



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119350481 A

(43) 申请公布日 2025. 01. 24

(21) 申请号 202411307275.X

(22) 申请日 2019.01.25

(30) 优先权数据

62/622,468 2018.01.26 US

(62) 分案原申请数据

201980015900.4 2019.01.25

(71) 申请人 建新公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 邱华伟 B·麦肯斯

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理师 封新琴

(51) Int.Cl.

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/42 (2006.01)

权利要求书2页 说明书70页 附图37页

(54) 发明名称

具有与FcRn增强的结合及延长的半衰期的
Fc变体

(57) 摘要

本发明涉及具有与FcRn增强的结合及延长的半衰期的Fc变体。具体地,本公开提供包含经修饰的Fc结构域的结合多肽(例如,抗体和免疫粘附素)。本公开还提供编码该结合多肽的核酸、重组表达载体和用于制备此类结合多肽的宿主细胞。还提供使用本文公开的结合多肽治疗疾病的方法。

1. 一种包含经修饰的Fc结构域的分离的结合多肽,该经修饰的Fc结构域包含:
氨基酸位置256处的天冬氨酸(D)或谷氨酸(E),和/或氨基酸位置307处的色氨酸(W)或谷氨酰胺(Q),其中氨基酸位置254不是苏氨酸(T),并且进一步包含:
氨基酸位置434处的苯丙氨酸(F)或酪氨酸(Y);或
氨基酸位置252处的酪氨酸(Y),
其中氨基酸位置依照EU编号。
2. 一种包含经修饰的Fc结构域的分离的结合多肽,该经修饰的Fc结构域包含选自以下位置处的氨基酸取代的组合:
 - a) 氨基酸位置252处的酪氨酸(Y)和氨基酸位置256处的天冬氨酸(D);
 - b) 氨基酸位置256处的天冬氨酸(D)和氨基酸位置434处的苯丙氨酸(F);
 - c) 氨基酸位置256处的天冬氨酸(D)和氨基酸位置434处的酪氨酸(Y);
 - d) 氨基酸位置307处的色氨酸(W)和氨基酸位置434处的苯丙氨酸(F);
 - e) 氨基酸位置252处的酪氨酸(Y)和氨基酸位置307处的色氨酸(W),其中酪氨酸(Y)不在氨基酸位置434处;
 - f) 氨基酸位置256处的天冬氨酸(D)和氨基酸位置307处的色氨酸(W),
其中酪氨酸(Y)不在氨基酸位置434处;
 - g) 氨基酸位置256处的天冬氨酸(D)和氨基酸位置307处的谷氨酰胺(Q),其中酪氨酸(Y)不在氨基酸位置434处;
 - h) 氨基酸位置252处的酪氨酸(Y)、氨基酸位置256处的天冬氨酸(D)和氨基酸位置307处的谷氨酰胺(Q),其中酪氨酸(Y)不在氨基酸位置434处;以及
 - i) 氨基酸位置252处的酪氨酸(Y)、氨基酸位置256处的谷氨酸(E)和氨基酸位置307处的谷氨酰胺(Q),其中苏氨酸(T)不在氨基酸位置254处,
组氨酸(H)不在氨基酸位置311处,并且酪氨酸(Y)不在氨基酸位置434处;
其中该氨基酸取代依照EU编号。
3. 一种包含经修饰的Fc结构域的分离的结合多肽,该经修饰的Fc结构域包含:
 - a) 选自M252Y/T256D、M252Y/T256E、M252Y/T307Q、M252Y/T307W、T256D/T307Q、T256D/T307W、T256E/T307Q和T256E/T307W的双重氨基酸取代,其中苏氨酸(T)不在氨基酸位置254处,组氨酸(H)不在氨基酸位置311处,并且酪氨酸(Y)不在氨基酸位置434处;或者
 - b) 选自M252Y/T256D/T307Q、M252Y/T256D/T307W、M252Y/T256E/T307Q和M252Y/T256E/T307W的三重氨基酸取代,其中苏氨酸(T)不在氨基酸位置254处,组氨酸(H)不在氨基酸位置311处,并且酪氨酸(Y)不在氨基酸位置434处;
其中该氨基酸取代依照EU编号。
4. 根据权利要求1-3中任一项所述的分离的结合多肽,其中该经修饰的Fc结构域是经修饰的人Fc结构域。
5. 根据权利要求1-4中任一项所述的分离的结合多肽,其中该经修饰的Fc结构域是经修饰的IgG1 Fc结构域。
6. 根据权利要求1-5中任一项所述的分离的结合多肽,其中该结合多肽具有人FcRn结合亲和力。
7. 根据权利要求1-5中任一项所述的分离的结合多肽,其中该结合多肽具有大鼠FcRn

结合亲和力。

8.根据权利要求1-7中任一项所述的分离的结合多肽,其中该结合多肽具有人和大鼠FcRn结合亲和力。

9.根据权利要求2-8中任一项所述的分离的结合多肽,其中与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,该分离的结合多肽具有改变的血清半衰期。

10.根据权利要求9所述的分离的结合多肽,其中与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,该分离的结合多肽具有增加的血清半衰期。

具有与FcRn增强的结合及延长的半衰期的Fc变体

[0001] 本申请是申请日为2019年1月25日、中国申请号为201980015900.4、发明名称为“具有与FcRn增强的结合及延长的半衰期的Fc变体”的发明申请的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求保护2018年1月26日提交的美国临时专利申请序列号62/622,468的优先权,该美国临时专利申请通过提述在此并入本文。

背景技术

[0004] 抗体与新生Fc受体 (FcRn) 的相互作用是维持和延长抗体和其他Fc衍生的治疗剂的血清半衰期的决定因素。FcRn是I类MHC样 α -结构域和 β 2-巨球蛋白 (β 2-m) 亚基的异二聚体,该异二聚体识别抗体Fc重链上与其他Fc γ 受体 (Fc γ R) 不同的区域。虽然FcRn在多种组织中表达,但它被认为主要在血管内皮、肾脏中和血脑屏障处起作用,分别用于阻止IgG降解、排泄和引发炎症反应。

[0005] 与FcRn结合的抗体是高度pH依赖性的,并且该相互作用仅在低pH (pH<6.5) 下以高亲和力(高纳摩尔至低微摩尔)发生,但在生理pH (pH约7.4) 下不发生。在将胞内体酸化至pH小于6.5时,IgG与FcRn之间的相互作用变得非常有利,并且直接负责抑制FcRn结合的抗体的降解并促进FcRn结合的抗体再循环至细胞表面。pH的增加削弱了相互作用并促进抗体释放至血流中。

[0006] 使用高通量诱变方法的Fc工程化已被广泛用于鉴定能增强FcRn结合亲和力的变体,因为增强的结合将可能导致治疗性抗体的功效增加和剂量频率降低,这是与野生型IgG抗体相比血清半衰期延长的直接结果。然而,增强FcRn结合亲和力的变体可具有不可预知的结果。例如,在pH 6.0下显示FcRn亲和力大幅增加的某些IgG变体,如N434W或P257I/Q311I等,在食蟹猴和人FcRn (hFcRn) 转基因小鼠研究中具有野生型或严重降低的血清半衰期(参见例如Kuo等人2011同上;Datta-Mannan等人2007,J.Biol.Chem.282:1709-1717;和Datta-Mannan等人2007,Metab.Dispos.35:86-94)。T250Q/M428L(QL)变体已经在动物模型中显示出IgG骨架特异性结果(参见例如Datta-Mannan等人2007,J.Biol.Chem.282:1709-1717;和Hinton等人2006,J.Immunol.176:346-356)。M252Y/S254T/T256E(YTE,EU编号)变体已经显示出在体外10倍增强,但在体内由于对于Fc γ RIIIa受体的亲和力的2倍降低而展示出抗体依赖性细胞介导的降低的细胞毒性(ADCC)(参见例如Da11'Acqua等人2002同上)。

[0007] 因此,仍然需要具有与FcRn的增强的结合和延长的循环半衰期的替代Fc变体。

发明内容

[0008] 本发明基于具有以下特征中的一种或多种的新型IgG抗体的发现:与野生型IgG抗体相比,增加的血清半衰期、增强的FcRn结合亲和力、在酸性pH下增强的FcRn结合亲和力、增强的Fc γ RIIIa结合亲和力和类似的热稳定性。

[0009] 因此,在某些方面,提供包含经修饰的Fc结构域的分离的结合多肽,该经修饰的Fc结构域包含氨基酸位置256处的天冬氨酸(D)或谷氨酸(E),和/或氨基酸位置307处的色氨酸

酸(W)或谷氨酰胺(Q),其中氨基酸位置254不是苏氨酸(T),并且进一步包含氨基酸位置434处的苯丙氨酸(F)或酪氨酸(Y)或氨基酸位置252处的酪氨酸(Y),其中该氨基酸位置依照EU编号。

[0010] 在某些示例性实施方案中,所述经修饰的Fc结构域是经修饰的人Fc结构域。在某些示例性实施方案中,所述经修饰的Fc结构域是经修饰的IgG1 Fc结构域。

[0011] 在某些示例性实施方案中,所述结合多肽具有人FcRn结合亲和力、大鼠FcRn结合亲和力或人和大鼠FcRn结合亲和力二者。

[0012] 在某些示例性实施例中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽具有改变的血清半衰期。在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽具有增加的血清半衰期。

[0013] 在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽具有改变的FcRn结合亲和力。在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽具有增强的FcRn结合亲和力。在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽在酸性pH下具有增强的FcRn结合亲和力。在某些示例性实施方案中,与结合多肽在升高的非酸性pH下的FcRn结合亲和力相比,所述分离的结合多肽在酸性pH下具有增强的FcRn结合亲和力。在某些示例性实施方案中,增强的FcRn结合亲和力包括降低的FcRn结合解离速率。

[0014] 在某些示例性实施方案中,酸性pH为约6.0。在某些示例性实施方案中,酸性pH为约6.0并且非酸性pH为约7.4。

[0015] 在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽具有改变的Fc γ RIIIa结合亲和力。在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽具有降低的Fc γ RIIIa结合亲和力。在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽具有增强的Fc γ RIIIa结合亲和力。

[0016] 在某些示例性实施方案中,所述分离的结合多肽具有与包含野生型Fc结构域的结合多肽大致相同的Fc γ RIIIa结合亲和力。

[0017] 在某些示例性实施方案中,所述分离的结合多肽具有与包含野生型Fc结构域的结合多肽大致相同的热稳定性。在某些示例性实施方案中,所述分离的结合多肽具有与包含具有依照EU编号的三重氨基酸取代M252Y/S254T/T256E的经修饰Fc结构域的结合多肽大致相同的热稳定性。

[0018] 在某些示例性实施方案中,所述分离的结合多肽是抗体,例如单克隆抗体。在某些示例性实施方案中,所述分离的抗体是嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。在某些示例性实施方案中,所述分离的抗体是全长抗体。

[0019] 在某些示例性实施方案中,所述分离的结合多肽特异性地结合一种或多种人靶标。

[0020] 在其他方面,提供一种包含经修饰的Fc结构域的分离的结合多肽,该经修饰的Fc结构域包含选自以下的位置处的氨基酸取代的组合:a)氨基酸位置252处的酪氨酸(Y)和氨基酸位置256处的天冬氨酸(D),b)氨基酸位置256处的天冬氨酸(D)和氨基酸位置434处的苯丙氨酸(F),c)氨基酸位置256处的天冬氨酸(D)和氨基酸位置434处的酪氨酸(Y),d)氨基

酸位置307处的色氨酸(W)和氨基酸位置434处的苯丙氨酸(F),e)氨基酸位置252处的酪氨酸(Y)和氨基酸位置307处的色氨酸(W),其中酪氨酸(Y)不在氨基酸位置434处,f)氨基酸位置256处的天冬氨酸(D)和氨基酸位置307处的色氨酸(W),其中酪氨酸(Y)不在氨基酸位置434处,g)氨基酸位置256处的天冬氨酸(D)和氨基酸位置307处的谷氨酰胺(Q),其中酪氨酸(Y)不在氨基酸位置434处,h)氨基酸位置252处的酪氨酸(Y)、氨基酸位置256处的天冬氨酸(D)和氨基酸位置307处的谷氨酰胺(Q),其中酪氨酸(Y)不在氨基酸位置434处,以及i)氨基酸位置252处的酪氨酸(Y)、氨基酸位置256处的谷氨酸(E)和氨基酸位置307处的谷氨酰胺(Q),其中苏氨酸(T)不在氨基酸位置254处,组氨酸(H)不在氨基酸位置311处,并且酪氨酸(Y)不在氨基酸位置434处,其中该氨基酸取代依照EU编号。

[0021] 在某些示例性实施方案中,所述经修饰的Fc结构域是经修饰的人Fc结构域。在某些示例性实施方案中,所述经修饰的Fc结构域是经修饰的IgG1 Fc结构域。

[0022] 在某些示例性实施方案中,所述结合多肽具有人FcRn结合亲和力、大鼠FcRn结合亲和力或人和大鼠FcRn结合亲和力二者。

[0023] 在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽具有改变的血清半衰期。在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽具有增加的血清半衰期。

[0024] 在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽具有改变的FcRn结合亲和力。在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽具有增强的FcRn结合亲和力。在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽在酸性pH下具有增强的FcRn结合亲和力。在某些示例性实施方案中,与结合多肽在升高的非酸性pH下的FcRn结合亲和力相比,所述分离的结合多肽在酸性pH下具有增强的FcRn结合亲和力。在某些示例性实施方案中,增强的FcRn结合亲和力包括降低的FcRn结合解离速率。在某些示例性实施方案中,所述分离的结合多肽在非酸性pH下具有比包含具有依照EU编号的双重氨基酸取代M428L/N434S的经修饰Fc结构域的结合多肽更小的FcRn结合亲和力。

[0025] 在某些示例性实施方案中,酸性pH为约6.0。在某些示例性实施方案中,酸性pH为约6.0并且非酸性pH为约7.4。

[0026] 在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽具有改变的Fc γ RIIIa结合亲和力。在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽具有降低的Fc γ RIIIa结合亲和力。在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽具有增强的Fc γ RIIIa结合亲和力。

[0027] 在某些示例性实施方案中,所述分离的结合多肽具有与包含野生型Fc结构域的结合多肽大致相同的Fc γ RIIIa结合亲和力。

[0028] 在某些示例性实施方案中,所述分离的结合多肽具有与包含野生型Fc结构域的结合多肽大致相同的热稳定性。在某些示例性实施方案中,所述分离的结合多肽具有与包含具有依照EU编号的三重氨基酸取代M252Y/S254T/T256E的经修饰Fc结构域的结合多肽大致相同的热稳定性。

[0029] 在某些示例性实施方案中,所述分离的结合多肽是抗体,例如单克隆抗体。在某些

示例性实施方案中,所述分离的抗体是嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。在某些示例性实施方案中,所述分离的抗体是全长抗体。

[0030] 在某些示例性实施方案中,所述分离的结合多肽特异性地结合一种或多种人靶标。

[0031] 在其他方面,提供一种包含经修饰的Fc结构域的分离的结合多肽,该经修饰的Fc结构域包含a)选自M252Y/T256D、M252Y/T256E、M252Y/T307Q、M252Y/T307W、T256D/T307Q、T256D/T307W、T256E/T307Q和T256E/T307W的双重氨基酸取代,其中苏氨酸(T)不在氨基酸位置254处,组氨酸(H)不在氨基酸位置311处,并且酪氨酸(Y)不在氨基酸位置434处,或者b)选自M252Y/T256D/T307Q、M252Y/T256D/T307W、M252Y/T256E/T307Q和M252Y/T256E/T307W的三重氨基酸取代,其中苏氨酸(T)不在氨基酸位置254处,组氨酸(H)不在氨基酸位置311处,并且酪氨酸(Y)不在氨基酸位置434处,其中该氨基酸取代依照EU编号。

[0032] 在某些示例性实施方案中,所述经修饰的Fc结构域是经修饰的人Fc结构域。在某些示例性实施方案中,所述经修饰的Fc结构域是经修饰的IgG1 Fc结构域。

[0033] 在某些示例性实施方案中,所述结合多肽具有人FcRn结合亲和力、大鼠FcRn结合亲和力或人和大鼠FcRn结合亲和力二者。

[0034] 在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽具有改变的血清半衰期。在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽具有增加的血清半衰期。

[0035] 在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽具有改变的FcRn结合亲和力。在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽具有增强的FcRn结合亲和力。在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽在酸性pH下具有增强的FcRn结合亲和力。在某些示例性实施方案中,与结合多肽在升高的非酸性pH下的FcRn结合亲和力相比,所述分离的结合多肽在酸性pH下具有增强的FcRn结合亲和力。在某些示例性实施方案中,增强的FcRn结合亲和力包括降低的FcRn结合解离速率。在某些示例性实施方案中,所述分离的结合多肽在非酸性pH下具有比包含具有依照EU编号的双重氨基酸取代M428L/N434S的经修饰Fc结构域的结合多肽更小的FcRn结合亲和力。

[0036] 在某些示例性实施方案中,酸性pH为约6.0。在某些示例性实施方案中,酸性pH为约6.0并且非酸性pH为约7.4。

[0037] 在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽具有改变的Fc γ RIIIa结合亲和力。在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽具有降低的Fc γ RIIIa结合亲和力。在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽具有增强的Fc γ RIIIa结合亲和力。

[0038] 在某些示例性实施方案中,所述分离的结合多肽具有与包含野生型Fc结构域的结合多肽大致相同的Fc γ RIIIa结合亲和力。

[0039] 在某些示例性实施例中,所述分离的结合多肽具有与包含野生型Fc结构域的结合多肽大致相同的热稳定性。在某些示例性实施方案中,所述分离的结合多肽具有与包含具有依照EU编号的三重氨基酸取代M252Y/S254T/T256E的经修饰Fc结构域的结合多肽大致相

同的热稳定性。

[0040] 在某些示例性实施方案中,所述分离的结合多肽是抗体,例如单克隆抗体。在某些示例性实施方案中,所述分离的抗体是嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。在某些示例性实施方案中,所述分离的抗体是全长抗体。

[0041] 在某些示例性实施方案中,所述分离的结合多肽特异性地结合一种或多种人靶标。

[0042] 在某些方面,提供一种包含经修饰的Fc结构域的分离的结合多肽,其中该经修饰的Fc结构域包含依照EU编号的氨基酸位置256处的天冬氨酸(D)和氨基酸位置307处的谷氨酰胺(Q)。

[0043] 在某些示例性实施方案中,所述经修饰的Fc结构域是经修饰的人Fc结构域。在某些示例性实施方案中,所述经修饰的Fc结构域是经修饰的IgG1 Fc结构域。

[0044] 在某些示例性实施方案中,所述结合多肽具有人FcRn结合亲和力或大鼠FcRn结合亲和力或人和大鼠FcRn结合亲和力二者。

[0045] 在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽具有增加的血清半衰期。

[0046] 在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽具有增强的FcRn结合亲和力。在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽在酸性pH下具有增强的FcRn结合亲和力。在某些示例性实施方案中,与结合多肽在升高的非酸性pH下的FcRn结合亲和力相比,所述分离的结合多肽在酸性pH下具有增强的FcRn结合亲和力。在某些示例性实施方案中,增强的FcRn结合亲和力包括降低的FcRn结合解离速率。

[0047] 在某些示例性实施方案中,酸性pH为约6.0。在某些示例性实施方案中,酸性pH为约6.0并且非酸性pH为约7.4。

[0048] 在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽具有改变的Fc γ RIIIa结合亲和力。

[0049] 在某些示例性实施方案中,所述分离的结合多肽是单克隆抗体。在某些示例性实施方案中,所述抗体是嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。

[0050] 在某些示例性实施方案中,所述分离的结合多肽特异性地结合一种或多种人靶标。

[0051] 在某些方面,提供一种分离的核酸分子,其包含编码所述分离的多肽的核酸。

[0052] 在某些方面,提供一种包含所述分离的核酸分子的载体。在某些示例性实施方案中,所述载体是表达载体。在某些方面,提供一种包含所述分离的核酸分子的表达载体。

[0053] 在某些方面,提供一种包含所述载体的宿主细胞。在某些方面,提供一种包含所述表达载体的宿主细胞。

[0054] 在某些示例性实施方案中,所述宿主细胞是真核或原核起源的。在某些示例性实施方案中,所述宿主细胞是哺乳动物起源的。在某些示例性实施方案中,所述宿主细胞是细菌起源的。

[0055] 在某些方面,提供一种包含所述分离的结合多肽的药物组合物。

[0056] 在某些方面,提供一种包含所述分离的抗体的药物组合物。

[0057] 在某些方面,提供一种包含经修饰的Fc结构域的分离的结合多肽,其中所述经修饰的Fc结构域包含依照EU编号的氨基酸位置256处的天冬氨酸(D)和氨基酸位置307处的色氨酸(W)。

[0058] 在某些示例性实施方案中,所述经修饰的Fc结构域是经修饰的人Fc结构域。在某些示例性实施方案中,所述经修饰的Fc结构域是经修饰的IgG1 Fc结构域。

[0059] 在某些示例性实施方案中,所述结合多肽具有人FcRn结合亲和力或大鼠FcRn结合亲和力或人和大鼠FcRn结合亲和力二者。

[0060] 在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽具有增加的血清半衰期。

[0061] 在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽具有增强的FcRn结合亲和力。在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽在酸性pH下具有增强的FcRn结合亲和力。在某些示例性实施方案中,与结合多肽在升高的非酸性pH下的FcRn结合亲和力相比,所述分离的结合多肽在酸性pH下具有增强的FcRn结合亲和力。在某些示例性实施方案中,增强的FcRn结合亲和力包括降低的FcRn结合解离速率。

[0062] 在某些示例性实施方案中,酸性pH为约6.0。在某些示例性实施方案中,酸性pH为约6.0并且非酸性pH为约7.4。

[0063] 在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽具有改变的Fc γ RIIIa结合亲和力。

[0064] 在某些示例性实施方案中,所述分离的结合多肽是单克隆抗体。在某些示例性实施方案中,所述抗体是嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。

[0065] 在某些示例性实施方案中,所述分离的结合多肽特异性地结合一种或多种人靶标。

[0066] 在某些方面,提供一种分离的核酸分子,其包含编码所述分离的多肽的核酸。

[0067] 在某些方面,提供一种包含所述分离的核酸分子的载体。在某些示例性实施方案中,所述载体是表达载体。在某些方面,提供一种包含所述分离的核酸分子的表达载体。

[0068] 在某些方面,提供一种包含所述载体的宿主细胞。在某些方面,提供一种包含所述表达载体的宿主细胞。

[0069] 在某些示例性实施方案中,所述宿主细胞是真核或原核起源的。在某些示例性实施方案中,所述宿主细胞是哺乳动物起源的。在某些示例性实施方案中,所述宿主细胞是细菌起源的。

[0070] 在某些方面,提供一种包含所述分离的结合多肽的药物组合物。

[0071] 在某些方面,提供一种包含所述分离的抗体的药物组合物。

[0072] 在某些方面,提供一种包含经修饰的Fc结构域的分离的结合多肽,其中该经修饰的Fc结构域包含依照EU编号的氨基酸位置252处的酪氨酸(Y)和氨基酸位置256处的天冬氨酸(D)。

[0073] 在某些示例性实施方案中,所述经修饰的Fc结构域是经修饰的人Fc结构域。在某些示例性实施方案中,所述经修饰的Fc结构域是经修饰的IgG1 Fc结构域。

[0074] 在某些示例性实施方案中,所述结合多肽具有人FcRn结合亲和力或大鼠FcRn结合

亲和力和人和大鼠FcRn结合亲和力二者。

[0075] 在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽具有增加的血清半衰期。

[0076] 在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽具有增强的FcRn结合亲和力。在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽在酸性pH下具有增强的FcRn结合亲和力。在某些示例性实施方案中,与结合多肽在升高的非酸性pH下的FcRn结合亲和力相比,所述分离的结合多肽在酸性pH下具有增强的FcRn结合亲和力。在某些示例性实施方案中,增强的FcRn结合亲和力包括降低的FcRn结合解离速率。

[0077] 在某些示例性实施方案中,酸性pH为约6.0。在某些示例性实施方案中,酸性pH为约6.0并且非酸性pH为约7.4。

[0078] 在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽具有改变的Fc γ RIIIa结合亲和力。

[0079] 在某些示例性实施方案中,所述分离的结合多肽是单克隆抗体。在某些示例性实施方案中,所述抗体是嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。

[0080] 在某些示例性实施方案中,所述分离的结合多肽特异性地结合一种或多种人靶标。

[0081] 在某些方面,提供一种分离的核酸分子,其包含编码所述分离的多肽的核酸。

[0082] 在某些方面,提供一种包含所述分离的核酸分子的载体。在某些示例性实施方案中,所述载体是表达载体。在某些方面,提供一种包含所述分离的核酸分子的表达载体。

[0083] 在某些方面,提供一种包含所述载体的宿主细胞。在某些方面,提供一种包含所述表达载体的宿主细胞。

[0084] 在某些示例性实施方案中,所述宿主细胞是真核或原核起源的。在某些示例性实施方案中,所述宿主细胞是哺乳动物起源的。在某些示例性实施方案中,所述宿主细胞是细菌起源的。

[0085] 在某些方面,提供一种包含所述分离的结合多肽的药物组合物。

[0086] 在某些方面,提供一种包含所述分离的抗体的药物组合物。

[0087] 在某些方面,提供一种包含经修饰的Fc结构域的分离的结合多肽,其中该经修饰的Fc结构域包含至少四个氨基酸取代的组合,该组合包含:氨基酸位置256处的天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)和氨基酸位置307处的色氨酸(W)或谷氨酰胺(Q),其中氨基酸位置254不是苏氨酸(T),并且进一步包含氨基酸位置434处的苯丙氨酸(F)或酪氨酸(Y);以及氨基酸位置252处的酪氨酸(Y),其中氨基酸位置依照EU编号。

[0088] 在某些方面,提供一种包含经修饰的Fc结构域的分离的结合多肽,该经修饰的Fc结构域具有选自由以下组成的组的位置处的氨基酸取代的组合:a)氨基酸位置252处的酪氨酸(Y)、氨基酸位置256处的天冬氨酸(D)、氨基酸位置307处的谷氨酰胺(Q)和氨基酸位置434处的酪氨酸(Y);b)氨基酸位置252处的酪氨酸(Y)、氨基酸位置256处的谷氨酸(E)、氨基酸位置307处的色氨酸(W)和氨基酸位置434处的酪氨酸(Y);c)氨基酸位置252处的酪氨酸(Y)、氨基酸位置256处的谷氨酸(E)、氨基酸位置307处的谷氨酰胺(Q)和氨基酸位置434处的酪氨酸(Y);d)氨基酸位置252处的酪氨酸(Y)、氨基酸位置256处的天冬氨酸(D)、氨基酸

位置307处的谷氨酰胺(Q)和氨基酸位置434处的苯丙氨酸(F);或e)氨基酸位置252处的酪氨酸(Y)、氨基酸位置256处的天冬氨酸(D)、氨基酸位置307处的色氨酸(W)和氨基酸位置434处的酪氨酸(Y),其中所述氨基酸取代依照EU编号。

[0089] 在某些方面,提供一种包含经修饰的Fc结构域的分离的结合多肽,该经修饰的Fc结构域包含:选自M252Y/T256D/T307Q/N434Y、M252Y/T256E/T307W/N434Y、M252Y/T256E/T307Q/N434Y、M252Y/T256D/T307Q/N434F和M252Y/T256D/T307W/N434Y的四重氨基酸取代,其中该氨基酸取代依照EU编号。

[0090] 在某些示例性实施方案中,所述经修饰的Fc结构域是经修饰的人Fc结构域。在某些示例性实施方案中,所述经修饰的Fc结构域是经修饰的IgG1 Fc结构域。

[0091] 在某些示例性实施方案中,所述结合多肽具有人FcRn结合亲和力。在某些示例性实施方案中,所述结合多肽具有大鼠FcRn结合亲和力。在某些示例性实施方案中,所述结合多肽具有人和大鼠FcRn结合亲和力。

[0092] 在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽具有改变的FcRn结合亲和力。在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽具有增强的FcRn结合亲和力。

[0093] 在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽在酸性pH下具有增强的FcRn结合亲和力。在某些示例性实施方案中,与包含M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F的结合多肽相比,所述分离的结合多肽在酸性pH下具有增强的FcRn结合亲和力。

[0094] 在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽在非酸性pH下具有增强的FcRn结合亲和力。在某些示例性实施方案中,与包含M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F的结合多肽相比,所述分离的结合多肽在非酸性pH下具有增强的FcRn结合亲和力。

[0095] 在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽在酸性pH下具有增强的FcRn结合亲和力,并且在非酸性pH下具有增强的FcRn结合亲和力。在某些示例性实施方案中,与包含M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F的结合多肽相比,所述分离的结合多肽在酸性pH下具有增强的FcRn结合亲和力,并且在非酸性pH下具有增强的FcRn结合亲和力。

[0096] 在某些示例性实施例中,所述酸性pH为约6.0。在某些示例性实施方案中,所述非酸性pH为约7.4。

[0097] 在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽具有改变的血清半衰期。在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽具有减少的血清半衰期。在某些示例性实施方案中,与包含M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F的结合多肽相比,所述分离的结合多肽具有减少的血清半衰期。

[0098] 在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽具有改变的Fc γ RIIIa结合亲和力。在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽具有降低的Fc γ RIIIa结合亲和力。在某些示例性实施方案中,与包含M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F的结合多肽相比,所述分离的结合

多肽具有降低的Fc γ RIIIa结合亲和力。

[0099] 在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽具有降低的热稳定性。在某些示例性实施方案中,与包含M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F的结合多肽相比,所述分离的结合多肽具有降低的热稳定性。

[0100] 在某些示例性实施方案中,所述分离的结合多肽是抗体。在某些示例性实施方案中,所述分离的结合多肽是单克隆抗体。在某些示例性实施方案中,所述分离的抗体是嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。在某些示例性实施方案中,所述分离的抗体是全长抗体。

[0101] 在某些示例性实施方案中,所述分离的结合多肽特异性地结合一种或多种靶标。

[0102] 在某些方面,提供一种分离的核酸分子,其包含编码所述分离的多肽的核酸。

[0103] 在某些方面,提供一种包含所述分离的核酸分子的载体。

[0104] 在某些示例性实施方案中,所述载体是表达载体。

[0105] 在某些方面,提供一种包含所述载体的宿主细胞。

[0106] 在某些示例性实施方案中,所述宿主细胞是真核或原核起源的。在某些示例性实施方案中,所述宿主细胞是哺乳动物起源的。在某些示例性实施方案中,所述宿主细胞是细菌起源的。

[0107] 在某些方面,提供一种包含所述分离的结合多肽的药物组合物。

[0108] 在某些方面,提供一种包含所述分离的抗体的药物组合物。

[0109] 在某些方面,提供一种包含经修饰的Fc结构域的分离的结合多肽,所述经修饰的Fc结构域包含依照EU编号的氨基酸位置252处的酪氨酸(Y)、氨基酸位置256处的天冬氨酸(D)、氨基酸位置307处的谷氨酰胺(Q)和氨基酸位置434处的酪氨酸(Y)。

[0110] 在某些方面,提供一种包含经修饰的Fc结构域的分离的结合多肽,所述经修饰的Fc结构域包含依照EU编号的氨基酸位置252处的酪氨酸(Y)、氨基酸位置256处的谷氨酸(E)、氨基酸位置307处的色氨酸(W)和氨基酸位置434处的酪氨酸(Y)。

[0111] 在某些方面,提供一种包含经修饰的Fc结构域的分离的结合多肽,所述经修饰的Fc结构域包含依照EU编号的氨基酸位置252处的酪氨酸(Y)、氨基酸位置256处的谷氨酸(E)、氨基酸位置307处的谷氨酰胺(Q)和氨基酸位置434处的酪氨酸(Y)。

[0112] 在某些方面,提供一种包含经修饰的Fc结构域的分离的结合多肽,所述经修饰的Fc结构域包含依照EU编号的氨基酸位置252处的酪氨酸(Y)、氨基酸位置256处的天冬氨酸(D)、氨基酸位置307处的谷氨酰胺(Q)和氨基酸位置434处的苯丙氨酸(F)。

[0113] 在某些方面,提供一种包含经修饰的Fc结构域的分离的结合多肽,所述经修饰的Fc结构域包含依照EU编号的氨基酸位置252处的酪氨酸(Y)、氨基酸位置256处的天冬氨酸(D)、氨基酸位置307处的色氨酸(W)和氨基酸位置434处的酪氨酸(Y)。

[0114] 在某些示例性实施方案中,所述经修饰的Fc结构域是经修饰的人Fc结构域。在某些示例性实施方案中,所述经修饰的Fc结构域是经修饰的IgG1 Fc结构域。

[0115] 在某些示例性实施方案中,所述结合多肽具有人FcRn结合亲和力。

[0116] 在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽具有减少的血清半衰期。在某些示例性实施方案中,与包含M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F的结合多肽相比,所述分离的结合多肽具有减少的血清半衰期。

[0117] 在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的

结合多肽在酸性pH下具有增强的FcRn结合亲和力,并且在非酸性pH下具有增强的FcRn结合亲和力。在某些示例性实施方案中,与包含M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F的结合多肽相比,所述分离的结合多肽在酸性pH下具有增强的FcRn结合亲和力,并且在非酸性pH下具有增强的FcRn结合亲和力。

[0118] 在某些示例性实施方案中,所述酸性pH为约6.0并且所述非酸性pH为约7.4。

[0119] 在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽具有降低的Fc γ RIIIa结合亲和力。在某些示例性实施方案中,与包含M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F的结合多肽相比,所述分离的结合多肽具有降低的Fc γ RIIIa结合亲和力。

[0120] 在某些示例性实施例中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,所述分离的结合多肽具有降低的热稳定性。在某些示例性实施方案中,与包含M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F的结合多肽相比,所述分离的结合多肽具有降低的热稳定性。

[0121] 在某些示例性实施方案中,所述分离的结合多肽是单克隆抗体。在某些示例性实施例中,所述抗体是嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。

[0122] 在某些示例性实施方案中,所述分离的结合多肽特异性地结合一种或多种靶标。

[0123] 在某些方面,提供一种分离的核酸分子,其包含编码所述分离的多肽的核酸。

[0124] 在某些方面,提供一种包含所述分离的核酸分子的表达载体。

[0125] 在某些方面,提供一种包含所述表达载体的宿主细胞。

[0126] 在某些方面,提供一种包含所述分离的结合多肽的药物组合物。

[0127] 在某些方面,提供一种治疗有此需要的受试者的疾病或病症的方法,其包括向该受试者施用治疗有效量的所述分离的结合多肽,或向该受试者施用治疗有效量的所述药物组合物。

[0128] 在某些示例性实施方案中,所述疾病或病症是癌症。在某些示例性实施例中,所述癌症是肿瘤。

[0129] 在某些示例性实施方案中,所述疾病或病症是自身免疫病症。

[0130] 在某些方面,提供了一种治疗有此需要的受试者的癌症的方法,其包括向该受试者施用治疗有效量的所述分离的结合多肽,或向该受试者施用治疗有效量的所述药物组合物。

[0131] 在某些方面,提供一种治疗有此需要的受试者的自身免疫病症的方法,其包括向该受试者施用治疗有效量的所述分离的结合多肽,或向该受试者施用治疗有效量的所述药物组合物。

附图说明

[0132] 从以下说明性实施方案的详细描述结合附图将更充分地理解本发明的前述和其他特征和优点。

[0133] 图1A至图1B描绘了与IgG1 Fc区相互作用的FcRn的结构。图1A描绘了hFcRn与显示一个Fc单体(深灰色带)的IgG1 Fc (pdb:4n0u)之间的相互作用,包括在具有 α 结构域(灰色)和 β 2-m(浅灰色)hFcRn亚基的复合物中显示为“聚糖”标记的棒的糖基化。参与与FcRn相互作用的大多数抗体残基位于与C_H2-C_H3界面(点划线)直接相邻的环中并且与糖基化位点相

对。图1B描绘了相对于图1A旋转75°的IgG1 Fc晶体结构 (pdb:5d4q) 的表面示意图。该FcRn结合界面包含C_H2和C_H3结构域中的残基。饱和文库在显示为棒的十一个位置处构建,如图所示:M252;I253;S254;T256;K288;T307;K322;E380;L432;N434和Y436。所有这些残基都紧密接近FcRn或与其直接接触。负责pH依赖性的关键组氨酸残基 (H310、H433、H435) 的表面聚集在感兴趣的位置附近并且如图所示。

[0134] 图2A至图2D描绘了Octet筛选测定和结果。图2A示意性地呈现了Octet筛选测定。NiNTA生物传感器捕获组氨酸标记的抗原并且随后捕获抗体变体,以用于大鼠FcRn (rFcRn) 结合动力学。图2B描绘了野生型 (实线)、T307A/E380A/N434A (AAA) 变体 (短划线)、LS (夹杂单点的短划线)、YTE (长划线)、H435A (夹杂单点的长划线) 和H310A/H435Q (夹杂两点的长划线) 抗体在pH 6.0下的rFcRn结合动力学曲线,它们与rFcRn缔合阶段的起点对齐。H435A和H310A/H435Q变体显示很少甚至没有FcRn结合。在Octet rFcRn结合测定中检测到YTE变体具有最慢的FcRn解离速率。图2C图示地描绘了通过Octet筛选获得的突变体子集进行了在pH 6.0下的FcRn结合动力学归一化。大多数突变体保留了与rFcRn的显著结合,但是几个突变体类似于模拟物对照 (点划线),显示所有rFcRn结合的丢失 (长划线,位于点划线下方 (模拟物))。两种变体 (实线) 具有比野生型抗体 (粗长划线) 更慢的rFcRn解离速率。图2D描绘了所有点突变的rFcRn解离速率的散点图分析,其中可观察到被残基位置分开的rFcRn结合动力学。饱和变体落入以下四种rFcRn解离速率方案中的一种:无结合 (未示出)、更快的结合 (黑色)、类似野生型的结合 (白色)、更慢的结合 (灰色)。18个突变体显示出比野生型抗体显著更慢的从rFcRn的解离速率 (黑色点划线)。

[0135] 图3图示地描绘了在pH 6.0和pH 7.4下基准和野生型变体与人和大鼠FcRn的Biacore动力学。示出了在pH 6.0 (第一和第三行) 和pH 7.4 (第二和第四行) 下每个人 (第一和第三列) 和大鼠 (第二和第四列) FcRn对于一系列浓度的野生型 (左上)、AAA变体 (右上)、M428/N434S (LS) 变体 (左下) 和M252Y/S254T/T256E (YTE) 变体 (右下) 的所有FcRn结合曲线。AAA、LS和YTE变体显示出比野生型抗体更慢的从FcRn的解离速率。一般而言,与野生型相比,该抗体以增加约10倍的亲和力结合rFcRn。LS变体对于hFcRn在pH 7.4下具有最紧密的亲和力,并且在pH 7.4下具有最大的残基结合,而rFcRn最紧密地结合YTE变体。

[0136] 图4A图示地描绘了在pH 6.0下先导饱和变体与人和大鼠FcRn的Biacore动力学。示出了18种先导饱和变体的浓度系列的FcRn结合动力学迹线。M252Y、T256D、T256E、N434F、N434P、N434Y、T307A、T307E、T307F、T307Q和T307W具有更慢的从人和大鼠FcRn二者的解离速率。其余变体仅对大鼠FcRn具有特异性。

[0137] 图4B图示地描绘了在pH 6.0下WT、基准和先导单一饱和变体与人FcRn的FcRn结合动力学。在pH 6.0下一系列浓度的WT、LS、YTE和18种饱和变体与人FcRn的FcRn结合传感图。用于组合文库的单一饱和变体用下划线和粗体表示。

[0138] 图5A至图5D描绘了显示在pH 6.0下具有从人和大鼠FcRn二者的较慢解离速率的多种变体的数据。图5A和图5B描绘了多种变体的Biacore传感图。

[0139] 图5A描绘了在pH 6.0下YTE变体 (夹杂单点的长划线)、LS变体 (夹杂两点的长划线)、野生型 (WT; 点划线) 和先导饱和变体 (先导; 各种阴影的实线) 的人FcRn的解离速率。在图5A中,描绘了归一化传感图,其显示与WT相比改善的hFcRn解离速率。图5B描绘了在pH 6.0下AAA变体 (虚线)、LS变体 (夹杂两点的划线)、YTE变体 (夹杂单点的划线)、野生型 (实

线)和先导饱和变体(不同频数和粗度的划线)的大鼠FcRn的解离速率。为清楚起见,示出了11种先导抗体的每一种的代表性注射。与野生型相比,这些先导单一变体显示出从人和大鼠FcRn的改善的解离速率动力学。图5C和图5D描绘了使用从Biacore动力学量测获得的缔合和解离速率,先导饱和(白色圆圈)和野生型(黑色圆圈)抗体变体对人(图5C)和大鼠(图5D)FcRn的结合亲和力图。示出了基准变体:AAA(面向右下方的对角线)、LS(虚线)和YTE(面向左下方的对角线)。尽管FcRn解离速率有所改善,但由于较慢的缔合动力学,大多数变体对人大鼠FcRn不具有更紧密的亲和力。11种变体具有从这两个物种FcRn的较慢解离速率。

[0140] 图6A至图6D描绘了显示先导饱和突变的组合进一步改善FcRn解离速率和结合亲和力的数据。图6A和图6B分别描绘了显示对于人大鼠FcRn的FcRn解离速率的代表性Biacore传感图。图6A描绘了与野生型(点划线)和LS变体(夹杂两点的长划线)相比,单一(划线)、双重(浅灰色实线)、三重(灰色实线)和四重(黑色实线)组合变体的代表性变体的人FcRn的归一化传感图。图6B描绘了与野生型(点划线)和YTE变体(实线)相比,单一(夹杂两点的长划线)、双重(夹杂单点的长划线)、三重(长划线)和四重(短划线)组合变体的代表性变体的大鼠FcRn的归一化传感图。与基准变体相比,多个突变的并入在更大程度上降低了对于FcRn的解离速率和增强了对于FcRn的结合亲和力。图6C和图6D描绘了显示缔合速率作为人(图6C)或大鼠(图6D)FcRn的解离速率的函数的组合饱和变体图,该图揭示大多数变体与基准变体相比在pH 6.0下具有与FcRn的增强的结合。对于人大鼠FcRn的最紧密结合变体分别是四重和双重组合。

[0141] 图7A至图7D描绘了显示在pH 6.0下增强的FcRn结合破坏了相互作用的pH依赖性的数据。图7A和图7B描绘了与野生型(点划线)和LS变体(图7A,实线)和YTE变体(图7B,实线)相比,在pH 7.4下单一(夹杂两点的长划线)、双重(夹杂单点的长划线)、三重(长划线)和四重(短划线)组合变体的Biacore FcRn结合动力学的代表性传感图。增加增强FcRn结合的突变的数目导致在生理pH下更大的残基结合,其中大多数双重、三重和四重变体显示出对这两种FcRn的稳健结合。图7C和图7D描绘了在pH 7.4下所有饱和变体对人(图7C)或大鼠(图7D)FcRn的稳态RU (
$$RU = \text{偏移} + \frac{(R_{\text{max}} - \text{偏移}) \cdot [\text{抗体}]}{[\text{抗体}] + K_{D,app}}$$
 (方程式2))作为在pH 6.0下的结

合亲和力的函数的图。在图7C中,示出了在pH 7.4下残基FcRn结合与在pH 6.0下的FcRn结合亲和力的比较。具有改善的FcRn结合特性的先导组合占据由LS基准变体(菱形)限定的左下象限。在图7D中,LS(菱形)和YTE(三角形)变体分别用作先导验证的截止值。这两种变体在pH 6.0下具有最紧密的结合亲和力,并且在pH 7.4下分别对于人大鼠FcRn具有最大的残基结合。在图7C和图7D两图中,示出了单一(白色圆圈)、双重(浅灰色圆圈)、三重(深灰色圆圈)和四重(黑色圆圈)变体以及YTE变体(三角形)。

[0142] 图8A至图8B描绘了从基准变体的FcRn亲和层析法和差示扫描荧光测定(DSF)获得的数据。图8A描绘了WT(黑色实线)、AAA(点划线)、LS(夹杂两点的长划线)、YTE(夹杂单点的长划线)、H435A(浅灰色实线)和H310A/H435Q(AQ;深灰色实线)变体的归一化洗脱曲线。pH值显示在图的顶部。对FcRn结合无效的变体(H435A、H310A/H435Q)不与柱结合并在流出液(<10mL)中洗脱。AAA、LS和YTE变体在比WT抗体更高的pH下洗脱。图8B描绘了WT(黑色)、LS(灰色)和YTE(深灰色)变体的DSF曲线。与WT和LS相比,YTE不稳定。

[0143] 图8C描绘了与WT和LS变体(垂直虚线)相比,用于组合变体的7种先导单一变体的FcRn亲和柱洗脱曲线。两种变体(N434F/Y)在比LS更高的pH下洗脱,这表明对于含有这些突变的变体而言与FcRn的相互作用的pH依赖性降低。

[0144] 图9A至图9D描绘了显示组合变体显著扰乱pH依赖性和热稳定性的数据。图9A描绘了单一(夹杂两点的长划线)、双重(夹杂单点的长划线)、三重(长划线)和四重变体(短划线)的代表性FcRn亲和层析图。增加增强FcRn结合突变的数目将洗脱移向更高的pH值;LS变体(小垂直虚线)。图9B描绘了对于先导饱和与组合变体(包括单一(白色圆圈)、双重(水平线)、三重(垂直线)和四重(方格)突变体)的洗脱pH的箱形图,其指示随着增强FcRn的突变体数目的增加,pH值越高的趋势。图9C示出了来自FcRn亲和层析的洗脱pH与使用Biacore的hFcRn解离速率之间的高相关性($R^2=0.94$)揭示抗体-FcRn相互作用的pH依赖性的丢失,其伴随改善的FcRn解离动力学。AAA(面向右下方的对角线)、LS(点划线)和YTE(面向左下方的对角线)变体具有与双重变体类似的hFcRn解离速率和洗脱pH值。图9D描绘了从组合饱和变体的DSF获得的 T_m 的箱形图,其揭示与WT、单一或基准变体相比,附加的增强FcRn结合的突变使抗体不稳定。

[0145] 图10A至图10B描绘了从FcRn亲和层析和7种先导变体的DSF获得的数据。图10A描绘了M252Y(实线)、T256D(夹杂单点的短划线)、T256E(长划线)、T307Q(夹杂单点的长划线)、T307W(夹杂两点的长划线)、N434F(虚线)和N434Y(短划线)变体的FcRn亲和层析。层析图揭示与野生型和LS抗体(垂直虚线)相比洗脱pH改变。N434F和N434Y具有比LS变体(垂直虚线)更高的洗脱pH(pH约8.3)。某些洗脱体积下的pH显示在层析图上方以供参考。图10B描绘了7种先导变体的DSF曲线,其显示7种先导单一变体中均未使抗体不稳定至与YTE变体(垂直虚线)相同的程度。除了T307Q(夹杂单点的长划线)之外的所有变体与WT(垂直点划线)相比是不稳定的。

[0146] 图11A至图11B描绘了显示在含有M252Y的组合变体中Fc γ RIIIa结合降低的数据。图11A示出了WT(黑色)、LS(灰色)和YTE(深灰色)变体的Fc γ RIIIa结合传感图揭示由YTE变体产生的结合反应降低。图11B描绘了如所示的基准、单一和组合变体的Fc γ RIIIa结合反应的箱形图。具有M252Y突变的变体含有对Fc γ RIIIa的降低的结合反应,包括所有四重变体。与N434F/Y的组合通常显示出与Fc γ RIIIa的增强的反应。

[0147] 图11C描绘了与WT和YTE变体(水平虚线)相比7种先导单一变体的Fc γ RIIIa结合反应。与WT相比,M252Y突变显示降低的Fc γ RIIIa结合,而6种变体显示与该受体的类似WT或增强的结合。

[0148] 图12A至图12D描绘了从7种先导组合变体的FcRn亲和层析法、DSF和Fc γ RIIIa结合获得的数据。图12A描绘了与野生型抗体和LS变体(分别为垂直虚线和垂直实线)相比的7种先导组合变体的FcRn亲和层析图。每种先导变体的洗脱pH接近LS变体。图12B示出了与YTE和野生型变体(如所示的垂直虚线)相比的先导组合变体的DSF曲线。7种先导变体中的六种具有与YTE变体类似或更不稳定的 T_m :MDWN(夹杂两点的长划线);YTWN(长划线);YDTN(实线);YETN(夹杂单点的长划线);YDQN(虚线);YEQN(夹杂单点的短划线)。MDQN变体与野生型抗体(短划线)具有类似的 T_m 。图12C描绘了与野生型(较大的虚线)和YTE变体(粗长的划线)相比,7种先导变体的Fc γ RIIIa结合动力学的Biacore传感图。含有M252Y的变体:YDTN(实线)、YDQN(夹杂单点的短划线)、YTWN(长划线)、YETN(夹杂单点的长划线)和YEQN

(较小的点划线),其中每种都以与YTE类似的方式具有降低的稳态RU。图12D示出了7种先导变体、野生型和YTE变体的稳态RU。只有MDWN和MDQN变体对于Fc γ RIIIIa具有与野生型抗体类似的亲和力。

[0149] 图12E至图12H描绘了显示3种先导变体展示一系列关键抗体属性的数据。图12E示出了与WT和LS(垂直虚线)相比,DQ(实线)、DW(虚线)和YD(划线)变体的FcRn亲和层析洗脱曲线。每种双重变体显示在WT与LS之间的洗脱pH。图12F描绘了与YTE和WT变体(垂直点划线)相比这三种变体的DSF荧光曲线揭示YD(划线)和DW(点划线)与YTE相比略微不稳定,但DQ(实线)类似于WT。图12G描绘了与WT和YTE(水平虚线)相比的Fc γ RIIIIa结合传感图。YD(划线)显示与YTE类似的结合反应,而DQ(实线)和DW(虚线)显示与WT相比略微降低。图12H描绘了如下数据,该数据显示同种桥接RF ELISA揭示3种先导变体和YTE显示与LS不同的显著减少或类似WT的RF结合。 $^{**}p<0.001$, $^{*}p<0.01$ 。

[0150] 图13A至图13D描绘了显示在pH 6.0和pH 7.4下先导组合变体的FcRn结合动力学的比较的数据。图13A和图13B示出了在pH 6.0下与野生型(虚线)和LS(hFcRn,图13A,粗长划线)或YTE(rFcRn,图13B,粗长划线)相比,先导组合变体对于人FcRn(图13A)或大鼠FcRn(图13B)的Biacore FcRn结合传感图。尽管改变了缔合和解离速率,但每种组合变体对相应的FcRn具有整体更紧密的结合亲和力。图13C和图13D示出了在pH 7.4下的Biacore FcRn传感图。与LS变体相比,每种hFcRn先导变体具有类似或降低的稳态FcRn结合反应。只有MDQN和MDWN变体在pH 7.4下显示出比YTE变体更少的rFcRn结合。

[0151] 图14是描绘根据某些实施方案的饱和文库的Octet rFcRn结合解离速率的表。野生型(WT)和类似野生型(类似WT)种类用白色矩形表示;WT种类如图所示。与野生型相比很少甚至没有rFcRn结合的变体用深灰色矩形表示。与野生型相比具有更快的rFcRn解离速率的变体用浅灰色矩形表示,并且与野生型相比具有更慢的rFcRn解离速率的变体用黑色矩形表示。

[0152] 图15A至图15C描绘了使用CM5传感器芯片开发的新结合测定。图15A是该测定的示意图。图15B示出了FcRn的直接固定。图15C示出了生物素化的FcRn的链霉亲和素捕获。

[0153] 图16A至图16B描绘了在pH 6.0下抗体2的FcRn结合。图16A描绘了人FcRn。图16B描绘了小鼠FcRn。

[0154] 图17A至图17B描绘了在pH 7.4下抗体2的FcRn结合。图17A描绘了人FcRn。图17B描绘了小鼠FcRn。

[0155] 图18图示地描绘了各种抗体2变体的pH依赖性。先导变体在pH 6下维持较高的结合亲和力并且在pH 7.4下维持比LS更低的残基结合。

[0156] 图19描绘了使用抗体1和抗体2的骨架的FcRn结合pH依赖性的比较。

[0157] 图20描绘了使用抗体1和抗体2的骨架的热稳定性的比较。

[0158] 图21描绘了使用抗体1和抗体2的骨架的Fc γ RIIIIa结合的比较。

[0159] 图22描绘了多个图,其显示DQ、DW和YD变体可在IgG1骨架间转移。a至c描绘了在三个IgG1骨架中在pH 6.0下归一化的FcRn结合传感图,其中WT(浅灰色)、LS(深灰色)、DQ(实心黑色)、DW(虚线)和YD(划线)变体在低pH下显示类似的动力学。DQ、DW和YD这三种变体具有比LS变体略快的缔合和解离速率,但维持更紧密的FcRn结合亲和力。d至f描绘了在pH 7.4下的FcRn结合传感图;LS基准变体(实心黑色)。g至i描绘了对于具有WT(灰色)、LS(深灰

色)、DQ(实心黑色)、DW(空心圆)和YD(空心方块)变体的每种抗体骨架在pH 7.4下的FcRn结合反应与在pH 6.0下的结合亲和力的比较。DQ、DW和YD显示出改善的FcRn特征,其中在pH 6.0下结合增强,并且在pH 7.4下结合最小。

[0160] 图23A至图23C示出了mAb2骨架中的三种先导变体类似地改善了与食蟹猴FcRn的结合。图23A描绘了在pH 6.0下WT(灰色)、LS(深灰色)、DQ(实心黑色)、DW(虚线)和YD(划线)的归一化cFcRn结合传感图,其显示与hFcRn类似的结合动力学和亲和力。图23B描绘了三种变体的cFcRn结合反应在生理pH下显著降低;但是LS(深灰色)以与hFcRn类似的方式显示出比WT(灰色)更强的结合。图23C描绘了WT(灰色)、LS(深灰色)、DQ(实心黑色)、DW(空心圆)和YD(空心方块)在pH 7.4下的残基cFcRn结合反应与在pH 6.0下的cFcRn结合亲和力的比较,其揭示所有三种变体均维持对于hFcRn所观察到的改善的FcRn结合特性。

[0161] 图24A至图24B示出了先导变体延长抗体血清半衰期。在食蟹猴(图24A)和hFcRn转基因小鼠(图24B)中对于WT(带有黑色实线的黑色圆圈)、LS(带有黑色划线的白色圆圈)、DQ(带有浅灰色实线的浅灰色圆圈)、DW(带有深灰色实线的深灰色圆圈)和YD(带有黑色虚线的黑色圆圈)抗体,血浆抗体浓度的药代动力学曲线作为时间的函数。与WT相比,所有三种先导变体延长抗体半衰期。

[0162] 图25描绘了在pH 7.4下所有饱和变体对于人FcRn的稳态RU作为在pH 6.0下的结合亲和力的函数的图。示出了在pH 7.4下残基FcRn结合与在pH 6.0下的FcRn结合亲和力的比较。在pH 6.0和pH 7.4下具有改善的FcRn结合特性的四重组用方框显示在图的右上象限中。示出了单一(白色圆圈)、双重(浅灰色圆圈)、三重(深灰色圆圈)和四重(黑色圆圈)变体以及基准AAA、LS和YTE变体(如图所示)。

[0163] 图26描绘了用于捕获生物素化FcRn的生物素CAPture方法的示意图。

[0164] 图27描绘了显示如所示的YTEKF基准和组合变体在pH 6.0下的人FcRn结合动力学的图。

[0165] 图28A至图28B示出了在pH 6.0(图28A)和pH 7.4(图28B)下组合变体与YTEKF基准相比的FcRn结合动力学。野生型用黑色实线表示(WT),并且YTEKF基准用虚线表示。

[0166] 图29描绘了与YTEKF基准相比,在pH 7.4下选择的变体对于人FcRn的稳态RU作为在pH 6.0下的结合亲和力的函数的图。几种变体(先导四重变体)在pH 6.0和pH 7.4下显示出相对于YTEKF基准的对人FcRn的增强的结合亲和力。

具体实施方式

[0167] 本公开提供具有改变的Fc新生受体(FcRn)结合亲和力的结合多肽(例如,抗体)。在某些实施方案中,所述结合多肽包含经修饰的Fc结构域,与包含野生型(例如,非修饰的)Fc结构域的结合多肽相比,所述经修饰的Fc结构域增强FcRn结合亲和力。本公开还提供了编码结合多肽的核酸、重组表达载体和用于制备结合多肽的宿主细胞,以及包含本文公开的结合多肽的药物组合物。还提供使用本公开的结合多肽治疗疾病的方法。

[0168] 免疫球蛋白的Fc结构域参与非抗原结合功能,并且具有由效应分子的结合(例如FcRn的结合)介导的若干种效应子功能。如图1A所示,Fc结构域包含CH2结构域和CH3结构域。参与与FcRn相互作用的大多数残基位于与C_H2-C_H3界面(图1A,虚线)直接相邻的环中并且与糖基化位点相对。图1B显示IgG1 Fc晶体结构(pdb:5d4q)的表面示意图,并示出了CH2

和CH3结构域中包含FcRn结合界面的残基。本公开提供包含经修饰的Fc结构域的结合多肽。包含经修饰的Fc结构域的结合多肽可以是抗体或免疫粘附素或Fc融合蛋白。

[0169] 在某些实施方案中,结合多肽可包含含有氨基酸取代的经修饰的Fc结构域,所述氨基酸取代改变抗体的抗原非依赖性效应子功能,特别是,改变该结合多肽的循环半衰期(例如,血清半衰期)。在一些实施方案中,结合多肽可包含含有氨基酸取代的经修饰的Fc结构域,与包含野生型(即,未修饰的)Fc结构域的结合多肽相比,所述氨基酸取代改变该结合多肽的血清半衰期。在一些实施方案中,结合多肽可包含含有氨基酸取代的经修饰的Fc结构域,与包含野生型(即,未修饰的)Fc结构域的结合多肽相比,所述氨基酸取代增加该结合多肽的血清半衰期。在一些实施方案中,结合多肽可包含含有氨基酸取代的经修饰的Fc结构域,与包含野生型(即,未修饰的)Fc结构域的结合多肽相比,所述氨基酸取代减少该结合多肽的血清半衰期。

[0170] 在某些实施方案中,包含改变(即,增加或减少)循环半衰期(例如,血清半衰期)的经修饰的Fc结构域的结合多肽还包含除了改变循环半衰期的一个或多个突变之外的一个或多个突变。在某些实施方案中,除了改变循环半衰期的一个或多个突变之外的一个或多个突变提供一种或多种期望的生物化学特征,例如与完整未改变的具有大致相同免疫原性的抗体相比时,降低或增强的效应子功能、非共价二聚化能力、增强的定位于肿瘤部位的能力、减少的血清半衰期、增加的血清半衰期等中的一种或多种。

[0171] 当与缺乏这些取代的结合多肽相比时,本文所述的结合多肽可显示出与新生Fc受体(FcRn)的增加或减少的结合,因此分别具有增加或减少的血清半衰期。具有改善的FcRn亲和力的Fc结构域预期具有较长的血清半衰期,并且此类分子在治疗哺乳动物的方法中具有有用的应用,在所述哺乳动物中需要所施用的抗体具有长半衰期例如以治疗慢性疾病或病症。相反,具有降低的FcRn结合亲和力的Fc结构域预期具有较短的血清半衰期,并且此类分子也可用于例如施用至哺乳动物,在所述哺乳动物中缩短的循环时间可能是有利的,例如,对于体内诊断成像或者在当起始抗体长期存在于循环中时具有毒副作用的情况下。具有降低的FcRn结合亲和力的Fc结构域也不太可能穿过胎盘,因此也可用于治疗孕妇的疾病或病症。此外,可能需要降低FcRn结合亲和力的其他应用包括局限于脑、肾和/或肝脏的应用。

[0172] 应理解,本公开中描述的方法不限于本文公开的特定方法和实验条件,因为这些方法和条件可以变化。还应理解,本文中所用术语仅出于描述特定实施方案的目的,而不意图具有限制性。

[0173] 此外,除非另有说明,否则本文所述的实验使用本领域技术范围内的常规分子和细胞生物学和免疫学技术。此类技术是技术人员熟知的,并且在文献中有充分的解释。参见,例如Ausubel等人,编辑,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley& Sons, Inc., NY, N.Y. (1987-2008), 包括所有的增刊,MR Green和J. Sambrook编辑的Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第四版),以及Harlow等人Antibodies: A Laboratory Manual, 第14章, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (2013, 第2版)。

[0174] 除非另外定义,否则本文使用的科学和技术术语具有本领域普通技术人员通常所理解的含义。如果存在任何可能的歧义,本文提供的定义优先于任何字典或外部定义。除非

上下文另有要求,否则单数术语应包括复数,并且复数术语应包括单数。除非另有规定,否则“或”的使用意指“和/或”。术语“包括”以及其他形式如“包括(“includes”和“included”)”的使用不是限制性的。

[0175] 通常,关于本文所述的细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学以及蛋白质和核酸化学和杂交所使用的术语是本领域熟知和常用的。本文提供的方法和技术通常根据本领域熟知并且如本说明书中引用和讨论的各种一般和更具体的参考文献中所述的常规方法进行,除非另有说明。酶促反应和纯化技术根据制造商的说明书如本领域通常实现或如本文所述进行。关于本文所述的分析化学、合成有机化学以及医药和药物化学的术语以及实验室程序和技术是本领域熟知和常用的那些术语、实验室程序和技术。使用标准技术用于化学合成、化学分析、药物制备、配制和递送以及患者的治疗。

[0176] 为了可以更容易理解本公开,如下定义选择的术语。

[0177] 术语“多肽”是指氨基酸的任何聚合体链,并且涵盖天然或人工蛋白质、多肽类似物或蛋白质序列的变体或其片段,除非上下文另有矛盾。多肽可以是单体或聚合体。例如,多肽片段包含至少约5个连续氨基酸、至少约10个连续氨基酸、至少约15个连续氨基酸或至少约20个连续氨基酸。

[0178] 术语“分离的蛋白质”或“分离的多肽”是指这样的蛋白质或多肽,所述蛋白质或多肽由于其起源或衍生源与其天然状态下伴随它的天然缔合组分并不缔合;基本上不含来自相同物种的其他蛋白质;由来自不同物种的细胞表达;或者不存在于自然界中。因此,化学合成或在与其自然来源的细胞不同的细胞系统中合成的蛋白质或多肽将被与其天然缔合组分“分离”。通过使用本领域熟知的蛋白质纯化技术分离,也可以使蛋白质或多肽基本上不含天然缔合组分。

[0179] 如本文所用,术语“结合蛋白”或“结合多肽”应指含有至少一个结合位点的蛋白质或多肽(例如,抗体或免疫粘附素),所述结合位点负责选择性地结合感兴趣的靶抗原(例如,人靶抗原)。示例性结合位点包括抗体可变结构域、受体的配体结合位点或配体的受体结合位点。在某些方面,结合蛋白或结合多肽包括多个(例如,两个、三个、四个或更多个)结合位点。在某些方面,结合蛋白或结合多肽不是治疗性酶。

[0180] 术语“配体”是指能够结合或被结合至另一种物质的任何物质。类似地,术语“抗原”是指可以产生抗体的任何物质。尽管“抗原”通常用于指抗体结合底物,并且在提及受体结合底物时经常使用“配体”,但这些术语彼此没有区别,并且涵盖范围广泛的重叠化学实体。为避免疑义,抗原和配体在本文中可互换使用。抗原/配体可以是肽、多肽、蛋白质、适配体、多糖、糖分子、碳水化合物、脂质、寡核苷酸、多核苷酸、合成分子、无机分子、有机分子及其任何组合。

[0181] 如本文所用的术语“特异性地结合”是指抗体或免疫粘附素以至多约 1×10^{-6} M、约 1×10^{-7} M、约 1×10^{-8} M、约 1×10^{-9} M、约 1×10^{-10} M、约 1×10^{-11} M、约 1×10^{-12} M或更低的解离常数(Kd)与抗原结合,和/或以比对于非特异性抗原的亲和力大至少约2倍的亲和力与抗原结合的能力。

[0182] 如本文所用,术语“抗体”是指这样的组装(例如,完整抗体分子、免疫粘附素或其变体),所述组装对感兴趣的抗原(例如肿瘤相关抗原)具有显著已知的特异性免疫反应活性。抗体和免疫球蛋白包含轻链和重链,在轻链与重链之间有或没有链间共价连接。脊椎动

物系统中的基本免疫球蛋白结构是比较清楚的。

[0183] 如下面将更详细讨论的,通用术语“抗体”包括可以在生物化学上区分的五种不同类别的抗体。尽管所有五类抗体显然都在本公开的范围,但以下讨论通常将针对免疫球蛋白分子的IgG类。关于IgG,免疫球蛋白包含分子量为约23,000道尔顿的两条相同的轻链和分子量为53,000-70,000的两条相同的重链。这四条链以“Y”构型经由二硫键连接,其中轻链范围是在重链旁从“Y”的口处开始并且继续直达可变区末。

[0184] 免疫球蛋白的轻链分类为kappa (κ) 或lambda (λ)。每种重链类别可以与 κ 或 λ 轻链结合。通常,当免疫球蛋白由杂交瘤、B细胞或基因工程化宿主细胞生成时,轻链和重链彼此共价键合,并且两条重链的“尾”部分经由共价二硫连接或非共价连接彼此键合。在重链中,氨基酸序列从Y构型的分叉末端的N-末端延伸至每条链底部的C-末端。本领域技术人员将理解,重链被分类为 γ (γ)、 μ (μ)、 α (α)、 δ (δ) 或 ϵ (ϵ),其中具有一些亚类(例如, $\gamma 1$ - $\gamma 4$)。该链的性质分别将抗体的“类别”确定为IgG、IgM、IgA、IgG或IgE。将免疫球蛋白同种型亚类(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1等)充分表征并且已知它们赋予功能特化作用。由于及时披露,这些类别和同种型的每一种的修饰形式对于技术人员都是容易辨别的,因此,它们在本公开的范围。

[0185] 轻链和重链二者都被分成结构和功能同源性的区域。术语“区域”是指免疫球蛋白或抗体链的一部分(“part”或“portion”),并且包括恒定区或可变区,以及所述区域的更离散的片段或部分。例如,轻链可变区包括散布在如本文定义的“框架区”或“FR”之间的“互补决定区”或“CDR”。

[0186] 免疫球蛋白重链或轻链的区域可以被定义为“恒定”(C)区或“可变”(V)区,在“恒定区”的情况下是基于多个类别成员的区域序列变化的相对缺乏,或在“可变区”的情况下是基于多个类别成员的区域内的显著变化。术语“恒定区”和“可变区”也可以关于功能使用。在这一方面,应当理解,免疫球蛋白或抗体的可变区确定抗原识别和特异性。相反,免疫球蛋白或抗体的恒定区赋予重要的效应子功能,如分泌、经胎盘的移动、Fc受体结合、补体结合等。各种免疫球蛋白类别的恒定区的亚基结构和三维构型是熟知的。

[0187] 免疫球蛋白重链和轻链的恒定区和可变区被折叠成结构域。术语“结构域”是指重链或轻链的球状区,所述球状区包含例如经由 β 折叠片层和/或链内二硫键稳定的肽环(例如,包含3至4个肽环)。免疫球蛋白的轻链上的恒定区可互换地称为“轻链恒定区结构域”、“CL区”或“CL结构域”。重链上的恒定结构域(例如,铰链、CH1、CH2或CH3结构域)可互换地称为“重链恒定区结构域”、“CH”区结构域或“CH结构域”。轻链上的可变结构域可互换地称为“轻链可变区结构域”、“VL区结构域”或“VL结构域”。重链上的可变结构域可互换地称为“重链可变区结构域”、“VH区结构域”或“VH结构域”。

[0188] 按照惯例,可变恒定区结构域的氨基酸编号随着它们远离免疫球蛋白或抗体的抗原结合位点或氨基末端而增加。每个重链和轻链免疫球蛋白链的N末端是可变区,并且C末端是恒定区。CH3和CL结构域分别包含重链和轻链的羧基末端。因此,轻链免疫球蛋白的结构域以VL-CL方向排列,而重链的结构域以VH-CH1-铰链-CH2-CH3方向排列。

[0189] 每个可变区结构域的氨基酸分配依照Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987和1991)的定义。Kabat还提供广泛使用的编号惯例(Kabat编号),其中不同重链可变区之间或不同轻

链可变区之间的相应残基被分配相同的编号。VL结构域的CDR 1、2和3在本文中也分别称为CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。VH结构域的CDR 1、2和3在本文中也分别称为CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3。如果这样指出,则CDR的分配可以依照IMGT® (Lefranc等人, *Developmental & Comparative Immunology* 27:55-77;2003),而非Kabat。重链恒定区的编号是经由如Kabat (Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987和1991) 中所述的EU索引。

[0190] 如本文所用,术语“VH结构域”包括免疫球蛋白重链的氨基末端可变结构域,且术语“VL结构域”包括免疫球蛋白轻链的氨基末端可变结构域。

[0191] 如本文所用,术语“CH1结构域”包括免疫球蛋白重链的第一(大多数胺基末端)恒定区结构域,其例如从Kabat编号系统中的大约位置114-223 (EU位置118-215) 延伸。CH1结构域与VH结构域和免疫球蛋白重链分子的铰链区的胺基末端相邻,并且不构成免疫球蛋白重链的Fc区的一部分。

[0192] 如本文所用,术语“铰链区”包括将CH1结构域与CH2结构域连接的重链分子的部分。铰链区包含约25个残基并且是柔性的,因此允许两个N末端抗原结合区独立地移动。铰链区可以细分为三个不同的结构域:上部、中部和下部铰链结构域 (Roux 等人 *J. Immunol.* 1998, 161:4083)。

[0193] 如本文所用,术语“CH2结构域”包括重链免疫球蛋白分子的这样的部分,其例如从Kabat编号系统中的大约位置244-360 (EU位置231-340) 延伸。CH2结构域是独特的,因为它不与另一个结构域紧密配对。而是将两个N连接的支链糖类链插入完整天然IgG分子的两个CH2结构域之间。在一个实施方案中,本公开的结合多肽包含衍生自IgG1分子 (例如人IgG1分子) 的CH2结构域。

[0194] 如本文所用,术语“CH3结构域”包括重链免疫球蛋白分子的这样的部分,其从CH2结构域的N末端例如从Kabat编号系统的大约位置361-476 (EU位置341-445) 延伸约110个残基。CH3结构域通常形成抗体的C末端部分。然而,在一些免疫球蛋白中,附加的结构域可以从CH3结构域延伸以形成分子的C末端部分 (例如, IgM的 μ 链和IgE的e链中的CH4结构域)。在一个实施方案中,本公开的结合多肽包含衍生自IgG1分子 (例如人IgG1分子) 的CH3结构域。

[0195] 如本文所用,术语“CL结构域”包括免疫球蛋白轻链的恒定区结构域,其例如从大约Kabat位置107A延伸至大约Kabat位置216。CL结构域与VL结构域相邻。在一个实施方案中,本公开的结合多肽包含衍生自 κ 轻链 (例如人 κ 轻链) 的CL结构域。

[0196] 如本文所用,术语“Fc区”定义为重链恒定区的这样的部分,其始于恰好木瓜蛋白酶切割位点 (即IgG中的残基216,将重链恒定区的第一个残基取为114) 上游的铰链区并在该抗体的C末端结束。因此,完整的Fc区至少包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域。

[0197] 如本文所用,术语“天然Fc”或“野生型Fc”是指包含非抗原结合片段的序列的分子,所述非抗原结合片段的序列是单体或多聚体形式,由抗体消化得到或通过其他方式产生;并且该术语可以包含铰链区。天然Fc的原始免疫球蛋白来源通常是人起源的,并且可以是任何免疫球蛋白,如IgG1和IgG2。天然Fc分子由单体多肽组成,所述单体多肽可通过共价 (即二硫键) 和非共价缔合而连接成二聚体或多聚体形式。天然Fc分子的单体亚基之间的分子间二硫键的数目范围为1至4,这取决于类别 (例如, IgG、IgA和IgE) 或亚类 (例如, IgG1、IgG2、IgG3、IgA1和IgA2)。天然Fc的一个实例是由木瓜蛋白酶消化IgG产生的二硫键键合

的二聚体。如本文所用,术语“天然Fc”对于单体、二聚体和多聚体形式是通用的。

[0198] 如本文所用,术语“Fc变体”或“经修饰的Fc”是指从天然/野生型Fc修饰但仍包含FcRn的结合位点的分子或序列。因此,术语“Fc变体”可包括从非人的天然Fc人源化的分子或序列。此外,天然Fc包含可以被去除的区域,因为它们提供了本文所述的抗体样结合多肽不需要的结构特征或生物活性。因此,术语“Fc变体”包括缺少一个或多个天然Fc位点或残基的分子或序列,或其中一个或多个Fc位点或残基已经被修饰,所述一个或多个Fc位点或残基影响或参与:(1)二硫键形成,(2)与选择的宿主细胞的不兼容性,(3)在选择的宿主细胞中表达时的N末端异质性,(4)糖基化,(5)与补体的相互作用,(6)与除了补救受体之外的Fc受体结合,或(7)抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。

[0199] 在某些示例性实施方案中,与包含野生型Fc的IgG抗体相比,本文特定的Fc变体具有增加的血清半衰期、增强的FcRn结合亲和力、在酸性pH下增强的FcRn结合亲和力、增强的Fc γ RIIIa结合亲和力和/或类似的热稳定性中的一种或多种。

[0200] 如本文所用,术语“Fc结构域”涵盖如上定义的天然/野生型Fc以及Fc变体和序列。与Fc变体和天然Fc分子一样,术语“Fc结构域”包括单体或多聚体形式的分子,无论是从完整抗体消化而来还是通过其他方式产生。

[0201] 如上所述,抗体的可变区允许其选择性地识别并特异性地结合抗原上的表位。也就是说,抗体的VL结构域和VH结构域组合以形成限定三维抗原结合位点的可变区(Fv)。该四元抗体结构在Y的每条臂的末端形成抗原结合位点。更具体地,该抗原结合位点由每个重链和轻链可变区上的三个互补决定区(CDR)限定。如本文所用,术语“抗原结合位点”包括特异性地结合(与抗原免疫反应)抗原(例如,细胞表面或可溶性抗原)的位点。抗原结合位点包括免疫球蛋白重链和轻链可变区,并且由这些可变区形成的结合位点决定了抗体的特异性。抗原结合位点由可变区形成,所述可变区在抗体之间有所不同。本公开的改变的抗体包含至少一个抗原结合位点。

[0202] 在某些实施方案中,本公开的结合多肽包含提供该结合多肽与选择的抗原的结合的至少两个抗原结合结构域。抗原结合结构域不需要衍生自相同的免疫球蛋白分子。在这一方面,可变区可能衍生自或衍生自任何类型的动物,这种动物可以被诱导产生体液反应并产生针对所需抗原的免疫球蛋白。因此,结合多肽的可变区可以是例如哺乳动物起源的,例如可以是人、鼠类、大鼠、山羊、绵羊、非人灵长类动物(如食蟹猴,猕猴等)、狼或骆驼科动物(例如,来自骆驼、美洲驼和相关物种)。

[0203] 在天然存在的抗体中,存在于每个单体抗体上的六个CDR是短的、非连续的氨基酸序列,所述氨基酸序列特异性地定位以形成抗原结合位点,因为假定该抗体在水性环境中呈现其三维构型。重链和轻链可变结构域的其余部分在氨基酸序列中显示出较小的分子间可变性,并且被称为框架区。框架区主要采用 β -片层构象,并且CDR形成环,所述环连接 β -片层结构,并且在一些情况下形成 β -片层结构的一部分。因此,这些框架区起到形成支架的作用,所述支架提供六个CDR通过链间非共价相互作用在正确方向上的定位。由定位的CDR形成的抗原结合结构域限定与免疫反应性抗原上的表位互补的表面。该互补表面促进抗体与免疫反应性抗原表位的非共价结合。

[0204] 示例性结合多肽包括抗体变体。如本文所用,术语“抗体变体”包括抗体的合成和工程化形式,所述抗体被改变使得它们不是天然存在的,例如包含至少两个重链部分但不

是两个完整重链的抗体(如结构域缺失的抗体或微型抗体);多特异性形式的抗体(例如,双特异性、三特异性等),其被改变以结合两种或更多种不同抗原或结合单一抗原上的不同表位;与scFv分子连接的重链分子等。另外,术语“抗体变体”包括多价形式的抗体(例如,三价、四价等,结合三个、四个或更多个拷贝的相同抗原的抗体)。

[0205] 如本文所用,术语“价(valency)”是指多肽中潜在的靶结合位点的数目。每个靶结合位点特异性地结合靶分子上的一个靶分子或特异性位点。当多肽包含多于一个靶结合位点时,每个靶结合位点可特异性地结合相同或不同的分子(例如,可结合不同的配体或不同的抗原,或结合相同抗原上的不同表位)。主题结合多肽通常具有对于人抗原分子特异性的至少一个结合位点。

[0206] 术语“特异性”是指与给定靶抗原(例如人靶抗原)特异性地结合(例如,与其免疫反应)的能力。结合多肽可以是单特异性的并且含有特异性地结合靶标的一个或多个结合位点,或者多肽可以是多特异性的并且含有特异性地结合相同或不同靶标的两个或更多个结合位点。在某些实施方案中,结合多肽对于相同靶标的两个不同(例如,非重叠)部分是特异性的。在某些实施方案中,结合多肽对于多于一种靶标是特异性的。包含结合肿瘤细胞上表达的抗原的抗原结合位点的示例性结合多肽(例如抗体)是本领域已知的,并且来自此类抗体的一个或多个CDR可以包括在如本文所述的抗体中。

[0207] 如本文所用,术语“抗原”或“靶抗原”是指能够被结合多肽的结合位点结合的分子或分子的一部分。靶抗原可具有一个或多个表位。

[0208] 术语“约”(“about”或“approximately”)意指给定值或范围的约20%内,如约10%内、约5%内或约1%内或更少。

[0209] 如本文所用,“施用”(“administer”或“administration”)是指将存在于体外的物质(例如,本文提供的分离的结合多肽)注射或以其他方式物理递送至患者中的行为,如通过但不限于术语,肺(例如,吸入)、黏膜(例如,鼻内)、皮内、静脉内、肌肉内递送和/或本文所述或本领域已知的任何其他物理递送方法。当控制或治疗疾病或其症状时,该物质的施用通常在该疾病或其症状发作之后发生。当预防疾病或其症状时,该物质的施用通常在该疾病或其症状发作之前发生,并且可以长期持续以延迟或减少疾病相关症状的出现或程度。

[0210] 如本文所用,术语“组合物”旨在涵盖含有任选指定量的指定成分(例如,本文提供的分离的结合多肽)的产品,以及直接或间接由任选指定的量的指定成分的组合产生的任何产品。

[0211] “有效量”是指足以在需要活性药剂的个体中实现期望的生理学结果的该活性药剂(例如,本公开的分离的结合多肽)的量。根据待治疗的个体的健康和身体状况、待治疗的个体的分类组、组合物的配制、个体的医疗状况评估和其他相关因素,有效量可在个体之间有所不同。

[0212] 如本文所用,术语“受试者”和“患者”可互换使用。如本文所用,受试者可以是哺乳动物,如非灵长类动物(例如,牛、猪、马、猫、狗、大鼠等)或灵长类动物(例如,猴和人)。在某些实施方案中,如本文所用的术语“受试者”是指脊椎动物,如哺乳动物。哺乳动物包括但不限于人、非人灵长类动物、野生动物、未驯服的动物、农场动物、运动动物和宠物。

[0213] 如本文所用,术语“疗法”是指可用于预防、管理、治疗和/或改善疾病或与其相关

的症状的任何方案、方法和/或药剂。在一些实施方案中,术语“疗法”是指可用于调节受试者中对于感染的免疫反应或与其相关的症状的任何方案、方法和/或药剂。在一些实施方案中,术语“多种疗法”和“疗法”是指本领域技术人员如医务人员已知的可用于预防、管理和/或改善疾病或与其相关的症状的生物疗法、支持疗法和/或其他疗法。在其他实施方案中,术语“多种疗法”和“疗法”是指本领域技术人员如医务人员已知的可用于调节受试者中对于感染的免疫反应或与其相关的症状的生物疗法、支持疗法和/或其他疗法。

[0214] 如本文所用,术语“治疗”(“treat”、“treatment”和“treating”)是指由一种或多种疗法的施用(包括,但不限于,一种或多种预防剂或治疗剂如本文提供的分离的结合多肽的施用)引起的疾病或与其相关的症状的进展、严重程度和/或持续时间的降低或改善。如本文所用,术语“治疗”还可以指改变所治疗的受试者的疾病进程。治疗的治疗效果包括但不限于预防疾病的发生或复发,缓和一种或多种症状、减少疾病的直接或间接病理后果、降低疾病进展的速度、改善或减缓疾病状态以及缓解或改善预后。

[0215] 结合多肽

[0216] 在一个方面,本公开提供包含经修饰的Fc结构域的结合多肽(例如,抗体、免疫粘附素、抗体变体和融合蛋白)。本文公开的结合多肽涵盖包含经修饰的Fc结构域的任何结合多肽。在某些实施方案中,所述结合多肽是抗体或免疫粘附素或其衍生物。来自任何来源或物种的任何抗体均可用于本文公开的结合多肽中。合适的抗体包括但不限于人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。合适的抗体包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、全长抗体或单链抗体。

[0217] 来自任何免疫球蛋白类别(例如,IgM、IgG、IgD、IgA和IgE)和物种的Fc结构域可用于本文公开的结合多肽中。还可以采用包含来自不同物种或Ig类的部分Fc结构域的嵌合Fc结构域。在某些实施方案中,Fc结构域是人Fc结构域。在一些实施方案中,Fc结构域是IgG1 Fc结构域。在其他实施方案中,Fc结构域是IgG4 Fc结构域。在一些实施例方案中,Fc结构域是人IgG1或IgG4Fc结构域。在一些实施方案中,Fc结构域是人IgG1 Fc结构域。在其他物种和/或Ig类或同种型的Fc结构域的情况下,技术人员将理解可以相应地调整本文所述的任何氨基酸取代。在一些实施方案中,经修饰的Fc结构域可包含选自依照EU编号的M252、I253、S254、T256、K288、T307、K322、E380、L432、N434或Y436及其任何组合的氨基酸取代。在一些实施方案中,经修饰的Fc结构域可包含在选自依照EU编号的M252、I253、S254、T256、K288、T307、K322、E380、L432、N434和Y436的任何两个氨基酸位置处的双重氨基酸取代。在一些实施方案中,经修饰的Fc结构域可包含在选自依照EU编号的M252、I253、S254、T256、K288、T307、K322、E380、L432、N434和Y436的任何三个氨基酸位置处的三重氨基酸取代。在一些实施方案中,经修饰的Fc结构域可包含在选自依照EU编号的M252、I253、S254、T256、K288、T307、K322、E380、L432、N434和Y436的任何四个氨基酸位置处的四重氨基酸取代。在一些实施方案中,可能需要经修饰的Fc结构域包含在选自依照EU编号的M252、I253、S254、T256、K288、T307、K322、E380、L432或Y436及其任何组合的任何氨基酸位置处的氨基酸取代,其中氨基酸位置N434未被取代(即,氨基酸位置N434是野生型)。

[0218] 在一些实施方案中,经修饰的Fc结构域可包含选自依照EU编号的M252Y(即,在氨基酸位置252处的酪氨酸)、T256D、T256E、K288D、K288N、T307A、T307E、T307F、T307M、T307Q、T307W、E380C、N434F、N434P、N434Y、Y436H、Y436N或Y436W及其任何组合的氨基酸取代。在一

些实施方案中,经修饰的Fc结构域可包含依照EU编号的双重氨基酸取代,所述双重氨基酸取代选自:M252,其中该取代是M252Y;T256,其中该取代是T256D或T256E;K288,其中该取代是K288D或K288N;T307,其中该取代是T307A、T307E、T307F、T307M、T307Q或T307W;E380,其中该取代是E380C;N434,其中该取代是N434F、N434P或N434Y;Y436,其中该取代是Y436H、Y436N或Y436W。在一些实施方案中,经修饰的Fc结构域可包含依照EU编号的三重氨基酸取代,所述三重氨基酸取代选自:M252,其中该取代是M252Y;T256,其中该取代是T256D或T256E;K288,其中该取代是K288D或K288N;T307,其中该取代是T307A、T307E、T307F、T307M、T307Q或T307W;E380,其中该取代是E380C;N434,其中该取代是N434F、N434P或N434Y;Y436,其中该取代是Y436H、Y436N或Y436W。在一些实施方案中,经修饰的Fc结构域可包含依照EU编号的四重氨基酸取代,所述四重氨基酸取代选自:M252,其中该取代是M252Y;T256,其中该取代是T256D或T256E;K288,其中该取代是K288D或K288N;T307,其中该取代是T307A、T307E、T307F、T307M、T307Q或T307W;E380,其中该取代是E380C;N434,其中该取代是N434F、N434P或N434Y;Y436,其中该取代是Y436H、Y436N或Y436W。在一些实施方案中,可能期望经修饰的Fc结构域包含选自依照EU编号的M252Y、T256D、T256E、K288D、K288N、T307A、T307E、T307F、T307M、T307Q、T307W、E380C、Y436H、Y436N或Y436W及其任何组合的任何氨基酸位置处氨基酸取代,其中氨基酸位置N434未被苯丙氨酸(F)或酪氨酸(Y)取代。在一些实施方案中,可能期望经修饰的Fc结构域包含选自依照EU编号的M252Y、T256D、T256E、K288D、K288N、T307A、T307E、T307F、T307M、T307Q、T307W、E380C、Y436H、Y436N或Y436W及其任何组合的任何氨基酸位置处氨基酸取代,其中氨基酸位置N434未被酪氨酸(Y)取代。在一些实施方案中,可能期望经修饰的Fc结构域包含选自依照EU编号的M252Y、T256D、T256E、K288D、K288N、T307A、T307E、T307F、T307M、T307Q、T307W、E380C、Y436H、Y436N或Y436W及其任何组合的任何氨基酸位置处氨基酸取代,其中氨基酸位置N434未被取代(即,氨基酸位置N434是野生型)。

[0219] 在某些实施方案中,经修饰的Fc结构域可包含选自依照EU编号的M252、T256、T307或N434及其任何组合的氨基酸取代。在某些实施方案中,经修饰的Fc结构域可包含在选自依照EU编号的M252、T256、T307和N434的任何两个氨基酸位置处的双重氨基酸取代。在某些实施方案中,经修饰的Fc结构域可包含在选自依照EU编号的M252、T256、T307和N434的任何三个氨基酸位置处的三重氨基酸取代。在某些实施方案中,经修饰的Fc结构域可包含在依照EU编号的氨基酸位置M252、T256、T307和N434处的四重氨基酸取代。在一些实施方案中,可能需要经修饰的Fc结构域包含选自依照EU编号的M252、T256或T307及其任何组合的氨基酸取代,其中氨基酸位置N434未被取代(即,氨基酸位置N434是野生型)。

[0220] 在示例性实施方案中,经修饰的Fc结构域可包含依照EU编号的如下氨基酸取代,所述氨基酸取代选自:M252,其中该取代是M252Y;T256,其中该取代是T256D或T256E;T307,其中该取代是T307Q或T307W;或N434,其中该取代是N434F或N434Y及其任何组合。在某些实施方案中,经修饰的Fc结构域可包含在依照EU编号的如下任何两个氨基酸位置处的双重氨基酸取代,所述任何两个氨基酸位置选自:M252,其中该取代是M252Y;T256,其中该取代是T256D或T256E;T307,其中该取代是T307Q或T307W;或N434,其中该取代是N434F或N434Y。在某些实施方案中,经修饰的Fc结构域可包含在依照EU编号的如下任何三个氨基酸位置处的三重氨基酸取代,所述任何三个氨基酸位置选自:M252,其中该取代是M252Y;T256,其中该

取代是T256D或T256E;T307,其中该取代是T307Q或T307W;或N434,其中该取代是N434F或N434Y。在某些实施方案中,经修饰的Fc结构域可包含在依照EU编号的如下氨基酸位置处的四重氨基酸取代,所述氨基酸位置选自:M252,其中该取代是M252Y;T256,其中该取代是T256D或T256E;T307,其中该取代是T307Q或T307W;或N434,其中该取代是N434F或N434Y。在一些实施方案中,可能期望经修饰的Fc结构域包含选自依照EU编号的M252Y、T256D、T256E、T307Q或T307W及其任何组合的氨基酸取代,其中氨基酸位置N434未被苯丙氨酸(F)或酪氨酸(Y)取代。在一些实施方案中,可能期望经修饰的Fc结构域包含选自依照EU编号的M252Y、T256D、T256E、T307Q或T307W及其任何组合的氨基酸取代,其中氨基酸位置N434未被酪氨酸(Y)取代。在一些实施方案中,可能期望经修饰的Fc结构域包含选自依照EU编号的M252Y、T256D、T256E、T307Q或T307W及其任何组合的氨基酸取代,其中氨基酸位置N434未被取代(即,氨基酸位置N434是野生型)。

[0221] 在某些实施方案中,经修饰的Fc结构域可包含选自依照EU编号的T256D或T256E和/或T307W或T307Q的氨基酸取代,并且进一步包含选自N434F或N434Y或M252Y的氨基酸取代。在一些实施方案中,可能期望经修饰的Fc结构域包含选自依照EU编号的T256D或T256E和/或T307W或T307Q的氨基酸取代,并且进一步包含氨基酸取代M252Y,其中氨基酸位置N434未被苯丙氨酸(F)或酪氨酸(Y)取代。在一些实施方案中,可能期望经修饰的Fc结构域包含选自依照EU编号的T256D或T256E和/或T307W或T307Q的氨基酸取代,并且进一步包含氨基酸取代M252Y,其中氨基酸位置N434未被酪氨酸(Y)取代。在一些实施方案中,,可能期望经修饰的Fc结构域包含选自依照EU编号的T256D或T256E和/或T307W或T307Q的氨基酸取代,并且进一步包含氨基酸取代M252Y,其中氨基酸位置N434未被取代(即,氨基酸位置N434是野生型)。

[0222] 在一些实施方案中,经修饰的Fc结构域可包含选自依照EU编号的M252Y/T256D、M252Y/T256E、M252Y/T307Q、M252Y/T307W、M252Y/N434F、M252Y/N434Y、T256D/T307Q、T256D/T307W、T256D/N434F、T256D/N434Y、T256E/T307Q、T256E/T307W、T256E/N434F、T256E/N434Y、T307Q/N434F、T307Q/N434Y、T307W/N434F和T307W/N434Y的双重氨基酸取代。在一些实施方案中,经修饰的Fc结构域可包含选自依照EU编号的M252Y/T256D/T307Q、M252Y/T256D/T307W、M252Y/T256D/N434F、M252Y/T256D/N434Y、M252Y/T256E/T307Q、M252Y/T256E/T307W、M252Y/T256E/N434F、M252Y/T256E/N434Y、M252Y/T307Q/N434F、M252Y/T307Q/N434Y、M252Y/T307W/N434F、M252T/T307W/N434Y、T256D/307Q/N434F、T256D/307W/N434F、T256D/307Q/N434Y、T256D/307W/N434Y、T256E/307Q/N434F、T256E/307W/N434F、T256E/307Q/N434Y和T256E/307W/N434Y的三重氨基酸取代。

[0223] 在一些实施方案中,经修饰的Fc结构域可包含选自依照EU编号的M252Y/T256D/T307Q/N434F、M252Y/T256E/T307Q/N434F、M252Y/T256D/T307W/N434F、M252Y/T256E/T307W/N434F、M252Y/T256D/T307Q/N434Y、M252Y/T256E/T307Q/N434Y、M252Y/T256D/T307W/N434Y和M252Y/T256E/T307W/N434Y的四重氨基酸取代。

[0224] 在一些实施方案中,可能期望修饰的Fc结构域在依照EU编号的氨基酸位置N434处包含野生型氨基酸。在一些实施方案中,可能期望Fc结构域在依照EU编号的氨基酸位置N434处不包含苯丙氨酸(F)或酪氨酸(Y)。在一些实施方案中,可能期望Fc结构域在依照EU编号的氨基酸位置N434处不包含酪氨酸(Y)。在一些实施方案中,经修饰的Fc结构域可包含

选自依照EU编号的M252Y/T256D、M252Y/T256E、M252Y/T307Q、M252Y/T307W、T256D/T307Q、T256D/T307W、T256E/T307Q和T256E/T307W的双重氨基酸取代。在一些实施方案中,经修饰的Fc结构域可包含选自依照EU编号的M252Y/T256D/T307Q、M252Y/T256D/T307W、M252Y/T256E/T307Q和M252Y/T256E/T307W的三重氨基酸取代。

[0225] 在一个实施方案中,具有改变的FcRn结合的结合多肽包含具有如本文公开的一个或多个氨基酸取代的Fc结构域。在一个实施方案中,具有增强的FcRn结合亲和力的结合多肽包含具有如本文公开的一个或多个氨基酸取代的Fc结构域。在一个实施方案中,具有增强的FcRn结合亲和力的结合多肽包含具有如本文公开的两个或更多个氨基酸取代的Fc结构域。在一个实施方案中,具有增强的FcRn结合亲和力的结合多肽包含具有如本文公开的三个或更多个氨基酸取代的Fc结构域。

[0226] 在一些实施方案中,结合多肽可显示出物种特异性FcRn结合亲和力。在一个实施方案中,结合多肽可显示出人FcRn结合亲和力。在一个实施方案中,结合多肽可以显示出大鼠FcRn结合亲和力。在一些实施方案中,结合多肽可显示出跨物种FcRn结合亲和力。这种结合多肽被认为是在一种或多种不同物种之间具有交叉反应性。在一个实施方案中,结合多肽可显示出人和大鼠FcRn结合亲和力二者。

[0227] 新生Fc受体(FcRn)与抗体的Fc区相互作用通过挽救正常的溶酶体降解来促进循环。此过程是pH依赖性过程,其发生在酸性pH下的胞内体中(例如,pH小于6.5)而不是在血流的生理pH条件下(例如,非酸性pH)发生。在一些实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,包含经修饰的Fc结构域的本公开的结合多肽在酸性pH下具有增强的FcRn结合亲和力。在一些实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,包含经修饰的Fc结构域的结合多肽在pH小于7,例如在约pH 6.5、约pH 6.0、约pH 5.5、约pH 5.0下具有增强的FcRn结合亲和力。在一些实施方案中,与包含经修饰的Fc结构域的结合多肽在升高的非酸性pH下的FcRn结合亲和力相比,该结合多肽在pH小于7,例如在约pH 6.5、约pH 6.0、约pH 5.5、约pH 5.0下具有增强的FcRn结合亲和力。升高的非酸性pH可以是例如pH大于7、约pH 7、约pH 7.4、约pH 7.6、约pH 7.8、约pH 8.0、约pH 8.5和约pH 9.0。

[0228] 在某些实施方案中,可期望包含经修饰的Fc结构域的结合多肽在非酸性pH下显示出与包含野生型Fc结构域的结合多肽大致相同的FcRn结合亲和力。在一些实施方案中,可期望包含经修饰的Fc结构域的结合多肽在非酸性pH下显示出比包含具有依照EU编号的双重氨基酸取代M428L/N434S的经修饰Fc结构域的结合多肽更小的FcRn结合亲和力。因此,可期望包含经修饰的Fc结构域的结合多肽对pH依赖性FcRn结合显示出最小的扰动。

[0229] 在一些实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,在酸性pH下具有增强的FcRn结合亲和力的包含经修饰Fc结构域的结合多肽具有降低的(即,更慢的)FcRn解离速率。在一些实施方案中,包含经修饰的Fc结构域的结合多肽(与该结合多肽在升高的非酸性pH下的FcRn结合亲和力相比,该结合多肽在酸性pH下具有增强的FcRn结合亲和力)与该结合多肽在升高的非酸性pH下的FcRn解离速率相比,在酸性pH下具有更慢的FcRn解离速率。

[0230] 在一些实施方案中,提供了包含经修饰的Fc结构域的结合多肽,所述结合多肽与包含野生型Fc的结合多肽相比在非酸性pH下显示出更高的FcRn结合亲和力。在一些实施方案中,提供一种包含经修饰的Fc结构域的结合多肽,所述结合多肽与包含野生型Fc结构域

的结合多肽相比在酸性pH下显示出更高的FcRn结合亲和力。在一些实施方案中,提供一种包含经修饰的Fc结构域的结合多肽,所述结合多肽与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比在非酸性pH下显示出更高的FcRn结合亲和力,并且与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比在酸性pH下显示出更高的FcRn结合亲和力。因此,在某些实施方案中,提供一种包含经修饰的Fc结构域的结合多肽,其显示出pH依赖性FcRn结合的丢失。

[0231] 某些实施方案包括如下抗体:除了显示出改变的FcRn结合亲和力的本文所述Fc突变之外,所述抗体还包含在一个或多个恒定区结构域中的如下至少一个氨基酸和/或在一个或多个可变区结构域中的如下至少一个氨基酸,所述至少一个氨基酸已经被缺失或以其他方式改变以提供所期望的生物化学特征,例如当与完整未改变的具有大致相同免疫原性的抗体相比时,降低或增强的效应子功能、非共价二聚化能力、增强的定位于肿瘤部位的能力、减少的血清半衰期、增加的血清半衰期等。

[0232] 在某些其他实施方案中,结合多肽包含衍生自不同抗体同种型的恒定区(例如,来自人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4中的两种或更多种的恒定区)。在其他实施方案中,结合多肽包含嵌合铰链(即,包含衍生自不同抗体同种型的铰链结构域的铰链部分的铰链,所述铰链结构域例如来自IgG4分子的上部铰链结构域和IgG1中间铰链结构域)。

[0233] 在某些实施方案中,可使用本领域已知的技术使Fc结构域突变以增加或降低效应子功能。在一些实施方案中,包含经修饰的Fc结构域的本公开的结合多肽具有对于Fc受体的改变的结合亲和力。存在几种不同类型的Fc受体,所述Fc受体基于它们识别的抗体类型进行分类。例如,Fc- γ 受体(Fc γ R)与IgG类抗体结合,Fc- α 受体(Fc α R)与IgA类抗体结合,并且Fc- ϵ 受体(Fc ϵ R)与IgE类抗体结合。Fc γ R术语包含若干个成员例如Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIa和Fc γ RIIIb的家族。在一些实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,包含经修饰的Fc结构域的结合多肽具有改变的Fc γ RIIIa结合亲和力。在一些实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,包含经修饰的Fc结构域的结合多肽具有降低的Fc γ RIIIa结合亲和力。在一些实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,包含经修饰的Fc结构域的结合多肽具有增强的Fc γ RIIIa结合亲和力。在一些实施方案中,与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,包含经修饰的Fc结构域的结合多肽具有大致相同的Fc γ RIIIa结合亲和力。

[0234] 在其他实施方案中,用于本文所述的诊断和治疗方法的结合多肽具有恒定区,例如IgG1重链恒定区,所述恒定区被改变以减少或消除糖基化。例如,包含经修饰的Fc结构域的结合多肽(例如,抗体或免疫粘附素)可进一步包含改变抗体Fc的糖基化的氨基酸取代。例如,所述经修饰的Fc结构域可具有降低的糖基化(例如,N或O连接的糖基化)。

[0235] 在国际PCT公开号W005/018572中公开赋予减少或改变的糖基化的示例性氨基酸取代,所述国际PCT公开号W005/018572通过提述以其整体并入本文。在一些实施方案中,结合多肽被修饰以消除糖基化。这种结合多肽可被称为“agly”结合多肽(例如,“agly”抗体)。尽管不受理论约束,但认为“agly”结合多肽可具有改善的体内安全性和稳定性。agly结合多肽可以具有其任何同种型或亚类,例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。许多本领域公认的方法可用于制备“agly”抗体或具有改变的聚糖的抗体。例如,具有经修饰的糖基化途径(例如,糖基转移酶缺失)的基因工程化宿主细胞(例如,经修饰的酵母例如毕赤酵母,或CHO细胞)可用于产生此类抗体。

[0236] 在某些实施方案中,结合多肽可包含介导一种或多种效应子功能的抗体恒定区(例如,IgG恒定区,例如人IgG恒定区,例如人IgG1恒定区)。例如,C1复合物与抗体恒定区的结合可激活补体系统。补体系统的激活在细胞病原体的调理作用和裂解中是重要的。补体系统的激活还刺激炎症反应,并且还可能参与自身免疫性超敏反应。此外,抗体经由Fc结构域与多种细胞上的受体结合(抗体Fc区上的Fc受体结合位点与细胞上的Fc受体(FcR)结合)。存在许多Fc受体,所述Fc受体对不同类的抗体具有特异性,包括IgG(γ 受体)、IgE(ϵ 受体)、IgA(α 受体)和IgM(μ 受体)。抗体与细胞表面上的Fc受体的结合引发许多重要和多样的生物反应,包括抗体包被颗粒的吞噬和破坏、免疫复合物的清除、杀伤细胞裂解抗体包被的靶细胞(称为抗体依赖性细胞介导的细胞毒性,或ADCC)、炎症介质的释放、胎盘转移和免疫球蛋白产生的控制。在一些实施方案中,结合多肽(例如,抗体或免疫粘附素)与Fc γ 受体结合。在替换的实施方案中,结合多肽可包含恒定区,所述恒定区缺乏一种或多种效应子功能(例如,ADCC活性)和/或不能结合Fc γ 受体。

[0237] 具有低热力学稳定性的蛋白质(包括抗体)具有增加的错折叠和聚集倾向,并且将会限制或阻碍该蛋白质作为有用治疗剂的活性、功效和潜力。在某些实施方案中,包含经修饰的Fc结构域的结合多肽具有与包含野生型Fc结构域的结合多肽大致相同的热稳定性。在一些实施方案中,包含经修饰的Fc结构域的结合多肽具有与包含具有三重氨基酸取代M252Y/S254T/T256E(YTE)的经修饰Fc结构域的结合多肽大致相同的热稳定性。

[0238] 所得的生理特征、生物利用度和修饰的其他生物化学效应(如肿瘤定位、生物分布和血清半衰期),可以使用熟知的免疫学技术在无需过多的实验的情况下容易地量测和量化。

[0239] 在某些实施方案中,本公开的结合多肽可包含抗体的抗原结合片段。术语“抗原结合片段”是指免疫球蛋白或抗体的多肽片段,其结合抗原或与完整抗体(即,所述免疫球蛋白或抗体的多肽片段所来源的完整抗体)竞争抗原结合(即特异性结合)。抗原结合片段可以通过本领域熟知的重组或生物化学方法产生。示例性抗原结合片段包括Fv、Fab、Fab'和(Fab')₂。在示例性实施方案中,本公开的结合多肽包含抗原结合片段和经修饰的Fc结构域。

[0240] 在一些实施方案中,结合多肽包含单链可变区序列(ScFv)。单链可变区序列包含具有一个或多个抗原结合位点的单个多肽,例如通过柔性接头与VH结构域连接的VL结构域。ScFv分子可以以VH-接头-VL方向或VL-接头-VH方向构建。连接构成抗原结合位点的VL和VH结构域的柔性铰链包含约10至约50个氨基酸残基。连接肽在本领域中是已知的。结合多肽可包含至少一个scFv和/或至少一个恒定区。在一个实施方案中,本公开的结合多肽可包含与经修饰的Fc结构域连接或融合的至少一个scFv。

[0241] 在一些实施方案中,本公开的结合多肽是多价(例如,四价)抗体,所述多价抗体通过将编码抗体的DNA序列与ScFv分子(例如,改变的ScFv分子)融合而产生。例如,在一个实施方案中,组合这些序列使得ScFv分子(例如,改变的ScFv分子)在其N末端或C末端经由柔性接头(例如,gly/ser接头)与抗体的Fc片段连接。在另一个实施方案中,本公开的四价抗体可以通过如下方法来制备:将ScFv分子与连接肽融合,所述连接肽与经修饰的Fc结构域融合以构建ScFv-Fab四价分子。

[0242] 在另一个实施方案中,本公开的结合多肽是改变的微型抗体。本公开的改变的微

型抗体是由两条多肽链组成的二聚体分子,每条多肽链包含经由连接肽与经修饰的Fc结构域融合的ScFv分子。可通过使用本领域描述的方法(参见,例如美国专利5,837,821或W0 94/09817A1)构建ScFv组分和连接肽组分来制备微型抗体。在另一个实施方案中,可以构建四价微型抗体。可以用与微型抗体相同的方式构建四价微型抗体,不同的是使用柔性接头连接两个ScFv分子。然后将连接的scFv-scFv构建体与经修饰的Fc结构域连接。

[0243] 在另一个实施方案中,本公开的结合多肽包含双抗体。双抗体是二聚体四价分子,其各自具有与scFv分子类似的多肽,但通常具有连接两个可变结构域的短(小于10个,例如约1至约5个)氨基酸残基接头,使得在相同的多肽链上的VL和VH结构域不能相互作用。相反,一条多肽链的VL和VH结构域(分别)与第二多肽链上的VH和VL结构域相互作用(参见例如,W0 02/02781)。本公开的双抗体包含与经修饰的Fc结构域融合的scFv样分子。

[0244] 在其他实施方案中,结合多肽包含多特异性或多价抗体,所述多特异性或多价抗体在同一多肽链上串联地包含一个或多个可变结构域,例如串联的可变结构域(TVD)多肽。示例性TVD多肽包括美国专利号5,989,830中描述的“双头”或“双Fv”构型。在双Fv构型中,两种不同抗体的可变结构域在两条单独的链(一条重链和一条轻链)上以串联方向表示,其中一条多肽链具有被肽接头隔开的两个串联的VH结构域(VH1-接头-VH2),并且另一条多肽链由通过肽接头串联连接的互补性VL结构域组成(VL1-接头-VL2)。在交叉双头构型中,两种不同抗体的可变结构域在两条单独的多肽链(一条重链和一条轻链)上以串联方向表示,其中一条多肽链具有被肽接头隔开的两个串联的VH结构域(VH1-接头-VH2),并且另一条多肽链由通过肽接头以相反方向串联连接的互补性VL结构域组成(VL2-接头-VL1)。基于“双Fv”形式的附加抗体变体包括双可变结构域IgG(DVD-IgG)双特异性抗体(参见美国专利号7,612,181)和TBTI形式(参见US2010/0226923 A1)。在一些实施方案中,结合多肽包括多特异性或多价抗体,所述多特异性或多价抗体包含在与经修饰的Fc结构域融合的同一条多肽链上串联的一个或多个可变结构域。

[0245] 在另一示例性实施方案中,结合多肽包含基于“双头”构型的交叉双可变结构域IgG(CODV-IgG)双特异性抗体(参见US20120251541 A1,其通过提述以其整体并入本文)。

[0246] 在另一个示例性实施例中,结合多肽是免疫粘附素。如本文所用,“免疫粘附素”是指包含与免疫球蛋白恒定结构域(即Fc区)连接的一个或多个结合结构域(例如,来自受体、配体或细胞黏附分子)的结合多肽(参见例如Ashkenazi等人1995,Methods 8(2):104-115,和Isaacs(1997)Brit.J.Rheum.36:305,其通过提述以其整体并入本文。免疫粘附素在其国际非专利药名称(international nonproprietary names,INN)中以后缀“-cept”标识。与抗体类似,免疫粘附素具有长的循环半衰期,易于通过基于亲和力的方法纯化,并且具有由二价赋予的亲合力优势。市售的治疗性免疫粘附素的实例包括依那西普(ENBREL®)、阿巴西普(ORENCIA®)、利纳西普(ARCALYST®)、阿柏西普(ZALTRAP®/EYLEA®)和贝拉西普(NULOJIX®)。

[0247] 在某些实施方案中,结合多肽包含免疫球蛋白样结构域。合适的免疫球蛋白样结构域包括但不限于纤连蛋白结构域(参见,例如Koide等人(2007),Methods Mol.Biol.352:95-109,其通过提述以其整体并入本文)、DARPin(参见例如Stumpp等人(2008)Drug Discov.Today13(15-16):695-701,其通过提述以其整体并入本文)、蛋白A的Z结构域(参见

Nygren等人(2008)FEBS J.275(11):2668-76,其通过提述以其整体并入本文)、脂质运载蛋白(参见例如Skerra等人(2008)FEBS J.275(11):2677-83,其通过提述以其整体并入本文)、Affilin(参见例如Ebersbach等人(2007)J.Mol.Biol.372(1):172-85,其通过提述以其整体并入本文)、Affitins(参见例如Krehenbrink等人(2008).J.Mol.Biol.383(5):1058-68,其通过提述以其整体并入本文)、Avimer(参见例如Silverman等人(2005)Nat.Biotechnol.23(12):1556-61,其通过提述以其整体并入本文)、Fynomer(参见例如Grabulovski等人(2007)J Biol Chem282(5):3196-3204,其通过提述以其整体并入本文)以及Kunitz结构域肽(参见例如Nixon等人(2006)Curr Opin Drug Discov Devel9(2):261-8,其通过提述以其整体并入本文)。

[0248] 对于本公开的结合多肽和免疫粘附素,实际上任何抗原都可以被结合多肽靶向,包括但不限于靶抗原的蛋白质、亚基、结构域、基序和/或表位,所述靶抗原包括可溶性因子(如细胞因子和膜结合因子)和跨膜受体二者。

[0249] 包含本文所述的经修饰的Fc结构域的本公开的结合多肽可包括已知的“亲本”抗体的CDR序列或可变结构域序列。在一些实施方案中,除了对本文公开的Fc结构域的修饰之外,亲本抗体和本公开的抗体可以共有类似或相同的序列。

[0250] 核酸和表达载体

[0251] 在一个方面,本发明提供编码本文公开的结合多肽的多核苷酸。还提供制备结合多肽的方法,所述方法包括表达这些多核苷酸。

[0252] 通常将编码本文公开的结合多肽的多核苷酸插入表达载体中以引入可用于产生所期望量的要求保护的抗体或免疫粘附素的宿主细胞中。因此,在某些方面,本发明提供包含本文公开的多核苷酸的表达载体以及包含这些载体和多核苷酸的宿主细胞。

[0253] 出于说明书和权利要求书的目的,本文使用术语“载体”或“表达载体”来意指用于在细胞中引入和表达所期望的基因的载体。如本领域技术人员所知,此类载体可以容易地选自质粒、噬菌体、病毒和逆转录病毒。通常,载体将包含选择标记、适当的限制性位点以促进所期望的基因的克隆,以及进入真核或原核细胞和/或在其中复制的能力。

[0254] 可以使用许多表达载体系统。例如,一类载体利用衍生自动物病毒如牛乳头瘤病毒、多瘤病毒、腺病毒、牛痘病毒、杆状病毒、逆转录病毒(RSV、MMTV或MOMLV)或SV40病毒的DNA元件。其他载体类涉及使用具有内部核糖体结合位点的多顺反子系统。另外,可以通过引入一种或多种标记来选择已将DNA整合至其染色体中的细胞,所述一种或多种标记允许转染的宿主细胞的选择。所述标记可提供对营养缺陷型主体的原营养、杀生物剂抗性(例如抗生素)或对重金属如铜的抗性。可选择的标记基因可以直接与待表达的DNA序列连接,或通过共转化引入同一细胞中。还可能附加的元件来最佳地合成mRNA。这些元件可包括信号序列、剪接信号以及转录启动子、增强子和终止信号。在一些实施方案中,将克隆的可变区基因与如上所述合成的重链和轻链恒定区基因(如人基因)一起插入表达载体中。

[0255] 在其他实施方案中,可使用多顺反子构建体表达如本文所述的结合多肽。在此类表达系统中,可从单个多顺反子构建体产生多种感兴趣的基因产物,如抗体的重链和轻链。这些系统有利地使用内部核糖体进入位点(IRES)在真核宿主细胞中提供相对高水平的多肽。兼容的IRES序列公开在美国专利号6,193,980中,其通过提述并入本文。本领域技术人员将理解,此类表达系统可用于有效产生本申请中公开的全范围多肽。

[0256] 更一般地,一旦已经制备编码本公开的结合多肽的载体或DNA序列,就可将表达载体引入适当的宿主细胞中。也就是说,该宿主细胞可被转化。可以通过本领域技术人员熟知的多种技术来实现将质粒引入宿主细胞中。这些技术包括但不限于转染(包括电泳和电穿孔)、原生质体融合、磷酸钙沉淀、与包膜DNA的细胞融合、显微注射和完整病毒感染。参见例如Ridgway, A.A.G. “Mammalian Expression Vectors” 第24.2章,第470-472页Vectors, Rodriguez和Denhardt, 编辑 (Butterworths, Boston, MA1988)。转化的细胞在适于产生轻链和重链的条件下生长,并测定重链和/或轻链蛋白质合成。示例性测定技术包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)或荧光激活细胞分选仪分析(FACS)、免疫组织化学等。

[0257] 如本文所用,术语“转化”应以广义使用,是指将DNA引入受体宿主细胞中,这改变了基因型并因此导致受体细胞的变化。

[0258] 沿着相同的思路,“宿主细胞”是指已经采用使用重组DNA技术构建的并且编码至少一种异源基因的载体转化的细胞。在描述用于从重组宿主分离多肽的过程时,术语“细胞”和“细胞培养物”可互换使用以表示抗体来源,除非另有明确说明。换言之,从“细胞”中回收多肽可意指从离心沉淀的全细胞,或从含有培养基和悬浮细胞二者的细胞培养物中回收。

[0259] 在一个实施方案中,用于表达结合多肽的宿主细胞系是真核或原核起源的。在一个实施方案中,用于表达结合多肽的宿主细胞系是细菌起源的。在一个实施方案中,用于表达结合多肽的宿主细胞系是哺乳动物起源的;本领域技术人员可以确定最适合于在其中表达所期望的基因产物的特定宿主细胞系。示例性宿主细胞系包括但不限于DG44和DUXB11(中国仓鼠卵巢系,DHFR⁻)、HELA(人宫颈癌)、CVI(猴肾系)、COS(具有SV40 T抗原的CVI的衍生物)、R1610(中国仓鼠成纤维细胞)、BALBC/3T3(小鼠成纤维细胞)、HAK(仓鼠肾系)、SP2/0(小鼠骨髓瘤)、BFA-1c1BPT(牛内皮细胞)、RAJI(人淋巴细胞)、293(人肾)。在一个实施方案中,细胞系提供由其表达的抗体的改变的糖基化,例如非岩藻糖基化(例如,PER.C6.RTM.(Crucell)或FUT8敲除CHO细胞系(POTELLIGENTTM细胞)(Biowa, Princeton, NJ))。在一个实施方案中,可使用NS0细胞。宿主细胞系通常可从商业服务、美国组织培养物保藏中心(American Tissue Culture Collection)或公开的文献中获得。

[0260] 体外生产允许按比例放大以给出大量的所期望的结合多肽。用于在组织培养条件下的哺乳动物细胞培养的技术是本领域已知的并且包括同质悬浮培养(例如在气升式反应器或连续搅拌反应器中),或在琼脂糖上微珠或陶瓷盒上的固定化或包埋的细胞培养(例如在中空纤维、微胶囊中)。如果必要和/或需要的话,可通过常规层析方法,例如凝胶过滤、离子交换层析法、在DEAE-纤维素上的层析法和/或(免疫)亲和层析法纯化多肽的溶液。

[0261] 编码结合多肽的一种或多种基因也可以在非哺乳动物细胞如细菌或酵母或植物细胞中表达。在这一方面,应当理解,也可以转化多种单细胞非哺乳动物微生物如细菌,即能够在培养或发酵中生长的那些微生物。易于转化的细菌包括肠杆菌科成员,如大肠杆菌或沙门氏菌属的菌株;芽孢杆菌科,如枯草芽孢杆菌;肺炎球菌属;链球菌属和流感嗜血杆菌。还应理解,当在细菌中表达时,多肽可以成为内含体的一部分。必须分离、纯化多肽,然后将其组装成功能分子。

[0262] 除原核生物外,还可使用真核微生物。酿酒酵母或普通面包酵母是真核微生物中最常用的,尽管许多其他菌株是通常可获得的。对于在酵母属中的表达,通常使用例如质粒

YRp7 (Stinchcomb等人, Nature, 282:39 (1979);Kingsman等人, Gene, 7:141 (1979); Tschemper等人, Gene, 10:157 (1980))。该质粒已经含有TRP1基因, 该基因提供缺乏在色氨酸中生长的能力的酵母突变菌株的选择标记, 例如ATCC号44076或PEP4-1 (Jones, Genetics, 85:12 (1977))。然后, trp1损伤的存在作为酵母宿主细胞基因组特征提供在没有色氨酸的情况下通过生长检测转化的有效环境。

[0263] 治疗方法

[0264] 在一个方面, 本发明提供治疗或诊断有此需要的患者的方法, 其包括施用有效量的本文公开的结合多肽。在某些实施方案中, 本公开提供用于诊断和/或治疗病症 (例如需要此类治疗的哺乳动物受试者的肿瘤病症) 的试剂盒和方法。在某些示例性实施方案中, 所述受试者是人。

[0265] 本公开的结合多肽可用于许多不同的应用。例如, 在一个实施方案中, 主题结合多肽可用于减少或消除带有被该结合多肽的结合结构域识别的表位的细胞。在另一实施方案中, 主题结合多肽有效地降低循环中可溶性抗原的浓度或消除循环中的可溶性抗原。在另一实施方案中, 主题结合多肽作为T细胞啮合物是有效的。在一个实施方案中, 结合多肽可减小肿瘤大小、抑制肿瘤生长和/或延长荷瘤动物的存活时间。因此, 本公开还涉及通过向此类人或动物施用有效无毒量的经修饰抗体来治疗人或其他动物中的肿瘤的方法。

[0266] 在一个实施方案中, 主题结合多肽可用于治疗疾病或病症。例如, 主题结合多肽可用于治疗抗体相关病症或抗体反应性病症、病况或疾病。如本文所用, 术语“抗体相关病症”或“抗体反应性病症”或“病况”或“疾病”是指或描述可通过施用包含本公开的抗体或结合多肽的药物组合物改善的疾病或障碍。

[0267] 在一个实施方案中, 主题结合多肽可用于治疗癌症。如本文所用, 术语“癌症”或“癌的”是指或描述通常以不受控制的细胞生长为特征的生理状况。癌症的实例包括但不限于癌、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤 (包括脂肪肉瘤)、神经内分泌肿瘤、间皮瘤、神经鞘瘤、脑膜瘤、腺癌、黑色素瘤和白血病或淋巴样恶性肿瘤。此类癌症的更具体的实例包括鳞状细胞癌 (例如, 上皮鳞状细胞癌)、肺癌 (包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞状细胞癌)、腹膜癌、肝细胞癌、胃癌 (gastric或stomach cancer) (包括胃肠癌)、胰腺癌、成胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌、子宫内膜或子宫癌、唾液腺癌、肾癌 (kidney或renal cancer)、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌、肛门癌、阴茎癌、睾丸癌、食管癌、胆道肿瘤以及头和颈癌。

[0268] 在另一个实施方案中, 主题结合多肽可用于治疗其他病症, 包括但不限于传染病、自身免疫病症、炎性病症、肺病、神经元或神经变性疾病、肝病、脊柱疾病、子宫疾病、抑郁症等。传染病的非限制性实例包括由RNA病毒 (例如, 正黏液病毒 (例如, 流感)、副粘病毒 (例如, 呼吸道合胞体病毒、副流感病毒、偏肺病毒)、弹状病毒 (例如, 狂犬病病毒)、冠状病毒、甲病毒 (例如, 基孔肯雅病病毒)、慢病毒 (例如, HIV) 等) 或DNA病毒引起的传染病。传染病的实例还包括但不限于由例如金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、肠球菌属、链球菌属、大肠杆菌引起的细菌性传染病和其他传染病, 包括例如由白色念珠菌引起的传染病。其他传染病包括但不限于疟疾、SARS、黄热病、莱姆螺旋体病、利什曼病、炭疽和脑膜炎。示例性自身免疫病症包括但不限于银屑病、类风湿性关节炎、干燥综合征 (Sjogren's Syndrome)、移植排斥、格雷夫斯病 (Grave's disease)、重症肌无力和狼疮 (例如, 系统性红斑狼疮)。因此,

本公开涉及一种治疗多种病况的方法,所述病况将受益于使用具有例如增加的半衰期的主题结合多肽。

[0269] 通过常规实验,本领域技术人员将能够确定有效无毒量的经修饰的结合多肽可用于治疗恶性肿瘤的目的。例如,本公开的治疗活性量的结合多肽可以根据因素诸如受试者的疾病阶段(例如,阶段I相对阶段IV)、年龄、性别、医疗并发症(例如,免疫抑制的病况或疾病)和体重,以及经修饰的抗体在该受试者中引发所期望的变化的能力而变化。可调整剂量方案以提供最佳治疗反应。例如,可每天施用几个分开的剂量,或者可如治疗情况的紧急状态所示按比例减少剂量。

[0270] 通常,本公开中提供的组合物可用于预防性或治疗性地治疗包含抗原标志物的任何肿瘤,所述抗原标志物允许通过经修饰的抗体靶向癌细胞。

[0271] 药物组合物及其施用

[0272] 制备并向受试者施用本公开的结合多肽的方法是本领域技术人员熟知的或容易确定的。本公开的结合多肽的施用途径可以是口服、肠胃外、通过吸入或局部。如本文所用的术语肠胃外包括静脉内、动脉内、腹膜内、肌肉内、皮下、直肠或阴道施用。虽然所有这些形式的施用明显被认为是在本公开的范围,但施用的形式将是用于注射,特别是用于静脉内或动脉内注射或滴注的溶液。通常,用于注射的合适的药物组合物可包含缓冲液(例如乙酸盐、磷酸盐或柠檬酸盐缓冲液)、表面活性剂(例如聚山梨醇酯)、任选稳定剂(例如人白蛋白)等。在一些实施方案中,结合多肽可被直接递送至不良细胞群的部位,由此增强患病组织对治疗剂的暴露。

[0273] 用于肠胃外施用的制剂包括无菌的水性或非水性溶液、悬浮液和乳液。非水性溶剂的实例是丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油、以及可注射的有机酯如油酸乙酯。水性载体包括水、醇性/水性溶液、乳液或悬浮液,包括盐水和缓冲介质。在本公开的组合物和方法中,药学上可接受的载体包括但不限于0.01-0.1M,例如0.05M磷酸盐缓冲液或0.8%盐水。其他常见的肠胃外媒介物包括磷酸钠溶液、林格氏右旋糖、右旋糖和氯化钠、乳酸林格氏液或固定油。静脉内媒介物包括流体和营养补充剂、电解质补充剂(如基于林格氏右旋糖的那些)等。也可存在防腐剂和其他添加剂,例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。更特别地,可适于注射使用的药物组合物包括无菌水溶液(水溶性的)或分散液,以及用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。在这种情况下,该组合物必须是无菌的并且应该是易于注射的程度的流体。它应该在制造和储存条件下稳定,并且通常可以防止微生物如细菌和真菌的污染作用。载体可以是溶剂或分散介质,该溶剂或分散介质含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)和其合适的混合物。例如,可以通过使用包衣如卵磷脂,通过在分散的情况下保持所需的粒度以及通过使用表面活性剂保持适当的流动性。

[0274] 防止微生物的作用可以通过多种抗细菌和抗真菌剂(例如,对羟基苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫汞撒等)来实现。在许多情况下,在组合物中包含等渗剂,例如糖、多元醇(如甘露糖醇、山梨糖醇)或氯化钠。通过在该组合物中包含延迟吸收的药剂例如单硬脂酸铝和明胶,可以实现可注射组合物的延长吸收。

[0275] 在任何情况下,可以通过将活性化合物(例如,经修饰的结合多肽自身或与其他活性剂组合)以所需的量掺入适当的溶剂中,接着过滤灭菌来制备无菌可注射溶液,所述溶剂

根据需要具有本文列举的一种成分或多种成分的组合。通常,通过将该活性化合物掺入无菌媒介物中来制备分散液,所述无菌媒介物含有碱性分散介质和所需的来自以上列举的那些中的其他成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,示例性制备方法包括真空干燥和冷冻干燥,所述真空干燥和冷冻干燥由先前无菌过滤的溶液产生活性成分和任何附加所需成分的粉末。将用于注射的制剂加工,填充至容器如安瓿、袋子、瓶子、注射器或小瓶中,并根据本领域已知的方法在无菌条件下密封。此外,制剂可以以试剂盒的形式包装和销售。这种制品通常具有表明相关组合物可用于治疗患有或易患自身免疫或肿瘤病症的受试者的标签或包装插页。

[0276] 用于治疗上述病况的本公开组合物的有效剂量根据许多不同因素而变化,所述因素包括施用方式、靶位点、患者的生理状态、患者是人还是动物、施用的其他药物以及治疗是预防性的还是治疗性的。通常,患者是人,但也可以治疗包括转基因哺乳动物在内的非人哺乳动物。可使用本领域技术人员已知的常规方法滴定治疗剂量以优化安全性和功效。

[0277] 可以多次施用本公开的结合多肽。单剂量之间的间隔可以是每周、每月或每年。如通过量测该患者中经修饰的结合多肽或抗原的血液水平所指示,间隔也可以是不规则的。在一些方法中,调整剂量以实现血浆经修饰的结合多肽浓度为约1-1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$,并且在一些方法中该浓度为约25-300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。可替代地,结合多肽可以作为持续释放制剂施用,在这种情况下需要较不频繁的施用。对于抗体,剂量和频率根据患者中抗体的半衰期而变化。通常,人源化抗体显示出最长的半衰期,其次是嵌合抗体和非人抗体。

[0278] 施用的剂量和频率可以根据治疗是预防性的还是治疗性的而变化。在预防性应用中,将含有本发明抗体或其混合物的组合物施用至尚未处于疾病状态的患者,以增强患者的抵抗力。这样的量被定义为“预防有效剂量”。在该用途中,精确量还取决于患者的健康状况和总体免疫力,但通常在每剂量约0.1至约25mg,尤其是每剂量约0.5至约2.5mg的范围内。以相对不频繁的间隔长时间施用相对低的剂量。一些患者在余生持续接受治疗。在治疗性应用中,有时需要以相对短的间隔施用相对高的剂量(例如,每剂量约1至400mg/kg抗体,其中约5至25mg的剂量更常用于放射免疫缀合物,并且更高剂量用于经细胞毒素-药物修饰的抗体),直到疾病进展减少或终止,或直到患者显示疾病症状的部分或完全改善。此后,可以向患者施用预防性方案。

[0279] 本公开的结合多肽可任选地与有效治疗需要治疗(例如,预防性或治疗性)的病症或病况的其他药剂组合施用。本公开的 ^{90}Y 标记的经修饰抗体的有效单次治疗剂量(即,治疗有效量)范围在约5与约75mCi之间,如在约10与约40mCi之间。 ^{131}I 修饰的抗体的有效单次治疗非骨髓消融剂量范围在约5与约70mCi之间或在约5与约40mCi之间。 ^{131}I 标记的抗体的有效单次治疗消融剂量(即,可能需要自体骨髓移植)的范围在约30与约600mCi之间,如在约50与小于约500mCi之间。连同嵌合抗体,由于关于鼠抗体的较长循环半衰期,碘-131标记的嵌合抗体的有效单次治疗非骨髓消融剂量的范围在约5与约40mCi之间,如小于约30mCi。例如, ^{111}In 标记的成像标准通常小于约5mCi。

[0280] 尽管可以如上所述施用结合多肽,但必须强调的是,在其他实施方案中,结合多肽可以作为一线疗法施用至其他健康患者。在此类实施方案中,可将结合多肽施用至具有正常或平均红骨髓储备的患者和/或施用至尚未进行治疗且未正在进行治疗的患者。如本文所用,经修饰的抗体或免疫粘附素的施用与辅助疗法一起或组合意指顺序、同时、同延、并

行、伴随或同期施用或施加该疗法和公开的抗体。本领域技术人员将理解,可以定时施用或施加组合的治疗性方案的各种组分以增强治疗的总体有效性。

[0281] 如前所述,本公开的结合多肽、免疫粘附素或其重组体可以以药物有效量施用,以用于哺乳动物病症的体内治疗。在这一方面,应当理解,所公开的结合多肽将被配制成促进活性剂的施用且提升活性剂的稳定性。

[0282] 根据本公开的药物组合物可以包含药学上可接受的无毒无菌载体,如生理盐水、无毒缓冲液、防腐剂等。为了本申请的目的,与治疗剂缀合或未缀合的结合多肽、免疫粘附素或其重组体的药物有效量应保持,这意指足以实现与抗原的有效结合且足以获得益处(例如,足以改善疾病或病症的症状或检测物质或细胞)的量。在肿瘤细胞的情况下,经修饰的结合多肽可以与肿瘤细胞或免疫反应细胞上选择的免疫反应性抗原相互作用,并提供这些细胞死亡的增加。当然,本公开的药物组合物可以以单剂量或多剂量施用,以提供药物有效量的经修饰的结合多肽。

[0283] 为了与本公开的范围保持一致,本公开的结合多肽可以按照上述治疗方法以足以产生治疗性或预防性效果的量施用至人或其他动物。本公开的结合多肽可以通过根据已知技术将本公开的抗体与常规药学上可接受的载体或稀释剂组合制备的常规剂型施用至这种人或其他动物。本领域技术人员将认识到,药学上可接受的载体或稀释剂的形式和特征取决于与其组合的活性成分的量,施用的途径和其他熟知的变量。本领域技术人员将进一步理解,包含本公开所述的一种或多种结合多肽的混合物可以证明是特别有效的。

[0284] 本文提及或引用的文章、专利和专利申请的内容以及所有其他文件和电子可用信息通过提述以其整体并入于此,其程度如同每个单独的出版物被具体且单独地指出经由提述并入。申请人保有将来自任何此类文章、专利、专利申请或其他物理和电子文件的任何和所有材料和信息实际并入本申请的权利。

[0285] 虽然已经参考本发明的具体实施方案描述了本发明,但本领域技术人员应理解,在不脱离本发明的真实精神和范围的情况下,可以进行各种改变并且可以替换等同物。对于本领域技术人员来说显而易见的是,在不脱离本文公开的实施方案的范围的情况下,可以使用合适的等同物进行本文所述方法的其他合适的修改和改编。此外,可以进行许多修改以采用特定情况、材料、物质组成、过程、过程步骤或步骤,以达到本发明的客观精神和范围。预期所有此类修改都在所附权利要求书的范围内。现在已经详细描述了某些实施方案,通过参考以下实施例将更清楚地理解它们,所述实施例仅用于说明的目的而并非限制性的。

[0286] 实施例

[0287] 通过以下实施例进一步阐明本发明,其不应被解释为进一步限制。

[0288] 实施例1:材料和方法

[0289] 蛋白质试剂:

[0290] 表达并分离以下蛋白质:具有C末端8x组氨酸标签的抗原;rFcRn(UniProt:P1359, p51亚基:残基23-298;UniProt:P07151, β 2-m:残基21-119);生物素化的食蟹猴FcRn(UniProt:Q8SPV9, p51亚基:残基24-297,其具有C末端Avi-标签;UniProt:Q8SPW0, β 2-m:残基21-119);生物素化的hFcRn(UniProt:P55899, p51亚基:残基24-297,其具有C末端Avi-标签;UniProt:P61769, β 2-m:残基21-119);人CD16a(UniProt:P08637, Fc γ RIIa:残基17-

208,其具有C末端HPC4标签和在位置158处的缬氨酸(V158))。从HEK293条件培养基获得H435A和H310A/H435Q重链变体。通过Evitria克隆mAb2变体,并使用mAbSelect SuRe亲和柱(GE Healthcare)从悬浮液CHO K1条件培养基纯化,并将缓冲液交换为pH 7.4的磷酸盐缓冲盐水(PBS)用于后续实验。

[0291] 饱和文库构建:

[0292] 使用NcoI和HindIII限制酶位点将具有前导DNA序列的WT IgG1 mAb1抗体重链和轻链分别并入pBH6414和pBH6368哺乳动物表达质粒中。使用闪电位点定向诱变试剂盒(Lightning Site Directed Mutagenesis Kit)(Agilent)和NNK(N=A/C/G/T,K=G/T)和WWC(W=A/T)引物(IDT Technologies)创建饱和文库,以在以下位置处引入所有可能的氨基酸:M252、I253、S254、T256、K288、T307、K322、E380、L432、N434和Y436(Eu编号)。通过LakePharma将mAb1骨架中的三种对照变体AAA(T307A/E380A/N434A)、LS(M428L/N434S)和YTE(M252Y/S254T/T256E)的重链DNA序列构建至pBH6414载体中。

[0293] 通过采用Q5诱变试剂盒(NEBiolabs)和T256D、T256E、T307Q、T307W、N434F和N434Y引物用WT和M252Y模板在PCR反应中对mAb1重链的位点定向诱变来获得组合饱和文库。使用具有M252Y、T256D、T307Q和T307W引物的Q5诱变试剂盒(NEBiolabs)将突变并入Ab3骨架中。通过Sanger测序(Genewiz, Inc.)确认所有Fc变体的产生。

[0294] 重组抗体表达和纯化:

[0295] 对于条件培养基筛选,将含有mAb1的突变重链和野生型轻链的DNA转染至1mL的Expi293哺乳动物细胞(Invitrogen)中,用于根据制造商的说明书进行表达。将细胞在37℃、5%二氧化碳和80%湿度下在2mL 96孔板(Greiner Bio-One)中以900转/分钟(RPM)摇动孵育,并用充气膜密封。转染后五天收集条件培养基并在-80℃下储存直至使用。mAb1和Ab3骨架的先导变体在具有0.2μm排放帽的125mL烧瓶(Corning)中以30mL规模表达。在整个表达持续时间内以125RPM摇动125mL培养瓶。转染后五天收集条件培养基,并通过0.22μm、50mL锥形过滤器(Corning)过滤,并在4℃下储存直至纯化。

[0296] 使用1mL mAbSelect SuRe HiTrap柱(GE Healthcare)进行mAb1和Ab3的分离。在pH 7.4的PBS的十个柱体积的洗涤步骤后,用五个柱体积的pH 3.0的0.1M柠檬酸(Sigma)洗脱抗体,并用0.5mL的pH 9.0的1M tris碱(Sigma)中和。将洗脱的抗体在pH 7.4的PBS中进行缓冲交换,并使用30kDa MWC0 Amicon浓缩器(Millipore)浓缩至>1mg mL⁻¹用于后续研究。纯化的抗体的浓度由它们在280nm处的UV吸光度(UV₂₈₀)和合适的消光系数来确定。

[0297] Octet条件培养基筛选和分析:

[0298] 在具有Ni-NTA生物传感器的Octet QK 384(PALL Life Sciences)上进行含有mAb1变体的条件培养基的筛选。His标记的抗原在pH 7.4的PBS、0.1%牛血清白蛋白(BSA, Sigma)和0.01%吐温-20(Sigma)(PBST-BSA7.4)中以15μg mL⁻¹捕获300sec,接着用pH 7.4的PBST-BSA洗涤20秒。在用pH 7.4的PBST-BSA以1:1稀释的条件培养基中捕获抗体200sec。在pH 6.0缓冲液中的缓冲液洗涤步骤后,使用200nM rFcRn进行缔合并且在pH 6.0下分别以150和200sec的解离时间获得FcRn结合动力学。在Octet筛选期间的所有步骤中,温度为30℃,摇动速度为1000RPM。将rFcRn结合动力学曲线针对FcRn缔合阶段的开始进行校正,并使用Octet 7.1分析软件建模为1:1结合模型。

[0299] FcRn结合动力学:

[0300] 使用具有直接固定FcRn或生物素CAPture试剂盒 (GE Healthcare) 的修改方案利用Biacore T200仪器 (GE Healthcare) 测量pH 6.0和pH 7.4下的FcRn结合动力学 (参见, 例如Abdiche等人, MAbs (2015) 7:331-343; Karlsson等人, Anal. Biochem. (2016) 502:53-63)。对于直接固定, 通过胺偶联化学 (GE Healthcare) 将生物素化的FcRn (浓度为 $20\mu\text{g mL}^{-1}$) 以 $10\mu\text{L min}^{-1}$ 在pH 4.5的10mM乙酸钠 (GE Healthcare) 中固定180s, 在C1传感器芯片的表面上达到约20RU。在生物素CAPture试剂盒的情况下, 将CAPture试剂捕获在CAP芯片表面至结合 $\text{RU} > 2,000\text{RU}$, 接着 $0.1\mu\text{g mL}^{-1}$ FcRn以 $30\mu\text{L min}^{-1}$ 在适当的通道中捕获24s, 至最终结合RU为约2RU。用于FcRn结合动力学实验的运行缓冲液是pH 6.0或7.4下的具有0.05%表面活性剂P-20 (PBS-P+, GE Healthcare) 的PBS。对于每种变体 (包括0nM对照), 一式四份地进行从1000nM抗体的浓度系列的4倍系列稀释。在 $10\mu\text{L min}^{-1}$ 的流速下分别获得180和300sec的缔合和解离时间的动力学测量。将C1和CAP传感器芯片分别用10mM四硼酸钠、pH 8.5的1M NaCl (GE Healthcare) 以 $50\mu\text{L min}^{-1}$ 再生30sec, 或用6M盐酸胍、250mM氢氧化钠 (GE Healthcare) 以 $50\mu\text{L min}^{-1}$ 再生120s, 接着在pH 6.0的PBS-P+中进行另外的60-90sec稳定步骤。使用如上所述的相同C1或CAP传感器芯片和动力学参数, 一式三份地获得1000nM下的所有变体在pH 7.4下的稳态RU测量, 只是两种方法的FcRn的捕获水平增加10至20倍。

[0301] 由于亲合力作用, 使用Biacore T200评估软件将pH 6.0下浓度系列的动力学参数拟合至二价模型。参见, 例如Suzuki等人, J. Immunol. (2010) 184:1968-1976。将每个浓度系列独立地拟合以获得平均的缔合和解离速率以及结合亲和力。表观结合亲和力是根据二价模型的首次缔合和解离速率计算的。同时使用1000nM的每种抗体一式三份地测量pH 7.4下的残基结合, 以供反应比较。将每个重复的稳态反应取平均以获得平均值和标准偏差。

[0302] FcRn亲和层析:

[0303] 在一个实验中, FcRn亲和柱从改编自Schlothauer等人2013, mAbs 5:576-586的方案中产生。将1mL链霉亲和素HP HiTrap柱 (GE Healthcare) 用五个柱体积的结合缓冲液 (pH 7.4的20mM磷酸钠 (Sigma)、150mM氯化钠 (NaCl; Sigma)) 以 1mL min^{-1} 平衡, 接着注射4毫克生物素化的cynoFcRn。用结合缓冲液洗涤柱并在4°C下储存直至使用。

[0304] 将FcRn亲和柱用五个柱体积的低pH缓冲液 (pH 5.5的20mM 2- (N-吗啉代) 乙磺酸 (MES; Sigma); 150mM NaCl) 平衡, 然后注射300 μg 的每种抗体。用低pH缓冲液将抗体溶液的pH调节至pH 5.5。在用低pH缓冲液进行十个柱体积洗涤后, 用超过30个柱体积的高pH缓冲液 (pH 9.5的20mM 1,3-双(三(羟甲基) 甲基胺基) 丙烷 (双三丙烷; Sigma); 150mM NaCl) 以 1mL min^{-1} 通过线性pH梯度洗脱1mL级分中的抗体, 并监测 UV_{280} 。用十个柱体积的低pH缓冲液重新平衡FcRn亲和柱, 以供后续运行或用结合缓冲液重新平衡以供储存。所有变体一式三份地进行。

[0305] 在Sigmaplot 11 (Systat Software, Inc.) 中使用等式1对于每种抗体的FcRn亲和柱洗脱曲线建模为单个高斯分布, 以确定 UV_{280} 最大值处的洗脱体积。

$$[0306] \quad \text{UV}_{280} = y_0 + a * \exp \frac{-(x-x_0)^2}{2b} \quad (\text{等式1})$$

[0307] 其中 x_0 是 UV_{280} 峰值最大值处的洗脱体积, y_0 是基线 UV_{280} 吸光度, 并且 a 和 b 与该分布的一半最大值处的全宽有关。通过Corning Pinnacle 540pH计量测每个级分的pH, 并使用线性回归将其与洗脱体积相关联。

[0308] 在另一个实验中,FcRn亲和柱改编自Schlothauer等人2013,mAbs 5:576-586,其中生物素化hFcRn在1mL Streptavidin HP HiTrap柱(GE Healthcare)上。在AKTAPure系统(AKTA)上,向柱中注射在低pH缓冲液(pH 5.5的20mM2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES;Sigma);150mM NaCl)中的300μg每种抗体。通过用超过30个柱体积的低和高pH缓冲液(pH 9.5的20mM 1,3-双(三(羟甲基)甲基胺基)丙烷(双三丙烷;Sigma);150mM NaCl)产生的线性pH梯度以0.5mL min⁻¹洗脱抗体,并监测吸光度和pH。将柱用低pH缓冲液重新平衡以供后续运行。所有变体一式三份地进行。在Sigmaplot 11(Systat Software,Inc.)中将FcRn亲和柱洗脱曲线拟合至单个高斯分布,以确定UV₂₈₀最大值处的洗脱体积和pH。

[0309] 差示扫描荧光测定:

[0310] 差示扫描荧光测定(DSF)实验在BioRad CFX96实时系统热循环仪(BioRad)上在20μL反应中进行。将抗体样品和5000x原液的Sypro Orange染料(Invitrogen)在pH 7.4的PBS中分别稀释至0.4mg mL⁻¹和10x。将抗体和Sypro Orange在96孔PCR板中以1:1的比例混合并用黏性封膜(microseal,BioRad)密封,达到每种抗体和5x Sypro Orange染料最终浓度为0.2mg mL⁻¹。所有抗体变体一式三份地进行。热循环仪程序由以下步骤组成:20℃下进行2分钟的平衡步骤,接着以恒定升温速率0.5℃/5sec升至最终温度为100℃。使用适合于Sypro Orange荧光的FAM激发波长(485nm)和ROX发射(625nm)检测器获得每个孔的荧光测量(参见例如Biggar等人2012,Biotechniques 53:231-238)。从BioRad CFX Manager输出DSF荧光强度曲线和一阶导数,并在Sigmaplot 11中分析。T_m定义为荧光强度曲线中第一次转变的中点。

[0311] Fc γ RIIIa结合动力学:

[0312] 使用Biacore T200仪器(GE Healthcare)测量结合动力学和亲和力(Zhou等人2008Biotechnol.Bioeng.99:652-665)。采用胺化学将在pH 4.5的乙酸盐中50μg mL⁻¹下的抗HPC4抗体(Roche)以10μL min⁻¹与CM5传感器芯片的表面偶联600sec,达到最终密度>20,000RU。用于Fc γ RIIIa结合动力学实验的运行缓冲液是pH 7.4下的具有0.05%表面活性剂P-20(HBS-P+,GE Healthcare)和2mM氯化钙(CaCl₂,Fluka)的HEPES缓冲盐水。通过以5μL min⁻¹捕获1.25μg mL⁻¹HPC4标记的Fc γ RIIIa-V158持续30sec初始化每个动力学迹线。测量300nM的每种变体的缔合和解离动力学,每种变体的每个步骤都以5μL min⁻¹测量120-180sec。完成动力学测量后,将CM5芯片用补充有10mM EDTA(Ambion)的HBS-P+缓冲液再生。在下一动力学测量之前,将CM5芯片用具有CaCl₂的HBS-P+洗涤120sec。

[0313] 在一个实验中,以与在pH 7.4下FcRn结合所述类似的方式分析Fc γ RIIIa动力学实验。对于WT、基准、先导单一和组合变体,获得从1000nM的一系列3倍连续稀释的动力学以确定对Fc γ RIIIa的结合亲和力。确定每个浓度和重复的稳态RU,绘制为抗体浓度的函数并拟合至如等式2中所示的稳态模型。

$$[0314] \quad RU = \text{偏移} + \frac{(R_{\max} - \text{偏移}) * [\text{抗体}]}{[\text{抗体}] + K_{D,\text{app}}} \quad (\text{等式2})$$

[0315] 其中偏移是0nM抗体的基线RU,R_{max}是高抗体浓度下的稳定期RU,[抗体]是抗体的浓度,并且K_{D,app}是变体与Fc γ RIIIa之间相互作用的表观结合亲和力。

[0316] 在另一实验中,使用平均稳态结合反应,以与对于pH 7.4下的FcRn结合所述类似的方式分析Fc γ RIIIa动力学实验。对于所有变体,一式三份地测定300nM抗体的稳态RU并

取平均值。确定相对于WT的反应变化的倍数变化(响应倍数变化),以供每种骨架中的变体之间的比较。

[0317] 等电聚焦

[0318] 在Maurice C (Protein Simple) 上使用毛细管电泳测定先导变体的等电点(pI)。每个200 μ L样品含有0.35%甲基纤维素(Protein Simple)、4%两性电解质(pharmalyte) 3-10 (GE Healthcare)、10mM精氨酸(Protein Simple)、0.2mg mL⁻¹抗体以及4.05和9.99pI标志物(Protein Simple)。将样品在1500V下加载至毛细管中持续1分钟,接着在3000V下进行分离阶段6分钟并使用色氨酸荧光监测。使用Maurice C软件确定每种变体的pI,并将其定义为主要种类的荧光最大值处的pH。

[0319] 同质桥接类风湿因子(RF)ELISA

[0320] 根据制造商的说明,使用EZ-Link硫代-NHS-LC-生物素和Mix-n-Stain™洋地黄毒苷抗体标记试剂盒(Biotium) 对抗体进行生物素化和洋地黄毒苷标记。对于每种变体制备含有4 μ g mL⁻¹的生物素化和洋地黄毒苷标记的抗体的储备溶液,并以1:1的比例与300U/mL RF (Abcam) 混合。在室温下孵育20小时后,将100 μ L的每种抗体-RF混合物添加至Streptawell板(Sigma-Aldrich) 中并在室温下孵育2小时。将板用具有0.05%吐温-20的pH 7.4的PBS洗涤三次,并向每个孔中添加100 μ L的1:2000稀释的HRP缀合的抗洋地黄毒苷二抗(Abcam)。在室温下孵育2小时后,洗涤孔并在室温下用100 μ L的TMB底物(Abcam) 处理15分钟。用100 μ L的终止溶液(Abcam) 终止反应,并在SpectraMax读板器上测量450nm处的吸光度。不含抗体-RF混合物的孔提供空白扣除,并将实验重复三次。使用学生t检验确定P值。

[0321] 体内药代动力学

[0322] 在食蟹猴和hFcRn转基因小鼠(Tg32品系, Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) 中进行药代动力学研究。在猴研究中,将mAb2骨架中的WT、LS、DQ、DW和YD变体以2.5mg/kg的单次静脉内剂量施用至三只未经治疗的雄性食蟹猴的头臂静脉中,其中剂量体积为1.5mL/kg。在给药后0.0035、0.17、1、3、7、14、21和28天的8个取样时间通过静脉穿刺隐静脉收集血液样品(0.5mL)。收集后,将血液样品在4℃下以1500g离心10分钟并在-80℃下储存。

[0323] 在hFcRn小鼠中,将抗体变体以2.5mg/kg的单次静脉内剂量施用于尾静脉中,其中剂量体积为5mL/kg。在每个时间点,使用预填充的肝素毛细管从隐静脉收集20 μ L血液。将收集的血液样品转移至微管中,并在4℃下以1500g离心10分钟。收集血浆样品,将其针对每个时间点进行合并(6只小鼠/样品),并在分析前在-80℃下储存。

[0324] 所有体内研究均遵循赛诺菲机构动物护理政策(Sanofi institutional animal care policy) 进行。食蟹猴和小鼠研究通过了法国“Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche”和德国“Regierungspraesidium Darmstadt”的核准。

[0325] 通过自下而上的LC-MS/MS测定确定了每个时间点的每种mAb2变体的浓度。在血浆等分试样沉淀后,使血浆沉淀物进行蛋白质变性、还原、烷基化、胰蛋白酶消化和固相提取,然后分析替代肽。通过将mAb2变体以1.00、2.00、5.00、10.0、20.0、50.0、100、200和400 μ g mL⁻¹掺入血浆中来制备校准标准物。在Waters Acquity UPLC系统上采用反相XBridge BEH C18柱(2.1x150mm, 3.5 μ M, 300Å, Waters)以300 μ L min⁻¹的流速以在水中0.1%甲酸和在乙腈中0.1%甲酸的阶梯式梯度进行肽分离。对于检测,以阳离子模式使用Sciex API5500质谱仪,其中源温度为700℃,离子喷雾电压为5500V,帘幕和雾化气体为40并且碰撞气体在中

间。停留时间为20ms,并且每次转化的入口电位为10V。将mAb2骨架的两个独特替代肽的多反应监测转变用于使用来自Analyst软件的MQIII积分算法的峰面积测定相对于标准物和对照的浓度。使用Phoenix软件(Certara)从作为时间函数的抗体浓度的非隔室模型获得清除率和血清半衰期。显示出浓度急剧下降的所有时间点被排除在平均血浆浓度之外,这是因为(不受任何理论的约束)假定的靶介导的药物处置(TMDD)和/或抗药物抗体(ADA)干扰。

[0326] 实施例2:条件培养基中饱和点突变的Octet筛选

[0327] FcRn是I类MHC样 α 结构域和 $\beta 2$ 巨球蛋白($\beta 2$ -m)亚基(对于大多数Fc受体是共同的)的异二聚体(图1A),并且识别抗体Fc重链上不同于其他Fc γ R的区域(参见例如,Oganesyan等人2014J.Biol.Chem.289:7812-7824;和Shields等人2001同上)。

[0328] 为了鉴定具有比WT抗体更慢的FcRn解离速率的变体,设计了基于生物层干涉法(BLI)的测定以高通量方式筛选条件培养基中的抗体变体(图2A)。使用几种基准变体开发了该测定,所述基准变体与WT抗体相比在pH 6.0下增强(AAA、LS和YTE)或降低(H435A、H310A/H435Q)对FcRn的亲和力。NiNTA生物传感器捕获his标记的抗原,并且随后在pH 7.4下捕获每种抗体变体以模拟条件培养基(图2A)。对于六种变体中的每一种,测量pH 6.0下对于大鼠FcRn(rFcRn)的结合动力学(图2B),所述大鼠FcRn与人FcRn(hFcRn)相比具有从人IgG1的慢约25倍的解离速率,并且更适合Octet研究。H435A(图2B,夹杂单点的长划线)和H310A/H435Q(图2B,夹杂两点的长划线)变体显示出很少甚至没有FcRn结合动力学(还参见例如Shields等人2001同上;Medesan等人1997同上;以及Raghavan等人1995同上)。与WT(图2B,实线)相比,AAA(图2B,短划线)、LS(图2B,夹杂单点的短划线)和YTE(图2B,长划线)变体均展示出更慢的解离动力学,其中FcRn解离速率降低2-7.3倍。这表明Octet筛选适合于区分具有扰乱的rFcRn解离动力学的变体。

[0329] IgG1抗体mAb1用作模型系统以产生饱和诱变文库,以筛选具有降低的FcRn解离速率的突变体。mAb1的Fc区中的十一个位置基于它们与FcRn界面接近或直接贡献FcRn界面而被选择(图1A和图1B)(参见例如Oganesyan等人2014同上;和Shields等人2001同上)。使用定点诱变构建这些位置处的所有点突变,并在Expi293细胞中转染以供表达。如上所述对饱和文库突变体进行条件培养基筛选。针对变体子集的归一化FcRn结合Octet传感图显示于图2C(长划线),以及野生型(图2C,粗长划线)和模拟物阴性对照(图2C,虚线)的归一化FcRn结合Octet传感图。模拟物显示出缺乏可观察到的FcRn结合。若干种突变体明显地破坏了rFcRn的结合,因为在动力学曲线中几乎观察不到信号变化(图2C,长划线,位于虚线(模拟物)下方)。将具有改善的FcRn解离速率的变体的截止值定义为低于WT抗体平均值的三个标准偏差。在图2C中显示的突变子集中,两个(图2C,实线)与野生型抗体相比具有显著降低的解离速率(图2C,粗长划线),而其余变体具有类似(图2C,夹杂单点的短划线)或更快(图2C,虚线(模拟物)上方的长划线)的rFcRn解离速率。

[0330] 所有单点突变的rFcRn解离速率在图2D和图14中通过位置和突变示出。在图14中,根据与野生型相比rFcRn解离率的倍数变化将数据分类为四类中的一种,并且野生型种类用黑色方块表示。

[0331] 在图14中,将饱和文库的十一个位置处的所有可能取代的rFcRn解离速率的倍数变化归一化为WT抗体的平均值并且以颜色编码。所有突变体落入四类中的一种:很少甚至没有结合(深灰色)、较快的rFcRn解离速率(灰色)、类似WT的rFcRn解离速率(水平线)和较

慢的rFcRn解离速率(网格)。多种变体具有比WT抗体更慢的rFcRn解离速率(网格)。

[0332] 图14中以深灰色着色的突变体以与模拟物(图2C,虚线)类似的方式显示出与rFcRn很少甚至没有结合,并且定位于M252、I253和S254环。I253处的唯一突变是甲硫氨酸和缬氨酸,并且二者均显著增加rFcRn解离速率,这进一步支持I253对FcRn相互作用的重要性。另外120种变体(图2D和图14,浅灰色矩形)使与rFcRn的相互作用不稳定,其中约50%位于每个C_H2和C_H3结构域中。二十五个突变体具有类似WT的解离速率(图2D和图14,白色矩形),其中11个位置中的八个位置具有至少一个类似WT的突变(图14,白色矩形)。与野生型相比,以下突变具有显著降低的rFcRn解离速率(图2D和图14,黑色矩形):M252Y、T256D/E、K288D/N、T307A/E/F/M/Q/W、E380C、N434F/P/Y和Y436H/N/W。M252Y、N434F和N434Y突变具有比WT抗体慢两倍以上解离速率(图2D)。表达这些突变并用蛋白A层析法纯化,用于进一步的体外FcRn动力学表征。

[0333] 实施例3:在pH 6.0下的Biacore FcRn结合动力学

[0334] 在使用Biacore的FcRn结合动力学测量中AAA、LS和YTE变体用作pH 6.0下人和大鼠FcRn二者的阳性对照。观察所有变体与FcRn的浓度依赖性结合,包括野生型、基准(图3)和先导(图4A和图4B),并且人和大鼠FcRn的单次注射的结合曲线分别示于图5A和图5B中。野生型抗体对于人和大鼠FcRn的结合亲和力分别为 2380 ± 470 nM和 207 ± 43 nM亲和力(表1)。

[0335] 表1:对于mAb1的纯化的先导抗体的体外表征参数。

[0336]

	Octet pH 6.0	FcRn 亲和 柱	DSF	Biacore pH 6.0						Biacore pH 7.4	
	rFcRn 解离 速率	洗脱 pH	T _m (°C)	缔合 速率	解离 速率	K _{D,app}	缔合 速率	解离 速率	K _{D,app}	稳态 RU	稳态 RU
E380C	2.08 ± 0.18	7.18 ± 0.11	64.7 ± 0.5	1.73 ± 0.39	4.57 ± 1.50	> 10,000	1.71 ± 0.25	106 ± 1	6310 ± 880	5.7 ± 0.1	27.7 ± 4.0
K288D	3.79 ± 0.06	7.33 ± 0.10	65.8 ± 0.1	3.31 ± 1.10	5.13 ± 0.75	> 10,000	6.61 ± 3.01	8.43 ± 0.60	149 ± 63	3.8 ± 0.2	21.9 ± 3.1
K288N	4.11 ± 0.08	7.39 ± 0.02	66.7 ± 0.3	4.12 ± 1.42	4.54 ± 0.34	> 10,000	6.42 ± 2.80	10.7 ± 0.9	190 ± 73	3.9 ± 0.2	20.4 ± 2.7
M252Y	0.95 ± 0.03	7.88 ± 0.03	64.4 ± 0.2	5.50 ± 1.83	1.43 ± 0.23	3100 ± 1500	10.6 ± 3.1	2.64 ± 0.62	25 ± 3	8.6 ± 0.9	57.7 ± 10.7
N434F	1.18 ± 0.05	8.30 ± 0.05	67.8 ± 0.2	35.4 ± 15.3	0.50 ± 0.08	165 ± 73	12.6 ± 1.4	3.36 ± 1.79	26 ± 13	20.1 ± 3.4	54.9 ± 9.1
N434P	3.80 ± 0.08	7.56 ± 0.02	63.6 ± 0.5	2.42 ± 0.54	3.35 ± 1.10	> 10,000	3.44 ± 0.07	6.67 ± 0.18	194 ± 9	3.5 ± 0.4	4.3 ± 0.6
N434Y	1.33 ± 0.04	8.46 ± 0.02	67.3 ± 0.5	35.9 ± 9.6	0.52 ± 0.10	137 ± 33	14.5 ± 1.82	3.46 ± 1.86	23 ± 12	22.6 ± 4.2	47.0 ± 6.3
T256D	2.24 ±	7.82 ±	64.7 ±	4.41 ±	2.51 ±	6700 ±	6.09 ±	4.84 ±	86 ±	5.8 ±	30.4 ±

[0337]

	Octet pH 6.0	FcRn 亲和 柱	DSF	Biacore pH 6.0						Biacore pH 7.4	
	rFcRn 解离 速率	洗脱 pH	T _m (°C)	缔合 速率	解离 速率	K _{D,app}	缔合 速率	解离 速率	K _{D,app}	稳态 RU	稳态 RU
	0.03	0.07	0.2	1.72	0.65	3540	1.84	0.08	27	0.6	3.4
T256E	3.26 ± 0.04	7.63 ± 0.06	66.3 ± 0.6	3.90 ± 2.37	3.38 ± 0.28	> 10,000	6.29 ± 1.59	6.94 ± 0.97	113 ± 15	4.8 ± 0.5	23.0 ± 2.7
T307A	2.98 ± 0.06	7.61 ± 0.03	68.0 ± 0.4	2.85 ± 0.72	2.91 ± 0.46	> 10,000	6.09 ± 2.72	7.08 ± 0.67	132 ± 48	5.2 ± 0.6	23.1 ± 2.8
T307E	3.29 ± 0.08	7.58 ± 0.03	70.2 ± 0.5	4.37 ± 1.63	2.98 ± 0.37	8130 ± 5070	5.55 ± 2.82	6.03 ± 0.20	141 ± 65	5.7 ± 0.7	21.5 ± 2.6
T307F	2.80 ± 0.07	7.61 ± 0.03	70.2 ± 0.3	2.70 ± 0.83	2.92 ± 0.13	> 10,000	5.69 ± 2.83	6.15 ± 0.14	131 ± 63	4.9 ± 0.7	21.9 ± 2.7
T307M	3.47 ± 0.13	7.40 ± 0.08	70.0 ± 0.4	4.08 ± 0.83	3.87 ± 0.28	> 10,000	6.81 ± 2.34	17.1 ± 4.0	279 ± 140	4.4 ± 0.7	15.3 ± 1.9
T307Q	1.84 ± 0.05	7.86 ± 0.06	70.3 ± 0.6	3.96 ± 1.10	2.15 ± 0.22	5720 ± 1530	7.35 ± 2.15	4.04 ± 0.28	58 ± 16	6.4 ± 0.8	24.3 ± 3.0
T307W	2.42 ± 0.08	7.75 ± 0.07	63.0 ± 0.5	3.33 ± 0.83	2.77 ± 0.29	8740 ± 2440	7.11 ± 2.29	7.37 ± 0.41	111 ± 32	5.8 ± 0.7	19.2 ± 3.3
Y436H	3.22 ± 0.08	7.33 ± 0.05	68.7 ± 0.3	2.59 ± 0.78	6.06 ± 1.00	> 10,000	5.06 ± 0.13	7.30 ± 0.88	131 ± 9	3.6 ± 0.5	16.3 ± 1.8
Y436N	5.25 ± 0.22	7.22 ± 0.05	65.8 ± 0.5	4.60 ± 2.36	7.37 ± 3.34	> 10,000	10.1 ± 4.9	20.3 ± 3.1	233 ± 86	3.6 ± 0.4	17.4 ± 2.0
Y436W	5.18 ± 0.18	7.39 ± 0.03	68.6 ± 0.7	2.84 ± 1.90	4.62 ± 0.92	> 10,000	3.44 ± 2.18	23.7 ± 7.7	1140 ± 950	3.7 ± 0.4	10.3 ± 1.2
WT	5.01 ± 0.45	7.37 ± 0.05	69.0 ± 0.2	16.2 ± 2.9	3.86 ± 0.38	2380 ± 470	7.26 ± 1.01	15.2 ± 0.23	207 ± 43	4.3 ± 1.0	12.2 ± 0.5
AAA	3.77 ±	7.94 ±	61.3 ±	8.37 ±	1.44 ±	1780 ±	15.7 ±	11.7 ±	77 ±	13.9 ±	23.6 ±

[0338]

	Octet pH 6.0	FcRn 亲和 柱	DSF	Biacore pH 6.0						Biacore pH 7.4	
	rFcRn 解离 速率	洗脱 pH	T _m (°C)	hFcRn			rFcRn			hFcRn	rFcRn
突变体				缔合 速率	解离 速率	K _{D,app}	缔合 速率	解离 速率	K _{D,app}	稳态 RU	稳态 RU
	1.03	0.06	0.6	1.82	0.04	380	3.3	1.1	18	3.1	4.9
LS	3.38 ± 0.23	8.29 ± 0.03	68.5 ± 0.3	19.3 ± 3.5	0.52 ± 0.03	272 ± 40	9.08 ± 1.58	6.58 ± 0.39	74 ± 9	18.3 ± 4.6	24.8 ± 4.8
YTE	0.66 ± 0.17	8.14 ± 0.03	61.2 ± 0.3	14.3 ± 4.4	0.45 ± 0.07	342 ± 117	6.52 ± 0.46	1.21 ± 0.21	18 ± 2	13.2 ± 3.5	53.9 ± 1.2

[0339] 使用每列顶部所示的实验技术获得表1中所示的所有数据。

[0340] 作为与从条件培养基中筛选获得的动力学常数的比较,测量使用纯化的蛋白质通过Octet得到的rFcRn解离速率。通过FcRn亲和层析法一式三份 (n=3) 地测定洗脱pH,并且DSF一式三份 (n=3) 地探测热稳定性。采用一系列抗体浓度一式两份 (n=2) 地从Biacore获得对人和大鼠FcRn的FcRn结合动力学,并独立地拟合。使用Biacore,用1000nM抗体一式三份 (n=3) 地测量每种变体与人和大鼠FcRn在pH 7.4下的稳态结合反应 (RU)。每次测量的单位如下:Octet pH 6.0rFcRn解离速率 ($\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$);洗脱pH (无单位);DSF T_m (°C);Biacore pH 6.0hFcRn缔合速率 ($\times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)、解离速率 ($\times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$) 和K_{D,app} ($\times 10^9 \text{ M}$);Biacore pH 6.0rFcRn缔合速率 ($\times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)、解离速率 ($\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) 和K_{D,app} ($\times 10^9 \text{ M}$);和Biacore pH 7.4稳态结合反应 (RU)。

[0341] 在图5B中,AAA (虚线)、LS (夹杂两点的划线) 和YTE (夹杂单点的划线) 变体与WT相比具有1.6至10.4倍的增强的结合亲和力。具有最紧密的FcRn亲和力的基准变体的特性是物种特异性的,因为LS对hFcRn具有最紧密的亲和力,而rFcRn对YTE具有更紧密的亲和力 (表2A)。

[0342] 表2A:对于mAb1的纯化的双组合抗体的体外表征参数。

[0343]

	FcRn 亲和 柱	DSF	Biacore pH 6.0				Biacore pH 7.4	
			hFcRn		rFcRn		hFcRn	rFcRn

[0344]

变体	洗脱pH	T _m (°C)	缔合速率	解离速率	K _{D,app}	缔合速率	解离速率	K _{D,app}	稳态RU	稳态RU
<u>MDQN</u>	7.92 ± 0.06	67.9 ± 0.4	3.76 ± 0.38	8.72 ± 0.10	232 ± 24	1.33 ± 0.22	1.27 ± 0.07	9.54 ± 1.66	10.7 ± 1.0	39.1 ± 4.5
<u>MDTF</u>	8.41 ± 0.07	62.3 ± 0.2	9.68 ± 0.64	2.90 ± 0.04	29.9 ± 2.0	2.18 ± 0.20	0.39 ± 0.01	1.78 ± 0.17	29.2 ± 4.0	63.0 ± 6.0
<u>MDTY</u>	8.45 ± 0.04	61.5 ± 0.2	18.3 ± 0.6	2.85 ± 0.01	15.6 ± 0.5	4.13 ± 0.15	0.25 ± 0.35	0.60 ± 0.85	37.1 ± 5.0	71.6 ± 6.6
<u>MDWN</u>	7.92 ± 0.04	57.8 ± 0.4	5.29 ± 0.14	8.92 ± 0.32	169 ± 8	1.57 ± 0.12	1.29 ± 0.01	8.24 ± 0.85	12.2 ± 1.3	42.1 ± 4.7
<u>MEQN</u>	7.84 ± 0.06	68.0 ± 0.5	2.87 ± 0.01	14.3 ± 0.2	499 ± 6	1.46 ± 0.25	1.56 ± 0.94	10.7 ± 6.7	5.8 ± 0.6	23.4 ± 3.1
<u>METF</u>	8.23 ± 0.03	64.1 ± 0.7	5.36 ± 1.41	4.19 ± 0.03	78.2 ± 20.5	1.08 ± 0.11	0.81 ± 0.07	7.53 ± 1.03	23.3 ± 3.2	59.0 ± 5.6
<u>METY</u>	8.38 ± 0.04	63.5 ± 0.6	6.28 ± 1.62	3.93 ± 0.02	62.6 ± 16.2	1.27 ± 0.11	0.98 ± 0.07	7.71 ± 0.84	26.8 ± 3.7	62.2 ± 6.3
<u>MEWN</u>	7.78 ± 0.04	58.2 ± 0.4	4.32 ± 0.36	14.0 ± 0.1	323 ± 27	1.81 ± 0.01	1.92 ± 0.05	10.6 ± 0.26	7.7 ± 0.9	33.0 ± 4.2
<u>MTQF</u>	8.56 ± 0.14	69.3 ± 0.2	5.74 ± 1.05	2.46 ± 0.05	42.9 ± 7.9	1.04 ± 0.07	0.40 ± 0.01	3.89 ± 0.26	34.2 ± 4.6	62.5 ± 7.6
<u>MTQY</u>	8.68 ± 0.15	69.2 ± 0.2	6.22 ± 1.38	2.02 ± 0.06	32.4 ± 7.3	1.16 ± 0.06	0.48 ± 0.01	4.11 ± 0.23	38.4 ± 5.2	63.0 ± 7.7
<u>MTWF</u>	8.61 ± 0.06	60.9 ± 0.2	7.87 ± 0.31	3.01 ± 0.08	38.2 ± 1.8	2.11 ± 0.06	0.57 ± 0.01	2.70 ± 0.08	30.5 ± 4.2	65.1 ± 6.4
<u>MTWY</u>	8.62 ± 0.14	62.1 ± 0.5	14.8 ± 0.8	3.17 ± 0.03	21.5 ± 1.2	4.80 ± 0.07	0.30 ± 0.04	0.62 ± 0.08	37.2 ± 4.9	69.6 ± 7.0
<u>YDTN</u>	8.29 ± 0.06	59.6 ± 0.9	6.33 ± 1.23	5.93 ± 0.20	93.6 ± 18.4	2.85 ± 0.11	1.67 ± 0.16	5.86 ± 0.61	9.7 ± 1.8	56.0 ± 5.6
<u>YETN</u>	7.83 ± 0.06	60.7 ± 0.7	5.92 ± 0.05	7.57 ± 0.30	128 ± 5	3.24 ± 0.07	2.73 ± 0.02	8.43 ± 0.20	9.8 ± 1.2	55.1 ± 6.1

[0345]

	FcRn 亲和柱	DSF	Biacore pH 6.0						Biacore pH 7.4	
			hFcRn			rFcRn			hFcRn	rFcRn
变体	洗脱pH	T _m (°C)	缔合速率	解离速率	K _{D,app}	缔合速率	解离速率	K _{D,app}	稳态RU	稳态RU
<u>YTQN</u>	7.87 ± 0.06	63.1 ± 0.1	3.45 ± 0.29	9.60 ± 0.01	278 ± 23	2.55 ± 0.24	1.05 ± 0.63	4.11 ± 2.51	10.6 ± 1.2	49.2 ± 5.6
<u>YTTF</u>	8.56 ± 0.09	62.2 ± 0.1	12.7 ± 0.7	2.30 ± 0.01	18.0 ± 1.0	4.03 ± 0.06	0.12 ± 0.02	0.29 ± 0.04	43.8 ± 5.8	79.3 ± 9.9
<u>YTTY</u>	8.95 ± 0.02	62.0 ± 0.1	20.6 ± 0.6	1.71 ± 0.02	8.32 ± 0.2	5.40 ± 0.07	0.14 ± 0.04	0.26 ± 0.08	54.1 ± 7.1	67.9 ± 7.9
<u>YTNW</u>	8.14 ± 0.02	59.3 ± 0.2	4.83 ± 0.20	5.70 ± 0.03	118 ± 5	2.08 ± 0.07	1.09 ± 0.03	5.21 ± 0.22	15.9 ± 1.7	66.1 ± 7.1

[0346] 人和大鼠FcRn的绝大多数先导变体(图5A和5B,各种阴影的实线)比WT或基准变体具有显著更慢(>2倍)的缔合速率(表1)。N434F和N434Y突变是唯一展示出对两种FcRn的增加的缔合速率的变体。不受任何理论约束,由于与hFcRn的较慢缔合动力学,先导变体的表观结合亲和力通常弱于WT,这与rFcRn(图5C和图5D,表1)不同。对于rFcRn的亲和力弱于YTE(图5D,面向左下角的对角线,表2A)。不受任何理论约束,这些结果表明单个突变不足以使亲和力增强超过LS和YTE变体。将FcRn解离速率进行排序(由于变体与hFcRn的弱结合亲和力)揭示了对人和大鼠FcRn的降低的解离速率的子集:M252Y、N434F/P/Y、T256D/E和T307A/E/F/Q/W(表2A)。进一步关注这些变体的组合,以进一步改善Fc区的FcRn结合能力以超过基准变体。

[0347] 表2B中示出了先导变体的体外表征参数。

[0348] 表2B:先导变体的体外表征参数。

[0349]

mAb1	FcRn亲和柱	DSF	Biacore	Biacore pH 6.0		Biacore pH 7.4	
			FcγRIIIa V158	hFcRn	rFcRn	hFcRn	rFcRn

[0350]

变体	pH	T _m (°C)	亲和力 倍数变化	缔合速率	解离速率	K _{D,app}	K _{D,app}	稳态 RU	稳态 RU
WT	7.37	69.0 ± 0.2	1.00	16.2 ± 2.9	3.9 ± 0.4	2380 ± 470	207 ± 43	4.2 ± 0.9	13.0 ± 3.2
LS	8.29	68.5 ± 0.3	1.04 ± 0.04	1.9 ± 0.4	5.0 ± 0.1	272 ± 40	74 ± 9	18.3 ± 4.6	24.8 ± 4.8
YTE	8.14	61.2 ± 0.3	0.52 ± 0.03	1.4 ± 0.4	4.7 ± 0.1	342 ± 117	18 ± 2	13.2 ± 3.5	53.9 ± 1.2
M252Y	7.88	64.4 ± 0.2	0.46 ± 0.03	5.5 ± 1.8	1.4 ± 0.2	>3000	25 ± 3	8.6 ± 1.0	50.5 ± 5.6
N434F	8.30	67.8 ± 0.2	1.16 ± 0.08	35 ± 15	0.5 ± 0.1	165 ± 73	26 ± 13	22.2 ± 2.6	61.5 ± 6.5
N434Y	8.46	67.3 ± 0.5	1.41 ± 0.06	36 ± 10	0.5 ± 0.1	137 ± 33	23 ± 12	25.5 ± 2.9	66.0 ± 7.1
T256D	7.82	64.7 ± 0.2	0.92 ± 0.04	4.4 ± 1.7	2.5 ± 0.7	>3000	86 ± 27	5.8 ± 0.5	23.2 ± 2.8
T256E	7.63	66.3 ± 0.6	0.89 ± 0.04	3.9 ± 2.4	3.4 ± 0.2	>3000	113 ± 15	4.5 ± 0.4	17.0 ± 2.1
T307Q	7.86	70.3 ± 0.6	1.00 ± 0.04	4.0 ± 1.1	2.2 ± 0.2	>3000	58 ± 16	6.6 ± 0.7	31.3 ± 3.7
T307W	7.75	63.0 ± 0.5	0.97 ± 0.04	3.3 ± 0.8	2.8 ± 0.3	>3000	111 ± 32	5.6 ± 0.7	21.9 ± 2.8
DQ	7.92	67.9 ± 0.4	0.73 ± 0.03	3.8 ± 0.4	8.7 ± 0.1	232 ± 24	9.5 ± 1.7	10.7 ± 1.0	39.1 ± 4.5
DW	7.92	57.8 ± 0.4	0.89 ± 0.04	5.3 ± 0.1	8.9 ± 0.3	169 ± 8	8.2 ± 0.9	12.2 ± 1.3	42.1 ± 4.7
YD	8.29	59.6 ± 0.9	0.48 ± 0.02	6.3 ± 1.2	5.9 ± 0.20	94 ± 18	5.9 ± 0.6	9.7 ± 1.8	56.0 ± 5.6

[0351] 在表2B中,使用每列顶部的实验技术获得所有数据。FcRn亲和层析法、DSF和Fc γ RIIIIa结合一式三份 (n=3) 地进行。一式四份地获得与人和大鼠FcRn的FcRn结合动力学并独立地拟合。单位:DSF T_m (°C);Fc γ RIIIIa结合 (相对于WT的倍数变化),Biacore pH

6.0hFcRn缔合速率($\times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),解离速率($\times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$)和 $K_{D,app}$ ($\times 10^9 \text{ M}$);Biacore pH 6.0rFcRn $K_{D,app}$ ($\times 10^9 \text{ M}$);Biacore pH 7.4hFcRn和rFcRn稳态RU(RU)。

[0352] 实施例4:组合变体进一步降低FcRn结合解离速率

[0353] 多个先导突变位于单个位置(图14,黑色矩形),如T307和N434,其中分别鉴定出六个和三个突变,所述突变显示较慢的FcRn解离动力学。只有在这些位置处具有最慢的与hFcRn的FcRn解离速率的突变被用于产生组合变体。在这种情况下,使用混合引物PCR和位点定向诱变将T307Q、T307W、N434F和N434Y与M252Y、T256D和T256E混合以获得双重、三重和四重变体。组合文库总计由54种变体组成,包括七种先导单一、18种双重、20种三重、8种四重变体和WT抗体。这些变体的命名如下:野生型背景含有M252、T256、T307和N434,并且重新标记为MTTN。因此,三重变体YTQY含有M252Y、T307Q和N434Y突变,同时将WT苏氨酸维持在位置256。

[0354] 与单一突变一样,使用Biacore在pH 6.0下的FcRn结合动力学用于确定哪种组合变体具有改善的亲和力。图6A和图6B中显示了单一(夹杂两点的长划线)、双重(夹杂单点的长划线)、三重(长划线)和四重(短划线)中每一种的代表性FcRn结合动力学迹线,这是与WT(虚线)和对于它们各自物种FcRn具有最紧密亲和力的基准变体(hFcRn:LS(夹杂两点的长划线);rFcRn:YTE(实线))的比较。hFcRn缔合和解离速率(图6C)揭示两种单一、15种双重、18种三重和八种四重变体具有比LS变体增强的结合亲和力(图6C,虚线)。类似地,除了一种三重变体之外的所有组合具有比YTE更紧密的对rFcRn的亲和力(图6D,面向左下方的对角线)。在hFcRn的情况下,附加的增强FcRn的突变进一步增加了结合亲和力(图6C)。对hFcRn具有最紧密亲和力的五种组合都是四重变体(图6C,有方格的),其结合亲和力比野生型高约500倍。rFcRn没有发生类似的现象(图6D),因为具有最高亲和力的变体是双重变体(图6D,水平线)。三重(图6D,垂直线)和四重(图6D,有方格的)变体通常仅显示解离速率的略微降低(小于2倍),但也展示出降低的缔合速率(图6D)。不受任何理论的约束,这些结果表明关于用rFcRn已经达到的FcRn表观结合亲和力可能存在下限(约0.5nM),而hFcRn不存在(图6B)。总计超过40种组合变体具有比基准变体更紧密的亲和力,并且需要进一步表征以选择对于体内研究具有有利特性的组合。

[0355] 实施例5:在生理pH下组合变体保持显著的结合

[0356] 由于在pH 6.0下显著改善的FcRn亲和力,使用FcRn亲和层析法和在pH7.4下Biacore稳态测量研究了对pH依赖性的影响。FcRn亲和层析法使用线性pH梯度直接测量突变对pH依赖性的扰动。具有弱FcRn结合的变体H435A及H310A/H435Q无论pH如何都不与柱结合(图8A)。WT在生理pH($\text{pH } 7.37 \pm 0.05$)附近洗脱,而AAA、LS和YTE需要较高的pH(表2B)。所有组合变体和七种先导单一变体需要比WT更高的pH从亲和柱洗脱(图8A和图8C)。N434F/Y变体在比LS(表2B)更高的pH下洗脱,其不受科学理论的约束,表明这些变体(单独和组合)破坏了pH依赖性。代表性层析图显示,随着突变数目洗脱pH明显转变至更高(图9A和图9B)。洗脱pH与hFcRn解离速率之间的强相关性($R^2=0.94$)(图9C)表明在pH 6.0下较慢的FcRn解离速率直接促成FcRn变体的洗脱pH增加。

[0357] 使用Biacore在pH 7.4下进行FcRn结合动力学实验,以测量生理条件下的残基结合活性。稳态RU用作残基FcRn结合亲和力的度量,因为一些变体显示出不可靠的动力学并且在该pH下很少甚至没有结合。图7A和图7B中示出了单一(夹杂两点的长划线)、双重(夹杂

单点的长划线)、三重(长划线)和四重(短划线)变体的代表性动力学迹线,其与LS(图7A,实线)和YTE(图7B,实线)比较。这两种变体在pH 7.4下分别展示出对人和大鼠FcRn的最大残基结合。与WT(4.3 ± 1.0 RU)相比,大多数先导单一变体具有略微升高的FcRn结合,但是其小于AAA(13.1 ± 1.7 RU)、LS(18.5 ± 2.6 RU)和YTE(13.1 ± 1.6 RU),N434F/Y突变除外(表2A和表2B)。组合变体在pH 7.4下还具有显著的对两个物种的FcRn的残基结合,其程度甚至比N434F/Y更大(图7A和图7B)。不受任何理论的约束,体内研究的理想候选物是在低pH下具有增加的FcRn结合但在升高的pH下以与WT类似的方式保持低水平的结合的变体(如AAA、LS和YTE变体)。在图7C和图7D所示的图中,这些组合将占据左下象限,该左下象限分别由LS和YTE变体在每种pH下对人和大鼠FcRn的亲合力指定。

[0358] 实施例6:FcRn亲和层析法

[0359] 组合变体展示出在pH 6.0下的表观结合亲和力与在pH 7.4下的稳态RU之间的中等的正相关性($hFcRn: R^2 = 0.69$, $rFcRn: R^2 = 0.71$) (图7C和图7D)。不受任何理论的约束,这些结果表明在pH 6.0下更高的亲和力通常转化为在pH 7.4下更大的残基FcRn结合。这些变体可以在血流中保持与FcRn结合并具有短的血清半衰期和/或促进其清除,这类似于高FcRn亲和力abdeg突变(参见例如Swiercz等人2014同事;和Vaccaro等人2005同上)。由于抗体-FcRn相互作用是pH依赖性的并且仅在低pH($< pH 6.5$)下发生,因此饱和突变可通过疏水性或电荷来源的贡献增强相互作用,所述贡献可能破坏关键组氨酸残基的去质子化(图1B,如图所示)并且在生理pH下弱化该相互作用。

[0360] FcRn亲和层析法使用线性pH梯度直接测量FcRn相互作用pH依赖性的扰动(参见例如Schlothauer等人2013同上)。采用AAA、LS、YTE、H435A和H310A/H435Q变体的FcRn亲和层析法揭示H435A(图8A,浅灰色实线)和H310A/H435Q(图8A,AQ,深灰色实线)甚至在pH 5.5下不与FcRn结合,并在流出物中洗脱。野生型抗体在生理pH($pH 7.37 \pm 0.05$)附近洗脱,而AAA、LS和YTE(通过Octet(图2A-图2D)和Biacore(图3)具有比野生型更慢的解离速率和更紧密的FcRn结合亲和力)需要相当更高的pH以从柱解离(AAA: 7.94 ± 0.06 ;LS: 8.29 ± 0.03 ;YTE: 8.14 ± 0.03)。洗脱曲线揭示,组合文库中的所有变体都需要比野生型更高的pH以从亲和柱洗脱。在图9A中示出了单一(夹杂两点的长划线)、双重(夹杂单点的长划线)、三重(长划线)和四重(短划线)变体的平均洗脱pH下的代表性层析图。与WT相比,七种先导单一变体需要更高的pH以从柱解离(图10A,表3),而具有对于hFcRn的类似野生型动力学的那些变体(K288D/N,Y436H/H/W)全部在与野生型类似的pH下洗脱。

[0361] 表3:先导抗体变体的体外表征参数

[0362]

变体	FcRn 亲和柱	DSF T _m (°C)	Biacore pH 6.0					
			hFcRn			rFcRn		
			结合速率 ($\times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	解离速率 ($\times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$)	K _{D,app} ($\times 10^9 \text{ M}$)	结合速率 ($\times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	解离速率 ($\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$)	K _{D,app} ($\times 10^9 \text{ M}$)
WT	7.37	69.0 ± 0.2	16.2 ± 2.9	3.9 ± 0.4	2380 ± 7.3	7.3 ± 1.0	15.2 ± 0.2	207 ± 43

[0363]

	FcRn 亲和柱	DSF	Biacore pH 6.0					
			hFcRn			rFcRn		
变体	pH	T _m (°C)	缔合速率 ($\times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	解离速率 ($\times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$)	K _{D,app} ($\times 10^9 \text{ M}$)	缔合速率 ($\times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	解离速率 ($\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$)	K _{D,app} ($\times 10^9 \text{ M}$)
					470			
E380C	7.18	64.7 ± 0.5	1.7 ± 0.4	4.6 ± 1.5	> 10,000	1.7 ± 0.25	106 ± 1	6310 ± 880
K288D	7.33	65.8 ± 0.1	3.3 ± 1.1	5.1 ± 0.8	> 10,000	6.6 ± 3.0	8.4 ± 0.6	149 ± 63
K288N	7.39	66.7 ± 0.3	4.1 ± 1.4	4.5 ± 0.3	> 10,000	6.4 ± 2.8	10.7 ± 0.9	190 ± 73
M252Y	7.88	64.4 ± 0.2	5.5 ± 1.8	1.4 ± 0.2	3100 ± 1500	10.6 ± 3.1	2.6 ± 0.6	25 ± 3
N434F	8.30	67.8 ± 0.2	35 ± 15	0.5 ± 0.1	165 ± 73	12.6 ± 1.4	3.4 ± 1.8	26 ± 13
N434P	7.56	63.6 ± 0.5	2.4 ± 0.5	3.4 ± 1.1	> 10,000	3.4 ± 0.1	6.7 ± 0.2	194 ± 9
N434Y	8.46	67.3 ± 0.5	36 ± 10	0.5 ± 0.1	137 ± 33	14.5 ± 1.8	3.5 ± 1.9	23 ± 12
T256D	7.82	64.7 ± 0.2	4.4 ± 1.7	2.5 ± 0.7	6700 ± 3540	6.1 ± 1.8	4.8 ± 0.1	86 ± 27
T256E	7.63	66.3 ± 0.6	3.9 ± 2.4	3.4 ± 0.2	> 10,000	6.3 ± 1.6	6.9 ± 1.0	113 ± 15
T307A	7.61	68.0 ± 0.4	2.9 ± 0.7	2.9 ± 0.5	> 10,000	6.1 ± 2.7	7.1 ± 0.7	132 ± 48
T307E	7.58	70.2 ± 0.5	4.4 ± 1.6	3.0 ± 0.4	8130 ± 5070	5.6 ± 2.8	6.0 ± 0.2	141 ± 65
T307F	7.61	70.2 ± 0.3	2.7 ± 0.8	2.9 ± 0.1	> 10,000	5.7 ± 2.8	6.2 ± 0.1	131 ± 63
T307M	7.40	70.0 ± 0.4	4.1 ± 0.8	3.9 ± 0.3	> 10,000	6.8 ± 2.3	17.1 ± 4.0	279 ± 140
T307Q	7.86	70.3 ± 0.6	4.0 ± 1.1	2.2 ± 0.2	5720 ± 1530	7.4 ± 2.2	4.0 ± 0.3	58 ± 16
T307W	7.75	63.0 ± 0.5	3.3 ± 0.8	2.8 ± 0.3	8740 ± 2440	7.1 ± 2.3	7.4 ± 0.4	111 ± 32
Y436H	7.33	68.7 ± 0.3	2.6 ± 0.8	6.1 ± 1.0	> 10,000	5.1 ± 0.1	7.3 ± 0.9	131 ± 9
Y436N	7.22	65.8 ± 0.5	4.6 ± 2.4	7.4 ± 3.3	> 10,000	10.1 ± 4.9	20.3 ± 3.1	233 ± 86
Y436W	7.39	68.6 ± 0.7	2.8 ± 1.9	4.6 ± 0.9	> 10,000	3.4 ± 2.2	23.7 ± 7.7	1140 ±

[0364]	变体	FcRn 亲和柱 pH	DSF T _m (°C)	Biacore pH 6.0				
				hFcRn			rFcRn	
				缔合速率 ($\times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	解离速率 ($\times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$)	K _{D,app} ($\times 10^9 \text{ M}$)	缔合速率 ($\times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	解离速率 ($\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$)
								950

[0365] 使用每列顶部的实验技术获得所有数据。通过FcRn亲和层析法一式三份 (n=3) 地测定洗脱pH, 并且DSF一式三份 (n=3) 地探测热稳定性。采用一系列抗体浓度从Biacore获得对人和大鼠FcRn的FcRn结合动力学 (n=4), 并独立地拟合。每次测量的单位如下: 洗脱pH (无单位); DSF T_m (°C); Biacore pH6.0hFcRn缔合速率 ($\times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)、解离速率 ($\times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$) 和K_{D,app} ($\times 10^9 \text{ M}$); Biacore pH 6.0rFcRn缔合速率 ($\times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)、解离速率 ($\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) 和K_{D,app} ($\times 10^9 \text{ M}$)。

[0366] N434F/Y变体均在比LS变体更高的pH下洗脱 (N434F: 8.30 ± 0.05 ; N434Y: 8.46 ± 0.02) 并且在pH 7.4下显示出相当大的FcRn结合 (表4)。这些结果表明单独的这些变体可以破坏pH依赖性。通常, 平均洗脱pH随着增强FcRn结合的突变数目的增加而增加 (图9B)。不受任何理论的约束, 与hFcRn解离速率相比显示出与洗脱pH的强相关性 ($R^2=0.94$) (图9C) 表明相互作用的pH依赖性的破坏直接促成在pH 6.0下对组合文库观察到的较慢的FcRn解离速率。

[0367] 实施例7: 热稳定性

[0368] 具有低热力学稳定性的大多数蛋白质 (包括抗体) 具有增加的错折叠和聚集倾向并且将会限制或阻碍作为新型治疗剂的活性、功效和潜力。使用DSF测定每种变体的热稳定性, 并将报告的溶解温度 (T_m) 定义为Sypro Orange荧光强度曲线中的第一次转变的中点。与T_m为 $69.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 的WT相比, LS变体类似WT ($68.5 \pm 0.3^\circ\text{C}$), 并且AAA和YTE热不稳定, 差约 8°C (AAA: $61.3 \pm 0.6^\circ\text{C}$; YTE: $61.2 \pm 0.3^\circ\text{C}$) (图8B、图9B和图10B; 以及表2B、表3和表4)。与T_m为 $69.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 的WT和LS相比, 通过DSF, AAA和YTE变体具有较低的热稳定性, 差约 8°C 。

[0369] 表4: 基准和先导组合的体外表征参数

	FcRn 亲和 柱	DSF	Biacore pH 6.0						Biacore pH 7.4		FcγRIIIa V158
			hFcRn			rFcRn			hFcRn	rFcRn	
变体	pH	T _m (°C)	缔合 速率 ($\times 10^4$ M ⁻¹ s ⁻¹)	解离 速率 ($\times 10^{-1}$ s ⁻¹)	K _{D,app} ($\times 10^9$ M)	缔合 速率 ($\times 10^4$ M ⁻¹ s ⁻¹)	解离 速率 ($\times 10^{-3}$ s ⁻¹)	K _{D,app} ($\times 10^9$ M)	稳态 RU	稳态 RU	K _{D,app} ($\times 10^9$ M)
WT	7.37	69.0 ± 0.2	16.2 ± 2.9	3.9 ± 0.4	2380 ± 470	7.3 ± 1.0	15.2 ± 0.2	207 ± 43	4.2 ± 0.9	13.0 ± 3.2	467 ± 99
AAA	7.94	61.3 ± 0.6	8.4 ± 1.8	1.4 ± 0.1	1780 ± 380	15.7 ± 3.3	11.7 ± 1.1	77 ± 18	13.9 ± 3.1	23.6 ± 4.9	450 ± 19
LS	8.29	68.5 ± 0.3	19.3 ± 3.5	0.5 ± 0.1	272 ± 40	9.1 ± 1.6	6.6 ± 0.4	74 ± 9	18.3 ± 4.6	24.8 ± 4.8	369 ± 19
YTE	8.14	61.2 ± 0.3	14.3 ± 4.4	0.5 ± 0.1	342 ± 117	6.5 ± 0.5	1.2 ± 0.2	18 ± 2	13.2 ± 3.5	53.9 ± 1.2	1040 ± 160
<u>MDQN</u>	7.92	67.9 ± 0.4	3.8 ± 0.4	8.7 ± 0.1	232 ± 24	1.3 ± 0.2	1.3 ± 0.1	9.5 ± 1.7	10.7 ± 1.0	39.1 ± 4.5	600 ± 4
<u>MDWN</u>	7.92	57.8 ± 0.4	5.3 ± 0.1	8.9 ± 0.3	169 ± 8	1.6 ± 0.1	1.3 ± 0.1	8.2 ± 0.9	12.2 ± 1.3	42.1 ± 4.7	512 ± 30
<u>YDTN</u>	8.29	59.6 ± 0.9	6.3 ± 1.2	5.9 ± 0.20	94 ± 18	2.9 ± 0.1	1.7 ± 0.2	5.9 ± 0.6	9.7 ± 1.8	56.0 ± 5.6	1060 ± 60
<u>YETN</u>	7.83	60.7 ± 0.7	5.9 ± 0.1	7.6 ± 0.3	128 ± 5	3.2 ± 0.1	2.7 ± 0.1	8.4 ± 0.2	9.8 ± 1.2	55.1 ± 6.1	878 ± 101
<u>YTWN</u>	8.14	59.3 ± 0.2	4.8 ± 0.2	5.7 ± 0.1	118 ± 5	2.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	5.2 ± 0.2	15.9 ± 1.7	66.1 ± 7.1	896 ± 53
<u>YDQN</u>	8.51	60.5 ± 0.1	2.5 ± 0.2	2.8 ± 0.1	115 ± 7	0.5 ± 0.1	0.3 ± 0.1	5.1 ± 0.3	19.8 ± 2.7	65.2 ± 6.6	1060 ± 50
<u>YEQN</u>	8.12	61.9 ± 1.9	1.9 ± 4.1	±	218 ± 6	0.5 ± 0.5	0.4 ± 0.4	7.8 ± 7.8	15.2 ± 15.2	61.8 ± 61.8	1620 ± 210
[0371]											
		0.8	0.1	0.1		0.1	0.1	0.4	2.1	6.4	

[0371]

[0372] 引入至野生型骨架中的突变以粗体和下划线表示。使用每列顶部所示的实验技术获得所有数据。一式三份 ($n=3$) 地测定洗脱pH和 T_m 。从Biacore获得在pH 6.0下对人和大鼠FcRn的FcRn结合动力学 ($n=4$) 并独立地拟合。使用Biacore以单一抗体浓度一式三份地测量pH 7.4下的稳态FcRn结合反应。使用Biacore从一系列抗体浓度一式两份地测定Fc γ RIIIa结合亲和力。每次测量的单位如下: 洗脱pH(无单位); DSF T_m ($^{\circ}\text{C}$); Biacore pH 6.0hFcRn缔合速率 ($\times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)、解离速率 ($\times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$) 和 $K_{D,app}$ ($\times 10^9 \text{ M}$); Biacore pH 6.0rFcRn缔合速率 ($\times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)、解离速率 ($\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) 和 $K_{D,app}$ ($\times 10^9 \text{ M}$); Biacore pH 7.4稳态结合响应(RU)和Fc γ RIIIa $K_{D,app}$ ($\times 10^9 \text{ M}$)。

[0373] 与野生型相比, 18种先导饱和变体中的12种具有降低的 T_m , 并且若干种T307突变体 (T307E/F/M/Q) 显示出轻微的稳定作用 (表4)。用于组合的七种单一变体 (图10B和表4) 中没有一种相对于YTE显著不稳定 (图8B和表5)。与单一变体 (图9D, 白色圆圈) 相比, 添加双重 (图9D, 水平线)、三重 (图9D, 垂直线) 和四重 (图9D, 有方格的) 变体导致总体热稳定性进一步降低。多种变体显示出低于AAA或YTE ($61.2 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$) 的 T_m , 其中>60%的这些变体含有T307W。四重变体 (图9D, 有方格的) 显示出溶解温度的明显双峰分布, 其中含有T307Q的组合比具有T307W的那些组合具有高大约 6°C 的热稳定性 (图9D)。

[0374] 实施例8: Fc变体改变与Fc γ RIIIa的结合相互作用

[0375] 除了与FcRn的相互作用外, Fc区铰链和 C_H2 结构域负责与其他Fc受体 (包括Fc γ RIIIa) 的相互作用。由于用于构建组合饱和文库的七种单一变体中的五种位于 C_H2 结构域中, 尽管它们的位置远离相互作用界面, 但是与这些受体相互作用的能力相对于野生型可能受到损害。使用Biacore以与pH 7.4下的FcRn结合类似的方式测量Fc γ RIIIa结合, 揭示YTE (图11A, 深灰色) 变体显示出与野生型 (图11A, 黑色) 相比结合反应降低约50%。不受任何理论的约束, YTE的降低的Fc γ RIIIa结合是M252Y突变 (图11B, 最低的白色圆圈) 的结果, 因为单独的该变体具有对该受体的显著降低的亲和力。其他单一突变不具有这种降低的亲和力 (图11B, 白色圆圈), 并且单独的N434F/Y变体使结合增强16%-40%。这些效果转移到它们相应组合的大多数但不是全部。例如, 含有M252Y的组合在Fc γ RIIIa结合方面具有17%至72%的降低 (表5)。

[0376] 表5: 条件培养基中饱和文库变体的浓度

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

[0378] 一个变体MDQF (图11B, 三重变体类别中最高的) 显示出在Fc γ RIIIIa结合方面140%的显著增加。因此, 组合饱和文库提供了具有多种Fc受体功能的变体, 所述变体可用于定制具有特定效应子功能的治疗性抗体。

[0379] 图11C示出了与WT和YTE变体相比七种先导单一变体的Fc γ RIIIIa结合反应的箱形图。

[0380] 实施例9: 七种先导组合平衡FcRn相互作用的pH依赖性

[0381] 不受任何理论的约束, 用于进一步体内研究的候选变体占据图7C和图7D中所示的图的左下象限。七种变体满足hFcRn的这些标准并且包含五种双重和两种三重组 (MDQN、

MDWN、YDTN、YETN、YTWN、YDQN和YEQN)并且不包含N434位置处的突变(表3)。这些组合中的每一种从FcRn亲和柱在AAA (pH 7.94 ± 0.06) 与LS (pH 8.29 ± 0.03) 之间洗脱,其中YDQN在 8.51 ± 0.14 的最高pH下洗脱(图12A,表5),这表明对pH依赖性仅有轻微的扰动并且在pH 7.4下具有更大的残基结合(表2A)。其中一种变体(MDQN)具有类似野生型的热稳定性,并且六种变体与YTE变体相比具有类似或降低的 T_m (图12B,表4)。在Fc γ RIIIa结合测定中,五种组合变体显示出与YTE类似的降低(表4)。对单一突变的进一步研究揭示,M252Y显著地影响Fc γ RIIIa结合,并且不受任何理论的约束,该影响转化至具有该突变的组合。剩余的六种单一突变类似WT或具有与该受体的略微改善的结合。

[0382] 基于它们的FcRn结合特性、热稳定性和Fc γ RIIIa结合,选择三种组合变体用于进一步研究。DQ (T256D/T307Q)、DW (T256D/T307W) 和YD (M252Y/T256D) 各自提供最佳的FcRn结合特性(表2B)作为LS变体(图12E)。每种变体提供不同范围的热稳定性和Fc γ RIIIa结合特性(图12F和图12G,表2B),其提供了一系列功能。图12H是同质桥接RF的图。

[0383] 分别与LS(图13A,粗长划线)和YTE变体(图13B,粗长划线)相比,在pH6.0下对人和大鼠FcRn的表观结合亲和力的增强在缔合与解离速率之间折中(图13A和图13B,表4)。通常,具有更快解离速率的组合也具有更快的缔合速率,反之亦然。在人与大鼠FcRn之间维持这种观察(表4)。此外,所有这些变体在pH 7.4下对于hFcRn具有比LS变体(图13C,粗长划线)更低的稳态反应。这些结果与rFcRn不一致,因为与YTE相比,在pH 7.4下五种含有M252Y的变体YDTN、YETN、YTWN、YDQN和YEQN具有升高的FcRn结合(图13,表5)。MDQN和MDWN变体是人与大鼠FcRn之间交叉反应的唯一组合。此外,这两种变体不会以与含有M252Y的变体类似的程度扰乱与Fc γ RIIIa的相互作用(图12C和图12D以及表5;MDQN: 600 ± 4 nM;MDWN: 512 ± 30 nM;WT: 467 ± 99 nM)。因此,关键FcRn相互作用位置处的饱和和组合诱变已经导致先导变体的鉴定,所述先导变体平衡了相互作用的pH依赖性,维持了与Fc受体的功能,可以增强体内FcRn功能,并且可以延长治疗性抗体的血清半衰期。

[0384] 实施例10:先导组合变体的类风湿因子结合特征

[0385] 研究了先导变体的等电点和RF结合,因为这些突变可能改变抗体表面电荷和免疫原性。已经认为更多的酸性抗体可延长抗体药代动力学。与WT和LS对照相比,由于T256D取代,所有三种先导导致pI降低约0.2pH单位。由于重叠的相互作用界面,增强FcRn的突变可以同时改变与宿主抗体的结合,如类风湿因子(RF)。同质桥接ELISA适用于测量先导变体的RF结合的变化。有趣的是,与WT相比,LS和YTE显示完全相反的RF结合的改变(图12H)。LS显著增加RF结合,而YTE显示显著降低($p < 0.001$)。YD($p < 0.001$)和DW($p < 0.01$)也显著降低RF结合,而DQ产生与WT类似的反应。不受任何理论的约束,这些结果表明DQ、DW和YD可提供与LS相比的免疫原性优势。YD、DW和DQ变体代表一系列关键抗体特征,所述特征可以与相对于基准YTE和LS变体改善的FcRn结合特性结合使用。

[0386] 实施例11:先导组合变体可转移至其他抗体

[0387] 使用CM5传感器芯片开发了新的结合测定,如图15A所示。结合测定包括将链霉亲和素固定在CM5传感器芯片上以捕获生物素化FcRn以达到约30RU(根据需要补充)的步骤。在pH 6.0和7.4测量抗体结合动力学以及在pH 8.5下测量再生。图15B和图15C示出了使用新的结合测定分别进行FcRn的直接固定和生物素化FcRn的链霉亲和素捕获。

[0388] 抗体2在pH 6.0下的FcRn结合:在小鼠FcRn的情况下,先导抗体2变体显示出比LS

变体(划线)和野生型(黑色)更慢的解离速率(图16A)。对于人FcRn,先导变体全部具有更快的缔合速率但具有与LS(划线)类似的解离速率(图16B)。

[0389] 抗体2在pH 7.4下的FcRn结合:与LS(划线)相比,所有先导变体在pH 7.4下显示出降低的人FcRn结合(图17A)。与抗体1背景一样,在pH 7.4下DW(MDWN)和DQ(MDQN)变体也显示出与小鼠(大鼠)FcRn的更低残基结合(图17B)。

[0390] 与LS相比,先导变体在pH 6.0下保持更高的结合亲和力并且在pH 7.4下保持更低的残基结合(图18)。重要的是,发现在对FcRn结合影响很小的情况下变体可在不同IgG1背景之间转移。如图19所示,无论背景如何,LS具有类似的洗脱pH。抗体2背景中的WT、DQ和DW显示出比在抗体1背景中更高的洗脱pH,这可能是在抗体2背景中pH 6.0下更紧密结合的结果。

[0391] 抗体2背景变体全部显示出略微增加的热稳定性,如图20所示。

[0392] 如图21所示,类似于抗体1背景,YD(YDTN)显示Fc γ RIIIa结合反应(左)和亲和力(右)的降低。DQ(浅灰色)和DW(深灰色)显示在抗体2背景中与WT(黑色)类似的Fc γ RIIIa结合特性。对LS的Fc γ RIIIa结合的影响在抗体1与抗体2之间是一致的。

[0393] 因此,与抗体1背景中的相同先导变体相比,抗体2背景中的先导变体不显著影响FcRn结合、pH依赖性、热稳定性或Fc γ RIIIa结合。

[0394] 在一个实施方案中,将DQ(T256D/T307Q)、DW(T256D/T307W)和YD(M252Y/T256D)变体并入另外的IgG1抗体和重组Fc片段中:mAb2识别来自mAb1的不同抗原,并且Ab3是Fc片段。在每种情况下,除了洗脱pH、热稳定性和Fc γ RIIIa结合亲和力之外,pH依赖性FcRn结合动力学(图22)也高度类似(表2B和表6)。不受任何理论的约束,这些结果表明DQ、DW和YD变体向由Fc结构域组成的蛋白质赋予其改善的FcRn结合特性。

[0395] 表6:条件培养基中饱和文库变体的浓度

		FcRn 亲和 柱	DSF	Biacore	Biacore pH 6.0			Biacore pH 7.4		
				Fc γ RIIIa V158	hFcRn	cFcRn	mFcRn	hFcRn	cFcRn	mFcRn
		pH	T _m	亲和力倍 数变化	*K _{D,app}	*K _{D,app}	*K _{D,app}	稳态 RU	稳态 RU	稳态 RU
[0396]	Ab 变体									
	2 WT	7.61	69.3 ± 0.1	1.0	678 ± 97	1440 ± 360	107 ± 9	1.3 ± 0.2	1.3 ± 0.3	92 ± 8
	2 LS	8.32	69.0 ± 0.1	1.23 ± 0.02	113 ± 22	210 ± 43	20 ± 9	44 ± 4	38 ± 6	285 ± 8

[0397]

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

[0398] 实施例12:先导变体延长体内血浆抗体消除半衰期

[0399] 检测DQ、DW和YD变体与WT和LS对照相比的药代动力学(PK)对食蟹猴和hFcRn转基因小鼠(品系Tg32)的抗体循环半衰期的影响(参见例如Avery等人Mabs (2016) 8:1064-1078)。与食蟹猴FcRn的FcRn结合研究揭示了与hFcRn类似的结合亲和力(图23A至图23B;表6)。将每只动物静脉内注射WT、LS、DQ、DW或YD变体,并通过质谱法定量抗体浓度以确定猴(图24A)和hFcRn转基因小鼠(图24B)中的清除率和血清半衰期。从抗体浓度的非隔室模型获得清除率和血清半衰期作为时间函数。在食蟹猴和小鼠二者中,所有三种先导变体和LS显示出与WT相比显著降低的清除率($p < 0.001$)。对于猴和小鼠,WT抗体的血浆半衰期分别为 9.9 ± 0.5 天和 11.7 天。此外,与两种物种中的野生型相比,鉴定的LS基准和变体显示消除半衰期的显著增加(在猴和小鼠中分别增加2.5倍和1.7倍)(表7)。与LS基准相比,DQ、DW和YD显示出类似的半衰期延长(表7)。本文通过饱和诱变鉴定的DQ、DW和YD突变表明,在小鼠和非人灵长类动物模型中,血浆半衰期与其WT对应物相比显著延长。

[0400] 表7:基准和先导变体的清除率和血清半衰期

[0401]

mAb2	食蟹猴(n = 3)				hFcRn Tg32小鼠(n = 6)			
	清除率 (mL 天 ⁻¹ kg ⁻¹)	t _{1/2} (天)			清除率 (mL 天 ⁻¹ kg ⁻¹)	t _{1/2} (天)		
变体	平均值 ±SD	平均值 ±SD	相 对 于 WT 倍 数	相 对 于 LS 倍 数	平均 值	平均 值	相 对 于 WT 倍 数	相 对 于LS 倍 数
WT	5.6 ± 0.5	9.9 ± 0.5	1.0	0.4	7.4	11.7	1.0	0.6
LS	2.1**	22.5 ± 2.4	2.3	1.0	4.6	19.5	1.7	1.0
DQ	3.4*	20.8	2.1	0.9	3.2	24.5	2.1	1.3
DW	2.5 ± 0.2	20.4 ± 0.9	2.1	0.9	3.5	20.1	1.7	1.0
YD	2.4 ± 0.3	23.5 ± 2.1	2.4	1.0	4.5	17.5	1.5	0.9

[0402] 在表7中,使用mAb2测定清除率和血浆半衰期。每个清除率和半衰期都是食蟹猴情况下n=3的平均值和来自n=6的hFcRn转基因小鼠库的单个评估。相对于WT的倍数和相对于LS的倍数分别显示与WT和LS相比血清半衰期的相对改善。*n=2由于ADA形成,**n=2由于部分皮下施用途径

[0403] 实施例13:在pH 6.0和pH 7.4下具有增强的FcRn结合的组合变体

[0404] 基于如实施例2中所述的Octet筛选(基于BLI的筛选),生成多种单一、双重、三重和四重变体,并评估它们在pH 6.0和pH 7.4下与FcRn的结合(表8)。

[0405] 表8:变体的结合亲和力(pH 6.0)和稳态结合(pH 7.4)

[0406]

变体	类型	结合亲和力(M ⁻¹)	结合亲和力错误(M ⁻¹)	稳态结合, pH 7.4 (RU)	稳态结合错误, pH 7.4 (RU)	比率 (pH 6.0/pH 7.4)	比率 (pH 6.0/pH 7.4)
WT (MTTN)	基准	420000	83000	4.2	0.9	100000	1.00E-05
AAA	基准	562000	120000	13.9	3.1	40432	2.47E-05
LS	基准	3680000	541000	18.3	4.6	201093	4.97E-06
YTE	基准	2920000	1000000	13.2	3.5	221212	4.52E-06
MDQN	双重	4310000	446000	10.7	1	402804	2.48E-06
MDTF	双重	33400000	2240000	29.2	4	1143836	8.74E-07
MDTY	双重	64100000	2050000	37.1	5	1727763	5.79E-07
MDWN	双重	5920000	280000	12.2	1.3	485246	2.06E-06
MEQN	双重	2000000	24100	5.8	0.6	344828	2.90E-06
METF	双重	12800000	3350000	23.3	3.2	549356	1.82E-

[0407]

							06
METY	双重	16000000	4130000	26.8	3.7	597015	1.68E-06
MEWN	双重	3100000	259000	7.7	0.9	402597	2.48E-06
MTQF	双重	23300000	4290000	34.2	4.6	681287	1.47E-06
MTQY	双重	30900000	6950000	38.4	5.2	804688	1.24E-06
MTWF	双重	26200000	1230000	30.5	4.2	859016	1.16E-06
MTWY	双重	46500000	2600000	37.2	4.9	1250000	8.00E-07
YDTN	双重	10700000	2100000	9.7	1.8	1103093	9.07E-07
YETN	双重	7810000	305000	9.8	1.2	796939	1.25E-06
YTQN	双重	3600000	298000	10.6	1.2	339623	2.94E-06
YTTF	双重	55600000	3090000	43.8	5.8	1269406	7.88E-07
YTTY	双重	120000000	2890000	54.1	7.1	2218115	4.51E-07
YTWN	双重	8470000	359000	15.9	1.7	532704	1.88E-06
MDQF	三重	6620000	1840000	55.3	11.2	119711	8.35E-06
MDQY	三重	36900000	4360000	49.4	6.7	746964	1.34E-06
MDWF	三重	28100000	2840000	47.1	6.4	596603	1.68E-06

[0408]

MDWY	三重	84000000	9890000	59	7.9	142372 9	7.02E- 07
MEQF	三重	142000	6490	8.6	0.8	16512	6.06E- 05
MEQY	三重	23800000	2660000	38.6	5.2	616580	1.62E- 06
MEWF	三重	56200000	8520000	41.9	5.6	134128 9	7.46E- 07
MEWY	三重	70400000	7440000	46.6	6.3	151073 0	6.62E- 07
YDQN	三重	8700000	560000	19.8	2.7	439394	2.28E- 06
YDTF	三重	29600000	2540000	57.7	7.7	512998	1.95E- 06
YDTY	三重	90100000	812000	65.4	8.9	137767 6	7.26E- 07
YDWN	三重	10100000	1540000	25.9	3.6	389961	2.56E- 06
YEQN	三重	4590000	126000	15.2	2.1	301974	3.31E- 06
YETY	三重	33400000	3580000	22.6	2.9	147787 6	6.77E- 07
YEWN	三重	6410000	904000	69.6	9.3	92098	1.09E- 05
YTQF	三重	56500000	1280000	59.9	8	943239	1.06E- 06
YTQY	三重	63300000	4010000	71.5	9.6	885315	1.13E- 06
YTWF	三重	65400000	2990000	62.6	8.2	104472 8	9.57E- 07
YTWY	三重	106000000	10600000	75.1	9.8	141145	7.08E-

[0409]

						1	07
YDQF	四重	111000000	4320000	68.6	10	161807 6	6.18E- 07
YDQY	四重	235000000	6060000	80.2	12	293017 5	3.41E- 07
YDWF	四重	166000000	3050000	71.8	9.9	231197 8	4.33E- 07
YDWY	四重	266000000	19100000	88.5	11.7	300565 0	3.33E- 07

[0410] 在表8中,示出了对于多种单一、双重、三重和四重突变体以及基准变体 (AAA、LS、YTE) 在pH 6.0下与FcRn的结合亲和力和在pH 7.4下与FcRn的稳态结合。

[0411] 将这些值绘制在图25中。图25示出了pH 6.0下的结合亲和力和pH 7.4下RU的比较。如图所示,基准变体LS在pH 6.0下具有最紧密的结合亲和力,并且测试的基准变体 (AAA、LS、YTE) 在pH 7.4下具有最大残基结合。

[0412] 确定图25中所示的若干种组合变体在pH 6.0和pH 7.4下显示出增强的FcRn结合亲和力。为了研究在pH 6.0和pH 7.4下任何组合变体是否显示出比MST-HN变体 (在本文中称为“YTEKF基准”,其含有Met252、Ser254、Thr256、His433和Asn434到Tyr252、Thr254、Glu256、Lys433和Phe434的突变) 更紧密的结合,进行以下方法。经由生物素CAPture方法进行生物素化人、食蟹猴和小鼠FcRn的捕获 (参见图26的示意图)。对于pH 6.0,一式两份地进行从1000nM的浓度系列 (5pts)。对于pH 7.4,一式三份地进行单一浓度 (1000nM) 注射 (每种FcRn的捕获水平增加10倍以观察在该pH下的结合)。缔合:180sec;解离:300sec。

[0413] 图27示出了在pH 6.0下YTEKF基准和多种组合变体的人FcRn结合动力学。如图27所示,与野生型 (WT) 相比,所有检测的变体都显示出对人FcRn的两个数量级的更紧密的亲和力。

[0414] 图28A和图28B示出了在pH 6.0 (图28A) 和pH 7.4 (图28B) 下组合变体与YTEKF基准相比的FcRn结合动力学。在图28A中,大多数变体显示出比YTEKF基准更慢的解离速率,并且具有类似或更慢的缔合速率。在图28B中,YTEKF在pH 7.4下显示出显著的结合,并且四种变体显示出更高的残基结合。

[0415] 表9:选择变体的结合亲和力 (pH 6.0) 和稳态结合 (pH 7.4)

[0416]

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

[0417] 在表9中,示出了选择组合变体以及YTEKF基准和WT在pH 6.0下与FcRn的结合亲和力和在pH 7.4下与FcRn的稳态结合。

[0418] 图29示出了如表9所示的选择组合变体在pH 6.0下的结合亲和力和在pH7.4下的RU的比较。如表9和图29所示,发现与YTEKF基准相比,四种四重变体在pH 6.0和pH 7.4下对FcRn具有更高的亲和力。四种四重变体偏爱T256D、T307Q和N434Y突变。相对于WT和YTEKF,这些四重变体显示出亲和力(在pH 6.0)分别提高了约500倍和3倍。

[0419] 测定其他表征参数,例如热稳定性、与Fc γ RIIIa的结合和洗脱pH,并显示在表10中。

[0420] 表10:先导四重变体的其他表征参数

[0421]

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

[0422]

[0423] *不受理论的约束,由于YTEKF中存在“YTE”,因此预期热稳定性和Fc γ RIIIa结合与先导四重变体类似。

[0424] 如表10所示,发现所有的先导四重变体都是热不稳定的并且显示出降低的Fc γ RIIIa结合能力。

[0425] 本公开涉及下述实施方案:

[0426] 1.一种包含经修饰的Fc结构域的分离的结合多肽,该经修饰的Fc结构域包含:

[0427] 氨基酸位置256处的天冬氨酸(D)或谷氨酸(E),和/或氨基酸位置307处的色氨酸(W)或谷氨酰胺(Q),其中氨基酸位置254不是苏氨酸(T),并且进一步包含:

[0428] 氨基酸位置434处的苯丙氨酸(F)或酪氨酸(Y);或

[0429] 氨基酸位置252处的酪氨酸(Y),

[0430] 其中氨基酸位置依照EU编号。

[0431] 2.一种包含经修饰的Fc结构域的分离的结合多肽,该经修饰的Fc结构域包含选自以下位置处的氨基酸取代的组合:

[0432] a) 氨基酸位置252处的酪氨酸(Y)和氨基酸位置256处的天冬氨酸(D);

[0433] b) 氨基酸位置256处的天冬氨酸(D)和氨基酸位置434处的苯丙氨酸(F);

[0434] c) 氨基酸位置256处的天冬氨酸(D)和氨基酸位置434处的酪氨酸(Y);

[0435] d) 氨基酸位置307处的色氨酸(W)和氨基酸位置434处的苯丙氨酸(F);

[0436] e) 氨基酸位置252处的酪氨酸(Y)和氨基酸位置307处的色氨酸(W),其中酪氨酸(Y)不在氨基酸位置434处;

[0437] f) 氨基酸位置256处的天冬氨酸(D)和氨基酸位置307处的色氨酸(W),其中酪氨酸(Y)不在氨基酸位置434处;

[0438] g) 氨基酸位置256处的天冬氨酸(D)和氨基酸位置307处的谷氨酰胺(Q),其中酪氨酸(Y)不在氨基酸位置434处;

[0439] h) 氨基酸位置252处的酪氨酸(Y)、氨基酸位置256处的天冬氨酸(D)和氨基酸位置307处的谷氨酰胺(Q),其中酪氨酸(Y)不在氨基酸位置434处;以及

[0440] i) 氨基酸位置252处的酪氨酸(Y)、氨基酸位置256处的谷氨酸(E)和氨基酸位置307处的谷氨酰胺(Q),其中苏氨酸(T)不在氨基酸位置254处,组氨酸(H)不在氨基酸位置311处,并且酪氨酸(Y)不在氨基酸位置434处;

[0441] 其中该氨基酸取代依照EU编号。

[0442] 3.一种包含经修饰的Fc结构域的分离的结合多肽,该经修饰的Fc结构域包含:

[0443] a) 选自M252Y/T256D、M252Y/T256E、M252Y/T307Q、M252Y/T307W、T256D/T307Q、T256D/T307W、T256E/T307Q和T256E/T307W的双重氨基酸取代,其中苏氨酸(T)不在氨基酸位置254处,组氨酸(H)不在氨基酸位置311处,并且酪氨酸(Y)不在氨基酸位置434处;或者

[0444] b) 选自M252Y/T256D/T307Q、M252Y/T256D/T307W、M252Y/T256E/T307Q和M252Y/T256E/T307W的三重氨基酸取代,其中苏氨酸(T)不在氨基酸位置254处,组氨酸(H)不在氨基酸位置311处,并且酪氨酸(Y)不在氨基酸位置434处;

[0445] 其中该氨基酸取代依照EU编号。

[0446] 4.根据项1-3中任一项所述的分离的结合多肽,其中该经修饰的Fc结构域是经修饰的人Fc结构域。

- [0447] 5. 根据项1-4中任一项所述的分离的结合多肽,其中该经修饰的Fc结构域是经修饰的IgG1 Fc结构域。
- [0448] 6. 根据项1-5中任一项所述的分离的结合多肽,其中该结合多肽具有人FcRn结合亲和力。
- [0449] 7. 根据项1-5中任一项所述的分离的结合多肽,其中该结合多肽具有大鼠FcRn结合亲和力。
- [0450] 8. 根据项1-7中任一项所述的分离的结合多肽,其中该结合多肽具有人和大鼠FcRn结合亲和力。
- [0451] 9. 根据项2-8中任一项所述的分离的结合多肽,其中与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,该分离的结合多肽具有改变的血清半衰期。
- [0452] 10. 根据项9所述的分离的结合多肽,其中与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,该分离的结合多肽具有增加的血清半衰期。
- [0453] 11. 根据项1-8中任一项所述的分离的结合多肽,其中与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,该分离的结合多肽具有改变的FcRn结合亲和力。
- [0454] 12. 根据项11所述的分离的结合多肽,其中与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,该分离的结合多肽具有增强的FcRn结合亲和力。
- [0455] 13. 根据项1-12中任一项所述的分离的结合多肽,其中与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,该分离的结合多肽在酸性pH下具有增强的FcRn结合亲和力。
- [0456] 14. 根据项1-13中任一项所述的分离的结合多肽,其中与所述结合多肽在升高的非酸性pH下的FcRn结合亲和力相比,该分离的结合多肽在酸性pH下具有增强的FcRn结合亲和力。
- [0457] 15. 根据项12-14中任一项所述的分离的结合多肽,其中所述增强的FcRn结合亲和力包括降低的FcRn结合解离速率。
- [0458] 16. 根据项13-15中任一项所述的分离的结合多肽,其中所述酸性pH为约6.0。
- [0459] 17. 根据项13-16中任一项所述的分离的结合多肽,其中所述酸性pH为约6.0并且所述非酸性pH为约7.4。
- [0460] 18. 根据项1-17中任一项所述的分离的结合多肽,其中与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,该分离的结合多肽具有改变的Fc γ RIIIa结合亲和力。
- [0461] 19. 根据项1-18中任一项所述的分离的结合多肽,其中与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,该分离的结合多肽具有降低的Fc γ RIIIa结合亲和力。
- [0462] 20. 根据项1-18中任一项所述的分离的结合多肽,其中与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,该分离的结合多肽具有增强的Fc γ RIIIa结合亲和力。
- [0463] 21. 根据项1-18中任一项所述的分离的结合多肽,其中该分离的结合多肽具有与包含野生型Fc结构域的结合多肽大致相同的Fc γ RIIIa结合亲和力。
- [0464] 22. 根据项1-21中任一项所述的分离的结合多肽,其中该分离的结合多肽具有与包含野生型Fc结构域的结合多肽大致相同的热稳定性。
- [0465] 23. 根据项1-21中任一项所述的分离的结合多肽,其中该分离的结合多肽具有与包含经修饰的Fc结构域的结合多肽大致相同的热稳定性,该经修饰的Fc结构域具有依照EU编号的三重氨基酸取代M252Y/S254T/T256E。

- [0466] 24. 根据项1-23中任一项所述的分离的结合多肽,其中该分离的结合多肽是抗体。
- [0467] 25. 根据项1-24中任一项所述的分离的结合多肽,其中该分离的结合多肽是单克隆抗体。
- [0468] 26. 根据项24-25中任一项所述的分离的结合多肽,其中该分离的抗体是嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。
- [0469] 27. 根据项24-26中任一项所述的分离的结合多肽,其中该分离的抗体是全长抗体。
- [0470] 28. 根据项1-27中任一项所述的分离的结合多肽,其中该分离的结合多肽特异性地结合一种或多种人靶标。
- [0471] 29. 一种分离的核酸分子,其包含编码根据项1-28中任一项所述的分离的多肽的核酸。
- [0472] 30. 一种载体,其包含根据项29所述的分离的核酸分子。
- [0473] 31. 根据项30所述的载体,其中所述载体是表达载体。
- [0474] 32. 一种宿主细胞,其包含根据项30-31中任一项所述的载体。
- [0475] 33. 根据项32所述的宿主细胞,其中该宿主细胞是真核或原核起源的。
- [0476] 34. 根据项32-33中任一项所述的宿主细胞,其中该宿主细胞是哺乳动物起源的。
- [0477] 35. 根据项32-33中任一项所述的宿主细胞,其中该宿主细胞是细菌起源的。
- [0478] 36. 一种药物组合物,其包含根据项1-28中任一项所述的分离的结合多肽。
- [0479] 37. 一种药物组合物,其包含根据项24-27中任一项所述的分离的抗体。
- [0480] 38. 一种包含经修饰的Fc结构域的分离的结合多肽,其中该经修饰的Fc结构域包含依照EU编号的氨基酸位置256处的天冬氨酸(D)和氨基酸位置307处的谷氨酰胺(Q)。
- [0481] 39. 一种包含经修饰的Fc结构域的分离的结合多肽,其中该经修饰的Fc结构域包含依照EU编号的氨基酸位置256处的天冬氨酸(D)和氨基酸位置307处的色氨酸(W)。
- [0482] 40. 一种包含经修饰的Fc结构域的分离的结合多肽,其中该经修饰的Fc结构域包含依照EU编号的氨基酸位置252处的酪氨酸(Y)和氨基酸位置256处的天冬氨酸(D)。
- [0483] 41. 根据项38-40中任一项所述的分离的结合多肽,其中该经修饰的Fc结构域是经修饰的人Fc结构域。
- [0484] 42. 根据项38-41中任一项所述的分离的结合多肽,其中所述经修饰的Fc结构域是经修饰的IgG1 Fc结构域。
- [0485] 43. 根据项38-42中任一项所述的分离的结合多肽,其中该结合多肽具有人FcRn结合亲和力。
- [0486] 44. 根据项38-42中任一项所述的分离的结合多肽,其中该结合多肽具有大鼠FcRn结合亲和力。
- [0487] 45. 根据项38-44中任一项所述的分离的结合多肽,其中与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,该分离的结合多肽具有增加的血清半衰期。
- [0488] 46. 根据项38-44中任一项所述的分离的结合多肽,其中与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,该分离的结合多肽具有增强的FcRn结合亲和力。
- [0489] 47. 根据项38-44中任一项所述的分离的结合多肽,其中与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,该分离的结合多肽在酸性pH下具有增强的FcRn结合亲和力。

[0490] 48. 根据项38-47中任一项所述的分离的结合多肽,其中与所述结合多肽在升高的非酸性pH下的FcRn结合亲和力相比,该分离的结合多肽在酸性pH下具有增强的FcRn结合亲和力。

[0491] 49. 根据项46-48中任一项所述的分离的结合多肽,其中该增强的FcRn结合亲和力包括降低的FcRn结合解离速率。

[0492] 50. 根据项47或48所述的分离的结合多肽,其中所述酸性pH为约6.0。

[0493] 51. 根据项47所述的分离的结合多肽,其中所述酸性pH为约6.0并且所述非酸性pH为约7.4。

[0494] 52. 根据项48所述的分离的结合多肽,其中所述酸性pH为约6.0。

[0495] 53. 根据项38-52中任一项所述的分离的结合多肽,其中与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,该分离的结合多肽具有改变的Fc γ RIIIa结合亲和力。

[0496] 54. 根据项38-53中任一项所述的分离的结合多肽,其中该分离的结合多肽是单克隆抗体。

[0497] 55. 根据项38-54中任一项所述的分离的结合多肽,其中所述抗体是嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。

[0498] 56. 根据项38-55中任一项所述的分离的结合多肽,其中该分离的结合多肽特异性地结合一种或多种人靶标。

[0499] 57. 一种分离的核酸分子,其包含编码根据项38-56中任一项所述的分离的多肽的核酸。

[0500] 58. 一种表达载体,其包含根据项57所述的分离的核酸分子。

[0501] 59. 一种宿主细胞,其包含根据项58所述的表达载体。

[0502] 60. 一种药物组合物,其包含根据项38-58中任一项所述的分离的结合多肽。

[0503] 61. 一种包含经修饰的Fc结构域的分离的结合多肽,其中该经修饰的Fc结构域包含至少四个氨基酸取代的组合,该组合包含:

[0504] 氨基酸位置256处的天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)和氨基酸位置307处的色氨酸(W)或谷氨酰胺(Q),其中氨基酸位置254不是苏氨酸(T),并且进一步包含:

[0505] 氨基酸位置434处的苯丙氨酸(F)或酪氨酸(Y);以及

[0506] 氨基酸位置252处的酪氨酸(Y),

[0507] 其中氨基酸位置依照EU编号。

[0508] 62. 一种包含经修饰的Fc结构域的分离的结合多肽,该经修饰的Fc结构域具有选自以下位置处的氨基酸取代的组合:

[0509] a) 氨基酸位置252处的酪氨酸(Y)、氨基酸位置256处的天冬氨酸(D)、氨基酸位置307处的谷氨酰胺(Q)和氨基酸位置434处的酪氨酸(Y);

[0510] b) 氨基酸位置252处的酪氨酸(Y)、氨基酸位置256处的谷氨酸(E)、氨基酸位置307处的色氨酸(W)和氨基酸位置434处的酪氨酸(Y);

[0511] c) 氨基酸位置252处的酪氨酸(Y)、氨基酸位置256处的谷氨酸(E)、氨基酸位置307处的谷氨酰胺(Q)和氨基酸位置434处的酪氨酸(Y);

[0512] d) 氨基酸位置252处的酪氨酸(Y)、氨基酸位置256处的天冬氨酸(D)、氨基酸位置307处的谷氨酰胺(Q)和氨基酸位置434处的苯丙氨酸(F);或

[0513] e) 氨基酸位置252处的酪氨酸(Y)、氨基酸位置256处的天冬氨酸(D)、氨基酸位置307处的色氨酸(W)和氨基酸位置434处的酪氨酸(Y),

[0514] 其中所述氨基酸取代依照EU编号。

[0515] 63. 一种包含经修饰的Fc结构域的分离的结合多肽, 该经修饰的Fc结构域包含:

[0516] 选自M252Y/T256D/T307Q/N434Y、M252Y/T256E/T307W/N434Y、M252Y/T256E/T307Q/N434Y、M252Y/T256D/T307Q/N434F和M252Y/T256D/T307W/N434Y的四重氨基酸取代,

[0517] 其中所述氨基酸取代依照EU编号。

[0518] 64. 根据项61-63中任一项所述的分离的结合多肽, 其中该经修饰的Fc结构域是经修饰的人Fc结构域。

[0519] 65. 根据项61-64中任一项所述的分离的结合多肽, 其中该经修饰的Fc结构域是经修饰的IgG1 Fc结构域。

[0520] 66. 根据项61-65中任一项所述的分离的结合多肽, 其中该结合多肽具有人FcRn结合亲和力。

[0521] 67. 根据项61-65中任一项所述的分离的结合多肽, 其中该结合多肽具有大鼠FcRn结合亲和力。

[0522] 68. 根据项61-67中任一项所述的分离的结合多肽, 其中该结合多肽具有人和大鼠FcRn结合亲和力。

[0523] 69. 根据项61-68中任一项所述的分离的结合多肽, 其中与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比, 该分离的结合多肽具有改变的FcRn结合亲和力。

[0524] 70. 根据项61-69所述的分离的结合多肽, 其中与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比, 该分离的结合多肽具有增强的FcRn结合亲和力。

[0525] 71. 根据项61-70中任一项所述的分离的结合多肽, 其中与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比, 该分离的结合多肽在酸性pH下具有增强的FcRn结合亲和力。

[0526] 72. 根据项61-71中任一项所述的分离的结合多肽, 其中与包含M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F的结合多肽相比, 该分离的结合多肽在酸性pH下具有增强的FcRn结合亲和力。

[0527] 73. 根据项61-72中任一项所述的分离的结合多肽, 其中与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比, 该分离的结合多肽在非酸性pH下具有增强的FcRn结合亲和力。

[0528] 74. 根据项61-73中任一项所述的分离的结合多肽, 其中与包含M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F的结合多肽相比, 该分离的结合多肽在非酸性pH下具有增强的FcRn结合亲和力。

[0529] 75. 根据项61-74中任一项所述的分离的结合多肽, 其中与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比, 该分离的结合多肽在酸性pH下具有增强的FcRn结合亲和力, 并且在非酸性pH下具有增强的FcRn结合亲和力。

[0530] 76. 根据项61-75中任一项所述的分离的结合多肽, 其中与包含M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F的结合多肽相比, 该分离的结合多肽在酸性pH下具有增强的FcRn结合亲和力, 并且在非酸性pH下具有增强的FcRn结合亲和力。

[0531] 77. 根据项61-76中任一项所述的分离的结合多肽, 其中该酸性pH为约6.0。

[0532] 78. 根据项61-77中任一项所述的分离的结合多肽, 其中该非酸性pH为约7.4。

- [0533] 79. 根据项61-78中任一项所述的分离的结合多肽,其中与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,该分离的结合多肽具有改变的血清半衰期。
- [0534] 80. 根据项61-79中任一项所述的分离的结合多肽,其中与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,该分离的结合多肽具有减少的血清半衰期。
- [0535] 81. 根据项61-80中任一项所述的分离的结合多肽,其中与包含M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F的结合多肽相比,该分离的结合多肽具有减少的血清半衰期。
- [0536] 82. 根据项61-81中任一项所述的分离的结合多肽,其中与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,该分离的结合多肽具有改变的Fc γ RIIIa结合亲和力。
- [0537] 83. 根据项61-82中任一项所述的分离的结合多肽,其中与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,该分离的结合多肽具有降低的Fc γ RIIIa结合亲和力。
- [0538] 84. 根据项61-83中任一项所述的分离的结合多肽,其中与包含M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F的结合多肽相比,该分离的结合多肽具有降低的Fc γ RIIIa结合亲和力。
- [0539] 85. 根据项61-84中任一项所述的分离的结合多肽,其中与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,该分离的结合多肽具有降低的热稳定性。
- [0540] 86. 根据项61-85中任一项所述的分离的结合多肽,其中与包含M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F的结合多肽相比,该分离的结合多肽具有降低的热稳定性。
- [0541] 87. 根据项61-86中任一项所述的分离的结合多肽,其中该分离的结合多肽是抗体。
- [0542] 88. 根据项61-87中任一项所述的分离的结合多肽,其中该分离的结合多肽是单克隆抗体。
- [0543] 89. 根据项61-88中任一项所述的分离的结合多肽,其中该分离的抗体是嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。
- [0544] 90. 根据项61-89中任一项所述的分离的结合多肽,其中该分离的抗体是全长抗体。
- [0545] 91. 根据项61-90中任一项所述的分离的结合多肽,其中该分离的结合多肽特异性地结合一种或多种靶标。
- [0546] 92. 一种分离的核酸分子,其包含编码根据项61-91中任一项所述的分离的多肽的核酸。
- [0547] 93. 一种载体,其包含根据项92所述的分离的核酸分子。
- [0548] 94. 根据项93所述的载体,其中该载体是表达载体。
- [0549] 95. 一种宿主细胞,其包含根据项93-94中任一项所述的载体。
- [0550] 96. 根据项95所述的宿主细胞,其中该宿主细胞是真核或原核起源的。
- [0551] 97. 根据项95-96中任一项所述的宿主细胞,其中该宿主细胞是哺乳动物起源的。
- [0552] 98. 根据项95-96中任一项所述的宿主细胞,其中该宿主细胞是细菌起源的。
- [0553] 99. 一种药物组合物,其包含根据项61-92中任一项所述的分离的结合多肽。
- [0554] 100. 一种药物组合物,其包含根据项87-90中任一项所述的分离的抗体。
- [0555] 101. 一种包含经修饰的Fc结构域的分离的结合多肽,该经修饰的Fc结构域包含依照EU编号的氨基酸位置252处的酪氨酸(Y)、氨基酸位置256处的天冬氨酸(D)、氨基酸位置

307处的谷氨酰胺(Q)和氨基酸位置434处的酪氨酸(Y)。

[0556] 102.一种包含经修饰的Fc结构域的分离的结合多肽,该经修饰的Fc结构域包含依照EU编号的氨基酸位置252处的酪氨酸(Y)、氨基酸位置256处的谷氨酸(E)、氨基酸位置307处的色氨酸(W)和氨基酸位置434处的酪氨酸(Y)。

[0557] 103.一种包含经修饰的Fc结构域的分离的结合多肽,该经修饰的Fc结构域包含依照EU编号的氨基酸位置252处的酪氨酸(Y)、氨基酸位置256处的谷氨酸(E)、氨基酸位置307处的谷氨酰胺(Q)和氨基酸位置434处的酪氨酸(Y)。

[0558] 104.一种包含经修饰的Fc结构域的分离的结合多肽,该经修饰的Fc结构域包含依照EU编号的氨基酸位置252处的酪氨酸(Y)、氨基酸位置256处的天冬氨酸(D)、氨基酸位置307处的谷氨酰胺(Q)和氨基酸位置434处的苯丙氨酸(F)。

[0559] 105.一种包含经修饰的Fc结构域的分离的结合多肽,该经修饰的Fc结构域包含依照EU编号的氨基酸位置252处的酪氨酸(Y)、氨基酸位置256处的天冬氨酸(D)、氨基酸位置307处的色氨酸(W)和氨基酸位置434处的酪氨酸(Y)。

[0560] 106.根据项101-105中任一项所述的分离的结合多肽,其中该经修饰的Fc结构域是经修饰的人Fc结构域。

[0561] 107.根据项101-106中任一项所述的分离的结合多肽,其中该经修饰的Fc结构域是经修饰的IgG1 Fc结构域。

[0562] 108.根据项101-107中任一项所述的分离的结合多肽,其中该结合多肽具有人FcRn结合亲和力。

[0563] 109.根据项101-108中任一项所述的分离的结合多肽,其中与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,该分离的结合多肽具有减少的血清半衰期。

[0564] 110.根据项101-109中任一项所述的分离的结合多肽,其中与包含M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F的结合多肽相比,该分离的结合多肽具有减少的血清半衰期。

[0565] 111.根据项101-110中任一项所述的分离的结合多肽,其中与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,该分离的结合多肽在酸性pH下具有增强的FcRn结合亲和力,并且在非酸性pH下具有增强的FcRn结合亲和力。

[0566] 112.根据项101-111中任一项所述的分离的结合多肽,其中与包含M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F的结合多肽相比,该分离的结合多肽在酸性pH下具有增强的FcRn结合亲和力,并且在非酸性pH下具有增强的FcRn结合亲和力。

[0567] 113.根据项111或112所述的分离的结合多肽,其中所述酸性pH为约6.0并且所述非酸性pH为约7.4。

[0568] 114.根据项101-113中任一项所述的分离的结合多肽,其中与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,该分离的结合多肽具有降低的Fc γ RIIIa结合亲和力。

[0569] 115.根据项101-114中任一项所述的分离的结合多肽,其中与包含M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F的结合多肽相比,该分离的结合多肽具有降低的Fc γ RIIIa结合亲和力。

[0570] 116.根据项101-115中任一项所述的分离的结合多肽,其中与包含野生型Fc结构域的结合多肽相比,该分离的结合多肽具有降低的热稳定性。

[0571] 117.根据项101-116中任一项所述的分离的结合多肽,其中与包含M252Y/S254T/

T256E/H433K/N434F的结合多肽相比,该分离的结合多肽具有降低的热稳定性。

[0572] 118.根据项101-117中任一项所述的分离的结合多肽,其中该分离的结合多肽是单克隆抗体。

[0573] 119.根据项118所述的分离的结合多肽,其中所述抗体是嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。

[0574] 120.根据项101-119中任一项所述的分离的结合多肽,其中该分离的结合多肽特异性地结合一种或多种靶标。

[0575] 121.一种分离的核酸分子,其包含编码根据项101-120中任一项所述的分离的多肽的核酸。

[0576] 122.一种表达载体,其包含根据项121所述的分离的核酸分子。

[0577] 123.一种宿主细胞,其包含根据项122所述的表达载体。

[0578] 124.一种药物组合物,其包含根据项101-120中任一项所述的分离的结合多肽。

[0579] 125.一种治疗有此需要的受试者的疾病或病症的方法,其包括向该受试者施用治疗有效量的根据项1-28、38-58、61-91和101-120中任一项所述的分离的结合多肽,或向该受试者施用治疗有效量的根据项36-37、60、99-100和124中任一项所述的药物组合物。

[0580] 126.根据项125所述的方法,其中该疾病或病症是癌症。

[0581] 127.根据项126所述的方法,其中该癌症是肿瘤。

[0582] 128.根据项125所述的方法,其中该疾病或病症是自身免疫病症。

[0583] 129.一种治疗有此需要的受试者的癌症的方法,其包括向该受试者施用治疗有效量的根据项1-28和38-58中任一项所述的分离的结合多肽,或向该受试者施用治疗有效量的根据项36、37和60中任一项所述的药物组合物。

[0584] 130.一种治疗有此需要的受试者的自身免疫病症的方法,其包括向该受试者施用治疗有效量的根据项61-91和101-120中任一项所述的分离的结合多肽,或向该受试者施用治疗有效量的根据项99、100和124中任一项所述的药物组合物。

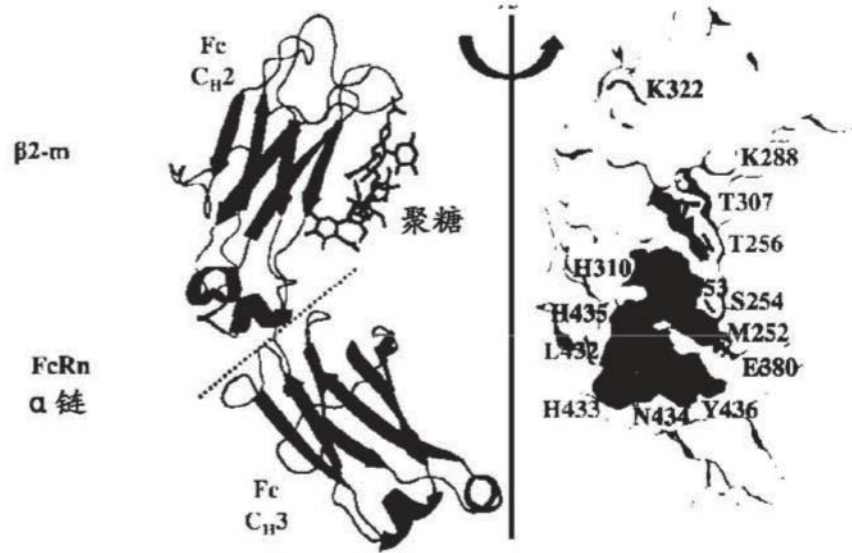


图1A

图1B



图2A

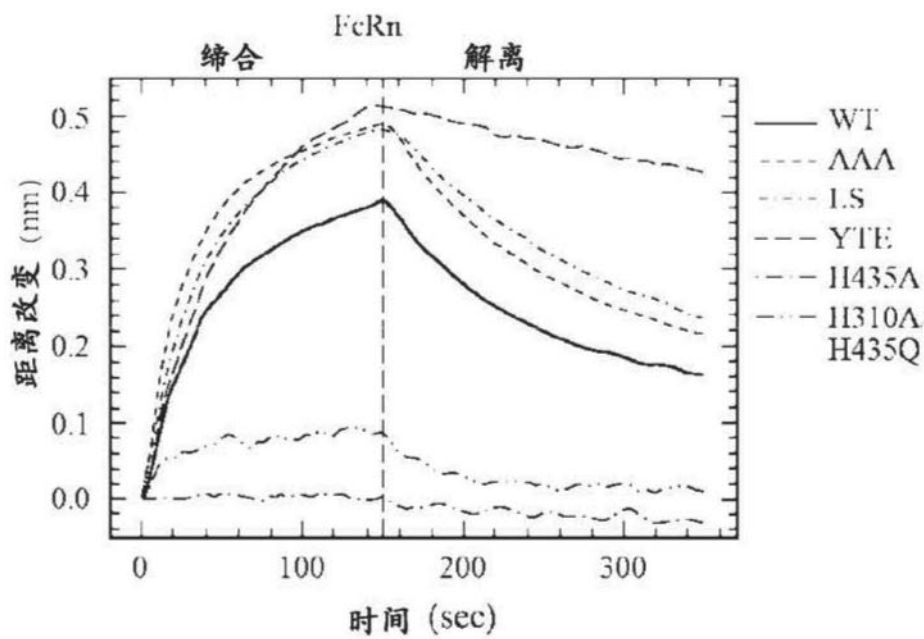


图2B

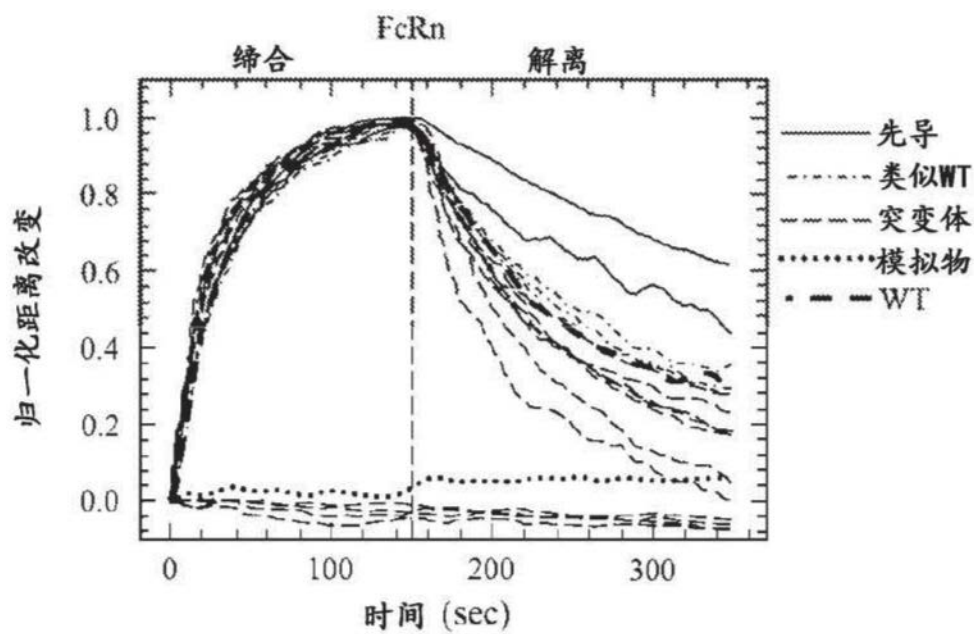


图2C

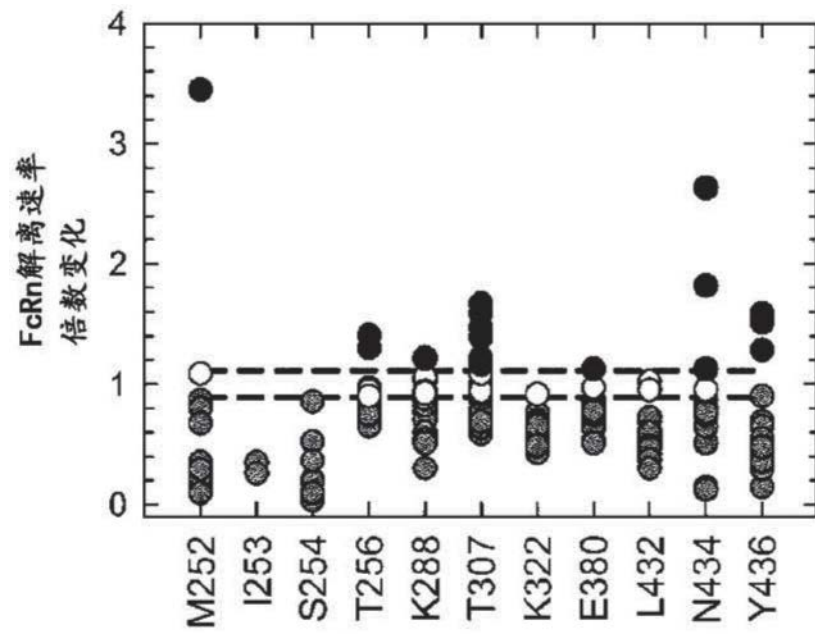


图2D

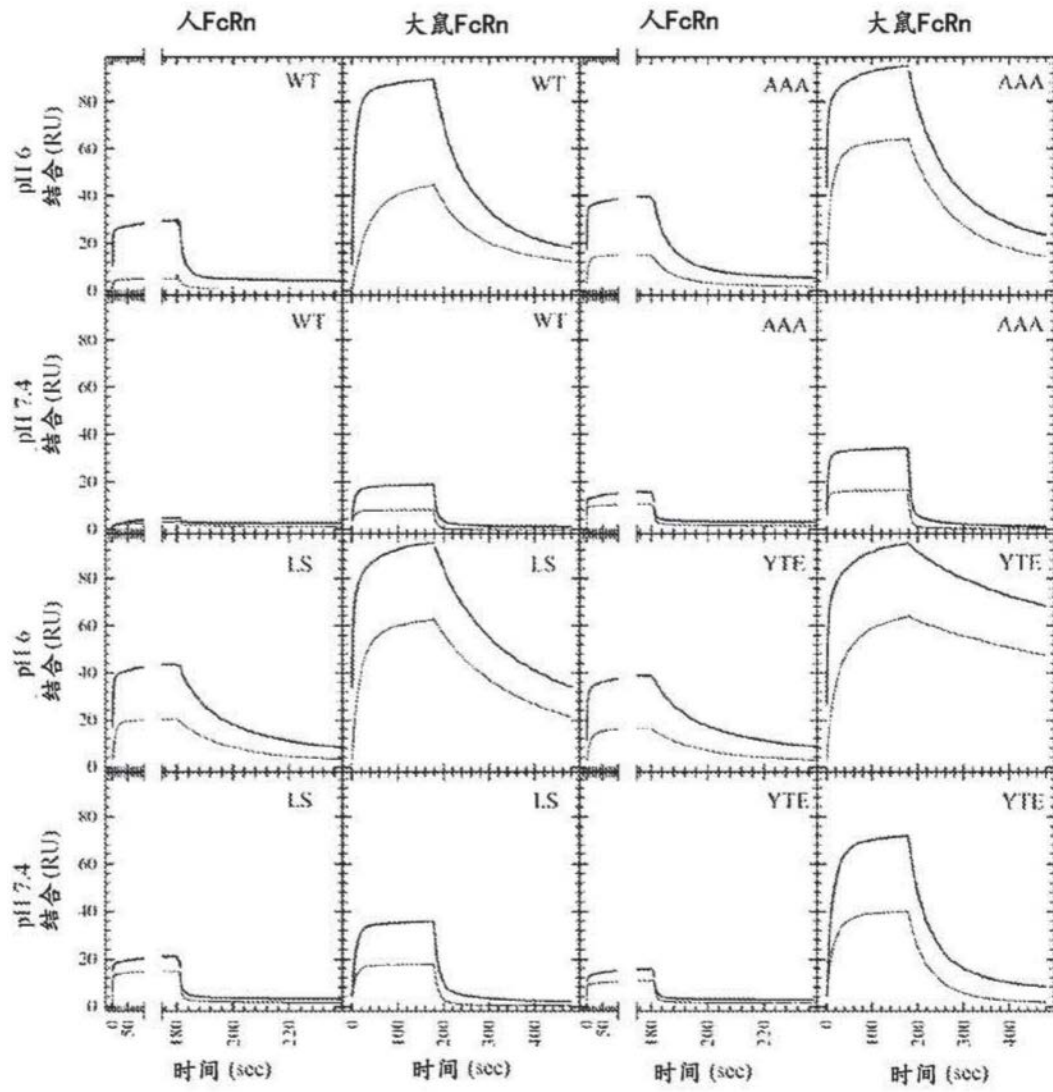


图3

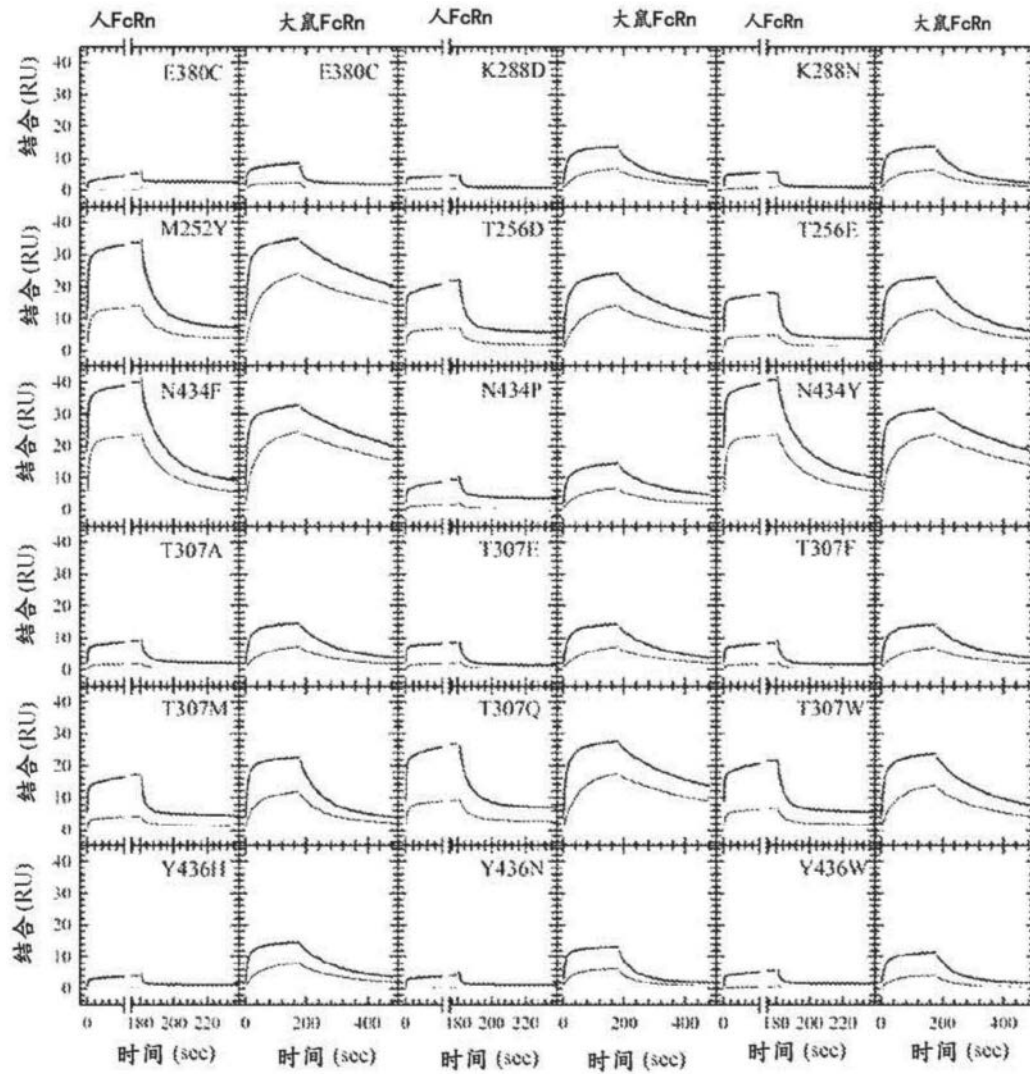


图4A

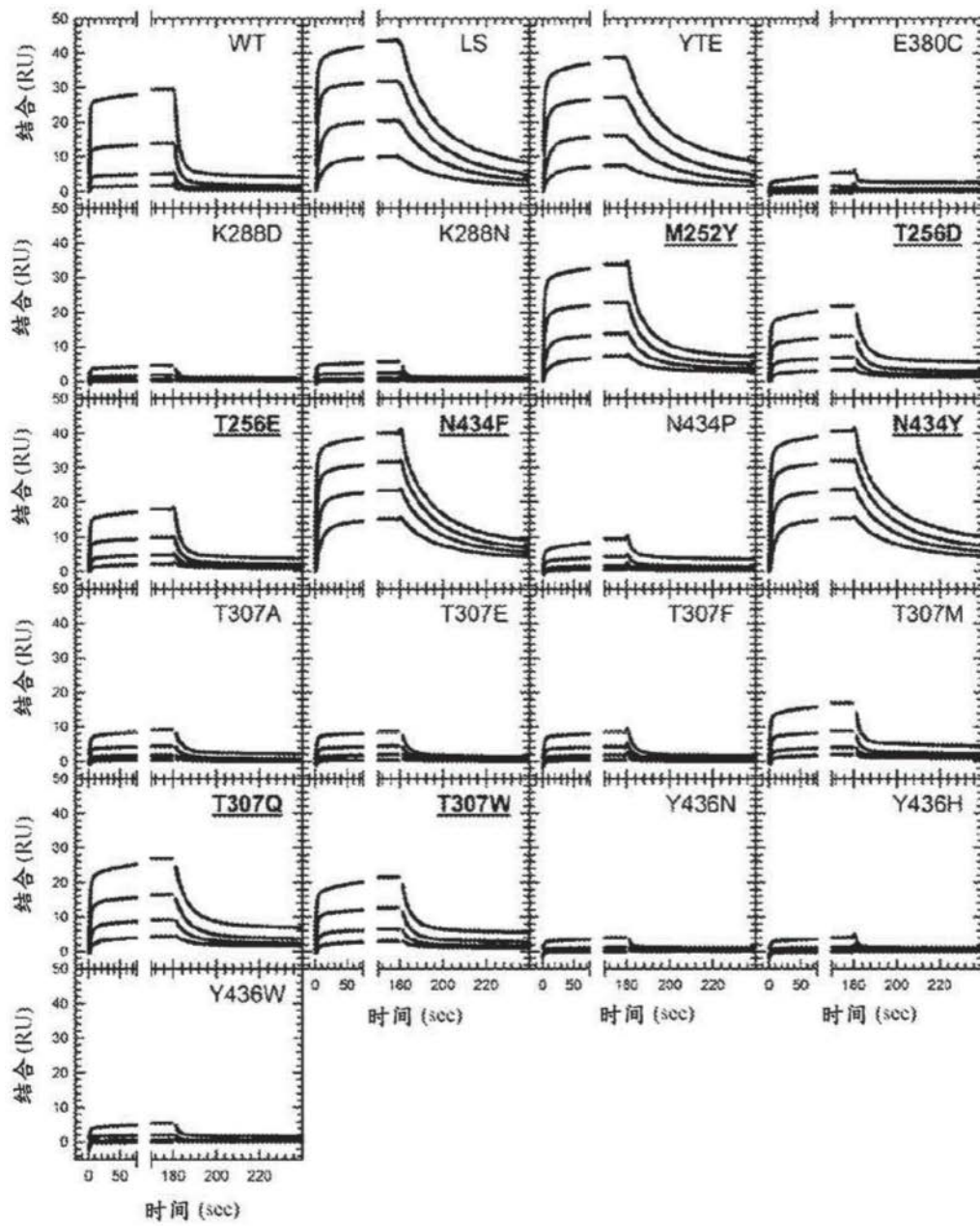


图4B

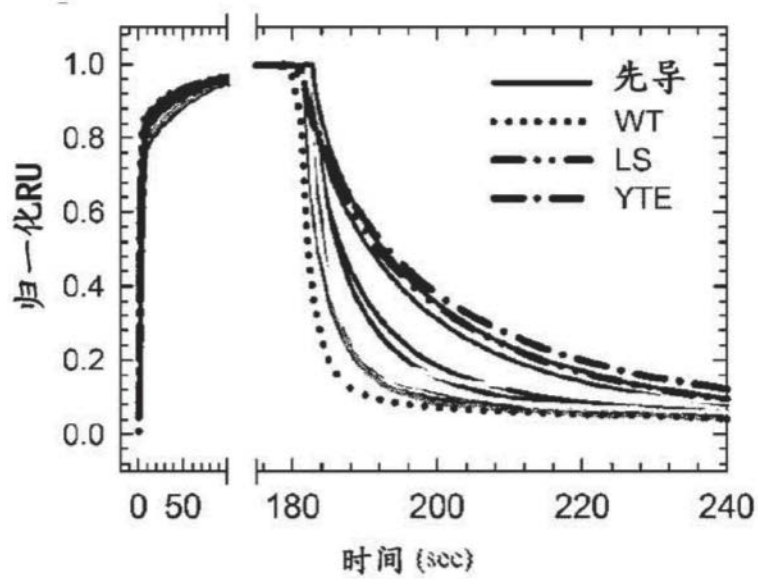


图5A

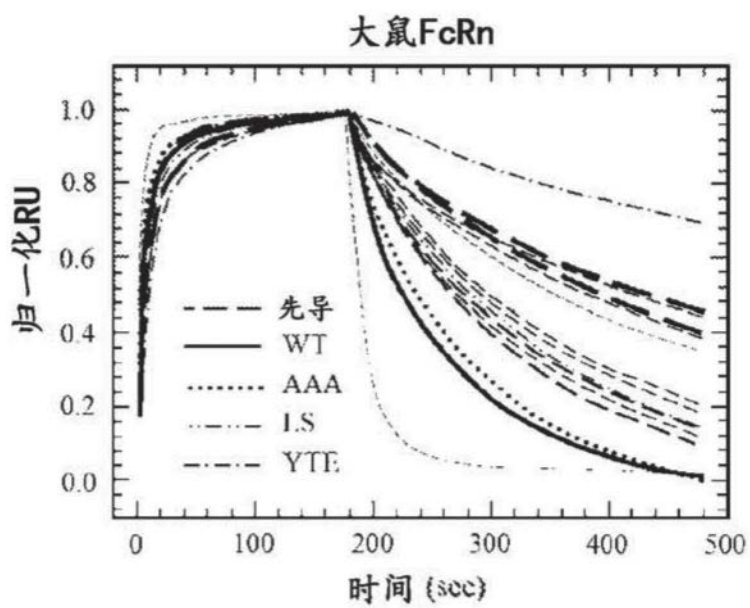


图5B

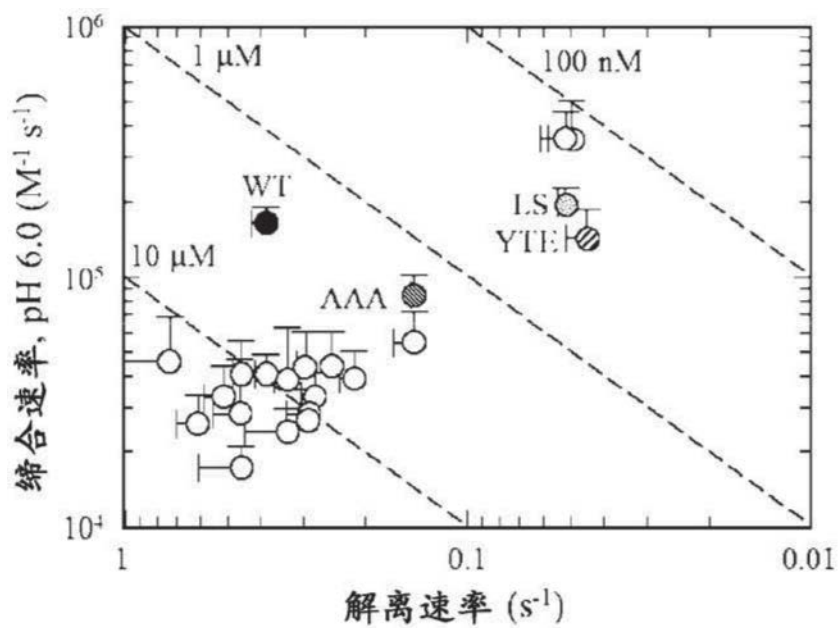


图5C

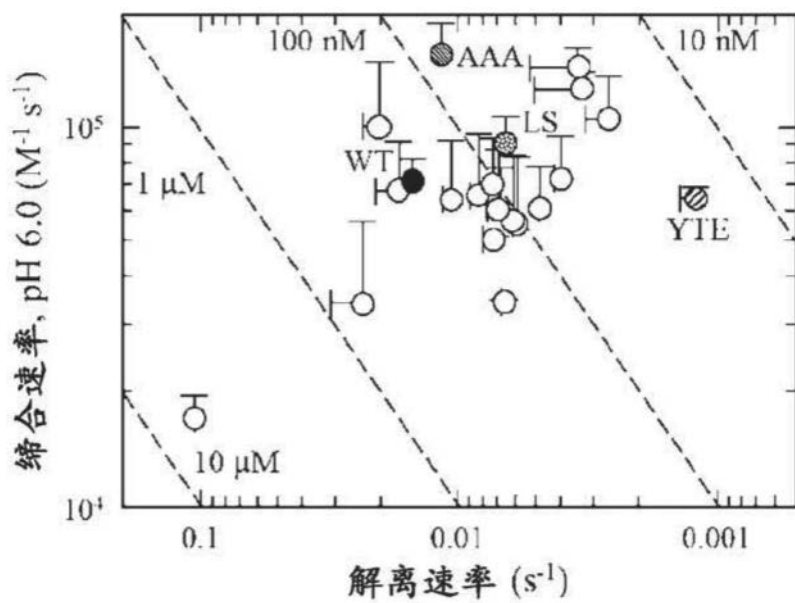


图5D

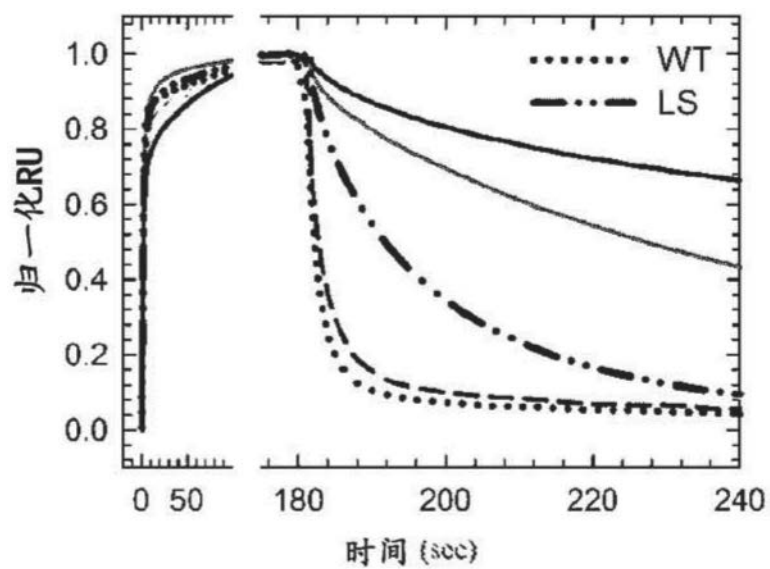


图6A

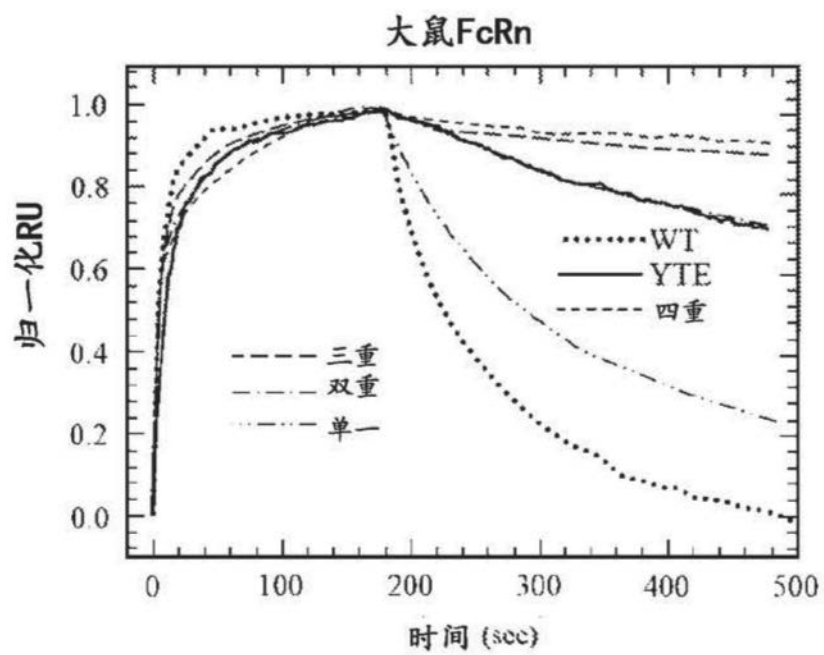


图6B

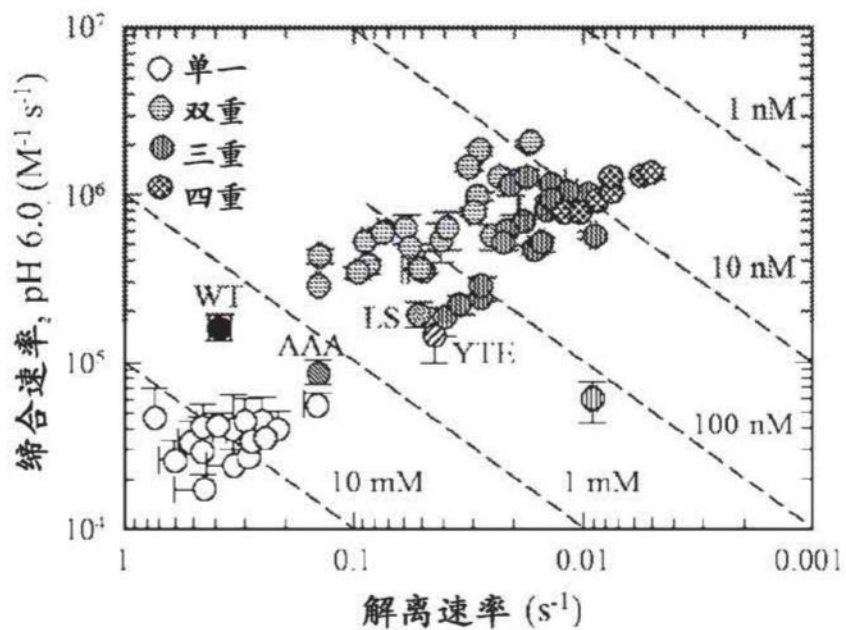


图6C

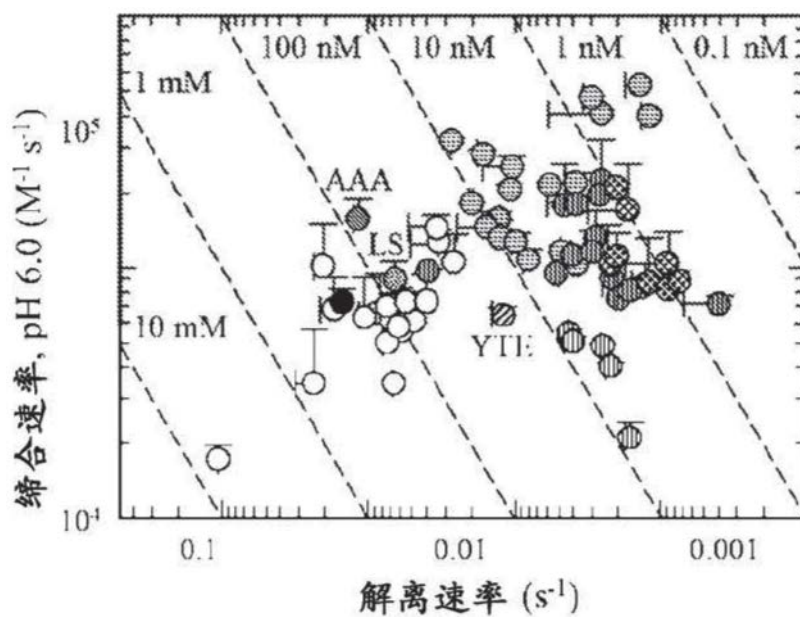


图6D

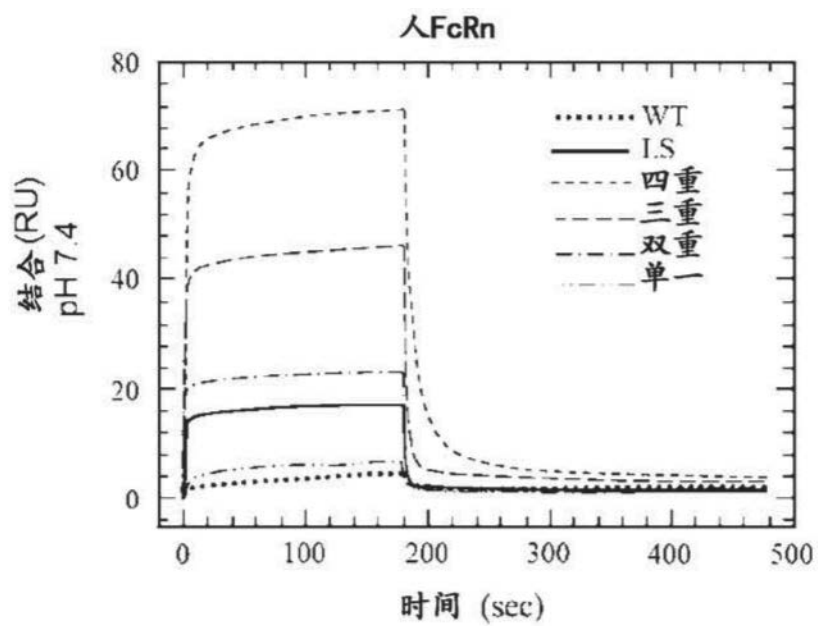


图7A

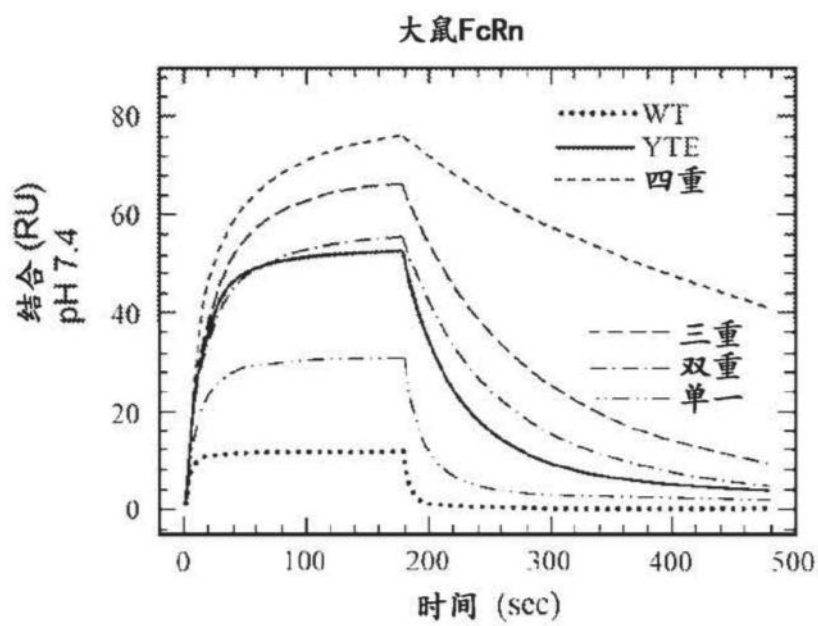


图7B

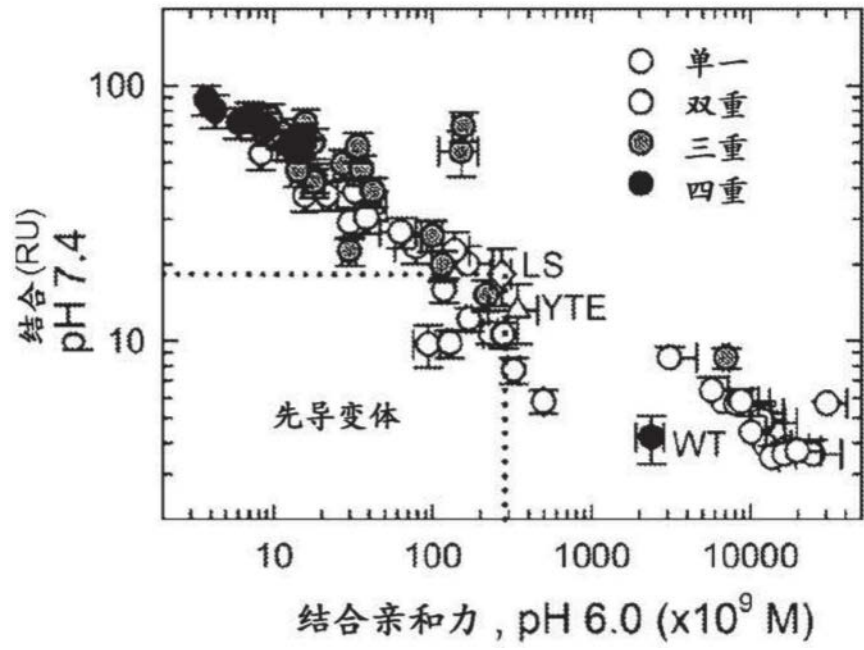


图7C

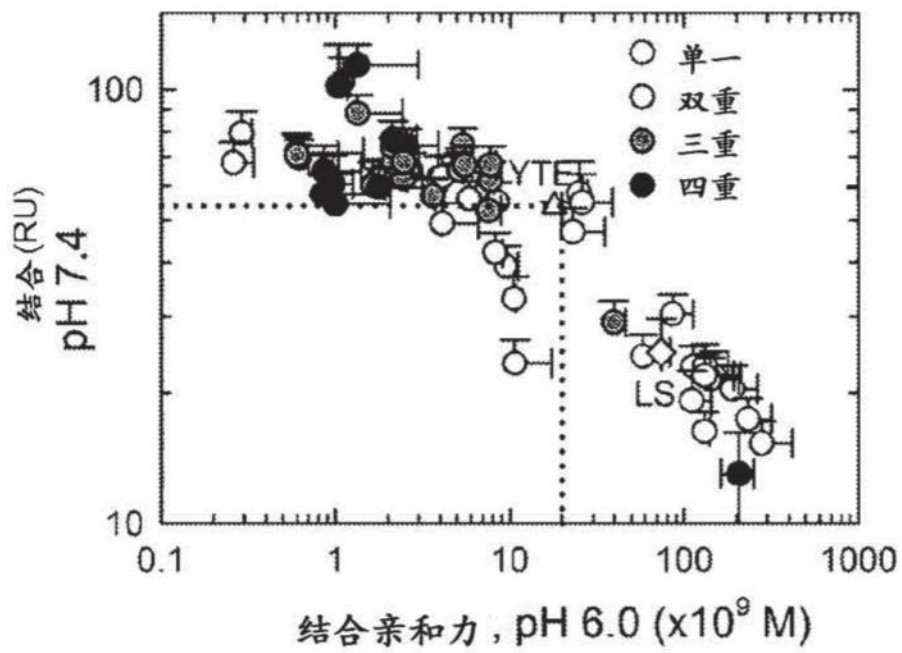


图7D

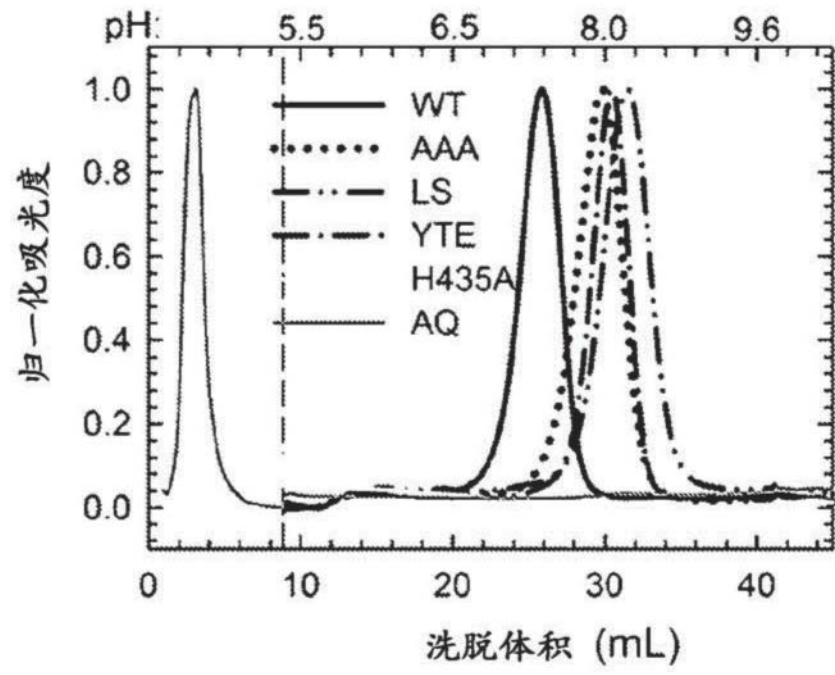


图8A

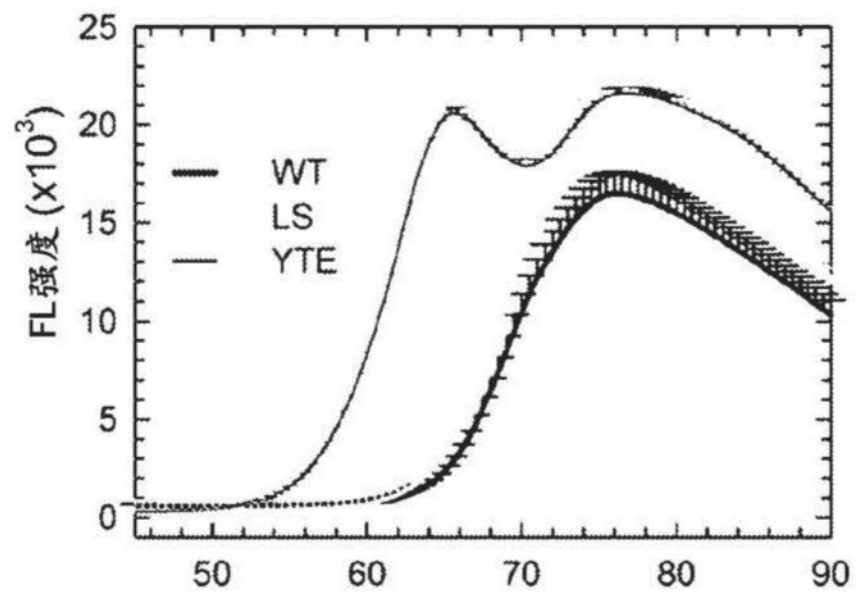


图8B

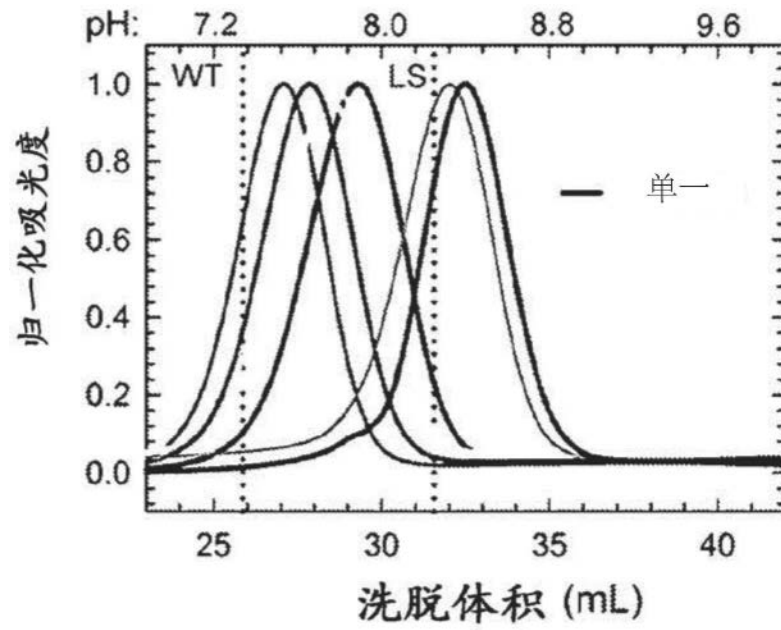


图8C

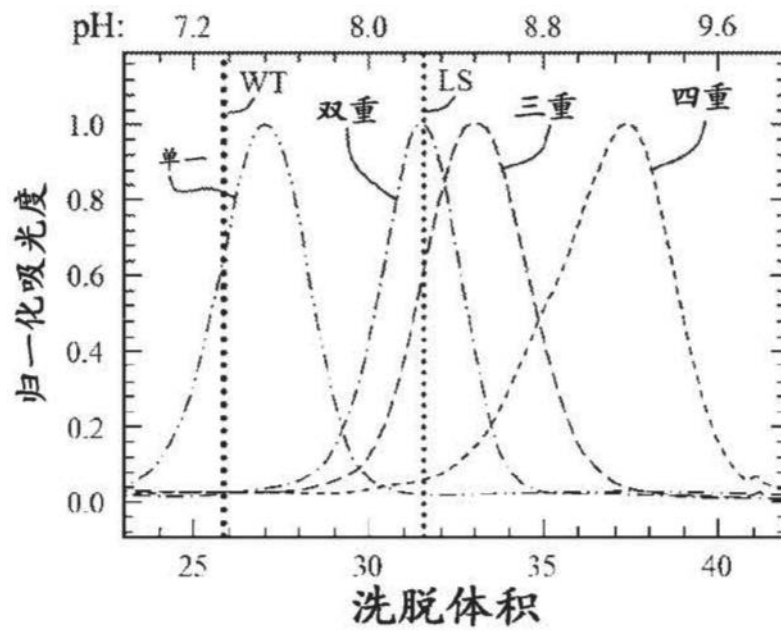


图9A

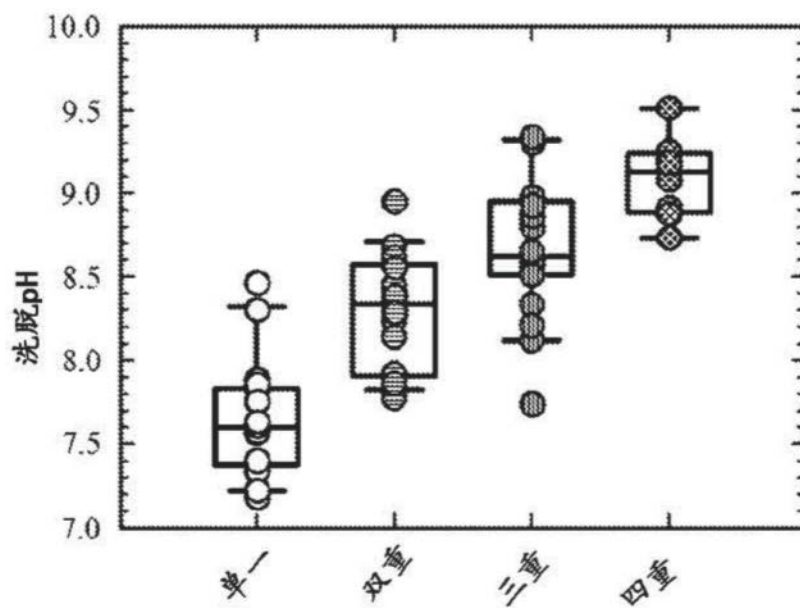


图9B

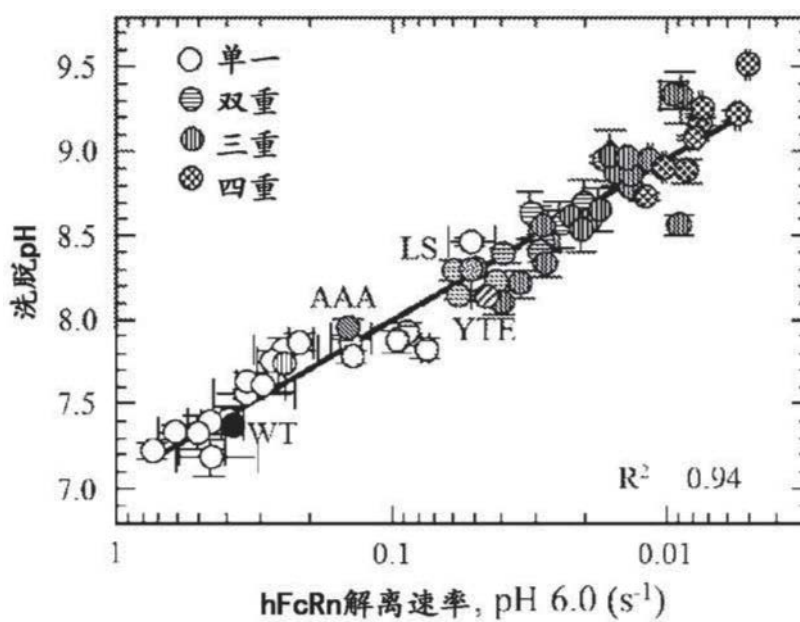


图9C

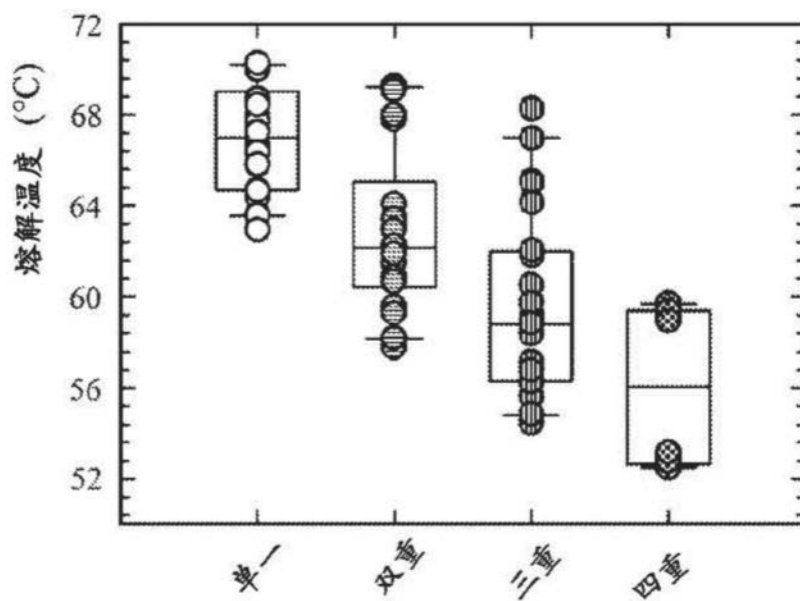


图9D

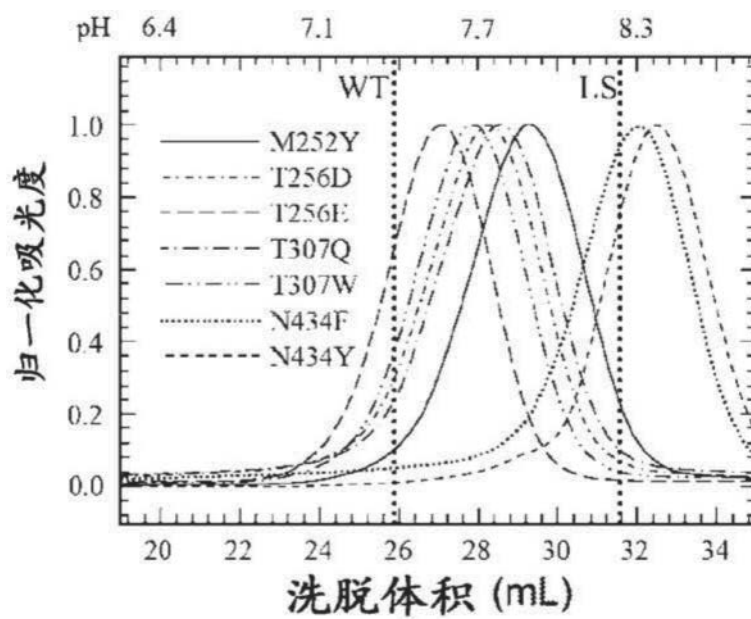


图10A

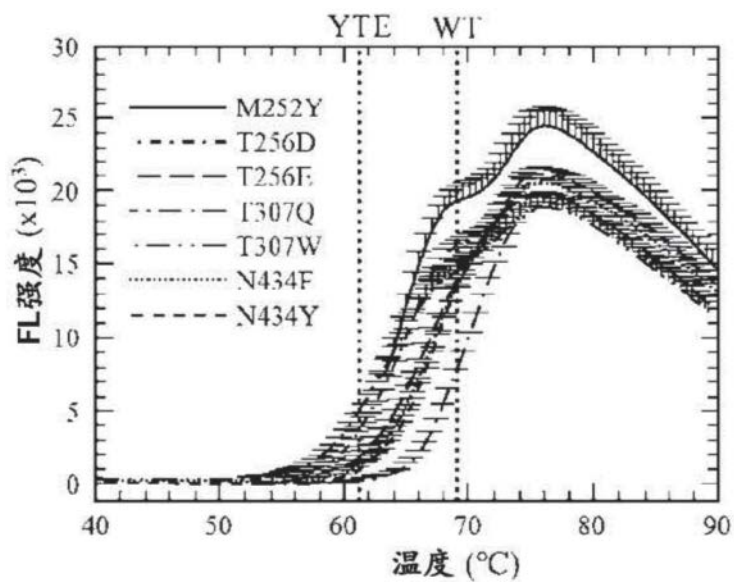


图10B

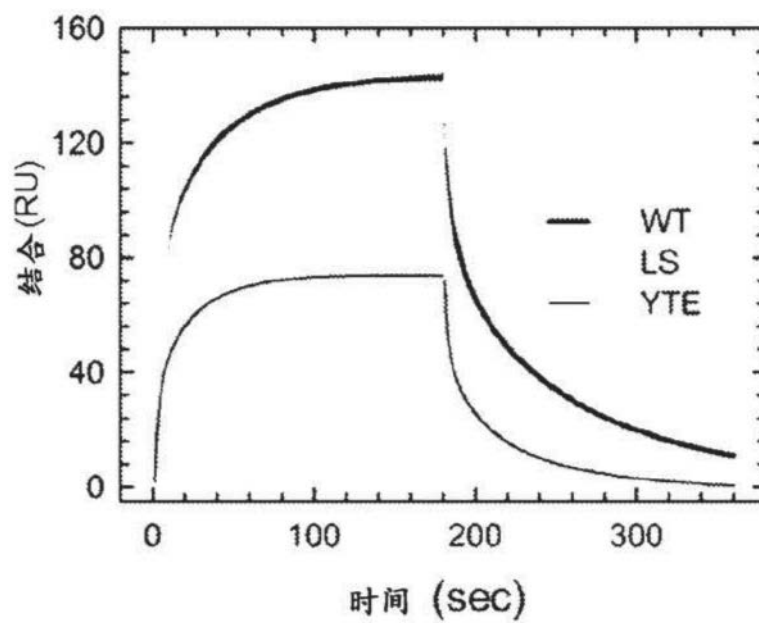


图11A

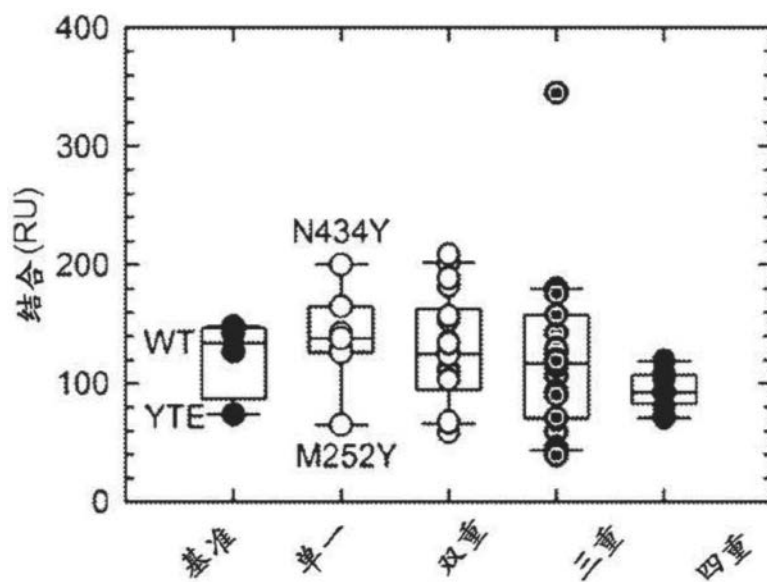


图11B

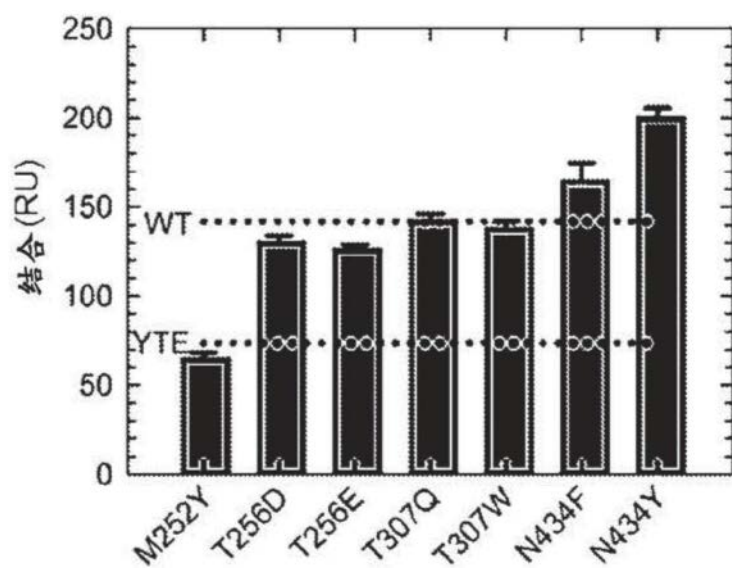


图11C

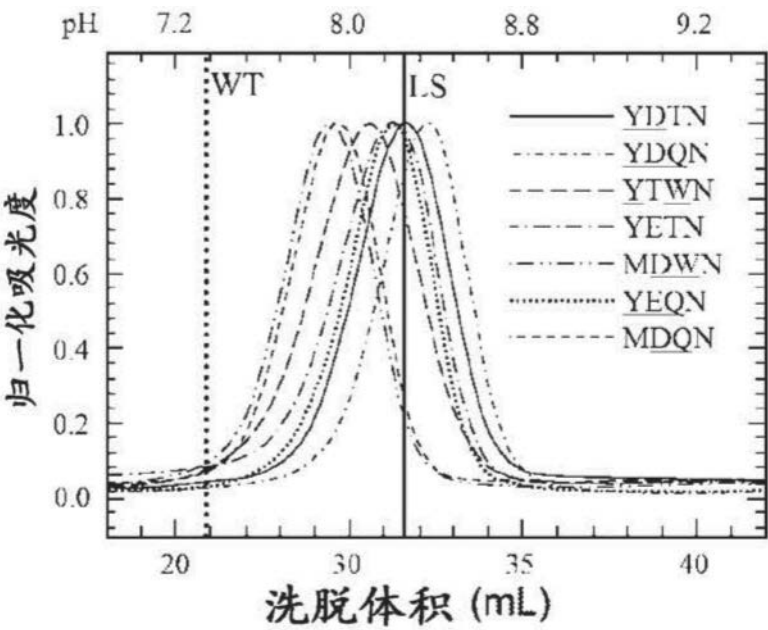


图12A

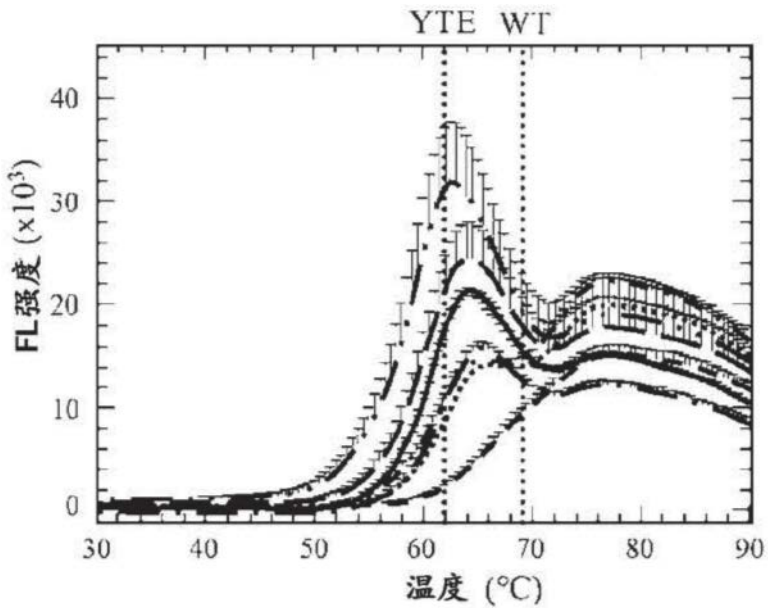


图12B

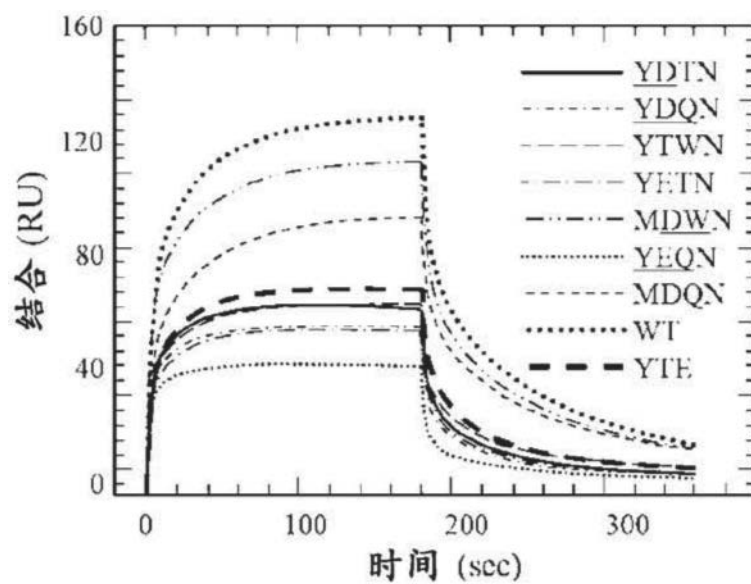


图12C

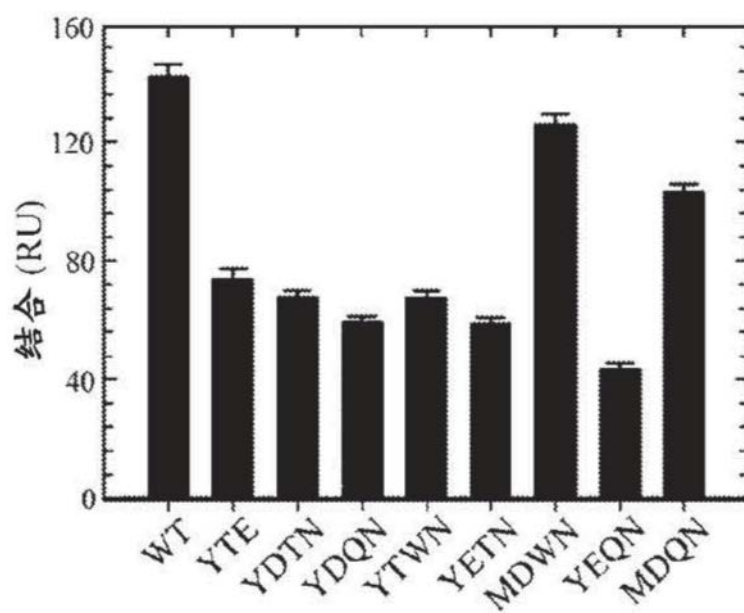


图12D

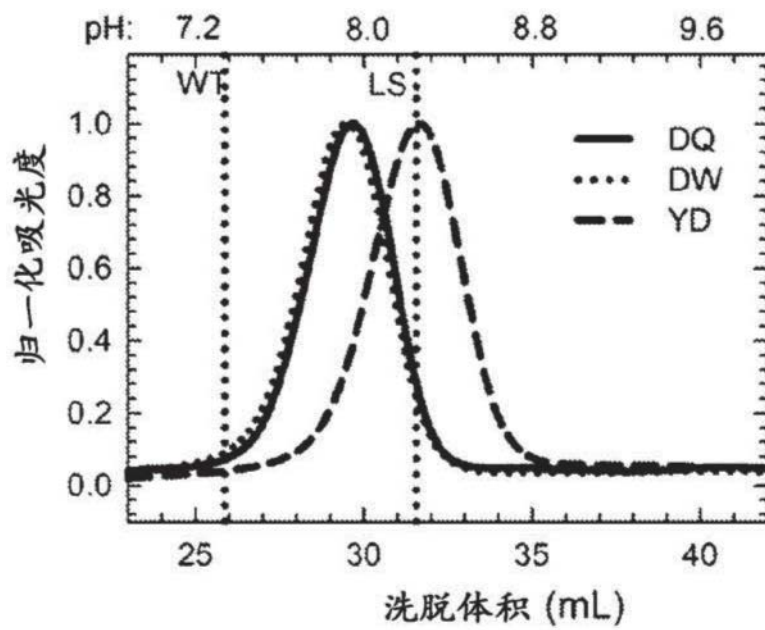


图12E

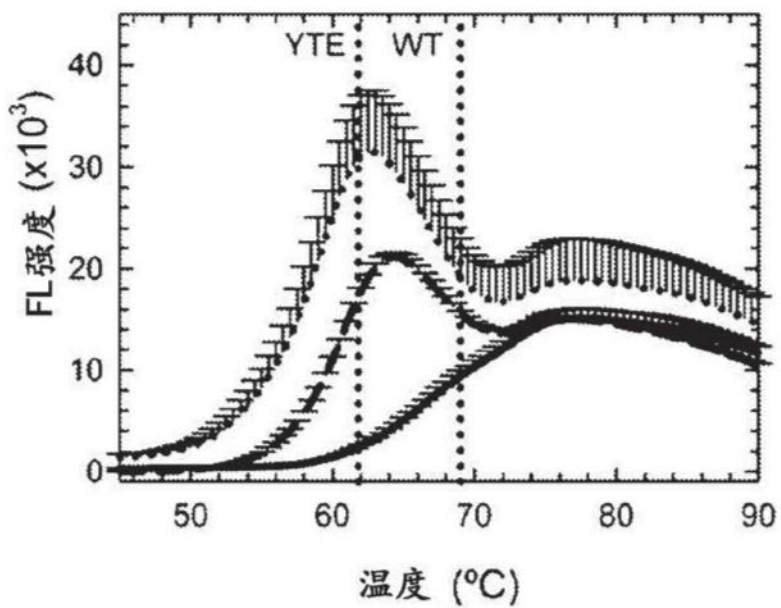


图12F

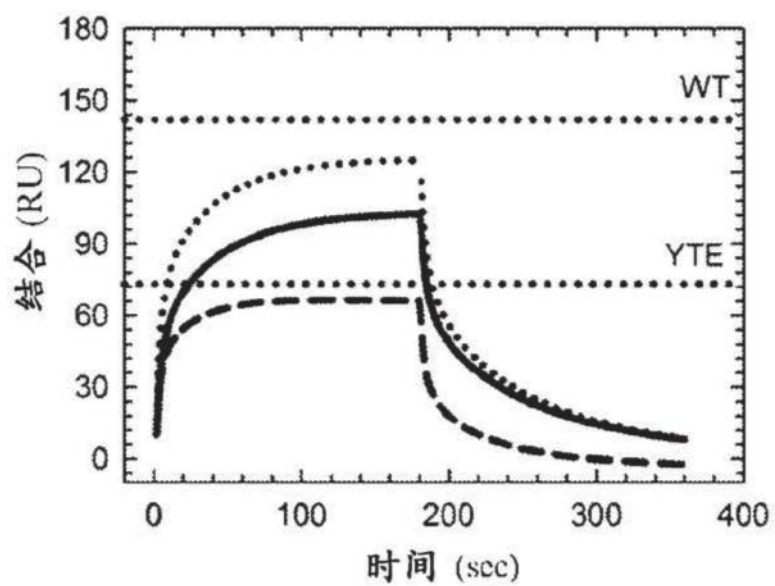


图12G

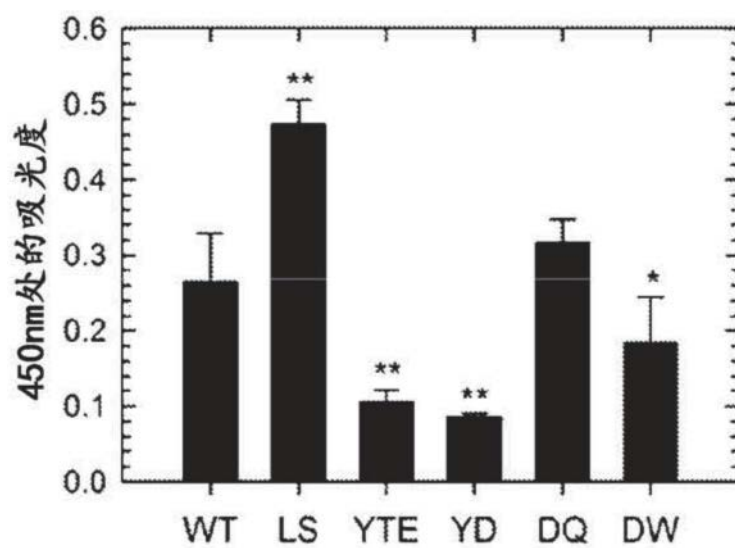


图12H

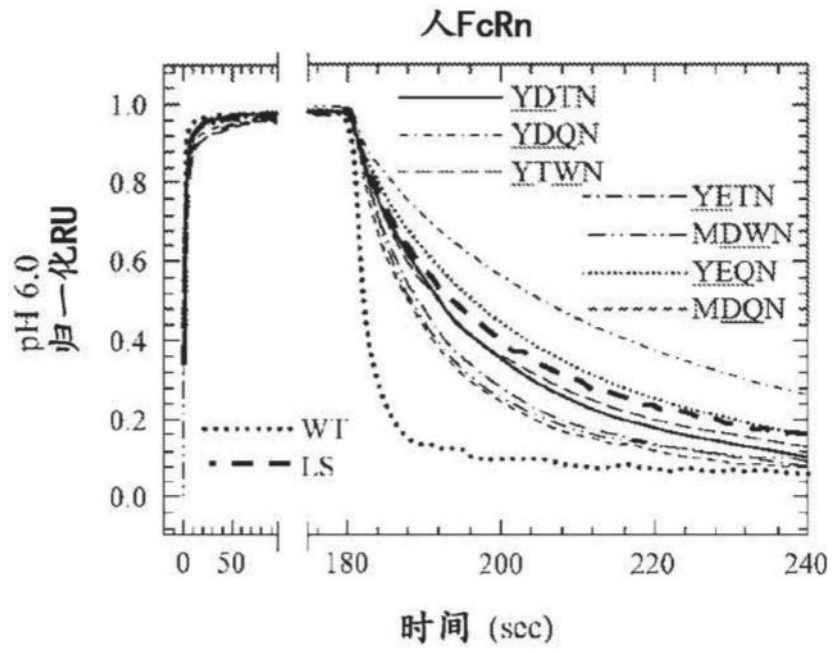


图13A

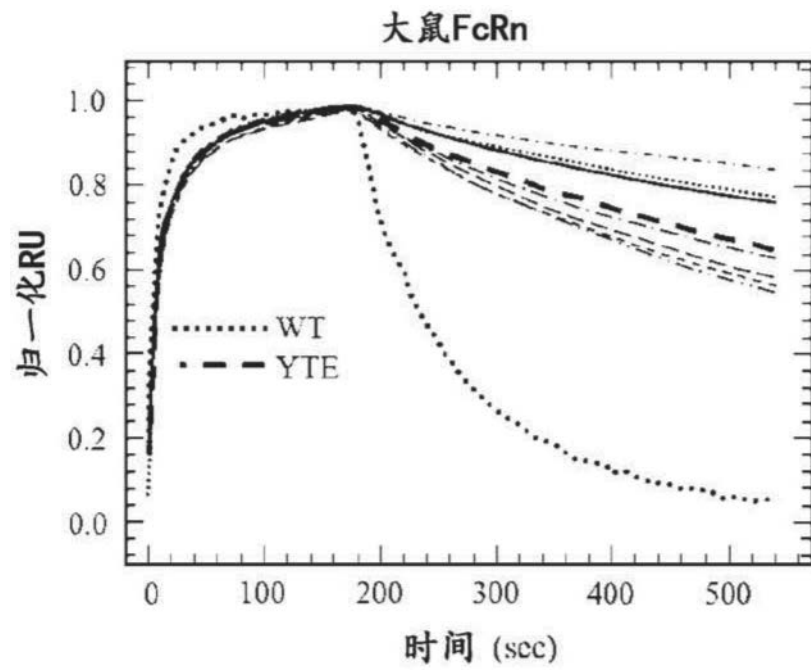


图13B

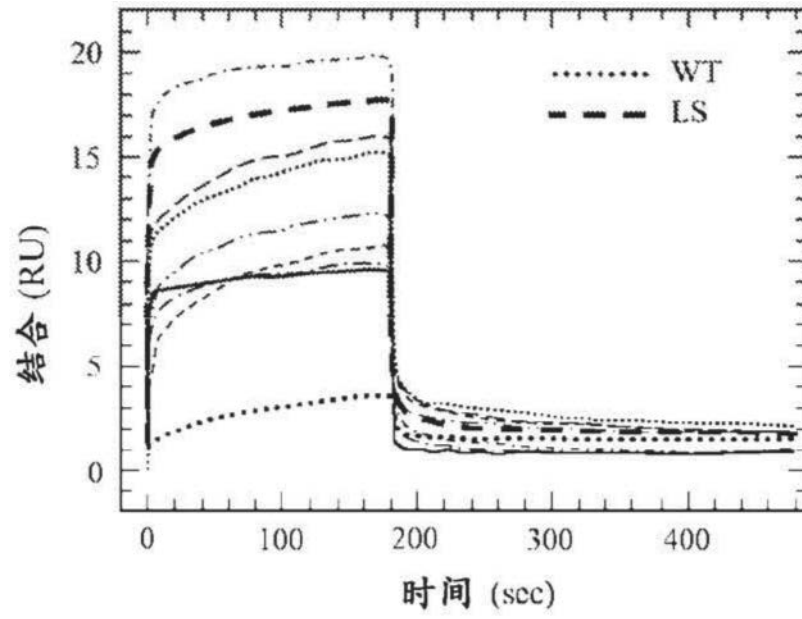


图13C

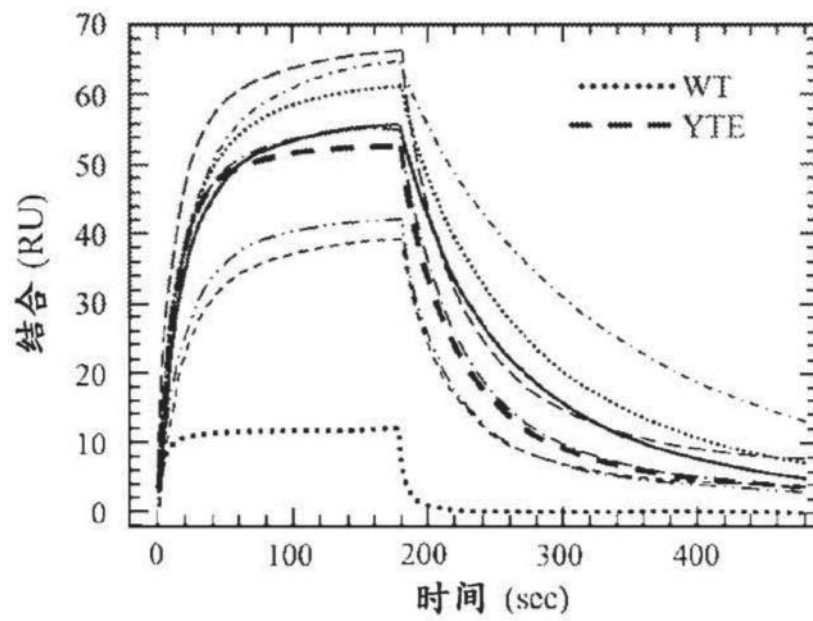


图13D

突变体	位置										
	M252	I253	S254	T256	K288	T307	K322	E380	L432	N434	Y436
	FcRn解离速率的倍数变化										
A											
C											
D											
E								WT			
F											
G											
H											
I		WT									
K					WT		WT				
L									WT		
M	WT										
N										WT	
P											
Q											
R											
S			WT								
T				WT		WT					
V											
W											
Y											WT

图14

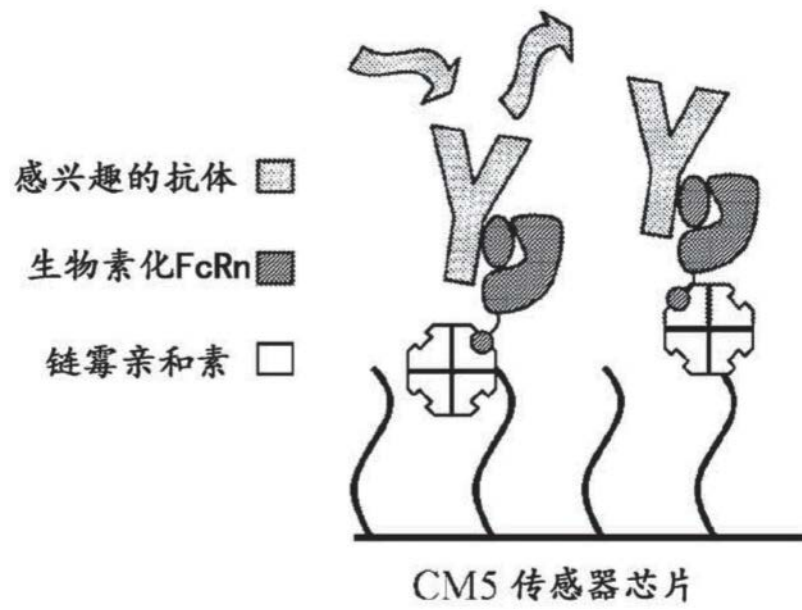


图15A

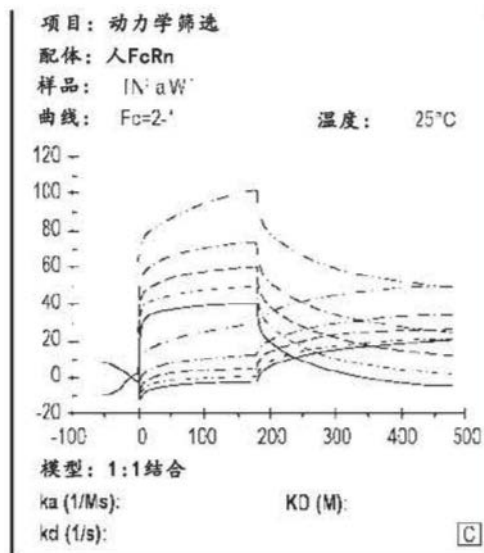
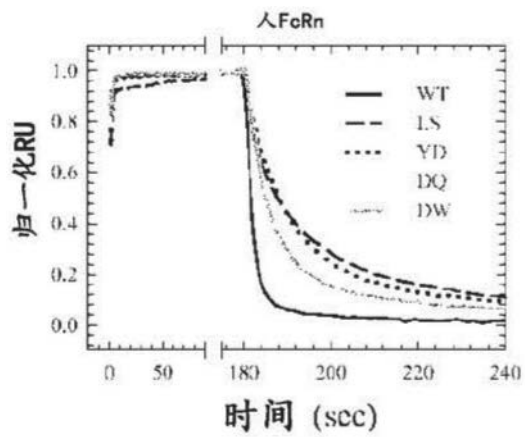
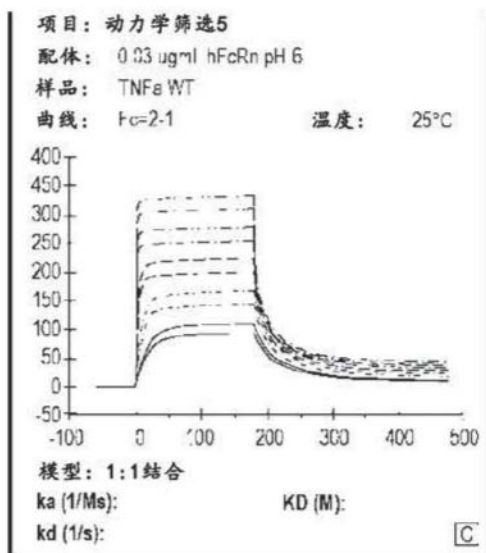


图15B



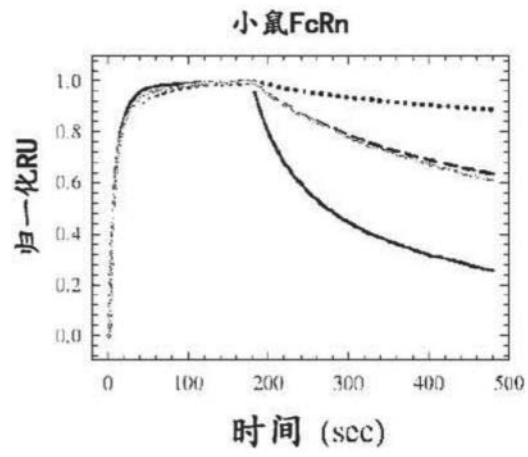


图16B

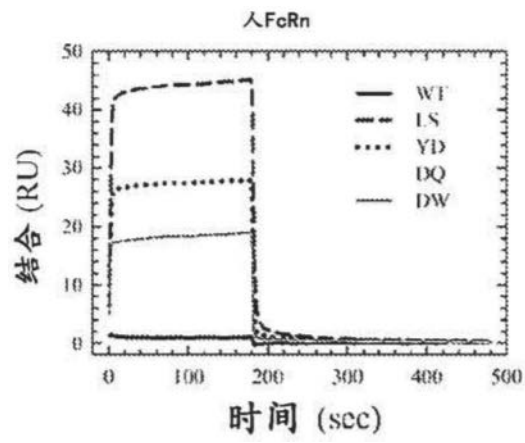


图17A

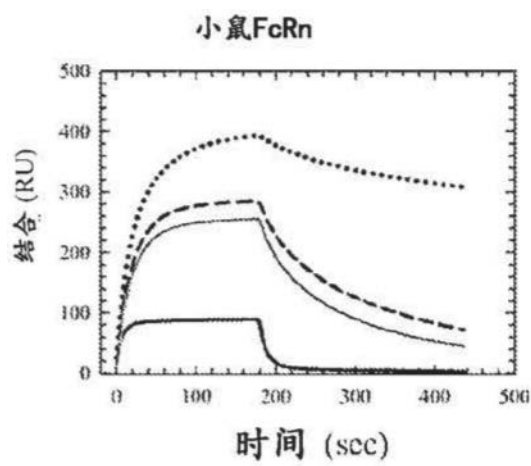


图17B

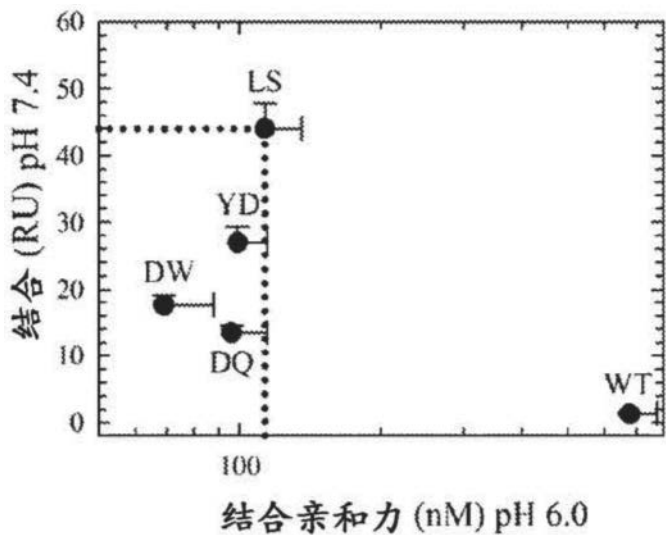
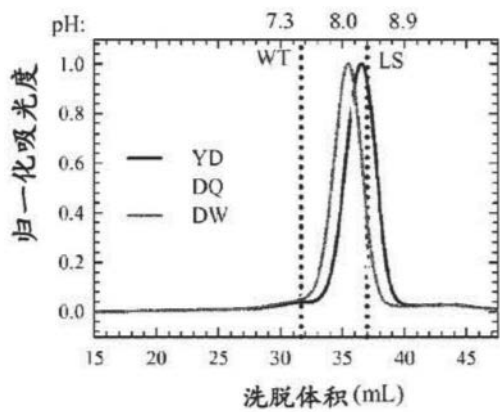
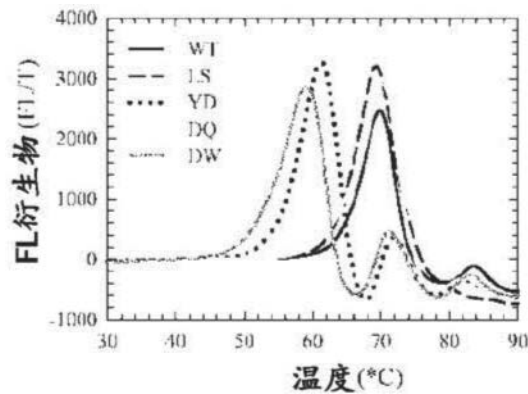


图18



变体	抗体 1	抗体 2
WT	7.37	7.61
LS	8.29	8.32
YD	8.29	8.25
DQ	7.92	8.06
DW	7.92	8.11

图19



变体	抗体 1	抗体 2
WT	69.0	69.3
LS	68.5	69.0
YD	59.6	60.5
DQ	67.9	69.3
DW	57.8	58.1

图20

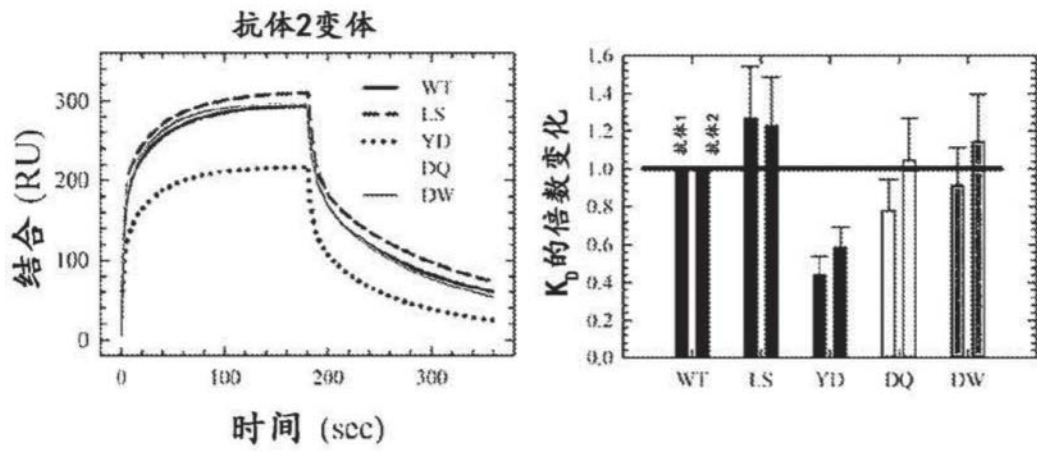


图21

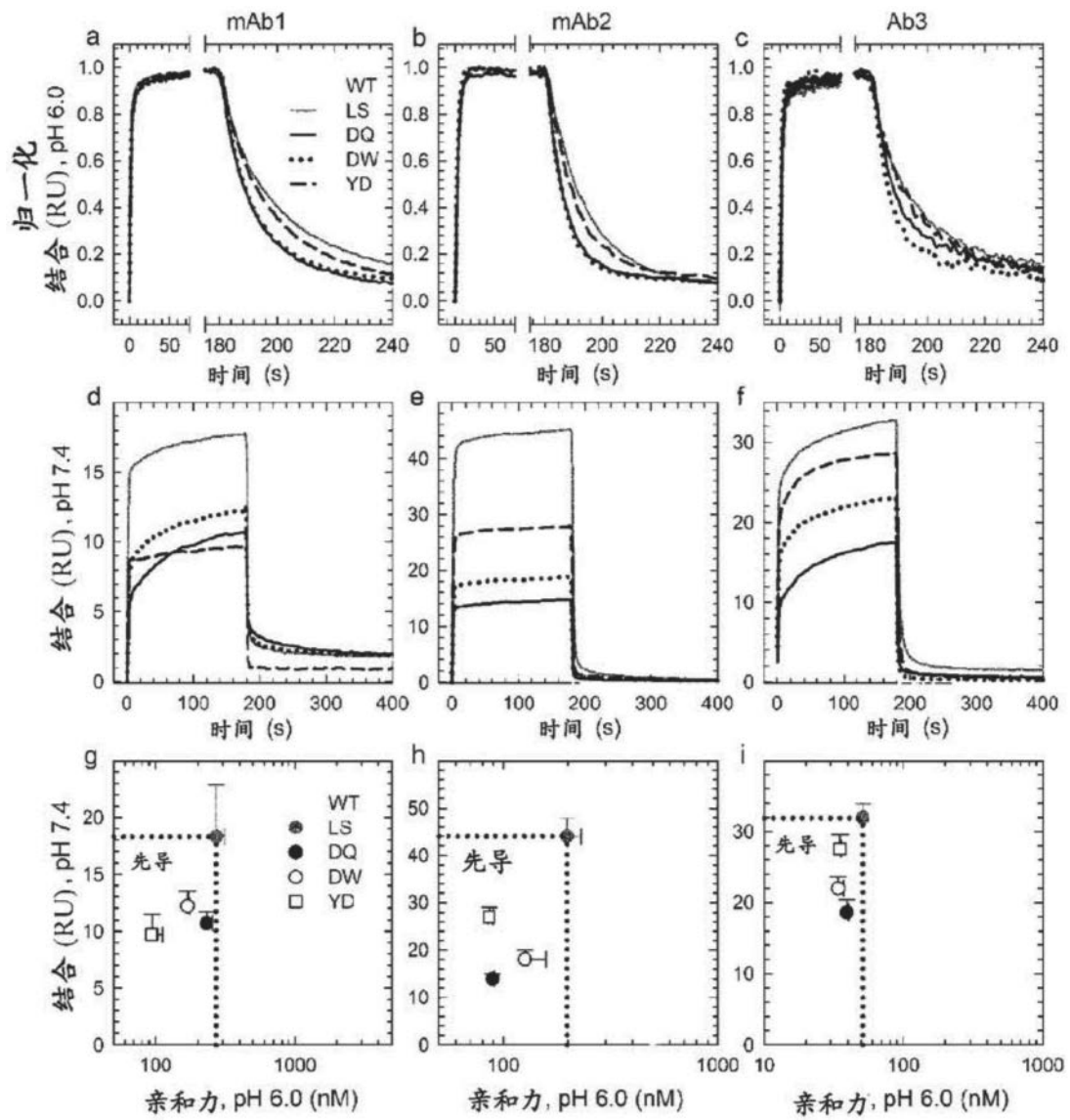


图22

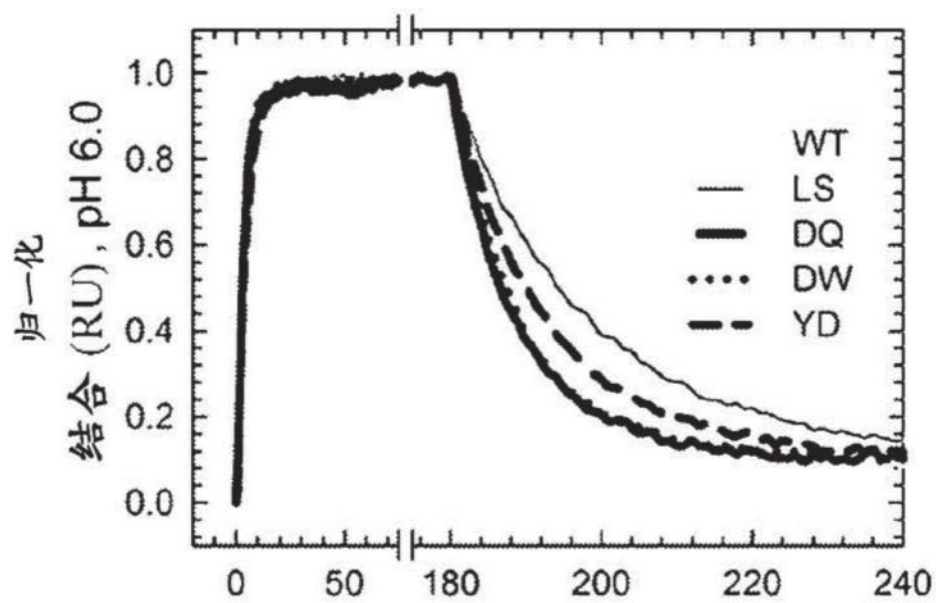


图23A

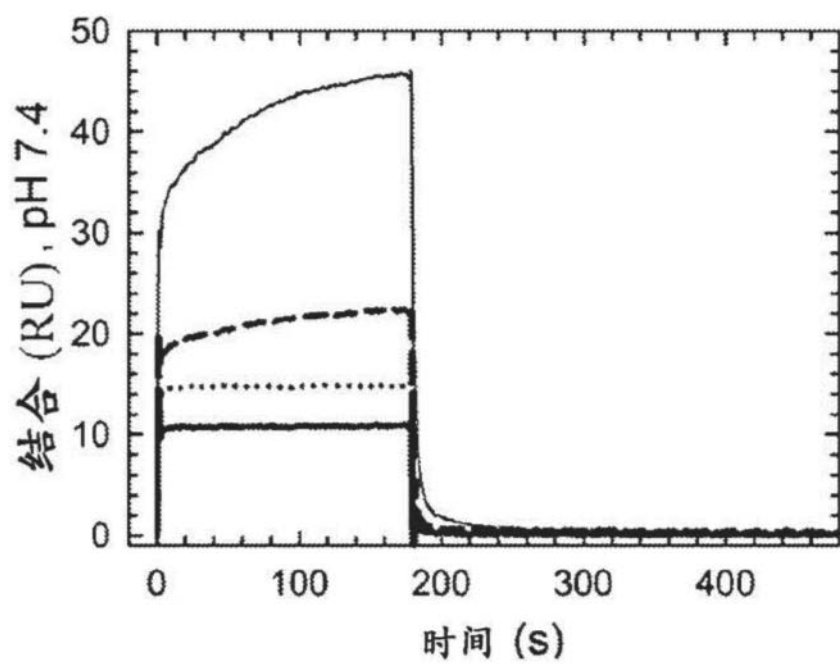


图23B

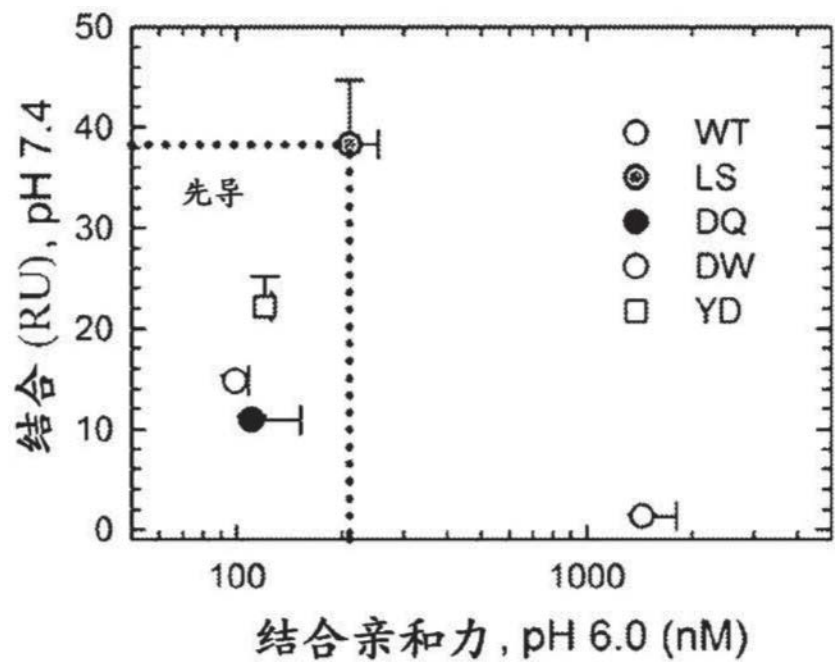


图23C

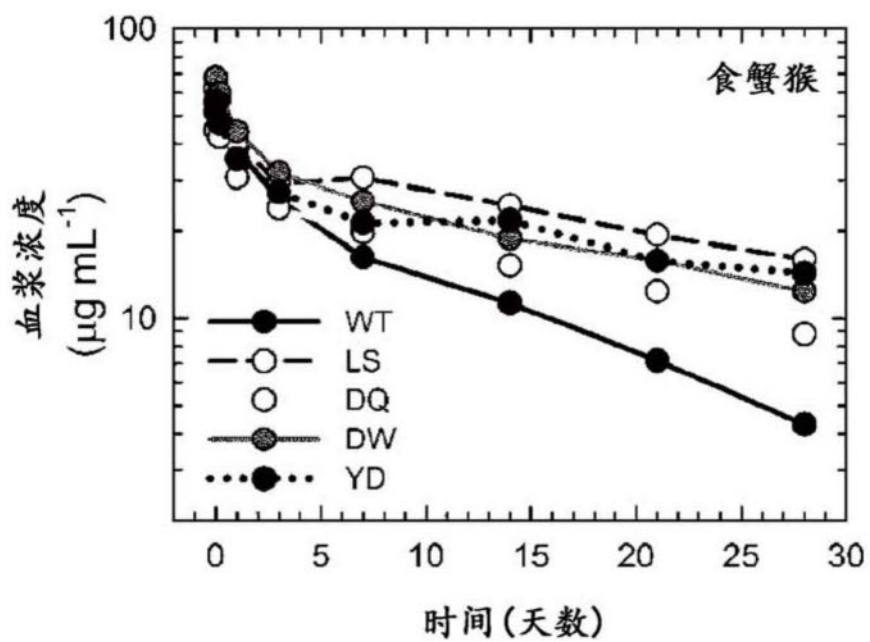


图24A

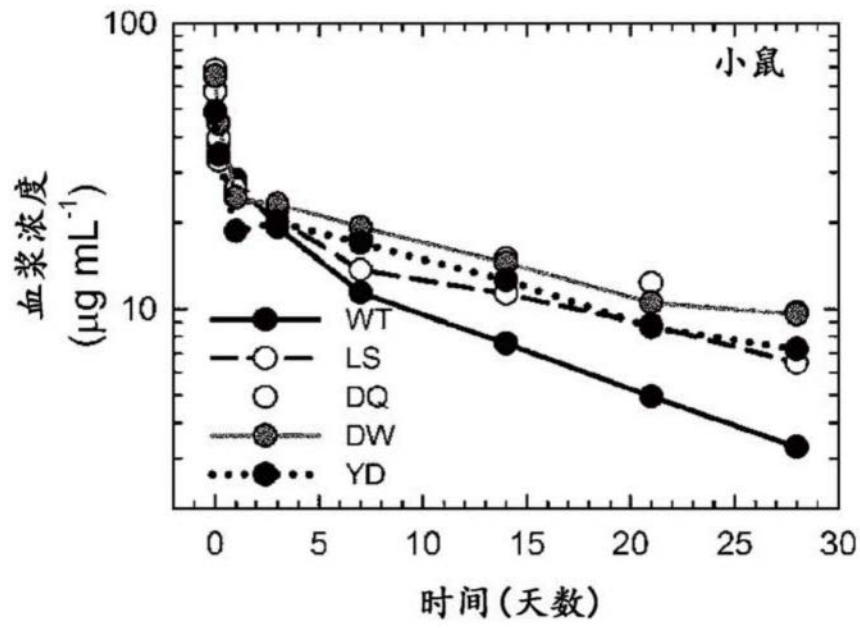


图24B

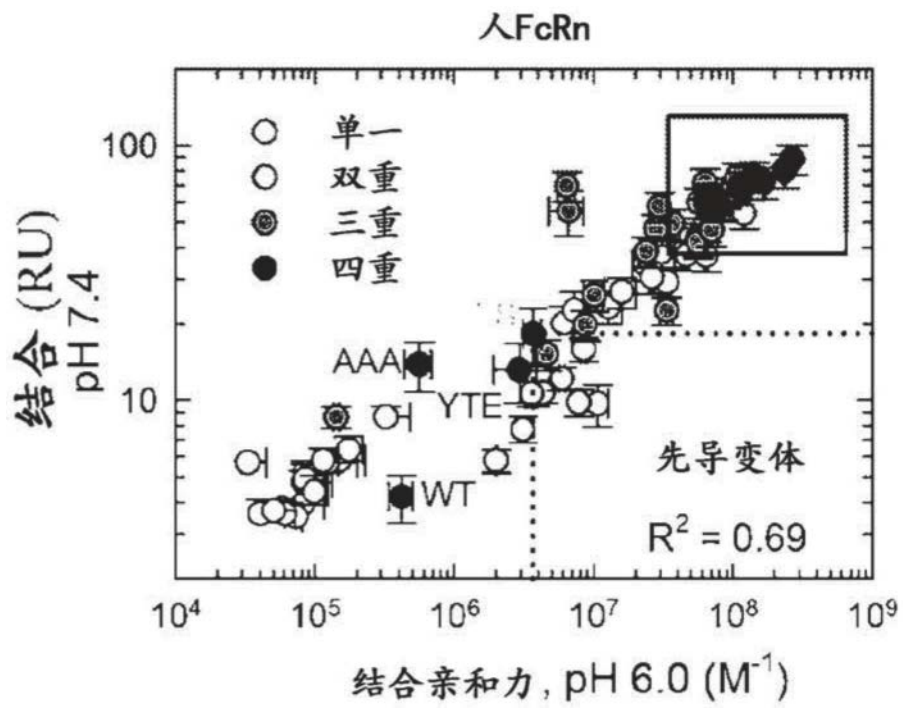


图25

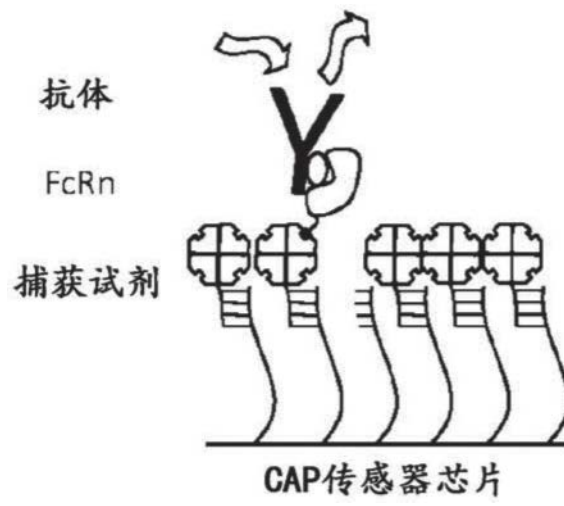


图26

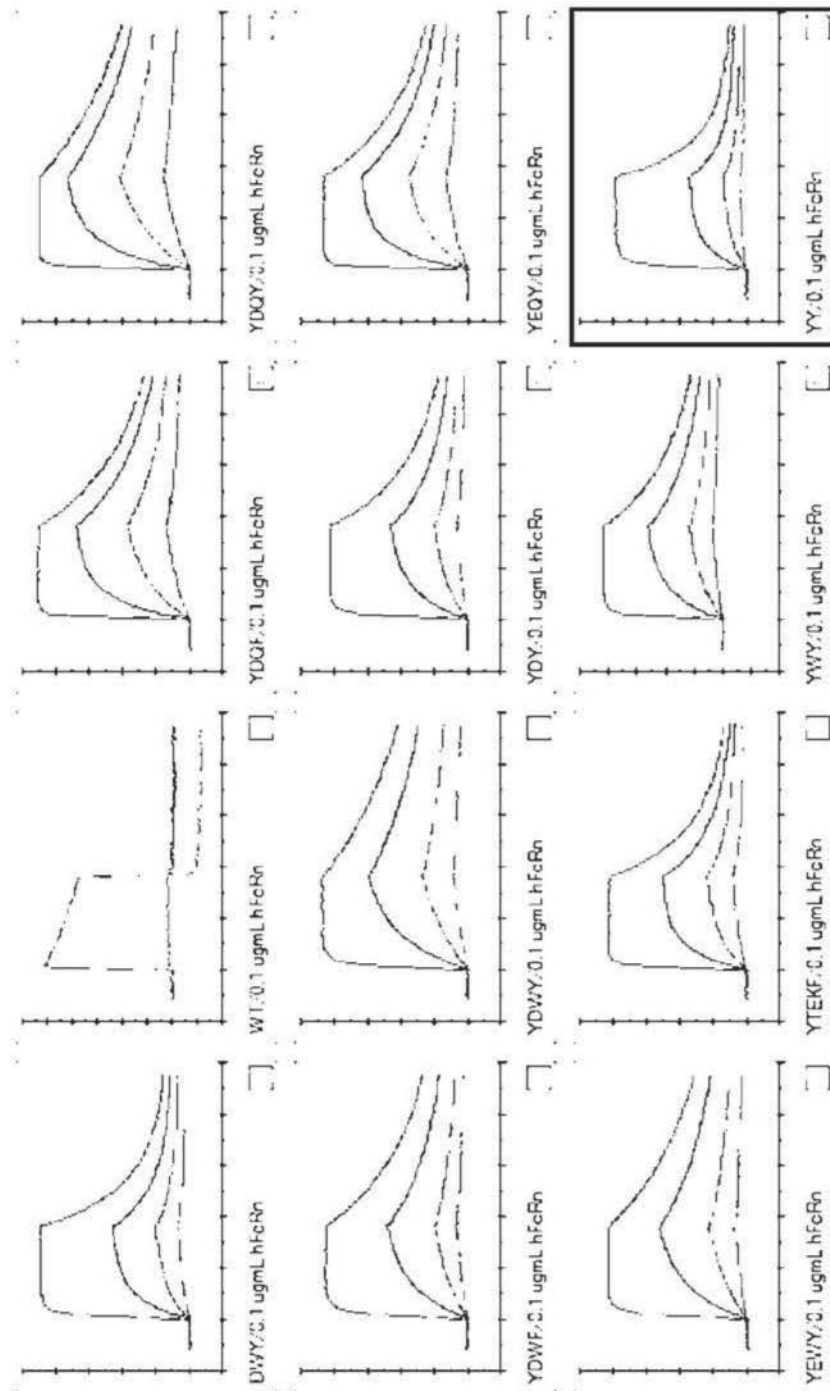


图27

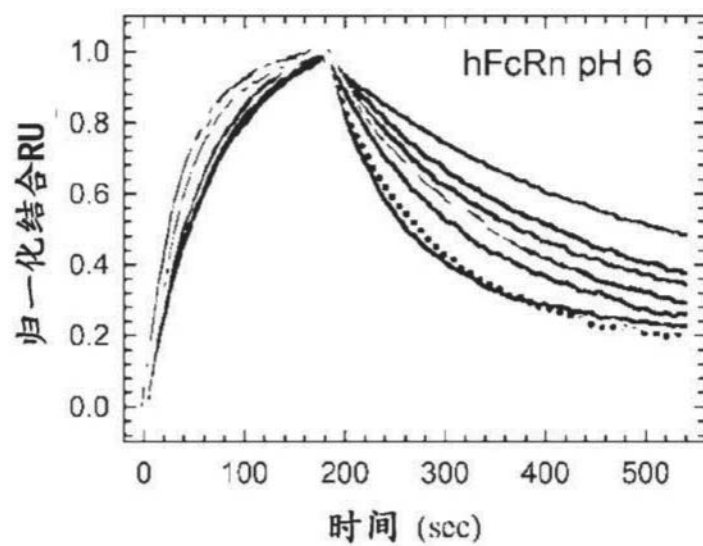


图28A

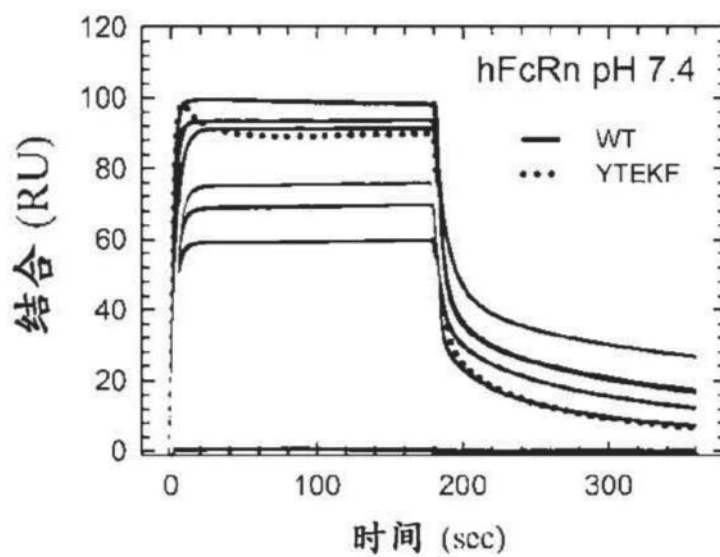


图28B

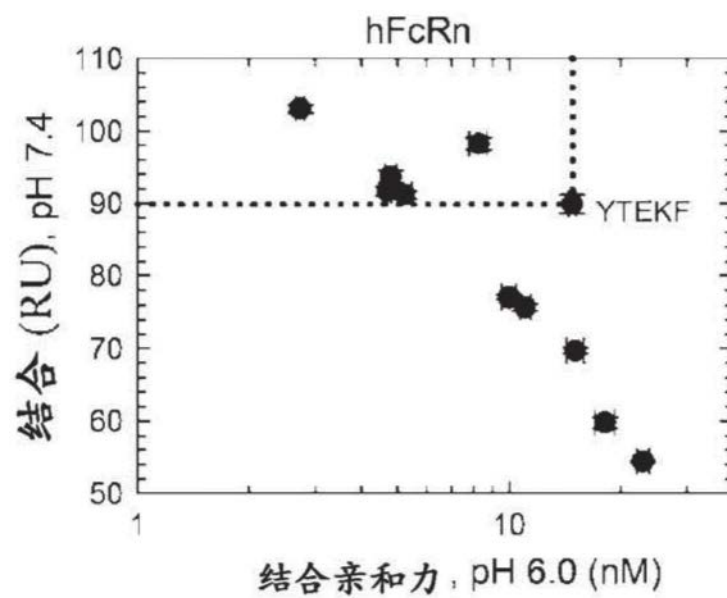


图29