(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119497721 A
(43)申请公布日 2025.02.21

(21)申请号 202380051969.9

(22)申请日 2023.07.28

(30)优先权数据
63/369,898 2022.07.29 US
63/374,967 2022.09.08 US
63/489,693 2023.03.10 US
63/495,511 2023.04.11 US
63/513,820 2023.07.14 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.01.06

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/071239 2023.07.28

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/026472 EN 2024.02.01

(71)申请人 艾莱克特有限责任公司
地址 美国

(72)发明人 E·布朗 H·萨利米 A·G·伊 M·L·唐 何维贤 T·尼维克长勇 R·加奈桑 L·山 T·比恩利 R·K-H·童 A·H-M·杨

(74)专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038
专利代理师 张小勇

(51)Int.Cl.
*C07K 16/28*(2006.01)

权利要求书16页 说明书137页
序列表（电子公布） 附图11页

(54)发明名称

转铁蛋白受体抗原结合结构域及其用途

(57)摘要

本公开一般涉及特异性结合至人转铁蛋白受体(TfR)的抗原结合结构域及其在跨血脑屏障(BBB)转运中的用途。

CN 119497721 A

1.一种特异性结合至人转铁蛋白受体(TfR)的顶端结构域的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域在周围注射后定位于受试者的脑实质,并且其中所述抗原结合结构域不在修饰的CH3结构域内。

2.一种特异性结合至人转铁蛋白受体(TfR)的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域包含重链可变区(VH)互补决定区(CDR)1、VH CDR2、VH CDR3以及轻链可变区(VL)CDR1、CDR2和CDR3序列,所述序列包含以下氨基酸序列:

(i)分别为SEQ ID NO:94、415、418、423、150和151;

(ii)分别为SEQ ID NO:74-76和135-137;

(iii)分别为SEQ ID NO:77-79和138-140;

(iv)分别为SEQ ID NO:80-82和135-137;

(v)分别为SEQ ID NO:83-85和141-143;

(vi)分别为SEQ ID NO:74、86、76和135-137;

(vii)分别为SEQ ID NO:87-89和143-145;

(viii)分别为SEQ ID NO:90-92和146-148;

(ix)分别为SEQ ID NO:83、93、85和141-143;

(x)分别为SEQ ID NO:94-96和149-151;

(xi)分别为SEQ ID NO:97、86、98和135-137;

(xii)分别为SEQ ID NO:99、100、101和152-154;

(xiii)分别为SEQ ID NO:99、102、103和155-157;(xiv)分别为SEQ ID NO:104-106、138、158和159;

(xv)分别为SEQ ID NO:107-109和160-162;

(xvi)分别为SEQ ID NO:99、110、103和155-157;

(xvii)分别为SEQ ID NO:99、111、112、152、163和164;(xviii)分别为SEQ ID NO:90、113、114、165、166和157;(xix)分别为SEQ ID NO:83、115、85、141、142和167;

(xx)分别为SEQ ID NO:116、110、103和155-157;

(xxi)分别为SEQ ID NO:117-119和168-170;

(xxii)分别为SEQ ID NO:116、110、103和168-170;

(xxiii)分别为SEQ ID NO:90、120、114、165、166和157;(xxiv)分别为SEQ ID NO:90、113、114、171、166和157;(xxv)分别为SEQ ID NO:97、121、122、135、136和172;(xxvi)分别为SEQ ID NO:74、123、124、173、136和137;(xxvii)分别为SEQ ID NO:74、125、126、174、136和137;(xxviii)分别为SEQ ID NO:99、127、128、155、175和176;(xxix)分别为SEQ ID NO:90、129、130、165、166和157;(xxx)分别为SEQ ID NO:131、132、133、177、166和178;(xxxi)分别为SEQ ID NO:131、132、133和179-181;

(xxxii)分别为SEQ ID NO:90、134、114、165、166和157;(xxxiii)分别为SEQ ID NO:83、302、303、141、142和182;(xxxiv)分别为SEQ ID NO:99、305、103、307、308和157;(xxxv)分别为SEQ ID NO:99、306、103、307、308和157;(xxxvi)分别为SEQ ID NO:99、306、103、307、309和157;(xxxvii)分别为SEQ ID NO:99、306、103、310、311和157;(xxxviii)分别为SEQ ID NO:99、305、103、310、311和157;(xxxix)分别为SEQ ID NO:99、312、103、307、308和157;(xl)分别为SEQ ID NO:99、312、103、307、309和157;

(xli)分别为SEQ ID NO:99、312、103、310、311和157(xlii)分别为SEQ ID NO:94、95、418、421、150和151;

(xliii)分别为SEQ ID NO:94、412、419、422、150和151;(xliv)分别为SEQ ID NO:94、412、420、422、150和151;(xlv)分别为SEQ ID NO:94、413、418、422、150和151;

(xlvi)分别为SEQ ID NO:94、414、418、422、150和151;(xlvii)分别为SEQ ID NO:94、416、418、422、150和151;(xlviii)分别为SEQ ID NO:94、417、418、424、150和151;(xlix)分别为SEQ ID NO:460、312、103、307、309和157;(l)分别为SEQ ID NO:460、312、461、307、309和157;

(li)分别为SEQ ID NO:460、312、462、307、309和157;

(lii)分别为SEQ ID NO:460、312、463、307、309和157;

(liii)分别为SEQ ID NO:460、312、464、307、309和157;

(liv)分别为SEQ ID NO:460、312、465、307、309和157;

(lv)分别为SEQ ID NO:460、312、466、307、309和157;

(lvi)分别为SEQ ID NO:460、312、467、307、309和157;

(lvii)分别为SEQ ID NO:460、312、468、307、309和157;

(lviii)分别为SEQ ID NO:460、312、469、307、309和157;

(lix)分别为SEQ ID NO:460、312、470、307、309和157;

(lx)分别为SEQ ID NO:460、312、103、471、309和157;

(lxi)分别为SEQ ID NO:460、312、103、472、309和157;

(lxii)分别为SEQ ID NO:460、312、103、473、309和157;

(lxiii)分别为SEQ ID NO:460、312、103、474、309和157;

(lxiv)分别为SEQ ID NO:460、312、103、475、309和157;

(lxv)分别为SEQ ID NO:460、312、103、476、309和157;或

(lxvi)分别为SEQ ID NO:460、312、103、471、309和157。

3.如权利要求1或2所述的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域包含VH和VL,其中所述VH和所述VL包含与以下氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%同一性的氨基酸序列:

(i)分别为SEQ ID NO:399和400;

(ii)分别为SEQ ID NO:10和11;

(iii)分别为SEQ ID NO:12和13;(iv)分别为SEQ ID NO:14和15;(v)分别为SEQ ID NO:16和17;(vi)分别为SEQ ID NO:18和19;(vii)分别为SEQ ID NO:20和21;(viii)分别为SEQ ID NO:22和23;(ix)分别为SEQ ID NO:24和25;(x)分别为SEQ ID NO:26和27;(xi)分别为SEQ ID NO:28和29;(xii)分别为SEQ ID NO:30和31;(xiii)分别为SEQ ID NO:32和33;(xiv)分别为SEQ ID NO:34和35;(xv)分别为SEQ ID NO:36和37;(xvi)分别为SEQ ID NO:38和39;(xvii)分别为SEQ ID NO:40和41;(xviii)分别为SEQ ID NO:42和43;(xix)分别为SEQ ID NO:44和45;(xx)分别为SEQ ID NO:46和47;(xxi)分别为SEQ ID NO:48和49;

(xxii)分别为SEQ ID NO:50和51;

(xxiii)分别为SEQ ID NO:52和53;

(xxiv)分别为SEQ ID NO:54和55;

(xxv)分别为SEQ ID NO:56和57;

(xxvi)分别为SEQ ID NO:58和59;

(xxvii)分别为SEQ ID NO:60和61;

(xxviii)分别为SEQ ID NO:62和63;(xxix)分别为SEQ ID NO:64和65;

(xxx)分别为SEQ ID NO:66和67;

(xxxi)分别为SEQ ID NO:68和69;

(xxxii)分别为SEQ ID NO:70和71;

(xxxiii)分别为SEQ ID NO:72和73;(xxxiv)分别为SEQ ID NO:313和314;(xxxv)分别为SEQ ID NO:315和316;(xxxvi)分别为SEQ ID NO:317和314;(xxxvii)分别为SEQ ID NO:318和316;(xxxviii)分别为SEQ ID NO:319和314;(xxxix)分别为SEQ ID NO:320和316;(xl)分别为SEQ ID NO:321和314;(xli)分别为SEQ ID NO:322和316;(xlii)分别为SEQ ID NO:323和314;(xliii)分别为SEQ ID NO:324和316;(xliv)分别为SEQ ID NO:325和326;(xlv)分别为SEQ ID NO:327和328;(xlvi)分别为SEQ ID NO:325和329;(xlvii)分别为SEQ ID NO:330和331;(xlviii)分别为SEQ ID NO:325和332;(xlix)分别为SEQ ID NO:330和333;(l)分别为SEQ ID NO:334和332;

(li)分别为SEQ ID NO:335和336;(lii)分别为SEQ ID NO:337和338;(liii)分别为SEQ ID NO:38和33;

(liv)分别为SEQ ID NO:339和340;(lv)分别为SEQ ID NO:339和341;(lvi)分别为SEQ ID NO:339和342;(lvii)分别为SEQ ID NO:343和340;(lviii)分别为SEQ ID NO:343和342;(lix)分别为SEQ ID NO:344和340;(lx)分别为SEQ ID NO:344和341;(lxi)分别为SEQ ID NO:344和342;(lxii)分别为SEQ ID NO:345和340;(lxiii)分别为SEQ ID NO:345和341;(lxiv)分别为SEQ ID NO:345和342;(lxv)分别为SEQ ID NO:346和347;(lxvi)分别为SEQ ID NO:348和316;(lxvii)分别为SEQ ID NO:349和347;(lxviii)分别为SEQ ID NO:349和350;(lxix)分别为SEQ ID NO:351和352;(lxx)分别为SEQ ID NO:349和353;(lxxi)分别为SEQ ID NO:346和354;(lxxii)分别为SEQ ID NO:349和355;(lxxiii)分别为SEQ ID NO:349和356;(lxxiv)分别为SEQ ID NO:357和316;(lxxv)分别为SEQ ID NO:349和358;(lxxvi)分别为SEQ ID NO:349和316;(lxxvii)分别为SEQ ID NO:359和360;(lxxviii)分别为SEQ ID NO:361和362;(lxxix)分别为SEQ ID NO:363和316;(lxxx)分别为SEQ ID NO:364和365;(lxxxi)分别为SEQ ID NO:349和366;(lxxxii)分别为SEQ ID NO:346和316;(lxxxiii)分别为SEQ ID NO:346和367;(lxxxiv)分别为SEQ ID NO:349和368;(lxxxv)分别为SEQ ID NO:369和316;(lxxxvi)分别为SEQ ID NO:346和370;(lxxxvii)分别为SEQ ID NO:371和316;(lxxxviii)分别为SEQ ID NO:372和356;(lxxxix)分别为SEQ ID NO:357和358;(xc)分别为SEQ ID NO:349和373;

(xci)分别为SEQ ID NO:346和374;

(xcii)分别为SEQ ID NO:375和316;(xciii)分别为SEQ ID NO:376和316;(xciv)分别为SEQ ID NO:346和377;(xcv)分别为SEQ ID NO:378和379;(xcvi)分别为SEQ ID NO:380和381;(xcvii)分别为SEQ ID NO:349和382;(xcviii)分别为SEQ ID NO:357和383;(xcix)分别为SEQ ID NO:349和358;(c)分别为SEQ ID NO:384和316;

(ci)分别为SEQ ID NO:385和316;(cii)分别为SEQ ID NO:357和386;(ciii)分别为

SEQ ID NO:387和388;(civ)分别为SEQ ID NO:359和316;(cv)分别为SEQ ID NO:389和316;(cvi)分别为SEQ ID NO:390和316;(cvii)分别为SEQ ID NO:391和392;(cviii)分别为SEQ ID NO:393和356;(cix)分别为SEQ ID NO:390和392;(cx)分别为SEQ ID NO:357和386;(cxi)分别为SEQ ID NO:394和395;(cxii)分别为SEQ ID NO:396和395;(cxiii)分别为SEQ ID NO:397和395;(cxiv)分别为SEQ ID NO:398和395;(cxv)分别为SEQ ID NO:401和395;(cxvi)分别为SEQ ID NO:402和403;

(cxvii)分别为SEQ ID NO:443和341;

(cxviii)分别为SEQ ID NO:444和341;

(cxix)分别为SEQ ID NO:445和341;

(cxx)分别为SEQ ID NO:446和341;

(cxxi)分别为SEQ ID NO:447和341;

(cxxii)分别为SEQ ID NO:448和341;

(cxxiii)分别为SEQ ID NO:449和341;

(cxxiv)分别为SEQ ID NO:450和341;

(cxxv)分别为SEQ ID NO:451和341;

(cxxvi)分别为SEQ ID NO:452和341;

(cxxvii)分别为SEQ ID NO:453和341;

(cxxviii)分别为SEQ ID NO:443和454;

(cxxix)分别为SEQ ID NO:443和455;

(cxxx)分别为SEQ ID NO:443和456;

(cxxxi)分别为SEQ ID NO:443和457;

(cxxxii)分别为SEQ ID NO:443和458;或

(cxxxiii)分别为SEQ ID NO:443和459。

4.一种特异性结合至人TfR的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域包含VH和VL,其中所述VH包含以下氨基酸序列:SEQ ID NO:399、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、313、315、317、318、319、320、321、322、323、324、325、327、330、334、335、337、38、339、343、344、345、346、348、349、351、357、359、361、363、364、369、371、372、375、376、378、380、384、385、387、389、390、391、393、394、396、397、398、401、402、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452或453。

5.一种特异性结合至人TfR的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域包含VH和VL,其中所述VL包含以下氨基酸序列:SEQ ID NO:400、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、314、316、326、328、329、331、332、333、336、338、340、341、342、347、350、352、353、354、355、356、358、360、362、365、366、367、368、370、373、374、377、379、381、382、383、386、388、392、395、403、454、455、456、457、458或459。

6.如权利要求1、4或5所述的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域包含VH和VL,所述VH和所述VL包含以下氨基酸序列:

(i)分别为SEQ ID NO:399和400;

(ii)分别为SEQ ID NO:10和11;

(iii)分别为SEQ ID NO:12和13;

(iv)分别为SEQ ID NO:14和15;

(v)分别为SEQ ID NO:16和17;

(vi)分别为SEQ ID NO:18和19;(vii)分别为SEQ ID NO:20和21;(viii)分别为SEQ ID NO:22和23;(ix)分别为SEQ ID NO:24和25;(x)分别为SEQ ID NO:26和27;(xi)分别为SEQ ID NO:28和29;(xii)分别为SEQ ID NO:30和31;(xiii)分别为SEQ ID NO:32和33;(xiv)分别为SEQ ID NO:34和35;(xv)分别为SEQ ID NO:36和37;(xvi)分别为SEQ ID NO:38和39;(xvii)分别为SEQ ID NO:40和41;(xviii)分别为SEQ ID NO:42和43;(xix)分别为SEQ ID NO:44和45;(xx)分别为SEQ ID NO:46和47;(xxi)分别为SEQ ID NO:48和49;(xxii)分别为SEQ ID NO:50和51;(xxiii)分别为SEQ ID NO:52和53;(xxiv)分别为SEQ ID NO:54和55;(xxv)分别为SEQ ID NO:56和57;

(xxvi)分别为SEQ ID NO:58和59;

(xxvii)分别为SEQ ID NO:60和61;

(xxviii)分别为SEQ ID NO:62和63;(xxix)分别为SEQ ID NO:64和65;

(xxx)分别为SEQ ID NO:66和67;

(xxxi)分别为SEQ ID NO:68和69;

(xxxii)分别为SEQ ID NO:70和71;

(xxxiii)分别为SEQ ID NO:72和73;(xxxiv)分别为SEQ ID NO:313和314;(xxxv)分别为SEQ ID NO:315和316;(xxxvi)分别为SEQ ID NO:317和314;(xxxvii)分别为SEQ ID NO:318和316;(xxxviii)分别为SEQ ID NO:319和314;(xxxix)分别为SEQ ID NO:320和316;(xl)分别为SEQ ID NO:321和314;

(xli)分别为SEQ ID NO:322和316;

(xlii)分别为SEQ ID NO:323和314;(xliii)分别为SEQ ID NO:324和316;(xliv)分别为SEQ ID NO:325和326;(xlv)分别为SEQ ID NO:327和328;(xlvi)分别为SEQ ID NO:325和329;(xlvii)分别为SEQ ID NO:330和331;(xlviii)分别为SEQ ID NO:325和332;(xlix)分别为SEQ ID NO:330和333;(l)分别为SEQ ID NO:334和332;

(li)分别为SEQ ID NO:335和336;(lii)分别为SEQ ID NO:337和338;(liii)分别为SEQ ID NO:38和33;

(liv)分别为SEQ ID NO:339和340;(lv)分别为SEQ ID NO:339和341;(lvi)分别为SEQ ID NO:339和342;(lvii)分别为SEQ ID NO:343和340;(lviii)分别为SEQ ID NO:343和342;(lix)分别为SEQ ID NO:344和340;(lx)分别为SEQ ID NO:344和341;(lxi)分别为SEQ ID NO:344和342;(lxii)分别为SEQ ID NO:345和340;(lxiii)分别为SEQ ID NO:345和341;(lxiv)分别为SEQ ID NO:345和342;(lxv)分别为SEQ ID NO:346和347;(lxvi)分别为SEQ ID NO:348和316;(lxvii)分别为SEQ ID NO:349和347;(lxviii)分别为SEQ ID NO:349和350;(lxix)分别为SEQ ID NO:351和352;(lxx)分别为SEQ ID NO:349和353;(lxxi)分别为SEQ ID NO:346和354;(lxxii)分别为SEQ ID NO:349和355;(lxxiii)分别为SEQ ID NO:349和356;(lxxiv)分别为SEQ ID NO:357和316;(lxxv)分别为SEQ ID NO:349和358;(lxxvi)分别为SEQ ID NO:349和316;(lxxvii)分别为SEQ ID NO:359和360;(lxxviii)分

别为SEQ ID NO:361和362;(lxxix)分别为SEQ ID NO:363和316;(lxxx)分别为SEQ ID NO:364和365;(lxxxi)分别为SEQ ID NO:349和366;(lxxxii)分别为SEQ ID NO:346和316;(lxxxiii)分别为SEQ ID NO:346和367;(lxxxiv)分别为SEQ ID NO:349和368;(lxxxv)分别为SEQ ID NO:369和316;(lxxxvi)分别为SEQ ID NO:346和370;(lxxxvii)分别为SEQ ID NO:371和316;(lxxxviii)分别为SEQ ID NO:372和356;(lxxxix)分别为SEQ ID NO:357和358;(xc)分别为SEQ ID NO:349和373;

(xci)分别为SEQ ID NO:346和374;

(xcii)分别为SEQ ID NO:375和316;(xciii)分别为SEQ ID NO:376和316;(xciv)分别为SEQ ID NO:346和377;(xcv)分别为SEQ ID NO:378和379;(xcvi)分别为SEQ ID NO:380和381;(xcvii)分别为SEQ ID NO:349和382;(xcviii)分别为SEQ ID NO:357和383;(xcix)分别为SEQ ID NO:349和358;(c)分别为SEQ ID NO:384和316;(ci)分别为SEQ ID NO:385和316;

(cii)分别为SEQ ID NO:357和386;

(ciii)分别为SEQ ID NO:387和388;(civ)分别为SEQ ID NO:359和316;(cv)分别为SEQ ID NO:389和316;

(cvi)分别为SEQ ID NO:390和316;(cvii)分别为SEQ ID NO:391和392;(cviii)分别为SEQ ID NO:393和356;(cix)分别为SEQ ID NO:390和392;(cx)分别为SEQ ID NO:357和386;

(cxi)分别为SEQ ID NO:394和395;(cxii)分别为SEQ ID NO:396和395;(cxiii)分别为SEQ ID NO:397和395;(cxiv)分别为SEQ ID NO:398和395;(cxv)分别为SEQ ID NO:401和395;(cxvi)分别为SEQ ID NO:402和403;(cxxxiv)分别为SEQ ID NO:443和341;(cxxxv)分别为SEQ ID NO:444和341;(cxxxvi)分别为SEQ ID NO:445和341;

(cxxxvii)分别为SEQ ID NO:446和341;

(cxxxviii)分别为SEQ ID NO:447和341;

(cxxxix)分别为SEQ ID NO:448和341;

(cxl)分别为SEQ ID NO:449和341;

(cxli)分别为SEQ ID NO:450和341;

(cxlii)分别为SEQ ID NO:451和341;

(cxliii)分别为SEQ ID NO:452和341;

(cxliv)分别为SEQ ID NO:453和341;

(cxlv)分别为SEQ ID NO:443和454;

(cxlvi)分别为SEQ ID NO:443和455;

(cxlvii)分别为SEQ ID NO:443和456;

(cxlviii)分别为SEQ ID NO:443和457;

(cxlix)分别为SEQ ID NO:443和458;或

(cxvii)分别为SEQ ID NO:443和459。

7.如权利要求1-6中任一项所述的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域能够穿过血脑屏障(BBB)。

8.如权利要求1-7中任一项所述的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域结合至

食蟹猴TfR。

9.如权利要求1-8中任一项所述的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域以500nM与10μM之间的亲和力结合人TfR。

10.如权利要求1-8中任一项所述的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域以2μM与8μM之间的亲和力结合人TfR。

11.如权利要求1-8中任一项所述的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域以2μM与5μM之间的亲和力结合人TfR。

12.如权利要求1-8中任一项所述的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域以750nM与2μM之间的亲和力结合人TfR。

13.如权利要求1-8中任一项所述的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域以50nM与500nM之间的亲和力结合人TfR。

14.如权利要求1-8中任一项所述的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域以100nM与250nM之间的亲和力结合人TfR。

15.如权利要求1-8中任一项所述的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域以1nM与50nM之间的亲和力结合人TfR。

16.如权利要求1-8中任一项所述的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域以6.7nM至3.5μM的亲和力结合人TfR。

17.如权利要求1-8中任一项所述的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域以38nM至2.3μM的亲和力结合至食蟹猴TfR。

18.如权利要求1-8中任一项所述的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域以约3.5μM的亲和力结合至人TfR。

19.如权利要求1-19中任一项所述的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域以约1.5μM的亲和力结合至食蟹猴TfR。

20.如权利要求9-19中任一项所述的抗原结合结构域,其中所述亲和力通过高通量表面等离子共振(SPR)检测来测量。

21.如权利要求1-20中任一项所述的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域内化于血脑屏障上皮细胞中,任选地其中所述血脑屏障上皮细胞为HCMEC/D3细胞。

22.如权利要求1-21中任一项所述的抗原结合结构域,其中相对于用同种型对照处理的HCMEC/D3细胞上TfR的细胞表面表达,所述抗原结合结构域不会将HCMEC/D3细胞上TfR的细胞表面表达降低超过60%。

23.如权利要求1-22中任一项所述的抗原结合结构域,其中相对于用同种型对照处理的HCMEC/D3细胞上TfR的细胞表面表达,所述抗原结合结构域不会将HCMEC/D3细胞上TfR的细胞表面表达降低超过40%。

24.如权利要求1-23中任一项所述的抗原结合结构域,其中相对于用同种型对照处理的HCMEC/D3细胞上TfR的细胞表面表达,所述抗原结合结构域不会显著增加HCMEC/D3细胞上TfR的细胞表面表达。

25.如权利要求1-24中任一项所述的抗原结合结构域,其中在血管耗竭的小鼠脑中,所述抗原结合结构域的累积是同种型对照的至少4倍或至少5倍。

26.如权利要求1-25中任一项所述的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域与人

TfR的特异性结合是与不相关蛋白的结合的至少5倍。

27.如权利要求1-26中任一项所述的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域与食蟹猴TfR的特异性结合是与不相关蛋白的结合的至少5倍。

28.如权利要求26或27所述的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域与人TfR的结合是与不相关蛋白的结合的至少5倍且/或与食蟹猴TfR的特异性结合是与不相关蛋白的结合的至少5倍。

29.如权利要求1-28中任一项所述的抗原结合结构域,其中在静脉内施用所述抗原结合结构域后,所述抗原结合结构域不显著降低灵长类动物脑中的TfR表达水平。

30.如权利要求1-29中任一项所述的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域在单一多肽链上包含VH和VL。

31.如权利要求1-30中任一项所述的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域包含单链可变片段(scFv)。

32.如权利要求31所述的抗原结合结构域,其中所述scFv处于VH-接头-VL的取向中。

33.如权利要求31所述的抗原结合结构域,其中所述scFv处于VL-接头-VH的取向中。

34.如权利要求32或33所述的抗原结合结构域,其中所述接头(i)为约5至约25个氨基酸、为约5至约20个氨基酸、为约10至约25个氨基酸、或为约10至约20个氨基酸,且/或(ii)包含GGSEGKS SGSGSESKSTGGS(SEQ ID NO:183)或GGGGSGGGGSGGGGSGG GGS(SEQ ID NO:288)的氨基酸序列。

35.如权利要求2-34中任一项所述的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域结合至人转铁蛋白受体(TfR)的顶端结构域,其中所述抗原结合结构域在周围注射后定位于受试者的脑实质,并且其中所述抗原结合结构域不在修饰的CH3结构域内。

36.如权利要求1-33中任一项所述的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域包含SEQ ID NO:404、185、186、189、190、192、193、195-259和261-284中任一项的氨基酸序列。

37.如权利要求1-29中任一项所述的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域包含第一多肽上的VH和第二多肽上的VL。

38.如权利要求1-37中任一项所述的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域为鼠、嵌合、人源化或人抗原结合结构域,任选地其中所述抗原结合结构域为人源化抗原结合结构域。

39.一种特异性结合至人TfR的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域为VHH,其包含(i)如权利要求1-36和38中任一项所述的抗原结合结构域的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,或(ii)如权利要求1-36和38中任一项所述的抗原结合结构域的VH,任选地其中所述VHH能够穿过血脑屏障(BBB)。

40.一种融合蛋白,其包含如权利要求1-39中任一项所述的抗原结合结构域和异源蛋白或肽。

41.如权利要求40所述的融合蛋白,其中所述异源蛋白或肽包含以下的氨基酸序列:β-分泌酶1(BACE1)、Abeta、表皮生长因子受体(EGFR)、人表皮生长因子受体2(HER2)、tau、载脂蛋白、载脂蛋白E(ApoE)、载脂蛋白E4(ApoE4)、α-突触核蛋白、CD20、亨廷顿蛋白、朊蛋白(PrP)、富含亮氨酸的重复激酶2(LRRK2)、parkin、早老素1、早老素2、β-葡萄糖脑苷脂酶(GCase或GBA)、颗粒蛋白前体(PGRN)、鞘脂激活蛋白原(PSAP)、糖蛋白非转移性蛋白B

(GPNMB)、γ分泌酶、死亡受体6(DR6)、淀粉样前体蛋白(APP)、p75神经营养因子受体(p75NTR)、胱天蛋白酶6、分拣蛋白(SORT)、髓系细胞上表达的触发受体2(TREM2)、CD33或唾液酸结合Ig样凝集素3(Siglec3)、唾液酸结合Ig样凝集素5(Siglec5)、唾液酸结合Ig样凝集素7(Siglec7)、唾液酸结合Ig样凝集素9(Siglec9)、配对免疫球蛋白样2型受体α(PILRA)、跨膜4结构域A4A(MS4A4A)、跨膜4结构域A6A(MS4A6A)或跨膜蛋白106B(TMEM106b)、丛集素(APOJ)、络丝蛋白、泛素蛋白连接酶E3A(UBE3A)、三肽基肽酶1(CLN2/TPP1)、α-L-艾杜糖醛酸酶(IDUA)、艾杜糖醛酸2-硫酸酯酶(IDS)、葡萄糖胺(N-乙酰基)-6-硫酸酯酶(GNS)、类肝素-α-氨基葡萄糖苷N-乙酰基转移酶(HGSNAT)、和N-乙酰基-α-氨基葡萄糖苷酶(NAGLU)、N-磺基葡萄糖胺磺基水解酶(SGSH),或其一部分。

42.如权利要求40或41所述的融合蛋白,其进一步包含Fc结构域。

43.如权利要求42所述的融合蛋白,其中所述Fc结构域能够结合FcRn。

44.如权利要求42或43所述的融合蛋白,其包含(i)结合至人TfR的单个scFv或VHH或Fab抗原结合结构域,和(ii)所述异源蛋白或肽的两个拷贝。

45.如权利要求44所述的融合蛋白,其中所述结合至人TfR的单个scFv、Fab或VHH抗原结合结构域连接至所述异源蛋白或肽的两个拷贝之一的C端。

46.如权利要求44所述的融合蛋白,其中所述异源蛋白或肽的两个拷贝连接至所述Fc结构域的N端。

47.如权利要求44所述的融合蛋白,其中所述结合至人TfR的单个scFv、Fab或VHH抗原结合结构域连接至所述Fc结构域的N端。

48.如权利要求44所述的融合蛋白,其中所述异源蛋白或肽的两个拷贝连接至所述Fc结构域的C端。

49.如权利要求40-43中任一项所述的融合蛋白,其包含(i)结合至人TfR的抗体,其中所述抗体包含两条重链和两条轻链;和(ii)所述异源蛋白或肽的两个拷贝,其中所述异源蛋白或肽的每个拷贝连接至所述两条抗体重链之一的C端。

50.如权利要求40-43中任一项所述的融合蛋白,其包含(i)结合至人TfR的两个scFv、Fab或VHH抗原结合结构域,(ii)Fc结构域;和(iii)所述异源蛋白或肽的两个拷贝,其中所述结合至人TfR的两个scFv、Fab或VHH抗原结合结构域连接至所述Fc结构域的C端,并且所述异源蛋白或肽的两个拷贝连接至所述Fc结构域的N端。

51.如权利要求40-43中任一项所述的融合蛋白,其包含(i)结合至人TfR的单个scFv、VHH或Fab抗原结合结构域,(ii)Fc结构域,和(iii)所述异源蛋白或肽的单个拷贝,其中所述结合至人TfR的单个scFv、VHH或Fab抗原结合结构域连接至所述Fc结构域的C端,并且所述异源蛋白或多肽连接至所述Fc结构域的N端。

52.如权利要求40-43中任一项所述的融合蛋白,其包含(i)结合至人TfR的单个scFv、VHH或Fab抗原结合结构域,(ii)Fc结构域,和(iii)所述异源蛋白或肽的单个拷贝,其中所述结合至人TfR的单个scFv、VHH或Fab抗原结合结构域连接至所述Fc结构域的N端,并且所述异源蛋白或多肽连接至所述Fc结构域的C端。

53.如权利要求40-43中任一项所述的融合蛋白,其包含(i)结合至人TfR的单个scFv、VHH或Fab抗原结合结构域,(ii)Fc结构域,和(iii)所述异源蛋白或肽的单个拷贝,其中所述结合至人TfR的单个scFv、VHH或Fab抗原结合结构域和所述异源蛋白或多肽均连接至所

述Fc结构域的N端。

54.如权利要求42-53中任一项所述的融合蛋白,其中所述Fc结构域为异二聚Fc,其任选地包含杵突变和臼突变。

55.如权利要求42-54中任一项所述的融合蛋白,其中所述Fc为单链单价Fc。

56.如权利要求42-55中任一项所述的融合蛋白,其中所述Fc为具有表1或2中所列修饰的修饰的Fc。

57.如权利要求40-56中任一项所述的融合蛋白,其中所述Fc包含降低效应子功能的突变,任选地其中所述降低效应子功能的突变包含(i)L234A、L235A和/或P331S,和/或(ii)N325S和/或L328F,和/或(iii)P329G或P329S。

58.一种抗体,其包含如权利要求1-39中任一项所述的抗原结合结构域。

59.一种抗体或其抗原结合片段,其与如权利要求1-39中任一项所述的抗原结合结构域结合至相同的人TfR表位。

60.一种抗体或其抗原结合片段,其竞争性地抑制如权利要求1-39中任一项所述的抗原结合结构域与人TfR的结合。

61.一种多特异性蛋白,其包含第一抗原结合结构域,所述第一抗原结合结构域为连接至第二抗原结合结构域的如权利要求1-39中任一项所述的抗原结合结构域,任选地其中所述第二抗原结合结构域特异性结合至CNS抗原。

62.一种多特异性蛋白,其包含连接至抗体或其抗原结合片段的如权利要求1-39中任一项所述的抗原结合结构域,任选地其中所述抗体或其抗原结合片段特异性结合至CNS抗原。

63.如权利要求62所述的多特异性蛋白,其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链恒定区。

64.如权利要求63所述的多特异性蛋白,其中如权利要求1-39中任一项所述的抗原结合结构域任选地经由氨基酸接头连接至所述重链恒定区的C端。

65.如权利要求61-64中任一项所述的多特异性蛋白,其中所述多特异性蛋白为双特异性的。

66.如权利要求61-65中任一项所述的多特异性蛋白,其中所述多特异性蛋白为二价、三价或四价的。

67.如权利要求66所述的多特异性蛋白,其中所述多特异性蛋白为二价的。

68.如权利要求66所述的多特异性蛋白,其中所述多特异性蛋白为三价的,任选地其中所述三价蛋白包含一个结合至人TfR的抗原结合结构域和两个结合至CNS抗原的抗原结合结构域。

69.如权利要求66所述的多特异性蛋白,其中所述多特异性蛋白为四价的,任选地其中所述四价蛋白包含两个结合至人TfR的抗原结合结构域和两个结合至CNS抗原的抗原结合结构域。

70.一种多特异性蛋白,其为三价和双特异性的并且包含连接至与CNS抗原结合的抗体的如权利要求1-36和38中任一项所述的抗原结合结构域,其中所述抗体包含两条重链和两条轻链,并且其中所述抗原结合结构域为任选地经由氨基酸接头连接至所述两条抗体重链之一的C端的scFv。

71.一种多特异性蛋白,其为三价和双特异性的并且包含连接至与CNS抗原结合的抗体的如权利要求1-36和38中任一项所述的抗原结合结构域,其中所述抗体包含两条重链和两条轻链,并且其中所述抗原结合结构域为任选地经由氨基酸接头连接至所述两条抗体重链之一的N端的scFv。

72.一种多特异性蛋白,其为四价和双特异性的并且包含如权利要求1-36和38中任一项所述的两个抗原结合结构域以及结合至CNS抗原的抗体,其中所述抗体包含两条重链和两条轻链,其中所述两个抗原结合结构域各自为scFv、Fab或VHH,其中所述两个抗原结合结构域之一任选地经由氨基酸接头连接至所述抗体重链之一的C端,并且其中所述另一抗原结合结构域任选地经由氨基酸接头连接至所述另一抗体重链的C端。

73.一种多特异性蛋白,其为四价和双特异性的并且包含如权利要求1-36和38中任一项所述的两个抗原结合结构域以及结合至CNS抗原的抗体,其中所述抗体包含两条重链和两条轻链,其中所述两个抗原结合结构域各自为scFv、Fab或VHH,其中所述两个抗原结合结构域之一任选地经由氨基酸接头连接至所述抗体重链之一的N端,并且其中所述另一抗原结合结构域任选地经由氨基酸接头连接至所述另一抗体重链的N端。

74.一种多特异性蛋白,其为四价和双特异性的并且包含如权利要求1-36和38中任一项所述的两个抗原结合结构域以及结合至CNS抗原的抗体,其中所述抗体包含两条重链和两条轻链,其中所述两个抗原结合结构域各自为scFv、Fab或VHH,其中所述两个抗原结合结构域之一任选地经由氨基酸接头连接至所述抗体重链之一的N端,并且其中所述另一抗原结合结构域任选地经由氨基酸接头连接至所述另一抗体重链的C端。

75.如权利要求73或74所述的多特异性蛋白,其中如权利要求1-36和38中任一项所述的两个抗原结合结构域为同一抗原结合结构域的两个拷贝。

76.一种多特异性蛋白,其为二价和双特异性的,其包含:(i)Fc结构域,(ii)如权利要求1-39中任一项所述的单个抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域为结合至人TfR并连接至所述Fc结构域的N端的单个scFv、VHH或Fab抗原结合结构域,和(iii)特异性结合CNS抗原的第二抗原结合结构域,其中所述第二抗原结合结构域为连接至所述Fc结构域的C端的单个scFv、VHH或Fab。

77.一种多特异性蛋白,其为二价和双特异性的,其包含:(i)Fc结构域,(ii)如权利要求1-39中任一项所述的单个抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域为结合至人TfR并连接至所述Fc结构域的C端的单个scFv、VHH或Fab抗原结合结构域,和(iii)特异性结合CNS抗原的第二抗原结合结构域,其中所述第二抗原结合结构域为连接至所述Fc结构域的N端的单个scFv、VHH或Fab。

78.如权利要求76或77所述的多特异性蛋白,其中所述Fc结构域为异二聚Fc,其任选地包含杵突变和臼突变。

79.如权利要求76-78中任一项所述的多特异性蛋白,其中所述Fc为具有一个或多个表1或2中所列修饰的修饰的Fc。

80.如权利要求76-79中任一项所述的多特异性蛋白,其中所述Fc包含降低效应子功能的突变,任选地其中所述降低效应子功能的突变包含(i)L234A、L235A和/或P331S,和/或(ii)N325S和/或L328F,和/或(iii)P329G或P329S。

81.如权利要求62-75中任一项所述的多特异性蛋白,其中所述抗体或其抗原结合片段

包含含有杵突变的恒定区和含有臼突变的恒定区。

82.如权利要求81所述的多特异性蛋白,其中所述抗原结合结构域任选地经由氨基酸接头连接至所述含有臼突变的恒定区。

83.如权利要求81所述的多特异性蛋白,其中所述抗原结合结构域任选地经由氨基酸接头连接至所述含有杵突变的恒定区。

84.如权利要求82或83所述的多特异性蛋白,其中所述氨基酸接头为甘氨酸-丝氨酸接头。

85.如权利要求84所述的多特异性蛋白,其中所述甘氨酸-丝氨酸接头包含氨基酸序列(GGGGS)x3(SEQ ID NO:184)或氨基酸序列(GGSGG)x3(SEQ ID NO:289)。

86.如权利要求61-85中任一项所述的多特异性蛋白,其中所述CNS抗原为脑抗原。

87.如权利要求61-86中任一项所述的多特异性蛋白,其中所述CNS抗原不是TfR。

88.如权利要求62-75和81-87中任一项所述的多特异性蛋白,其中所述抗体或其抗原结合片段包含降低效应子功能的突变,任选地其中所述降低效应子功能的突变包含(i)L234A、L235A和/或P331S,和/或(ii)N325S和/或L328F,和/或(iii)P329G或P329S。

89.如权利要求62-75和81-88中任一项所述的多特异性蛋白,其中所述抗体或其抗原结合片段包含恒定区,所述恒定区包含杵突变和降低效应子功能的突变,任选地其中所述降低效应子功能的突变包含(i)L234A、L235A和/或P331S,和/或(ii)N325S和/或L328F,和/或(iii)P329G或P329S。

90.如权利要求62-75和81-88中任一项所述的多特异性蛋白,其中所述抗体或其抗原结合片段包含恒定区,所述恒定区包含臼突变和降低效应子功能的突变,任选地其中所述降低效应子功能的突变包含(i)L234A、L235A和/或P331S,和/或(ii)N325S和/或L328F,和/或(iii)P329G或P329S。

91.如权利要求62-75和81-90中任一项所述的多特异性蛋白,其中所述抗体或其抗原结合片段为IgG抗体或其抗原结合片段。

92.如权利要求91所述的多特异性蛋白,其中所述IgG抗体或其抗原结合片段为IgG1抗体或其抗原结合片段或IgG4抗体或其抗原结合片段。

93.如权利要求61-92中任一项所述的多特异性蛋白,其中所述多特异性蛋白以约65nM至约4μM的平衡解离常数($K_D$)结合人TfR且/或以约37nM至约1.3μM的$K_D$结合食蟹猴TfR。

94.如权利要求61-93中任一项所述的多特异性蛋白,其中所述多特异性蛋白在血脑屏障上皮细胞中的内化是同种型对照的内化的大于10倍或大于40倍,任选地其中所述血脑屏障上皮细胞为HCMEC/D3细胞。

95.如权利要求61-94中任一项所述的多特异性蛋白,其中相对于用同种型对照处理的HCMEC/D3细胞上TfR的细胞表面表达,所述多特异性蛋白不会将HCMEC/D3细胞上TfR的细胞表面表达降低超过60%。

96.如权利要求61-95中任一项所述的多特异性蛋白,其中相对于用同种型对照处理的HCMEC/D3细胞上TfR的细胞表面表达,所述多特异性蛋白不会将HCMEC/D3细胞上TfR的细胞表面表达降低超过40%。

97.如权利要求61-96中任一项所述的多特异性蛋白,其中相对于用同种型对照处理的HCMEC/D3细胞上TfR的细胞表面表达,所述多特异性蛋白不会显著增加HCMEC/D3细胞上TfR

的细胞表面表达。

98.如权利要求61-97中任一项所述的多特异性蛋白,其中在血管耗竭的小鼠脑中,所述多特异性蛋白的累积是同种型对照的至少4倍或5倍。

99.如权利要求61、65-69、76-80和93-97中任一项所述的多特异性蛋白,其中所述第二抗原结合结构域与人TfR的特异性结合是与不相关蛋白的结合的至少5倍。

100.如权利要求61、65-69、76-80和93-98中任一项所述的多特异性蛋白,其中所述第二抗原结合结构域与食蟹猴TfR的特异性结合是与不相关蛋白的结合的至少5倍。

101.如权利要求99或100所述的多特异性蛋白,其中所述第二抗原结合结构域与人TfR的结合是与不相关蛋白的结合的至少5倍且/或与食蟹猴TfR的特异性结合是与不相关蛋白的结合的至少5倍。

102.如权利要求61-101中任一项所述的多特异性蛋白,其中所述CNS抗原为β-分泌酶1(BACE1)、Abeta、表皮生长因子受体(EGFR)、人表皮生长因子受体2(HER2)、tau、载脂蛋白、载脂蛋白E(ApoE)、载脂蛋白E4(ApoE4)、α-突触核蛋白、CD20、亨廷顿蛋白、朊蛋白(PrP)、富含亮氨酸的重复激酶2(LRRK2)、parkin、早老素1、早老素2、β-葡萄糖脑苷脂酶(Gcase或GBA)、颗粒蛋白前体(PGRN)、鞘脂激活蛋白原(PSAP)、γ分泌酶、死亡受体6(DR6)、淀粉样前体蛋白(APP)、p75神经营养因子受体(p75NTR)、胱天蛋白酶6、分拣蛋白(SORT)、髓系细胞上表达的触发受体2(TREM2)、唾液酸结合Ig样凝集素3(Siglec3)、唾液酸结合Ig样凝集素5(Siglec5)、唾液酸结合Ig样凝集素7(Siglec7)、唾液酸结合Ig样凝集素9(Siglec9)、唾液酸结合Ig样凝集素11(Siglec11)、糖蛋白非转移性黑色素瘤蛋白B(GPNMB)、配对免疫球蛋白样2型受体α(PILRA)、跨膜4结构域A4A(MS4A4A)、跨膜4结构域A6A(MS4A6A)、MS4A4E、跨膜蛋白106B(TMEM106b)、泛素蛋白连接酶E3A(UBE3A)、CR1、ABCA1、ABCA7、HLA-DR1、HLA-DR5、IL1RAP、TREML2、IL-34、SORL1或ADAM1。

103.如权利要求102所述的多特异性蛋白,其中所述CNS抗原为MS4A4A,任选地其中(i)所述结合至MS4A4A的抗原结合结构域、抗体或抗原结合结构域包含VH和/或VL,所述VH包含SEQ ID NO:406的MS4A4A结合VH序列,所述VL包含SEQ ID NO:407的VL序列;且/或(ii)所述结合至人TfR的抗原结合结构域包含SEQ ID NO:406的scFv序列。

104.如权利要求103所述的多特异性蛋白,其中所述多特异性蛋白包含SEQ ID NO:405-407的氨基酸序列。

105.如权利要求61-104中任一项所述的多特异性蛋白,其中所述多特异性蛋白能够结合FcRn。

106.如权利要求40-57中任一项所述的融合蛋白、如权利要求58-60中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、或如权利要求61-105中任一项所述的多特异性蛋白,其中所述融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白连接至显像剂。

107.如权利要求40-57中任一项所述的融合蛋白、如权利要求58-60中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、或如权利要求61-105中任一项所述的多特异性蛋白,其能够穿过BBB。

108.一种组合物,其包含第一多核苷酸、第二多核苷酸和第三多核苷酸,其中所述第一多核苷酸、所述第二多核苷酸和所述第三多核苷酸编码如权利要求61-105中任一项所述的多特异性蛋白,其中所述第一多核苷酸编码第一重链,所述第二多核苷酸编码第二重链和

所述特异性结合至人TfR的抗原结合结构域,并且所述第三多核苷酸编码轻链。

109.一种组合物,其包含第一多核苷酸、第二多核苷酸和第三多核苷酸,其中所述第一多核苷酸、所述第二多核苷酸和所述第三多核苷酸编码如权利要求61-105中任一项所述的多特异性蛋白,其中所述第一多核苷酸编码第一重链和特异性结合至人TfR的第一抗原结合结构域,所述第二多核苷酸编码第二重链和特异性结合至人TfR的第二抗原结合结构域,并且所述第三多核苷酸编码轻链,任选地其中所述结合至人TfR的第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域包含相同的氨基酸序列。

110.如权利要求108或109所述的组合物,其中所述第一重链包含杵突变且所述第二重链包含臼突变。

111.如权利要求108-110中任一项所述的组合物,其中所述第一多核苷酸、所述第二多核苷酸和所述第三多核苷酸的比率为约1:3:6。

112.如权利要求108或109所述的组合物,其中所述第一重链包含臼突变且所述第二重链包含杵突变。

113.一种组合物,其包含第一多核苷酸和第二多核苷酸,其中所述第一多核苷酸和所述第二多核苷酸编码如权利要求61-105中任一项所述的多特异性蛋白,其中所述第一多核苷酸编码重链和所述结合至人TfR的抗原结合结构域,并且其中所述第二多核苷酸编码轻链。

114.一种宿主细胞,其包含如权利要求108-113中任一项所述的组合物。

115.一种分离的多核苷酸,其包含编码如权利要求1-39中任一项所述的抗原结合结构域的重链的核酸分子。

116.一种分离的多核苷酸,其包含编码如权利要求1-39中任一项所述的抗原结合结构域的轻链可变区的核酸分子。

117.一种分离的载体,其包含如权利要求115所述的多核苷酸和/或如权利要求116所述的多核苷酸。

118.一种分离的载体,其包含编码如权利要求1-39中任一项所述的抗原结合结构域的重链可变区的核酸分子和编码所述抗原结合结构域的轻链可变区的核酸分子。

119.一种宿主细胞,其包含如权利要求115或116所述的多核苷酸或如权利要求117或118所述的载体。

120.如权利要求114或119所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞选自由以下组成的组:组织培养中的大肠杆菌、假单胞菌属、芽孢杆菌属、链霉菌属、酵母属、CHO、YB/20、NS0、PER-C6、HEK-293T、NIH-3T3、HeLa、BHK、Hep G2、SP2/0、R1.1、B-W、L-M、COS1、COS 7、BSC1、BSC40、BMT10细胞、植物细胞、昆虫细胞和人细胞。

121.一种产生抗原结合结构域或多特异性蛋白的方法,其包括培养如权利要求114、119和120中任一项所述的宿主细胞,使得产生所述抗原结合结构域或多特异性蛋白,任选地其中所述方法进一步包括从所述培养物中分离所述抗原结合结构域或多特异性蛋白。

122.一种分离的抗原结合结构域或其多特异性蛋白,其通过如权利要求121所述的方法产生。

123.一种药物组合物,其包含(i)如权利要求1-107中任一项所述的抗原结合结构域、融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白和(ii)药学上可接受的载剂。

124.如权利要求123所述的药物组合物,其中与同种型对照相比,所述融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白在向受试者施用后在脑中的浓度增加。

125.如权利要求123或124所述的药物组合物,其中与同种型对照相比,施用使融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、多特异性蛋白、或药物组合物向脑内的递送增加了至少50%、至少100%、至少200%、至少500%或至少1000%。

126.一种治疗受试者的神经系统疾病或病症的方法,其包括向所述受试者施用如权利要求40-107和123-125中任一项所述的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、多特异性蛋白、或药物组合物。

127.如权利要求126所述的方法,其中与同种型对照相比,施用使融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、多特异性蛋白、或药物组合物向脑内的递送增加了至少50%、至少100%、至少200%、至少500%或至少1000%。

128.如权利要求126或127所述的方法,其中施用增加融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、多特异性蛋白、或药物组合物向额叶皮层、内嗅皮层和/或海马体中的递送。

129.如权利要求126-128所述的方法,其中所述神经系统疾病或病症选自神经病变病症、神经退行性疾病、癌症、眼部疾病病症、癫痫发作、溶酶体贮积症、淀粉样变性、病毒或微生物疾病、缺血、行为障碍和CNS炎症。

130.如权利要求129所述的方法,其中所述神经系统疾病或病症选自阿尔茨海默氏病(AD)、亨廷顿病、肌张力障碍、共济失调、贝尔氏麻痹、中风、痴呆、路易体痴呆、肌营养不良(MD)、多发性硬化症(MS)、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)、囊性纤维化、安格曼氏综合征、利德尔综合征、帕金森氏病、皮克氏病、佩吉特氏病、癌症、脑炎、创伤性脑损伤和边缘为主的年龄相关性TDP-43脑病(LATE)。

131.如权利要求130所述的方法,其中所述痴呆为额颞叶痴呆(FTD)。

132.如权利要求130所述的方法,其中所述神经系统疾病或病症为阿尔茨海默氏病。

133.如权利要求132所述的方法,其中所述阿尔茨海默氏病为早发性阿尔茨海默氏病、前驱阿尔茨海默氏病、轻度阿尔茨海默氏病或迟发性阿尔茨海默氏病。

134.如权利要求130所述的方法,其中所述神经系统疾病或病症为帕金森氏病。

135.如权利要求126所述的方法,其中所述神经系统疾病或病症为额颞叶癫痫。

136.如权利要求126所述的方法,其中所述神经系统疾病或病症为自闭症。

137.如权利要求126所述的方法,其中所述神经系统疾病或病症为无脑回畸形。

138.一种治疗受试者的溶酶体贮积症的方法,其包括向所述受试者施用如权利要求40-107和123-125中任一项所述的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、多特异性蛋白、或药物组合物。

139.如权利要求138所述的方法,其中所述溶酶体贮积症选自戈谢病、蜡样脂质褐质病(巴顿病)、粘多糖贮积症(MPS)I型、MPSII型和MPS III型。

140.一种转运融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白穿过受试者的BBB的方法,其包括向所述受试者施用如权利要求40-107和123-125中任一项所述的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、多特异性蛋白、或药物组合物。

141.如权利要求140所述的方法,其中与同种型对照相比,所述融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白在施用后在脑中的浓度增加。

142.如权利要求140或141所述的方法,其中与同种型对照相比,所述融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、多特异性蛋白、或药物组合物在脑中的浓度增加了至少50%、至少100%、至少200%、至少500%或至少1000%。

143.如权利要求140-142所述的方法,其中与施用同种型对照相比,所述融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白的施用不会造成所述受试者中网织红细胞计数降低超过10%。

144.如权利要求143所述的方法,其中与同种型对照相比,所述融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白的施用不会造成所述受试者中网织红细胞计数降低。

145.一种提高受试者的CSF中的CNS结合抗原的浓度的方法,其包括向所述受试者施用如权利要求61-105中任一项所述的多特异性蛋白,其中所述CNS结合抗原的浓度与向所述受试者施用单独所述CNS结合抗原相比有所增加。

146.一种对受试者内的CNS抗原进行成像的方法,其包括向所述受试者施用如权利要求106所述的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白,以及将所述显像剂定位在所述受试者内。

147.一种体外检测CNS抗原的方法,其包括使体外样品与如权利要求106所述的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白接触和将所述显像剂定位在所述样品内。

148.如权利要求40-107和123-125中任一项所述的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、多特异性蛋白或药物组合物在如权利要求126-147中任一项所述的方法中的用途。

149.如权利要求40-107和123-125中任一项所述的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、多特异性蛋白或药物组合物,其用于如权利要求126-147中任一项所述的方法中。

# 转铁蛋白受体抗原结合结构域及其用途

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求2022年7月29日申请的美国临时申请号63/369,898;2022年9月8日申请的美国临时申请号63/374,967;2023年3月10日申请的美国临时申请号63/489,693;2023年4月11日申请的美国临时申请号63/495,511;和2023年7月14日申请的美国临时申请号63/513,820的优先权权益;所述申请各自以引用方式整体并入本文。

[0003] 对电子提交的序列表的参考

[0004] 电子提交的序列表(名称:4503_022PC05_SeqListing_ST26.xml;大小:660,697字节;以及创建日期:2023年7月13日)的内容以引用方式整体并入本文。

## 技术领域

[0005] 本公开涉及特异性结合至人转铁蛋白受体(TfR)的抗原结合结构域。这些抗原结合结构域可穿过血脑屏障并且可跨血脑屏障转运与抗原结合结构域相关的其他剂(例如,治疗活性剂)。

## 背景技术

[0006] 物质从血液被动转移至脑受到血脑屏障(BBB)限制。BBB精确控制中枢神经系统(CNS)的稳态,从而实现适当的神经元功能,并且还保护神经组织免受毒素和病原体的侵害。BBB的改变是不同神经系统疾病的病理和进展的重要组成部分。然而,BBB在向CNS递送治疗剂方面存在问题。虽然重组蛋白和抗体治疗剂在CNS外已取得了很大成功,但此类生物制剂无法有效穿过BBB。因此,一些治疗剂向CNS的递送依赖于治疗剂向CNS中的直接注射。然而,此类注射为侵入性操作,其功效受到含有治疗剂的脑脊液(CSF)从脑至血液的快速输出的限制。或者,可以高剂量全身施用意图用于CNS的治疗剂,以允许治疗剂充分渗透BBB。然而,由于周围的高剂量或为实现高剂量而增加的制造和调配负担,此方法可能会产生非预期的效果。因此,需要用于跨BBB递送治疗剂的改进的产品和方法。

## 发明内容

[0007] 本文提供了特异性结合至人转铁蛋白受体(TfR)的抗原结合结构域、融合蛋白、抗体和多特异性蛋白,以及其制备和使用方法。

[0008] 在一些方面中,本文提供了一种特异性结合至人转铁蛋白受体(TfR)的顶端结构域的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域在周围注射后定位于受试者的脑实质,并且其中所述抗原结合结构域不在修饰的CH3结构域内。

[0009] 在一些方面中,本文提供了一种特异性结合至人转铁蛋白受体(TfR)的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域包含重链可变区(VH)互补决定区(CDR)1、VH CDR2、VH CDR3以及轻链可变区(VL)CDR1、CDR2和CDR3序列,所述序列包含以下氨基酸序列:分别为SEQ ID NO:94、415、418、423、150和151;分别为SEQ ID NO:74-76和135-137;分别为SEQ ID NO:77-79和138-140;分别为SEQ ID NO:80-82和135-137;分别为SEQ ID NO:83-85和141-

143;分别为SEQ ID NO:74、86、76和135-137;分别为SEQ ID NO:87-89和143-145;分别为SEQ ID NO:90-92和146-148;分别为SEQ ID NO:83、93、85和141-143;分别为SEQ ID NO:94-96和149-151;分别为SEQ ID NO:97、86、98和135-137;分别为SEQ ID NO:99、100、101和152-154;分别为SEQ ID NO:99、102、103和155-157;分别为SEQ ID NO:104-106、138、158和159;分别为SEQ ID NO:107-109和160-162;分别为SEQ ID NO:99、110、103和155-157;分别为SEQ ID NO:99、111、112、152、163和164;分别为SEQ ID NO:90、113、114、165、166和157;分别为SEQ ID NO:83、115、85、141、142和167;分别为SEQ ID NO:116、110、103和155-157;分别为SEQ ID NO:117-119和168-170;分别为SEQ ID NO:116、110、103和168-170;分别为SEQ ID NO:90、120、114、165、166和157;分别为SEQ ID NO:90、113、114、171、166和157;分别为SEQ ID NO:97、121、122、135、136和172;分别为SEQ ID NO:74、123、124、173、136和137;分别为SEQ ID NO:74、125、126、174、136和137;分别为SEQ ID NOs:99、127、128、155、175和176;分别为SEQ ID NO:90、129、130、165、166和157;分别为SEQ ID NO:131、132、133、177、166和178;分别为SEQ ID NO:131、132、133和179-181;分别为SEQ ID NO:90、134、114、165、166和157;分别为SEQ ID NO:83、302、303、141、142和182;分别为SEQ ID NO:99、305、103、307、308和157;分别为SEQ ID NO:99、306、103、307、308和157;分别为SEQ ID NO:99、306、103、307、309和157;分别为SEQ ID NO:99、306、103、310、311和157;分别为SEQ ID NO:99、305、103、310、311和157;分别为SEQ ID NO:99、312、103、307、308和157;分别为SEQ ID NO:99、312、103、307、309和157;分别为SEQ ID NO:99、312、103、310、311和157;分别为SEQ ID NO:94、95、418、421、150和151;分别为SEQ ID NO:94、412、419、422、150和151;分别为SEQ ID NO:94、412、420、422、150和151;分别为SEQ ID NO:94、413、418、422、150和151;分别为SEQ ID NO:94、414、418、422、150和151;分别为SEQ ID NO:94、416、418、422、150和151;分别为SEQ ID NO:94、417、418、424、150和151;分别为SEQ ID NO:460、312、103、307、309和157;分别为SEQ ID NO:460、312、461、307、309和157;分别为SEQ ID NO:460、312、462、307、309和157;分别为SEQ ID NO:460、312、463、307、309和157;分别为SEQ ID NO:460、312、464、307、309和157;分别为SEQ ID NO:460、312、465、307、309和157;分别为SEQ ID NO:460、312、466、307、309和157;分别为SEQ ID NO:460、312、467、307、309和157;分别为SEQ ID NO:460、312、468、307、309和157;分别为SEQ ID NO:460、312、469、307、309和157;分别为SEQ ID NO:460、312、470、307、309和157;分别为SEQ ID NO:460、312、103、471、309和157;分别为SEQ ID NO:460、312、103、472、309和157;分别为SEQ ID NO:460、312、103、473、309和157;分别为SEQ ID NO:460、312、103、474、309和157;分别为SEQ ID NO:460、312、103、475、309和157;分别为SEQ ID NO:460、312、103、476、309和157;或分别为SEQ ID NO:460、312、103、471、309和157。

[0010] 在一些方面中,抗原结合结构域包含VH和VL,其中所述VH和所述VL包含和以下氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%同一性的氨基酸序列:分别为SEQ ID NO:399和400;分别为SEQ ID NO:10和11;分别为SEQ ID NO:12和13;分别为SEQ ID NO:14和15;分别为SEQ ID NO:16和17;分别为SEQ ID NO:18和19;分别为SEQ ID NO:20和21;分别为SEQ ID NO:22和23;分别为SEQ ID NO:24和25;分别为SEQ ID NO:26和27;分别为SEQ ID NO:28和29;分别为SEQ ID NO:30和31;分别为SEQ ID NO:32和33;分别为SEQ ID NO:34和35;分别为SEQ ID NO:36和37;分别为SEQ ID NO:38和39;分别为SEQ ID

NO:40和41;分别为SEQ ID NO:42和43;分别为SEQ ID NO:44和45;分别为SEQ ID NO:46和47;分别为SEQ ID NO:48和49;分别为SEQ ID NO:50和51;分别为SEQ ID NO:52和53;分别为SEQ ID NO:54和55;分别为SEQ ID NO:56和57;分别为SEQ ID NO:58和59;分别为SEQ ID NO:60和61;分别为SEQ ID NO:62和63;分别为SEQ ID NO:64和65;分别为SEQ ID NO:66和67;分别为SEQ ID NO:68和69;分别为SEQ ID NO:70和71;分别为SEQ ID NO:72和73;分别为SEQ ID NO:313和314;分别为SEQ ID NO:315和316;分别为SEQ ID NO:317和314;分别为SEQ ID NO:318和316;分别为SEQ ID NO:319和314;分别为SEQ ID NO:320和316;分别为SEQ ID NO:321和314;分别为SEQ ID NO:322和316;分别为SEQ ID NO:323和314;分别为SEQ ID NO:324和316;分别为SEQ ID NO:325和326;分别为SEQ ID NO:327和328;分别为SEQ ID NO:325和329;分别为SEQ ID NO:330和331;分别为SEQ ID NO:325和332;分别为SEQ ID NO:330和333;分别为SEQ ID NO:334和332;分别为SEQ ID NO:335和336;分别为SEQ ID NO:337和338;分别为SEQ ID NO:38和33;分别为SEQ ID NO:339和340;分别为SEQ ID NO:339和341;分别为SEQ ID NO:339和342;分别为SEQ ID NO:343和340;分别为SEQ ID NO:343和342;分别为SEQ ID NO:344和340;分别为SEQ ID NO:344和341;分别为SEQ ID NO:344和342;分别为SEQ ID NO:345和340;分别为SEQ ID NO:345和341;分别为SEQ ID NO:345和342;分别为SEQ ID NO:346和347;分别为SEQ ID NO:348和316;分别为SEQ ID NO:349和347;分别为SEQ ID NO:349和350;分别为SEQ ID NO:351和352;分别为SEQ ID NO:349和353;分别为SEQ ID NO:346和354;分别为SEQ ID NO:349和355;分别为SEQ ID NO:349和356;分别为SEQ ID NO:357和316;分别为SEQ ID NO:349和358;分别为SEQ ID NO:349和316;分别为SEQ ID NO:359和360;分别为SEQ ID NO:361和362;分别为SEQ ID NO:363和316;分别为SEQ ID NO:364和365;分别为SEQ ID NO:349和366;分别为SEQ ID NO:346和316;分别为SEQ ID NO:346和367;分别为SEQ ID NO:349和368;分别为SEQ ID NO:369和316;分别为SEQ ID NO:346和370;分别为SEQ ID NO:371和316;分别为SEQ ID NO:372和356;分别为SEQ ID NO:357和358;分别为SEQ ID NO:349和373;分别为SEQ ID NO:346和374;分别为SEQ ID NO:375和316;分别为SEQ ID NO:376和316;分别为SEQ ID NO:346和377;分别为SEQ ID NO:378和379;分别为SEQ ID NO:380和381;分别为SEQ ID NO:349和382;分别为SEQ ID NO:357和383;分别为SEQ ID NO:349和358;分别为SEQ ID NO:384和316;分别为SEQ ID NO:385和316;分别为SEQ ID NO:357和386;分别为SEQ ID NO:387和388;分别为SEQ ID NO:359和316;分别为SEQ ID NO:389和316;分别为SEQ ID NO:390和316;分别为SEQ ID NO:391和392;分别为SEQ ID NO:393和356;分别为SEQ ID NO:390和392;分别为SEQ ID NO:357和386;分别为SEQ ID NO:394和395;分别为SEQ ID NO:396和395;分别为SEQ ID NO:397和395;分别为SEQ ID NO:398和395;分别为SEQ ID NO:401和395;分别为SEQ ID NO:402和403;分别为SEQ ID NO:443和341;分别为SEQ ID NO:444和341;分别为SEQ ID NO:445和341;分别为SEQ ID NO:446和341;分别为SEQ ID NO:447和341;分别为SEQ ID NO:448和341;分别为SEQ ID NO:449和341;分别为SEQ ID NO:450和341;分别为SEQ ID NO:451和341;分别为SEQ ID NO:452和341;分别为SEQ ID NO:453和341;分别为SEQ ID NO:443和454;分别为SEQ ID NO:443和455;分别为SEQ ID NO:443和456;分别为SEQ ID NO:443和457;分别为SEQ ID NO:443和458;或分别为SEQ ID NO:443和459。

[0011] 在一些方面中,本文提供了一种特异性结合至人TfR的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域包含VH和VL,其中所述VH包含以下氨基酸序列:SEQ ID NO:399、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、313、315、317、318、319、320、321、322、323、324、325、327、330、334、335、337、38、339、343、344、345、346、348、349、351、357、359、361、363、364、369、371、372、375、376、378、380、384、385、387、389、390、391、393、394、396、397、398、401、402、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452或453。

[0012] 在一些方面中,本文提供了一种特异性结合至人TfR的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域包含VH和VL,其中所述VL包含以下氨基酸序列:SEQ ID NO:400、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、314、316、326、328、329、331、332、333、336、338、340、341、342、347、350、352、353、354、355、356、358、360、362、365、366、367、368、370、373、374、377、379、381、382、383、386、388、392、395、403、454、455、456、457、458或459。

[0013] 在一些方面中,本文提供的抗原结合结构域包含含有以下氨基酸序列的VH和VL:分别为SEQ ID NO:399和400;分别为SEQ ID NO:10和11;分别为SEQ ID NO:12和13;分别为SEQ ID NO:14和15;分别为SEQ ID NO:16和17;分别为SEQ ID NO:18和19;分别为SEQ ID NO:20和21;分别为SEQ ID NO:22和23;分别为SEQ ID NO:24和25;分别为SEQ ID NO:26和27;分别为SEQ ID NO:28和29;分别为SEQ ID NO:30和31;分别为SEQ ID NO:32和33;分别为SEQ ID NO:34和35;分别为SEQ ID NO:36和37;分别为SEQ ID NO:38和39;分别为SEQ ID NO:40和41;分别为SEQ ID NO:42和43;分别为SEQ ID NO:44和45;分别为SEQ ID NO:46和47;分别为SEQ ID NO:48和49;分别为SEQ ID NO:50和51;分别为SEQ ID NO:52和53;分别为SEQ ID NO:54和55;分别为SEQ ID NO:56和57;分别为SEQ ID NO:58和59;分别为SEQ ID NO:60和61;分别为SEQ ID NO:62和63;分别为SEQ ID NO:64和65;分别为SEQ ID NO:66和67;分别为SEQ ID NO:68和69;分别为SEQ ID NO:70和71;分别为SEQ ID NO:72和73;分别为SEQ ID NO:313和314;分别为SEQ ID NO:315和316;分别为SEQ ID NO:317和314;分别为SEQ ID NO:318和316;分别为SEQ ID NO:319和314;分别为SEQ ID NO:320和316;分别为SEQ ID NO:321和314;分别为SEQ ID NO:322和316;分别为SEQ ID NO:323和314;分别为SEQ ID NO:324和316;分别为SEQ ID NO:325和326;分别为SEQ ID NO:327和328;分别为SEQ ID NO:325和329;分别为SEQ ID NO:330和331;分别为SEQ ID NO:325和332;分别为SEQ ID NO:330和333;分别为SEQ ID NO:334和332;分别为SEQ ID NO:335和336;分别为SEQ ID NO:337和338;分别为SEQ ID NO:38和33;分别为SEQ ID NO:339和340;分别为SEQ ID NO:339和341;分别为SEQ ID NO:339和342;分别为SEQ ID NO:343和340;分别为SEQ ID NO:343和342;分别为SEQ ID NO:344和340;分别为SEQ ID NO:344和341;分别为SEQ ID NO:344和342;分别为SEQ ID NO:345和340;分别为SEQ ID NO:345和341;分别为SEQ ID NO:345和342;分别为SEQ ID NO:346和347;分别为SEQ ID NO:348和316;分别为SEQ ID NO:349和347;分别为SEQ ID NO:349和350;分别为SEQ ID NO:351和352;分别为SEQ ID NO:349和353;分别为SEQ ID NO:346和354;分别为SEQ ID NO:349和355;分别为SEQ ID NO:349和356;分别为SEQ ID NO:357和316;分别为SEQ ID NO:349和358;分别为SEQ ID NO:349和316;分别为SEQ ID NO:359和360;分别为SEQ ID NO:361和362;分别为SEQ ID

NO:363和316;分别为SEQ ID NO:364和365;分别为SEQ ID NO:349和366;分别为SEQ ID NO:346和316;分别为SEQ ID NO:346和367;分别为SEQ ID NO:349和368;分别为SEQ ID NO:369和316;分别为SEQ ID NO:346和370;分别为SEQ ID NO:371和316;分别为SEQ ID NO:372和356;分别为SEQ ID NO:357和358;分别为SEQ ID NO:349和373;分别为SEQ ID NO:346和374;分别为SEQ ID NO:375和316;分别为SEQ ID NO:376和316;分别为SEQ ID NO:346和377;分别为SEQ ID NO:378和379;分别为SEQ ID NO:380和381;分别为SEQ ID NO:349和382;分别为SEQ ID NO:357和383;分别为SEQ ID NO:349和358;分别为SEQ ID NO:384和316;分别为SEQ ID NO:385和316;分别为SEQ ID NO:357和386;分别为SEQ ID NO:387和388;分别为SEQ ID NO:359和316;分别为SEQ ID NO:389和316;分别为SEQ ID NO:390和316;分别为SEQ ID NO:391和392;分别为SEQ ID NO:393和356;分别为SEQ ID NO:390和392;分别为SEQ ID NO:357和386;分别为SEQ ID NO:394和395;分别为SEQ ID NO:396和395;分别为SEQ ID NO:397和395;分别为SEQ ID NO:398和395;分别为SEQ ID NO:401和395;分别为SEQ ID NO:402和403;分别为SEQ ID NO:443和341;分别为SEQ ID NO:444和341;分别为SEQ ID NO:445和341;分别为SEQ ID NO:446和341;分别为SEQ ID NO:447和341;分别为SEQ ID NO:448和341;分别为SEQ ID NO:449和341;分别为SEQ ID NO:450和341;分别为SEQ ID NO:451和341;分别为SEQ ID NO:452和341;分别为SEQ ID NO:453和341;分别为SEQ ID NO:443和454;分别为SEQ ID NO:443和455;分别为SEQ ID NO:443和456;分别为SEQ ID NO:443和457;分别为SEQ ID NO:443和458;或分别为SEQ ID NO:443和459。

[0014] 在一些方面中,抗原结合结构域特异性结合至人转铁蛋白受体(TfR)的顶端结构域,所述抗原结合结构域在周围注射后定位于受试者的脑实质,并且所述抗原结合结构域不在修饰的CH3结构域内。

[0015] 在一些方面中,抗原结合结构域能够穿过血脑屏障(BBB)。在一些方面中,抗原结合结构域结合至食蟹猴TfR。在一些方面中,抗原结合结构域内化于血脑屏障上皮细胞中。在一些方面中,血脑屏障上皮细胞为HCMEC/D3细胞。

[0016] 在一些方面中,抗原结合结构域以500nM与10μM之间的亲和力结合人TfR。在一些方面中,抗原结合结构域以2μM与8μM之间的亲和力结合人TfR。在一些方面中,抗原结合结构域以2μM与5μM之间的亲和力结合人TfR。在一些方面中,抗原结合结构域以750nM与2μM之间的亲和力结合人TfR。在一些方面中,抗原结合结构域以50nM与500nM之间的亲和力结合人TfR。在一些方面中,抗原结合结构域以100nM与250nM之间的亲和力结合人TfR。在一些方面中,抗原结合结构域以1nM与50nM之间的亲和力结合人TfR。在一些方面中,抗原结合结构域以6.7nM至3.5μM的亲和力结合人TfR。在一些方面中,抗原结合结构域以38nM至2.3μM的亲和力结合至食蟹猴TfR。在一些方面中,抗原结合结构域以约3.5μM的亲和力结合至人TfR。在一些方面中,抗原结合结构域以约1.5μM的亲和力结合至食蟹猴TfR。在一些方面中,通过高通量表面等离子共振(SPR)检测来测量亲和力。

[0017] 在一些方面中,相对于用同种型对照处理的HCMEC/D3细胞上TfR的细胞表面表达,抗原结合结构域不会将HCMEC/D3细胞上TfR的细胞表面表达降低超过60%。在一些方面中,相对于用同种型对照处理的HCMEC/D3细胞上TfR的细胞表面表达,抗原结合结构域不会将HCMEC/D3细胞上TfR的细胞表面表达降低超过40%。在一些方面中,相对于用同种型对照处

理的HCMEC/D3细胞上TfR的细胞表面表达,抗原结合结构域不会显著增加HCMEC/D3细胞上TfR的细胞表面表达。在一些方面中,在血管耗竭的小鼠脑中,抗原结合结构域的累积是同种型对照的至少4倍或至少5倍。

[0018] 在一些方面中,抗原结合结构域与人TfR的特异性结合是与不相关蛋白的结合的至少5倍。在一些方面中,抗原结合结构域与食蟹猴TfR的特异性结合是与不相关蛋白的结合的至少5倍。在一些方面中,抗原结合结构域与人TfR的结合是与不相关蛋白的结合的至少5倍且/或与食蟹猴TfR的特异性结合是与不相关蛋白的结合的至少5倍。在一些方面中,在静脉内施用抗原结合结构域后,抗原结合结构域不显著降低灵长类动物脑中的TfR表达水平。

[0019] 在一些方面中,抗原结合结构域在单一多肽链上包含VH和VL。在一些方面中,抗原结合结构域包含单链可变片段(scFv)。在一些方面中,scFv处于VH-接头-VL的取向中。在一些方面中,scFv处于VL-接头-VH的取向中。在一些方面中,接头为约5至约25个氨基酸、为约5至约20个氨基酸、为约10至约25个氨基酸、或为约10至约20个氨基酸。在一些方面中,接头包含GGSEGKSSGSGSESKSTGG S(SEQ ID NO:183)或GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:288)的氨基酸序列。在一些方面中,抗原结合结构域包含第一多肽上的VH和第二多肽上的VL。

[0020] 在一些方面中,抗原结合结构域包含SEQ ID NO:404、185、186、189、190、192、193、195-259和261-284中任一项的氨基酸序列。

[0021] 在一些方面中,抗原结合结构域为鼠、嵌合、人源化或人抗原结合结构域,任选地其中抗原结合结构域为人源化抗原结合结构域。

[0022] 在一些方面中,本文提供了一种特异性结合至人TfR的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域为VHH并且包含(i)本文提供的抗原结合结构域的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,或(ii)本文提供的抗原结合结构域的VH,任选地其中VHH能够穿过血脑屏障(BBB)。

[0023] 在一些方面中,本文提供了一种融合蛋白,其包含本文提供的抗原结合结构域和异源蛋白或肽。在一些方面中,本文提供的异源蛋白或肽包含以下的氨基酸序列:β-分泌酶1(BACE1)、Abeta、表皮生长因子受体(EGFR)、人表皮生长因子受体2(HER2)、tau、载脂蛋白、载脂蛋白E(ApoE)、载脂蛋白E4(ApoE4)、α-突触核蛋白、CD20、亨廷顿蛋白、朊蛋白(PrP)、富含亮氨酸的重复激酶2(LRRK2)、parkin、早老素1、早老素2、β-葡萄糖脑苷脂酶(GCase或GBA)、颗粒蛋白前体(PGRN)、鞘脂激活蛋白原(PSAP)、糖蛋白非转移性蛋白B(GPNMB)、γ分泌酶、死亡受体6(DR6)、淀粉样前体蛋白(APP)、p75神经营养因子受体(p75NTR)、胱天蛋白酶6、分拣蛋白(SORT)、髓系细胞上表达的触发受体2(TREM2)、CD33或唾液酸结合Ig样凝集素3(Siglec3)、唾液酸结合Ig样凝集素5(Siglec5)、唾液酸结合Ig样凝集素7(Siglec7)、唾液酸结合Ig样凝集素9(Siglec9)、配对免疫球蛋白样2型受体α(PILRA)、跨膜4结构域A4A(MS4A4A)、跨膜4结构域A 6A(MS4A6A)或跨膜蛋白106B(TMEM106b)、丛集素(APOJ)、络丝蛋白、泛素蛋白连接酶E3A(UBE3A)、三肽基肽酶1(CLN2/TPP1)、α-L-艾杜糖醛酸酶(IDUA)、艾杜糖醛酸2-硫酸酯酶(IDS)、葡萄糖胺(N-乙酰基)-6-硫酸酯酶(GNS)、类肝素-α-氨基葡萄糖苷N-乙酰基转移酶(HGSNAT)、N-乙酰基-α-氨基葡萄糖苷酶(NAGLU)、或N-磺基葡萄糖胺磺基水解酶(SGSH),或其一部分。

[0024] 在一些方面中,本文提供了一种融合蛋白,其进一步包含Fc结构域。在一些方面中,Fc结构域能够结合FcRn。

[0025] 在一些方面中,本文提供了一种融合蛋白,其包含(i)结合至人TfR的单个scFv或VHH或Fab抗原结合结构域,和(ii)异源蛋白或肽的两个拷贝。在一些方面中,包含结合至人TfR的单个scFv、Fab或VHH抗原结合结构域的融合蛋白连接至异源蛋白或肽的两个拷贝之一的C端。在一些方面中,异源蛋白或肽的两个拷贝连接至Fc结构域的N端。在一些方面中,结合至人TfR的单个scFv、Fab或VHH抗原结合结构域连接至本文提供的融合蛋白的Fc结构域的N端。在一些方面中,异源蛋白或肽的两个拷贝连接至本文提供的融合蛋白的Fc结构域的C端。

[0026] 在一些方面中,本文提供了一种融合蛋白,其包含(i)结合至人TfR的抗体,其中所述抗体包含两条重链和两条轻链;和(ii)异源蛋白或肽的两个拷贝,其中异源蛋白或肽的每个拷贝连接至两条抗体重链之一的C端。在一些方面中,本文提供了一种融合蛋白,其包含(i)结合至人TfR的两个scFv、Fab或VHH抗原结合结构域,(ii)Fc结构域;和(iii)异源蛋白或肽的两个拷贝,其中结合至人TfR的两个scFv、Fab或VHH抗原结合结构域连接至Fc结构域的C端,并且异源蛋白或肽的两个拷贝连接至Fc结构域的N端。在一些方面中,本文提供了一种融合蛋白,其包含(i)结合至人TfR的单个scFv、VHH或Fab抗原结合结构域,(ii)Fc结构域,和(iii)异源蛋白或肽的单个拷贝,其中结合至人TfR的单个scFv、VHH或Fab抗原结合结构域连接至Fc结构域的C端,并且异源蛋白或多肽连接至Fc结构域的N端。在一些方面中,本文提供了一种融合蛋白,其包含(i)结合至人TfR的单个scFv、VHH或Fab抗原结合结构域,(ii)Fc结构域,和(iii)异源蛋白或肽的单个拷贝,其中结合至人TfR的单个scFv、VHH或Fab抗原结合结构域连接至Fc结构域的N端,并且异源蛋白或多肽连接至Fc结构域的C端。在一些方面中,本文提供了一种融合蛋白,其包含(i)结合至人TfR的单个scFv、VHH或Fab抗原结合结构域,(ii)Fc结构域,和(iii)异源蛋白或肽的单个拷贝,其中结合至人TfR的单个scFv、VHH或Fab抗原结合结构域和异源蛋白或多肽均连接至Fc结构域的N端。

[0027] 在一些方面中,Fc结构域为异二聚Fc,任选地包含杵和臼(knob and hole)突变。在一些方面中,Fc为单链单价Fc。在一些方面中,Fc为具有一个或多个表1或2中所列修饰的修饰的Fc。在一些方面中,Fc包含降低效应子功能的突变,任选地其中降低效应子功能的突变包含(i)L234A、L235A和/或P331S,和/或(ii)N325S和/或L328F,和/或(iii)P329G或P329S。

[0028] 在一些方面中,本文提供了一种抗体,其包含本文提供的抗原结合结构域。在一些方面中,本文提供了一种抗体或其抗原结合片段,其与本文提供的抗原结合结构域结合至相同的人TfR表位。在一些方面中,本文提供了一种抗体或其抗原结合片段,其竞争性地抑制本文提供的抗原结合结构域与人TfR的结合。

[0029] 在一些方面中,本文提供了一种多特异性蛋白,其包含第一抗原结合结构域,所述第一抗原结合结构域为连接至第二抗原结合结构域的本文提供的抗原结合结构域。在一些方面中,第二抗原结合结构域特异性结合至CNS抗原。在一些方面中,本文提供了一种多特异性蛋白,其包含连接至抗体或其抗原结合片段的本文提供的抗原结合结构域。在一些方面中,抗体或其抗原结合片段特异性结合至CNS抗原。在一些方面中,抗体或其抗原结合片段包含重链恒定区。在一些方面中,本文提供的抗原结合结构域任选地经由氨基酸接头连接至重链恒定区的C端。在一些方面中,多特异性蛋白为双特异性的。在一些方面中,多特异性蛋白为二价、三价或四价的。在一些方面中,多特异性蛋白为二价的。在一些方面中,多特

异性蛋白为三价的,任选地其中三价蛋白包含一个结合至人TfR的抗原结合结构域和两个结合至CNS抗原的抗原结合结构域。在一些方面中,多特异性蛋白为四价的,任选地其中四价蛋白包含两个结合至人TfR的抗原结合结构域和两个结合至CNS抗原的抗原结合结构域。

[0030] 在一些方面中,本文提供了一种多特异性蛋白,其为三价和双特异性的并且包含连接至与CNS抗原结合的抗体的本文提供的抗原结合结构域,其中所述抗体包含两条重链和两条轻链,并且其中抗原结合结构域为任选地经由氨基酸接头连接至两条抗体重链之一的C端的scFv。

[0031] 在一些方面中,本文提供了一种多特异性蛋白,其为三价和双特异性的并且包含连接至与CNS抗原结合的抗体的本文提供的抗原结合结构域,其中所述抗体包含两条重链和两条轻链,并且其中抗原结合结构域为任选地经由氨基酸接头连接至两条抗体重链之一的N端的scFv。

[0032] 在一些方面中,本文提供了一种多特异性蛋白,其为四价和双特异性的并且包含两个本文提供的抗原结合结构域和与CNS抗原结合的抗体,其中所述抗体包含两条重链和两条轻链,其中两个抗原结合结构域各自为scFv、Fab或VHH,其中两个抗原结合结构域之一任选地经由氨基酸接头连接至抗体重链之一的C端,并且其中另一抗原结合结构域任选地经由氨基酸接头连接至另一抗体重链的C端。

[0033] 在一些方面中,本文提供了一种多特异性蛋白,其为四价和双特异性的并且包含两个本文提供的抗原结合结构域和与CNS抗原结合的抗体,其中所述抗体包含两条重链和两条轻链,其中两个抗原结合结构域各自为scFv、Fab或VHH,其中两个抗原结合结构域之一任选地经由氨基酸接头连接至抗体重链之一的N端,并且其中另一抗原结合结构域任选地经由氨基酸接头连接至另一抗体重链的N端。

[0034] 在一些方面中,本文提供了一种多特异性蛋白,其为四价和双特异性的并且包含两个本文提供的抗原结合结构域和与CNS抗原结合的抗体,其中所述抗体包含两条重链和两条轻链,其中两个抗原结合结构域各自为scFv、Fab或VHH,其中两个抗原结合结构域之一任选地经由氨基酸接头连接至抗体重链之一的N端,并且其中另一抗原结合结构域任选地经由氨基酸接头连接至另一抗体重链的C端。

[0035] 在一些方面中,本文提供的两个抗原结合结构域为同一抗原结合结构域的两个拷贝。

[0036] 在一些方面中,本文提供了一种多特异性蛋白,其为二价和双特异性的,其包含:(i)Fc结构域,(ii)单个本文提供的抗原结合结构域,其中抗原结合结构域为结合至人TfR并连接至Fc结构域的N端的单个scFv、VHH或Fab抗原结合结构域,和(iii)特异性结合CNS抗原的第二抗原结合结构域,其中第二抗原结合结构域为连接至Fc结构域的C端的单个scFv、VHH或Fab。

[0037] 在一些方面中,本文提供了一种多特异性蛋白,其为二价和双特异性的,其包含:(i)Fc结构域,(ii)单个本文提供的抗原结合结构域,其中抗原结合结构域为结合至人TfR并连接至Fc结构域的C端的单个scFv、VHH或Fab抗原结合结构域,和(iii)特异性结合CNS抗原的第二抗原结合结构域,其中第二抗原结合结构域为连接至Fc结构域的N端的单个scFv、VHH或Fab。

[0038] 在一些方面中,Fc结构域为异二聚Fc,任选地包含杵和臼突变。在一些方面中,Fc

为具有一个或多个表1或2中所列修饰的修饰的Fc。在一些方面中,Fc包含降低效应子功能的突变,任选地其中降低效应子功能的突变包含(i)L234A、L235A和/或P331S,和/或(ii)N325S和/或L328F,和/或(iii)P329G或P329S。在一些方面中,抗体或其抗原结合片段包含降低效应子功能的突变,任选地其中降低效应子功能的突变包含(i)L234A、L235A和/或P331S,和/或(ii)N325S和/或L328F,和/或(iii)P329G或P329S。在一些方面中,抗体或其抗原结合片段包含恒定区,所述恒定区包含杵突变和降低效应子功能的突变,任选地其中降低效应子功能的突变包含(i)L234A、L235A和/或P331S,和/或(ii)N325S和/或L328F,和/或(iii)P329G或P329S。在一些方面中,抗体或其抗原结合片段包含恒定区,所述恒定区包含臼突变和降低效应子功能的突变,任选地其中降低效应子功能的突变包含(i)L234A、L235A和/或P331S,和/或(ii)N325S和/或L328F,和/或(iii)P329G或P329S。

[0039] 在一些方面中,抗体或其抗原结合片段包含含有杵突变的恒定区和含有臼突变的恒定区。在一些方面中,抗原结合结构域任选地经由氨基酸接头连接至含有臼突变的恒定区。在一些方面中,抗原结合结构域任选地经由氨基酸接头连接至含有杵突变的恒定区。

[0040] 在一些方面中,氨基酸接头为甘氨酸-丝氨酸接头。在一些方面中,甘氨酸-丝氨酸接头包含氨基酸序列(GGGGS)x3(SEQ ID NO:184)或氨基酸序列(GGSGG)x3(SEQ ID NO:289)。

[0041] 在一些方面中,CNS抗原为脑抗原。在一些方面中,CNS抗原不是TfR。

[0042] 在一些方面中,抗体或其抗原结合片段为IgG抗体或其抗原结合片段。在一些方面中,IgG抗体或其抗原结合片段为IgG1抗体或其抗原结合片段或IgG4抗体或其抗原结合片段。

[0043] 在一些方面中,多特异性蛋白以约65nM至约4μM的平衡解离常数(KD)结合人TfR且/或以约37nM至约1.3μM的KD结合食蟹猴TfR。

[0044] 在一些方面中,多特异性蛋白在血脑屏障上皮细胞中的内化与同种型对照的内化相比大于10倍或大于40倍,任选地其中血脑屏障上皮细胞为HCMEC/D3细胞。在一些方面中,相对于用同种型对照处理的HCMEC/D3细胞上TfR的细胞表面表达,多特异性蛋白不会将HCMEC/D3细胞上TfR的细胞表面表达降低超过60%。在一些方面中,相对于用同种型对照处理的HCMEC/D3细胞上TfR的细胞表面表达,多特异性蛋白不会将HCMEC/D3细胞上TfR的细胞表面表达降低超过40%。在一些方面中,相对于用同种型对照处理的HCMEC/D3细胞上TfR的细胞表面表达,多特异性蛋白不会显著增加HCMEC/D3细胞上TfR的细胞表面表达。

[0045] 在一些方面中,在血管耗竭的小鼠脑中,多特异性蛋白的累积是同种型对照的至少4倍或5倍。在一些方面中,第二抗原结合结构域与人TfR的特异性结合是与不相关蛋白的结合的至少5倍。在一些方面中,第二抗原结合结构域与食蟹猴TfR的特异性结合是与不相关蛋白的结合的至少5倍。在一些方面中,第二抗原结合结构域与人TfR的结合是与不相关蛋白的结合的至少5倍且/或与食蟹猴TfR的特异性结合是与不相关蛋白的结合的至少5倍。

[0046] 在一些方面中,CNS抗原为β-分泌酶1(BACE1)、Abeta、表皮生长因子受体(EGFR)、人表皮生长因子受体2(HER2)、tau、载脂蛋白、载脂蛋白E(ApoE)、载脂蛋白E4(ApoE4)、α-突触核蛋白、CD20、亨廷顿蛋白、朊蛋白(PrP)、富含亮氨酸的重复激酶2(LRRK2)、parkin、早老素1、早老素2、β-葡萄糖脑苷脂酶(GCase或GBA)、颗粒蛋白前体(PGRN)、鞘脂激活蛋白原(PSAP)、γ分泌酶、死亡受体6(DR6)、淀粉样前体蛋白(APP)、p75神经营养因子受体

(p75NTR)、胱天蛋白酶6、分拣蛋白(SORT)、髓系细胞上表达的触发受体2(TREM2)、唾液酸结合Ig样凝集素3(Siglec3)、唾液酸结合Ig样凝集素5(Siglec5)、唾液酸结合Ig样凝集素7(Siglec7)、唾液酸结合Ig样凝集素9(Siglec9)、唾液酸结合Ig样凝集素11(Siglec11)、糖蛋白非转移性黑色素瘤蛋白B(GPNMB)、配对免疫球蛋白样2型受体α(PILRA)、跨膜4结构域A4A(MS4A4A)、跨膜4结构域A 6A(MS4A6A)、MS4A4E、跨膜蛋白106B(TMEM106b)、泛素蛋白连接酶E3A(UBE3A)、CR1、ABCA1、ABCA7、HLA-DR1、HLA-DR5、IL1RAP、TREML2、IL-34、SORL1或ADAM1。在一些方面中,CNS抗原为MS4A4A,任选地其中(i)结合至MS4A4A的抗原结合结构域、抗体或抗原结合结构域包含VH和/或VL,所述VH包含SEQ ID NO:406的MS4A4A结合VH序列,所述VL包含SEQ ID NO:407的VL序列;且/或(ii)结合至人TfR的抗原结合结构域包含SEQ ID NO:406的scFv序列。

[0047] 在一些方面中,多特异性蛋白包含SEQ ID NO:405-407的氨基酸序列。

[0048] 在一些方面中,多特异性蛋白能够结合FcRn。

[0049] 在一些方面中,本文提供的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段或多特异性蛋白连接至显像剂。

[0050] 在一些方面中,本文提供的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段或多特异性蛋白能够穿过BBB。

[0051] 在一些方面中,本文提供了一种组合物,其包含第一多核苷酸、第二多核苷酸和第三多核苷酸,其中第一多核苷酸、第二多核苷酸和第三多核苷酸编码本文提供的多特异性蛋白,其中第一多核苷酸编码第一重链,第二多核苷酸编码第二重链和特异性结合至人TfR的抗原结合结构域,并且第三多核苷酸编码轻链。

[0052] 在一些方面中,本文提供了一种组合物,其包含第一多核苷酸、第二多核苷酸和第三多核苷酸,其中第一多核苷酸、第二多核苷酸和第三多核苷酸编码本文提供的多特异性蛋白,其中第一多核苷酸编码第一重链和特异性结合至人TfR的第一抗原结合结构域,第二多核苷酸编码第二重链和特异性结合至人TfR的第二抗原结合结构域,并且第三多核苷酸编码轻链,任选地其中结合至人TfR的第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域包含相同的氨基酸序列。

[0053] 在一些方面中,第一重链包含杵突变并且第二重链包含臼突变。

[0054] 在一些方面中,第一重链包含臼突变并且第二重链包含杵突变。在一些方面中,第一重链包含臼突变并且第二重链包含杵突变。

[0055] 在一些方面中,第一多核苷酸、第二多核苷酸和第三多核苷酸的比率为约1:3:6。

[0056] 在一些方面中,本文提供了一种组合物,其包含第一多核苷酸和第二多核苷酸,其中第一多核苷酸和第二多核苷酸编码本文提供的多特异性蛋白,其中第一多核苷酸编码重链和结合至人TfR的抗原结合结构域,并且其中第二多核苷酸编码轻链。

[0057] 在一些方面中,本文提供了一种宿主细胞,其包含本文提供的组合物。

[0058] 在一些方面中,本文提供了一种分离的多核苷酸,其包含编码本文提供的抗原结合结构域的重链的核酸分子。在一些方面中,本文提供了一种分离的多核苷酸,其包含编码本文提供的抗原结合结构域的轻链可变区的核酸分子。

[0059] 在一些方面中,本文提供了一种分离的载体,其包含本文提供的多核苷酸。

[0060] 在一些方面中,本文提供了一种分离的载体,其包含编码本文提供的抗原结合结

构域的重链可变区的核酸分子和编码抗原结合结构域的轻链可变区的核酸分子。

[0061] 在一些方面中,本文提供了一种宿主细胞,其包含本文提供的多核苷酸或本文提供的载体。在一些方面中,宿主细胞选自由以下组成的组:组织培养中的大肠杆菌(E.coli)、假单胞菌属(Pseudomonas)、芽孢杆菌属(Bacillus)、链霉菌属(Streptomyces)、酵母属、CHO、YB/20、NS0、PER-C6、HEK-293T、NIH-3T3、HeLa、BHK、Hep G2、SP2/0、R1.1、B-W、L-M、COS1、COS 7、BSC1、BSC40、BMT10细胞、植物细胞、昆虫细胞和人细胞。

[0062] 在一些方面中,本文提供了一种产生抗原结合结构域或多特异性蛋白的方法,其包括培养本文提供的宿主细胞以便产生抗原结合结构域或多特异性蛋白,任选地其中所述方法进一步包括从培养物中分离抗原结合结构域或多特异性蛋白。

[0063] 在一些方面中,本文提供了一种分离的抗原结合结构域或其多特异性蛋白,其通过本文提供的方法产生。

[0064] 在一些方面中,本文提供了一种药物组合物,其包含(i)本文提供的抗原结合结构域、融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白,和(ii)药学上可接受的载剂。在一些方面中,与同种型对照相比,融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白在向受试者施用后在脑中的浓度增加。在一些方面中,与同种型对照相比,所述施用使融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、多特异性蛋白、或药物组合物向脑内的递送增加了至少50%、至少100%、至少200%、至少500%或至少1000%。

[0065] 在一些方面中,本文提供了一种治疗受试者的神经系统疾病或病症的方法,其包括向受试者施用本文提供的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、多特异性蛋白、或药物组合物。在一些方面中,与同种型对照相比,所述施用使融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、多特异性蛋白、或药物组合物向脑内的递送增加了至少50%、至少100%、至少200%、至少500%或至少1000%。在一些方面中,所述施用增加融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、多特异性蛋白、或药物组合物向额叶皮层、内嗅皮层和/或海马体中的递送。

[0066] 在一些方面中,神经系统疾病或病症选自神经病变病症、神经退行性疾病、癌症、眼部疾病病症、癫痫发作、溶酶体贮积症、淀粉样变性、病毒或微生物疾病、缺血、行为障碍和CNS炎症。在一些方面中,神经系统疾病或病症选自阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease,AD)、亨廷顿病(Huntington's disease)、肌张力障碍、共济失调、贝尔氏麻痹(Bell's palsy)、中风、痴呆、路易体痴呆、肌营养不良(MD)、多发性硬化症(MS)、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)、囊性纤维化、安格曼氏综合征(Angelman's syndrome)、利德尔综合征(Liddle syndrome)、帕金森氏病(Parkinson's disease)、皮克氏病(Pick's disease)、佩吉特氏病(Paget's disease)、癌症、脑炎、创伤性脑损伤和边缘为主的年龄相关性TDP-43脑病(LATE)。在一些方面中,痴呆为额颞叶痴呆(FTD)。在一些方面中,神经系统疾病或病症为阿尔茨海默氏病。在一些方面中,阿尔茨海默氏病为早发性阿尔茨海默氏病、前驱阿尔茨海默氏病、轻度阿尔茨海默氏病或迟发性阿尔茨海默氏病。在一些方面中,神经系统疾病或病症为帕金森氏病。在一些方面中,神经系统疾病或病症为额颞叶癫痫。在一些方面中,神经系统疾病或病症为自闭症。在一些方面中,神经系统疾病或病症为无脑回畸形。

[0067] 在一些方面中,本文提供了一种治疗受试者的溶酶体贮积症的方法,其包括向受试者施用本文提供的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、多特异性蛋白、或药物组合物。在一些方面中,溶酶体贮积症选自戈谢病(Gaucher disease)、蜡样脂质褐质病(巴顿病

(Batten disease))、粘多糖贮积症(MPS)I型、MPS II型和MPS III型。

[0068] 在一些方面中,本文提供了一种转运融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白穿过受试者的BBB的方法,其包括向受试者施用本文提供的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、多特异性蛋白、或药物组合物。

[0069] 在一些方面中,与同种型对照相比,融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白在施用后在脑中的浓度增加。在一些方面中,与同种型对照相比,融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、多特异性蛋白、或药物组合物在脑中的浓度增加了至少50%、至少100%、至少200%、至少500%或至少1000%。

[0070] 在一些方面中,与施用同种型对照相比,融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白的施用不会造成受试者中网织红细胞计数降低超过10%。在一些方面中,与同种型对照相比,融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白的施用不会造成受试者中网织红细胞计数降低。

[0071] 在一些方面中,本文提供了一种增加受试者CSF中CNS结合抗原的浓度的方法,其包括向受试者施用本文提供的多特异性蛋白,其中CNS结合抗原的浓度与向受试者单独施用CNS结合抗原相比有所增加。

[0072] 在一些方面中,本文提供了一种对受试者内的CNS抗原进行成像的方法,其包括向受试者施用本文提供的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白,以及将显像剂定位在受试者内。

[0073] 在一些方面中,本文提供了一种体外检测CNS抗原的方法,其包括使体外样品与本文提供的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白接触,和将显像剂定位在所述样品内。

[0074] 在一些方面中,本文提供了一种本文提供的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、多特异性蛋白、或药物组合物在本文提供的方法中的用途。

[0075] 在一些方面中,本文提供了一种本文提供的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、多特异性蛋白、或药物组合物,其用于本文提供的方法中。

[0076] 应理解,可组合本文所述的各种方面的一个、一些或全部特性以形成本公开的其他方面。本公开的这些和其他方面对于本领域技术人员而言将变得显而易知。本公开的这些和其他方面通过以下具体实施方式进一步描述。

## 附图说明

[0077] 图1A示出了2+1双特异性抗体的实例。

[0078] 图1B示出了2+2双特异性抗体的实例。

[0079] 图1C示出了具有两个不同scFv的2+2双特异性抗体的实例。

[0080] 图1D示出了包含TfR抗原结合结构域的示例性形式。(i)示出了示例性2+1双特异性抗体形式;(ii)示出了示例性1+1抗体形式;并且(iii)示出了另一示例性1+1抗体形式,具有两个不同的VHH结构域。

[0081] 图1E示出了包含TfR抗原结合结构域和异源蛋白或多肽的融合蛋白的示例性形式。圆形“pacman”形状代表异源蛋白或多肽。(i)、(ii)、(iii)和(iv)示出了示例性1+1融合蛋白形式。(v)和(vi)示出了示例性2+1融合蛋白形式。(vii)示出了示例性2+2融合蛋白形

式。

[0082] 图2示出了用2+1抗TfR双特异性抗体处理后hCMEC/D3细胞上的TfR表面水平,其经由FACS来评价。(参见实施例13。)

[0083] 图3示出了用人源化2+1抗TfR双特异性抗体处理后hCMEC/D3细胞上的TfR表面水平,其经由FACS来评价。(参见实施例13。)

[0084] 图4示出了用2+1抗TfR双特异性抗体处理后hCMEC/D3细胞中的总TfR蛋白水平,其经由蛋白质印迹来评价。(参见实施例13。)

[0085] 图5示出了2+1抗TfR双特异性抗体的脑PK相对于同种型对照的倍数变化。(参见实施例17。)

[0086] 图6示出了2+1抗TfR双特异性抗体在野生型和hTfR ECD$^{+/-}$敲入小鼠中的血清PK。(参见实施例19。)

[0087] 图7示出了与来自同种型治疗动物的总血管TfR水平相比,在向hu-TfR$^{+/-}$KI小鼠注射抗TfR抗体(即,TfR-9.1B.39和TfR-15.WH8)后的总血管TfR水平。(参见实例20。)

[0088] 图8示出了2+1抗TfR双特异性抗体治疗后的血液网织红细胞水平。(参见实例21。)

[0089] 图9示出了2+1抗TfR双特异性抗体针对BBB细胞系的适度抗体依赖性细胞毒性(ADCC)反应。(参见实施例22。)

[0090] 图10示出了NSLF和LALAPS强烈改善来自2+1抗TfR双特异性抗体的ADCC信号。(参见实施例22。)

[0091] 图11示出了在体外测定中通过sTREM2水平测量的2+1抗TfR双特异性抗体活性。(参见实施例24。)

[0092] 图12示出了施用2+1抗TfR双特异性抗体后非人灵长类动物(NHP)中的绝对网织红细胞计数。(参见实施例26。)

[0093] 图13示出了第一次给药和第二次给药后2+1抗TfR双特异性抗体的血清和CSF水平。(参见实施例27。)

[0094] 图14示出了施用2+1抗TfR双特异性抗体后NHP脑级分中的抗体浓度。(参见实施例28。)

[0095] 图15示出了施用2+1抗TfR双特异性抗体后NHP的血清和CSF中的可溶性TREM2(sTREM2)水平。(参见实施例29。)

[0096] 图16示出了施用2+1抗TfR双特异性抗体后NHP的CSF中的CSF-1水平。(参见实施例29。)

[0097] 图17示出了在第2剂量的2+1抗TfR抗体后48小时食蟹猴脑切片中的相对TfR蛋白水平(通过夹心Meso Scale Discovery方法测定)。每只动物的Tfr蛋白浓度均已归一化,并示出为对照治疗动物(hIgG1 Iso)平均值中的TfR水平百分比。(参见实例30。)

## 具体实施方式

[0098] 本公开涉及特异性结合至人转铁蛋白受体(TfR)的抗原结合结构域;包含此类抗原结合结构域的抗体及其抗原结合片段;制备和使用此类抗原结合结构域、抗体及其抗原结合片段的方法;包含此类抗原结合结构域、抗体及其抗原结合片段的药物组合物;编码此类抗原结合结构域、抗体及其抗原结合片段的核酸;以及包含编码此类抗原结合结构域、抗

体及其抗原结合片段的核酸的宿主细胞。

[0099] 本文所描述或所提及的技术和程序一般由本领域技术人员充分理解且通常使用常规方法加以使用,诸如广泛利用的方法,诸如Sambrook等人Molecular Cloning:A Laboratory Manual第3版(2001)Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.;Current Protocols in Molecular Biology(F.M.Ausubel等人编,(2003);Monoclonal Antibodies:A Practical Approach(P.Shepherd和C.Dean编,Oxford University Press,2000)中所述的那些。

[0100] 定义

[0101] 术语“中枢神经系统”和“CNS”是指控制身体功能的神经组织复合体,并且包括脑、脊髓。

[0102] 术语“血脑屏障”和“BBB”是指由紧密型连结紧密密封的脑毛细血管内皮细胞网络。

[0103] “中枢神经系统抗原”或“CNS抗原”为在CNS(包括脑)中表达的抗原,其可用抗体或小分子靶向。此类抗原的实例包括但不限于:β-分泌酶1(BACE1)、淀粉样蛋白β(Abeta)、表皮生长因子受体(EGFR)、人表皮生长因子受体2(HER2)、tau、载脂蛋白E4(ApoE4)、α-突触核蛋白、CD20、亨廷顿蛋白、朊蛋白(PrP)、富含亮氨酸的重复激酶2(LRRK2)、parkin、早老素1、早老素2、β-葡萄糖脑苷脂酶(Gcase或GBA)、颗粒蛋白前体(PGRN)、鞘脂激活蛋白原(PSAP)、γ分泌酶、死亡受体6(DR6)、淀粉样前体蛋白(APP)、p75神经营养因子受体(p75NTR)、介白素6受体(IL6R)、TNF受体1(TNFR1)、介白素1β(IL1(3))、胱天蛋白酶6、分拣蛋白(SORT)、髓系细胞上表达的触发受体2(TREM2)、CD33或唾液酸结合Ig样凝集素3(Siglec3)、唾液酸结合Ig样凝集素5(Siglec5)、唾液酸结合Ig样凝集素7(Siglec7)、唾液酸结合Ig样凝集素9(Siglec9)、糖蛋白非转移性黑色素瘤蛋白B(GPNMB)、配对免疫球蛋白样2型受体α(PILRA)、跨膜4结构域A4A(MS4A4A)、跨膜4结构域A 6A(MS4A6A)、泛素蛋白连接酶E3A(UBE3A)或跨膜蛋白106B(TMEM106b)。

[0104] “脑抗原”为在脑中表达的CNS抗原。

[0105] 除非另外指示,否则术语“转铁蛋白受体”、“TfR”、“TfR多肽”或“TfR蛋白”在本文中可互换使用,是指来自任何脊椎动物来源,包括哺乳动物,诸如灵长类动物(例如,人和食蟹猴(cynomolgus monkey,cyno))和啮齿动物(例如,小鼠和大鼠)的任何天然TfR。TfR也称为转铁蛋白受体蛋白1、TR、tfR1、Trfr、T9和p90。在一些方面中,所述术语涵盖野生型序列和天然存在的变体序列,例如剪接变体或等位基因变体。在一些方面中,所述术语涵盖“全长”未加工TfR以及由在细胞中加工产生的任何形式的TfR。在一些方面中,TfR为人TfR。如本文所用,术语“人TfR”是指具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的多肽。

[0106] MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNSHVEMKLAVDEEENADNNTKANVTKPKRCSGSICYGTIAVIVFFLIGFMIGYLGYCKGVEPKTECERLAGTESPVREEPGEDFPAARRLYWDDLKRKLSEKLDSTDFTGTIKLLNENSYVPREAGSQKDENLALYVENQFREFKLSKVWRDQHFVKIQVKDSAQNSVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVNAELSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSRSSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCRMVTSESKNVKLTVSNVLKEIKILNIFGVIKGFVEPDHYVVVGAQRDAWGPGAAKSGVGTALLLKLAQMFSDMVLKDGFQPSRSIIFASWSAGDFGSVGATEWLEGYLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQNVKHPVTGQFLYQ

DSNWASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELIERIPELNKVARAAAEVAGQFVIK LTHDVELNLDYERYNSQLLSFVRDLNQYRADIKEMGLSLQWLYSARGDFFRATSRLTTDFGNAEKTDRFVMKKLND RVMRVEYHFLSPYVSPKESPFRHVFWGSGSHTLPALLENLKLRKQNNGAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGD VWDIDNEF(SEQ ID NO:8)

[0107] 如本文所用,术语“抗体”和“免疫球蛋白”可互换使用,并且是指通过免疫球蛋白分子的可变区内的至少一个抗原识别位点识别并特异性结合至靶标的抗体分子,所述靶标诸如蛋白质、多肽、肽、碳水化合物、多核苷酸、脂质或前述(例如,糖蛋白)的组合。术语“抗体”涵盖单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、多特异性(例如双特异性)抗体和任何其他免疫球蛋白分子,只要所述抗体表现出所需生物活性即可。基于分别称为α、δ、ε、γ和μ的抗体重链恒定区的身份,抗体可为免疫球蛋白的五种主要类别中的任一种:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM或其亚类(同种型)(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)。不同类别的抗体具有不同且熟知的亚基结构和三维构型。关于不同类别的抗体的结构和特性,参见例如Basic and Clinical Immunology,第8版,Daniel P.Stites,Abba I.Terr和Tristram G.Parslow(编),Appleton&Lange,Norwalk,CT,1994,第71页和第6章。

[0108] 术语“抗TfR抗体”、“结合至TfR的抗体”和“特异性结合TfR的抗体”是指能够以足够亲和力结合TfR的抗体,使得所述抗体可用作靶向TfR的诊断剂和/或治疗剂。在一个方面中,抗TfR抗体与无关非TfR多肽的结合程度低于所述抗体与TfR的结合的约10%,如例如通过放射性免疫测定(RIA)所测量。在某些方面中,结合至TfR的抗体具有以下解离常数(KD):<20μM、<15μM、<12μM、<10μM、<7.5μM、<5μM、<,2.5μM、<1μM、<100nM、<10nM、<1nM、<0.1nM、<0.01nM或<0.001nM(例如,$10^{-8}$M或更低,例如$10^{-8}$M至$10^{-13}$M,例如$10^{-9}$M至$10^{-13}$M)。在某些方面中,抗TfR抗体结合至在来自不同物种的TfR中保守的TfR表位。

[0109] 术语“抗体片段”是指抗体的一部分。抗体的“抗原结合片段”是指与抗原结合的抗体的一部分。抗体的抗原结合片段可包含抗体的抗原决定区(例如,互补决定区(CDR))。抗体的抗原结合片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')2和Fv片段、线性抗体和单链抗体。抗体的抗原结合片段可为单价或多价的(例如,二价)。抗体的抗原结合片段可为单特异性或多特异性的(例如双特异性)。抗体的抗原结合片段可来源于任何动物物种,诸如啮齿动物(例如小鼠、大鼠或仓鼠)和人,或可人工产生。

[0110] “抗原结合结构域”或“抗原结合区”是指与抗原结合的抗体的单价部分。“抗原结合结构域”可包含抗体的抗原决定区(例如,互补决定区(CDR))。抗体或其抗原结合片段(包括单特异性和多特异性(例如双特异性)抗体或其抗原结合片段可包含抗原结合结构域。在一些方面中,抗原结合结构域不存在于抗体的背景中。

[0111] 术语“抗TfR抗原结合结构域”、“结合至TfR的抗原结合结构域”、“抗TfR抗原结合区”、“结合至TfR的抗原结合区”和“TfR结合结构域”是指以足够的亲和力结合至TfR的抗原结合结构域,使得所述抗原结合结构域可用作靶向TfR的诊断剂和/或治疗剂。在一个方面中,抗TfR抗原结合结构域与无关非TfR多肽的结合程度低于所述抗原结合结构域与TfR的结合的约10%,如例如通过放射性免疫测定(RIA)所测量。在某些方面中,结合至TfR的抗体具有以下解离常数(KD):<20μM、<15μM、<12μM、<10μM、<7.5μM、<5μM、<2.5μM、<1μM、<100nM、<10nM、<1nM、<0.1nM、<0.01nM或<0.001nM(例如$10^{-8}$M或更低,例如$10^{-8}$M至$10^{-13}$M,例如$10^{-9}$M至$10^{-13}$M)。在某些方面中,抗TfR抗原结合结构域结合至在来自不同物种的TfR中保守的TfR

的表位。

[0112] 术语“全长抗体”、“完整抗体(intact antibody)”或“全抗体(whole antibody)”可互换使用,是指如与抗体片段相反,呈其实质上完整形式的抗体。特定言的,全抗体包括具有包括Fc区的重链和轻链的那些抗体。恒定区可为天然序列恒定区(例如,人天然序列恒定区)或其氨基酸序列变体。在一些情况下,完整抗体可具有一种或多种效应子功能。

[0113] “天然IgG抗体”通常为约150,000道尔顿的异四聚糖蛋白,由两条相同轻(“L”)链和两条相同重(“H”)链构成。每条轻链由一个共价二硫键连接至重链,而二硫键联的数量因不同免疫球蛋白同种型的重链而变化。每条重链和轻链还具有规则间隔的链内二硫桥。每条重链在一个末端具有可变结构域($V_H$),其后具有许多恒定结构域。每条轻链在一个末端具有可变结构域($V_L$)并且在其另一末端具有恒定结构域;轻链的恒定结构域与重链的第一恒定结构域对准,并且轻链可变结构域与重链的可变结构域对准。据信特定氨基酸残基在轻链可变结构域与重链可变结构域之间形成界面。

[0114] 抗体的木瓜酶消化产生两个相同抗原结合片段,称作“Fab”片段,和残余“Fc”片段(名称反映容易结晶的能力)。Fab片段由完整轻链连同重链的可变区结构域($V_H$)和一条重链的第一恒定结构域($C_H1$)组成。每个Fab片段就抗原结合而言为单价的,即,其具有单一抗原结合位点。抗体的胃蛋白酶处理产生单一大F(ab')$_2$片段,其大致对应于具有不同抗原结合活性的两个二硫键连接的Fab片段且仍能够与抗原交联。Fab'片段与Fab片段的不同之处在于在$C_H1$结构域的羧基端具有数个额外残基,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH在本文中是其中恒定结构域的半胱氨酸残基携带游离硫醇基的Fab'的名称。F(ab')$_2$抗体片段最初作为Fab'片段对产生,所述片段之间具有铰链半胱氨酸。抗体片段的其他化学偶联也是已知的。

[0115] Fc片段包含通过二硫键保持在一起的两条重链的羧基端部分。抗体的效应子功能由Fc区中的序列决定,所述区还通过在某些类型的细胞上发现的Fc受体(FcR)识别。

[0116] “Fv”是包含完全抗原识别和结合位点的最小抗体片段。此片段由一个重链可变区结构域和一个轻链可变区结构域紧密、非共价缔合的二聚体组成。由此两个结构域的折叠产生六个高变环(来自H链和L链的各3个环),所述高变环贡献氨基酸残基以供抗原结合并且向抗体赋予抗原结合特异性。然而,即使单一可变结构域(或仅包含三个对抗原具有特异性的CDR的半Fv)也能够识别并结合抗原,但亲和力低于完整结合位点。

[0117] “单链Fv”还缩写为“sFv”或“scFv”,其是包含连接至单一多肽链中的VH抗体域和VL抗体域的抗体片段。在一些方面中,scFv多肽进一步包含在$V_H$域与$V_L$域之间的多肽接头,其使得scFv能够形成抗原结合所需的结构。

[0118] 术语“双抗体”是指通过以下方式制备的小抗体片段:在$V_H$结构域与$V_L$结构域之间用短接头(约5-10个残基)构建scFv片段(参见前一段),使得实现可变结构域的链间而非链内配对,由此产生二价片段,即具有两个抗原结合位点的片段。双特异性双抗体为两个“交叉”scFv片段的异二聚体,其中所述两个抗体的$V_H$结构域和$V_L$结构域存在于不同的多肽链上。

[0119] 如本文所用,TfR抗体的“2+1抗体形式”是指三价的双特异性抗体形式,其包含(i)结合至人TfR的单一抗原结合结构域和(ii)一抗体,其中所述抗体包含两条重链和两条轻链;其中结合至人TfR的单一抗原结合结构域连接至两条抗体重链之一的C端。此形式在图

1A和1D(i)中举例说明。

[0120] 如本文所用,TfR抗体的“2+2抗体形式”是指四价的双特异性抗体形式,其包含(i)两个结合至人TfR的抗原结合结构域和(ii)一抗体,其中所述抗体包含两条重链和两条轻链;其中结合至人TfR的一个抗原结合结构域连接至两条抗体重链之一的C端,并且结合至人TfR的另一抗原结合结构域连接至两条抗体重链中的另一者的C端。结合至人TfR的两个抗原结合结构域可包含相同的氨基酸序列。结合至人TfR的两个抗原结合结构域可包含不同的氨基酸序列。此形式在图1B和1C中举例说明。

[0121] 如本文所用,TfR抗体的“1+1抗体形式”是指二价的双特异性抗体形式,其包含(i)一个结合至人TfR的抗原结合结构域;和(ii)结合除人TfR之外的抗原的抗原结合结构域,任选地包含Fc结构域。此形式在图1D中举例说明。示例性1+1融合蛋白形式在图1E中举例说明。

[0122] 如本文所用,术语“可变区”或“可变结构域”可互换使用并且使本领域常见的。可变区通常是指抗体的一部分,一般是轻链或重链的一部分,通常为成熟重链中约氨基端110至120个氨基酸或110至125个氨基酸和成熟轻链中约90至115个氨基酸,其序列在抗体之间存在很大差异,并且用于特定抗体对其特定抗原的结合和特异性中。序列的变异性集中在称为互补决定区(CDR)的那些区域,而可变结构域中更高保守性区称为框架区(FR)。不希望受任何特定机制或理论约束,据信轻链和重链的CDR主要负责抗体与抗原的相互作用和特异性。在一些方面中,可变区为人可变区。在一些方面中,可变区包含啮齿动物或鼠CDR和人框架区(FR)。在一些方面中,可变区为灵长类动物(例如,非人灵长类动物)可变区。在一些方面中,可变区包含啮齿动物或鼠CDR和灵长类动物(例如,非人灵长类动物)框架区(FR)。术语“Kabat编号”和类似术语是本领域公认的并且是指抗体或其抗原结合片段的重链可变区和轻链可变区中的氨基酸残基的编号系统。在某些方面中,CDR可根据Kabat编号系统来确定(参见,例如Kabat EA和Wu TT(1971)Ann NY Acad Sci 190:382-391和Kabat EA等人,(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH出版号91-3242)。使用Kabat编号系统,抗体重链分子内的CDR通常存在于氨基酸位置31至35,其任选地可包括35之后的一个或两个额外氨基酸(在Kabat编号方案中称为35A和35B)(CDRH1);氨基酸位置50至65(CDRH2)和氨基酸位置95至102(CDRH3)处。使用Kabat编号系统,抗体轻链分子内的CDR通常存在于氨基酸位置24至34(CDRL1)、氨基酸位置50至56(CDRL2)和氨基酸位置89至97(CDRL3)处。在一些方面中,本文所述的抗体的CDR已根据Kabat编号方案确定。Chothia是指结构环的位置(Chothia和Lesk J.Mol.Biol.196:901-917(1987))。当使用Kabat编号约定时,Chothia CDRH1环的末端在H32与H34之间根据环长度而变化(这是因为Kabat编号方案将插入置于H35A和H35B处;如果35A和35B都不存在,则环在32处结束;如果仅存在35A,则环在33处结束;如果35A和35B都存在,则环在34处结束)。AbM高变区表示Kabat CDR与Chothia结构环之间的折衷并且由Oxford Molecular的AbM抗体建模软件使用。在一些方面中,CDR可为“contact”CDR。“contact”CDR是基于对可用的复杂晶体结构的分析。以下注明来自这些CDR中的每一个的残基。

[0123]

| 环 | Kabat | AbM | Chothia | Contact |
|---|---|---|---|---|
| L1 | L24-L34 | L24-L34 | L26-L32 | L30-L36 |
| L2 | L50-L56 | L50-L56 | L50-L52 | L46-L55 |
| L3 | L89-L97 | L89-L97 | L91-L96 | L89-L96 |
| H1 | H31-H35B | H26-H35B | H26-H32 | H30-H35B(Kabat 编号) |
| H1 | H31-H35 | H26-H35 | H26-H32 | H30-H35(Chothia 编号) |
| H2 | H50-H65 | H50-H58 | H53-H55 | H47-H58 |
| H3 | H95-H102 | H95-H102 | H96-H101 | H93-H101 |

[0124] CDR可包含如下“延伸的CDR”:VL中的24-36或24-34(L1)、46-56或50-56(L2)和89-97或89-96(L3),和VH中的26-35(H1)、50-65或49-65(H2)和93-102、94-102或95-102(H3)。可变结构域残基根据Kabat等人,同上,针对这些延伸的HVR定义中的每一个进行编号。

[0125] 术语“VH”和“VH结构域”可互换使用,是指抗体的重链可变区。

[0126] 如本文所用,术语“重链”当用于提及抗体时可指基于恒定区的氨基酸序列的任何不同类型,例如alpha(α)、delta(δ)、epsilon(ε)、gamma(γ)和mu(μ),其分别产生抗体的IgA、IgD、IgE、IgG和IgM类别,包括IgG的亚类,例如$IgG_1$、$IgG_2$、$IgG_3$和$IgG_4$。重链氨基酸序列是本领域熟知的。在一些方面中,重链为人重链。

[0127] 术语“VL”和“VL结构域”可互换使用,是指抗体的轻链可变区。

[0128] 如本文所用,术语“轻链”当用于提及抗体时可指基于恒定区的氨基酸序列的任何不同类型,例如kappa(κ)或lambda(λ)。轻链氨基酸序列是本领域熟知的。在一些方面中,轻链为人轻链。

[0129] 如本文所用,术语“恒定区”为抗体中非抗体可变区的区域,例如不直接参与抗体与抗原的结合的轻链和/或重链的羧基端部分,但其可表现出各种效应子功能,诸如与Fc受体的相互作用。免疫球蛋白分子的恒定区通常具有相对于免疫球蛋白可变结构域更保守的氨基酸序列。在某些方面中,抗体或抗原结合片段包含足以实现抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的恒定区或其部分。

[0130] “恒定结构域”意指恒定区内能够形成免疫球蛋白折叠的结构域。恒定结构域包括CH1结构域、CH2结构域、CH3结构域和CL结构域。

[0131] 当提及抗体或其抗原结合片段时,术语“单克隆”是指参与单个抗原决定子或表位的高度特异性识别和结合的均质抗体或抗原结合片段群体。这与多克隆抗体相反,多克隆抗体通常包括针对不同抗原决定子的不同抗体。术语“单克隆”抗体或其抗原结合片段涵盖完整和全长单克隆抗体以及抗体片段(诸如Fab、Fab’、F(ab’)2、Fv)、单链(scFv)突变体、包含抗体或抗体部分的融合蛋白、以及包含抗原识别位点的任何其他修饰的免疫球蛋白分子。此外,“单克隆”抗体或其抗原结合片段是指以多种方式制得的此类抗体及其抗原结合片段,所述方式包括但不限于通过杂交瘤、噬菌体选择、重组表达和转基因动物。

[0132] 术语“嵌合”抗体或其抗原结合片段是指其中氨基酸序列来源于两个或更多个物种的抗体或其抗原结合片段。通常,轻链和重链的可变区对应于来源于一个哺乳动物物种(例如小鼠、大鼠、兔等)的具有所需特异性、亲和力和能力的抗体或其抗原结合片段的可变区,而恒定区与来源于另一物种(通常为人)的抗体或其抗原结合片段中的序列同源,以避免在所述物种中引发免疫反应。

[0133] 术语“人源化”抗体或其抗原结合片段是指非人(例如鼠)抗体或抗原结合片段的

形式,其为特异性免疫球蛋白链、嵌合免疫球蛋白或其片段,它们含有最小非人(例如鼠)序列。通常,人源化抗体或其抗原结合片段为人免疫球蛋白,其中来自互补决定区(CDR)的残基被来自源自非人物种(例如小鼠、大鼠、兔、仓鼠)的分子的具有所需特异性、亲和力和能力的CDR的残基替换("CDR移植的")(Jones等人,Nature321:522-525(1986);Riechmann等人,Nature 332:323-327(1988);Verhoeyen等人,Science 239:1534-1536(1988))。人源化抗体或其抗原结合片段可通过Fv框架区中和/或替换的非人残基内额外残基的取代来进一步修饰,以改进和优化抗体或其抗原结合片段的特异性、亲和力和/或能力。一般而言,人源化抗体或其抗原结合片段将包含VH和VL,其包含对应于非人免疫球蛋白的至少一个并且通常两个或三个CDR区的实质上全部,而全部或基本上全部FR区都是人免疫球蛋白共有序列的那些。人源化抗体或其抗原结合片段还可包含免疫球蛋白恒定区或Fc区,通常为人免疫球蛋白的恒定区或Fc区的至少一部分。用于生成人源化抗体的方法的实例描述于美国专利5,225,539;Roguska等人,Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,91(3):969-973(1994);和Roguska等人,Protein Eng.9(10):895-904(1996)中。在一些方面中,"人源化抗体"为表面重建的抗体。

[0134] 术语"人"抗体或其抗原结合片段意指具有来源于人免疫球蛋白基因座的氨基酸序列的抗体或其抗原结合片段,其中此类抗体或抗原结合片段使用本领域已知的任何技术制得。人抗体或其抗原结合片段的此定义包括完整或全长抗体及其片段。

[0135] "框架"或"FR"残基为除如本文所定义的CDR残基以外的那些可变结构域残基。

[0136] 如本文所用,"受体人框架"为包含来源于人免疫球蛋白框架或人共有框架的$V_L$或$V_H$框架的氨基酸序列的框架。"来源于"人免疫球蛋白框架或人共有框架的受体人框架可包含其相同氨基酸序列,或其可包含预存在的氨基酸序列变化。在一些方面中,预存在的氨基酸变化的数量为10或更少、9或更少、8或更少、7或更少、6或更少、5或更少、4或更少、3或更少、或2或更少。在预存在的氨基酸变化存在于VH中时,在一些方面中,那些变化仅出现于位置71H、73H和78H中的三个、两个或一个处;例如,在那些位置处的氨基酸残基可变为71A、73T和/或78A。在一些方面中,VL受体人框架的序列与$V_L$人免疫球蛋白框架序列或人共有框架序列相同。

[0137] "人共有框架"为表示在选择人免疫球蛋白$V_L$或$V_H$框架序列时最常出现的氨基酸残基的框架。一般而言,人免疫球蛋白$V_L$或$V_H$序列从可变结构域序列的亚组进行选择。一般而言,序列的亚组为如Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991)中的亚组。实例包括关于$V_L$,亚组可为如Kabat等人,同上中的亚组κI、κII、κIII或κIV。另外,关于$V_H$,亚组可为如Kabat等人,同上中的亚组I、亚组II或亚组III。

[0138] 例如本公开的抗体的指定位置处的"氨基酸修饰"是指指定残基的取代或缺失,或者在指定残基相邻处插入至少一个氨基酸残基。指定残基"相邻"处的插入意指在距其一至两个残基内的插入。插入可在指定残基的N端或C端。在一些方面中,氨基酸修饰为取代。

[0139] 抗体"效应子功能"是指可归因于抗体的Fc区(天然序列Fc区或氨基酸序列变体Fc区)的那些生物活性并且随抗体同种型而变化。

[0140] 术语"Fc区"或"片段可结晶区"在本文中用于定义免疫球蛋白重链的C端区,包括天然序列Fc区和变体Fc区。尽管免疫球蛋白重链Fc区的边界可能变化,但人IgG重链Fc区通

常被定义为从位置Cys226处的氨基酸残基或从Pro230延伸至其羧基端。Fc区的C端赖氨酸(残基447,根据EU编号系统)可例如在抗体的产生或纯化期间或通过对编码抗体的重链的核酸进行重组工程化来去除。因此,完整抗体的组合物可包含去除所有K447残基的抗体群体、未去除K447残基的抗体群体和具有含和不含K447残基的抗体的混合物的抗体群体。用于本公开的抗体中的合适天然序列Fc区包括人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。

[0141] “天然序列Fc区”包含与自然界中发现的Fc区的氨基酸序列具有同一性的氨基酸序列。天然序列人Fc区包括天然序列人IgG1 Fc区(非A和A同种异型);天然序列人IgG2 Fc区;天然序列人IgG3Fc区;和天然序列人IgG4 Fc区以及其天然存在的变体。

[0142] “变体Fc区”包含由于至少一个氨基酸修饰、在一些方面中一个或多个氨基酸取代而与天然序列Fc区的氨基酸序列不同的氨基酸序列。在一些方面中,变体Fc区与天然序列Fc区或与亲代多肽的Fc区相比具有至少一个氨基酸取代,例如在天然序列Fc区中或亲代多肽的Fc区中约一个至约十个氨基酸取代,并且在一些方面中约一个至约五个氨基酸取代。在一些方面中,变体Fc区与天然序列Fc区和/或与亲代多肽的Fc区具有至少80%同源性,与其具有至少90%同源性,或与其具有至少95%同源性。

[0143] “Fc受体”或“FcR”描述结合至抗体的Fc区的受体。在一些方面中,FcR为天然序列人FcR。在一些方面中,FcR为结合IgG抗体的FcR(γ受体)并且包括FcγRI、FcγRII和FcγRIII亚类的受体,包括这些受体的等位基因变体和替代性剪接形式,FcγRII受体包括FcγRIIA(“活化受体”)和FcγRIIB(“抑制受体”),其具有相似的氨基酸序列,主要不同之处在于其细胞质结构域。活化受体FcγRIIA在其细胞质结构域中含有基于免疫受体酪氨酸的活化基序(“ITAM”)。抑制受体FcγRIIB在其细胞质结构域中含有基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(“ITIM”)。在本文中,术语“FcR”涵盖其他FcR,包括有待将来鉴定的那些FcR。FcR还可增加抗体的血清半衰期。

[0144] “结合亲和力”通常是指分子(例如,抗体或其抗原结合片段)的单个结合位点与其结合伴侣(例如,抗原)之间的非共价相互作用的总强度。除非另有说明,否则如本文所用,“结合亲和力”是指反映结合对成员(例如,抗体或其抗原结合片段与抗原)之间的1:1相互作用的内在结合亲和力。分子X对其伴侣Y的亲和力通常可用平衡解离常数($K_D$)表示。亲和力可以本领域已知的许多方式测量和/或表示,包括但不限于平衡解离常数($K_D$)和平衡缔合常数($K_A$)。$K_D$根据$k_{off}/k_{on}$的商计算,而$K_A$根据$k_{on}/k_{off}$的商计算。$k_{on}$是指例如抗体或其抗原结合片段与抗原的缔合速率常数,并且$k_{off}$是指例如抗体或其抗原结合片段与抗原的解离速率常数。$k_{on}$和$k_{off}$可通过本领域普通技术人员已知的技术诸如BIAcore®或KinExA来测定。

[0145] 关于抗体与靶分子的结合,术语“特异性结合”或“特异性地结合”或对特定多肽或特定多肽靶标上的表位“具特异性”意指显著不同于非特异性相互作用的结合。特异性结合可例如通过测定与对照分子的结合相比的分子结合来测量。例如,特异性结合可通过与类似于靶标的对照分子(例如,过量非标记靶标)竞争来测定。在此情况下,如果标记靶标与探针的结合受到过量非标记靶标竞争性地抑制,则指示特异性结合。如本文所用,术语“特异性结合”或“特异性地结合至”特定多肽或特定多肽靶标上的表位或对其“具有特异性”可例如通过对靶标具有以下KD的分子表现:约$10^{-4}$M或更低、$10^{-5}$M或更低、$10^{-6}$M或更低、$10^{-7}$M或更低、$10^{-8}$M或更低、$10^{-9}$M或更低、$10^{-10}$M或更低、$10^{-11}$M或更低、$10^{-12}$M或更低中的任一者或在10

$^{-4}$M至$10^{-6}$M或$10^{-6}$M至$10^{-10}$M或$10^{-7}$M至$10^{-9}$M范围内的KD。如本领域技术人员应理解,亲和力与KD值相反地相关。对抗原的高亲和力通过低KD值测量。在一些方面中,术语“特异性结合”是指如下结合,其中分子结合至特定多肽或特定多肽上的表位,基本上未结合至任何其他多肽或多肽表位。

[0146] 术语“接头”或“连接的”是指两个多肽或两个异源分子之间的共价键联。在一些方面中,接头为化学接头。在一些方面中,接头包含肽键,并且两个多肽或两个异源分子直接或经由一个或多个额外氨基酸彼此连接。甘氨酸接头为包含一个或多个甘氨酸但不含其他氨基酸的接头,例如GGGG(SEQ ID NO:285)。富含甘氨酸的接头为包含一个或多个甘氨酸并且可含有其他氨基酸的接头,只要甘氨酸为接头中的主要种类即可,例如GGGNGG,其中N为任何氨基酸(SEQ ID NO:286)。甘氨酸-丝氨酸接头为含有任意比例的甘氨酸和丝氨酸的接头,例如GGGS(SEQ ID NO:287)。类似地,脯氨酸接头为包含一个或多个脯氨酸但不含其他氨基酸的接头。富含脯氨酸的接头为包含一个或多个脯氨酸并且可含有其他氨基酸的接头,只要脯氨酸为接头中的主要种类即可。

[0147] 如本文所用,“氨基酸序列同一性百分比(%)”和“同源性”就肽、多肽或抗体序列而言是指在比对序列并且在必要时引入空位以实现最大序列同一性百分比之后,候选序列中与特定肽或多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比,并且任何保守性取代均不被视为序列同一性的一部分。出于测定氨基酸序列同一性百分比的目的而进行的比对可以此项技术的技能内的多种方式,例如使用公开可得的计算机软件,诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或MEGALIGN$^{TM}$(DNASTAR)软件来实现。本领域技术人员可确定用于测量比对的适当参数,包括在所比较的序列的全长内实现最大比对所需的本领域已知的任何算法。

[0148] 术语“表位”包括能够由抗体结合的任何决定子。表位为抗原中由靶向彼抗原的抗体结合的区,并且当抗原为多肽时,包括直接地接触抗体的特定氨基酸。大多数情况下,表位位于多肽上,但在一些情况下,可位于诸如核酸的其他种类的分子上。表位决定子可包括诸如氨基酸、糖侧链、磷酰基或磺酰基的分子的化学活性表面分组,并且可具有特定三维结构特征和/或特定电荷特征。一般而言,对特定靶标抗原具有特异性的抗体将优先地识别多肽和/或巨分子的复杂混合物中的靶抗原上的表位。

[0149] 与参考抗体“结合至相同表位”的抗体是指与参考抗体接触抗原上的相同氨基酸残基的抗体。抗体与参考抗体结合至相同表位的能力可使用肽扫描诱变或高通量丙氨酸扫描诱变来确定。在后一种方法中,可通过将每个单独氨基酸残基突变为丙氨酸(或者如果氨基酸残基为丙氨酸,则将其突变为另一残基诸如丝氨酸)并测试每个突变体与靶抗体或其抗原结合片段的结合来生成抗原或其一部分(例如胞外结构域)的综合突变文库。

[0150] 如果抗体优先结合至给定表位或重叠表位,使得其在某种程度上阻断参考抗体与所述表位的结合,则称所述抗体“竞争性地抑制”参考抗体与给定表位的结合。竞争性抑制可通过本领域已知的任何方法例如竞争ELISA测定来测定。据称抗体竞争性地抑制参考抗体与给定表位的结合至少90%、至少80%、至少70%、至少60%或至少50%。

[0151] “分离”的多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物是呈自然界中未发现的形式的多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物。分离的多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物包括已纯化至不再呈其在自然界中发现的形式的程度的那些。在一些方面中,分离的抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物为基本上纯的。

[0152] 如本文所用,“基本上纯的”是指至少50％纯(即,不含污染物)、至少90％纯、至少95％纯、至少98％纯或至少99％纯的材料。

[0153] 术语“表达系统”是指包含可操作连接的编码序列和控制序列的一个或多个核酸分子,以及宿主细胞和/或其他体外转录和翻译机器,使得能够产生由核酸分子编码的一种或多种蛋白质。

[0154] 如本文所用,术语“载体”意图指代能够转运已与其连接的另一核酸的核酸分子。一种类型的载体为“质粒”,其是指其中可接合额外DNA区段的环状双链DNA。另一类型的载体为噬菌体载体。另一类型的载体为病毒载体,其中额外DNA区段可接合至病毒基因组中。某些载体能够在引入它们的宿主细胞中自主复制(例如,具有细菌复制起点的细菌载体和游离型哺乳动物载体)。其他载体(例如非游离型哺乳动物载体)可在引入至宿主细胞中时整合至宿主细胞的基因组中,并且由此与宿主基因组一起复制。此外,某些载体能够指导与其可操作性连接的基因的表达。此类载体在本文中称作“重组表达载体”或简称作“表达载体”。一般而言,在重组DNA技术中具有实用性的表达载体通常呈质粒形式。在本说明书中,“质粒”和“载体”可互换使用,因为质粒为最常用的载体形式。

[0155] 如本文中可互换使用的“多肽”或“核酸”是指任何长度的核苷酸聚合物,并且包括DNA和RNA。核苷酸可为去氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、修饰的核苷酸或碱基和/或其类似物,或者可通过DNA或RNA聚合酶或通过合成反应掺入至聚合物中的任何底物。

[0156] “宿主细胞”包括可作为或已作为用于掺入多核苷酸插入物的载体的接受者的个别细胞或细胞培养物。宿主细胞包括单一宿主细胞的子代,并且所述子代可归因于天然、偶然或有意突变而未必与原始亲代细胞完全相同(在形态方面或在基因组DNA互补方面)。宿主细胞包括用本发明的多核苷酸体内转染的细胞。

[0157] 如本文所用,“载剂”包括在所用剂量和浓度下对暴露于其的细胞或哺乳动物无毒的药学上可接受的载剂、赋形剂或稳定剂。

[0158] 如本文所用,术语“治疗”是指设计用于在临床病理学的过程中改变所治疗的个体的自然病程的临床干预。所需治疗效果包括降低特定疾病、病症或疾患的进展速率、改善或减轻其病理状态以及缓解或改善其预后。例如,如果与特定疾病、病症或疾患有关的一种或多种症状得以缓解或消除,则个体被成功“治疗”。

[0159] 如本文所用,术语“施用(administer)”、“施用(administering)”、“施用(administration)”等是指可用于将药物(例如抗人抗体或其抗原结合片段)递送至所需生物作用位点的方法。

[0160] “有效量”是指至少在必需的剂量和时间段下有效实现所需治疗结果的量。有效量可在一次或多次施用中提供。有效量也是其中治疗的任何毒性或有害效应均由治疗有益效应超过的量。关于治疗用途,有益或所需结果包括以下临床结果,诸如减轻由疾病引起的一种或多种症状、增加罹患疾病者的生活品质、降低治疗疾病所需的其他药剂的剂量、增强另一药剂的效应(诸如经由靶向)、延迟疾病的进展和/或延长存活。药物、化合物或药物组合物的有效量是足以直接地或间接地实现治疗性治疗的量。如在临床情形下应理解,药物、化合物或药物组合物的有效量在联合另一药物、化合物或药物组合物的情况下可能或可能不实现。因此,在施用一种或多种治疗剂的情形下可考虑“有效量”,并且如果联合一种或多种其他剂可实现或实现所需结果,则可考虑给予有效量的单一剂。

[0161] 如本文所用,术语“受试者”与“患者”可互换使用。受试者可为哺乳动物,诸如非人动物(例如,奶牛、猪、马、猫、狗、大鼠、小鼠、猴或其他灵长类动物等)。在一些方面中,受试者为食蟹猴。在一些方面中,受试者为人。

[0162] 如本文所用,与另一化合物或组合物“联合”或“组合”施用包括同时施用和/或在不同时间下施用。联合施用还涵盖呈共制剂形式施用或呈单独组合物形式施用,包括以不同的给药频率或间隔和使用相同的施用途径或不同的施用途径。在一些方面中,联合施用为作为同一治疗方案的一部分的施用。

[0163] 如本文所用,“神经系统病症”是指累及CNS和/或在CNS中有病因的疾病或病症。示例性CNS疾病或病症包括但不限于神经病、淀粉样变性、癌症、眼部疾病或病症、病毒或微生物感染、炎症、缺血、神经退行性疾病、癫痫发作、行为障碍和溶酶体贮积症。

[0164] 如本文所用,“溶酶体贮积症”或(LSD)是指一种遗传性代谢疾病,其特征在于底物(诸如未消化或部分消化的巨分子)在器官的各种细胞中过量累积,最终导致细胞功能障碍和临床异常。LSD已被定义为溶酶体功能缺陷,通常按累积底物分类,并且包括神经鞘脂沉积症、寡糖沉积症、粘脂沉积症、粘多糖沉积症、脂蛋白贮积症、神经元蜡样质脂褐质沉积症等。LSD还可包括导致大分子累积的蛋白质的其他缺乏或缺陷,所述蛋白质诸如溶酶体酶正常翻译后修饰所需的蛋白质或对正常溶酶体运输重要的蛋白质。LSD为由单基因缺陷引起的疾病。近70%LSD是由酶缺陷引起的,并且其余为酶活化剂或相关蛋白质的缺陷。

[0165] “蛋白质替代疗法”或“PRT”是指在缺乏或不存在特定蛋白质的患者中补充或替代所述蛋白质的医学治疗。

[0166] “酶替代疗法酶”或“ERT酶”是指在溶酶体贮积症中缺乏的酶。“ERT酶变体”是指野生型ERT酶或其片段的功能变体,包括等位基因变体和剪接变体,其中ERT酶变体例如当在相同条件下测定时具有至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%的对应野生型ERT酶或其片段的活性。ERT酶的“催化活性片段”是指全长ERT酶或其变体的一部分,其中催化活性片段例如当在相同条件下测定时具有至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%的对应全长ERT酶或其变体的活性。

[0167] 如本文所用,术语“约”和“大约”当用于修饰数值或数值范围时,表示高于所述值或范围10%和低于所述值或范围10%的偏差仍然在所列举值或范围的预期含义内。应当理解,无论在本文中以“约”或“大约”数值或范围的语言描述方面,还提供涉及特定数值或范围的类似方面。

[0168] 除非上下文另外清楚指示,否则如本文和随附权利要求书中所用,单数形式“一(a)”、“一(an)”和“所述(the)”包括复数个提及物。例如,对“抗体”的提及是对一个至多个抗体的提及,诸如摩尔量,并且包括本领域技术人员已知的其等效物等。

[0169] 应当理解,无论在本文中用语言“包含(comprising)”描述方面,还提供用“由.....组成(consisting of)”和/或“基本上由.....组成(consisting essentially of)”描述的类似方面。在本公开中,“包含(comprises)”、“包含(comprising)”、“含有(containing)”和“具有(having)”等可意指“包括(includes)”、“包括(including)”等;“基本上由.....组成(consisting essentially of)”或“基本上由.....组成(consists essentially of)”为开放式的,允许存在比所列举内容更多的内容,只要所列举内容的基

本或新颖特征不会因多于所列举内容的存在而改变,但排除先前技术方面。

[0170] 抗TfR抗原结合结构域

[0171] 本文提供了特异性结合至人TfR的抗原结合结构域。

[0172] 此类抗原结合结构域能够穿过血脑屏障(BBB)并且能够跨BBB转运与抗原结合结构域缔合的其他剂(例如,治疗活性剂)。因此,在一些方面中,本文提供了特异性结合至人TfR的抗原结合结构域,其能够内化于BBB上皮细胞诸如HCMEC/D3细胞中。

[0173] 在一些方面中,特异性结合至人TfR的抗原结合结构域包含表12和13中所列抗体的六个CDR(即,表12中所列抗体的三个VH CDR和表13中所列相同抗体的三个VL CDR)。

[0174] 在一些方面中,特异性结合至人TfR的抗原结合结构域包含表12和13以及19、21、24和25中所列抗体的六个CDR。在一些方面中,此类抗原结合结构域的CDR可根据Chothia编号方案来确定,其是指免疫球蛋白结构环的位置(参见例如Chothia C和Lesk AM,(1987),J Mol Biol 196:901-917;Al-Lazikani B等人,(1997)J Mol Biol273:927-948;Chothia C等人,(1992)J Mol Biol 227:799-817;Tramontano A等人,(1990)J Mol Biol 215(1):175-82;和美国专利号7,709,226)。通常,当使用Kabat编号约定时,Chothia CDR-H1环存在于重链氨基酸26至32、33或34处,Chothia CDR-H2环存在于重链氨基酸52至56处,并且Chothia CDR-H3环存在于重链氨基酸95至102处,而Chothia CDR-L1环存在于轻链氨基酸24至34处,Chothia CDR-L2环存在于轻链氨基酸50至56处,并且Chothia CDR-L3环存在于轻链氨基酸89至97处。当使用Kabat编号约定编号时,Chothia CDR-H1环的末端在H32与H34之间视环长度而变化(这是因为Kabat编号方案将插入置于H35A和H35B处;如果35A和35B都不存在,则环在32处结束;如果仅存在35A,则环在33处结束;如果35A和35B都存在,则环在34处结束)。

[0175] 在一些方面中,特异性结合至人TfR的抗原结合结构域包含表12、13、19、21、24和25中所列抗体的六个Chothia CDR。在一些方面中,诸如特异性结合至人TfR的抗原结合结构域包含一个或多个CDR,其中Chothia和Kabat CDR具有相同的氨基酸序列。在一些方面中,本文提供了特异性结合至人TfR并包含Kabat CDR与Chothia CDR的组合的抗原结合结构域。

[0176] 在一些方面中,特异性结合至人TfR的抗原结合结构域的CDR可根据MacCallum RM等人,(1996)J Mol Biol 262:732-745来确定。还参见例如Martin A.“Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains,”in Antibody Engineering,Kontermann和Dübel编,第31章,第422-439页,Springer-Verlag,Berlin(2001)。在一些方面中,本文提供了特异性结合至人TfR并包含表12、13、19、21、24和25中所列抗体的VH CDR和VL CDR的抗原结合结构域,如通过MacCallum RM等人的方法所确定。

[0177] 在一些方面中,特异性结合至人TfR的抗原结合结构域的CDR可根据AbM编号方案来确定,所述编号方案是指AbM高变区,代表Kabat CDR与Chothia结构环之间的折衷,并且由Oxford Molecular's AbM抗体建模软件(Oxford Molecular Group,Inc.)使用。在一些方面中,本文提供了特异性结合至人TfR并包含表12、13、19、21、24和25中所列抗体的VH CDR和VL CDR的抗原结合结构域,如通过AbM编号方案所确定。

[0178] 在一些方面中,特异性结合至人TfR的抗原结合结构域包含根据如Lefranc M-P,(1999)The Immunologist 7:132-136和Lefranc M-P等人,(1999)Nucleic Acids Res 27:

209-212中所述的IMGT编号系统的表12、13、19、21、24和25中所列抗体的六个IMGT CDR。根据IMGT编号方案,VH-CDR1在位置26至35处,VH-CDR2在位置51至57处,VH-CDR3在位置93至102处,VL-CDR1在位置27至32处,VL-CDR2在位置50至52处,并且VL-CDR3在位置89至97处。

[0179] 在一些方面中,本文提供的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域由其单独VL结构域、或其单独VH结构域、或其3个单独VL CDR、或其3个单独VH CDR来描述。参见例如Rader C等人,(1998)PNAS 95:8910-8915,其以引用方式整体并入本文,描述了通过分别从人轻链或重链文库鉴定互补轻链或重链,产生具有与原始抗体的亲和力一样高或更高的亲和力的人源化抗体变体,由此实现小鼠抗αvβ3抗体的人源化。还参见Clackson T等人,(1991)Nature 352:624-628,其以引用方式整体并入本文,描述了通过使用特定VL结构域(或VH结构域)并筛选文库中的互补可变结构域产生结合特定抗原的抗体的方法。筛选产生针对特定VH结构域的14个新伴侣和针对特定VL结构域的13个新伴侣,它们都是强结合剂,如通过ELISA确定。还参见Kim SJ和Hong HJ,(2007)J Microbiol 45:572-577,其以引用方式整体并入本文,描述了通过使用特定VH结构域并筛选文库(例如,人VL文库)中的互补VL结构域来产生结合特定抗原的抗体的方法;所选VL结构域又可用于指导额外互补(例如,人)VH结构域的选择。

[0180] 在一些方面中,特异性结合至人TfR的抗原结合结构域包含表19、21、24和25中所列抗体的VH。

[0181] 在一些方面中,特异性结合至人TfR的抗原结合结构域包含表19、21、24和25中所列抗体的VL。

[0182] 在一些方面中,特异性结合至人TfR的抗原结合结构域包含表11(即,表11中所列抗体的VH和表11中所列相同抗体的VL)或表19、21、24和25(即,表19、21、24和25中所列抗体的VH和表19、21、24和25中所列相同抗体的VL)中所列抗体的VH和VL。

[0183] 在一些方面中,特异性结合至人TfR的抗原结合结构域包含(i)包含与表11、19、21、24和25中的抗体的VH氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VH,和(ii)包含与表11、19、21、24和25中的相同抗体的VL氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VL。在一些方面中,特异性结合至人TfR的抗原结合结构域还包含表12、13、19、21、24和25中的抗体的CDR(例如,VH和/或VL中不相同的氨基酸在CDR之外)。

[0184] 在一些方面中,特异性结合至人TfR的抗原结合结构域包含(i)包含与表11、19、21、24和25中的抗体的VH氨基酸序列具有至少85%同一性的氨基酸序列的VH,和(ii)包含与表11、19、21、24和25中的相同抗体的VL氨基酸序列具有至少85%同一性的氨基酸序列的VL。在一些方面中,特异性结合至人TfR的抗原结合结构域还包含表12、13、19、21、24和25中的抗体的CDR(例如,VH和/或VL中不相同的氨基酸在CDR之外)。

[0185] 在一些方面中,特异性结合至人TfR的抗原结合结构域包含(i)包含与表11、19、21、24和25中的抗体的VH氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列的VH,和(ii)包含与表11、19、21、24和25中的相同抗体的VL氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列的VL。在一些方面中,特异性结合至人TfR的抗原结合结构域还包含表12、13、19、21、24和25中的抗体的CDR(例如,VH和/或VL中不相同的氨基酸在CDR之外)。

[0186] 在一些方面中,特异性结合至人TfR的抗原结合结构域包含(i)包含与表11、19、21、24和25中的抗体的VH氨基酸序列具有至少95%同一性的氨基酸序列的VH,和(ii)包含

与表11、19、21、24和25中的相同抗体的VL氨基酸序列具有至少95％同一性的氨基酸序列的VL。在一些方面中,特异性结合至人TfR的抗原结合结构域还包含表12、13、19、21、24和25中的抗体的CDR(例如,VH和/或VL中不相同的氨基酸在CDR之外)。

[0187] 在一些方面中,特异性结合至人TfR的抗原结合结构域包含(i)包含与表11、19、21、24和25中的抗体的VH氨基酸序列具有至少96％同一性的氨基酸序列的VH,和(ii)包含与表11、19、21、24和25中的相同抗体的VL氨基酸序列具有至少96％同一性的氨基酸序列的VL。在一些方面中,特异性结合至人TfR的抗原结合结构域还包含表12、13、19、21、24和25中的抗体的CDR(例如,VH和/或VL中不相同的氨基酸在CDR之外)。

[0188] 在一些方面中,特异性结合至人TfR的抗原结合结构域包含(i)包含与表11、19、21、24和25中的抗体的VH氨基酸序列具有至少97％同一性的氨基酸序列的VH,和(ii)包含与表11、19、21、24和25中的相同抗体的VL氨基酸序列具有至少97％同一性的氨基酸序列的VL。在一些方面中,特异性结合至人TfR的抗原结合结构域还包含表12、13、19、21、24和25中的抗体的CDR(例如,VH和/或VL中不相同的氨基酸在CDR之外)。

[0189] 在一些方面中,特异性结合至人TfR的抗原结合结构域包含(i)包含与表11、19、21、24和25中的抗体的VH氨基酸序列具有至少98％同一性的氨基酸序列的VH,和(ii)包含与表11、19、21、24和25中的相同抗体的VL氨基酸序列具有至少98％同一性的氨基酸序列的VL。在一些方面中,特异性结合至人TfR的抗原结合结构域还包含表12、13、19、21、24和25中的抗体的CDR(例如,VH和/或VL中不相同的氨基酸在CDR之外)。

[0190] 在一些方面中,特异性结合至人TfR的抗原结合结构域包含(i)包含与表11、19、21、24和25中的抗体的VH氨基酸序列具有至少99％同一性的氨基酸序列的VH,和(ii)包含与表11、19、21、24和25中的相同抗体的VL氨基酸序列具有至少99％同一性的氨基酸序列的VL。在一些方面中,特异性结合至人TfR的抗原结合结构域还包含表12、13、19、21、24和25中的抗体的CDR(例如,VH和/或VL中不相同的氨基酸在CDR之外)。

[0191] 在一些方面中,本文提供了一种与抗体结合至相同TfR表位的抗原结合结构域,所述抗体包含表11、19、21、24和25中的抗体的VH氨基酸序列和表11、19、21、24和25中的相同抗体的VL氨基酸序列。

[0192] 在一些方面中,本文提供了一种竞争性地抑制抗体与TfR的结合的抗原结合结构域,所述抗体包含表11、19、21、24和25中的抗体的VH氨基酸序列和表11、19、21、24和25中的相同抗体的VL氨基酸序列。

[0193] 在一些方面中,特异性结合至人TfR的抗原结合结构域包含在单一多肽链上的VH和VL(例如表11、19、21、24和25中的VH和VL)。在一些方面中,抗原结合结构域包含scFv。scFv可包含位于VL的N端的VH或位于VH的N端的VL。scFv可包含例如VH与VL之间的接头。因此,scFv可呈VH-接头-VL或VL-接头-VH的取向中。此种接头的长度可为约5至约25个氨基酸。此种接头的长度可为约5至约20个氨基酸。此种接头的长度可为约10至约25个氨基酸。此种接头的长度可为约10至约20个氨基酸。此种接头可为例如甘氨酸接头、富含甘氨酸的接头或甘氨酸-丝氨酸接头。此种接头可包含GGSEGKSSGSGSESKSTGGS(SEQ ID NO:183)的氨基酸序列。此种接头可包含GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:288)的氨基酸序列。

[0194] 在一些方面中,特异性结合至人TfR的抗原结合结构域包含第一多肽上的VH和第二多肽上的VL(例如,Fab)。

[0195] 在一些方面中,特异性结合至人TfR的抗原结合结构域包含仅有重链的抗体(例如,VHH或纳米抗体)的抗原结合片段。

[0196] 在一些方面中,特异性结合至人TfR的抗原结合结构域为鼠抗原结合结构域。在一些方面中,特异性结合至人TfR的抗原结合结构域为嵌合抗原结合结构域。在一些方面中,特异性结合至人TfR的抗原结合结构域为人源化抗原结合结构域。在一些方面中,特异性结合至人TfR的抗原结合结构域为人抗原结合结构域。

[0197] 在一些方面中,本文提供的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域还结合至食蟹猴TfR。

[0198] 在一些实施方案中,本文提供的抗原结合结构域以“低”亲和力结合至人TfR。在一些方面中,抗原结合结构域以500nM与10uM之间的亲和力结合人TfR。在一些方面中,抗原结合结构域以2μM与5μM之间的亲和力结合人TfR。在一些方面中,抗原结合结构域以1μM与5μM之间的亲和力结合人TfR。在一些方面中,抗原结合结构域以2μM与8μM之间的亲和力结合人TfR。在一些方面中,抗原结合结构域以750nM与2μM之间的亲和力结合人TfR。

[0199] 在一些实施方案中,本文提供的抗原结合结构域以“中等”亲和力结合至人TfR。在一些实施方案中,本文提供的抗原结合结构域以“中等”亲和力结合至人TfR。在一些方面中,抗原结合结构域以10nM与500nM之间的亲和力结合人TfR。在一些方面中,抗原结合结构域以50nM与500nM之间的亲和力结合人TfR。在一些方面中,抗原结合结构域以100nM与250nM之间的亲和力结合人TfR。在一些方面中,抗原结合结构域以10nM与100nM之间的亲和力结合人TfR。在一些方面中,抗原结合结构域以250nM与500nM之间的亲和力结合人TfR。

[0200] 在一些实施方案中,本文提供的抗原结合结构域以“高”亲和力结合至人TfR。在一些方面中,抗原结合结构域以小于10nM的亲和力结合人TfR。在一些方面中,抗原结合结构域以0.01nM与10nM之间的亲和力结合人TfR。在一些方面中,抗原结合结构域以0.1nM与10nM之间的亲和力结合人TfR。在一些方面中,抗原结合结构域以0.01nM与1nM之间的亲和力结合人TfR。

[0201] 在一些方面中,本文提供的抗原结合结构域以不大于250nM(例如,10μM至250nM、5μM至250nM、1nM至250nM或3nM至250nM)的亲和力、不大于200nM(例如,10μM至200nM、5μM至200nM、1nM至200nM或3nM至200nM)的亲和力、或不大于150nM(例如,10μM至150nM、5μM至150nM、1nM至150nM或3nM至150nM)的亲和力特异性结合至人TfR,任选地其中使用表面等离子共振来测量亲和力。可例如使用Carterra LSA平台来测量表面等离子共振。在一些方面中,如通过ELISA $OD_{450}$所测量,本文提供的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域结合至人TfR。

[0202] 在一些方面中,本文提供的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域以不大于250nM(例如,10μM至250nM、5μM至250nM、1μM至250nM、1nM至250nM或3nM至250nM)的亲和力、不大于200nM(例如,10μM至200nM、5μM至200nM、1μM至200nM、1nM至200nM或3nM至200nM)的亲和力、或不大于150nM(例如,10μM至150nM、5μM至150nM、1μM至150nM、1nM至150nM或3nM至150nM)的亲和力结合至食蟹猴TfR,任选地其中使用表面等离子共振来测量亲和力。可例如使用Carterra LSA平台来测量表面等离子共振。在一些方面中,本文提供的抗原结合结构域以0.1μM至10μM、0.1μM至100μM、0.1μM至100μM、0.1μM至1nM、1μM至10μM、1μM至100μM、1μM至1nM、1μM至10nM、1μM至100nM、1μM至150nM、或1μM至250nM的亲和力特异性结合至人TfR。

[0203] 在一些方面中,本文提供的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域以不大于250nM(例如,1μM至250nM、10μM至250nM、1nM至250nM或3nM至250nM)的亲和力、不大于200nM(例如,1μM至200nM、10μM至250nM、1nM至200nM或3nM至200nM)的亲和力、或不大于150nM(例如,1μM至150nM、10μM至250nM、1nM至150nM或3nM至150nM)的亲和力结合至人TfR和食蟹猴TfR中的每一个,任选地其中使用表面等离子共振来测量亲和力。可例如使用Carterra LSA平台来测量表面等离子共振。在一些方面中,本文提供的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域以1μM至100μM、1μM至1nM、1μM至10nM、1μM至100nM、1μM至150nM、或1μM至250nM的亲和力结合至人TfR和食蟹猴TfR中的每一个。

[0204] 在一些方面中,本文提供的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域以6.7nM至3.5μM的亲和力结合至人TfR并以38nM至2.3μM的亲和力结合至食蟹猴TfR。在一些方面中,本文提供的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域以6.7nM至340nM的亲和力结合至人TfR并以18nM至870nM的亲和力结合至食蟹猴TfR,任选地其中使用表面等离子共振来测量亲和力。可例如使用Carterra LSA平台来测量表面等离子共振。

[0205] 在一些方面中,相对于用同种型对照处理的HCMEC/D3细胞上TfR的细胞表面表达,本文提供的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域将HCMED/D3细胞上TfR的细胞表面表达降低40-80%。可例如使用蛋白质印迹或FACS来测量细胞表面表达。

[0206] 在一些方面中,相对于用同种型对照处理的HCMEC/D3细胞上TfR的细胞表面表达,本文提供的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域未显著增加HCMED/D3细胞上TfR的细胞表面表达。可例如使用蛋白质印迹或FACS来测量细胞表面表达。

[0207] 在一些方面中,相对于用同种型对照处理的HCMEC/D3细胞上TfR的细胞表面表达,本文提供的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域未使HCMED/D3细胞上TfR的细胞表面表达降低超过40%、60%或80%,并且相对于用同种型对照处理的HCMEC/D3细胞上TfR的细胞表面表达,未显著增加HCMED/D3细胞上TfR的细胞表面表达。可例如使用蛋白质印迹或FACS来测量细胞表面表达。

[0208] 在一些方面中,在周围注射后,本文提供的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域在血管耗竭的人TfR敲入小鼠脑中的累积是同种型对照的至少4倍或5倍。

[0209] 在一些方面中,在周围注射后,本文提供的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域在血管耗竭的非人灵长类动物脑中的累积是同种型对照的至少2倍。在一些方面中,在周围注射后,本文提供的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域在血管耗竭的非人灵长类动物脑中的累积是同种型对照的至少4倍或5倍。在一些方面中,在周围注射后,本文提供的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域在血管耗竭的非人灵长类动物脑中的累积是同种型对照的至少8倍。在一些方面中,在周围注射后,本文提供的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域在血管耗竭的非人灵长类动物脑中的累积是同种型对照的8倍至64倍。在一些方面中,在周围注射后,本文提供的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域在血管耗竭的非人灵长类动物脑中的累积是同种型对照的8倍至64倍。在一些方面中,在周围注射后,本文提供的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域在血管耗竭的非人灵长类动物脑中的累积是同种型对照的2倍至11倍。

[0210] 在一些方面中,本文提供的抗原结合结构域与人TfR的特异性结合是与不相关蛋白的结合的至少5倍。在一些方面中,本文提供的抗原结合结构域与食蟹猴TfR的特异性结

合是与不相关蛋白的结合的至少5倍。在一些方面中,本文提供的抗原结合结构域与人TfR的特异性结合是与不相关蛋白的结合的至少5倍且/或与食蟹猴TfR的特异性结合是与不相关蛋白的结合的至少5倍。

[0211] 本文还提供了与本文提供的TfR抗原结合结构域结合至相同的TfR表位的抗原结合结构域。本文还提供了竞争性地抑制本文提供的TfR抗原结合结构域与TfR的结合的抗原结合结构域。

[0212] 包含抗TfR抗原结合结构域的剂

[0213] 本文提供了包含特异性结合至人TfR的抗原结合结构域的剂(例如,融合蛋白、多特异性(例如,双特异性)蛋白、抗体、其抗原结合片段等)。

[0214] 融合蛋白

[0215] 在一些方面中,本文提供的融合蛋白包含:特异性结合至人TfR的抗原结合结构域和异源蛋白。在一些方面中,本文提供的融合蛋白包含:(i)特异性结合至人TfR的抗原结合结构域和(ii)异源蛋白或多肽或其片段。在一些方面中,异源蛋白为可用于蛋白质替代疗法(PRT)中的蛋白质或多肽或其片段。在一些方面中,异源多肽为酶(例如,用于酶替代疗法(ERT)中的酶)或其催化活性片段。在一些方面中,异源多肽或蛋白为ERT酶或ERT酶变体、或其催化活性片段。

[0216] 在一些方面中,本文提供的融合蛋白中的异源多肽为生长因子。在一些方面中,本文提供的融合蛋白中的异源多肽为诱骗受体。在一些方面中,本文提供的融合蛋白中的异源多肽为颗粒蛋白前体(PGRN)、鞘脂激活蛋白原(PSAP)或存活运动神经元蛋白(SMN)。在一些方面中,异源蛋白为选自以下的酶:泛素蛋白连接酶E3A(UBE3A)、α-L艾杜糖醛酸酶(IDUA)、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶(IDS)、N-乙酰半乳胺糖-6-硫酸酯酶(GALNS)、N-磺基葡萄糖胺磺基水解酶(SGSH)、N-乙酰半乳胺糖-4-硫酸酯酶(芳基硫酸酯酶B;ARSB)、酸性神经鞘髓磷脂酶(ASM)、β-葡萄糖脑苷脂酶(GCase或GBA)、半乳糖苷基神经酰胺β-半乳糖苷酶、葡苷基神经酰胺酶、β-己糖胺酶A、β-己糖胺酶B、芳基硫酸酯酶A、β-半乳糖苷酶、酸性神经酰胺酶、α-葡萄糖苷酶、溶酶体酸性脂肪酶、溶酶体蛋白酶、其合成酶替代物诸如拉罗尼酶(larodinase)、艾杜硫酸酶、elosulphaseα或半乳糖硫酸酶(galsuphase)、或其变体、或其催化活性片段。在一些方面中,异源蛋白为选自以下的蛋白质或酶:丛集素(APOJ)、络丝蛋白、三肽基肽酶1(CLN2/TPP1)、葡萄糖胺(N-乙酰基)-6-硫酸酯酶(GNS)、类肝素-α-氨基葡萄糖苷N-乙酰基转移酶(HGSNAT)、和N-乙酰基-α-氨基葡萄糖苷酶(NAGLU)、α-L艾杜糖醛酸酶(IDUA)、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶(IDS)、N-乙酰半乳胺糖-6-硫酸酯酶(GALNS)、N-磺基葡萄糖胺磺基水解酶(SGSH)、N-乙酰半乳胺糖-4-硫酸酯酶(芳基硫酸酯酶B;ARSB)、酸性神经鞘髓磷脂酶(ASM)、β-葡萄糖脑苷脂酶(GCase或GBA)、半乳糖苷基神经酰胺β-半乳糖苷酶、葡苷基神经酰胺酶、β-己糖胺酶A、β-己糖胺酶B、芳基硫酸酯酶A、β-半乳糖苷酶、酸性神经酰胺酶、α-葡萄糖苷酶、溶酶体酸性脂肪酶、溶酶体蛋白酶、其合成酶替代物诸如拉罗尼酶、艾杜硫酸酶、elosulphaseα或半乳糖硫酸酶、或其变体、或其催化活性片段。

[0217] 本文所公开的融合蛋白的示例性形式描绘于图1E中。

[0218] 例如,在一些方面中,融合蛋白中的异源蛋白或多肽在特异性结合至人TfR的抗原结合结构域的N端。在一些方面中,融合蛋白中的异源蛋白或多肽在特异性结合至人TfR的抗原结合结构域的C端。在一些方面中,异源融合蛋白或多肽与特异性结合至人TfR的抗原

结合结构域经由肽键直接相连。在一些方面中,异源融合蛋白或多肽与特异性结合至人TfR的抗原结合结构域经由接头例如肽接头相连。在一些方面中,融合蛋白包含抗原结合结构域和异源蛋白或多肽以及Fc部分。在一些方面中,抗原结合结构域和异源蛋白或多肽连接至融合蛋白的Fc部分的N端。在一些方面中,抗原结合结构域和异源蛋白连接至融合蛋白的Fc部分的C端。在其他方面中,抗原结合结构域连接至融合蛋白的Fc部分的N端,并且异源蛋白或多肽连接至融合蛋白的Fc部分的C端。在其他方面中,抗原结合结构域连接至融合蛋白的Fc部分的C端,并且异源蛋白或多肽连接至融合蛋白的Fc部分的N端。

[0219] 在一些方面中,本文公开了一种融合蛋白,其包含(i)结合至人TfR的单个scFv、或VHH、或Fab抗原结合结构域和(ii)异源蛋白或多肽,其中所述融合蛋白包含异源蛋白或多肽的两个拷贝。在一些方面中,融合蛋白包含Fc结构域。Fc可为异二聚Fc,其包含具有杵突变的第一Fc多肽和具有臼突变的第二Fc多肽(“杵-臼Fc”,本文中所述)。在一些方面中,结合至人TfR的单个scFv、Fab或VHH抗原结合结构域连接至Fc结构域的C端(即,连接至Fc结构域的两条重链中的一者),而异源蛋白或多肽的两个拷贝连接至Fc的N端。在一些方面中,结合至人TfR的单个scFv、Fab或VHH抗原结合结构域连接至Fc结构域的N端(即,连接至Fc结构域的两条重链中的一者),而异源蛋白或多肽的两个拷贝连接至Fc结构域的C端。此2+1形式的实例在图1E中示出为(v)和(vi)。

[0220] 在一些方面中,本文公开了一种融合蛋白,其包含(i)结合至人TfR的抗体,其中所述抗体包含两条重链和两条轻链;和(ii)异源蛋白或多肽的两个拷贝,所述异源蛋白或多肽连接至两条抗体重链的C端。

[0221] 在一些方面中,融合蛋白包含(i)结合至人TfR并连接至重链的C端的两个scFv、Fab或VHH抗原结合结构域,和(ii)连接至Fc结构域的N端的融合蛋白或融合蛋白变体的两个拷贝。

[0222] 在一些方面中,本文公开了一种融合蛋白,其包含(i)结合至人TfR的单个scFv、VHH或Fab抗原结合结构域,和(ii)Fc结构域,和(iii)异源蛋白或肽的单个拷贝,其中结合至人TfR的单个scFv、VHH或Fab抗原结合结构域连接至Fc结构域的C端且异源蛋白或多肽连接至Fc结构域的N端。在一些实施方案中,Fc为单链工程化单价Fc结构域。融合蛋白的此单链1+1形式的实例在图1E中示出为(i)。

[0223] 在一些方面中,本文公开了一种融合蛋白,其包含(i)结合至人TfR的单个scFv、VHH或Fab抗原结合结构域,(ii)Fc结构域,和(iii)异源蛋白或肽的单个拷贝,其中结合至人TfR的单个scFv、VHH或Fab抗原结合结构域连接至Fc结构域的N端并且异源蛋白或多肽连接至Fc结构域的C端。在一些实施方案中,Fc为单链工程化单价Fc。融合蛋白的此1+1形式的实例在图1E中示出为(ii)。

[0224] 在一些方面中,本文公开了一种融合蛋白,其包含(i)结合至人TfR的单个scFv、VHH或Fab抗原结合结构域,和(ii)Fc结构域,和(iii)异源蛋白或肽的单个拷贝,其中结合至人TfR的单个scFv、VHH或Fab抗原结合结构域和异源蛋白或多肽均连接至Fc结构域的N端或C端。融合蛋白的此1+1形式的实例在图1E中示出为(iv)。

[0225] 双特异性蛋白和多特异性蛋白

[0226] 在一些方面中,本文提供的抗体或其抗原结合片段包含特异性结合至人TfR的抗原结合结构域。在一些方面中,抗体或其抗原结合片段包含特异性结合至人TfR的抗原结合

结构域和特异性结合至CNS抗原或脑抗原的抗原结合结构域。在一些方面中,CNS抗原或脑抗原不是TfR。本文还提供了与本文提供的TfR抗原结合结构域结合至相同的TfR表位的抗体或其抗原结合片段。本文还提供了竞争性地抑制本文提供的TfR抗原结合结构域与TfR的结合的抗体或其抗原结合片段。

[0227] 在一些方面中,本文提供的多特异性蛋白包含结合至人TfR的第一抗原结合结构域以及第二抗原结合结构域。结合至人TfR的第一抗原结合结构域可为本文提供的任何结合至人TfR的抗原结合结构域。第二抗原结合结构域可为特异性结合至CNS抗原或脑抗原的抗原结合结构域。在一些方面中,CNS抗原或脑抗原不是TfR。

[0228] 在一些方面中,本文提供的多特异性蛋白包含结合至人TfR的抗原结合结构域,所述抗原结合结构域连接至抗体或其抗原结合片段。抗体或其抗原结合片段可结合CNS抗原或脑抗原。在一些方面中,CNS抗原或脑抗原不是TfR。在一些方面中,此类多特异性蛋白可呈2+1抗体形式(如图1A中所示)或2+2抗体形式(如图1B和1C中所示)。

[0229] 在一些方面中,本文提供的多特异性蛋白包含TfR抗原结合结构域,其为与结合至CNS抗原的抗体连接的scFv,其中所述抗体包含两条重链和两条轻链。在一些方面中,scFv例如经由蛋白质接头连接至两条抗体重链之一的C端。

[0230] 在一些方面中,多特异性蛋白包含1)结合TfR的抗原结合结构域,2)结合不同CNS或脑抗原的第二抗原结合结构域,和3)Fc区,其中TfR抗原结合结构域和第二抗原结合结构域与多特异性蛋白的Fc区相连或连接。在其他方面中,多特异性蛋白包含1)包含重链可变区并结合TfR的抗原结合结构域,2)包含重链可变区并结合不同CNS或脑抗原的第二抗原结合结构域,和3)Fc区,其中TfR抗原结合结构域和第二抗原结合结构域与多特异性蛋白的Fc区相连或连接。在一些方面中,多特异性蛋白包含结合TfR的抗原结合结构域、结合不同CNS或脑抗原的第二抗原结合结构域、和Fc区。在一些方面中,TfR抗原结合结构域和第二抗原结合结构域与多特异性蛋白的Fc部分的N端相连或连接。在其他方面中,TfR抗原结合结构域与多特异性蛋白的Fc部分的N端相连或连接,并且第二抗原结合结构域连接至多特异性蛋白的Fc部分的C端。在其他方面中,TfR抗原结合结构域与多特异性蛋白的Fc部分的C端相连或连接,并且第二抗原结合结构域连接至多特异性蛋白的Fc部分的N端。

[0231] 在一些方面中,本文提供的多特异性蛋白包含作为scFv的TfR抗原结合结构域的两个拷贝和结合至CNS抗原的抗体,其中所述抗体包含两条重链和两条轻链,其中抗原结合结构域的两个拷贝之一连接至抗体重链之一的C端,并且其中抗原结合结构域的另一拷贝连接至另一抗体重链的C端。在一些方面中,scFv经由蛋白质接头连接至重链。

[0232] 在一些方面中,本文公开了一种三价双特异性蛋白,其包含(i)结合至人TfR的单个scFv、Fab或VHH抗原结合结构域和(ii)抗体,其中所述抗体包含两条重链和两条轻链;并且其中结合至人TfR的单个scFv、Fab或VHH抗原结合结构域连接至两条抗体重链之一的C端或N端。Fc可为异二聚Fc,诸如杵和臼Fc。此具有杵-臼Fc的2+1形式的实例在图1D中示出为(i)。

[0233] 在一些方面中,本文公开了一种四价双特异性蛋白,其包含(i)结合至人TfR的两个scFv、Fab或VHH抗原结合结构域和(ii)抗体,其中所述抗体包含两条重链和两条轻链;并且其中结合至人TfR的一个scFv、Fab或VHH抗原结合结构域连接至两条抗体重链之一的C端,并且结合至人TfR的另一scFv、Fab或VHH抗原结合结构域连接至两条抗体重链中的另一

者的C端或N端。在一些方面中,结合至人TfR的两个scFv、Fab或VHH抗原结合结构域可包含相同的氨基酸序列。在一些方面中,Fc为异二聚Fc,诸如具有杵突变和臼突变的Fc结构域。

[0234] 在一些方面中,本文公开了一种二价双特异性蛋白,其包含(i)结合至人TfR并连接至Fc二聚体的Fc结构域的N端的单个scFv、VHH或Fab抗原结合结构域,和(ii)第二抗原结合结构域,其中所述第二抗原结合结构域不特异性结合人TfR并连接至Fc二聚体的第二Fc结构域的N端。在一些方面中,第二抗原结合结构域结合除TfR之外的CNS或脑抗原。此1+1形式的实例在图1D中示出为(iii)。

[0235] 在一些方面中,本文公开了一种二价双特异性蛋白,其包含(i)结合至人TfR并连接至Fc二聚体的Fc结构域的N端或C端的单个scFv、VHH或Fab抗原结合结构域,和(ii)第二抗原结合结构域,其中所述第二抗原结合结构域不特异性结合人TfR并包含连接至Fc二聚体的Fc的N端或Fc二聚体的第二Fc结构域的C端的单个scFv、VHH或Fab。在一些方面中,Fc为异二聚Fc,诸如具有杵突变和臼突变的Fc结构域。此1+1形式的实例在图1D中示出为(ii),其中单个scFv连接至Fc区的Fc结构域的N端,并且第二抗原结合结构域连接至Fc区的第二Fc结构域的N端。

[0236] 如本文所提供,本文提供的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白可为多特异性的,例如双特异性的。双特异性结合分子的许多不同形式和用途是本领域已知的(综述于例如Kontermann;Drug Discov Today,2015年7月;20(7):838-47;MAbs,2012年3月-4月;4(2):182-97中)。根据本发明的双特异性蛋白不限于任何特定的双特异性形式或其产生方法。因此,本公开的双特异性蛋白可包括具有结合至人TfR的第一抗原结合结构域和例如结合至CNS抗原或脑抗原的第二抗原结合结构域的各种构型。

[0237] 双特异性分子包括例如κ-λ体、双重亲和力重靶向分子(DART)、杵臼抗体、链交换工程化结构域体(SEEDbody)和DuoBody。在一些方面中,本文提供的双特异性融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白包含杵突变和臼突变。在一些方面中,杵突变包含根据EU编号的氨基酸取代T366W。在一些方面中,臼突变包含根据EU编号的氨基酸取代T366S、L368A和Y407V。可用于本公开中的双特异性分子的实例包括(i)具有两个包含不同抗原结合结构域的臂的单一抗体;(ii)对两个不同表位具有特异性的单链抗体,例如经由两个由额外肽接头串联连接的scFv;(iii)双重可变结构域抗体(DVD-Ig),其中每条轻链和重链含有两个通过短肽键联串联的可变结构域(Wu等人,Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin(DVD-Ig.TM.)Molecule,In:Antibody Engineering,Springer Berlin Heidelberg(2010));(iv)化学连接的双特异性(Fab')2片段;(v)Tandab,其为两个单链双抗体的融合物,产生四价双特异性抗体,其对每个靶抗原具有两个结合位点;(vi)flexibody,其为scFv与双抗体的组合,产生多价分子;(vii)所谓的“对接与锁定”分子,基于蛋白激酶A中的“二聚化和对接域”,当将其应用于Fab时,可产生由连接至不同Fab片段的两个相同Fab片段组成的三价双特异性结合蛋白;(viii)所谓的Scorpion分子,其包含例如融合至人Fab臂的两端的两个scFv;和(ix)双抗体。抗体结构的其他实例描述于WO2019/246288中,所述专利以引用方式并入。

[0238] 在一些方面中,本文提供的双特异性蛋白选自以下形式中的一者:CrossMab、DAF(二合一)、DAF(四合一)、DutaMab、DT-IgG、电荷对、Fab-臂交换、Triomab、LUZ-Y、Fcab、κλ体、正交Fab、DVD-IgG、IgG(H)-scFv、scFv-(H)IgG、IgG(L)-scFv、scFv-(L)IgG、IgG(L,H)-

Fv、IgG(H)-V、V(H)-IgG、IgG(L)-V、V(L)-IgG、KIH IgG-scFab、2scFv-IgG、IgG-2scFv、scFv4-Ig、Zybody、DVI-IgG(四合一)、纳米抗体、纳米抗体-HAS、BiTE、TandAb、scDiabody-CH3、双抗体-CH3、三抗体、微型抗体、微型体、TriBi微型体、scFv-CH3 KIH、Fab-scFv、scFV-CH-CL-scFV、F(ab')2、F(ab')2-scFv2、scFV-KIH、Fab-scFv-Fc、四价HCAb、scDiabody-Fc、双抗体-Fc、串联scFv-Fc、胞内抗体(Intrabody)、ImmTAC、HSAbody、scDiabody-HAS、串联scFv-毒素、IgG-IgG、Cov-X-体和scFv1-PEG-scFv2,如Spiess,C.,等人,Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies.Mol.Immunol.(2015)中所述,所述文献以引用方式并入本文。

[0239] 在一些方面中,本文提供的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白为二价的。在一些方面中,本文提供的多特异性蛋白为多价的(例如,二价的)。在一些方面中,本文提供的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白为三价的(例如,呈2+1抗体形式)。在一些方面中,三价形式包含本文提供的单个TfR抗原结合结构域和结合至CNS抗原或脑抗原的两个抗原结合结构域。结合至CNS抗原或脑抗原的两个抗原结合结构域可包含相同的氨基酸序列或可包含不同的氨基酸序列。在一些方面中,TfR抗原结合结构域为scFv。在一些方面中,TfR抗原结合结构域为VHH。

[0240] 在一些方面中,本文提供的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白为四价的(例如,呈2+2抗体形式)。在一些方面中,四价形式包含本文提供的两个TfR抗原结合结构域和结合至CNS抗原或脑抗原的两个抗原结合结构域。两个TfR抗原结合结构域可包含相同的氨基酸序列或可包含不同的氨基酸序列。在一些方面中,两个TfR抗原结合结构域包含相同的氨基酸序列。在一些方面中,TfR抗原结合结构域中的一者或两者为scFv。结合至CNS抗原或脑抗原的两个抗原结合结构域可包含相同的氨基酸序列或可包含不同的氨基酸序列。

[0241] 本文提供的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白可包含接头,例如将TfR抗原结合结构域连接至异源蛋白、抗体或其抗原结合片段、或其他抗原结合结构域。接头可为例如甘氨酸接头、富含甘氨酸的接头、或甘氨酸-丝氨酸接头。接头可包含氨基酸序列(GGGGS)x3(SEQ ID NO:184)。接头可包含氨基酸序列(GGSGG)x3(SEQ ID NO:289)。

[0242] 本文提供的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白可包含恒定区。在一些方面中,本文提供的TfR抗原结合结构域连接至恒定区,例如恒定区的C端。在一些方面中,恒定结构域为人恒定结构域。在一些方面中,恒定结构域为鼠、大鼠、兔或猴(例如食蟹猴)恒定结构域。恒定区可为重链恒定区。恒定区可为人恒定区。恒定区可为人重链恒定区。恒定区可为IgG恒定区。恒定区可为IgG1恒定区。恒定区可为IgG2恒定区。恒定区可为IgG4恒定区。恒定区可为人IgG恒定区。恒定区可为人IgG1恒定区。恒定区可为人IgG2恒定区。恒定区可为人IgG4恒定区。接头可包含氨基酸序列GGSGG(无重复)(SEQ ID NO:304)。接头的长度可为1至20个氨基酸。

[0243] 在一些方面中,本文提供的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白包含重链和轻链。关于重链,在一些方面中,本文所述的抗原结合蛋白的重链可为alpha(α)、delta(δ)、epsilon(ε)、gamma(γ)或mu(μ)重链。在一些方面中,重链可包含人alpha(α)、delta(δ)、epsilon(ε)、gamma(γ)或mu(μ)重链。在一些方面中,重链包含人gamma(γ)重链恒定区。在一些方面中,重链包含IgG1重链恒定区的氨基酸序列。在一些方面中,重链包含

IgG2(例如IgG2a或IgG2b)重链恒定区的氨基酸序列。在一些方面中,重链包含IgG4重链恒定区的氨基酸序列。关于轻链,在一些方面中,轻链为κ轻链。在一些方面中,轻链为λ轻链。在一些方面中,轻链为人κ轻链或人λ轻链。

[0244] 在一些方面中,本文提供的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白包含恒定区,所述恒定区包含IgG、IgE、IgM、IgD、IgA或IgY免疫球蛋白分子或人IgG、IgE、IgM、IgD、IgA或IgY免疫球蛋白分子的恒定区的氨基酸序列。在一些方面中,本文提供的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白包含恒定区,所述恒定区包含IgG、IgE、IgM、IgD、IgA或IgY免疫球蛋白分子、免疫球蛋白分子的任何类别(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或任何亚类(例如,IgG2a和IgG2b)的恒定区的氨基酸序列。在一些方面中,恒定区包含人IgG、IgE、IgM、IgD、IgA或IgY免疫球蛋白分子、免疫球蛋白分子的任何类别(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或任何亚类(例如,IgG2a和IgG2b)的恒定区的氨基酸序列。

[0245] 人恒定区序列的非限制性实例已描述于例如美国专利号5,693,780和Kabat EA等人,(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH出版号91-3242)中。

[0246] 在一些方面中,本文提供的恒定区包含杵突变。在一些方面中,本文提供的恒定区包含臼突变。因此,在一些方面中,本文提供的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白可包含含有杵突变的恒定区和含有臼突变的恒定区。

[0247] FC结构域

[0248] 本文提供的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白可包含Fc结构域或其片段。在一些方面中,Fc结构域为IgG类别、IgM类别或IgA类别。在一些方面中,Fc结构域或其片段为IgG Fc结构域或其片段。在一些方面中,Fc结构域或其片段为人IgG Fc结构域或其片段。在一些方面中,Fc结构域或其片段为人IgG1 Fc结构域或其片段。在一些方面中,Fc结构域或其片段为人IgG2 Fc结构域或其片段。在一些方面中,Fc结构域或其片段为人IgG4 Fc结构域或其片段。在一些方面中,Fc结构域或其片段为单价Fc。

[0249] 在本文提供的一些方面中,所提供的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白包含修饰的Fc结构域或其片段。在一些方面中,修饰的Fc结构域或其片段为包含一个或多个修饰的修饰的IgG1 Fc。例如,在一些方面中,IgG1修饰的Fc包含一个或多个氨基酸取代(例如,相对于相同同种型的野生型Fc结构域)。在一些方面中,一个或多个氨基酸取代选自N297A(Bolt S等人(1993)Eur JImmunol 23:403-411)、D265A(Shields等人(2001)R.J.Biol.Chem.276,6591-6604)、L234A、L235A(Hutchins等人(1995)Proc Natl Acad Sci USA,92:11980-11984;Alegre等人,(1994)Transplantation 57:1537-1543.31;Xu等人,(2000)Cell Immunol,200:16-26)、G237A(Alegre等人(1994)Transplantation 57:1537-1543.31;Xu等人(2000)Cell Immunol,200:16-26)、C226S、C229S、E233P、L234V、L234F、L235E(McEarchern等人,(2007)Blood,109:1185-1192)、P331S(Sazinsky等人,(2008)Proc Natl Acad Sci USA 2008,105:20167-20172)、K322A(Hezareh等人(2001)J Virol.75(24)12161-12168)、S267E、L328F、A330L、M252Y、S254T、E430G和/或T256E,其中氨基酸位置根据EU编号约定。在一些方面中,Fc包含根据EU编号的氨基酸取代L234A、L235A和P331S(LALAPS)。在一些方面中,Fc包含根据EU编号的N325S和L328F突变。在一些方面中,Fc包含

根据EU编号的P329G或P329S。在一些方面中,Fc包含根据EU编号的K322A。

[0250] 表1:示例性Fc结构域

[0251]

| Fc 变体(根据 Eu 编号的突变) | 描述 |
|---|---|
| huIgG1 WT | 人 IgG1 Fc |

[0252]

| | |
|---|---|
| huIgG1 NSLF (N325S、L328F) | huIgG1 Fc 的两种多肽均含有 N325S 和 L328F 突变，其减少与 FcGR3a 的结合并增加与 FcGR2a 的结合。 |
| huIgG1 LALAPS (L234A、L235A、P329S) | huIgG1 Fc 的两种多肽均含有 L234A、L235A 和 P329S 突变，其使效应子功能(FcGR2a、FcgR3a 和补体结合)最小化 |
| huIgG1 LALAPSv2 (L234A、L235A、P331S) | huIgG1 Fc 的两种多肽均含有 L234A、L235A 和 P331S 突变，其使效应子功能(FcGR2a、FcgR3a 和补体结合)最小化 |
| huIgG1 LALA (L234A、L235A) | huIgG1 Fc 的两种多肽均含有 L234A、L235A 突变，其使效应子功能(FcGR2a、FcgR3a 结合)最小化 |
| huIgG1 K322A | huIgG1 Fc 的两种多肽均含有 K332A 突变，其使补体激活的效应子功能最小化。 |
| huIgG1 YTE (M252Y、S254T、T256E) | huIgG1 Fc 的两种多肽均含有 M252Y、S254T、T256E 突变，其增强与 FcRn 的亲和力以延长抗体半衰期 |
| huIgG1 LS (M428L、N434S) | 两种 huIgG1 Fc 均含有 M428L、N434S 突变。<br>这增强与 FcRn 的亲和力以延长抗体半衰期 |
| huIgG1 LALAPS (L234A、L235A、P329S) / huIgG1 WT | 一种 huIgG1 Fc 多肽含有 L234A、L235A 和 P329S 突变。另一种 huIgG1 Fc 多肽为野生型。<br>这调节效应子功能活性(FcgR2、FcgR3a 和补体结合) |
| huIgG1 LALAPSv2 (L234A、L235A、P331S) / huIgG1 WT | 一种 huIgG1 Fc 多肽含有 L234A、L235A 和 P331S 突变。另一种 huIgG1 Fc 多肽为野生型。<br>这调节效应子功能活性(FcgR2、FcgR3a 和补体结合) |
| huIgG1 LALA (L234A、L235A)/huIgG1 WT | 一种 huIgG1 Fc 多肽含有 L234A 和 L235A 突变。<br>另一种 huIgG1 Fc 多肽为野生型。<br>这调节效应子功能活性(FcgR2 和 FcgR3a 结合) |
| HuIgG1 LALA (L234A、L235A)/hu IgG1 PS (P329S) | 一种 huIgG1 Fc 多肽含有 L234A 和 L235A 突变。<br>另一种 huIgG1 Fc 多肽含有 P329S 突变。<br>这调节效应子功能活性(FcgR2、FcgR3a 和补体结合)。 |
| HuIgG1 LALA (L234A、L235A)/huIgG1 PSv2 (P331S) | 一种 huIgG1 Fc 多肽含有 L234A 和 L235A 突变。<br>另一种 huIgG1 Fc 多肽含有 P329S 突变。<br>这调节效应子功能活性(FcgR2、FcgR3a 和补体结合)。 |
| huIgG4 WT | 人 IgG4 Fc |
| huIgG4 S228P | 两种人 IgG4 Fc 多肽均含有 S228P 突变<br>这使 wt IgG4 Fc 中存在的 Fab 臂交换最小化 |

[0253]

| | |
|---|---|
| 异二聚 Fc (杵和臼) | Fc“杵”多肽含有 T366W 突变<br>Fc“臼”多肽含有 T366S、L368A、Y407V 突变<br>这促进 Fc 异二聚化且可与任何上述 Fc 突变组合。 |

[0254] 在本文提供的一些方面中,本文提供的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白为双特异性融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白。双特异性分子包括例如κ-λ体、双重亲和力重靶向分子(DART)、杵臼抗体、链交换工程化结构域体(SEEDbody)和DuoBody。在一些方面中,本文提供的双特异性融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白包含杵突变和臼突变。在一些方面中,杵突变包含根据EU编号的氨基酸取代T366W。在一些方面中,臼突变包含根据EU编号的氨基酸取代T366S、L368A和Y407V。

[0255] 在本文提供的一些方面中,本文提供的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白包含一个或多个突变以促进Fc结构域的异二聚化。在一些方面中,本文提供的双特异性的二聚化Fc结构域由含有氨基酸突变、取代、添加或缺失的Fc结构域形成以促进异二聚化,其中包含不同Fc结构域的不同多肽可二聚化以产生异二聚体构型。在一些方面中,本公开的双特异性抗体包含含有第一CH3区的第一Fc序列和含有第二CH3区的第二Fc序列,其中第一CH3区与第二CH3区的序列不同且使得所述第一CH3区与第二CH3区之间的异二聚相互作用强于所述第一CH3区与第二CH3区之间的同二聚相互作用中的每一个。

[0256] 促进Fc结构域的异二聚化的方法包括Fc结构域的氨基酸序列的氨基酸缺失、添加或取代,诸如通过包括一组“杵臼(knob-into-hole)”缺失、添加或取代或包括氨基酸缺失、添加或取代以实现Fc的静电转向,从而有利于不同多肽链之间有吸引力的相互作用。用于促进互补Fc多肽的异二聚化的方法先前已描述于以下文献中:例如Ridgway等人,1996,Protein Eng,9:617-621;Merchant等人,1998,Nature Biotechnol,16:677-681;Moore等人,2011,MAbs,3:546-557;Von Kreudenstein等人,2013,5:646-654;Gunasekaran等人,2010,J Biol Chem,285:19637-19464;Leaver-Fay等人,2016,Structure,24:641-651;Ha等人,2016,Frontiers in Immunology,7:1;Davis等人,2010,Protein Eng Des Sel,23:195-202;WO1996/027011;WO1998/050431;WO2006/028936;WO2009/089004;WO2011/143545;WO2014/067011;WO2012/058768;WO2018/027025;US2014/0363426;US2015/0307628;US2018/0016354;US2015/0239991;US2017/0058054;USPN5731168;USPN7183076;USPN9701759;USPN9605084;USPN9650446;USPN8216805;USPN8765412;和USPN8258268。

[0257] 在一些方面中,Fc异二聚体的互补Fc多肽包括改变跨Fc二聚体界面的电荷极性,使得静电匹配的Fc结构域的共表达支持有利的吸引相互作用,从而促进期望的Fc异二聚体形成的突变;而不利的排斥电荷相互作用会抑制不需要的Fc同二聚体形成(Guneskaran等人,2010,J Biol Chem,285:19637-19646)。当在细胞中共表达时,多肽链之间的缔合是可能的,但由于电荷排斥,所述链基本上不会自缔合。

[0258] 另外,Fc异二聚体的互补Fc多肽包括促进两个Fc多肽的异二聚化的“杵臼”构型。“杵臼”技术描述于例如美国专利号5,731,168;7,695,936;8,216,805;8,765,412;Ridgway等人,Prot Eng 9,617-621(1996);和Carter,J Immunol Meth 248,7-15(2001)中。一般而言,所述方法涉及在第一多肽的界面处引入突起(“杵”)和在第二多肽的界面中处引入对应空腔(“臼”),使得突起可定位在空腔中,从而促进异二聚体形成并阻碍同二聚体形成。通过

用较大侧链(例如酪氨酸或色氨酸)替换来自第一多肽的界面的小氨基酸侧链来构建突起。通过用较小氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)替换大的氨基酸侧链,在第二多肽的界面中产生与突起大小相同或相似的补偿空腔。突起和空腔可通过改变编码多肽的核酸,例如通过位点特异性诱变或通过肽合成而制成。在一些方面中,杵修饰包含Fc结构域的两个亚基中的一个中的氨基酸取代T366W,并且臼修饰包含Fc结构域的两个亚基中的另一个中的氨基酸取代T366S、L368A和Y407V。在一些方面中,包含杵修饰的Fc结构域的亚基另外包含氨基酸取代S354C,并且包含臼修饰的Fc结构域的亚基另外包含氨基酸取代Y349C。此两个半胱氨酸残基的引入导致在Fc区的两个亚基之间形成二硫桥,从而进一步稳定二聚体(Carter,J Immunol Methods 248,7-15(2001))。因此,在此类构型中,第一Fc多肽包含形成"杵"的氨基酸修饰并且第二Fc多肽包含形成"臼"的氨基酸修饰,由此形成包含互补Fc多肽的Fc异二聚体。

[0259] Fc异二聚体构型的互补Fc多肽的示例性配对氨基酸修饰在下表中列出(EU编号)。

[0260] 表2:异二聚Fc结构域的示例性配对Fc修饰

[0261]

| 第一Fc多肽 | 第二Fc多肽 |
|---|---|
| T366Y | Y407T |
| T366W | T366S/L368W/Y407V |
| T366W | T366S/L368A/Y407V |
| T366W/S354C | T366S/L368A/Y407V/Y349C |
| T350V/L351Y/F405A/Y407V | T350V/T366L/K392L/T394W |
| K360D/D399M/Y407A | E345R/Q347R/T366V/K409V |
| K409D/K392D | D399K/E356K |
| K360E/K409W | Q347R/D399V/F405T |
| L360E/K409W/Y349C | Q347R/D399V/F405T/S354C |
| K370E/K409W | E357N/D399V/F405T |

[0262] 本文提供的一些剂包含抗体的抗原结合片段。抗体的抗原结合片段包括但不限于Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')$_2$、Fv和scFv片段以及下文所述的其他片段。关于某些抗体片段的综述,参见Hudson等人Nat.Med.9:129-134(2003)。关于scFv片段的综述,参见例如WO 93/16185;和美国专利号5571894和5587458。关于包含挽救受体结合表位残基并具有增加的体内半衰期的Fab和F(ab')$_2$片段的论述,参见美国专利号5869046号。

[0263] 双抗体为具有两个抗原结合位点的抗体片段,其可为二价的和/或双特异性的。参见例如EP404097;WO 1993/01161;Hudson等人Nat.Med.9:129-134(2003)。三抗体和四功能抗体还描述于Hudson等人Nat.Med.9:129-134(2003)中。单结构域抗体为包含抗体的全部或一部分重链可变结构域或者全部或一部分轻链可变结构域的抗体片段。一些方面,单结构域抗体为人单结构域抗体(参见例如美国专利号6248516)。

[0264] 抗体片段可通过各种技术制得,所述技术包括但不限于完整抗体的蛋白水解消化以及由重组宿主细胞(例如大肠杆菌或噬菌体)产生,如本文所述。

[0265] 如本文所提供,本文提供的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白可为嵌合的。某些嵌合抗体描述于例如美国专利号4816567中。在一个实例中,嵌合抗体包含非人可变区(例如,来源于小鼠、大鼠、仓鼠、兔或非人灵长类动物诸如猴的可变区)和人恒

定区。在另一个实例中,嵌合抗体为“类别转换”抗体,其中类别或亚类相对于亲代抗体的类别或亚类已发生变化。

[0266] 如本文所提供,本文提供的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白可为人源化的。典型地,非人抗体被人源化以降低针对人的免疫原性,同时保留亲代非人抗体的特异性和亲和力。在一些方面中,人源化抗体在人中基本上为非免疫原性的。在一些方面中,人源化抗体对靶标的亲和力与来自产生所述人源化抗体的另一物种的抗体基本上相同。参见例如美国专利号5530101;5693761;5693762;和5585089。在一些方面中,鉴定出可在不减弱抗原结合结构域的天然亲和力同时降低其免疫原性的情况下修饰的抗体可变结构域的氨基酸。参见例如美国专利号5766886和5869619。一般而言,人源化抗体包含一个或多个可变结构域,其中CDR(或其部分)来源于非人抗体,并且框架区(FR)(或其部分)来源于人抗体序列。人源化抗体可包含人恒定区的至少一部分。在一些方面中,人源化抗体中的一些FR残基被来自非人抗体(例如,产生CDR残基的抗体)的对应残基取代,例如以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0267] 人源化抗体及其制备方法综述于例如Almagro等人Front.Biosci.13:161 9-1633(2008)中,并且进一步描述于例如美国专利号5821337、7527791、6982321和7087409中。可用于人源化的人框架区包括但不限于:使用“最佳拟合”方法选择的框架区(参见例如Sims等人J.Immunol.151:2296(1993));来源于轻链可变区或重链可变区的特定亚组的人抗体的共有序列的框架区(参见例如Carter等人Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:4285(1992);和Presta等人,J.Immunol.151:2623(1993));人成熟(体细胞突变)框架区或人种系框架区(参见例如Almagro和Fransson Front.Biosci.13:1619-1633(2008));和来源于筛选FR文库的框架区(参见例如Baca等人J.Biol.Chem.272:10678-10684(1997)和Rosok等人J.Biol.Chem.271:22611-22618(1996))。

[0268] 如本文所提供,本文提供的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白可为人的。人抗体可使用本领域已知的各种技术产生。人抗体一般描述于van Dijk等人Curr.Opin.Pharmacol.5:368-74(2001)和Lonberg Curr.Opin.Immunol.20:450-459(2008)中。

[0269] 人抗体可通过向已被修饰以响应于抗原攻击而产生完整人抗体或具有人可变区的完整抗体的转基因动物施用免疫原来制备。人们可用人Ig基因座的大片段使缺乏小鼠抗体产生的小鼠品系工程化,预期此小鼠将在小鼠抗体不存在下产生人抗体。大的人Ig片段可保留大的可变基因多样性以及对抗体产生和表达的适当调控。通过利用关于抗体多样化和选择以及对人蛋白质的免疫耐受性缺乏的小鼠机制,这些小鼠品系中再现的人抗体库可产生针对任何所关注抗原(包括人抗原)的高亲和力全人抗体。使用杂交瘤技术,可产生并选择具有所需特异性的抗原特异性人MAb。某些示例性方法描述于美国专利号5545807、EP 546073和EP 546073。还参见例如描述XENOMOUSE™技术的美国专利号6075181和6150584;描述HUMAB®技术的美国专利号5770429;描述K-M MOUSE®技术的美国专利号7041870;和描述VELOCIMOUSE®技术的美国专利申请公布号US2007/0061900。来自由此类动物产生的完整抗体的人可变区可例如通过与不同的人恒定区组合来进一步修饰。

[0270] 还可通过基于杂交瘤的方法来制备人抗体。已描述用于产生人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系。(参见例如Kozbor J.Immunol.133:3001(1984)和

Boerner等人J.Immunol.147:86(1991))。经由人B-细胞杂交瘤技术生成的人抗体还描述于Li等人Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1 03:3557-3562(2006)中。额外方法包括描述于例如美国专利号7189826(描述由杂交瘤细胞系产生单克隆人IgM抗体)中的那些方法。人杂交瘤技术(Trioma技术)还描述于Vollmers等人Histology and Histopathology 20(3):927-937(2005)和Vollmers等人Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology27(3):185-91(2005)中。人抗体还可通过分离选自人来源的噬菌体展示文库的Fv克隆可变结构域序列而生成。此类可变结构域序列可然后与所需人恒定结构域组合。用于从抗体文库选择人抗体的技术描述于下文。

[0271] 在本文提供的一些方面中,抗体为通过体外方法和/或筛选组合文库中具有所需一种或多种活性的抗体而分离的人抗体。合适的实例包括但不限于噬菌体展示(CAT、Morphosys、Dyax、Biosite/Medarex、Xoma、Symphogen、Alexion(先前称为Proliferon)、Affimed)、核糖体展示(CAT)、酵母展示(Adimab)等。在某些噬菌体展示方法中,通过聚合酶链反应(PCR)单独地选殖VH和VL基因的库,并且随机地重组于噬菌体文库中,然后可在所述噬菌体文库中筛选抗原结合噬菌体,如Winter等人Ann.Rev.Immunol.12:433-455(1994)中所述。例如,本领域已知用于产生噬菌体展示文库和筛选所述文库中具有所需结合特征的抗体的多种方法。还参见Sidhu等人J.Mol.Biol.338(2):299-310,2004;Lee等人J.Mol.Biol.340(5):1073-1093,2004;Fellouse Proc.Natl.Acad.Sci.USA 101(34):12467-12472(2004);和Lee等人J.Immunol.Methods 284(-2):1 19-132(2004)。噬菌体典型地将抗体片段展示为单链Fv(scFv)片段或Fab片段。来自免疫来源的文库提供针对免疫原的高亲和力抗体而无需构建杂交瘤。或者,可克隆(例如,从人)初始库以在不进行任何免疫的情况下提供针对多种非自体以及自体抗原的单一抗体来源,如Griffiths等人EMBO J.12:725-734(1993)所述。最后,初始文库还可通过从干细胞克隆未重排的V-基因区段,并且使用包含随机序列的PCR引物来编码高变CDR3区并实现体外重排而以合成方式制得,如Hoogenboom等人J.Mol.Biol.,227:381-388,1992所述。描述人抗体噬菌体文库的专利公布包括例如:美国专利号5750373和美国专利公布号2007/0292936和2009/0002360。在本文中从人抗体文库分离的抗体被视为人抗体或人抗体片段。

[0272] 如本文所提供,本文提供的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白可包含结合至CNS抗原或脑抗原的抗原结合结构域。如本文所提供,本文提供的抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白可包含结合至CNS抗原或脑抗原的抗原结合结构域。在一些方面中,CNS抗原或脑抗原可为β-分泌酶1(BACE1)、Abeta、表皮生长因子受体(EGFR)、人表皮生长因子受体2(HER2)、tau、载脂蛋白、载脂蛋白E(ApoE)、载脂蛋白E4(ApoE4)、α-突触核蛋白、CD20、亨廷顿蛋白、朊蛋白(PrP)、富含亮氨酸的重复激酶2(LRRK2)、parkin、早老素1、早老素2、γ分泌酶、死亡受体6(DR6)、淀粉样前体蛋白(APP)、p75神经营养因子受体(p75NTR)、胱天蛋白酶6、分拣蛋白(SORT)、髓系细胞上表达的触发受体2(TREM2)、CD33或唾液酸结合Ig样凝集素3(Siglec3)、跨膜4结构域A4A(MS4A4A)、跨膜4结构域A 6A(MS4A6A)或跨膜蛋白106B(TMEM106b)。在一些方面中,CNS抗原或脑抗原可为β-分泌酶1(BACE1)、Abeta、表皮生长因子受体(EGFR)、人表皮生长因子受体2(HER2)、tau、载脂蛋白、载脂蛋白E(ApoE)、载脂蛋白E4(ApoE4)、α-突触核蛋白、CD20、亨廷顿蛋白、朊蛋白(PrP)、富含亮氨酸的重复激酶2(LRRK2)、parkin、早老素1、早老素2、β-葡萄糖脑苷脂酶(GCase或GBA)、颗粒蛋

白前体(PGRN)、鞘脂激活蛋白原(PSAP)、泛素蛋白连接酶E3A(UBE3A)、γ分泌酶、死亡受体6(DR6)、淀粉样前体蛋白(APP)、p75神经营养因子受体(p75NTR)、胱天蛋白酶6、分拣蛋白(SORT)、髓系细胞上表达的触发受体2(TREM2)、CD33、唾液酸结合Ig样凝集素3(Siglec3)、唾液酸结合Ig样凝集素5(Siglec5)、唾液酸结合Ig样凝集素7(Siglec7)、唾液酸结合Ig样凝集素9(Siglec9)、唾液酸结合Ig样凝集素11(Siglec11)、糖蛋白非转移性黑色素瘤蛋白B(GPNMB)、配对免疫球蛋白样2型受体α(PILRA)、跨膜4结构域A4A(MS4A4A)、跨膜4结构域A6A(MS4A6A)、MSA4A4E、跨膜蛋白106B(TMEM106b)、CR1、ABCA1、ABCA7、HLA-DR1、HLA-DR5、IL1RAP、TREML2、IL-34、SORL1和ADAM1。

[0273] 在一些方面中,CNS或脑抗原在中枢神经系统内的癌细胞上。在一些方面中,CNS或脑抗原为在血液癌细胞上的选自以下的细胞表面靶标:B7H3、BCMA、CD125、CD166、CD19、CD20、CD205、CD22、CD25、CD30、CD37、CD39、CD73和CD79b。在一些方面中,CNS或脑抗原为选自以下的肿瘤细胞靶标:siglec-3或CD33、siglec-5、siglec-7、siglec-9、siglec 14、PILRA、IL18-BP、MerTK、ACKR1、ALK、AXL、CD25、CD44v6、CD46、CD56(NCAM)、CDH6(钙粘蛋白6)、CEACAM 5(CD66E)、EGFR、EGFR viii、ETBR、FGFR(1-4)、叶酸受体α、GAL-3BP(半乳凝素结合蛋白)、GD2、GD3、GloboH(球六糖神经酰胺(globohexasylceramide))、gp100、gpNMB、HER2、HER3、HER4、IGFR1、KIT、LIV1A、LRRC15(富含亮氨酸的重复蛋白15)、MET、NaPi2B、PDL1、PMEL17、PRAME、PSMA、PTK7(CCK4;结肠癌激酶)、RON、ROR1、TF(组织因子)和TROP2。

[0274] 如本文所提供,本文提供的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白可包含结合至CNS抗原或脑抗原的抗原结合结构域。如本文所提供,本文提供的多特异性蛋白可包含结合至CNS抗原或脑抗原的抗原结合结构域。结合至CNS抗原或脑抗原的抗原结合结构域可包含VH和VL。下面提供示例性CNS抗原结合VH和VL序列。另外的VH和VL和抗原结合结构域序列可见于US2017/0224702、US2018/0002433、US2021/0236634和US2021/0238265中,其各自以引用方式整体并入本文。

[0275] 表3:示例性CNS抗原

[0276]

| CNS抗原 | VH | VL |
|---|---|---|
| BACE1 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYAIHWVRQAPGKGLEWVGWISPAGGSTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGPFSPWVMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:290) | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:291) |
| BACE1 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFYYSSIHWVRQAPGKGLEWVASISPYSGYTSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQPTHYYYYAKGYKAMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:292) | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSYSPFTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:293) |
| α-突触核蛋白 | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRFTMTWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGGTSYADSVKGRLTVSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNWAPFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:294) | EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSRSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTVSRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:295) |
| α-突触核蛋白 | EVQLLESGGGLVQTGGSLRLSCAASGFTFSSYAMTWVRQAPGKGLEWVSAIRSNGDRTDYADSVKGRFTISRDNSQNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNWAPFDSWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:296) | EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:297) |
| Abeta | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYDFTRYYINWVRQAPGQGLEWMGWINPGSGNTKYNEKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGITVYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:298) | DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSRGKTYLNWLLQKPGQSPQLLIYAVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGTHYPFTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:299) |
| Tau | EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFNFNISAIHWVRQASGKGLEWVGRIRSKSHNYATLYAASLKGRFTLSRDDSRNTAYLQMSSLQTEDMAVYYCTVLSANYDTFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:300) | SYELTQPPSVSVSPGQTARISCFGDTLPKQYTYWYQQKPGQAPVLVIYKDTERPSGIPERFSGSSSGTTVTLTISGVQAEDEADYYCLSADNSATWVFGGGTKVTVL (SEQ ID NO:301) |

[0277] 如本文所提供,本文提供的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白能够穿过BBB,这是由于在所述融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白中的抗TfR抗原结合结构域能够穿过BBB的事实。

[0278] 在一些方面中,本文提供的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白在血脑屏障上皮细胞中的内化是同种型对照的内化的大于10倍。血脑屏障上皮细胞可为例如HCMEC/D3细胞。

[0279] 在一些方面中,相对于用同种型对照处理的HCMEC/D3细胞上TfR的细胞表面表达,

本文提供的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白不会将HCMEC/D3细胞上TfR的细胞表面表达降低超过60％。在一些方面中，相对于用同种型对照处理的HCMEC/D3细胞上TfR的细胞表面表达，本文提供的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白不会将HCMEC/D3细胞上TfR的细胞表面表达降低超过40％。可例如使用蛋白质印迹或FACS来测量细胞表面表达。

[0280] 在一些方面中，相对于用同种型对照处理的HCMEC/D3细胞上TfR的细胞表面表达，本文提供的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白不会显著增加HCMEC/D3细胞上TfR的细胞表面表达。可例如使用蛋白质印迹或FACS来测量细胞表面表达。

[0281] 在一些方面中，相对于用同种型对照处理的HCMEC/D3细胞上TfR的细胞表面表达，本文提供的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白不会将HCMEC/D3细胞上TfR的细胞表面表达降低超过60％，并且相对于用同种型对照处理的HCMEC/D3细胞上TfR的细胞表面表达，不会显著增加HCMEC/D3细胞上TfR的细胞表面表达。可例如使用蛋白质印迹或FACS来测量细胞表面表达。在一些方面中，相对于用同种型对照处理的HCMEC/D3细胞上TfR的细胞表面表达，本文提供的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白不会将HCMEC/D3细胞上TfR的细胞表面表达降低超过40％，并且相对于用同种型对照处理的HCMEC/D3细胞上TfR的细胞表面表达，不会显著增加HCMEC/D3细胞上TfR的细胞表面表达。可例如使用蛋白质印迹或FACS来测量细胞表面表达。

[0282] 在一些方面中，在血管耗竭的小鼠脑中，本文提供的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白的累积是同种型对照的至少4倍。在一些方面中，在血管耗竭的小鼠脑中，本文提供的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白的累积是同种型对照的至少5倍。

[0283] 在一些方面中，本文提供的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白以约6.7nM至约3.5μM的平衡解离常数($K_D$)结合人TfR。在一些方面中，本文提供的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白以约6.7nM至约340nM的平衡解离常数($K_D$)结合人TfR。在一些方面中，本文提供的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白以约38nM至约2.3μM的$K_D$结合食蟹猴TfR。在一些方面中，本文提供的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白以约18nM至约870nM的$K_D$结合食蟹猴TfR。在一些方面中，本文提供的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白以约6.7nM至约3.5μM的平衡解离常数($K_D$)结合人TfR并在本文中以约38nM至约2.3μM的$K_D$结合食蟹猴TfR。在一些方面中，本文提供的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白以约6.7nM至约340nM的平衡解离常数($K_D$)结合人TfR并在本文中以约18nM至约870nM的$K_D$结合食蟹猴TfR。

[0284] 多核苷酸和制备抗TfR抗原结合结构域的方法以及包含所述抗TfR抗原结合结构域的剂

[0285] 在一些方面中，本文提供多核苷酸，其包含编码本文所述的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域、融合蛋白、抗体、其抗原结合片段、或多特异性蛋白或本文所述的其结构域的核苷酸序列；和载体，例如包含用于在宿主细胞(例如大肠杆菌和哺乳动物细胞)中重组表达的此类多核苷酸的载体。

[0286] 在一些方面中，本文提供的多核苷酸包含编码本文提供的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域的重链的核酸分子。在一些方面中，本文提供的多核苷酸包含编码本文提

供的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域的轻链的核酸分子。在一些方面中,本文提供的多核苷酸包含编码本文提供的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域的重链的核酸分子和编码本文提供的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域的轻链的核酸分子。

[0287] 在一些方面中,本文提供多核苷酸的组合或组合物。在一些方面中,组合或组合物包含第一多核苷酸、第二多核苷酸和第三多核苷酸,其中第一多核苷酸、第二多核苷酸和第三多核苷酸编码本文提供的多特异性蛋白,例如,其中第一多核苷酸编码第一重链,第二多核苷酸编码第二重链和本文提供的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域,并且第三多核苷酸编码轻链。在一些方面中,结合至人TfR的抗原结合结构域为scFv。在一些方面中,第一重链包含杵突变并且第二重链包含臼突变。在一些方面中,第一重链包含臼突变并且第二重链包含杵突变。

[0288] 在一些方面中,组合或组合物包含第一多核苷酸、第二多核苷酸和第三多核苷酸,其中第一多核苷酸、第二多核苷酸和第三多核苷酸编码本文提供的多特异性蛋白,其中第一多核苷酸编码第一重链和特异性结合至人TfR的第一抗原结合结构域,第二多核苷酸编码第二重链和特异性结合至人TfR的第二抗原结合结构域,并且第三多核苷酸编码轻链。在一些方面中,结合至人TfR的第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域包含相同的氨基酸序列。在一些方面中,结合至人TfR的第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域包含不同的氨基酸序列。在一些方面中,结合至人TfR的第一抗原结合结构域和/或第二抗原结合结构域为scFv。在一些方面中,第一重链包含杵突变并且第二重链包含臼突变。在一些方面中,第一重链包含臼突变并且第二重链包含杵突变。

[0289] 在一些方面中,组合或组合物包含第一多核苷酸和第二多核苷酸,其中第一多核苷酸和第二多核苷酸编码本文提供的多特异性蛋白,其中第一多核苷酸编码重链和本文提供的结合至人TfR的抗原结合结构域,并且其中第二多核苷酸编码轻链。

[0290] 本文还提供了多核苷酸,其包含编码本文所述的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域、融合蛋白、抗体、其抗原结合片段、或多特异性蛋白或本文所述的其结构域的核苷酸序列,所述多核苷酸例如通过密码子/RNA优化、用异源信号序列替换和/或消除mRNA不稳定元件来优化。通过引入密码子变化(例如,由于遗传密码的简并性而编码相同氨基酸的密码子变化)和/或消除mRNA中的抑制区来生成用于重组表达的经优化核酸的方法可通过采用例如美国专利号5,965,726;6,174,666;6,291,664;6,414,132;和6,794,498中描述的优化方法来进行。

[0291] 包含编码本文所述的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域、融合蛋白、抗体、其抗原结合片段、或多特异性蛋白或本文所述的其结构域的核苷酸序列的多核苷酸可由来自合适来源(例如杂交瘤)的核酸,使用本领域熟知的方法(例如PCR和其他分子克隆方法)生成。例如,可使用从产生感兴趣抗体的杂交瘤细胞获得的基因组DNA进行使用可与已知序列的3'和5'末端杂交的合成引物的PCR扩增。此类PCR扩增方法可用于获得包含例如编码抗原结合结构域、抗体或其抗原结合片段的轻链和/或重链的序列的核酸。扩增的核酸可被克隆至载体中用于在宿主细胞中表达并用于进一步克隆,例如以生成本文所述的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域、融合蛋白、抗体、其抗原结合片段、或多特异性蛋白或本文所述的其结构域。

[0292] 本文提供的多核苷酸可呈例如RNA形式或DNA形式。DNA包括cDNA、基因组DNA和合

成DNA,并且DNA可为双链或单链的。如果为单链,则DNA可为编码链或非编码(反义)链。在一些方面中,多核苷酸为缺少一个或多个内源性内含子的cDNA或DNA。在一些方面中,多核苷酸为非天然存在的多核苷酸。在一些方面中,多核苷酸是重组产生的。在一些方面中,多核苷酸是分离的。在一些方面中,多核苷酸是基本上纯的。

[0293] 在一些实施方案中,本文提供的多核苷酸呈RNA形式。在一些实施方案中,本文提供的多核苷酸呈编码本文提供的融合蛋白的RNA形式。在一些实施方案中,本文提供的多核苷酸为合成的传讯RNA(mRNA)。在一些实施方案中,合成的mRNA具有至少一个核苷修饰。在一些实施方案中,至少一个核苷修饰选自由以下组成的组:吡啶-4-酮核糖核苷、5-氮杂-尿苷、2-硫代-5-氮杂-尿苷、2-硫代尿苷、4-硫代-假尿苷、2-硫代-假尿苷、5-羟基尿苷、3-甲基尿苷、5-羧甲基-尿苷、1-羧甲基-假尿苷、5-丙炔基-尿苷、1-丙炔基-假尿苷、5-牛磺酸甲基尿苷、1-牛磺酸甲基-假尿苷、5-牛磺酸甲基-2-硫代-尿苷、1-牛磺酸甲基-4-硫代-尿苷、5-甲基-尿苷、1-甲基-假尿苷、4-硫代-1-甲基-假尿苷、2-硫代-1-甲基-假尿苷、1-甲基-1-脱氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-1-脱氮-假尿苷、二氢尿苷、二氢假尿苷、2-硫代-二氢尿苷、2-硫代-二氢假尿苷、2-甲氧基尿苷、2-甲氧基-4-硫代尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、5-氮杂-胞苷、假异胞苷、3-甲基-胞苷、N4-乙酰基胞苷、5-甲酰基胞苷、N4-甲基胞苷、5-羟甲基胞苷、1-甲基-假异胞苷、吡咯并胞苷、吡咯并-假异胞苷、2-硫代-胞苷、2-硫代-5-甲基-胞苷、4-硫代-假异胞苷、4-硫代-1-甲基-假异胞苷、4-硫代-1-甲基-1-脱氮-假异胞苷、1-甲基-1-脱氮-假异胞苷、泽布拉林(zebularine)、5-氮杂-泽布拉林、5-甲基-泽布拉林、5-氮杂-2-硫代-泽布拉林、2-硫代-泽布拉林、2-甲氧基-胞苷、2-甲氧基-5-甲基-胞苷、4-甲氧基-假异胞苷、4-甲氧基-1-甲基-假异胞苷、2-氨基嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、7-脱氮-腺嘌呤、7-脱氮-8-氮杂-腺嘌呤、7-脱氮-2-氨基嘌呤、7-脱氮-8-氮杂-2-氨基嘌呤、7-脱氮-2,6-二氨基嘌呤、7-脱氮-8-氮杂-2,6-二氨基嘌呤、1-甲基腺苷、N6-甲基腺苷、N6-异戊烯基腺苷、N6-(顺式羟基异戊烯基)腺苷、2-甲硫基-N6-(顺式羟基异戊烯基)腺苷、N6-甘氨酰基胺甲酰基腺苷、N6-苏氨酰基胺甲酰基腺苷、2-甲硫基-N6-苏氨酰基胺甲酰基腺苷、N6,N6-二甲基腺苷、7-甲基腺嘌呤、2-甲硫基腺嘌呤、2-甲氧基腺嘌呤、肌苷、1-甲基肌苷、怀俄苷(wyosine)、怀丁苷、7-脱氮-鸟苷、7-脱氮-8-氮杂-鸟苷、6-硫代-鸟苷、6-硫代-7-脱氮-鸟苷、6-硫代-7-脱氮-8-氮杂-鸟苷、7-甲基-鸟苷、6-硫代-7-甲基-鸟苷、7-甲基肌苷、6-甲氧基鸟苷、1-甲基鸟苷、N2-甲基鸟苷、N2,N2-二甲基鸟苷、8-氧代鸟苷、7-甲基-8-氧代鸟苷、1-甲基-6-硫代-鸟苷、N2-甲基-6-硫代-鸟苷和N2,N2-二甲基-6-硫代-鸟苷。

[0294] 在一些方面中,本文提供了编码融合蛋白的多核苷酸,所述融合蛋白包含本文提供的抗原结合蛋白和异源多肽。在一些方面中,异源多肽包含结合至以下各者的抗原结合结构域:β-分泌酶1(BACE1)、Abeta、表皮生长因子受体(EGFR)、人表皮生长因子受体2(HER2)、tau、载脂蛋白、载脂蛋白E(ApoE)、载脂蛋白E4(ApoE4)、α-突触核蛋白、CD20、亨廷顿蛋白、朊蛋白(PrP)、富含亮氨酸的重复激酶2(LRRK2)、parkin、早老素1、早老素2、β-葡萄糖脑苷脂酶(GCase或GBA)、颗粒蛋白前体(PGRN)、鞘脂激活蛋白原(PSAP)、γ分泌酶、死亡受体6(DR6)、淀粉样前体蛋白(APP)、p75神经营养因子受体(p75NTR)、胱天蛋白酶6、分拣蛋白(SORT)、髓系细胞上表达的触发受体2(TREM2)、CD33或唾液酸结合Ig样凝集素3(Siglec3)、唾液酸结合Ig样凝集素5(Siglec5)、唾液酸结合Ig样凝集素7(Siglec7)、唾液

酸结合Ig样凝集素9(Siglec9)、糖蛋白非转移性黑色素瘤蛋白B(GPNMB)、配对免疫球蛋白样2型受体α(PILRA)、跨膜4结构域A4A(MS4A4A)、跨膜4结构域A 6A(MS4A6A)、或跨膜蛋白106B(TMEM106b),或其一部分。在一些方面中,异源多肽包含结合至泛素蛋白连接酶E3A(UBE3A)的抗原结合结构域。在一些方面中,本文提供了编码本文提供的多特异性蛋白的多核苷酸。在一些方面中,多特异性蛋白包含结合至以下各者的抗原结合结构域:β-分泌酶1(BACE1)、Abeta、表皮生长因子受体(EGFR)、人表皮生长因子受体2(HER2)、tau、载脂蛋白、载脂蛋白E(ApoE)、载脂蛋白E4(ApoE4)、α-突触核蛋白、CD20、亨廷顿蛋白、朊蛋白(PrP)、富含亮氨酸的重复激酶2(LRRK2)、parkin、早老素1、早老素2、β-葡萄糖脑苷脂酶(GCase或GBA)、颗粒蛋白前体(PGRN)、鞘脂激活蛋白原(PSAP)、γ分泌酶、死亡受体6(DR6)、淀粉样前体蛋白(APP)、p75神经营养因子受体(p75NTR)、脱天蛋白酶6、分拣蛋白(SORT)、髓系细胞上表达的触发受体2(TREM2)、CD33或唾液酸结合Ig样凝集素3(Siglec3)、唾液酸结合Ig样凝集素5(Siglec5)、唾液酸结合Ig样凝集素7(Siglec7)、唾液酸结合Ig样凝集素9(Siglec9)、糖蛋白非转移性黑色素瘤蛋白B(GPNMB)、配对免疫球蛋白样2型受体α(PILRA)、跨膜4结构域A4A(MS4A4A)、跨膜4结构域A 6A(MS4A6A)、或跨膜蛋白106B(TMEM106b),或其一部分。在一些方面中,多特异性蛋白包含结合至泛素蛋白连接酶E3A(UBE3A)的抗原结合结构域。在一些实施方案中,多核苷酸为mRNA(例如,合成mRNA)。

[0295] 在一些实施方案中,本文公开了多核苷酸,其编码包含异源多肽的本文所公开的融合蛋白。在一些方面中,异源多肽为ERT酶或ERT酶变体、或其催化活性片段。在一些方面中,异源多肽包含β-葡萄糖脑苷脂酶(GCase或GBA)、颗粒蛋白前体(PGRN)、鞘脂激活蛋白原(PSAP)或其催化活性片段。在一些方面中,本文提供的融合蛋白中的异源多肽为生长因子。在一些方面中,本文提供的融合蛋白中的异源多肽为诱骗受体。在一些方面中,本文提供的融合蛋白中的异源多肽为颗粒蛋白前体(PGRN)、鞘脂激活蛋白原(PSAP)或存活运动神经元蛋白(SMN)。在一些方面中,异源蛋白为选自以下的酶:α-L艾杜糖醛酸酶(IDUA)、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶(IDS)、N-乙酰半乳胺糖-6-硫酸酯酶(GALNS)、N-磺基葡萄糖胺磺基水解酶(SGSH)、N-乙酰半乳胺糖-4-硫酸酯酶(芳基硫酸酯酶B;ARSB)、酸性神经鞘髓磷脂酶(ASM)、β-葡萄糖脑苷脂酶(GCase或GBA)、半乳糖苷基神经酰胺β-半乳糖苷酶、葡苷基神经酰胺酶、β-己糖胺酶A、β-己糖胺酶B、芳基硫酸酯酶A、β-半乳糖苷酶、酸性神经酰胺酶、α-葡萄糖苷酶、溶酶体酸性脂肪酶、溶酶体蛋白酶、其合成酶替代物诸如拉罗尼酶、艾杜硫酸酶、elosulphaseα或半乳糖硫酸酶、或其变体、或其催化活性片段。在一些方面中,异源蛋白为选自以下的酶:丛集素(APOJ)、络丝蛋白、泛素蛋白连接酶E3A(UBE3A)、三肽基肽酶1(CLN2/TPP1)、葡萄糖胺(N-乙酰基)-6-硫酸酯酶(GNS)、类肝素-α-氨基葡萄糖苷N-乙酰基转移酶(HGSNAT)、和N-乙酰基-α-氨基葡萄糖苷酶(NAGLU)、α-L艾杜糖醛酸酶(IDUA)、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶(IDS)、N-乙酰半乳胺糖-6-硫酸酯酶(GALNS)、N-磺基葡萄糖胺磺基水解酶(SGSH)、N-乙酰半乳胺糖-4-硫酸酯酶(芳基硫酸酯酶B;ARSB)、酸性神经鞘髓磷脂酶(ASM)、β-葡萄糖脑苷脂酶(GCase或GBA)、半乳糖苷基神经酰胺β-半乳糖苷酶、葡苷基神经酰胺酶、β-己糖胺酶A、β-己糖胺酶B、芳基硫酸酯酶A、β-半乳糖苷酶、酸性神经酰胺酶、α-葡萄糖苷酶、溶酶体酸性脂肪酶、溶酶体蛋白酶、其合成酶替代物诸如拉罗尼酶、艾杜硫酸酶、elosulphaseα或半乳糖硫酸酶、或其变体、或其催化活性片段α-L艾杜糖醛酸酶(IDUA)、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶(IDS)、N-乙酰半乳胺糖-6-硫酸酯酶(GALNS)、N-磺基葡萄糖胺磺基

水解酶(SGSH)、N-乙酰半乳胺糖-4-硫酸酯酶(芳基硫酸酯酶B;ARSB)、酸性神经鞘髓磷脂酶(ASM)、β-葡萄糖脑苷脂酶(GCase或GBA)、半乳糖苷基神经酰胺β-半乳糖苷酶、葡苷基神经酰胺酶、β-己糖胺酶A、β-己糖胺酶B、芳基硫酸酯酶A、β-半乳糖苷酶、酸性神经酰胺酶、α-葡萄糖苷酶、溶酶体酸性脂肪酶、溶酶体蛋白酶、其合成酶替代物诸如拉罗尼酶、艾杜硫酸酶、elosulphaseα或半乳糖硫酸酶、或其变体、或其催化活性片段。在一些实施方案中,多核苷酸为mRNA(例如,合成mRNA)。

[0296] 在某些方面中,本文提供了包含多核苷酸的载体(例如,表达载体),所述多核苷酸包含编码本文所述的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域、融合蛋白、抗体、其抗原结合片段、或多特异性蛋白或本文所述的其结构域的核苷酸序列,用于在宿主细胞(例如哺乳动物宿主细胞)中重组表达。可例如使用本领域熟知的技术,通过重组DNA技术产生用于产生本文所述的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域、融合蛋白、抗体、其抗原结合片段、或多特异性蛋白或本文所述的其结构域的载体。这些方法包括例如体外重组DNA技术、合成技术和体内基因重组。还提供了可复制载体,其包含编码本文所述的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域、融合蛋白、抗体、其抗原结合片段、或多特异性蛋白或本文所述的其结构域的核苷酸序列,所述核苷酸序列可操作地连接至启动子。此类载体可例如包括编码抗原结合结构域、抗体或其抗原结合片段的恒定区的核苷酸序列(参见例如国际公布号WO 86/05807和WO 89/01036;以及美国专利号5,122,464),并且抗原结合结构域、抗体或其抗原结合片段的可变结构域可克隆至此类载体中,用于表达整条重链、整条轻链、或整条重链和整条轻链两者。在一些实施方案中,载体为基因疗法载体(例如,AAV或慢病毒载体)。

[0297] 在某些方面中,本文提供了包含多核苷酸的表达系统,所述多核苷酸包含编码本文所述的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域、融合蛋白、抗体、其抗原结合片段、或多特异性蛋白或本文所述的其结构域的核苷酸序列。表达系统可包含在载体上。表达系统还可整合至宿主细胞染色体中。在一些方面中,表达系统为无细胞表达系统。在一些方面中,表达系统包含宿主细胞,所述宿主细胞包含本文提供的多核苷酸和/或载体。

[0298] 因此,本文还提供了细胞,例如宿主细胞,其包含用于重组表达本文所述的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域、融合蛋白、抗体、其抗原结合片段、或多特异性蛋白或本文所述的其结构域的多核苷酸和/或载体。在一些方面中,为了表达双链抗原结合蛋白,单独编码重链和轻链两者的载体可在宿主细胞中共表达,以表达整个免疫球蛋白。在一些方面中,宿主细胞含有两种不同的载体,第一载体包含编码本文所述的抗原结合蛋白的重链的多核苷酸,并且第二载体包含编码所述抗原结合蛋白的轻链的多核苷酸。在一些方面中,第一宿主细胞包含含有编码重链的多核苷酸的第一载体,并且第二宿主细胞包含含有编码轻链的多核苷酸的第二载体。在一些方面中,本文提供了一种宿主细胞群,其包含此类第一宿主细胞和此类第二宿主细胞。

[0299] 在一些方面中,本文提供了用于在宿主细胞中产生本文所述的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域、融合蛋白、抗体、其抗原结合片段、或多特异性蛋白或本文所述的其结构域的方法。在一些方面中,本文提供用于产生特异性结合至人TfR的单链抗原结合结构域、Fc结构域和异源蛋白或多肽的方法。在一些方面中,本文提供用于产生如本文所述的特异性结合至人TfR的单链抗原结合结构域、Fc结构域和第二抗原结合结构域的方法。表达载体可通过常规技术转移至细胞(例如宿主细胞)中,并且所得细胞可随后通过常规技术培

养,以产生本文所述的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域、融合蛋白、抗体、其抗原结合片段、或多特异性蛋白或本文所述的其结构域。

[0300] 可利用多种宿主表达载体系统来表达本文所述的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域、融合蛋白、抗体、其抗原结合片段、或多特异性蛋白或本文所述的其结构域(参见例如美国专利号5,807,715)。此类宿主表达系统不仅代表媒介物,通过所述媒介物可产生感兴趣编码序列并随后将其纯化;而且还代表细胞,所述细胞当用适当的核苷酸编码序列转化或转染时,可原位表达本文所述的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域、融合蛋白、抗体、其抗原结合片段、或多特异性蛋白或本文所述的其结构域。它们包括但不限于用含有抗体编码序列的重组噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA表达载体转化的微生物,诸如细菌(例如大肠杆菌和枯草芽孢杆菌(B.subtilis));用含有抗体编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母(例如毕赤酵母(Saccharomyces Pichia));用含有抗体编码序列的重组病毒表达载体(例如杆状病毒(baculovirus))感染的昆虫细胞系统;用含有编码序列的重组病毒表达载体(例如花椰菜花叶病毒(cauliflower mosaic virus),CaMV;烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus),TMV)感染或用含有编码序列的重组质粒表达载体(例如Ti质粒)转化的植物细胞系统(例如绿藻,诸如莱茵衣藻(Chlamydomonas reinhardtii));或哺乳动物细胞系统(例如COS(例如COS1或COS)、CHO、BHK、MDCK、HEK 293、NS0、PER.C6、VERO、CRL7030、HsS78Bst、HeLa、和NIH3T3、HEK-293T、HepG2、SP210、R1.1、B-W、L-M、BSC1、BSC40、YB/20和BMT10细胞),其具有含有来源于哺乳动物细胞基因组(例如金属硫蛋白启动子)或哺乳动物病毒(例如腺病毒晚期启动子;牛痘病毒7.5K启动子)的启动子的重组表达构建体。在一些方面中,用于表达本文所述的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域、融合蛋白、抗体、其抗原结合片段、或多特异性蛋白或本文所述的其结构域的细胞为CHO细胞,例如来自CHO GS System™(Lonza)的CHO细胞。在一些方面中,用于表达本文所述的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域、融合蛋白、抗体、其抗原结合片段、或多特异性蛋白或本文所述的其结构域的细胞为人细胞,例如人细胞系。在一些方面中,哺乳动物表达载体为pOptiVEC™或pcDNA3.3。在一些方面中,细菌细胞诸如大肠杆菌或真核细胞(例如哺乳动物细胞)用于表达本文所述的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域、融合蛋白、抗体、其抗原结合片段、或多特异性蛋白或本文所述的其结构域。例如,哺乳动物细胞诸如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞联合载体诸如来自人巨细胞病毒的主要中间早期基因启动子元件为抗体的有效表达系统(Foecking MK和Hofstetter H(1986)Gene 45:101-105;和Cockett MI等人,(1990)Biotechnology 8:662-667)。在一些方面中,本文所述的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域、融合蛋白、抗体、其抗原结合片段、或多特异性蛋白或本文所述的其结构域由CHO细胞或NS0细胞产生。

[0301] 此外,可选择宿主细胞品系,其调节插入序列的表达,或以所需的特定方式修饰和加工基因产物。蛋白质产物的此类修饰(例如糖基化)和加工(例如切割)可有助于蛋白质功能。为此,可使用真核宿主细胞,其具有用于适当加工初级转录物、使基因产物糖基化和磷酸化的细胞机器。此类哺乳动物宿主细胞包括但不限于CHO、VERO、BHK、Hela、MDCK、HEK 293、NIH 3T3、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20和T47D、NS0(不内源性产生任何免疫球蛋白链的鼠骨髓瘤细胞系)、CRL7030、COS(例如COS1或COS)、PER.C6、VERO、HsS78Bst、HEK-293T、HepG2、SP210、R1.1、B-W、L-M、BSC1、BSC40、YB/20、BMT10和HsS78Bst细胞。

[0302] 一旦本文所述的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域、融合蛋白、抗体、其抗原结合片段、或多特异性蛋白或本文所述的其结构域已通过重组表达产生,则其可通过本领域已知用于纯化的任何方法来纯化,例如通过色谱(例如,离子交换、亲和力,特别是通过蛋白A后对特定抗原的亲和力和分级柱色谱)、离心、差异溶解性或通过用于纯化蛋白质的任何其他标准技术。此外,本文所述的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域、融合蛋白、抗体、其抗原结合片段、或多特异性蛋白或本文所述的其结构域可与异源多肽序列融合以促进纯化。

[0303] 在一些方面中,一旦分离或纯化本文所述的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域、融合蛋白、抗体、其抗原结合片段、或多特异性蛋白。一般而言,分离或纯化的本文所述的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域、融合蛋白、抗体、其抗原结合片段、或多特异性蛋白基本上不含其他蛋白质。例如,在一些方面中,本文所述的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域、融合蛋白、抗体、其抗原结合片段、或多特异性蛋白的制剂基本上不含细胞材料和/或化学前体。

[0304] 药物组合物

[0305] 本文提供了组合物,其包含本文所述的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域、融合蛋白、抗体、其抗原结合片段或多特异性蛋白。在一些方面中,具有所需纯度的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域、融合蛋白、抗体、其抗原结合片段、或多特异性蛋白存在于包含例如生理上可接受的载剂、赋形剂或稳定剂的制剂中(Remington'sPharmaceutical Sciences(1990)Mack Publishing Co.,Easton,PA)。可接受的载剂、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度下对接受者无毒。适合胃肠外施用的制剂包括水性和非水性等渗无菌注射溶液,其可包含抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使制剂与预定接受者的血液等渗的溶质;以及水性和非水性无菌悬浮液,其可包含悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂。

[0306] 在一些方面中,药物组合物包含本文所述的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域、融合蛋白、抗体、其抗原结合片段、或多特异性蛋白和药学上可接受的载剂(参见例如Gennaro,Remington:The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons:Drugfacts Plus,第20版(2003);Ansel等人,Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,第7版,Lippencott Williams and Wilkins(2004);Kibbe等人,Handbook of Pharmaceutical Excipients,第3版,Pharmaceutical Press(2000))。在一些方面中,本文所述的药物组合物用作药剂。待用于体内施用的组合物可为无菌的。这容易由通过例如无菌滤膜过滤来实现。

[0307] 本文还提供了包含多核苷酸的药物组合物,所述多核苷酸编码本文所述的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域、融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白。在一些实施方案中,多核苷酸为RNA。在一些实施方案中,多核苷酸为合成mRNA。在一些实施方案中,多核苷酸为修饰的mRNA。在一些实施方案中,包含多核苷酸的药物组合物进一步包含基于脂质的转染试剂。

[0308] 本文所述的药物组合物可用于在体内或体外发挥生物效应。例如,本文所述的药物组合物可用于穿过例如受试者中的血脑屏障。

[0309] 在一些方面中,本文提供的药物组合物用于治疗疾病或疾患,诸如神经病变病症、神经退行性疾病、癌症、眼部疾病病症、癫痫发作、溶酶体贮积症、淀粉样变性、病毒或微生

物疾病、缺血、行为障碍和CNS炎症。在一些方面中,本文提供的药物组合物用于治疗疾病或疾患,诸如阿尔茨海默氏病(AD)、中风、痴呆、肌营养不良(MD)、多发性硬化症(MS)、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)、囊性纤维化、安格曼氏综合征、利德尔综合征、帕金森氏病、皮克氏病、佩吉特氏病、癌症和创伤性脑损伤。在一些方面中,本文提供的药物组合物用于治疗额颞叶痴呆。

[0310] 在一些方面中,本文提供的药物组合物被调配用于静脉内施用。在一些方面中,本文提供的药物组合物被调配用于皮下施用。

[0311] 使用抗TfR抗原结合结构域的方法和包含所述抗TfR抗原结合结构域的剂

[0312] 如本文所提供的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域、包含此类抗原结合结构域的融合蛋白、抗体、其抗原结合片段和多特异性蛋白宜转运穿过血脑屏障。因此,本文提供施用或转运特异性结合至人TfR的抗原结合蛋白或包含特异性结合至人TfR的抗原结合蛋白的融合蛋白、抗体、其抗原结合片段或多特异性蛋白穿过受试者的血脑屏障的方法,其包括向受试者施用特异性结合至人TfR的抗原结合蛋白或包含特异性结合至人TfR的抗原结合蛋白的融合蛋白、抗体、其抗原结合片段或多特异性蛋白。

[0313] 鉴于如本文所提供的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域和包含此类抗原结合结构域的融合蛋白、抗体、其抗原结合片段和多特异性蛋白转运穿过血脑屏障的能力,它们可用于治疗神经系统疾病或病症。在一些方面中,治疗受试者的神经系统疾病或病症的方法包括向受试者施用特异性结合至人TfR的抗原结合蛋白或包含特异性结合至人TfR的抗原结合蛋白的融合蛋白、抗体、其抗原结合片段或多特异性蛋白。神经系统疾病或病症可为例如神经病变病症、神经退行性疾病、癌症、眼部疾病病症、癫痫发作、溶酶体贮积症、淀粉样变性、病毒或微生物疾病、缺血、行为障碍或CNS炎症。神经系统疾病或病症可为例如神经退行性疾病(诸如路易体病、脊髓灰质炎后综合征、Shy-Draeger综合征、橄榄体桥脑小脑萎缩、帕金森病、戈谢病、多系统萎缩、纹状体黑质变性、脊髓小脑性共济失调、脊髓性肌萎缩)、tau蛋白病(诸如阿尔茨海默氏病和核上神经麻痹症)、朊蛋白病(诸如牛海绵状脑病变、绵羊痒病、克雅氏综合征(Creutz-feldt-Jakob syndrome)、库鲁病(kuru)、格斯特曼-施特劳斯勒-沙因克病(Gerstmann-Straussler-Scheinker disease)、慢性消耗病和致死性家族性失眠症)、延髓麻痹、运动神经元疾病、神经系统异变性疾病(诸如Canavan病、亨廷顿病、神经元蜡样脂质褐质病、亚力山大氏病(Alexander's disease)、妥瑞综合征(Tourette's syndrome)、门克斯卷发综合征(Menkes kinky hair syndrome)、Cockayne氏综合征、哈勒沃登-斯帕茨综合征(Halervorden-Spatz syndrome)、拉福拉病(lafora disease)、雷特综合征(Rett syndrome)、肝豆状核变性、勒-奈二氏综合征(Lesch-Nyhan syndrome)和翁-伦二氏综合征(Unverricht-Lundborg syndrome))、痴呆(诸如皮克氏病和脊髓小脑性共济失调)、CNS和/或脑部的癌症(诸如神经胶质母细胞瘤或由身体其他部位的癌症引起的脑转移瘤)、阿尔茨海默氏病(AD)、中风、痴呆、肌营养不良(MD)、多发性硬化症(MS)、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)、边缘为主的年龄相关性TDP-43脑病(LATE)、囊性纤维化、安格曼氏综合征、利德尔综合征、帕金森氏病、皮克氏病、佩吉特氏病、癌症或创伤性脑损伤。在一些方面中,神经系统疾病或病症为痴呆。在一些方面中,神经系统疾病或病症为额颞叶痴呆。在一些方面中,神经系统疾病或病症为阿尔茨海默氏病。在一些方面中,神经系统疾病或病症为帕金森氏病。在一些方面中,神经系统疾病或病症为额颞叶癫痫。在一些实

施方案中,神经系统疾病或病症为自闭症。在一些方面中,神经系统疾病或病症为无脑回畸形。

[0314] 在一些方面中,本文提供了一种用本文所公开的融合蛋白治疗溶酶体贮积症的方法。在一些方面中,溶酶体贮积症选自戈谢病、蜡样脂质褐质病(巴顿病)、粘多糖贮积症(MPS)I型、MPS II型和MPS III型。

[0315] 如本文所提供的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域以及包含此类抗原结合结构域的融合蛋白、抗体、其抗原结合片段、和多特异性蛋白可用于检测抗原(例如,CNS抗原或脑抗原)。可标记用于所述目的的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域以及包含此类抗原结合结构域的融合蛋白、抗体、其抗原结合片段和多特异性蛋白。示例性标记包括例如放射性同位素(例如$^{64}$CU)和荧光标记。因此,提供了使用本文所述的特异性结合至人TfR的抗原结合蛋白或包含特异性结合至人TfR的抗原结合蛋白的融合蛋白、抗体、其抗原结合片段或多特异性蛋白来检测抗原的方法。在一些方面中,检测受试者的CNS(例如脑)中的抗原的方法包括向CNS(例如脑)中的抗原施用特异性结合至人TfR的抗原结合蛋白或包含特异性结合至人TfR的抗原结合蛋白的融合蛋白、抗体、其抗原结合片段或多特异性蛋白。此类方法可进一步包括例如对受试者进行正电子发射断层显像术(PET)成像。在一些方面中,本文公开了一种体外检测CNS抗原的方法,其包括使体外样品与本文提供的融合蛋白、抗体或其抗原结合片段、或多特异性蛋白接触和将显像剂定位在所述样品内。

[0316] 如本文所提供的特异性结合至人TfR的抗原结合结构域以及包含此类抗原结合结构域的融合蛋白、抗体、其抗原结合片段、和多特异性蛋白可用于预后、诊断、监测和/或筛选应用,包括本领域技术人员熟知和标准的并且基于本说明书的体内应用。在一些方面中,本文提供了一种特异性结合至人TfR的抗原结合蛋白或包含特异性结合至人TfR的抗原结合蛋白的融合蛋白、抗体、其抗原结合片段或多特异性蛋白,其用作诊断剂。在一些方面中,特异性结合至人TfR的抗原结合蛋白或包含特异性结合至人TfR的抗原结合蛋白的融合蛋白、抗体、其抗原结合片段或多特异性蛋白包含可检测标记。

[0317] 本文中所引用的所有参考文献,包括专利申请和公布,均以引用的方式整体并入本文中。

[0318] 通过参考以下实施例,将更充分地理解本公开。然而,其不应被视为限制本公开的范围。本公开通篇的所有引用特此明确地以引用的方式并入。

[0319] 实施例

[0320] 实施例1:转铁蛋白受体(TfR)的Avi-His标记变体的产生

[0321] 通过将基于cDNA的合成基因克隆至哺乳动物表达载体中,随后在Expi293细胞中瞬时转染和表达,进行转铁蛋白受体抗原(SEQ ID NO:1-7)的人、食蟹猴(cynomolgus macaque,cyno)和小鼠变体的哺乳动物表达。构建体包含异源信号肽和C端Avi-His标签,以便进行纯化和生物素化。简言之,根据制造商说明书,使用Expifectamine 293转染试剂盒(ThermoFisher A14524)转染编码抗原的质粒。转染后五天,收获培养物上清液,通过离心澄清,并使用HisPur Ni-NTA树脂(Thermo Scientific 88223)以滴注柱(drip-column)形式纯化。使用0.2um过滤装置过滤200mL培养物上清液,并将3mL在PBS中的树脂浆料添加至过滤的上清液中。将样品在4℃下在摇动下孵育过夜,并且次日将珠粒加载至20mL滴注柱上,用10mL His-Select洗涤缓冲液(Millipore Sigma H5288)洗涤,并用5mL His-Pur洗脱

缓冲液(Millipore Sigma H5413)洗脱。使用Amicon Ultra-15离心过滤装置(Millipore UFC9010)将洗脱液缓冲液更换为PBS。通过使用Nanodrop 8000(ThermoFisher)测量280nm处的吸光度来量化抗体浓度。通过SDS-PAGE测定抗原纯度。使用体积排阻色谱(SEC)分析抗原的聚集情况。根据制造商说明书,使用BirA生物素-蛋白连接酶试剂盒(AVIDITY)对一些抗原进行生物素化。

[0322] TfR的顶端结构域为病毒(Helguera,G.,等人,Virology 86(7):4024-4028(April 2012))和抗体(Kariolis M.,等人,Sci.Transl.Med.12(545):eaay1359(May 2020))进入内皮细胞提供途径,而不干扰受体的天然功能。生成Tfr的顶端结构域的标记变体。这些构建体包含全长人TfR序列的氨基酸69-263,具有C端Avi-His标签(SEQ ID NO:4)或C端myc-V5-His标签(SEQ ID NO:5)(下表4中的序列)。所得克隆在Expi293细胞中表达,并如上所述通过HisPur Ni-NTA树脂纯化。

[0323] 编码人TfR(huTfR)和食蟹猴TfR(cynoTfR)顶端结构域和N端His/Avi标签的排列形式的DNA片段从GeneArt订购并克隆至pcDNA 3.4载体(SEQ ID NO:6和7)中。所得克隆在Expi293细胞中表达,并使用制造商方案,通过Ni-NTA琼脂糖(QIAGEN 30230)进行纯化。

[0324] 表4.Avi-His标记的TfR变体

[0325]

| SEQ ID NO | 描述 | 序列 |
|---|---|---|
| 1 | huTfR 胞外结构域 (ECD) Avi-His | CKGVEPKTECERLAGTESPVREEPGEDFPAARRLYWDDLK RKLSEKLDSTDFTGTIKLLNENSYVPREAGSQKDENLALYV ENQFREFKLSKVWRDQHFVKIQVKDSAQNSVIIVDKNGRL VYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDFEDLYT PVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPI VNAELSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSRSSGLPNI PVQTISRAAAEKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCRMVTSESKN VKLTVSNVLKEIKILNIFGVIKGFVEPDHYVVVGAQRDAWG PGAAKSGVGTALLLKLAQMFSDMVLKDGFQPSRSIIFASWS AGDFGSVGATEWLEGYLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNF KVSASPLLYTLIEKTMQNVKHPVTGQFLYQDSNWASKDTD YPYLGTTMDTYKELIERIPELNKVARAAAEVAGQFVIKLTH DVELNLDYERYNSQLLSFVRDLNQYRADIKEMGLSLQWLY SARGDFFRATSRLTTDFGNAEKTDRFVMKKLNDRVMRVE YHFLSPYVSPKESPFRHVFWGSGSHTLPALLENLKLRKQNN GAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVWDIDNEFGGG LNDIFEAQKIEWHEHHHHHHHHH |
| 2 | 食蟹猴 TfR ECD Avi-His | CKGVEPKTECERLAGTESPAREEPEEDFPAAPRLYWDDLKR KLSEKLDTTDFTSTIKLLNENLYVPREAGSQKDENLALYIEN QFREFKLSKVWRDQHFVKIQVKDSAQNSVIIVDKNGGLVY LVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDFEDLDSPV NGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVK ADLSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSQSSGLPNIPV QTISRAAAEKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCKMVTSENKSVK LTVSNVLKETKILNIFGVIKGFVEPDHYVVVGAQRDAWGP GAAKSSVGTALLLKLAQMFSDMVLKDGFQPSRSIIFASWSA GDFGSVGATEWLEGYLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFK VSASPLLYTLIEKTMQDVKHPVTGRSLYQDSNWASKVEKL TLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKEL VERIPELNKVARAAAEVAGQFVIKLTHDTELNLDYERYNS QLLLFLRDLNQYRADVKEMGLSLQWLYSARGDFFRATSRL TTDFRNAEKRDKFVMKKLNDRVMRVEYYFLSPYVSPKESP FRHVFWGSGSHTLSALLESLKLRRQNNSAFNETLFRNQLAL ATWTIQGAANALSGDVWDIDNEFGGGLNDIFEAQKIEWHE HHHHHHHHH |
| 3 | 小鼠 TfR (muTfR) ECD Avi-His | CKRVEQKEECVKLAETEETDKSETMETEDVPTSSRLYWAD LKTLLSEKLNSIEFADTIKQLSQNTYTPREAGSQKDESLAYY IENQFHEFKFSKVWRDEHYVKIQVKSSIGQNMVTIVQSNGN LDPVESPEGYVAFSKPTEVSGKLVHANFGTKKDFEELSYSV NGSLVIVRAGEITFAEKVANAQSFNAIGVLIYMDKNKFPVV EADLALFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSQSSGLPNIP VQTISRAAAEKLFGKMEGSCPARWNIDSSCKLELSQNQNV KLIVKNVLKERRILNIFGVIKGYEEPDRYVVVGAQRDALGA GVAAKSSVGTGLLLKLAQVFSDMISKDGFRPSRSIIFASWT |

[0326]

| | | |
|---|---|---|
| | | AGDFGAVGATEWLEGYLSSLHLKAFTYINLDKVVLGTSNF KVSASPLLYTLMGKIMQDVKHPVDGKSLYRDSNWISKVEK LSFDNAAYPFLAYSGIPAVSFCFCEDADYPYLGTRLDTYEA LTQKVPQLNQMVRTAAEVAGQLIIKLTHDVELNLDYEMYN SKLLSFMKDLNQFKTDIRDMGLSLQWLYSARGDYFRATSR LTTDFHNAEKTNRFVMREINDRIMKVEYHFLSPYVSPRESP FRHIFWGSGSHTLSALVENLKLRQKNITAFNETLFRNQLAL ATWTIQGVANALSGDIWNIDNEFGGGLNDIFEAQKIEWHE HHHHHHHHH |
| 4 | huTfR 顶端结构域-Avi-His | KIQVKDSAQNSVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATV TGKLVHANFGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVA NAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVNAELSFFGHAHLGTGDPYT PGFPSFNHTQFPPSRSSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGNMEGD CPSDWKTDSTCRMVTSESKNVKLTVSNVLKEGGGLNDIFE AQKIEWHEHHHHHHHHHH |
| 5 | huTfR 顶端结构域-myc-V5-His | KIQVKDSAQNSVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATV TGKLVHANFGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVA NAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVNAELSFFGHAHLGTGDPYT PGFPSFNHTQFPPSRSSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGNMEGD CPSDWKTDSTCRMVTSESKNVKLTVSNVLKERAAAGSGSE QKLISEEDLGKPIPNPLLGLDSTHHHHHHHHHH |
| 6 | HuTfR 顶端排列的 N 端 Avi-His | HHHHHHHHGLNDIFEAQKIEWHESSGLPNIPVQTISRAAAE KLFGNMEGDCPSDWKTDSTCRMVTSESKNVKLTVSNDSA QNSVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHAN FGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIG VLIYMDQTKFPIVNAELS |
| 7 | 食蟹猴 TfR 顶端排列的 N 端 Avi-His | HHHHHHHHHHGLNDIFEAQKIEWHESSGLPNIPVQTISRAA AEKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCKMVTSENKSVKLTVSND SAQNSVIIVDKNGGLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVH ANFGTKKDFEDLDSPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLN AIGVLIYMDQTKFPIVKADLS |

[0327] 实施例2:过表达TfR的CHO细胞系的产生

[0328] 生成几种细胞系用于筛选如本文所述获得的抗TfR抗体的结合。简言之,使用各自表达全长人TfR和小鼠TfR(分别为SEQ ID NO:8和9)的pLenti-EF1a构建体来生成稳定表达人TfR和小鼠TfR的CHO细胞。使用慢病毒构建体(Genecopoeia)表达具有潮霉素选择的人TfR和具有潮霉素选择的小鼠TfR。使用ViraSafe™慢病毒包装系统(CellBiolabs VPK-206)由293T细胞的转染生成慢病毒。随后,使用含有慢病毒的上清液转导中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。转导后2天,将嘌呤霉素或潮霉素添加至培养基中作为人TfR和小鼠TfR的选择压力。通过流式细胞术分析稳定表达人TfR和小鼠TfR的所得CHO细胞的细胞表面表达。

[0329] 表5.全长TfR序列

[0330]

| SEQ ID NO | 描述 | 序列 |
|---|---|---|
| 8 | 全长人TfR | MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNSHVEM<br>KLAVDEEENADNNTKANVTKPKRCSGSICYGTIAVIVFFL<br>IGFMIGYLGYCKGVEPKTECERLAGTESPVREEPGEDFPA<br>ARRLYWDDLKRKLSEKLDSTDFTGTIKLLNENSYVPREA<br>GSQKDENLALYVENQFREFKLSKVWRDQHFVKIQVKDS<br>AQNSVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLV<br>HANFGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAES<br>LNAIGVLIYMDQTKFPIVNAELSFFGHAHLGTGDPYTPGF<br>PSFNHTQFPPSRSSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGNMEGDCP<br>SDWKTDSTCRMVTSESKNVKLTVSNVLKEIKILNIFGVIK<br>GFVEPDHYVVVGAQRDAWGPGAAKSGVGTALLLKLAQ<br>MFSDMVLKDGFQPSRSIIFASWSAGDFGSVGATEWLEGY<br>LSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTM<br>QNVKHPVTGQFLYQDSNWASKVEKLTLDNAAFPFLAYS<br>GIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELIERIPELNKVAR<br>AAAEVAGQFVIKLTHDVELNLDYERYNSQLLSFVRDLNQ<br>YRADIKEMGLSLQWLYSARGDFFRATSRLTTDFGNAEKT<br>DRFVMKKLNDRVMRVEYHFLSPYVSPKESPFRHVFWGS<br>GSHTLPALLENLKLRKQNNGAFNETLFRNQLALATWTIQ<br>GAANALSGDVWDIDNEF |
| 9 | 全长小鼠TfR | MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNSHVEM<br>KLAADEEENADNNMKASVRKPKRFNGRLCFAAIALVIFF<br>LIGFMSGYLGYCKRVEQKEECVKLAETEETDKSETMETE<br>DVPTSSRLYWADLKTLLSEKLNSIEFADTIKQLSQNTYTP<br>REAGSQKDESLAYYIENQFHEFKFSKVWRDEHYVKIQVK<br>SSIGQNMVTIVQSNGNLDPVESPEGYVAFSKPTEVSGKLV<br>HANFGTKKDFEELSYSVNGSLVIVRAGEITFAEKVANAQS<br>FNAIGVLIYMDKNKFPVVEADLALFGHAHLGTGDPYTPG<br>FPSFNHTQFPPSQSSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGKMEGSC<br>PARWNIDSSCKLELSQNQNVKLIVKNVLKERRILNIFGVIK<br>GYEEPDRYVVVGAQRDALGAGVAAKSSVGTGLLLKLAQ<br>VFSDMISKDGFRPSRSIIFASWTAGDFGAVGATEWLEGYL<br>SSLHLKAFTYINLDKVVLGTSNFKVSASPLLYTLMGKIMQ<br>DVKHPVDGKSLYRDSNWISKVEKLSFDNAAYPFLAYSGI<br>PAVSFCFCEDADYPYLGTRLDTYEALTQKVPQLNQMVRT<br>AAEVAGQLIIKLTHDVELNLDYEMYNSKLLSFMKDLNQF<br>KTDIRDMGLSLQWLYSARGDYFRATSRLTTDFHNAEKTN<br>RFVMREINDRIMKVEYHFLSPYVSPRESPFRHIFWGSGSH |

[0331]

| | | |
|---|---|---|
| | | TLSALVENLKLRQKNITAFNETLFRNQLALATWTIQGVA<br>NALSGDIWNIDNEF |

[0332] 实施例3:TfR人源化小鼠的生成

[0333] 小鼠品系在Taconic Biosciences GmbH(Germany)处生成,用于使TfR的胞外结构域人源化。使用CRISPR用人版本替代小鼠ECD,同时在小鼠启动子的控制下保留小鼠胞内和跨膜部分。通过IHC和/或蛋白质印迹评价来自这些小鼠的脑切片,以确认人ECD在体内的表达和定位(数据未示出)。

[0334] 实施例4:抗TfR杂交瘤抗体的生成

[0335] 为了获得针对TfR的抗体,使用以下程序来生成杂交瘤。每周两次通过皮下或腹膜内注射具有或不具有佐剂的人、食蟹猴和/或小鼠TfR的纯化的胞外结构域多肽(如以上实施例1中所述而获得)来使BALB/c小鼠或Sprague Dawley大鼠(Charles River Laboratories,Wilmington,MA)免疫。在总共7-8次注射后以及最后一次加强后三天,从小鼠或大鼠收获淋巴结以用于杂交瘤细胞系生成。

[0336] 通过在过表达人或小鼠TfR的CHO细胞上进行FACS并通过针对人、食蟹猴和小鼠TfR Avi-His蛋白的ELISA来分析来自动物的血清对TfR的反应性(实施例1)。分离出血清与过表达人或小鼠TfR的CHO细胞表达出强结合的动物的淋巴细胞,并将其与SP2/mIL-6(CRL-2016,American Type Culture Collection,Rockville,MD)或Sp2ab(ENZ-70008,Enzo Life Sciences,Farmingdale,NY)小鼠骨髓瘤细胞经由电融合(Hybrimune,BTX,Holliston,MA)来融合,并在37℃、5%CO2下在Clonacell-HY培养基C(Stemcell Technologies,Vancouver,BC,Canada,目录号03803)中孵育过夜。

[0337] 次日,将融合细胞离心并再悬浮于含有HAT(Sigma Aldrich,目录号H0262)的Clonacell-HY培养基E(Stemcell Technologies,目录号03805)中。将细胞接种至T225烧瓶中并在37℃、5%CO2下生长7天,然后冷冻保存杂交瘤文库。随后将文库解冻并在Clonacell-HY培养基E中恢复过夜。次日,使用FACS Aria II细胞分选仪(BD Biosciences,San Jose,CA)将IgG阳性杂交瘤单细胞分选至Falcon 96孔U形底板中。从小鼠融合物中分选出768个杂交瘤,并且从大鼠融合物中分选出768个杂交瘤。使细胞在200ul Clonacell-HY培养基E中在37℃、5%CO2下生长11天后,通过FACS在过表达人或小鼠TfR的CHO细胞上筛选来自每个孔的组织培养物上清液(如下所述)。

[0338] 实施例5:通过FACS筛选抗TfR抗体杂交瘤上清液

[0339] 最初通过FACS筛选总共1536份抗TfR杂交瘤上清液,以确定其与CHO亲代细胞相比同过表达人或小鼠TfR细胞的CHO细胞差异结合的能力。收获过表达细胞,将其洗涤并用Pacific Blue、FITC和Pacific Orange染料(ThermoFisher)标记,以创建独特的条形码细胞群。将条形码细胞(每个细胞群5x$10^4$个)等分到96孔U形底板中,并将其与50μl杂交瘤细胞培养物上清液或1μg/ml市售纯化的小鼠抗人TfR单克隆抗体(Sigma Aldrich,目录号SAB4700515)和大鼠抗小鼠TfR抗体(Invitrogen,Waltham,MA,目录号R17217)一起在冰上孵育30分钟。在此初级孵育后,经由离心去除上清液,将细胞用175μl冰冷的FACS缓冲液(PBS+1%FBS+2mM EDTA)洗涤两次,并且然后将细胞在冰上用抗小鼠IgG Fc-异藻蓝蛋白(APC)或抗大鼠IgG Fc-APC(Jackson Labs,分别为目录号115-136-071和目录号112-136-071)(1:1000稀释)进一步孵育20分钟。在此二级抗体孵育后,将细胞再次用冰冷的FACS缓冲液洗涤两次并再悬浮于最终体积为50μl的FACS缓冲液中。使用FACS Canto系统(BD Biosciences)分析细胞上的结合强度,并针对所测试的每个抗TfR杂交瘤上清液,测定每个条形码细胞群上的APC平均荧光强度(MFI)比率。

[0340] 与同种型对照相比,总共189个小鼠杂交瘤和115个大鼠杂交瘤克隆同稳定过表达人TfR的CHO细胞的结合(如通过MFI所测定)显示出大于3倍的差异。与同种型对照相比,总共15个大鼠杂交瘤同稳定过表达小鼠TfR的CHO细胞显示出大于2倍的结合差异(数据未示出)。通过FACS发现,没有一个杂交瘤克隆与人和小鼠TfR发生交叉反应。

[0341] 表6.所选小鼠杂交瘤上清液的FACS结果(示出为相对于CHO亲代的倍数)

[0342]

| | 相对于亲代(CHO WT)的倍数 | |
|---|---|---|
| 抗体 | CHO + huTfR | CHO + muTfR |
| TfR1 | 228 | 1 |
| TfR2 | 458 | 1 |
| TfR3 | 38 | 1 |
| TfR4 | 61 | 1 |
| TfR5 | 561 | 1 |
| TfR6 | 451 | 1 |
| TfR7 | 87 | 1 |
| TfR8 | 215 | 1 |
| TfR9 | 203 | 1 |
| TfR10 | 389 | 1 |
| TfR11 | 290 | 1 |
| TfR13 | 392 | 1 |
| TfR14 | 6 | 1 |
| TfR15 | 119 | 1 |
| TfR16 | 534 | 1 |
| TfR17 | 73 | 1 |
| TfR18 | 75 | 1 |
| TfR22 | 290 | 1 |
| TfR23 | 279 | 1 |
| TfR24 | 370 | 1 |
| TfR25 | 135 | 1 |
| TfR26 | 285 | 1 |
| TfR27 | 279 | 1 |
| TfR28 | 157 | 1 |
| TfR30 | 169 | 1 |
| TfR31 | 90 | 1 |
| TfR32 | 137 | 1 |

[0343] 表7.所选大鼠杂交瘤上清液的FACS结果(示出为相对于CHO亲代的倍数)

[0344]

| | 相对于亲代(CHO WT)的倍数 | |
|---|---|---|
| 抗体 | CHO + huTfR | CHO + muTfR |
| TfR33 | 123 | 1 |
| TfR34 | 84 | 1 |

[0345]

| | | |
|---|---|---|
| TfR35 | 306 | 1 |
| TfR36 | 433 | 1 |
| TfR37 | 290 | 1 |
| TfR38 | 439 | 1 |
| TfR39 | 245 | 1 |
| TfR40 | 65 | 1 |
| TfR41 | 92 | 1 |
| TfR42 | 369 | 1 |
| TfR43 | 231 | 1 |
| TfR44 | 84 | 1 |
| TfR45 | 550 | 1 |
| TfR46 | 370 | 1 |
| TfR47 | 442 | 1 |
| TfR48 | 96 | 1 |
| TfR49 | 297 | 1 |
| TfR50 | 322 | 1 |
| TfR51 | 86 | 1 |
| TfR52 | 466 | 1 |
| TfR53 | 167 | 1 |
| TfR54 | 646 | 1 |

[0346] 实施例6:通过重组TfR蛋白结合测定筛选抗TfR抗体杂交瘤上清液

[0347] 将来自如上文所述获得的319个杂交瘤的杂交瘤培养物上清液针对其与同不相关的Avi-His标记的对照蛋白的结合相比结合Avi-His标记的huTfR ECD、huTfR顶端结构域和muTfR ECD(如实施例1中所述)的能力进行筛选。简言之,将96孔聚苯乙烯板用含5μg/ml链霉亲和素(Thermo Fisher,目录号PI21125)的包被缓冲液(0.05M碳酸盐缓冲液,pH 9.6,Sigma,目录号C3041)在4℃下包被过夜。然后用ELISA稀释剂(PBS+0.5%BSA+0.05%Tween20)封闭包被的板持续一小时。去除封闭缓冲液,并将Avi-His标记的人TfR、人TfR顶端结构域、小鼠TfR和不相关Avi-His标记蛋白以1μg/ml添加至ELISA稀释剂中,并在室温下捕获1小时。用300μl的PBST(PBS+0.05%Tween20,Thermo 28352)洗涤三次后,将杂交瘤细胞培养物上清液(50μl/孔)添加至每个孔中。在室温下孵育30min后,将所述板用300μl PBST洗涤三次。将抗小鼠IgG Fc-HRP或抗大鼠IgG Fc-HRP(Jackson Immunoresearch,目录号分别为115-035-071和112-036-071)二级抗体以1:5000稀释于ELISA稀释剂中,以50μl/孔添加至每个孔中,并且在室温下在摇动下孵育30分钟。在最后一组洗涤(PBST中3×300μl)后,将50μl/孔的BioFx TMB底物(Surmodics,目录号TMBW-1000-01)添加至孔中。5-10分钟后,用50μl/孔的2N硫酸淬灭反应。使用SoftMax Pro软件在SpectraMax M5(Molecular Devices,Sunnyvale,CA)上读取板在450nm处的吸光度。

[0348] 根据此杂交瘤上清液筛选,鉴定出总计112种抗TfR杂交瘤克隆,与背景相比,所述克隆与重组huTfR Avi-His的结合展示大于5倍的差异,并且这些抗TfR杂交瘤克隆中的86种也结合至huTfR顶端结构域。所选小鼠抗TfR杂交瘤克隆和大鼠抗TfR杂交瘤克隆的结合数据(示出为同重组huTfR Avi-His的结合相对于不相关蛋白的比率)分别示于表8和9中。

[0349] 表8:所选小鼠杂交瘤上清液的ELISA(OD450)结果(示出为相对于不相关蛋白的倍数)

[0350]

| | 相对于不相关蛋白的比率 | |
|---|---|---|
| 抗体 | huTfR 顶端 Avi-His | huTfR Avi-His |
| TfR1 | 22 | 9 |
| TfR2 | 5 | 1 |
| TfR3 | 37 | 14 |
| TfR4 | 42 | 20 |
| TfR5 | 15 | 12 |
| TfR6 | 37 | 17 |
| TfR7 | 48 | 25 |
| TfR8 | 37 | 16 |
| TfR9 | 10 | 5 |
| TfR10 | 35 | 14 |
| TfR11 | 39 | 25 |
| TfR13 | 22 | 7 |
| TfR14 | 29 | 19 |
| TfR15 | 34 | 21 |
| TfR16 | 18 | 16 |
| TfR17 | 26 | 22 |
| TfR18 | 32 | 21 |
| TfR22 | 33 | 24 |
| TfR23 | 31 | 24 |
| TfR24 | 31 | 17 |
| TfR25 | 33 | 21 |

[0351]

| | | |
|---|---|---|
| TfR26 | 35 | 22 |
| TfR27 | 34 | 22 |
| TfR28 | 30 | 22 |
| TfR30 | 29 | 8 |
| TfR31 | 20 | 17 |
| TfR32 | 25 | 13 |

[0352] 表9:所选大鼠杂交瘤上清液的ELISA(OD450)结果(示出为相对于不相关蛋白的倍数)

[0353]

| | 相对于不相关蛋白的倍数 | |
|---|---|---|
| 抗体 | huTfR 顶端 Avi-His | huTfR Avi-His |
| TfR33 | 23 | 9 |
| TfR34 | 6 | 9 |
| TfR35 | 23 | 29 |
| TfR36 | 22 | 30 |
| TfR37 | 8 | 4 |
| TfR38 | 32 | 31 |
| TfR39 | 22 | 17 |
| TfR40 | 19 | 11 |
| TfR41 | 17 | 8 |
| TfR42 | 25 | 19 |
| TfR43 | 31 | 24 |
| TfR44 | 16 | 10 |
| TfR45 | 34 | 29 |
| TfR46 | 17 | 5 |
| TfR47 | 5 | 7 |
| TfR48 | 9 | 17 |
| TfR49 | 20 | 22 |
| TfR50 | 13 | 7 |
| TfR51 | 23 | 19 |
| TfR52 | 26 | 8 |
| TfR53 | 26 | 12 |
| TfR54 | 23 | 11 |

[0354] 实施例7:抗TfR抗体体外内化至血脑屏障内皮细胞系中

[0355] 对抗TfR杂交瘤抗体进行纯化并针对其内化至hCMEC/D3细胞系中的能力进行筛选。

[0356] 使用ProPlus Phytip柱(Biotage,Uppsala,Sweden,目录号PTH 91-20-07)在Hamilton STAR平台(Hamilton Company,Reno,NV)上纯化来自抗TfR杂交瘤克隆的上清液。简言之,将来自上清液的抗体由树脂填充吸头上偶联的蛋白A捕获,用PBS洗涤两次,用Pierce IgG洗脱缓冲液(ThermoFisher,目录号21004)洗脱,并用1M Tris-HCl pH 8中和至6.0的最终pH值。通过使用Nanodrop 8000(ThermoFisher)测量280nm处的吸光度来确定纯化抗体的浓度。然后测试杂交瘤纯化抗体的内化能力。

[0357] 在血脑屏障处向内皮细胞中的内化为跨BBB进入脑中的转胞吞作用的第一阶段。为了鉴定具有内化能力的抗TfR抗体,将HCMEC/D3细胞以2.5*10^4个细胞/孔接种于黑壁透明底96孔板(#3904,Corning)中。第二天,用100μl培养基(EBM2,Lonza)中6μg/ml与等浓度的pHrodo-Red标记试剂(Z25612,Invitrogen)预缀合的抗TfR抗体处理细胞。人IgG同种型和具有已知内化能力的抗TfR抗体分别作为阴性和阳性对照包括在测定中。

[0358] 然后将板置于IncuCyte机器(活细胞分析系统)中,并在24小时的时间过程中每2小时捕获一次图像。然后使用IncuCyte软件处理并分析图像。24小时时间点的内化数据(pHrodo Red阳性面积$\mu m^2$/图像)作为同种型hIgG1的相对倍数变化,总结于下表10中。

[0359] 数据以每孔的总红色面积报告,并作为相对于用作阴性对照的不相关小鼠IgG抗体的倍数变化显示在表10中。此测定中还包括用作阳性对照的抗TfR抗体。

[0360] 表10:纯化的抗TfR杂交瘤抗体的内化

[0361]

| 抗体 | 相对于同种型对照的倍数 |
|---|---|
| TfR1 | 25.0 |
| TfR2 | 18.0 |
| TfR3 | 7.2 |
| TfR4 | 47.1 |
| TfR5 | 72.3 |
| TfR6 | 76.8 |
| TfR7 | 6.2 |
| TfR8 | 7.9 |
| TfR9 | 26.2 |
| TfR10 | 11.9 |

[0362]

| | |
|---|---|
| TfR11 | 2.0 |
| TfR13 | 22.5 |
| TfR14 | 14.2 |
| TfR15 | 1.2 |
| TfR16 | 2.2 |
| TfR17 | 7.6 |
| TfR18 | 1.2 |
| TfR22 | 1.9 |
| TfR23 | 1.6 |
| TfR24 | 9.9 |
| TfR25 | 6.7 |
| TfR26 | 8.6 |
| TfR27 | 1.4 |
| TfR28 | 3.2 |
| TfR30 | 714.7 |
| TfR31 | 2.5 |
| TfR32 | 10.2 |
| 抗 TfR 阳性对照 | 16.7 |
| 同种型对照 | 1.0 |

[0363] 实施例8:抗TfR抗体的分子克隆

[0364] 如下克隆来自上述杂交瘤的抗TfR抗体。收获1-2x$10^5$个杂交瘤细胞,用PBS洗涤,并再悬浮于200μl RNAlater(Invitrogen,目录号AM7021)中。将样品储存于-80℃下并送往Abterra Biosciences(San Diego,CA)进行测序。简言之,提取RNA并进行cDNA合成。使用专有引物以5'RACE策略扩增IgG/IgM、IgK和IgL的可变区。将杂交瘤可变区扩增子在Illumina MiSeq平台(Illumina,San Diego,CA)上测序。通过Abterra的Reptor分析流程处理来自杂交瘤的读数。

[0365] 在72个顶端结构域阳性抗TfR杂交瘤克隆中,总共鉴定出32个独特序列。小鼠来源的独特顶端结构域结合抗TfR抗体的可变重链和可变轻链的氨基酸序列提供于下表11中。在来自大鼠的24个顶端结构域阳性抗TfR杂交瘤克隆中,鉴定出另外21个独特序列。

[0366] 表11:来自小鼠杂交瘤的抗huTfR顶端结构域抗体序列

[0367]

| 抗体 | VH 序列 | VL 序列 |
| --- | --- | --- |
| TfR1 | QVQLQQSGPELVKPGASVK<br>MSCKASGYTFTNYYIHWV | DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMRCK<br>SSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPG |

[0368]

| | | |
|---|---|---|
| | KQRPGQGLEWIGWIYPGDG STKYNEKFKGKTTLTADKS SSTAYMLLSSLTSEDSAIYF CARDGSSAPKFTYWGQGTL VTVSA (SEQ ID NO:10) | QPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGS GSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQ NDYSYPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:11) |
| TfR2 | EVQLQQSGPELVKPGASVK ISCKASGYTFTDYNMHWV KQSHGKSLEWIGYIYPYNG GTGYNQKFKSKATLTVDNS SSTAYMELRSLTSEDSAVY YCATLYDGYYFDYWGQGT TLTVSS (SEQ ID NO:12) | DILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRAS QSIGTSIHWYQQRTNGSPRLLIKYA SESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINN VESEDIADYYCQQSNSWPFTFGSG TKLEIK (SEQ ID NO:13) |
| TfR3 | QVQLRQSGPELVKPGASVR ISCKASGYTFTSFYIHWVKQ RPGQGLEWIGWIYPGDVNT HYSDKFKGKATLTADKSSS TAYMQLSSLTSEDSAVYFC AREGYGYFAYWGQGTLVT VSA (SEQ ID NO:14) | DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCK SSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPG QPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGV GSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQ NDYSYPLTFGSGTKLELK (SEQ ID NO:15) |
| TfR4 | QVQLQQSGAELVRPGTSVK VSCKASGYAFTNYLIEWVK QRPGQGLEWIGVINPGSGG TTYNEKFKGKATLTADKSS STAYMQLSGLTSDDSAVYF CARRSPYFDYWGQGTTLTV SS (SEQ ID NO:16) | SIVMTQTPKFLLVSAGDRVTITCK ASQSVSNDVAWYQQKPGQSPKLLI YYASNRYTGVPDRFTGSGYGTDFT FTISTVQAEDLAVYFCHQDYISPTF GGGTKLEIK (SEQ ID NO:17) |
| TfR5 | QVQLQQSGPELVKPGASVK MSCKASGYTFTNYYIHWV KQRPGQGLEWIGWIYPGDG NTNYNEKFKGKTTLTADKS SSTAYMLLSSLTSEDSAIYF CARDGSSAPKFTYWGQGTL VTVSA (SEQ ID NO:18) | DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMRCK SSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPG QPPKLLFYWASTRESGVPDRFTGS GSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQ NDYSYPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:19) |
| TfR6 | DVQLVESGGGLVQPGGSRK LSCAASGFTFSSFGMHWVR QAPEKGLEWVAYISSGSSAI YYADTVKGRFTVSRDNPKN TLFLQMTSLRSEDTAIYYCA TSYVYDPPWFAYWGQGTL VTVSA (SEQ ID NO:20) | DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCK ASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLL IYWASTRPTGVPDRFTGSGSGTDY TLTISSVQAEDLALYSCQQHFSTP WTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:21) |
| TfR7 | DVQLQESGPGLVKPSQSLSL TCTVTGYSITSDYAWNWLR QFPGNKLEWMGYISYSGYS RHNPSLKSRISITRDTSKNQF | DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC KASQNVLTNVAWYQQKPGHSPKA LIYSSSSRNSGVPDRFTGSGSGTDF TLTISNVQSEDLAEYFCQQYNTYP |

[0369]

| | | |
|---|---|---|
| | FLQLNSVTSEDTATYYCAR GDWDFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:22) | YTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:23) |
| TfR8 | QVQLQQSGAELVRPGTSVK VSCKASGYAFTNYLIEWVK QRPGQGLEWIGVINPGSGG TNYNEKFKGKATLTADKSS STAYMQLSSLTSDDSAVYF CARRSPYFDYWGQGTTLTV SS (SEQ ID NO:24) | SIVMTQTPKFLLVSAGDRVTITCK ASQSVSNDVAWYQQKPGQSPKLLI YYASNRYTGVPDRFTGSGYGTDFT FTISTVQAEDLAVYFCHQDYISPTF GGGTKLEIK (SEQ ID NO:25) |
| TfR9 | EVQLQQSGPELVKPGASVK ISCKTSGYTFTEYAMHWVK QSHGKSLEWIGGINPNDGG TSYNQKFKGKATLTVDKSS STAYMELRSLTSEDSAVYY CSSQRWLLRGGDYWGQGT TLTVSS (SEQ ID NO:26) | DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKS SQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSP KRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSG TDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGT HFPQTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:27) |
| TfR10 | QVQLQQSGPELVKPGASVK MSCKASGYTFTSYYIHWVK QRPGQGLEWIGWIYPGDGN TNYNEKFKGKTTLTADKSS STAYMLLSSLTSEDSAIYFC ARDGSIPFAYWGQGTLVTV SA (SEQ ID NO:28) | DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCK SSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPG QPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGS GSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQ NDYSYPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:29) |
| TfR11 | EVQLQQSGTVLARPGASVK MSCKASGYSFTSYWMHWV KQRPGQGLEWIGAIFPGNID TIYNQKFKDKAKLTAVTSA STAYMELSSLTNEDSAVYF CTRLYYDYVWGAGTTVTV SS (SEQ ID NO:30) | DIKMTQSPSSMYASLGERVTLTCK ASQDINSYLSWFQQKPGKSPKTLI YHVNRLVDGVPSRFSGSGSGQDYS LTISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPYT FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:31) |
| TfR12 | QVQLQQPGSELVRPGASVK LSCKASGYTFTSYWMHWV KQRPGQGLEWIGNIYPGSG SSNYDEKFKNKATLTVDTS SNTAYMQLSSLTSEDSAVY YCTRSSYYGNFDTMDNWG QGTSVTVSS (SEQ ID NO:32) | QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCS ASSSIRYMNWYQQKPVTSPKRWIY DTSTLASGVPARFSGSGSGTSYSLT ISSMEAEDAATYYCHQRSSYPWTF GGGTKLEIK (SEQ ID NO:33) |
| TfR13 | DVKLVESGGGLVKPGGSLK LSCAASGFTFSSYTMSWVR QTPEKRLEWVATISSGGSYT YFPDSVKGRFTISRDNAKNT LYLQMSSLKSEDTAIYYCT RAHYYAYDYWGQGTTLTV SS | DILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRAS QSIGTSIHWYQQRTNGSPRLLIKYA SGSISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSV ESEDIADYYCQQSNSWPTSTFGAG TKLELK (SEQ ID NO:35) |

[0370]

| | | |
|---|---|---|
| | (SEQ ID NO:34) | |
| TfR14 | QVQLQQSGPELVKPGASVK ISCKASGYAFSSSWMNWVK QRPGQGLEWIGRIYPGDGD TNYNGKFKGKATLTADKSS STAYMQLSSLTSVDSAVYF CARDPIIDYYYYAMDYWG QGTSVTVSS (SEQ ID NO:36) | DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRA SESVDNYGISFMNWFQQKPGQPPK LLIYAASNQGSGVPARFSGSGSGT DFSLNIHPMEEDDTAMYFCQQSKE VPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:37) |
| TfR15 | QVQLQQPGSELVRPGASVK LSCKASGYTFTSYWMHWV KQRPGQGLEWIGNIYPGSG SSNYDEKFKSKATLTVDTSS STAYMQLNSLTSEDSAVYY CTRSSYYGNFDTMDNWGQ GTSVTVSS (SEQ ID NO:38) | QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCS ASSSIRYMNWYQQKPVTSPKRWIY DTSTLASGVPARFSGSGSGTSYSLT ISSMEAEDAATYYCHQRSSYPWTF GGGTKLEIK (SEQ ID NO:33) |
| TfR16 | EVQLQQSGTVLARPGASVK MSCKTSGYSFSSYWMHWV KQRPGQGLEWIGTIYPGNS DTIYNQNFKGKAKLTAVTS ASTAYMELSSLTNEDSAVY YCSTIYYFSNWGQGTTLTV SS (SEQ ID NO:40) | DIKMTQSPSPMFASLGERVTITCKA SQDINSYLSWFQQKPGKSPKTLIYR ANRLLDGVPSRFSGSGSGQDYSLTI SSLDYEDVGIYYCLQYDVFPYTFG GGTKLEIK (SEQ ID NO:41) |
| TfR17 | DVQLQESGPGLVKPSQSLSL TCTVTGYSITSDYAWNWIR QFPGNKLEWMGYISYSGST SYNPSLKSRISITRDTSKNQF FLQLNSVTTEDTATYYCAS WGYRYLEDYWGQGTSVTV SS (SEQ ID NO:42) | QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCS ASSSISSMHWYQQKPGTSPKRWIS DTSKLASGIPARFSGSGSGTSYSLTI SSMAAEDAAAYYCHQRSSYPWTF GGGTKLEIK (SEQ ID NO:43) |
| TfR18 | QVQLQQSGAELVRPGTSVK VSCKASGYAFTNYLIEWIK QRPGQGLEWIGVINPGNND TTYNEMFKAKTTLTADKSS NTAYMQLSSLTSDDSAVYF CARRSPYFDYWGQGTTLTV SS (SEQ ID NO:44) | SIVMTQTPKFLLVSAGDRVTITCK ASQSVSNDVAWYQQKPGQSPKLLI YYASNRYTGVPDRFTGSGYGTDFT FTISTVQAEDLAVYFCHQDYSSPTF GGGTKLEIK (SEQ ID NO:45) |
| TfR19 | QVQLQQPGSELVRPGASVK LSCKASGYTFTSYWTHWV KQRPGQGLEWIGNIYPGSG SSNYDEKFKSKATLTVDTSS STAYMQLSSLTSEDSAVYF CTRSSYYGNFDTMDNWGQ GTSVTVSS (SEQ ID NO:46) | QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCS ASSSIRYMNWYQQKPVTSPKRWIY DTSTLASGVPARFSGSGSGTSYSLT ISSMEAEDAATYYCHQRSSYPWTF GGGTKLEIK (SEQ ID NO:33) |
| TfR20 | DVQLQESGPGLVKPSQSLSL | DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRA |

[0371]

| | | |
|---|---|---|
| | TCTVTGYSITSDHAWNWIR QFPGNKLEWMGYISYSGSS SYNPSLKSRISITRDTSKNQF FLQLNSVTTEDTATYYCAR SGWGMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:48) | SEYINSYLAWYQQKQGKSPQLLVF KEKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSL KINSLQPEDFGSYYCQHHYGNPWT FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:49) |
| TfR21 | QVQLQQPGSELVRPGASVK LSCKASGYTFTSYWTHWV KQRPGQGLEWIGNIYPGSG SSNYDEKFKSKATLTVDTSS STAYMQLSSLTSEDSAVYF CTRSSYYGNFDTMDNWGQ GTSVTVSS (SEQ ID NO:50) | DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRA SEYINSYLAWYQQKQGKSPQLLVF KEKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSL KINSLQPEDFGSYYCQHHYGNPWT FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:51) |
| TfR22 | DVQLQESGPGLVKPSQSLSL TCTVTGYSITSDYAWNWIR QFPGNKLEWMGYISYSGST RYNPSLKSRISITRDTSKNQF FLQLNSVTTEDTATYYCTS WGYRYLEDYWGQGTSVTV SA (SEQ ID NO:52) | QIVLTQSPAIMSASPGERVTMTCSA SSSISSMHWYQQKPGTSPKKWIYD TSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTI SSMEAEDAATYYCHQRSSYPWTF GGGTKLEIK (SEQ ID NO:53) |
| TfR23 | DVQLQESGPGLVKPSQSLSL TCTVTGYSITSDYAWNWIR QFPGNKLEWMGYISYSGST SYNPSLKSRISITRDTSKNQF FLQLNSVTTEDTATYYCTS WGYRYLEDYWGQGTSVTV SS (SEQ ID NO:54) | QIVLTQSPAIMSASPGERVTMTCSA SSSISSLHWYQQKPGTSPKKWIYD TSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLAI SSMEAEDAATYYCHQRSSYPWTF GGGTKLEIK (SEQ ID NO:55) |
| TfR24 | QVQLQQSGPELVKPGTSVK MSCKASGYTFTSYYIHWVK QRPGQGLEWIGWIYPGDDN THYNENFKGKTTLTADKSS STAYMLLSSLTSEDSAIYFC ARDYYGRFAYWGQGTLVT VSA (SEQ ID NO:56) | DIVMTQSPSSLTVTAGERVTMSCK SSQSLLNSGNQKNYLTWFQQKPG QPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGS GSGTDFTVTISSVQAEDLAVYYCQ NDYGYPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:57) |
| TfR25 | QVQLQQSGPELVKPGTSVK MSCKASGYTFTNYYIHWM KQRPGQGLEWIGWIYPGDG NTHYNERFKGKTTLTADKS SSTVYMFLTSLTSEDSAIYF CAKDKDMPGMDYWGQGT SVTVSS (SEQ ID NO:58) | DMVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSC KSSQSLFNSENQKNYLTWYQQKP GQPPKLLISWASTRESGVPDRFTGS GSGTDFTLTINSVQAEDLAVYYCQ NDYSYPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:59) |
| TfR26 | QVQLHQSGPELVKPGASVK MSCKASGYTFTNYYIHWV KQRPGQGLEWIGWIYPGDG VTHYNEKFKGKTTLTADKS | DIVMTQSPSSLTVTSGEKVTMSCK SSQSLLNSENQKNYLTWYQQKPG QPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGS GSGPDFTLTISSVQAEDLAVYYCQ |

[0372]

| | | |
|---|---|---|
| | SSTAYMLLSSLTSEDSAIYF CARDKDVPGMDYWGQGTS VTVSS (SEQ ID NO:60) | NDYSYPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:61) |
| TfR27 | QVQLQQPGSELVRPGASVK LSCKASGYTFTSYWMHWV KQRPGQGLEWIGNIYPGTG STNYDEKFKSKATLTVDTS SSTAYMQLSSLTSEDSAVY YCTRSSYYGNFDTMDYWG QGTSVTVSS (SEQ ID NO:62) | QIFLTQSPAIMSASPGERVTMTCSA SSSIRYMNWYQQKPGTSPKRWIYD TSELASGVPARFTGSGSGTSYSLTI SSMEAEDAATYYCHQRSGYPWTF GGGTKLEIK (SEQ ID NO:63) |
| TfR28 | DVQLQESGPGLVKPSQSLSL TCTVTGYSITSDYAWNWIR QFPGNKLEWMGYISYSGST SYNPSLRSRISITRDTSKNQF FLQLNSVTTEDTATYYCAIR GYRYEEDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:64) | QIVLTQSPAIMSASPREKVTMTCSA SSSISSMHWYQQKPGTSPKRWIYD TSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTI SSMEAEDAATYYCHQRSSYPWTF GGGTKLEIK (SEQ ID NO:65) |
| TfR29 | QVQLQQSGPQLVRPGASVK ISCKASGYSFTNYWLHWVK QRPGQGLEWIGMIDPSDSET RLNQKFKDKATLTVDKSSS TAYMQLSSPTSEDSAVYYC ARWGGGYYGFAYWGQGT LVTVSA (SEQ ID NO:66) | QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCS ASSSISYMHWYQQKPGTSPKRWIY DTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLT ISSMEAEDAATYYCHQRSSYTFGG GTKLEIK (SEQ ID NO:67) |
| TfR30 | QVQLQQSGPQLVRPGASVK ISCKASGYSFTNYWLHWVK QRPGQGLEWIGMIDPSDSET RLNQKFKDKATLTVDKSSS TAYMQLSSPTSEDSAVYYC ARWGGGYYGFAYWGQGT LVTVSA (SEQ ID NO:68) | DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSITCK ASQNVRTAVAWYQQKPGQSPKAL IYLASNRHTGVPDRFTGSGSGTDF TLTISNVQSEDLADYFCLQHWNYP WTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:69) |
| TfR31 | DVQLQESGPGLVKPSQSLSL TCTVTGYSITSDYAWNWIR QFPGNKLEWMGYISYSGRT SYNPSLKSRISFTRDTSKNQ FFLQLNSVTTEDTATYYCA GWGYRYLEDYWGQGTSVT VSS (SEQ ID NO:70) | QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCS ASSSISSMHWYQLKPGTSPKKWIY DTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLT ISSMEAEDAATYYCHQRSSYPWTF GGGTKLEIK (SEQ ID NO:71) |
| TfR32 | QVQLQQSGADLVRPGTSVK VSCKASGNAFSNYLIEWVK QRPGQGLEWIGVINPGSGET NYNEKFKGKATLTADKSSS TAYMQLSSLTSDDSAVYFC AIRYDGPLLDHWGQGTSVT VSS | SIVMTQTPKFLLVSAGDRVTITCK ASQSVSNDVAWFQQKPGQSPKLLI YYASNRYTGVPDRFTGSGYGTDFT FTIRNVQAEDLAVYFCQQDYISPTF GAGTKLELK (SEQ ID NO:73) |

[0373]

| | | |
|---|---|---|
| | (SEQ ID NO:72) | |

[0374] 表12:来自小鼠杂交瘤的抗huTfR顶端结构域抗体序列(Kabat)

[0375]

| 抗体 | HVR*-H1 | HVR-H2 | HVR-H3 |
|---|---|---|---|
| TfR1 | NYYIH (SEQ ID NO:74) | WIYPGDGSTKY NEKFKG (SEQ ID NO:75) | DGSSAPKFTY (SEQ ID NO:76) |
| TfR2 | DYNMH (SEQ ID NO:77) | YIYPYNGGTGY NQKFKS (SEQ ID NO:78) | LYDGYYFDY (SEQ ID NO:79) |
| TfR3 | SFYIH (SEQ ID NO:80) | WIYPGDVNTHY SDKFKG (SEQ ID NO:81) | EGYGYFAY (SEQ ID NO:82) |
| TfR4 | NYLIE (SEQ ID NO:83) | VINPGSGGTTY NEKFKG (SEQ ID NO:84) | RSPYFDY (SEQ ID NO:85) |
| TfR5 | NYYIH (SEQ ID NO:74) | WIYPGDGNTNY NEKFKG (SEQ ID NO:86) | DGSSAPKFTY (SEQ ID NO:76) |
| TfR6 | SFGMH (SEQ ID NO:87) | YISSGSSAIYYA DTVKG (SEQ ID NO:88) | SYVYDPPWFAY (SEQ ID NO:89) |
| TfR7 | SDYAWN (SEQ ID NO:90) | YISYSGYSRHNP SLKS (SEQ ID NO:91) | GDWDFDY (SEQ ID NO:92) |
| TfR8 | NYLIE (SEQ ID NO:83) | VINPGSGGTNY NEKFKG (SEQ ID NO:93) | RSPYFDY (SEQ ID NO:85) |
| TfR9 | EYAMH (SEQ ID NO:94) | GINPNDGGTSY NQKFKG (SEQ ID NO:95) | QRWLLRGGDY (SEQ ID NO:96) |
| TfR10 | SYYIH (SEQ ID NO:97) | WIYPGDGNTNY NEKFKG (SEQ ID NO:86) | DGSIPFAY (SEQ ID NO:98) |
| TfR11 | SYWMH (SEQ ID NO:99) | AIFPGNIDTIYN QKFKD (SEQ ID NO:100) | LYYDYV (SEQ ID NO:101) |
| TfR12 | SYWMH (SEQ ID NO:99) | NIYPGSGSSNYD EKFKN (SEQ ID NO:102) | SSYYGNFDTMDN (SEQ ID NO:103) |
| TfR13 | SYTMS (SEQ ID NO:104) | TISSGGSYTYFP DSVKG (SEQ ID NO:105) | AHYYAYDY (SEQ ID NO:106) |
| TfR14 | SSWMN (SEQ ID NO:107) | RIYPGDGDTNY NGKFKG (SEQ ID NO:108) | DPIIDYYYYAMDY (SEQ ID NO:109) |
| TfR15 | SYWMH (SEQ ID | NIYPGSGSSNYD EKFKS (SEQ ID | SSYYGNFDTMDN (SEQ ID NO:103) |

[0376]

| | | | |
|---|---|---|---|
| | NO:99) | NO:110) | |
| TfR16 | SYWMH (SEQ ID NO:99) | TIYPGNSDTIYN QNFKG (SEQ ID NO:111) | IYYFCN (SEQ ID NO:112) |
| TfR17 | SDYAWN (SEQ ID NO:90) | YISYSGSTSYNP SLKS (SEQ ID NO:113) | WGYRYLEDY (SEQ ID NO:114) |
| TfR18 | NYLIE (SEQ ID NO:83) | VINPGNNDTTY NEMFKA (SEQ ID NO:115) | RSPYFDY (SEQ ID NO:85) |
| TfR19 | SYWTH (SEQ ID NO:116) | NIYPGSGSSNYD EKFKS (SEQ ID NO:110) | SSYYGNFDTMDN (SEQ ID NO:103) |
| TfR20 | SDHAWN (SEQ ID NO:117) | YISYSGSSSYNP SLKS (SEQ ID NO:118) | SGWGMDY (SEQ ID NO:119) |
| TfR21 | SYWTH (SEQ ID NO:116) | NIYPGSGSSNYD EKFKS (SEQ ID NO:110) | SSYYGNFDTMDN (SEQ ID NO:103) |
| TfR22 | SDYAWN (SEQ ID NO:90) | YISYSGSTRYNP SLKS (SEQ ID NO:120) | WGYRYLEDY (SEQ ID NO:114) |
| TfR23 | SDYAWN (SEQ ID NO:90) | YISYSGSTSYNP SLKS (SEQ ID NO:113) | WGYRYLEDY (SEQ ID NO:114) |
| TfR24 | SYYIH (SEQ ID NO:97) | WIYPGDDNTHY NENFKG (SEQ ID NO:121) | DYYGRFAY (SEQ ID NO:122) |
| TfR25 | NYYIH (SEQ ID NO:74) | WIYPGDGNTHY NERFKG (SEQ ID NO:123) | DKDMPGMDY (SEQ ID NO:124) |
| TfR26 | NYYIH (SEQ ID NO:74) | WIYPGDGVTHY NEKFKG (SEQ ID NO:125) | DKDVPGMDY (SEQ ID NO:126) |
| TfR27 | SYWMH (SEQ ID NO:99) | NIYPGTGSTNY DEKFKS (SEQ ID NO:127) | SSYYGNFDTMDY (SEQ ID NO:128) |
| TfR28 | SDYAWN (SEQ ID NO:90) | YISYSGSTSYNP SLRS (SEQ ID NO:129) | RGYRYEEDY (SEQ ID NO:130) |
| TfR29 | NYWLH (SEQ ID NO:131) | MIDPSDSETRLN QKFKD (SEQ ID NO:132) | WGGGYYGFAY (SEQ ID NO:133) |
| TfR30 | NYWLH (SEQ ID NO:131) | MIDPSDSETRLN QKFKD (SEQ ID NO:132) | WGGGYYGFAY (SEQ ID NO:133) |
| TfR31 | SDYAWN (SEQ ID NO:90) | YISYSGRTSYNP SLKS (SEQ ID NO:134) | WGYRYLEDY (SEQ ID NO:114) |

[0377]

| | | | |
|---|---|---|---|
| TfR32 | NYLIE (SEQ ID NO:83) | VINPGSGETNY NEKFKG (SEQ ID NO:302) | RYDGPLLDH (SEQ ID NO:303) |
| TfR12.EB | SYWMH (SEQ ID NO:99) | NIYPGSGSSSYA QKFQG (SEQ ID NO:305) | SSYYGNFDTMDN (SEQ ID NO:103) |
| TfR15.WH1 | SYWMH (SEQ ID NO:99) | IIYPGSGSSNYA QKFQG (SEQ ID NO:306) | SSYYGNFDTMDN (SEQ ID NO:103) |
| TfR15.WH2 | SYWMH (SEQ ID NO:99) | IIYPGSGSSNYA QKFQG (SEQ ID NO:306) | SSYYGNFDTMDN (SEQ ID NO:103) |
| TfR15.WH3 | SYWMH (SEQ ID NO:99) | IIYPGSGSSNYA QKFQG (SEQ ID NO:306) | SSYYGNFDTMDN (SEQ ID NO:103) |
| TfR15.WH4 | SYWMH (SEQ ID NO:99) | NIYPGSGSSSYA QKFQG (SEQ ID NO:305) | SSYYGNFDTMDN (SEQ ID NO:103) |
| TfR15.WH6 | SYWMH (SEQ ID NO:99) | NIYPGSGSSSYA QKFQG (SEQ ID NO:305) | SSYYGNFDTMDN (SEQ ID NO:103) |
| TfR15.WH7 | SYWMH (SEQ ID NO:99) | NIYPGSGSSNYA QKFQG (SEQ ID NO:312) | SSYYGNFDTMDN (SEQ ID NO:103) |
| TfR15.WH8 | SYWMH (SEQ ID NO:99) | NIYPGSGSSNYA QKFQG (SEQ ID NO:312) | SSYYGNFDTMDN (SEQ ID NO:103) |
| TfR15.WH9 | SYWMH (SEQ ID NO:99) | NIYPGSGSSNYA QKFQG (SEQ ID NO:312) | SSYYGNFDTMDN (SEQ ID NO:103) |
| TfR15.WH10 | SYWMH (SEQ ID NO:99) | NIYPGSGSSNYA QKFQG (SEQ ID NO:312) | SSYYGNFDTMDN (SEQ ID NO:103) |
| TfR15.WH11 | SYWMH (SEQ ID NO:99) | NIYPGSGSSNYA QKFQG (SEQ ID NO:312) | SSYYGNFDTMDN (SEQ ID NO:103) |
| TfR15.WH12 | SYWMH (SEQ ID NO:99) | NIYPGSGSSNYA QKFQG (SEQ ID NO:312) | SSYYGNFDTMDN (SEQ ID NO:103) |
| TfR9.1A scFv | EYAMH (SEQ ID NO:94) | GINPNDGGTSY NQKFKG (SEQ ID NO:95) | QRWLLRGGDY (SEQ ID NO:96) |
| TfR9.1B scFv | EYAMH (SEQ ID NO:94) | GINPNDGGTSY NQKFKG (SEQ ID NO:95) | QRWLLRGGDY (SEQ ID NO:96) |
| TfR9.2A scFv | EYAMH (SEQ ID NO:94) | GINPNDGGTSY NQKFKG (SEQ ID NO:95) | QRWLLRGGDY (SEQ ID NO:96) |
| TfR9.2B | EYAMH | GINPNDGGTSY | QRWLLRGGDY |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | scFv | (SEQ ID NO:94) | NQKFKG (SEQ ID NO:95) | (SEQ ID NO:96) |
| | TfR9.3A scFv | EYAMH (SEQ ID NO:94) | GINPNDGGTSY NQKFKG (SEQ ID NO:95) | QRWLLRGGDY (SEQ ID NO:96) |
| | TfR9.3B scFv | EYAMH (SEQ ID NO:94) | GINPNDGGTSY NQKFKG (SEQ ID NO:95) | QRWLLRGGDY (SEQ ID NO:96) |
| | TfR9.4A scFv | EYAMH (SEQ ID NO:94) | GINPNDGGTSY NQKFKG (SEQ ID NO:95) | QRWLLRGGDY (SEQ ID NO:96) |
| | TfR9.4B scFv | EYAMH (SEQ ID NO:94) | GINPNDGGTSY NQKFKG (SEQ ID NO:95) | QRWLLRGGDY (SEQ ID NO:96) |
| | TfR9.5A scFv | EYAMH (SEQ ID NO:94) | GINPNDGGTSY NQKFKG (SEQ ID NO:95) | QRWLLRGGDY (SEQ ID NO:96) |
| | TfR9.5B scFv | EYAMH (SEQ ID NO:94) | GINPNDGGTSY NQKFKG (SEQ ID NO:95) | QRWLLRGGDY (SEQ ID NO:96) |
| | TfR12.1A scFv | SYWMH (SEQ ID NO:99) | NIYPGSGSSNYD EKFKN (SEQ ID NO:102) | SSYYGNFDTMDN (SEQ ID NO:103) |
| [0378] | TfR12.1B scFv | SYWMH (SEQ ID NO:99) | NIYPGSGSSNYD EKFKN (SEQ ID NO:102) | SSYYGNFDTMDN (SEQ ID NO:103) |
| | TfR12.2A scFv | SYWMH (SEQ ID NO:99) | NIYPGSGSSNYD EKFKN (SEQ ID NO:102) | SSYYGNFDTMDN (SEQ ID NO:103) |
| | TfR12.2B scFv | SYWMH (SEQ ID NO:99) | NIYPGSGSSNYD EKFKN (SEQ ID NO:102) | SSYYGNFDTMDN (SEQ ID NO:103) |
| | TfR12.3A scFv | SYWMH (SEQ ID NO:99) | NIYPGSGSSNYD EKFKN (SEQ ID NO:102) | SSYYGNFDTMDN (SEQ ID NO:103) |
| | TfR12.3B scFv | SYWMH (SEQ ID NO:99) | NIYPGSGSSNYD EKFKN (SEQ ID NO:102) | SSYYGNFDTMDN (SEQ ID NO:103) |
| | TfR12.4A scFv | SYWMH (SEQ ID NO:99) | NIYPGSGSSNYD EKFKN (SEQ ID NO:102) | SSYYGNFDTMDN (SEQ ID NO:103) |
| | TfR12.4B scFv | SYWMH (SEQ ID NO:99) | NIYPGSGSSNYD EKFKN (SEQ ID NO:102) | SSYYGNFDTMDN (SEQ ID NO:103) |
| | TfR15.WH8.1.1 | SYWMH (SEQ ID NO:99) | NIYPGSGSSNYA QKFQG (SEQ ID NO:312) | SSYYGNFDTMDN (SEQ ID NO:103) |

[0379] *HVR＝高变区;也称为CDR

[0380] 表13:来自小鼠杂交瘤的抗huTfR顶端结构域抗体序列(Kabat)

[0381]

| 抗体 | HVR-L1 | HVR-L2 | HVR-L3 |
|---|---|---|---|
| TfR1 | KSSQSLLNSGNQKNYLT (SEQ ID NO:135) | WASTRES (SEQ ID NO:136) | QNDYSYPLT (SEQ ID NO:137) |
| TfR2 | RASQSIGTSIH (SEQ ID NO:138) | YASESIS (SEQ ID NO:139) | QQSNSWPFT (SEQ ID NO:140) |
| TfR3 | KSSQSLLNSGNQKNYLT (SEQ ID NO:135) | WASTRES (SEQ ID NO:136) | QNDYSYPLT (SEQ ID NO:137) |
| TfR4 | KASQSVSNDVA (SEQ ID NO:141) | YASNRYT (SEQ ID NO:142) | HQDYISPT (SEQ ID NO:143) |
| TfR5 | KSSQSLLNSGNQKNYLT (SEQ ID NO:135) | WASTRES (SEQ ID NO:136) | QNDYSYPLT (SEQ ID NO:137) |
| TfR6 | KASQDVSTAVA (SEQ ID NO:143) | WASTRPT (SEQ ID NO:144) | QQHFSTPWT (SEQ ID NO:145) |
| TfR7 | KASQNVLTNVA (SEQ ID NO:146) | SSSSRNS (SEQ ID NO:147) | QQYNTYPYT (SEQ ID NO:148) |
| TfR8 | KASQSVSNDVA (SEQ ID NO:141) | YASNRYT (SEQ ID NO:142) | HQDYISPT (SEQ ID NO:143) |
| TfR9 | KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO:149) | LVSKLDS (SEQ ID NO:150) | WQGTHFPQT (SEQ ID NO:151) |
| TfR10 | KSSQSLLNSGNQKNYLT (SEQ ID NO:135) | WASTRES (SEQ ID NO:136) | QNDYSYPLT (SEQ ID NO:137) |
| TfR11 | KASQDINSYLS (SEQ ID NO:152) | HVNRLVD (SEQ ID NO:153) | LQYDEFPYT (SEQ ID NO:154) |
| TfR12 | SASSSIRYMN (SEQ ID NO:155) | DTSTLAS (SEQ ID NO:156) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TfR13 | RASQSIGTSIH (SEQ ID NO:138) | YASGSIS (SEQ ID NO:158) | QQSNSWPTST (SEQ ID NO:159) |
| TfR14 | RASESVDNYGISFMN (SEQ ID NO:160) | AASNQGS (SEQ ID NO:161) | QQSKEVPWT (SEQ ID NO:162) |
| TfR15 | SASSSIRYMN (SEQ ID NO:155) | DTSTLAS (SEQ ID NO:156) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TfR16 | KASQDINSYLS (SEQ ID | RANRLLD | LQYDVFPYT |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | NO:152) | (SEQ ID NO:163) | (SEQ ID NO:164) |
| TfR17 | SASSSISSMH (SEQ ID NO:165) | DTSKLAS (SEQ ID NO:166) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TfR18 | KASQSVSNDVA (SEQ ID NO:141) | YASNRYT (SEQ ID NO:142) | HQDYSSPT (SEQ ID NO:167) |
| TfR19 | SASSSIRYMN (SEQ ID NO:155) | DTSTLAS (SEQ ID NO:156) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TfR20 | RASEYINSYLA (SEQ ID NO:168) | KEKTLAE (SEQ ID NO:169) | QHHYGNPWT (SEQ ID NO:170) |
| TfR21 | RASEYINSYLA (SEQ ID NO:168) | KEKTLAE (SEQ ID NO:169) | QHHYGNPWT (SEQ ID NO:170) |
| TfR22 | SASSSISSMH (SEQ ID NO:165) | DTSKLAS (SEQ ID NO:166) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TfR23 | SASSSISSLH (SEQ ID NO:171) | DTSKLAS (SEQ ID NO:166) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TfR24 | KSSQSLLNSGNQKNYLT (SEQ ID NO:135) | WASTRES (SEQ ID NO:136) | QNDYGYPLT (SEQ ID NO:172) |
| TfR25 | KSSQSLFNSENQKNYLT (SEQ ID NO:173) | WASTRES (SEQ ID NO:136) | QNDYSYPLT (SEQ ID NO:137) |
| TfR26 | KSSQSLLNSENQKNYLT (SEQ ID NO:174) | WASTRES (SEQ ID NO:136) | QNDYSYPLT (SEQ ID NO:137) |
| TfR27 | SASSSIRYMN (SEQ ID NO:155) | DTSELAS (SEQ ID NO:175) | HQRSGYPWT (SEQ ID NO:176) |
| TfR28 | SASSSISSMH (SEQ ID NO:165) | DTSKLAS (SEQ ID NO:166) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TfR29 | SASSSISYMH (SEQ ID NO:177) | DTSKLAS (SEQ ID NO:166) | HQRSSYT (SEQ ID NO:178) |
| TfR30 | KASQNVRTAVA (SEQ ID NO:179) | LASNRHT (SEQ ID NO:180) | LQHWNYPWT (SEQ ID NO:181) |
| TfR31 | SASSSISSMH (SEQ ID NO:165) | DTSKLAS (SEQ ID NO:166) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TfR32 | KASQSVSNDVA (SEQ ID NO:141) | YASNRYT (SEQ ID | QQDYISPT (SEQ ID |

[0382]

[0383]

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | NO:142) | NO:182) |
| TfR12.EB | RASSSIRYMN (SEQ ID NO:307) | DTSTLQS (SEQ ID NO:308) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TfR15.WH1 | RASSSIRYMN (SEQ ID NO:307) | DTSTLQS (SEQ ID NO:308) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TfR15.WH2 | RASSSIRYMN (SEQ ID NO:307) | DTSNRAT (SEQ ID NO:309) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TfR15.WH3 | RASSSIRYLN (SEQ ID NO:310) | DTSSLQS (SEQ ID NO:311) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TfR15.WH4 | RASSSIRYMN (SEQ ID NO:307) | DTSTLQS (SEQ ID NO:308) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TfR15.WH6 | RASSSIRYLN (SEQ ID NO:310) | DTSSLQS (SEQ ID NO:311) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TfR15.WH7 | RASSSIRYMN (SEQ ID NO:307) | DTSTLQS (SEQ ID NO:308) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TfR15.WH8 | RASSSIRYMN (SEQ ID NO:307) | DTSNRAT (SEQ ID NO:309) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TfR15.WH9 | RASSSIRYLN (SEQ ID NO:310) | DTSSLQS (SEQ ID NO:311) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TfR15.WH10 | RASSSIRYMN (SEQ ID NO:307) | DTSTLQS (SEQ ID NO:308) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TfR15.WH11 | RASSSIRYMN (SEQ ID NO:307) | DTSNRAT (SEQ ID NO:309) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TfR15.WH12 | RASSSIRYLN (SEQ ID NO:310) | DTSSLQS (SEQ ID NO:311) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TfR9.1A scFv | KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO:149) | LVSKLDS (SEQ ID NO:150) | WQGTHFPQT (SEQ ID NO:151) |
| TfR9.1B scFv | KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO:149) | LVSKLDS (SEQ ID NO:150) | WQGTHFPQT (SEQ ID NO:151) |
| TfR9.2A scFv | KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO:149) | LVSKLDS (SEQ ID NO:150) | WQGTHFPQT (SEQ ID NO:151) |
| TfR9.2B scFv | KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO:149) | LVSKLDS (SEQ ID NO:150) | WQGTHFPQT (SEQ ID NO:151) |

[0384]

| | | | |
|---|---|---|---|
| TfR9.3A scFv | KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO:149) | LVSKLDS (SEQ ID NO:150) | WQGTHFPQT (SEQ ID NO:151) |
| TfR9.3B scFv | KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO:149) | LVSKLDS (SEQ ID NO:150) | WQGTHFPQT (SEQ ID NO:151) |
| TfR9.4A scFv | KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO:149) | LVSKLDS (SEQ ID NO:150) | WQGTHFPQT (SEQ ID NO:151) |
| TfR9.4B scFv | KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO:149) | LVSKLDS (SEQ ID NO:150) | WQGTHFPQT (SEQ ID NO:151) |
| TfR9.5A scFv | KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO:149) | LVSKLDS (SEQ ID NO:150) | WQGTHFPQT (SEQ ID NO:151) |
| TfR9.5B scFv | KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO:149) | LVSKLDS (SEQ ID NO:150) | WQGTHFPQT (SEQ ID NO:151) |
| TfR12.1A scFv | SASSSIRYMN (SEQ ID NO:155) | DTSTLAS (SEQ ID NO:156) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TfR12.1B scFv | SASSSIRYMN (SEQ ID NO:155) | DTSTLAS (SEQ ID NO:156) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TfR12.2A scFv | SASSSIRYMN (SEQ ID NO:155) | DTSTLAS (SEQ ID NO:156) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TfR12.2B scFv | SASSSIRYMN (SEQ ID NO:155) | DTSTLAS (SEQ ID NO:156) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TfR12.3A scFv | SASSSIRYMN (SEQ ID NO:155) | DTSTLAS (SEQ ID NO:156) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TfR12.3B scFv | SASSSIRYMN (SEQ ID NO:155) | DTSTLAS (SEQ ID NO:156) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TfR12.4A scFv | SASSSIRYMN (SEQ ID NO:155) | DTSTLAS (SEQ ID NO:156) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TfR12.4B scFv | SASSSIRYMN (SEQ ID NO:155) | DTSTLAS (SEQ ID NO:156) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TfR15.WH8.1.1 | RASSSIRYMN (SEQ ID NO:307) | DTSNRAT (SEQ ID NO:309) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |

[0385] 实施例9:杂交瘤抗体再形式化为2+1双特异性抗体

[0386] 基于以下各种标准来选择用于形式化为2+1双特异性形式的抗体:1)基于ELISA和FACS结合测定,抗体涵盖广泛范围的亲和力,2)抗体涵盖广泛范围的内化活性,3)在CDR中

未鉴定出突出的高风险修饰位点,和4)在所获得的杂交瘤序列中,抗体在系统发育上彼此不同。

[0387] 使用在重链恒定结构域中具有杵-突变的无靶标特异性的IgG同种型抗体(“惰性同种型对照抗体”)来形式化为2+1双特异性抗体。抗TfR scFv(VH和VL)经由带有“臼”突变(IgG同种型抗体的“臼侧”)的恒定结构域的C端处的接头附接至IgG同种型抗体上。附接至scFv的IgG同种型抗体称为2+1双特异性抗体,如图1A和图1D(i)中所示。连接scFv内的VH结构域和VL结构域的20个氨基酸接头为GGSEGKSSGSGSESKSTGGS(SEQ ID NO:183)(Bird等人,Science1988年10月21日;242(4877):423-6),并且将Fc“臼”域的C端连接至scFv的接头为(GGGGS)x3(SEQ ID NO:184)。通过基因合成制备编码2+1双特异性抗体的DNA,并将其克隆至表达载体pcDNA3.4(ThermoFisher)中。

[0388] 使用SEQ ID NO:185中的框架将scFv(VH和VL)序列形式化为具有“臼”突变的IgG重链的表达构建体(“重链-臼”构建体)。在一些情况下,“重链-臼”构建体包含一组突变(H435R、Y436F),以使与蛋白A的结合最小化(Tustian等人,MAbs.2016年5月-6月;8(4):828-38)(SEQ ID NO:186)。还生成对应的重链杵和轻链表达构建体(SEQ ID NO:187-188)。在一些情况下,重链-臼和重链-杵还包含降低效应子功能的突变(SEQ ID NO:189-194)。

[0389] 2+1双特异性抗体的示范结构包含以下组分:1)同种型对照hIgG1野生型抗体,其在恒定区中具有杵((T366W)突变和臼突变(T366S_L368A_Y407V),2)hIgG1抗体的“臼侧”与scFv之间的(G4S)x3接头,3)scFv的VH序列,4)scFv的VH与VL之间的20个氨基酸的接头序列,以及5)scFv的VL序列。

[0390] 表14.2+1双特异性抗体序列

[0391]

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列 |
|---|---|---|
| 185 | 同种型对照重链 hIgG1 wt 白 scFv (T366S_L368A_Y407V)-(G4S)3 接头-VH-20AA 接头-VL | EVRLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYA MGWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVK GRFTTSRDDSKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGGPGWYAADVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK-GGGGSGGGGSGGGGS-**X1**-GGSEGKSSGSGSESKSTGGS-**X2**，其中 X1 为 SEQ ID NO:10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、313、315、317、318、319、320、321、322、323、324、325、327、330、334、335、337、339、343、344、345、346、348、349、351、357、359、361、363、364、369、371、372、375、376、378、380、384、385、387、389、390、391、393、394、396、397、398、399、401、402、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452 和 453 中任一项的氨基酸序列，并且其中 X2 为 SEQ ID NO:11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、314、316、326、328、329、331、332、333、336、338、340、341、342、347、350、352、353、354、355、356、358、360、362、365、366、367、368、370、373、374、377、379、381、382、383、386、388、392、395、400、403、454、455、456、457、458 和 459 中任一项的氨基酸序列。 |
| 186 | 同种型对照重链 hIgG1 wt 白 scFv | EVRLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYA MGWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVK GRFTTSRDDSKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCA |

[0392]

| | | |
|---|---|---|
| | (T366S_L368A_Y407V)-(G4S)3 接头-VH-20AA 接头-VL，具有突变 (H435R、Y436F) | RGGPGWYAADVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNRFTQKSLSLSPGK-GGGGSGGGGSGGGGS-**X1**-GGSEGKSSGSGSESKSTGGS-**X2**，其中 X1 为 SEQ ID NO:10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、313、315、317、318、319、320、321、322、323、324、325、327、330、334、335、337、339、343、344、345、346、348、349、351、357、359、361、363、364、369、371、372、375、376、378、380、384、385、387、389、390、391、393、394、396、397、398、399、401、402、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452 和 453 中任一项的氨基酸序列，并且其中 X2 为 SEQ ID NO:11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、314、316、326、328、329、331、332、333、336、338、340、341、342、347、350、352、353、354、355、356、358、360、362、365、366、367、368、370、373、374、377、379、381、382、383、386、388、392、395、400、403、454、455、456、457、458 和 459 中任一项的氨基酸序列。 |
| 187 | 同种型对照重链 hIgG1 wt 杵(T366W) | EVRLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYA MGWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVK GRFTTSRDDSKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGGPGWYAADVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT |

| | | |
|---|---|---|
| | | PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 188 | 同种型对照轻链 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNW YQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQQADLPAFAFGGGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC |
| 189 | 同种型对照重链 hIgG1 LALAPS 白 scFv (T366S_L368 A_Y407V) (L234A_L235 A_P331S)-(G4S)3 接头-VH-20AA 接头-VL | EVRLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYA MGWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVK GRFTTSRDDSKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGGPGWYAADVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK-GGGGSGGGGSGGGGS-**X1**-GGSEGKSSGSGSESKSTGGS-**X2**，其中 X1 为 SEQ ID NO:10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、313、315、317、318、319、320、321、322、323、324、325、327、330、334、335、337、339、343、344、345、346、348、349、351、357、359、361、363、364、369、371、372、375、376、378、380、384、385、387、389、390、391、393、394、396、397、398、399、401、402、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452 和 453 中任一项的氨基酸序列，并且其中 X2 为 SEQ ID NO:11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、314、316、326、328、329、331、332、333、336、338、340、341、342、347、350、352、353、354、355、356、358、360、362、365、366、367、368、370、373、374、377、379、381、382、383、386、388、392、395、400、403、454、455、456、457、458 和 459 中任一项的氨基酸序列。 |

[0393]

[0394]

| | | |
|---|---|---|
| 190 | 同种型对照重链 hIgG1 LALAPS 白 scFv (T366S_L368A_Y407V) (L234A_L235A_P331S)-(G4S)3 接头-VH-20AA 接头-VL，具有突变 (H435R、Y436F) | EVRLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYA MGWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVK GRFTTSRDDSKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGGPGWYAADVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNRFTQKSLSLSPGK-GGGGSGGGGSGGGGS-**X1**-GGSEGKSSGSGSESKSTGGS-**X2**，其中 X1 为 SEQ ID NO:10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、313、315、317、318、319、320、321、322、323、324、325、327、330、334、335、337、339、343、344、345、346、348、349、351、357、359、361、363、364、369、371、372、375、376、378、380、384、385、387、389、390、391、393、394、396、397、398、399、401、402、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452 和 453 中任一项的氨基酸序列，并且其中 X2 为 SEQ ID NO:11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、314、316、326、328、329、331、332、333、336、338、340、341、342、347、350、352、353、354、355、356、358、360、362、365、366、367、368、370、373、374、377、379、381、382、383、386、388、392、395、400、403、454、455、456、457、458 和 459 中任一项的氨基酸序列。 |
| 191 | 同种型对照重链 hIgG1 LALAPS 杵 (T366W) (L234A_L235A_P331S) | EVRLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYA MGWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVK GRFTTSRDDSKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGGPGWYAADVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE |

[0395]

| | | |
|---|---|---|
| | | EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 192 | 同种型对照重链 hIgG1 NSLF 白 scFv (T366S_L368A_Y407V) (N325S_L328F)-(G4S)3 接头-VH-20AA 接头-VL | EVRLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYA MGWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVK GRFTTSRDDSKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGGPGWYAADVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSSK AFPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK-GGGGSGGGGSGGGGS-**X1**-GGSEGKSSGSGSESKSTGGS-**X2**，其中 X1 为 SEQ ID NO:10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、313、315、317、318、319、320、321、322、323、324、325、327、330、334、335、337、339、343、344、345、346、348、349、351、357、359、361、363、364、369、371、372、375、376、378、380、384、385、387、389、390、391、393、394、396、397、398、399、401、402、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452 和 453 中任一项的氨基酸序列，并且其中 X2 为 SEQ ID NO:11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、314、316、326、328、329、331、332、333、336、338、340、341、342、347、350、352、353、354、355、356、358、360、362、365、366、367、368、370、373、374、377、379、381、382、383、386、388、392、395、400、403、454、455、456、457、458 和 459 中任一项的氨基酸序列。 |
| 193 | 同种型对照重链 hIgG1 NSLF 白 scFv (T366S_L368 | EVRLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYA MGWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVK GRFTTSRDDSKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGGPGWYAADVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFP |

[0396]

| | | |
|---|---|---|
| | A_Y407V)(N325S_L328F)-(G4S)3 接头-VH-20AA 接头-VL 突变(H435R、Y436F) | LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSSKAFPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK-GGGGSGGGGSGGGGS-**X1**-GGSEGKSSGSGSESKSTGGS-**X2**，其中 X1 为 SEQ ID NO:10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、313、315、317、318、319、320、321、322、323、324、325、327、330、334、335、337、339、343、344、345、346、348、349、351、357、359、361、363、364、369、371、372、375、376、378、380、384、385、387、389、390、391、393、394、396、397、398、399、401、402、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452 和 453 中任一项的氨基酸序列，并且其中 X2 为 SEQ ID NO:11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、314、316、326、328、329、331、332、333、336、338、340、341、342、347、350、352、353、354、355、356、358、360、362、365、366、367、368、370、373、374、377、379、381、382、383、386、388、392、395、400、403、454、455、456、457、458 和 459 中任一项的氨基酸序列。 |
| 194 | 同种型对照重链 hIgG1 NSLF 杵(T366W)(N325S_L328F) | EVRLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTTSRDDSKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGPGWYAADVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSSKAFPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV |

[0397]

| | | |
|---|---|---|
| | | MHEALHNHYTQKSLSLSPGK |

[0398] 为了生成2+1双特异性抗体,根据制造商说明书进行Expi293细胞的瞬时转染

(Invitrogen)。对于20mL培养物,使用20μg由3个表达质粒(重链-臼-scFv序列、重链-杵序列和轻链序列)组成的总DNA。将重链-杵、重链-臼-scFv和轻链质粒的摩尔比优化为1:3:6,以实现2+1双特异性抗体的高纯度。转染后5天收获细胞培养物上清液。使用带有MabSelect Sure树脂(Cytiva)的滴注柱纯化澄清的上清液,用PBS洗涤,并用pH 3.5洗脱缓冲液洗脱,并用Tris-HCl中和至5.5-6.0的最终pH。将含有抗体的中和洗脱物透析至PBS中。通过使用Nanodrop 8000(ThermoFisher)或Lunatic(Unchained Labs)测量280nm处的吸光度来量化抗体浓度。通过SDS-PAGE测定2+1双特异性抗体的纯度。使用体积排阻色谱(SEC)分析2+1双特异性抗体的聚集情况。然后,产生抗体并纯化为2+1双特异性抗体,并经由ELISA、FACS和内化进行分析,以确认2+1形式的结合保留。

[0399] 实施例10:2+1抗TfR双特异性抗体的产生和表征

[0400] 如实施例9中所述将抗TfR杂交瘤抗体转化为2+1形式并表达和纯化。经由ELISA和FACS证实结合保留。

[0401] 为了通过ELISA测定再形式化的scFv 2+1抗TfR抗体的结合保留,在4℃下用链霉亲和素(1μg/ml,Thermo Fisher)包被高结合ELISA板(Thermo Fisher)过夜。然后将板用含有0.05%tween-20(PBST)的磷酸盐缓冲盐水洗涤三次,并用封闭缓冲液(PBS+1%BSA,1h,室温)孵育。将板再次用PBST洗涤三次,并与生物素化的人、食蟹猴和小鼠TfR以及不相关抗原、人转铁蛋白受体(1μg/ml,1h,室温)一起孵育。将板再次用PBST洗涤三次,并与抗TfR抗体(1μg/ml,1h,室温)一起孵育。将板用PBST再次洗涤三次,并与二级检测抗体抗人辣根过氧化物酶缀合抗体一起孵育(1:5000稀释,30min,室温)。最后一次将板洗涤三次并与TMB-ELISA底物溶液(Thermo Fisher)一起孵育,然后用$H_2SO_4$淬灭。然后通过使用SpectraMax M5(Molecular Devices)量化450nm($OD_{450}$)处的光密度来分析抗TfR结合。作为scFv 2+1抗TfR抗体与TfR的结合特征在下表15中总结为相对于同种型hIgG的倍数变化。

[0402] 为了通过FACS测定再形式化的2+1scFv抗TfR抗体的结合保留,评价抗体与HCMEC/D3细胞(源自人脑内皮细胞的细胞系)、过表达人和小鼠TfR的CHO细胞系以及CHO细胞的结合以供非特异性结合。将细胞接种于组织培养板(50,000个细胞/孔)中,洗涤并再悬浮于FACS缓冲液(PBS+2%BSA+1mM EDTA)中。然后将抗TfR抗体与细胞一起孵育(5μg/ml,在冰上1小时),并用FACS缓冲液洗涤两次。然后将细胞与异藻蓝蛋白缀合的抗小鼠二级抗体(Jackson Immunoresearch)一起孵育(1:1000,在冰上30分钟),然后然后用FACS缓冲液洗涤两次。然后将细胞再悬浮于补充有0.5%碘化丙啶(Thermo Fisher)的FACS缓冲液中。然后在iQue流式细胞仪(IntelliCyt)上通过测量平均荧光强度(MFI)来分析抗TfR结合。FACS数据在下表15中总结为相对于同种型hIgG1的MFI倍数变化。

[0403] 总之,32种再形式化抗体中有28种以2+1形式保留针对TfR的结合亲和力(表15)。重要的是,32种抗体中仅有6种(TfR6、TfR9、TfR12、TfR15、TfR19、TfR27)显示出强烈的食蟹猴交叉反应性,因此只有那些抗体才会被考虑进一步成熟。

[0404] 表15:再形式化为2+1双特异性形式的抗TfR抗体的结合特征。

[0405]

| | ELISA(相对于同种型对照的倍数) | | | | FACS (CHO + hTfR) |
|---|---|---|---|---|---|
| 抗体 | huTfR Avi-His | 食蟹猴 TfR Avi-His | MuTfR Avi-His | hTfR 顶端 | 相对于 CHO 亲代的倍数 |
| TfR1 | 11 | 1 | 1 | 13 | 28 |
| TfR2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| TfR3 | 9 | 1 | 1 | 9 | 7 |
| TfR4 | 30 | 1 | 1 | 40 | 305 |
| TfR5 | 24 | 1 | 1 | 42 | 298 |
| TfR6 | 5 | 21 | 1 | 1 | 19 |
| TfR7 | 27 | 1 | 1 | 45 | 314 |
| TfR8 | 26 | 1 | 1 | 32 | 293 |

[0406]

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| TfR9 | 23 | 10 | 1 | 26 | 62 |
| TfR10 | 25 | 1 | 1 | 35 | 93 |
| TfR11 | 28 | 4 | 1 | 44 | 107 |
| TfR12 | 28 | 36 | 1 | 40 | 152 |
| TfR13 | 6 | 1 | 1 | 8 | 17 |
| TfR14 | 5 | 4 | 1 | 37 | 2 |
| TfR15 | 29 | 28 | 1 | 40 | 875 |
| TfR16 | 29 | 1 | 1 | 39 | 1005 |
| TfR17 | 24 | 1 | 1 | 38 | 305 |
| TfR18 | 28 | 1 | 1 | 39 | 777 |
| TfR19 | 26 | 30 | 1 | 41 | 277 |
| TfR20 | 14 | 1 | 2 | 1 | 65 |
| TfR21 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 |
| TfR22 | 27 | 1 | 2 | 40 | 442 |
| TfR23 | 29 | 1 | 1 | 40 | 278 |
| TfR24 | 4 | 1 | 1 | 3 | 11 |
| TfR25 | 3 | 1 | 1 | 12 | 23 |
| TfR26 | 27 | 1 | 1 | 39 | 590 |
| TfR27 | 27 | 32 | 1 | 42 | 309 |
| TfR28 | 27 | 1 | 1 | 39 | 438 |
| TfR29 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| TfR30 | 32 | 5 | 1 | 40 | 261 |
| TfR31 | 25 | 5 | 1 | 41 | 383 |
| TfR32 | 21 | 1 | 1 | 30 | 242 |
| 同种型对照 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 |

[0407] 实施例11:BBB内皮细胞系中2+1抗TfR双特异性抗体的体外内化

[0408] 如先前所述(实施例7)进行2+1抗TfR双特异性抗体向hCMEC/D3细胞系中的内化。2+1抗TfR双特异性抗体显示出广泛范围的内化能力,其中许多显示出比抗TfR对照抗体显著更高的内化能力。

[0409] 表16:再形式化为2+1双特异性抗体形式的抗TfR抗体的内化特征(每孔累积强度/相面积的倍数变化)

[0410]

| 2+1 双特异性抗体 | 相对于同种型对照 IgG 的倍数变化 |
|---|---|
| TfR1 | 483 |
| TfR2 | 1 |
| TfR3 | 0 |
| TfR4 | 110 |
| TfR5 | 91 |

[0411]

| | |
|---|---|
| TfR6 | 1 |
| TfR7 | 32 |
| TfR8 | 52 |
| TfR9 | 529 |
| TfR10 | 561 |
| TfR11 | 35 |
| TfR12 | 239 |
| TfR13 | 218 |
| TfR14 | 2 |
| TfR15 | 56 |
| TfR16 | 28 |
| TfR17 | 5 |
| TfR18 | 16 |
| TfR19 | 16 |
| TfR20 | 1 |
| TfR21 | 0 |
| TfR22 | 146 |
| TfR23 | 35 |
| TfR24 | 2 |
| TfR25 | 1 |
| TfR26 | 223 |
| TfR27 | 43 |
| TfR28 | 18 |
| TfR29 | 10 |
| TfR30 | 41 |
| TfR31 | 40 |
| TfR32 | 304 |
| 抗 TfR IgG | 26 |
| 同种型对照 | 1 |

[0412] 实施例12:抗TfR小鼠抗体的人源化

[0413] 选择TfR9、TfR12和TfR15的scFv部分进行人源化。针对食蟹猴交叉反应性,而且针对其功能(内化)、功能稳定性(热应激后内化的能力)和序列多样性选择这些抗体。

[0414] 使用CDR移植方法进行人源化。使非人抗体人源化最常用的方法的一系将来自非人抗体的CDR移植至人抗体受体框架上。通常,此类CDR移植会由于人源化抗体框架的扰动而导致其亲和力减弱或完全丧失。结果,可能需要保留小鼠框架中的某些残基以替换对应位置处的人残基(回复突变),以恢复减弱或失去的亲和力。因此,准确预测在所选人抗体种系受体框架中保留的残基是至关重要的,所述框架可保留人源化抗体的功能和互补位。另外,为了良好可制造性和下游开发,需要保留或改善热稳定性和溶解性。

[0415] 利用MOE(Molecular Operating Environment,Chemical Computing Group,Montreal,Canada)的BioMOE模块在使抗TfR小鼠单克隆抗体(mAb)人源化的方法中应用基于结构的抗体建模。简言之,使待人源化的小鼠mAb序列的VH和VL序列与取自IMGT(http://www.imgt.org/)的人VL、VH、LJ和HJ功能性种系序列相比较。排除假基因和ORF。每一种小鼠mAb(查询),选择五个最相似的VL和五个最相似的VH种系序列,并与最相似的VJ和HJ基因组合,产生25个人源化序列。待移植至人框架上的CDR根据AbM定义(http://www.bioinf.org.uk/abs/#cdrdef)来定义。

[0416] 根据人类库中VH框架和VL框架的频率选择两个人源化序列。将查询和人源化序列用于创建Fv同源模型。利用MOE(Molecular Operating Environment,Chemical Computing Group,Montreal,Canada)的BioMOE模块或Antibody Modeler模块创建Fv同源模型。通过完整抗体同源建模过程,将AMBER10:EHT力场用于能量最小化。基于Fv同源模型,通过MOE所提供的评分度量来计算、分析和分选分子描述符,诸如VL与VH之间的相互作用能、基于座标的等电点(3D pI)、疏水性补丁和带电表面积。利用这些分子描述符来对人源化mAb进行优先排序以用于下游实验程序,包括蛋白质表达、纯化、结合亲和力测试和功能测定。

[0417] MOE的BioMOE模块提供一种工具,即突变位点特性,以使潜在残基显现并分类用于回复突变。回复突变定义为氨基酸取代恢复为原始查询序列来替代人源化序列。使用此工具,使原始查询(参考)个别地与针对一级氨基酸序列与3D Fv同源模型的3D结构两者所选择的人源化变体进行比较。

[0418] 根据氨基酸类型差异、与CDR残基的相互作用电位、VL/VH配对的冲击电位、以及CDR内及其附近疏水和带电表面积的电位变化,对参考与人源化变体之间的变化进行分类。

[0419] 个别地评价在CDR或VL/VH界面附近、具有显著电荷差异或含有强H键相互作用的突变,并且将显著破坏性突变恢复为原始查询残基。结果,人源化序列可含有多达五个回复突变。

[0420] 下表17中描述TfR9、TfR12和TfR15的人源化序列。

[0421] 表17:TfR9、TfR12和TfR15的人源化变体scFv中的重链和轻链序列加下划线。

[0422]

| 抗体 | 抗体序列 |
|---|---|
| 亲代 TfR9 scFv | EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYAMHWVKQSHGK SLEWIGGINPNDGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLT SEDSAVYYCSSQRWLLRGGDYWGQGTTLTVSSGGSEGKSSGSG SESKSTGGSDVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKT YLNWLLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKIS RVEAEDLGVYYCWQGTHFPQTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:195) |
| TfR9.1 A scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYAMHWVRQAPG QGLEWMGGINPNDGGTSYNQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELS SLRSEDTAVYYCASQRWLLRGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSS GSGSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSD GKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:196) |
| TfR9.1 B scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYAMHWVRQAPG QGLEWMGGINPNDGGTSYNQKFKGRVTMTVDTSTSTAYMELS SLRSEDTAVYYCASQRWLLRGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSS GSGSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSD GKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:197) |
| TfR9.2 A scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYAMHWVRQAPG QRLEWMGGINPNDGGTSYNQKFKGRVTITRDTSASTAYMELSS LRSEDTAVYYCASQRWLLRGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSS GSGSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSD GKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:198) |
| TfR9.2 B scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYAMHWVRQAPG QRLEWMGGINPNDGGTSYNQKFKGRVTITVDTSASTAYMELRS LRSEDTAVYYCASQRWLLRGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSS |

[0423]

| | |
|---|---|
| | GSGSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSD GKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:199) |
| TfR9.3 A scFv | EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTEYAMHWVQQAPG KGLEWMGGINPNDGGTSYNQKFKGRVTITADTSTDTAYMELSS LRSEDTAVYYCATQRWLLRGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSS GSGSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSD GKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:200) |
| TfR9.3 B scFv | EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTEYAMHWVQQAPG KGLEWMGGINPNDGGTSYNQKFKGRVTITADKSTDTAYMELRS LRSEDTAVYYCATQRWLLRGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSS GSGSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSD GKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:201) |
| TfR9.4 A scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTEYAMHWVRQAPG KGLEWMGGINPNDGGTSYNQKFKGRVTMTEDTSTDTAYMELS SLRSEDTAVYYCATQRWLLRGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKS SGSGSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDS DGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:202) |
| TfR9.4 B scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTEYAMHWVRQAPG KGLEWMGGINPNDGGTSYNQKFKGRVTMTEDKSTDTAYMELR SLRSEDTAVYYCATQRWLLRGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKS SGSGSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDS DGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:203) |
| TfR9.5 A scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYAMHWVRQAPG QGLEWMGGINPNDGGTSYNQKFKGRVTSTRDTSISTAYMELSR LRSDDTVVYYCASQRWLLRGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSS GSGSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSD GKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:204) |
| TfR9.5 B scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYAMHWVRQAPG QGLEWMGGINPNDGGTSYNQKFKGRVTLTVDTSISTAYMELSR LRSDDTVVYYCASQRWLLRGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSS GSGSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSD GKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:205) |
| 亲代 TfR12 scFv | QVQLQQPGSELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPG QGLEWIGNIYPGSGSSNYDEKFKNKATLTVDTSSNTAYMQLSSL TSEDSAVYYCTRSSYYGNFDTMDNWGQGTSVTVSSGGSEGKSS GSGSESKSTGGSQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSIRYMN |

[0424]

| | |
|---|---|
| | WYQQKPVTSPKRWIYDTSTLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSM EAEDAATYYCHQRSSYPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:206) |
| TfR12. 1A scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAP GQGLEWMGNIYPGSGSSNYDEKFKNRVTMTRDTSTSTVYMELS SLRSEDTAVYYCARSSYYGNFDTMDNWGQGTTVTVSSGGSEG KSSGSGSESKSTGGSDIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCSASSSIRY MNWYQQKPGKAPKLLIYDTSTLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISS LQPEDFATYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:207) |
| TfR12. 1B scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAP GQGLEWMGNIYPGSGSSNYDEKFKNRVTLTVDTSTSTAYMELS SLRSEDTAVYYCARSSYYGNFDTMDNWGQGTTVTVSSGGSEG KSSGSGSESKSTGGSQIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCSASSSIRY MNWYQQKPGKAPKRLIYDTSTLASGVPSRFSGSGSGTSYTLTISS LQPEDFATYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:208) |
| TfR12. 2A scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAP GQGLEWMGNIYPGSGSSNYDEKFKNRVTMTRDTSTSTVYMELS SLRSEDTAVYYCARSSYYGNFDTMDNWGQGTTVTVSSGGSEG KSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSIRY MNWYQQKPGQAPRLLIYDTSTLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISS LEPEDFAVYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:209) |
| TfR12. 2B scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAP GQGLEWMGNIYPGSGSSNYDEKFKNRVTLTVDTSTSTVYMELS SLRSEDTAVYYCARSSYYGNFDTMDNWGQGTTVTVSSGGSEG KSSGSGSESKSTGGSQIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSIRY MNWYQQKPGQAPRRLIYDTSTLASGIPARFSGSGSGTSFTLTISS LEPEDFAVYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:210) |
| TfR12. 3A scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAP GQGLEWMGNIYPGSGSSNYDEKFKNRVTMTRDTSTSTVYMELS SLRSEDTAVYYCARSSYYGNFDTMDNWGQGTTVTVSSGGSEG KSSGSGSESKSTGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSIRY MNWYQQKPGKAPKLLIYDTSTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:211) |
| TfR12. 3B scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAP GQGLEWMGNIYPGSGSSNYDEKFKNRVTLTVDTSTSTVYMELS SLRSEDTAVYYCARSSYYGNFDTMDNWGQGTTVTVSSGGSEG KSSGSGSESKSTGGSQIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSIRY MNWYQQKPGKAPKRLIYDTSTLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:212) |
| TfR12. 4A scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAP GQGLEWMGNIYPGSGSSNYDEKFKNRVTSTRDTSISTAYMELSR LRSDDTVVYYCARSSYYGNFDTMDNWGQGTTVTVSSGGSEGK SSGSGSESKSTGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSIRYM NWYQQKPGKAPKLLIYDTSTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:213) |
| TfR12. 4B scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAP GQGLEWMGNIYPGSGSSNYDEKFKNRVTLTVDTSISTAYMELS RLRSDDTVVYYCARSSYYGNFDTMDNWGQGTTVTVSSGGSEG KSSGSGSESKSTGGSQIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSIRY MNWYQQKPGKAPKRLIYDTSTLASGVPSRFSGSGSGTSYTLTISS LQPEDFATYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:214) |

[0425]

| | |
|---|---|
| TfR12.EB scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAP GQGLEWMGNIYPGSGSSSYAQKFQGRVTMTVDTSTNTVYMEL SSLRSEDTAVYYCTRSSYYGNFDTMDNWGQGTMVTVSSGGSE GKSSGSGSESKSTGGSDIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASSSIR YMNWYQQKPGKAPKRLIYDTSTLQSGVPSRFSGSGSGTEYTLTI SSLQPEDFATYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:215) |
| 亲代 TfR15 | QVQLQQPGSELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPG QGLEWIGNIYPGSGSSNYDEKFKSKATLTVDTSSSTAYMQLNSL TSEDSAVYYCTRSSYYGNFDTMDNWGQGTSVTVSSGGSEGKSS GSGSESKSTGGSQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSIRYMN WYQQKPVTSPKRWIYDTSTLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSM EAEDAATYYCHQRSSYPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:216) |
| TfR15.WH1 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAP GQGLEWMGIIYPGSGSSNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELS SLRSEDTAVYYCTRSSYYGNFDTMDNWGQGTTVTVSSGGSEGK SSGSGSESKSTGGSDIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASSSIRYM NWYQQKPGKAPKRLIYDTSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSL QPEDFATYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:217) |
| TfR15.WH2 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAP GQGLEWMGIIYPGSGSSNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELS SLRSEDTAVYYCTRSSYYGNFDTMDNWGQGTTVTVSSGGSEGK SSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSIRYM NWYQQKPGQAPRRLIYDTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSL EPEDFAVYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:218) |
| TfR15.WH3 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAP GQGLEWMGIIYPGSGSSNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELS SLRSEDTAVYYCTRSSYYGNFDTMDNWGQGTTVTVSSGGSEGK SSGSGSESKSTGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSIRYL NWYQQKPGKAPKRLIYDTSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:219) |
| TfR15.WH4 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAP GQGLEWMGNIYPGSGSSSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELS SLRSEDTAVYYCTRSSYYGNFDTMDNWGQGTTVTVSSGGSEGK SSGSGSESKSTGGSDIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASSSIRYM NWYQQKPGKAPKRLIYDTSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSL QPEDFATYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:220) |
| TfR15.WH6 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAP GQGLEWMGNIYPGSGSSSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELS SLRSEDTAVYYCTRSSYYGNFDTMDNWGQGTTVTVSSGGSEGK SSGSGSESKSTGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSIRYL NWYQQKPGKAPKRLIYDTSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:221) |
| TfR15.WH7 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAP GQGLEWMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELS SLRSEDTAVYYCTRSSYYGNFDTMDNWGQGTTVTVSSGGSEGK SSGSGSESKSTGGSDIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASSSIRYM NWYQQKPGKAPKRLIYDTSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSL QPEDFATYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:222) |
| TfR15.WH8 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAP GQGLEWMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELS |

[0426]

| | |
|---|---|
| | SLRSEDTAVYYCTRSSYYGNFDTMDNWGQGTTVTVSSGGSEGK SSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSIRYM NWYQQKPGQAPRRLIYDTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSL EPEDFAVYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:223) |
| TfR15. WH9 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAP GQGLEWMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELS SLRSEDTAVYYCTRSSYYGNFDTMDNWGQGTTVTVSSGGSEGK SSGSGSESKSTGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSIRYL NWYQQKPGKAPKRLIYDTSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:224) |
| TfR15. WH10 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAP GQGLEWMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRVTLTVDTSTSTVYMELS SLRSEDTAVYYCTRSSYYGNFDTMDNWGQGTTVTVSSGGSEGK SSGSGSESKSTGGSDIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASSSIRYM NWYQQKPGKAPKRLIYDTSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSL QPEDFATYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:225) |
| TfR15. WH11 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAP GQGLEWMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRVTLTVDTSTSTVYMELS SLRSEDTAVYYCTRSSYYGNFDTMDNWGQGTTVTVSSGGSEGK SSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSIRYM NWYQQKPGQAPRRLIYDTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSL EPEDFAVYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:226) |
| TfR15. WH12 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAP GQGLEWMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRVTLTVDTSTSTVYMELS SLRSEDTAVYYCTRSSYYGNFDTMDNWGQGTTVTVSSGGSEGK SSGSGSESKSTGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSIRYL NWYQQKPGKAPKRLIYDTSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:227) |

[0427] 表18-TfR9、TfR12和TfR15的人源化变体的可变重链结构域和可变轻链结构域

[0428]

| 抗体 | VH 序列 | VL 序列 |
|---|---|---|
| 亲代 TfR9 scFv | EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKT SGYTFTEYAMHWVKQSHGKSLE WIGGINPNDGGTSYNQKFKGKAT LTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAV YYCSSQRWLLRGGDYWGQGTTL TVSS (SEQ ID NO:26) | DVVMTQTPLTLSVTIGQPASIS CKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQ RPGQSPKRLIYLVSKLDSGVP DRFTGSGSGTDFTLKISRVEAE DLGVYYCWQGTHFPQTFGGG TKLEIK (SEQ ID NO:27) |
| TfR9. 1A scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTEYAMHWVRQAPGQGL EWMGGINPNDGGTSYNQKFKGR VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDT AVYYCASQRWLLRGGDYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO:313) | DVVMTQSPLSLPVTLGQPASIS CKSSQSLLDSDGKTYLNWFQ QRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYYCWQGTHFPQTFGGG TKVEIK (SEQ ID NO:314) |
| TfR9. 1B scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTEYAMHWVRQAPGQGL EWMGGINPNDGGTSYNQKFKGR | DVVMTQSPLSLPVTLGQPASIS CKSSQSLLDSDGKTYLNWLQ QRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVP |

[0429]

| | | |
|---|---|---|
| | VTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDT AVYYCASQRWLLRGGDYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO:315) | DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYYCWQGTHFPQTFGGG TKVEIK (SEQ ID NO:316) |
| TfR9.2A scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTEYAMHWVRQAPGQRL EWMGGINPNDGGTSYNQKFKGR VTITRDTSASTAYMELSSLRSEDT AVYYCASQRWLLRGGDYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO:317) | DVVMTQSPLSLPVTLGQPASIS CKSSQSLLDSDGKTYLNWFQ QRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYYCWQGTHFPQTFGGG TKVEIK (SEQ ID NO:314) |
| TfR9.2B scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTEYAMHWVRQAPGQRL EWMGGINPNDGGTSYNQKFKGR VTITVDTSASTAYMELRSLRSEDT AVYYCASQRWLLRGGDYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO:318) | DVVMTQSPLSLPVTLGQPASIS CKSSQSLLDSDGKTYLNWLQ QRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYYCWQGTHFPQTFGGG TKVEIK (SEQ ID NO:316) |
| TfR9.3A scFv | EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCK VSGYTFTEYAMHWVQQAPGKGL EWMGGINPNDGGTSYNQKFKGR VTITADTSTDTAYMELSSLRSEDT AVYYCATQRWLLRGGDYWGQG TLVTVSS (SEQ ID NO:319) | DVVMTQSPLSLPVTLGQPASIS CKSSQSLLDSDGKTYLNWFQ QRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYYCWQGTHFPQTFGGG TKVEIK (SEQ ID NO:314) |
| TfR9.3B scFv | EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCK VSGYTFTEYAMHWVQQAPGKGL EWMGGINPNDGGTSYNQKFKGR VTITADKSTDTAYMELRSLRSEDT AVYYCATQRWLLRGGDYWGQG TLVTVSS (SEQ ID NO:320) | DVVMTQSPLSLPVTLGQPASIS CKSSQSLLDSDGKTYLNWLQ QRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYYCWQGTHFPQTFGGG TKVEIK (SEQ ID NO:316) |
| TfR9.4A scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK VSGYTLTEYAMHWVRQAPGKGL EWMGGINPNDGGTSYNQKFKGR VTMTEDTSTDTAYMELSSLRSED TAVYYCATQRWLLRGGDYWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO:321) | DVVMTQSPLSLPVTLGQPASIS CKSSQSLLDSDGKTYLNWFQ QRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYYCWQGTHFPQTFGGG TKVEIK (SEQ ID NO:314) |
| TfR9.4B scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK VSGYTLTEYAMHWVRQAPGKGL EWMGGINPNDGGTSYNQKFKGR VTMTEDKSTDTAYMELRSLRSED TAVYYCATQRWLLRGGDYWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO:322) | DVVMTQSPLSLPVTLGQPASIS CKSSQSLLDSDGKTYLNWLQ QRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYYCWQGTHFPQTFGGG TKVEIK (SEQ ID NO:316) |
| TfR9.5A scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTEYAMHWVRQAPGQGL EWMGGINPNDGGTSYNQKFKGR VTSTRDTSISTAYMELSRLRSDDT VVYYCASQRWLLRGGDYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO:323) | DVVMTQSPLSLPVTLGQPASIS CKSSQSLLDSDGKTYLNWFQ QRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYYCWQGTHFPQTFGGG TKVEIK (SEQ ID NO:314) |
| TfR9.5B scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTEYAMHWVRQAPGQGL EWMGGINPNDGGTSYNQKFKGR VTLTVDTSISTAYMELSRLRSDDT VVYYCASQRWLLRGGDYWGQGT | DVVMTQSPLSLPVTLGQPASIS CKSSQSLLDSDGKTYLNWLQ QRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYYCWQGTHFPQTFGGG |

[0430]

| | | |
|---|---|---|
| | LVTVSS (SEQ ID NO:324) | TKVEIK (SEQ ID NO:316) |
| 亲代 TfR12 scFv | QVQLQQPGSELVRPGASVKLSCK ASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGL EWIGNIYPGSGSSNYDEKFKNKAT LTVDTSSNTAYMQLSSLTSEDSAV YYCTRSSYYGNFDTMDNWGQGT SVTVSS (SEQ ID NO:32) | QIVLTQSPAIMSASPGEKVTM TCSASSSIRYMNWYQQKPVTS PKRWIYDTSTLASGVPARFSG SGSGTSYSLTISSMEAEDAATY YCHQRSSYPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:33) |
| TfR12.1A scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGL EWMGNIYPGSGSSNYDEKFKNRV TMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCARSSYYGNFDTMDNWGQG TTVTVSS (SEQ ID NO:325) | DIQLTQSPSFLSASVGDRVTIT CSASSSIRYMNWYQQKPGKA PKLLIYDTSTLASGVPSRFSGS GSGTEFTLTISSLQPEDFATYY CHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:326) |
| TfR12.1B scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGL EWMGNIYPGSGSSNYDEKFKNRV TLTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARSSYYGNFDTMDNWGQG TTVTVSS (SEQ ID NO:327) | QIQLTQSPSFLSASVGDRVTIT CSASSSIRYMNWYQQKPGKA PKRLIYDTSTLASGVPSRFSGS GSGTSYTLTISSLQPEDFATYY CHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:328) |
| TfR12.2A scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGL EWMGNIYPGSGSSNYDEKFKNRV TMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCARSSYYGNFDTMDNWGQG TTVTVSS (SEQ ID NO:325) | EIVLTQSPATLSLSPGERATLS CSASSSIRYMNWYQQKPGQA PRLLIYDTSTLASGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC HQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:329) |
| TfR12.2B scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGL EWMGNIYPGSGSSNYDEKFKNRV TLTVDTSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCARSSYYGNFDTMDNWGQG TTVTVSS (SEQ ID NO:330) | QIVLTQSPATLSLSPGERATLS CSASSSIRYMNWYQQKPGQA PRRLIYDTSTLASGIPARFSGS GSGTSFTLTISSLEPEDFAVYY CHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:331) |
| TfR12.3A scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGL EWMGNIYPGSGSSNYDEKFKNRV TMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCARSSYYGNFDTMDNWGQG TTVTVSS (SEQ ID NO:325) | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CSASSSIRYMNWYQQKPGKA PKLLIYDTSTLASGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:332) |
| TfR12.3B scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGL EWMGNIYPGSGSSNYDEKFKNRV TLTVDTSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCARSSYYGNFDTMDNWGQG TTVTVSS (SEQ ID NO:330) | QIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CSASSSIRYMNWYQQKPGKA PKRLIYDTSTLASGVPSRFSGS GSGTDYTLTISSLQPEDFATYY CHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:333) |
| TfR12.4A scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGL EWMGNIYPGSGSSNYDEKFKNRV TSTRDTSISTAYMELSRLRSDDTV VYYCARSSYYGNFDTMDNWGQG TTVTVSS (SEQ ID NO:334) | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CSASSSIRYMNWYQQKPGKA PKLLIYDTSTLASGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:332) |

[0431]

| | | |
|---|---|---|
| TfR1 2.4B scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGL EWMGNIYPGSGSSNYDEKFKNRV TLTVDTSISTAYMELSRLRSDDTV VYYCARSSYYGNFDTMDNWGQG TTVTVSS (SEQ ID NO:335) | QIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CSASSSIRYMNWYQQKPGKA PKRLIYDTSTLASGVPSRFSGS GSGTSYTLTISSLQPEDFATYY CHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:336) |
| TfR1 2.EB scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGL EWMGNIYPGSGSSSYAQKFQGRV TMTVDTSTNTVYMELSSLRSEDT AVYYCTRSSYYGNFDTMDNWGQ GTMVTVSS (SEQ ID NO:337) | DIQLTQSPSFLSASVGDRVTIT CRASSSIRYMNWYQQKPGKA PKRLIYDTSTLQSGVPSRFSGS GSGTEYTLTISSLQPEDFATYY CHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:338) |
| 亲代 TfR1 5 | QVQLQQPGSELVRPGASVKLSCK ASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGL EWIGNIYPGSGSSNYDEKFKSKAT LTVDTSSSTAYMQLNSLTSEDSAV YYCTRSSYYGNFDTMDNWGQGT SVTVSS (SEQ ID NO:38) | QIVLTQSPAIMSASPGEKVTM TCSASSSIRYMNWYQQKPVTS PKRWIYDTSTLASGVPARFSG SGSGTSYSLTISSMEAEDAATY YCHQRSSYPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:33) |
| TfR1 5.WH 1 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGL EWMGIIYPGSGSSNYAQKFQGRV TMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCTRSSYYGNFDTMDNWGQG TTVTVSS (SEQ ID NO:339) | DIQLTQSPSFLSASVGDRVTIT CRASSSIRYMNWYQQKPGKA PKRLIYDTSTLQSGVPSRFSGS GSGTEFTLTISSLQPEDFATYY CHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:340) |
| TfR1 5.WH 2 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGL EWMGIIYPGSGSSNYAQKFQGRV TMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCTRSSYYGNFDTMDNWGQG TTVTVSS (SEQ ID NO:339) | EIVLTQSPATLSLSPGERATLS CRASSSIRYMNWYQQKPGQA PRRLIYDTSNRATGIPARFSGS GSGTDFTLTISSLEPEDFAVYY CHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:341) |
| TfR1 5.WH 3 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGL EWMGIIYPGSGSSNYAQKFQGRV TMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCTRSSYYGNFDTMDNWGQG TTVTVSS (SEQ ID NO:339) | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASSSIRYLNWYQQKPGKAP KRLIYDTSSLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYC HQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:342) |
| TfR1 5.WH 4 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGL EWMGNIYPGSGSSSYAQKFQGRV TMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCTRSSYYGNFDTMDNWGQG TTVTVSS (SEQ ID NO:343) | DIQLTQSPSFLSASVGDRVTIT CRASSSIRYMNWYQQKPGKA PKRLIYDTSTLQSGVPSRFSGS GSGTEFTLTISSLQPEDFATYY CHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:340) |
| TfR1 5.WH 6 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGL EWMGNIYPGSGSSSYAQKFQGRV TMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCTRSSYYGNFDTMDNWGQG TTVTVSS (SEQ ID NO:343) | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASSSIRYLNWYQQKPGKAP KRLIYDTSSLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYC HQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:342) |
| TfR1 5.WH | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGL | DIQLTQSPSFLSASVGDRVTIT CRASSSIRYMNWYQQKPGKA |

[0432]

| | | |
|---|---|---|
| 7 | EWMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRV<br>TMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTA<br>VYYCTRSSYYGNFDTMDNWGQG<br>TTVTVSS (SEQ ID NO:344) | PKRLIYDTSTLQSGVPSRFSGS<br>GSGTEFTLTISSLQPEDFATYY<br>CHQRSSYPWTFGGGTKVEIK<br>(SEQ ID NO:340) |
| TfR1<br>5.WH<br>8 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK<br>ASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGL<br>EWMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRV<br>TMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTA<br>VYYCTRSSYYGNFDTMDNWGQG<br>TTVTVSS (SEQ ID NO:344) | EIVLTQSPATLSLSPGERATLS<br>CRASSSIRYMNWYQQKPGQA<br>PRRLIYDTSNRATGIPARFSGS<br>GSGTDFTLTISSLEPEDFAVYY<br>CHQRSSYPWTFGGGTKVEIK<br>(SEQ ID NO:341) |
| TfR1<br>5.WH<br>9 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK<br>ASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGL<br>EWMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRV<br>TMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTA<br>VYYCTRSSYYGNFDTMDNWGQG<br>TTVTVSS (SEQ ID NO:344) | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT<br>CRASSSIRYLNWYQQKPGKAP<br>KRLIYDTSSLQSGVPSRFSGSG<br>SGTDFTLTISSLQPEDFATYYC<br>HQRSSYPWTFGGGTKVEIK<br>(SEQ ID NO:342) |
| TfR1<br>5.WH<br>10 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK<br>ASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGL<br>EWMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRV<br>TLTVDTSTSTVYMELSSLRSEDTA<br>VYYCTRSSYYGNFDTMDNWGQG<br>TTVTVSS (SEQ ID NO:345) | DIQLTQSPSFLSASVGDRVTIT<br>CRASSSIRYMNWYQQKPGKA<br>PKRLIYDTSTLQSGVPSRFSGS<br>GSGTEFTLTISSLQPEDFATYY<br>CHQRSSYPWTFGGGTKVEIK<br>(SEQ ID NO:340) |
| TfR1<br>5.WH<br>11 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK<br>ASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGL<br>EWMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRV<br>TLTVDTSTSTVYMELSSLRSEDTA<br>VYYCTRSSYYGNFDTMDNWGQG<br>TTVTVSS (SEQ ID NO:345) | EIVLTQSPATLSLSPGERATLS<br>CRASSSIRYMNWYQQKPGQA<br>PRRLIYDTSNRATGIPARFSGS<br>GSGTDFTLTISSLEPEDFAVYY<br>CHQRSSYPWTFGGGTKVEIK<br>(SEQ ID NO:341) |
| TfR1<br>5.WH<br>12 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK<br>ASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGL<br>EWMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRV<br>TLTVDTSTSTVYMELSSLRSEDTA<br>VYYCTRSSYYGNFDTMDNWGQG<br>TTVTVSS (SEQ ID NO:345) | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT<br>CRASSSIRYLNWYQQKPGKAP<br>KRLIYDTSSLQSGVPSRFSGSG<br>SGTDFTLTISSLQPEDFATYYC<br>HQRSSYPWTFGGGTKVEIK<br>(SEQ ID NO:342) |

[0433] 实施例13:2+1抗TfR双特异性抗体对hCEMC/D3细胞中的TfR再循环和降解的影响

[0434] 理想的BBB转运分子将有效转运至脑中,而不会影响靶受体(在此情况下为TfR)的表达水平或定位。为了确定2+1抗TfR双特异性抗体对转铁蛋白受体的再循环的影响,采用FACS和蛋白质印迹法两者。

[0435] FACS方法:将HCMEC/D3细胞以1.5*10^5个细胞/孔接种于24孔板的100μL培养基(EBM2,Lonza)中。然后用20mg/ml的2+1抗TfR双特异性抗体处理细胞24小时,之后通过FACS Canto系统(BD Biosciences)处理。人IgG1同种型作为阴性对照包括在测定中。由于2+1抗TfR双特异性抗体对TfR顶端结构域具有特异性,因此将细胞用不与此域结合的b3/25Ab染色(Luria-Pérez R.,等人;Bol Med Hosp Infant Mex.2016;73(6):372-379),从而避免抗体竞争受体结合。为了定义2+1抗TfR双特异性抗体对TfR再循环的影响,将用每个单独的2+1抗TfR双特异性抗体处理的细胞的平均荧光强度(MFI)针对对于人IgG同种型所获得的平均荧光强度进行归一化。用2+1抗TfR双特异性抗体处理HCMEC/D3细胞导致细胞表面TfR表

达降低40-80％(图2)。

[0436] 选择这些克隆中的两个,即TfR9和TfR12,用于进一步工程化,并生成一组人源化抗体(实施例8和12)。有趣的是,一些衍生自TfR9的抗体克隆(即TfR9.1B和TfR9.5B)对受体再循环未表达出不利影响。相比之下,所有由TfR12生成的克隆均严重损害受体再循环(图3)。使用相同策略,基于TfR15(实施例8和12)生成一组人源化抗体,并鉴定出另一个抗体克隆TfR15.WH8,其对TfR再循环无不利影响(数据未示出)。

[0437] 为了验证FACS数据,通过蛋白质印迹对抗体处理后从HCMEC/D3获得的细胞裂解物中的TfR蛋白的总量进行量化。

[0438] 蛋白质印迹法:将HCMEC/D3细胞以每孔3*10^5个细胞接种于12孔板中的1mL培养基(EBM2,Lonza)中。然后将细胞暴露于20mg/ml的2+1抗TfR双特异性抗体持续24小时,之后通过蛋白质印迹(WB)来处理。作为对照,将另外的孔用人IgG1同种型对照(20mg/ml)或PBS处理。用冰冷的PBS洗涤两次后,使用刮刀将细胞收集至1.5ml微量离心管中。离心(2000g,5min)后,从管中去除上清液,并在含有蛋白酶抑制剂混合物(cOmplete™,迷你蛋白酶抑制剂混合物,Roche,#11836153001)的RIPA缓冲液(RO278,Sigma-Aldrich)中裂解细胞。然后将细胞在4℃下在章动器上孵育,然后在4℃下在台式离心机中以最大速度离心20分钟。接下来,将上清液转移至新管中,与LDS样品缓冲液(Invitrogen,#NP0007)混合,然后在加热块(95℃)上孵育5分钟。随后,将样品进行蛋白质凝胶电泳,然后将蛋白质转移至硝酸纤维素膜上。在室温下用封闭缓冲液(TBST+5％奶粉)处理膜1小时,之后在4℃下用1mg/ml的2+1抗TfR双特异性抗体(R&D Systems Inc,#MAB2474)探测24小时。此后,将膜用PBST洗涤4次,然后在室温下与1:3000稀释的HRP缀合山羊抗小鼠IgG1抗体(Jackson Immunoresearch,#115-035-003)孵育1小时。用PBST洗涤4次后,使用Supersignal West Pico试剂(ThermoFisher,#34580)对膜进行显色,使用iBright仪器进行成像和分析。接下来,将膜与剥离缓冲液(ThermoFisher,#21059)一起孵育以去除结合的抗体,之后用抗人b-肌动蛋白(Abcam,#ab8227)进行探测以用于量化目的。将每种抗体的TfR带密度归一化为其对应的b-肌动蛋白带密度。然后,将这些值归一化为从用人IgG1同种型处理的细胞获得的值。

[0439] 与FACS数据类似,用2+1抗TfR双特异性抗体处理HCMEC/D3细胞对TfR蛋白总量影响很小或无影响,特别是TfR9.1B对总蛋白水平无影响。相比之下,在暴露于由TfR12生成的人源化抗体后,HCMEC/D3中的总TfR蛋白极大地降低(图4)。

[0440] 实施例14:TfR9.1B的人源化变体的工程化

[0441] 选择人源化TfR9.1B进行进一步的亲和力优化。将TR9.1B的抗TfR scFv部分克隆至pComb3X噬菌粒载体(Addgene,Watertown MA)中,并使用重叠延伸聚合酶链式反应(PCR)诱变来生成随机化VH和VL文库,其由9E+07个不同序列的理论文库大小组成。将它们包装至噬菌体中,每个噬菌体携带并表达独特的VH/VL组合。使用可溶性生物素化TfR Avi-his蛋白以逐渐增加的严格性对噬菌体文库进行三轮淘选。第三轮后挑取单个群落,并通过ELISA针对结合筛选周质提取物(PPE)中的scFv。在初始ELISA筛选后,选择9_1B scFv变体中的46个以克隆至BamHI与NotI位点之间的2+1‘臼’载体中(上文实施例9中所述),其为连接Fc部分与scFv部分的3x(G4S)接头的3’。如上(实施例9)所述在Expi293表达系统中表达和纯化此46种TfR9.1B 2+1双特异性抗体以用于进一步表征并列于下表19中。

[0442] 表19:亲和力优化的TfR9.1B变体序列重链和轻链序列加下划线。

[0443]

| 变体 | 抗TfR scFv序列 |
| --- | --- |
| **TfR9.1B.1** | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYA MHWVRQAPGQGLEWMGGINPNDGGTSYNQK FKGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC ASQRWLQRGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSG SGSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC KSSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLV SKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCWQGTHFPQSFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:228) |
| **TfR9.1B.2** | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYA MHWVRQAPGQGLEWMGGINPNDGGTSYNQKF KGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA SQRWLLRGGDHWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGS GSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVS KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:229) |
| **TfR9.1B.3** | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYA MHWVRQAPGQGLEWMGGINPNDGGTSYNQKF KGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA SQRWLERGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGS GSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVS KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQSFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:230) |
| **TfR9.1B.4** | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYA MHWVRQAPGQGLEWMGGINPNDGGTSYNQKF KGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA SQRWLERGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGS GSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSQSLLDSDGKIYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSK LDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:231) |
| **TfR9.1B.5** | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYA MHWVRQAPGQGLEWMGGINPNDGGTSYNQKF KGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA SQRWLLIGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSG SESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKS |

[0444]

| | |
|---|---|
| | SQSDLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSK LDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CWQGTSFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:232) |
| **TfR9.1B.6** | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYA MHWVRQAPGQGLEWMGGINPNDGGTSYNQKF KGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA SQRWLERGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGS GSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK TSQSLLDPDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVS KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:233) |
| **TfR9.1B.7** | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYA MHWVRQAPGQGLEWMGGINPNDGGTSYNQKF KGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA SQRWLQRGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKPSGS GSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSQSLKDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVS KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:234) |
| **TfR9.1B.8** | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYA MHWVRQAPGQGLEWMGGINPNDGGTSYNQKF KGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA SQRWLERGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGS GSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSKSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVS KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:235) |
| **TfR9.1B.9** | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYA MHWVRQAPGQGLEWMGGINPNDGGTSYNQKF KGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA SQRWLERGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGS GSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSVSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVS KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:236) |
| **TfR9.1B.10** | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYA MHWVRQAPGQGLEWMGGINPNDGGTSYNQKF KGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA SQGWLLRGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGS GSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVS KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:237) |

[0445]

| | |
|---|---|
| **TfR9.1B.11** | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYA MHWVRQAPGQGLEWMGGINPNDGGTSYNQKF KGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA SQRWLERGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGS GSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSQSLLDSDGVTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVS KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:238) |
| **TfR9.1B.12** | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYA MHWVRQAPGQGLEWMGGINPNDGGTSYNQKF KGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA SQRWLERGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGS GSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVS KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:239) |
| **TfR9.1B.14** | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYA MHWVRQAPGQGLEWMGGINPNDGGTHYNQK FKGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC ASQRWLLRGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSG SGSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC KSSRSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLV SKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:240) |
| **TfR9.1B.15** | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYA MHWVRQAPGQGLEWMGGINPNDGGTSYSQKF KGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA SQRWLERGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGS GSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSQSLLDKDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVS KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:241) |
| **TfR9.1B.16** | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYA MHWVRQAPGQGLEWMGGINPNDSGTSYNQKF KGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA SQRWLERGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGS GSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVS KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:242) |
| **TfR9.1B.17** | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYA MHWVRQAPGQGLEWMGGINPNDGGTSYNQKF KGRVTMTVDTSTSTAYMELSNLRSEDTAVYYC ASQRWLLKGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSG |

[0446]

| | |
|---|---|
| | SGSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC KSSQSLLDSDGITYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVS KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:243) |
| **TfR9.1B.18** | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYA MHWVRQAPGQGLEWMGGINPNDGGTSYNQKF KGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA SQRWLERGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGS GSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSTSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVS KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:244) |
| **TfR9.1B.19** | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYA MHWVRQAPGQGLEWMGGINPNDGGTSYNQKF KGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA SQRWLQRGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGS GSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVS KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:245) |
| **TfR9.1B.20** | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYA MHWVRQAPGQGLEWMGGINPNDGGTSYNQKF KGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA SQRWLQRGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGS GSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVS KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTKFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:246) |
| **TfR9.1B.21** | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYA MHWVRQAPGQGLEWMGGINPNDGGTSYNQKF KGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA SQRWLERGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGS GSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSQSLLDSDGRTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVS KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:247) |
| **TfR9.1B.22** | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYA MHWVRQAPGQGLEWMGGINPKDGGTSYNQKF KGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA SQGWLLRGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGS GSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVS KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY |

[0447]

| | |
|---|---|
| | YCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:248) |
| **TfR9.1B.23** | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYA MHWVRQAPGQGLEWMGGINPNDGGTSYNQKF KGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA SQRWLQRGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGS GSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSQSLIDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSK LDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:249) |
| **TfR9.1B.24** | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYA MHWVRQAPGQGLEWMGGINPNDGGTSYNQKF KGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA SQRWLMRGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSSS GSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVS KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:250) |
| **TfR9.1B.25** | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEHA MHWVRQAPGQGLEWMGGINPNDGGTSTNQKF KGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA SQGWLLRGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGS GSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSVSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVS KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:251) |
| **TfR9.1B.26** | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYA MHWVRQAPGQGLEWMGGINPNDGGTSYNQKF KGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA SQGWLLRGGDYWGQGTLVTVSSGGSEDKSSGS GSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSQSLLDSDGVTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVS KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:252) |
| **TfR9.1B.27** | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYA MHWVRQAPGQGLEWMGGINPNDGGTSYNQKF KGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA SQRWLERGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGS GSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSQSLLDEDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVS KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:253) |
| **TfR9.1B.28** | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYA MHWVRQAPGQGLEWMGGINPNDGGTSYNQKF KGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA |

[0448]

| | |
|---|---|
| | SQRWLQRGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGS GSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSQSLEDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVS KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:254) |
| **TfR9.1B.29** | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTEYA MHWVRQAPGQGLEWMGGINPNDGGTSYNQKF KGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA SQRWLERGGNYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGS GSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVS KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:255) |
| **TfR9.1B.30** | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYA MHWVRQAPGQGLEWMGGINPNDGGTSYNQKF KGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA SQRWLFRGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGS GSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVS KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:256) |
| **TfR9.1B.31** | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYA MHWVRQAPGQGLEWMGGINPNDGGTSYNQKF KGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA SQRWLQRGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGS GSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSQSLQDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVS KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:257) |
| **TfR9.1B.32** | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYA MHWVRQAPGQGLEWMGGINPNDGGTSYNQKF KGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA SQRSLLRGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSG SESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKP SQSLLDGDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSK LDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:258) |
| **TfR9.1B.33** | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYA MHWVRQAPGQGLEWMGGINPNDGGTSYNQKF KGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA SQRWLYRGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGS GSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSQSLLDEDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYQVS KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY |

[0449]

| | |
|---|---|
| | YCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:259) |
| **TfR9.1B.34** | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYA MHWVRQAPGQGLEWMGGINPNDGGTSYNQKF KGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA SQRWLERGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGS GSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK TSQSLLDPDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVS KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQSTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:261) |
| **TfR9.1B.35** | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYA MHWVRQAPGQGLEWMGGINPNDGGTSYNQKF KGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA SQGWLLRGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGS GSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVS KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY HCWQGTHFPQSFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:262) |
| **TfR9.1B.36** | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYA MHWVRQAPGQGLEWMGGINPNDGGTSYNQKF KGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA SQRWLERGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGS GSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSQSLLDSDGVTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVS KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:263) |
| **TfR9.1B.37** | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYA MHWVRQAPGQGLEWMGGINPNDGGTFYNQKF KGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA SQGWLLRGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGS GSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVS KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:264) |
| **TfR9.1B.38** | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYA MHWVRQAPGQGLEWMGGINPNDGGTSYAQKF KGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA SQRWLNRGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGS GSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVS KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:265) |
| **TfR9.1B.39** | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYA MHWVRQAPGQGLEWMGGINPNDGGTSYNQKF KGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA |

| | |
|---|---|
| | SQGWLLRGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGS GSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK ASQSLLDEDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVS KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:266) |
| **TfR9.1B.40** | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYA MHWVRQAPGQGLEWMGGINPNDGGTSYNQKF KGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA SQRWLDRGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGS GSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVS KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTQFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:267) |
| **TfR9.1B.41** | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYA MHWVRQAPGQGLEWMGGINPNDGGTHYNQK FKGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC ASQRWLLRGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSG SGSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC KSSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLV SKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:268) |
| [0450] **TfR9.1B.42** | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYA MHWVRQAPGQGLEWMGGINPNDGGTSYNQKF KGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA SQRELLRGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSG SESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKS SQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSK LDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:269) |
| **TfR9.1B.43** | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYA MHWVRQAPGQGLEWMGGINPNDGGTSYLQKF KGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA SQRWLLRGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGS GSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVS KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:270) |
| **TfR9.1B.44** | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYA MHWVRQAPGQGLEWMGGINPNDGGTSYNQKF KGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA SQRWLLRGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGS GSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSQSLLDSIGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSK LDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:271) |

[0451]

| | |
|---|---|
| **TfR9.1B.45** | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYA MHWVRQAPGQGLEWMGGINPNDGGTSYNQKF KGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA SQGWLQRGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGS GSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSVSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVS KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:272) |
| **TfR9.1B.46** | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYA MHWVRQAPGQGLEWMGGINPNDGGTSYLQKF KGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA SQRWLLRGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGS GSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSQSLLDSIGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSK LDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:273) |

[0452] 表20-亲和力优化的TfR9.1B变体的可变重链结构域和可变轻链结构域

[0453]

| 抗体 | VH 序列 | VL 序列 |
|---|---|---|
| TfR9.1B.1 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGINPNDGGTS YNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQ RWLQRGGDYWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:346) | DVVMTQSPLSLPVTLGQP ASISCKSSQSLLDSDGKTY LNWLQQRPGQSPRRLIYL VSKLDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQSFGGGTK VEIK (SEQ ID NO:347) |
| TfR9.1B.2 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGINPNDGGTS YNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQ RWLLRGGDHWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:348) | DVVMTQSPLSLPVTLGQP ASISCKSSQSLLDSDGKTY LNWLQQRPGQSPRRLIYL VSKLDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTK VEIK (SEQ ID NO:316) |
| TfR9.1B.3 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGINPNDGGTS YNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQ RWLERGGDYWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:349) | DVVMTQSPLSLPVTLGQP ASISCKSSQSLLDSDGKTY LNWLQQRPGQSPRRLIYL VSKLDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQSFGGGTK VEIK (SEQ ID NO:347) |
| TfR9.1B.4 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGINPNDGGTS YNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQ RWLERGGDYWGQGTLVTVS | DVVMTQSPLSLPVTLGQP ASISCKSSQSLLDSDGKIY LNWLQQRPGQSPRRLIYL VSKLDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTK |

[0454]

| | | |
|---|---|---|
| | S (SEQ ID NO:349) | VEIK (SEQ ID NO:350) |
| TfR9.1B.5 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGINPNDGGTS YNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQ RWLLIGGDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:351) | DVVMTQSPLSLPVTLGQP ASISCKSSQSDLDSDGKTY LNWLQQRPGQSPRRLIYL VSKLDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTSFPQTFGGGTK VEIK (SEQ ID NO:352) |
| TfR9.1B.6 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGINPNDGGTS YNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQ RWLERGGDYWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:349) | DVVMTQSPLSLPVTLGQP ASISCKTSQSLLDPDGKTY LNWLQQRPGQSPRRLIYL VSKLDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTK VEIK (SEQ ID NO:353) |
| TfR9.1B.7 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGINPNDGGTS YNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQ RWLQRGGDYWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:346) | DVVMTQSPLSLPVTLGQP ASISCKSSQSLKDSDGKTY LNWLQQRPGQSPRRLIYL VSKLDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTK VEIK (SEQ ID NO:354) |
| TfR9.1B.8 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGINPNDGGTS YNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQ RWLERGGDYWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:349) | DVVMTQSPLSLPVTLGQP ASISCKSSKSLLDSDGKTY LNWLQQRPGQSPRRLIYL VSKLDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTK VEIK (SEQ ID NO:355) |
| TfR9.1B.9 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGINPNDGGTS YNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQ RWLERGGDYWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:349) | DVVMTQSPLSLPVTLGQP ASISCKSSVSLLDSDGKTY LNWLQQRPGQSPRRLIYL VSKLDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTK VEIK (SEQ ID NO:356) |
| TfR9.1B.10 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGINPNDGGTS YNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQ GWLLRGGDYWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:357) | DVVMTQSPLSLPVTLGQP ASISCKSSQSLLDSDGKTY LNWLQQRPGQSPRRLIYL VSKLDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTK VEIK (SEQ ID NO:316) |
| TfR9.1B.11 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGINPNDGGTS YNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQ RWLERGGDYWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:349) | DVVMTQSPLSLPVTLGQP ASISCKSSQSLLDSDGVTY LNWLQQRPGQSPRRLIYL VSKLDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTK VEIK (SEQ ID NO:358) |

[0455]

| | | |
|---|---|---|
| TfR9.1B.12 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGINPNDGGTS YNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQ RWLERGGDYWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:349) | DVVMTQSPLSLPVTLGQP ASISCKSSQSLLDSDGKTY LNWLQQRPGQSPRRLIYL VSKLDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTK VEIK (SEQ ID NO:316) |
| TfR9.1B.14 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGINPNDGGTH YNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQ RWLLRGGDYWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:359) | DVVMTQSPLSLPVTLGQP ASISCKSSRSLLDSDGKTY LNWLQQRPGQSPRRLIYL VSKLDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTK VEIK (SEQ ID NO:360) |
| TfR9.1B.15 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGINPNDGGTS YSQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQ RWLERGGDYWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:361) | DVVMTQSPLSLPVTLGQP ASISCKSSQSLLDKDGKT YLNWLQQRPGQSPRRLIY LVSKLDSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGV YYCWQGTHFPQTFGGGT KVEIK (SEQ ID NO:362) |
| TfR9.1B.16 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGINPNDSGTS YNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQ RWLERGGDYWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:363) | DVVMTQSPLSLPVTLGQP ASISCKSSQSLLDSDGKTY LNWLQQRPGQSPRRLIYL VSKLDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTK VEIK (SEQ ID NO:316) |
| TfR9.1B.17 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGINPNDGGTS YNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSNLRSEDTAVYYCASQ RWLLKGGDYWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:364) | DVVMTQSPLSLPVTLGQP ASISCKSSQSLLDSDGITY LNWLQQRPGQSPRRLIYL VSKLDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTK VEIK (SEQ ID NO:365) |
| TfR9.1B.18 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGINPNDGGTS YNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQ RWLERGGDYWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:349) | DVVMTQSPLSLPVTLGQP ASISCKSSTSLLDSDGKTY LNWLQQRPGQSPRRLIYL VSKLDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTK VEIK (SEQ ID NO:366) |
| TfR9.1B.19 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGINPNDGGTS YNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQ RWLQRGGDYWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:346) | DVVMTQSPLSLPVTLGQP ASISCKSSQSLLDSDGKTY LNWLQQRPGQSPRRLIYL VSKLDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTK VEIK (SEQ ID NO:316) |
| TfR9.1B.20 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV | DVVMTQSPLSLPVTLGQP |

[0456]

| | | |
|---|---|---|
| | SCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGINPNDGGTS YNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQ RWLQRGGDYWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:346) | ASISCKSSQSLLDSDGKTY LNWLQQRPGQSPRRLIYL VSKLDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTKFPQTFGGGTK VEIK (SEQ ID NO:367) |
| TfR9.1B.21 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGINPNDGGTS YNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQ RWLERGGDYWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:349) | DVVMTQSPLSLPVTLGQP ASISCKSSQSLLDSDGRTY LNWLQQRPGQSPRRLIYL VSKLDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTK VEIK (SEQ ID NO:368) |
| TfR9.1B.22 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGINPKDGGTS YNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQ GWLLRGGDYWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:369) | DVVMTQSPLSLPVTLGQP ASISCKSSQSLLDSDGKTY LNWLQQRPGQSPRRLIYL VSKLDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTK VEIK (SEQ ID NO:316) |
| TfR9.1B.23 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGINPNDGGTS YNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQ RWLQRGGDYWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:346) | DVVMTQSPLSLPVTLGQP ASISCKSSQSLIDSDGKTY LNWLQQRPGQSPRRLIYL VSKLDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTK VEIK (SEQ ID NO:370) |
| TfR9.1B.24 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGINPNDGGTS YNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQ RWLMRGGDYWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:371) | DVVMTQSPLSLPVTLGQP ASISCKSSQSLLDSDGKTY LNWLQQRPGQSPRRLIYL VSKLDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTK VEIK (SEQ ID NO:316) |
| TfR9.1B.25 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTEHAMHWVRQ APGQGLEWMGGINPNDGGTS TNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQ GWLLRGGDYWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:372) | DVVMTQSPLSLPVTLGQP ASISCKSSVSLLDSDGKTY LNWLQQRPGQSPRRLIYL VSKLDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTK VEIK (SEQ ID NO:356) |
| TfR9.1B.26 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGINPNDGGTS YNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQ GWLLRGGDYWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:357) | DVVMTQSPLSLPVTLGQP ASISCKSSQSLLDSDGVTY LNWLQQRPGQSPRRLIYL VSKLDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTK VEIK (SEQ ID NO:358) |
| TfR9.1B.27 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTEYAMHWVRQ | DVVMTQSPLSLPVTLGQP ASISCKSSQSLLDEDGKTY |

[0457]

| | | |
|---|---|---|
| | APGQGLEWMGGINPNDGGTS YNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQ RWLERGGDYWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:349) | LNWLQQRPGQSPRRLIYL VSKLDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTK VEIK (SEQ ID NO:373) |
| TfR9.1B.28 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGINPNDGGTS YNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQ RWLQRGGDYWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:346) | DVVMTQSPLSLPVTLGQP ASISCKSSQSLEDSDGKTY LNWLQQRPGQSPRRLIYL VSKLDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTK VEIK (SEQ ID NO:374) |
| TfR9.1B.29 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYAFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGINPNDGGTS YNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQ RWLERGGNYWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:375) | DVVMTQSPLSLPVTLGQP ASISCKSSQSLLDSDGKTY LNWLQQRPGQSPRRLIYL VSKLDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTK VEIK (SEQ ID NO:316) |
| TfR9.1B.30 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGINPNDGGTS YNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQ RWLFRGGDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:376) | DVVMTQSPLSLPVTLGQP ASISCKSSQSLLDSDGKTY LNWLQQRPGQSPRRLIYL VSKLDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTK VEIK (SEQ ID NO:316) |
| TfR9.1B.31 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGINPNDGGTS YNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQ RWLQRGGDYWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:346) | DVVMTQSPLSLPVTLGQP ASISCKSSQSLQDSDGKTY LNWLQQRPGQSPRRLIYL VSKLDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTK VEIK (SEQ ID NO:377) |
| TfR9.1B.32 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGINPNDGGTS YNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQ RSLLRGGDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:378) | DVVMTQSPLSLPVTLGQP ASISCKPSQSLLDGDGKT YLNWLQQRPGQSPRRLIY LVSKLDSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGV YYCWQGTHFPQTFGGGT KVEIK (SEQ ID NO:379) |
| TfR9.1B.33 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGINPNDGGTS YNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQ RWLYRGGDYWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:380) | DVVMTQSPLSLPVTLGQP ASISCKSSQSLLDEDGKTY LNWLQQRPGQSPRRLIYQ VSKLDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTK VEIK (SEQ ID NO:381) |
| TfR9.1B.34 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGINPNDGGTS | DVVMTQSPLSLPVTLGQP ASISCKTSQSLLDPDGKTY LNWLQQRPGQSPRRLIYL |

[0458]

| | | |
|---|---|---|
| | YNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQ RWLERGGDYWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:349) | VSKLDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQSTHFPQTFGGGTK VEIK (SEQ ID NO:382) |
| TfR9.1B.35 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGINPNDGGTS YNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQ GWLLRGGDYWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:357) | DVVMTQSPLSLPVTLGQP ASISCKSSQSLLDSDGKTY LNWLQQRPGQSPRRLIYL VSKLDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVY HCWQGTHFPQSFGGGTK VEIK (SEQ ID NO:383) |
| TfR9.1B.36 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGINPNDGGTS YNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQ RWLERGGDYWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:349) | DVVMTQSPLSLPVTLGQP ASISCKSSQSLLDSDGVTY LNWLQQRPGQSPRRLIYL VSKLDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTK VEIK (SEQ ID NO:358) |
| TfR9.1B.37 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGINPNDGGTF YNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQ GWLLRGGDYWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:384) | DVVMTQSPLSLPVTLGQP ASISCKSSQSLLDSDGKTY LNWLQQRPGQSPRRLIYL VSKLDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTK VEIK (SEQ ID NO:316) |
| TfR9.1B.38 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGINPNDGGTS YAQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQ RWLNRGGDYWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:385) | DVVMTQSPLSLPVTLGQP ASISCKSSQSLLDSDGKTY LNWLQQRPGQSPRRLIYL VSKLDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTK VEIK (SEQ ID NO:316) |
| TfR9.1B.39 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGINPNDGGTS YNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQ GWLLRGGDYWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:357) | DVVMTQSPLSLPVTLGQP ASISCKASQSLLDEDGKT YLNWLQQRPGQSPRRLIY LVSKLDSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGV YYCWQGTHFPQTFGGGT KVEIK (SEQ ID NO:386) |
| TfR9.1B.40 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGINPNDGGTS YNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQ RWLDRGGDYWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:387) | DVVMTQSPLSLPVTLGQP ASISCKSSQSLLDSDGKTY LNWLQQRPGQSPRRLIYL VSKLDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTQFPQTFGGGTK VEIK (SEQ ID NO:388) |
| TfR9.1B.41 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGINPNDGGTH YNQKFKGRVTMTVDTSTSTA | DVVMTQSPLSLPVTLGQP ASISCKSSQSLLDSDGKTY LNWLQQRPGQSPRRLIYL VSKLDSGVPDRFSGSGSG |

[0459]

| | | |
|---|---|---|
| | YMELSSLRSEDTAVYYCASQ RWLLRGGDYWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:359) | TDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTK VEIK (SEQ ID NO:316) |
| TfR9.1B.42 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGINPNDGGTS YNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQ RELLRGGDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:389) | DVVMTQSPLSLPVTLGQP ASISCKSSQSLLDSDGKTY LNWLQQRPGQSPRRLIYL VSKLDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTK VEIK (SEQ ID NO:316) |
| TfR9.1B.43 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGINPNDGGTS YLQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQ RWLLRGGDYWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:390) | DVVMTQSPLSLPVTLGQP ASISCKSSQSLLDSDGKTY LNWLQQRPGQSPRRLIYL VSKLDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTK VEIK (SEQ ID NO:316) |
| TfR9.1B.44 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGINPNDGGTS YNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQ RWLLRGGDYWGQGTLVTVS SGGSEGKSS (SEQ ID NO:391) | DVVMTQSPLSLPVTLGQP ASISCKSSQSLLDSIGKTY LNWLQQRPGQSPRRLIYL VSKLDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTK VEIK (SEQ ID NO:392) |
| TfR9.1B.45 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGINPNDGGTS YNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQ GWLQRGGDYWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:393) | DVVMTQSPLSLPVTLGQP ASISCKSSVSLLDSDGKTY LNWLQQRPGQSPRRLIYL VSKLDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTK VEIK (SEQ ID NO:356) |
| TfR9.1B.46 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGINPNDGGTS YLQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQ RWLLRGGDYWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:390) | DVVMTQSPLSLPVTLGQP ASISCKSSQSLLDSIGKTY LNWLQQRPGQSPRRLIYL VSKLDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPQTFGGGTK VEIK (SEQ ID NO:392) |

[0460] 选择克隆TfR9.1B.39作为另一轮随机诱变的模板,以去除两个潜在的异构化位点(VL中的D34和VH中的D62)。使用生物素化人和食蟹猴TfR Avi-His蛋白作为诱饵进行淘选和ELISA筛选,选择具有两个潜在固定的异构化位点的七个突变体,以2+1双特异性形式克隆至同一载体中,并用于进一步表征(参见表21)。

[0461] 表21:TfR9.1B.39变体序列(VH和VL序列加下划线)

[0462]

| 变体 | 抗 TfR scFv 序列 |
|---|---|
| TfR9.1B.39 scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGINPNDGGTSYNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQGWLLRGGDYWGQGTLVTVS SGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCKASQSLLDEDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPQTF GGGTKVEIK (SEQ ID NO:274) |
| TfR9.1B.39.5 scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGIDPRSGGTSYNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQGWLKRGGDYWGQGTLVTVS SGGSEGRSSGSGSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCKASQSLLDEEGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPQTF GGGTKVEIK (SEQ ID NO:275) |
| TfR9.1B.39.8 scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGIDPRSGGTSYNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQGWLQRGGDYWGQGTLVTVS SGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCKASQSLLDEEGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPQTF GGGTKVEIK (SEQ ID NO:276) |
| TfR9.1B.39.36 scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGIDPNTGGTSYNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQGWLLRGGDYWGQGTLVTVS SGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCKASQSLLDEEGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPQTF GGGTKVEIK (SEQ ID NO:277) |
| TfR9.1B.39.37 scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGIAPGTGGTSYNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQGWLLRGGDYWGQGTLVTVS SGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCKASQSLLDEEGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPQTF GGGTKVEIK (SEQ ID NO:278) |
| TfR9.1B.39.38 scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGIAPNTGGTSYNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQGWLLRGGDYWGQGTLVTVS SGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCKASQSLLDEGGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPQTF GGGTKVEIK (SEQ ID NO:279) |
| TfR9.1B.39.39 scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYAMHWVRQ APGQGLEWMGGINPSFGGTSYNQKFKGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASQGWLLRGGDYWGQGTLVTVS SGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCKASQSLLDEEGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPQTF GGGTKVEIK (SEQ ID NO:280) |

[0463]

| | |
|---|---|
| TfR9.1B.39.40 scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYAMHWVRQAPGQGLEWMGGINPKEGGTSYNQKFKGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCASQGWLLRGGDYWGQGTLVTVSSGGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKASQSLLDEDQKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:281) |

[0464] 表22-TfR9.1B.39变体的可变重链结构域和可变轻链结构域

[0465]

| 抗体 | VH 序列 | VL 序列 |
|---|---|---|
| TfR9.1B.39 scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYAMHWVRQAPGQGLEWMGGINPNDGGTSYNQKFKGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCASQGWLLRGGDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:357) | DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKASQSLLDEDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:386) |
| TfR9.1B.39.5 scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYAMHWVRQAPGQGLEWMGGIDPRSGGTSYNQKFKGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCASQGWLKRGGDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:394) | DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKASQSLLDEEGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:395) |
| TfR9.1B.39.8 scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYAMHWVRQAPGQGLEWMGGIDPRSGGTSYNQKFKGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCASQGWLQRGGDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:396) | DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKASQSLLDEEGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:395) |
| TfR9.1B.39.36 scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYAMHWVRQAPGQGLEWMGGIDPNTGGTSYNQKFKGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCASQGWLLRGGDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:397) | DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKASQSLLDEEGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:395) |
| TfR9.1B.39.37 scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYAMHWVRQAPGQGLEWMGGIAPGTGGTSYNQKFKGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCASQGWLLRGGDY | DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKASQSLLDEEGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID |

| | | |
|---|---|---|
| | WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:398) | NO:395) |
| TfR9.1B.39.38 scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYAMHWVRQAPGQGLEWMGGIAPNTGGTSYNQKFKGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCASQGWLLRGGDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:399) | DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKASQSLLDEGGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:400) |
| TfR9.1B.39.39 scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYAMHWVRQAPGQGLEWMGGINPSFGGTSYNQKFKGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCASQGWLLRGGDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:401) | DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKASQSLLDEEGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:395) |
| TfR9.1B.39.40 scFv | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYAMHWVRQAPGQGLEWMGGINPKEGGTSYNQKFKGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCASQGWLLRGGDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:402) | DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKASQSLLDEDQKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:403) |

[0466]

[0467] 表23:亲和力优化的TfR9.1B.39变体的CDR序列(Kabat定义)

| **变体** | **CDR-H1** | **CDR-H2** | **CDR-H3** |
|---|---|---|---|
| TfR9.1B.39 | EYAMH (SEQ ID NO:94) | GINPNDGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO:95) | QGWLLRGGDY (SEQ ID NO:418) |
| TfR9.1B.39.5 | EYAMH (SEQ ID NO:94) | GIDPRSGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO:412) | QGWLKRGGDY (SEQ ID NO:419) |
| TfR9.1B.39.8 | EYAMH (SEQ ID NO:94) | GIDPRSGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO:412) | QGWLQRGGDY (SEQ ID NO:420) |
| TfR9.1B.39.36 | EYAMH (SEQ ID NO:94) | GIDPNTGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO:413) | QGWLLRGGDY (SEQ ID NO:418) |
| TfR9.1B.39.37 | EYAMH (SEQ ID NO:94) | GIAPGTGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO:414) | QGWLLRGGDY (SEQ ID NO:418) |
| TfR9.1B.39.38 | EYAMH (SEQ ID NO:94) | GIAPNTGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO:415) | QGWLLRGGDY (SEQ ID NO:418) |
| TfR9.1B.39.39 | EYAMH (SEQ ID NO:94) | GINPSFGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO:416) | QGWLLRGGDY (SEQ ID NO:418) |
| TfR9.1B.39.40 | EYAMH (SEQ ID NO:94) | GINPKEGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO:417) | QGWLLRGGDY (SEQ ID NO:418) |
| **变体** | **CDR-L1** | **CDR-L2** | **CDR-L3** |
| TfR9.1B.39 | KASQSLLDEDG | LVSKLDS (SEQ ID | WQGTHFPQT |

[0468]

[0469]

| | | | |
|---|---|---|---|
| | KTYLN (SEQ ID NO:421) | NO:150) | (SEQ ID NO:151) |
| TfR9.1B.39.5 | KASQSLLDEEG KTYLN (SEQ ID NO:422) | LVSKLDS (SEQ ID NO:150) | WQGTHFPQT (SEQ ID NO:151) |
| TfR9.1B.39.8 | KASQSLLDEEG KTYLN (SEQ ID NO:422) | LVSKLDS (SEQ ID NO:150) | WQGTHFPQT (SEQ ID NO:151) |
| TfR9.1B.39.36 | KASQSLLDEEG KTYLN (SEQ ID NO:422) | LVSKLDS (SEQ ID NO:150) | WQGTHFPQT (SEQ ID NO:151) |
| TfR9.1B.39.37 | KASQSLLDEEG KTYLN (SEQ ID NO:422) | LVSKLDS (SEQ ID NO:150) | WQGTHFPQT (SEQ ID NO:151) |
| TfR9.1B.39.38 | KASQSLLDEGG KTYLN (SEQ ID NO:423) | LVSKLDS (SEQ ID NO:150) | WQGTHFPQT (SEQ ID NO:151) |
| TfR9.1B.39.39 | KASQSLLDEEG KTYLN (SEQ ID NO:422) | LVSKLDS (SEQ ID NO:150) | WQGTHFPQT (SEQ ID NO:151) |
| TfR9.1B.39.40 | KASQSLLDEDQ KTYLN (SEQ ID NO:424) | LVSKLDS (SEQ ID NO:150) | WQGTHFPQT (SEQ ID NO:151) |

[0470] 实施例15:人源化TfR15抗体的工程化

[0471] 对人源化TfR15进行工程化以优化对靶标的亲和力并去除VH(Trp 38)中的潜在氧化位点。WH7、WH8和WH12的DNA片段(其中Trp 38被Tyr替换)从GeneArt订购,并克隆至与上述相同的载体中。从Expi293表达系统表达和纯化蛋白质,并进行进一步表征。这些工程化变体的序列在下表24中提供。对TfR15.WH8.1.1进行优化(经由CDR的丙氨酸扫描)以产生具有一系列结合亲和力的变体(参见以下实施例16和17)。

[0472] 表24:具有去除的可靠性位点或降低的亲和力的TfR15变体

[0473]

| 抗体 | 序列 |
|---|---|
| TfR15.WH8 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPG QGLEWMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSL RSEDTAVYYCTRSSYYGNFDTMDNWGQGTTVTVSSGGSEGKSSG SGSESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSIRYMNWY QQKPGQAPRRLIYDTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDF AVYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 223) |

[0474]

| | |
|---|---|
| TfR15.WH7.1 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRSSYYGNFDTMDNWGQGTTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASSSIRYMNWYQQKPGKAPKRLIYDTSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:282) |
| TfR15.WH8.1 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRSSYYGNFDTMDNWGQGTTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSIRYMNWYQQKPGQAPRRLIYDTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:283) |
| TfR15.WH12.1 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRVTLTVDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRSSYYGNFDTMDNWGQGTTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSIRYLNWYQQKPGKAPKRLIYDTSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:284) |
| TfR15.WH8.1.1 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRSSYYGNFDTMDNWGQGTTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSIRAMNWYQQKPGQAPRRLIYDTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:404)与 TfR.15.WH8.1.42A 相同 |

[0475] 实施例16:人源化TfR.15.WH8.1变体的工程化

[0476] 对人源化TfR.15.WH8.1变体进行工程化以优化靶标亲和力。第一步是对CDR进行丙氨酸扫描,然后在CDR中的选定位置处进行氨基酸取代。为了对CDR进行丙氨酸扫描,从Integrated DNA Technologies(IDT)订购含有变体的DNA片段,并将其克隆至表达载体中。从Expi293细胞中表达和纯化蛋白质,并进行进一步表征。根据丙氨酸扫描结果(数据未示出),选择关键氨基酸位置进行进一步以下氨基酸取代:从丙氨酸(A)至甘氨酸(G)、天冬氨酸(D)、天冬酰胺(N)、组氨酸(H)、赖氨酸(K)、谷氨酰胺(Q)、谷氨酸(E)或丝氨酸(S)。存在3个额外变体,其中除了氨基酸取代之外,还交换VL和VH取向或改变接头。对于WH8.1.42A.LH变体,VH和VL取向交换为VL-接头-VH。对于WH8.1.42A.3x(G4S)变体,接头改变为(GGGGS)x3(SEQ ID NO:184)。对于WH8.1.42A.L1变体,接头改变为SPNSASHSGSAPQTSSAPGSQ(SEQ ID NO:442)(Hennecke等人,(1998)PEDS,11:405-410)。含有变体的DNA片段从IDT订购,并以2+2抗体形式克隆至表达载体中。如上所述,从Expi293表达系统中表达和纯化2+2抗体,并进行进一步表征。序列示于下表25-27中。

[0477] 表25:亲和力优化的TfR.15.WH8.1变体序列重链和轻链序列加下划线。

[0478]

| 变体 | 抗 TfR scFv 序列 |
| --- | --- |
| TFR.15.WH8.1 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRSSYYGNFDTMDNWGQGTTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSIRYMNWYQQKPGQAPRRLIYDTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:283) |
| TFR.15.WH8.1.24A | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRSAYYGNFDTMDNWGQGTTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSIRYMNWYQQKPGQAPRRLIYDTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:425) |

[0479]

| | |
|---|---|
| TFR.15.WH8.1.24K | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRSKYYGNFDTMDNWGQGTTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSIRYMNWYQQKPGQAPRRLIYDTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:426) |
| TFR.15.WH8.1.24D | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRSDYYGNFDTMDNWGQGTTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSIRYMNWYQQKPGQAPRRLIYDTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:427) |
| TFR.15.WH8.1.24N | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRSNYYGNFDTMDNWGQGTTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSIRYMNWYQQKPGQAPRRLIYDTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:428) |
| TFR.15.WH8.1.24H | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRSHYYGNFDTMDNWGQGTTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSIRYMNWYQQKPGQAPRRLIYDTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:429) |
| TFR.15.WH8.1.26K | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRSSYKGNFDTMDNWGQGTTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSIRYMNWYQQKPGQAPRRLIYDTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:430) |
| TFR.15.WH8.1.26Q | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRSSYQGNFDTMDNWGQGTTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSIRYMNWYQQKPGQAPRRLIYDTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:431) |
| TFR.15.WH8.1.26H | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRSSYHGNFDTMDNWGQGTTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSIRYMNWYQQKPGQAPRRLIYDTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:432) |
| TFR.15.WH8.1.26E | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRSSYEGNFDTMDNWGQGTTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSIRYMNWYQQKPGQAPRRLIYDTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:433) |
| TFR.15.WH8.1.26S | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRSSYSGNFDTMDNWGQGTTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSIRYMNWYQQKPGQAPRRLIYDTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:434) |
| TFR.15.WH8.1.42A | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRSSYYGNFDTMDNWGQGTTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGER |

| | |
|---|---|
| | ATLSCRASSSIRAMNWYQQKPGQAPRRLIYDTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:404) |
| TFR.15.WH8.1.42Q | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGNI YPGSGSSNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRSSYYGN FDTMDNWGQGTTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASSSIRQMNWYQQKPGQAPRRLIYDTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:435) |
| TFR.15.WH8.1.42H | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGNI YPGSGSSNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRSSYYGN FDTMDNWGQGTTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASSSIRHMNWYQQKPGQAPRRLIYDTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:436) |
| TFR.15.WH8.1.42D | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGNI YPGSGSSNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRSSYYGN FDTMDNWGQGTTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASSSIRDMNWYQQKPGQAPRRLIYDTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:437) |
| TFR.15.WH8.1.42S | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGNI YPGSGSSNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRSSYYGN FDTMDNWGQGTTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASSSIRSMNWYQQKPGQAPRRLIYDTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:438) |
| TFR.15.WH8.1.42K | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGNI YPGSGSSNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRSSYYGN FDTMDNWGQGTTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASSSIRKMNWYQQKPGQAPRRLIYDTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:439) |
| TFR.15.WH8.1.42A.LH | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSIRAMNWYQQKPGQAPRRLIYDTSNRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIKGGSE GKSSGSGSESKSTGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHW VRQAPGQGLEWMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSE DTAVYYCTRSSYYGNFDTMDNWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:440) |
| TFR.15.WH8.1.42A.3x(G4S) | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGNI YPGSGSSNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRSSYYGN FDTMDNWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLS CRASSSIRAMNWYQQKPGQAPRRLIYDTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSL EPEDFAVYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:441) |
| TFR.15.WH8.1.42A.L1 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGNI YPGSGSSNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRSSYYGN FDTMDNWGQGTTVTVSSSPNSASHSGSAPQTSSAPGSQEIVLTQSPATLSLSPGE RATLSCRASSSIRAMNWYQQKPGQAPRRLIYDTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTL TISSLEPEDFAVYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:442) |

[0480]

[0481] 表26-亲和力优化的TfR.15.WH8.1变体的可变重链结构域和可变轻链结构域

| 抗体 | VH 序列 | VL 序列 |
|---|---|---|
| TFR.15.WH8.1 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLE WMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRVT MTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAV YYCTRSSYYGNFDTMDNWGQGT TVTVSS (SEQ ID NO:443) | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASSSIRYMNWYQQKPGQAPR RLIYDTSNRATGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQR SSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:341) |

[0482]

[0483]

| | | |
|---|---|---|
| TFR.15.WH8.1.24A | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRSAYYGNFDTMDNWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:444) | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSIRYMNWYQQKPGQAPRRLIYDTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:341) |
| TFR.15.WH8.1.24K | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRSKYYGNFDTMDNWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:445) | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSIRYMNWYQQKPGQAPRRLIYDTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:341) |
| TFR.15.WH8.1.24D | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRSDYYGNFDTMDNWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:446) | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSIRYMNWYQQKPGQAPRRLIYDTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:341) |
| TFR.15.WH8.1.24N | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRSNYYGNFDTMDNWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:447) | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSIRYMNWYQQKPGQAPRRLIYDTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:341) |
| TFR.15.WH8.1.24H | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRSHYYGNFDTMDNWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:448) | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSIRYMNWYQQKPGQAPRRLIYDTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:341) |
| TFR.15.WH8.1.26K | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRSSYKGNFDTMDNWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:449) | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSIRYMNWYQQKPGQAPRRLIYDTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:341) |
| TFR.15.WH8.1.26Q | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRSSYQGNFDTMDNWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:450) | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSIRYMNWYQQKPGQAPRRLIYDTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:341) |
| TFR.15.WH8.1.26H | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRSSYHGNFDTMDNWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:451) | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSIRYMNWYQQKPGQAPRRLIYDTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:341) |
| TFR.15.WH8.1. | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLE | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSIRYMNWYQQKPGQAPR |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | 26E | WMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRVT MTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAV YYCTRSSYEGNFDTMDNWGQGTT VTVSS (SEQ ID NO:452) | RLIYDTSNRATGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQR SSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:341) |
| | TFR.15.WH8.1.26S | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLE WMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRVT MTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAV YYCTRSSYSGNFDTMDNWGQGTT VTVSS (SEQ ID NO:453) | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASSSIRYMNWYQQKPGQAPR RLIYDTSNRATGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQR SSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:341) |
| | TFR.15.WH8.1.42A | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLE WMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRVT MTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAV YYCTRSSYYGNFDTMDNWGQGT TVTVSS (SEQ ID NO:443) | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASSSIRAMNWYQQKPGQAPR RLIYDTSNRATGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQR SSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:454) |
| | TFR.15.WH8.1.42Q | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLE WMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRVT MTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAV YYCTRSSYYGNFDTMDNWGQGT TVTVSS (SEQ ID NO:443) | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASSSIRQMNWYQQKPGQAPR RLIYDTSNRATGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQR SSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:455) |
| [0484] | TFR.15.WH8.1.42H | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLE WMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRVT MTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAV YYCTRSSYYGNFDTMDNWGQGT TVTVSS (SEQ ID NO:443) | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASSSIRHMNWYQQKPGQAPR RLIYDTSNRATGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQR SSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:456) |
| | TFR.15.WH8.1.42D | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLE WMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRVT MTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAV YYCTRSSYYGNFDTMDNWGQGT TVTVSS (SEQ ID NO:443) | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASSSIRDMNWYQQKPGQAPR RLIYDTSNRATGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQR SSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:457) |
| | TFR.15.WH8.1.42S | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLE WMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRVT MTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAV YYCTRSSYYGNFDTMDNWGQGT TVTVSS (SEQ ID NO:443) | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASSSIRSMNWYQQKPGQAPRR LIYDTSNRATGIPARFSGSGSGT DFTLTISSLEPEDFAVYYCHQRS SYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:458) |
| | TFR.15.WH8.1.42K | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLE WMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRVT MTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAV YYCTRSSYYGNFDTMDNWGQGT TVTVSS (SEQ ID NO:443) | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASSSIRKMNWYQQKPGQAPR RLIYDTSNRATGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQR SSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:459) |

[0485]

| | | |
|---|---|---|
| TFR.15.WH8.1.42A.LH | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRSSYYGNFDTMDNWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:443) | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSIRAMNWYQQKPGQAPRRLIYDTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:454) |
| TFR.15.WH8.1.42A.3x(G4S) | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRSSYYGNFDTMDNWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:443) | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSIRAMNWYQQKPGQAPRRLIYDTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:454) |
| TFR.15.WH8.1.42A.L1 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGNIYPGSGSSNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRSSYYGNFDTMDNWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:443) | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSIRAMNWYQQKPGQAPRRLIYDTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:454) |

[0486] 表27:亲和力优化的TfR.15.WH8.1变体的CDR序列(Kabat定义)

[0487]

| 抗体 | CDR-H1 | CDR-H2 | CDR-H3 |
|---|---|---|---|
| TFR.15.WH8.1 | SYYMH (SEQ ID NO:460) | NIYPGSGSSNYAQKFQG (SEQ ID NO:312) | SSYYGNFDTMDN (SEQ ID NO:103) |
| TFR.15.WH8.1.24A | SYYMH (SEQ ID NO:460) | NIYPGSGSSNYAQKFQG (SEQ ID NO:312) | SAYYGNFDTMDN (SEQ ID NO:461) |
| TFR.15.WH8.1.24K | SYYMH (SEQ ID NO:460) | NIYPGSGSSNYAQKFQG (SEQ ID NO:312) | SKYYGNFDTMDN (SEQ ID NO:462) |
| TFR.15.WH8.1.24D | SYYMH (SEQ ID NO:460) | NIYPGSGSSNYAQKFQG (SEQ ID NO:312) | SDYYGNFDTMDN (SEQ ID NO:463) |
| TFR.15.WH8.1.24N | SYYMH (SEQ ID NO:460) | NIYPGSGSSNYAQKFQG (SEQ ID NO:312) | SNYYGNFDTMDN (SEQ ID NO:464) |
| TFR.15.WH8.1.24H | SYYMH (SEQ ID NO:460) | NIYPGSGSSNYAQKFQG (SEQ ID NO:312) | SHYYGNFDTMDN (SEQ ID NO:465) |
| TFR.15.WH8.1.26K | SYYMH (SEQ ID NO:460) | NIYPGSGSSNYAQKFQG (SEQ ID NO:312) | SSYKGNFDTMDN (SEQ ID NO:466) |
| TFR.15.WH8.1.26Q | SYYMH (SEQ ID NO:460) | NIYPGSGSSNYAQKFQG (SEQ ID NO:312) | SSYQGNFDTMDN (SEQ ID NO:467) |
| TFR.15.WH8.1.26H | SYYMH (SEQ ID NO:460) | NIYPGSGSSNYAQKFQG (SEQ ID NO:312) | SSYHGNFDTMDN (SEQ ID NO:468) |
| TFR.15.WH8.1.26E | SYYMH (SEQ ID NO:460) | NIYPGSGSSNYAQKFQG (SEQ ID NO:312) | SSYEGNFDTMDN (SEQ ID NO:469) |
| TFR.15.WH8.1.26S | SYYMH (SEQ ID NO:460) | NIYPGSGSSNYAQKFQG (SEQ ID NO:312) | SSYSGNFDTMDN (SEQ ID NO:470) |
| TFR.15.WH8.1.42A | SYYMH (SEQ ID NO:460) | NIYPGSGSSNYAQKFQG (SEQ ID NO:312) | SSYYGNFDTMDN (SEQ ID NO:103) |
| TFR.15.WH8.1.42Q | SYYMH (SEQ ID NO:460) | NIYPGSGSSNYAQKFQG (SEQ ID NO:312) | SSYYGNFDTMDN (SEQ ID NO:103) |
| TFR.15.WH8.1.42H | SYYMH (SEQ ID | NIYPGSGSSNYAQKF | SSYYGNFDTMDN |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | NO:460) | QG (SEQ ID NO:312) | (SEQ ID NO:103) |
| TFR.15.WH8.1.42D | SYYMH (SEQ ID NO:460) | NIYPGSGSSNYAQKF QG (SEQ ID NO:312) | SSYYGNFDTMDN (SEQ ID NO:103) |
| TFR.15.WH8.1.42S | SYYMH (SEQ ID NO:460) | NIYPGSGSSNYAQKF QG (SEQ ID NO:312) | SSYYGNFDTMDN (SEQ ID NO:103) |
| TFR.15.WH8.1.42K | SYYMH (SEQ ID NO:460) | NIYPGSGSSNYAQKF QG (SEQ ID NO:312) | SSYYGNFDTMDN (SEQ ID NO:103) |
| TFR.15.WH8.1.42A.LH | SYYMH (SEQ ID NO:460) | NIYPGSGSSNYAQKF QG (SEQ ID NO:312) | SSYYGNFDTMDN (SEQ ID NO:103) |
| TFR.15.WH8.1.42A.3x (G4S) | SYYMH (SEQ ID NO:460) | NIYPGSGSSNYAQKF QG (SEQ ID NO:312) | SSYYGNFDTMDN (SEQ ID NO:103) |
| TFR.15.WH8.1.42A.L1 | SYYMH (SEQ ID NO:460) | NIYPGSGSSNYAQKF QG (SEQ ID NO:312) | SSYYGNFDTMDN (SEQ ID NO:103) |
| **抗体** | **CDR-L1** | **CDR-L2** | **CDR-L3** |
| TFR.15.WH8.1 | RASSSIRYMN (SEQ ID NO:307) | DTSNRAT (SEQ ID NO:309) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TFR.15.WH8.1.24A | RASSSIRYMN (SEQ ID NO:307) | DTSNRAT (SEQ ID NO:309) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TFR.15.WH8.1.24K | RASSSIRYMN (SEQ ID NO:307) | DTSNRAT (SEQ ID NO:309) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TFR.15.WH8.1.24D | RASSSIRYMN (SEQ ID NO:307) | DTSNRAT (SEQ ID NO:309) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TFR.15.WH8.1.24N | RASSSIRYMN (SEQ ID NO:307) | DTSNRAT (SEQ ID NO:309) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TFR.15.WH8.1.24H | RASSSIRYMN (SEQ ID NO:307) | DTSNRAT (SEQ ID NO:309) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TFR.15.WH8.1.26K | RASSSIRYMN (SEQ ID NO:307) | DTSNRAT (SEQ ID NO:309) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TFR.15.WH8.1.26Q | RASSSIRYMN (SEQ ID NO:307) | DTSNRAT (SEQ ID NO:309) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TFR.15.WH8.1.26H | RASSSIRYMN (SEQ ID NO:307) | DTSNRAT (SEQ ID NO:309) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TFR.15.WH8.1.26E | RASSSIRYMN (SEQ ID NO:307) | DTSNRAT (SEQ ID NO:309) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TFR.15.WH8.1.26S | RASSSIRYMN (SEQ ID NO:307) | DTSNRAT (SEQ ID NO:309) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TFR.15.WH8.1.42A | RASSSIRAMN (SEQ ID NO:471) | DTSNRAT (SEQ ID NO:309) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TFR.15.WH8.1.42Q | RASSSIRQMN (SEQ ID NO:472) | DTSNRAT (SEQ ID NO:309) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TFR.15.WH8.1.42H | RASSSIRHMN (SEQ ID NO:473) | DTSNRAT (SEQ ID NO:309) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TFR.15.WH8.1.42D | RASSSIRDMN (SEQ ID NO:474) | DTSNRAT (SEQ ID NO:309) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TFR.15.WH8.1.42S | RASSSIRSMN (SEQ ID NO:475) | DTSNRAT (SEQ ID NO:309) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TFR.15.WH8.1.42K | RASSSIRKMN (SEQ ID NO:476) | DTSNRAT (SEQ ID NO:309) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TFR.15.WH8.1.42A.LH | RASSSIRAMN (SEQ ID NO:471) | DTSNRAT (SEQ ID NO:309) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TFR.15.WH8.1.42A.3x (G4S) | RASSSIRAMN (SEQ ID NO:471) | DTSNRAT (SEQ ID NO:309) | HQRSSYPWT (SEQ ID NO:157) |
| TFR.15.WH8.1.42A.L | RASSSIRAMN | DTSNRAT (SEQ ID | HQRSSYPWT (SEQ |

[0488]

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1 | (SEQ ID NO:471) | NO:309) | ID NO:157) |

[0489]

[0490] 实施例17:TfR.15.WH8.1变体的结合动力学

[0491] 使用Carterra LSA仪器(Carterra,Salt Lake City,UT)评价2+2TfR.15.WH8.1变体(具有2个抗TfR scFv的同种型IgG)与Avi-His标记的人和食蟹猴TfR顶端结构域的结合动力学。根据仪器制造商说明书,使用山羊抗人Fcγ多克隆抗体(JacksonImmunoResearch)在HC30M传感器芯片(Carterra)上制备捕获坪。如下进行两次独立实验,使得每种抗体的N介于一次与两次测定之间。产生小于20RU的分析物结合的点被排除在进一步分析之外。

[0492] 通过用运行缓冲液(HBS-EP+;Teknova)稀释并添加0.5mg/mL BSA(MP Biomedicals)来制备2+2抗TfR双特异性抗体,得到15μg/mL的终浓度并以阵列形式捕获在山羊抗人Fcγ捕获表面上。测试所捕获抗体与TfR顶端Avi-His的重组人和食蟹猴异种同源物结合的能力。通过使用单通道流动池在整个抗体阵列上注射每种分析物来生成亲和力的估计值。将TfR顶端Avi-His分析物用运行缓冲液稀释,由2500nM人和食蟹猴TfR顶端Avi-His开始,进行八次三倍连续稀释,然后进行两次10倍稀释。注射分析物持续5分钟,随后解离15分钟。每次分析物注射系列后,用10mM甘氨酸pH 2.0缓冲液(Carterra)使抗体再生。使用NextGenKIT高通量动力学分析软件(Carterra)来处理和分析数据。

[0493] 由结合至人和食蟹猴TfR顶端Avi-His的本公开的2+2抗TfR双特异性抗体的拟合的缔合和解离速率常数(k-on和k-off)计算平衡解离常数($K_D$)。对于N>1的测量,计算平均值和标准差,并将所有样品的测量值合并,并使用GraphPad Prism作图。$K_D$值总结于下表28中。如表中所示,一些抗体展示出异质结合谱,其不拟合至1:1结合模型,因此在此系列实验中无法确定它们的速率常数。

[0494] 表28:2+2抗TfR双特异性抗体的平衡解离常数(KD)

[0495]

| | 人顶端 TfR | | | 食蟹猴顶端 TfR | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 抗体 | 平均 $K_D$(M) | SD | N | 平均 $K_D$(M) | SD | N |
| TFR.15.WH8.1 | 2.8E-08 | NA | 1 | 1.7E-08 | 4.2E-09 | 2 |
| TFR.15.WH8.1.24A | HET | NA | 1 | >2.5E-6 | 2.4E-06 | 2 |
| TFR.15.WH8.1.24D | NB | NA | 1 | NB | | 2 |
| TFR.15.WH8.1.24H | 5.6E-09 | NA | 1 | 2.6E-09 | 1.6E-09 | 2 |
| TFR.15.WH8.1.24K | NB | NA | 1 | NB | | 2 |
| TFR.15.WH8.1.24N | 1.4E-07 | NA | 1 | 4.7E-08 | 1.7E-08 | 2 |
| TFR.15.WH8.1.26E | NB | NA | 1 | NB | | 2 |
| TFR.15.WH8.1.26H | 2.8E-07 | NA | 1 | 2.2E-06 | 4.4E-07 | 2 |
| TFR.15.WH8.1.26K | NB | NA | 1 | NB | | 2 |
| TFR.15.WH8.1.26Q | NB | NA | 1 | NB | | 2 |
| TFR.15.WH8.1.26S | >2.5E-6 | NA | 1 | >2.5E-6 | 2.6E-05 | 2 |
| TFR.15.WH8.1.42A | 1.6E-07 | NA | 1 | 8.8E-08 | 3.9E-09 | 2 |
| TFR.15.WH8.1.42A.3x(G4S) | HET | NA | 1 | 7.4E-08 | 2.9E-08 | 2 |
| TFR.15.WH8.1.42D | HET | NA | 1 | NB | | 2 |
| TFR.15.WH8.1.42H | NB | NA | 1 | NB | | 2 |
| TFR.15.WH8.1.42K | NB | NA | 1 | NB | | 2 |
| TFR.15.WH8.1.42A.L1 | 1.5E-07 | NA | 1 | 1.0E-07 | 2.1E-08 | 2 |
| TFR.15.WH8.1.42A.LH | 1.9E-07 | NA | 1 | 6.0E-08 | 9.0E-09 | 2 |
| TFR.15.WH8.1.42Q | 6.2E-08 | NA | 1 | 4.0E-08 | 2.1E-08 | 2 |
| TFR.15.WH8.1.42S | 5.1E-07 | NA | 1 | 6.9E-07 | 2.3E-07 | 2 |

[0496] N=测定次数;NT=未测试;NA=不适用;LB=低结合(低于测量限度);NB=未检测

到结合;HET＝异质结合。

[0497] 这些结果例示,2+2抗TfR双特异性抗体对TfR顶端结构域结合表现出约3nM至>2.5μM的亲和力范围。具体而言,2+2抗TfR双特异性抗体与人TfR Avi-His结合的亲和力范围为6nM至>2.5μM;并且本公开的抗TfR抗体与食蟹猴TfR Avi-His结合的亲和力范围为3nM至>2.5μM。

[0498] 实施例18:2+1抗TfR双特异性抗体的结合动力学

[0499] 使用Carterra LSA仪器(Carterra,Salt Lake City,UT)来评价人源化2+1抗TfR双特异性抗体对人和食蟹猴TfR Avi-His的结合动力学。简言之,通过20至180倍稀释至10mM乙酸盐pH 4.5(Carterra)中来一式两份地制备2+1抗TfR双特异性抗体,得到30μg/mL的终浓度。使用单通道流动池用100mM MES pH 5.5、100mM磺基-NHS、400mM EDC(均在MES pH 5.5中复原;在即将运行测定之前,将100μl每种物质混合于小瓶中)的1:1:1混合物的7分钟注射来激活HC30M传感器芯片(Carterra)。在转换至多通道阵列流动池之后,将所述抗体注射于四个96点阵列中的激活芯片上达15分钟。然后,通过使用单通道流动池注射1M乙醇胺pH 8.5(Carterra)达7分钟来封闭芯片上的剩余未缀合活性基团。所得传感器芯片对于在四种不同密度下的每种抗体含有八个点。如下进行两次独立实验,使得每种抗体的N介于一次与八次测定之间。产生小于20RU的分析物结合的点被排除在进一步分析之外。

[0500] 用含有0.5mg/ml BSA(MP Biomedicals)的运行缓冲液HBS-EP$^{+}$(Teknova)引发后,测试固定化抗TfR 2+1抗体与两种形式的TfR Avi-His结合的能力,所述两种形式为如上所述的人和食蟹猴异种同源物。通过使用单通道流动池在整个抗体阵列上注射每种分析物来生成亲和力的估计值。将TfR Avi-His分析物用运行缓冲液稀释,从1μM人和食蟹猴TfR Avi-His开始,进行八次三倍连续稀释。注射分析物持续5分钟,随后解离10分钟。每次注射分析物后,用Pierce$^{TM}$IgG洗脱缓冲液(ThermoScientific)使抗体再生。使用NextGenKIT高通量动力学分析软件(Carterra)来处理和分析数据。

[0501] 由本公开的抗TfR Avi-His抗体的拟合的缔合和解离速率常数(k-on和k-off)计算平衡解离常数($K_D$)。合并所述值,计算平均值和标准差,并使用GraphPad Prism绘制图表。$K_D$值总结于下表29中。如表中所示,一些抗体展示出异质结合谱,其不拟合至1:1结合模型,因此无法确定它们的速率常数。

[0502] 表29.抗TfR 2+1双特异性抗体的平衡解离常数($K_D$)

[0503]

| | huTfR Avi-His | | | 食蟹猴 TfR Avi-His | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 抗体 | 平均 $K_D$ (M) | SD | N | 平均 $K_D$ (M) | SD | N |
| TfR9.1B.9 | 6.7E-09 | NA | 1 | 异质 | 异质 | NA |
| TfR9.1B.10 | 异质 | 异质 | NA | 异质 | 异质 | NA |
| TfR9.1B.11 | 异质 | 异质 | NA | 异质 | 异质 | NA |

[0504]

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| TfR9.1B.13 | 2.9E-08 | 4.9E-09 | 2 | 8.3E-07 | NA | 1 |
| TfR9.1B.14 | 3.4E-08 | NA | 1 | 8.7E-07 | NA | 1 |
| TfR9.1B.20 | 异质 | 异质 | NA | 异质 | 异质 | NA |
| TfR9.1B.22 | 2.6E-07 | NA | 1 | 异质 | 异质 | NA |
| TfR9.1B.24 | 异质 | 异质 | NA | 异质 | 异质 | NA |
| TfR9.1B.26 | 异质 | 异质 | NA | 异质 | 异质 | NA |
| TfR9.1B.27 | 异质 | 异质 | NA | 异质 | 异质 | NA |
| TfR9.1B.28 | 1.0E-08 | 1.9E-09 | 3 | 异质 | 异质 | NA |
| TfR9.1B.33 | 2.5E-08 | NA | 1 | 异质 | 异质 | NA |
| TfR9.1B.35 | 异质 | 异质 | NA | 异质 | 异质 | NA |
| TfR9.1B.36 | 1.3E-08 | 1.2E-09 | 4 | 异质 | 异质 | NA |
| TfR9.1B.38 | 1.5E-08 | 1.9E-09 | 3 | 异质 | 异质 | NA |
| TfR9.1B.39 | 8.7E-08 | NA | 1 | 异质 | 异质 | NA |
| TfR9.1B.40 | 8.2E-09 | 9.7E-10 | 3 | 异质 | 异质 | NA |
| TfR9.1B.41 | 3.4E-07 | NA | 1 | 异质 | 异质 | NA |
| TfR9.1B.43 | NB | NB | NA | 异质 | 异质 | NA |
| TfR9.1B.45 | 1.3E-08 | NA | 1 | 异质 | 异质 | NA |
| TfR15.WH7 | 4.3E-08 | 1.7E-08 | 2 | 5.3E-08 | 7.8E-09 | 2 |
| TfR15.WH9 | 1.1E-07 | NA | 1 | 2.2E-07 | NA | 1 |
| TfR15.WH10 | 4.8E-08 | 1.6E-09 | 2 | 3.9E-08 | 1.0E-08 | 2 |
| TfR15.WH12 | NB | NB | NA | 异质 | 异质 | NA |
| TfR15.WH11a | 1.1E-07 | NA | 1 | 9.2E-08 | NA | 1 |
| TfR15.WH2 | NB | NB | NA | 异质 | 异质 | NA |
| TfR15.WH8 | 2.6E-08 | NA | 1 | 1.8E-08 | NA | 1 |
| TfR15.EB6 | 异质 | 异质 | NA | 3.0E-08 | 5.0E-09 | 4 |
| TfR9.1B | 3.5E-08 | NA | 1 | 异质 | 异质 | NA |
| TfR15 亲代 | 8.7E-09 | 3.8E-09 | 4 | 异质 | 异质 | NA |

[0505] N＝测定次数;NT＝未测试;NA＝不适用;LB＝低结合(低于测量限度);NB＝未检测到结合

[0506] 这些结果例示,2+1抗TfR双特异性抗体对TfR Avi-His表现出约6nM至900nM的亲和力范围。具体而言,本公开的2+1抗TfR双特异性抗体与huTfR Avi-His结合的亲和力在6.7nM至340nM的范围内。本公开的抗TfR抗体与食蟹猴TfR Avi-His结合的亲和力在18nM至870nM的范围内。

[0507] 实施例19:2+1抗TfR双特异性抗体在huTfR ECD KI小鼠中的PK

[0508] 2+1抗TfR双特异性抗体产生:用于体内PK研究的2+1抗TfR双特异性抗体在具有同种型对照(非结合)Fab臂的2+1主链上表达和纯化。

[0509] 用于体内PK研究的抗体是通过根据制造商说明书进行的ExpiCHO细胞(Invitrogen)的瞬时转染生成的。对于400mL培养物,使用由3个表达质粒(重链-臼-scFv、重链-杵和轻链)组成的320μg总DNA。对3种质粒的摩尔比进行优化,以获得高纯度的2+1抗Tfr双特异性抗体。转染后10天收获细胞培养物上清液。使用蛋白A亲和色谱来纯化抗体,然后在AKTA Avant 25(Cytiva)上进行离子交换色谱,以去除产物相关的杂质。将纯化的抗体透析至PBS中。通过280nm处的吸光度、CE-SDS、体积排阻色谱和内毒素测量进行分析表征。

[0510] 研究设计:为了建立2+1抗TfR双特异性抗体脑渗透的体内概念验证,生成一种杂合敲入(KI)小鼠,其中小鼠TfR的胞外结构域区域被两个等位基因之一中的人TfR的胞外结构域区域替换。这是由于2+1抗Tfr双特异性抗体特异性结合至灵长类动物,但不结合小鼠TfR。值得注意的是,所得TfRmu/hu KI小鼠中的TfR蛋白总量与野生型(WT)动物中观察到的总量并无区别(数据未示出)。使用两剂量策略来确定所注射的Ab随时间推移的脑摄取和周围清除率。在第1天和第14天向一组WT和hu-TfRmu/hu小鼠给予10mg/kg同种型IgG或2+1抗TfR双特异性抗体。在血清分离管中在不同时间点从抗体治疗的动物中收集血液样品,然后在离心前使其在室温(RT)下凝结。随后将所得上清液(代表血清)转移至新管中,并储存在-80℃下直至分析。

[0511] 样品制备:在第15天(即注射二级抗体后24小时)从抗体治疗的小鼠中收集脑组织。在此之前,将小鼠麻醉并用15ml PBS进行心脏灌注以清除血管。然后将脑组织切碎并使用手动研磨机在含有10mM HEPES(#15630130,Gibco)的1ml HBSS缓冲液(MilliporeSigma#55037C)中均质化。随后,将样品在1000g下离心5分钟,以沉淀出血管部分。然后将代表实质的上清液转移至新管中,并与包括蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物(cOmplete™,迷你蛋白酶抑制剂混合物,Roche,#11836153001)的10x RIPA缓冲液(终浓度1x)混合。在4℃下在章动器上孵育20分钟后,将样品冷冻在干冰上并储存在-80℃直至分析。经由通过%18葡聚糖(70kDa,#31390,Sigma-Aldrich)离心,随后在HBSS缓冲液中洗涤2次,从髓鞘碎片中清除血管级分。此后,将样品在RIPA缓冲液(RO278,Sigma-Aldrich)中裂解并储存在-80℃下直至分析。使用WB分析证实此方法的有效性,其中脑内皮细胞的标志物(例如CD31和紧密连接蛋白-5)在实质部分中不存在(数据未示出)。

[0512] 药代动力学(PK)分析:使用MSD(Meso Scale Discovery)方法测量血清和脑样品中的抗体浓度。简言之,将50μl/孔的山羊抗人IgG1 Ab(Jackson ImmunoResearch,#109-005-097)以1μg/ml的PBS溶液添加至MSD板中,并在4℃下孵育过夜。然后将板用洗涤缓冲液(0.05%Tween-20,于1xPBS中)洗涤3次,然后与封闭缓冲液(含有3%BSA的洗涤缓冲液)在室温下孵育1小时。随后,将血清(在PBS中1:10000稀释)和脑(在PBS中1:2稀释)样品一式两份地添加至板中,并在振荡器上以500RPM孵育1小时。已知浓度的人IgG1同种型Ab包括在测定中以创建标准曲线。接下来,将板用洗涤缓冲液洗涤3次,然后以0.2μg/ml的PBS溶液添加30μl/孔的磺基-Tag山羊抗人抗体(R32AJ-5,Meso Scale Discovery),并在振荡器上以500RPM孵育1小时。最后,用洗涤缓冲液洗涤3次后,将150μl/孔的1x READ缓冲液(R92PC-2,Meso Scale Discovery)添加至板中,之后使用Sector Imager S600仪器进行读取。

[0513] 通过测量血管耗竭的脑中的抗体浓度得出,在hu-TfRmu/hu小鼠中2+1抗TfR双特异性抗体的水平是同种型IgG的4-5倍(图5)。相比之下,在不表达靶受体的WT动物中2+1抗TfR双特异性抗体的脑摄取与针对同种型IgG观察到的脑摄取相似。总之,这些结果表明2+1抗TfR双特异性抗体具有增强的由转铁蛋白受体介导的进入脑的能力。通过测量抗体治疗的小鼠的血浆样品中的抗体浓度来确定周围PK。在WT小鼠中,2+1抗TfR双特异性抗体的血浆水平具有缓慢半衰期的特征,并且与同种型抗体无法区分(图6)。相反,与同种型IgG相比,两种2+1抗TfR双特异性抗体在hu-$TfR^{mu/hu}$小鼠中表现出更高的血浆清除率,这与TfR介导的周围处置一致。

[0514] 实施例20:2+1抗TfR双特异性抗体对体内脑内皮细胞上TfR表达的影响

[0515] 为了确定2+1抗Tfr双特异性抗体是否会异常调控体内靶细胞中的受体再循环,对从抗体治疗动物中收集的脑组织血管部分中的TfR蛋白总量进行量化。为此,将分离的血管在RIPA缓冲液中裂解并通过WB进行处理,如实施例13中所述。使用定量分析,在从注射有抗TfR抗体(即TfR-9.1B.39和TfR-15.WH8)的hu-TfR$^{+/-}$KI小鼠获得的样品之间与来从同种型治疗的动物的那些样品相比未观察到在TfR带密度上的显著差异(图7)。值得注意的是,在此测定中,用与小鼠TfR不存在交叉反应性的抗人TfR抗体(R&D Systems Inc,#MAB2474)来探测膜。结果,在从WT动物获得的血管中未检测到TfR带。总之,这些观察结果表明,2+1抗TfR双特异性抗体不会改变体内血脑屏障(BBB)处的TfR再循环。

[0516] 实施例21:在小鼠中2+1抗TfR双特异性抗体治疗后的体内网织红细胞耗竭

[0517] 已知抗TfR抗体可在体内诱导网织红细胞群的细胞死亡。为了检验这一点,向一组WT和hu-TfR$^{+/-}$KI小鼠注射2+1抗TfR双特异性抗体(TfR-9.1B.39和TfR-15.WH8)、人IgG1同种型或先前发表的抗ms TfR抗体8D3(Boado等人,Biotechnol Bioeng.2009Mar 1;102(4):1251-1258),已知后者会驱动小鼠网织红细胞的强烈耗竭。后两种抗体分别作为阴性对照和阳性对照包括在实验中。所有测试抗体均在WT人IgG1主链上,所述主链可在体内驱动ADCC、ADCP和CDC反应。注射后24小时从抗体治疗的动物中收集血液样品并通过FACS进行分析。通过用抗CD71(Invitrogen,#目录号17-0719-42)、噻唑橙(MilliporeSigma,#390062)和抗小鼠CD45对细胞染色以排除循环白细胞(Invitrogen,#12-0451-83),可将网织红细胞与成熟红细胞(RBC)区分开。噻唑橙结合残留的核糖体RNA分子,所述分子存在于网织红细胞中,但不存在于成熟RBC中。与RBC相比,网织红细胞表达高水平的转铁蛋白受体(CD71)。正如预期的,注射8D3抗体导致WT动物中网织红细胞完全丧失(数据未示出)。相比之下,无论基因型如何,此细胞群在同种型治疗的动物中均无改变。同样,在接受抗TfR 2+1双特异性抗体的WT小鼠中,未观察到网织红细胞数量的变化,这是有道理的,因为这些动物不表达靶受体(图8)。相反,用TfR-9.1B.39和TfR-15.WH8治疗的hu-TfR$^{+/-}$KI小鼠展示网织红细胞数量分别降低约80％至90％(图8)。根据已发表的结果(Yamamoto等人,Molecular Genetics and Metabolism Reports,第27卷,2021年6月,100758),此处所见的网织红细胞耗竭可能是通过诱导ADCC(抗体依赖性细胞毒性)反应介导的,这在后续实施例中得到进一步评价。

[0518] 实施例22:体外效应子功能(CDC和ADCC)的评价

[0519] 为了研究2+1抗TfR双特异性抗体中所见的网织红细胞耗竭的机制,评价这些相同抗体引发体外效应子反应的能力,诸如补体依赖性细胞毒性(CDC)和抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。此外,鉴于已证明wt huIgG1主链上的抗TfR抗体可引发ADCC反应,因此测试替代性Fc形式,诸如N325S/L328F(NSLF)和L234A/L235A/P331S(LALAPS),它们强烈地减少与活化FcgR(特别是作为ADCC的关键驱动因素的FcgRIIIa)的结合。

[0520] CDC方法和结果:在hCMEC/D3细胞系上测量2+1抗TfR双特异性抗体驱动补体沉积的能力,所述细胞系表达高水平的两种受体。将靶细胞分离,在PBS中洗涤1x,并在RPMI 1640培养基中稀释至2x10$^6$个细胞/mL。在圆底96孔板(Falcon#351177)中,每孔等分50uL靶细胞(每孔1x105个细胞)。向这些细胞中添加在相同培养基中稀释的25uL 4x抗体。将细胞与抗体在37℃下孵育15分钟,然后每孔添加25uL汇集的补体人血清(Innovative Research,IPLA-CSER)作为补体来源,并将板在37℃下再孵育2小时。此后,用FACS缓冲液

(PBS+2％FBS+1mM EDTA)洗涤细胞2次,并再悬浮于50μL FACS缓冲液+0.25μL/孔的碘化丙啶(Fischer Scientific,BD 556463)中,之后在iQue流式细胞仪(IntelliCyt)上进行分析。将CDC作为每孔中PI+单细胞的比例进行分析。在此测定中,2+1抗TfR双特异性抗体均未诱导显著的CDC反应(数据未示出)。

[0521] ADCC方法和结果:使用Promega的ADCC Reporter Bioassay系统(#G7010)评价2+1双特异性抗体引起抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的能力。此系统依赖于稳定表达FcgRIIIa受体(V158变体)和驱动萤火虫荧光素酶表达的NFAT反应元件的工程化Jurkat T细胞系。将靶细胞以1.2x$10^6$个/mL的浓度稀释于测定缓冲液(RPMI+4％低IgG血清)中,并将25μL细胞(每孔30,000个)等分至96孔白色测定板的适当孔中。向含有细胞的孔中添加25μL的3x抗体,还在测定缓冲液中稀释。在将抗体添加至靶细胞中后,将所提供的效应细胞(以2x$10^7$个/mL冷冻)在37℃下解冻,并将630uL添加至3.6mL温热的(37℃)测定缓冲液中,轻轻混合,并将25μL效应细胞(每孔75000个,E:T比率为2.5)立即添加至含有靶细胞和抗体的孔中。然后将板在37℃和5％$CO_2$下孵育6小时以允许受体细胞活化和荧光素酶表达。6小时后,将板平衡至室温(15分钟),同时准备Bio-Glo荧光素酶测定试剂。将75μL荧光素酶测定试剂添加至每个孔中,将板孵育10分钟,并在BioTek读板器上测量发光。在野生型人IgG1形式中,一些针对TfR的2+1双特异性抗体能够驱动显著的ADCC信号(图9)。进行进一步实验来测试是否可通过消除与各种FcR的结合来改善这些反应。

[0522] Fc工程化和ADCC结果:引发ADCC信号的两种2+1抗TfR双特异性抗体(TfR9.1B.39和TfR15.WH8)以多种Fc形式(包括野生型hIgG1、hIgG1 NSLF和hIgG1 LALAPS)再表达,并以先前描述的相同ADCC测定形式再测试。先前已描述NSLF和LALAPS均强烈减少与FcgRIIIA的结合(Leoh等人,Molecular Immunology,2015年7月29日,67(2Pt B):407-415,Shang等人,J Biol Chem.2014;289:15309-15318),所述结合为ADCC活性的主要驱动力。在此测定中,NSLF和LALAPS均能够显著减少ADCC信号,其中在对于测试的2+1抗Tfr双特异性抗体所测试的最高浓度下NSLF显示出>90％的信号减少(图10)。

[0523] 实施例23:2+1抗TfR双特异性抗体亲和力和可靠性优化的克隆的结合动力学

[0524] 使用GatorBio BLI仪器(GatorBio,Palo Alto,CA)评价2+1抗TfR双特异性抗体与人TfR Avi-His的结合动力学。简言之,将2+1抗TfR双特异性抗体用含有0.5mg/ml BSA(MP Biomedicals)的运行缓冲液(HBS-EP+,Teknova)进行稀释,进行一系列七倍、五倍、三倍连续稀释,然后两次10倍稀释,从Tf9.1B.39.36、TfR9.1B.39.37、TfR9.1B.39.38和WH8亲代的4μM浓度开始并从TfR9.1B.39、TfR9.1B.39.05、TfR9.1B.39.39、TfR9.1B.39.40、TfR15.WH7.1、TfR15.WH8.1和TfR15.WH12.1的2μM浓度开始。将生物素化TfR Avi-His用运行缓冲液稀释至5μg/mL。将链霉亲和素探针(Gator)浸入生物素化TfR Avi-His溶液中,持续五秒以将蛋白质加载至尖端上。然后将探针浸入相应抗体浓度中缔合三分钟,然后在运行缓冲液中解离三分钟。在加载步骤与缔合步骤之间进行运行缓冲液中的洗涤步骤。将带有生物素化TfR Avi-His的探针用10mM甘氨酸-HCl pH 2.5缓冲液再生。将生物素化TfR Avi-His在每个结合周期开始时补充五秒。将数据用参考探针和缓冲液(空白)孔进行双重参考,并使用Gator分析软件(GatorBio)进行处理和分析。

[0525] 由2+1抗Tfr双特异性抗体的拟合缔合速率常数和解离速率常数(k-on和k-off)计算平衡解离常数(KD)。合并所述值,计算平均值和标准差,并使用GraphPad Prism绘制图

表。如表中所示,一些抗体展示出异质结合谱,其不拟合至1:1结合模型,因此无法确定它们的速率常数。$K_D$值总结于下表30中。

[0526] 表30.抗TfR 2+1抗体的平衡解离常数($K_D$)

[0527]

| | huTfR Avi-His | | | 食蟹猴 TfR Avi-His | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 抗体 | 平均 $K_D$ (M) | SD | N | 平均 $K_D$ (M) | SD | N |
| TfR9.1B.39 | 7.5E-07 | 3.2E-08 | 2 | 1.3E-06 | 5.1E-07 | 4 |
| TfR9.1B.39.05 | 异质 | 异质 | 1 | 异质 | 异质 | 1 |
| Tf9.1B.39.36 | 2.3E-06 | 2.8E-07 | 2 | 2.3E-06 | NA | 1 |
| TfR9.1B.39.37 | 5.5E-07 | 1.1E-07 | 2 | 1.3E-06 | 1.2E-06 | 2 |
| TfR9.1B.39.38 | 3.5E-06 | 7.2E-07 | 2 | 1.5E-06 | NA | 1 |
| TfR9.1B.39.39 | 异质 | 异质 | 1 | 异质 | 异质 | 1 |
| TfR9.1B.39.40 | LB | LB | 1 | 5.7E-07 | NA | 1 |
| TfR15.WH7.1 | 1.2E-07 | NA | 1 | 1.0E-07 | NA | 1 |
| TfR15.WH8.1 | 6.5E-08 | NA | 1 | 3.7E-08 | NA | 1 |
| TfR15.WH12.1 | 异质 | 异质 | 1 | 异质 | 异质 | 1 |

[0528] N=测定次数;NT=未测试;NA=不适用;LB=低结合(低于测量限度);NB=未检测到结合。

[0529] 这些结果例示,2+1抗TfR双特异性抗体对TfR Avi-His表现出约30nM至4μM的亲和力范围。2+1抗TfR双特异性抗体与人TfR Avi-His结合的亲和力范围为65nM至3.5μM;2+1抗TfR双特异性抗体与食蟹猴TfR Avi-His结合的亲和力范围为38nM至2.3μM。

[0530] 实施例24:TD1-TfR双特异性抗体体外sTREM2测定

[0531] 为了评价2+1抗TfR抗体的药代动力学和药效动力学,用以下物质生成2+1抗TfR双特异性抗体:(i)TfR9.1B.39.38scFv;和(ii)呈2+1(臼)形式的人MS4A4A(称为"TD1")特异性单克隆抗体(称为"TD1-TfR")(实施例25中所述)。为了证实TD1-TfR保留亲代TD1抗体的功能,使用人单核细胞来源的巨噬细胞进行可溶性TREM2(sTREM2)测定。预期这些细胞在用TD1进行抗体治疗后会显示出sTREM2产生的增加。

[0532] 根据制造商方案,使用RosetteSep人单核细胞富集混合物(Stemcell technologies)和Ficoll离心从全血中分离人单核细胞。用ACK裂解缓冲液裂解红细胞后,将单核细胞再悬浮于完全培养基(RPMI、10%FBS、Pen/Strep、L-谷氨酰胺、HEPES、非必需氨基酸和丙酮酸钠)中。为了从这些分离的单核细胞中获得巨噬细胞,将50ng/ml人M-CSF和8%体积/体积人血清添加至细胞中持续5-7天。

[0533] 用1ug/mL的测试抗体(huIgG1、TD1、iso-TfR(同种型对照IgG抗体,连接至TfR9.1B.39.38)或TD1-TfR)刺激每孔$10^5$个巨噬细胞持续48小时。将重复孔作为技术重复进行处理。通过MSD平台测试上清液中的sTREM2。

[0534] 如图11所例示,与hIgG1和Iso-TfR相比,TD1-TfR在体外测定中通过提高sTREM2水平而显示出活性。TD-1和TD1-TfR在体外测定中显示出类似的sTREM2水平提高。此数据表明,向TD1抗体中添加抗TfR scFv不会损害TD1的功能。

[0535] 实施例25:TD1-TfR双特异性抗体和用于向非人灵长类动物静脉内施用的方法

[0536] 为了评价本文所公开的2+1抗TfR抗体的药代动力学和药效动力学,用以下物质生成2+1抗TfR双特异性抗体:(i)TfR9.1B.39.38scFV;和(ii)呈2+1(臼)形式的人MS4A4A

(TD1)特异性抗体(称为“TD1-TfR”)。已证明TD1增加非人灵长类动物脑中的若干生物标志物,包括可溶性TREM2(sTREM2)和集落刺激因子1(CSF1)-数据未示出。TD1-TfR的完整氨基酸序列如下:

[0537] TD1重链hIgG1 NSLF(N325S、L328F)杵(T366W)

[0538] QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYAFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT

[0539] HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE

[0540] DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD

[0541] WLNGKEYKCKVSSKAFPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE

[0542] LTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD

[0543] GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP

[0544] GK(SEQ ID NO:405)。

[0545] TD1重链hIgG1 NSLF(N325S、L328F)臼scFv(T366S、L368A、Y407V)-(G4S)3接头-VH-20AA接头-VL,具有突变(H435R、Y436F)

[0546] QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYAFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSSKAFPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYAMHWVRQAPGQGLEWMGGIAPNTGGTSYNQKFKGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCASQGWLLRGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKASQSLLDEGGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK(SEQ ID NO:406)。

[0547] TD1轻链

[0548] DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSRSLLYSAGKTYLSWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGIDFHQTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:407)。

[0549] 此外,出于对照目的,生成具有(i)TfR特异性scFv和(ii)呈2+1(臼)形式的IgG1 NSLF的双特异性抗体(称为“Iso-TfR”)。Iso-Tfr的完整氨基酸序列如下:

[0550] 同种型对照重链hIgG1 NSLF(N325S、L328F)杵(T366W)

[0551] EVRLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTTSRDDSKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGPGWYAADVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSSKAFPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO:408)。

[0552] 同种型对照重链hIgG1 NSLF(N325S、L328F)臼scFv(T366S、L368A、Y407V)-(G4S)3接头-VH-20AA接头-VL,具有突变(H435R、Y436F)

[0553] EVRLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTTSRDDSKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGPGWYAADVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSSKAFPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYAMHWVRQAPGQGLEWMGGIAPNTGGTSYNQKFKGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCASQGWLLRGGDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKASQSLLDEGGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK(SEQ ID NO:409)。

[0554] 同种型对照轻链

[0555] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQADLPAFAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:410)。

[0556] 对单独人MSA4A(TD1)有特异性的抗体的完整氨基酸序列如下:

[0557] TD1重链hIgG1 NSLF(N325S、L328F)

[0558] QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYAFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSSKAFPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:411)。

[0559] TD1轻链

[0560] DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSRSLLYSAGKTYLSWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGIDFHQTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:407)。

[0561] 在第1天和第29天在初试雄性食蟹猴(n=12)中静脉内给予(总共2次施用)表31中4种抗体各20mg/kg(n=3)后进行PK/PD研究。由于抗体的脑渗透性较差,已证明此剂量水平的TD1会在NHP中产生不完全的PD反应。所述研究的目标是寻找脑中提高的抗体水平,以及相关PD生物标志物的同时增加。

[0562] 表31.抗TfR双特异性抗体的体内施用

[0563]

| 组 | 动物数量(仅雄性) | 测试物品 | 给药途径 |
|---|---|---|---|
| 1 | 3 | Iso-TfR | IV |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 2 | 3 | TD1-TfR | IV |
| 3 | 3 | TD1 | IV |
| 4 | 3 | huIgG1(同种型对照) | IV |

[0564] 静脉内剂量经由隐静脉以缓慢推注的方式施用。第1-4组之间靶剂量水平(mg/kg)、靶剂量浓度(mg/mL)和靶剂量体积(mL/kg)一致。

[0565] 实施例26:向非人灵长类动物静脉内施用TD1-TfR双特异性抗体后的血液学参数

[0566] 在剂量前和剂量施用后第3、8、15、29和31天,从股静脉收集用于血液学的血液样品(~2mL)至含有EDTA钾的管中。

[0567] 表32.静脉内施用抗TfR双特异性抗体后测试的血液学参数

[0568]

| | |
|---|---|
| 红细胞(Red blood cell/erythrocyte)计数 | 血小板计数 |
| 血红素 | 白细胞(White blood cell/leukocyte)计数 |
| 血容比 | 血细胞分类计数(百分比和绝对值) |
| 平均红细胞体积 | 红细胞分布宽度 |
| 平均红细胞血红素量 | 血涂片 |
| 平均红细胞血红素浓度 | 网织红细胞计数 |

[0569] 测试设施网织红细胞计数的正常范围为25.7-122.3 $10^3/\mu l$。

[0570] 图12例示了在研究持续时间内的绝对网织红细胞计数。正常范围由虚线表示。总之,在研究过程中未观察到任何血液学参数的显著变化,并且未观察到网织红细胞的持续降低。

[0571] 实施例27:在非人灵长类动物中IV施用后TD1-TfR双特异性抗体的CSF和血清水平

[0572] 如实施例25中所述,在第一次施用和第二次施用后的不同时间从NHP收集脑脊液(CSF)和血清。如下所述测试血清和CSF的抗体水平。

[0573] 夹心ELISA方法:将100μL/孔的山羊抗人IgG、猴吸附的BIOTIN(Southern Biotech;目录号2049-08)工作溶液(0.5μg/mL)添加至含有SuperBlock™封闭缓冲液(ThermoScientific;参考号15500)的96孔Pierce™链霉亲和素包被的高结合板中,并在室温(RT)下在板振荡器上以350转/分钟(RPM)孵育1小时±10分钟。将血清或CSF质量控制(QC)和测试样品在测定缓冲液(1x TBS、0.05%Tween-20和0.1%BSA)中稀释至最低要求的稀释度(MRD),然后加载至测定板上,同时将标准校准曲线和测定缓冲液QC(AB-QC)直接添加至测定板中。孵育完成后,使用洗板机,将板用洗涤缓冲液(1X PBS和0.05%Tween-20)洗涤3次,然后将100μL/孔的校准标准品、QC和MRD稀释的血清或CSF QC和测试样品添加至板中,并在室温下在板振荡器上以350RPM孵育2小时±15分钟。然后洗涤板,并向板中添加100μL/孔的山羊抗人IgG、猴吸附的HRP(Southern Biotech;目录号2049-05)工作溶液(0.08μg/mL)并在室温下在板振荡器上以350RPM孵育1小时±10分钟。HRP孵育后,洗涤板,并添加100μL/孔的四甲基联苯胺(TMB)底物溶液(Surmodics产品编号TMBS-1000-01),并在室温(RT)下通过用铝箔覆盖或置于抽屉里而避光孵育15±10分钟。孵育完成后,将100μL/孔的终止溶液(Surmodics产品编号NSTP-1000-01)添加至板中以终止反应。然后将板置于350RPM下的板振荡器上,在室温下持续至少2分钟。然后在Molecular Devices SpectraMax M5仪器上读取板,并从每个孔产生原始光密度(OD450-540)信号。使用校准标准曲线通过浓度插值来确定每个未知样品中分析物的浓度。通过SoftMax Pro(Molecular Devices/7.1

版),使用加权因子为$1/Y^2$的4参数逻辑(4-PL)模型执行标准回归。

[0574] 图13例示,与TD1相比,使用TD1-TfR见到CSF Cmax有所增加。与同种型对照相比,使用Iso-TfR还见到CSF Cmax有所增加。此外,如图13所例示,与单独的Iso-TfR或TD1相比,TD1-TfR在NHP中展示出更快的血清清除率。

[0575] 实施例28:TfR结合臂对非人灵长类动物中的脑摄取和脑药效动力学的影响

[0576] 还使用血管耗竭的脑裂解物直接评估多个NHP脑区域(额叶皮层、内嗅皮层和海马)中的抗体水平。

[0577] 脑样品制备:在第30天(即,施用二级抗体后48小时)从抗体治疗的食蟹猴中收集脑组织。在此之前,将动物麻醉并用PBS进行心脏灌注以清除血管。关于给药详情,参见实施例25。然后将脑组织切碎并使用手动研磨机在含有10mM HEPES(#15630130,Gibco)的HBSS缓冲液(MilliporeSigma#55037C)中均质化。随后,将样品在1000g下离心5分钟,以沉淀出血管部分。然后将代表实质的上清液转移至新管中,并与包括蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物(cOmplete™,迷你蛋白酶抑制剂混合物,Roche,#11836153001)的10x RIPA缓冲液(终浓度1x)混合。在4℃下在章动器上孵育45分钟后,将样品冷冻在干冰上并储存在-80℃下直至分析。经由通过18%葡聚糖(70kDa,#31390,Sigma-Aldrich)离心,随后在HBSS缓冲液中洗涤2次,从髓鞘碎片中清除血管级分。此后,将样品在RIPA缓冲液(R0278,Sigma-Aldrich)中裂解并储存在-80℃下直至分析。先前已使用蛋白质印迹分析证实此方法的有效性,其中脑内皮细胞的标志物(例如CD31和紧密连接蛋白-5)在实质部分中不存在(数据未示出)。

[0578] 药代动力学(PK)分析:使用MSD(Meso Scale Discovery)方法测量脑样品中的抗体浓度。简言之,将50μl/孔的山羊抗人IgG(猴子吸收)抗体以1μg/ml的PBS溶液添加至MSD板中,并在振荡器上以500RPM在4℃下孵育过夜。然后将板用洗涤缓冲液(在1xPBS中的0.05%Tween-20)洗涤3次,随后与封闭缓冲液(含有3%BSA的洗涤缓冲液)在室温下孵育1小时。随后,将脑(在PBS中稀释)样品一式两份添加至板中,并在室温下在振荡器上以500RPM孵育2小时。然后将板用洗涤缓冲液洗涤3次,然后以0.5μg/ml的PBS溶液添加40μl/孔的磺基-Tag山羊抗人抗体(R32AJ-5,Meso Scale Discovery),并在振荡器上以500RPM孵育1小时。最后,用洗涤缓冲液洗涤3次后,将150μl/孔的1x READ缓冲液(R92PC-2,Meso Scale Discovery)添加至板中,之后使用Sector Imager S600仪器进行读取。使用其相应抗体的十一次2倍系列稀释液(100-0.019ng/ml)生成每次处理的标准曲线。使用四参数逻辑回归拟合曲线,以用于计算样品内的抗体浓度。

[0579] 图14例示,TfR BBB靶向臂能够在所有3个测试脑区域中与TD1相比增加(i)TD1-TfR的脑摄取(增加范围为2至11倍)和在所有3个测试脑区域中与同种型亲代抗体相比增加(ii)Iso-TfR的脑摄取(增加范围为8至64倍)。

[0580] 实施例29:NHP样品中TD1-TfR双特异性抗体的药效动力学分析

[0581] 进一步测试如实施例25中所述的来自NHP测试受试者的CSF和血清以及如实施例28中所述的NHP脑裂解物的TD1功能的下游生物标志物,包括sTREM2和CSF1R,如下所述。

[0582] CSF1R方法总结(脑裂解物)

[0583] 使用来自R&D Systems的酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(目录号DY329)测量食蟹猴脑裂解液中集落刺激因子1受体(CSF1R)的浓度。将小鼠抗人M-CSF R捕获抗体(R&D Systems,部件号841246)在1x PBS(Corning;REF 21-040-CM)中稀释至4μg/mL的工作浓度,

并以100μL/孔包被于96孔微孔板(Nunc-Immuno Maxisorp;ThermoScientific目录号446612)上,并在室温下在不摇动下孵育过夜。第二天,将板用洗涤缓冲液(1x PBS和0.05%Tween-20)洗涤3次,用300μL试剂稀释剂(R&D Systems,部件号841380)封闭,并在不摇动下孵育至少1小时。在试剂稀释剂中制备人M-CSF R标准品和QC(R&D Systems,部件号841248)。在测定缓冲液(1x PBS、1%BSA和0.05%Tween-20)中以最低要求的稀释度(MRD)稀释测试样品和QC。然后洗涤板,将100μL/孔的人M-CSF1R标准品、在测定缓冲液中稀释的QC和稀释的样品添加至适当的孔中,并在室温下孵育2小时。洗涤板并添加100μL/孔的100ng/mL生物素化山羊抗人M-CSF R检测抗体(R&D Systems,部件号841247)于试剂稀释剂中的工作溶液,并在室温下孵育2小时。孵育完成后,洗涤板,然后添加在试剂稀释剂中1:200稀释的链霉亲和素-HRP(R&D Systems,部件号890803)并在室温下孵育20分钟。将板洗涤最后一次,并添加100μL/孔的底物溶液(R&D Systems,部件号895000和895001),并在室温下孵育20分钟。孵育完成后,将50μL/孔的终止溶液(R&D Systems,部件号895032)添加至板中并充分混合。然后在Molecular Devices SpectraMax M5仪器上读取板,并从每个孔产生原始光密度($OD_{450-540}$)信号。通过针对校准标准曲线的插值来确定每个未知样品中的CSF1R浓度。通过SoftMax Pro(Molecular Devices,7.1版),使用加权因子为$1/Y^2$的4参数逻辑(4-PL)模型执行标准回归。

[0584] CSF1方法总结(CSF)

[0585] 将Meso Scale Discovery的电化学发光(ECL)测定试剂盒(MSD,目录号K151XRK-4)用于测量食蟹猴脑脊液(CSF)样品中集落刺激因子1(CSF1)的浓度。将96孔MSD GOLD小斑点链霉亲和素板(MSD,目录号L45SA-1)用25μL/孔的在稀释剂100(MSD,目录号R50AA-4)中1:17.5稀释的生物素化抗人CSF1抗体(MSD,目录号C21XR-3)包被,并在室温下在设定为700转/分钟(RPM)的板振荡器上孵育1小时。

[0586] 在稀释剂43(MSD,目录号R50AG-2)中制备标准品,并在测定缓冲液中进一步1:1稀释,然后加载至板上。在稀释剂43中制备QC,并在测定缓冲液中按MRD稀释。将稀释的QC用稀释剂43按1:1进一步稀释,然后加载至板上。在测定缓冲液中按MRD稀释测试样品。将稀释的样品在稀释剂43中按1:1进一步稀释,然后加载至板上。

[0587] 洗涤后,将50μL标准品、在稀释剂43中稀释的QC和稀释的测试样品添加至适当的孔中,并在设置为700RPM的振荡器上在室温下孵育1小时。然后洗涤板,并将50μL在稀释剂3(MSD,目录号R50AP-2)中按1:100稀释的检测抗体(SULFO-TAG抗人CSF1抗体;MSD,目录号D21XR-3)添加至每个孔中并在设定为700RPM的板振荡器上在室温下孵育1小时。孵育完成后,洗涤板,然后添加150μL/孔的MSD GOLD读取缓冲液B(MSD,目录号R60AM-2),并在MSD Sector 600Imager上读取板。在读取缓冲液存在下,施加电压时,钌会产生化学发光信号。信号强度与样品中存在的CSF1浓度成比例。利用具有$1/y^2$加权的四参数逻辑(4-PL)曲线拟合方程,根据标准曲线对CSF1水平进行量化。使用Microsoft Excel和GraphPad Prism 9.0分析数据。

[0588] sTREM2方法总结(血清、CSF和脑裂解物)

[0589] 使用MSD平台上的电化学发光(ECL)测定来测量食蟹猴血清、脑脊液(CSF)和脑裂解物中髓系细胞上表达的触发受体2(TREM2)的浓度。用50μL/孔的捕获抗体T2-8F11(在Alector处生成)包被96孔标准MSD板(目录号L15XA),在2-8℃下在1X PBS(Corning;REF

21-040-CM)中在设定为500转/分钟(RPM)的板振荡器上过夜。用洗涤缓冲液(1x PBS、0.05％Tween-20)洗涤后,用150μL/孔的封闭缓冲液(PBS中的1％热灭活的高级BSA)来封闭板。然后洗涤板,并将50μL/孔的食蟹猴TREM2-Fc标准品(在Adimab LLC处生成)、在测定缓冲液(1x PBS、0.05％Tween-20和1％BSA)中稀释的QC和样品添加至适当的孔中并在室温(RT)下在设定为500RPM的振荡器上孵育1小时。标准品、QC和样品中存在的TREM2由固定化T2-8F11捕获抗体结合。洗去任何未结合的物质后,将50μL/孔的在测定缓冲液中以100ng/mL稀释的生物素化山羊抗人TREM2多克隆抗体(R&D Systems,目录号BAF1828)添加至板的每个孔中,并在RT下在设定为500RPM的振荡器上孵育1小时。洗涤板之后,添加50μL在测定缓冲液中的磺基-Tag链霉亲和素(MSD,目录号R32AD-1)溶液(0.2μg/mL),并在设定为500RPM的振荡器上于RT下孵育30分钟。孵育完成后,洗涤板并添加150μL/孔的1x读取缓冲液(通过用含去离子水的表面活性剂(MSD,目录号R92TC-1)稀释4X读取缓冲液T来制备),并在MSD Sector 600Imager上读取板。在读取缓冲液存在下,施加电压时,钌会产生化学发光信号。信号强度与样品中存在的TREM2浓度成比例。通过SoftMax Pro(Molecular Devices,7.1版),使用加权因子为$1/Y^2$的4参数逻辑(4-PL)模型执行标准回归。

[0590] 图15例示,在施用第一剂量和第二剂量后,与单独TD1、Iso-TfR或hIgG1相比,用TD1-TfR处理的NHP中的可溶性TREM2(sTREM2)的血清水平提高。图16例示,与单独TD1、Iso-Tfr或hIgG1相比,用TD1-TfR治疗的NHP的CSF中的CSF-1水平提高。这些数据显示实施例28中所见的脑渗透增强也导致更强的药效动力学反应。

[0591] 实施例30:在施用2+1抗TfR双特异性抗体后测量食蟹猴脑中的TfR水平

[0592] 已证明抗TfR抗体能够降解受体(Niewoehner等人,Neuron 20148:49-60),这是渗透BBB的抗TfR分子的不良副作用。为了测试此效果,从给予2+1抗TfR和对照抗体(实施例25)的非人灵长类动物收集脑组织样品,并通过MSD方法量化总TfR水平。

[0593] 样品制备:在第31天(即第二次Ab注射后48小时)从抗体治疗的食蟹猴收集脑组织,随后冷冻。在此之前,将动物麻醉并用肝素化0.9％盐水进行全身灌注以疏通血管。然后将解冻的脑切片切碎并使用手动研磨机在含有10mM HEPES(#15630130,Gibco)的HBSS缓冲液(MilliporeSigma#55037C)中以140mg/mL的浓度均质化。随后,将样品与含有Halt蛋白酶抑制剂混合物(Thermo Scientific#78438)的10x放射免疫沉淀测定缓冲液(RIPA,1x终浓度)混合。在4℃下在章动器上孵育45分钟后,将样品在4℃下以15,000RPM离心20分钟。然后将所得上清液转移至新管中并储存在-80℃下直至进一步分析。

[0594] 使用MSD(Meso Scale Discovery)方法测定NHP脑样品中TfR的表达水平。简言之,将体积为50mL/孔的小鼠抗食蟹猴TfR IgG1 Ab(Invitrogen,#MA5-16644)以1mg/mL的PBS溶液的浓度添加至MSD板中。然后将板在4℃下在振荡器上以500RPM孵育过夜。此后,将板用洗涤缓冲液(1xPBS中的0.05％Tween-20)洗涤三次,并与150mL/孔的封闭缓冲液(含有3％BSA的洗涤缓冲液)在室温下孵育1小时。为了生成标准曲线,在含有RIPA缓冲液的PBS中制备11份食蟹猴TfR ECD蛋白(内部生产)的3倍系列稀释液,起始浓度为1mg/mL。然后将标准稀释液和脑样品(在PBS中1:6稀释)以50mL/孔的体积添加至板中。值得注意的是,标准稀释液和脑样品的RIPA缓冲液的终浓度保持一致。随后,将板在振荡器上以500RPM孵育2小时,随后用洗涤缓冲液洗涤三次。接下来,将30mL/孔的磺基-Tag兔抗食蟹猴TfR Ab(SinoBilogical,目录号90253-T16)以0.5mg/mL的浓度添加至板中的测定缓冲液(含有1％

BSA的洗涤缓冲液)中。然后将板在振荡器上以500RPM孵育1小时。在另一轮洗涤后,将150mL/孔的1x READ缓冲液(R92PC-2,Meso Scale Discovery)添加至板中,然后立即使用Sector Imager S600仪器读取板。分别使用SoftMax Pro 7.1和Prism 9.0软件进行数据处理和分析。根据对照组(用hIgG1同种型对照抗体治疗)的平均TfR水平,对所有动物中TfR的脑表达水平进行归一化。如图17所示,定量数据分析显示,与注射hIgG1同种型对照抗体或单独TD1抗体的那些动物相比,用2+1抗TfR双特异性抗体治疗的动物脑组织中TfR表达水平略有下降,这在统计上并不显著。这些结果显示本文所公开的2+1抗TfR双特异性抗体对体内TfR表达无显著影响。

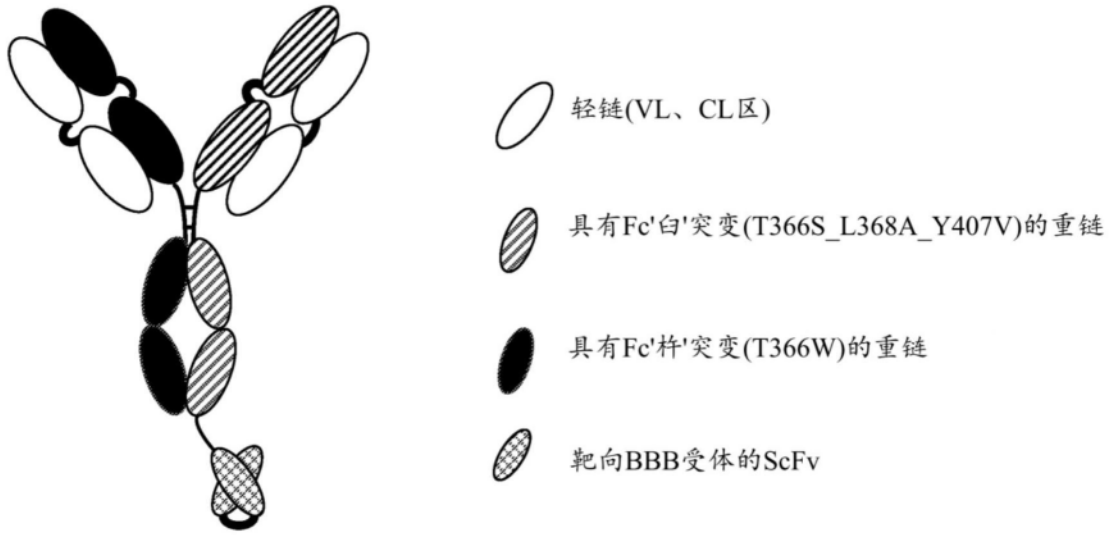
轻链(VL、CL区)
具有Fc'白'突变(T366S_L368A_Y407V)的重链
具有Fc'杵'突变(T366W)的重链
靶向BBB受体的ScFv

图1A

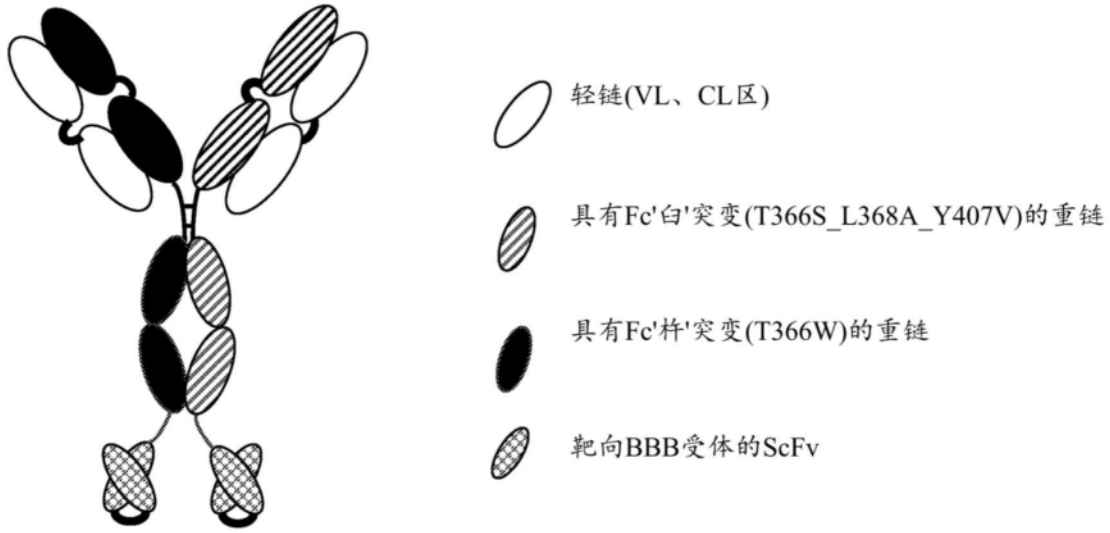
轻链(VL、CL区)
具有Fc'白'突变(T366S_L368A_Y407V)的重链
具有Fc'杵'突变(T366W)的重链
靶向BBB受体的ScFv

图1B

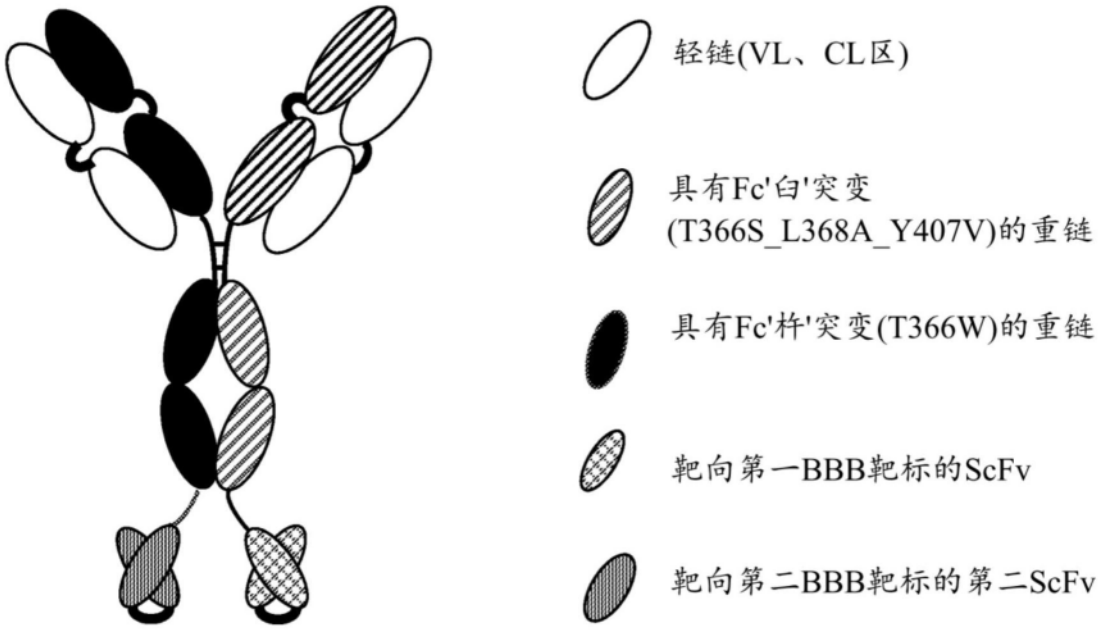
轻链(VL、CL区)
具有Fc'臼'突变
(T366S_L368A_Y407V)的重链
具有Fc'杵'突变(T366W)的重链
靶向第一BBB靶标的ScFv
靶向第二BBB靶标的第二ScFv

图1C

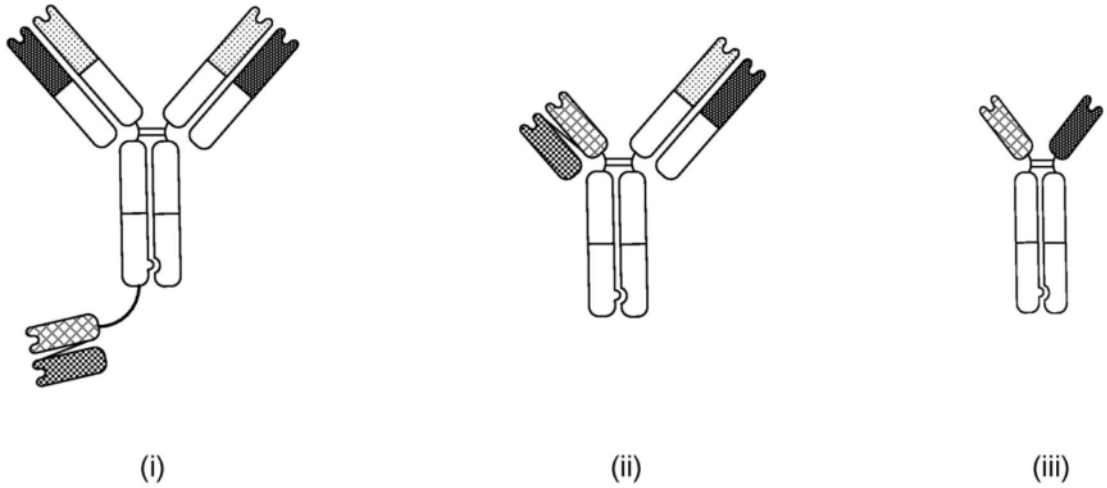
(i)
(ii)
(iii)

图1D

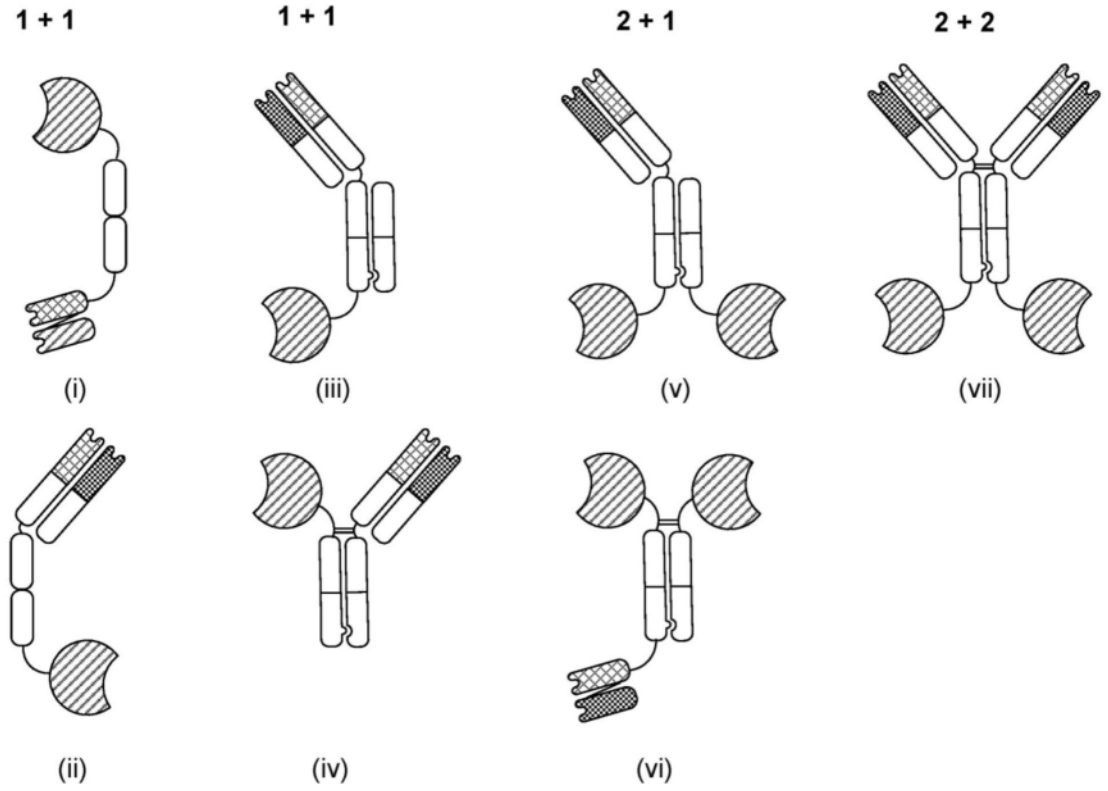
1 + 1
1 + 1
2 + 1
2 + 2
(i)
(iii)
(v)
(vii)
(ii)
(iv)
(vi)

图1E

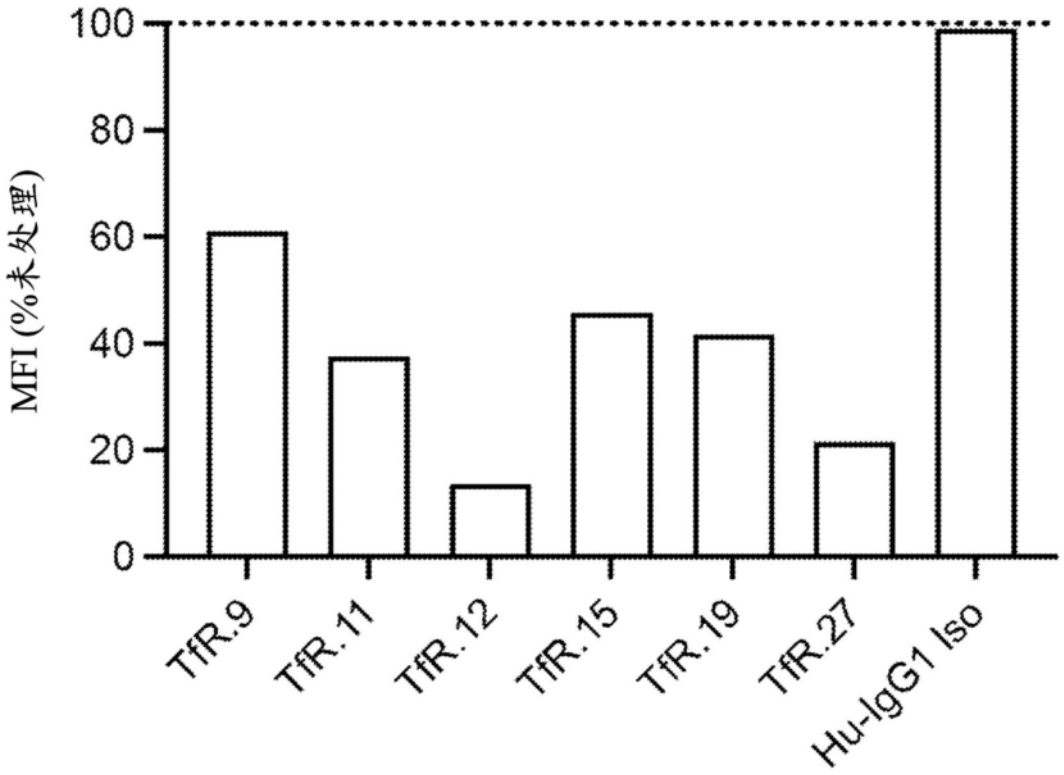
100
80
60
40
20
0
MFI (%未处理)
TfR.9
TfR.11
TfR.12
TfR.15
TfR.19
TfR.27
Hu-IgG1 Iso

图2

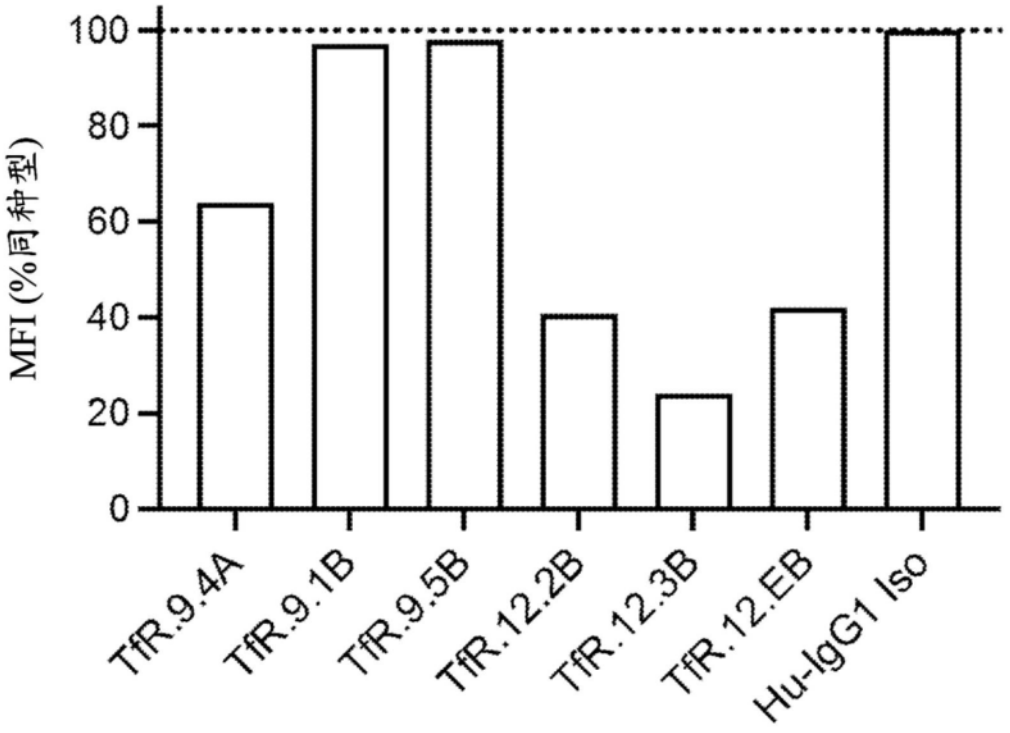
MFI (%同种型)
100
80
60
40
20
0
TfR.9.4A
TfR.9.1B
TfR.9.5B
TfR.12.2B
TfR.12.3B
TfR.12.EB
Hu-IgG1 Iso

图3

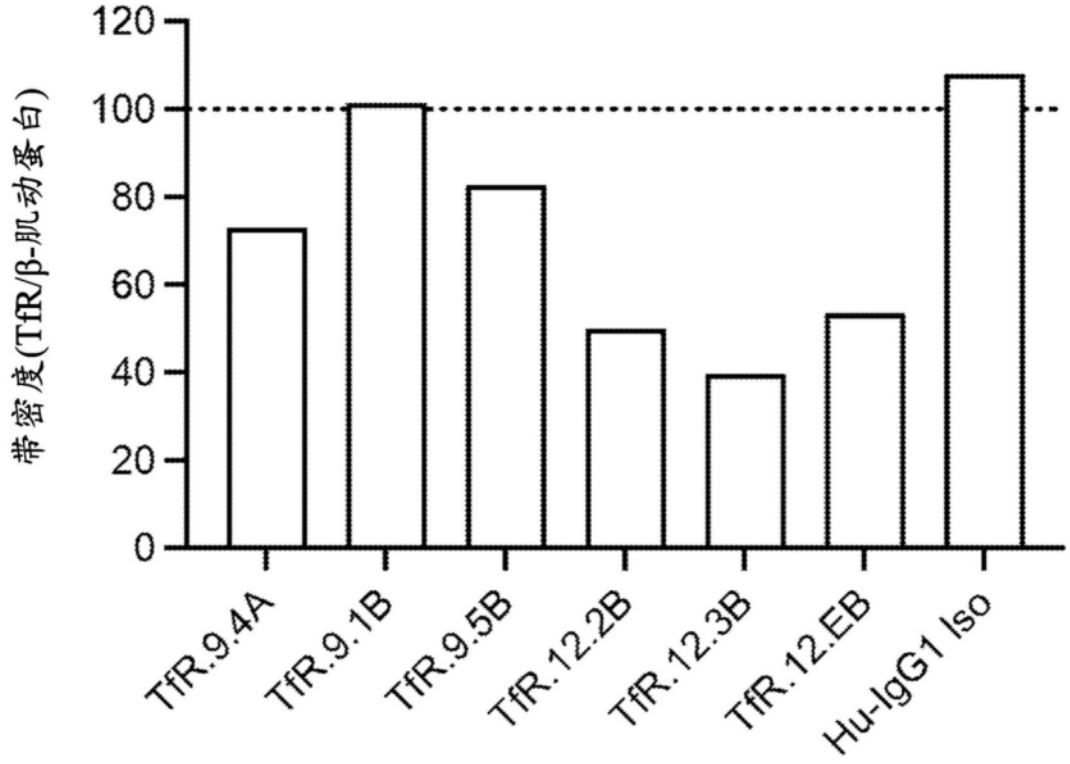
带密度(TfR/β-肌动蛋白)
120
100
80
60
40
20
0
TfR.9.4A
TfR.9.1B
TfR.9.5B
TfR.12.2B
TfR.12.3B
TfR.12.EB
Hu-IgG1 Iso

图4

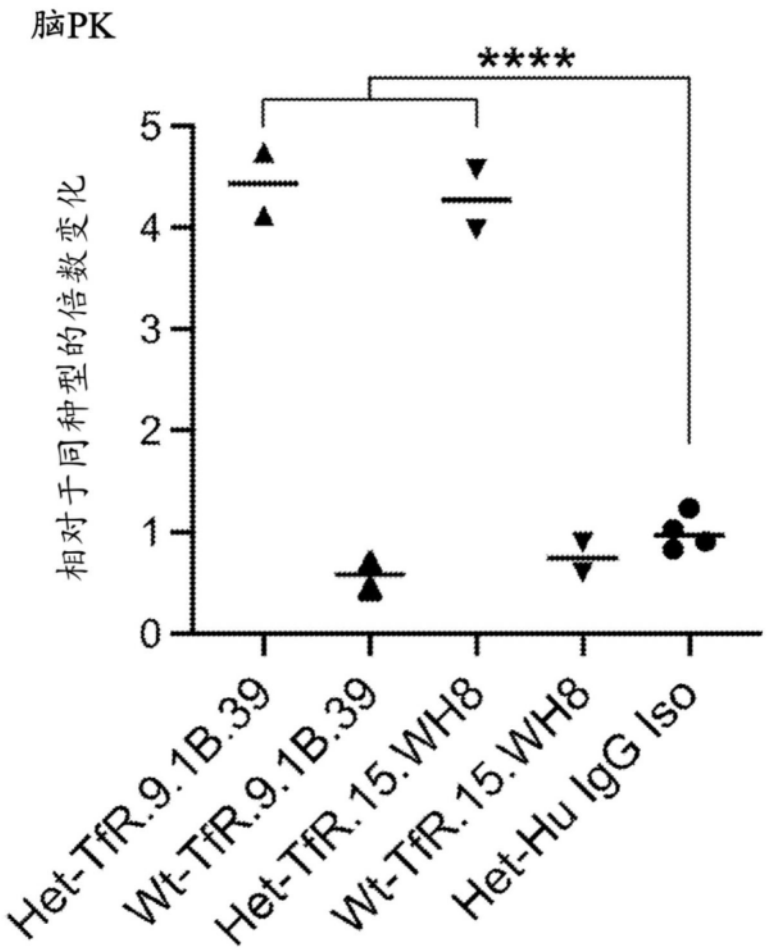
脑PK
****
相对于同种型的倍数变化
0
1
2
3
4
5
Het-TfR.9.1B.39
Wt-TfR.9.1B.39
Het-TfR.15.WH8
Wt-TfR.15.WH8
Het-Hu IgG Iso

图5

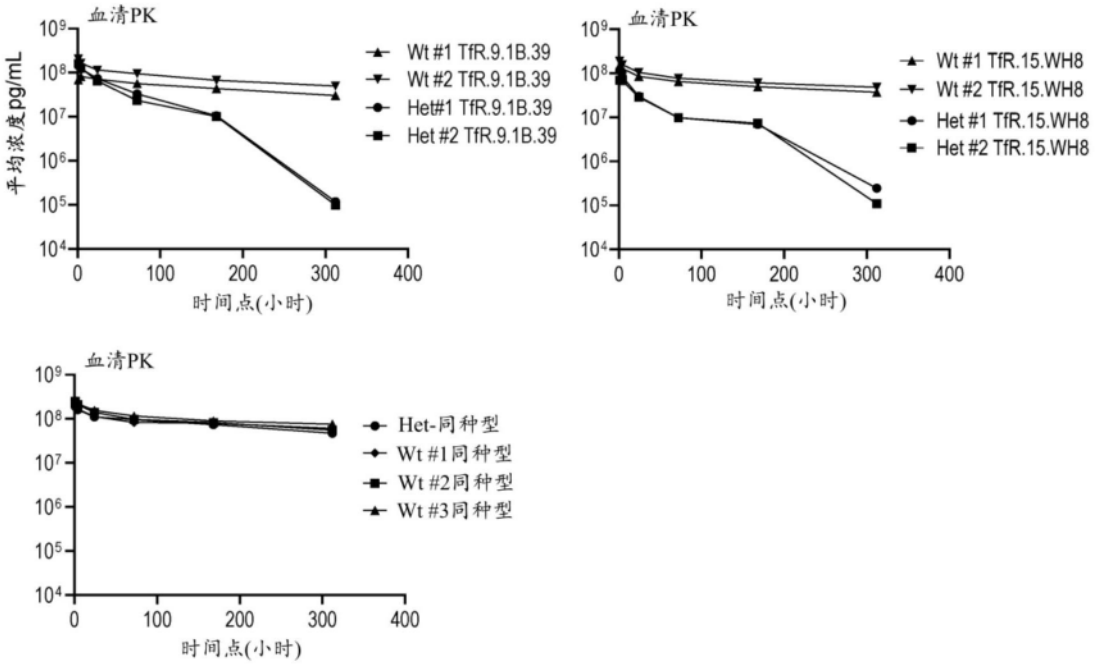
血清PK
平均浓度pg/mL
时间点(小时)
Wt #1 TfR.9.1B.39
Wt #2 TfR.9.1B.39
Het#1 TfR.9.1B.39
Het #2 TfR.9.1B.39
血清PK
时间点(小时)
Wt #1 TfR.15.WH8
Wt #2 TfR.15.WH8
Het #1 TfR.15.WH8
Het #2 TfR.15.WH8
血清PK
时间点(小时)
Het-同种型
Wt #1同种型
Wt #2同种型
Wt #3同种型

图6

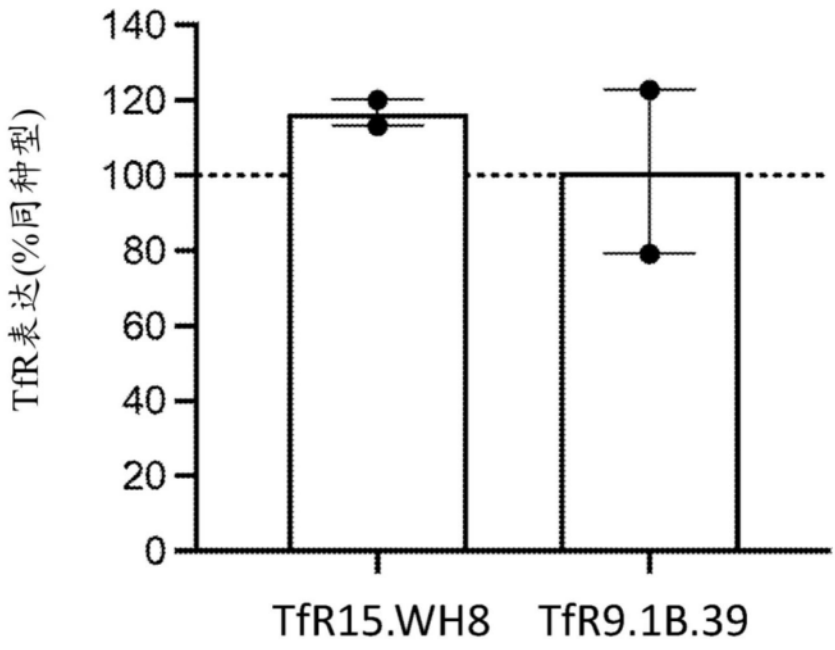
TfR表达(%同种型)
TfR15.WH8
TfR9.1B.39

图7

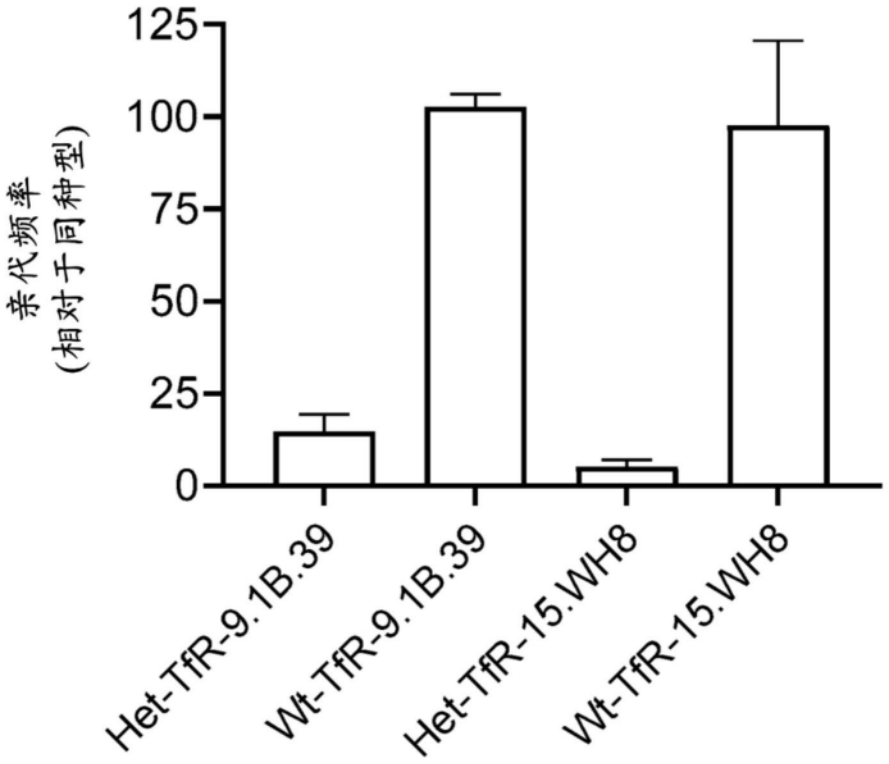
125
100
75
50
25
0
亲代频率
(相对于同种型)
Het-TfR-9.1B.39
Wt-TfR-9.1B.39
Het-TfR-15.WH8
Wt-TfR-15.WH8

图8

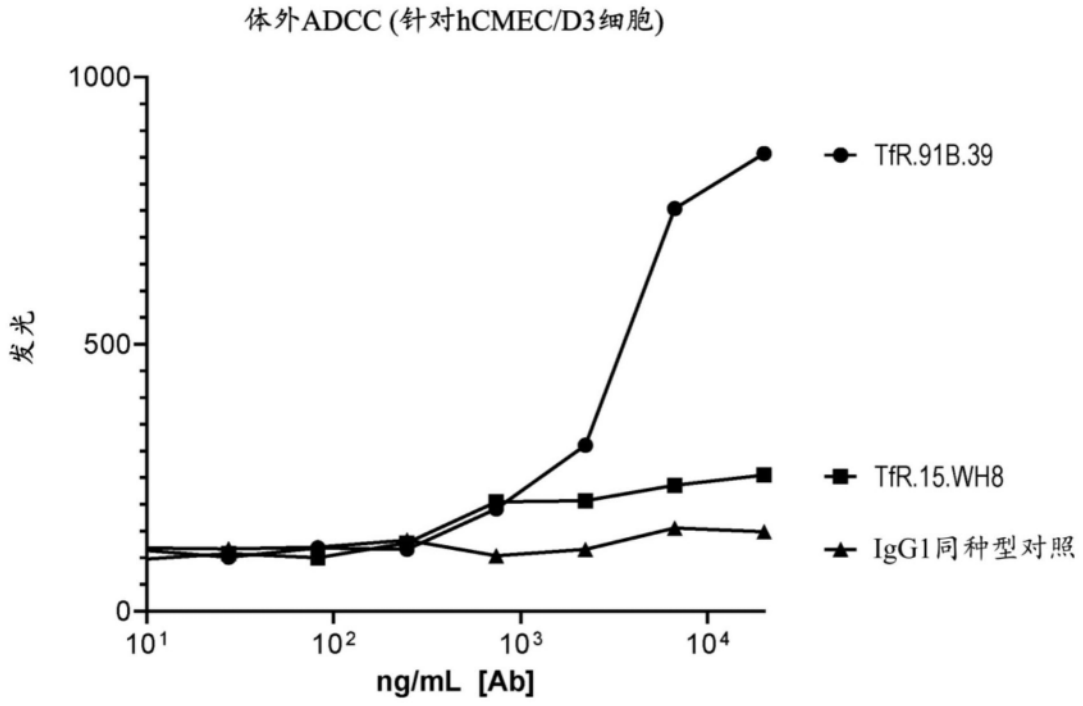
体外ADCC (针对hCMEC/D3细胞)
1000
500
0
发光
$10^1$
$10^2$
$10^3$
$10^4$
ng/mL [Ab]
TfR.91B.39
TfR.15.WH8
IgG1同种型对照

图9

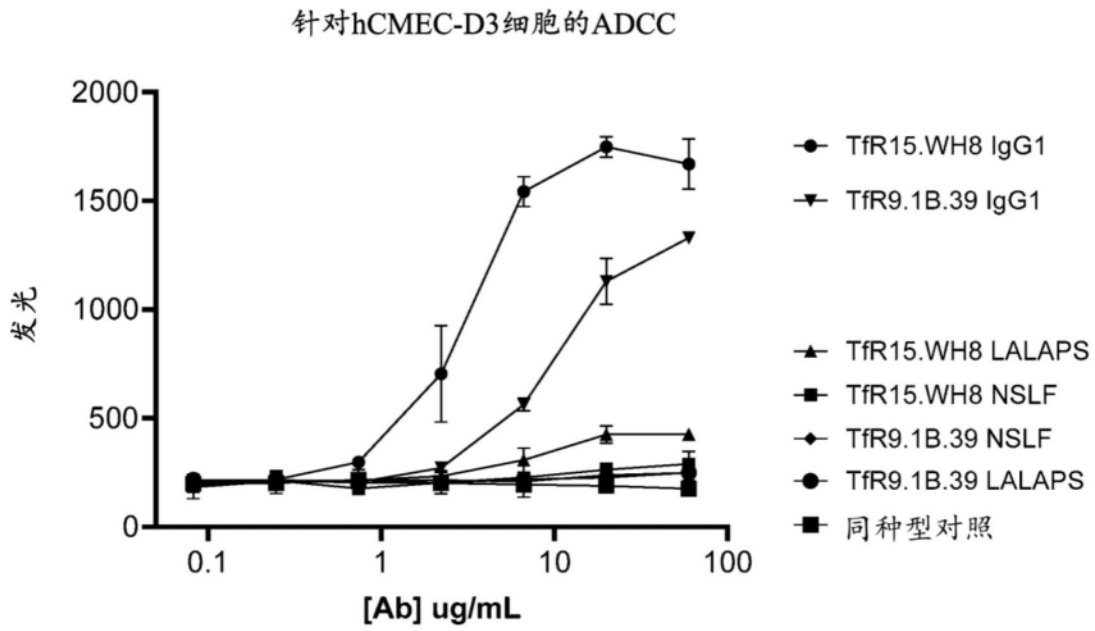
针对hCMEC-D3细胞的ADCC
发光
2000
1500
1000
500
0
0.1
1
10
100
[Ab] ug/mL
TfR15.WH8 IgG1
TfR9.1B.39 IgG1
TfR15.WH8 LALAPS
TfR15.WH8 NSLF
TfR9.1B.39 NSLF
TfR9.1B.39 LALAPS
同种型对照

图10

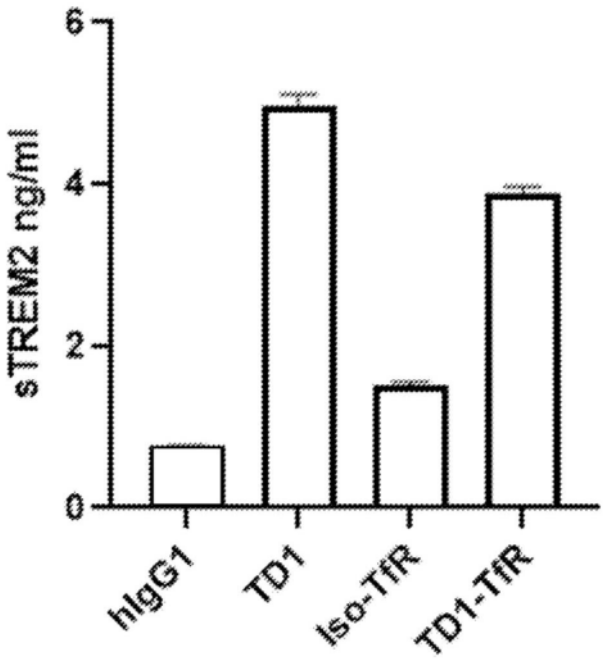
sTREM2 ng/ml
6
4
2
0
hIgG1
TD1
Iso-TfR
TD1-TfR

图11

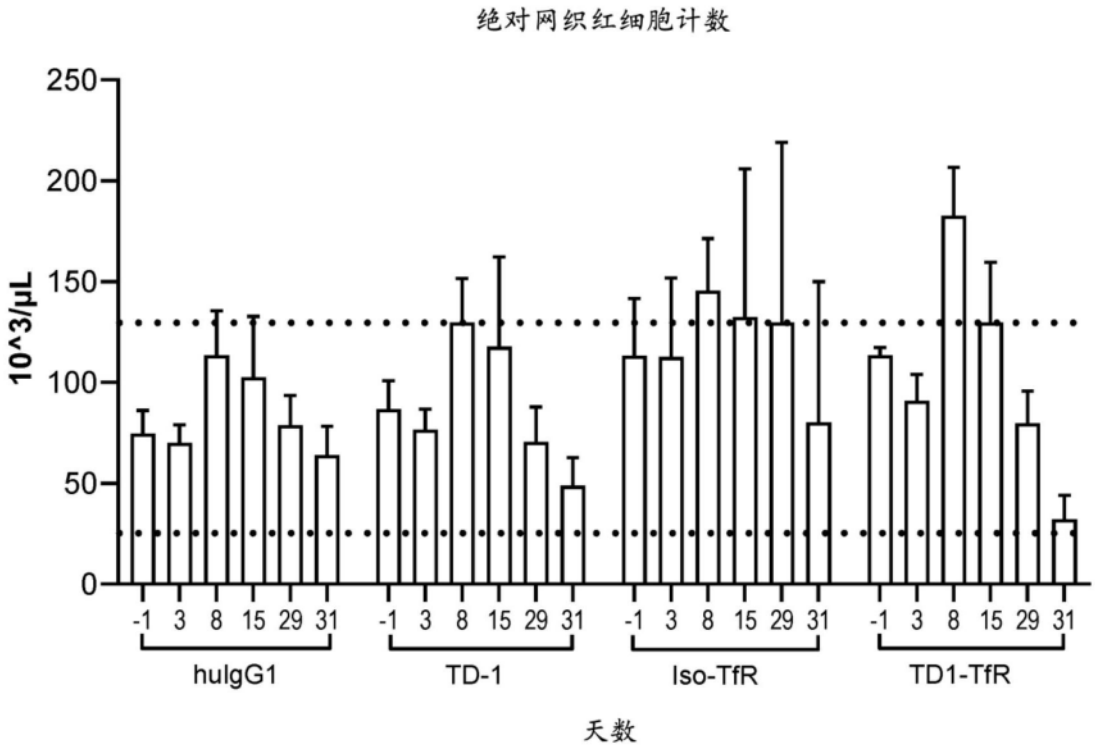
绝对网织红细胞计数
250
200
150
100
50
0
10^3/μL
-1 3 8 15 29 31
-1 3 8 15 29 31
-1 3 8 15 29 31
-1 3 8 15 29 31
huIgG1
TD-1
Iso-TfR
TD1-TfR
天数

图12

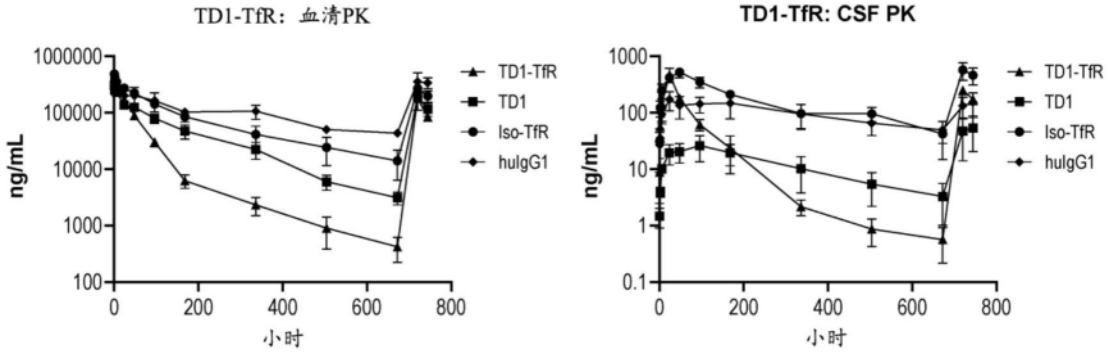
TD1-TfR：血清PK
1000000
100000
10000
1000
100
ng/mL
0
200
400
600
800
小时
TD1-TfR
TD1
Iso-TfR
huIgG1
TD1-TfR: CSF PK
1000
100
10
1
0.1
ng/mL
0
200
400
600
800
小时
TD1-TfR
TD1
Iso-TfR
huIgG1

图13

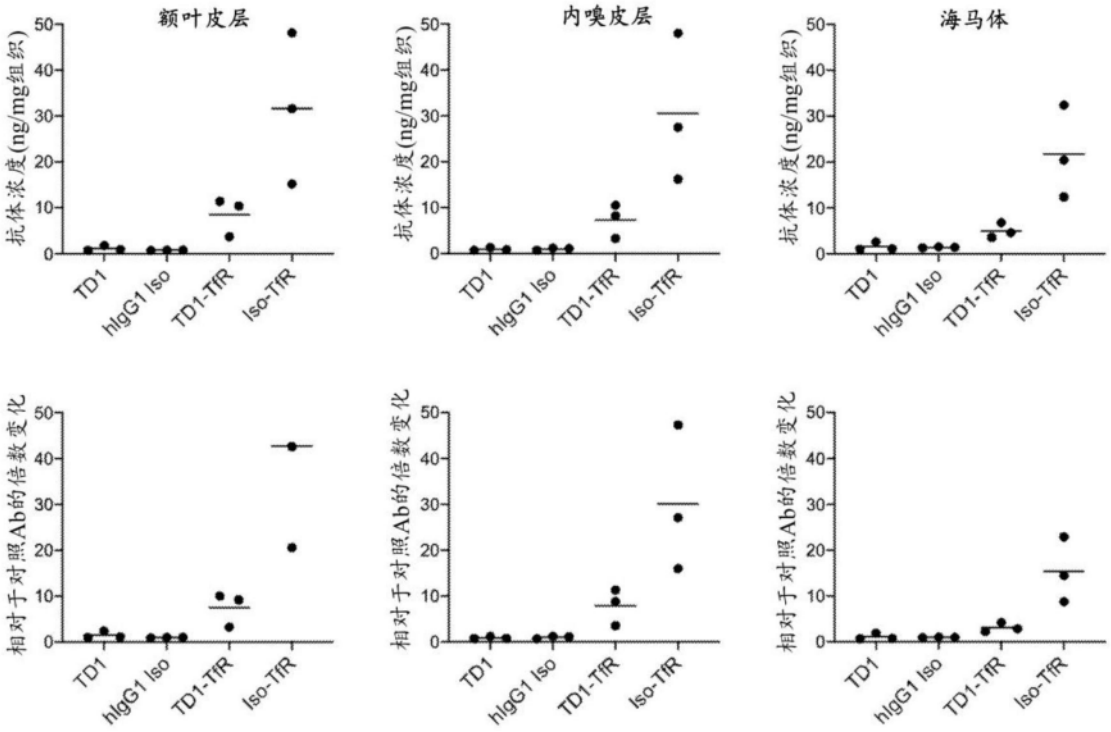
额叶皮层
内嗅皮层
海马体
抗体浓度(ng/mg组织)
相对于对照Ab的倍数变化
TD1
hIgG1 Iso
TD1-TfR
Iso-TfR

图14

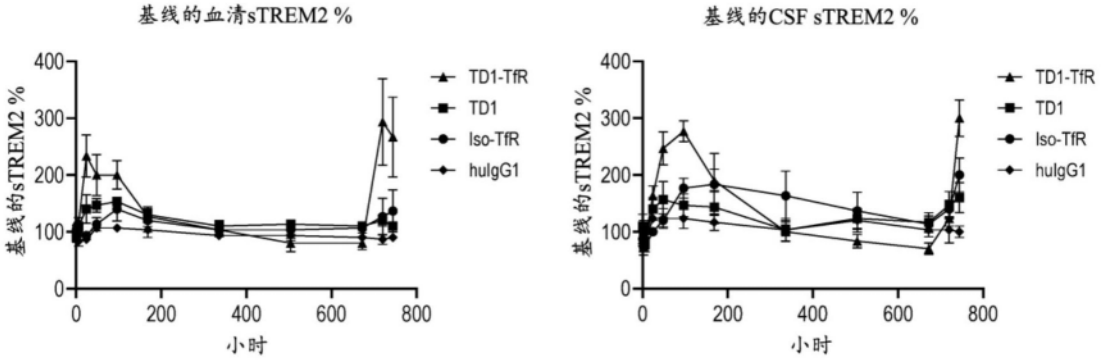
基线的血清sTREM2 %
基线的CSF sTREM2 %
基线的sTREM2 %
小时
TD1-TfR
TD1
Iso-TfR
huIgG1

图15

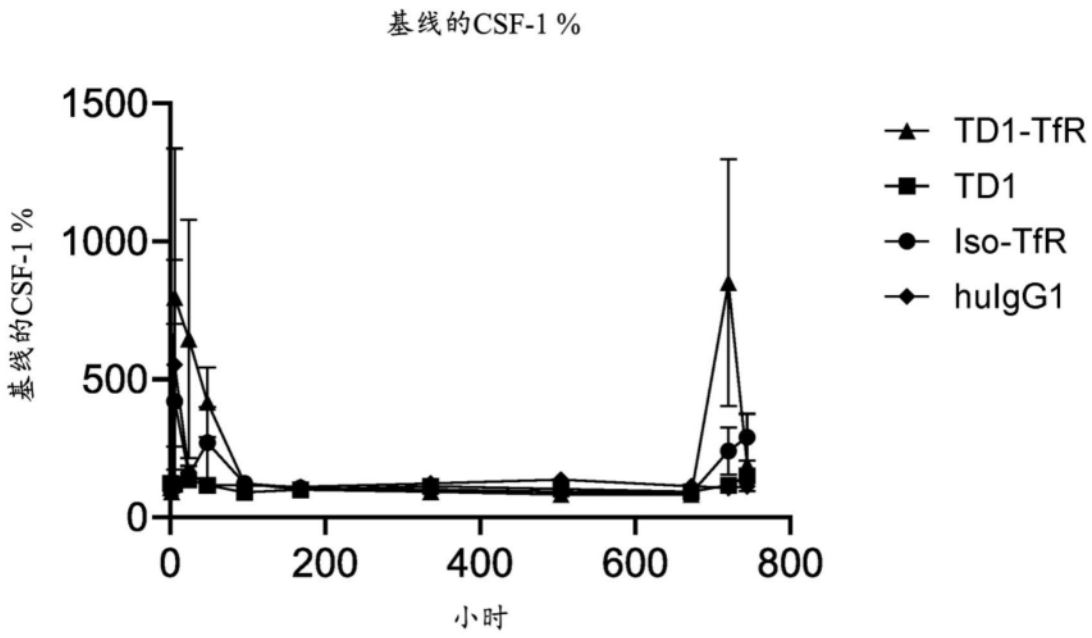
基线的CSF-1 %
1500
1000
500
0
0
200
400
600
800
小时
基线的CSF-1 %
TD1-TfR
TD1
Iso-TfR
huIgG1

图16

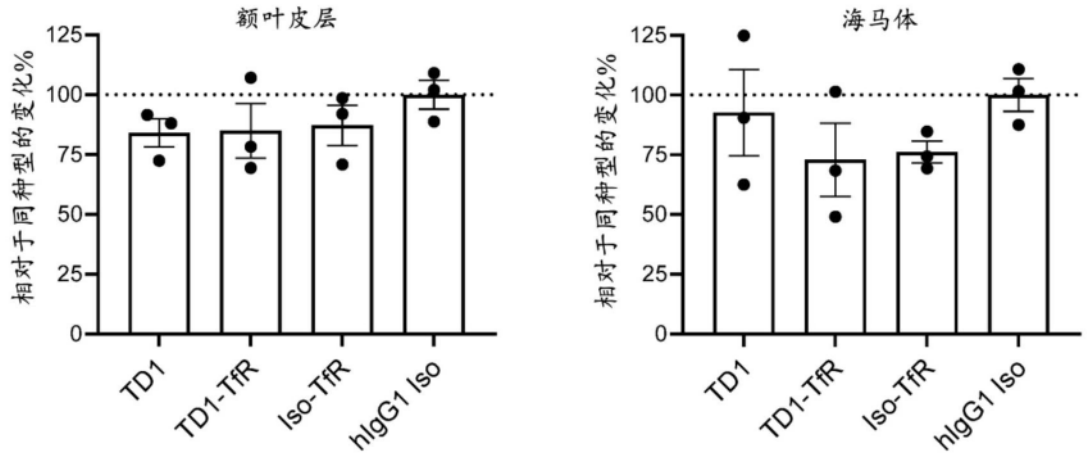
额叶皮层
海马体
相对于同种型的变化%
125
100
75
50
25
0
TD1
TD1-TfR
Iso-TfR
hIgG1 Iso

图17