



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本 (11) 公開編號：TW 201940512 A

(43) 公開日：中華民國 108 (2019) 年 10 月 16 日

(21) 申請案號：108102958 (22) 申請日：中華民國 108 (2019) 年 01 月 25 日

(51) Int. Cl. :	C07K16/28 (2006.01)	A61K39/395 (2006.01)
	C12N15/13 (2006.01)	C12N15/63 (2006.01)
	C12N1/21 (2006.01)	C12N5/07 (2010.01)
	A61K35/00 (2006.01)	

(30) 優先權：2018/01/26 美國 62/622,468

(71) 申請人：美商健臻公司 (美國) GENZYME CORPORATION (US)
美國

(72) 發明人：邱 華偉 QIU, HUAWEI (US)；麥克尼斯 布萊恩 MACKNESS, BRIAN (US)

(74) 代理人：陳彥希；何愛文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：130 項 圖式數：29 共 165 頁

(54) 名稱

具有與 Fc Rn 增進的結合及延長的半衰期之 Fc 變異體

(57) 摘要

本揭示文本提供包含經修飾的 Fc 結構域的結合多肽(例如，抗體和免疫黏附素)。本揭示文本還提供編碼該結合多肽的核酸、重組表現載體和用於製備這類結合多肽的宿主細胞。還提供了使用本文揭示的結合多肽治療疾病的方法。

The present disclosure provides binding polypeptides (e.g., antibodies and immunoadhesins) comprising a modified Fc domain. The present disclosure also provides nucleic acids encoding the binding polypeptides, recombinant expression vectors, and host cells for making such binding polypeptides. Methods of using the binding polypeptides disclosed herein to treat disease are also provided.

【發明說明書】

【中文發明名稱】 具有與FcRn增進的結合及延長的半衰期之Fc變異體

【英文發明名稱】 Fc VARIANTS WITH ENHANCED BINDING TO FcRn AND PROLONGED HALF-LIFE

【技術領域】

【0001】 本揭示文本提供包含經修飾的Fc結構域的結合多肽(例如，抗體和免疫黏附素)。本揭示文本還提供編碼該結合多肽的核酸、重組表現載體和用於製備這類結合多肽的宿主細胞。還提供了使用本文揭示的結合多肽治療疾病的方法。

【先前技術】

【0002】 抗體與新生兒Fc受體(FcRn)的相互作用是維持和延長抗體和其他Fc衍生的治療劑的血清半衰期的決定因素。FcRn是MHC類-I樣 α -結構域和 $\beta 2$ -巨球蛋白($\beta 2$ -m)亞基的異二聚體，該異二聚體識別抗體Fc重鏈上與其他Fc γ 受體(Fc γ R)不同的區域。雖然FcRn在多種組織中表現，但它被認為主要在血管內皮、腎臟中和血腦障壁處起作用，分別用於阻止IgG降解、排泄和引發炎性反應。

【0003】 與FcRn結合的抗體是高度pH依賴性的，並且該相互作用僅在低pH(pH < 6.5)下以高親和力(高奈摩爾至低微摩爾)發生，但在生理pH (pH約7.4)下不發生。在將胞內體(endosome)酸化至pH小於6.5時，IgG與FcRn之間的相互作用變得非常有利，並且直接負責抑制降解並促進FcRn結合的抗體再循環至細胞表面。pH的增加削弱了相互作用並促進抗體釋放至血流中。

【0004】 使用高通量突變誘發方法的Fc工程已被廣泛用於鑑定能增強

FcRn結合親和力的變異體，因為增強的結合將可能導致治療性抗體的功效增加和劑量頻率降低，這是與野生型IgG抗體相比延長的血清半衰期的直接結果。然而，增強FcRn結合親和力的變異體可能具有不可預知的結果。例如，在pH 6.0下顯示FcRn親和力大幅增加的某些IgG變異體，如N434W或P257I/Q311I等，在食蟹猴和人FcRn(hFcRn)轉基因小鼠研究中具有野生型或嚴重降低的血清半衰期(參見例如Kuo等人 2011 同上；Datta-Mannan等人 2007, *J. Biol. Chem.* 282:1709-1717；以及 Datta-Mannan等人 2007, *Metab. Dispos.* 35: 86-94)。T250Q/M428L (QL)變異體已經在動物模型中顯示出IgG骨架特異性結果(參見例如Datta-Mannan等人 2007, *J. Biol. Chem.* 282:1709-1717；和Hinton等人 2006, *J. Immunol.* 176:346-356)。M252Y/S254T/T256E (YTE，EU編號)變異體已經顯示出在體外10倍增強，但在體內由於對於Fc γ RIIIa受體的親和力的2倍降低而展示出抗體依賴性細胞介導的減小的細胞毒性(ADCC)(參見例如Dall'Acqua等人 2002 同上)。

【0005】因此，仍然需要具有與FcRn的增強的結合和延長的循環半衰期的替代Fc變異體。

【發明內容】

【0006】本發明基於具有以下特徵中的一種或多種的新型IgG抗體的發現：與野生型IgG抗體相比，增加的血清半衰期、增強的FcRn結合親和力、在酸性pH下增強的FcRn結合親和力、增強的Fc γ RIIIa結合親和力和類似的熱穩定性。

【0007】因此，在某些態樣，提供了包含經修飾的Fc結構域的分離的結合多肽，該經修飾的Fc結構域包含胺基酸位置256處的天門冬胺酸(D)或麴胺酸

(E)，和/或胺基酸位置307處的色胺酸(W)或麩醯胺酸(Q)，其中胺基酸位置254不是蘇胺酸(T)，並且進一步包含胺基酸位置434處的苯丙胺酸(F)或酪胺酸(Y)或胺基酸位置252處的酪胺酸(Y)，其中該胺基酸位置按照EU編號。

【0008】在某些示例性實施例中，經修飾的Fc結構域是經修飾的人Fc結構域。在某些示例性實施例中，經修飾的Fc結構域是經修飾的IgG1 Fc結構域。

【0009】在某些示例性實施例中，該結合多肽具有人FcRn結合親和力、大鼠FcRn結合親和力或人和大鼠FcRn結合親和力二者。

【0010】在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，分離的結合多肽具有改變的血清半衰期。在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，分離的結合多肽具有增加的血清半衰期。

【0011】在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，分離的結合多肽具有改變的FcRn結合親和力。在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，分離的結合多肽具有增強的FcRn結合親和力。在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，分離的結合多肽在酸性pH下具有增強的FcRn結合親和力。在某些示例性實施例中，與結合多肽在升高的非酸性pH下的FcRn結合親和力相比，分離的結合多肽在酸性pH下具有增強的FcRn結合親和力。在某些示例性實施例中，增強的FcRn結合親和力包括降低的FcRn結合解離速率。

【0012】在某些示例性實施例中，酸性pH為約6.0。在某些示例性實施例中，酸性pH為約6.0並且非酸性pH為約7.4。

【0013】在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，分離的結合多肽具有改變的Fc γ RIIIa結合親和力。在某些示例性實施例中，

與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，分離的結合多肽具有降低的Fc γ RIIIa結合親和力。在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，分離的結合多肽具有增強的Fc γ RIIIa結合親和力。

【0014】 在某些示例性實施例中，分離的結合多肽具有與包含野生型Fc結構域的結合多肽大致相同的Fc γ RIIIa結合親和力。

【0015】 在某些示例性實施例中，分離的結合多肽具有與包含野生型Fc結構域的結合多肽大致相同的熱穩定性。在某些示例性實施例中，分離的結合多肽具有與包含具有按照EU編號的三重胺基酸取代M252Y/S254T/T256E的經修飾Fc結構域的結合多肽大致相同的熱穩定性。

【0016】 在某些示例性實施例中，該分離的結合多肽是抗體，例如單株抗體。在某些示例性實施例中，該分離的抗體是嵌合抗體、人源化抗體或人抗體。在某些示例性實施例中，該分離的抗體是全長抗體。

【0017】 在某些示例性實施例中，該分離的結合多肽特異性地結合一種或多種人標靶。

【0018】 在其他態樣，提供了包含經修飾的Fc結構域之分離的結合多肽，該經修飾的Fc結構域包含選自以下組成之群的位置處的胺基酸取代的組合：a) 胺基酸位置252處的酪胺酸(Y)和胺基酸位置256處的天門冬胺酸(D)，b) 胺基酸位置256處的天門冬胺酸(D)和胺基酸位置434處的苯丙胺酸(F)，c) 胺基酸位置256處的天門冬胺酸(D)和胺基酸位置434處的酪胺酸(Y)，d) 胺基酸位置307處的色胺酸(W)和胺基酸位置434處的苯丙胺酸(F)，e) 胺基酸位置252處的酪胺酸(Y)和胺基酸位置307處的色胺酸(W)，其中酪胺酸(Y)不在胺基酸位置434處，f) 胺基酸位置256處的天門冬胺酸(D)和胺基酸位置307處的色胺酸(W)，其中酪胺酸(Y)不在

胺基酸位置434處，g) 胺基酸位置256處的天門冬胺酸(D)和胺基酸位置307處的
麩醯胺酸(Q)，其中酪胺酸(Y)不在胺基酸位置434處，h) 胺基酸位置252處的酪胺
酸(Y)、胺基酸位置256處的天門冬胺酸(D)和胺基酸位置307處的麩醯胺酸(Q)，
其中酪胺酸(Y)不在胺基酸位置434處，以及i) 胺基酸位置252處的酪胺酸(Y)、胺
基酸位置256處的麩胺酸(E)和胺基酸位置307處的麩醯胺酸(Q)，其中蘇胺酸(T)
不在胺基酸位置254處，組胺酸(H)不在胺基酸位置311處，並且酪胺酸(Y)不在胺
基酸位置434處，其中該胺基酸取代按照EU編號。

【0019】 在某些示例性實施例中，經修飾的Fc結構域是經修飾的人Fc結構
域。在某些示例性實施例中，經修飾的Fc結構域是經修飾的IgG1 Fc結構域。

【0020】 在某些示例性實施例中，該結合多肽具有人FcRn結合親和力、大
鼠FcRn結合親和力或人和大鼠FcRn結合親和力二者。

【0021】 在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相
比，分離的結合多肽具有改變的血清半衰期。在某些示例性實施例中，與包含
野生型Fc結構域的結合多肽相比，分離的結合多肽具有增加的血清半衰期。

【0022】 在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相
比，分離的結合多肽具有改變的FcRn結合親和力。在某些示例性實施例中，與
包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，分離的結合多肽具有增強的FcRn結合親
和力。在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，分離
的結合多肽在酸性pH下具有增強的FcRn結合親和力。在某些示例性實施例中，
與結合多肽在升高的非酸性pH下的FcRn結合親和力相比，分離的結合多肽在酸
性pH下具有增強的FcRn結合親和力。在某些示例性實施例中，增強的FcRn結合
親和力包括降低的FcRn結合解離速率。在某些示例性實施例中，分離的結合多

肽在非酸性pH下具有比包含具有按照EU編號的雙重胺基酸取代M428L/N434S的經修飾Fc結構域的結合多肽更小的FcRn結合親和力。

【0023】 在某些示例性實施例中，酸性pH為約6.0。在某些示例性實施例中，酸性pH為約6.0並且非酸性pH為約7.4。

【0024】 在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，分離的結合多肽具有改變的Fc γ RIIa結合親和力。在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，分離的結合多肽具有降低的Fc γ RIIa結合親和力。在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，分離的結合多肽具有增強的Fc γ RIIa結合親和力。

【0025】 在某些示例性實施例中，分離的結合多肽具有與包含野生型Fc結構域的結合多肽大致相同的Fc γ RIIa結合親和力。

【0026】 在某些示例性實施例中，分離的結合多肽具有與包含野生型Fc結構域的結合多肽大致相同的熱穩定性。在某些示例性實施例中，分離的結合多肽具有與包含具有按照EU編號的三重胺基酸取代M252Y/S254T/T256E的經修飾Fc結構域的結合多肽大致相同的熱穩定性。

【0027】 在某些示例性實施例中，該分離的結合多肽是抗體，例如單株抗體。在某些示例性實施例中，該分離的抗體是嵌合抗體、人源化抗體或人抗體。在某些示例性實施例中，該分離的抗體是全長抗體。

【0028】 在某些示例性實施例中，該分離的結合多肽特異性地結合一種或多種人標靶。

【0029】 在其他態樣，提供了包含經修飾的Fc結構域的分離的結合多肽，所述經修飾的Fc結構域包含 a) 選自 M252Y/T256D、M252Y/T256E、

M252Y/T307Q、M252Y/T307W、T256D/T307Q、T256D/T307W、T256E/T307Q 和T256E/T307W組成之群的雙重胺基酸取代，其中蘇胺酸(T)不在胺基酸位置254 處，組胺酸(H)不在胺基酸位置311處，並且酪胺酸(Y)不在胺基酸位置434處，或者b) 選自M252Y/T256D/T307Q、M252Y/T256D/T307W、M252Y/T256E/T307Q 和M252Y/T256E/T307W的三重胺基酸取代，其中蘇胺酸(T)不在胺基酸位置254 處，組胺酸(H)不在胺基酸位置311處，並且酪胺酸(Y)不在胺基酸位置434處，其中該胺基酸取代按照EU編號。

【0030】 在某些示例性實施例中，經修飾的Fc結構域是經修飾的人Fc結構域。在某些示例性實施例中，經修飾的Fc結構域是經修飾的IgG1 Fc結構域。

【0031】 在某些示例性實施例中，該結合多肽具有人FcRn結合親和力、大鼠FcRn結合親和力或人和大鼠FcRn結合親和力二者。

【0032】 在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，分離的結合多肽具有改變的血清半衰期。在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，分離的結合多肽具有增加的血清半衰期。

【0033】 在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，分離的結合多肽具有改變的FcRn結合親和力。在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，分離的結合多肽具有增強的FcRn結合親和力。在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，分離的結合多肽在酸性pH下具有增強的FcRn結合親和力。在某些示例性實施例中，與結合多肽在升高的非酸性pH下的FcRn結合親和力相比，分離的結合多肽在酸性pH下具有增強的FcRn結合親和力。在某些示例性實施例中，增強的FcRn結合親和力包括降低的FcRn結合解離速率。在某些示例性實施例中，分離的結合多

肽在非酸性pH下具有比包含具有按照EU編號的雙重胺基酸取代M428L/N434S的經修飾Fc結構域的結合多肽更小的FcRn結合親和力。

【0034】在某些示例性實施例中，酸性pH為約6.0。在某些示例性實施例中，酸性pH為約6.0並且非酸性pH為約7.4。

【0035】在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，分離的結合多肽具有改變的Fc γ RIIIa結合親和力。在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，分離的結合多肽具有降低的Fc γ RIIIa結合親和力。在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，分離的結合多肽具有增強的Fc γ RIIIa結合親和力。

【0036】在某些示例性實施例中，分離的結合多肽具有與包含野生型Fc結構域的結合多肽大致相同的Fc γ RIIIa結合親和力。

【0037】在某些示例性實施例中，分離的結合多肽具有與包含野生型Fc結構域的結合多肽大致相同的熱穩定性。在某些示例性實施例中，分離的結合多肽具有與包含具有按照EU編號的三重胺基酸取代M252Y/S254T/T256E的經修飾Fc結構域的結合多肽大致相同的熱穩定性。

【0038】在某些示例性實施例中，該分離的結合多肽是抗體，例如單株抗體。在某些示例性實施例中，該分離的抗體是嵌合抗體、人源化抗體或人抗體。在某些示例性實施例中，該分離的抗體是全長抗體。

【0039】在某些示例性實施例中，該分離的結合多肽特異性地結合一種或多種人標靶。

【0040】在某些態樣，提供了包含經修飾的Fc結構域之分離的結合多肽，其中該經修飾的Fc結構域包含按照EU編號的胺基酸位置256處的天門冬胺酸(D)

和胺基酸位置307處的麩醯胺酸(Q)。

【0041】在某些示例性實施例中，經修飾的Fc結構域是經修飾的人Fc結構域。在某些示例性實施例中，經修飾的Fc結構域是經修飾的IgG1 Fc結構域。

【0042】在某些示例性實施例中，該結合多肽具有人FcRn結合親和力或大鼠FcRn結合親和力或人和大鼠FcRn結合親和力二者。

【0043】在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，分離的結合多肽具有增加的血清半衰期。

【0044】在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，分離的結合多肽具有增強的FcRn結合親和力。在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，分離的結合多肽在酸性pH下具有增強的FcRn結合親和力。在某些示例性實施例中，與結合多肽在升高的非酸性pH下的FcRn結合親和力相比，分離的結合多肽在酸性pH下具有增強的FcRn結合親和力。在某些示例性實施例中，增強的FcRn結合親和力包括降低的FcRn結合解離速率。

【0045】在某些示例性實施例中，酸性pH為約6.0。在某些示例性實施例中，酸性pH為約6.0並且非酸性pH為約7.4。

【0046】在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，分離的結合多肽具有改變的Fc γ RIIIa結合親和力。

【0047】在某些示例性實施例中，該分離的結合多肽是單株抗體。在某些示例性實施例中，該抗體是嵌合抗體、人源化抗體或人抗體。

【0048】在某些示例性實施例中，該分離的結合多肽特異性地結合一種或多種人標靶。

【0049】在某些態樣，提供了包含編碼該分離的多肽的核酸的分離的核酸分子。

【0050】在某些態樣，提供了包含分離的核酸分子的載體。在某些示例性實施例中，載體是表現載體。在某些態樣，提供了包含分離的核酸分子的表現載體。

【0051】在某些態樣，提供了包含載體的宿主細胞。在某些態樣，提供了包含表現載體的宿主細胞。

【0052】在某些示例性實施例中，該宿主細胞是真核或原核起源的。在某些示例性實施例中，該宿主細胞是哺乳動物起源的。在某些示例性實施例中，該宿主細胞是細菌起源的。

【0053】在某些態樣，提供了包含分離的結合多肽的醫藥組合物。

【0054】在某些態樣，提供了包含分離的抗體的醫藥組合物。

【0055】在某些態樣，提供了包含經修飾的Fc結構域的分離的結合多肽，其中該經修飾的Fc結構域包含按照EU編號的胺基酸位置256處的天門冬胺酸(D)和胺基酸位置307處的色胺酸(W)。

【0056】在某些示例性實施例中，經修飾的Fc結構域是經修飾的人Fc結構域。在某些示例性實施例中，經修飾的Fc結構域是經修飾的IgG1 Fc結構域。

【0057】在某些示例性實施例中，該結合多肽具有人FcRn結合親和力或大鼠FcRn結合親和力或人和大鼠FcRn結合親和力二者。

【0058】在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，分離的結合多肽具有增加的血清半衰期。

【0059】在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相

比，分離的結合多肽具有增強的FcRn結合親和力。在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，分離的結合多肽在酸性pH下具有增強的FcRn結合親和力。在某些示例性實施例中，與結合多肽在升高的非酸性pH下的FcRn結合親和力相比，分離的結合多肽在酸性pH下具有增強的FcRn結合親和力。在某些示例性實施例中，增強的FcRn結合親和力包括降低的FcRn結合解離速率。

【0060】在某些示例性實施例中，酸性pH為約6.0。在某些示例性實施例中，酸性pH為約6.0並且非酸性pH為約7.4。

【0061】在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，分離的結合多肽具有改變的Fc γ RIIIa結合親和力。

【0062】在某些示例性實施例中，該分離的結合多肽是單株抗體。在某些示例性實施例中，該抗體是嵌合抗體、人源化抗體或人抗體。

【0063】在某些示例性實施例中，該分離的結合多肽特異性地結合一種或多種人標靶。

【0064】在某些態樣，提供了包含編碼該分離的多肽的核酸的分離的核酸分子。

【0065】在某些態樣，提供了包含分離的核酸分子的載體。在某些示例性實施例中，載體是表現載體。在某些態樣，提供了包含分離的核酸分子的表現載體。

【0066】在某些態樣，提供了包含載體的宿主細胞。在某些態樣，提供了包含表現載體的宿主細胞。

【0067】在某些示例性實施例中，該宿主細胞是真核或原核起源的。在某

些示例性實施例中，該宿主細胞是哺乳動物起源的。在某些示例性實施例中，該宿主細胞是細菌起源的。

【0068】在某些態樣，提供了包含分離的結合多肽之醫藥組合物。

【0069】在某些態樣，提供了包含分離的抗體之醫藥組合物。

【0070】在某些態樣，提供了包含經修飾的Fc結構域之分離的結合多肽，其中該經修飾的Fc結構域包含按照EU編號的胺基酸位置252處的酪胺酸(Y)和胺基酸位置256處的天門冬胺酸(D)。

【0071】在某些示例性實施例中，經修飾的Fc結構域是經修飾的人Fc結構域。在某些示例性實施例中，經修飾的Fc結構域是經修飾的IgG1 Fc結構域。

【0072】在某些示例性實施例中，該結合多肽具有人FcRn結合親和力或大鼠FcRn結合親和力或人和大鼠FcRn結合親和力二者。

【0073】在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，分離的結合多肽具有增加的血清半衰期。

【0074】在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，分離的結合多肽具有增強的FcRn結合親和力。在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，分離的結合多肽在酸性pH下具有增強的FcRn結合親和力。在某些示例性實施例中，與結合多肽在升高的非酸性pH下的FcRn結合親和力相比，分離的結合多肽在酸性pH下具有增強的FcRn結合親和力。在某些示例性實施例中，增強的FcRn結合親和力包括降低的FcRn結合解離速率。

【0075】在某些示例性實施例中，酸性pH為約6.0。在某些示例性實施例中，酸性pH為約6.0並且非酸性pH為約7.4。

【0076】在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，分離的結合多肽具有改變的Fc γ RIIa結合親和力。

【0077】在某些示例性實施例中，該分離的結合多肽是單株抗體。在某些示例性實施例中，該抗體是嵌合抗體、人源化抗體或人抗體。

【0078】在某些示例性實施例中，該分離的結合多肽特異性地結合一種或多種人標靶。

【0079】在某些態樣，提供了包含編碼該分離的多肽的核酸之分離的核酸分子。

【0080】在某些態樣，提供了包含分離的核酸分子之載體。在某些示例性實施例中，載體是表現載體。在某些態樣，提供了包含分離的核酸分子的表現載體。

【0081】在某些態樣，提供了包含載體的宿主細胞。在某些態樣，提供了包含表現載體的宿主細胞。

【0082】在某些示例性實施例中，該宿主細胞是真核或原核起源的。在某些示例性實施例中，該宿主細胞是哺乳動物起源的。在某些示例性實施例中，該宿主細胞是細菌起源的。

【0083】在某些態樣，提供了包含分離的結合多肽之醫藥組合物。

【0084】在某些態樣，提供了包含分離的抗體之醫藥組合物。

【0085】在某些態樣，提供了包含經修飾的Fc結構域之分離的結合多肽，其中該經修飾的Fc結構域包含至少四個胺基酸取代的組合，該組合包含：胺基酸位置256處的天門冬胺酸(D)或穀胺酸(E)和胺基酸位置307處的色胺酸(W)或穀醯胺酸(Q)，其中胺基酸位置254不是蘇胺酸(T)，並且進一步包含胺基酸位置434

處的苯丙胺酸(F)或酪胺酸(Y)；以及 胺基酸位置252處的酪胺酸(Y)，其中胺基酸位置按照EU編號。

【0086】 在某些態樣，提供了包含經修飾的Fc結構域之分離的結合多肽，該經修飾的Fc結構域具有選自以下組成之群的位置處的胺基酸取代之組合：a) 胺基酸位置252處的酪胺酸(Y)、胺基酸位置256處的天門冬胺酸(D)、胺基酸位置307處的麴醯胺酸(Q)和胺基酸位置434處的酪胺酸(Y)；b) 胺基酸位置252處的酪胺酸(Y)、胺基酸位置256處的麴胺酸(E)、胺基酸位置307處的色胺酸(W)和胺基酸位置434處的酪胺酸(Y)；c) 胺基酸位置252處的酪胺酸(Y)、胺基酸位置256處的麴胺酸(E)、胺基酸位置307處的麴醯胺酸(Q)和胺基酸位置434處的酪胺酸(Y)；d) 胺基酸位置252處的酪胺酸(Y)、胺基酸位置256處的天門冬胺酸(D)、胺基酸位置307處的麴醯胺酸(Q)和胺基酸位置434處的苯丙胺酸(F)；或e) 胺基酸位置252處的酪胺酸(Y)、胺基酸位置256處的天門冬胺酸(D)、胺基酸位置307處的色胺酸(W)和胺基酸位置434處的酪胺酸(Y)，其中該胺基酸取代按照EU編號。

【0087】 在某些態樣，提供了包含經修飾的Fc結構域之分離的結合多肽，該經修飾的Fc結構域包含：選自 M252Y/T256D/T307Q/N434Y 、 M252Y/T256E/T307W/N434Y 、 M252Y/T256E/T307Q/N434Y 、 M252Y/T256D/T307Q/N434F 和 M252Y/T256D/T307W/N434Y 組成之群的四重胺基酸取代，其中該胺基酸取代按照EU編號。

【0088】 在某些示例性實施例中，經修飾的Fc結構域是經修飾的人Fc結構域。在某些示例性實施例中，經修飾的Fc結構域是經修飾的IgG1 Fc結構域。

【0089】 在某些示例性實施例中，該結合多肽具有人FcRn結合親和力。在某些示例性實施例中，該結合多肽具有大鼠FcRn結合親和力。在某些示例性實

施例中，該結合多肽具有人和大鼠FcRn結合親和力。

【0090】在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，分離的結合多肽具有改變的FcRn結合親和力。在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，分離的結合多肽具有增強的FcRn結合親和力。

【0091】在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，分離的結合多肽在酸性pH下具有增強的FcRn結合親和力。在某些示例性實施例中，與包含M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F的結合多肽相比，分離的結合多肽在酸性pH下具有增強的FcRn結合親和力。

【0092】在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，分離的結合多肽在非酸性pH下具有增強的FcRn結合親和力。在某些示例性實施例中，與包含M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F的結合多肽相比，分離的結合多肽在非酸性pH下具有增強的FcRn結合親和力。

【0093】在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，分離的結合多肽在酸性pH下具有增強的FcRn結合親和力，並且在非酸性pH下具有增強的FcRn結合親和力。在某些示例性實施例中，與包含M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F的結合多肽相比，分離的結合多肽在酸性pH下具有增強的FcRn結合親和力，並且在非酸性pH下具有增強的FcRn結合親和力。

【0094】在某些示例性實施例中，該酸性pH為約6.0。在某些示例性實施例中，該非酸性pH為約7.4。

【0095】在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相

比，分離的結合多肽具有改變的血清半衰期。在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，分離的結合多肽具有減少的血清半衰期。在某些示例性實施例中，與包含M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F的結合多肽相比，分離的結合多肽具有減少的血清半衰期。

【0096】在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，分離的結合多肽具有改變的Fc γ RIIIa結合親和力。在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，分離的結合多肽具有降低的Fc γ RIIIa結合親和力。在某些示例性實施例中，與包含M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F的結合多肽相比，分離的結合多肽具有降低的Fc γ RIIIa結合親和力。

【0097】在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，分離的結合多肽具有降低的熱穩定性。在某些示例性實施例中，與包含M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F的結合多肽相比，分離的結合多肽具有降低的熱穩定性。

【0098】在某些示例性實施例中，該分離的結合多肽是抗體。在某些示例性實施例中，該分離的結合多肽是單株抗體。在某些示例性實施例中，該分離的抗體是嵌合抗體、人源化抗體或人抗體。在某些示例性實施例中，該分離的抗體是全長抗體。

【0099】在某些示例性實施例中，該分離的結合多肽特異性地結合一種或多種標靶。

【0100】在某些態樣，提供了包含編碼該分離的多肽的核酸之分離的核酸分子。

【0101】在某些態樣，提供了包含分離的核酸分子的載體。

【0102】在某些示例性實施例中，載體是表現載體。

【0103】在某些態樣，提供了包含載體的宿主細胞。

【0104】在某些示例性實施例中，該宿主細胞是真核或原核起源的。在某些示例性實施例中，該宿主細胞是哺乳動物起源的。在某些示例性實施例中，該宿主細胞是細菌起源的。

【0105】在某些態樣，提供了包含分離的結合多肽之醫藥組合物。

【0106】在某些態樣，提供了包含分離的抗體之醫藥組合物。

【0107】在某些態樣，提供了包含經修飾的Fc結構域之分離的結合多肽，所述經修飾的Fc結構域包含按照EU編號的胺基酸位置252處的酪胺酸(Y)、胺基酸位置256處的天門冬胺酸(D)、胺基酸位置307處的麩醯胺酸(Q)和胺基酸位置434處的酪胺酸(Y)。

【0108】在某些態樣，提供了包含經修飾的Fc結構域之分離的結合多肽，所述經修飾的Fc結構域包含按照EU編號的胺基酸位置252處的酪胺酸(Y)、胺基酸位置256處的麩胺酸(E)、胺基酸位置307處的色胺酸(W)和胺基酸位置434處的酪胺酸(Y)。

【0109】在某些態樣，提供了包含經修飾的Fc結構域之分離的結合多肽，所述經修飾的Fc結構域包含按照EU編號的胺基酸位置252處的酪胺酸(Y)、胺基酸位置256處的麩胺酸(E)、胺基酸位置307處的麩醯胺酸(Q)和胺基酸位置434處的酪胺酸(Y)。

【0110】在某些態樣，提供了包含經修飾的Fc結構域之分離的結合多肽，所述經修飾的Fc結構域包含按照EU編號的胺基酸位置252處的酪胺酸(Y)、胺基酸位置256處的天門冬胺酸(D)、胺基酸位置307處的麩醯胺酸(Q)和胺基酸位置

434處的苯丙胺酸(F)。

【0111】在某些態樣，提供了包含經修飾的Fc結構域之分離的結合多肽，所述經修飾的Fc結構域包含按照EU編號的胺基酸位置252處的酪胺酸(Y)、胺基酸位置256處的天門冬胺酸(D)、胺基酸位置307處的色胺酸(W)和胺基酸位置434處的酪胺酸(Y)。

【0112】在某些示例性實施例中，經修飾的Fc結構域是經修飾的人Fc結構域。在某些示例性實施例中，經修飾的Fc結構域是經修飾的IgG1 Fc結構域。

【0113】在某些示例性實施例中，該結合多肽具有人FcRn結合親和力。

【0114】在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，分離的結合多肽具有減少的血清半衰期。在某些示例性實施例中，與包含M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F的結合多肽相比，分離的結合多肽具有減少的血清半衰期。

【0115】在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，分離的結合多肽在酸性pH下具有增強的FcRn結合親和力，並且在非酸性pH下具有增強的FcRn結合親和力。在某些示例性實施例中，與包含M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F的結合多肽相比，分離的結合多肽在酸性pH下具有增強的FcRn結合親和力，並且在非酸性pH下具有增強的FcRn結合親和力。

【0116】在某些示例性實施例中，該酸性pH為約6.0並且該非酸性pH為約7.4。

【0117】在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，分離的結合多肽具有降低的Fc γ RIIIa結合親和力。在某些示例性實施例中，

與包含M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F的結合多肽相比，分離的結合多肽具有降低的Fc γ RIIIa結合親和力。

【0118】在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，分離的結合多肽具有降低的熱穩定性。在某些示例性實施例中，與包含M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F的結合多肽相比，分離的結合多肽具有降低的熱穩定性。

【0119】在某些示例性實施例中，該分離的結合多肽是單株抗體。在某些示例性實施例中，該抗體是嵌合抗體、人源化抗體或人抗體。

【0120】在某些示例性實施例中，該分離的結合多肽特異性地結合一種或多種標靶。

【0121】在某些態樣，提供了包含編碼該分離的多肽的核酸之分離的核酸分子。

【0122】在某些態樣，提供了包含分離的核酸分子之表現載體。

【0123】在某些態樣，提供了包含表現載體的宿主細胞。

【0124】在某些態樣，提供了包含分離的結合多肽的醫藥組合物。

【0125】在某些態樣，提供了一種治療有需要的受試者的疾病或障礙的方法，其包括向該受試者投予治療有效量的如請求項1-28、38-58、61-91和101-120中任一項之分離的結合多肽，或向該受試者投予治療有效量的如請求項36-37、60、99-100和124中任一項的醫藥組合物。

【0126】在某些示例性實施例中，該疾病或障礙是癌症。在某些示例性實施例中，該癌症是腫瘤。

【0127】在某些示例性實施例中，該疾病或障礙是自身免疫病症。

【0128】在某些態樣，提供了一種治療有需要的受試者的癌症的方法，其包括向該受試者投予治療有效量的如請求項1-28和38-58中任一項之分離的結合多肽，或向該受試者投予治療有效量的如請求項36、37和60中任一項的醫藥組合物。

【0129】在某些態樣，提供了一種治療有需要的受試者的自身免疫障礙的方法，其包括向該受試者投予治療有效量的如請求項61-91和101-120中任一項之分離的結合多肽，或向該受試者投予治療有效量的如請求項99、100和124中任一項的醫藥組合物。

【圖式簡單說明】

【0130】從以下說明性實施例的詳細描述結合附圖將更充分地理解本發明的前述和其他特徵和優點。

【0131】圖1A至圖1B描繪了與IgG1 Fc區相互作用的FcRn的結構。圖1A描繪了hFcRn與顯示一個Fc單體(深灰色帶)的IgG1 Fc (pdb : 4n0u)之間的相互作用，包括在具有 α -結構域(灰色)和 $\beta2-m$ (淺灰色)hFcRn亞基的複合物中顯示為“聚糖”標記的棒的糖基化。參與與FcRn相互作用的大多數抗體殘基位於與C_H2-C_H3界面(點劃線)直接相鄰的環中並且與糖基化位點相對。圖1B描繪了相對於圖1A旋轉75°的IgG1 Fc晶體結構(pdb : 5d4q)的表面示意圖。該FcRn結合界面包含C_H2和C_H3結構域中的殘基。飽和文庫在顯示為棒的十一個位置處構建，如圖所示：M252；I253；S254；T256；K288；T307；K322；E380；L432；N434和Y436。所有這些殘基都緊密接近FcRn或與其直接接觸。與pH依賴有關的關鍵組氨酸殘基(H310、H433、H435)的表面聚集在感興趣的位置附近並且如圖所示。

【0132】圖2A至圖2D描繪了Octet篩選測定和結果。圖2A示意性地呈現了

Octet篩選測定。NiNTA生物感測器捕獲組胺酸標記的抗原並且隨後捕獲抗體變異體，以用於大鼠FcRn(rFcRn)結合動力學。圖2B描繪了野生型(實線)、T307A/E380A/N434A (AAA)變異體(短劃線)、LS (夾雜單點的短劃線)、YTE (長劃線)、H435A(夾雜單點的長劃線)和H310A/H435Q (夾雜兩點的長劃線)抗體在pH 6.0下的rFcRn結合動力學曲線，它們與rFcRn結合階段的起點對齊。H435A和H310A/H435Q變異體顯示很少甚至沒有FcRn結合。YTE變異體在Octet rFcRn結合測定中檢測到具有最慢的FcRn解離速率。圖2C圖示地描繪了藉由Octet篩選獲得的突變體子集進行了在pH 6.0下的FcRn結合動力學歸一化。大多數突變體保留了與rFcRn的顯著結合，但是若干個突變體類似於模擬物對照(點劃線)，顯示所有rFcRn結合的喪失(長劃線，位於點劃線下方(模擬物))。兩種變異體(實線)具有比野生型抗體(粗長劃線)更慢的rFcRn解離速率。圖2D描繪了所有點突變的rFcRn解離速率的散點圖分析，其中可觀察到被殘基位置分開的rFcRn結合動力學。飽和變異體落入以下四種rFcRn解離速率方案中的一種：無結合(未示出)、更快的結合(黑色)、類似野生型的結合(白色)、更慢的結合(灰色)。十八個突變體顯示出比野生型抗體顯著更慢的從rFcRn的解離速率(黑色劃線)。

【0133】圖3圖示地描繪了在pH 6.0和pH 7.4下基準和野生型變異體與人和大鼠FcRn的Biacore動力學。示出了在pH 6.0 (第一和第三行)和pH 7.4 (第二和第四行)下每個人(第一和第三列)和大鼠(第二和第四列)FcRn對於一系列濃度的野生型(左上)、AAA 變異體(右上)、M428/N434S(LS) 變異體(左下)和M252Y/S254T/T256E(YTE)變異體(右下)的所有FcRn結合曲線。AAA、LS和YTE變異體顯示出比野生型抗體更慢的從FcRn的解離速率。一般而言，與野生型相比，該抗體以增加約10倍的親和力結合rFcRn。LS變異體對於hFcRn在pH 7.4下

具有最緊密的親和力，並且在pH 7.4下具有最大的殘基結合，而rFcRn最緊密地結合YTE變異體。

【0134】 圖4A圖示地描繪了在pH 6.0下先導飽和變異體與人和大鼠FcRn的Biacore動力學。示出了18種先導飽和變異體的濃度系列的FcRn結合動力學跡線。M252Y、T256D、T256E、N434F、N434P、N434Y、T307A、T307E、T307F、T307Q和T307W具有更慢的從人和大鼠FcRn二者的解離速率。其餘變異體僅對大鼠FcRn具有特異性。

【0135】 圖4B圖示地描繪了在pH 6.0下WT、基準和先導單一飽和變異體與人FcRn的FcRn結合動力學。在pH 6.0下一系列濃度的WT、LS、YTE和18種飽和變異體與人FcRn的FcRn結合傳感圖。用於組合文庫的單一飽和變異體用下劃線和粗體表示。

【0136】 圖5A至圖5D描繪了顯示在pH 6.0下具有從人和大鼠FcRn的較慢解離速率的多種變異體的資料。圖5A和圖5B描繪了多種變異體的Biacore傳感圖。圖5A描繪了在pH 6.0下對於YTE變異體(夾雜單點的長劃線)、LS變異體(夾雜兩點的長劃線)、野生型(WT；點劃線)和先導飽和變異體(先導；各種色調的實線)的人FcRn的解離速率。在圖5A中，描繪了歸一化傳感圖，其顯示與WT相比改善的hFcRn解離速率。圖5B描繪了在pH 6.0下對於AAA變異體(虛線)、LS變異體(夾雜兩點的劃線)、YTE變異體(夾雜單點的劃線)、野生型(實線)和先導飽和變異體(不同頻度和粗度的劃線)的大鼠FcRn的解離速率。為清楚起見，示出了十一種先導抗體的每一種的代表性注射。與野生型相比，這些先導單一變異體顯示出從人和大鼠FcRn的改善的解離速率動力學。圖5C和圖5D描繪了使用從Biacore動力學量測獲得的結合和解離速率，先導飽和(白色圓圈)和野生型(黑色

圓圈)抗體變異體對於人(圖5C)和大鼠(圖5D)FcRn的結合親和力圖。示出了基準變異體：AAA(面向右下方的對角線)、LS(虛線)和YTE(面向左下方的對角線)。儘管FcRn解離速率有所改善，但由於較慢的結合動力學，大多數變異體對人或大鼠FcRn不具有更緊密的親和力。十一種變異體具有從這兩個物種FcRn的較慢解離速率。

【0137】 圖6A至圖6D描繪了顯示先導飽和突變的組合進一步改善FcRn解離速率和結合親和力的資料。圖6A和圖6B分別描繪了顯示對於人和大鼠FcRn的FcRn解離速率的代表性Biacore傳感圖。圖6A描繪了與野生型(點劃線)和LS變異體(夾雜兩點的長劃線)相比，單一(劃線)、雙重(淺灰色實線)、三重(灰色實線)和四重(黑色實線)組合變異體的代表性變異體的人FcRn的歸一化傳感圖。圖6B描繪了與野生型(點劃線)和YTE變異體(實線)相比，單一(夾雜兩點的長劃線)、雙重(夾雜單點的長劃線)、三重(長劃線)和四重(短劃線)組合變異體的代表性變異體的大鼠FcRn的歸一化傳感圖。與基準變異體相比，多個突變的摻入在更大程度上降低瞭解離速率和增強了對於FcRn的結合親和力。圖6C和圖6D描繪了顯示結合速率作為人(圖6C)或大鼠(圖6D)FcRn的解離速率的函數的組合飽和變異體圖，該圖揭示大多數變異體與基準變異體相比在pH 6.0下具有與FcRn的增強的結合。對於人和大鼠FcRn的最緊密結合變異體分別是四重和雙重組合。

【0138】 圖7A中圖7D描繪了顯示在pH 6.0下增強的FcRn結合破壞了相互作用的pH依賴性的資料。圖7A和圖7B描繪了與野生型(點劃線)和LS變異體(圖7A，實線)和YTE變異體(圖7B，實線)相比，在pH 7.4下單一(夾雜兩點的長劃線)、雙重(夾雜單點的長劃線)、三重(長劃線)和四重(短劃線)組合變異體的Biacore FcRn結合動力學的代表性傳感圖。增加增強FcRn結合的突變的數目導致在生理

pH下更大的殘基結合，其中大多數雙重、三重和四重變異體顯示出對這兩種FcRn的穩健結合。圖7C和圖7D描繪了在pH 7.4下所有飽和變異體對人(圖7C)或大鼠(圖7D)FcRn的穩態RU (RU = 偏移 + $\frac{(R_{max} - 偏移) * [抗體]}{[抗體] + K_{D,app}}$ (方程式2))作為在pH 6.0下的結合親和力的函數的圖。在圖7C中，示出了在pH 7.4下殘基FcRn結合與在pH 6.0下的FcRn結合親和力的比較。具有改善的FcRn結合特性的先導組合佔據由LS基準變異體(菱形)限定的左下象限。在圖7D中，LS(菱形)和YTE(三角形)變異體分別用作先導驗證的截止值。這兩種變異體在pH 6.0下具有最緊密的結合親和力，並且在pH 7.4下分別對於人和大鼠FcRn具有最大的殘基結合。在圖7C和圖7D兩圖中，示出了單一(白色圓圈)、雙重(淺灰色圓圈)、三重(深灰色圓圈)和四重(黑色圓圈)變異體以及YTE變異體(三角形)。

【0139】圖8A至圖8B描繪了從基準變異體的FcRn親和層析法和差示掃描螢光測定(DSF)獲得的資料。圖8A描繪了WT(黑色實線)、AAA(點劃線)、LS(夾雜兩點的長劃線)、YTE(夾雜單點的長劃線)、H435A(淺灰色實線)和H310A/H435Q(AQ；深灰色實線)變異體的歸一化溶離曲線。pH值顯示在圖的頂部。對FcRn結合無效的變異體(H435A、H310A/H435Q)不與柱結合並在流出液(< 10 mL)中溶離。AAA、LS和YTE變異體在比WT抗體更高的pH下溶離。圖8B描繪了WT(黑色)、LS(灰色)和YTE(深灰色)變異體的DSF曲線。與WT和LS相比，YTE不穩定。圖8C描繪了與WT和LS變異體(垂直虛線)相比，用於組合變異體的七種先導單一變異體的FcRn親和柱溶離曲線。兩種變異體(N434F/Y)在比LS更高的pH下溶離，這表明對於含有這些突變的變異體而言與FcRn的相互作用的pH依賴性降低。

【0140】圖9A至圖9D描繪了顯示組合變異體顯著擾亂pH依賴性和熱穩定

性的資料。圖9A描繪了單一(夾雜兩點的長劃線)、雙重(夾雜單點的長劃線)、三重(長劃線)和四重變異體(短劃線)的代表性FcRn親和層析圖。增加增強FcRn結合突變的數目將溶離移向更高的pH值；LS變異體(小點劃垂直線)。圖9B描繪了對於先導飽和與組合變異體(包括單一(白色圓圈)、雙重(水平線)、三重(垂直線)和四重(方格)突變體)的溶離pH的箱線圖，其表明隨著增強FcRn的突變體數目的增加，pH值越高的趨勢。圖9C示出了來自FcRn親和層析法的溶離pH與使用Biacore的hFcRn解離速率之間的高相關性($R^2 = 0.94$)揭示抗體-FcRn相互作用的pH依賴性的喪失，其伴隨改善的FcRn解離動力學。AAA(面向右下方的對角線)、LS(點劃線)和YTE(面向左下方的對角線)變異體具有與雙重變異體類似的hFcRn解離速率和溶離pH值。圖9D描繪了從組合飽和變異體的DSF獲得的T_m的箱線圖，其揭示與WT、單一或基準變異體相比，附加的增強FcRn結合的突變使抗體不穩定。

【0141】 圖10A至圖10B描繪了從FcRn親和層析法和七種先導變異體的DSF獲得的資料。圖10A描繪了M252Y(實線)、T256D(夾雜單點的短劃線)、T256E(長劃線)、T307Q(夾雜單點的長劃線)、T307W(夾雜兩點的長劃線)、N434F(虛線)和N434Y(短劃線)變異體的FcRn親和層析法。層析圖揭示與野生型和LS抗體(垂直點劃線)相比溶離pH改變。N434F和N434Y具有比LS變異體(垂直點劃線)更高的溶離pH(pH約8.3)。某些溶離體積處的pH顯示在層析圖上方以供參考。圖10B描繪了七種先導變異體的DSF曲線，其顯示七種先導單一變異體中沒有一種使抗體不穩定至與YTE變異體(垂直點劃線)相同的程度。除了T307Q(夾雜單點的長劃線)之外的所有變異體與WT(垂直點劃線)相比是不穩定的。

【0142】 圖11A至圖11B描繪了顯示在含有M252Y的組合變異體中Fc γ RIIIa結合降低的資料。圖11A示出了WT(黑色)、LS(灰色)和YTE(深灰色)

變異體的Fc γ RIIIa結合傳感圖揭示由YTE變異體產生的結合反應降低。圖11B描繪了如所示的基準、單一和組合變異體的Fc γ RIIIa結合反應的箱線圖。具有M252Y突變的變異體含有對Fc γ RIIIa的降低的結合反應，包括所有四重變異體。與N434F/Y的組合通常顯示出與Fc γ RIIIa的增強的反應。圖11C描繪了與WT和YTE變異體(水平點劃線)相比七種先導單一變異體的Fc γ RIIIa結合反應。與WT相比，M252Y突變顯示降低的Fc γ RIIIa結合，而六種變異體顯示與該受體的類似WT或增強的結合。

【0143】 圖12A至圖12D描繪了從七種先導組合變異體的FcRn親和層析法、DSF和Fc γ RIIIa結合獲得的資料。圖12A描繪了與野生型抗體和LS變異體(分別為垂直點劃線和垂直實線)相比的七種先導組合變異體的FcRn親和層析圖。每種先導變異體的溶離pH接近LS變異體。圖12B示出了與YTE和野生型變異體(如所示的垂直點劃線)相比的先導組合變異體的DSF曲線。七種先導變異體中的六種具有與YTE變異體類似或更不穩定的T_m：MDWN(夾雜兩點的長劃線)；YTWN(長劃線)；YDTN(實線)；YETN(夾雜單點的長劃線)；YDQN(虛線)；YEQN(夾雜單點的短劃線)。MDQN變異體與野生型抗體(短劃線)具有類似的T_m。圖12C描繪了與野生型(較大的點劃線)和YTE變異體(粗長的劃線)相比，七種先導變異體的Fc γ RIIIa結合動力學的Biacore傳感圖。含有M252Y的變異體：YDTN(實線)，YDQN(夾雜單點的短劃線)、YTWN(長劃線)、YETN(夾雜單點的長劃線)和YEQN(較小的點劃線)，其中每種都以與YTE類似的方式具有降低的穩態RU。(D)示出了七種先導變異體、野生型和YTE變異體的穩態RU。只有MDWN和MDQN變異體對於Fc γ RIIIa具有與野生型抗體類似的親和力。

【0144】 圖12E至圖12H描繪了顯示三種先導變異體展示一系列關鍵抗體

屬性的資料。圖12E示出了與WT和LS (垂直點劃線)相比，DQ (實線)、DW (點劃線)和YD (劃線)變異體的FcRn親和層析溶離曲線。每種雙重變異體顯示在WT與LS之間的溶離pH。圖12F描繪了與YTE和WT變異體(垂直點劃線)相比這三種變異體的DSF螢光曲線揭示YD (劃線)和DW (點劃線)與YTE相比略微不穩定，但DQ (實線)類似於WT。圖12G描繪了與WT和YTE (水平點劃線)相比的Fc γ RIIIa結合傳感圖。YD (劃線)顯示與YTE類似的結合反應，而DQ (實線)和DW (點劃線)顯示與WT相比略微降低。圖12H描繪了如下資料，該資料顯示同質橋接RF ELISA揭示這三種先導變異體和YTE顯示與LS不同的顯著減少或類似WT的RF結合。**p < 0.001，*p < 0.01。

【0145】 圖13A至圖13D描繪了顯示在pH 6.0和pH 7.4下先導組合變異體的FcRn結合動力學的比較的資料。圖13A和圖13B示出了在pH 6.0下與野生型(點劃線)和LS (hFcRn，圖13A，粗長劃線)或YTE (rFcRn，圖13B，粗長劃線)相比，先導組合變異體對於人FcRn (圖13A)或大鼠FcRn (圖13B)的Biacore FcRn結合傳感圖。儘管改變了締合和解離速率，但每種組合變異體對相應的FcRn具有整體更緊密的結合親和力。圖13C和圖13D示出了在pH 7.4下的Biacore FcRn傳感圖。與LS變異體相比，每種hFcRn先導變異體具有類似或降低的穩態FcRn結合反應。只有MDQN和MDWN變異體在pH 7.4下顯示出比YTE 變異體更少的rFcRn結合。

【0146】 圖14是描繪根據某些實施例的飽和文庫的Octet rFcRn結合解離速率的表。野生型(WT)和類似野生型(類似WT)種類用白色矩形表示；WT種類如圖所示。與野生型相比很少甚至沒有rFcRn結合的變異體用深灰色矩形表示。與野生型相比具有更快的rFcRn解離速率的變異體用淺灰色矩形表示，並且與野生型相比具有更慢的rFcRn解離速率的變異體用黑色矩形表示。

【0147】圖15A至圖15C描繪了使用CM5感測器晶片開發的新結合測定。

圖15A是該測定的示意圖。圖15B示出了FcRn的直接固定。圖15C示出了生物素化的FcRn的鏈黴親和素捕獲。

【0148】圖16A至圖16B描繪了在pH 6.0下抗體2的FcRn結合。圖16A描繪了人FcRn。圖16B描繪了小鼠FcRn。

【0149】圖17A至圖17B描繪了在pH 7.4下抗體2的FcRn結合。圖17A描繪了人FcRn。圖17B描繪了小鼠FcRn。

【0150】圖18圖示地描繪了各種抗體2變異體的pH依賴性。先導變異體在pH 6下維持較高的結合親和力並且在pH 7.4下維持比LS更低的殘基結合。

【0151】圖19描繪了使用抗體1和抗體2的骨架的FcRn結合pH依賴性的比較。

【0152】圖20描繪了使用抗體1和抗體2的骨架的熱穩定性的比較。

【0153】圖21描繪了使用抗體1和抗體2的骨架的Fc γ RIIa結合的比較。

【0154】圖22A至圖22I描繪了多個圖，其顯示DQ、DW和YD變異體可在IgG1骨架間轉移。圖a至圖c描繪了在三個IgG1骨架中在pH 6.0下歸一化的FcRn結合傳感圖，其中WT (淺灰色)、LS (深灰色)、DQ (實心黑色)、DW (點劃線)和YD (劃線)變異體在低pH下顯示類似的動力學。DQ、DW和YD這三種變異體具有比LS變異體略快的結合和解離速率，但維持更緊密的FcRn結合親和力。圖d至圖f描繪了在pH 7.4下的FcRn結合傳感圖；LS基準變異體(實心黑色)。圖g至圖i描繪了對於具有WT (灰色)、LS (深灰色)、DQ (實心黑色)、DW (空心圓)和YD (空心方塊)變異體的每種抗體骨架在pH 7.4下的FcRn結合反應與在pH 6.0下的結合親和力的比較。DQ、DW和YD顯示出改善的FcRn特徵，其中在pH 6.0下的結合

增強，並且在pH 7.4下的結合最小。

【0155】 圖23A至圖23C示出了mAb2骨架中的三種先導變異體類似地改善了與食蟹猴FcRn的結合。圖23A描繪了在pH 6.0下WT (灰色)、LS (深灰色)、DQ (實心黑色)、DW (點劃線)和YD (劃線)的歸一化cFcRn結合傳感圖，其顯示與hFcRn類似的結合動力學和親和力。圖23B描繪了三種變異體的cFcRn結合反應在生理pH下顯著降低；但是LS (深灰色)以與hFcRn類似的方式顯示出比WT (灰色)更強的結合。圖23C描繪了WT (灰色)、LS (深灰色)、DQ (實心黑色)、DW (空心圓)和YD (空心方塊)在pH 7.4下的殘基cFcRn結合反應與在pH 6.0下的cFcRn結合親和力的比較，其揭示所有三種變異體均維持對於hFcRn所觀察到的改善的FcRn結合特性。

【0156】 圖24A至圖24B示出了先導變異體延長抗體血清半衰期。在食蟹猴(圖24A)和hFcRn轉基因小鼠(圖24B)中對於WT (帶有黑色實線的黑色圓圈)、LS (帶有黑色劃線的白色圓圈)、DQ (帶有淺灰色實線的淺灰色圓圈)、DW (帶有深灰色實線的深灰色圓圈)和YD(帶有黑色虛線的黑色圓圈)抗體，作為時間的函數的血漿抗體濃度的藥代動力學曲線。與WT相比，所有三種先導變異體延長抗體半衰期。

【0157】 圖25描繪了在pH 7.4下所有飽和變異體對於人FcRn的穩態RU作為在pH 6.0下的結合親和力的函數的圖。示出了在pH 7.4下殘基FcRn結合與在pH 6.0下的FcRn結合親和力的比較。在pH 6.0和pH 7.4下具有改善的FcRn結合特性的四重組合用方框顯示在圖的右上象限中。示出了單一(白色圓圈)、雙重(淺灰色圓圈)、三重(深灰色圓圈)和四重(黑色圓圈)變異體以及基準AAA、LS和YTE變異體(如圖所示)。

【0158】圖26描繪了用於捕獲生物素化FcRn的生物素CAPture方法的示意圖。

【0159】圖27描繪了顯示如所示的YTEKF基準和組合變異體在pH 6.0下的人FcRn結合動力學的圖。

【0160】圖28A至圖28B示出了在pH 6.0(圖28A)和pH 7.4(圖28B)下組合變異體與YTEKF基準相比的FcRn結合動力學。野生型用黑色實線表示(WT)，並且YTEKF基準用點劃線表示。

【0161】圖29描繪了與YTEKF基準相比，在pH 7.4下選擇變異體對於人FcRn的穩態RU作為在pH 6.0下的結合親和力的函數的圖。若干種變異體(先導四重變異體)在pH 6.0和pH 7.4下顯示出相對於YTEKF基準的對人FcRn的增強的結合親和力。

【實施方式】

【0162】本揭示文本提供了具有改變的Fc新生兒受體(FcRn)結合親和力的結合多肽(例如，抗體)。在某些實施例中，結合多肽包含經修飾的Fc結構域，與包含野生型(例如，非修飾的)Fc結構域的結合多肽相比，所述經修飾的Fc結構域增強FcRn結合親和力。本揭示文本還提供了編碼結合多肽的核酸、重組表現載體和用於製備結合多肽的宿主細胞，以及包含本文揭示的結合多肽的醫藥組合物。還提供了使用本揭示文本的結合多肽治療疾病的方法。

【0163】免疫球蛋白的Fc結構域參與非抗原結合功能，並且具有由效應分子的結合例如FcRn的結合介導的若干種效應子功能。如圖1A所示，Fc結構域包含CH2結構域和CH3結構域。參與與FcRn相互作用的大多數殘基位於與C_H2-C_H3

界面(圖1A，點劃線)直接相鄰的環中並且與糖基化位點相對。圖1B顯示了IgG1 Fc晶體結構(pdb : 5d4q)的表面示意圖，並示出了CH2和CH3結構域中包含FcRn結合界面的殘基。本揭示文本提供了包含經修飾的Fc結構域的結合多肽。包含經修飾的Fc結構域的結合多肽可以是抗體或免疫黏附素或Fc融合蛋白。

【0164】 在某些實施例中，結合多肽可以包含含有胺基酸取代的經修飾的Fc結構域，所述胺基酸取代改變抗體的抗原非依賴性效應子功能，具體而言，改變該結合多肽的循環半衰期(例如，血清半衰期)。在一些實施例中，結合多肽可以包含含有胺基酸取代的經修飾的Fc結構域，與包含野生型(即，未修飾的)Fc結構域的結合多肽相比，所述胺基酸取代改變該結合多肽的血清半衰期。在一些實施例中，結合多肽可以包含含有胺基酸取代的經修飾的Fc結構域，與包含野生型(即，未修飾的)Fc結構域的結合多肽相比，所述胺基酸取代增加該結合多肽的血清半衰期。在一些實施例中，結合多肽可以包含含有胺基酸取代的經修飾的Fc結構域，與包含野生型(即，未修飾的)Fc結構域的結合多肽相比，所述胺基酸取代減少該結合多肽的血清半衰期。

【0165】 在某些實施例中，包含改變(即，增加或減少)循環半衰期(例如，血清半衰期)的經修飾的Fc結構域的結合多肽除了改變循環半衰期的一個或多個突變之外還包含一個或多個突變。在某些實施例中，除了改變循環半衰期的一個或多個突變之外的一個或多個突變提供一種或多種期望的生物化學特徵，例如與完整未改變的具有大致相同免疫原性的抗體相比時，降低或增強的效應子功能、非共價二聚化能力、增強的定位於腫瘤部位的能力、減少的血清半衰期、增加的血清半衰期等中的一種或多種。

【0166】 當與缺乏這些取代的結合多肽相比時，本文所述的結合多肽可以

顯示出與新生兒Fc受體(FcRn)的增加或減少的結合，因此分別具有增加或減少的血清半衰期。具有改善的FcRn親和力的Fc結構域預期具有較長的血清半衰期，並且此類分子在治療哺乳動物的方法中具有有用的應用，在所述哺乳動物中需要所投予的抗體具有長半衰期例如以治療慢性疾病或障礙。相反，具有減小的FcRn結合親和力的Fc結構域預期具有較短的血清半衰期，並且此類分子也可用於例如投予至哺乳動物，在所述哺乳動物中縮短的循環時間可能是有利的，例如，對於體內診斷成像或者在當起始抗體長期存在於循環中時具有毒副作用的情況下。具有降低的FcRn結合親和力的Fc結構域也不太可能穿過胎盤，因此也可用於治療孕婦的疾病或障礙。此外，可能需要降低FcRn結合親和力的其他應用包括局限於腦、腎和/或肝的應用。

【0167】 應理解，本揭示文本中描述的方法不限於本文揭示的特定方法和實驗條件，因為這些方法和條件可以變化。還應理解，本文中所用術語僅用於描述具體實施例的目的，而不意圖具有限制性。

【0168】 此外，除非另有說明，否則本文所述的實驗使用本領域技術範圍內的常規分子和細胞生物學和免疫學技術。此類技術是熟習此項技術者公知的，並且在文獻中有充分的解釋。參見例如Ausubel,等人,編輯, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., NY, N.Y. (1987-2008),包括所有的增刊，MR Green 和 J. Sambrook 以及 Harlow 等人編輯的 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (第四版), *Antibodies: A Laboratory Manual*, 第14章, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (2013, 第2版)。

【0169】 除非另外定義，否則本文使用的科學和技術術語具有熟習此項技術者通常所理解的含義。如果存在任何可能的歧義，本文提供的定義優先於任

何字典或外部定義。除非上下文另有要求，否則單數術語應包括複數，並且複數術語應包括單數。除非另有規定，否則“或”的使用意指“和/或”。術語“包括”以及其他形式如“包括”（“includes”和“included”）的使用不是限制性的。

【0170】通常，關於本文所述的細胞和組織培養、分子生物學、免疫學、微生物學、遺傳學以及蛋白質和核酸化學和雜交所使用的術語是本領域公知和常用的。本文提供的方法和技術通常根據本領域公知並且如本說明書中引用和討論的各種一般和更具體的參考文獻中所述的常規方法進行，除非另有說明。酶促反應和純化技術根據製造商的說明書如本領域通常實現或如本文所述進行。關於本文所述的分析化學、合成有機化學以及醫藥和藥物化學的術語以及實驗室程序和技術是本領域公知和常用的那些術語、實驗室程序和技術。使用標準技術用於化學合成、化學分析、藥物製備、配製和遞送以及患者的治療。

【0171】為了可以更容易理解本揭示文本，如下定義選擇的術語。

【0172】術語“多肽”是指胺基酸的任何聚合體鏈，並且包括天然或人工蛋白質、多肽類似物或蛋白質序列的變異體或其片段，除非上下文另有說明。多肽可以是單體或聚合體。例如，多肽片段包含至少約5個連續胺基酸、至少約10個連續胺基酸、至少約15個連續胺基酸或至少約20個連續胺基酸。

【0173】術語“分離的蛋白質”或“分離的多肽”是指這樣的蛋白質或多肽，所述蛋白質或多肽由於其起源或衍生源與其天然狀態下伴隨它的天然締合組分非締合；基本上不含來自相同物種的其他蛋白質；由來自不同物種的細胞表現；或者不存在於自然界中。因此，化學合成或在與其天然來源的細胞不同的細胞系統中合成的蛋白質或多肽將與其天然締合組分“分離”。藉由使用

本領域公知的蛋白質純化技術分離，也可以使蛋白質或多肽基本上不含天然締合組分。

【0174】如本文所用，術語“結合蛋白”或“結合多肽”應指含有至少一個結合位點的蛋白質或多肽(例如，抗體或免疫黏附素)，所述結合位點負責選擇性地結合感興趣的靶抗原(例如，人靶抗原)。示例性結合位點包括抗體可變結構域、受體的配位體結合位點或配位體的受體結合位點。在某些態樣，結合蛋白或結合多肽包括多個(例如，兩個、三個、四個或更多個)結合位點。在某些態樣，結合蛋白或結合多肽不是治療性酶。

【0175】術語“配位體”是指能夠結合或被結合至另一種物質的任何物質。類似地，術語“抗原”是指可以產生抗體的任何物質。儘管“抗原”通常用於指抗體結合底物，並且在提及受體結合底物時經常使用“配位體”，但這些術語彼此沒有區別，並且包括範圍廣泛的重疊化學實體。為避免疑義，抗原和配位體在本文中可互換使用。抗原/配位體可以是肽、多肽、蛋白質、適體、多糖、糖分子、碳水化合物、脂質、寡核苷酸、多核苷酸、合成分子、無機分子、有機分子及其任何組合。

【0176】如本文所用的術語“特異性地結合”是指抗體或免疫黏附素以至多約 1×10^{-6} M、約 1×10^{-7} M、約 1×10^{-8} M、約 1×10^{-9} M、約 1×10^{-10} M、約 1×10^{-11} M、約 1×10^{-12} M或更低的解離常數(Kd)與抗原結合，和/或以比對於非特異性抗原的親和力大至少約2倍的親和力與抗原結合的能力。

【0177】如本文所用，術語“抗體”是指這樣的組裝(例如，完整抗體分子、免疫黏附素或其變異體)，所述組裝對感興趣的抗原(例如腫瘤相關抗原)具有顯著已知的特異性免疫反應活性。抗體和免疫球蛋白包含輕鏈和重鏈，在輕

鏈與重鏈之間有或沒有鏈間共價連接。脊椎動物系統中的基本免疫球蛋白結構是比較清楚的。

【0178】如下面將更詳細討論的，通用術語“抗體”包括可以在生物化學上區分的五種不同類的抗體。儘管所有五類抗體顯然都在本揭示文本的範圍內，但以下討論通常將針對免疫球蛋白分子的IgG類。關於IgG，免疫球蛋白包含分子量為約23,000道爾頓的兩條相同的輕鏈和分子量為53,000-70,000的兩條相同的重鏈。這四條鏈以“Y”構型經由二硫鍵連接，其中輕鏈範圍是在重鏈旁從“Y”的口處開始並且繼續直達可變區末。

【0179】免疫球蛋白的輕鏈分類為kappa(κ)或lambda(λ)。每種重鏈類可以與 κ 或 λ 輕鏈結合。通常，當免疫球蛋白由雜交瘤、B細胞或基因工程化宿主細胞生成時，輕鏈和重鏈彼此共價鍵合，並且兩條重鏈的“尾”部分經由共價二硫連接或非共價連接彼此鍵合。在重鏈中，胺基酸序列從Y構型的分叉末端的N-末端延伸至每條鏈底部的C-末端。熟習此項技術者將理解，重鏈被分類為 γ (γ)、 μ (μ)、 α (α)、 δ (δ)或 ϵ (ϵ)，其中具有一些亞類(例如， $\gamma 1$ - $\gamma 4$)。該鏈的性質分別將抗體的“類”確定為IgG、IgM、IgA、IgG或IgE。將免疫球蛋白同種型亞類(例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1等)充分表徵並且已知它們賦予功能特化。由於及時披露，這些類和同種型的每一種的修飾形式對於技術人員都是容易辨別的，因此，它們在本揭示文本的範圍內。

【0180】輕鏈和重鏈二者都被分成結構和功能同源性的區域。術語“區域”是指免疫球蛋白或抗體鏈的一部分(“part”或“portion”)，並且包括恒定區或可變區，以及所述區域的更離散的片段或部分。例如，輕鏈可變區包括散佈在如本文定義的“架構區”或“FR”之間的“互補決定區”或“CDR”。

【0181】免疫球蛋白重鏈或輕鏈的區域可以被定義為“恒定”(C)區或“可變”(V)區，在“恒定區”的情況下是基於多個類成員的區域內序列變化的相對缺乏，或在“可變區”的情況下是基於多個類成員的區域內的顯著變化。術語“恒定區”和“可變區”也可以關於功能使用。在這一態樣，應當理解，免疫球蛋白或抗體的可變區確定抗原識別和特異性。相反，免疫球蛋白或抗體的恒定區賦予重要的效應子功能，如分泌、經胎盤的移動、Fc受體結合、補體結合等。各種免疫球蛋白類的恒定區的亞基結構和三維構型是公知的。

【0182】免疫球蛋白重鏈和輕鏈的恒定區和可變區折疊成結構域。術語“結構域”是指重鏈或輕鏈的球狀區，所述球狀區包含例如經由β折疊片和/或鏈內二硫鍵穩定的肽環(例如，包含3至4個肽環)。免疫球蛋白輕鏈上的恒定區可互換地稱為“輕鏈恒定區結構域”、“CL區”或“CL結構域”。重鏈上的恒定結構域(例如，鉸鏈、CH1、CH2或CH3結構域)可互換地稱為“重鏈恒定區結構域”、“CH”區結構域或“CH結構域”。輕鏈上的可變結構域可互換地稱為“輕鏈可變區結構域”、“VL區結構域”或“VL結構域”。重鏈上的可變結構域可互換地稱為“重鏈可變區結構域”、“VH區結構域”或“VH結構域”。

【0183】按照慣例，可變恒定區結構域的胺基酸編號隨著它們遠離免疫球蛋白或抗體的抗原結合位點或胺基末端而增加。每個重鏈和輕鏈免疫球蛋白鏈的N-末端是可變區，並且C-末端是恒定區。CH3和CL結構域分別包含重鏈和輕鏈的羧基-末端。因此，輕鏈免疫球蛋白的結構域以VL-CL方向排列，而重鏈的結構域以VH-CH1-鉸鏈-CH2-CH3方向排列。

【0184】每個可變區結構域的胺基酸分配符合Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987和1991)

的定義。Kabat還提供廣泛使用的編號慣例(Kabat編號)，其中不同重鏈可變區之間或不同輕鏈可變區之間的相應殘基被分配相同的編號。VL結構域的CDR 1、2和3在本文中也分別稱為CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。VH結構域的CDR 1、2和3在本文中也分別稱為CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3。如果這樣指出，則CDR的分配可以按照IMGT®(Lefranc等人, *Developmental & Comparative Immunology* 27:55-77; 2003)，而非Kabat。重鏈恒定區的編號是經由如Kabat (*Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987和1991)中提出的EU索引。

【0185】如本文所用，術語“VH結構域”包括免疫球蛋白重鏈的胺基末端可變結構域，且術語“VL結構域”包括免疫球蛋白輕鏈的胺基末端可變結構域。

【0186】如本文所用，術語“CH1結構域”包括免疫球蛋白重鏈的第一(大多數胺基末端)恒定區結構域，其例如從Kabat編號系統中的大約位置114-223 (EU位置118-215)延伸。CH1結構域與VH結構域和免疫球蛋白重鏈分子的鉸鏈區的胺基末端相鄰，並且不構成免疫球蛋白重鏈的Fc區的一部分。

【0187】如本文所用，術語“鉸鏈區”包括將CH1結構域與CH2結構域連接的重鏈分子的部分。鉸鏈區包含約25個殘基並且是柔性的，因此允許兩個N-末端抗原結合區獨立地移動。鉸鏈區可以細分為三個不同的結構域：上部、中部和下部鉸鏈結構域(Roux等人 *J. Immunol.* 1998, 161 :4083)。

【0188】如本文所用，術語“CH2結構域”包括重鏈免疫球蛋白分子的部分，其例如從Kabat編號系統中的大約位置244-360 (EU位置231-340)延伸。CH2結構域是獨特的，因為它不與另一個結構域緊密配對。而是將兩個N-連接的支

鏈碳水化合物鏈插入完整天然IgG分子的兩個CH2結構域之間。在一個實施例中，本揭示文本的結合多肽包含來源於IgG1分子(例如人IgG1分子)的CH2結構域。

【0189】如本文所用，術語“CH3結構域”包括重鏈免疫球蛋白分子的部分，其從CH2結構域的N-末端例如從Kabat編號系統的大約位置361-476(EU位置341-445)延伸約110個殘基。CH3結構域通常形成抗體的C-末端部分。然而，在一些免疫球蛋白中，附加的結構域可以從CH3結構域延伸以形成分子的C-末端部分(例如，IgM的μ鏈和IgE的ε鏈中的CH4結構域)。在一個實施例中，本揭示文本的結合多肽包含來源於IgG1分子(例如人IgG1分子)的CH3結構域。

【0190】如本文所用，術語“CL結構域”包括免疫球蛋白輕鏈的恒定區結構域，其例如從大約Kabat位置107A延伸至大約Kabat位置216。CL結構域與VL結構域相鄰。在一個實施例中，本揭示文本的結合多肽包含來源於κ輕鏈(例如人κ輕鏈)的CL結構域。

【0191】如本文所用，術語“Fc區”定義為重鏈恒定區的部分，其始於木瓜蛋白酶切割位點(即IgG中的殘基216，將重鏈恒定區的第一個殘基取為114)上游的鉸鏈區並在該抗體的C-末端結束。因此，完整的Fc區至少包含鉸鏈結構域、CH2結構域和CH3結構域。

【0192】如本文所用，術語“天然Fc”或“野生型Fc”是指包含非抗原結合片段的序列的分子，所述非抗原結合片段的序列是單體或多聚體形式，由抗體消化產生或藉由其他方式產生；並且該術語可以包含鉸鏈區。天然Fc的原始免疫球蛋白通常是人起源的，並且可以是任何免疫球蛋白，如IgG1和IgG2。天然Fc分子由單體多肽組成，所述單體多肽可藉由共價(即二硫鍵)和非共價締合而

連接成二聚體或多聚體形式。天然Fc分子的單體亞基之間的分子間二硫鍵的數目範圍為1至4，這取決於類(例如，IgG、IgA和IgE)或亞類(例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgA1和IgGA2)。天然Fc的一個例子是由木瓜蛋白酶消化IgG產生的二硫鍵鍵合的二聚體。如本文所用，術語“天然Fc”對於單體、二聚體和多聚體形式是通用的。

【0193】如本文所用，術語“Fc變異體”或“經修飾的Fc”是指從天然/野生型Fc修飾但仍包含FcRn的結合位點的分子或序列。因此，術語“Fc變異體”可以包括從非人天然Fc人源化的分子或序列。此外，天然Fc包含可以去除的區域，因為它們提供了本文所述的抗體樣結合多肽不需要的結構特徵或生物活性。因此，術語“Fc變異體”包括缺少一個或多個天然Fc位點或殘基的分子或序列，或其中一個或多個Fc位點或殘基已經被修飾，所述一個或多個Fc位點或殘基影響或參與：(1)二硫鍵形成，(2)與選擇的宿主細胞的不相容性，(3)在選擇的宿主細胞中表現時的N-末端異質性，(4)糖基化，(5)與補體的相互作用，(6)與除了補救受體之外的Fc受體結合，或(7)抗體依賴性細胞毒性(ADCC)。

【0194】在某些示例性實施例中，與包含野生型Fc的IgG抗體相比，本文特定的Fc變異體具有增加的血清半衰期、增強的FcRn結合親和力、在酸性pH下增強的FcRn結合親和力、增強的Fc γ RIIIa結合親和力和/或類似的熱穩定性中的一種或多種。

【0195】如本文所用，術語“Fc結構域”包括如上定義的天然/野生型Fc以及Fc變異體和序列。與Fc變異體和天然Fc分子一樣，術語“Fc結構域”包括單體或多聚體形式的分子，無論是從完整抗體消化而來還是藉由其他方式產生。

【0196】如上所述，抗體的可變區允許其選擇性地識別並特異性地結合抗

原上的抗原決定基。也就是說，抗體的VL結構域和VH結構域組合以形成限定三維抗原結合位點的可變區(Fv)。該四聚體抗體結構在Y的每條臂的末端形成抗原結合位點。更具體地，該抗原結合位點由每個重鏈和輕鏈可變區上的三個互補決定區(CDR)限定。如本文所用，術語“抗原結合位點”包括特異性地結合(與……免疫反應)抗原(例如細胞表面或可溶性抗原)的位點。抗原結合位點包括免疫球蛋白重鏈和輕鏈可變區，並且由這些可變區形成的結合位點決定了抗體的特異性。抗原結合位點由可變區形成，所述可變區在抗體之間有所不同。本揭示文本的改變的抗體包含至少一個抗原結合位點。

【0197】在某些實施例中，本揭示文本的結合多肽包含提供該結合多肽與選擇的抗原的結合的至少兩個抗原結合結構域。抗原結合結構域不需要來源於相同的免疫球蛋白分子。在這一態樣，可變區可能來源於或來源於任何類型的動物，這種動物可以被誘導產生體液反應並產生針對所需抗原的免疫球蛋白。因此，結合多肽的可變區可以是例如哺乳動物起源的，例如可以是人、鼠、大鼠、山羊、綿羊、非人靈長類動物(如食蟹猴，獼猴等)、羽扇豆或駱駝科動物(例如，來自駱駝、美洲駝和相關物種)。

【0198】在天然存在的抗體中，存在於每個單體抗體上的六個CDR是短的、非連續的胺基酸序列，所述胺基酸序列特異性地定位以形成抗原結合位點，因為假定該抗體在水性環境中呈現其三維構型。重鏈和輕鏈可變結構域的其餘部分在胺基酸序列中顯示出較小的分子間可變性，並且被稱為架構區。架構區主要採用 β -折疊構象，並且CDR形成環，所述環連接 β -折疊結構，並且在一些情況下形成 β -折疊結構的一部分。因此，這些架構區起到形成支架的作用，所述支架提供六個CDR藉由鏈間非共價相互作用在正確方向上的定位。由定位的CDR

形成的抗原結合結構域限定了與免疫反應性抗原上的抗原決定基互補的表面。該互補表面促進抗體與免疫反應性抗原抗原決定基的非共價結合。

【0199】示例性結合多肽包括抗體變異體。如本文所用，術語“抗體變異體”包括抗體的合成和工程化形式，所述抗體被改變使得它們不是天然存在的，例如包含至少兩個重鏈部分但不是兩個完整重鏈的抗體(如結構域缺失的抗體或微型抗體)；多特異性形式的抗體(例如，雙特異性、三特異性等)，其被改變以結合兩種或更多種不同抗原或結合單一抗原上的不同抗原決定基；與scFv分子連接的重鏈分子等。另外，術語“抗體變異體”包括多價形式的抗體(例如，三價、四價等)，結合相同抗原的三個、四個或更多個拷貝的抗體。

【0200】如本文所用，術語“價態”是指多肽中潛在的靶結合位點的數目。每個靶結合位點特異性地結合靶分子上的一個靶分子或特異性位點。當多肽包含多於一個靶結合位點時，每個靶結合位點可以特異性地結合相同或不同的分子(例如，可以結合不同的配位體或不同的抗原，或結合相同抗原上的不同抗原決定基)。主題結合多肽通常具有對於人抗原分子特異性的至少一個結合位點。

【0201】術語“特異性”是指與給定靶抗原(例如人靶抗原)特異性地結合(例如，與……免疫反應)的能力。結合多肽可以是單特異性的並且含有特異性地結合標靶的一個或多個結合位點，或者多肽可以是多特異性的並且含有特異性地結合相同或不同標靶的兩個或多個結合位點。在某些實施例中，結合多肽對於相同標靶的兩個不同(例如，非重疊)部分是特異性的。在某些實施例中，結合多肽對於多於一種標靶是特異性的。示例性結合多肽(例如抗體)是本領域已知的，所述多肽包含結合腫瘤細胞上表現的抗原的抗原結合位點，並且來自此類

抗體的一個或多個CDR可以包括在如本文所述的抗體中。

【0202】如本文所用，術語“抗原”或“靶抗原”是指能夠被結合多肽的結合位點結合的分子或分子的一部分。靶抗原可具有一個或多個抗原決定基。

【0203】術語“約”(“about”或“approximately”)意指給定值或範圍的約20%內，如約10%內、約5%內或約1%內或更少。

【0204】如本文所用，“投予”(“administer”或“administration”)是指將存在於體外的物質(例如，本文提供的分離的結合多肽)注射或以其他方式物理遞送至患者中的行為，如藉由但不限於術語，肺(例如，吸入)、黏膜(例如，鼻內)、真皮內、靜脈內、肌肉內遞送和/或本文所述或本領域已知的任何其他物理遞送方法。當控制或治療疾病或其症狀時，該物質的投予通常在該疾病或其症狀發作之後進行。當預防疾病或其症狀時，該物質的投予通常在該疾病或其症狀發作之前進行，並且可以長期持續以延遲或減少疾病相關症狀的出現或程度。

【0205】如本文所用，術語“組合物”旨在涵蓋含有任選指定量的指定成分(例如，本文提供的分離的結合多肽)的產品，以及直接或間接由任選指定的量的指定成分的組合產生的任何產品。

【0206】“有效量”是指足以在需要藥劑的個體中實現所需生理學結果的該活性藥劑(例如，本揭示文本的分離的結合多肽)的量。根據待治療個體的健康和身體狀況、待治療個體的分類組、組合物的配製、個體的醫療狀況評估和其他相關因素，有效量可在個體之間有所不同。

【0207】如本文所用，術語“受試者”和“患者”可互換使用。如本文所用，受試者可以是哺乳動物，如非靈長類動物(例如，牛、豬、馬、貓、狗、大鼠等)或靈長類動物(例如，猴和人)。在某些實施例中，如本文所用的術語“受

試者”是指脊椎動物，如哺乳動物。哺乳動物包括但不限於人、非人靈長類動物、野生動物、未馴服的動物、農場動物、運動動物和寵物。

【0208】如本文所用，術語“療法”是指可用於預防、管理、治療和/或改善疾病或與其相關的症狀的任何方案、方法和/或藥劑。在一些實施例中，術語“療法”是指可用於調節受試者中對於感染的免疫反應或與其相關的症狀的任何方案、方法和/或試劑。在一些實施例中，術語“多種療法”和“療法”是指熟習此項技術者如醫務人員已知的可用於預防、管理和/或改善疾病或與其相關的症狀的生物療法、支持療法和/或其他療法。在其他實施例中，術語“多種療法”和“療法”是指熟習此項技術者如醫務人員已知的可用於調節受試者中對於感染的免疫反應或與其相關的症狀的生物療法、支持療法和/或其他療法。

【0209】如本文所用，術語“治療”(“treat”、“treatment”和“treating”)是指由一種或多種療法的投予(包括但不限於一種或多種預防或治療劑如本文提供的分離的結合多肽的投予)引起的疾病或與其相關的症狀的進展、嚴重程度和/或持續時間的降低或改善。如本文所用，術語“治療”還可以指改變所治療的受試者的疾病進程。治療的治療效果包括但不限於預防疾病的發生或復發，緩和一種或多種症狀、減少疾病的直接或間接病理後果、降低疾病進展的速度、改善或減緩疾病狀態以及緩解或改善預後。

結合多肽

【0210】在一個態樣，本揭示文本提供了包含經修飾的Fc結構域的結合多肽(例如，抗體、免疫黏附素、抗體變異體和融合蛋白)。本文揭示的結合多肽包括包含經修飾的Fc結構域的任何結合多肽。在某些實施例中，結合多肽是抗體

或免疫黏附素或其衍生物。來自任何來源或物種的任何抗體均可用於本文揭示的結合多肽中。合適的抗體包括但不限於人抗體、人源化抗體或嵌合抗體。合適的抗體包括但不限於單株抗體、多株抗體、全長抗體或單鏈抗體。

【0211】來自任何免疫球蛋白類(例如，IgM、IgG、IgD、IgA和IgE)和物種的Fc結構域可用於本文揭示的結合多肽中。還可以使用包含來自不同物種或Ig類的Fc結構域的部分的嵌合Fc結構域。在某些實施例中，Fc結構域是人Fc結構域。在一些實施例中，Fc結構域是IgG1 Fc結構域。在其他實施例中，Fc結構域是IgG4 Fc結構域。在一些實施例中，Fc結構域是人IgG1或IgG4 Fc結構域。在一些實施例中，Fc結構域是人IgG1 Fc結構域。在其他物種和/或Ig類或同種型的Fc結構域的情況下，技術人員將理解可以相應地調整本文所述的任何胺基酸取代。在一些實施例中，經修飾的Fc結構域可以包含選自按照EU編號的M252、I253、S254、T256、K288、T307、K322、E380、L432、N434或Y436及其任何組合的胺基酸取代。在一些實施例中，經修飾的Fc結構域可以包含在選自按照EU編號的M252、I253、S254、T256、K288、T307、K322、E380、L432、N434和Y436的任何兩個胺基酸位置處的雙重胺基酸取代。在一些實施例中，經修飾的Fc結構域可以包含在選自按照EU編號的M252、I253、S254、T256、K288、T307、K322、E380、L432、N434和Y436的任何三個胺基酸位置處的三重胺基酸取代。在一些實施例中，經修飾的Fc結構域可以包含在選自按照EU編號的M252、I253、S254、T256、K288、T307、K322、E380、L432、N434和Y436的任何四個胺基酸位置處的四重胺基酸取代。在一些實施例中，可能需要經修飾的Fc結構域包含在選自按照EU編號的M252、I253、S254、T256、K288、T307、K322、E380、L432或Y436及其任何組合的任何胺基酸位置處的胺基酸取代，其

中胺基酸位置N434未被取代(即，胺基酸位置N434是野生型)。

【0212】在一些實施例中，經修飾的Fc結構域可以包含選自按照EU編號的M252Y(即，在胺基酸位置252處的酪胺酸)、T256D、T256E、K288D、K288N、T307A、T307E、T307F、T307M、T307Q、T307W、E380C、N434F、N434P、N434Y、Y436H、Y436N或Y436W及其任何組合的胺基酸取代。在一些實施例中，經修飾的Fc結構域可以包含按照EU編號的雙重胺基酸取代，所述雙重胺基酸取代選自：M252，其中該取代是M252Y；T256，其中該取代是T256D或T256E；K288，其中該取代是K288D或K288N；T307，其中該取代是T307A、T307E、T307F、T307M、T307Q或T307W；E380，其中該取代是E380C；N434，其中該取代是N434F、N434P或N434Y；Y436，其中該取代是Y436H、Y436N或Y436W。在一些實施例中，經修飾的Fc結構域可以包含按照EU編號的三重胺基酸取代，所述三重胺基酸取代選自：M252，其中該取代是M252Y；T256，其中該取代是T256D或T256E；K288，其中該取代是K288D或K288N；T307，其中該取代是T307A、T307E、T307F、T307M、T307Q或T307W；E380，其中該取代是E380C；N434，其中該取代是N434F、N434P或N434Y；Y436，其中該取代是Y436H、Y436N或Y436W。在一些實施例中，經修飾的Fc結構域可以包含按照EU編號的四重胺基酸取代，所述四重胺基酸取代選自：M252，其中該取代是M252Y；T256，其中該取代是T256D或T256E；K288，其中該取代是K288D或K288N；T307，其中該取代是T307A、T307E、T307F、T307M、T307Q或T307W；E380，其中該取代是E380C；N434，其中該取代是N434F、N434P或N434Y；Y436，其中該取代是Y436H、Y436N或Y436W。在一些實施例中，可能需要經修飾的Fc結構域包含在選自按照EU編號的M252Y、T256D、T256E、K288D、K288N、

T307A、T307E、T307F、T307M、T307Q、T307W、E380C、Y436H、Y436N或Y436W及其任何組合的任何胺基酸位置處的胺基酸取代，其中胺基酸位置N434未被苯丙胺酸(F)或酪胺酸(Y)取代。在一些實施例中，可能需要經修飾的Fc結構域包含在選自按照EU編號的M252Y、T256D、T256E、K288D、K288N、T307A、T307E、T307F、T307M、T307Q、T307W、E380C、Y436H、Y436N或Y436W及其任何組合的任何胺基酸位置處的胺基酸取代，其中胺基酸位置N434未被酪胺酸(Y)取代。在一些實施例中，可能需要經修飾的Fc結構域包含在選自按照EU編號的M252Y、T256D、T256E、K288D、K288N、T307A、T307E、T307F、T307M、T307Q、T307W、E380C、Y436H、Y436N或Y436W及其任何組合的任何胺基酸位置處的胺基酸取代，其中胺基酸位置N434未被取代(即，胺基酸位置N434是野生型)。

【0213】在某些實施例中，經修飾的Fc結構域可以包含選自按照EU編號的M252、T256、T307或N434及其任何組合的胺基酸取代。在某些實施例中，經修飾的Fc結構域可以包含在選自按照EU編號的M252、T256、T307和N434的任何兩個胺基酸位置處的雙重胺基酸取代。在某些實施例中，經修飾的Fc結構域可以包含在選自按照EU編號的M252、T256、T307和N434的任何三個胺基酸位置處的三重胺基酸取代。在某些實施例中，經修飾的Fc結構域可以包含在按照EU編號的胺基酸位置M252、T256、T307和N434處的四重胺基酸取代。在一些實施例中，可能需要經修飾的Fc結構域包含選自按照EU編號的M252、T256或T307及其任何組合的胺基酸取代，其中胺基酸位置N434未被取代(即，胺基酸位置N434是野生型)。

【0214】在示例性實施例中，經修飾的Fc結構域可以包含按照EU編號的胺

基酸取代，所述胺基酸取代選自：M252，其中該取代是M252Y；T256，其中該取代是T256D或T256E；T307，其中該取代是T307Q或T307W；或N434，其中該取代是N434F或N434Y及其任何組合。在某些實施例中，經修飾的Fc結構域可以包含在按照EU編號的任何兩個胺基酸位置處的雙重胺基酸取代，所述任何兩個胺基酸位置選自：M252，其中該取代是M252Y；T256，其中該取代是T256D或T256E；T307，其中該取代是T307Q或T307W；或N434，其中該取代是N434F或N434Y。在某些實施例中，經修飾的Fc結構域可以包含在按照EU編號的任何三個胺基酸位置處的三重胺基酸取代，所述任何三個胺基酸位置選自：M252，其中該取代是M252Y；T256，其中該取代是T256D或T256E；T307，其中該取代是T307Q或T307W；或N434，其中該取代是N434F或N434Y。在某些實施例中，經修飾的Fc結構域可以包含在按照EU編號的如下胺基酸位置處的四重胺基酸取代，所述胺基酸位置選自：M252，其中該取代是M252Y；T256，其中該取代是T256D或T256E；T307，其中該取代是T307Q或T307W；或N434，其中該取代是N434F或N434Y。在一些實施例中，可能需要經修飾的Fc結構域包含選自按照EU編號的M252Y、T256D、T256E、T307Q或T307W及其任何組合的胺基酸取代，其中胺基酸位置N434未被苯丙胺酸(F)或酪胺酸(Y)取代。在一些實施例中，可能需要經修飾的Fc結構域包含選自按照EU編號的M252Y、T256D、T256E、T307Q或T307W及其任何組合的胺基酸取代，其中胺基酸位置N434未被酪胺酸(Y)取代。在一些實施例中，可能需要經修飾的Fc結構域包含選自按照EU編號的M252Y、T256D、T256E、T307Q或T307W及其任何組合的胺基酸取代，其中胺基酸位置N434未被取代(即，胺基酸位置N434是野生型)。

【0215】在某些實施例中，按照EU編號，經修飾的Fc結構域可以包含選自
第 47 頁，共 110 頁(發明說明書)

T256D或T256E和/或T307W或T307Q的胺基酸取代，並且進一步包含選自N434F或N434Y或M252Y的胺基酸取代。在一些實施例中，按照EU編號，可能需要經修飾的Fc結構域包含選自T256D或T256E和/或T307W或T307Q的胺基酸取代，並且進一步包含胺基酸取代M252Y，其中胺基酸位置N434未被苯丙胺酸(F)或酪胺酸(Y)取代。在一些實施例中，按照EU編號，可能需要經修飾的Fc結構域包含選自T256D或T256E和/或T307W或T307Q的胺基酸取代，並且進一步包含胺基酸取代M252Y，其中胺基酸位置N434未被酪胺酸(Y)取代。在一些實施例中，按照EU編號，可能需要經修飾的Fc結構域包含選自T256D或T256E和/或T307W或T307Q的胺基酸取代，並且進一步包含胺基酸取代M252Y，其中胺基酸位置N434未被取代(即，胺基酸位置N434是野生型)。

【0216】在一些實施例中，經修飾的Fc結構域可以包含選自按照EU編號的M252Y/T256D、M252Y/T256E、M252Y/T307Q、M252Y/T307W、M252Y/N434F、M252Y/N434Y、T256D/T307Q、T256D/T307W、T256D/N434F、T256D/N434Y、T256E/T307Q、T256E/T307W、T256E/N434F、T256E/N434Y、T307Q/N434F、T307Q/N434Y、T307W/N434F和T307W/N434Y的雙重胺基酸取代。在一些實施例中，經修飾的Fc結構域可以包含選自按照EU編號的M252Y/T256D/T307Q、M252Y/T256D/T307W、M252Y/T256D/N434F、M252Y/T256D/N434Y、M252Y/T256E/T307Q、M252Y/T256E/T307W、M252Y/T256E/N434F、M252Y/T256E/N434Y、M252Y/T307Q/N434F、M252Y/T307Q/N434Y、M252Y/T307W/N434F、M252T/T307W/N434Y、T256D/307Q/N434F、T256D/307W/N434F、T256D/307Q/N434Y、T256E/307Q/N434F、T256E/307W/N434F、T256E/307Q/N434Y 和

T256E/307W/N434Y的三重胺基酸取代。

【0217】在一些實施例中，經修飾的Fc結構域可以包含選自按照EU編號的
 M252Y/T256D/T307Q/N434F 、 M252Y/T256E/T307Q/N434F 、
 M252Y/T256D/T307W/N434F 、 M252Y/T256E/T307W/N434F 、
 M252Y/T256D/T307Q/N434Y 、 M252Y/T256E/T307Q/N434Y 、
 M252Y/T256D/T307W/N434Y和M252Y/T256E/T307W/N434Y的四重胺基酸取代。

【0218】在一些實施例中，可能需要經修飾的Fc結構域在按照EU編號的胺基酸位置N434處包含野生型胺基酸。在一些實施例中，可能需要Fc結構域在按照EU編號的胺基酸位置N434處不包含苯丙胺酸(F)或酪胺酸(Y)。在一些實施例中，可能需要Fc結構域在按照EU編號的胺基酸位置N434處不包含酪胺酸(Y)。在一些實施例中，經修飾的Fc結構域可以包含選自按照EU編號的
 M252Y/T256D、M252Y/T256E、M252Y/T307Q、M252Y/T307W、T256D/T307Q、
 T256D/T307W、T256E/T307Q和T256E/T307W的雙重胺基酸取代。在一些實施例中，經修飾的Fc結構域可以包含選自按照EU編號的M252Y/T256D/T307Q、
 M252Y/T256D/T307W、M252Y/T256E/T307Q和M252Y/T256E/T307W的三重胺基酸取代。

【0219】在一個實施例中，具有改變的FcRn結合的結合多肽包含具有如本文揭示的一個或多個胺基酸取代的Fc結構域。在一個實施例中，具有增強的FcRn結合親和力的結合多肽包含具有如本文揭示的一個或多個胺基酸取代的Fc結構域。在一個實施例中，具有增強的FcRn結合親和力的結合多肽包含具有如本文揭示的兩個或更多個胺基酸取代的Fc結構域。在一種實施例中，具有增強的FcRn

結合親和力的結合多肽包含具有如本文揭示的三個或更多個胺基酸取代的Fc結構域。

【0220】在一些實施例中，結合多肽可以顯示出物種特異性FcRn結合親和力。在一個實施例中，結合多肽可以顯示出人FcRn結合親和力。在一個實施例中，結合多肽可以顯示出大鼠FcRn結合親和力。在一些實施例中，結合多肽可以顯示出跨物種FcRn結合親和力。這種結合多肽被認為是在一種或多種不同物種之間具有交叉反應性。在一種實施例中，結合多肽可以顯示出人和大鼠FcRn結合親和力。

【0221】新生兒Fc受體(FcRn)與抗體的Fc區相互作用以藉由挽救正常的溶酶體降解促進循環。這一過程是pH依賴性過程，其發生在酸性pH下的核內體中(例如，pH小於6.5)而不是在血流的生理pH條件下(例如，非酸性pH)。在一些實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，包含經修飾的Fc結構域的本揭示文本的結合多肽在酸性pH下具有增強的FcRn結合親和力。在一些實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，包含經修飾的Fc結構域的結合多肽在pH小於7，例如在約pH 6.5、約pH 6.0、約pH 5.5、約pH 5.0下具有增強的FcRn結合親和力。在一些實施例中，與包含經修飾的Fc結構域的結合多肽在升高的非酸性pH下的FcRn結合親和力相比，該結合多肽在pH小於7，例如在約pH 6.5、約pH 6.0、約pH 5.5、約pH 5.0下具有增強的FcRn結合親和力。升高的非酸性pH可以是例如pH大於7、約pH 7、約pH 7.4、約pH 7.6、約pH 7.8、約pH 8.0、約pH 8.5、約pH 9.0。

【0222】在某些實施例中，可能需要包含經修飾的Fc結構域的結合多肽在非酸性pH下顯示出與包含野生型Fc結構域的結合多肽大致相同的FcRn結合親和

力。在一些實施例中，可能需要包含經修飾的Fc結構域的結合多肽在非酸性pH下顯示出比包含具有按照EU編號的雙重胺基酸取代M428L/N434S的經修飾Fc結構域的結合多肽更小的FcRn結合親和力。因此，可能需要包含經修飾的Fc結構域的結合多肽對pH依賴性FcRn結合顯示出最小的擾動。

【0223】在一些實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，在酸性pH下具有增強的FcRn結合親和力的包含經修飾Fc結構域的結合多肽具有降低的(即，更慢的)FcRn解離速率。在一些實施例中，包含經修飾的Fc結構域的結合多肽(與該結合多肽在升高的非酸性pH下的FcRn結合親和力相比，該結合多肽在酸性pH下具有增強的FcRn結合親和力)與該結合多肽在升高的非酸性pH下的FcRn解離速率相比，在酸性pH下具有更慢的FcRn解離速率。

【0224】在一些實施例中，提供了包含經修飾的Fc結構域的結合多肽，所述結合多肽與包含野生型Fc的結合多肽相比在非酸性pH下顯示出更高的FcRn結合親和力。在一些實施例中，提供了包含經修飾的Fc結構域的結合多肽，所述結合多肽與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比在酸性pH下顯示出更高的FcRn結合親和力。在一些實施例中，提供了包含經修飾的Fc結構域的結合多肽，所述結合多肽與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比在非酸性pH下顯示出更高的FcRn結合親和力，並且與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比在酸性pH下顯示出更高的FcRn結合親和力。因此，在某些實施例中，提供了包含經修飾的Fc結構域的結合多肽，其顯示出pH依賴性FcRn結合的喪失。

【0225】某些實施例包括如下抗體：除了顯示出改變的FcRn結合親和力的本文所述Fc突變之外，所述抗體還包含在一個或多個恒定區結構域中的至少一個胺基酸和/或在一個或多個可變區結構域中的至少一個胺基酸，所述至少一個

胺基酸已經缺失或以其他方式改變以提供所需的生物化學特徵，例如當與完整未改變的具有大致相同免疫原性的抗體相比時降低或增強的效應子功能、非共價二聚化能力、增強的定位於腫瘤部位的能力、減少的血清半衰期、增加的血清半衰期等。

【0226】在某些其他實施例中，結合多肽包含來源於不同抗體同種型的恒定區(例如，來自人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4中的兩種或更多種的恒定區)。在其他實施例中，結合多肽包含嵌合鉸鏈(即，包含來源於不同抗體同種型的鉸鏈結構域的鉸鏈部分的鉸鏈，所述鉸鏈結構域例如來自IgG4分子的上部鉸鏈結構域和IgG1中間鉸鏈結構域)。

【0227】在某些實施例中，可以使用本領域已知的技術使Fc結構域突變以增加或減少效應子功能。在一些實施例中，包含經修飾的Fc結構域的本揭示文本的結合多肽具有對於Fc受體的改變的結合親和力。存在幾種不同類型的Fc受體，所述Fc受體基於它們識別的抗體類型進行分類。例如，Fc- γ 受體(Fc γ R)與IgG類抗體結合，Fc- α 受體(Fc α R)與IgA類抗體結合，並且Fc- ϵ 受體(Fc ϵ R)與IgE類抗體結合。Fc γ R屬包含多個成員例如Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIa和Fc γ RIIIb的家族。在一些實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，包含經修飾的Fc結構域的結合多肽具有改變的Fc γ RIIIa結合親和力。在一些實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，包含經修飾的Fc結構域的結合多肽具有降低的Fc γ RIIIa結合親和力。在一些實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，包含經修飾的Fc結構域的結合多肽具有增強的Fc γ RIIIa結合親和力。在一些實施例中，與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，包含經修飾的Fc結構域的結合多肽具有大致相同的Fc γ RIIIa結合親和力。

【0228】在其他實施例中，用於本文所述的診斷和治療方法的結合多肽具有恒定區，例如IgG1重鏈恒定區，所述恒定區被改變以減少或消除糖基化。例如，包含經修飾的Fc結構域的結合多肽(例如，抗體或免疫黏附素)可以進一步包含改變抗體Fc的糖基化的胺基酸取代。例如，所述經修飾的Fc結構域可具有降低的糖基化(例如，N-或O-連接的糖基化)。

【0229】在國際PCT公開案號WO05/018572中揭示賦予降低或改變的糖基化的示例性胺基酸取代，其藉由引用以全文併入本文。在一些實施例中，結合多肽被修飾以消除糖基化。這種結合多肽可以稱為“agly”結合多肽(例如，“agly”抗體)。儘管不受理論約束，但認為“agly”結合多肽可具有改善的體內安全性和穩定性。agly結合多肽可以具有其任何同種型或亞類，例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。許多本領域公認的方法可用於製備“agly”抗體或具有改變的聚糖的抗體。例如，具有經修飾的糖基化途徑(例如，糖基轉移酶缺失)的基因工程化宿主細胞(例如，經修飾的酵母例如畢赤酵母，或CHO細胞)可用於產生此類抗體。

【0230】在某些實施例中，結合多肽可以包含介導一種或多種效應子功能的抗體恒定區(例如IgG恒定區，例如人IgG恒定區，例如人IgG1恒定區)。例如，C1複合物與抗體恒定區的結合可以激活補體系統。補體系統的激活在細胞病原體的調理作用和裂解中是重要的。補體系統的激活還刺激炎性反應，並且還可能參與自身免疫性超敏反應。此外，抗體經由Fc結構域與多種細胞上的受體結合(抗體Fc區上的Fc受體結合位點與細胞上的Fc受體(FcR)結合)。存在許多Fc受體，所述Fc受體對不同類的抗體具有特異性，包括IgG(γ 受體)、IgE(ϵ 受體)、IgA(α 受體)和IgM(μ 受體)。抗體與細胞表面上的Fc受體的結合引發了許多重要和多樣的生物反應，包括抗體包被顆粒的吞噬和破壞、免疫複合物的清除、殺傷細

胞裂解抗體包被的靶細胞(稱為抗體依賴性細胞介導的細胞毒性，或ADCC)、炎症介質的釋放、胎盤轉移和免疫球蛋白產生的控制。在一些實施例中，結合多肽(例如，抗體或免疫黏附素)與Fc- γ 受體結合。在備選實施例中，結合多肽可以包含恒定區，所述恒定區缺乏一種或多種效應子功能(例如，ADCC活性)和/或不能結合Fc γ 受體。

【0231】 具有低熱力學穩定性的蛋白質(包括抗體)具有增加的錯折疊和聚集傾向，並且將會限制或阻礙該蛋白質作為有用治療劑的活性、功效和潛力。在某些實施例中，包含經修飾的Fc結構域的結合多肽具有與包含野生型Fc結構域的結合多肽大致相同的熱穩定性。在一些實施例中，包含經修飾的Fc結構域的結合多肽具有與包含具有三重胺基酸取代M252Y/S254T/T256E (YTE)的經修飾Fc結構域的結合多肽大致相同的熱穩定性。

【0232】 所得的生理特徵、生物利用度和修飾的其他生物化學效應(如腫瘤定位、生物分佈和血清半衰期)，可以使用公知的免疫學技術在無需過多的實驗的情況下容易地量測和量化。

【0233】 在某些實施例中，本揭示文本的結合多肽可以包含抗體的抗原結合片段。術語“抗原結合片段”是指免疫球蛋白或抗體的多肽片段，其結合抗原或與完整抗體(即，與所述免疫球蛋白或抗體的多肽片段所來源的完整抗體)競爭抗原結合(即特異性結合)。抗原結合片段可以藉由本領域公知的重組或生物化學方法產生。示例性的抗原結合片段包括Fv、Fab、Fab'和(Fab')2。在示例性實施例中，本揭示文本的結合多肽包含抗原結合片段和經修飾的Fc結構域。

【0234】 在一些實施例中，結合多肽包含單鏈可變區序列(ScFv)。單鏈可變區序列包含具有一個或多個抗原結合位點的單個多肽，例如藉由柔性連接子

與VH結構域連接的VL結構域。ScFv分子可以以VH-連接子-VL方向或VL-連接子-VH方向構建。連接構成抗原結合位點的VL和VH結構域的柔性鉸鏈包含約10至約50個胺基酸殘基。連接肽在本領域中是已知的。結合多肽可以包含至少一個scFv和/或至少一個恒定區。在一個實施例中，本揭示文本的結合多肽可以包含與經修飾的Fc結構域連接或融合的至少一個scFv。

【0235】在一些實施例中，本揭示文本的結合多肽是多價(例如，四價)抗體，所述多價抗體藉由將編碼抗體的DNA序列與ScFv分子(例如，改變的ScFv分子)融合而產生。例如，在一個實施例中，組合這些序列使得ScFv分子(例如，改變的ScFv分子)在其N-末端或C-末端經由柔性連接子(例如，gly/ser連接子)與抗體的Fc片段連接。在另一個實施例中，本揭示文本的四價抗體可以藉由如下方法來製備：將ScFv分子與連接肽融合，所述連接肽與經修飾的Fc結構域融合以構建ScFv-Fab四價分子。

【0236】在另一個實施例中，本揭示文本的結合多肽是改變的微型抗體。本揭示文本的改變的微型抗體是由兩條多肽鏈組成的二聚體分子，每條多肽鏈包含經由連接肽與經修飾的Fc結構域融合的ScFv分子。可以藉由使用本領域描述的方法(參見例如美國專利5,837,821或WO 94/09817A1)構建ScFv組分和連接肽組分來製備微型抗體。在另一個實施例中，可以構建四價微型抗體。可以用與微型抗體相同的方式構建四價微型抗體，不同的是使用柔性連接子連接兩個ScFv分子。然後將連接的scFv-scFv構建體與經修飾的Fc結構域連接。

【0237】在另一個實施例中，本揭示文本的結合多肽包含雙抗體。雙抗體是二聚體四價分子，其各自具有與scFv分子類似的多肽，但通常具有連接兩個可變結構域的短(小於10個，例如約1至約5個)胺基酸殘基連接子，使得在相同的多

肽鏈上的VL和VH結構域不能相互作用。相反，一條多肽鏈的VL和VH結構域(分別)與第二多肽鏈上的VH和VL結構域相互作用(參見例如，WO 02/02781)。本揭示文本的雙抗體包含與經修飾的Fc結構域融合的scFv樣分子。

【0238】在其他實施例中，結合多肽包含多特異性或多價抗體，所述多特異性或多價抗體在同一多肽鏈上串聯地包含一個或多個可變結構域，例如串聯的可變結構域(TVD)多肽。示例性TVD多肽包括美國專利號5,989,830中描述的“雙頭”或“雙Fv”構型。在雙Fv構型中，兩種不同抗體的可變結構域在兩條單獨的鏈(一條重鏈和一條輕鏈)上以串聯方向表示，其中一條多肽鏈具有被肽連接子隔開的兩個串聯的VH結構域(VH1-連接子-VH2)，並且另一條多肽鏈由藉由肽連接子串聯連接的互補VL結構域組成(VL1-連接子-VL2)。在交叉雙頭構型中，兩種不同抗體的可變結構域在兩條單獨的多肽鏈(一條重鏈和一條輕鏈)上以串聯方向表示，其中一條多肽鏈具有被肽連接子隔開的兩個串聯的VH結構域(VH1-連接子-VH2)，並且另一條多肽鏈由藉由肽連接子以相反方向串聯連接的互補VL結構域組成(VL2-連接子-VL1)。基於“雙Fv”形式的附加抗體變異體包括雙可變結構域IgG(DVD-IgG)雙特異性抗體(參見美國專利號7,612,181)和TBTI形式(參見US 2010/0226923 A1)。在一些實施例中，結合多肽包括多特異性或多價抗體，所述多特異性或多價抗體包含在與經修飾的Fc結構域融合的同一多肽鏈上串聯的一個或多個可變結構域。

【0239】在另一個示例性實施例中，結合多肽包含基於“雙頭”構型的交叉雙可變結構域IgG (CODV-IgG)雙特異性抗體(參見US 20120251541 A1，其藉由引用以其全文併入本文)。

【0240】在另一個示例性實施例中，結合多肽是免疫黏附素。如本文所

用，“免疫黏附素”是指包含與免疫球蛋白恒定結構域(即Fc區)連接的一個或多個結合結構域(例如，來自受體、配位體或細胞黏附分子)的結合多肽(參見例如Ashkenazi等人 1995, *Methods* 8(2): 104–115，和Isaacs (1997) *Brit. J. Rheum.* 36:305，其藉由引用以其全文併入本文。免疫黏附素在其國際非專利藥名稱(international nonproprietary names, INN)中以後綴“-cept”標識。與抗體類似，免疫黏附素具有長的循環半衰期，易於藉由基於親和力的方法純化，並且具有由二價賦予的親合力優勢。市售治療性免疫黏附素的例子包括依那西普(ENBREL®)、阿巴西普(ORENCIA®)、利納西普(ARCALYST®)、阿柏西普(ZALTRAP®/EYLEA®)和貝拉西普(NULOJIX®)。

【0241】在某些實施例中，結合多肽包含免疫球蛋白樣結構域。合適的免疫球蛋白樣結構域包括但不限於纖連蛋白結構域(參見例如Koide等人 (2007), *Methods Mol. Biol.* 352: 95–109，其經由引用以其全文併入本文)、DARPin(參見例如Stumpp等人 (2008) *Drug Discov. Today* 13 (15–16): 695–701，其經由引用以其全文併入本文)、蛋白A的Z結構域(參見Nygren等人 (2008) *FEBS J.* 275 (11): 2668–76，其經由引用以其全文併入本文)、脂質運載蛋白(參見例如Skerra等人 (2008) *FEBS J.* 275 (11): 2677–83，其經由引用以其全文併入本文)、Affilins(參見例如Ebersbach等人 (2007) *J. Mol. Biol.* 372 (1): 172–85，其經由引用以其全文併入本文)、Affitins(參見例如Krehenbrink等人 (2008). *J. Mol. Biol.* 383 (5): 1058–68，其藉由引用以其全文併入本文)、高親和性多聚體(參見例如Silverman等人 (2005) *Nat. Biotechnol.* 23 (12): 1556–61，其經由引用以其全文併入本文)、Fynomers(參見例如Grabulovski等人 (2007) *J Biol Chem* 282 (5): 3196–3204，其經由引用以其全文併入本文)以及Kunitz結構域肽(參見例如Nixon等人 (2006) *Curr Opin Drug*

Discov Devel9 (2): 261–8，其經由引用以其全文併入本文)。

【0242】對於本揭示文本的結合多肽和免疫黏附素，實際上任何抗原都可以被結合多肽靶向，包括但不限於靶抗原的蛋白質、亞基、結構域、基序和/或抗原決定基，所述靶抗原包括可溶性因子(如細胞因子和膜結合因子)和跨膜受體二者。

【0243】包含本文所述的經修飾的Fc結構域的本揭示文本的結合多肽可以包括已知“親本”抗體的CDR序列或可變結構域序列。在一些實施例中，除了對本文揭示的對Fc結構域的修飾之外，親本抗體和本揭示文本的抗體可以共有類似或相同的序列。

核酸和表現載體

【0244】在一個態樣，本發明提供編碼本文揭示的結合多肽的多核苷酸。還提供了製備結合多肽的方法，所述方法包括表現這些多核苷酸。

【0245】通常將編碼本文揭示的結合多肽的多核苷酸插入表現載體中以引入宿主細胞中，所述宿主細胞可用於產生所需量的要求保護的抗體或免疫黏附素。因此，在某些態樣，本發明提供了包含本文揭示的多核苷酸的表現載體以及包含這些載體和多核苷酸的宿主細胞。

【0246】出於說明書和申請專利範圍之目的，本文使用術語“載體”或“表現載體”來意指用於在細胞中引入和表現所需基因的載體。如熟習此項技術者所知，此類載體可以容易地選自質體、噬菌體、病毒和逆轉錄病毒。一般而言，載體將包含選擇標誌物、適當的限制性位點以促進所需基因的選殖，以及進入真核或原核細胞和/或在其中複製的能力。

【0247】可以使用許多表現載體系統。例如，一類載體綱利用來源於動物

病毒如牛乳頭瘤病毒、多瘤病毒、腺病毒、牛痘病毒、杆狀病毒、逆轉錄病毒(RSV、MMTV或MOMLV)或SV40病毒的DNA元件。其他載體類涉及使用具有內部核糖體結合位點的多順反子系統。另外，可以藉由引入一種或多種標誌物來選擇已將DNA整合至其染色體中的細胞，所述一種或多種標誌物允許轉染的宿主細胞的選擇。標誌物可以提供對營養缺陷型主體的原營養、殺生物劑抗性(例如抗生素)或對重金屬如銅的抗性。可選擇標誌基因可以直接與待表現的DNA序列連接，或藉由共轉化引入同一細胞中。還可能需要附加的元件來最佳地合成mRNA。這些元件可包括信號序列、剪接信號以及轉錄啟動子、強化子和終止信號。在一些實施例中，將選殖的可變區基因與如上所述合成的重鏈和輕鏈恒定區基因(如人基因)一起插入表現載體中。

【0248】 在其他實施例中，可以使用多順反子構建體表現如本文所述的結合多肽。在此類表現系統中，可以從單個多順反子構建體產生多種感興趣的基因產物，如抗體的重鏈和輕鏈。這些系統有利地使用內部核糖體進入位點(IRES)在真核宿主細胞中提供相對高水平的多肽。相容的IRES序列揭示在美國專利號6,193,980中，其經由引用併入本文中。熟習此項技術者將理解，此類表現系統可用於有效產生本申請案中揭示的全範圍多肽。

【0249】 更一般地，一旦製備了編碼本揭示文本的結合多肽的載體或DNA序列，就可以將表現載體引入合適的宿主細胞中。也就是說，該宿主細胞可以被轉化。可以藉由熟習此項技術者公知的各種技術來實現將質體引入宿主細胞中。這些技術包括但不限於轉染(包括電泳和電穿孔)、原生質體融合、磷酸鈣沉澱、與包膜DNA的細胞融合、顯微注射和完整病毒感染。參見例如Ridgway, A. A. G. “Mammalian Expression Vectors” 第24.2章, 第470-472頁 Vectors, Rodriguez

和Denhardt,編輯 (Butterworths, Boston, MA 1988)。轉化的細胞在適合於產生輕鏈和重鏈的條件下生長，並測定重鏈和/或輕鏈蛋白質合成。示例性測定技術包括酶聯免疫吸附測定(ELISA)、放射免疫測定(RIA)或螢光激活細胞分選儀分析(FACS)、免疫組織化學等。

【0250】如本文所用，術語“轉化”應在廣義上使用，是指將DNA引入受體宿主細胞中，這改變了基因型並因此導致受體細胞的變化。

【0251】沿著相同的思路，“宿主細胞”是指已經採用使用重組DNA技術構建的並且編碼至少一種異源基因的載體轉化的細胞。在描述用於從重組主體分離多肽的過程時，術語“細胞”和“細胞培養物”可互換使用以表示抗體來源，除非另有明確說明。換言之，從“細胞”中回收多肽可以意指從離心沉澱的全細胞，或從含有培養基和懸浮細胞二者的細胞培養物中回收。

【0252】在一個實施例中，用於表現結合多肽的宿主細胞株是真核或原核起源的。在一個實施例中，用於表現結合多肽的宿主細胞株是細菌起源的。在一個實施例中，用於表現結合多肽的宿主細胞株是哺乳動物起源的；熟習此項技術者可以確定最適合於在其中表現所需基因產物的特定宿主細胞株。示例性宿主細胞株包括但不限於DG44和DUXB11 (中國倉鼠卵巢系, DHFR-)、HELA (人宮頸癌)、CVI (猴腎系)、COS (具有SV40 T抗原的CVI的衍生物)、R1610 (中國倉鼠成纖維細胞)、BALBC/3T3 (小鼠成纖維細胞)、HAK (倉鼠腎系)、SP2/O (小鼠骨髓瘤)、BFA-1c1BPT (牛內皮細胞)、RAJI (人淋巴細胞)、293 (人腎)。在一個實施例中，細胞株提供由其表現的抗體的改變的糖基化，例如非岩藻糖基化(例如，PER.C6.RTM.(Crucell) 或 FUT8 敲除 CHO 細胞株 (POTELLIGENTTM 細胞)(Biowa, Princeton, NJ))。在一個實施例中，可以使用NS0細胞。宿主細胞株通

常可從商業服務、美國組織培養物保藏中心(American Tissue Culture Collection)或公開的文獻中獲得。

【0253】體外生產允許按比例放大以給出大量的所需結合多肽。在組織培養條件下用於哺乳動物細胞培養的技術是本領域已知的並且包括同質懸浮培養(例如在氣升式反應器或連續攪拌反應器中)，或在瓊脂糖上微珠或陶瓷盒上的固定化或包埋的細胞培養(例如在中空纖維、微膠囊中)。如果必要和/或需要的話，可以藉由常規層析方法，例如凝膠過濾、離子交換層析法、在DEAE-纖維素上的層析法和/或(免疫)親和層析法純化多肽的溶液。

【0254】編碼結合多肽的一種或多種基因也可以在非哺乳動物細胞如細菌或酵母或植物細胞中表現。在這一態樣，應當理解，也可以轉化多種單細胞非哺乳動物微生物如細菌，即那些能夠在培養或發酵中生長的那些微生物。易於轉化的細菌包括腸桿菌科成員，如大腸桿菌或沙門氏菌屬的菌株；芽孢桿菌科，如枯草芽孢桿菌；肺炎球菌；鏈球菌屬和流感嗜血桿菌。還應理解，當在細菌中表現時，多肽可以成為內含體的一部分。必須分離、純化多肽，然後將其組裝成功能分子。

【0255】除原核生物外，還可以使用真核微生物。釀酒酵母或普通麵包酵母是真核微生物中最常用的，儘管許多其他菌株是通常可獲得的。對於在酵母屬中的表現，通常使用例如質體YRp7 (Stinchcomb等人, *Nature*, 282:39 (1979)；Kingsman等人, *Gene*, 7:141 (1979)；Tschemper等人, *Gene*, 10:157 (1980))。該質體已經含有TRP1基因，該基因提供缺乏在色氨酸中生長的能力的酵母突變菌株的選擇標誌物，例如ATCC No. 44076或PEP4-1 (Jones, *Genetics*, 85:12 (1977))。然後，*trp1*損傷的存在作為酵母宿主細胞基因組特徵提供在沒有色氨酸的情況下藉

由生長檢測轉化的有效環境。

治療方法

【0256】 在一個態樣，本發明提供了治療或診斷有需要的患者的方法，其中包括投予有效量的本文揭示的結合多肽。在某些實施例中，本揭示文本提供了用於診斷和/或治療障礙(例如需要這種治療的哺乳動物受試者的腫瘤障礙)的套組和方法。在某些示例性實施例中，該受試者是人。

【0257】 本揭示文本的結合多肽可用於許多不同的應用。例如，在一個實施例中，主題結合多肽可用於減少或消除帶有被該結合多肽的結合結構域識別的抗原決定基的細胞。在另一個實施例中，主題結合多肽有效地降低循環中可溶性抗原的濃度或消除循環中的可溶性抗原。在另一個實施例中，主題結合多肽作為T細胞銜接物是有效的。在一個實施例中，結合多肽可以減小腫瘤大小、抑制腫瘤生長和/或延長荷瘤動物的存活時間。因此，本揭示文本還涉及藉由向這種人或動物投予有效無毒量的經修飾抗體來治療人或其他動物中的腫瘤的方法。

【0258】 在一個實施例中，主題結合多肽可用於治療疾病或障礙。例如，主題結合多肽可用於治療抗體相關障礙或抗體反應性障礙、病症或疾病。如本文所用，術語“抗體相關障礙”或“抗體反應性障礙”或“病症”或“疾病”是指或描述可藉由投予包含本揭示文本的抗體或結合多肽的醫藥組合物改善的疾病或障礙。

【0259】 在一個實施例中，主題結合多肽可用於治療癌症。如本文所用，術語“癌症”或“癌的”是指或描述通常以不受控制的細胞生長為特徵的生理狀況。癌症的例子包括但不限於癌、淋巴瘤、胚細胞瘤、肉瘤(包括脂肪肉瘤)、

神經內分泌腫瘤、間皮瘤、神經鞘瘤、腦膜瘤、腺癌、黑色素瘤和白血病或淋巴惡性腫瘤。此類癌症的更具體的例子包括鱗狀細胞癌(例如，上皮鱗狀細胞癌)、肺癌(包括小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌和肺鱗狀細胞癌)、腹膜癌、肝細胞癌、胃癌(gastric或stomach cancer)(包括胃腸癌)、胰腺癌、膠質母細胞瘤、宮頸癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝癌、乳腺癌、結腸癌、直腸癌、結直腸癌、子宮內膜或子宮癌、唾液腺癌、腎癌(kidney或renal cancer)、攝護腺癌、外陰癌、甲狀腺癌、肝癌、肛門癌、陰莖癌、睾丸癌、食管癌、膽道腫瘤以及頭頸癌。

【0260】在另一個實施例中，主題結合多肽可用於治療其他障礙，包括但不限於傳染病、自身免疫障礙、炎性障礙、肺病、神經元或神經變性疾病、肝病、脊柱疾病、子宮疾病、抑鬱症等。傳染病的非限制性例子包括由RNA病毒(例如，正黏病毒(例如，流感)、副黏病毒(例如，呼吸道合胞體病毒、副流感病毒、偏肺病毒)、彈狀病毒(例如，狂犬病病毒)、冠狀病毒、甲病毒(例如，基孔肯雅病毒)、慢病毒(例如，HIV)等)或DNA病毒引起的那些傳染病。傳染病的例子還包括但不限於由例如金黃色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、腸球菌屬、鏈球菌屬、大腸桿菌引起的細菌性傳染病和其他傳染病，包括例如由白色念珠菌引起的那些傳染病。其他傳染病包括但不限於瘧疾、SARS、黃熱病、萊姆病、利什曼病、炭疽和腦膜炎。示例性自身免疫障礙包括但不限於銀屑病、類風濕性關節炎、肖格倫症候群(Sjogren's Syndrome)、移植排斥、格雷夫斯病(Grave's disease)、重症肌無力和狼瘡(例如，系統性紅斑狼瘡)。因此，本揭示文本涉及治療各種病症的方法，所述病症將受益於使用具有例如增加的半衰期的主題結合多肽。

【0261】藉由常規實驗，熟習此項技術者將能夠確定有效無毒量的經修飾的結合多肽可用於治療惡性腫瘤的目的。例如，本揭示文本的治療活性量的結

合多肽可以根據因素諸如受試者的疾病階段(例如，階段I相對階段IV)、年齡、性別、醫療併發症(例如，免疫抑制的病症或疾病)和體重，以及經修飾的抗體在該受試者中引發所需反應的能力而變化。可以調整劑量方案以提供最佳治療反應。例如，可以每天投予幾個分開的劑量，或者可以如治療情況的緊急狀態所示按比例減少劑量。

【0262】一般而言，本揭示文本中提供的組合物可用於預防性或治療性地治療包含抗原標誌物的任何腫瘤，所述抗原標誌物允許藉由經修飾的抗體靶向癌細胞。

醫藥組合物及其投予

【0263】製備並向受試者投予本揭示文本的結合多肽的方法是熟習此項技術者公知的或容易確定的。本揭示文本的結合多肽的投予途徑可以是口服、腸胃外、吸入或局部。如本文所用的術語腸胃外包括靜脈內、動脈內、腹膜內、肌肉內、皮下、直腸或陰道投予。雖然所有這些形式的投予明顯被認為是在本揭示文本的範圍內，但投予的形式將是用於注射，具體地是用於靜脈內或動脈內注射或滴注的溶液。通常，用於注射的合適的醫藥組合物可以包含緩衝液(例如乙酸鹽、磷酸鹽或檸檬酸鹽緩衝液)、表面活性劑(例如聚山梨醇酯)、任選穩定劑(例如人白蛋白)等。在一些實施例中，結合多肽可以直接遞送至不良細胞群的部位，從而增強患病組織對治療劑的暴露。

【0264】用於腸胃外投予的製劑包括無菌的水性或非水性溶液、懸浮液和乳液。非水性溶劑的例子是丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄欖油、以及可注射的有機酯如油酸乙酯。水性載體包括水、醇性/水性溶液、乳液或懸浮液，包括鹽水和緩衝介質。在本揭示文本的組合物和方法中，醫藥上可接受的載劑包括

但不限於0.01-0.1 M，例如0.05 M磷酸鹽緩衝液或0.8%鹽水。其他常見的腸胃外媒劑包括磷酸鈉溶液、林格氏右旋糖、右旋糖和氯化鈉、乳酸林格氏液或固定油。靜脈內媒劑包括流體和營養補充劑、電解質補充劑(如基於林格氏右旋糖的那些)等。也可以存在防腐劑和其他添加劑，例如抗微生物劑、抗氧化劑、螯合劑和惰性氣體等。更具體地，適合於注射使用的醫藥組合物包括無菌水溶液(水溶性的)或分散液，以及用於臨時製備無菌可注射溶液或分散液的無菌粉末。在這種情況下，該組合物必須是無菌的並且應該是易於注射的程度的流體。它應該在製造和儲存條件下穩定，並且通常可以防止微生物如細菌和真菌的污染作用。載體可以是溶劑或分散介質，該溶劑或分散介質含有例如水、乙醇、多元醇(例如，甘油、丙二醇和液體聚乙二醇等)和其合適的混合物。例如，藉由使用包衣如卵磷脂，藉由在分散的情況下保持所需的粒度以及藉由使用表面活性劑，可以保持適當的流動性。

【0265】 防止微生物的作用可以藉由多種抗細菌和抗真菌劑(例如，對羥基苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、抗壞血酸、硫汞撒等)來實現。在許多情況下，在組合物中包含等滲劑，例如糖、多元醇(如甘露糖醇、山梨糖醇)或氯化鈉。藉由在該組合物中包含延遲吸收的藥劑例如單硬脂酸鋁和明膠，可以實現可注射組合物的延長吸收。

【0266】 在任何情況下，可以藉由將活性化合物(例如，經修飾的結合多肽自身或與其他活性劑組合)以所需的量摻入適當的溶劑中，接著過濾滅菌來製備無菌可注射溶液，所述溶劑根據需要具有本文列舉的一種成分或多種成分的組合。通常，藉由將該活性化合物摻入無菌媒劑中來製備分散液，所述無菌載體含有鹼性分散介質和來自以上列舉的那些的所需其他成分。在用於製備無菌可

注射溶液的無菌粉末的情況下，示例性製備方法包括真空乾燥和冷凍乾燥，所述真空乾燥和冷凍乾燥由先前無菌過濾的溶液產生活性成分和任何附加所需成分的粉末。將用於注射的製劑加工，填充至容器如安瓿、袋子、瓶子、注射器或小瓶中，並根據本領域已知的方法在無菌條件下密封。此外，製劑可以以套組的形式包裝和銷售。這種製品通常具有標簽或包裝說明書，其表明相關組合物可用於治療患有或易患自身免疫或腫瘤障礙的受試者。

【0267】用於治療上述病症的本揭示文本組合物的有效劑量根據許多不同因素而變化，所述因素包括投予方式、靶部位、患者的生理狀態、患者是人還是動物、投予的其他藥物以及治療是預防性的還是治療性的。通常，患者是人，但也可以治療包括轉基因哺乳動物在內的非人哺乳動物。可以使用熟習此項技術者已知的常規方法滴定治療劑量以優化安全性和功效。

【0268】可以多次投予本揭示文本的結合多肽。單劑量之間的間隔可以是每週、每月或每年。如藉由量測該患者中經修飾的結合多肽或抗原的血液水平所指示，間隔也可以是不規則的。在一些方法中，調節劑量以實現血漿經修飾的結合多肽濃度為約1-1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，並且在一些方法中該濃度為約25-300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。可替代地，結合多肽可以作為持續釋放製劑投予，在這種情況下需要較不頻繁的投予。對於抗體，劑量和頻率根據患者中抗體的半衰期而變化。通常，人源化抗體顯示出最長的半衰期，其次是嵌合抗體和非人抗體。

【0269】投予的劑量和頻率可以根據治療是預防性的還是治療性的而變化。在預防性應用中，將含有本發明抗體或其混合物的組合物投予至尚未處於疾病狀態的患者，以增強患者的抵抗力。這樣的量被定義為“預防有效劑量”。在該用途中，精確量還取決於患者的健康狀態和總體免疫性，但通常在每劑量約

0.1至約25 mg，尤其是每劑量約0.5至約2.5 mg的範圍內。以相對不頻繁的間隔長時間投予相對低的劑量。一些患者在餘生持續接受治療。在治療性應用中，有時需要以相對短的間隔投予相對高的劑量(例如，每劑量約1至400 mg/kg抗體，其中約5至25 mg的劑量更常用於放射免疫接合物，並且更高劑量用於經細胞毒素-藥物修飾的抗體)，直到疾病進展減少或終止，或直到患者顯示疾病症狀的部分或完全改善。此後，可以向患者投予預防性方案。

【0270】 本揭示文本的結合多肽可任選地與有效治療需要治療(例如，預防性或治療性)的障礙或病症的其他藥劑組合投予。本揭示文本的⁹⁰Y標記的經修飾抗體的有效單次治療劑量(即治療有效量)範圍在約5與約75 mCi之間，如在約10與約40 mCi之間。¹³¹I經修飾抗體的有效單次治療非骨髓消融劑量範圍在約5與約70 mCi之間或在約5與約40 mCi之間。¹³¹I標記的抗體的有效單次治療消融劑量(即，可能需要自體骨髓移植)的範圍在約30與約600 mCi之間，如在約50與小於約500 mCi之間。與嵌合抗體一起，由於關於鼠抗體的較長循環半衰期，碘-131標記的嵌合抗體的有效單次治療非骨髓消融劑量的範圍在約5與約40 mCi之間，如小於約30 mCi。例如，¹¹¹In標記的成像標準通常小於約5 mCi。

【0271】 儘管可以如上所述投予結合多肽，但必須強調的是，在其他實施例中，結合多肽可以作為一線療法投予至其他健康患者。在這樣的實施例中，可以將結合多肽投予至具有正常或平均紅骨髓儲備的患者和/或投予至尚未進行治療且未進行治療的患者。如本文所用，經修飾的抗體或免疫黏附素的投予與輔助療法一起或組合意指順序、同時、同延、並行、伴隨或同期投予或施加該療法和揭示的抗體。熟習此項技術者將理解，可以定時投予或施加組合的治療性方案的各種組分以增強治療的總體有效性。

【0272】如前所述，本揭示文本的結合多肽、免疫黏附素或其重組體可以以醫藥有效量投予，以用於哺乳動物障礙的體內治療。在這一態樣，應當理解，所揭示的結合多肽將被配製成促進投予且促進活性劑的穩定性。

【0273】根據本揭示文本的醫藥組合物可以包含醫藥上可接受的無毒無菌載體，如生理鹽水、無毒緩衝液、防腐劑等。為了本申請的目的，與治療劑接合或未接合的結合多肽、免疫黏附素或其重組體的醫藥有效量的應保持意指足以實現與抗原的有效結合且足以獲得益處(例如，足以改善疾病或障礙的症狀或檢測物質或細胞)的量。在腫瘤細胞的情況下，經修飾的結合多肽可以與腫瘤細胞或免疫反應細胞上選擇的免疫反應性抗原相互作用，並提供這些細胞死亡的增加。當然，本揭示文本的醫藥組合物可以以單劑量或多劑量投予，以提供醫藥有效量的經修飾的結合多肽。

【0274】為了與本揭示文本的範圍保持一致，本揭示文本的結合多肽可以按照上述治療方法以足以產生治療或預防效果的量投予至人或其他動物。本揭示文本的結合多肽可以藉由根據已知技術將本揭示文本的抗體與常規醫藥上可接受的載劑或稀釋劑組合製備的常規劑型投予至這種人或其他動物。熟習此項技術者將認識到，醫藥上可接受的載劑或稀釋劑的形式和特徵取決於與其組合的活性成分的量，投予的途徑和其他公知的變量。熟習此項技術者將進一步理解，包含本揭示文本所述的一種或多種結合多肽的混合物可以證明是特別有效的。

【0275】本文提及或引用的文章、專利和專利申請的內容以及所有其他文件和電子可用信息藉由引用以其全文併入於此，其程度如同每個單獨的出版物被具體且單獨地指出經由引用併入。申請人保有將來自任何此類文章、專利、

專利申請或其他物理和電子文件的任何和所有材料和信息實際納入本申請的權利。

【0276】 雖然已經參考本發明的具體實施例描述了本發明，但熟習此項技術者應理解，在不脫離本發明的真實精神和範圍的情況下，可以進行各種改變並且可以替換等同物。對於熟習此項技術者來說顯而易見的是，在不脫離本文揭示的實施例的範圍的情況下，可以使用合適的等同物進行本文所述方法的其他合適的修改和改編。此外，可以進行許多修改以採用特定情況、材料、物質組成、過程、過程步驟或步驟，以達到本發明的客觀精神和範圍。預期所有此類修改都在所附申請專利範圍的範疇內。現在已經詳細描述了某些實施例，藉由參考以下實例將更清楚地理解它們，所述實例僅用於說明的目的而並非限制性的。

實例

【0277】 藉由以下實例進一步闡明本發明，其不應解釋為進一步限制。

實例1：材料和方法

蛋白質試劑：

【0278】 表現並分離以下蛋白質：具有C-末端8x組氨酸標記的抗原；rFcRn(UniProt：P1359，p51亞基：殘基23-298；UniProt：P07151，β2-m：殘基21-119)；生物素化的食蟹猴FcRn (UniProt：Q8SPV9，p51亞基：殘基24-297，其具有C-末端Avi-標記；UniProt：Q8SPW0，β2-m：殘基21-119)；生物素化的hFcRn (UniProt：P55899，p51亞基：殘基24-297，其具有C-末端Avi-標記；UniProt：

P61769, β 2-m: 殘基21-119); 人CD16a (UniProt: P08637, Fc γ RIIIa: 殘基17-208, 其具有C-末端HPC4標記和在位置158處的缬氨酸(V158))。從HEK293條件培養基獲得H435A和H310A/H435Q重鏈變異體。藉由Evitria選殖mAb2變異體, 並使用mAbSelect SuRe親和柱(GE Healthcare)從懸浮液CHO K1條件培養基純化, 並將緩衝液更換為pH 7.4的磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)用於後續實驗。

飽和文庫構建:

【0279】 使用NcoI和HindIII限制酶位點將具有前導DNA序列的WT IgG1 mAb1抗體重鏈和輕鏈分別併入pBH6414和pBH6368哺乳動物表現質體中。使用閃電位點定向突變誘發套組(Lightning Site Directed Mutagenesis Kit)(Agilent)和NNK (N = A/C/G/T, K = G/T)和WWC (W = A/T)引子(IDT Technologies)創建飽和文庫, 以在以下位置處引入所有可能的胺基酸: M252、I253、S254、T256、K288、T307、K322、E380、L432、N434和Y436 (Eu編號)。藉由LakePharma將mAb1骨架中的三種對照變異體AAA (T307A/E380A/N434A)、LS (M428L/N434S)和YTE (M252Y/S254T/T256E)的重鏈DNA序列構建至pBH6414載體中。

【0280】 藉由採用Q5突變誘發套組(NEBiolabs)和T256D、T256E、T307Q、T307W、N434F和N434Y引子用WT和M252Y模板在PCR反應中對mAb1重鏈的位點定向突變誘發來獲得組合飽和文庫。使用具有M252Y、T256D、T307Q和T307W引子的Q5突變誘發套組(NEBiolabs)將突變摻入Ab3骨架中。藉由Sanger測序(Generewiz, Inc.)確認所有Fc變異體的產生。

重組抗體表現和純化:

【0281】對於條件培養基篩選，將含有mAb1的突變重鏈和野生型輕鏈的DNA轉染至1 mL的Expi293哺乳動物細胞(Invitrogen)中，用於根據製造商的說明書進行表現。將細胞在37°C、5%二氧化碳和80%濕度下在2 mL 96孔板(Greiner Bio-One)中以900轉/分鐘(RPM)搖動孵育，並用充氣膜密封。轉染後五天收集條件培養基並在-80°C下儲存直至使用。mAb1和Ab3骨架的先導變異體在具有0.2 μm透氣帽的125 mL燒瓶(Corning)中以30 mL規模表現。在整個表現持續時間內以125 RPM搖動125 mL培養瓶。轉染後五天收集條件培養基，並通過0.22 μm、50 mL錐形過濾器(Corning)過濾，並在4°C下儲存直至純化。

【0282】使用1 mL mAbSelect SuRe HiTrap柱(GE Healthcare)進行mAb1和Ab3的分離。在pH 7.4的PBS的十個柱體積的洗滌步驟後，用五個柱體積的pH 3.0的0.1 M 檸檬酸(Sigma)溶離抗體，並用0.5 mL的pH 9.0的1 M tris鹼(Sigma)中和。將溶離的抗體在pH 7.4的PBS中進行緩衝交換，並使用30 kDa MWCO Amicon濃縮器(Millipore)濃縮至 $> 1 \text{ mg mL}^{-1}$ 用於後續研究。純化的抗體的濃度由它們在280 nm處的UV吸光度(UV₂₈₀)和合適的消光係數來確定。

*Octet*條件培養基篩選和分析：

【0283】在具有Ni-NTA生物感測器的Octet QK 384 (PALL Life Sciences)上進行含有mAb1變異體的條件培養基的篩選。His標記的抗原在pH 7.4的PBS、0.1%牛血清白蛋白(BSA, Sigma)和0.01%吐溫-20(Sigma)(PBST-BSA 7.4)中以15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 捕獲300 sec，接著用pH 7.4的PBST-BSA洗滌20秒。在用pH 7.4的PBST-BSA以1:1稀釋的條件培養基中捕獲抗體200秒。在pH 6.0緩衝液中的緩衝液洗滌步驟後，使用200 nM rFcRn進行締合並且在pH 6.0下分別以150和200 sec

的解離時間獲得FcRn結合動力學。在Octet篩選期間的所有步驟中，溫度為30°C，搖動速度為1000 RPM。將rFcRn結合動力學曲線針對FcRn結合階段的開始進行校正，並使用Octet 7.1分析軟體建模為1:1結合模型。

FcRn結合動力學：

【0284】使用具有直接固定FcRn或生物素CAPture套組(GE Healthcare)的修改方案利用Biacore T200儀器(GE Healthcare)量測pH 6.0和pH 7.4下的FcRn結合動力學(參見例如Abdiche等人, *MAbs* (2015) 7:331-343；Karlsson等人, *Anal. Biochem.* (2016) 502:53-63)。對於直接固定，藉由胺偶聯化學(GE Healthcare)將生物素化的FcRn (濃度為 $20 \mu\text{g mL}^{-1}$)以 $10 \mu\text{L min}^{-1}$ 在pH 4.5的10 mM乙酸鈉(GE Healthcare)中固定180 s，在C1感測器晶片的表面上達到約20 RU。在生物素CAPture套組的情況下，將CAPture試劑捕獲在CAP晶片表面至表面密度 $> 2,000$ RU，接著 $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ FcRn以 $30 \mu\text{L min}^{-1}$ 在適當的通道中捕獲24 s，至最終表面密度為約2 RU。用於FcRn結合動力學實驗的運行緩衝液是pH 6.0或7.4下的具有0.05%表面活性劑P-20(PBS-P+, GE Healthcare)的PBS。對於每種變異體(包括0 nM對照)，一式四份地進行來自1000 nM抗體的4倍系列稀釋的濃度系列。在 $10 \mu\text{L min}^{-1}$ 的流速下分別獲得180和300 sec的結合和解離時間的動力學量測。將C1和CAP感測器晶片分別用10 mM四硼酸鈉、pH 8.5的1 M NaCl(GE Healthcare)以 $50 \mu\text{L min}^{-1}$ 再生30 sec，或用6 M鹽酸胍、250 mM氫氧化鈉(GE Healthcare)以 $50 \mu\text{L min}^{-1}$ 再生120 s，接著在pH 6.0的PBS-P+中進行另外的60-90 sec穩定步驟。使用如上所述的相同C1或CAP感測器晶片和動力學參數，一式三份地獲得在1000 nM下所有變異體在pH 7.4下的穩態RU量測，不同的是兩種方法的FcRn的捕獲水平

增加10至20倍。

【0285】由於親合力作用，使用Biacore T200評估軟體將pH 6.0下濃度系列的動力學參數擬合至二價模型。參見例如Suzuki等人, *J. Immunol.* (2010) 184: 1968-1976。將每個濃度系列獨立地擬合以獲得平均的締合和解離速率以及結合親和力。表觀結合親和力是根據二價模型的首次締合和解離速率計算的。同時使用1000 nM的每種抗體一式三份地量測pH 7.4下的殘基結合，以供反應比較。將每個重複實驗的穩態反應取平均以獲得平均值和標準差。

*FcRn*親和層析法：

【0286】在一個實驗中，FcRn親和柱從改編自Schlothauer等人 2013, *mAbs* 5: 576-586的方案中產生。將1 mL鏈黴親和素HP HiTrap柱(GE Healthcare)用五個柱體積的結合緩衝液(pH 7.4的20 mM磷酸鈉(Sigma)、150 mM氯化鈉(NaCl；Sigma))以 1 mL min^{-1} 平衡，接著注射4毫克生物素化的cynoFcRn。用結合緩衝液洗滌柱並在4°C下儲存直至使用。

【0287】將FcRn親和柱用五個柱體積的低pH緩衝液(pH 5.5的20 mM 2-(N-嗎啉代)乙磺酸(MES；Sigma)；150 mM NaCl)平衡，然後注射300 μg 的每種抗體。用低pH緩衝液將抗體溶液的pH調節至pH 5.5。在用低pH緩衝液進行十個柱體積洗滌後，用超過30個柱體積的高pH緩衝液(pH 9.5的20 mM 1,3-雙(三(羥甲基)甲基胺基)丙烷(雙三丙烷；Sigma)；150 mM NaCl)以 1 mL min^{-1} 在1 mL級分中通過線性pH梯度溶離抗體，並監測UV₂₈₀。用十個柱體積的低pH緩衝液重新平衡FcRn親和柱，以供後續運行或結合緩衝液以供儲存。所有變異體一式三份地進行。

【0288】在SigmaPlot 11(Systat Software, Inc.)中使用方程式1將對於每種抗

體的FcRn親和柱溶離曲線建模為單個高斯分佈，以確定UV₂₈₀最大值處的溶離體積。

$$UV_{280} = y_0 + a * \exp^{-\frac{(x-x_0)^2}{2b}} \quad (\text{方程式1})$$

【0289】其中x₀是UV₂₈₀最大值峰值處的溶離體積，y₀是基線UV₂₈₀吸光度，並且a和b與該分佈的一半最大值處的全寬有關。藉由Corning Pinnacle 540 pH計量測每個級分的pH，並使用線性回歸將其與溶離體積相關聯。

【0290】在另一個實驗中，FcRn親和柱改編自Schlothauer等人 2013, *mAbs* 5: 576-586，其中生物素化hFcRn在1 mL Streptavidin HP HiTrap柱(GE Healthcare)上。在AKTA Pure系統(AKTA)上，向柱中注射在低pH緩衝液(pH 5.5的20 mM 2-(N-嗎啉代)乙磺酸(MES；Sigma)；150 mM NaCl)中的300 µg每種抗體。藉由用超過30個柱體積的低和高pH緩衝液(pH 9.5的20 mM 1,3-雙(三(羥甲基)甲基胺基)丙烷(雙三丙烷；Sigma)；150 mM NaCl)產生的線性pH梯度以0.5 mL min⁻¹溶離抗體，並監測吸光度和pH。將柱用低pH緩衝液重新平衡以供後續運行。所有變異體一式三份地進行。在SigmaPlot 11(Systat Software, Inc.)中將FcRn親和柱溶離曲線擬合至單個高斯分佈，以確定UV₂₈₀最大值處的溶離體積和pH。

差示掃描螢光測定：

【0291】差示掃描螢光測定(DSF)實驗在BioRad CFX96實時系統熱循環儀(BioRad)上在20 µL反應中進行。將抗體樣品和Sypro橙染料的5000x原液(Invitrogen)在pH 7.4的PBS中分別稀釋至0.4 mg mL⁻¹和10x。將抗體和Sypro橙在96孔PCR板中以1:1的比例混合並用黏性微墊(microseal，BioRad)密封，達到每種抗體和5x Sypro橙染料的最終濃度為0.2 mg mL⁻¹。所有抗體變異體一式三份地

進行。熱循環儀程序由以下步驟組成：20°C下進行2分鐘的平衡步驟，接著以恒定升溫速率0.5°C/5 sec升至最終溫度為100°C。使用適合於Sypro橙色螢光的FAM激發波長(485 nm)和ROX發射(625 nm)檢測器獲得每個孔的螢光量測(參見例如Biggar等人 2012, *Biotechniques* 53: 231-238)。從BioRad CFX Manager輸出DSF螢光強度曲線和一階導數，並在SigmaPlot 11中分析。T_m定義為螢光強度曲線中第一次轉變的中點。

*FcγRIIIa*結合動力學：

【0292】使用Biacore T200儀器(GE Healthcare)量測結合動力學和親和力(Zhou等人 2008 *Biotechnol. Bioeng.* 99: 652-665)。採用胺化學將在pH 4.5的乙酸鹽中50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 下的抗HPC4抗體(Roche)以10 $\mu\text{l min}^{-1}$ 與CM5感測器晶片的表面偶聯600 sec，達到最終密度> 20,000 RU。用於FcγRIIIa結合動力學實驗的運行緩衝液是pH 7.4下的具有0.05%表面活性劑P-20(HBS-P+，GE Healthcare)和2 mM氯化鈣(CaCl₂，Fluka)的HEPES緩衝鹽水。藉由以5 $\mu\text{l min}^{-1}$ 捕獲1.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ HPC4標記的FcγRIIIa-V158持續30 sec初始化每個動力學跡線。量測每種變異體在300 nM下的結合和解離動力學，每種變異體的每個步驟都以5 $\mu\text{l min}^{-1}$ 量測120-180 sec。完成動力學量測後，將CM5晶片用補充有10 mM EDTA(Ambion)的HBS-P+緩衝液再生。在下一次動力學量測之前，將CM5晶片用HBS-P+與CaCl₂洗滌120 sec。

【0293】在一個實驗中，以與在pH 7.4下FcRn結合所述類似的方式分析FcγRIIIa動力學實驗。對於WT、基準、單一和組合變異體，獲得從1000 nM的一系列3倍連續稀釋的動力學以確定對於FcγRIIIa的結合親和力。確定每個濃度和重複的穩態RU，繪製為抗體濃度的函數並擬合至如方程式2中所示的穩態模型。

$$RU = \frac{(R_{max} - 偏移) * [抗體]}{[抗體] + K_{D,app}} \quad (\text{方程式2})$$

【0294】其中偏移是0 nM抗體的基線RU， R_{max} 是高抗體濃度下的穩定期RU，[抗體]是抗體的濃度，並且 $K_{D,app}$ 是變異體與Fc γ RIIIa之間相互作用的表觀結合親和力。

【0295】在另一個實驗中，使用平均穩態結合反應，以與對於pH 7.4下的FcRn結合所述類似的方式分析Fc γ RIIIa動力學實驗。對於所有變異體，一式三份地測定300 nM抗體的穩態RU並取平均值。確定相對於WT的反應變化的倍數變化(響應倍數變化)，以供每種骨架中的變異體之間的比較。

等電聚焦

【0296】在Maurice C(Protein Simple)上使用毛細管電泳測定先導變異體的等電點(pI)。每個200 μ L樣品都含有0.35%甲基纖維素(Protein Simple)、4%兩性載體3-10 (GE Healthcare)、10 mM精氨酸(Protein Simple)、0.2 mg mL⁻¹抗體以及4.05和9.99 pI標誌物(Protein Simple)。將樣品在1500 V下加載至毛細管中1分鐘，接著在3000 V下進行分離階段6分鐘並使用色氨酸螢光監測。使用Maurice C軟體確定每種變異體的pI，並將其定義為主要種類的螢光最大值處的pH。

同質橋接類風濕因子(RF)ELISA

【0297】根據製造商的說明，使用EZ-Link 硫代-NHS-LC-生物素和Mix-n-StainTM洋地黃毒昔抗體標記套組(Biotium)對抗體進行生物素化和洋地黃毒昔標記。對於每種抗體製備含有4 μ g mL⁻¹的生物素化和洋地黃毒昔標記的抗體的儲備溶液，並以1 : 1的比例與300 U/mL RF(Abcam)混合。在室溫下孵育20

小時後，將100 μL 的每種抗體-RF混合物添加至Streptawell板(Sigma-Aldrich)中並在室溫下孵育2小時。將板用具有0.05%吐溫-20的pH 7.4的PBS洗滌三次，並向每個孔中添加100 μL 的1 : 2000稀釋的HRP接合的抗洋地黃毒昔二級抗體(Abcam)。在室溫下孵育2小時後，洗滌孔並在室溫下用100 μL 的TMB底物(Abcam)處理15分鐘。用100 μL 的終止溶液(Abcam)終止反應，並在SpectraMax讀板器上量測450 nm處的吸光度。不含抗體-RF混合物的孔提供空白扣除，並將實驗重複三次。使用學生t檢驗確定P值。

體內藥代動力學

【0298】 在食蟹猴和hFcRn轉基因小鼠(Tg32品系，Jackson Laboratory，Bar Harbor，ME)中進行藥代動力學研究。在食蟹猴研究中，將mAb2骨架中的WT、LS、DQ、DW和YD變異體以2.5 mg/kg的單次靜脈內劑量投予至三隻未經治療的雄性食蟹猴的頭臂靜脈中，其中劑量體積為1.5 mL/kg。在投予後0.0035、0.17、1、3、7、14、21和28天的8個取樣時間藉由靜脈穿刺隱靜脈收集血液樣品(0.5 mL)。收集後，將血液樣品在4°C下以1500 g離心10分鐘並在-80°C下儲存。

【0299】 在hFcRn小鼠中，將抗體變異體以2.5 mg/kg的單次靜脈內劑量投予至尾靜脈中，其中劑量體積為5 mL/kg。在每個時間點，使用預填充的肝素毛細管從隱靜脈收集20 μl 血液。將收集的血液樣品轉移至微管中，並在4°C下以1500 g離心10分鐘。收集血漿樣品，將其針對每個時間點進行合併(6只小鼠/樣品)，並在分析前在-80°C下儲存。

【0300】 所有體內研究均遵循賽諾菲機構動物護理政策(Sanofi institutional animal care policy)進行。食蟹猴和小鼠研究藉由了法國

“ Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche ” 和德國
“Regierungspraesidium Darmstadt” 的核准。

【0301】藉由自下而上的LC-MS/MS測定確定了每個時間點的每種mAb2變異體的濃度。在血漿等分試樣沉澱後，使血漿沉澱物進行蛋白質變性、還原、烷基化、胰蛋白酶消化和固相提取，然後分析替代肽。藉由將mAb2變異體以1.00、2.00、5.00、10.0、20.0、50.0、100、200和400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 摻入血漿中來製備校準標準物。在Waters Acquity UPLC系統上採用反相XBridge BEH C18柱(2.1 x 150 mm, 3.5 μM , 300Å, Waters)以300 $\mu\text{L min}^{-1}$ 的流速以在水中的0.1%甲酸和在乙腈中的0.1%甲酸的階梯式梯度進行肽分離。對於檢測，以陽離子模式使用Sciex API5500質譜儀，其中源溫度為700°C，離子噴霧電壓為5500 V，簾幕和霧化氣體為40並且碰撞氣體在中間。停留時間為20 ms，並且每次轉化的入口電位為10 V。將mAb2骨架的兩個獨特替代肽的多反應監測轉變用於使用來自Analyst軟體的MQIII積分算法的峰面積測定相對於標準物和對照的濃度。使用Phoenix軟體(Certara)從作為時間函數的抗體濃度的非隔室模型獲得清除率和血清半衰期。顯示出濃度急劇下降的所有時間點被排除在平均血漿濃度之外，這是因為(不受任何理論的約束)假定的靶介導的藥物處置(TMDD)和/或抗藥物抗體(ADA)干擾。

實例2：條件培養基中飽和點突變的Octet篩選

【0302】FcRn是MHC類-I樣 α -結構域和 $\beta 2$ -巨球蛋白($\beta 2\text{-m}$)亞基(對於大多數Fc受體是共同的)的異二聚體(圖1A)，並且識別抗體Fc重鏈上不同於其他Fc γ R的區域(參見例如，Oganesyan等人 2014 *J. Biol. Chem.* 289: 7812-7824；和Shields等人 2001 同上)。

【0303】為了鑑定具有比WT抗體更慢的FcRn解離速率的變異體，設計了基於生物層干涉法(BLI)的測定以高通量方式篩選條件培養基中的抗體變異體(圖2A)。使用幾種基準變異體開發了該測定，所述基準變異體與WT抗體相比在pH 6.0下增強(AAA、LS和YTE)或降低(H435A、H310A/H435Q)對於FcRn的親和力。NiNTA生物感測器捕獲his標記的抗原，並且隨後在pH 7.4下捕獲每種抗體變異體以模擬條件培養基(圖2A)。對於六種變異體中的每一種，量測pH 6.0下對於大鼠FcRn (rFcRn)的結合動力學(圖2B)，所述大鼠FcRn與人FcRn (hFcRn)相比具有從人IgG1的慢約25倍的解離速率，並且更適合Octet研究。H435A(圖2B，夾雜單點的長劃線)和H310A/H435Q(圖2B，夾雜兩點的長劃線)變異體顯示出很少甚至沒有FcRn結合動力學(還參見例如Shields等人 2001 同上；Medesan等人 1997 同上；以及Raghavan等人 1995 同上)。與WT (圖2B，實線)相比，AAA (圖2B，短劃線)、LS (圖2B，夾雜單點的短劃線)和YTE (圖2B，長劃線)變異體均展示出更慢的解離動力學，其中FcRn解離速率降低2-7.3倍。這表明Octet篩選適合於區分具有擾亂的rFcRn解離動力學的變異體。

【0304】IgG1抗體mAb1用作模型系統以產生飽和突變誘發文庫，以篩選具有降低的FcRn解離速率的突變體。mAb1的Fc區中的十一個位置基於它們與FcRn界面接近或直接貢獻FcRn界面而被選擇(圖1A和圖1B)(參見例如Oganesyan等人 2014 同上；和Shields等人 2001 同上)。使用定點突變誘發構建這些位置處的所有點突變，並在Expi293細胞中轉染以供表現。如上所述對飽和文庫突變體進行條件培養基篩選。採用野生型(圖2C，粗長劃線)和模擬陰性對照(圖2C，點劃線)針對變異體子集的歸一化FcRn結合Octet傳感圖示於圖2C(長劃線)中。模擬物顯示出缺乏可觀察到的FcRn結合。若干種突變體明顯地破壞了rFcRn的結合，

因為在動力學曲線中幾乎觀察不到信號變化(圖2C，長劃線，位於點劃線(模擬物)下方)。將具有改善的FcRn解離速率的變異體的截止值定義為低於WT抗體平均值的三個標準差。在圖2C中顯示的突變子集中，兩個(圖2C，實線)與野生型抗體相比具有顯著降低的解離速率(圖2C，粗長劃線)，而其餘變異體具有類似(圖2C，夾雜單點的短劃線)或更快(圖2C，點劃線(模擬物)上方的長劃線)的rFcRn解離速率。

【0305】所有單點突變的rFcRn解離速率在圖2D和圖14中藉由位置和突變示出。在圖14中，根據與野生型相比rFcRn解離率的倍數變化將資料分類為四類中的一種，並且野生型種類用黑色方塊表示。

【0306】在圖14中，將飽和文庫的十一個位置處的所有可能取代的rFcRn解離速率的倍數變化歸一化為WT抗體的平均值並且顏色編碼。所有突變體分為四類：很少甚至沒有結合(深灰色)、較快的rFcRn解離速率(灰色)、類似WT的rFcRn解離速率(水平線)和較慢的rFcRn解離速率(網格)。多種變異體具有比WT抗體更慢的rFcRn解離速率(網格)。

【0307】圖14中以深灰色著色的突變體以與模擬物(圖2C，點劃線)類似的方式顯示出與rFcRn很少甚至沒有結合，並且定位於M252、I253和S254環。I253處的唯一突變是甲硫胺酸和擗胺酸，並且二者均顯著增加rFcRn解離速率，這進一步支持I253對FcRn相互作用的重要性。另外120種變異體(圖2D和圖14，淺灰色矩形)使與rFcRn的相互作用不穩定，其中約50%位於每個C_H2和C_H3結構域中。二十五個突變體具有類似WT的解離速率(圖2D和圖14，白色矩形)，其中11個位置中的八個位置具有至少一個類似WT的突變(圖14，白色矩形)。與野生型相比，以下突變具有顯著降低的rFcRn解離速率(圖2D和圖14，黑色矩形)：

M252Y、T256D/E、K288D/N、T307A/E/F/M/Q/W、E380C、N434F/P/Y和Y436H/N/W。M252Y、N434F和N434Y突變具有比WT抗體(圖2D)慢兩倍以上的解離速率。這些突變進行表現並用蛋白A層析法純化，用於進一步的體外FcRn動力學表徵。

實例3：在pH 6.0下的Biacore FcRn結合動力學

【0308】在使用Biacore的FcRn結合動力學量測中AAA、LS和YTE變異體用作pH 6.0下人和大鼠FcRn二者的陽性對照。觀察所有變異體與FcRn的濃度依賴性結合，所述變異體包括野生型、基準(圖3)和先導(圖4A和圖4B)，並且人和大鼠FcRn的單次注射的結合曲線分別示於圖5A和圖5B中。野生型抗體對於人和大鼠FcRn的結合親和力分別為 2380 ± 470 nM和 207 ± 43 nM親和力(表1)。

【0309】表1：對於mAb1的純化先導抗體的體外表徵參數。

突變體	Octet pH 6.0	FcRn 親和柱	DSF	Biacore pH 6.0						Biacore pH 7.4	
				hFcRn			rFcRn			hFcRn	rFcRn
				解離速率	pH	T _m (°C)	解離速率	解離速率	K _{D,app}		
E380C	2.08 ± 0.18	7.18 ± 0.11	64.7 ± 0.5	1.73 ± 0.39	4.57 ± 1.50	> 10,000	1.71 ± 0.25	106 ± 1	6310 ± 880	5.7 ± 0.1	27.7 ± 4.0
K288D	3.79 ± 0.06	7.33 ± 0.10	65.8 ± 0.1	3.31 ± 1.10	5.13 ± 0.75	> 10,000	6.61 ± 3.01	8.43 ± 0.60	149 ± 63	3.8 ± 0.2	21.9 ± 3.1
K288N	4.11 ± 4.12	7.39 ± 4.12	66.7 ± 4.54	>	6.42 ± 10.7	190 ± 190	3.9 ± 3.9	20.4 ± 20.4	± 20.4	± 20.4	± 20.4

	Octet pH 6.0	FcRn 親和 柱	DSF	Biacore pH 6.0						Biacore pH 7.4		
				hFcRn			rFcRn			hFcRn		
				rFcRn 解離 速率	溶離 pH	T _m (°C)	締合 速率	解離 速率	K _{D,app}	締合 速率	解離 速率	
突變體												
M252Y	0.08	0.02	± 0.3	±	±	1.42	0.34	10,000	± 0.9	73	0.2	2.7
	0.95	7.88	± 64.4	±	±	5.50	1.43	3100	± 10.6	2.64	8.6	± 57.7
N434F	0.03	0.03	± 0.2	±	±	1.83	0.23	1500	± 3.1	25 ± 3	0.9	10.7
	1.18	8.30	± 67.8	±	±	35.4	0.50	165	± 12.6	3.36	26	± 20.1
N434P	0.05	0.05	± 0.2	±	±	15.3	0.08	73	± 1.4	1.79	13	± 54.9
	3.80	7.56	± 63.6	±	±	2.42	3.35	>	±	194 ± 3.5	± 4.3	±
N434Y	0.08	0.02	± 0.5	±	±	0.54	1.10	10,000	± 0.07	9	0.4	0.6
	1.33	8.46	± 67.3	±	±	35.9	0.52	137	±	23	± 22.6	± 47.0
T256D	0.04	0.02	± 0.5	±	±	9.6	0.10	33	±	12	4.2	6.3
	2.24	7.82	± 64.7	±	±	4.41	2.51	6700	±	86	± 5.8	± 30.4
T256E	0.03	0.07	± 0.2	±	±	1.72	0.65	3540	±	27	0.6	3.4
	3.26	7.63	± 66.3	±	±	3.90	3.38	>	±	113 ± 4.8	± 23.0	±
T307A	0.04	0.06	± 0.6	±	±	2.37	0.28	10,000	± 1.59	15	0.5	2.7
	2.98	7.61	± 68.0	±	±	2.85	2.91	>	±	132 ± 5.2	± 23.1	±
T307E	0.06	0.03	± 0.4	±	±	0.72	0.46	10,000	± 2.72	48	0.6	2.8
T307E	3.29	7.58	± 70.2	±	±	4.37	2.98	8130	± 5.55	6.03	141 ± 5.7	± 21.5

	Octet pH 6.0	FeRn 親和 柱	DSF	Biacore pH 6.0								Biacore pH 7.4	
				hFcRn				rFcRn				hFcRn	rFcRn
突變體	rFcRn 解離 速率	溶離 pH	T _m (°C)	締合 速率	解離 速率	K _{D,app}	締合 速率	解離 速率	K _{D,app}	穩態 RU	穩態 RU		
	0.08	0.03	± 0.5	±	±	5070	±	±	65	0.7	2.6		
T307F	2.80 ± 7.61 ± 70.2			2.70	2.92	>	5.69	6.15	131 ± 4.9 ± 21.9 ±				
	0.07	0.03	± 0.3	±	±	10,000	±	±	63	0.7	2.7		
	0.83	0.13	0.13	0.83	0.13	2.83	0.14						
T307M	3.47 ± 7.40 ± 70.0			4.08	3.87	>	6.81	17.1	279 ± 4.4 ± 15.3 ±				
	0.13	0.08	± 0.4	±	±	10,000	±	±	140	0.7	1.9		
	0.83	0.83	0.28	0.83	0.28	2.34	± 4.0						
T307Q	1.84 ± 7.86 ± 70.3			3.96	2.15	5720 ±	7.35	4.04	58 ± 6.4 ± 24.3 ±				
	0.05	0.06	± 0.6	±	±	1530	±	±	16	0.8	3.0		
	1.10	1.10	0.22	1.10	0.22	2.15	0.28						
T307W	2.42 ± 7.75 ± 63.0			3.33	2.77	8740 ±	7.11	7.37	111 ± 5.8 ± 19.2 ±				
	0.08	0.07	± 0.5	±	±	2440	±	±	32	0.7	3.3		
	0.83	0.83	0.29	0.83	0.29	2.29	0.41						
Y436H	3.22 ± 7.33 ± 68.7			2.59	6.06	>	5.06	7.30	131 ± 3.6 ± 16.3 ±				
	0.08	0.05	± 0.3	±	±	10,000	±	±	9	0.5	1.8		
	0.78	0.78	1.00	0.78	1.00	0.13	0.88						
Y436N	5.25 ± 7.22 ± 65.8			4.60	7.37	>	10.1	20.3	233 ± 3.6 ± 17.4 ±				
	0.22	0.05	± 0.5	±	±	10,000	± 4.9	± 3.1	86	0.4	2.0		
	2.36	2.36	3.34	2.36	3.34								
Y436W	5.18 ± 7.39 ± 68.6			2.84	4.62	>	3.44	23.7	1140	3.7 ± 10.3 ±			
	0.18	0.03	± 0.7	±	±	10,000	± 7.7	± 9.50	0.4	0.4	1.2		
	1.90	1.90	0.92	1.90	0.92	2.18							
WT	5.01 ± 7.37 ± 69.0			16.2	3.86	2380 ±	7.26	15.2	207 ± 4.3 ± 12.2 ±				

突變體	Octet pH 6.0	FcRn 親和柱	DSF	Biacore pH 6.0								Biacore pH 7.4	
				hFcRn				rFcRn				hFcRn	
				解離速率	溶離 pH	T _m (°C)	締合速率	解離速率	K _{D,app}	解離速率	解離速率	K _{D,app}	穩態 RU
	0.45	0.05	± 0.2	± 2.9	±		470	±	±	43	1.0	0.5	
AAA	3.77	± 7.94	± 61.3	8.37	1.44		1780	± 15.7	11.7	77	± 13.9	± 23.6	±
	1.03	0.06	± 0.6	±	1.82	0.04	380	± 3.3	± 1.1	18	3.1	4.9	
LS	3.38	± 8.29	± 68.5	19.3	0.52		272	±	9.08	6.58	18.3	± 24.8	±
	0.23	0.03	± 0.3	± 3.5	±	0.03	40	1.58	0.39	74	± 9	4.6	4.8
YTE	0.66	± 8.14	± 61.2	14.3	0.45		342	±	6.52	1.21	13.2	± 53.9	±
	0.17	0.03	± 0.3	± 4.4	±	0.07	117	0.46	0.21	18	± 2	3.5	1.2

【0310】使用每列頂部所示的實驗技術獲得表1中所示的所有資料。

【0311】作為與從條件培養基中篩選獲得的動力學常數的比較，量測使用純化蛋白質藉由Octet得到的rFcRn解離速率。藉由FcRn親和層析法一式三份地測定溶離pH (n = 3)，並且DSF一式三份地探測熱穩定性(n = 3)。採用一系列抗體濃度一式兩份地從Biacore獲得對人和大鼠FcRn的FcRn結合動力學(n = 2)，並獨立地擬合。使用Biacore，用1000 nM抗體一式三份地量測每種變異體與人和大鼠FcRn在pH 7.4下的穩態結合反應(RU)(n = 3)。每次量測的單位如下：Octet pH 6.0 rFcRn解離速率($\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$)；溶離pH (無單位)；DSF T_m (°C)；Biacore pH 6.0 hFcRn 締合速率($\times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)、解離速率($\times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$)和K_{D,app} ($\times 10^9 \text{ M}$)；Biacore pH 6.0 rFcRn

締合速率($\times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)、解離速率($\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$)和 $K_{D,\text{app}}$ ($\times 10^9 \text{ M}$)；和Biacore pH 7.4穩態結合反應(RU)。

【0312】在圖5B中，AAA(點劃線)、LS(夾雜兩點的劃線)和YTE(夾雜單點的劃線)變異體具有與WT相比1.6與10.4倍之間的增強的結合親和力。具有最緊密的FcRn親和力的基準變異體的特性是物種特異性的，因為LS對hFcRn具有最緊密的親和力，而rFcRn對YTE具有更緊密的親和力(表2A)。

【0313】表2A：對於mAb1的純化雙組合抗體的體外表徵參數。

變異體	FcRn親和 柱	DSF	Biacore pH 6.0						Biacore pH 7.4		
			hFcRn			rFcRn			hFcRn	rFcRn	
			締合速率	解離速率	$K_{D,\text{app}}$	締合速率	解離速率	$K_{D,\text{app}}$			
變異體	溶離pH	T_m (°C)							穩態RU	穩態RU	
<u>MDQN</u>	7.92 ± 0.06		67.9 0.4	± 3.76 0.38	± 8.72 0.10	232 24	± 1.33 0.22	± 1.27 0.07	9.54 1.66	± 10.7 1.0	$\pm 39.1 \pm 4.5$
<u>MDTF</u>	8.41 ± 0.07		62.3 0.2	± 9.68 0.64	± 2.90 0.04	29.9 2.0	± 2.18 0.20	± 0.39 0.01	1.78 0.17	± 29.2 4.0	$\pm 63.0 \pm 6.0$
<u>MDTY</u>	8.45 ± 0.04		61.5 0.2	± 18.3 0.6	± 2.85 0.01	15.6 0.5	± 4.13 0.15	± 0.25 0.35	0.60 0.85	± 37.1 5.0	$\pm 71.6 \pm 6.6$
<u>MDWN</u>	7.92 ± 0.04		57.8 0.4	± 5.29 0.14	± 8.92 0.32	169 ± 8 0.12	1.57 0.01	± 1.29 0.85	8.24 1.3	± 12.2 1.3	$\pm 42.1 \pm 4.7$
<u>MEQN</u>	7.84 ± 0.06		68.0 0.5	± 2.87 0.01	± 14.3 0.2	499 ± 6 0.25	1.46 0.94	± 1.56 6.7	10.7 6.7	$\pm 5.8 \pm 0.6$ 23.4 ± 3.1	
<u>METF</u>	8.23 ± 0.03		64.1 0.7	± 5.36 1.41	± 4.19 0.03	78.2 20.5	± 1.08 0.11	± 0.81 0.07	7.53 1.03	± 23.3 3.2	$\pm 59.0 \pm 5.6$
<u>METY</u>	8.38 ± 0.04		63.5 0.6	± 6.28 1.62	± 3.93 0.02	62.6 16.2	± 1.27 0.11	± 0.98 0.07	7.71 0.84	± 26.8 3.7	$\pm 62.2 \pm 6.3$
<u>MEWN</u>	7.78 ± 0.04		58.2 0.4	± 4.32 0.36	± 14.0 0.1	323 27	± 1.81 0.01	± 1.92 0.05	10.6 0.26	$\pm 7.7 \pm 0.9$ 33.0 ± 4.2	

	FcRn親和 柱	DSF	Biacore pH 6.0							Biacore pH 7.4	
			hFcRn			rFcRn			hFcRn	rFcRn	
			結合率	速率	解離速率	結合率	速率	解離速率			
變異體	溶離pH	T _m (°C)	K _{D,app}			K _{D,app}			穩態RU	穩態RU	
MT <u>QF</u>	8.56 ± 0.14	69.3 0.2	±5.74 1.05	±2.46 0.05	±42.9 7.9	±1.04 0.07	±0.40 0.01	±3.89 0.26	±34.2 4.6	±62.5 ± 7.6	
MT <u>QY</u>	8.68 ± 0.15	69.2 0.2	±6.22 1.38	±2.02 0.06	±32.4 7.3	±1.16 0.06	±0.48 0.01	±4.11 0.23	±38.4 5.2	±63.0 ± 7.7	
MT <u>WF</u>	8.61 ± 0.06	60.9 0.2	±7.87 0.31	±3.01 0.08	±38.2 1.8	±2.11 0.06	±0.57 0.01	±2.70 0.08	±30.5 4.2	±65.1 ± 6.4	
MT <u>WY</u>	8.62 ± 0.14	62.1 0.5	±14.8 0.8	±3.17 0.03	±21.5 1.2	±4.80 0.07	±0.30 0.04	±0.62 0.08	±37.2 4.9	±69.6 ± 7.0	
YDTN	8.29 ± 0.06	59.6 0.9	±6.33 1.23	±5.93 0.20	±93.6 18.4	±2.85 0.11	±1.67 0.16	±5.86 0.61	±9.7 ± 1.8	56.0 ± 5.6	
YETN	7.83 ± 0.06	60.7 0.7	±5.92 0.05	±7.57 0.30	±128 ± 5 0.07	3.24 0.02	±2.73 0.20	±8.43 0.25	±9.8 ± 1.2	55.1 ± 6.1	
YTQN	7.87 ± 0.06	63.1 0.1	±3.45 0.29	±9.60 0.01	±278 23	±2.55 0.24	±1.05 0.63	±4.11 2.51	±10.6 1.2	±49.2 ± 5.6	
YTTF	8.56 ± 0.09	62.2 0.1	±12.7 0.7	±2.30 0.01	±18.0 1.0	±4.03 0.06	±0.12 0.02	±0.29 0.04	±43.8 5.8	±79.3 ± 9.9	
YTTY	8.95 ± 0.02	62.0 0.1	±20.6 0.6	±1.71 0.02	±8.32 0.2	±5.40 0.07	±0.14 0.04	±0.26 0.08	±54.1 7.1	±67.9 ± 7.9	
YTWN	8.14 ± 0.02	59.3 0.2	±4.83 0.20	±5.70 0.03	±118 ± 5 0.07	2.08 0.07	±1.09 0.03	±5.21 0.22	±15.9 1.7	±66.1 ± 7.1	

【0314】人和大鼠FcRn的絕大多數先導變異體(圖5A和5B，各種色調的實線)具有比WT或基準變異體顯著更慢(> 2倍)的結合速率(表1)。N434F和N434Y突變是唯一展示出對於兩種FcRn的增加的結合速率的變異體。不受任何理論約束，由於與hFcRn的較慢結合動力學，先導變異體的表觀結合親和力通常弱於

WT，這與rFcRn(圖5C和圖5D，表1)不同。對於rFcRn的親和力弱於YTE(圖5D，面向左下角的對角線，表2A)。不受任何理論約束，這些結果表明單個突變不足以使親和力增強超過LS和YTE變異體。將FcRn解離速率進行排序(由於變異體與hFcRn的弱結合親和力)揭示了對人和大鼠FcRn的降低的解離速率的子集：M252Y、N434F/P/Y、T256D/E和T307A/E/F/Q/W(表2A)。進一步關注這些變異體的組合，以進一步改善Fc區的FcRn結合能力以超過基準變異體。

【0315】表2B中示出了先導變異體的體外表徵參數。

【0316】表2B：先導變異體的體外表徵參數。

mAb1	FcRn 親和柱	DSF	Biacore	Biacore pH 6.0				Biacore pH 7.4	
			FcγRIIIa V158	hFcRn	rFcRn	hFcRn	rFcRn		
變異體	pH	T _m (°C)	親和力倍數變化	結合速率	解離速率	K _{D,app}	K _{D,app}	穩態RU	穩態RU
WT	7.37	69.0 ± 0.2	1.00	16.2 ± 2.9	3.9 ± 0.4	2380 ± 470	207 ± 43	4.2 ± 0.9	13.0 ± 3.2
LS	8.29	68.5 ± 0.3	1.04 ± 0.04	1.9 ± 0.4	5.0 ± 0.1	272 ± 40	74 ± 9	18.3 ± 4.6	24.8 ± 4.8
YTE	8.14	61.2 ± 0.3	0.52 ± 0.03	1.4 ± 0.4	4.7 ± 0.1	342 ± 117	18 ± 2	13.2 ± 3.5	53.9 ± 1.2
M252Y	7.88	64.4 ± 0.2	0.46 ± 0.03	5.5 ± 1.8	1.4 ± 0.2	>3000	25 ± 3	8.6 ± 1.0	50.5 ± 5.6
N434F	8.30	67.8 ± 0.2	1.16 ± 0.08	35 ± 15	0.5 ± 0.1	165 ± 73	26 ± 13	22.2 ± 2.6	61.5 ± 6.5
N434Y	8.46	67.3 ± 0.5	1.41 ± 0.06	36 ± 10	0.5 ± 0.1	137 ± 33	23 ± 12	25.5 ± 2.9	66.0 ± 7.1
T256D	7.82	64.7 ± 0.2	0.92 ± 0.04	4.4 ± 1.7	2.5 ± 0.7	>3000	86 ± 27	5.8 ± 0.5	23.2 ± 2.8
T256E	7.63	66.3 ± 0.6	0.89 ± 0.09	3.9 ± 2.4	3.4 ± 0.2	>3000	113 ± 15	4.5 ± 0.4	17.0 ± 2.1

mAb1	FcRn 親和柱	DSF	Biacore	Biacore pH 6.0				Biacore pH 7.4	
			FcγRIIIa V158	hFcRn			rFcRn	hFcRn	rFcRn
變異體	pH	T _m (°C)	親和力倍數變化	結合速率	解離速率	K _{D,app}	K _{D,app}	穩態RU	穩態RU
			0.04						
T307Q	7.86	70.3 ± 0.6	1.00 ± 0.04	4.0 ± 1.1	2.2 ± 0.2	>3000	58 ± 16	6.6 ± 0.7	31.3 ± 3.7
T307W	7.75	63.0 ± 0.5	0.97 ± 0.04	3.3 ± 0.8	2.8 ± 0.3	>3000	111 ± 32	5.6 ± 0.7	21.9 ± 2.8
DQ	7.92	67.9 ± 0.4	0.73 ± 0.03	3.8 ± 0.4	8.7 ± 0.1	232 ± 24	9.5 ± 1.7	10.7 ± 1.0	39.1 ± 4.5
DW	7.92	57.8 ± 0.4	0.89 ± 0.04	5.3 ± 0.1	8.9 ± 0.3	169 ± 8	8.2 ± 0.9	12.2 ± 1.3	42.1 ± 4.7
YD	8.29	59.6 ± 0.9	0.48 ± 0.02	6.3 ± 1.2	5.9 ± 0.20	94 ± 18	5.9 ± 0.6	9.7 ± 1.8	56.0 ± 5.6

【0317】在表2B中，使用每列頂部的實驗技術獲得所有資料。FcRn親和層析法、DSF和FcγRIIIa結合一式三份地進行($n = 3$)。一式四份地獲得與人和大鼠FcRn的FcRn結合動力學並獨立地擬合。單位：DSF T_m(°C)；FcγRIIIa結合(相對於WT的倍數變化)，Biacore pH 6.0 hFcRn結合速率($\times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)，解離速率($\times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$)和K_{D,app}($\times 10^9 \text{ M}$)；Biacore pH 6.0 rFcRn K_{D,app}($\times 10^9 \text{ M}$)；Biacore pH 7.4 hFcRn和rFcRn穩態RU(RU)。

實例4：組合變異體進一步降低FcRn結合解離速率

【0318】多個先導突變位於單個位置(圖14，黑色矩形)，如T307和N434，其中分別鑑定出六個和三個突變，所述突變顯示較慢的FcRn解離動力學。只有

在這些位置處具有最慢的與hFcRn的FcRn解離速率的突變被用於產生組合變異體。在這種情況下，使用混合引子PCR和位點定向突變誘發將T307Q、T307W、N434F和N434Y與M252Y、T256D和T256E混合以獲得雙重、三重和四重變異體。組合文庫總計由54種變異體組成，包括七種先導單一、18種雙重、20種三重、8種四重變異體和WT抗體。這些變異體的命名如下：野生型背景含有M252、T256、T307和N434，並且重新標記為MTTN。因此，三重變異體YTQY含有M252Y、T307Q和N434Y突變，同時將WT蘇氨酸維持在位置256。

【0319】與單一突變一樣，使用Biacore在pH 6.0下的FcRn結合動力學用於確定哪種組合變異體具有改善的親和力。圖6A和圖6B中顯示了單一(夾雜兩點的長劃線)、雙重(夾雜單點的長劃線)、三重(長劃線)和四重(短劃線)中每一種的代表性FcRn結合動力學跡線，這是與WT(點劃線)和對於它們各自物種FcRn具有最緊密親和力的基準變異體(hFcRn：LS(夾雜兩點的長劃線)；rFcRn：YTE(實線))的比較。hFcRn締合和解離速率(圖6C)揭示兩種單一、15種雙重、18種三重和八種四重變異體具有比LS變異體增強的結合親和力(圖6C，虛線)。類似地，除了一種三重變異體之外的所有組合具有比YTE更緊密的對rFcRn的親和力(圖6D，面向左下方的對角線)。在hFcRn的情況下，附加的增強FcRn的突變進一步增加了結合親和力(圖6C)。對hFcRn具有最緊密親和力的五種組合都是四重變異體(圖6C，方格)，其結合親和力比野生型高約500倍。rFcRn沒有發生類似的現象(圖6D)，因為具有最高親和力的變異體是雙重變異體(圖6D，水平線)。三重(圖6D，垂直線)和四重(圖6D，方格)變異體通常僅顯示解離速率的略微降低(小於2倍)，但也展示出降低的締合速率(圖6D)。不受任何理論的約束，這些結果表明關於用rFcRn已經達到的FcRn表觀結合親和力可能存在下限(約0.5 nM)，而hFcRn不存在

(圖6B)。總計超過40種組合變異體具有比基準變異體更緊密的親和力，並且需要進一步表徵以選擇對於體內研究具有有利特性的組合。

實例5：在生理pH下組合變異體保持顯著的結合

【0320】由於在pH 6.0下顯著改善的FcRn親和力，使用FcRn親和層析法和在pH 7.4下Biacore穩態量測研究了對pH依賴性的影響。FcRn親和層析法使用線性pH梯度直接量測突變對pH依賴性的擾動。具有弱FcRn結合的變異體H435A及H310A/H435Q無論pH如何都不與柱結合(圖8A)。WT在生理pH($pH\ 7.37\ \pm\ 0.05$)附近溶離，而AAA、LS和YTE需要更高的pH(表2B)。所有組合變異體和七種先導單一變異體需要比WT更高的pH從親和柱溶離(圖8A和圖8C)。N434F/Y變異體在比LS(表2B)更高的pH下溶離，其不受科學理論的約束，表明這些變異體(單獨和組合)破壞了pH依賴性。代表性的層析圖顯示在突變數目的情況下，明顯轉換至更高的溶離pH(圖9A和圖9B)。溶離pH與hFcRn解離速率之間的強相關性($R^2 = 0.94$)(圖9C)表明在pH 6.0下較慢的FcRn解離速率直接促成FcRn變異體的溶離pH增加。

【0321】使用Biacore在pH 7.4下進行FcRn結合動力學實驗，以量測生理條件下的殘基結合活性。穩態RU用作殘基FcRn結合親和力的量度，因為一些變異體顯示出不可靠的動力學並且在該pH下很少甚至沒有結合。圖7A和圖7B中示出了單一(夾雜兩點的長劃線)、雙重(夾雜單點的長劃線)、三重(長劃線)和四重(短劃線)變異體的代表性動力學跡線，與LS(圖7A，實線)和YTE(圖7B，實線)比較。這兩種變異體分別在pH 7.4下展示出對人和大鼠FcRn的最大殘基結合。與WT($4.3\ \pm\ 1.0\ RU$)相比，大多數先導單一變異體具有略微升高的FcRn結合，但是其

小於AAA (13.1 ± 1.7 RU)、LS (18.5 ± 2.6 RU)和YTE (13.1 ± 1.6 RU)，N434F/Y突變除外(表2A和表2B)。組合變異體在pH 7.4下具有顯著的對兩個物種的FcRn的殘基結合，其程度甚至比N434F/Y更大(圖7A和圖7B)。不受任何理論的約束，體內研究的理想候選物是在低pH下具有增加的FcRn結合的變異體(如AAA、LS和YTE變異體)，但是在升高的pH下以與WT類似的方式保持低水平的結合。在圖7C和圖7D所示的圖中，這些組合將佔據左下象限，該左下象限分別由LS和YTE變異體在每種pH下對人和大鼠FcRn的親和力指定。

實例6：FcRn親和層析法

【0322】組合變異體展示出在pH 6.0下的表觀結合親和力與在pH 7.4下的穩態RU之間的中等的正相關性(hFcRn : $R^2 = 0.69$ ，rFcRn : $R^2 = 0.71$)(圖7C和圖7D)。不受任何理論的約束，這些結果表明在pH 6.0下更高的親和力通常轉化為在pH 7.4下更大的殘基FcRn結合。這些變異體可以在血流中保持與FcRn結合並具有短的血清半衰期和/或促進其清除，這類似於高FcRn親和力abdeg突變(參見例如Swiercz等人 2014 *supra*; and Vaccaro et al. 2005 同上)。由於抗體-FcRn相互作用是pH依賴性的並且僅在低pH(<pH 6.5)下發生，因此飽和突變可能藉由疏水性或電荷來源的貢獻增強相互作用，所述貢獻可能破壞關鍵組氨酸殘基的去質子化(圖1B，如圖所示)並且在生理pH下弱化該相互作用。

【0323】FcRn親和層析法使用線性pH梯度直接量測FcRn相互作用pH依賴性的擾動(參見例如Schlothauer等人 2013 同上)。採用AAA、LS、YTE、H435A和H310A/H435Q變異體的FcRn親和層析法揭示H435A (圖8A，淺灰色實線)和H310A/H435Q (圖8A，圖AQ，深灰色實線)甚至在pH 5.5下不與FcRn結合，並在

流出物中溶離。野生型抗體在生理pH (pH 7.37 ± 0.05)附近溶離，而AAA、LS和YTE(藉由Octet (圖2)和Biacore (圖3)具有比野生型更慢的解離速率和更緊密的FcRn結合親和力)需要相當更高的pH以從柱解離(AAA : 7.94 ± 0.06 ; LS : 8.29 ± 0.03 ;YTE : 8.14 ± 0.03)。溶離曲線揭示，組合文庫中的所有變異體都需要比野生型更高的pH以從親和柱溶離。在圖9A中示出了單一(夾雜兩點的長劃線)、雙重(夾雜單點的長劃線)、三重(長劃線)和四重(短劃線)變異體的平均溶離pH下的代表性層析圖。與WT相比，七種先導單一變異體需要更高的pH以從柱解離(圖10A，表3)，而具有對於hFcRn的類似野生型動力學的那些變異體(K288D/N，Y436H/H/W)全部在與野生型類似的pH下溶離。

【0324】表3：先導抗體變異體的體外表徵參數

變異體	FcRn親和柱	DSF	Biacore pH 6.0					
			hFcRn			rFcRn		
	pH	T _m (°C)	結合速率 (x10 ⁴ M ⁻¹ s ⁻¹)	解離速率 (x10 ⁻¹ s ⁻¹)	K _{D,app} (x10 ⁹ M)	結合速率 (x10 ⁴ M ⁻¹ s ⁻¹)	解離速率 (x10 ⁻³ s ⁻¹)	K _{D,app} (x10 ⁹ M)
WT	7.37	69.0 ± 0.2	16.2 ± 2.9	3.9 ± 0.4	2380 ± 470	7.3 ± 1.0	15.2 ± 0.2	207 ± 43
E380C	7.18	64.7 ± 0.5	1.7 ± 0.4	4.6 ± 1.5	> 10,000	1.7 ± 0.25	106 ± 1	6310 ± 880
K288D	7.33	65.8 ± 0.1	3.3 ± 1.1	5.1 ± 0.8	> 10,000	6.6 ± 3.0	8.4 ± 0.6	149 ± 63
K288N	7.39	66.7 ± 0.3	4.1 ± 1.4	4.5 ± 0.3	> 10,000	6.4 ± 2.8	10.7 ± 0.9	190 ± 73
M252Y	7.88	64.4 ± 0.2	5.5 ± 1.8	1.4 ± 0.2	3100 ± 1500	10.6 ± 3.1	2.6 ± 0.6	25 ± 3
N434F	8.30	67.8 ± 0.2	35 ± 15	0.5 ± 0.1	165 ± 73	12.6 ± 1.4	3.4 ± 1.8	26 ± 13
N434P	7.56	63.6 ± 0.5	2.4 ± 0.5	3.4 ± 1.1	> 10,000	3.4 ± 0.1	6.7 ± 0.2	194 ± 9
N434Y	8.46	67.3 ± 0.5	36 ± 10	0.5 ± 0.1	137 ± 33	14.5 ± 1.8	3.5 ± 1.9	23 ± 12
T256D	7.82	64.7 ± 0.2	4.4 ± 1.7	2.5 ± 0.7	6700 ± 3540	6.1 ± 1.8	4.8 ± 0.1	86 ± 27

	FcRn親和 柱	DSF	Biacore pH 6.0					
			hFcRn			rFcRn		
	pH	T _m (°C)	結合速率 ($\times 10^4$ M ⁻¹ s ⁻¹)	解離速率 ($\times 10^{-1}$ s ⁻¹)	K _{D,app} ($\times 10^9$ M)	結合速率 ($\times 10^4$ M ⁻¹ s ⁻¹)	解離速率 ($\times 10^{-3}$ s ⁻¹)	K _{D,app} ($\times 10^9$ M)
T256E	7.63	66.3 ± 0.6	3.9 ± 2.4	3.4 ± 0.2	> 10,000	6.3 ± 1.6	6.9 ± 1.0	113 ± 15
T307A	7.61	68.0 ± 0.4	2.9 ± 0.7	2.9 ± 0.5	> 10,000	6.1 ± 2.7	7.1 ± 0.7	132 ± 48
T307E	7.58	70.2 ± 0.5	4.4 ± 1.6	3.0 ± 0.4	8130 ± 5070	5.6 ± 2.8	6.0 ± 0.2	141 ± 65
T307F	7.61	70.2 ± 0.3	2.7 ± 0.8	2.9 ± 0.1	> 10,000	5.7 ± 2.8	6.2 ± 0.1	131 ± 63
T307M	7.40	70.0 ± 0.4	4.1 ± 0.8	3.9 ± 0.3	> 10,000	6.8 ± 2.3	17.1 ± 4.0	279 ± 140
T307Q	7.86	70.3 ± 0.6	4.0 ± 1.1	2.2 ± 0.2	5720 ± 1530	7.4 ± 2.2	4.0 ± 0.3	58 ± 16
T307W	7.75	63.0 ± 0.5	3.3 ± 0.8	2.8 ± 0.3	8740 ± 2440	7.1 ± 2.3	7.4 ± 0.4	111 ± 32
Y436H	7.33	68.7 ± 0.3	2.6 ± 0.8	6.1 ± 1.0	> 10,000	5.1 ± 0.1	7.3 ± 0.9	131 ± 9
Y436N	7.22	65.8 ± 0.5	4.6 ± 2.4	7.4 ± 3.3	> 10,000	10.1 ± 4.9	20.3 ± 3.1	233 ± 86
Y436W	7.39	68.6 ± 0.7	2.8 ± 1.9	4.6 ± 0.9	> 10,000	3.4 ± 2.2	23.7 ± 7.7	1140 ± 950

【0325】 使用每列頂部的實驗技術獲得所有資料。藉由FcRn親和層析法一式三份地測定溶離pH($n = 3$)，並且DSF一式三份地探測熱穩定性($n = 3$)。採用一系列抗體濃度從Biacore獲得對人和大鼠FcRn的FcRn結合動力學($n = 4$)，並獨立地擬合。每次量測的單位如下：溶離pH(無單位)；DSF T_m (°C)；Biacore pH 6.0 hFcRn結合速率($\times 10^4$ M⁻¹ s⁻¹)、解離速率($\times 10^{-1}$ s⁻¹)和K_{D,app}($\times 10^9$ M)；Biacore pH 6.0 rFcRn結合速率($\times 10^4$ M⁻¹ s⁻¹)、解離速率($\times 10^{-3}$ s⁻¹)和K_{D,app}($\times 10^9$ M)。

【0326】 N434F/Y變異體均在比LS變異體更高的pH下溶離(N434F : 8.30 ± 0.05；N434Y : 8.46 ± 0.02)並且在pH 7.4下顯示出相當大的FcRn結合(表4)。這些

結果表明單獨的這些變異體可以破壞pH依賴性。一般而言，平均溶離pH隨著增強FcRn結合的突變數目的增加而增加(圖9B)。不受任何理論的約束，與hFcRn解離速率相比顯示出與溶離pH的強相關性($R^2 = 0.94$)(圖9C)表明相互作用的pH依賴性的破壞直接促成在pH 6.0下對組合文庫觀察到的較慢的FcRn解離速率。

實例7：熱穩定性

【0327】具有低熱力學穩定性的大多數蛋白質(包括抗體)具有增加的錯折疊和聚集傾向並且將會限制或阻礙作為新型治療劑的活性、功效和潛力。使用DSF測定每種變異體的熱穩定性，並將報告的熔融溫度(T_m)定義為Sypro Orange螢光強度曲線中的第一次轉變的中點。與 T_m 為 $69.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 的WT相比，LS變異體類似WT ($68.5 \pm 0.3^\circ\text{C}$)，並且AAA和YTE熱不穩定，差約 8°C (AAA : $61.3 \pm 0.6^\circ\text{C}$; YTE : $61.2 \pm 0.3^\circ\text{C}$)(圖8B、圖9B和圖10D；以及表2B、表3和表4)。與 T_m 為 $69.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 的WT和LS相比，藉由DSF，AAA和YTE變異體具有較低的熱穩定性，差約 8°C 。

【0328】表4：基準和先導組合的體外表徵參數

變異體	FcRn 親和柱	DSF pH	Biacore pH 6.0						Biacore pH 7.4				FcγRIIIa V158
			hFcRn			rFcRn			hFcRn	rFcRn			
			T_m ($^\circ\text{C}$)	締合速率 ($\times 10^4$ $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	解離速率 ($\times 10^{-1}$ s^{-1})	$K_{D,app}$ ($\times 10^9 \text{ M}$)	締合速率 ($\times 10^4$ $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	解離速率 ($\times 10^{-3}$ s^{-1})	$K_{D,app}$ ($\times 10^9$ M)	穩態 RU	穩態 RU	$K_{D,app}$ ($\times 10^9 \text{ M}$)	
WT	7.37		69.0 0.2	± 16.2 2.9	± 3.9 0.4	$\pm 2380 \pm 470$	7.3 1.0	± 15.2 0.2	± 207 43	± 4.2 0.9	± 13.0 3.2	$\pm 467 \pm 99$	

AAA	7.94	61.3 0.6	\pm 8.4 1.8	\pm 1.4 0.1	\pm	1780 \pm 380	15.7 3.3	\pm 11.7 1.1	\pm	77 \pm 18	13.9 3.1	\pm 23.6 4.9	\pm	450 \pm 19
LS	8.29	68.5 0.3	\pm 19.3 3.5	\pm 0.5 0.1	\pm	272 \pm 40	9.1 1.6	\pm 6.6 0.4	\pm	74 \pm 9	18.3 4.6	\pm 24.8 4.8	\pm	369 \pm 19
YTE	8.14	61.2 0.3	\pm 14.3 4.4	\pm 0.5 0.1	\pm	342 \pm 117	6.5 0.5	\pm 1.2 0.2	\pm	18 \pm 2	13.2 3.5	\pm 53.9 1.2	\pm	1040 \pm 160
<u>MDQN</u>	7.92	67.9 0.4	\pm 3.8 0.4	\pm 8.7 0.1	\pm	232 \pm 24	1.3 0.2	\pm 1.3 0.1	\pm 9.5 1.7	\pm 10.7 1.0	\pm 39.1 4.5	\pm	\pm	600 \pm 4
<u>MDWN</u>	7.92	57.8 0.4	\pm 5.3 0.1	\pm 8.9 0.3	\pm	169 \pm 8	1.6 0.1	\pm 1.3 0.1	\pm 8.2 0.9	\pm 12.2 1.3	\pm 42.1 4.7	\pm	\pm	512 \pm 30
<u>YDTN</u>	8.29	59.6 0.9	\pm 6.3 1.2	\pm 5.9 0.20	\pm	94 \pm 18	2.9 0.1	\pm 1.7 0.2	\pm 5.9 0.6	\pm 9.7 1.8	\pm 56.0 5.6	\pm	\pm	1060 \pm 60
<u>YETN</u>	7.83	60.7 0.7	\pm 5.9 0.1	\pm 7.6 0.3	\pm	128 \pm 5	3.2 0.1	\pm 2.7 0.1	\pm 8.4 0.2	\pm 9.8 1.2	\pm 55.1 6.1	\pm	\pm	878 \pm 101
<u>YTWN</u>	8.14	59.3 0.2	\pm 4.8 0.2	\pm 5.7 0.1	\pm	118 \pm 5	2.1 0.1	\pm 1.1 0.1	\pm 5.2 0.2	\pm 15.9 1.7	\pm 66.1 7.1	\pm	\pm	896 \pm 53
<u>YDQN</u>	8.51	60.5 0.1	\pm 2.5 0.2	\pm 2.8 0.1	\pm	115 \pm 7	0.5 0.1	\pm 0.3 0.1	\pm 5.1 0.3	\pm 19.8 2.7	\pm 65.2 6.6	\pm	\pm	1060 \pm 50
<u>YEQN</u>	8.12	61.9 0.8	\pm 1.9 0.1	\pm 4.1 0.1	\pm	218 \pm 6	0.5 0.1	\pm 0.4 0.1	\pm 7.8 0.4	\pm 15.2 2.1	\pm 61.8 6.4	\pm	\pm	1620 \pm 210

【0329】引入野生型骨架的突變以粗體和下劃線表示。使用每列頂部所示

的實驗技術獲得所有資料。一式三份地測定溶離pH和T_m(n = 3)。從Biacore獲得在pH 6.0下對人和大鼠FcRn的FcRn結合動力學(n = 4)並獨立地擬合。使用Biacore以單一抗體濃度一式三份地量測pH 7.4下的穩態FcRn結合反應。使用Biacore從一系列抗體濃度一式兩份地測定FcγRIIIa結合親和力。每次量測的單位如下：溶離pH(無單位)；DSF T_m(°C)；Biacore pH 6.0 hFcRn結合速率(x10⁵ M⁻¹ s⁻¹)、解離速率(x10⁻² s⁻¹)和K_{D,app}(x10⁹ M)；Biacore pH 6.0 rFcRn結合速率(x10⁵ M⁻¹ s⁻¹)、解

離速率($\times 10^{-3}$ s⁻¹)和 $K_{D,app}$ ($\times 10^9$ M)；Biacore pH 7.4穩態結合響應(RU)和Fc γ RIIIa $K_{D,app}$ ($\times 10^9$ M)。

【0330】與野生型相比，18種先導飽和變異體中的十二種具有降低的 T_m ，並且若干種T307突變體(T307E/F/M/Q)顯示出輕微的穩定作用(表4)。用於組合的七種單一變異體(圖10B和表4)中沒有一種相對於YTE顯著不穩定(圖8B和表5)。與單一變異體(圖9D，白色圓圈)相比，添加雙重(圖9D，水平線)、三重(圖9D，垂直線)和四重(圖9D，方格)變異體導致總體熱穩定性進一步降低。多種變異體顯示出低於AAA或YTE ($61.2 \pm 0.$ °C)的 T_m ，其中> 60%的這些變異體含有T307W。四重變異體(圖9D，方格)顯示出熔融溫度的明顯雙峰分佈，其中含有T307Q的組合比具有T307W的那些組合具有高大約6°C的熱穩定性(圖9D)。

實例8：Fc變異體改變與Fc γ RIIIa的結合相互作用

【0331】除了與FcRn的相互作用外，Fc區鉸鏈和C_H2結構域負責與其他Fc受體(包括Fc γ RIIIa)的相互作用。由於用於構建組合飽和文庫的七種單一變異體中的五種位於C_H2結構域內，儘管它們的位置遠離相互作用界面，但是與這些受體相互作用的能力相對於野生型可能受到損害。使用Biacore以與pH 7.4下的FcRn結合類似的方式量測Fc γ RIIIa結合，揭示YTE (圖11A，深灰色)變異體顯示出與野生型(圖11A，黑色)相比結合反應降低約50%。不受任何理論的約束，YTE的降低的Fc γ RIIIa結合是M252Y突變(圖11B，最低的白色圓圈)的結果，因為單獨的該變異體具有對該受體的顯著降低的親和力。其他單一突變不具有這種降低的親和力(圖11B，白色圓圈)，並且單獨的N434F/Y變異體使結合增強16%-40%。這些效果轉移到它們相應組合的大多數但不是全部。例如，含有

M252Y的組合在Fc γ RIIIa結合方面具有17%與72%之間的降低(表5)。

【0332】表5：條件培養基中飽和文庫變異體的濃度

位置		M252	I253	S254	T256	K288	T307	K322	E380	L432	N434	Y436
突變體		濃度 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)										
A	89.4	3.4	99.5	4.5	106	< 0.1	110	206	173	108	22.0	
C	< 0.1	0.2	108	< 0.1	< 0.1	< 0.1	323	< 0.1	138	31.8	< 0.1	
D	22.7	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	169	127	133	< 0.1	2.2	
E	< 0.1	136	93.0	163	< 0.1	23.5	167	WT	2.7	65.9	8.9	
F	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	154	127	118	< 0.1	< 0.1	
G	46.7	< 0.1	172	106	< 0.1	4.9	124	146	107	< 0.1	< 0.1	
H	< 0.1	< 0.1	< 0.1	207	< 0.1	7.0	229	103	124	< 0.1	173	
I	< 0.1	WT	< 0.1	193	53.9	< 0.1	63.0	60.2	182	16.3	< 0.1	
K	1.2	4.1	< 0.1	3.2	WT	88.8	WT	69.2	25.0	< 0.1	67.0	
L	< 0.1	< 0.1	103	124	< 0.1	< 0.1	181	169	WT	77.7	< 0.1	
M	WT	80.0	1.5	122	< 0.1	< 0.1	112	76.8	97.3	30.5	90.1	
N	< 0.1	< 0.1	89.6	46.8	< 0.1	126	231	190	235	WT	18.9	
P	0.7	< 0.1	18.5	2.7	92.6	< 0.1	1.3	175	< 0.1	120	< 0.1	
Q	176	35.7	20.9	123	1.0	14.0	216	197	188	55.4	96.9	
R	0.8	< 0.1	< 0.1	189	< 0.1	1.5	209	9.1	142	102	25.0	
S	< 0.1	71.1	WT	141	< 0.1	88.8	99.3	153	106	< 0.1	3.0	
T	19.7	12.5	< 0.1	WT	83.8	WT	218	176	114	75.2	34.1	
V	63.6	89.9	67.1	150	< 0.1	< 0.1	88.9	239	114	68.0	18.0	
W	2.8	< 0.1	< 0.1	2.9	4.9	< 0.1	66.8	171	< 0.1	21.6	128	
Y	0.7	< 0.1	150	117	< 0.1	1.1	143	11.3	26.1	< 0.1	WT	

【0333】一個變異體MDQF(圖11B，三重變異體類別中最高的)顯示出在

Fc γ RIIIa結合方面140%的顯著增加。因此，組合飽和文庫提供了具有多種Fc受體

功能的變異體，所述變異體可用於定制具有特定效應子功能的治療性抗體。

【0334】圖11C示出了與WT和YTE變異體相比七種先導單一變異體的Fc γ RIIIa結合反應的箱線圖。

實例9：七種先導組合平衡FcRn相互作用的pH依賴性

【0335】不受任何理論的約束，用於進一步體內研究的候選變異體佔據圖7C和圖7D中所示的圖的左下象限。七種變異體滿足hFcRn的這些標準並且包含五種雙重和兩種三重組合(MDQN、MDWN、YDTN、YETN、YTWN、YDQN和YEQN)並且不包含N434位置處的突變(表3)。這些組合中的每一種從FcRn親和柱在AAA (pH 7.94 ± 0.06)與LS (pH 8.29 ± 0.03)之間溶離，其中YDQN在8.51 ± 0.14的最高pH下溶離(圖12A，表5)，這表明對pH依賴性僅有輕微的擾動並且在pH 7.4下具有更大的殘基結合(表2A)。其中一種變異體(MDQN)具有類似野生型的熱穩定性，並且六種變異體具有與YTE變異體相比類似或降低的T_m(圖12B，表4)。在Fc γ RIIIa結合測定中，五種組合變異體顯示出與YTE類似的降低(表4)。對單一突變的進一步研究揭示，M252Y顯著地影響Fc γ RIIIa結合，並且不受任何理論的約束，該影響轉化至具有該突變的組合。剩餘的六種單一突變類似WT或具有與該受體的略微改善的結合。

【0336】基於它們的FcRn結合特性、熱穩定性和Fc γ RIIIa結合，選擇三種組合變異體用於進一步研究。DQ (T256D/T307Q)、DW (T256D/T307W)和YD (M252Y/T256D)各自提供最佳的FcRn結合特性(表2B)作為LS變異體(圖12E)。每種變異體提供不同範圍的熱穩定性和Fc γ RIIIa結合特性(圖12F和圖12G，表2B)，其提供了一系列功能。圖12H是同質橋接RF的圖。

【0337】分別與LS(圖13A，粗長劃線)和YTE變異體(圖13B，粗長劃線)相比，在pH 6.0下人和大鼠FcRn的表觀結合親和力的增強在結合與解離速率之間折中(圖13A和圖13B，表4)。通常，具有更快解離速率的組合也具有更快的結合速率，反之亦然。在人與大鼠FcRn之間維持這種觀察(表4)。此外，所有這些變異體在pH 7.4下對於hFcRn具有比LS變異體(圖13C，粗長劃線)更低的穩態反應。這些結果與rFcRn不一致，因為與YTE相比，在pH 7.4下五種含有M252Y的變異體YDTN、YETN、YTWN、YDQN和YEQN具有升高的FcRn結合(圖13，表5)。MDQN和MDWN變異體是人與大鼠FcRn之間交叉反應的唯一組合。此外，這兩種變異體不會以與含有M252Y的變異體類似的程度擾亂與Fc_γRIIIa的相互作用(圖12C和圖12D以及表5；MDQN： 600 ± 4 nM；MDWN： 512 ± 30 nM；WT： 467 ± 99 nM)。因此，關鍵FcRn相互作用位置處的飽和和組合突變誘發已經導致先導變異體的鑑定，所述先導變異體平衡了相互作用的pH依賴性，維持了與Fc受體的功能，可以增強體內FcRn功能，並且可以延長治療性抗體的血清半衰期。

實例10：先導組合變異體的類風濕因子結合特徵

【0338】研究了先導變異體的等電點和RF結合，因為這些突變可能改變抗體表面電荷和免疫原性。已經認為更多的酸性抗體可延長抗體藥代動力學。與WT和LS對照相比，由於T256D取代，所有三種先導導致pI降低約0.2 pH單位。由於重疊的相互作用界面，增強FcRn的突變可以同時改變與主體抗體的結合，如類風濕因子(RF)。同質橋接ELISA適用於量測先導變異體的RF結合的變化。有趣的是，與WT相比，LS和YTE顯示完全相反的RF結合變化(圖12H)。LS顯著增加RF結合，而YTE顯示顯著降低($p < 0.001$)。YD ($p < 0.001$)和DW ($p < 0.01$)

也顯著降低RF結合，而DQ產生與WT類似的反應。不受任何理論的約束，這些結果表明DQ、DW和YD可提供與LS相比的免疫原性優勢。YD、DW和DQ變異體代表一系列關鍵抗體特徵，所述特徵可以與相對於基準YTE和LS變異體改善的FcRn結合特性結合使用。

實例11：先導組合變異體可轉移至其他抗體

【0339】 使用CM5感測器晶片開發了新的結合測定，如圖15A所示。結合測定包括將鏈黴親和素固定在CM5感測器晶片上以捕獲生物素化FcRn捕獲以達到約30 RU (根據需要補充)的步驟。在pH 6.0和7.4以及pH 8.5下量測抗體結合動力學用於再生。圖15B和圖15C示出了使用新的結合測定分別進行FcRn的直接固定和生物素化FcRn的鏈黴親和素捕獲。

【0340】 抗體2在pH 6.0下的FcRn結合：在小鼠FcRn的情況下，先導抗體2變異體顯示出比LS變異體(劃線)和野生型(黑色)更慢的解離速率(圖16A)。對於人FcRn，先導變異體全部具有更快的結合速率但具有與LS(劃線)類似的解離速率(圖16B)。

【0341】 在pH 7.4下抗體2的FcRn結合：與LS(短劃線)相比，所有的先導變異體在pH 7.4下顯示出降低的人FcRn結合(圖17A)。與抗體1背景一樣，在pH 7.4下DW (MDWN)和DQ (MDQN)變異體也顯示出與小鼠(大鼠)FcRn的更低殘基結合(圖17B)。

【0342】 與LS相比，先導變異體在pH 6.0下保持更高的結合親和力並且在pH 7.4下保持更低的殘基結合(圖18)。重要的是，發現在對FcRn結合影響很小的情況下變異體可在不同IgG1背景之間轉移。如圖19所示，無論背景如何，LS都

具有類似的溶離pH。抗體2背景中的WT、DQ和DW顯示出比在抗體1背景中更高的溶離pH，這可能是在抗體2背景中pH 6.0下更緊密結合的結果。

【0343】抗體2背景變異體全部顯示出略微增加的熱穩定性，如圖20所示。

【0344】如圖21所示，類似於抗體1背景，YD (YDTN)顯示Fc γ RIIIa結合反應(左)和親和力(右)的降低。DQ (淺灰色)和DW (深灰色)顯示在抗體2背景中與WT(黑色)類似的Fc γ RIIIa結合特性。對LS的Fc γ RIIIa結合的影響在抗體1與抗體2之間是一致的。

【0345】因此，與抗體1背景中的相同先導變異體相比，抗體2背景中的先導變異體不顯著影響FcRn結合、pH依賴性、熱穩定性或Fc γ RIIIa結合。

【0346】在一個實施例中，將DQ (T256D/T307Q)、DW (T256D/T307W)和YD (M252Y/T256D)變異體摻入附加的IgG1抗體和重組Fc片段中：mAb2識別來自mAb1的不同抗原，並且Ab3是Fc片段。在每種情況下，除了溶離pH、熱穩定性和Fc γ RIIIa結合親和力之外，pH依賴性FcRn結合動力學(圖22)也高度類似(表2B和表6)。不受任何理論的約束，這些結果表明DQ、DW和YD變異體向由Fc結構域組成的蛋白質賦予其改善的FcRn結合特性。

【0347】表6：條件培養基中飽和文庫變異體的濃度

Ab	變異體	pH	T _m	FcRn親和力倍數變化	Biacore		Biacore pH 6.0			Biacore pH 7.4		
					DSF	Fc γ RIIIa V158	hFcRn	cFcRn	mFcRn	hFcRn	cFcRn	mFcRn
2	WT	7.61	69.3 ± 0.1	1.0	678 ± 97	1440 ± 360	107 ± 9	1.3 ± 0.2	1.3 ± 0.3	92 ± 8		
2	LS	8.32	69.0 ± 0.02	1.23 ± 0.02	113 ± 22	210 ± 43	20 ± 9	44 ± 4	38 ± 6	285 ± 8		

			0.1							
2	DQ	8.06	69.3 ± 0.1	1.05 ± 0.01	97 ± 33	110 ± 42	24 ± 11	14 ± 1	11 ± 1	248 ± 5
2	DW	8.11	58.1 ± 0.1	1.15 ± 0.01	69 ± 25	99 ± 9	13 ± 5	18 ± 2	15 ± 1	257 ± 8
2	YD	8.25	60.5 ± 0.1	0.58 ± 0.01	99 ± 49	120 ± 6	10 ± 3	27 ± 2	22 ± 3	394 ± 11
3	WT	7.62	67.5 ± 0.2	1.0	717 ± 23		61 ± 1	2.2 ± 0.3		72 ± 2
3	LS	8.32	66.6 ± 0.2	1.11 ± 0.03	51 ± 2		16 ± 2	32 ± 2		103 ± 1
3	DQ	8.07	63.8 ± 0.2	0.87 ± 0.02	51 ± 1		24 ± 1	19 ± 2		89 ± 1
3	DW	8.12	57.1 ± 0.2	0.93 ± 0.02	39 ± 6		23 ± 1	22 ± 2		99 ± 1
3	YD	8.23	59.5 ± 0.1	0.73 ± 0.02	54 ± 1		0.5 ± 0.2	28 ± 3		125 ± 2

實例12：先導變異體延長體內血漿抗體消除半衰期

【0348】檢測DQ、DW和YD變異體與WT和LS對照相比的藥代動力學(PK)對食蟹猴和hFcRn轉基因小鼠(品系Tg32)的抗體循環半衰期的影響(參見例如 Avery等人 *Mabs* (2016) 8: 1064-1078)。與食蟹猴FcRn的FcRn結合研究揭示了與hFcRn類似的結合親和力(圖23A至圖23B；表6)。將每只動物靜脈內注射WT、LS、DQ、DW或YD變異體，並藉由質譜法定量抗體濃度以確定食蟹猴(圖24A)和hFcRn轉基因小鼠(圖24B)中的清除率和血清半衰期。從作為時間函數的抗體濃度的非隔室模型獲得清除率和血清半衰期。在食蟹猴和小鼠二者中，所有三

種先導變異體和LS顯示出與WT相比顯著降低的清除率($p < 0.001$)。對於食蟹猴和小鼠，WT抗體的血漿半衰期分別為 9.9 ± 0.5 天和 11.7 天。此外，與兩種物種中的野生型相比，鑑定的LS基準和變異體顯示消除半衰期的顯著增加(在食蟹猴和小鼠中分別增加2.5倍和1.7倍)(表7)。與LS基準相比，DQ、DW和YD顯示出類似的半衰期延長(表7)。本文藉由飽和突變誘發鑑定的DQ、DW和YD突變表明，在小鼠和非人靈長類動物模型中，血漿半衰期與其WT對照相比顯著延長。

【0349】表7：基準和先導變異體的清除率和血清半衰期

mAb2	食蟹猴 (n = 3)			hFcRn Tg32小鼠 (n = 6)				
	清除率 (mL 天 $^{-1}$ kg $^{-1}$)	$t_{1/2}$ (天)		清除率 (mL 天 $^{-1}$ kg $^{-1}$)	$t_{1/2}$ (天)			
變異 體	平均值 \pm SD	平均值 \pm SD	倍數 相對 於WT	倍數 相對 於LS	平均值	平均值	倍數相 對於 WT	倍數相 對於LS
WT	5.6 ± 0.5	9.9 ± 0.5	1.0	0.4	7.4	11.7	1.0	0.6
LS	2.1^{**}	22.5 ± 2.4	2.3	1.0	4.6	19.5	1.7	1.0
DQ	3.4^*	20.8	2.1	0.9	3.2	24.5	2.1	1.3
DW	2.5 ± 0.2	20.4 ± 0.9	2.1	0.9	3.5	20.1	1.7	1.0
YD	2.4 ± 0.3	23.5 ± 2.1	2.4	1.0	4.5	17.5	1.5	0.9

【0350】在表7中，使用mAb2測定清除率和血漿半衰期。每個清除率和半衰期都是食蟹猴的n = 3的平均值和來自n = 6 hFcRn轉基因小鼠庫的單個評估。倍數相對於WT和倍數相對於LS分別顯示與WT和LS相比血清半衰期的相對改善。 $^*n = 2$ 由於ADA形成， $^{**}n = 2$ 由於部分皮下投予途徑

實例13：在pH 6.0和pH 7.4下具有增強的FcRn結合的組合變異體

【0351】基於如實例2中所述的Octet篩選(基於BLI的篩選)，生成各種單一、雙重、三重和四重變異體，並評估它們在pH 6.0和pH 7.4下與FcRn的結合(表8)。

【0352】表8：變異體的結合親和力(pH 6.0)和穩態結合(pH 7.4)

變異體	類型	結合親和力 (M^{-1})	結合親和力 錯 誤 (M^{-1})	穩態結合, pH 7.4 (RU)	穩態結合錯誤, pH 7.4 (RU)	比例 (pH 6.0 / pH 7.4)	比例 (pH 6.0 / pH 7.4)
WT (MTTN)	基準	420000	83000	4.2	0.9	100000	1.00E-0 5
AAA	基準	562000	120000	13.9	3.1	40432	2.47E-0 5
LS	基準	3680000	541000	18.3	4.6	201093	4.97E-0 6
YTE	基準	2920000	1000000	13.2	3.5	221212	4.52E-0 6
MDQN	雙重	4310000	446000	10.7	1	402804	2.48E-0 6
MDTF	雙重	33400000	2240000	29.2	4	1143836	8.74E-0 7
MDTY	雙重	64100000	2050000	37.1	5	1727763	5.79E-0 7
MDWN	雙重	5920000	280000	12.2	1.3	485246	2.06E-0 6

MEQN	雙重	2000000	24100	5.8	0.6	344828	2.90E-0 6
METF	雙重	12800000	3350000	23.3	3.2	549356	1.82E-0 6
METY	雙重	16000000	4130000	26.8	3.7	597015	1.68E-0 6
MEWN	雙重	3100000	259000	7.7	0.9	402597	2.48E-0 6
MTQF	雙重	23300000	4290000	34.2	4.6	681287	1.47E-0 6
MTQY	雙重	30900000	6950000	38.4	5.2	804688	1.24E-0 6
MTWF	雙重	26200000	1230000	30.5	4.2	859016	1.16E-0 6
MTWY	雙重	46500000	2600000	37.2	4.9	1250000	8.00E-0 7
YDTN	雙重	10700000	2100000	9.7	1.8	1103093	9.07E-0 7
YETN	雙重	7810000	305000	9.8	1.2	796939	1.25E-0 6
YTQN	雙重	3600000	298000	10.6	1.2	339623	2.94E-0 6
YTTF	雙重	55600000	3090000	43.8	5.8	1269406	7.88E-0 7
YTYY	雙重	120000000	2890000	54.1	7.1	2218115	4.51E-0 7
YTWN	雙重	8470000	359000	15.9	1.7	532704	1.88E-0 6
MDQF	三重	6620000	1840000	55.3	11.2	119711	8.35E-0 6
MDQY	三重	36900000	4360000	49.4	6.7	746964	1.34E-0

							6
MDWF	三重	28100000	2840000	47.1	6.4	596603	1.68E-0 6
MDWY	三重	84000000	9890000	59	7.9	1423729	7.02E-0 7
MEQF	三重	142000	6490	8.6	0.8	16512	6.06E-0 5
MEQY	三重	23800000	2660000	38.6	5.2	616580	1.62E-0 6
MEWF	三重	56200000	8520000	41.9	5.6	1341289	7.46E-0 7
MEWY	三重	70400000	7440000	46.6	6.3	1510730	6.62E-0 7
YDQN	三重	8700000	560000	19.8	2.7	439394	2.28E-0 6
YDTF	三重	29600000	2540000	57.7	7.7	512998	1.95E-0 6
YDTY	三重	90100000	812000	65.4	8.9	1377676	7.26E-0 7
YDWN	三重	10100000	1540000	25.9	3.6	389961	2.56E-0 6
YEQN	三重	4590000	126000	15.2	2.1	301974	3.31E-0 6
YETY	三重	33400000	3580000	22.6	2.9	1477876	6.77E-0 7
YEWN	三重	6410000	904000	69.6	9.3	92098	1.09E-0 5
YTQF	三重	56500000	1280000	59.9	8	943239	1.06E-0 6
YTQY	三重	63300000	4010000	71.5	9.6	885315	1.13E-0 6

YTWF	三重	65400000	2990000	62.6	8.2	1044728	9.57E-0 7
YTWY	三重	106000000	10600000	75.1	9.8	1411451	7.08E-0 7
YDQF	四重	111000000	4320000	68.6	10	1618076	6.18E-0 7
YDQY	四重	235000000	6060000	80.2	12	2930175	3.41E-0 7
YDWF	四重	166000000	3050000	71.8	9.9	2311978	4.33E-0 7
YDWY	四重	266000000	19100000	88.5	11.7	3005650	3.33E-0 7

【0353】在表8中，示出了對於各種單一、雙重、三重和四重突變體以及基準變異體(AAA、LS、YTE)在pH 6.0下與FcRn的結合親和力和在pH 7.4下與FcRn的穩態結合。

【0354】將這些值繪製在圖25中。圖25示出了pH 6.0下的結合親和力和pH 7.4下RU的比較。如圖所示，基準變異體LS在pH 6.0下具有最緊密的結合親和力，並且測試的基準變異體(AAA、LS、YTE)在pH 7.4下具有最大殘基結合。

【0355】確定圖25中所示的若干種組合變異體在pH 6.0和pH 7.4下顯示出增強的FcRn結合親和力。為了研究在pH 6.0和pH 7.4下任何組合變異體是否顯示出比MST-HN變異體(在本文中稱為“YTEKF基準”，其含有Met252、Ser254、Thr256、His433和Asn434到Tyr252、Thr254、Glu256、Lys433和Phe434的突變)更緊密的結合，進行以下方法。經由生物素CAPture方法進行生物素化的人、食蟹猴和小鼠FcRn的捕獲(參見圖26的示意圖)。對於pH 6.0，一式兩份地從1000 nM進行濃度系列(5 pts)。對於pH 7.4，一式三份地進行單一濃度(1000 nM)注射(每

種FcRn的捕獲水平增加10倍以觀察在該pH下的結合)。結合：180 sec；解離：300 sec。

【0356】 圖27示出了在pH 6.0下YTEKF基準和各種組合變異體的人FcRn結合動力學。如圖27所示，與野生型(WT)相比，所有檢測的變異體都顯示出對人FcRn的高出兩個數量級的更緊密的親和力。

【0357】 圖28A和圖28B示出了在pH 6.0(圖28A)和pH 7.4(圖28B)下組合變異體與YTEKF基準相比的FcRn結合動力學。在圖28A中，大多數變異體顯示出比YTEKF基準更慢的解離速率，並且具有類似或更慢的結合速率。在圖28B中，YTEKF在pH 7.4下顯示出顯著的結合，並且四種變異體顯示出更高的殘基結合。

【0358】 表9：選擇變異體的結合親和力(pH 6.0)和穩態結合(pH 7.4)

人FcRn	pH 6.0		pH 7.4	
變異體	KD (nM)	SD	RU	SD
YDQY	2.7	0.1	103.1	0.6
YEWY	8.3	0.5	98.2	0.9
YEQY	4.8	0.2	93.6	0.8
YDQF	4.7	0.1	91.7	0.6
YDWY	5.2	0.2	91.2	0.5
YTEKF	14.8	0.3	89.9	1.3
YWY	10.0	0.4	77.1	0.3
YDWF	11.0	0.4	75.7	0.5
YDY	15.1	0.8	69.7	0.4
DWY	18.1	1.1	59.8	0.8
YY	22.9	0.9	54.4	0.1
WT	1288	201	0.4	0.1

【0359】 在表9中，示出了選擇組合變異體以及YTEKF基準和WT在pH 6.0下對FcRn的結合親和力和在pH 7.4下與FcRn的穩態結合。

【0360】 圖29示出了如表9所示的選擇組合變異體在pH 6.0下的結合親和力和在pH 7.4下的RU的比較。如表9和圖29所示，發現與YTEKF基準相比，四種四重變異體在pH 6.0和pH 7.4下對FcRn具有更高的親和力。四種四重變異體偏愛T256D、T307Q和N434Y突變。與WT和YTEKF相比，這些四重變異體顯示出親和力(在pH 6.0)分別提高了約500倍和3倍。

【0361】 測定其他表徵參數，例如熱穩定性、與Fc γ RIIIa的結合和溶離pH，並顯示在表10中。

【0362】 表10：先導四重變異體的其他表徵參數

變異體	親和力, pH 6.0 (nM)	穩態RU, pH 7.4	Tm (°C)	Fc γ RIIIa 結合 (RU)	溶離pH
YDQY	2.7	103.1	59.0	119	9.2
YEWY	8.3	98.2	52.7	92	9.3
YEQY	4.8	93.6	59.5	108	9.1
YDQF	4.7	91.7	59.1	93.2	8.8
YDWY	5.2	91.2	52.5	104	9.5
WT	~1500	<1	69.0	142	7.37
YTEKF	14.8	89.9	N.P.*	N.P.*	N.P.

*不受理論的約束，由於YTEKF中存在“YTE”，因此熱穩定性和Fc γ RIIIa結合預計與先導四重變異體類似

【0363】 如表10所示，發現所有的先導四重變異體都是熱不穩定的並且顯示出降低的Fc γ RIIIa結合能力。

【符號說明】

無

201940512

【生物材料寄存】

無

201940512

申請案號：

201940512

申請日：

IPC 分類：

【發明摘要】

【中文發明名稱】 具有與FcRn增進的結合及延長的半衰期之Fc變異體

【英文發明名稱】 Fc VARIANTS WITH ENHANCED BINDING TO FcRn AND PROLONGED HALF-LIFE

【中文】

本揭示文本提供包含經修飾的Fc結構域的結合多肽(例如，抗體和免疫黏附素)。本揭示文本還提供編碼該結合多肽的核酸、重組表現載體和用於製備這類結合多肽的宿主細胞。還提供了使用本文揭示的結合多肽治療疾病的方法。

【英文】

The present disclosure provides binding polypeptides (e.g., antibodies and immunoadhesins) comprising a modified Fc domain. The present disclosure also provides nucleic acids encoding the binding polypeptides, recombinant expression vectors, and host cells for making such binding polypeptides. Methods of using the binding polypeptides disclosed herein to treat disease are also provided.

【指定代表圖】 無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明申請專利範圍】

【第1項】 一種包含經修飾的Fc結構域之分離的結合多肽，該經修飾的Fc結構域包含：

胺基酸位置 256 處的天門冬胺酸(D)或蘇氨酸(E)，和/或胺基酸位置 307 處的色胺酸(W)或蘇醯胺酸(Q)，其中胺基酸位置 254 不是蘇胺酸(T)，並且進一步包含：

胺基酸位置 434 處的苯丙胺酸(F)或酪胺酸(Y)；或

胺基酸位置 252 處的酪胺酸(Y)，

其中胺基酸位置按照 EU 編號。

【第2項】 一種包含經修飾的Fc結構域之分離的結合多肽，該經修飾的Fc結構域包含選自以下組成之群的位置處之胺基酸取代的組合：

- a) 胺基酸位置 252 處的酪胺酸(Y)和胺基酸位置 256 處的天門冬胺酸(D)；
- b) 胺基酸位置 256 處的天門冬胺酸(D)和胺基酸位置 434 處的苯丙胺酸(F)；
- c) 胺基酸位置 256 處的天門冬胺酸(D)和胺基酸位置 434 處的酪胺酸(Y)；
- d) 胺基酸位置 307 處的色胺酸(W)和胺基酸位置 434 處的苯丙胺酸(F)；
- e) 胺基酸位置 252 處的酪胺酸(Y)和胺基酸位置 307 處的色胺酸(W)，其中酪胺酸(Y)不在胺基酸位置 434 處；
- f) 胺基酸位置 256 處的天門冬胺酸(D)和胺基酸位置 307 處的色胺酸(W)，其中酪胺酸(Y)不在胺基酸位置 434 處；
- g) 胺基酸位置 256 處的天門冬胺酸(D)和胺基酸位置 307 處的蘇醯胺酸(Q)，其中酪胺酸(Y)不在胺基酸位置 434 處；

h) 肽氨基酸位置 252 處的酪胺酸(Y)、肽氨基酸位置 256 處的天門冬胺酸(D)和肽氨基酸位置 307 處的麴醯胺酸(Q)，其中酪胺酸(Y)不在肽氨基酸位置 434 處；以及

i) 肽氨基酸位置 252 處的酪胺酸(Y)、肽氨基酸位置 256 處的麴胺酸(E)和肽氨基酸位置 307 處的麴醯胺酸(Q)，其中蘇胺酸(T)不在肽氨基酸位置 254 處，組胺酸(H)不在肽氨基酸位置 311 處，並且酪胺酸(Y)不在肽氨基酸位置 434 處；其中該肽氨基酸取代按照 EU 編號。

【第3項】 一種包含經修飾的Fc結構域的分離的結合多肽，該經修飾的Fc結構域包含：

a) 選自 M252Y/T256D、M252Y/T256E、M252Y/T307Q、M252Y/T307W、T256D/T307Q、T256D/T307W、T256E/T307Q 和 T256E/T307W 的雙重肽氨基酸取代，其中蘇胺酸(T)不在肽氨基酸位置 254 處，組胺酸(H)不在肽氨基酸位置 311 處，並且酪胺酸(Y)不在肽氨基酸位置 434 處；或者

b) 選自 M252Y/T256D/T307Q、M252Y/T256D/T307W、M252Y/T256E/T307Q 和 M252Y/T256E/T307W 的三重肽氨基酸取代，其中蘇胺酸(T)不在肽氨基酸位置 254 處，組胺酸(H)不在肽氨基酸位置 311 處，並且酪胺酸(Y)不在肽氨基酸位置 434 處；

其中該肽氨基酸取代按照 EU 編號。

【第4項】 如請求項1-3中任一項之分離的結合多肽，其中該經修飾的Fc結構域是經修飾的人Fc結構域。

【第5項】 如請求項1-4中任一項之分離的結合多肽，其中該經修飾的Fc結構域是經修飾的IgG1 Fc結構域。

【第6項】如請求項1-5中任一項之分離的結合多肽，其中該結合多肽具有人FcRn結合親和力。

【第7項】如請求項1-5中任一項之分離的結合多肽，其中該結合多肽具有大鼠FcRn結合親和力。

【第8項】如請求項1-7中任一項之分離的結合多肽，其中該結合多肽具有人和大鼠FcRn結合親和力。

【第9項】如請求項2-8中任一項之分離的結合多肽，其中與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，該分離的結合多肽具有改變的血清半衰期。

【第10項】如請求項9之分離的結合多肽，其中與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，該分離的結合多肽具有增加的血清半衰期。

【第11項】如請求項1-8中任一項之分離的結合多肽，其中與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，該分離的結合多肽具有改變的FcRn結合親和力。

【第12項】如請求項11之分離的結合多肽，其中與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，該分離的結合多肽具有增強的FcRn結合親和力。

【第13項】如請求項1-12中任一項之分離的結合多肽，其中與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，該分離的結合多肽在酸性pH下具有增強的FcRn結合親和力。

【第14項】如請求項1-13中任一項之分離的結合多肽，其中與該結合多肽在升高的非酸性pH下的FcRn結合親和力相比，該分離的結合多肽在酸性pH下具有增強的FcRn結合親和力。

【第15項】如請求項12-14中任一項之分離的結合多肽，其中該增強的FcRn結合親和力包括降低的FcRn結合解離速率。

【第16項】如請求項13-15中任一項之分離的結合多肽，其中該酸性pH為約6.0。

【第17項】如請求項13-16中任一項之分離的結合多肽，其中該酸性pH為約6.0並且該非酸性pH為約7.4。

【第18項】如請求項1-17中任一項之分離的結合多肽，其中與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，該分離的結合多肽具有改變的Fc γ RIIa結合親和力。

【第19項】如請求項1-18中任一項之分離的結合多肽，其中與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，該分離的結合多肽具有降低的Fc γ RIIa結合親和力。

【第20項】如請求項1-18中任一項之分離的結合多肽，其中與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，該分離的結合多肽具有增強的Fc γ RIIa結合親和力。

【第21項】如請求項1-18中任一項之分離的結合多肽，其中該分離的結合多肽具有與包含野生型Fc結構域的結合多肽大致相同的Fc γ RIIa結合親和力。

【第22項】如請求項1-21中任一項之分離的結合多肽，其中該分離的結合多肽具有與包含野生型Fc結構域的結合多肽大致相同的熱穩定性。

【第23項】如請求項1-21中任一項之分離的結合多肽，其中該分離的結合多肽具有與包含具有按照EU編號的三重胺基酸取代M252Y/S254T/T256E的經修飾Fc結構域的結合多肽大致相同的熱穩定性。

【第24項】如請求項1-23中任一項之分離的結合多肽，其中該分離的結合多肽是抗體。

【第25項】如請求項1-24中任一項之分離的結合多肽，其中該分離的結合多肽是單株抗體。

【第26項】如請求項24-25中任一項之分離的結合多肽，其中該分離的抗體

是嵌合抗體、人源化抗體或人抗體。

【第27項】 如請求項24-26中任一項之分離的結合多肽，其中該分離的抗體是全長抗體。

【第28項】 如請求項1-27中任一項之分離的結合多肽，其中該分離的結合多肽特異性地結合一種或多種人標靶。

【第29項】 一種分離的核酸分子，其包含編碼如請求項1-28中任一項之分離的多肽之核酸。

【第30項】 一種載體，其包含如請求項29之分離的核酸分子。

【第31項】 如請求項30的載體，其中該載體是表現載體。

【第32項】 一種宿主細胞，其包含如請求項30-31中任一項的載體。

【第33項】 如請求項32的宿主細胞，其中該宿主細胞是真核或原核起源的。

【第34項】 如請求項32-33中任一項的宿主細胞，其中該宿主細胞是哺乳動物起源的。

【第35項】 如請求項32-33中任一項的宿主細胞，其中該宿主細胞是細菌起源的。

【第36項】 一種醫藥組合物，其包含如請求項1-28中任一項之分離的結合多肽。

【第37項】 一種醫藥組合物，其包含如請求項24-27中任一項之分離的抗體。

【第38項】 一種包含經修飾的Fc結構域之分離的結合多肽，其中該經修飾的Fc結構域包含按照EU編號的胺基酸位置256處的天門冬胺酸(D)和胺基酸位置307處的麩醯胺酸(Q)。

【第39項】 一種包含經修飾的Fc結構域之分離的結合多肽，其中該經修飾的Fc結構域包含按照EU編號的胺基酸位置256處的天門冬胺酸(D)和胺基酸位置307處的色胺酸(W)。

【第40項】 一種包含經修飾的Fc結構域之分離的結合多肽，其中該經修飾的Fc結構域包含按照EU編號的胺基酸位置252處的酪胺酸(Y)和胺基酸位置256處的天門冬胺酸(D)。

【第41項】 如請求項38-40中任一項之分離的結合多肽，其中該經修飾的Fc結構域是經修飾的人Fc結構域。

【第42項】 如請求項38-41中任一項之分離的結合多肽，其中該經修飾的Fc結構域是經修飾的IgG1 Fc結構域。

【第43項】 如請求項38-42中任一項之分離的結合多肽，其中該結合多肽具有人FcRn結合親和力。

【第44項】 如請求項38-42中任一項之分離的結合多肽，其中該結合多肽具有大鼠FcRn結合親和力。

【第45項】 如請求項38-44中任一項之分離的結合多肽，其中與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，該分離的結合多肽具有增加的血清半衰期。

【第46項】 如請求項38-44中任一項之分離的結合多肽，其中與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，該分離的結合多肽具有增強的FcRn結合親和力。

【第47項】 如請求項38-44中任一項之分離的結合多肽，其中與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，該分離的結合多肽在酸性pH下具有增強的FcRn結合親和力。

【第48項】 如請求項38-47中任一項之分離的結合多肽，其中與該結合多肽

在升高的非酸性pH下的FcRn結合親和力相比，該分離的結合多肽在酸性pH下具有增強的FcRn結合親和力。

【第49項】 如請求項46-48中任一項之分離的結合多肽，其中該增強的FcRn結合親和力包括降低的FcRn結合解離速率。

【第50項】 如請求項47或48之分離的結合多肽，其中該酸性pH為約6.0。

【第51項】 如請求項47之分離的結合多肽，其中該酸性pH為約6.0並且該非酸性pH為約7.4。

【第52項】 如請求項48之分離的結合多肽，其中該酸性pH為約6.0。

【第53項】 如請求項38-52中任一項之分離的結合多肽，其中與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，該分離的結合多肽具有改變的Fc γ RIIIa結合親和力。

【第54項】 如請求項38-53中任一項之分離的結合多肽，其中該分離的結合多肽是單株抗體。

【第55項】 如請求項38-54中任一項之分離的結合多肽，其中該抗體是嵌合抗體、人源化抗體或人抗體。

【第56項】 如請求項38-55中任一項之分離的結合多肽，其中該分離的結合多肽特異性地結合一種或多種人標靶。

【第57項】 一種分離的核酸分子，其包含編碼如請求項38-56中任一項之分離的多肽的核酸。

【第58項】 一種表現載體，其包含如請求項57的分離的核酸分子。

【第59項】 一種宿主細胞，其包含如請求項58的表現載體。

【第60項】 一種醫藥組合物，其包含如請求項38-58中任一項之分離的結合多肽。

【第61項】一種包含經修飾的Fc結構域的分離的結合多肽，其中該經修飾的Fc結構域包含至少四個胺基酸取代的組合，該組合包含：

胺基酸位置 256 處的天門冬胺酸(D)或穀胺酸(E)和胺基酸位置 307 處的色胺酸(W)或穀醯胺酸(Q)，其中胺基酸位置 254 不是蘇胺酸(T)，並且進一步包含：

胺基酸位置 434 處的苯丙胺酸(F)或酪胺酸(Y)；以及

胺基酸位置 252 處的酪胺酸(Y)，

其中胺基酸位置按照 EU 編號。

【第62項】一種包含經修飾的Fc結構域的分離的結合多肽，該經修飾的Fc結構域具有選自以下之群的位置處的胺基酸取代的組合：

- a) 胺基酸位置 252 處的酪胺酸(Y)、胺基酸位置 256 處的天門冬胺酸(D)、胺基酸位置 307 處的穀醯胺酸(Q)和胺基酸位置 434 處的酪胺酸(Y)；
 - b) 胺基酸位置 252 處的酪胺酸(Y)、胺基酸位置 256 處的穀胺酸(E)、胺基酸位置 307 處的色胺酸(W)和胺基酸位置 434 處的酪胺酸(Y)；
 - c) 胺基酸位置 252 處的酪胺酸(Y)、胺基酸位置 256 處的穀胺酸(E)、胺基酸位置 307 處的穀醯胺酸(Q)和胺基酸位置 434 處的酪胺酸(Y)；
 - d) 胺基酸位置 252 處的酪胺酸(Y)、胺基酸位置 256 處的天門冬胺酸(D)、胺基酸位置 307 處的穀醯胺酸(Q)和胺基酸位置 434 處的苯丙胺酸(F)；或
 - e) 胺基酸位置 252 處的酪胺酸(Y)、胺基酸位置 256 處的天門冬胺酸(D)、胺基酸位置 307 處的色胺酸(W)和胺基酸位置 434 處的酪胺酸(Y)，
- 其中該胺基酸取代按照 EU 編號。

【第63項】一種包含經修飾的Fc結構域的分離的結合多肽，該經修飾的Fc

結構域包含選自以下之群的四重胺基酸取代：

選自 M252Y/T256D/T307Q/N434Y、M252Y/T256E/T307W/N434Y、

M252Y/T256E/T307Q/N434Y、M252Y/T256D/T307Q/N434F 和

M252Y/T256D/T307W/N434Y，

其中該胺基酸取代按照 EU 編號。

【第64項】 如請求項61-63中任一項之分離的結合多肽，其中該經修飾的Fc結構域是經修飾的人Fc結構域。

【第65項】 如請求項61-64中任一項之分離的結合多肽，其中該經修飾的Fc結構域是經修飾的IgG1 Fc結構域。

【第66項】 如請求項61-65中任一項之分離的結合多肽，其中該結合多肽具有人FcRn結合親和力。

【第67項】 如請求項61-65中任一項之分離的結合多肽，其中該結合多肽具有大鼠FcRn結合親和力。

【第68項】 如請求項61-67中任一項之分離的結合多肽，其中該結合多肽具有人和大鼠FcRn結合親和力。

【第69項】 如請求項61-68中任一項之分離的結合多肽，其中與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，該分離的結合多肽具有改變的FcRn結合親和力。

【第70項】 如請求項61-69之分離的結合多肽，其中與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，該分離的結合多肽具有增強的FcRn結合親和力。

【第71項】 如請求項61-70之任一項的分離的結合多肽，其中與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，該分離的結合多肽在酸性pH下具有增強的FcRn結合親和力。

【第72項】如請求項61-71之任一項的分離的結合多肽，其中與包含M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F的結合多肽相比，該分離的結合多肽在酸性pH下具有增強的FcRn結合親和力。

【第73項】如請求項61-72中任一項之分離的結合多肽，其中與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，該分離的結合多肽在非酸性pH下具有增強的FcRn結合親和力。

【第74項】如請求項61-73中任一項之分離的結合多肽，其中與包含M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F的結合多肽相比，該分離的結合多肽在非酸性pH下具有增強的FcRn結合親和力。

【第75項】如請求項61-74中任一項之分離的結合多肽，其中與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，該分離的結合多肽在酸性pH下具有增強的FcRn結合親和力，並且在非酸性pH下具有增強的FcRn結合親和力。

【第76項】如請求項61-75中任一項之分離的結合多肽，其中與包含M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F的結合多肽相比，該分離的結合多肽在酸性pH下具有增強的FcRn結合親和力，並且在非酸性pH下具有增強的FcRn結合親和力。

【第77項】如請求項61-76中任一項之分離的結合多肽，其中該酸性pH為約6.0。

【第78項】如請求項61-77中任一項之分離的結合多肽，其中該非酸性pH為約7.4。

【第79項】如請求項61-78中任一項之分離的結合多肽，其中與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，該分離的結合多肽具有改變的血清半衰期。

【第80項】如請求項61-79中任一項之分離的結合多肽，其中與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，該分離的結合多肽具有減少的血清半衰期。

【第81項】如請求項61-80中任一項之分離的結合多肽，其中與包含M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F的結合多肽相比，該分離的結合多肽具有減少的血清半衰期。

【第82項】如請求項61-81中任一項之分離的結合多肽，其中與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，該分離的結合多肽具有改變的Fc γ RIIIa結合親和力。

【第83項】如請求項61-82中任一項之分離的結合多肽，其中與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，該分離的結合多肽具有降低的Fc γ RIIIa結合親和力。

【第84項】如請求項61-83中任一項之分離的結合多肽，其中與包含M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F的結合多肽相比，該分離的結合多肽具有降低的Fc γ RIIIa結合親和力。

【第85項】如請求項61-84中任一項之分離的結合多肽，其中與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，該分離的結合多肽具有降低的熱穩定性。

【第86項】如請求項61-85中任一項之分離的結合多肽，其中與包含M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F的結合多肽相比，該分離的結合多肽具有降低的熱穩定性。

【第87項】如請求項61-86中任一項之分離的結合多肽，其中該分離的結合多肽是抗體。

【第88項】如請求項61-87中任一項之分離的結合多肽，其中該分離的結合多肽是單株抗體。

【第89項】如請求項61-88中任一項之分離的結合多肽，其中該分離的抗體

是嵌合抗體、人源化抗體或人抗體。

【第90項】如請求項61-89中任一項之分離的結合多肽，其中該分離的抗體是全長抗體。

【第91項】如請求項61-90中任一項之分離的結合多肽，其中該分離的結合多肽特異性地結合一種或多種標靶。

【第92項】一種分離的核酸分子，其包含編碼如請求項61-91中任一項之分離的多肽的核酸。

【第93項】一種載體，其包含如請求項92之分離的核酸分子。

【第94項】如請求項93的載體，其中該載體是表現載體。

【第95項】一種宿主細胞，其包含如請求項93-94中任一項的載體。

【第96項】如請求項95的宿主細胞，其中該宿主細胞是真核或原核起源的。

【第97項】如請求項95-96中任一項的宿主細胞，其中該宿主細胞是哺乳動物起源的。

【第98項】如請求項95-96中任一項的宿主細胞，其中該宿主細胞是細菌起源的。

【第99項】一種醫藥組合物，其包含如請求項61-92中任一項之分離的結合多肽。

【第100項】一種醫藥組合物，其包含如請求項87-90中任一項之分離的抗體。

【第101項】一種包含經修飾的Fc結構域之分離的結合多肽，該經修飾的Fc結構域包含按照EU編號的胺基酸位置252處的酪胺酸(Y)、胺基酸位置256處的天門冬胺酸(D)、胺基酸位置307處的麩醯胺酸(Q)和胺基酸位置434處的酪胺酸

(Y)。

【第102項】 一種包含經修飾的Fc結構域之分離的結合多肽，該經修飾的Fc結構域包含按照EU編號的胺基酸位置252處的酪胺酸(Y)、胺基酸位置256處的麩胺酸(E)、胺基酸位置307處的色胺酸(W)和胺基酸位置434處的酪胺酸(Y)。

【第103項】 一種包含經修飾的Fc結構域之分離的結合多肽，該經修飾的Fc結構域包含按照EU編號的胺基酸位置252處的酪胺酸(Y)、胺基酸位置256處的麩胺酸(E)、胺基酸位置307處的麩醯胺酸(Q)和胺基酸位置434處的酪胺酸(Y)。

【第104項】 一種包含經修飾的Fc結構域之分離的結合多肽，該經修飾的Fc結構域包含按照EU編號的胺基酸位置252處的酪胺酸(Y)、胺基酸位置256處的天門冬胺酸(D)、胺基酸位置307處的麩醯胺酸(Q)和胺基酸位置434處的苯丙胺酸(F)。

【第105項】 一種包含經修飾的Fc結構域之分離的結合多肽，該經修飾的Fc結構域包含按照EU編號的胺基酸位置252處的酪胺酸(Y)、胺基酸位置256處的天門冬胺酸(D)、胺基酸位置307處的色胺酸(W)和胺基酸位置434處的酪胺酸(Y)。

【第106項】 如請求項101-105中任一項之分離的結合多肽，其中該經修飾的Fc結構域是經修飾的人Fc結構域。

【第107項】 如請求項101-106中任一項之分離的結合多肽，其中該經修飾的Fc結構域是經修飾的IgG1 Fc結構域。

【第108項】 如請求項101-107中任一項之分離的結合多肽，其中該結合多肽具有人FcRn結合親和力。

【第109項】 如請求項101-108中任一項之分離的結合多肽，其中與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，該分離的結合多肽具有減少的血清半衰期。

【第110項】如請求項101-109中任一項之分離的結合多肽，其中與包含M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F的結合多肽相比，該分離的結合多肽具有減少的血清半衰期。

【第111項】如請求項101-110中任一項之分離的結合多肽，其中與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，該分離的結合多肽在酸性pH下具有增強的FcRn結合親和力，並且在非酸性pH下具有增強的FcRn結合親和力。

【第112項】如請求項101-111中任一項之分離的結合多肽，其中與包含M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F的結合多肽相比，該分離的結合多肽在酸性pH下具有增強的FcRn結合親和力，並且在非酸性pH下具有增強的FcRn結合親和力。

【第113項】如請求項111或112之分離的結合多肽，其中該酸性pH為約6.0並且該非酸性pH為約7.4。

【第114項】如請求項101-113中任一項之分離的結合多肽，其中與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，該分離的結合多肽具有降低的Fc γ RIIa結合親和力。

【第115項】如請求項101-114中任一項之分離的結合多肽，其中與包含M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F的結合多肽相比，該分離的結合多肽具有降低的Fc γ RIIa結合親和力。

【第116項】如請求項101-115中任一項之分離的結合多肽，其中與包含野生型Fc結構域的結合多肽相比，該分離的結合多肽具有降低的熱穩定性。

【第117項】如請求項101-116中任一項之分離的結合多肽，其中與包含M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F的結合多肽相比，該分離的結合多肽具有降

低的熱穩定性。

【第118項】 如請求項101-117中任一項之分離的結合多肽，其中該分離的結合多肽是單株抗體。

【第119項】 如請求項118之分離的結合多肽，其中該抗體是嵌合抗體、人源化抗體或人抗體。

【第120項】 如請求項101-119中任一項之分離的結合多肽，其中該分離的結合多肽特異性地結合一種或多種標靶。

【第121項】 一種分離的核酸分子，其包含編碼如請求項101-120中任一項之分離的多肽的核酸。

【第122項】 一種表現載體，其包含如請求項121之分離的核酸分子。

【第123項】 一種宿主細胞，其包含如請求項122的表現載體。

【第124項】 一種醫藥組合物，其包含如請求項101-120中任一項之分離的結合多肽。

【第125項】 一種治療有需要的受試者之疾病或障礙的方法，其包括向該受試者投予治療有效量的如請求項1-28、38-58、61-91和101-120中任一項之分離的結合多肽，或向該受試者投予治療有效量的如請求項36-37、60、99-100和124中任一項的醫藥組合物。

【第126項】 如請求項125的方法，其中該疾病或障礙是癌症。

【第127項】 如請求項126的方法，其中該癌症是腫瘤。

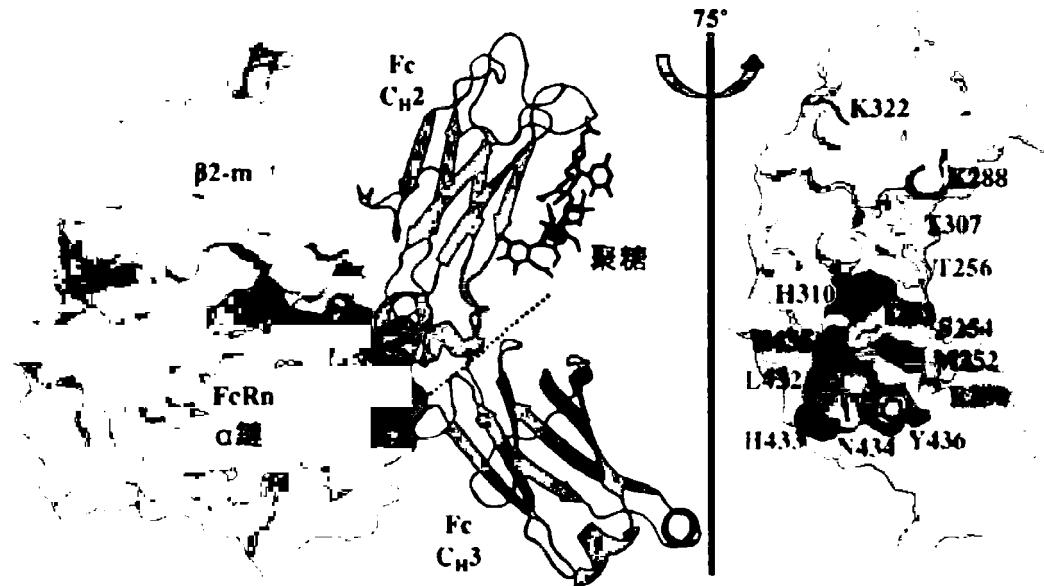
【第128項】 如請求項125的方法，其中該疾病或障礙是自身免疫障礙。

【第129項】 一種治療有需要的受試者的癌症的方法，其包括向該受試者投予治療有效量的如請求項1-28和38-58中任一項之分離的結合多肽，或向該受試

者投予治療有效量的如請求項36、37和60中任一項的醫藥組合物。

【第130項】 一種治療有需要的受試者的自身免疫障礙的方法，其包括向該受試者投予治療有效量的如請求項61-91和101-120中任一項之分離的結合多肽，或向該受試者投予治療有效量的如請求項99、100和124中任一項的醫藥組合物。

【發明圖式】

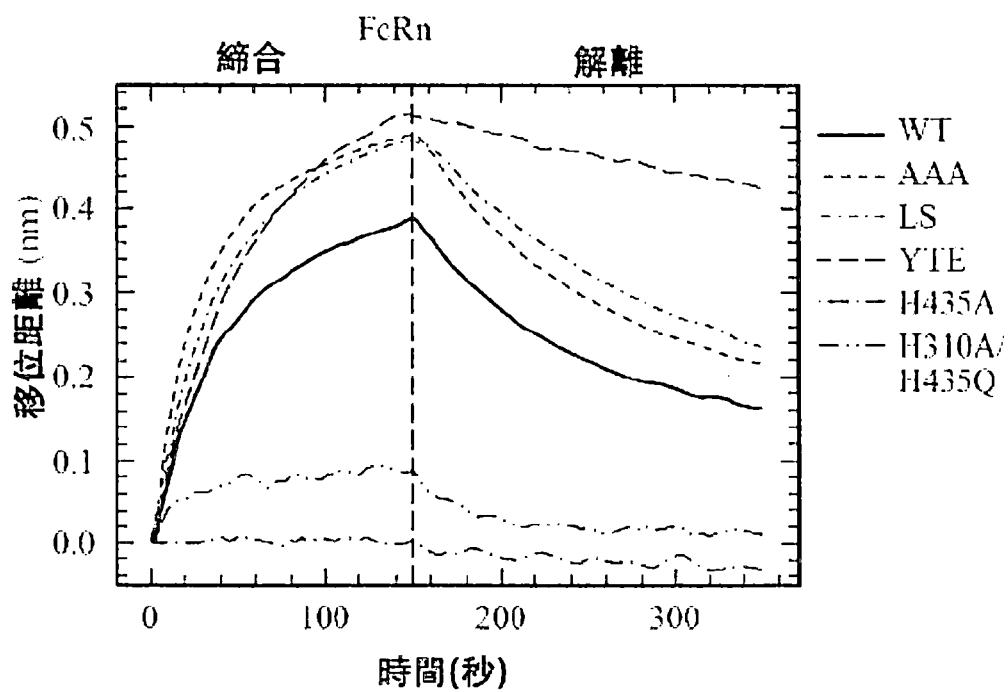


【圖1A】

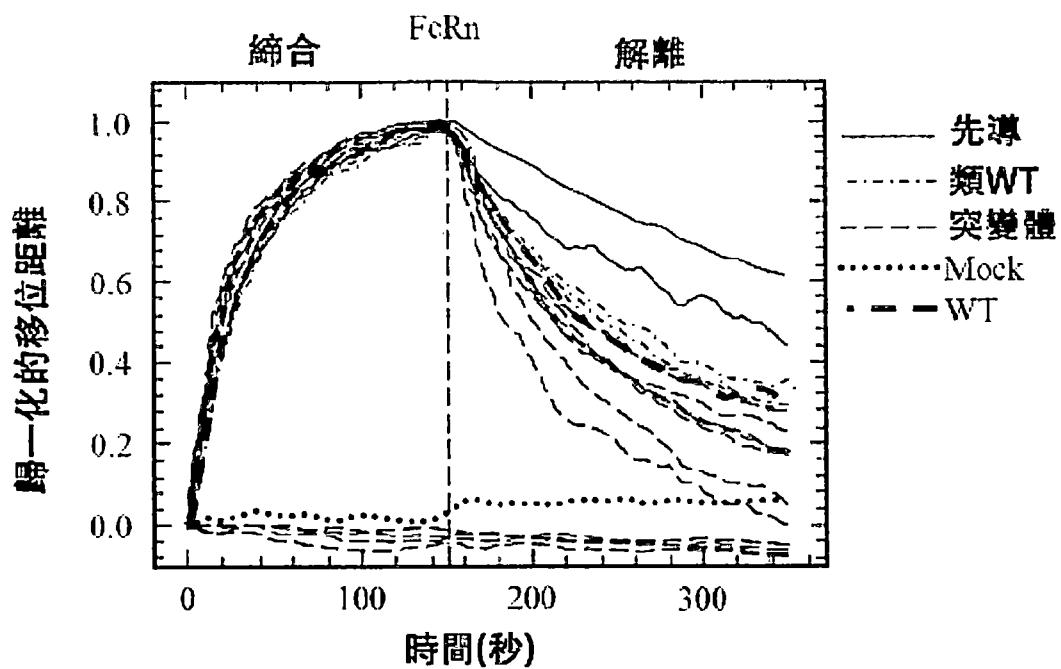
【圖1B】



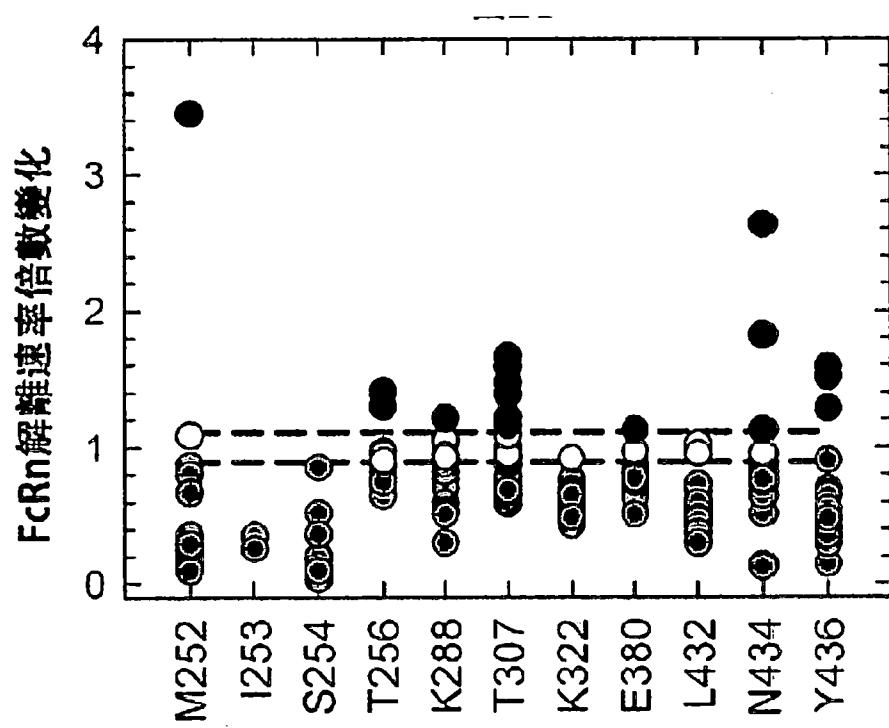
【圖2A】



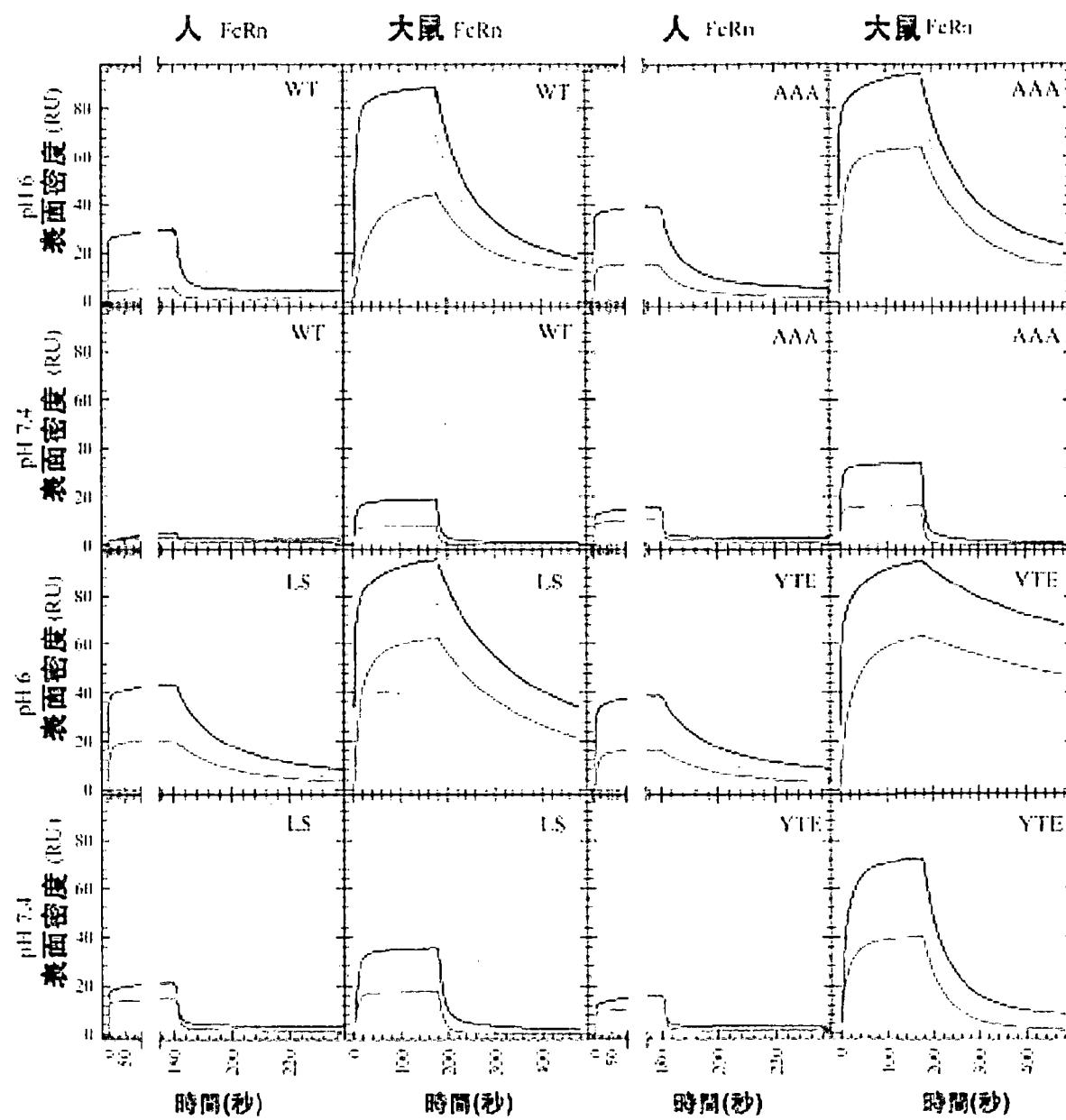
【圖2B】



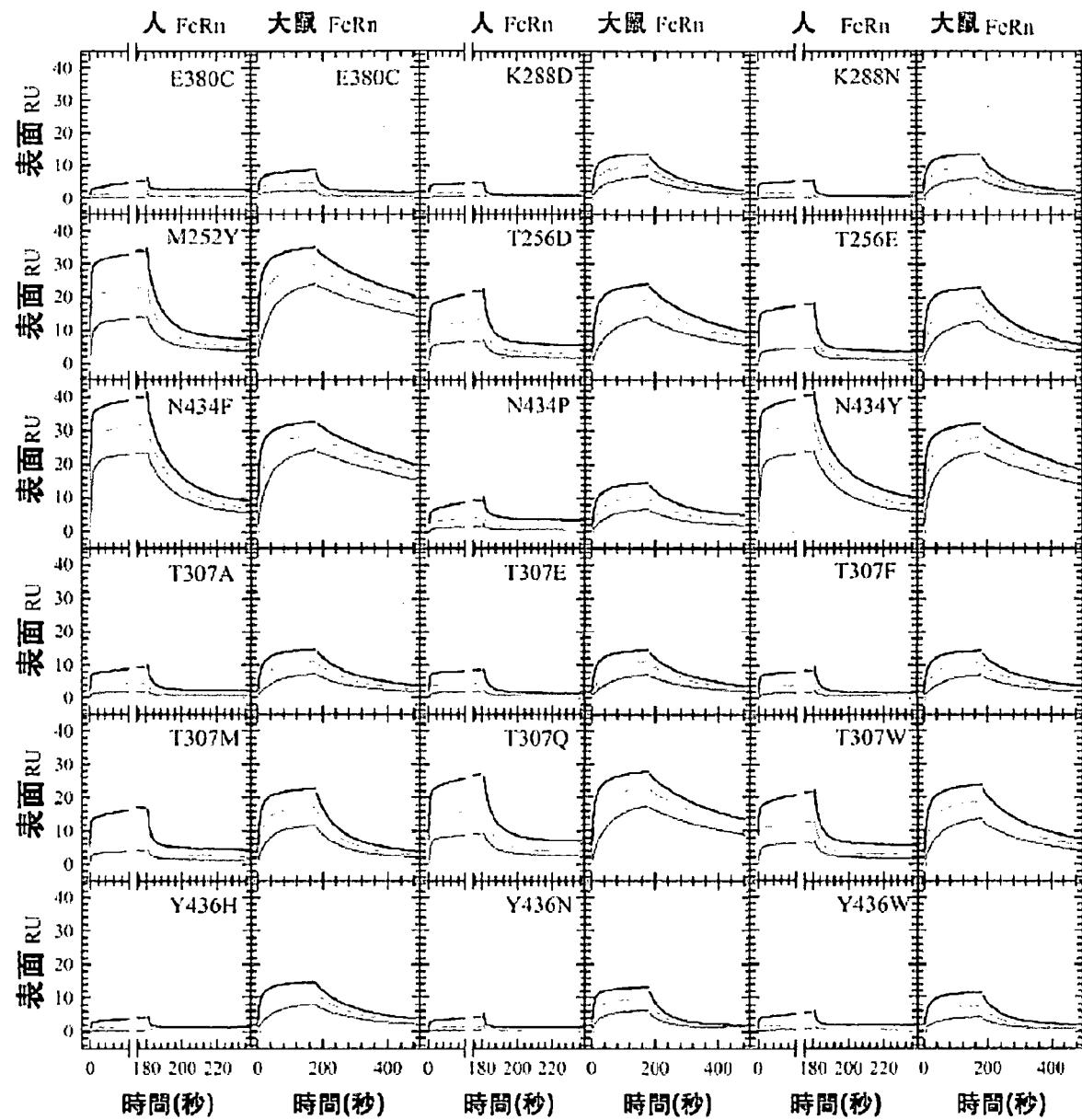
【圖2C】



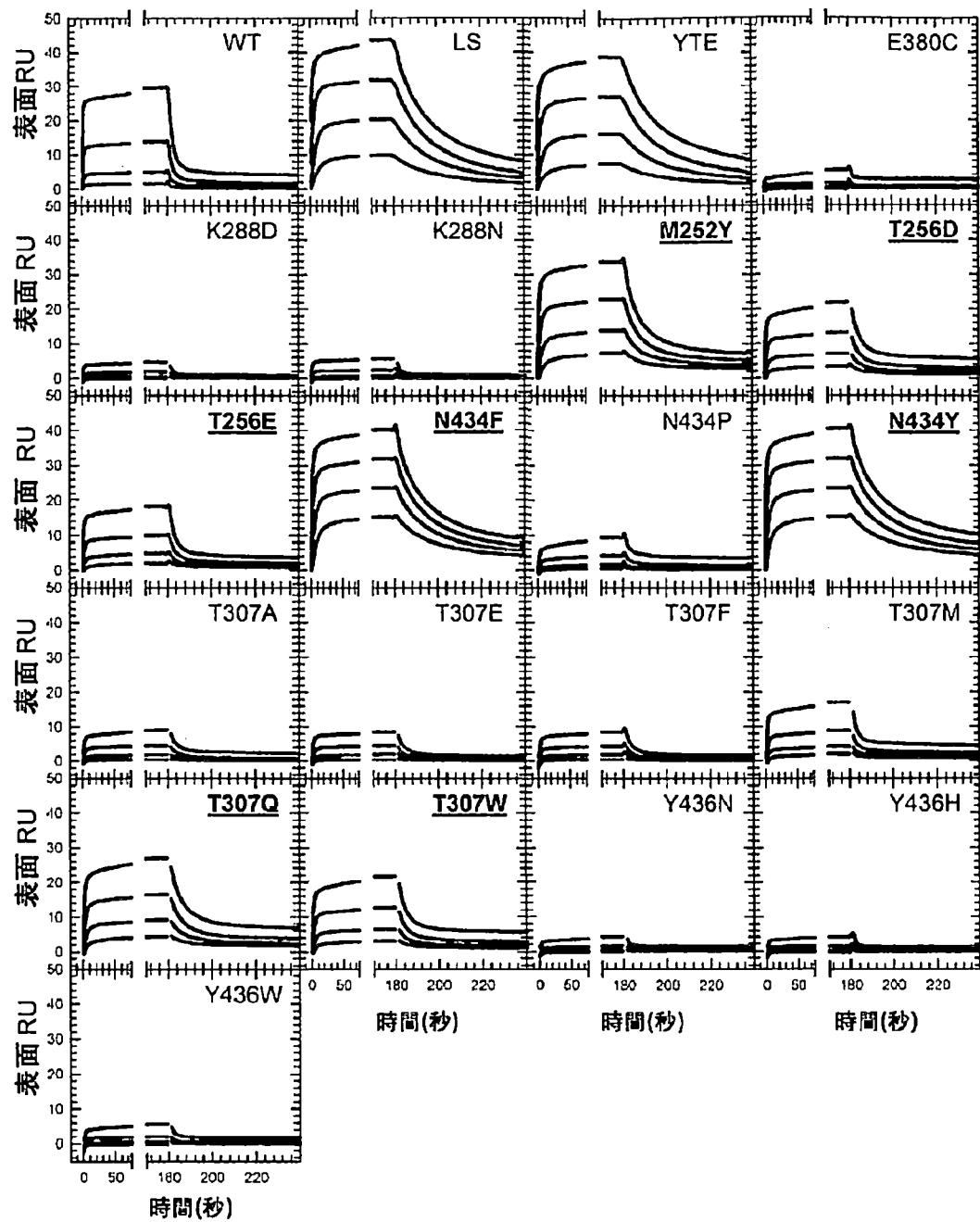
【圖2D】



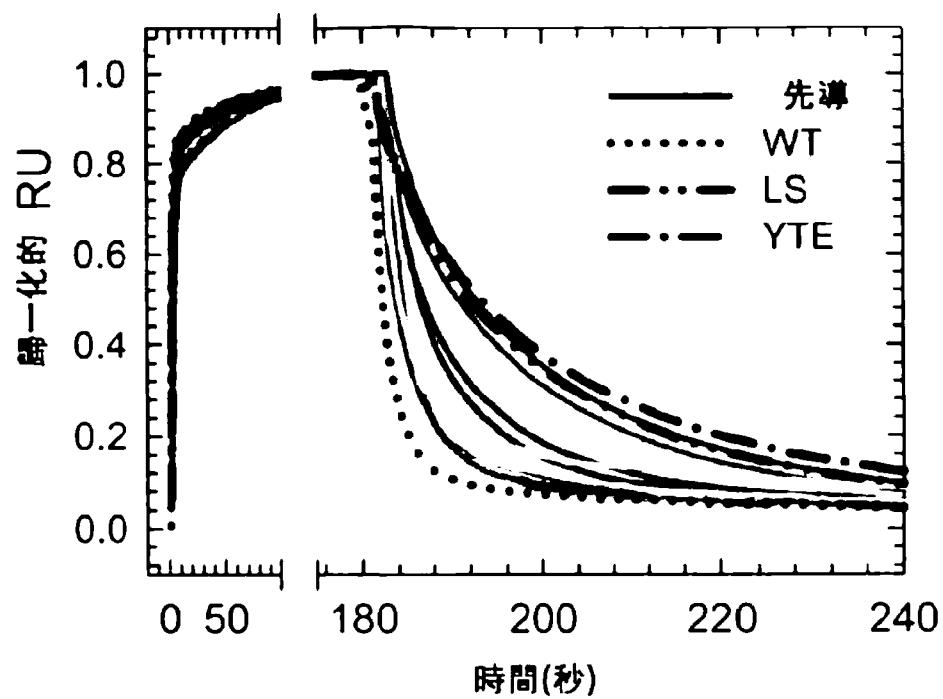
【圖3】



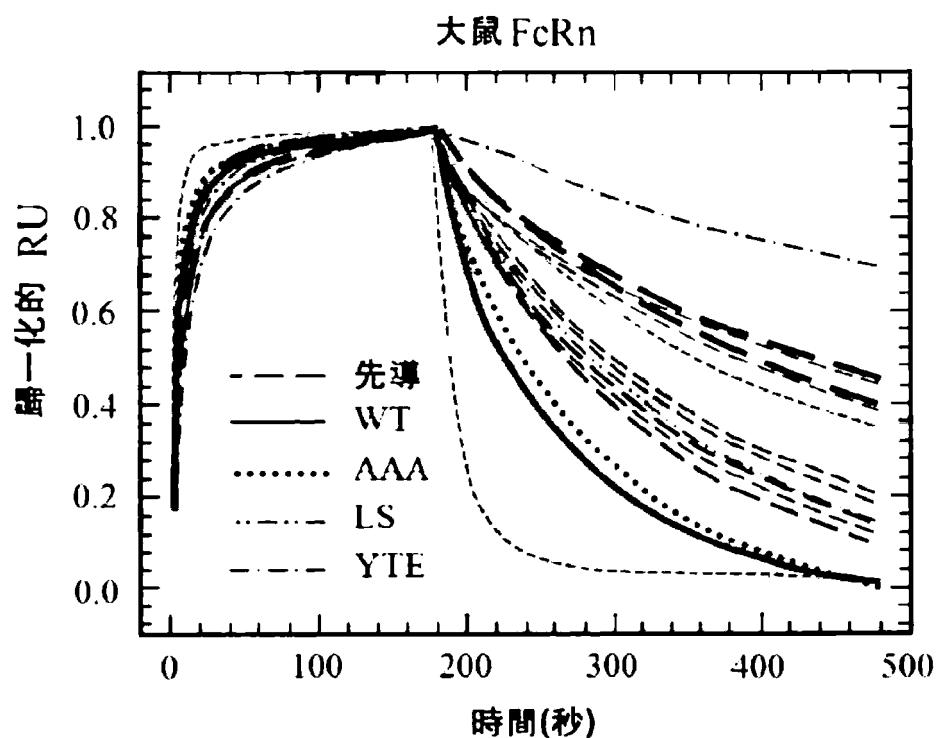
【圖4A】



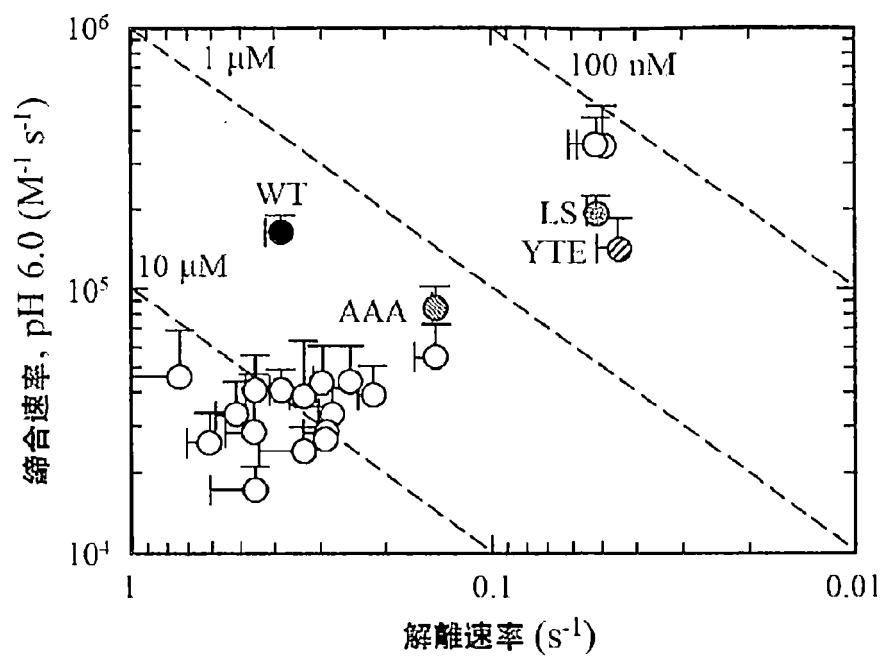
【圖4B】



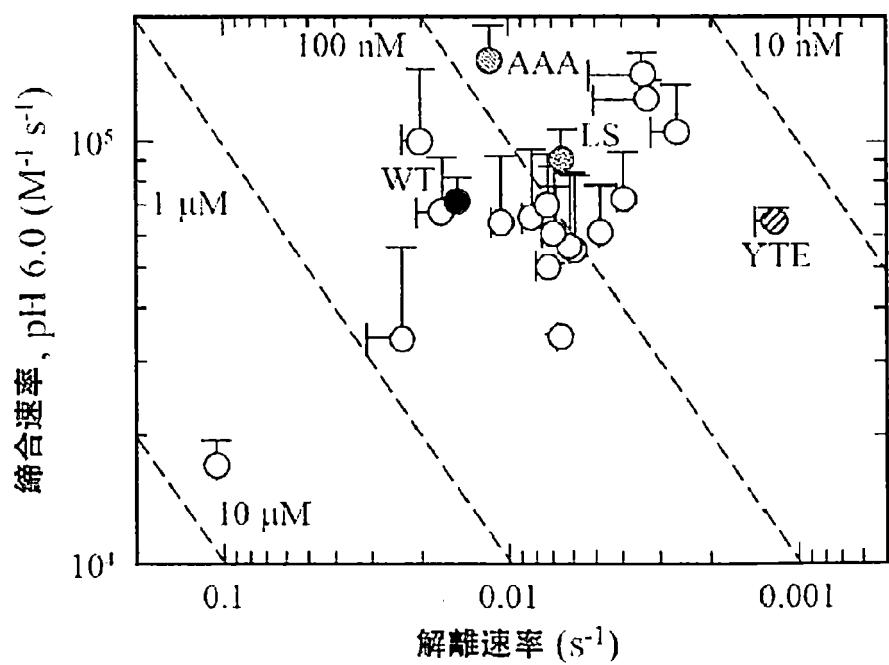
【圖5A】



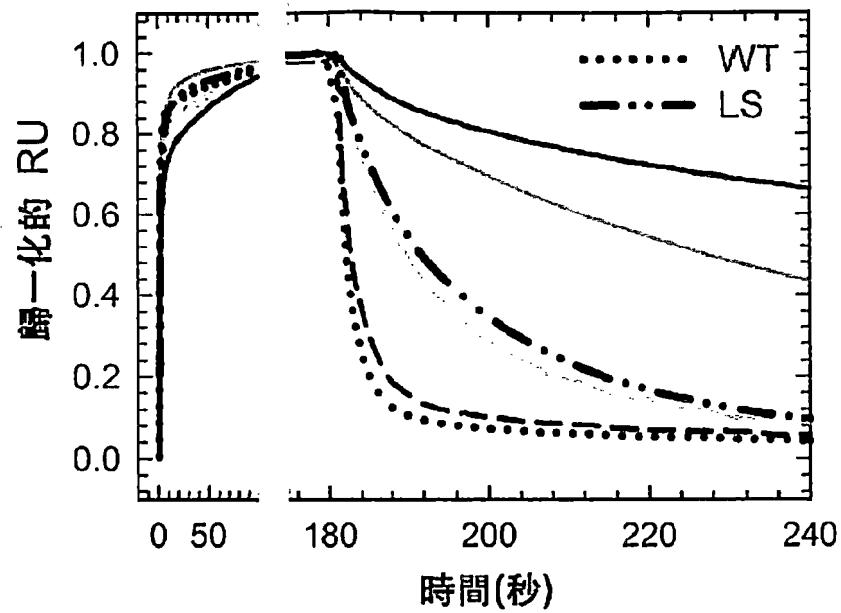
【圖5B】



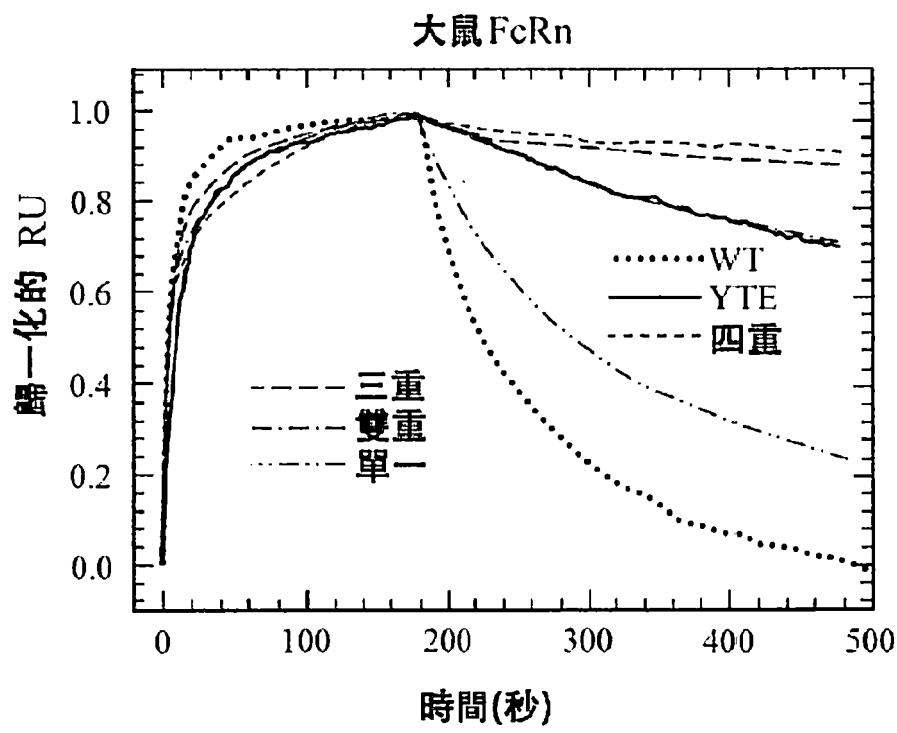
【圖5C】



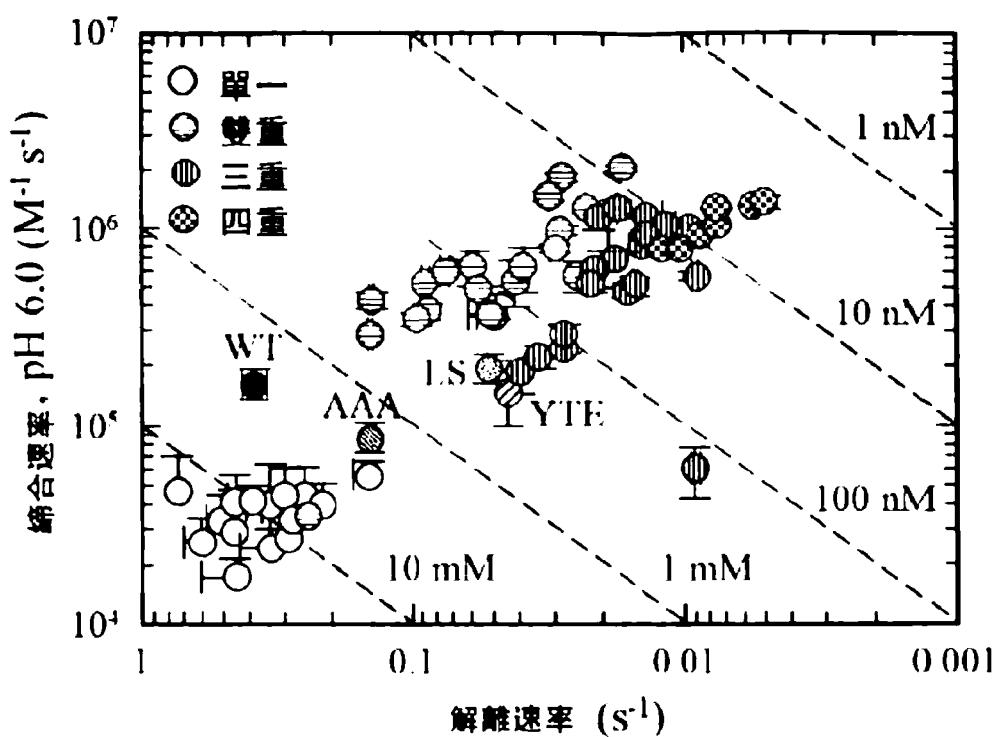
【圖5D】



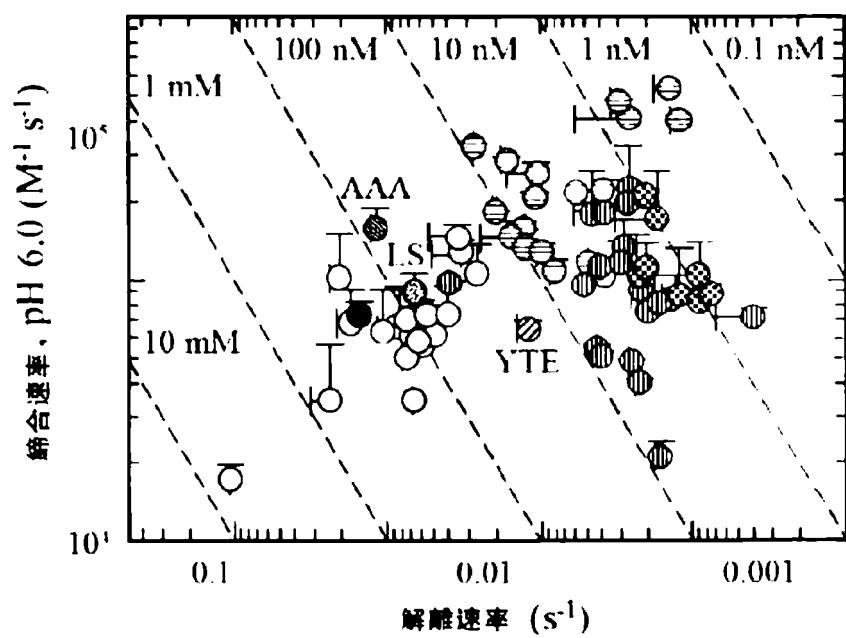
【圖6A】



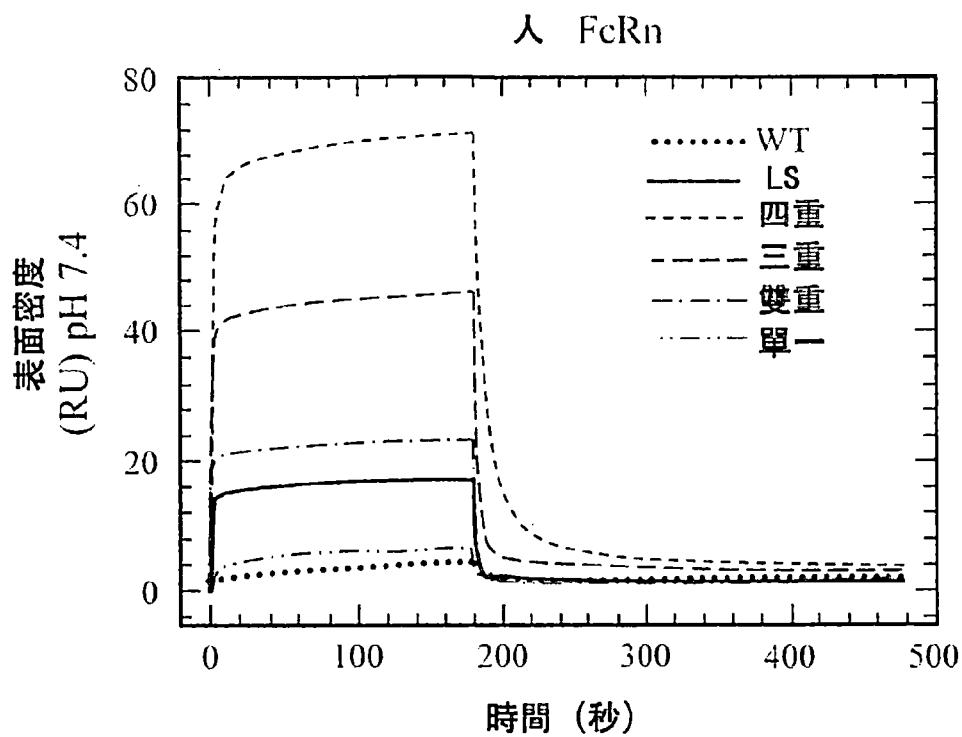
【圖6B】



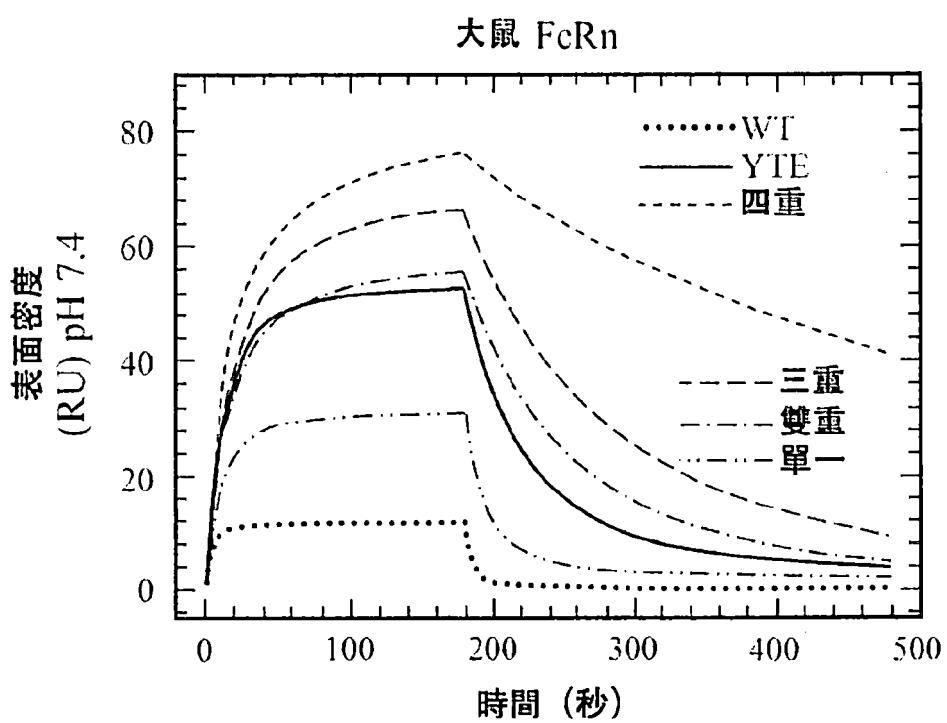
【圖6C】



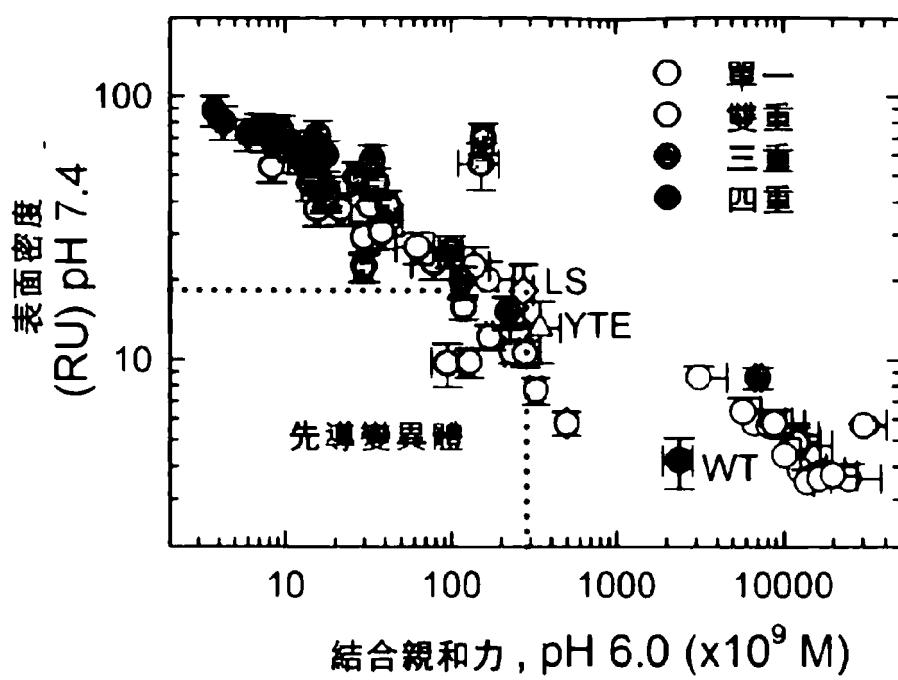
【圖6D】



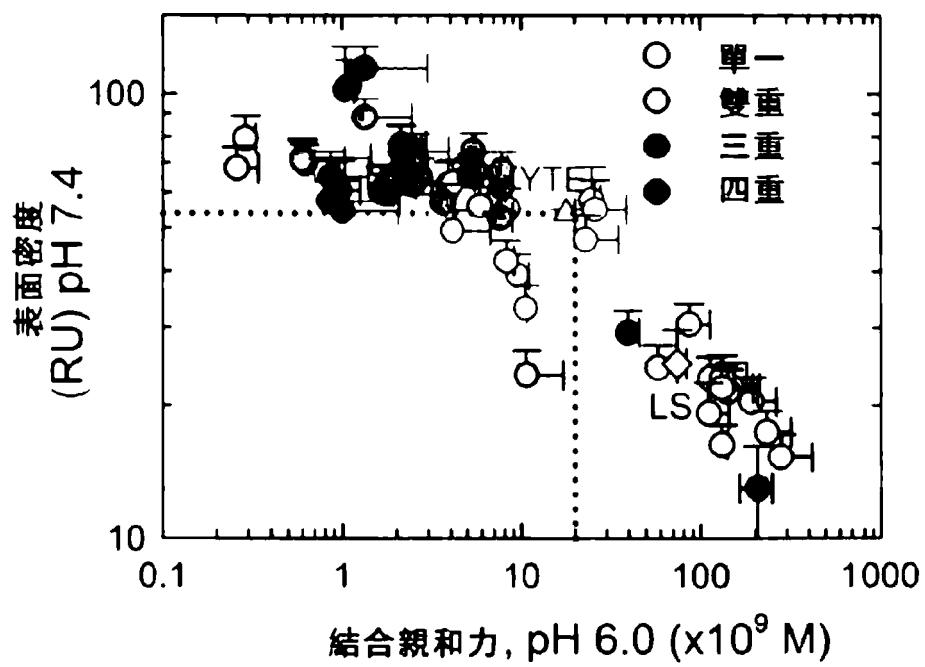
【圖7A】



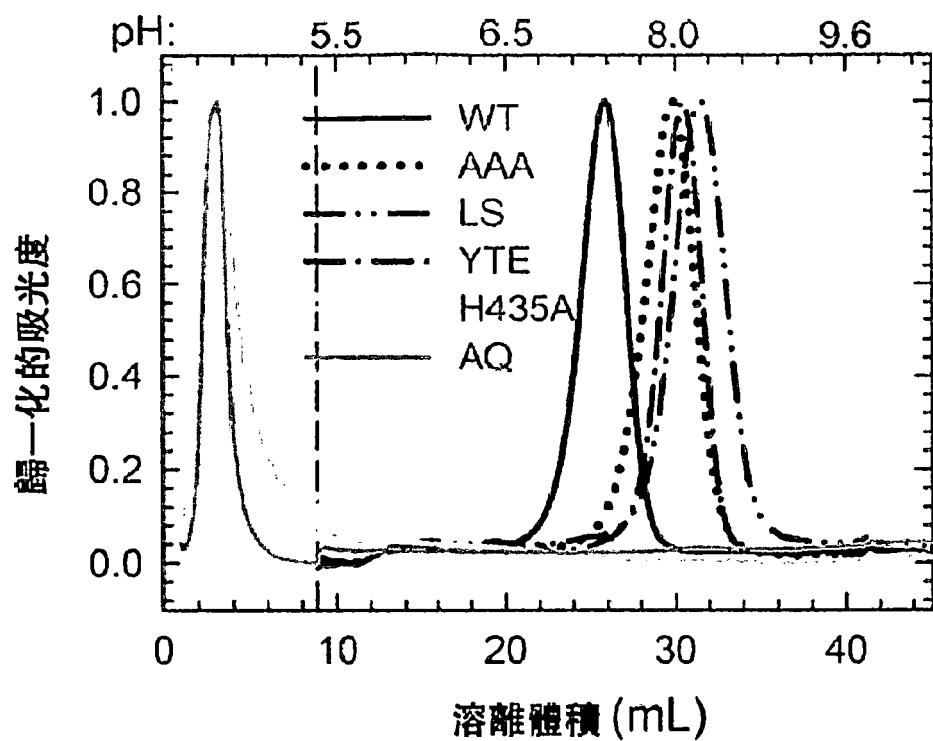
【圖7B】



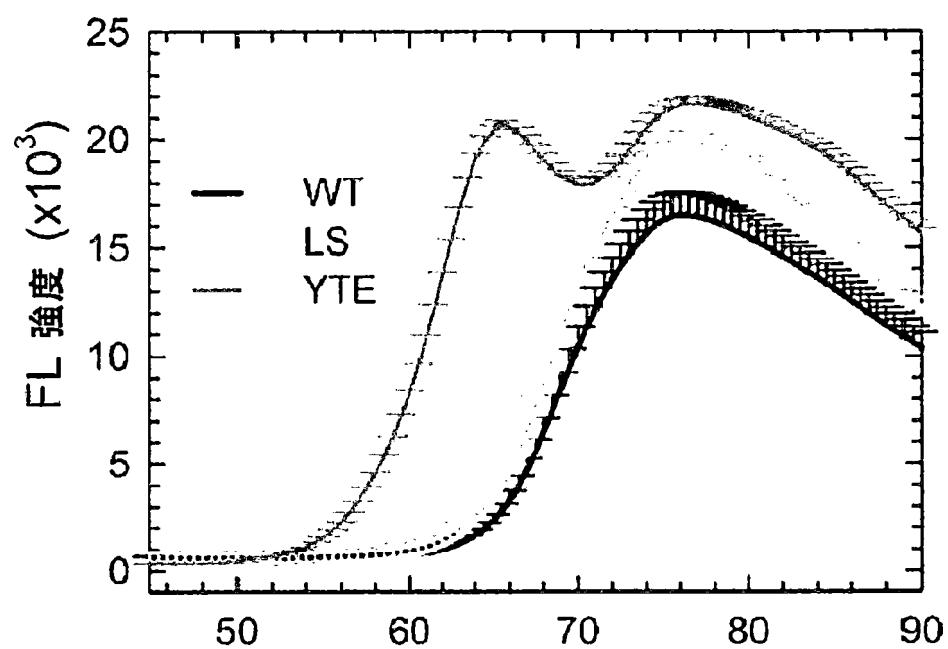
【圖7C】



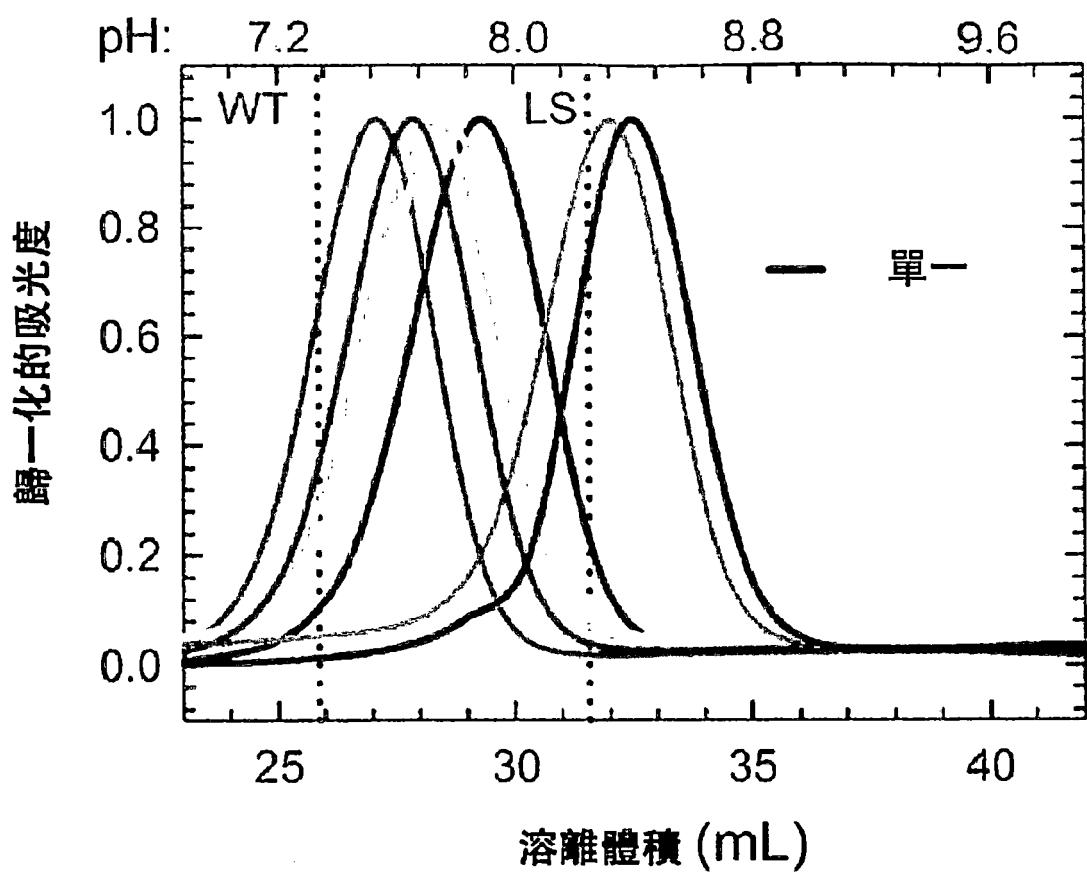
【圖7D】



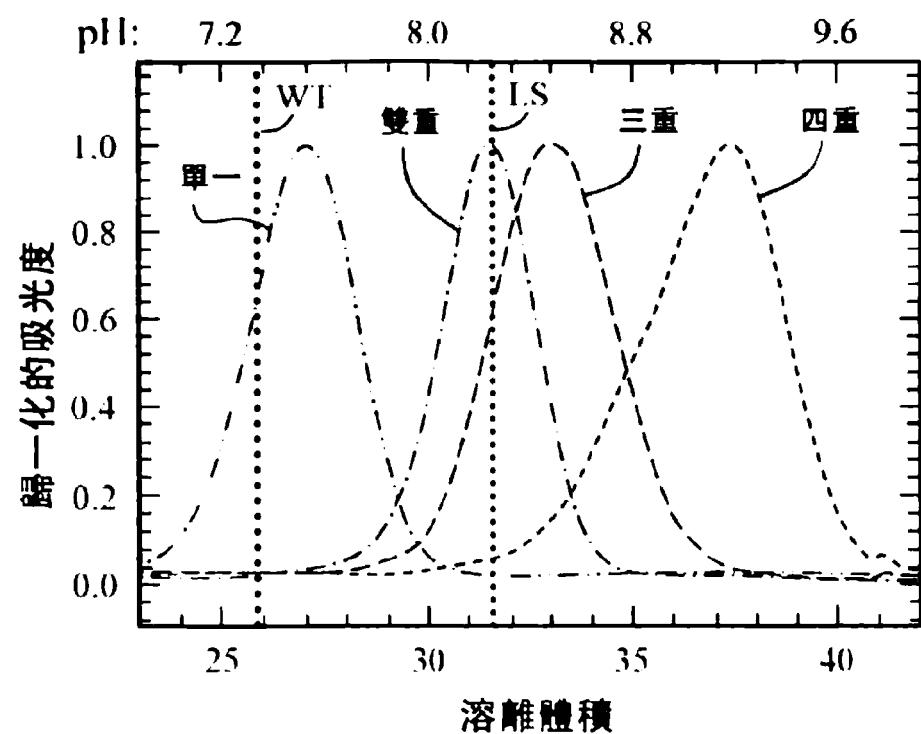
【圖8A】



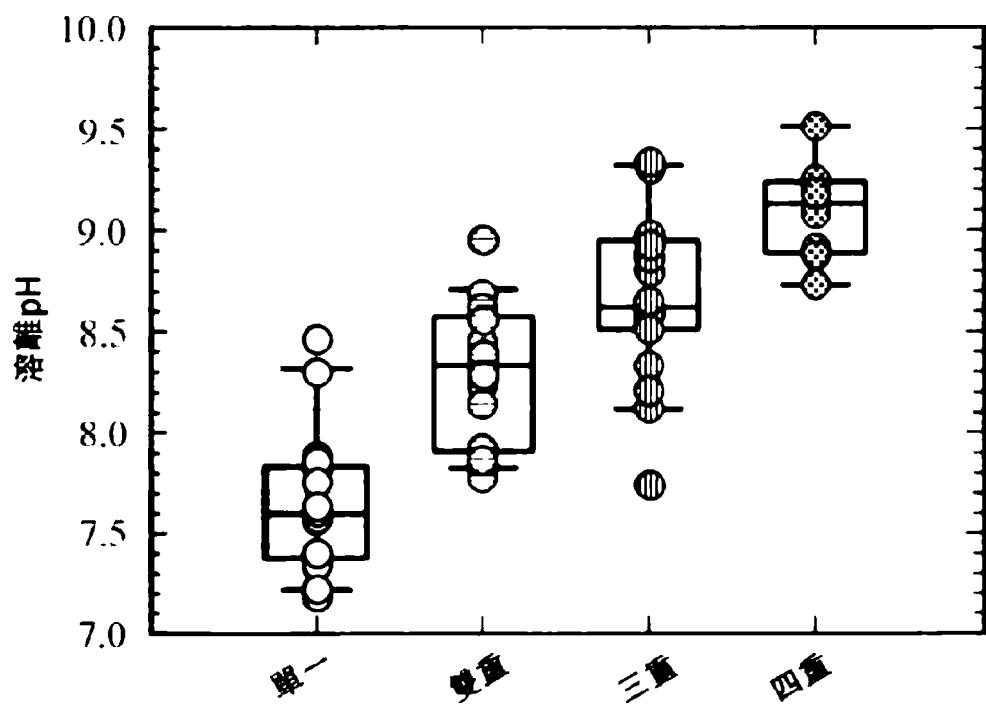
【圖8B】



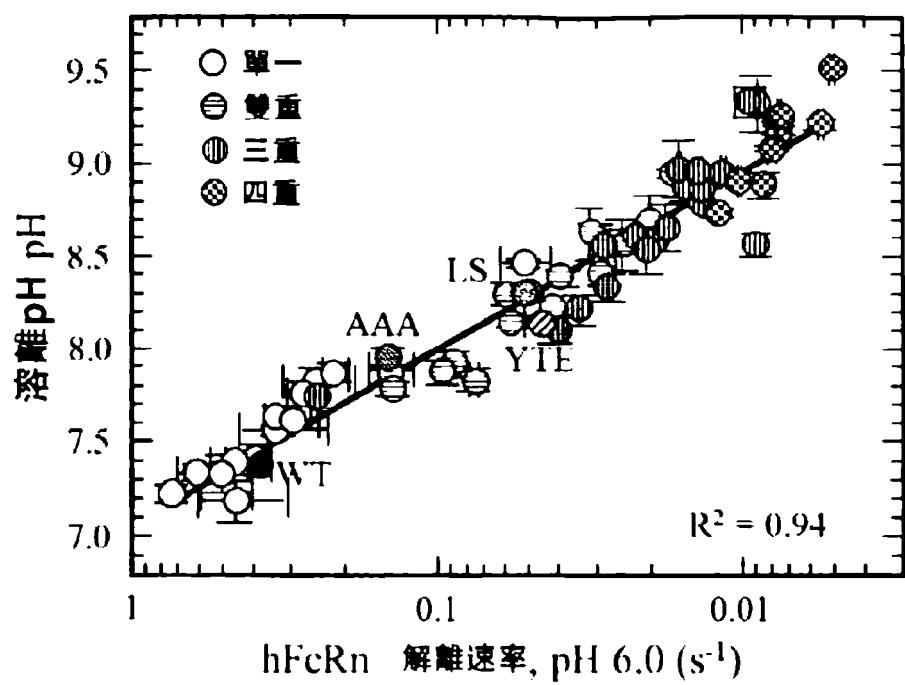
【圖8C】



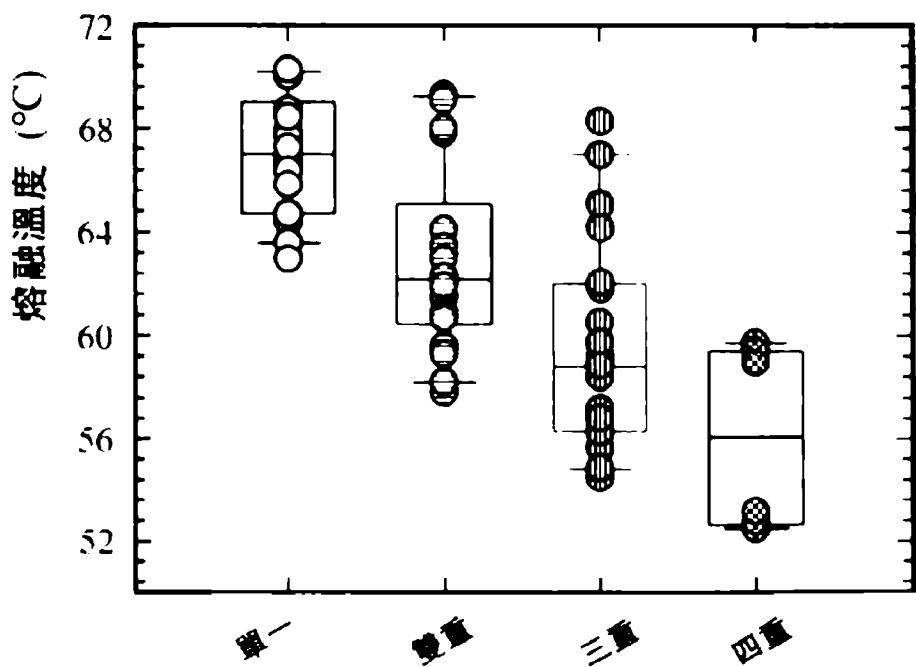
【圖9A】



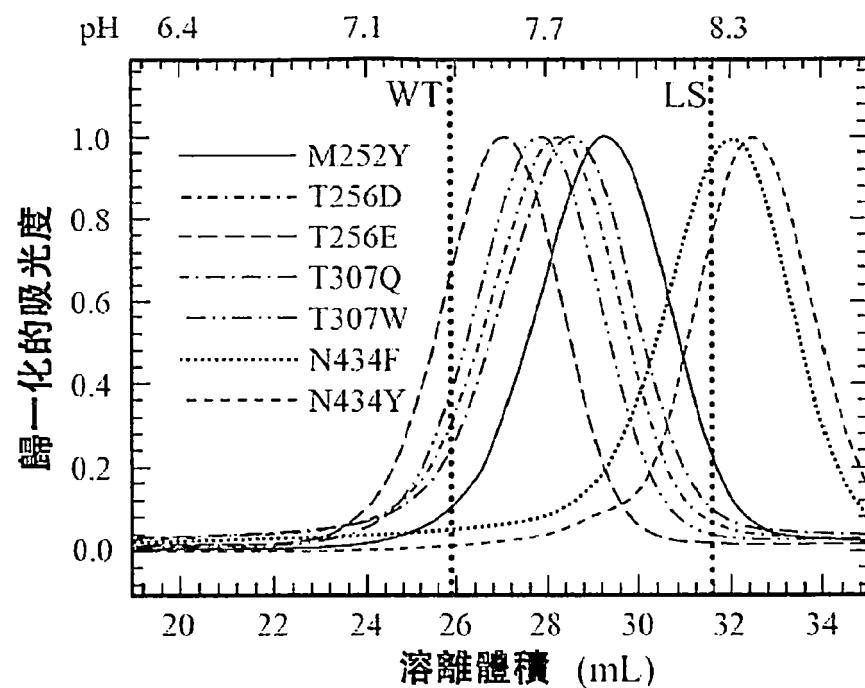
【圖9B】



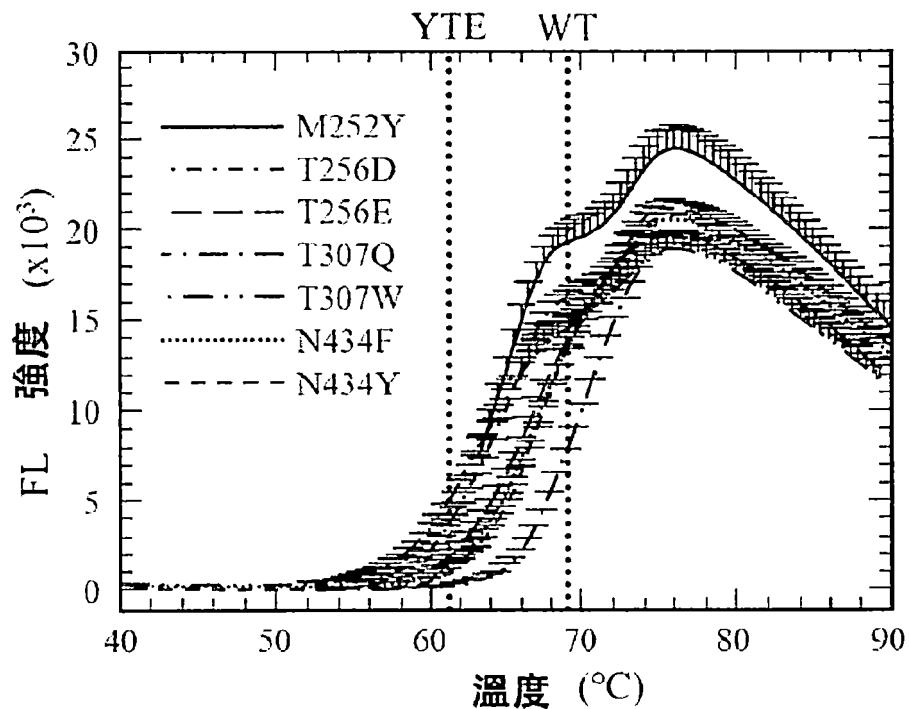
【圖9C】



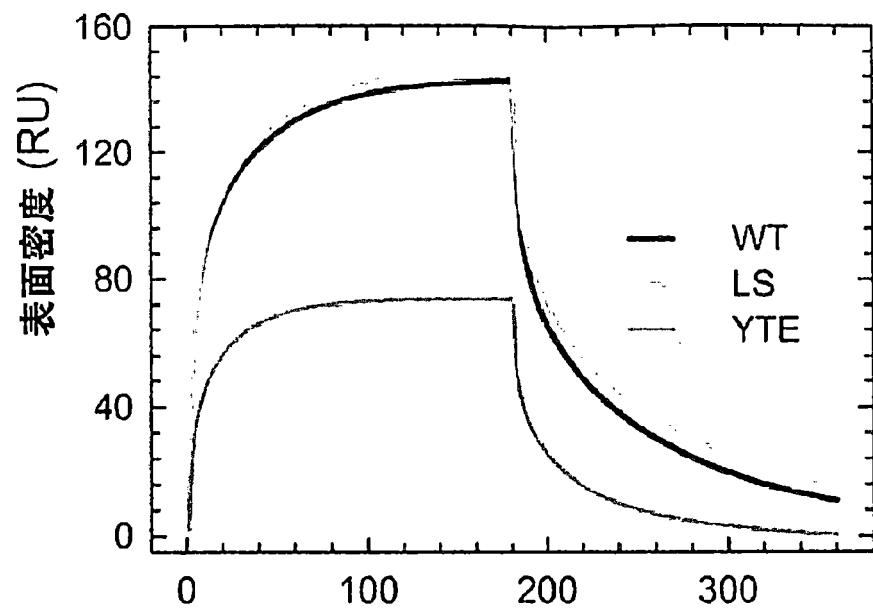
【圖9D】



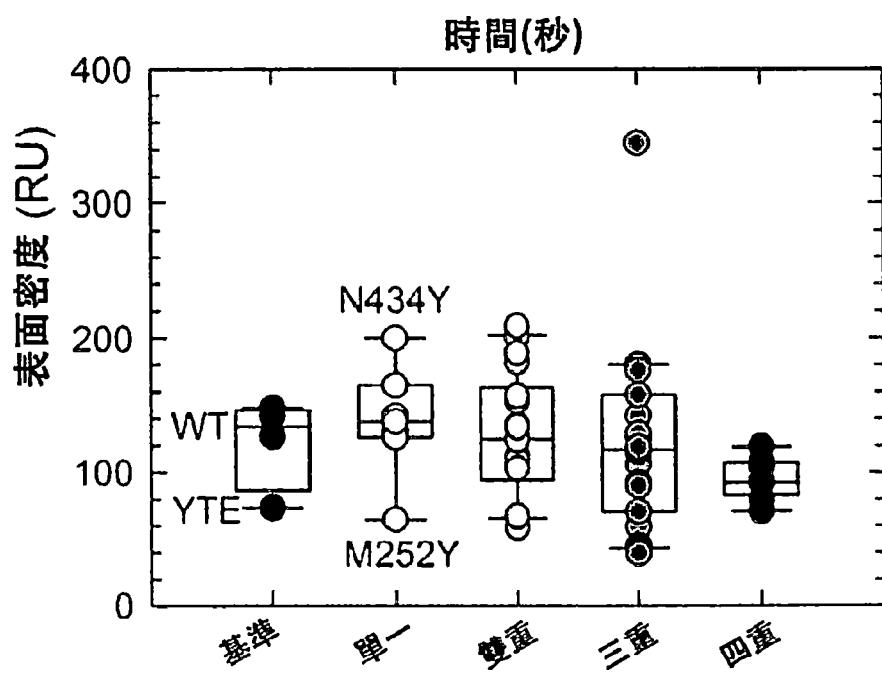
【圖10A】



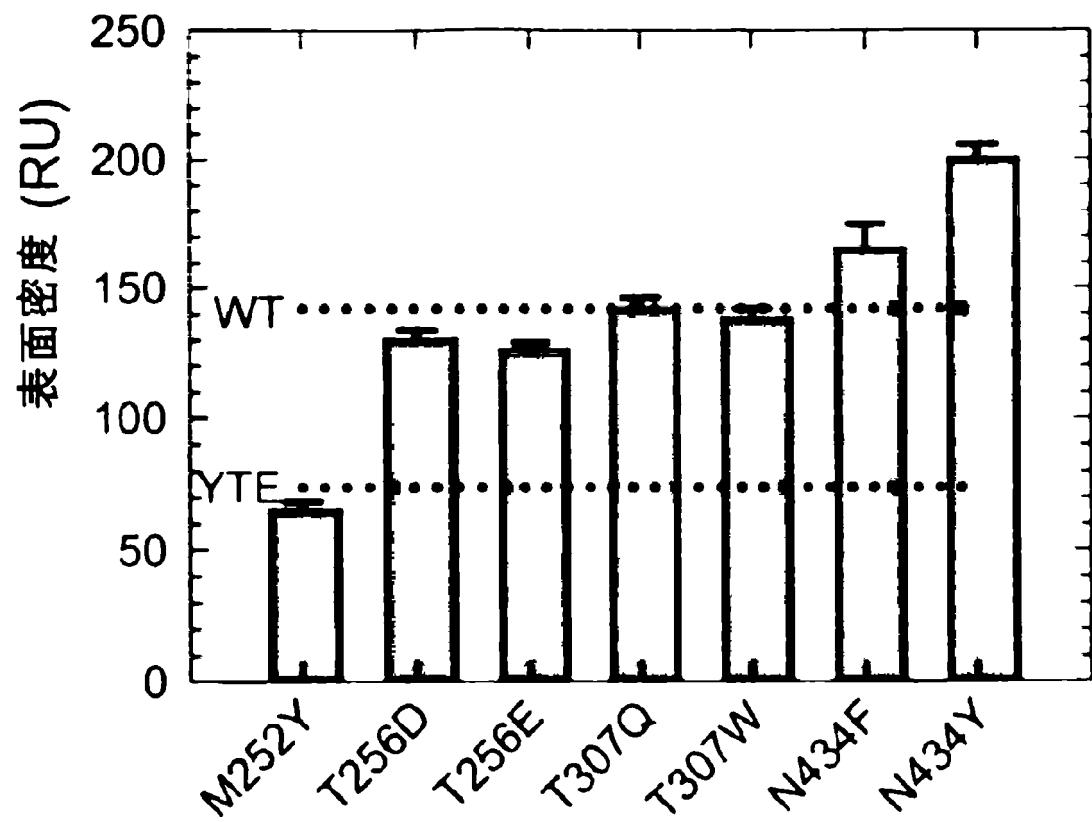
【圖10B】



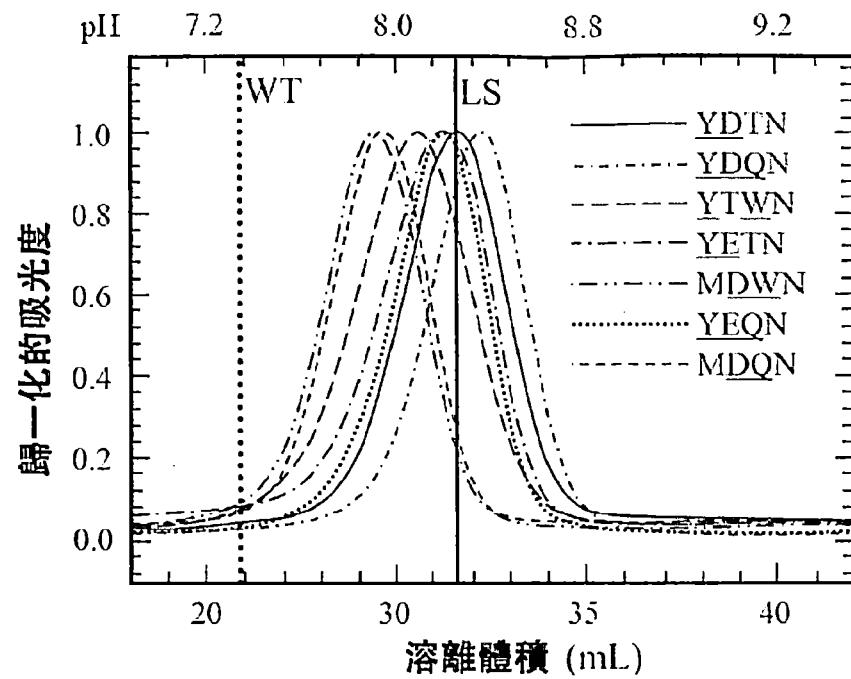
【圖11A】



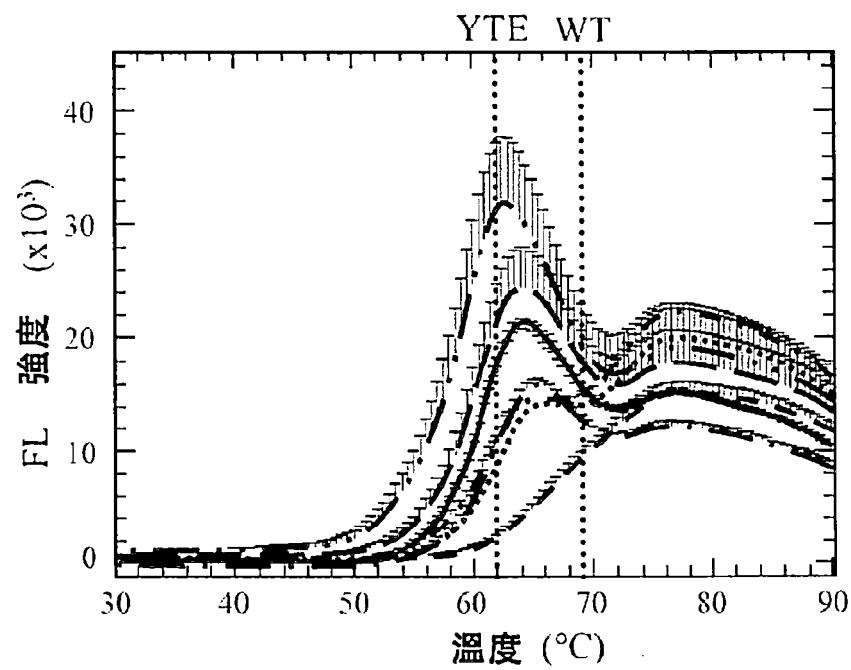
【圖11B】



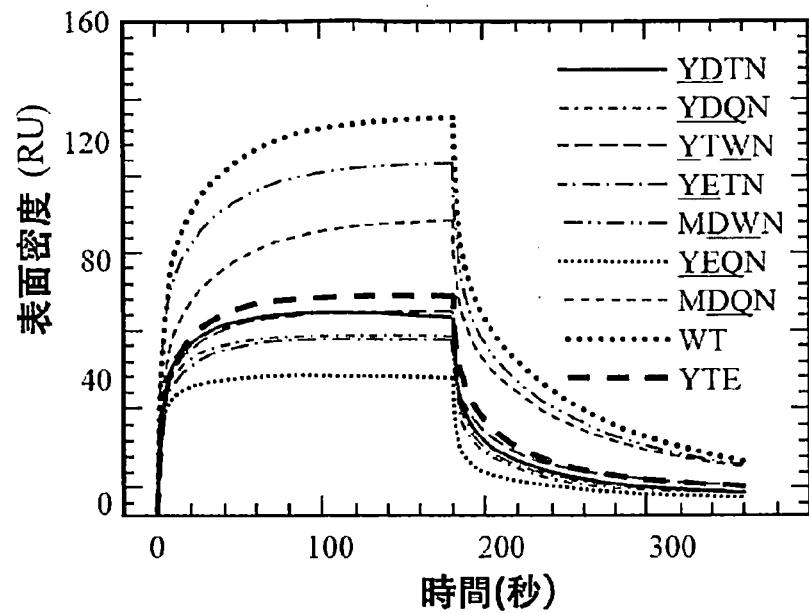
【圖11C】



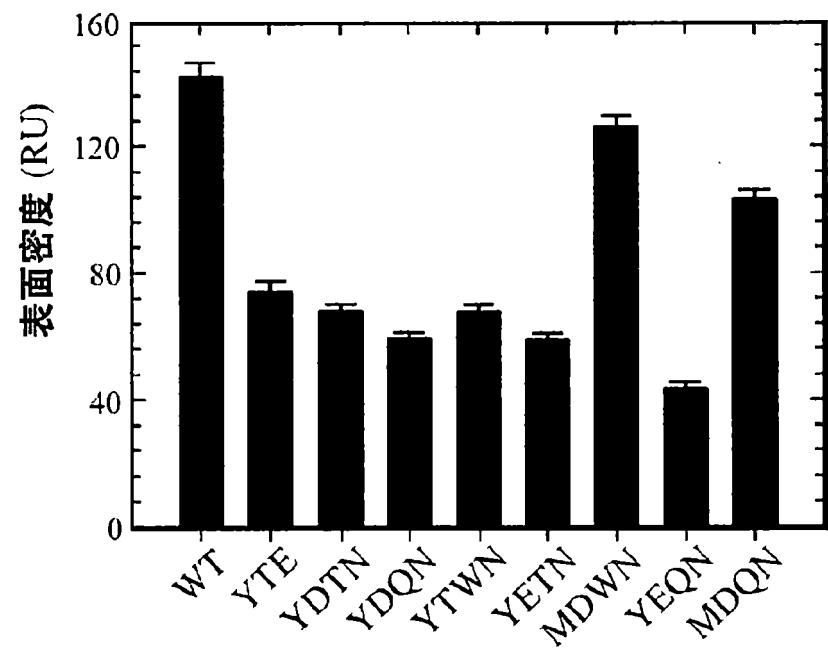
【圖12A】



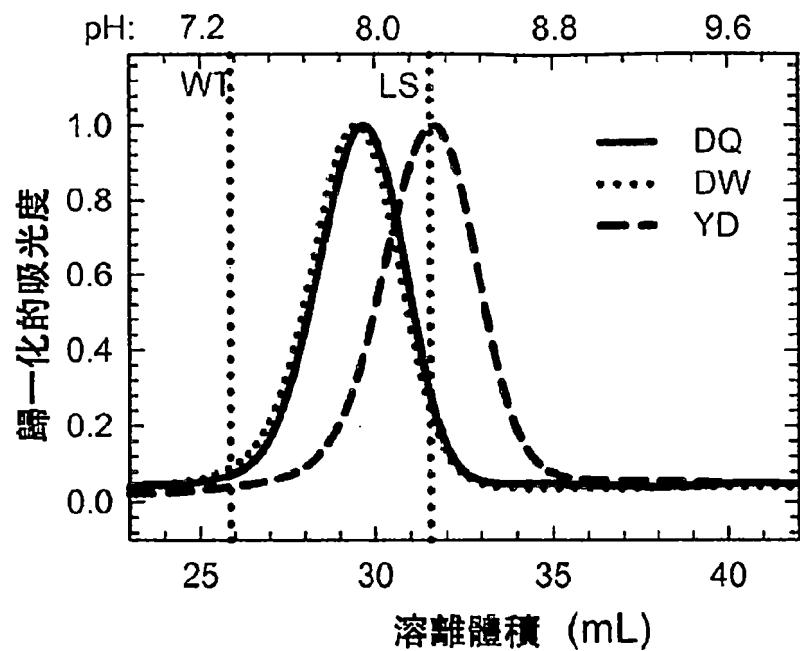
【圖12B】



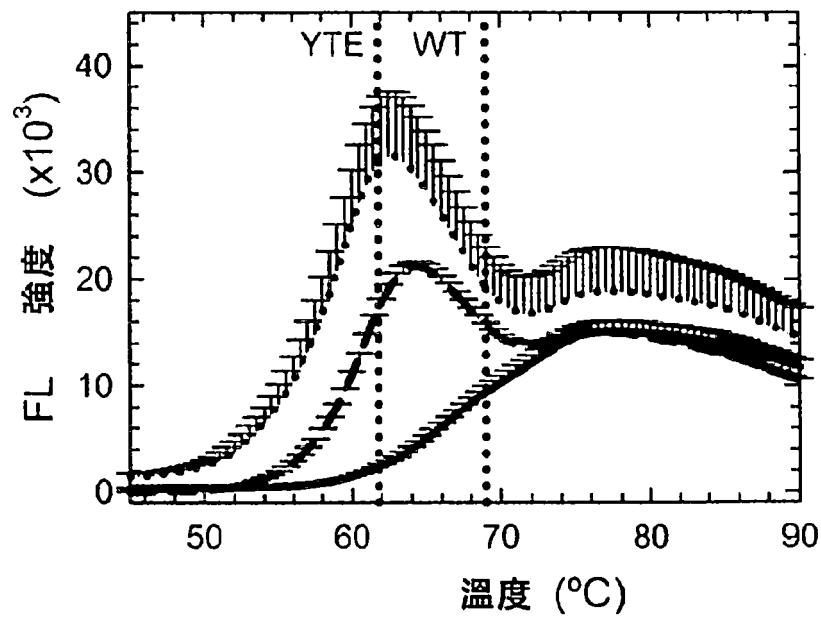
【圖12C】



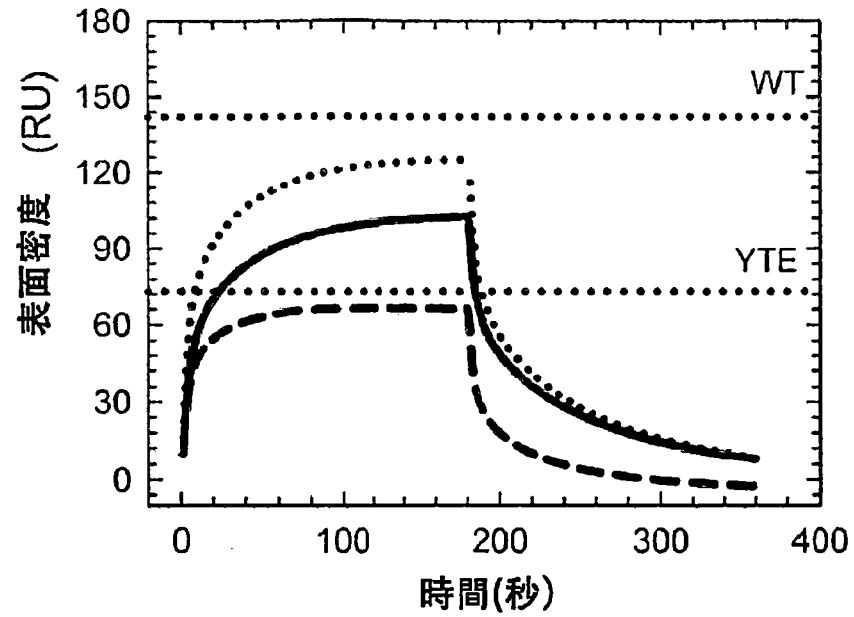
【圖12D】



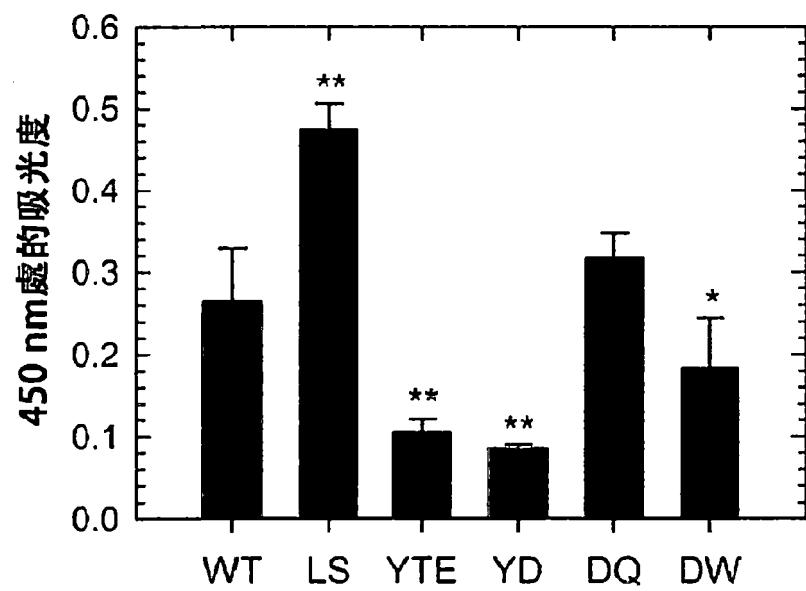
【圖12E】



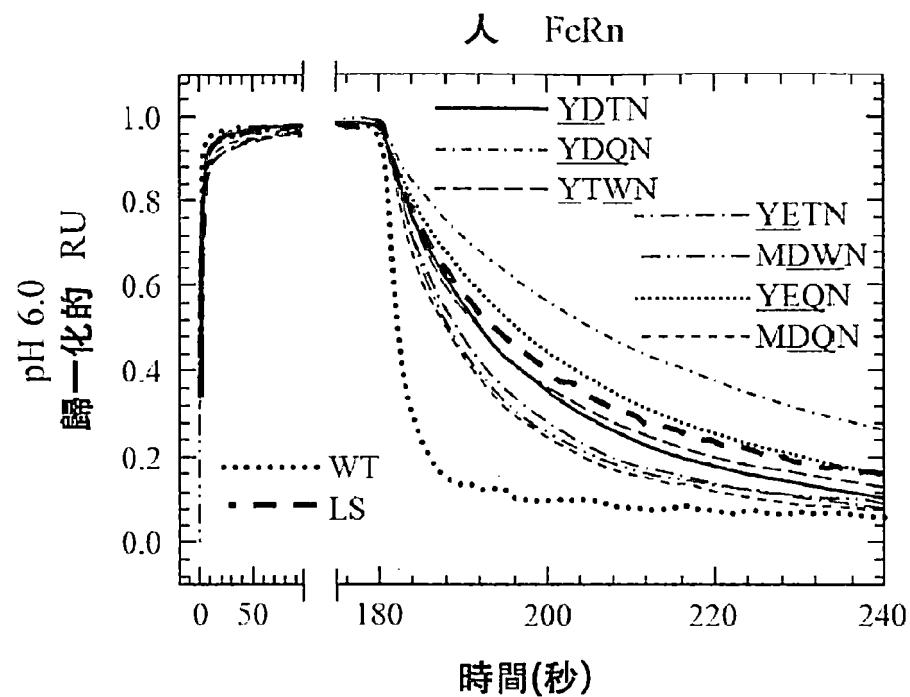
【圖12F】



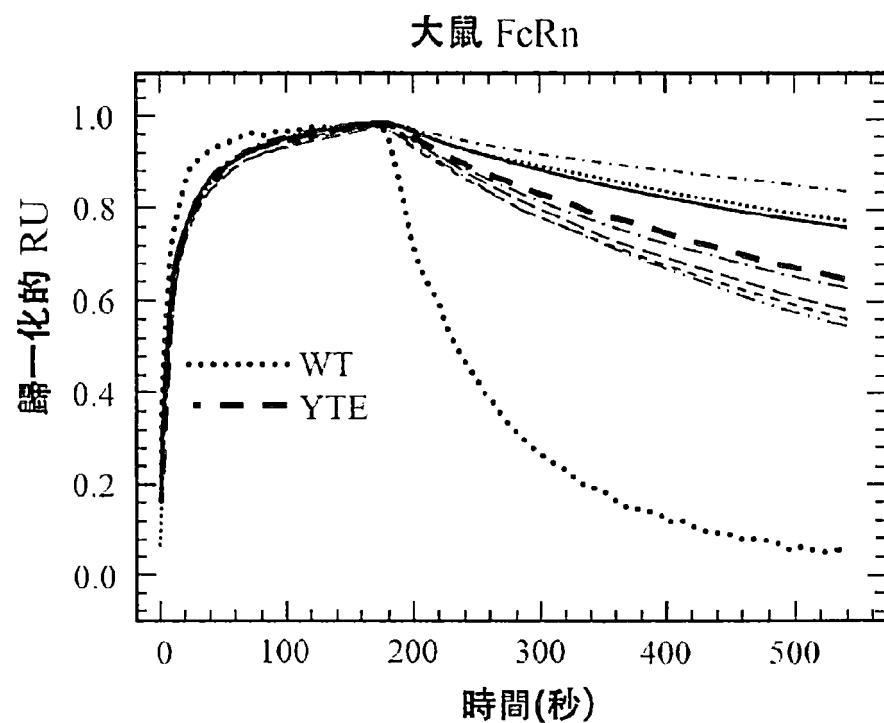
【圖12G】



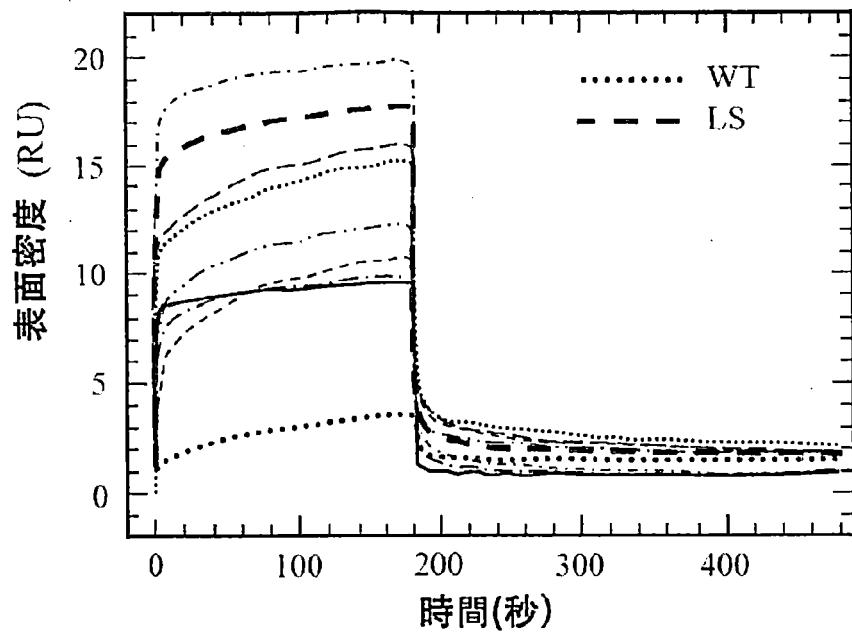
【圖12H】



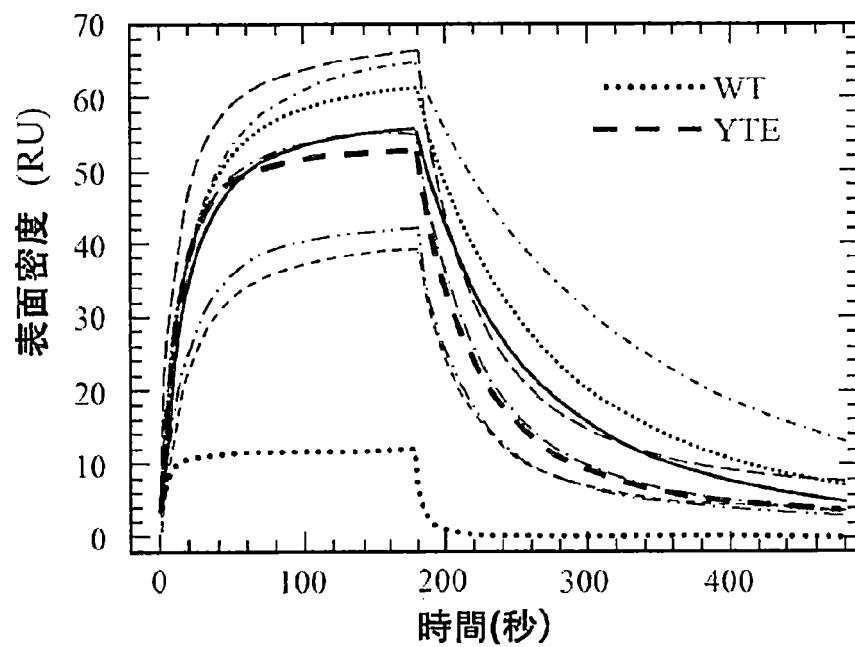
【圖13A】



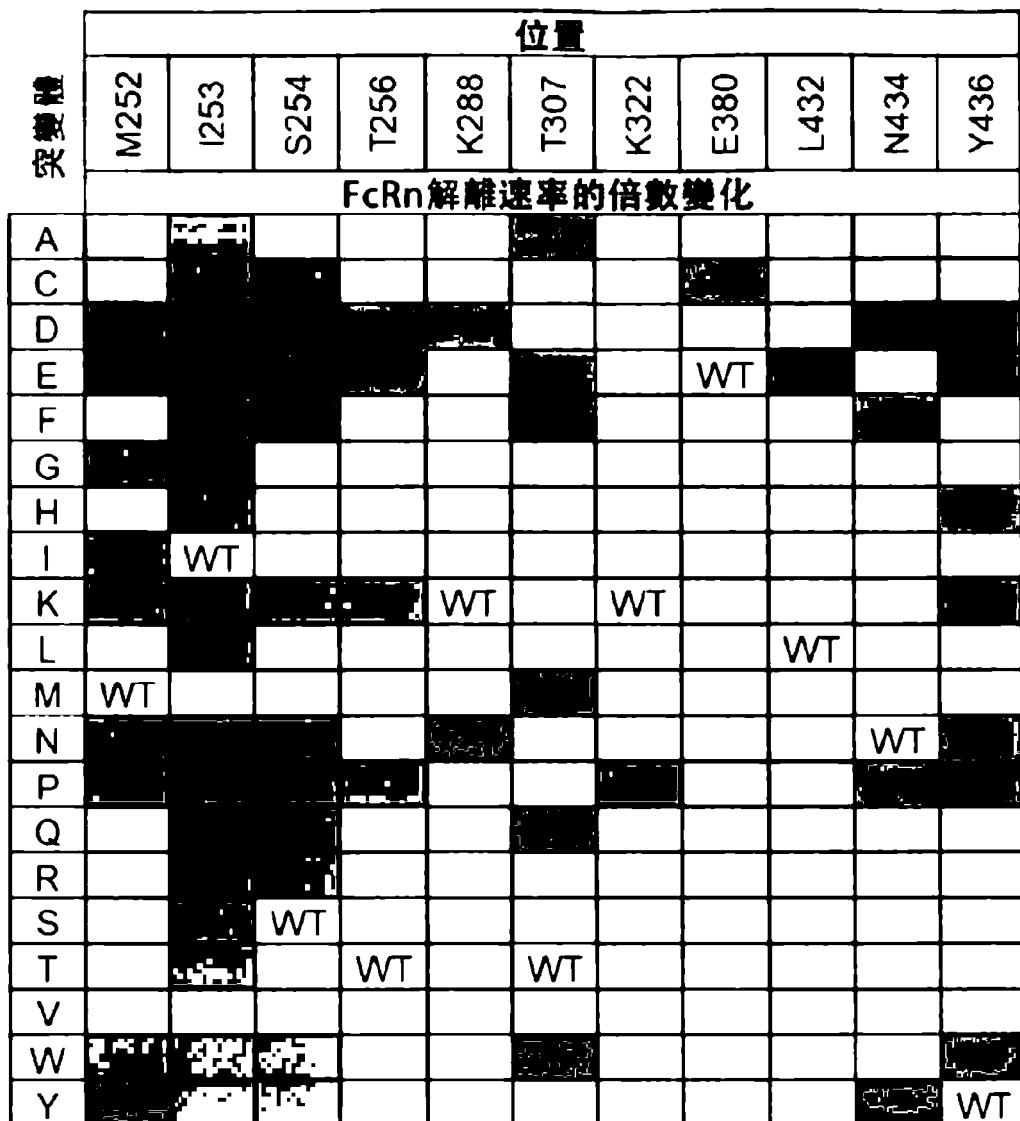
【圖13B】



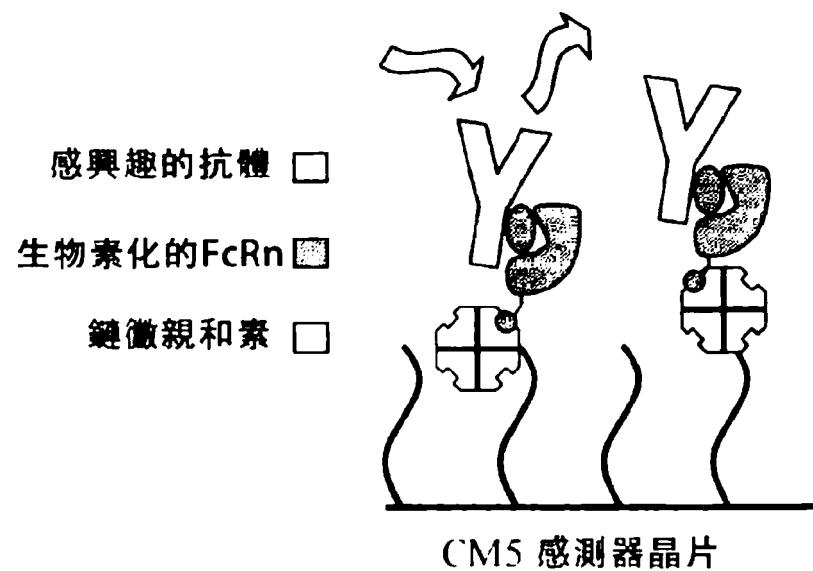
【圖13C】



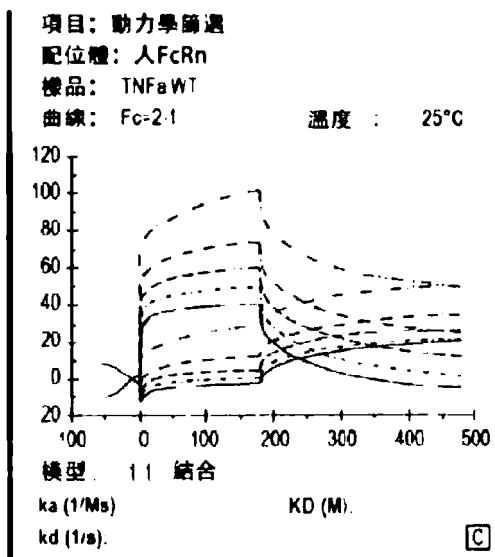
【圖13D】



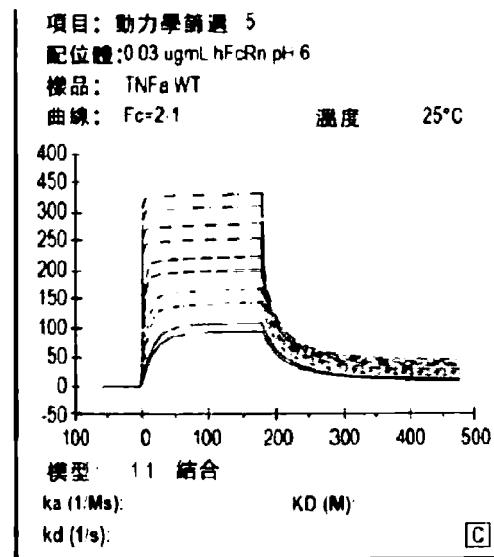
【圖14】



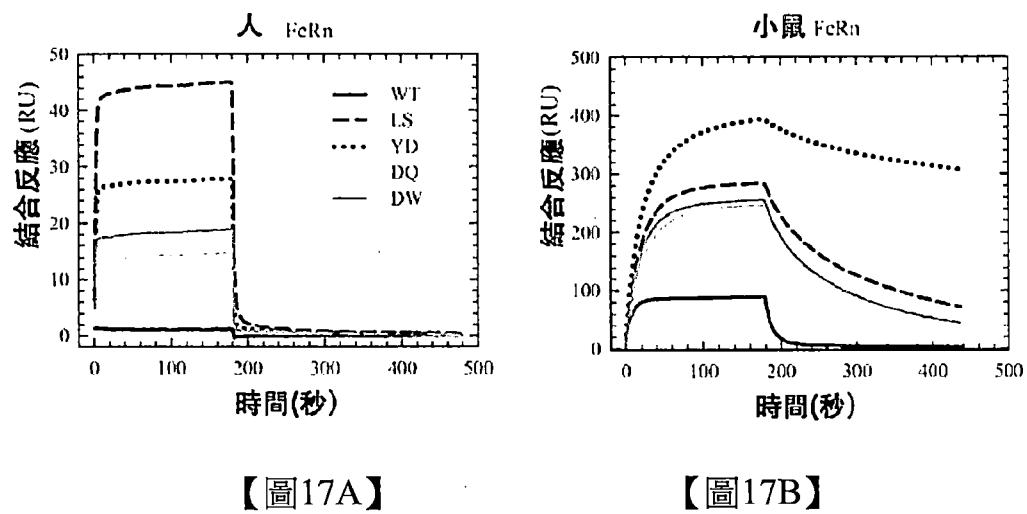
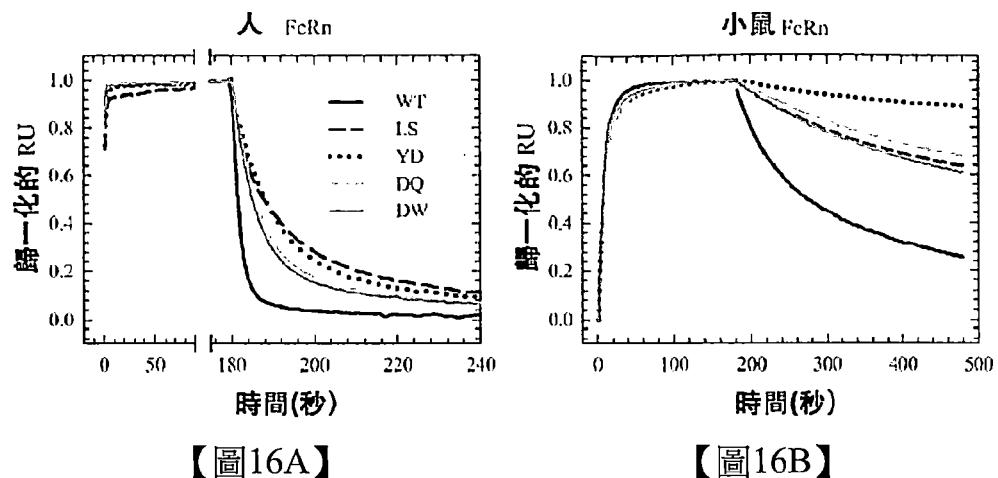
【圖15A】

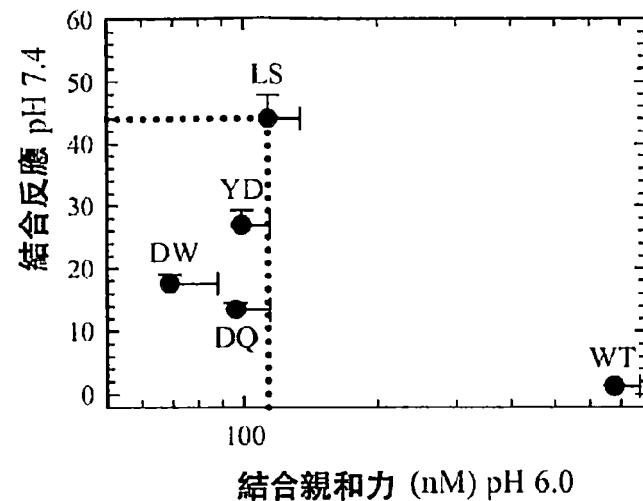


【圖15B】

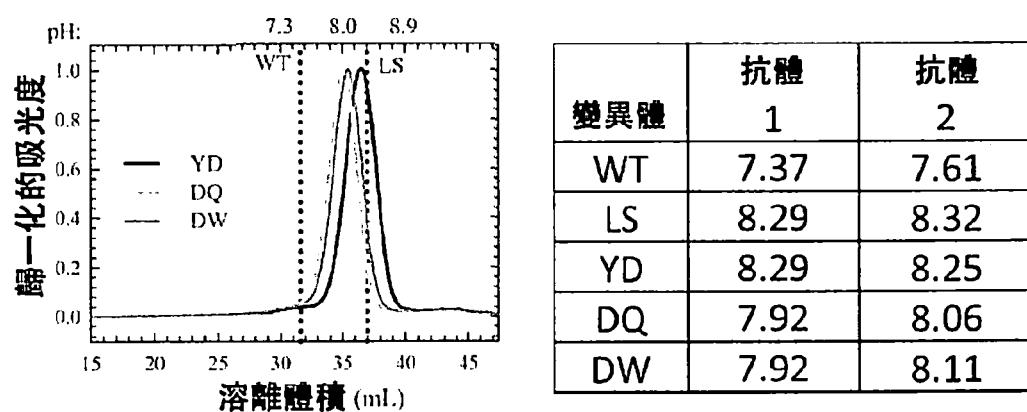


【圖15C】

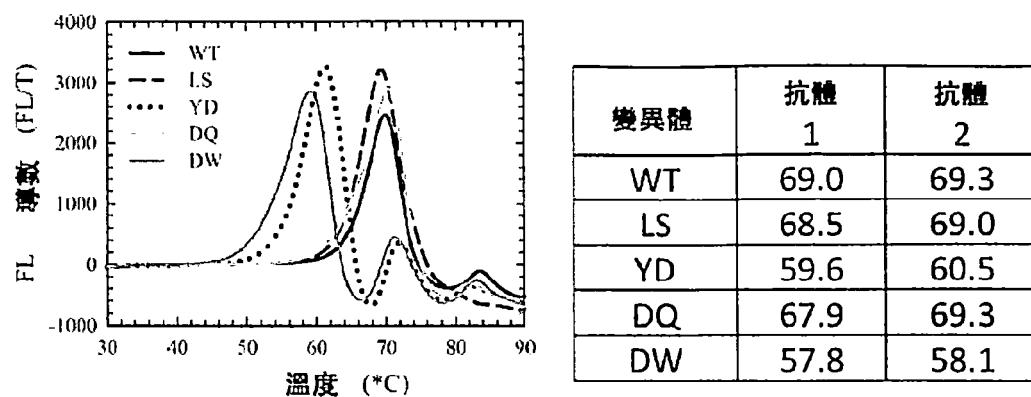




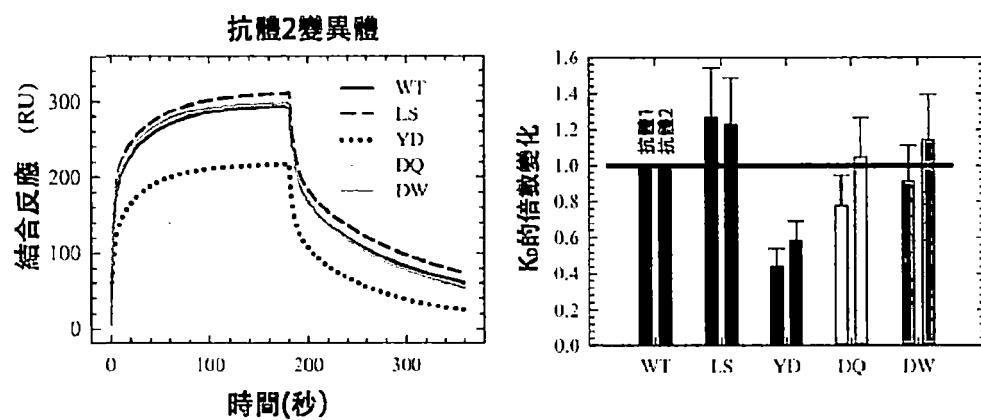
【圖18】



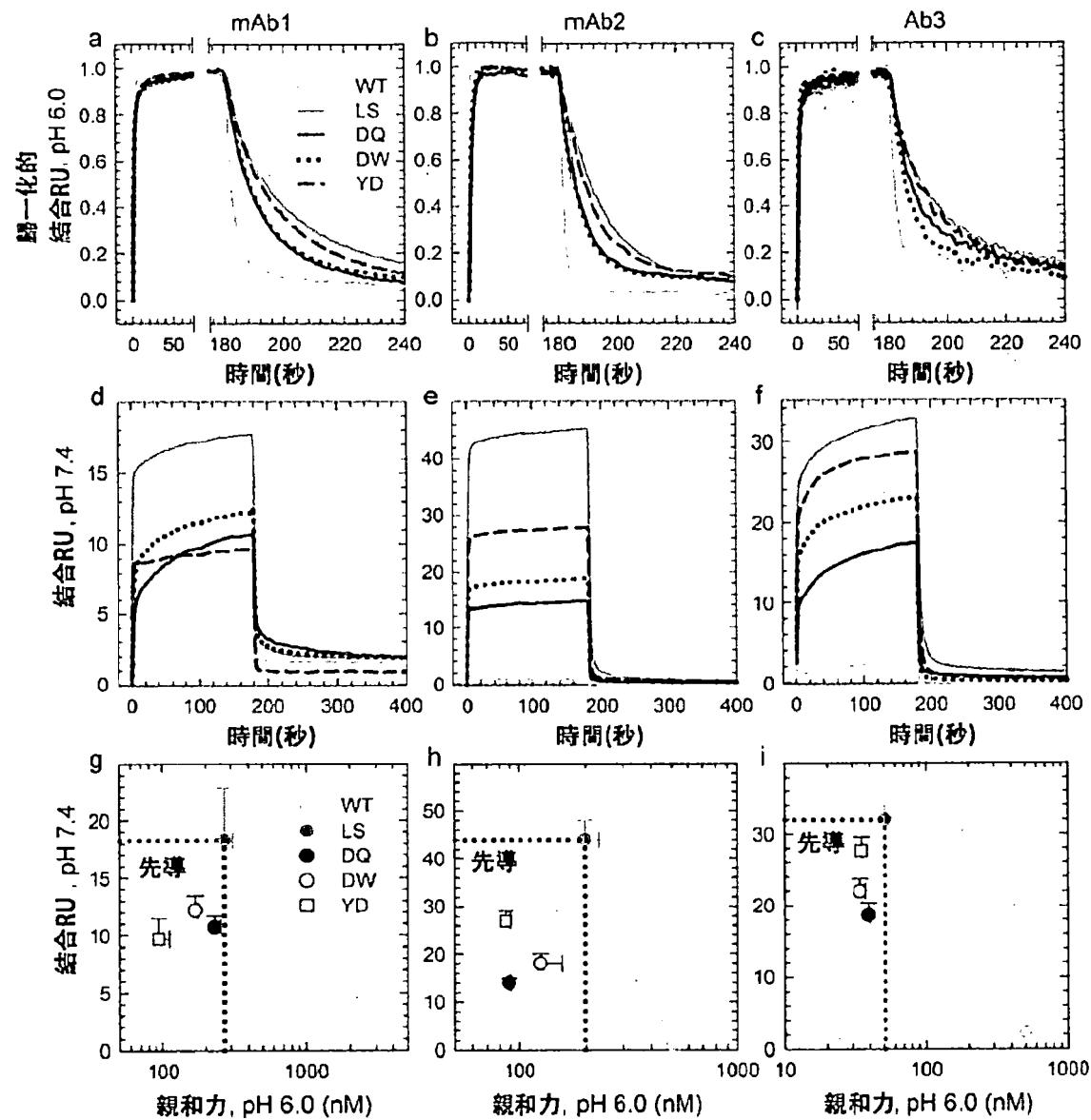
【圖19】



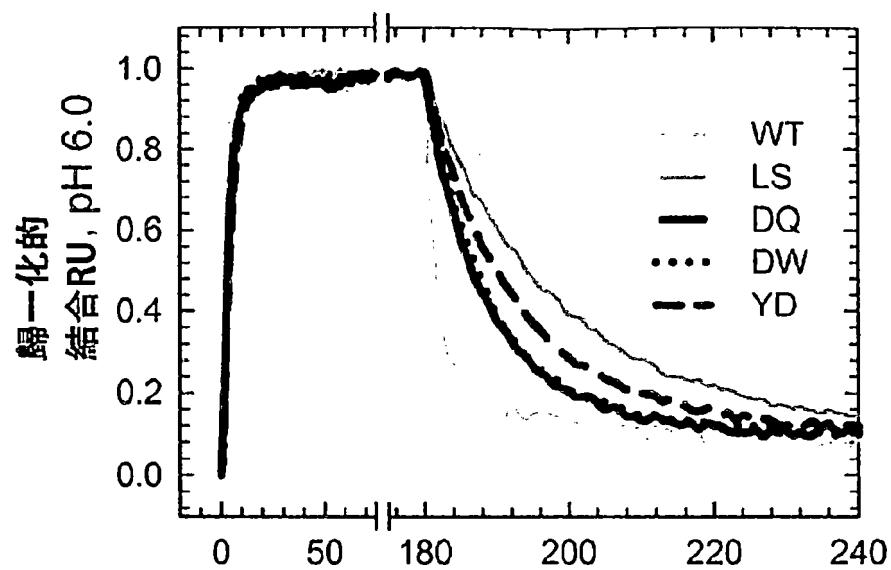
【圖20】



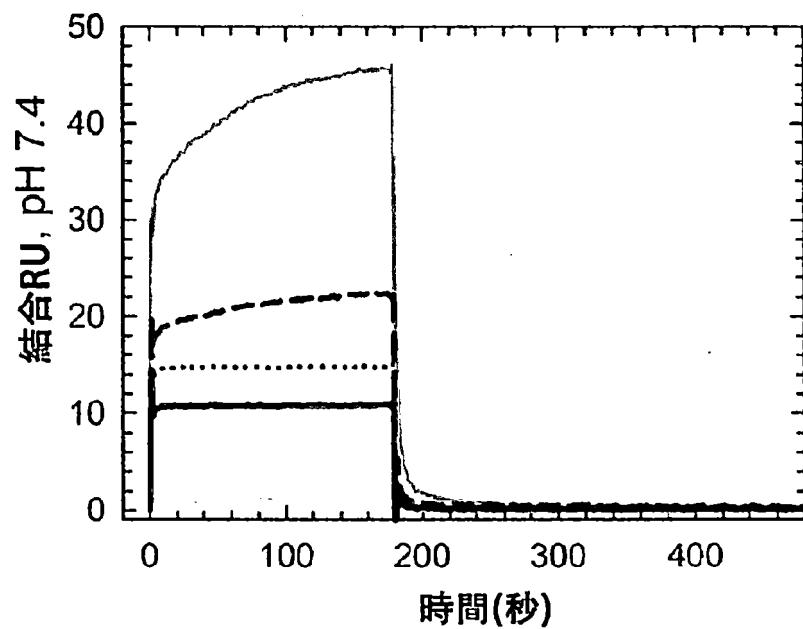
【圖21】



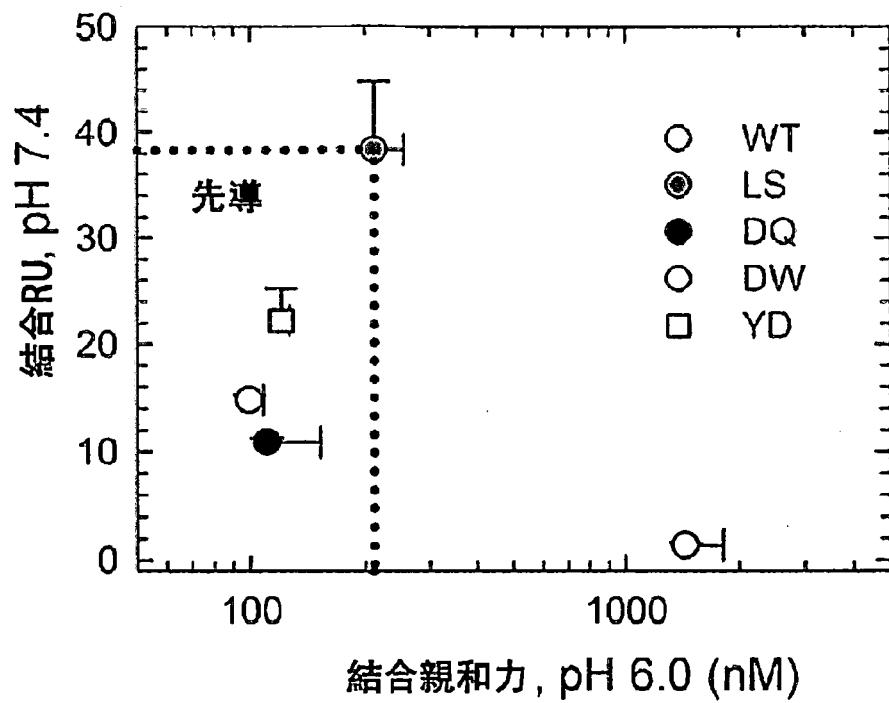
(圖22)



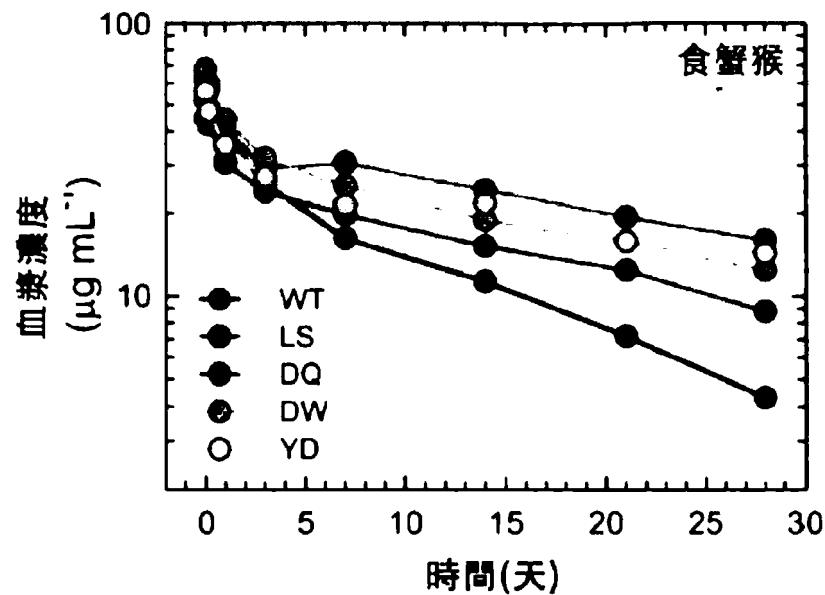
【圖23A】



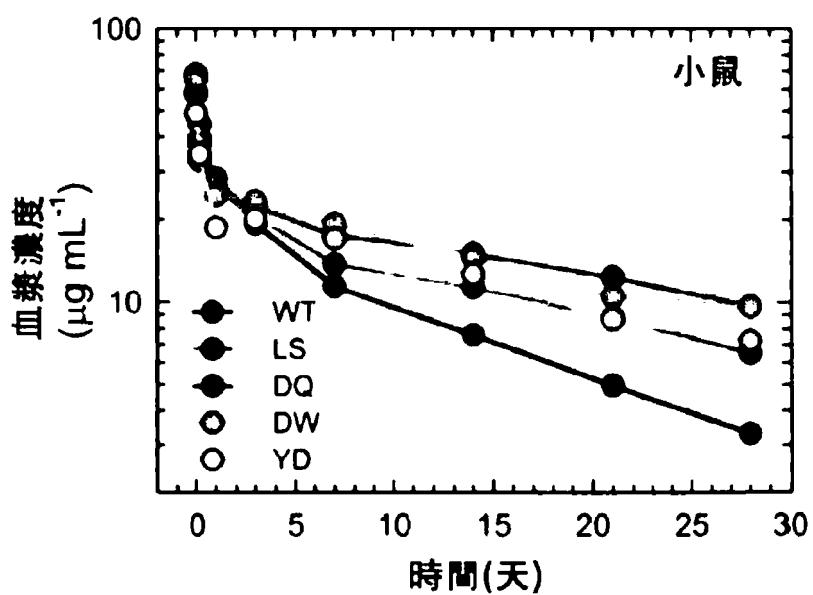
【圖23B】



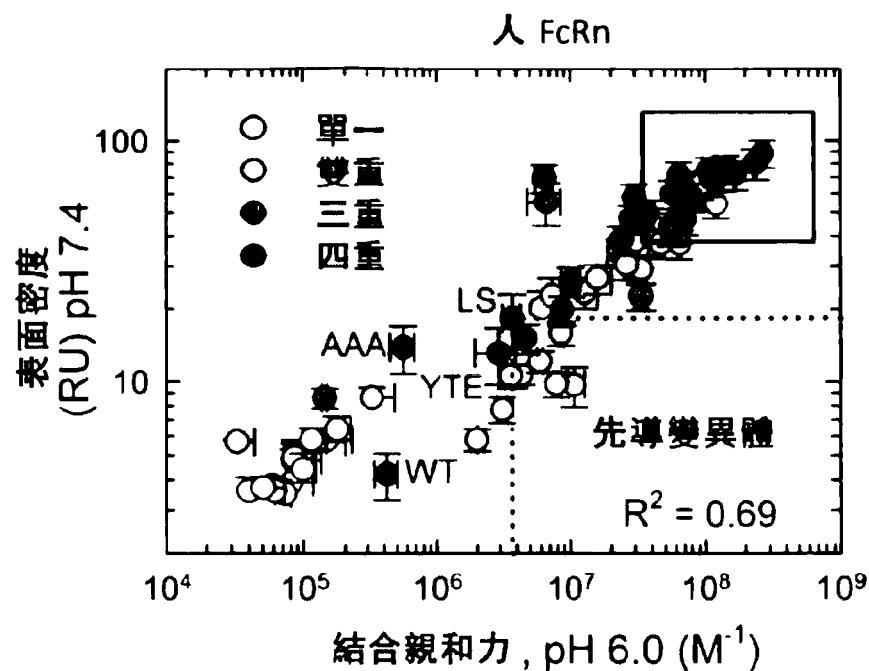
【圖23C】



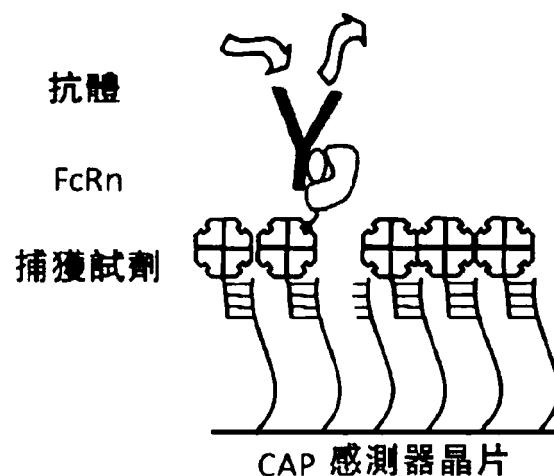
【圖24A】



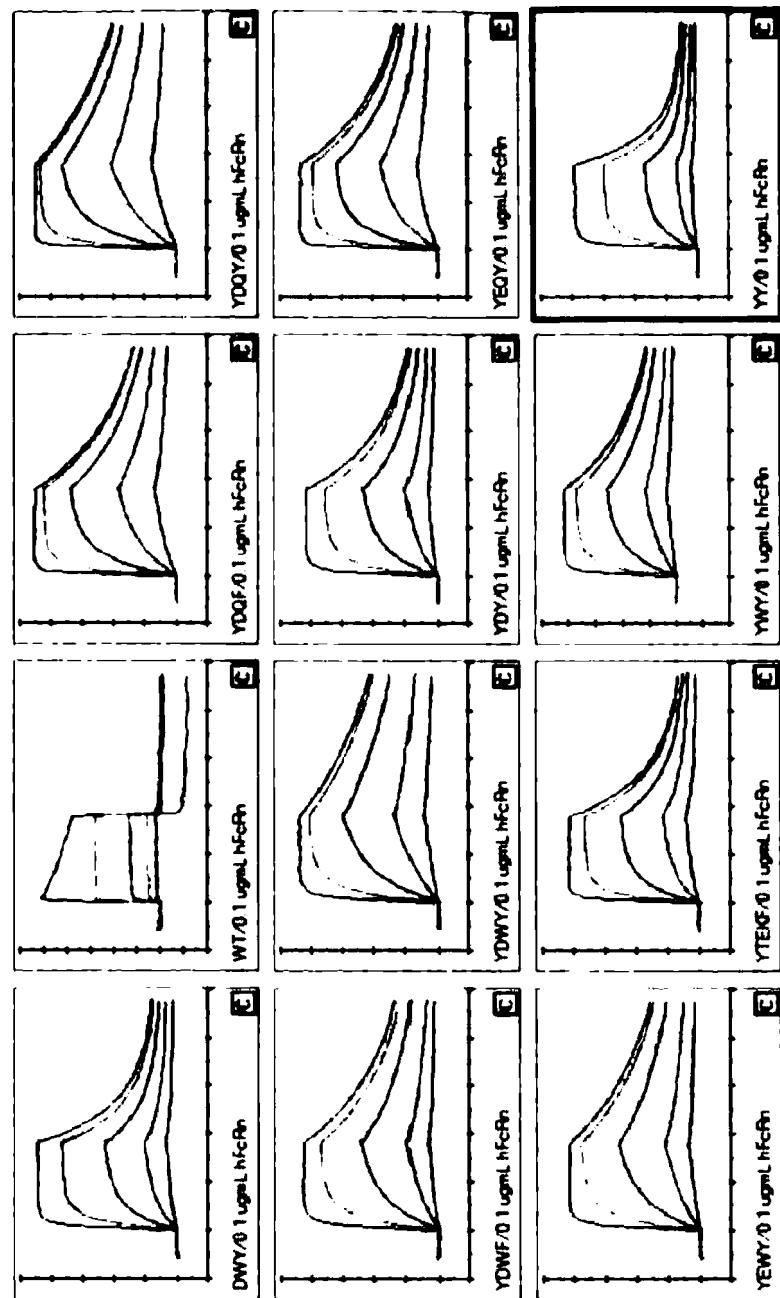
【圖24B】



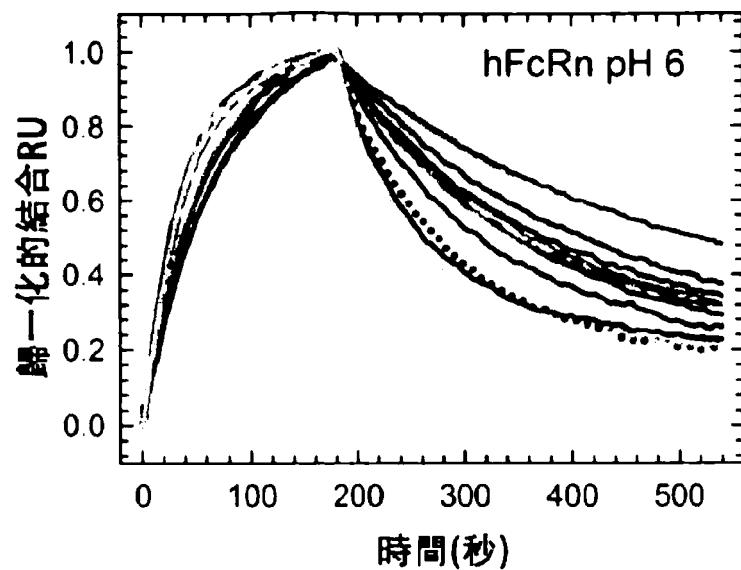
【圖25】



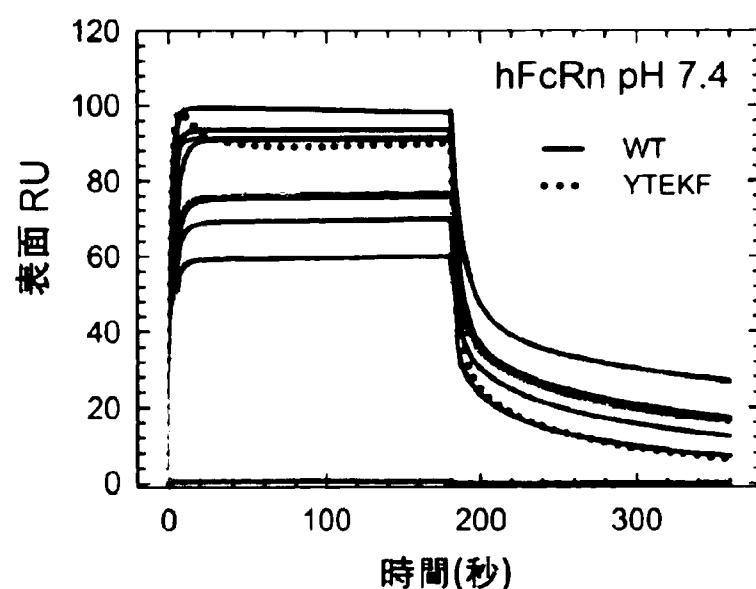
【圖26】



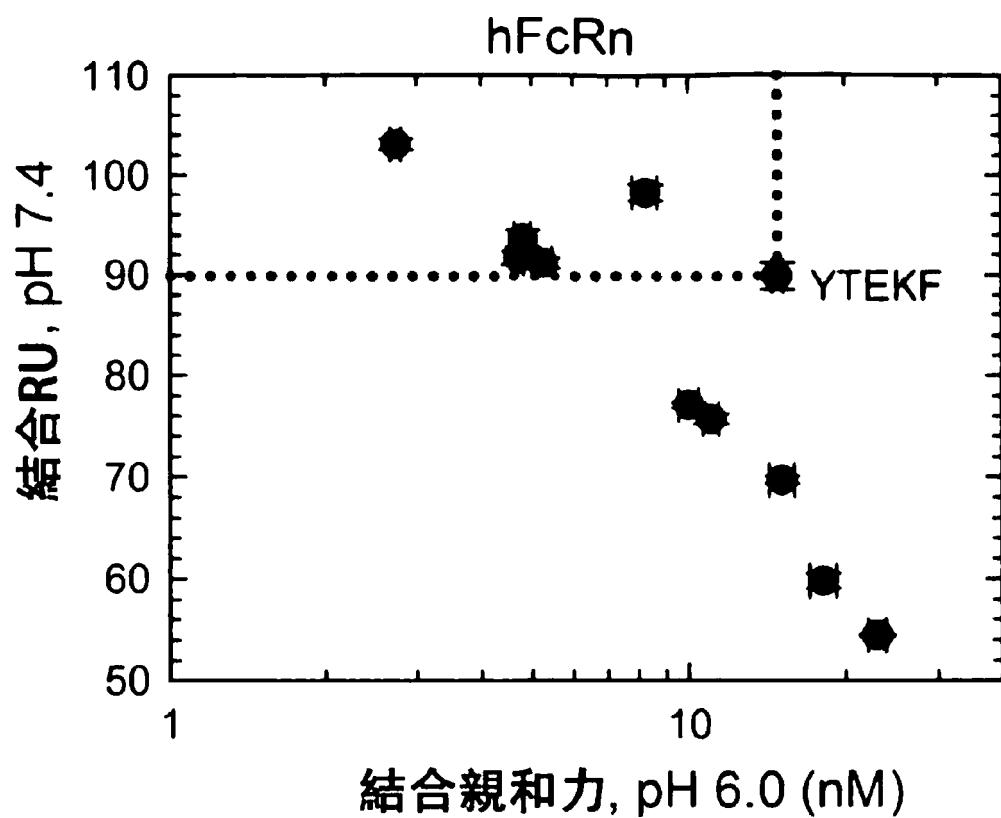
【圖27】



【圖28A】



【圖28B】



【圖29】