疗性分子的功效。

[0168] 本文所述的方法和组合物允许通过将多种正交异二聚化技术(例如,选自表3和表4的两组不同的突变)任选地与同二聚化技术(例如,选自表5和表6的突变)一起引入结合在一起以形成同一蛋白质的多肽中来构建具有多个Fc结构域的抗原结合蛋白。本文所述的设计原理(将多个异二聚化突变引入组装成同一蛋白质的多肽中)允许创建多种多样的蛋白质构型,包括例如具有串联Fc结构域的抗体样蛋白质、对称分支的蛋白质和不对称分支蛋白质。本文所述的设计原理允许受控产生复杂的蛋白质构型,同时不利于形成不期望的更高级结构或不受控复合物。本文所述的正交Fc-抗原结合结构域构建体含有至少一个抗原结合结构域以及通过接头连接在一起的至少两个Fc结构域,其中至少两个Fc结构域彼此不同,例如,构建体的至少一个Fc结构域与抗原结合结构域连接,并且构建体的至少一个Fc结构域不与抗原结合结构域连接,或者构建体的两个Fc结构域与不同的抗原结合结构域连接。通过以下过程制造正交Fc-抗原结合结构域构建体:表达含有两个或更多个被接头分开的Fc单体的一条长肽链,并且表达各自含有被设计成优先结合长肽链上的一个或多个特定Fc单体的单个Fc单体的两条或更多条不同的短肽链。可以以这种方式串联连接任意数量的Fc结构域,从而允许创建具有2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个Fc结构域的构建体。

[0169] 使用在PCT/US2018/012689和国际公开号W0/2015/168643、W02017/151971、W02017/205436和W0 2017/205434(这些文献通过引用整体并入本文)中描述的用于组装具有两个或更多个Fc结构域的分子的Fc工程化方法创建正交Fc-抗原结合结构域构建体。这些工程化方法利用两组异二聚化选择性模块来准确组装正交Fc-抗原结合结构域构建体(构建体45-48;图12至图15:(i)具有不同反向电荷突变(表4)的异二聚化选择性模块以及(ii)具有工程化空腔和突起(表3)的异二聚化选择性模块)。可以将任何异二聚化选择性模块结合到一对Fc单体中,该对Fc单体被设计成通过将特定的氨基酸置换引入每个Fc单体多肽中来组装到构建体的特定Fc结构域中。异二聚化选择性模块被设计成支持具有特定异二聚化选择性模块的互补氨基酸置换的Fc单体之间的缔合,同时不利于与具有不同异二聚化选择性模块的突变的Fc单体缔合。这些异二聚体化突变确保将不同的Fc单体多肽组装成构建体的不同Fc结构域的所需串联构型,而最小化形成较小或较大复合物。这些构建体的特性允许有效产生基本上同质的药物组合物,这对于确保药物组合物的安全性、功效、均匀性和可靠性是期望的。

[0170] 在一些实施方案中,本文所述的正交Fc-抗原结合结构域构建体的组装可以使用本文所述的两组异二聚化突变之间的不同静电转向突变来实现。正静电转向突变的一个实例是Fc单体的第一旋钮中的E357K和Fc单体的第一孔洞中的K370D(其中这些Fc单体缔合

形成第一Fc结构域)以及Fc单体的第二旋钮中的D399K和Fc单体的第二孔洞中的K409D(其中这些Fc单体缔合形成第二Fc结构域)。

[0171] 在一些实施方案中,Fc-抗原结合结构域构建体具有至少两个对不同靶分子具有不同结合特征(诸如不同结合亲和力(对于相同或不同靶标))或特异性的抗原结合结构域(例如,两个、三个、四个、五个或六个抗原结合结构域)。可由上述Fc支架产生双特异性构建体,其中Fc-抗原结合结构域构建体的两个或更多个多肽包括不同的抗原结合结构域,例如长链包括一个具有第一特异性的抗原结合结构域,并且短链包括具有第二特异性的不同抗原结合结构域。不同的抗原结合结构域可使用不同的轻链或共同的轻链,或者可由scFv结构域组成。

[0172] 可通过使用两组不同的异二聚化突变(即正交异二聚化突变)来产生双特异性和三特异性构建体。此类异二聚化序列需要以它们不利于与其他异二聚化序列缔合的方式进行设计。此类设计可以使用如本文所述的两组异二聚化突变之间的不同静电转向突变和/或两组异二聚化突变之间的不同的突起-进入-空腔突变来实现。正交静电转向突变的一个实例是第一旋钮Fc中的E357K、第一孔洞Fc中的K370D、第二旋钮Fc中的D399K和第二孔洞Fc中的K409D。

[0173] I.Fc结构域单体

[0174] Fc结构域单体包括铰链结构域、C_H2抗体恒定结构域和C_H3抗体恒定结构域(例如,人IgG1铰链、C_H2抗体恒定结构域和具有任选氨基酸置换的C_H3抗体恒定结构域)的至少一部分。Fc结构域单体可以是免疫球蛋白抗体同种型IgG、IgE、IgM、IgA或IgD。Fc结构域单体也可以是任何免疫球蛋白抗体同种型(例如,IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3或IgG4)。Fc结构域单体也可以是杂合体,例如具有来自IgG1的铰链和C_H2以及来自IgA的C_H3或者具有来自IgG1的铰链和C_H2以及来自IgG3的C_H3。Fc结构域单体的二聚体是可以结合Fc受体(例如,Fc γ RIIIa,一种位于白细胞的表面上的受体)的Fc结构域(本文进一步定义)。在本公开中,Fc结构域单体的C_H3抗体恒定结构域可在C_H3-C_H3抗体恒定结构域的界面处含有氨基酸置换,以促进它们彼此的缔合。在其他实施方案中,Fc结构域单体包括附接到N末端或C末端的附加部分,例如白蛋白结合肽或纯化肽。在本公开中,Fc结构域单体不含有任何类型的抗体可变区,例如V_H、V_L、互补决定区(CDR)或高变区(HVR)。

[0175] 在一些实施方案中,本文所述的Fc-抗原结合结构域构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc-抗原结合结构域构建体)中的Fc结构域单体可具有与SEQ ID NO:42的序列具有至少95%同一性(至少97%、99%或99.5%同一性)的序列。在一些实施方案中,本文所述的Fc-抗原结合结构域构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc-抗原结合结构域构建体)中的Fc结构域单体可具有与SEQ ID NO:43、44、46、47、48和50-53中任一者的序列具有至少95%同一性(至少97%、99%或99.5%同一性)的序列。在某些实施方案中,Fc-抗原结合结构域构建体中的Fc结构域单体可具有与SEQ ID NO:48、52和53中任一者的序列具有至少95%同一性(至少97%、99%或99.5%同一性)的序列。

[0176] SEQ ID NO:42

[0177] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL

SPGK

[0178] SEQ ID NO:44

[0179] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSL
CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVSCSMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0180] SEQ ID NO:46

[0181] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSL
CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVSCSMHEALHNHYTQKSLSL
SPG

[0182] SEQ ID NO:48

[0183] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSL
CAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVSCSMHEALHNHYTQKSLSL
SPG

[0184] SEQ ID NO:50

[0185] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDELTKNQVSLW
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0186] SEQ ID NO:51

[0187] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVSCSMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0188] SEQ ID NO:52

[0189] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVSCSMHEALHNHYTQKSLSL
SPG

[0190] SEQ ID NO:53

[0191] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLTKNQVSLW
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0192] II.Fc结构域

[0193] 如本文所定义,Fc结构域包括两个Fc结构域单体,它们通过C_H3抗体恒定结构域之间的相互作用而二聚化。Fc结构域形成与Fc受体(例如,Fc-γ受体(即Fcγ受体(FcγR))、

Fc- α 受体(即Fc α 受体(Fc α R))、Fc- ϵ 受体(即、Fc ϵ 受体(Fc ϵ R))和/或新生儿Fc受体(FcRn))结合的最小结构。在一些实施方案中,本公开的Fc结构域与Fc γ 受体(例如,Fc γ RI(CD64)、Fc γ RIIa(CD32)、Fc γ RIIb(CD32)、Fc γ RIIIa(CD16a)、Fc γ RIIIb(CD16b))和/或Fc γ RIV和/或新生儿Fc受体(FcRn)结合。

[0194] III. 抗原结合结构域

[0195] 抗原结合结构域可以是与特定靶分子或靶分子组结合的任何蛋白质或多肽。抗原结合结构域包括特异性结合靶分子的一种或多种肽或多肽。抗原结合结构域可包括抗体的抗原结合结构域。在一些实施方案中,抗原结合结构域可以是抗体或抗体构建体的片段,例如抗体的与靶抗原结合的最小部分。抗原结合结构域也可以是特异性结合靶标的合成工程化肽,例如基于纤连蛋白的结合蛋白(例如, FN3单体)。在一些实施方案中,抗原结合结构域可以是配体或受体。片段抗原结合(Fab)片段是抗体上与靶抗原结合的区域。它由重链和轻链中每一者的一个恒定结构域和一个可变结构域构成。Fab片段包括V_H、V_L、C_H1和C_L结构域。可变结构域V_H和V_L各自在单体的氨基末端处包含一组3个互补决定区(CDR)。Fab片段可以是免疫球蛋白抗体同种型IgG、IgE、IgM、IgA或IgD。Fab片段单体也可以是任何免疫球蛋白抗体同种型(例如, IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3或IgG4)。在一些实施方案中,在对免疫球蛋白进行蛋白酶(例如,胃蛋白酶)处理之后,Fab片段可共价附接到第二相同的Fab片段,从而形成F(ab')₂片段。在一些实施方案中,Fab可表达为单个多肽,该单个多肽包括例如与结构域之间的接头融合的可变结构域和恒定结构域。

[0196] 在一些实施方案中,可仅使用Fab片段的一部分作为抗原结合结构域。在一些实施方案中,可仅使用Fab的轻链组分(V_L+C_L),或者可仅使用Fab的重链组分(V_H+C_H)。在一些实施方案中,可使用单链可变片段(scFv),该单链可变片段是Fab可变区的V_H和V_L链的融合蛋白。在其他实施方案中,可使用线性抗体,该线性抗体包括一对串联Fd区段(V_H-C_H1-V_H-C_H1),该对串联Fd区段与互补轻链多肽一起形成一对抗原结合区。

[0197] 可将抗原结合结构域在本文所述的含Fc的多肽内以各种数量放置并且放置在各种位置处。在一些实施方案中,可将一个或多个抗原结合结构域放置在含Fc的多肽的Fc结构域的N末端、C末端和/或这些Fc结构域之间。在一些实施方案中,可将多肽或肽接头放置在抗原结合结构域(例如,Fab结构域)与含Fc的多肽的Fc结构域之间。在一些实施方案中,可将串联连接的多个抗原结合结构域(例如,2、3、4或5个或更多个抗原结合结构域)沿着多肽链放在任何位置处(Wu等人,Nat.Biotechnology,25:1290-1297,2007)。

[0198] 在一些实施方案中,可以将两个或更多个抗原结合结构域相对于彼此以各种距离放置在含Fc结构域的多肽上或由多个含Fc结构域的多肽制成的蛋白质复合物上。在一些实施方案中,将两个或更多个抗原结合结构域彼此靠近放置,例如放在同一Fc结构域上,如在单克隆抗体中。在一些实施方案中,将两个或更多个抗原结合结构域相对于彼此更远离地放置,例如抗原结合结构域被蛋白质结构上的1、2、3、4或5个或更多个Fc结构域彼此分开。

[0199] 在一些实施方案中,本公开的抗原结合结构域包括表1A和表1B中列出的靶标或抗原,以及所列出的靶标或抗原的表1A和表1B中列出的一个、两个、三个、四个、五个或全部六个CDR序列,如下表1A和表1B进一步详细提供。

[0200]

表 1A. CDR 序列

靶标	抗体名称	CDR1-IMGT (重)	CDR2-IMGT (重)	CDR3-IMGT (重)	CDR1-IMGT (轻)	CDR2-IMGT (轻)	CDR3-IMGT (轻)
B7-H3	Enoblitumab	GFTFSFG (SEQ ID NO: 76)	ISSSSAI (SEQ ID NO: 106)	GRGRENYY GSRLDY (SEQ ID NO: 137)	QNVDTN (SEQ ID NO: 171)	SAS	QQYNNYPF T (SEQ ID NO: 201)
β-淀粉样蛋白	甘 特 殊 单 抗 (Gantenerumab)	GFTFSYA (SEQ ID NO: 77)	INASGTRT (SEQ ID NO: 107)	ARGKGNTH KPYGYVRY FDV (SEQ ID NO: 138)	QSVSSSY (SEQ ID NO: 172)	GAS	LQIYNNMPIT (SEQ ID NO: 202)
CCR4	莫 加 珠 单 抗 (Mogamulizumab)	GFIFSNYG (SEQ ID NO: 78)	ISSASTYS (SEQ ID NO: 108)	GRHSDGNF AFGY (SEQ ID NO: 139)	RNIWHINGD TY (SEQ ID NO: 173)	KVS	FQGSLLPWT (SEQ ID NO: 203)
CD19	Inebilizumab	GFTFSSSW (SEQ ID NO: 79)	IYPGDGDT (SEQ ID NO: 109)	ARSGFITV RDFDY (SEQ ID NO: 140)	ESVDTFGISF (SEQ ID NO: 174)	EAS	QQSKEVPFT (SEQ ID NO: 204)
CD20	奥 滨 尤 妥 珠 单 抗 (Obinutuzumab)	GYAFSYSW (SEQ ID NO: 80)	IFPGDGD (SEQ ID NO: 110)	ARNVFDGY WLVY (SEQ ID NO: 141)	KSLLSHNGI TY (SEQ ID NO: 175)	QMS	AQNLELPYT (SEQ ID NO: 205)

[0201]

CD20	奥卡土珠单抗 (Ocaratuzumab)	GRTFTSYN MH (SEQ ID NO: 81)	AIYPLTGDT (SEQ ID NO: 111)	ARSTYVGG DWQFDV (SEQ ID NO: 142)	SSVPY (SEQ ID NO: 176)	ATS	QQWLSNPP T (SEQ ID NO: 206)
CD20	利妥昔单抗 (Rituximab)	GYTFTSYN (SEQ ID NO: 82)	IYPGNGDT (SEQ ID NO: 112)	CARSTYYG GDWYFNV (SEQ ID NO: 143)	SSVS (SEQ ID NO: 177)	ATS	QQWTSNPP T (SEQ ID NO: 207)
CD20	乌妥昔单抗 (Ublituximab)	GYTFTSYN (SEQ ID NO: 82)	IYPGNGDT (SEQ ID NO: 112)	ARYDYNIA MDY (SEQ ID NO: 144)	SSVS (SEQ ID NO: 177)	ATS	QQWTFNPP T (SEQ ID NO: 208)
CD20	维妥珠单抗 (Veltuzumab)	GYTFTSYN (SEQ ID NO: 82)	IYPGNGDT (SEQ ID NO: 112)	ARSTYVGG DWYFDV (SEQ ID NO: 145)	SSVS (SEQ ID NO: 177)	ATS	QQWTSNPP T (SEQ ID NO: 207)
CD22	依帕珠单抗 (Epratuzumab)	GYTFTSYW (SEQ ID NO: 83)	INPRNDYT (SEQ ID NO: 113)	ARRDITFY (SEQ ID NO: 146)	QSVLYSAN HKNY (SEQ ID NO: 178)	WAS	HQYLSS (SEQ NO: 209)
CD37	奥特乐土珠单抗 (Otlertuzumab)	GYSFTGYN (SEQ ID NO: 84)	IDPYYGGT (SEQ ID NO: 114)	ARSVGPFDS (SEQ ID NO: 147)	ENVYSY (SEQ ID NO: 179)	FAK	QHHSNPNW T (SEQ ID NO:)

[0202]

CD38	达雷木单抗 (Daratumumab)	GFTFNSFA (SEQ ID NO: 85)	ISGSGGGT (SEQ ID NO: 115)	AKDKILWF GEPVFDY (SEQ ID NO: 148)	QSVSSY (SEQ ID NO: 180)	DAS	210) QQRSNWPP T (SEQ ID NO: 211)
CD38	伊沙妥昔单抗 (Isatuximab)	GYTFTDYW (SEQ ID NO: 86)	IYPGDGDT (SEQ ID NO: 109)	ARGDYYGS NSLDY (SEQ ID NO: 149)	QDVSTV (SEQ ID NO: 181)	SAS	QQHYSPPYT (SEQ ID NO: 212)
CD3epsilon	弗罗鲁单抗 (Foralumab)	GFKFSGYG (SEQ ID NO: 87)	IWYDGSKK (SEQ ID NO: 116)	ARQMGYW HFDLW (SEQ ID NO: 150)	QSVSSY (SEQ ID NO: 180)	DAS	QQRSNWPP LT (SEQ ID NO: 213)
CD52	阿仑珠单抗 (Alemtuzumab)	GFTFTDFY (SEQ ID NO: 88)	IRDKAKGYT T (SEQ ID NO: 117)	AREGHTAA PFDY (SEQ ID NO: 151)	QNIDKY (SEQ ID NO: 182)	NTN	LQHISRPT (SEQ ID NO: 214)
CD105	Carotuximab	GFTFSDAW (SEQ ID NO: 89)	IRSKASNHA T (SEQ ID NO: 118)	TRWRRFFDS (SEQ ID NO: 152)	SSVS (SEQ ID NO: 177)	ATS	QQWSSNPL T (SEQ ID NO: 215)
CD147	cHAb18	GFTFSDAW (SEQ ID NO: 89)	IRSANNHAP T	TRDSTATH (SEQ ID NO: 152)	QSVIND (SEQ ID NO: 177)	TAS	QQDTSP (SEQ ID NO: 215)

[0203]

		89)	(SEQ ID NO: 119)	153)	183)	216)
c-Met	ABT-700	GYIFTAYT (SEQ ID NO: 90)	IKPNNGLA (SEQ ID NO: 120)	ARSEITTEF DY (SEQ ID NO: 154)	ESVDSYANS F (SEQ ID NO: 184)	QQSKEDPLT (SEQ ID NO: 217)
CTLA-4	伊匹单抗 (Ipilimumab)	GFTFSSYT (SEQ ID NO: 91)	ISYDGNK (SEQ ID NO: 121)	ARTGWLGP FDY (SEQ ID NO: 155)	QSVGSSY (SEQ ID NO: 185)	QQYGSSPW T (SEQ ID NO: 218)
EGFR2	Margetuximab	GFNIKDTY (SEQ ID NO: 92)	IYPTNGYT (SEQ ID NO: 122)	SRWGGDGF YAMDY (SEQ ID NO: 156)	QDVNTA (SEQ ID NO: 186)	QQHYTTPT (SEQ ID NO: 219)
EGFR3	Lumretuzumab	GYTFRSSY (SEQ ID NO: 93)	IYAGTGSP (SEQ ID NO: 123)	ARHRDYYS NSLTY (SEQ ID NO: 157)	QSVLNSGN QKNY (SEQ ID NO: 187)	QSDYSYPY (SEQ ID NO: 220)
EphA3	Ifabotuzumab	GYTFTGYW (SEQ ID NO: 94)	IYPGSGNT (SEQ ID NO: 124)	ARGGYED FDS (SEQ ID NO: 158)	QGIISY (SEQ ID NO: 188)	GQYANYPY T (SEQ ID NO: 221)
GD3	依美昔单抗	GFAFSHYA (SEQ ID NO: 95)	ISSGSGT (SEQ ID NO: 125)	TRVKLGTY YFDS	QDISNY (SEQ ID NO: 189)	HQYSKLP (SEQ ID NO: 222)

[0204]

	(Ecomeximab)	95)	125)	(SEQ ID NO: 159)	189)		222)
GPC3	克锥特珠单抗 (Codrituzumab)	GYTFDYE (SEQ ID NO: 96)	LDPKTGDT (SEQ ID NO: 126)	TRFYSYTY (SEQ ID NO: 160)	QSLVHSNR NTY (SEQ ID NO: 190)	KVS	SQNTHPPT (SEQ ID NO: 223)
KIR2DL1/2/3	利瑞鲁单抗 (Lirilumab)	GGTFSFYA (SEQ ID NO: 97)	FIPIFGAA (SEQ ID NO: 127)	ARIPSGSY YDYDMDV (SEQ ID NO: 161)	QSVSSY (SEQ ID NO: 180)	DAS	QQRSNWMT (SEQ ID NO: 224)
MUC5AC	恩妥昔单抗 (Ensituximab)	GFSLSKFG (SEQ ID NO: 98)	IWGDGST (SEQ ID NO: 128)	VKPGGDY (SEQ ID NO: 162)	SSISY (SEQ ID NO: 191)	DTS	HQRDSYPWT (SEQ ID NO: 225)
磷脂酰丝氨酸	巴维昔单抗 (Bavituximab)	GYSFTGYN (SEQ ID NO: 84)	IDPYYGDT (SEQ ID NO: 129)	VKGGYYGH WYFDV (SEQ ID NO: 163)	QDIGSS (SEQ ID NO: 192)	ATS	LQYVSSPPT (SEQ ID NO: 226)
RHD	罗勒杜单抗 (Roledumab)	GFTFKNYA (SEQ ID NO: 99)	ISYDGRNI (SEQ ID NO: 130)	ARVRSRW LQLGLEDAF HI (SEQ ID NO: 164)	QDIRNY (SEQ ID NO: 193)	AAS	QQYNSPPT (SEQ ID NO: 227)
SLAMF7	埃罗妥珠单抗	GFDFSRYW	INPDSSTI	ARPDGNYW	QDVGIA	WAS	QQYSSYPYT

[0205]

	(Elotuzumab)	(SEQ ID NO: 100)	(SEQ ID NO: 131)	YFDV (SEQ ID NO: 165)	(SEQ ID NO: 194)	(SEQ ID NO: 228)
HER2	曲妥珠单抗 (Trastuzumab)	GFNIKDTY (SEQ ID NO: 92)	IYPTNGYT (SEQ ID NO: 122)	SRWGGDGF YAMDY (SEQ ID NO: 156)	QDVNTA (SEQ ID NO: 186)	QQHYTTTPPT (SEQ ID NO: 219)
OX40	欧西鲁单抗 (Oxelumab)	GFTFNSYA (SEQ ID NO: 101)	ISGSGGFT (SEQ ID NO: 132)	AKDRLVAP GTFDY (SEQ ID NO: 166)	QGISSW (SEQ ID NO: 195)	QQYNSYPY T (SEQ ID NO: 229)
PD-L1	阿维鲁单抗 (Avelumab)	GFTFSSYI (SEQ ID NO: 102)	IYPSGGIT (SEQ ID NO: 133)	ARIKLGTVT TVDY (SEQ ID NO: 167)	SSDVGGYN Y (SEQ ID NO: 196)	SSYTSSTR V (SEQ ID NO: 230)
CD135	4G8-SDIEM	SYWMH (SEQ ID NO: 103)	EIDPSDSYK DYNQKFKD (SEQ ID NO: 134)	AITTPFD (SEQ ID NO: 168)	RASQISNN LH (SEQ ID NO: 197)	QQSNTWPTY T (SEQ ID NO: 231)
HIV1	VRC01LS	GYTFLNCPI (SEQ ID NO: 104)	GWMKPRGG AVN (SEQ ID NO: 135)	ARYFFGSSP NWYFD (SEQ ID NO: 169)	SQYGLAW (SEQ ID NO: 198)	QQYEFFGQ GT (SEQ ID NO: 232)

[0206]

HER3	KTN3379	GFTFSYYY MQ (SEQ ID NO: 105)	IGSSGGVTN (SEQ ID NO: 136)	ARVGLGDA FDIWQQ (SEQ ID NO: 170)	SLSNIGLN (SEQ ID NO: 199)	SRN	AAWDDSP G (SEQ ID NO: 233)
------	---------	---------------------------------------	----------------------------------	---	---------------------------------	-----	-------------------------------------

[0207] 表1B:可变结构域序列

[0208]

抗体	VH/CH1	VL
阿 特 殊 单 抗 (Atezolizumab) PD-L1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSDSWIHWRQAPGK GLEWVAWISPYGGSTYYADSV KGRFTISADTSKNTAYLQMNSL RAEDTAVYCARRHWPGGFDY WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYASTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQDVSTAVAWYQ QKPGKAPKLLIYSASFLYS GVPSRFSGSGSGTDFLTIS SLQPEDFATYYCQQYLYH PATFGQGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC
度 伐 利 尤 单 抗 (Durvalumab) PD-L1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSRYWMSWVRQAPG KGLEWVANIKQDGSEKYYVDS VKGRFTISRDNANKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAREGGWFGE LAFDYWGQGTLLTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPASIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF	EIVLTQSPGTLSLSPGERAT LSCRASQRVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYDASSRAT GIPDRFSGSGSGTDFLTIS RLEPEDFAVYYCQQYGSL PWTFGQGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC

抗体	VH/CH1	VL
	FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K	
替西木单抗 (Tremelimumab) CTLA-4	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDP RGATLYYYYY GMDVWGQGT VTVSSASTKG PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA VLQSSGLYSL SSVVTVPSSN FGTQTYTCNV DHKPSNTKVD KTVERKCCVE CPPCPAPPVA GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVQFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF NSTFRVSVL TVVHQDWLNG KEYKCKVSNK GLPAIEKTI SKTKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP MLDSGGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQSIN SYLDWYQQKPGKAPKLLI YAASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYY CQQYYSTPFTFGPGTKVEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSSSTL TLSKADYEKHKVYACEVT HQLSPVTKSFN RGE
伊沙妥昔单抗 (Isatuximab) CD38	QVQLVQSGAEVAKPGTSVKLS CKASGYTFTDYWMQWVKQRP GQGLEWIGTIYPGDGDTGYAQ KFQGKATLTADKSSKTVYMHL SSLASEDSAVYYCARGDYYGS NSLDYWGQGTSTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI	DIVMTQSHLSMSTSLGDPV SITCKASQDVSTVVAWYQ QKPGQSPRRLIYSASYRYI GVPDRFTGSGAGTDFTFTI SSVQAEDLAVYYCQQHYS PPYTFGGGTKLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDS KDYSLSSSTLTLKADYE KHKVYACEVTHQGLSPV TKSFNRGEC

[0209]

抗体	VH/CH1	VL
[0210]	SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSK SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K	
MOR 202 CD38	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYYMNWVRQAPG KGLEWVSGISGDPSNTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARDLPLVYTG FAYWGQGTLVTV (仅 VH)	DIELTQPPSVSVAPGQTARI SCSGDNL RHYYVYWYQQ KPGQAPVLVIYGDSKRPSG IP ERFSGSNSGNTATLTISGT QAEDEADYYCQTYTGGS LVFGGGTKLTVLGQ

[0211] Fc-抗原结合结构域构建体45的抗原结合结构域(图12中的4504/4512和4518/4520)各自可以包括表1A和表1B中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0212] Fc-抗原结合结构域构建体46的抗原结合结构域(图13中的4610/4620和4614/4622)各自可以包括表1A和表1B中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0213] Fc-抗原结合结构域构建体47的抗原结合结构域(图14中的4712/4720和4716/4722)各自可以包括表1A和表1B中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0214] Fc-抗原结合结构域构建体48的抗原结合结构域(图15中的4816/4832、4820/4834、4824/4836和4828/4838)各自可以包括表1A和表1B中列出的抗体中的任何一种的三个重链和三个轻链CDR序列。

[0215] 在一些实施方案中,抗原结合结构域(例如,Fab或scFv)包括表2或表1B中列出的抗体的V_H和V_L链。在一些实施方案中,Fab包括表2或表1B中列出的抗体的V_H和V_L链中包含的CDR。在一些实施方案中,Fab包括表2中列出的抗体的V_H和V_L链中包含的CDR,并且V_H和V_L序列的其余部分与表2中的抗体的V_H和V_L序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。在一些实施方案中,Fab包括表1B中列出的抗体的VH和VL链中包含的CDR,并且VH和VL序列的其余部分与表1B中的抗体的VH和VL序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0216] 表2

[0217]

靶标	抗体名称
AbGn-7抗原	AbGn-7
AMHR2	GM-102
B7-H3	DS-5573a
CA19-9	MVT-5873
CAIX	抗CAIX
CD19	XmAb5871
CD33	BI-836858
CD37	BI-836826
CD38	MOR-202
CD47	Anti-CD47
CD70	ARGX-110
CD70	ARGX-110
CD98	IGN-523
CD147	Metuzumab
CD157	MEN-1112
c-Met	ARGX-111
EGFR2	GT-Mab 7.3-GEX
EphA2	DS-8895a
FGFR2	FPA-144
GM2	BIW-8962
HPA-1a	NAITgam
ICAM-1	BI-505
IL-3R α	Talacotuzumab
JL-1	Leukotuximab
κ 骨髓瘤抗原	MDX-1097
KIR32DL2	IPH-4102
LAG-3	GSK-2381781
<i>P. aeruginosa</i> serotype O1	AR-104
pGlu- β	PBD-C06
TA-MUC1	GT-MAB 2.5-GEX

[0218] Fc-抗原结合结构域构建体45的抗原结合结构域(图12中的4504/4512和4518/4520)各自可以包括表2或表1B中列出的抗体中的任何一种的V_H和V_L序列。

[0219] Fc-抗原结合结构域构建体46的抗原结合结构域(图13中的4610/4620和4614/4622)各自可以包括表2或表1B中列出的抗体中的任何一种的V_H和V_L序列。

[0220] Fc-抗原结合结构域构建体47的抗原结合结构域(图14中的4712/4720和4716/4722)各自可以包括表2或表1B中列出的抗体中的任何一种的V_H和V_L序列。

[0221] Fc-抗原结合结构域构建体48的抗原结合结构域(图15中的4816/4832、4820/4834、4824/4836和4828/4838)各自可以包括表2或表1B中列出的抗体中的任何一种的V_H和V_L序列。

[0222] Fc-抗原结合结构域构建体45的抗原结合结构域(图12中的4504/4512和4518/4520)各自可以包括表2或表1B中列出的抗体中的任何一种的V_H和V_L序列中包含的CDR序列。

[0223] Fc-抗原结合结构域构建体46的抗原结合结构域(图13中的4610/4620和4614/4622)各自可以包括表2或表1B中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0224] Fc-抗原结合结构域构建体47的抗原结合结构域(图14中的4712/4720和4716/4722)各自可以包括表2或表1B中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0225] Fc-抗原结合结构域构建体48的抗原结合结构域(图15中的4816/4832、4820/4834、4824/4836和4828/4838)各自可以包括表2或表1B中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列。

[0226] Fc-抗原结合结构域构建体45的抗原结合结构域(图12中的4504/4512和4518/4520)各自可以包括 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列,并且 V_H 和 V_L 序列的其余部分与表2或表1B中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0227] Fc-抗原结合结构域构建体46的抗原结合结构域(图13中的4610/4620和4614/4622)各自可以包括 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列,并且 V_H 和 V_L 序列的其余部分与表2或表1B中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0228] Fc-抗原结合结构域构建体47的抗原结合结构域(图14中的4712/4720和4716/4722)各自可以包括 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列,并且 V_H 和 V_L 序列的其余部分与表2或表1B中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0229] Fc-抗原结合结构域构建体48的抗原结合结构域(图15中的4816/4832、4820/4834、4824/4836和4828/4838)各自可以包括 V_H 和 V_L 序列中包含的CDR序列,并且 V_H 和 V_L 序列的其余部分与表2或表1B中列出的抗体中的任何一种的 V_H 和 V_L 序列具有至少95%同一性、至少97%同一性、至少99%同一性或至99.5%同一性。

[0230] IV. 二聚化选择性模块

[0231] 在本公开中,二聚化选择性模块包括Fc结构域单体内的组分或选择性氨基酸,所述组分或选择性氨基酸促进两个Fc结构域单体的优选配对以形成Fc结构域。具体地,二聚化选择性模块是Fc结构域单体的 C_H3 抗体恒定结构域的部分,该部分包括位于两个Fc结构域单体的相互作用的 C_H3 抗体恒定结构域之间的界面处的氨基酸置换。在二聚化选择性模块中,由于针对氨基酸置换选择的氨基酸的相容性,那些置换使得两个 C_H3 抗体恒定结构域的二聚化变得有利。有利的Fc结构域的最终形成选择性超过其他Fc结构域,所述其他Fc结构域由缺少二聚化选择性模块的Fc结构域单体形成或在二聚化选择性模块中具有不相容的氨基酸置换。这种类型的氨基酸置换可以使用本领域众所周知的常规分子克隆技术(诸如QuikChange[®]诱变)产生。

[0232] 在一些实施方案中,二聚化选择性模块在 C_H3 抗体恒定结构域中包括工程化空腔(本文进一步描述)。在其他实施方案中,二聚化选择性模块在 C_H3 抗体恒定结构域中包括工程化突起(本文进一步描述)。为了选择性地形成Fc结构域,具有相容二聚化选择性模块的两个Fc结构域单体(例如,含有工程化空腔的一个 C_H3 抗体恒定结构域和含有工程化突起的另一个 C_H3 抗体恒定结构域)组合以形成Fc结构域单体的突起-进入-空腔对。工程化突起和工程化空腔是异二聚化选择性模块的实例,它们可以在Fc结构域单体的 C_H3 抗体恒定结构

域中产生,以便促进具有相容异二聚化选择性模块的两个Fc结构域单体的有利异二聚化。

[0233] 在其他实施方案中,具有包含带正电荷的氨基酸置换的二聚化选择性模块的Fc结构域单体和具有包含带负电荷的氨基酸置换的二聚化选择性模块的Fc结构域单体可通过带电氨基酸的有利静电转向(本文进一步描述)选择性地组合以形成Fc结构域。在一些实施方案中,Fc结构域单体可包括以下带正电荷和带负电荷的氨基酸置换中的一者或多者:K392D、K392E、D399K、K409D、K409E、K439D和K439E。在一个实例中,包含带正电荷的氨基酸置换(例如,D356K或E357K)的Fc结构域单体和包含带负电荷的氨基酸置换(例如,K370D或K370E)的Fc结构域单体可通过带电氨基酸的有利静电转向选择性地组合以形成Fc结构域。在另一个实例中,包含E357K的Fc结构域单体和包含K370D的Fc结构域单体可通过带电氨基酸的有利静电转向选择性地组合以形成Fc结构域。在另一个实例中,包含E356K和D399K的Fc结构域单体和包含K392D和K409D的Fc结构域单体可通过带电氨基酸的有利静电转向选择性地组合以形成Fc结构域。在一些实施方案中,可将反向电荷氨基酸置换用作异二聚化选择性模块,其中包含不同但相容的反向电荷氨基酸置换的两个Fc结构域单体组合以形成异二聚体Fc结构域。特定二聚化选择性模块在下文进一步描述的表3和表4中进一步列出,但不限于此。

[0234] 在其他实施方案中,两个Fc结构域单体包括在 C_H3 结构域之间的界面处的带电残基环内至少两个位置中包含相同的反向电荷突变的同二聚化选择性模块。同二聚体选择性模块是促进Fc结构域单体的同二聚化以形成同二聚体Fc结构域的反向电荷氨基酸置换。通过逆转两个Fc结构域单体中的两个或更多个互补残基对的两个成员的电荷,突变的Fc结构域单体保持与相同突变序列的Fc结构域单体互补,但与不含那些突变的Fc结构域单体具有更低的互补性。在一个实施方案中,Fc结构域包括Fc结构域单体,其包括双重突变体K409D/D399K、K392D/D399K、E357K/K370E、D356K/K439D、K409E/D399K、K392E/D399K、E357K/K370D或D356K/K439E。在另一个实施方案中,Fc结构域包括Fc结构域单体,其包括组合任何一对双重突变体的四重突变体,例如K409D/D399K/E357K/K370E。同二聚化选择性模块的实例进一步在表5和表6中示出。同二聚化Fc结构域可以用于在Fc-抗原结合结构域构建体上产生对称的分支点。在一个实施方案中,本文所述的Fc-抗原结合结构域构建体具有一个同二聚化Fc结构域。在一个实施方案中,Fc-抗原结合结构域构建体具有两个或更多个同二聚化Fc结构域,例如两个、三个、四个或五个或更多个同二聚化结构域。在一个实施方案中,Fc-抗原结合结构域构建体具有三个同二聚化Fc结构域。在一些实施方案中,Fc-抗原结合结构域构建体具有一个同二聚化选择性模块。在一些实施方案中,Fc-抗原结合结构域构建体具有两个或更多个同二聚化选择性模块,例如两个、三个、四个或五个或更多个同二聚化选择性模块。

[0235] 在其他实施方案中,含有(i)至少一个反向电荷突变和(ii)至少一个工程化空腔或至少一个工程化突起的Fc结构域单体可与另一个含有(i)至少一个反向电荷突变和(ii)至少一个工程化突起或至少一个工程化空腔的Fc结构域单体选择性地组合以形成Fc结构域。例如,含有反向电荷突变K370D和工程化空腔Y349C、T366S、L368A和Y407V的Fc结构域单体以及另一个含有反向电荷突变E357K和工程化突起S354C和T366W的Fc结构域单体可选择性地组合以形成Fc结构域。

[0236] 此类Fc结构域的形成通过 C_H3 抗体恒定结构域中的相容氨基酸置换来促进。含有

不相容氨基酸置换的两个二聚化选择性模块(例如,两者均含有工程化空腔,两者均含有工程化突起,或两者均在 C_H3-C_H3 界面处含有相同的带电氨基酸)不会促进异二聚体Fc结构域的形成。

[0237] 可以使用多对异二聚化Fc结构域来产生具有多个不对称分支点、多个非分支点或不对称分支点和非分支点两者的Fc-抗原结合结构域构建体。将多种不同的异二聚化技术(参见例如,表3和表4)结合到不同的Fc结构域中以组装这些含Fc结构域的构建体。异二聚化技术对不期望的Fc单体配对具有最小的缔合(正交性)。可以在不同的Fc结构域中使用两种不同的Fc异二聚化方法(诸如旋钮-进入-孔洞(表3)和静电转向(表4)),以控制多肽链组装成所需构建体。另选地,可以将两个不同的旋钮-进入-孔洞变体(例如,选自表3的两组不同的突变)或两个不同的静电转向变体(例如,选自表4的两组不同的突变)用于不同的Fc结构域中,以控制多肽链组装成所需的构建体。可以通过将异二聚化Fc结构域的Fc结构域单体放置在不同的多肽链(多肽链具有多个Fc结构域)上来产生不对称分支。可以通过将异二聚化Fc结构域的一个Fc结构域单体放置在具有多个Fc结构域的多肽链上并且将异二聚化Fc结构域的另一个Fc结构域单体放置在具有单个Fc结构域的多肽链上来产生非分支点。

[0238] 在一些实施方案中,本文所述的Fc-抗原结合结构域构建体是线性的。在一些实施方案中,本文所述的Fc-抗原结合结构域构建体不具有分支点。例如,Fc-抗原结合结构域构建体可以由一个较大肽与两个或更多个Fc结构域单体(其中至少两个Fc结构域单体是不同的(即,具有不同的异二聚化突变))以及两个或更多个较小肽(各自具有不同的单个Fc结构域单体(即,两个或更多个较小肽具有Fc结构域单体,这些Fc结构域单体具有不同的异二聚化突变))组装而成。本文所述的Fc-抗原结合结构域构建体可以具有彼此不相容的两个或更多个二聚化选择性模块,例如选自表3和/或表4的至少两个不相容的二聚化选择性模块,这些二聚化选择性模块促进或有利于Fc-抗原结合结构域构建体的适当形成,从而每个较小肽的Fc结构域单体与较大肽上的其相容Fc结构域单体缔合。在一些实施方案中,长肽上的第一Fc结构域单体或Fc结构域单体的第一子集包含形成第一二聚化选择性模块的一部分的氨基酸置换,该部分与第一二聚化选择性模块的通过第一短肽的Fc结构域单体中的氨基酸置换形成的一部分相容。长肽上的第二Fc结构域单体或Fc结构域单体的第二子集包含形成第二二聚化选择性模块的一部分的氨基酸置换,该部分与第二二聚化选择性模块的通过第二短肽的Fc结构域单体中的氨基酸置换形成的一部分相容。第一二聚化选择性模块有利于长肽上的第一Fc结构域单体(或Fc结构域单体的第一子集)与第一短肽的Fc结构域单体结合,同时不利于第一Fc结构域单体与第二短肽的Fc结构域单体之间的结合。类似地,第二二聚化选择性模块有利于长肽上的第二Fc结构域单体(或Fc结构域单体的第二子集)与第二短肽的Fc结构域单体结合,而不利第二Fc结构域单体与第一短肽的Fc结构域单体之间的结合。

[0239] 在某些实施方案中,Fc-抗原结合结构域构建体可以包括具有第一二聚化选择性模块的第一Fc结构域和具有第二二聚化选择性模块的第二Fc结构域。在一些实施方案中,第一Fc结构域由具有选自表3的至少一个突起形成突变和/或选自表4的至少一个反向电荷突变的一个Fc单体(例如,该Fc单体可以具有S354C和T366W突起形成突变以及E357K反向电荷突变)以及具有选自表3的至少一个空腔形成突变和/或选自表4的至少一个反向电荷突变的一个Fc单体(例如,该Fc单体可以具有Y349C、T366S、L368A和Y407V空腔形成突变以及

K370D反向电荷突变) 组装而成。在一些实施方案中, 第二Fc结构域由具有选自表3的至少一个突起形成突变和/或选自表4的至少一个反向电荷突变的一个Fc单体 (例如, 该Fc单体可以具有D356K和D399K反向电荷突变) 以及具有选自表3的至少一个空腔形成突变和/或选自表4的至少一个反向电荷突变的一个Fc单体 (例如, 该Fc单体可以具有K392D和K409D反向电荷突变) 组装而成。

[0240] 此外, 用于促进具有明确的Fc结构域单体的Fc结构域的形成的其他方法包括但不限于: LUZ-Y方法 (美国专利申请公开号W02011034605), 该方法包括使亮氨酸拉链的单体 α -螺旋与每个Fc结构域单体进行C末端融合, 以允许异二聚体形成; 以及链交换工程化结构域 (SEED) 主体方法 (Davis等人, Protein Eng Des Sel. 23:195-202, 2010), 该方法生成具有异二聚体Fc结构域单体的Fc结构域, 这些异二聚体Fc结构域单体各自包括IgA和IgG C_H3序列的交替区段。

[0241] V. 工程化空腔和工程化突起

[0242] Carter和同事 (Ridgway等人, Protein Eng. 9:617-612, 1996; Atwell等人, J Mol Biol. 270:26-35, 1997; Merchant等人, Nat Biotechnol. 16:677-681, 1998) 描述了工程化空腔和工程化突起 (或“旋钮-进入-孔洞”策略) 的用途。旋钮和孔洞相互作用有利于异二聚体形成, 而旋钮-旋钮和孔洞-孔洞相互作用由于空间冲突和有利相互作用的缺失会阻碍同二聚体形成。“旋钮-进入-孔洞”技术也在美国专利号5,731,168中公开。

[0243] 在本公开中, 工程化空腔和工程化突起用于制备本文所述的Fc-抗原结合结构域构建体。工程化空腔是当用具有较小侧链体积的不同氨基酸替换蛋白质中的原始氨基酸时产生的空隙。工程化突起是当用具有较大侧链体积的不同氨基酸替换蛋白质中的原始氨基酸时产生的突起。具体地, 被替换的氨基酸位于Fc结构域单体的C_H3抗体恒定结构域中, 并且涉及两个Fc结构域单体的二聚化。在一些实施方案中, 产生一个C_H3抗体恒定结构域中的工程化空腔, 以容纳另一个C_H3抗体恒定结构域中的工程化突起, 使得两个C_H3抗体恒定结构域均充当促进或有利于两个Fc结构域单体的二聚化的二聚化选择性模块 (例如, 异二聚化选择性模块) (上文描述)。在其他实施方案中, 产生一个C_H3抗体恒定结构域中的工程化空腔, 以更好地容纳另一个C_H3抗体恒定结构域中的原始氨基酸。在另外其他实施方案中, 产生一个C_H3抗体恒定结构域中的工程化突起, 以与另一个C_H3抗体恒定结构域中的原始氨基酸形成另外的相互作用。

[0244] 可以通过用含有较小侧链的氨基酸 (诸如丙氨酸、缬氨酸或苏氨酸) 替换含有较大侧链 (诸如酪氨酸或色氨酸) 的氨基酸来构建工程化空腔。具体地, 一些二聚化选择性模块 (例如, 异二聚化选择性模块) (上文进一步描述) 含有工程化空腔, 诸如C_H3抗体恒定结构域中的Y407V突变。类似地, 可以通过用含有较大侧链的氨基酸替换含有较小侧链的氨基酸来构建工程化突起。具体地, 一些二聚化选择性模块 (例如, 异二聚化选择性模块) (上文进一步描述) 含有工程化突起, 诸如C_H3抗体恒定结构域中的T366W突变。在本公开中, 还将工程化空腔和工程化突起与C_H3结构域间二硫键工程化组合, 以增强异二聚体形成。在一个实例中, 含有工程化空腔Y349C、T366S、L368A和Y407V的Fc结构域单体可与含有工程化突起S354C和T366W的另一个Fc结构域单体选择性地组合以形成Fc结构域。在另一个实例中, 含有添加有Y349C的工程化空腔的Fc结构域单体和含有添加有S354C的工程化突起的Fc结构域单体可选择性地组合以形成Fc结构域。与二硫键工程化或结构计算 (混合HA-TF) 组合的

其他工程化空腔和工程化突起包括在表3中,但不限于此。

[0245] 表3:Fc异二聚化方法(旋钮-进入-孔洞)

方法	突变(链 A) (Fc 结构域单体 1 的 CH3 结构域)	突变(链 B) (Fc 结构域单体 2 的 CH ₃ 结构域)	参考文献
旋钮-进入-孔洞(Y-T)	Y407T	T336Y	美国专利号 8,216,805
旋钮-进入-孔洞	Y407A	T336W	美国专利号 8,216,805
旋钮-进入-孔洞	F405A	T394W	美国专利号 8,216,805
旋钮-进入-孔洞	Y407T	T366Y	美国专利号 8,216,805
旋钮-进入-孔洞	T394S	F405W	美国专利号 8,216,805
[0246] 旋钮-进入-孔洞	T394W, Y407T	T366Y, F406A	美国专利号 8,216,805
旋钮-进入-孔洞	T394S, Y407A	T366W, F405W	美国专利号 8,216,805
旋钮-进入-孔洞	T366W, T394S	F405W, T407A	美国专利号 8,216,805
旋钮-进入-孔洞	F405T	T394Y	
旋钮-进入-孔洞	S354C, T366W	Y349C, T366S, L368A, Y407V	
旋钮-进入-孔洞(CW-CSAV)	Y349C, T366S, L368A, Y407V	S354C, T366W	Merchant 等人, <i>Nat. Biotechnol.</i> 16(7):677-81, 1998
HA-TF	S364H, F405A	Y349T, T394F	WO2011028952

[0247] 注意:所有残基均按EU编号方案(Edelman等人,Proc Natl Acad Sci USA,63:78-85,1969)进行编号

[0248] 用不同的氨基酸残基替换C_H3抗体恒定结构域中的原始氨基酸残基可以通过改变编码原始氨基酸残基的核酸来实现。可以被替换的原始氨基酸残基的数量上限是C_H3抗体恒定结构域的界面中的残基总数,只要仍维持界面处充分的相互作用。

[0249] 将工程化空腔和工程化突起与静电转向组合

[0250] 可以将静电转向与旋钮-进入-孔洞调节技术组合,以有利于例如两个不同多肽中的Fc结构域单体之间的异二聚化作用。下文更详细描述静电转向利用肽、蛋白质结构域和蛋白质中带相反电荷的氨基酸之间的有利静电相互作用来控制更高级蛋白质分子的形成。可以使用静电转向来促进同二聚化或异二聚化,可以将后者有效地与旋钮-进入-孔洞技术组合。在异二聚化的情况下,将不同但相容的突变引入要异二聚化的每个Fc结构域单体中。因此,可以修饰Fc结构域单体以包括以下带正电荷和带负电荷的氨基酸置换中的一者:D356K、D356R、E357K、E357R、K370D、K370E、K392D、K392E、D399K、K409D、K409E、K439D和K439E。例如,一个Fc结构域单体(例如,具有空腔(Y349C、T366S、L368A和Y407V)的Fc结构域单体)还可以包括K370D突变,并且另一个Fc结构域单体(例如,具有突起(S354C和T366W)的

Fc结构域单体)可以包括E357K。

[0251] 更一般地,可以将以下任何空腔突变(或突变组合)与表4中的突变组合:Y407T、Y407A、F405A、Y407T、T394S、T394W:Y407A、T366W:T394S、T366S:L368A:Y407V:Y349C和S3364H:F405,并且可以将以下任何突起突变(或突变组合)与表4中的突变组合:T366Y、T366W、T394W、F405W、T366Y:F405A、T366W:Y407A、T366W:S354C和Y349T:T394F,该突变与表4中与空腔突变(突变组合)组合使用的突变配对。

[0252] 更一般地,可以将以下任何空腔突变(或突变组合)与表3中的静电转向突变组合:Y407T、Y407A、F405A、Y407T、T394S、T394W:Y407A、T366W:T394S、T366S:L368A:Y407V:Y349C和S3364H:F405,并且可以将以下任何突起突变(或突变组合)与表3中的静电转向突变组合:T366Y、T366W、T394W、F405W、T366Y:F405A、T366W:Y407A、T366W:S354C和Y349T:T394F。

[0253] VI. 静电转向

[0254] 静电转向是利用肽、蛋白质结构域和蛋白质中带相反电荷的氨基酸之间的有利静电相互作用来控制更高级蛋白质分子的形成。在美国专利申请公开号2014-0024111中公开了使用静电转向效应来改变抗体结构域的相互作用以减少同二聚体形成的方法,有利于在双特异性抗体的生成中的异二聚体形成。

[0255] 在本公开中,使用静电转向来控制Fc结构域单体的二聚化和Fc-抗原结合结构域构建体的形成。具体地,为了使用静电转向来控制Fc结构域单体的二聚化,用带正电荷或带负电的氨基酸残基替换构成 C_H3-C_H3 界面的一个或多个氨基酸残基,使得相互作用取决于引入的具体带电氨基酸而变得具有静电有利或不利。在一些实施方案中,用带负电荷的氨基酸(诸如天冬氨酸或谷氨酸)替换界面中带正电荷的氨基酸(诸如赖氨酸、精氨酸或组氨酸)。在其他实施方案中,用带正电荷的氨基酸替换界面中带负电荷的氨基酸。可将带电氨基酸引入相互作用的 C_H3 抗体恒定结构域中的一者或两者。通过将带电氨基酸引入相互作用的 C_H3 抗体恒定结构域,产生二聚化选择性模块(上文进一步描述),这些二聚化选择性模块可以选择性地形成Fc结构域单体的二聚体,如由来源于带电氨基酸之间的相互作用的静电转向效应控制。

[0256] 在一些实施方案中,为了产生包括反向电荷的二聚化选择性模块(该二聚化选择性模块可以选择性地形成Fc结构域单体的二聚体,如由静电转向效应控制),可通过异二聚化或同二聚化选择性地形成两个Fc结构域单体。

[0257] Fc结构域单体的异二聚化

[0258] 可以通过在两个Fc结构域单体中引入不同但相容的突变(诸如表4中包括的电荷残基对,但不限于此)来促进Fc结构域单体的异二聚化。在一些实施方案中,Fc结构域单体可包括以下带正电荷和带负电荷的氨基酸置换中的一者或多者:D356K、D356R、E357K、E357R、K370D、K370E、K392D、K392E、D399K、K409D、K409E、K439D和K439E,例如D356K、D356R、E357K、E357R、K370D、K370E、K392D、K392E、D399K、K409D、K409E、K439D和K439E中的1、2、3、4或5个或更多个。在一个实例中,包含带正电荷的氨基酸置换(例如,D356K或E357K)的Fc结构域单体和包含带负电荷的氨基酸置换(例如,K370D或K370E)的Fc结构域单体可通过带电氨基酸的有利静电转向选择性地组合以形成Fc结构域。在另一个实例中,包含E357K的Fc结构域单体和包含K370D的Fc结构域单体可通过带电氨基酸的有利静电转向选择性地组合以形成Fc结构域。在另一个实例中,包含E356K和D399K的Fc结构域单体和包含K392D和K409D

的Fc结构域单体可通过带电氨基酸的有利静电转向选择性地组合以形成Fc结构域。

[0259] “异二聚体Fc结构域”是指通过两个Fc结构域单体的异二聚化形成的Fc结构域，其中两个Fc结构域单体含有促进这两个Fc结构域单体的有利形成的不同反向电荷突变(异二聚化选择性模块)(参见例如，表4中的突变)。在一个实例中，在具有三个Fc结构域的Fc-抗原结合结构域构建体中，三个Fc结构域中的两个可通过两个Fc结构域单体的异二聚化形成，如通过静电转向效应促进。

[0260] 表4:Fc异二聚化方法(静电转向)

[0261]

方法	突变(链A) (Fc 结构域单体 1 的 CH3 结构域)	突变(链B) (Fc 结构域单体 2 的 CH ₃ 结构域)	参考文献
静电转向	K409D	D399K	US 2014/0024111
静电转向	K409D	D399R	US 2014/0024111
静电转向	K409E	D399K	US 2014/0024111
静电转向	K409E	D399R	US 2014/0024111
静电转向	K392D	D399K	US 2014/0024111
静电转向	K392D	D399R	US 2014/0024111
静电转向	K392E	D399K	US 2014/0024111
静电转向	K392E	D399R	US 2014/0024111
静电转向 (DD-KK)	K392D, K409D	E356K, D399K	Gunasekaran 等 人, <i>J Biol Chem.</i> 285: 19637-46, 2010
静电转向	K370E, K409D, K439E	E356K, E357K, D399K	WO 2006/106905
旋钮-进入-孔 洞加静电转向	S354C, E357K, T366W	Y349C, T366S, L368A, K370D, Y407V	WO 2015/168643
静电转向	K370D	E357K	US 2014/0024111
静电转向	K370D	E357R	US 2014/0024111
静电转向	K370E	E357K	US 2014/0024111
静电转向	K370E	E357R	US 2014/0024111
静电转向	K370D	D356K	US 2014/0024111
静电转向	K370D	D356R	US 2014/0024111
静电转向	K370E	D356K	US 2014/0024111
静电转向	K370E	D356R	US 2014/0024111

[0262]	静电转向	K370E, K409D, K439E	E356K, E357K, D399K	US 2014/0024111
--------	------	---------------------	---------------------	--------------------

[0263] 注意：所有残基均按EU编号方案 (Edelman等人, Proc Natl Acad Sci USA, 63:78-85, 1969) 进行编号

[0264] Fc结构域单体的同二聚化

[0265] 可以通过以对称方式在两个Fc结构域单体中引入相同的静电转向突变(同二聚化选择性模块)来促进Fc结构域单体的同二聚化。在一些实施方案中,两个Fc结构域单体包括在C_H3结构域之间的界面处的带电残基环内至少两个位置中包含相同的反向电荷突变的同二聚化选择性模块。通过逆转两个Fc结构域单体中的两个或更多个互补残基对的两个成员的电荷,突变的Fc结构域单体保持与相同突变序列的Fc结构域单体互补,但与不含那些突变的Fc结构域单体具有更低的互补性。可被引入Fc结构域单体中以促进其同二聚化的静电转向突变在表5和表6中示出,但不限于此。在一个实施方案中,Fc结构域包括两个Fc结构域单体,每个Fc结构域单体包括双重反向电荷突变体(表5),例如K409D/D399K。在另一个实施方案中,Fc结构域包括两个Fc结构域单体,每个Fc结构域单体包括四重反向突变体(表6),例如K409D/D399K/K370D/E357K。

[0266] 例如,在具有三个Fc结构域的Fc-抗原结合结构域构建体中,三个Fc结构域中的一个可通过两个Fc结构域单体的同二聚化形成,如通过静电转向效应促进。“同二聚体Fc结构域”是指通过两个Fc结构域单体的同二聚化形成的Fc结构域,其中两个Fc结构域单体含有相同的反向电荷突变(参见例如,表5和表6中的突变)。在具有三个Fc结构域(一个羧基末端“茎”Fc结构域和两个氨基末端“分支”Fc结构域)的Fc-抗原结合结构域构建体中,羧基末端“茎”Fc结构域可以是同二聚体Fc结构域(也称为“茎同二聚体Fc结构域”)。茎同二聚体Fc结构域可由两个Fc结构域单体形成,每个Fc结构域单体含有双重突变体K409D/D399K。

[0267] 表5:Fc同二聚化方法

[0268]	方法	突变(链 A 和 B) (Fc 结构域单体 1 和 2 的 CH3 结构域)	参考文献
	野生型	无	
	静电转向 (KD)	D399K, K409D	Gunasekaran 等人, <i>J Biol Chem.</i> 285: 19637-46, 2010, WO 2015/168643
	静电转向	D399K, K409E	Gunasekaran 等人, <i>J Biol Chem.</i> 285: 19637-46, 2010, WO 2015/168643
	静电转向	E357K, K370D	Gunasekaran 等人, <i>J Biol Chem.</i> 285: 19637-46,

[0269]

方法	突变 (链 A 和 B) (Fc 结构域单体 1 和 2 的 CH3 结构域)	参考文献
		2010, WO 2015/168643
静电转向	E357K, K370E	Gunasekaran 等人, <i>J Biol Chem.</i> 285: 19637-46, 2010, WO 2015/168643
静电转向	D356K, K439D	Gunasekaran 等人, <i>J Biol Chem.</i> 285: 19637-46, 2010, WO 2015/168643
静电转向	D356K, K439E	Gunasekaran 等人, <i>J Biol Chem.</i> 285: 19637-46, 2010, WO 2015/168643
静电转向	K392D, D399K	Gunasekaran 等人, <i>J Biol Chem.</i> 285: 19637-46, 2010, WO 2015/168643
静电转向	K392E, D399K	Gunasekaran 等人, <i>J Biol Chem.</i> 285: 19637-46, 2010, WO 2015/168643
静电转向	D399R, K409D	
静电转向	D399R, K409E	
静电转向	D399R, K392D	
静电转向	D399R, K392E	
静电转向	E357K, K370D	
静电转向	E357R, K370D	
静电转向	E357K, K370E	
静电转向	E357R, K370E	
静电转向	D356K, K370D	
静电转向	D356R, K370D	
静电转向	D356K, K370E	
静电转向	D356R, K370E	

[0270] 注意:所有残基均按EU编号方案 (Edelman等人, Proc Natl Acad Sci USA, 63:78-85, 1969) 进行编号

[0271] 表6:Fc同二聚化突变—四个反向电荷

[0272]

同二聚体 Fc 结构域中两个 Fc 结构域单体中每一个的 C _H 3 恒定结构域中的反向电荷突变	同二聚体 Fc 结构域中两个 Fc 结构域单体中每一个的 C _H 3 结构域中的反向电荷突变
---	---

[0273]

同二聚体 Fc 结构域中两个 Fc 结构域单体中每一个的 C _{H3} 恒定结构域中的反向电荷突变	同二聚体 Fc 结构域中两个 Fc 结构域单体中每一个的 C _{H3} 结构域中的反向电荷突变
K409D/D399K/K370D/E357K	K392D/D399K/K370D/E357K
K409D/D399K/K370D/E357R	K392D/D399K/K370D/E357R
K409D/D399K/K370E/E357K	K392D/D399K/K370E/E357K
K409D/D399K/K370E/E357R	K392D/D399K/K370E/E357R
K409D/D399K/K370D/D356K	K392D/D399K/K370D/D356K
K409D/D399K/K370D/D356R	K392D/D399K/K370D/D356R
K409D/D399K/K370E/D356K	K392D/D399K/K370E/D356K
K409D/D399K/K370E/D356R	K392D/D399K/K370E/D356R
K409D/D399R/K370D/E357K	K392D/D399R/K370D/E357K
K409D/D399R/K370D/E357R	K392D/D399R/K370D/E357R
K409D/D399R/K370E/E357K	K392D/D399R/K370E/E357K
K409D/D399R/K370E/E357R	K392D/D399R/K370E/E357R
K409D/D399R/K370D/D356K	K392D/D399R/K370D/D356K
K409D/D399R/K370D/D356R	K392D/D399R/K370D/D356R
K409D/D399R/K370E/D356K	K392D/D399R/K370E/D356K
K409D/D399R/K370E/D356R	K392D/D399R/K370E/D356R
K409E/D399K/K370D/E357K	K392E/D399K/K370D/E357K
K409E/D399K/K370D/E357R	K392E/D399K/K370D/E357R
K409E/D399K/K370E/E357K	K392E/D399K/K370E/E357K
K409E/D399K/K370E/E357R	K392E/D399K/K370E/E357R
K409E/D399K/K370D/D356K	K392E/D399K/K370D/D356K
K409E/D399K/K370D/D356R	K392E/D399K/K370D/D356R
K409E/D399K/K370E/D356K	K392E/D399K/K370E/D356K
K409E/D399K/K370E/D356R	K392E/D399K/K370E/D356R
K409E/D399R/K370D/E357K	K392E/D399R/K370D/E357K
K409E/D399R/K370D/E357R	K392E/D399R/K370D/E357R
K409E/D399R/K370E/E357K	K392E/D399R/K370E/E357K
K409E/D399R/K370E/E357R	K392E/D399R/K370E/E357R
K409E/D399R/K370D/D356K	K392E/D399R/K370D/D356K
K409E/D399R/K370D/D356R	K392E/D399R/K370D/D356R
K409E/D399R/K370E/D356K	K392E/D399R/K370E/D356K
K409E/D399R/K370E/D356R	K392E/D399R/K370E/D356R

[0274] 注意：所有残基均按EU编号方案 (Edelman等人, Proc Natl Acad Sci USA, 63:78-85, 1969) 进行编号

[0275] 其他异二聚化方法

[0276] 已经描述了许多其他异二聚化技术。可以将这些技术(表7)中的任何一种或多种与本文所述的任何旋钮-进入-孔洞和/或静电转向异二聚化和/或同二聚化技术组合,以产生Fc-抗原结合结构域构建体。

[0277] 表7:其他Fc异二聚化方法

[0278]

方法	突变(链 A)	突变(链 B)	参考文献
ZW1 (VYAV-VLLW)	T350V, L351Y, F405A, Y407V	T350V, T366L, K392L, T394W	Von Kreudenstein 等人, MAbs, 5:646-54, 2013
IgG1 铰链/CH3 电荷对 (EEE-RRR)	D221E, P228E, L368E	D221R, P228R, K409R	Strop 等人, J Mol Biol, 420:204-19, 2012
EW-RVT	K360E, K409W	Q347R, D399V, F405T	Choi 等人, Mol Cancer Ther, 12:2748-59, 2013
EW-RVT _{S-S}	K360E, K409W, Y349C	Q347R, D399V, F405T, S354C	Choi 等人, Mol Immunol, 65:377-83, 2015
电荷引入 (DK Biclonic)	L351D	T366K	De Nardis, J Biol Chem, 292:14706-17, 2017
电荷引入 (DEKK Biclonic)	L351D, L368E	L351K, T366K	De Nardis, J Biol Chem, 292:14706-17, 2017
DuoBody (L-R)	F405L	K409R	Labrijn 等人, Proc Natl Acad Sci USA, 110:5145-50, 2013
SEEDbody	IgG/A 嵌合体	IgG/A 嵌合体	Davis 等人, Protein Eng Des Sel, 23:195-202, 2010
BEAT (A/B)	S364K, T366V, K370T, K392Y, F405S, Y407V, K409W, T411N	Q347E, Y349A, L351F, S364T, T366V, K370T, T394D, V397L, D399E, F405A, Y407S, K409R, T411R	Skegro 等人, J Biol Chem, 292:9745-59, 2017
BEAT (A/B min)	S364K, T366V, K370T, K392Y, K409W, T411N	F405A, Y407S	Skegro 等人, J Biol Chem, 292:9745-59, 2017

方法	突变 (链 A)	突变 (链 B)	参考文献
BEAT (A/B + Q)	Q347A, S364K, T366V, K370T, K392Y, F405S, Y407V, K409W, T411N	Q347E, Y349A, L351F, S364T, T366V, K370T, T394D, V397L, D399E, F405A, Y407S, K409R, T411R	Skegro 等人, J Biol Chem, 292:9745-59, 2017
[0279] BEAT (A/B - T)	S364K, T366V, K370T, K392Y, F405S, Y407V, K409W, T411N	Q347E, Y349A, L351F, S364T, T366V, K370T, T394D, V397L, D399E, F405A, Y407S, K409R	Skegro 等人, J Biol Chem, 292:9745-59, 2017
7.8.60 (DMA-RRVV)	K360D, D399M, Y407A	E345R, Q347R, T366V, K409V	Leaver-Fay 等人, Structure, 24:641-51, 2016
20.8.34 (SYMV-GDQA)	Y349S, K370Y, T366M, K409V	E356G, E357D, S364Q, Y407A	Leaver-Fay 等人, Structure, 24:641-51, 2016

[0280] 注意:所有残基均按EU编号方案 (Edelman等人, Proc Natl Acad Sci USA, 63:78-85, 1969) 进行编号

[0281] VII. 接头

[0282] 在本公开中, 接头用于描述多肽或蛋白质结构域和/或结合的非蛋白质部分之间的键合或连接。在一些实施方案中, 接头是至少两个Fc结构域单体之间的键合或连接, 接头将第一Fc结构域单体的C_H3抗体恒定结构域的C末端与第二Fc结构域单体的铰链结构域的N末端连接, 使得两个Fc结构域单体彼此串联连接。在其他实施方案中, 接头是Fc结构域单体与附接到其上的任何其他蛋白质结构域之间的键合。例如, 接头可以将Fc结构域单体的C_H3抗体恒定结构域的C末端附接到白蛋白结合肽的N末端。

[0283] 接头可以是简单的共价键 (例如, 肽键)、合成聚合物 (例如, 聚乙二醇 (PEG) 聚合物) 或由化学反应 (例如, 化学缀合) 产生的任何种类的键。在接头是肽键的情况下, 在一个蛋白质结构域的C末端处的羧酸基团可以在缩合反应中与另一个蛋白质结构域的N末端的氨基反应, 以形成肽键。具体地, 肽键可以通过本领域众所周知的常规有机化学反应由合成手段形成, 或通过天然产生由宿主细胞形成, 其中编码以串联系列的两种蛋白质的DNA序列的多核苷酸序列, 例如两个Fc结构域的单体, 可以通过宿主细胞中的必需分子机器, 例如DNA聚合酶和核糖体, 直接转录且翻译成编码两种蛋白质的连续多肽。

[0284] 在接头是合成聚合物例如PEG聚合物的情况下, 聚合物可以在每个末端处用反应性化学官能团官能化, 以与在两个蛋白质的连接末端处的末端氨基酸反应。

[0285] 在接头 (除了上述肽键之外) 由化学反应制成的情况下, 可以分别将化学官能团 (例如, 胺、羧酸、酯、叠氮化物或本领域常用的其他官能团) 合成地附接到一种蛋白质的C末端和另一种蛋白质的N末端。然后两个官能团可以通过合成化学手段反应, 以形成化学键, 因此将两种蛋白质连接在一起。此类化学缀合程序对于本领域技术人员是常规的。

[0286] 间隔物

[0287] 在本公开中,两个Fc结构域单体之间的接头可以是包括3-200个氨基酸的氨基酸间隔物(例如,3-200、3-180、3-160、3-140、3-120、3-100、3-90、3-80、3-70、3-60、3-50、3-45、3-40、3-35、3-30、3-25、3-20、3-15、3-10、3-9、3-8、3-7、3-6、3-5、3-4、4-200、5-200、6-200、7-200、8-200、9-200、10-200、15-200、20-200、25-200、30-200、35-200、40-200、45-200、50-200、60-200、70-200、80-200、90-200、100-200、120-200、140-200、160-200或180-200个氨基酸)。在一些实施方案中,两个Fc结构域单体之间的接头是含有至少12个氨基酸(诸如12-200个氨基酸(例如,12-200、12-180、12-160、12-140、12-120、12-100、12-90、12-80、12-70、12-60、12-50、12-40、12-30、12-20、12-19、12-18、12-17、12-16、12-15、12-14或12-13个氨基酸)(例如,14-200、16-200、18-200、20-200、30-200、40-200、50-200、60-200、70-200、80-200、90-200、100-200、120-200、140-200、160-200、180-200或190-200个氨基酸))的氨基酸间隔物。在一些实施方案中,两个Fc结构域单体之间的接头是含有12-30个氨基酸(例如,12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个氨基酸)的氨基酸间隔物。合适的肽间隔物是本领域已知的,并且包括例如含有柔性氨基酸残基(诸如甘氨酸和丝氨酸)的肽接头。在某些实施方案中,间隔物可以含有GS、GGS、GGGS (SEQ ID NO:1)、GGSG (SEQ ID NO:2)或SGGG (SEQ ID NO:3)的基序,例如多个或重复基序。在某些实施方案中,间隔物可以含有2至12个氨基酸,包括GS的基序,例如GS、GSGS (SEQ ID NO:4)、GSGSGS (SEQ ID NO:5)、GSGSGSGS (SEQ ID NO:6)、GSGSGSGSGS (SEQ ID NO:7)或GSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO:8)。在某些其他实施方案中,间隔物可以含有3至12个氨基酸,包括GGS的基序,例如GGS、GGS GGS (SEQ ID NO:9)、GGS GGS GGS (SEQ ID NO:10)和GGS GGS GGS GGS (SEQ ID NO:11)。在另外其他实施方案中,间隔物可以含有4至20个氨基酸,包括GGSG (SEQ ID NO:2)的基序,例如GGS GGS GGS (SEQ ID NO:12)、GGS GGS GGS GGS (SEQ ID NO:13)、GGS GGS GGS GGS GGS (SEQ ID NO:14)或GGS GGS GGS GGS GGS GGS (SEQ ID NO:15)。在其他实施方案中,间隔物可以含有GGGS (SEQ ID NO:1)的基序,例如GGGS GGS (SEQ ID NO:16)或GGGS GGS GGS GGS (SEQ ID NO:17)。在某些实施方案中,间隔物是SGGS GGS GGS GGS GGS (SEQ ID NO:18)。

[0288] 在一些实施方案中,两个Fc结构域单体之间的间隔物仅含有甘氨酸残基,例如至少4个甘氨酸残基(例如,4-200、4-180、4-160、4-140、4-40、4-100、4-90、4-80、4-70、4-60、4-50、4-40、4-30、4-20、4-19、4-18、4-17、4-16、4-15、4-14、4-13、4-12、4-11、4-10、4-9、4-8、4-7、4-6或4-5个甘氨酸残基)(例如,4-200、6-200、8-200、10-200、12-200、14-200、16-200、18-200、20-200、30-200、40-200、50-200、60-200、70-200、80-200、90-200、100-200、120-200、140-200、160-200、180-200或190-200个甘氨酸残基)。在某些实施方案中,间隔物具有4-30个甘氨酸残基(例如,4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个甘氨酸残基)。在一些实施方案中,仅含有甘氨酸残基的间隔物可不被糖基化(例如,0-连接糖基化,也称为O-糖基化),或与例如含有一个或多个丝氨酸残基的间隔物(例如,SGGS GGS GGS GGS GGS GGS (SEQ ID NO:18))相比,可具有降低水平的糖基化(例如,降低水平的O-糖基化)(例如,降低水平的用聚糖(诸如木糖、甘露糖、唾液酸、岩藻糖(Fuc)和/或半乳糖(Gal)(例如,木糖))进行的O-糖基化)。

[0289] 在一些实施方案中,仅含有甘氨酸残基的间隔物可不被O-糖基化(例如,0-木糖基化),或与例如含有一个或多个丝氨酸残基的间隔物(例如,SGGS GGS GGS GGS GGS GGS (SEQ ID

NO:18))相比,可具有降低水平的O-糖基化水平(例如,降低水平的O-木糖基化)。

[0290] 在一些实施方案中,仅含有甘氨酸残基的间隔物可不经蛋白水解,或与例如含有一个或多个丝氨酸残基的间隔物(例如,SGGSGGGSGGSGGGSGGG (SEQ ID NO:18))相比,可具有降低速率的蛋白水解。

[0291] 在某些实施方案中,间隔物可以含有GGGG (SEQ ID NO:19)的基序,例如GGGGGGGG (SEQ ID NO:20)、GGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:21)、GGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:22)或GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:23)。在某些实施方案中,间隔物可以含有GGGGG (SEQ ID NO:24)的基序,例如GGGGGGGGGG (SEQ ID NO:25)或GGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:26)。在某些实施方案中,间隔物是GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:27)。

[0292] 在其他实施方案中,间隔物还可以含有除甘氨酸和丝氨酸外的氨基酸,例如GENLYFQSGG (SEQ ID NO:28)、SACYCELS (SEQ ID NO:29)、RSIAT (SEQ ID NO:30)、RPACKIPNDLKQKVMNH (SEQ ID NO:31)、GGSAGGSGSGSSGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG (SEQ ID NO:32)、AAANSSIDLISVPVDSR (SEQ ID NO:33)或GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGS (SEQ ID NO:34)。

[0293] 在本公开的某些实施方案中,使用12或20个氨基酸肽间隔物串联连接两个Fc结构域单体,所述12和20个氨基酸的肽间隔物由序列GGGSGGGSGGGS (SEQ ID NO:35)和SGGSGGGSGGSGGGSGGSGG (SEQ ID NO:18)组成。在其他实施方案中,可使用由序列GGSGGGSGGSGGGSGGSGG (SEQ ID NO:36)组成的18个氨基酸肽间隔物。

[0294] 在一些实施方案中,两个Fc结构域单体之间的间隔物可具有与上文所述的SEQ ID NO:1-36中任一者的序列具有至少75%同一性(例如,至少77%、79%、81%、83%、85%、87%、89%、91%、93%、95%、97%、99%或99.5%同一性)的序列。在某些实施方案中,两个Fc结构域单体之间的间隔物可具有与SEQ ID NO:17、18、26和27中任一者的序列具有至少80%同一性(例如,至少82%、85%、87%、90%、92%、95%、97%、99%或99.5%同一性)的序列。在某些实施方案中,两个Fc结构域单体之间的间隔物可具有与SEQ ID NO:18或27的序列具有至少80%同一性(例如,至少82%、85%、87%、90%、92%、95%、97%、99%或99.5%同一性)的序列。

[0295] 在某些实施方案中,Fc结构域单体的铰链的氨基末端与同一多肽中的Fc单体的羧基末端之间的接头(即,该接头将第一Fc结构域单体的CH3抗体恒定结构域的C-末端与第二Fc结构域单体的铰链结构域的N-末端连接,使得两个Fc结构域单体彼此串联连接)是具有3个或更多个氨基酸(例如,3-200个氨基酸(例如,3-200、3-180、3-160、3-140、3-120、3-100、3-90、3-80、3-70、3-60、3-50、3-45、3-40、3-35、3-30、3-25、3-20、3-15、3-10、3-9、3-8、3-7、3-6、3-5、3-4、4-200、5-200、6-200、7-200、8-200、9-200、10-200、15-200、20-200、25-200、30-200、35-200、40-200、45-200、50-200、60-200、70-200、80-200、90-200、100-200、120-200、140-200、160-200或180-200个氨基酸))的间隔物而不是共价键或含有至少12个氨基酸(诸如12-200个氨基酸,例如12-200、12-180、12-160、12-140、12-120、12-100、12-90、12-80、12-70、12-60、12-50、12-40、12-30、12-20、12-19、12-18、12-17、12-16、12-15、12-14或12-13个氨基酸)(例如14-200、16-200、18-200、20-200、30-200、40-200、50-200、60-200、70-200、80-200、90-200、100-200、120-200、140-200、160-200、180-200或190-200个氨基酸)的氨基酸间隔物。

[0296] 间隔物也可以存在于Fc结构域单体的铰链结构域的N-末端与CD38结合结构域(例如,CD38重链结合结构域的CH1结构域或CD38轻链结合结构域的CL结构域)的羧基末端之间,使得这些结构域通过3个或更多个氨基酸(例如,3-200个氨基酸(例如,3-200、3-180、3-160、3-140、3-120、3-100、3-90、3-80、3-70、3-60、3-50、3-45、3-40、3-35、3-30、3-25、3-20、3-15、3-10、3-9、3-8、3-7、3-6、3-5、3-4、4-200、5-200、6-200、7-200、8-200、9-200、10-200、15-200、20-200、25-200、30-200、35-200、40-200、45-200、50-200、60-200、70-200、80-200、90-200、100-200、120-200、140-200、160-200或180-200个氨基酸))的间隔物或含有至少12个氨基酸(诸如12-200个氨基酸,例如12-200、12-180、12-160、12-140、12-120、12-100、12-90、12-80、12-70、12-60、12-50、12-40、12-30、12-20、12-19、12-18、12-17、12-16、12-15、12-14或12-13个氨基酸)(例如14-200、16-200、18-200、20-200、30-200、40-200、50-200、60-200、70-200、80-200、90-200、100-200、120-200、140-200、160-200、180-200或190-200个氨基酸)的氨基酸间隔物连接。

[0297] VII. 血清蛋白结合肽

[0298] 与血清蛋白肽结合可以改善蛋白质药物的药代动力学,并且具体地,可将本文描述的Fc-抗原结合结构域构建体与血清蛋白结合肽融合。

[0299] 作为一个实例,可以用于本文所述的方法和组合物中的白蛋白结合肽是本领域一般已知的。在一个实施方案中,白蛋白结合肽包括序列DICLPRWGCLW(SEQ ID NO:37)。在一些实施方案中,白蛋白结合肽具有与SEQ ID NO:37的序列至少80%同一性(例如,80%、90%或100%同一性)的序列。

[0300] 在本公开中,可将白蛋白结合肽附接到Fc-抗原结合结构域构建体中的某些多肽的N末端或C末端。在一个实施方案中,可将白蛋白结合肽附接到含有抗原结合结构域的Fc构建体中的一个或多个多肽的C末端。在另一个实施方案中,可以将白蛋白结合肽融合到含有抗原结合结构域的Fc构建体中的编码串联连接的两个Fc结构域单体的多肽的C末端。在又一个实施方案中,可以将白蛋白结合肽附接到与编码串联连接的两个Fc结构域单体的多肽中的第二Fc结构域单体连接的Fc结构域单体(例如,图1中的Fc结构域单体114和116;图2中的Fc结构域单体214和216)的C末端。可以将白蛋白结合肽遗传融合到Fc-抗原结合结构域构建体或通过化学手段(例如,化学缀合)附接到Fc-抗原结合结构域构建体。如果需要,可以在Fc-抗原结合结构域构建体与白蛋白结合肽之间插入间隔物。不受理论束缚,预期在本公开的Fc-抗原结合结构域构建体中包括白蛋白结合肽可通过其与血清白蛋白结合延长治疗性蛋白质的保留。

[0301] VIII. Fc-抗原结合结构域构建体

[0302] 一般来讲,本公开的特征在于具有2-10个Fc结构域以及附接的一个或多个抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体。这些Fc结构域对于Fc受体(例如,Fc γ RIIIa)可具有比单个野生型Fc结构域更高的结合亲和力和/或亲合力。本公开公开了工程化两个相互作用的C_H3抗体恒定结构域的界面处的氨基酸的方法,使得Fc结构域的两个Fc结构域单体彼此选择性地形成二聚体,从而防止形成不需要的多聚体或聚集体。Fc-抗原结合结构域构建体包括偶数数量的Fc结构域单体,其中每对Fc结构域单体形成Fc结构域。Fc-抗原结合结构域构建体至少包括由四个Fc结构域单体和一个抗原结合结构域的二聚体形成的两个功能性Fc结构域。可例如用接头、间隔物、肽键、化学键或化学部分将抗原结合结构域与Fc结

构域连接。在一些实施方案中,本公开涉及工程化第一对两个相互作用的CH3抗体恒定结构域的界面处选自表3和表4的一组氨基酸置换以及工程化第二对两个相互作用的CH3抗体恒定结构域的界面处选自表3和表4的第二组氨基酸置换(不同于第一组氨基酸置换)的方法,使得Fc结构域的第一对两个Fc结构域单体彼此选择性地形成二聚体,并且Fc结构域的第二对两个Fc结构域单体彼此选择性地形成二聚体,从而防止形成不需要的多聚体或聚集体。

[0303] Fc-抗原结合结构域构建体可以以许多方式组装。Fc-抗原结合结构域构建体可以由不对称串联Fc结构域组装而成。Fc-抗原结合结构域构建体可以由单分支的Fc结构域组装而成,其中分支点在N末端Fc结构域。Fc-抗原结合结构域构建体可以由单分支的Fc结构域组装而成,其中分支点在C末端Fc结构域。Fc-抗原结合结构域构建体可以由单分支的Fc结构域组装而成,其中分支点在N末端或C末端Fc结构域。可以使用具有不同抗原结合结构域序列的长链和短链将Fc-抗原结合结构域构建体组装形成双特异性构建体。可以使用具有不同组异二聚化突变和不同抗原结合结构域的链将Fc-抗原结合结构域构建体组装形成双特异性和三特异性构建体。双特异性Fc-抗原结合结构域构建体包括两个不同的抗原结合结构域。三特异性Fc-抗原结合结构域构建体包括三个不同的抗原结合结构域。

[0304] 可以以许多方式将抗原结合结构域与Fc-抗原结合结构域构建体连接。可以将抗原结合结构域表达为Fc链的融合蛋白。可以将抗原的重链组分表达为Fc链的融合蛋白,并且可以将轻链组分表达为单独的多肽(图16A)。在一些实施方案中,将scFv用作抗原结合结构域。可以将scFv表达为长Fc链的融合蛋白(图16B)。在一些实施方案中,单独表达重链和轻链组分并将其外源添加到Fc-抗原结合结构域构建体中。在一些实施方案中,单独表达抗原结合结构域,稍后利用化学键将其与Fc-抗原结合结构域构建体连接(图16C)。

[0305] 在一些实施方案中,Fc-抗原结合结构域构建体中的一个或多个Fc多肽缺乏C末端赖氨酸残基。在一些实施方案中,Fc-抗原结合结构域构建体中的所有Fc多肽缺乏C末端赖氨酸残基。在一些实施方案中,在Fc-抗原结合结构域构建体中的一个或多个Fc多肽中不存在C末端赖氨酸可改善Fc-抗原结合结构域构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc-抗原结合结构域构建体)(例如,具有至少85%、90%、95%、98%或99%同质性的具有三个Fc结构域的Fc-抗原结合结构域构建体群体)的同质性。

[0306] 在一些实施方案中,将本文所述的Fc-抗原结合结构域构建物中的N末端Asp突变为Gln。

[0307] 对于本文实施例中描述的示例性Fc-抗原结合结构域构建体,Fc-抗原结合结构域构建体1-28可分别在旋钮和孔洞亚基中包含E357K和K370D电荷对。Fc-抗原结合结构域构建体29-42可以使用可含有E357K和K370D对的正交静电转向突变,并且还可以包括其他转向突变。对于具有正交旋钮和孔洞的Fc-抗原结合构建体29-42,除了一个正交对外,都需要静电转向突变,并且这些静电转向突变可包括在所有正交对中。

[0308] 在一些实施方案中,如果需要两个正交旋钮和孔洞,则旋钮1的静电转向修饰可以是E357K,而孔洞1的静电转向修饰可以是K370D,并且旋钮2的静电转向修饰可以是K370D,而孔洞2的静电转向修饰可以是E357K。如果需要第三正交旋钮和孔洞(例如,对于三特异性抗体),则可为旋钮3添加静电转向修饰E357K和D399K,而为孔洞3添加静电转向修饰K370D和K409D,或者可为旋钮3添加静电转向修饰K370D和K409D,而孔洞3添加静电转向修饰E357K和D399K。

[0309] 本文所述的示例性Fc-抗原结合结构域构建体(例如,Fc-抗原结合结构域构建体1-42)中的任何一种相对于具有单个Fc结构域和抗原结合结构域的构建体可以在抗体依赖性细胞毒性(ADCC)测定、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)测定中具有增强的效应子功能,或可以包括具有单个Fc结构域和抗原结合结构域的构建体不显示的生物活性。

[0310] IX. 宿主细胞和蛋白质的产生

[0311] 在本公开中,宿主细胞指包括从其对应的核酸表达本文所述多肽和构建体所需的必要细胞组分(例如,细胞器)的媒介物。核酸可包括在核酸载体中,可以通过本领域已知的常规技术(转化、转染、电穿孔、磷酸钙沉淀、直接显微注射等)将所述核酸载体引入宿主细胞中。宿主细胞可以是哺乳动物、细菌、真菌或昆虫起源。哺乳动物宿主细胞包括但不限于CHO(或CHO衍生的细胞株,例如CHO-K1、CHO-DXB11 CHO-DG44)、鼠宿主细胞(例如NS0、Sp2/0)、VERY、HEK(例如HEK293)、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20和T47D、CRL7030和HsS78Bst细胞。还可以选择宿主细胞,其调节蛋白质构建体的表达,或以所需的特定方式修饰且加工蛋白质产物。不同的宿主细胞具有蛋白质产物的翻译后加工和修饰的特征和特异性机制。可以选择合适的细胞系或宿主系统,以确保表达的蛋白质的正确修饰和加工。

[0312] 为了从其相应的DNA质粒构建体表达和分泌蛋白质产物,可以用通过本领域已知的适当表达控制元件控制的DNA转染或转化宿主细胞,所述表达控制元件包括启动子、增强子、序列、转录终止子、多腺苷酸化位点和可选择标记物。用于表达治疗性蛋白质的方法是本领域已知的。参见例如,Paulina Balbas,Argelia Lorence(编辑)Recombinant Gene Expression:Reviews and Protocols(Methods in Molecular Biology),Humana Press;2004版本第2版(2004年7月20日);Vladimir Voynov和Justin A.Caravella(编辑)Therapeutic Proteins:Methods and Protocols(Methods in Molecular Biology)Humana Press;2012版本第2版(2012年6月28日)。

[0313] 在一些实施方案中,通过用编码组装成Fc构建体的多肽的DNA质粒构建体转染的宿主细胞产生(细胞培养上清液中)的至少50%的Fc-抗原结合结构域构建体在结构上相同(例如,以摩尔为基础),例如50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%的Fc构建体在结构上相同。

[0314] X. 无岩藻糖基化

[0315] 每个Fc单体在Asn 297处包括N-糖基化位点。聚糖可以以多种不同形式存在于给定的Fc单体上。在含有抗体或本文所述的抗原结合Fc构建体的组合物中,聚糖可以是非常异质的,并且存在的聚糖的性质尤其取决于用于产生抗体或抗原结合Fc构建体的细胞的类型、细胞的生长条件(包括生长培养基)和产生后纯化。在各种情况下,将含有本文所述的构建体的组合物无岩藻糖基化至少某种程度。例如,至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%或95%存在于组合物中的聚糖(例如,Fc聚糖)缺乏岩藻糖残基。因此,5%-60%、5%-50%、5%-40%、10%-50%、10%-50%、10%-40%、20%-50%或20%-40%的聚糖缺乏岩藻糖残基。可以通过在1,3,4-三-O-乙酰基-2-脱氧基-2-氟-L-岩藻糖抑制剂存在下培养产生抗体的细胞来产生无岩藻糖基化至少某种程度的组合物。可以使用多种其他方法来产生本文所述的构建体和多肽的相对无岩藻糖基

化形式,包括:在FUT8表达降低或不表达的细胞中表达,以及在过表达 β -1,4-甘露糖基-糖蛋白4 β -N-乙酰氨基葡萄糖转移酶(GnT-III)的细胞中表达。

[0316] XI.纯化

[0317] 可以通过蛋白质纯化领域中已知的任何方法来纯化Fc-抗原结合结构域构建体,例如通过色谱法(例如,离子交换色谱法、亲和(例如,蛋白A亲和)色谱法和尺寸排阻柱色谱法)、离心、差异溶解度或通过用于蛋白质纯化的任何其他标准技术。例如,可以通过适当选择并组合亲和柱(诸如蛋白A柱)与色谱柱、过滤、超滤、盐析和透析程序来分离和纯化Fc-抗原结合结构域构建体(参见例如,Process Scale Purification of Antibodies,Uwe Gottschalk(编辑) John Wiley&Sons, Inc., 2009;以及Subramanian(编辑) Antibodies-Volume I-Production and Purification,Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York (2004))。

[0318] 在一些情况下,可以将Fc-抗原结合结构域构建体缀合到一种或多种纯化肽,以促进从例如全细胞裂解产物混合物中纯化和分离Fc-抗原结合结构域构建体。在一些实施方案中,纯化肽结合对纯化肽具有特异性亲和力的另一部分。在一些实施方案中,将与纯化肽特异性结合的此类部分附接到固体支持物,诸如基质、树脂或琼脂糖珠。可与Fc-抗原结合结构域构建体连接的纯化肽的实例包括但不限于六组氨酸肽、FLAG肽、myc肽和血凝素(HA)肽。六组氨酸肽(HHHHHH (SEQ ID NO:38))以微摩尔亲和力结合镍功能化的琼脂糖亲和柱。在一些实施方案中,FLAG肽包括序列DYKDDDDK (SEQ ID NO:39)。在一些实施方案中,FLAG肽包括串联的整数倍的序列DYKDDDDK,例如3xDYKDDDDK。在一些实施方案中,myc肽包括序列EQKLISEEDL (SEQ ID NO:40)。在一些实施方案中,myc肽包括串联的整数倍的序列EQKLISEEDL,例如3xEQKLISEEDL。在一些实施方案中,HA肽包括序列YPYDVPDYA (SEQ ID NO:41)。在一些实施方案中,HA肽包括串联的整数倍的序列YPYDVPDYA,例如3xYPYDVPDYA。特异性识别并结合FLAG、myc或HA纯化肽的抗体是本领域众所周知的,并且通常可商购获得。用这些抗体功能化的固体支持物(例如,基质、树脂或琼脂糖珠)可用于纯化包括FLAG、myc或HA肽的Fc-抗原结合结构域构建体。

[0319] 对于Fc-抗原结合结构域构建体,可将蛋白A柱色谱法用作纯化过程。蛋白A配体通过Fc区与Fc-抗原结合结构域构建体相互作用,使得蛋白A色谱法成为能够去除大部分宿主细胞蛋白的高选择性捕获过程。在本公开中,可使用如实施例4-8中所述的蛋白A柱色谱法来纯化Fc-抗原结合结构域构建体。

[0320] 在一些实施方案中,使用本文所述的异二聚化和/或同二聚化结构域允许制备具有60%或更高纯度的Fc-抗原结合结构域构建体,即其中细胞中产生的60%或更多的蛋白质构建体材料是所需的Fc构建体结构,例如制剂中60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的蛋白质构建体材料是所需的Fc构建体结构。在一些实施方案中,Fc-抗原结合结构域构建体的制剂中少于30%的蛋白质构建体材料是不期望的Fc构建体结构(例如,构建体的更高级物质,如实施例1所述),例如制剂中30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%或更少的蛋白质构建体材料是不期望的Fc构建体结构。在一些实施方案中,在使用一种或多种已知的纯化方法(例如,蛋白A亲和纯化)进一步纯化之后,Fc-抗原结合结构域构建体的最终纯度可以为80%或更高,即其中80%或更多的纯化蛋白质构建体材料是所需的Fc构建体结构,例如制剂中80%、85%、90%、95%、

96%、97%、98%、99%或100%的蛋白质构建体材料是所需的Fc构建体结构。在一些实施方案中,使用一种或多种已知的纯化方法(例如,蛋白A亲和纯化)进一步纯化的Fc-抗原结合结构域构建体的制剂中少于15%的蛋白质构建体材料是不期望的Fc构建体结构(例如,构建体的更高级物质,如实施例1所述),例如制剂中15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%或更少的蛋白质构建体材料是不期望的Fc构建体结构。

[0321] XII. 药物组合物/制剂

[0322] 本公开的特征在于包括一种或多种本文所述的Fc-抗原结合结构域构建体的药物组合物。在一个实施方案中,药物组合物包括在结构上相同或基本相同的基本上同质的Fc-抗原结合结构域构建体群体。在各种实例中,药物组合物包括Fc-抗原结合结构域构建体1-42中的任何一种的基本上同质的群体。

[0323] 可以将本公开的治疗性蛋白质构建体(例如,本文所述的Fc-抗原结合结构域构建体(例如,具有三个Fc结构域的Fc-抗原结合结构域构建体))结合到药物组合物中。包括治疗性蛋白质的药物组合物可以通过本领域技术人员已知的方法进行配制。药物组合物可以以可注射制剂的形式肠胃外施用,所述可注射制剂包括在水或另一种药学可接受的液体中的无菌溶液或悬浮液。例如,药物组合物可以通过以下过程进行配制:将Fc-抗原结合结构域构建体与药学可接受的媒介物或介质(诸如无菌注射用水(WFI)、生理盐水、乳化剂、悬浮剂、表面活性剂、稳定剂、稀释剂、粘合剂、赋形剂)适当组合,随后以普遍接受的药学实践所需的单位剂量形式混合。在药物制剂中包括的活性成分的量使得提供在指定范围内的合适剂量。

[0324] 用于注射的无菌组合物可以根据常规药学实践使用注射用蒸馏水作为媒介物进行配制。例如,生理盐水或含有葡萄糖和其他补充剂(诸如D-山梨糖醇、D-甘露糖、D-甘露糖醇和氯化钠)的等渗溶液可用作注射用水溶液,任选与本领域普遍已知的合适的增溶剂(例如,醇诸如乙醇和多元醇诸如丙二醇或聚乙二醇)和非离子表面活性剂(诸如聚山梨醇酯80TM、HCO-50)等组合。用于治疗性蛋白质产物的配制方法是本领域已知的,参见例如Banga(编辑)Therapeutic Peptides and Proteins:Formulation,Processing and Delivery Systems(第2版)Taylor&Francis Group,CRC Press(2006)。

[0325] XIII. 治疗方法和剂量

[0326] 本文所述的Fc-抗原结合结构域构建体可以用于治疗多种癌症(例如,血液恶性肿瘤和实体瘤)和自身免疫疾病。

[0327] 药物组合物以与剂量制剂相容的方式施用,并且以治疗有效的量施用,以导致症状的改善或纠正。药物组合物以各种剂型施用,例如静脉内剂型、皮下剂型、经口剂型如可摄取溶液、药物释放胶囊等等。用于各个受试者的适当剂量取决于治疗目标、施用途径和患者的状况。一般地,重组蛋白以1-200mg/kg(例如1-100mg/kg,例如20-100mg/kg)给药。相应地,医疗保健提供者有必要根据需要定制且和滴定剂量且修改施用途径,以获得最佳疗效。

[0328] XIV. 补体依赖性细胞毒性(CDC)

[0329] 本公开中描述的Fc-抗原结合结构域构建体能够激活各种Fc受体介导的效应子功能。免疫系统的一个组分是补体依赖性细胞毒性(CDC)系统,它是先天免疫系统的一部分,可增强抗体和吞噬细胞清除外源病原体的能力。三种生化途径激活补体系统:经典补体途径、替代补体途径和凝集素途径,这些途径都需要一组复杂的激活和信号级联。

[0330] 在经典补体途径中,IgG或IgM触发补体激活。C1q蛋白与抗原结合后与这些抗体结合,从而形成C1复合物。该复合物产生C1s酯酶,该酯酶将C4和C2蛋白裂解并激活为C4a和C4b以及C2a和C2b。然后,C2a和C4b片段形成称为C3转化酶的蛋白复合物,该蛋白复合物将C3裂解为C3a和C3b,从而使信号放大并形成膜攻击复合物。

[0331] 本公开的Fc-抗原结合结构域构建体能够通过免疫系统增强CDC活性。

[0332] 可通过使用比色测定来评估CDC,在该比色测定中,将抗原表达细胞(例如,Raji细胞(ATCC))用连续稀释的抗体、Fc-抗原结合结构域构建体或IVIg包被。可以将人血清补体(Quidel)以25%v/v添加到所有孔中,并且在37℃下温育2小时。在添加WST-1细胞增殖试剂(Roche Applied Science)后,可以将细胞在37℃下温育12小时。然后将板放置在振荡器上2分钟,并且可以测量450nm处的吸光度。

[0333] XV. 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)

[0334] 本公开的Fc-抗原结合结构域构建体还能够通过免疫系统增强抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)活性。ADCC是适应性免疫系统的一部分,在该系统中,抗体与外源病原体的表面抗原结合并靶向它们以致死亡。ADCC涉及通过抗体激活自然杀伤(NK)细胞。NK细胞表达Fc受体,这些受体与抗体(诸如IgG和IgM)的Fc部分结合。当抗体与病原体感染的靶细胞表面结合后,它们随后会结合NK细胞并激活它们。NK细胞释放细胞因子(诸如IFN- γ)和蛋白质(诸如穿孔素和颗粒酶)。穿孔素是在钙存在下低聚的成孔溶细胞素。颗粒酶是在靶细胞中诱导程序性细胞死亡的丝氨酸蛋白酶。除NK细胞外,巨噬细胞、嗜中性粒细胞和嗜酸性粒细胞也可以介导ADCC。

[0335] 可使用发光测定来评估ADCC。将人原代NK效应细胞(Hemacare)解冻,并使其在淋巴细胞生长培养基-3(Lonza)中以 5×10^5 个/mL在37℃下静息过夜。第二天,收获人淋巴瘤细胞系Raji靶细胞(ATCC CCL-86),将其重悬于测定培养基(无酚红RPMI,10%FBS Δ , GlutaMAXTM)中,并在37℃下在各种浓度的每种目的探针存在下铺板30分钟。然后收获静息NK细胞,将其重悬于测定培养基中,并添加到含有抗CD20包被的Raji细胞的板中。将板在37℃下温育6小时,其中效应子与靶细胞的最终比例为5:1(5×10^4 个NK细胞: 1×10^4 个Raji)。

[0336] 使用CytoTox-GloTM细胞毒性测定试剂盒(Promega)来确定ADCC活性。CytoTox-GloTM测定使用发光肽底物来测量死细胞蛋白酶活性,该蛋白酶活性由已经丧失膜完整性的细胞(例如,裂解的Raji细胞)释放。温育6小时后,将制备的试剂(底物)添加到板的每个孔中,并在室温下置于定轨板振荡器上15分钟。使用PHERAstar F5读板仪(BMG Labtech)测量发光。从测试条件中减去对照条件(仅NK细胞+Raji)的读数以消除背景后,分析数据。

[0337] XVI. 抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)

[0338] 本公开的Fc-抗原结合结构域构建体还能够通过免疫系统增强抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)活性。ADCP(也称为抗体调理作用)是吞噬细胞标记病原体摄入和清除的过程。吞噬细胞是通过摄入有害的外源病原体以及死亡或垂死的细胞来保护人体的细胞。该过程被病原体相关分子模式(PAMPS)激活,从而引起NF- κ B激活。然后,调理素(诸如C3b)和抗体可以附着到目标病原体上。当靶标被调理素包被时,Fc结构域经由其Fc受体吸引吞噬细胞。然后吞噬细胞吞噬细胞,并且摄入物质的吞噬体与溶酶体融合。然后,随后的吞噬溶酶体蛋白水解消化细胞物质。

[0339] 可使用生物发光测定来评估ADCP。抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)是治疗

性抗体的重要作用机制。ADCP可以由单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞和树突细胞经由Fc γ RIIa (CD32a)、Fc γ RI (CD64) 和Fc γ RIIIa (CD16a) 介导。三种受体都可以参与抗体识别、免疫受体聚簇和导致ADCP的信号事件;但是,阻断研究表明,Fc γ RIIa是参与该过程的主要Fc γ 受体。

[0340] Fc γ RIIa-H ADCP报告基因生物测定是一种基于生物发光细胞的测定,可以用于测量抗体和具有Fc结构域(特异性结合和激活Fc γ RIIa)的其他生物制剂的效力和稳定性。该测定由表达高亲和力人Fc γ RIIa-H变体的遗传工程化Jurkat T细胞系组成,该变体在氨基酸131处含有组氨酸(H)并且含有由NFAT响应元件(NFAT-RE)驱动的荧光素酶报告基因。

[0341] 当与靶细胞和相关抗体共培养时,Fc γ RIIa-H效应细胞结合抗体的Fc结构域,从而引起Fc γ RIIa信号传导和NFAT-RE介导的荧光素酶活性。检测生物发光信号并用荧光素酶测定和标准发光计进行定量。

[0342] 实施例

[0343] 提出以下实施例以向本领域普通技术人员提供完整的公开内容以及对如何执行、制备和评估本文所要求保护的方法和化合物的描述,并且这些实施例旨在仅是本公开的示例,并非旨在限制发明人视为其公开的内容的范围。

[0344] 实施例1. 正交异二聚化结构域控制包含线性Fc-抗原结构域的多肽的组装的用途

[0345] 已经描述了将Fc结构域附加到抗体的C末端的多种方法,包括在产生串联Fc构建体时,在Fc结构域之间具有和不具有肽接头的情况下(参见例如,Nagashima等人,Nagashima等人,Mol Immunol,45:2752-63,2008,以及Wang等人,MAbs,9:393-403,2017)。然而,在科学文献中描述的用于制备具有多个Fc结构域的抗体构建体的方法的有效性受到限制,因为这些方法导致产生许多包含Fc结构域的蛋白质的不期望物质。这些物质具有不同的分子量,这是由于在产物产生过程中多肽链的不受控制的错配缔合导致的,从而形成分子量的阶梯(参见例如,Nagashima等人,Mol Immunol,45:2752-63,2008,以及Wang等人,MAbs,9:393-403,2017)。图1和图2示意性地描绘了具有各种分子量的多个Fc结构域的蛋白质物质的一些实例,这些蛋白质物质可以通过包含两个串联Fc单体(图1)或三个串联Fc单体(图3)的多肽的错配缔合产生。使用这些现有方法一致地实现具有多个Fc结构域(具有明确的分子量)的所需Fc-抗原结合结构域构建体需要去除具有较大分子量的更高级物质(HOS),这大大降低了所需构建体的产率。

[0346] 使用正交异二聚化结构域允许产生具有串联Fc延伸的结构,而不产生大量的更高级物质(HOS)。图3A和图3B描绘了具有两个Fc结构域(图3A)或3个Fc结构域(图3B)的正交线性Fc-抗原结构域结合构建体的实例,这些构建体通过将具有多个Fc结构域单体的一个长多肽与两个不同的短多肽(各自具有单个Fc单体)连接而产生。在这些实例中,每个构建体的一个Fc结构域包括旋钮-进入-孔洞突变并结合该Fc结构域的CH3-CH3界面中的反向电荷突变,以及1个其他Fc结构域(图3A)或2个其他Fc结构域(图3B)的CH3-CH3界面中的两个反向电荷突变。具有Fc单体(具有两个反向电荷突变)的短多肽链对具有突起形成突变和单个反向电荷突变的长链Fc单体具有较低亲和力,并且更有可能与具有2个相容反向电荷突变的长链Fc单体结合。具有Fc单体的短多肽链(具有空腔形成突变并结合反向电荷突变)更有可能与具有突起形成突变并结合相容反向电荷突变的长链Fc单体结合。

[0347] 实施例2. 可以使用正交异二聚化结构域产生的Fc构建体结构的类型

[0348] 可以将具有选自表3和表4的不同旋钮-进入-孔洞和/或静电反向电荷突变的正交异二聚化结构域整合到不同的多肽链中,以控制组装Fc-抗原结合结构域构建体过程中多个抗原结合结构域和Fc结构域的定位。可以使用以下设计原理来产生各种不同结构的Fc-抗原结合结构域构建体:将至少两个正交异二聚化结构域结合到组装成这些构建体的多肽链中。

[0349] 图4描绘了使用正交异二聚化技术组装的线性串联Fc构建体的一些实例。这些结构实例证明了使用两组不同的异二聚化突变(一组Fc结构域(A和B)的Fc单体中的第一组异二聚化突变和另一组Fc结构域(C和D)的Fc单体中的第二组异二聚化突变)来控制多个抗原结合结构域沿着具有三个串联Fc结构域的构建体在各个特定位置处的定位。实施例4、5和6描述了与图4A、图4B和图4D的示意图中描绘的结构相对应的正交线性Fc-抗原结构域结合构建体的产生。在具有最少不希望的更高级物质的情况下产生具有抗CD20或抗PD-L1结构域的构建体45、46和47,并使用CDC、ADCP和ADCC测定测试这两种构建体的功能。

[0350] 也可以使用正交异二聚化技术来产生分支Fc-抗原结合结构域构建体,这些构建体具有抗原结合结构域和Fc结构域的对称分布(使用多肽链的不对称排列)。图5描绘了这些Fc构建体的一些实例。这些构建体具有使用一组异二聚化突变(C和D异二聚化对)在一个Fc结构域处连接在一起的两条长多肽链。另一组异二聚化突变(A和B异二聚化对)促进长链多肽的其他Fc结构域单体与小链多肽上的相容Fc结构域单体的缔合。这些分支构建体在结构上类似于对称分支构建体,而不是可以使用单个同二聚化Fc结构域产生。

[0351] 也可以使用正交异二聚化技术产生不对称分支Fc-抗原结合结构域构建体。图6描绘了不对称分支Fc构建体的一些实例。通过使用一组异二聚化突变(C和D异二聚化对)在一个Fc结构域处连接具有不同数量的Fc结构域的两条不同长度的多肽链(例如,具有3个Fc结构域和2个Fc结构域的多肽链)来产生构建体。一组不同的异二聚化突变(A和B异二聚化对)促进这些多肽链上的其他Fc结构域单体与小链多肽上的相容Fc结构域单体的缔合。另选地,图7描绘了通过使用一组异二聚化突变(C和D异二聚化对)在一个Fc结构域处连接两条长多肽链(具有相同数量的Fc结构域)而产生的不对称分支Fc构建体的实例,这些不对称分支Fc构建体具有奇数数量的不对称分布在分子上的抗原结合结构域。

[0352] 实施例3. 不对称分支Fc-抗原结合结构域构建体的制备

[0353] 设计并在细胞中产生两种不同的包含Fc的构建体,以测试使用正交异二聚化技术是否可以有效地生产不对称分支Fc-抗原结合结构域构建体。两种Fc构建体(图8和图9)各自具有三个Fc结构域,并且使用两组异二聚化结构域突变由三个不同的多肽组装而成。两种构建体都是具有Fc结构域的对称分布(使用多肽链的不对称排列)的分支Fc构建体,并且各自具有在构建体上不对称分布的单个抗CD20 Fab结构域。图8描绘了具有三个Fc结构域的Fc构建体,其中两个Fc结构域具有旋钮-进入-孔洞突变并结合静电转向突变(一个Fc结构域具有S354C和T366W突起形成突变和E357K反向电荷突变,而其他Fc结构域具有Y349C、T366S、L368A和Y407V空腔形成突变并结合K370D反向电荷突变),并且一个Fc结构域具有静电转向突变(一个Fc单体具有D356K和D399K反向电荷突变,而另一个Fc结构域具有K392D和K409D反向电荷突变)。图9描绘了使用相同的异二聚化突变组装而成的相对于图8的结构具有反向结构的Fc构建体,不同之处图9的Fc结构具有一个具有旋钮-进入-孔洞突变并结合静电转向突变的Fc结构域和两个仅具有静电转向突变的Fc结构域。表8描绘了这些构建体

的序列。

[0354] 表8.图8和图9中所描绘的构建体的序列

构建体	轻链	长 Fc 链 (具有抗 CD20 VH 和 CH1)	第二长 Fc 链 (没有抗 CD20 VH 和 CH1)	短 Fc 链
图 8 构建 体 (CD20)	SEQ ID NO: 61 DIVMTQTPLSLP VTPGEPASISCR SSKSLLSHNGIT YLYWYLQKPG QSPQLLIYQMS NLVSGVPDRFS GSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVY YCAQNLELPYT FGGGTKVEIKR TVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPR EAKVQWKVDN ALQSGNSQESV TEQDSKDSTYS LSSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPVT KSFNRGEC	SEQ ID NO: QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYAFS YSWINWVRQ APGQGLEWM GRIFPGDGD DYNGKFKGR VTITADKSTST AYMELSSLRS EDTAVYYCAR NVFDGYWLV YWGQGTLLV VSSASTKGPS VFPLAPSSKST SGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSV TVPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGGP SVFLFPPKPKD TLMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYV DGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGK EYKCKVSNKA	SEQ ID NO: DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYT LPPCRDKLTKNQ VSLWCLVKGFYP SDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSP GKGGGGGGGGGG GGGGGGGGGGGG DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQ	SEQ ID NO: DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHE DPEVKFNWY VDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNG KEYKCKVSN KALPAPIEKT SKAKGQPREP QVCTLPSPSRD ELTKNQVSL CAVDGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP VLDSGGSFFL VSKLTVDKSR WQQGNVFSC SVMHEALHN HYTQKSLSL PG

[0355]

[0356]

		LPAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPCRDKL TKNQVSLWCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHY TQKSLSLSPGK GGGGGGGGGG GGGGGGGGGG GGDKTHTCPP CPAPELLGGPS VFLFPPKPKDT LMISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVD GVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRKELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLKS DGSFFLYSKLT VDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGQ	VSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQ PENNYDTTPPVL DSDGSFFLYSDL TVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSP G	
图 9 构建体 (CD-20)	SEQ ID NO: 61 DIVMTQTPLSLP VTPGEPASISCR SSKSLLHSNGIT YLYWYLQKPG QSPQLLIYQMS NLVSGVPDRFS GSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVY YCAQNLELPYT FGGGTKVEIKR TVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTAS	SEQ ID NO: QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYAFS YSWINWVRQ APGQGLEWM GRIFPGDGD DYNGKFKGR VTITADKSTST AYMELSSLRS EDTAVYYCAR NVFDGYWL YWGQGTSLV	SEQ ID NO: DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISK AKGQPREPQVCT LPPSRDELTKNQ	SEQ ID NO: DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHE DPEVKFNWY VDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNG KEYKCKVSN KALPAPIEKTI

[0357]

VVCLLNNFYPR EAKVQWKVDN ALQSGNSQESV TEQDSKDSTYS LSSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPVT KSFNRGEC	VSSASTKGPS VFPLAPSSKST SGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGGP SVFLFPPKPKD TLMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYV DGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPCRDKL TKNQVSLWCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHY TQKSLSLSPGK GGGGGGGGG GGGGGGGGG GGDKTHTCPP CPAPELLGPS VFLFPPKPKDT LMISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVD GVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRKELTK NQVSLTCLVK	VSLSCAVDGFYP SDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVL DSDGSFFLVSKL TVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSP GKGGGGGGGGG GGGGGGGGGGG DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYT LPPSRKELTKNQ VSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVL KSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSP GQ	SKAKGQPREP QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYDTPP VLDSGDSFFL YSDLTVDKSR WQQGNVFSC SVMHEALHN HYTQKSLSL PG
---	--	--	--

[0358]		GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLKS DGSFFLYSKLT VDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGQ		
--------	--	---	--	--

[0359] 使每种构建体在HEK细胞中表达,并通过SDS-PAGE分析培养基。图10示出了图8中所描绘的构建体的主要蛋白质条带为200kDa,如所期望的所需产物。用于产生可以产生200kDa产物的该构建体的四个氨基酸序列的唯一其他组合将是Fab轻链的两个拷贝与包含与Fab VH和CH1结构域串联的两个Fc结构域的长链的两个拷贝的组合,该链中的两个异二聚化突变体无法自缔合。然而,在对应的无Fab的构建体中未观察到异二聚化Fc序列的这种自缔合(数据未示出)。类似地,图11示出了图9中所描绘的构建体的主要蛋白质条带具有略高于200kDa(该产物的期望重量)的分子量。用于产生可以产生200kDa产物的该构建体的四个氨基酸序列的唯一其他组合将是Fab轻链的两个拷贝与包含与Fab VH和CH1结构域串联的两个Fc结构域的长链的两个拷贝的组合,该链中的两个异二聚化突变体无法自缔合。然而,在对应的无Fab的构建体中未观察到异二聚化Fc序列的这种自缔合(数据未示出)。

[0360] 实施例4. 具有抗CD20抗原结合结构域或抗PD-L1抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体45的设计和纯化

[0361] Fc-抗原结合结构域构建体被设计成提高折叠效率,以最小化不受控制的亚基缔合(不受控制的亚基缔合可产生不需要的高分子量低聚体和多聚体),并产生基本上同质(例如,至少85%、90%、95%、98%或99%同质)的用于药物用途的组合物。考虑到这些目标,如下所述制备由串联Fc结构域形成的无支链构建体(图12)。Fc-抗原结合结构域构建体45(CD20)和构建体45(PD-L1)各自包括三个不同的含Fc单体的多肽(抗CD20长Fc链(SEQ ID NO:239)或抗PD-L1长Fc链(SEQ ID NO:240);以及第一短Fc链(其是抗CD20短Fc链(SEQ ID NO:247)或抗PD-L1 Fc短链(SEQ ID NO:248))的拷贝;以及第二短Fc链(SEQ ID NO:63)的两个拷贝),以及分别抗CD20轻链多肽(SEQ ID NO:61)或抗PD-L1轻链多肽(SEQ ID NO:49)的两个拷贝。长Fc链包含与N末端的抗原结合结构域串联的三个Fc结构域单体,每个Fc结构域单体具有选自表3的一组突起形成突变和/或选自表4的一个或多个反向电荷突变(第一Fc结构域单体具有与第二Fc结构域单体和第三Fc结构域单体不同的一组异二聚化突变)。第一短Fc链包含Fc结构域单体和N末端的抗原结合结构域,该结构域单体具有选自表3的第一组空腔形成突变和/或任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(其中这些突变与第二短Fc链中的第二组突变不同)。第二短Fc链包含Fc结构域单体,该结构域单体具有选自表3的第二组空腔形成突变和/或选自表4的一个或多个反向电荷突变(其中这些突变与第一短Fc链中的第一组突变不同)。

[0362] 在这种情况下,长Fc链包含与具有S354C和T366W突起形成突变和E357K电荷突变的两个Fc结构域单体串联的具有D356K和D399K电荷突变的一个Fc结构域单体,以及N末端的抗CD20 VH和CH1结构域(EU位置1-220)(构建体45(CD20))或N末端的抗PD-L1 VH和CH1结构域(EU位置1-220)(构建体45(PD-L1))。第一短Fc链包含具有K392D和K409D电荷突变的Fc结构域单体,以及N末端的抗CD20 VH和CH1结构域(EU位置1-220)(构建体45(CD20))或N末

端的抗PD-L1 VH和CH1结构域(EU位置1-220)(构建体45(PD-L1))。第二短Fc链包含具有Y349C、T366S、L368A和Y407V空腔形成突变和K370D电荷突变的Fc结构域单体。

[0363] 表9. 构建体45(CD20)和构建体45(PD-L1)序列

[0364]

构建体	轻链	长 Fc 链 (具有抗 CD20 或抗 PD-L1 VH 和 CH1)	第一短 Fc 链 (具有抗 CD20 或抗 PD-L1 VH 和 CH1)	第二短 Fc 链
构建体 45 (CD20)	SEQ ID NO: 61 DIVMTQTPLSLPV TPGEPASISCRSSK SLLHSNGITYLYW YLQKPGQSPQLLI YQMSNLVSGVPD RFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVY YCAQNLELPYTFG GGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNMF YPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVT EQDSKSTYSLSS TLTLKADYEKHK VYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 239 QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYAFS YSWINWVRQ APGQGLEWM GRIFPGDGD DYNGKFKGR VTITADKSTST AYMELSSLRS EDTAVYYCAR NVFDGYWLV YWGQGLTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKST SGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV TVPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGGP SVFLFPPKPKD	SEQ ID NO: 247 QVQLVQSGAEV KKPGSSVKVSC KASGYAFSYSW INWVRQAPGQG LEWMGRIFPGD GDTDYNGKFK GRVTITADKSTS TAYMELSSLRS EDTAVYYCAR NVFDGYWLV WGQGLTVTVSS ASTKGPSVFPL APSSKSTSGGT AALGCLVKDYF PEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGT QTYICNVNHKP SNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPP CPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCV VVDVSHEDPEV	SEQ ID NO: 63 DKTHTCPPCP APPELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHE DPEVKFNWY VDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNG KEYKCKVSN KALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVCTLPSPSRD ELTKNQVSL CAVDGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP VLDSGDSFLL VSKLTVDKSR WQQGNVFSC SVMHEALHN HYTQKSLSL PG

[0365]

	TLMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYV DGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPCRDKL TKNQVSLWCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHY TQKSLSLSPGK GGGGGGGGG GGGGGGGGG GGDKTHTCPP CPAPELLGGPS VFLFPPKPKDT LMISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVD GVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPCRDKLT KNQVSLWCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHY TQKSLSLSPGK GGGGGGGGG GGGGGGGGG GGDKTHTCPP CPAPELLGGPS VFLFPPKPKDT	KFNWYVDGVE VHNAKTKPREE QYNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKTIS KAKGQPREPQV YTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWE SNGQPENNYDT TPPVLDSGDSFF LYSDLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG	
--	---	---	--

[0366]

		LMISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVD GVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRKELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLKS DGSFFLYSKLT VDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGQ		
构建体 45 (PD-L1)	SEQ ID NO: 49 QSALTQPASVSGS PGQSITISCTGTSS DVGGYNYVSWYQ QHPGKAPKLMYD VSNRPSGVSNRFS GSKSGNTASLTISG LQAEDEADYYCSS YTSSSTRVFGTGT KVTVLGQPKANPT VTLFPPSSEELQAN KATLVCLISDFYP GAVTVAWKADGS PVKAGVETTKPSK QSNNKYAASSYLS LTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKT VAPTECS	SEQ ID NO: 240 EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFSS YIMMWVRQA PGKGLEWVSS IYPSGGITFYA DTVKGRFTISR DNSKNTLYLQ MNSLRAEDTA VYYCARIKLG TVTTVDYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPLA PSSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVPS SLGTQTYICN VNHKPSNTKV DKKVEPKSCD KTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLF PPKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVE VHNAKTKPRE	SEQ ID NO: 248 EVQLLESGGGL VQPGGSLRLSC AASGFTFSSYIM MWVRQAPGKG LEWVSSIYPSG GITFYADTVKG RFTISRDNKNT LYLQMNSLRAE DTAVYYCARIK LGTVTTVDYW QGTLVTVSSA STKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPE PVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSN TKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQYN STYRVVSVLTV LHQDWLNGKE	SEQ ID NO: 63 DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHE DPEVKFNWY VDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNG KEYKCKVSN KALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVCTLPPSRD ELTKNQVSL CAVDGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP VLDSGDSFFL VSKLTVDKSR WQQGNVFSC SVMHEALHN HYTQKSLSLS PG

[0367]

		EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAIEK TISKAKGQPRE PQVYTLPPCR DKLTKNQVSL WCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSGSSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNH YTQKSLSLSPG KGGGGGGGG GGGGGGGGG GGGDKTHTCP PCPAPELLGGP SVFLFPPKPKD TLMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYV DGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPCRDKL TKNQVSLWCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTPPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHY TQKSLSLSPGK GGGGGGGGG GGGGGGGGG GGDKTHTCPP CPAPELLGGPS VFLFPPKPKDT LMISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVD GVEVHNAKT KPREEQYNST	YKCKVSNKALP APIEKTISKAKG QPREPQVYTL PSRDELTKNQV SLTCLVKGFYP SDIAVEWESNG QPENNYDTPP VLDSGSSFFLY SDLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMH EALHNHYTQKS LSLSPG	
--	--	---	--	--

[0368]		YRVVSVLTVL HQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRKELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLKS DGSFFLYSKLT VDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGQ		
--------	--	--	--	--

[0369] 细胞培养

[0370] 将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾 (HEK) 293细胞中。短和长Fc链的氨基酸序列由多个质粒编码。

[0371] 蛋白质纯化

[0372] 使用Poros MabCapture A (LifeTechnologies) 柱,通过基于蛋白A的亲和柱色谱法从细胞培养上清液中纯化表达的蛋白质。上样后,用磷酸盐缓冲盐水 (PBS, pH 7.0) 洗涤捕获的Fc-抗原结合结构域构建体,并进一步用中间洗涤缓冲液50mM柠檬酸盐缓冲液 (pH 5.5) 洗涤,以除去其他与工艺有关的杂质。用100mM甘氨酸 (pH 3) 洗脱结合的Fc构建体物质,并通过添加1M TRIS (pH 7.4) 快速中和洗脱液,然后离心并通过0.2μm过滤器进行无菌过滤。

[0373] 使用Poros XS树脂 (Applied Biosciences),通过离子交换色谱法进一步分离蛋白质。用50mM MES (pH 6,缓冲液A) 预平衡柱,并且在平衡缓冲液中稀释 (1:3) 样品以便上样。使用12-15CV线性梯度 (50mM MES (100%A) 至400mM氯化钠 (pH 6,100%B)) 作为洗脱缓冲液洗脱样品。通过分析尺寸排阻色谱法 (SEC) 分析洗脱期间收集的所有级分,并合并目标级分以产生纯化的Fc构建体物质。

[0374] 在离子交换后,在切向流过滤系统上,使用30kDa截止聚醚砜 (PES) 膜滤筒将目标级分缓冲交换到1X-PBS缓冲液中。将样品浓缩至大约10-15mg/mL,并通过0.2μm过滤器进行无菌过滤。

[0375] 非还原性十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

[0376] 将样品在95℃的Laemmli样品缓冲液 (4% SDS, Bio-Rad) 中变性10分钟。使样品在Criterion TGX无染色凝胶 (4-15% 聚丙烯酰胺, Bio-Rad) 上运行。通过UV照射或考马斯蓝染色对蛋白质条带进行可视化。通过ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad) 对凝胶进行成像。使用Imagelab 4.0.1软件 (Bio-Rad) 执行条带的定量。

[0377] 实施例5.具有抗CD20抗原结合结构域或抗PD-L1抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体46的设计和纯化

[0378] 如下所述制备由串联Fc结构域形成的无支链构建体 (图13)。Fc-抗原结合结构域构建体46 (CD20) 和构建体46 (PD-L1) 各自包括三个不同的含Fc单体的多肽 (长Fc链 (SEQ ID

N0:241);第一短Fc链(SEQ ID N0:236)的拷贝;以及第二短Fc链(其是抗CD20短Fc链(SEQ ID N0:67)或抗PD-L1 Fc短链(SEQ ID N0:68))的两个拷贝);以及分别抗CD20轻链多肽(SEQ ID N0:61)或抗PD-L1轻链多肽(SEQ ID N0:49)的两个拷贝。长Fc链包含串联的三个Fc结构域单体,每个Fc结构域单体具有选自表3的一组突起形成突变和/或选自表4的一个或多个反向电荷突变(第一Fc结构域单体具有与第二Fc结构域单体和第三Fc结构域单体不同的一组异二聚化突变)。第一短Fc链包含Fc结构域单体,该结构域单体具有选自表3的第一组空腔形成突变和/或选自表4的一个或多个反向电荷突变(其中这些突变与第二短Fc链中的第二组突变不同)。第二短Fc链包含Fc结构域单体和N末端的抗原结合结构域,该结构域单体具有选自表3的第二组空腔形成突变和/或选自表4的一个或多个反向电荷突变(其中这些突变与第一短Fc链中的第一组突变不同)。

[0379] 在这种情况下,长Fc链包含与具有S354C和T366W突起形成突变和E357K电荷突变的两个Fc结构域单体串联的具有D356K和D399K电荷突变的一个Fc结构域单体。第一短Fc链包含具有K392D和K409D电荷突变的Fc结构域单体。第二短Fc链包含具有Y349C、T366S、L368A和Y407V空腔形成突变和K370D电荷突变的Fc结构域单体,以及N末端的抗CD20 VH和CH1结构域(EU位置1-220)(构建体46(CD20))或N末端的抗PD-L1 VH和CH1结构域(EU位置1-220)(构建体46(PD-L1))。

[0380] 表10. 构建体46(CD20)和构建体46(PD-L1)序列

	构建体	轻链	长 Fc 链	第一短 Fc 链	第二短 Fc 链 (具有抗 CD20 或抗 PD-L1 VH 和 CH1)
[0381]	构建体 46 (CD20)	SEQ ID NO: 61 DIVMTQTPLSLPV TPGEPASISCRSSK SLLHSNGITYLYW YLQKPGQSPQLLI YQMSNLVSGVPD RFSGSGSGTDFTL	SEQ ID NO: 241 DKTHTCPP CPAPPELLG GPSVFLFPP KPKDTLMIS RTPEVTCV	SEQ ID NO: 236 DKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSH	SEQ ID NO: 67 QVQLVQSG AEVKKPGSS VKVSCKASG YAFSYSWIN WVRQAPGQ

[0382]

KISRVEAEDVGVY YCAQNLELPYTFG GGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSS TLTLKADYEKHK VYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC	VVDVSHED PEVKFNWY VDGVEVHN AKTKPREE QYNSTYRV VSVLTVLH QDWLNGK EYKCKVSN KALPAPIEK TISKAKGQP REPQVYTL PPCRDKLT KNQVSLWC LVKGFYPS DIAVEWES NGQPENNY KTTTPVLDS DGSFFLYSK LTVDKSRW QQGNVFSC SVMHEALH NHYTQKSL SLSPGKGG GGGGGGG GGGGGGG GGGGDKTH TCPPCPAPE LLGGPSVFL FPPKPKDTL MISRTPEVT CVVVDVSH EDPEVKFN WYVDGVE VHNAKTKP REEQYNST YRVVSVLT VLHQDWL NGKEYKCK VSNKALPA PIEKTISKA KGQPREPQ VYTLPPCR DKLTKNQV SLWCLVKG FYPSDIAVE WESNGQPE NNYKTTTP VLDSGDSFF LYSKLTV KSRWQQG	EDPEVKFNW YVDGVEVH NAKTKPREE QYNSTYRVV SVLTVLHQD WLNGKEYK CKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQV YTLPPSRDEL TKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQ PENNYDTP PVLDSGDSFF LYSDLTVDK SRWQQGNVF SCSVMHEAL HNHYTQKSL SLSPG	GLEWMGRIF PGDGDYD NGKFKGRV TITADKSTST AYMELSSLR SEDVAVYYC ARNVFDGY WLWYWGQG TLVTVSSAS TKGPSVFPL APSSKSTSG GTAALGCLV KDYFPEPVT VSWNSGAL TSGVHTFPA VLQSSGLYS LSSVTVPS SSLGTQTYIC NVNHKPSNT KVDKKVEP KSCDKTHTC PPCPAPPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMIS RTPEVTCVV VDVSHEDPE VKFNWYVD GVEVHNAK TKPREEQYN STYRVVSVL TVLHQDWL NGKEYKCK VSNKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVCT LPPSRDEL KNQVSLSCA VDGFYPSDI AVEWESNG QPENNYKTT PPVLDSGDS FFLVSKLTV DKSRWQQG NVFSCSVMH EALHNHYT QKSLSLSPG
--	--	---	---

[0383]

		NVFSCSVM HEALHNHY TQKSLSLSP GKGGGGG GGGGGGG GGGGGGG GDKTHTCP PCPAPELLG GPSVFLFPP KPKDTLMIS RTPEVTCV VVDVSHED PEVKFNWY VDGVEVHN AKTKPREE QYNSTYRV VSVLTVLH QDWLNGK EYKCKVSN KALPAPIEK TISKAKGQP REPQVYTL PPSRKELTK NQVSLTCL VKGFYPSDI AVEWESNG QPENNYKT TPPVLKSD GSFFLYSKL TVDKSRWQ QGNVFSCS VMHEALHN HYTQKSLS LSPGQ		
构建体 46 (PD-L1)	SEQ ID NO: 49 QSALTQPASVSGS PGQSITISCTGTSS DVGGYNYVSWYQ QHPGKAPKLMYD VSNRPSGVSNRFS GSKSGNTASLTISG LQAEDEADYYCSS YTSSSTRVFGTGT KVTVLGQPKANPT VTLFPPSSEELQAN KATLVCLISDFYP GAVTVAWKADGS PVKAGVETTKPSK QSNNKYAASSYLS LTPEQWKSHRSYS	SEQ ID NO: 241 DKTHTCPP CPAPELLG GPSVFLFPP KPKDTLMIS RTPEVTCV VVDVSHED PEVKFNWY VDGVEVHN AKTKPREE QYNSTYRV VSVLTVLH QDWLNGK EYKCKVSN KALPAPIEK	SEQ ID NO: 236 DKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSH EDPEVKFNW YVDGVEVH NAKTKPREE QYNSTYRVV SVLTVLHQD WLNGKEYK CKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQV	SEQ ID NO: 68 EVQLLESGG GLVQPGGSL RLSCAASGF TFSSYIMMW VRQAPGKG LEWVSSIYP SGGITFYAD TVKGRFTIS RDNSKNTLY LQMNSLRAE DTAVYYCA RIKLGTVTT VDYWGQGT LVTVSSAST

[0384]

CQVTHEGSTVEKT VAPTECS	TISKAKGQP REPQVYTL PPCRDKLT KNQVSLWC LVKGFYPS DIAVEWES NGQPENNY KTPPVLDS DGSFFLYSK LTVDKSRW QQGNVFSC SVMHEALH NHYTQKSL SLSPGKGG GGGGGGG GGGGGGG GGGGDKTH TCPPCPAPE LLGGPSVFL FPPKPKDTL MISRTPEVT CVVVDVSH EDPEVKFN WYVDGVE VHNAKTKP REEQYNST YRVVSVLT VLHQDWL NGKEYKCK VSNKALPA PIEKTISKA KGQPREPQ VYTLPPCR DKLTKNQV SLWCLVKG FYPSDIAVE WESNGQPE NNYKTPPP VLDSGDSFF LYSKLTV KSRWQQG NVFSCSVM HEALHNHY TQKSLSLSP GKGGGGG GGGGGGG GGGGGGG GDKTHTCP PCPAPELLG GPSVFLFPP	YTLPPSRDEL TKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQ PENNYDTPP PVLDSGDSFF LYSDLTVDK SRWQQGNVF SCSVMHEAL HNHYTQKSL SLSPG	KGPSVFPLA PSSKSTSGG TAALGCLVK DYFPEPVT SWNSGALTS GVHTFPAVL QSSGLYSLS SVVTVPSST LGTQTYICN VNHKPSNTK VDKKVEPKS CDKTHTCPP CPAPELLGG PSVFLFPPK KDTLMISRT PEVTCVVVD VSHEDPEVK FNWYVDGV EVHNAKTKP REEQYNSTY RVVSVLTVL HQDWLNGK EYKCKVSN KALPAPIEK TISKAKGQP REPQVCTLP PSRDELTKN QVSLSCAVD GFYPSDIAV EWESNGQPE NNYKTPPPV LDSDGSFFL VSKLTVDKS RWQQGNVF SCSVMHEAL HNHYTQKSL SLSPG
--------------------------	---	--	--

[0385]

KPKDTLMIS
RTPEVTCV
VVDVSHED
PEVKFNWY
VDGVEVHN
AKTKPREE
QYNSTYRV
VSVLTVLH
QDWLNGK
EYKCKVSN
KALPAPIEK
TISKAKGQP
REPQVYTL
PPSRKELTK
NQVSLTCL
VKGFYPSDI
AVEWESNG
QPENNYKT
TPPVLKSD
GSFFLYSKL
TVDKSRWQ
QGNVFSCS
VMHEALHN
HYTQKSLS
LSPGQ

[0386] 细胞培养

[0387] 将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾 (HEK) 293细胞中。短和长Fc链的氨基酸序列由多个质粒编码。

[0388] 蛋白质纯化

[0389] 使用Poros MabCapture A (LifeTechnologies) 柱,通过基于蛋白A的亲和柱色谱法从细胞培养上清液中纯化表达的蛋白质。上样后,用磷酸盐缓冲盐水 (PBS, pH 7.0) 洗涤捕获的Fc-抗原结合结构域构建体,并进一步用中间洗涤缓冲液50mM柠檬酸盐缓冲液 (pH 5.5) 洗涤,以除去其他与工艺有关的杂质。用100mM甘氨酸 (pH 3) 洗脱结合的Fc构建体物质,并通过添加1M TRIS (pH 7.4) 快速中和洗脱液,然后离心并通过0.2μm过滤器进行无菌过滤。

[0390] 使用Poros XS树脂 (Applied Biosciences),通过离子交换色谱法进一步分离蛋白质。用50mM MES (pH 6,缓冲液A) 预平衡柱,并且在平衡缓冲液中稀释 (1:3) 样品以便上样。使用12-15CV线性梯度 (50mM MES (100%A) 至400mM氯化钠 (pH 6,100%B)) 作为洗脱缓冲液洗脱样品。通过分析尺寸排阻色谱法 (SEC) 分析洗脱期间收集的所有级分,并合并目标级分以产生纯化的Fc构建体物质。

[0391] 在离子交换后,在切向流过滤系统上,使用30kDa截止聚醚砜 (PES) 膜滤筒将目标级分缓冲液交换到1X-PBS缓冲液中。将样品浓缩至大约10-15mg/mL,并通过0.2μm过滤器进行无菌过滤。

[0392] 非还原性十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

[0393] 将样品在95℃的Laemmli样品缓冲液 (4% SDS, Bio-Rad) 中变性10分钟。使样品在

Criterion TGX无染色凝胶(4-15%聚丙烯酰胺,Bio-Rad)上运行。通过UV照射或考马斯蓝染色对蛋白质条带进行可视化。通过ChemiDoc MP Imaging System(Bio-Rad)对凝胶进行成像。使用Imagelab 4.0.1软件(Bio-Rad)执行条带的定量。

[0394] 实施例6.具有抗CD20抗原结合结构域或抗PD-L1抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体47的设计和纯化

[0395] Fc-抗原结合结构域构建体被设计成提高折叠效率,以最小化不受控制的亚基缔合(不受控制的亚基缔合可产生不必要的高分子量低聚体和多聚体),并产生基本上同质(例如,至少85%、90%、95%、98%或99%同质)的用于药物用途的组合物。考虑到这些目标,如下所述制备由串联Fc结构域形成的无支链构建体(图14)。Fc-抗原结合结构域构建体47(CD20)和构建体47(PD-L1)各自包括三个不同的含Fc单体的多肽(长Fc链(SEQ ID NO:243);以及第一短Fc链(其是抗CD20短Fc链(SEQ ID NO:247)或抗PD-L1 Fc短链(SEQ ID NO:248))的两个拷贝);以及第二短Fc链(SEQ ID NO:63)的拷贝),以及分别抗CD20轻链多肽(SEQ ID NO:61)或抗PD-L1轻链多肽(SEQ ID NO:49)的两个拷贝。长Fc链包含串联的三个Fc结构域单体,每个Fc结构域单体具有选自表3的一组突起形成突变(异二聚化突变)和/或选自表4的一个或多个反向电荷突变(第三Fc结构域单体具有与第一Fc结构域单体和第二Fc结构域单体不同的一组异二聚化突变)。第一短Fc链包含Fc结构域单体和N末端的抗原结合结构域,该结构域单体具有选自表3的第一组空腔形成突变和/或任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变(其中这些突变与第二短Fc链中的第二组突变不同)。第二短Fc链包含Fc结构域单体,该结构域单体具有选自表3的第二组空腔形成突变和/或选自表4的一个或多个反向电荷突变(其中这些突变与第一短Fc链中的第一组突变不同)。

[0396] 在这种情况下,长Fc链包含与具有S354C和T366W突起形成突变和E357K电荷突变的Fc结构域单体串联的各自具有D356K和D399K电荷突变的两个Fc结构域单体。第一短Fc链包含具有K392D和K409D电荷突变的Fc结构域单体,以及N末端的抗CD20 VH和CH1结构域(EU位置1-220)(构建体47(CD20))或N末端的抗PD-L1 VH和CH1结构域(EU位置1-220)(构建体47(PD-L1))。第二短Fc链包含具有Y349C、T366S、L368A和Y407V空腔形成突变和K370D电荷突变的Fc结构域单体。

[0397] 表11.构建体47(CD20)和构建体47(PD-L1)序列

[0398]

构建体	轻链	长 Fc 链	第一短 Fc 链 (具有抗 CD20 或抗 PD-L1 VH 和 CH1)	第二短 Fc 链
构建体 47 (CD20)	SEQ ID NO: 61 DIVMTQTPLSLP VTPGEPASISCRS SKSLLHSNGITYL YWYLQKPGQSP QLLIYQMSNLVS GVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAE DVGYYCAQNL ELPYTFGGGTKV EIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDN ALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLS STLTLSKADYEK HKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNR GEC	SEQ ID NO: 243 DKTHTCPPCP APPELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAKG QPREPQVYTL PPCRDKLTKN QVSLWCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKLT VDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGKGGG GGGGGGGGG GGGGGGGGD KTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLF PPKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIEK TISKAKGQPRE PQVYTLPPSR KELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTT PVLKSDGSFFL	SEQ ID NO: 247 QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYAFS YSWINWVRQ APGQGLEWM GRIFPGDGD DYNGKFKGR VTITADKSTST AYMELSSLRS EDTAVYYCAR NVFDGYWL YWGQGT VSSASTKGPS VFPLAPSSKST SGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV TVPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGGP SVFLFPPKPKD TLMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYV DGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSRDEL KNQVSLTCLV KGFYPSDIAVE WESNGQPENN YDTPPVLD DGSFFLYSDLT VDKSRWQQG NVFSCSVMHE	SEQ ID NO: 63 DKTHTCPPCPA PELLGGPSVFL FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTISK AKGQPREPQV CTLPPSRDEL KNQVSLSCAV DGFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS GSFFLVSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEALH NHYTQKSLSLS PG

[0399]

		YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNH YTQKSLSLSPG QKGGGGGGGG GGGGGGGGGG GGGGDKTHTC PPCAPELLGG PSVFLFPPKPK DTLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWY VDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRKEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL KSDGSFFLYS KLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHY TQKSLSLSPGQ	ALHNHYTQKS LSLSPG	
构建体 47 (PD-L1)	SEQ ID NO: 49 QSALTQPASVSG SPGQSITISCTGTS SDVGGYNYVSW YQQHPGKAPKL MIYDVSNRPSGV SNRFSGSKSGNT ASLTISGLQAEDE ADYYCSSYTSSS TRVFGTGTKVTV LGQPKANPTVTL FPPSSEELQANK ATLVCLISDFYPG AVTVAWKADGS PVKAGVETTKPS KQSNNKYAASSY LSLTPEQWKSHR SYSCQVTHEGST VEKTVAPTECS	SEQ ID NO: 243 EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFSS YIMMWVRQA PGKGLEWVSS IYPSGGITFYA DTVKGRFTISR DNSKNTLYLQ MNSLRAEDTA VYYCARIKLG TVTTVDYWG QGTLTVVSSA STKGPSVFPLA PSSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVPSS SLGTQTYICN	SEQ ID NO: 248 DKTHTCPPCP APELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAKG QPREPQVCTL PPSRDELTKN QVSLSCAVDG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPVLDS GSFFLVSKLTV DKSRWQQGN	SEQ ID NO: 63 DKTHTCPPCPA PELLGGPSVFL FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTISK AKGQPREPQV CTLPPSRDELTKN KNQVSLSCAV DGFYPSDIAVE WESNGQPENNY YKTTTPVLDS GSFFLVSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEALH

[0400]

		VNHKPSNTKV DKKVEPKSCD KTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLF PPKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIEK TISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLKSDGSFFL YSDLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNH YTQKSLSLSPG KGGGGGGGG GGGGGGGGG GGGDKHTTCP PCPAPELLGGP SVFLFPPKPKD TLMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYV DGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPCRDKL TKNQVSLWCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHY TQKSLSLSPG	VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPG	NHYTQKSLSLS PG
--	--	---	-----------------------------------	-------------------

[0401] 细胞培养

[0402] 将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾 (HEK) 293细胞中。短和长Fc链的氨基酸序列由多个质粒编码。

[0403] 蛋白质纯化

[0404] 使用Poros MabCapture A (LifeTechnologies) 柱,通过基于蛋白A的亲和柱色谱法从细胞培养上清液中纯化表达的蛋白质。上样后,用磷酸盐缓冲盐水 (PBS, pH 7.0) 洗涤捕获的Fc-抗原结合结构域构建体,并进一步用中间洗涤缓冲液50mM柠檬酸盐缓冲液 (pH 5.5) 洗涤,以除去其他与工艺有关的杂质。用100mM甘氨酸 (pH 3) 洗脱结合的Fc构建体物质,并通过添加1M TRIS (pH 7.4) 快速中和洗脱液,然后离心并通过0.2 μ m过滤器进行无菌过滤。

[0405] 使用Poros XS树脂 (Applied Biosciences),通过离子交换色谱法进一步分离蛋白质。用50mM MES (pH 6,缓冲液A) 预平衡柱,并且在平衡缓冲液中稀释 (1:3) 样品以便上样。使用12-15CV线性梯度 (50mM MES (100%A) 至400mM氯化钠 (pH 6,100%B)) 作为洗脱缓冲液洗脱样品。通过分析尺寸排阻色谱法 (SEC) 分析洗脱期间收集的所有级分,并合并目标级分以产生纯化的Fc构建体物质。

[0406] 在离子交换后,在切向流过滤系统上,使用30kDa截止聚醚砜 (PES) 膜滤筒将目标级分缓冲交换到1X-PBS缓冲液中。将样品浓缩至大约10-15mg/mL,并通过0.2 μ m过滤器进行无菌过滤。

[0407] 非还原性十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

[0408] 将样品在95°C的Laemmli样品缓冲液 (4% SDS, Bio-Rad) 中变性10分钟。使样品在Criterion TGX无染色凝胶 (4-15% 聚丙烯酰胺, Bio-Rad) 上运行。通过UV照射或考马斯蓝染色对蛋白质条带进行可视化。通过ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad) 对凝胶进行成像。使用Imagelab 4.0.1软件 (Bio-Rad) 执行条带的定量。

[0409] 实施例7. 具有抗CD20抗原结合结构域或抗PD-L1抗原结合结构域的Fc-抗原结合结构域构建体48的设计和纯化

[0410] 如下所述制备由串联Fc结构域形成的无支链构建体 (图15)。Fc-抗原结合结构域构建体48 (CD20) 和构建体48 (PD-L1) 各自包括三个不同的含Fc单体的多肽 (长Fc链 (SEQ ID NO:A); 第一短Fc链 (其是抗CD20短Fc链 (SEQ ID NO:Y) 或抗PD-L1 Fc短链 (SEQ ID NO:Y)) 的四个拷贝); 以及第二短Fc链的一个拷贝), 以及分别抗CD20轻链多肽 (SEQ ID NO:61) 或抗PD-L1轻链多肽 (SEQ ID NO:49) 的四个拷贝。长Fc链包含串联的五个Fc结构域单体, 每个Fc结构域单体具有选自表3的一组突起形成突变 (异二聚化突变), 以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变 (第一Fc结构域单体、第二Fc结构域单体、第三Fc结构域单体和第四Fc结构域单体具有与第五Fc结构域单体不同的一组异二聚化突变)。第一短Fc链包含Fc结构域单体和N末端的抗原结合结构域, 该结构域单体具有选自表3的第一组空腔形成突变, 以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变 (其中这些突变与第二短Fc链中的第二组突变不同)。第二短Fc链包含Fc结构域单体, 该结构域单体具有选自表3的第二组空腔形成突变, 以及任选的选自表4的一个或多个反向电荷突变 (其中这些突变与第一短Fc链中的第一组突变不同)。

[0411] 在这种情况下,长Fc链包含与具有K409D/D399K电荷突变 (以促进异二聚化) 的一个Fc结构域单体串联的具有E357K电荷突变和S354C和T366W突起形成突变 (以促进异二聚化) 的四个Fc结构域单体。第一短Fc链包含具有K370D电荷突变和Y349C、T366S、L368A和Y407V空腔形成突变 (以促进异二聚化) 的Fc结构域单体, 以及N末端的抗CD20VH和CH1结构

域(EU位置1-220)(构建体48(CD20))或N末端的抗PD-L1 VH和CH1结构域(EU位置1-220)(构建体48(PD-L1))。第二短Fc链包含具有K409D/D399K电荷突变(以促进异二聚化)的Fc结构域单体。

[0412] 细胞培养

[0413] 将DNA序列优化以在哺乳动物细胞中表达,并克隆到pcDNA3.4哺乳动物表达载体中。将DNA质粒构建体经由脂质体转染到人胚肾(HEK)293细胞中。短和长Fc链的氨基酸序列由多个质粒编码。

[0414] 蛋白质纯化

[0415] 使用Poros MabCapture A(LifeTechnologies)柱,通过基于蛋白A的亲和柱色谱法从细胞培养上清液中纯化表达的蛋白质。上样后,用磷酸盐缓冲盐水(PBS,pH 7.0)洗涤捕获的Fc-抗原结合结构域构建体,并进一步用中间洗涤缓冲液50mM柠檬酸盐缓冲液(pH 5.5)洗涤,以除去其他与工艺有关的杂质。用100mM甘氨酸(pH 3)洗脱结合的Fc构建体物质,并通过添加1M TRIS(pH 7.4)快速中和洗脱液,然后离心并通过0.2 μ m过滤器进行无菌过滤。

[0416] 使用Poros XS树脂(Applied Biosciences),通过离子交换色谱法进一步分离蛋白质。用50mM MES(pH 6,缓冲液A)预平衡柱,并且在平衡缓冲液中稀释(1:3)样品以便上样。使用12-15CV线性梯度(50mM MES(100%A)至400mM氯化钠(pH 6,100%B))作为洗脱缓冲液洗脱样品。通过分析尺寸排阻色谱法(SEC)分析洗脱期间收集的所有级分,并合并目标级分以产生纯化的Fc构建体物质。

[0417] 在离子交换后,在切向流过滤系统上,使用30kDa截止聚醚砜(PES)膜滤筒将目标级分缓冲液交换到1X-PBS缓冲液中。将样品浓缩至大约10-15mg/mL,并通过0.2 μ m过滤器进行无菌过滤。

[0418] 非还原性十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

[0419] 将样品在95℃的Laemmli样品缓冲液(4%SDS,Bio-Rad)中变性10分钟。使样品在Criterion TGX无染色凝胶(4-15%聚丙烯酰胺,Bio-Rad)上运行。通过UV照射或考马斯蓝染色对蛋白质条带进行可视化。通过ChemiDoc MP Imaging System(Bio-Rad)对凝胶进行成像。使用Imagelab 4.0.1软件(Bio-Rad)执行条带的定量。

[0420] 实施例9.用于表征Fc-抗原结合结构域构建体的实验分析

[0421] 肽和糖肽液相色谱-MS/MS

[0422] 将蛋白质(Fc构建体)在6M胍(Sigma)中稀释至1 μ g/ μ L。添加二硫苏糖醇(DTT),使浓度为10mM,以在65℃的变性条件下还原二硫键30分钟。在冰上冷却后,将样品与30mM碘乙酰胺(IAM)一起在黑暗中温育1小时,以使游离硫醇烷基化(氨甲酰甲基化)。然后将蛋白质通过10-kDa膜透析到25mM碳酸氢铵缓冲液(pH 7.8)中,以除去IAM、DTT和胍。在Barocycler(NEP 2320;Pressure Biosciences,Inc.)中用胰蛋白酶消化蛋白质。使压力在37℃下在20,000psi与环境压力之间循环,1小时内总共进行30次循环。在Ultimate 3000(Dionex)色谱系统和Q-Exactive(Thermo Fisher Scientific)质谱仪上进行肽的LC-MS/MS分析。使用0.1%FA的水溶液和0.1%FA的乙腈溶液作为流动相,在BEH PepMap(Waters)柱上分离肽。

[0423] 完整的质谱分析

[0424] 使用10kDa旋转过滤器(EMD Millipore)将50 μ g蛋白质(Fc构建体)缓冲交换到

50mM碳酸氢铵 (pH 7.8) 中,使浓度为1 μ g/ μ L。将30单位PNGase F (Promega) 添加到样品中,并在37 $^{\circ}$ C下温育5小时。使用0.1%FA的水溶液和0.1%FA的乙腈溶液作为流动相,在Waters Acquity C4BEH谱 (1x100mm,1.7 μ m粒径,300A孔径) 上进行分离。在Ultimate3000 (Dionex) 色谱系统和Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific) 质谱仪上进行LC-MS。使用Biopharma Finder (Thermo Fisher Scientific) 的默认ReSpect方法对光谱进行去卷积。

[0425] 毛细管电泳-十二烷基硫酸钠 (CE-SDS) 测定

[0426] 将样品稀释至1mg/mL,并与HT Protein Express变性缓冲液 (PerkinElmer) 混合。将混合物在40 $^{\circ}$ C下温育20分钟。将样品用70 μ L水稀释并转移至96孔板。通过配备有HT Protein Express LabChip (PerkinElmer) 的Caliper GXII仪器 (PerkinElmer) 分析样品。使用荧光强度来计算每种尺寸变体的相对丰度。

[0427] 非还原性SDS-PAGE

[0428] 将样品在95 $^{\circ}$ C的Laemmli样品缓冲液 (4%SDS,Bio-Rad) 中变性10分钟。使样品在Criterion TGX无染色凝胶 (4-15%聚丙烯酰胺,Bio-Rad) 上运行。通过UV照射或考马斯蓝染色对蛋白质条带进行可视化。通过ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad) 对凝胶进行成像。使用Imagelab 4.0.1软件 (Bio-Rad) 执行条带的定量。

[0429] 补体依赖性细胞毒性 (CDC)

[0430] 通过比色测定评估CDC,在该比色测定中,将Raji细胞 (ATCC) 用连续稀释的利妥昔单抗、Fc构建体或IVIg包被。将人血清补体 (Quidel) 以25%v/v添加到所有孔中,并且在37 $^{\circ}$ C下温育2小时。在添加WST-1细胞增殖试剂 (Roche Applied Science) 后,将细胞在37 $^{\circ}$ C下温育12小时。将板放置在振荡器上2分钟,并且测量450nm处的吸光度。

[0431] 实施例10.抗CD20 Fc构建体对补体依赖性细胞毒性 (CDC) 的激活

[0432] 开发CDC测定以测试抗CD20 Fc构建体相对于抗CD20单克隆抗体奥滨尤妥珠单抗增强CDC活性的程度。如实施例4、5和6中所述产生具有Gazyva的Fab序列 (VL+CL,VH+CH1) 的抗CD20 Fc构建体45、46和47。在如下进行的CDC测定中测试每个抗CD20 Fc构建体和奥滨尤妥珠单抗单克隆抗体:

[0433] 将在补充有10%热灭活的FBS的RPMI-1640中生长的Daudi细胞沉淀,用冰冷的PBS洗涤1次,然后以1.0 $\times 10^6$ 个活细胞/mL的浓度重悬于含0.1%BSA的RPMI-1640中。将五十微升这种细胞悬液添加到96孔板的所有孔中 (板边缘除外)。将板保持在冰上,直到完成所有添加。在RPMI-1640+BSA中,将测试制品从起始浓度450nM开始连续稀释四倍。每个测试制品总共测试十个浓度。分别将五十微升添加到板中的Daudi细胞中。在RPMI-1640+BSA中以1:5稀释正常或C1q耗尽人补体血清 (Quidel, San Diego, CA)。分别将五十微升添加到板中的Daudi细胞中。六个正常血清对照孔接收细胞,仅接收培养基 (未处理) 和1/5正常血清 (正常背景)。这些孔中的三个还接收16.5 μ L Triton X-100 (Promega, Madison, WI) (正常裂解对照)。类似地制备C1q耗尽背景和裂解对照。将PBS添加到所有板边缘孔中。将板在37 $^{\circ}$ C下温育2小时。2小时后,将50 μ L预热的Alamar蓝 (Thermo, Waltham, MA) 添加到所有孔中 (板边缘除外)。将板放回温育箱保持过夜 (在37 $^{\circ}$ C下温育18小时)。18小时后,在FlexStation 3中测量荧光。使用544/590Ex/Em过滤器和Auto Cut-Off对板进行顶部读取。计算正常背景、正常裂解对照、C1q耗尽背景和C1q耗尽裂解对照孔的平均值。如下计算细胞裂解百分比:

[0434] %细胞裂解 = (RFU测试 - RFU背景) / (RFU裂解对照 - RFU背景) * 100。确定每种构建

体的EC50 (nM)。

[0435] 如表12中所示,抗CD20 Fc构建体在Daudi细胞中诱导CDC,并且相对于奥滨尤妥珠单抗单克隆抗体在增强细胞毒性中表现出更大的效力,如较低的EC50值所证明。

[0436] 表12.抗CD20 Fc构建体在Daudi细胞中诱导CDC的效力

构建体 ¹	n	EC50 (nM)		
		范围	平均值	SD
IgG1 抗体, 岩藻糖基化	5	38 – 65	47	11
S3L-AA2-OBI 构建体 45 (抗 CD20)	2	0.50 – 0.57	0.54	0.046
S3L-0AA2-OBI 构建体 46 (抗 CD20)	4	0.20 – 0.25	0.23	0.025
S3L-0A22-OBI2 构建体 47 (抗 CD20)	4	0.16 – 0.21	0.18	0.027

[0438] ¹除非另有说明,否则所有构建体都包括G20接头。

[0439] 实施例11.抗PD-L1 Fc构建体对补体依赖性细胞毒性 (CDC) 的激活

[0440] 开发CDC测定以测试抗PD-L1 Fc构建体相对于抗PD-L1单克隆抗体阿维鲁单抗 (Bavencio) 增强CDC活性的程度。如实施例4、5和6中所述产生具有阿维鲁单抗的Fab序列 (VL+CL, VH+CH1) 的抗PD-L1 Fc构建体45、46和47。在如下进行的CDC测定中测试每个抗PD-L1 Fc构建体以及岩藻糖基化和无岩藻糖基化阿维鲁单抗单克隆抗体:

[0441] 将转染以稳定表达人PD-L1基因的人胚肾 (HEK) 细胞系 (CrownBio) 在DMEM、10% FBS和2μg/mL嘌呤霉素 (作为选择标记) 中培养。收获细胞并将其在不含基因泰克汀 (genetecin) 或酚红 (Lonza) 的X-Vivo-15培养基中稀释。将100μl 6x10⁵个细胞/mL的HEK-PD-L1细胞铺在96孔组织培养处理的平底板 (BD Falcon) 中。将Fc构建体和抗体在X-Vivo-15培养基中按以1:3连续稀释。将50μL稀释的构建体添加到孔中靶细胞的顶部。将50μl未稀释的人血清补体 (Quidel Corporation) 添加到每个孔中。然后将测定板在37℃下温育2小时。温育2小时后,将20μL WST-1细胞增殖试剂 (Roche Diagnostics Corp) 添加到每个孔中,并在37℃下温育过夜。第二天早上,将测定板放置在板振荡器上2-5分钟。在分光光度计 (Molecular Devices SPECTRAmax M2) 上以600nm校正在450nm处测定吸光度。确定每种构建体的EC50 (nM)。

[0442] 如表13中所示,抗PD-L1 Fc构建体47在表达人PD L1的HEK细胞中诱导CDC,但是使用该测定,其余的抗PD-L1 Fc构建体和阿维鲁单抗单克隆抗体似乎未诱导CDC。

[0443] 表13.抗PD-L1 Fc构建体在表达PD-L1的HEK细胞中诱导CDC的效力

构建体 ¹	n	EC50 (nM)		
		范围	平均值	SD
IgG1 抗体, 岩藻糖基化	7	无 CDC 活性 ²	无 CDC 活性 ²	N/A
IgG1 抗体, 无岩藻糖基化	1	无 CDC 活性 ²	无 CDC 活性 ²	N/A
[0444] S3L-AA2-AVE 构建体 45 (抗 PD-L1)	1	无 CDC 活性 ²	无 CDC 活性 ²	N/A
S3L-AA2-2AVE 构建体 46 (抗 PD-L1)	1	未确定	未确定	N/A
S3L-A22-2AVE 构建体 47 (抗 PD-L1)	2	1.4 – 2.7	1.6	1.1

[0445] ¹除非另有说明,否则所有构建体都包括G20接头。²构建体在测定条件下未产生可测量的CDC。

[0446] 实施例12.抗CD20 Fc构建体对抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)的激活

[0447] ADCP报告基因测定

[0448] 开发ADCP报告基因测定以测试抗CD20 Fc构建体相对于抗CD20单克隆奥滨尤妥珠单抗抗体(Gazyva)激活Fc γ RIIa信号传导、从而增强ADCP活性的程度。如实施例4、5和6中所述产生具有Gazyva的Fab序列(VL+CL,VH+CH1)的抗CD20 Fc构建体45、46和47。在如下进行的ADCC报告基因测定中测试每个抗CD20 Fc构建体以及岩藻糖基化和无岩藻糖基化奥滨尤妥珠单抗单克隆抗体:

[0449] 将Raji靶细胞(1.5×10^4 个细胞/孔)和Jurkat/Fc RIIa-H效应细胞(Promega)(3.5×10^4 个细胞/孔)重悬于补充有4%低IgG血清(Promega)的RPMI 1640培养基中,并与连续稀释的抗CD20 Fc构建体一起接种到96孔板中。在5%CO₂中在37°C下温育6小时后,使用PHERAstar FS发光计(BMG LABTECH)根据制造商的规程使用Bio-Glo荧光素酶测定试剂

(Promega) 测量发光。

[0450] 如表14中所示,抗CD20 Fc构建体在ADCP报告基因测定中诱导Fc γ RIIa信号传导,并且相对于奥滨尤妥珠单抗单克隆抗体在增强ADCP活性中表现出更大的效力,如较低的EC50值所证明。

[0451] 表14.抗CD20 Fc构建体在ADCP报告基因测定中诱导Fc γ RIIa信号传导的效力

[0452]

构建体 ¹	n	EC50 (nM)		
		范围	平均值	SD
IgG1 抗体, 岩藻糖基化	6	4.5 - 10.8	7.1	2.2
IgG1 抗体, 无岩藻糖基化	3	5.5 - 6.1	5.8	0.3
S3L-AA2-OBI 构建体 45 (抗 CD20)	1	0.13	0.13	N/A
S3L-OAA2-OBI 构建体 46 (抗 CD20)	1	0.17	0.17	N/A
S3L-OA22-OBI2 构建体 47 (抗 CD20)	1	0.08	0.08	N/A

[0453] ¹除非另有说明,否则所有构建体都包括G20接头。

[0454] 实施例13.抗PD-L1 Fc构建体对抗体依赖性细胞吞噬作用 (ADCP) 的激活

[0455] ADCP报告基因测定

[0456] 开发ADCP报告基因测定以测试抗PD-L1 Fc构建体相对于抗PD-L1单克隆抗体阿维鲁单抗 (Bavencio) 激活Fc γ RIIa信号传导、从而增强ADCP活性的程度。如实施例4、5和6中所述产生具有阿维鲁单抗的Fab序列 (VL+CL, VH+CH1) 的抗PD-L1 Fc构建体45、46和47。在如下进行的ADCC报告基因测定中测试每个抗PD-L1 Fc构建体以及岩藻糖基化和无岩藻糖基化阿维鲁单抗单克隆抗体:

[0457] 将HEK-PD-L1靶细胞 (1.5x10⁴个细胞/孔) 和效应Jurkat/Fc γ RIIa-H细胞 (Promega) (3.5x10⁴个细胞/孔) 重悬于补充有4%低IgG血清 (Promega) 的RPMI 1640培养基中,并与连续稀释的抗PD-L1 Fc构建体一起接种到96孔板中。在5%CO₂中在37℃下温育6小

时后,使用PHERAstar FS发光计 (BMG LABTECH) 根据制造商的规程使用Bio-Glo荧光素酶测定试剂 (Promega) 测量发光。

[0458] 如表15中所示,抗PD-L1 Fc构建体在ADCP报告基因测定中诱导Fc γ RIIa信号传导。

[0459] 表15.抗PD-L1 Fc构建体在ADCP报告基因测定中诱导Fc γ RIIa信号传导的效力

[0460]

构建体编号 ¹	n	EC50 (nM)		
		范围	平均值	SD
IgG1 抗体, 岩藻糖基化	6	没有效果 ²	没有效果 ²	N/A
IgG1 抗体, 无岩藻糖基化	1	没有效果 ²	没有效果 ²	N/A
S3L-AA2-AVE 构建体 45 (抗 PD-L1)	1	0.031	0.031	N/A
S3L-AA2-2AVE 构建体 46 (抗 PD-L1)	1	0.03	0.03	N/A

[0461]

构建体编号 ¹	n	EC50 (nM)		
		范围	平均值	SD
S3L-A22-2AVE 构建体 47 (抗 PD-L1)	1	0.03	0.03	N/A

[0462] ¹除非另有说明,否则所有构建体都包括G20接头。²构建体在测定条件下未诱导可测量的Fc γ RIIa信号传导。

[0463] 实施例14.抗CD20 Fc构建体对抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 的激活

[0464] ADCC报告基因测定

[0465] 开发ADCC报告基因测定以测试抗CD20 Fc构建体相对于抗CD20单克隆抗体奥滨尤妥珠单抗 (Gazyva) 诱导Fc γ RIIa信号传导并增强ADCC活性的程度。如实施例4、5和6中所述产生具有Gazyva的Fab序列 (VL+CL, VH+CH1) 的抗CD20 Fc构建体45、46和47。在如下进行的ADCC报告基因测定中测试每个抗CD20 Fc构建体和岩藻糖基化奥滨尤妥珠单抗单克隆抗体:

[0466] 将Raji靶细胞 (1.25x10⁴个细胞/孔) 和Jurkat/Fc γ RIIIa效应细胞 (Promega) (7.45x10⁴个细胞/孔) 重悬于补充有4%低IgG血清 (Promega) 的RPMI 1640培养基中, 并与连续稀释的抗CD20 Fc构建体一起接种到96孔板中。在5%CO₂中在37℃下温育6小时后, 使用PHERAstar FS发光计 (BMG LABTECH) 根据制造商的规程使用Bio-Glo荧光素酶测定试剂 (Promega) 测量发光。

[0467] 如表16中所示, 抗CD20 Fc构建体在ADCC报告基因测定中诱导Fc γ RIIIa信号传导。

[0468] 表16. 抗CD20 Fc构建体在ADCC报告基因测定中诱导Fc γ RIIIa信号传导的效力

[0469]

构建体 ¹	n	EC50 (nM)		
		范围	平均值	SD
IgG1 抗体, 岩藻糖基化	6	0.039-0.15	0.08	0.04
S3L-AA2-OBI 构建体 45 (抗 CD20)	1	0.055	0.055	N/A

[0470]

构建体 ¹	n	EC50 (nM)		
		范围	平均值	SD
S3L-0AA2-OBI 构建体 46 (抗 CD20)	1	0.09	0.09	N/A
S3L-0A22-OBI2 构建体 47 (抗 CD20)	1	0.043	0.043	N/A

[0471] ¹除非另有说明, 否则所有构建体都包括G20接头。

[0472] 实施例15. 抗PD-L1 Fc构建体对抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 的激活

[0473] ADCC报告基因测定

[0474] 开发ADCC报告基因测定以测试抗PD-L1 Fc构建体相对于抗PD-L1单克隆抗体阿维鲁单抗 (Bavencio) 诱导Fc γ RIIIa信号传导并增强ADCC活性的程度。如实施例4、5和6中所述产生具有阿维鲁单抗的Fab序列 (VL+CL, VH+CH1) 的抗PD-L1 Fc构建体45、46和47。在如下进行的ADCC报告基因测定中测试每个抗PD-L1 Fc构建体以及岩藻糖基化和无岩藻糖基化阿维鲁单抗单克隆抗体:

[0475] 将HEK-PD-L1靶细胞 (1.25x10⁴个细胞/孔) 和效应Jurkat/Fc γ RIIIa细胞 (Promega) (7.45x10⁴个细胞/孔) 重悬于补充有4%低IgG血清 (Promega) 的RPMI 1640培养

基中,并与连续稀释的抗PD-L1构建体一起接种到96孔板中。在5%CO₂中在37℃下温育6小时后,使用PHERAstar FS发光计 (BMG LABTECH) 根据制造商的规程使用Bio-Glo荧光素酶测定试剂 (Promega) 测量发光。

[0476] 如表17中所示,一些抗PD-L1 Fc构建体在ADCC报告基因测定中诱导Fc γ RIIIIa信号传导。使用该测定法无法确定Fc构建体44、45和47以及无岩藻糖基化单克隆抗体对Fc γ RIIIIa信号传导的诱导。

[0477] 表17. 抗PD-L1 Fc构建体在ADCC报告基因测定中诱导Fc γ RIIIIa信号传导的效力

构建体编号 ¹	n	EC50 (nM)		
		范围	平均值	SD
[0478] IgG1 抗体, 岩藻糖基化	5	0.037 - 0.056	0.049	0.008

构建体编号 ¹	n	EC50 (nM)		
		范围	平均值	SD
[0479] IgG1 抗体, 无岩藻糖基化	1	未确定 ²	未确定 ²	N/A
	1	未确定 ²	未确定 ²	N/A
	1	0.029	0.029	N/A
	1	未确定 ²	未确定 ²	N/A

[0480] ¹除非另有说明,否则所有构建体都包括G20接头。

[0481] ²数据无法可靠地拟合到四参数对数 (4PL) 曲线中。

[0482] 实施例16: 替代的不对称分支Fc-抗原结合结构域构建体

[0483] 图8和图9中的两个Fc构建体各自具有三个Fc结构域,并且使用两组异二聚化结构域突变由三个不同的多肽组装而成。两种构建体都是具有Fc结构域的对称分布(使用多肽链的不对称排列)的分支Fc构建体,并且各自具有在构建体上不对称分布的单个抗CD20 Fab结构域。图18和图19分别描绘了图8和图9的构建体的替代方案,其中具有旋钮-进入-孔

洞突变并结合静电转向突变的Fc结构域和仅具有静电转向突变的Fc结构域的相对位置交换。图20和图21呈现了多肽的序列。

[0484] 其他实施方案

[0485] 本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请都以引用的方式并入本文，其程度如同每个独立的出版物或专利申请具体地且个别地指出以引用的方式并入。

[0486] 虽然本公开已结合其具体实施方案进行描述，但应理解，进一步的修改是可能的，并且本专利申请预期覆盖一般而言遵循本公开的原理的本公开的任何变化、用途或适应，并且包括与本公开的此类偏离，所述偏离在本公开所属领域内的已知或惯常实践内，并且可以应用于上文所述的基本特征，并且落入权利要求的范围内。其他实施方案在权利要求内。

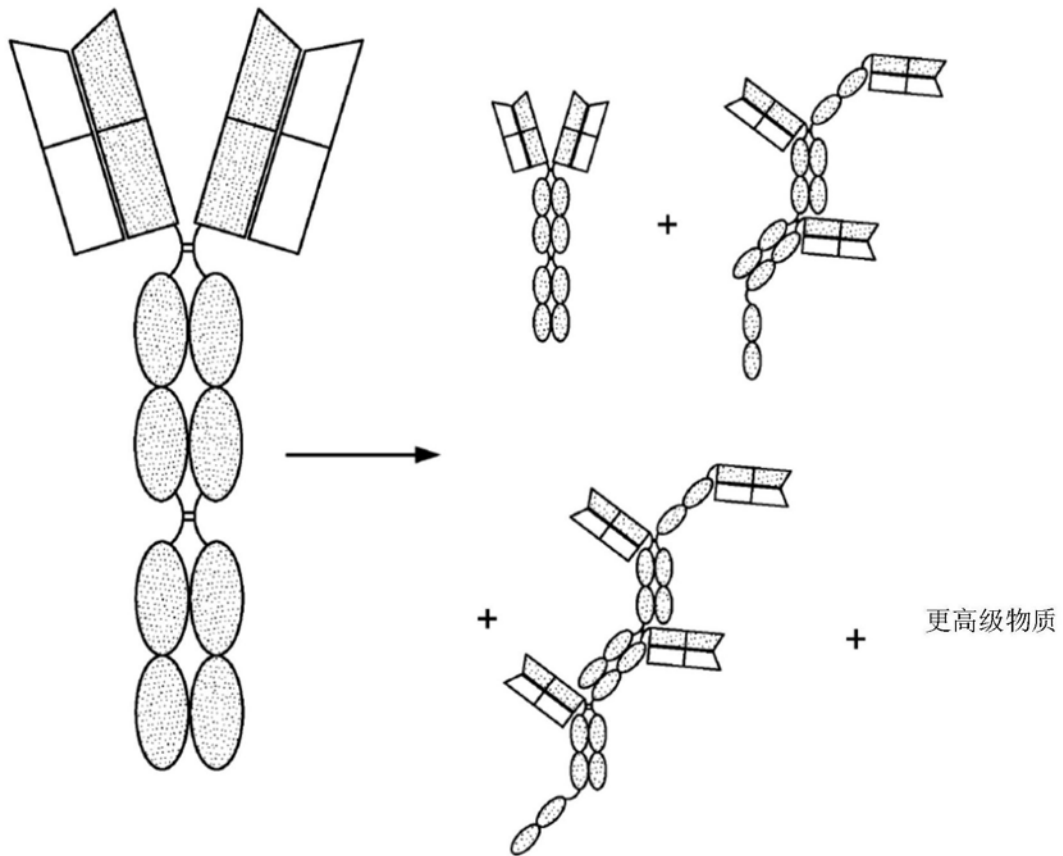


图1

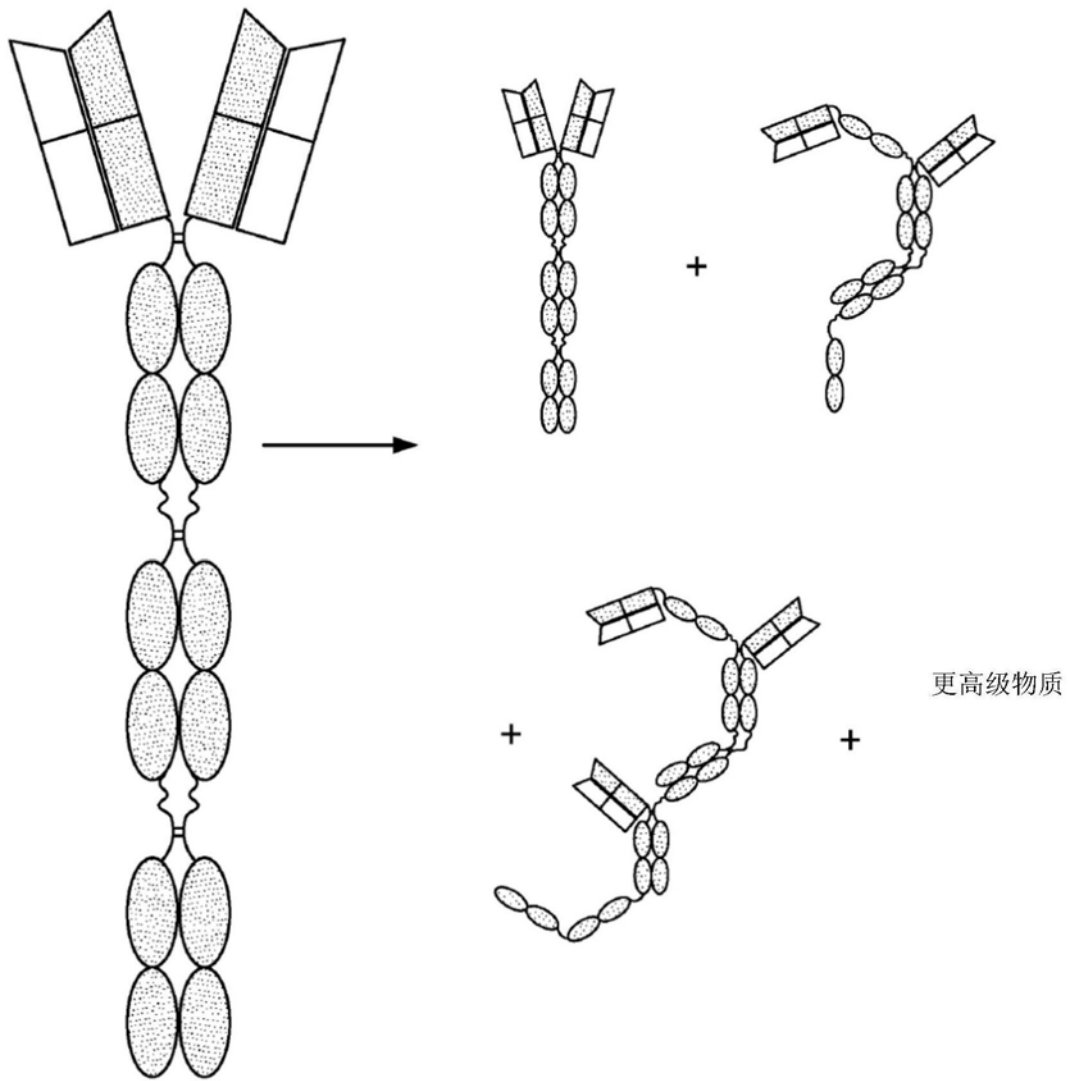


图2

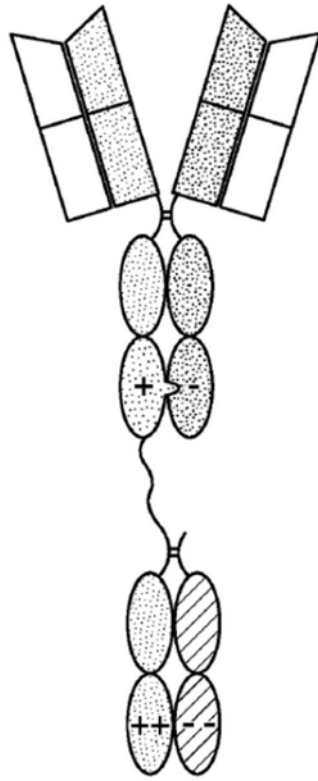


图3A

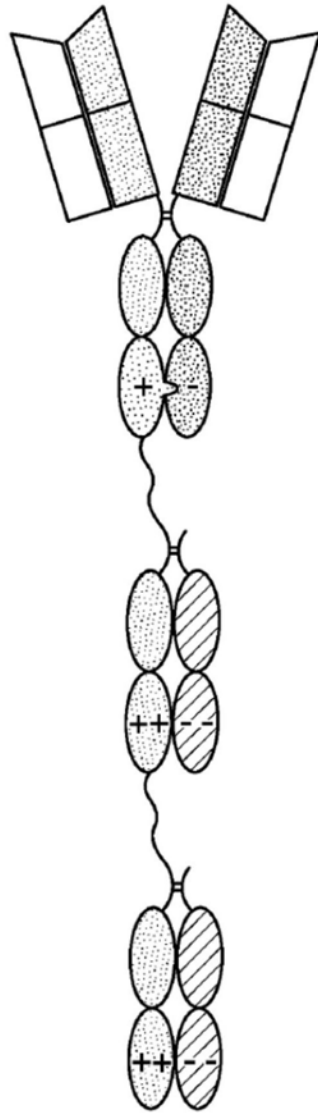


图3B

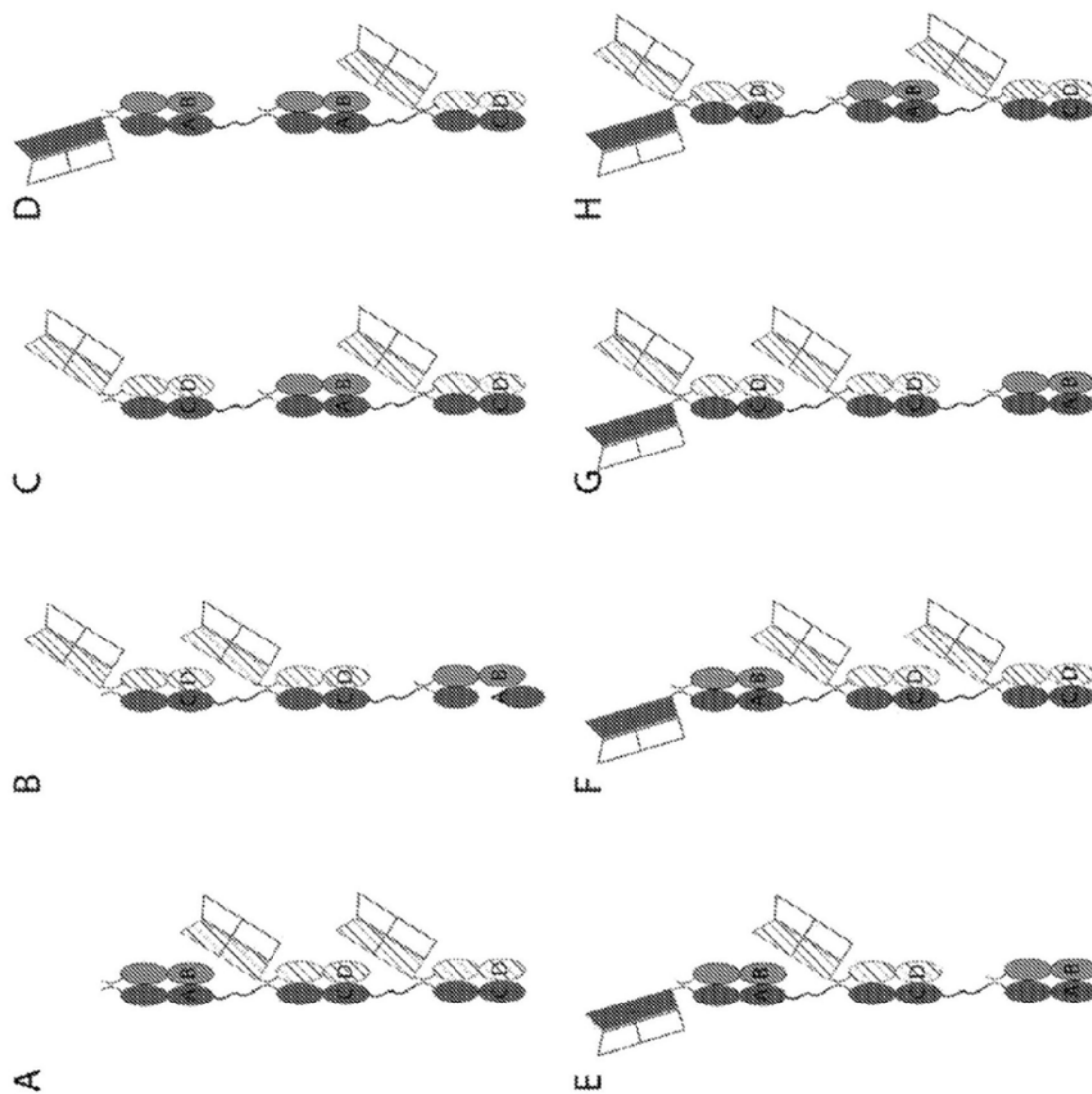


图4

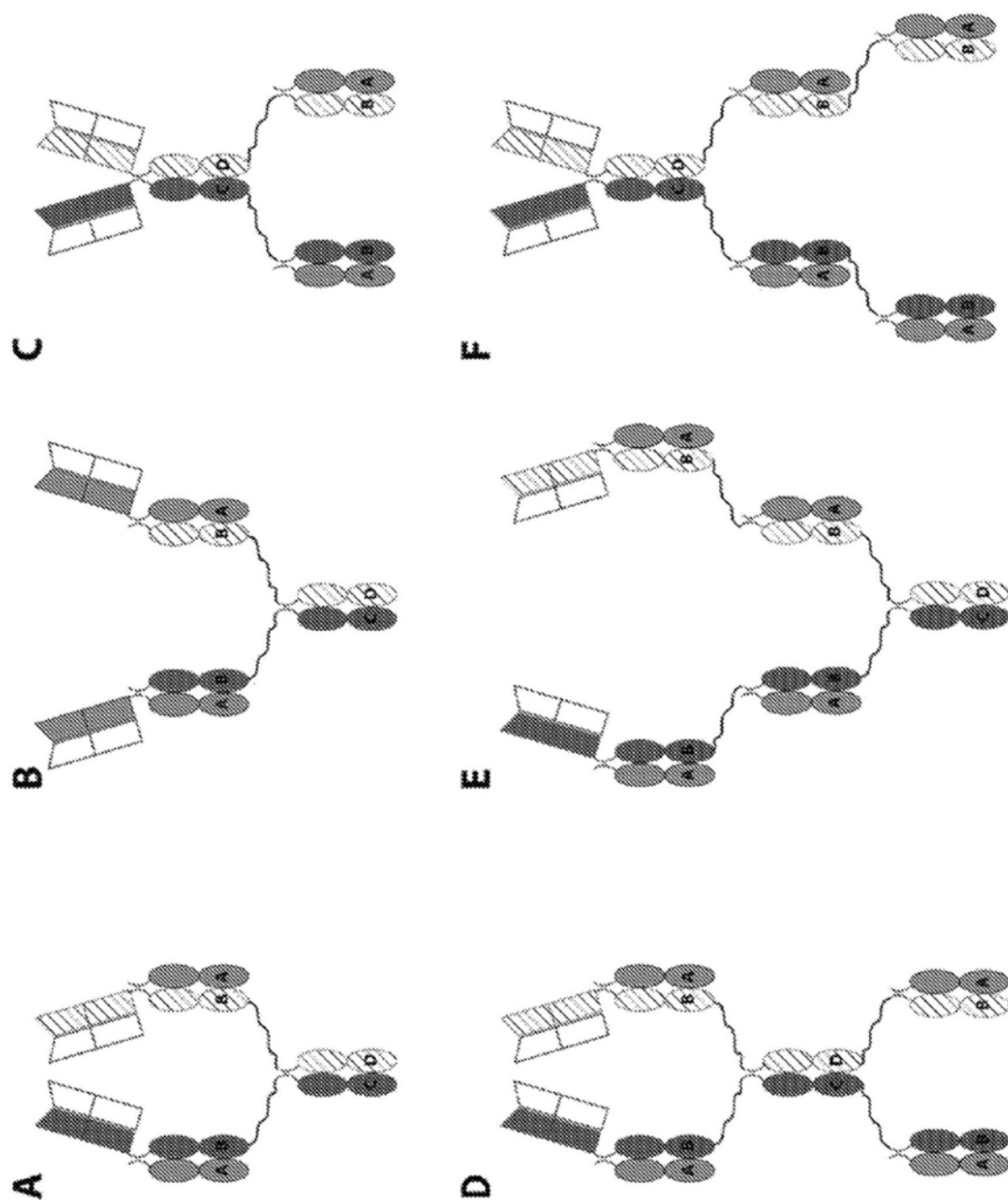


图5

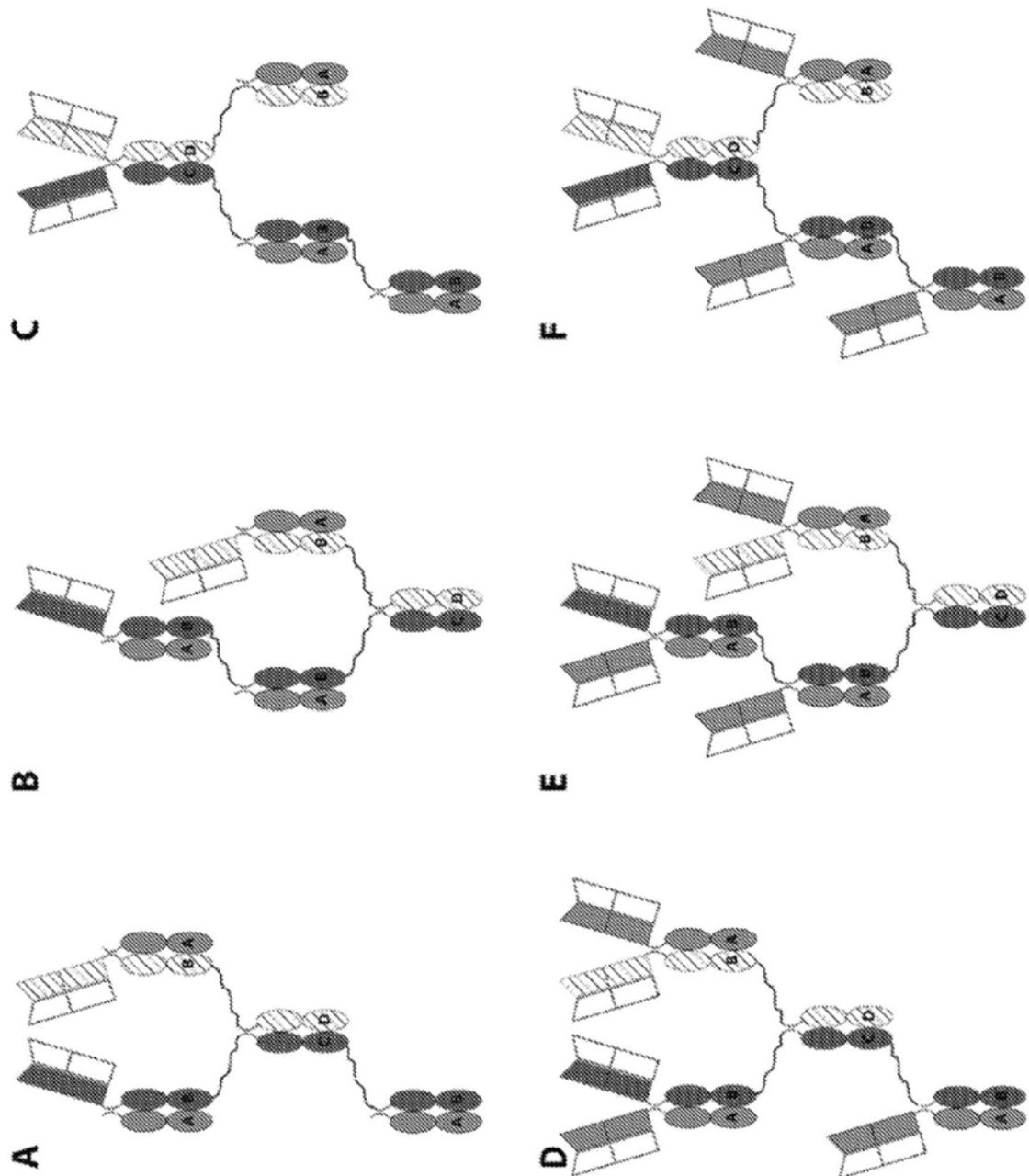


图6

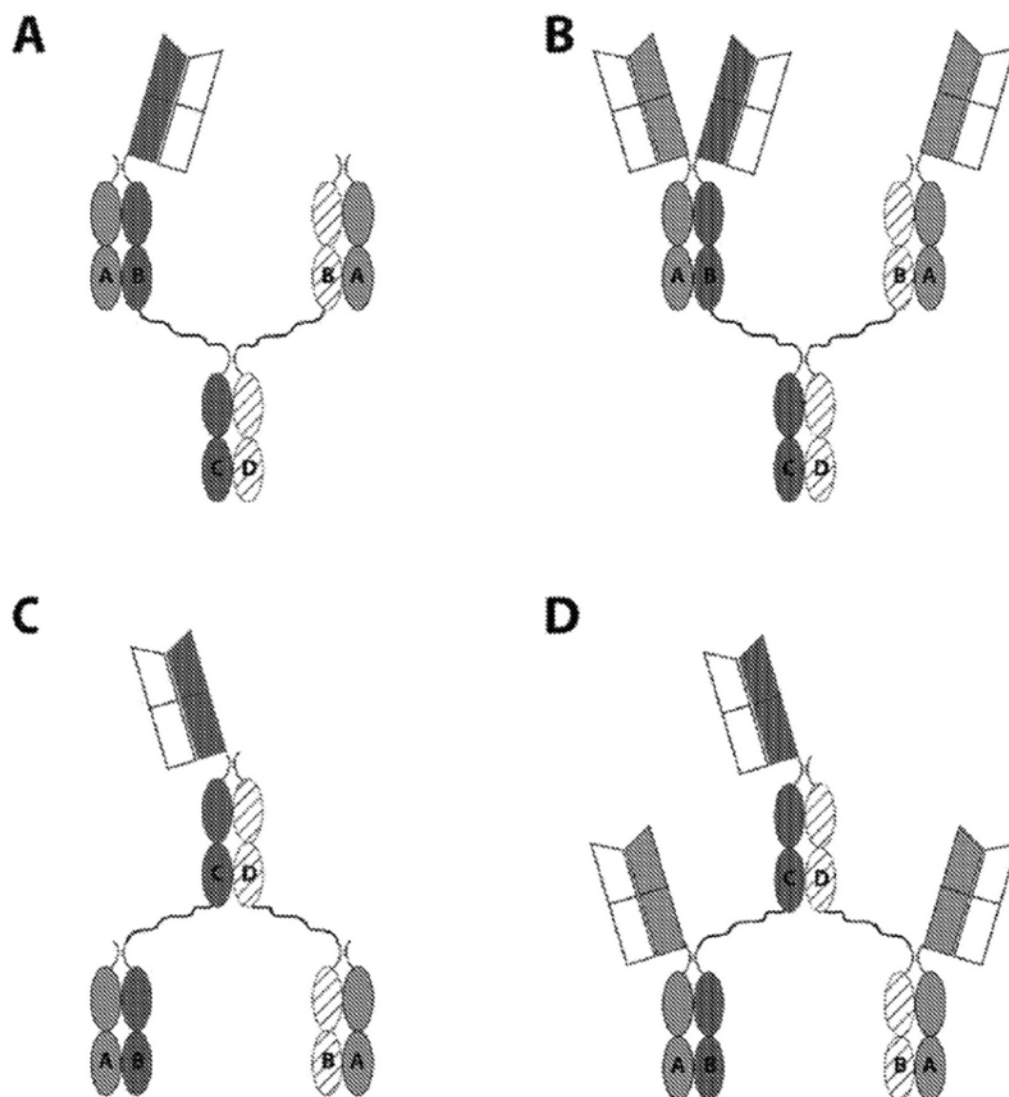


图7

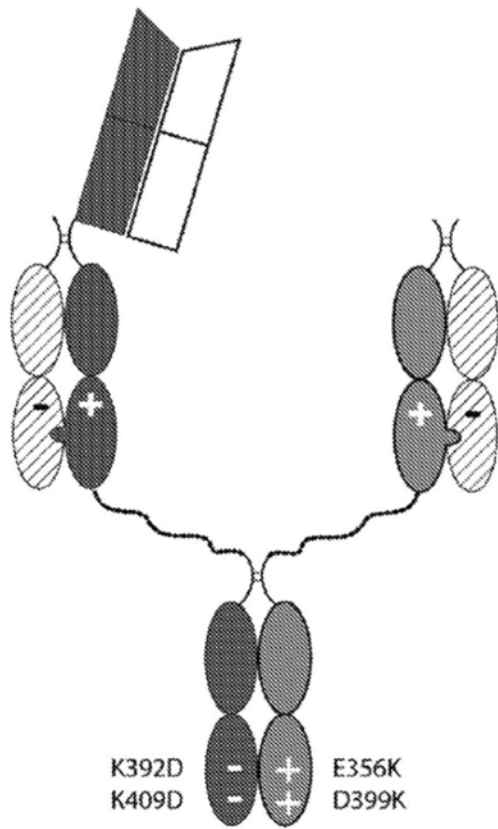
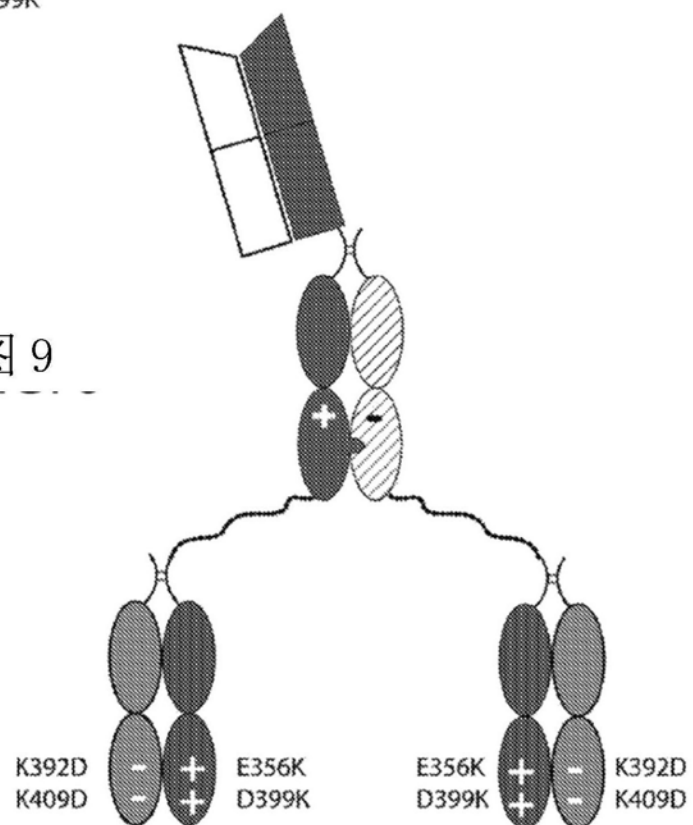


图 8

图 9



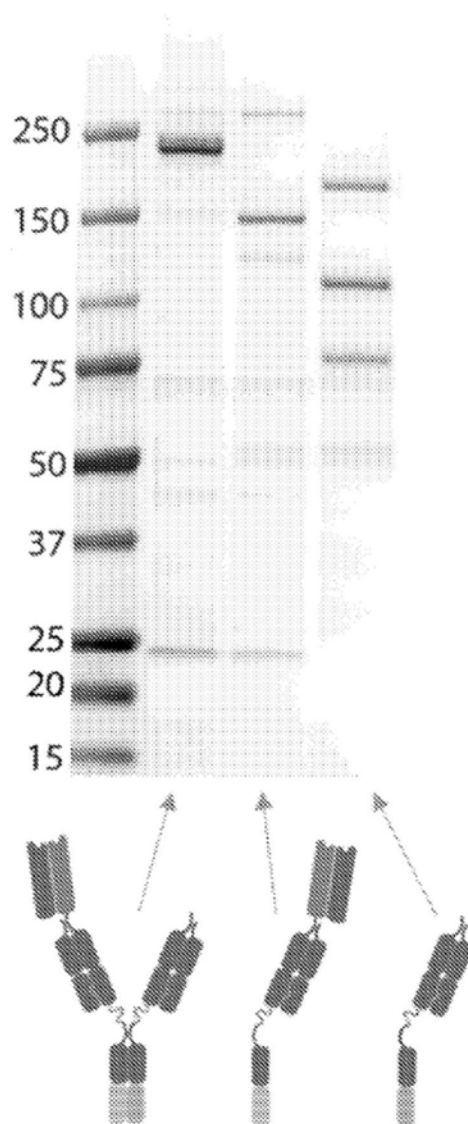


图10

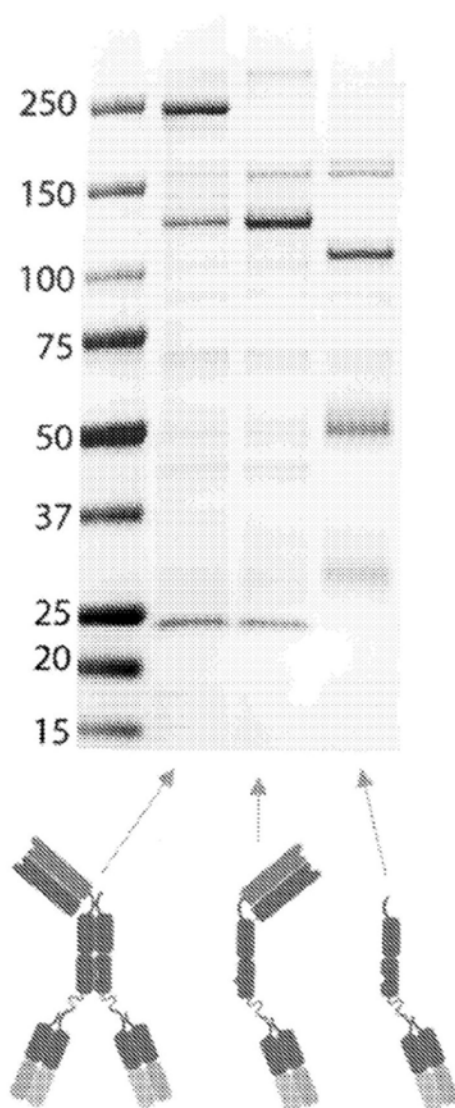


图11

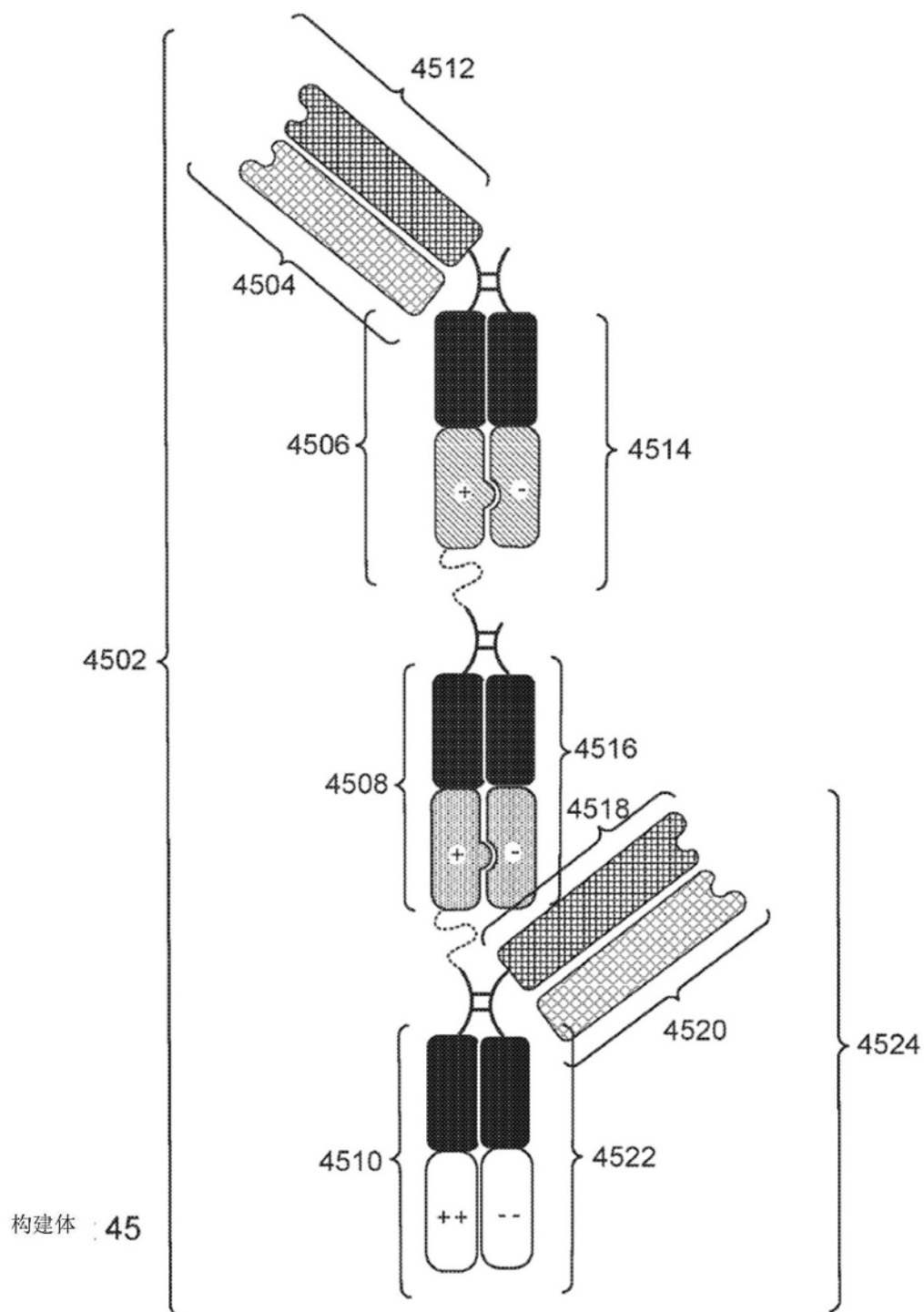
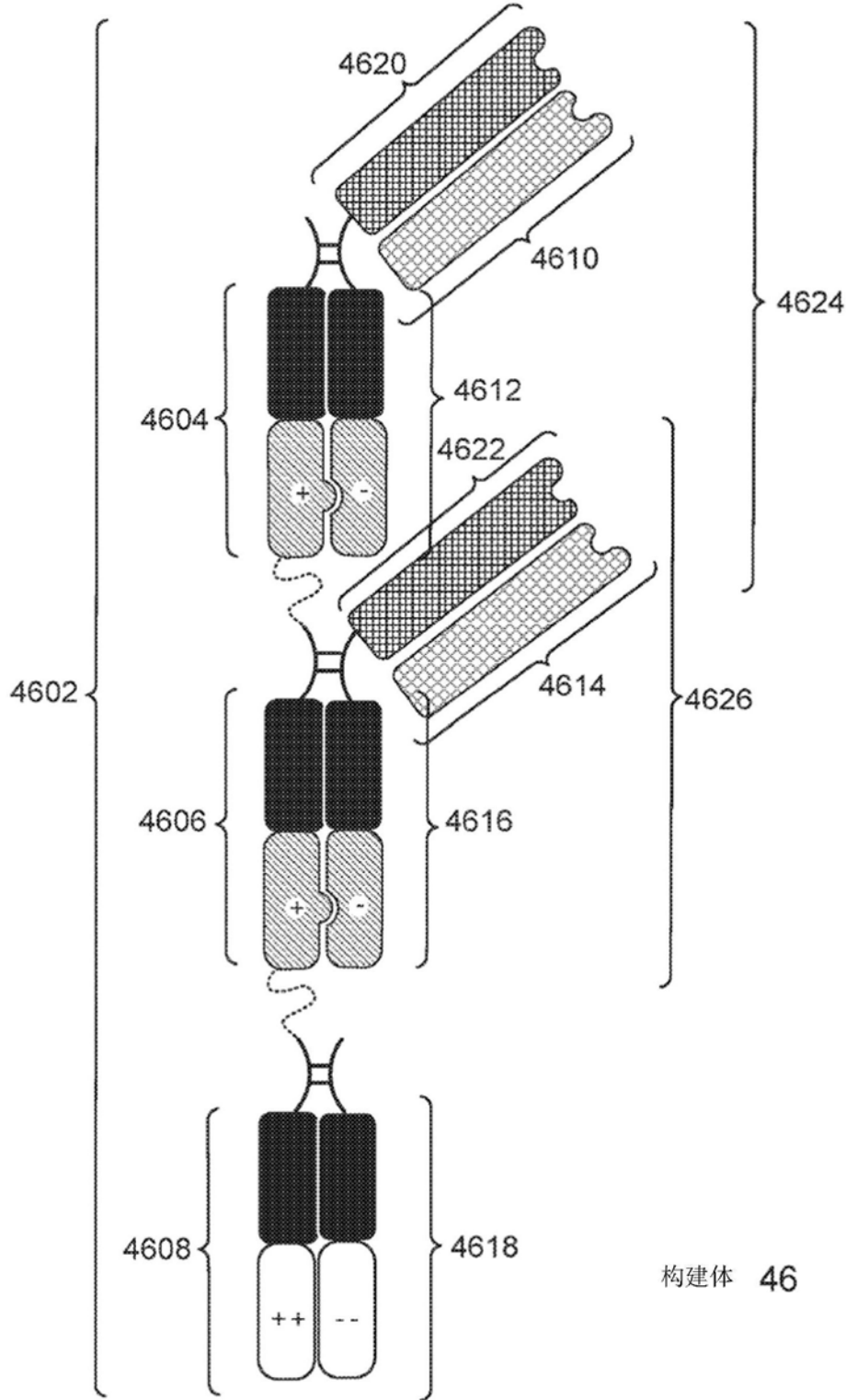
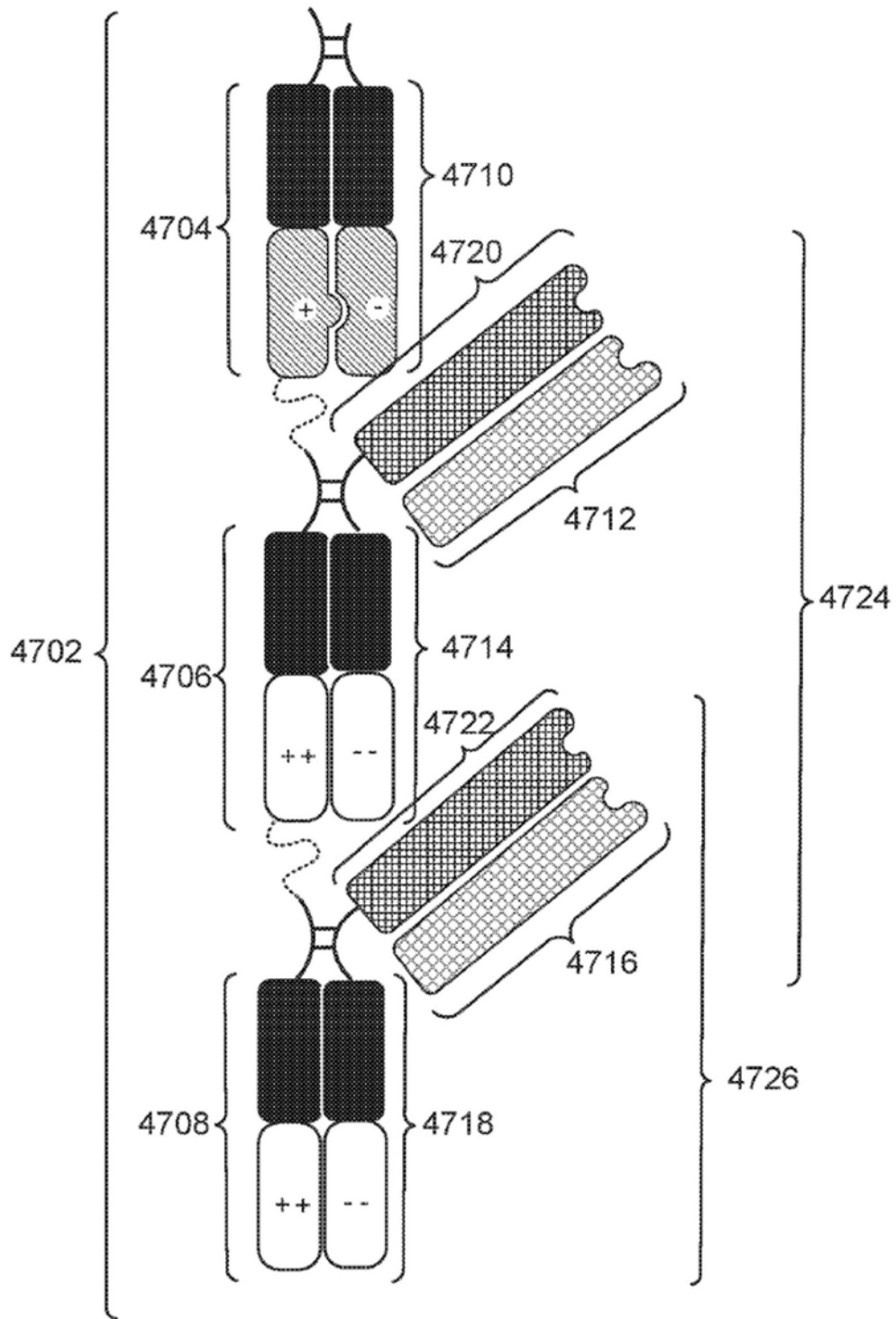


图12



构建体 46

图13



构建体 47

图14

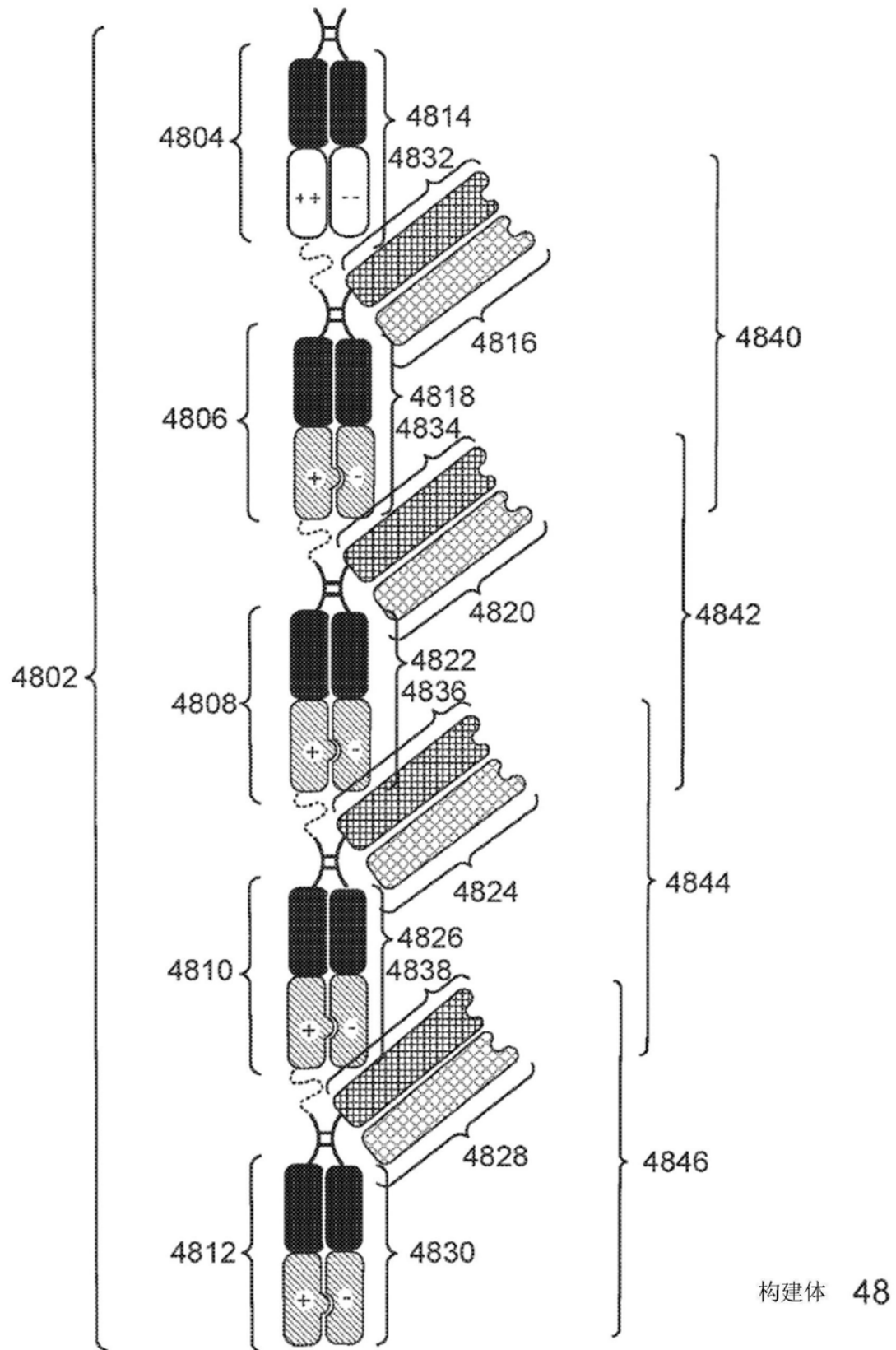


图15

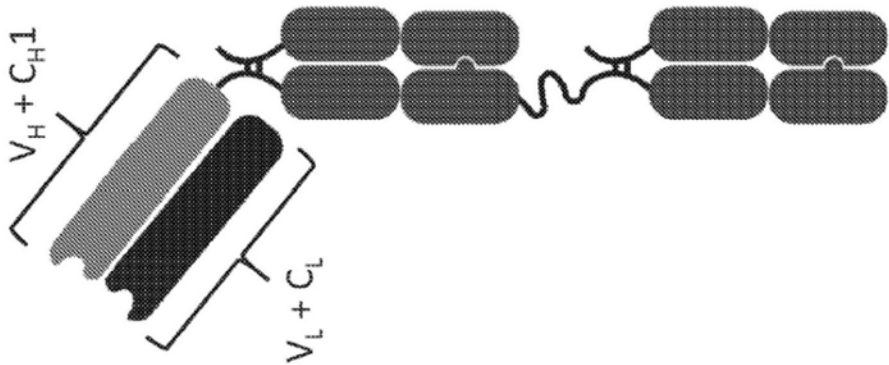


图16A

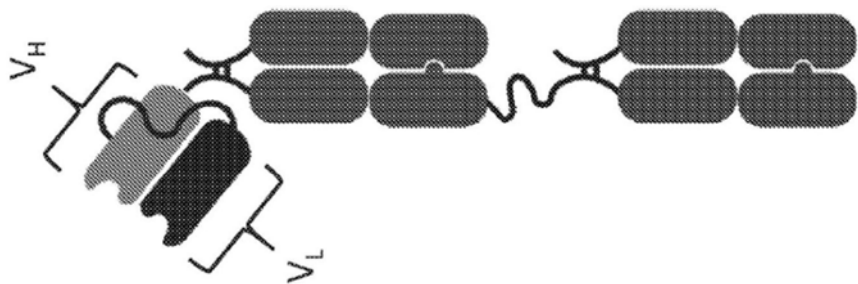


图16B

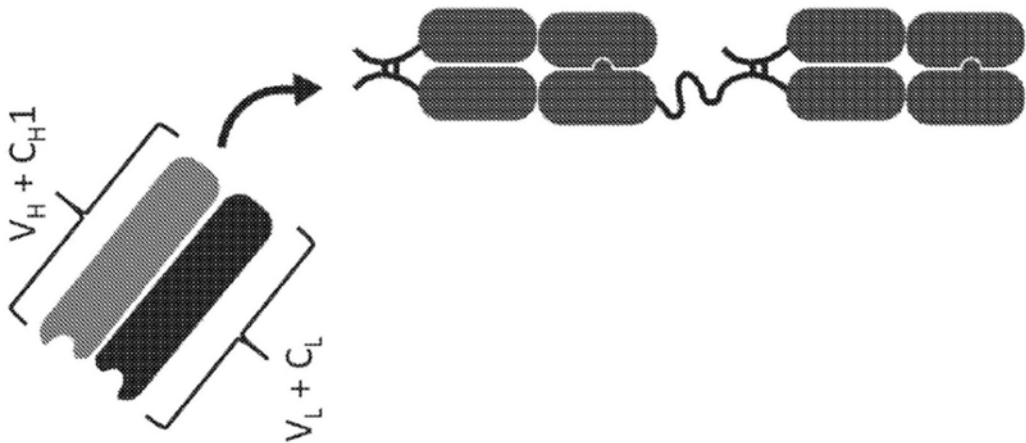


图16C

216 EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWYVD 280
281 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVWSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR 344
345 EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK 409
410 LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 447

(SEQ ID NO: 43)

图17A

221 DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD 280
281 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR 344
345 EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSK 409
410 LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG 446

(SEQ ID NO: 45)

图17B

216 EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMI~~SRTPEVTCVW~~DVSHEDPEVKFNWYVD 280
281 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWVS~~VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR~~ 344
345 EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSK 409
410 LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG 446

(SEQ ID NO: 47)

图17C

221 DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD 280
281 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR 344
345 EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSK 409
410 LTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNIHYTQKSLSPGK 447

(SEQ ID NO: 42)

图17D

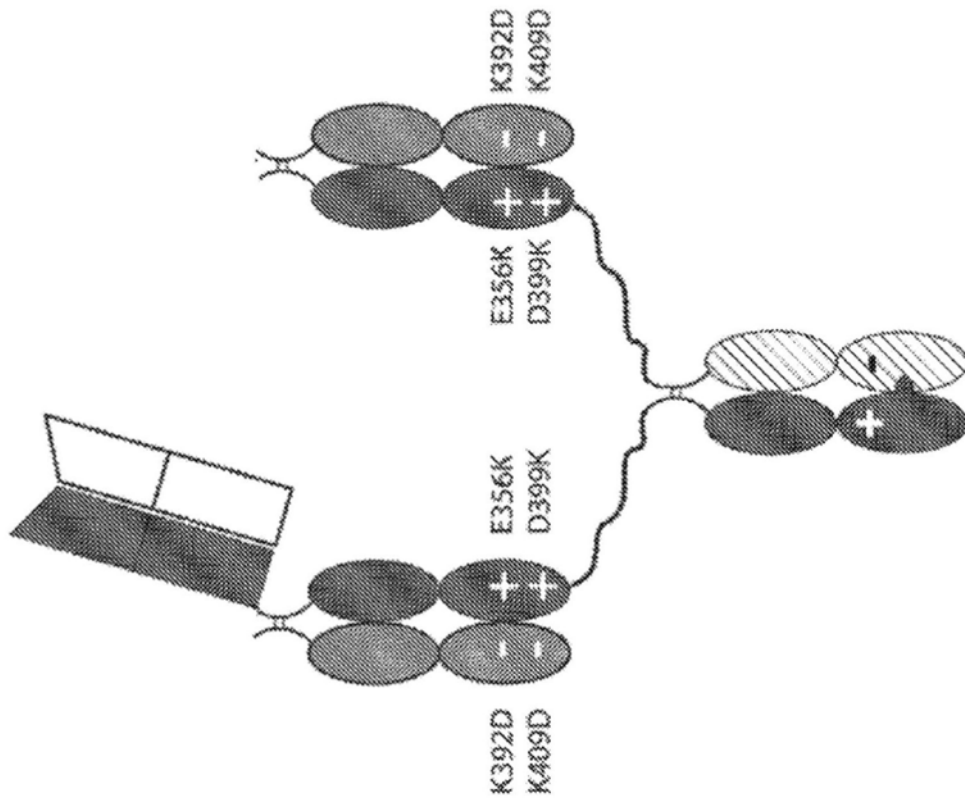


图18

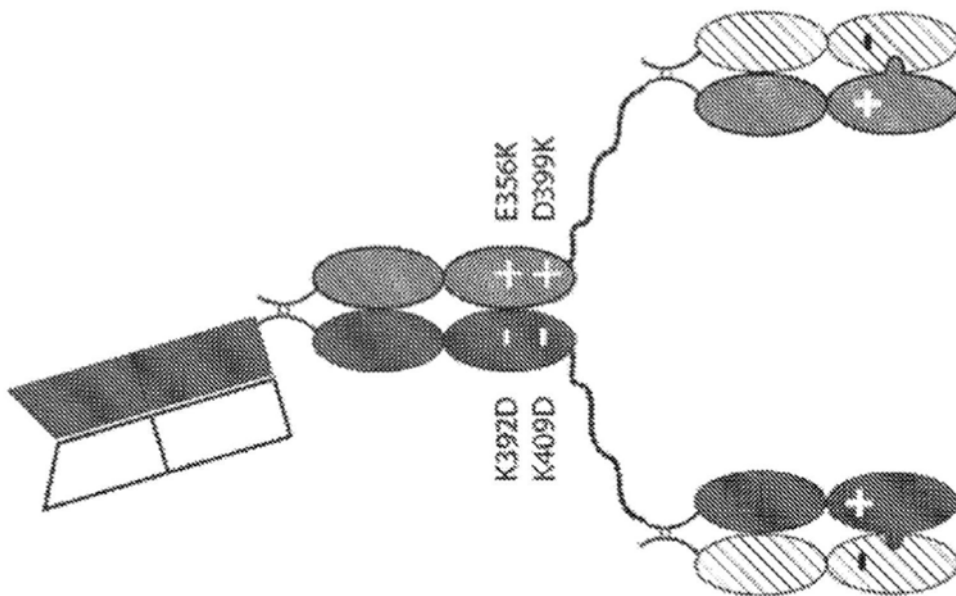


图19

[illegible]

图20

[illegible]

图21