



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116867514 A

(43) 申请公布日 2023. 10. 10

(21) 申请号 202180091688.7

(22) 申请日 2021.12.10

(30) 优先权数据

63/123,915 2020.12.10 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.07.21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/062951 2021.12.10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/125986 EN 2022.06.16

(71) 申请人 英温拉公司

地址 美国威斯康星州

(72) 发明人 J·H·戴维斯 N·M·马歇尔

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

专利代理师 陈文平

(51) Int.Cl.

A61K 39/00 (2006.01)

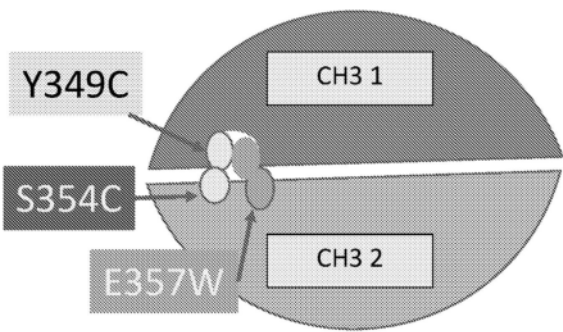
权利要求书4页 说明书28页 附图19页

(54) 发明名称

用于异二聚化的正交突变

(57) 摘要

提供了具有驱动异二聚化的正交突变的异二聚化结构域,特别是异二聚化抗体CH3结构域,包含此类异二聚化结构域的异二聚体多肽,以及包含此类异二聚体多肽的抗体构建体。



1. 一种异二聚化蛋白质,其包含:
第一多肽链和第二多肽链,
其中
 - a) 所述第一多肽链包含第一CH3结构域,和所述第二多肽链包含第二CH3结构域,
 - b) 所述第一CH3结构域的Y349被半胱氨酸(C)置换(Y349C),
 - c) 所述第二CH3结构域的S354被半胱氨酸(C)置换(S354C),以及
 - d) 所述第二CH3结构域的E357被疏水性或芳族氨基酸置换,其中根据E₀索引对位置进行编号。
2. 根据权利要求1所述的异二聚化蛋白质,其中所述疏水性氨基酸残基选自以下:丙氨酸(A)、异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、脯氨酸(P)和缬氨酸(V)。
3. 根据权利要求1或权利要求2所述的异二聚化蛋白质,其中所述第二CH3结构域的E357被疏水性氨基酸置换。
4. 根据权利要求3所述的异二聚化蛋白质,其中所述疏水性氨基酸残基是甲硫氨酸(M)(E357M)。
5. 根据权利要求1或权利要求2所述的异二聚化蛋白质,其中所述芳族氨基酸残基选自以下:组氨酸(H)、色氨酸(W)、苯丙氨酸(F)和酪氨酸(Y)。
6. 根据权利要求1、2或5中任一项所述的异二聚化蛋白质,其中E357被芳族氨基酸置换。
7. 根据权利要求6所述的异二聚化蛋白质,其中所述芳族氨基酸残基是色氨酸(W)(E357W)。
8. 根据权利要求1-7中任一项所述的异二聚化蛋白质,其中所述第二CH3结构域的S364被选自以下的氨基酸残基置换:丙氨酸(A)、天冬氨酸(D)、谷氨酸(E)、组氨酸(H)、赖氨酸(K)、亮氨酸(L)、天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、精氨酸(R)、苏氨酸(T)、色氨酸(W)和酪氨酸(Y)。
9. 根据权利要求1-8中任一项所述的异二聚化蛋白质,其中所述第二CH3结构域的S364被精氨酸(R)置换(S364R)。
10. 根据权利要求1-7中任一项所述的异二聚化蛋白质,其中所述第一CH3结构域的K370被选自以下的氨基酸残基置换:天冬氨酸(D)、谷氨酸(E)、苯丙氨酸(F)、组氨酸(H)、甲硫氨酸(M)、天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、精氨酸(R)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、色氨酸(W)和酪氨酸(Y)。
11. 根据权利要求10所述的异二聚化蛋白质,其中所述第一CH3结构域的K370被精氨酸(R)置换(K370R)。
12. 根据权利要求1-11中任一项所述的异二聚化蛋白质,其中每个CH3结构域独立地选自人IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1或IgA2 CH3结构域。
13. 根据权利要求1-11中任一项所述的异二聚化蛋白质,其中两个CH3结构域相同地选自人IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1或IgA2 CH3结构域。
14. 根据权利要求13所述的异二聚化蛋白质,其中两个CH3结构域都是人IgG1结构域。
15. 根据权利要求13所述的异二聚化蛋白质,其中两个CH3结构域都是人IgG4结构域。
16. 根据权利要求1-15中任一项所述的异二聚化蛋白质,其中在所述第一或第二CH3结

构域中没有另外的工程化突变。

17. 根据权利要求1-15中任一项所述的异二聚化蛋白质,其中在所述第一和/或第二CH3结构域中有至少一个另外的工程化突变。

18. 根据权利要求17所述的异二聚化蛋白质,其中所述至少一个另外的工程化突变中的至少一个是所述第一CH3结构域中的杵突变和所述第二CH3结构域中的臼突变。

19. 根据权利要求17所述的异二聚化蛋白质,其中在所述第一CH3结构域中有臼突变,和在所述第二CH3结构域中有杵突变。

20. 根据权利要求18或权利要求19所述的异二聚化蛋白质,其中所述杵突变是T366W。

21. 根据权利要求18-20中任一项所述的异二聚化蛋白质,其中所述臼突变选自T366S、L368A、F405T或Y407V。

22. 根据权利要求21所述的异二聚化蛋白质,其中所述臼突变是F405T。

23. 根据权利要求17-22中任一项所述的异二聚化蛋白质,其中所述至少一个另外的工程化突变中的至少一个是工程化电荷对。

24. 根据权利要求23所述的异二聚化蛋白质,其中所述第一CH3结构域包含L351D突变,和所述第二CH3结构域包含T366K突变。

25. 根据权利要求23所述的异二聚化蛋白质,其中所述第二CH3结构域包含L351D突变,和所述第一CH3结构域包含T366K突变。

26. 根据权利要求1-25中任一项所述的异二聚化蛋白质,其中所述第一和第二多肽链中的每一个进一步包含免疫球蛋白可变结构域。

27. 根据权利要求1-26中任一项所述的异二聚化蛋白质,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:17的氨基酸序列。

28. 根据权利要求1-27中任一项所述的异二聚化蛋白质,其中所述第二多肽包含SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:18的氨基酸序列。

29. 根据权利要求26所述的异二聚化蛋白质,其中所述第一和第二多肽链两者均包含V_H结构域。

30. 根据权利要求26所述的异二聚化蛋白质,其中

(a) 所述第一多肽链包含V_H结构域,和所述第二多肽链包含V_L结构域,或

(b) 所述第一多肽链包含V_L结构域,和所述第二多肽链包含V_H结构域,以及

其中所述第一和第二多肽的可变结构域缔合以形成第一抗原结合位点(ABS),且所述异二聚化蛋白质形成抗体构建体。

31. 根据权利要求30所述的抗体构建体,其中包含所述V_H结构域的所述多肽链进一步包含CH2结构域和第三CH3结构域,其中所述结构域从N末端至C末端如下排序,

a) V_H-第一CH3-CH2-第三CH3,

b) V_H-第二CH3-CH2-第三CH3,

c) V_H-第三CH3-CH2-第一CH3,或

d) V_H-第三CH3-CH2-第二CH3。

32. 根据权利要求31所述的抗体构建体,其中包含所述V_H结构域的所述多肽链的结构域从N末端至C末端如下排序,

a) V_H-第一CH3-CH2-第三CH3,或

b) V_H -第二CH3-CH2-第三CH3。

33. 根据权利要求30所述的抗体构建体, 其中包含所述 V_L 结构域的所述多肽链进一步包含CH2结构域和第三CH3结构域, 其中所述结构域从N末端至C末端如下排序,

	<u>结构域A</u>	-	<u>结构域B</u>	-	<u>结构域D</u>	-	<u>结构域E</u>
a)	V_L	-	第一CH3	-	CH2	-	第三CH3, 或
b)	V_L	-	第二CH3	-	CH2	-	第三CH3, 或
c)	V_L	-	第三CH3	-	CH2	-	第一CH3, 或
d)	V_L	-	第三CH3	-	CH2	-	第二CH3。

34. 根据权利要求33所述的抗体构建体, 其中包含所述 V_L 结构域的所述多肽链的结构域从N末端至C末端如下排序:

	<u>结构域A</u>	-	<u>结构域B</u>	-	<u>结构域D</u>	-	<u>结构域E</u>
a)	V_L	-	第一CH3	-	CH2	-	第三CH3, 或
b)	V_L	-	第二CH3	-	CH2	-	第三CH3。

35. 根据权利要求34所述的抗体构建体, 其中包含所述 V_L 结构域的所述多肽链和包含所述 V_H 结构域的所述多肽链的结构域从N末端至C末端分别如下排序:

a)

第一多肽链

<u>结构域A</u>	-	<u>结构域B</u>	-	<u>结构域D</u>	-	<u>结构域E</u>
V_L	-	第一CH3	-	CH2	-	第三CH3

第二多肽链

结构域F-结构域G

V_H -第二CH3, 或

b)

第一多肽链

<u>结构域A</u>	-	<u>结构域B</u>	-	<u>结构域D</u>	-	<u>结构域E</u>
V_L	-	第二CH3	-	CH2	-	第三CH3

第二多肽链

结构域F-结构域G

V_H -第一CH3。

36. 根据权利要求35所述的抗体构建体, 其进一步包含第三多肽链和第四多肽链, 其中:

(a) 所述第三多肽链包含结构域H、结构域I、结构域J和结构域K, 其中所述结构域以H-I-J-K取向从N末端至C末端排列, 且其中结构域H具有可变区结构域氨基酸序列, 结构域I具有恒定区结构域氨基酸序列, 结构域J具有CH2氨基酸序列, 和K具有恒定区结构域氨基酸序列;

(b) 所述第四多肽链包含结构域L和结构域M, 其中所述结构域以L-M取向从N末端至C末端排列, 且其中结构域L具有可变区结构域氨基酸序列, 和结构域M具有恒定区结构域氨基酸序列;

(c) 所述第三和第四多肽通过形成第二抗原结合位点 (ABS) 的H和L结构域之间的相互作用以及I和M结构域之间的相互作用而缔合; 以及

(d) 所述第一和第三多肽通过D和J结构域之间的相互作用以及E和K结构域之间的相互作用而缔合。

37. 根据权利要求36所述的抗体构建体, 其中:

结构域H是 V_L 结构域;

结构域I是 C_L 结构域;

结构域J是CH2结构域; 以及

结构域K是第四CH3结构域。

38. 根据权利要求37所述的抗体构建体, 其中:

结构域L是 V_H 结构域; 以及

结构域M是CH1结构域。

用于异二聚化的正交突变

[0001] 1. 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2020年12月10日提交的美国临时申请No. 63/123,915的权益和优先权,其全部内容通过引用并入本文。

[0003] 2. 序列表

[0004] 本申请含有通过EFS-Web提交的序列表,在此将其全部内容通过引用并入本文。该ASCII副本在202X年XX月创建,被命名为XXXXX_sequencelisting.txt,并且大小为XXX字节。

3. 背景技术

[0005] 蛋白质异二聚体在细胞内的正确组装需要蛋白质:蛋白质相互作用,其有利于构成分多肽链的异二聚化而不是同源二聚化。驱动不同多肽链的特异性缔合的需要随着蛋白质中多肽数目的增加而增加。例如,具有两条不同重链和两条不同轻链的二价双特异性抗体的正确组装需要第一轻链与第一重链、第二轻链与第二重链和第一重链与第二重链的特异性异二聚化。有效组装要求驱动各种异二聚体缔合的蛋白质:蛋白质相互作用对于每个这样的异二聚体对是不同的。

[0006] 已经开发了驱动某些工程化抗体结构域的优先异二聚化的多种正交突变,包括孔中杵臼(KIH)突变,参见例如美国专利号5,731,168;5,807,706;和5,821,333;电荷对突变,参见例如美国专利号9,358,286;二硫化物稳定的KIH突变,参见例如美国专利号7,951,917;8,642,745和9,409,989;以及其他。

[0007] 本领域需要进一步的方法来驱动特异性异二聚化和多聚化,以单独使用和与已知的异二聚化特征组合使用。

4. 发明内容

[0008] 我们已经工程化了新的正交突变,其能够驱动多个多肽链的特异性异二聚化,促进多肽的高保真度缔合,特别适用于多价、多特异性抗体构建体。

5. 附图说明

[0009] 参考以下描述和附图,本发明的这些与其他特征、方面和优点将变得更好理解,其中:

[0010] 图1A-1E示出了具有本发明的示例性正交突变的异二聚体CH3结构域。图1A展示了没有额外突变的二聚化CH3结构域。图1B展示了具有额外的杵臼突变的二聚化CH3结构域,其中杵在与E357W突变相同的结构域中。图1C展示了具有额外的杵臼突变的二聚化CH3结构域,其中杵在与E357W突变相对的结构域中。图1D展示了CH3结构域中与具有E357W突变的结构域相对的进一步的“级联”突变。图1E展示了含有E357W突变的CH3结构域中的进一步的“级联”突变。

[0011] 图2呈现了本文所述的各种二价抗体构建体的示意性结构,并有各自的命名惯例。

[0012] 图3呈现了展示示例性二价抗体构建体“BC1”的结构域内容的示意图。本文所述的正交突变可以被进一步工程化到E:K配对结构域。

[0013] 图4呈现了展示示例性二价抗体构建体“BC6”的结构域内容的示意图。本文所述的正交突变可以被进一步工程化到E:K配对结构域。

[0014] 图5呈现了展示示例性二价抗体构建体“BC28”的结构域内容的示意图。本文所述的正交突变可以被进一步工程化到B:G配对结构域或E:K配对结构域。

[0015] 图6呈现了展示示例性二价抗体构建体“BC44”的结构域内容的示意图。本文所述的正交突变可以被进一步工程化到B:G配对结构域或E:K配对结构域。

[0016] 图7呈现了展示示例性二价抗体构建体“BC-96”的结构域内容的示意图,其包括本文所述的各种正交突变。

[0017] 图8A-8D展示了在BC96和各种替代物的CH1纯化之后的尺寸排阻色谱(SEC)分析的结果。图8A展示了与BC96不同的变体的结果,其中结构域B缺少K370突变,结构域G缺少E357突变。图8B展示了与BC96不同之处在于结构域B缺乏K370突变的变体的结果。图8C展示了与BC96不同之处在于结构域G缺少E357突变的变体的结果。图8D展示BC96的结果,其在结构域B中含有K370R突变且在结构域G中含有E357W突变。

[0018] 图9呈现了为评价单个突变赋予的正交性程度而创建的构建体的示意图。显示对应于所需产物和污染物的条带的代表性SDS-PAGE凝胶与同源二聚体污染物的示意图一起被展示。

[0019] 图10A-10C展示了各种构建体的蛋白A纯化后的尺寸排阻色谱(SEC)和SDS-PAGE分析的结果。图10A展示了第一CH3结构域含有S354C突变且第二相对的CH3结构域含有Y349C突变的构建体的结果。图10B展示了第一CH3结构域含有S354C和E357W突变且第二相对的CH3结构域含有Y349C突变的构建体的结果。图10C展示了第一CH3结构域含有S354C、E357W和S364R突变且第二相对的CH3结构域含有Y349C突变的构建体的结果。

[0020] 图11A-11B展示了各种构建体的CH1纯化后的SEC和SDS-PAGE分析结果。图11A展示了第一CH3结构域含有S354C和E357W突变且第二相对的CH3结构域含有Y349C突变的构建体的结果。图11B展示了第一CH3结构域含有S354C、E357W和S364R突变且第二相对的CH3结构域含有Y349C突变的构建体的结果。

6. 具体实施方式

[0021] 6.1. 定义

[0022] 除非本文另有定义,本文使用的所有技术和科学术语具有本发明所属领域技术人员通常理解的含义。

[0023] 如本文所用,以下术语具有下文赋予其的含义。

[0024] “抗原结合位点”(“ABS”)是指特异性识别或结合给定抗原或表位的抗体构建体的区域。据说ABS和包含这种ABS的抗体构建体“识别”ABS特异性结合的表位(或更一般地,抗原),并且据说表位(或更一般地,抗原)是ABS的“识别特异性”或“结合特异性”。

[0025] 据说ABS以特定的亲和力与其特异性抗原或表位结合。如本文所述,“亲和力”是指一个分子与另一个分子之间的非共价分子间力的相互作用强度。亲和力,即相互作用的强度,可以被表示为解离平衡常数(K_D),其中较低的 K_D 值表示分子之间更强的相互作用。抗体

构建体的 K_D 值通过本领域熟知的方法测量,包括但不限于生物层干涉法(例如Octet/FORTEBIO®)、表面等离子共振(SPR)技术(例如Biacore®)和细胞结合测定。除非另有说明,为了本文的目的,亲和力是使用Octet/FORTEBIO®通过生物层干涉法测量的解离平衡常数。

[0026] 如本文所用的“特异性结合”是指ABS与其同源抗原或表位之间的亲和力,其中 K_D 值低于 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M或 10^{-10} M。

[0027] 如本文所述的抗体构建体中ABS的数目定义了抗体构建体的“效价”。具有单个ABS的抗体构建体是“单价的”。具有多个ABS的抗体构建体被称为“多价的”。具有两个ABS的多价抗体构建体是“二价的”。具有三个ABS的多价抗体构建体是“三价的”。具有四个ABS的多价抗体构建体是“四价的”。

[0028] 在抗体构建体的各种多价实施方式中,所有的多个ABS具有相同的识别特异性。这种构建体是“单特异性的”“多价的”抗体构建体。在其他多价实施方式中,多个ABS中的至少两个具有不同的识别特异性。这样的抗体构建体是多价的和“多特异性的”。在ABS共同具有两种识别特异性的多价实施方式中,结合分子是“双特异性的”。在ABS共同具有三种识别特异性的多价实施方式中,结合分子是“三特异性的”。

[0029] 在多价实施方式中,其中ABS共同具有对相同抗原上存在的不同表位的多种识别特异性,抗体构建体是“多表位的”。ABS共同识别相同抗原上的两个表位的多价实施方式是“双表位的”。

[0030] 在各种多价实施方式中,抗体构建体的多价改善了结合分子对特定靶标的亲合力。如本文所述,“亲合力”是指两个或更多个分子(例如针对特定靶标的多价结合分子)之间相互作用的总强度,其中亲合力是由多个ABS的亲和力提供的相互作用的累积强度。如上所述,可以通过与用于测定亲和力相同的方法测定亲合力。在某些实施方式中,结合分子对特定靶标的亲合力使得相互作用是特异性结合相互作用,其中两个分子之间的亲合力具有低于 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、或 10^{-10} M的 K_D 值。在某些实施方式中,结合分子对特定靶标的亲合力具有使得相互作用是特异性结合相互作用的 K_D 值,其中单个ABS的一种或多种亲和力不具有足以独立地特异性结合其各自的抗原或表位的 K_D 值。在某些实施方式中,亲合力是由多个ABS对共享的特异性靶标或复合物上的单独抗原(如在单个细胞上发现的单独抗原)的亲和力提供的相互作用的累积强度。在某些实施方式中,亲合力是由多个ABS对共享的单个抗原上的单独表位的亲和力提供的相互作用的累积强度。

[0031] 如本文所用的“B-体(B-Body)”是指如图2所示的抗体构建体,其包含第一和第二多肽链,其中:(a)第一多肽链包含结构域A、结构域B、结构域D和结构域E,其中结构域以A-B-D-E取向从N端到C端排列,并且其中结构域A具有VL氨基酸序列,结构域B具有CH3氨基酸序列,结构域D具有CH2氨基酸序列,结构域E具有恒定区结构域氨基酸序列;(b)第二多肽链包含结构域F和结构域G,其中结构域以F-G取向从N末端至C末端排列,其中结构域F具有VH氨基酸序列,结构域G具有CH3氨基酸序列;和(c)第一和第二多肽通过A和F结构域之间的相互作用与B和G结构域之间的相互作用缔合形成抗体构建体。B-体被更详细地描述于US2018/0118811和W02019/204522中,其公开内容通过引用整体并入本文。

[0032] 如本文所述的“正交修饰”或同义的“正交突变”是抗体结构域的氨基酸序列中的

一个或多个工程化突变,与不存在正交修饰的第一和第二结构域的结合相比,其改变具有正交修饰的第一结构域与具有互补正交修饰的第二结构域的结合亲和力。在一些实施方式中,与不存在正交修饰的第一和第二结构域的结合相比,正交修饰降低了具有正交修饰的第一结构域与具有互补正交修饰的第二结构域的结合亲和力。在一些实施方式中,与不存在正交修饰的第一和第二结构域的结合相比,正交修饰不改变具有正交修饰的第一结构域对具有互补正交修饰的第二结构域的结合亲和力。在优选的实施方式中,与不存在正交修饰的第一和第二结构域的结合相比,正交修饰增加了具有正交修饰的第一结构域与具有互补正交修饰的第二结构域的结合亲和力。在某些优选实施方式中,正交修饰降低了具有正交修饰的结构域对缺乏互补正交修饰的结构域的亲和力。

[0033] 在特定的实施方式中,如下文更详细描述,正交修饰包括但不限于工程化的二硫键、杵臼突变和电荷对突变。在特定的实施方式中,正交修饰包括选自但不限于工程化二硫键、杵臼突变和电荷对突变的正交修饰的组合。

[0034] 6.2. 其他解释惯例

[0035] 除非另有说明,本文所有提及的“序列”是指氨基酸序列。“内源序列”或“原生序列”是指包括上下文规定的核酸和氨基酸序列在内的的任何序列,其源自生物体、组织或细胞且未经人工修饰或突变。

[0036] 除非另外指明,否则抗体恒定区残基编号依据如描述于以下的Eu索引:www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html#refs,其在此通过引用整体并入本文,并根据其在内源恒定区序列中的位置鉴定残基,而不管残基在本文所述抗体构建体的链中的物理位置。

[0037] 除非另有说明,所有提及的互补决定区(CDR)是Kabat定义的CDR。

[0038] 当关于多肽链(例如,“第一”多肽链、“第二”多肽链等多肽“链1”、“链2”等)被使用时,术语“第一”,“第二”,“第三”,“第四”等,在本文中被用作形成多聚体分子的特定多肽链的唯一标识符,并且不旨在表示抗体构建体内不同多肽链的顺序或量。

[0039] 当关于CH3结构域被使用时,术语“第一”、“第二”、“第三”、“第四”等用于指定特定的结构域,并且不旨在表示结构域的顺序或数量。

[0040] 在本公开中,“包含/含有(comprises/comprising/containing)”、“具有(having)”、“包括(includes/including)”及其语言变体具有美国专利法中赋予它们的含义,允许存在除明确列举的那些之外的另外的组分。

[0041] 本文提供的范围被理解为该范围内的所有值的简写,包括所列举的端点。例如,1至50的范围被理解为包括以下的任何数字、数字的组合或子范围:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49和50。

[0042] 除非明确说明或从上下文中显而易见,否则如本文所用的术语“或”被理解为包括在内的。除非明确说明或从上下文中显而易见,否则如本文所用,术语“一”、“一个”和“该”被理解为单数或复数。

[0043] 除非具体说明或从上下文中显而易见,如本文所用的术语“约”被理解为在本领域的正常公差范围内,例如在平均值的2个标准偏差内。约可以被理解为在所述值的10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%或0.01%内。除非另外指

明,否则“约”指在所述值的10%内。

[0044] 6.3.异二聚化蛋白质

[0045] 在第一方面,提供了异二聚化蛋白质。异二聚化蛋白质包含第一多肽链和第二多肽链,其中

[0046] a) 第一多肽链包含第一CH3结构域,和第二多肽链包含第二CH3结构域,

[0047] b) 第一CH3结构域的Y349被半胱氨酸(C)置换(Y349C),

[0048] c) 第二CH3结构域的S354被半胱氨酸(C)置换(S354C),以及

[0049] d) 第二CH3结构域的E357被疏水性或芳族氨基酸置换,

[0050] 其中依据Eu索引对位置进行编号。

[0051] 在各种实施方式中,疏水性氨基酸残基选自以下:丙氨酸(A)、异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、脯氨酸(P)和缬氨酸(V)。在各种实施方式中,芳族氨基酸残基选自以下:组氨酸(H)、色氨酸(W)、苯丙氨酸(F)和酪氨酸(Y)。

[0052] 在某些实施方式中,第二CH3结构域的E357被疏水性氨基酸置换。在一个具体的实施方式中,疏水性氨基酸残基是甲硫氨酸(M)(E357M)。

[0053] 在某些实施方式中,第二CH3结构域的E357被芳香族氨基酸置换。在具体的实施方式中,芳族氨基酸残基是色氨酸(W)(E357W)。

[0054] 6.3.1.CH3结构域

[0055] 本文所述的异二聚化蛋白质的CH3结构域具有源自天然位于抗体重链C末端的结构域的氨基酸序列,上述突变被工程化到所述结构域中。在多种实施方式中,CH3序列是哺乳动物序列,包括但不限于小鼠、大鼠、仓鼠、兔、犬、猫、骆驼、驴、山羊和人序列。在优选的实施方式中,CH3序列是人序列。在某些实施方式中,CH3序列来自IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgM、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4同种型。在具体的实施方式中,CH3序列来自IgG1同种型。在优选的实施方式中,CH3序列来自IgG1同种型。在一些实施方式中,CH3序列来自IgA同种型。

[0056] 在某些实施方式中,CH3序列是来自IgE或IgM同种型的CH4序列。

[0057] 在某些实施方式中,CH3序列是内源序列。在特定的实施方式中,CH3序列是UniProt登录号P01857的氨基酸224-330。在各种实施方式中,CH3序列是内源CH3序列的片段。在特定的实施方式中,CH3序列具有缺少N末端氨基酸G224和Q225的内源CH3序列。在特定的实施方式中,CH3序列具有缺少C末端氨基酸P328、G329和K330的内源CH3序列。在特定的实施方式中,CH3序列具有同时缺少N末端氨基酸G224和Q225以及C末端氨基酸P328、G329和K330的内源CH3序列。

[0058] 在某些实施方式中,如Stickler等人更详细描述(Genes Immun.2011Apr;12(3):213-221)(其教导的全部内容通过引用并入本文),通过用另一种同种异型的氨基酸替换一种同种异型的特定氨基酸(本文称为同种-同种异型(isoallotype)突变)来工程化CH3序列以降低免疫原性。在特定的实施方式中,G1m1同种异型的特定氨基酸被替换。在一个优选的实施方式中,在CH3序列中产生同种-同种异型突变D356E和L358M。

[0059] 在一些实施方式中,在第一或第二CH3结构域中没有另外的工程化突变。在一些实施方式中,如下所述,CH3序列是具有除上述那些突变之外的一个或多个工程化突变的内源序列。

[0060] 6.3.2.CH3结构域中的另外的工程化正交突变

[0061] 在一些实施方式中,存在工程化到第一和/或第二CH3结构域中的至少一个另外的正交突变。

[0062] 6.3.2.1级联突变

[0063] 在各种实施方式中,第一和/或第二CH3结构域进一步包含由E357突变新产生的突变,例如E357W突变(“级联”突变)。

[0064] 在一些实施方式中,与含有E357突变的CH3结构域相对的CH3结构域进一步包含K370中的突变。在各种实施方式中,赖氨酸(K)突变为A、D、E、F、G、H、I、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y。在特定的实施方式中,赖氨酸(K)突变为D、E、F、H、M、N、Q、R、S、T、W或Y。在具体的实施方式中,突变是K370R。

[0065] 在一些实施方式中,含有E357突变的CH3结构域进一步包含S364中的突变。在各种实施方式中,丝氨酸(S)突变为A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、V、W或Y。在特定的实施方式中,丝氨酸突变为A、D、E、H、K、L、N、Q、R、T、W或Y。在一个优选的实施方式中,丝氨酸突变为R。

[0066] 在一些实施方式中,与含有E357突变的CH3结构域相对的CH3结构域进一步包含K370中的突变,并且含有E357突变的结构域进一步包含S364中的突变。在各种实施方式中,K370突变为D、E、F、H、M、N、Q、R、S、T、W或Y。在具体的实施方式中,突变是K370R。在各种实施方式中,S364突变为A、D、E、H、K、L、N、Q、R、T、W或Y。

[0067] 6.3.2.2杵臼

[0068] 在各种实施方式中,第一和第二CH3结构域进一步包含正交的杵臼(“K-I-H”)突变。

[0069] 如本文所使用的,杵臼突变是改变第一结构域表面的空间特征的突变,使得相对于与不具有互补空间突变的结构域的缔合,第一结构域将优先与具有互补空间突变的第二结构域缔合。在美国专利号5,821,333和美国专利号第8,216,805中更详细地描述了杵臼突变,其各自以其全文被并入本文中。

[0070] 在一些实施方式中,至少一种另外的工程化突变是第一CH3结构域中的杵突变和第二CH3结构域中的臼突变。在一些实施方式中,在第一CH3结构域中有臼突变,和在第二CH3结构域中有杵突变。

[0071] 在某些实施方式中,杵突变是T366W或T366Y。

[0072] 在某些实施方式中,臼突变选自T366S、L368A、F405T、Y407V或Y407T。在一个具体的实施方式中,臼突变是F405T。

[0073] 在某些实施方式中,杵臼突变是第一CH3结构域中的T366W突变和第二CH3结构域中的Y407A突变。在某些实施方式中,杵臼突变是第二CH3结构域中的T366W突变和第一CH3结构域中的Y407A突变。

[0074] 在某些实施方式中,杵臼突变是第一CH3结构域中的T366Y突变和第二结构域中的Y407T突变。在某些实施方式中,杵臼突变是第二CH3结构域中的T366Y突变和第一结构域中的Y407T突变。

[0075] 在某些实施方式中,杵臼突变是第一CH3结构域中的T394W和第二CH3结构域中的F405A。在某些实施方式中,杵臼突变是第二CH3结构域中的T394W和第一CH3结构域中的F405A。

[0076] 在某些实施方式中, 杆臼突变是第一CH3结构域中的T366Y突变和F405A以及第二CH3结构域中的T394W突变和Y407T突变。在某些实施方式中, 杆臼突变是在第二CH3结构域中的T366Y突变和F405A突变以及在第一CH3结构域中的T394W突变和Y407T突变。

[0077] 6.3.2.3 工程化电荷对

[0078] 在各种实施方式中, 第一和第二CH3结构域进一步包含正交电荷对突变。

[0079] 如本文所用, 电荷对突变是影响结构域表面中氨基酸电荷的突变, 使得相对于与不具有互补电荷对突变的结构域的缔合, 结构域将优先与具有互补电荷对突变的第二结构域缔合。在某些实施方式中, 电荷对突变改善了特定结构域之间的正交缔合。电荷对突变被更详细地描述于美国专利号8,592,562中; 9,248,182; 和9,358,286中, 其各自以其全文通过引用被并入本文中。

[0080] 在某些实施方式中, 电荷对突变是第一CH3结构域中的T366K突变和第二CH3结构域中的L351D突变。在某些实施方式中, 电荷对突变是第二CH3结构域中的T366K突变和第一CH3结构域中的L351D突变。

[0081] 6.4. 抗体构建体

[0082] 6.4.1. 可变结构域

[0083] 在各种实施方式中, 异二聚化蛋白质的第一和第二多肽链中的至少一个进一步包含免疫球蛋白可变结构域。

[0084] 在一些实施方式中, 第一和第二多肽链均进一步包含免疫球蛋白可变结构域。

[0085] 在一些实施方式中, 第一和第二多肽链两者均包含 V_H 结构域。在一些实施方式中, 第一和第二多肽链两者均包含 V_L 结构域。

[0086] 在一些实施方式中, 第一多肽链包含 V_H 结构域且第二多肽链包含 V_L 结构域, 或第一多肽链包含 V_L 结构域且第二多肽链包含 V_H 结构域。在这些实施方式中, 第一和第二多肽的可变结构域缔合以形成第一抗原结合位点(ABS), 并且异二聚化蛋白质是抗体构建体。

[0087] 在某些抗体构建体中, 包含 V_H 结构域的多肽链进一步包含CH2结构域和第三CH3结构域, 其中结构域从N末端至C末端如下排序,

[0088] a) V_H -第一CH3-CH2-第三CH3,

[0089] b) V_H -第二CH3-CH2-第三CH3,

[0090] c) V_H -第三CH3-CH2-第一CH3, 或

[0091] d) V_H -第三CH3-CH2-第二CH3。

[0092] 在具体的实施方式中, 包含 V_H 结构域的多肽链的结构域从N末端至C末端如下排序,

[0093] a) V_H -第一CH3-CH2-第三CH3, 或

[0094] b) V_H -第二CH3-CH2-第三CH3。

[0095] 在某些抗体构建体实施方式中, 包含 V_L 结构域的多肽链进一步包含CH2结构域和第三CH3结构域。在具体的实施方式中, 参考图2, 结构域从N末端至C末端如下排序,

- 结构域A - 结构域B - 结构域D - 结构域E
- a) V_L - 第一CH3 - CH2 - 第三CH3, 或
- [0096] b) V_L - 第二CH3 - CH2 - 第三CH3, 或
- c) V_L - 第三CH3 - CH2 - 第一CH3, 或
- d) V_L - 第三CH3 - CH2 - 第二CH3。

[0097] 在具体的实施方式中,参考图2,包含 V_L 结构域的多肽链的结构域从N末端至C末端如下排序:

- 结构域A - 结构域B - 结构域D - 结构域E
- [0098] a) V_L - 第一CH3 - CH2 - 第三CH3, 或
- b) V_L - 第二CH3 - CH2 - 第三CH3。

[0099] 在具体实施方式中,参考图2,包含 V_L 结构域的多肽链和包含 V_H 结构域的多肽链的结构域从N末端至C末端分别如下排序:

[0100] a) 第一多肽链

- 结构域A - 结构域B - 结构域D - 结构域E
- [0101] V_L - 第一CH3 - CH2 - 第三CH3

[0102] 第二多肽链

[0103] 结构域F - 结构域G

[0104] V_H - 第二CH3

[0105] 或

[0106] b) 第一多肽链

- 结构域A - 结构域B - 结构域D - 结构域E
- [0107] V_L - 第二CH3 - CH2 - 第三CH3

[0108] 第二多肽链

[0109] 结构域F - 结构域G

[0110] V_H - 第一CH3。

[0111] 在各种实施方式中,参考图2,抗体构建体进一步包含第三多肽链和第四多肽链,其中:

[0112] (a) 第三多肽链包含结构域H、结构域I、结构域J和结构域K,其中结构域以H-I-J-K取向从N末端至C末端排列,且其中结构域H具有可变区结构域氨基酸序列,结构域I具有恒定区结构域氨基酸序列,结构域J具有CH2氨基酸序列,和K具有恒定区结构域氨基酸序列;

[0113] (b) 第四多肽链包含结构域L和结构域M,其中结构域以L-M取向从N末端至C末端排列,且其中结构域L具有可变区结构域氨基酸序列,和结构域M具有恒定区结构域氨基酸序列;

[0114] (c) 第三和第四多肽通过形成第二抗原结合位点(ABS)的H和L结构域之间的相互作用以及I和M结构域之间的相互作用而缔合;以及

[0115] (d) 第一和第三多肽通过D和J结构域之间的相互作用以及E和K结构域之间的相互作用而缔合。

[0116] 在具体的实施方式中,结构域H是V_L结构域;结构域I是C_L结构域;结构域J是CH2结构域;结构域K是第四CH3结构域。在特定的实施方式中,结构域L是V_H结构域;结构域M是CH1结构域。

[0117] 在具体的实施方式中,结构域A具有VL抗体结构域序列,结构域F具有VH抗体结构域序列。在一些实施方式中,结构域A具有VH抗体结构域序列且结构域F具有VL抗体结构域序列。

[0118] 在一些实施方式中,抗体构建体包含原生抗体结构,其中结构域A和H包含VH氨基酸序列,结构域F和L包含VL氨基酸序列,结构域B和I包含CH1,结构域G和M包含CL,结构域D和J包含CH2,结构域E和K包含CH3。

[0119] 在一些实施方式中,抗体构建体是B-Body™。B-Body™抗体构建体描述于US2018/0118811和W02019/204522中,其公开内容通过引用整体并入本文,具体实施方式在下文进一步描述。

[0120] 在一些实施方式中,抗体构建体是CrossMab™。CrossMab™抗体描述于美国专利号8,242,247;9,266,967;和8,227,577、美国专利申请公布号20120237506、美国专利申请公布号US20090162359、W02016016299、W02015052230。在一些实施方式中,抗体构建体是二价双特异性抗体,其包含:a)特异性结合第一抗原的抗体的轻链和重链;和b)特异性结合第二抗原的抗体的轻链和重链,其中特异性结合第二抗原的抗体的恒定结构域CL和CH1被彼此替换。

[0121] 在一些实施方式中,抗体构建体是具有美国专利号8,871,912和W02016/087650中描述的通用结构的抗体。在一些实施方式中,抗体构建体是包含由VL-CH3组成的轻链(LC)和包含VH-CH3-CH2-CH3的重链(HC)的结构域交换的抗体,其中LC的VL-CH3与HC的VH-CH3二聚化,从而形成包含CH3LC/CH3HC结构域对的结构域交换的LC/HC二聚体。

[0122] 在一些实施方式中,抗体构建体如W02017/011342中所述。在一些实施方式中,抗体构建体如W02006/093794中所述。

[0123] 6.4.1.1.1VH结构域

[0124] 在各种实施方式中,VH结构域具有为哺乳动物序列的氨基酸序列,包括人序列、人源化序列、合成序列、或人、非人哺乳动物和/或合成序列的组合。在各种实施方式中,VH氨基酸序列是天然存在序列的突变序列。

[0125] 6.4.1.1.2VL结构域

[0126] 在各种实施方式中,VL结构域具有为哺乳动物序列的氨基酸序列,包括人序列、人源化序列、合成序列、或人、非人哺乳动物和/或合成序列的组合。在各种实施方式中,VL氨基酸序列是天然存在序列的突变序列。

[0127] 在某些实施方式中,VL氨基酸序列是λ轻链可变结构域序列。在某些实施方式中,VL氨基酸序列是κ轻链可变域序列。

[0128] 6.4.1.1.3互补决定区

[0129] 本文所述抗体构建体的VH和VL结构域包含被称为“互补决定区”(CDR)的高度可变序列,通常为三个CDR(CDR1、CD2和CDR3)。在多种实施方式中,CDR是哺乳动物序列,包括但

不限于小鼠、大鼠、仓鼠、兔、骆驼、驴、山羊和人序列。在优选的实施方式中,CDR是人序列。在各种实施方式中,CDR是天然存在的序列。在各种实施方式中,CDR是天然存在的序列,其已经被突变以改变抗原结合位点对特定抗原或表位的结合亲和力。在某些实施方式中,天然存在的CDR已经在体内宿主中通过亲和力成熟和体细胞超突变进行了突变。在某些实施方式中,CDR已经通过包括但不限于PCR诱变和化学诱变的方法在体外进行了突变。在各种实施方式中,CDR是合成序列,包括但不限于从随机序列CDR文库和合理设计的CDR文库获得的CDR。

[0130] 6.4.1.1.4骨架区和CDR移植

[0131] 本文所述抗体构建体的VH和VL结构域包含“骨架区”(FR)序列。FR通常是作为散布的CDR的支架的保守序列区域,通常以FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4排列(从N末端至C末端)。在多种实施方式中,FR是哺乳动物序列,包括但不限于小鼠、大鼠、仓鼠、兔、犬、猫、骆驼、驴、山羊和人序列。在一个优选的实施方式中,FR是人序列。在各种实施方式中,FR是天然存在的序列。在各种实施方式中,FR是合成的序列,包括但不限于合理设计的序列。

[0132] 在多种实施方式中,FR和CDR都来自相同的天然存在的可变结构域序列。在多种实施方式中,FR和CDR来自不同的可变结构域序列,其中CDR被移植到FR支架上,CDR提供对特定抗原的特异性。在某些实施方式中,移植的CDR都源自相同的天然存在的可变结构域序列。在某些实施方式中,移植的CDR衍生自不同的可变结构域序列。在某些实施方式中,移植的CDR是合成序列,包括但不限于从随机序列CDR文库和合理设计的CDR文库获得的CDR。在某些实施方式中,移植的CDR和FR来自相同物种。在某些实施方式中,移植的CDR和FR来自不同物种。在优选的移植的CDR实施方式中,抗体是“人源化的”,其中移植的CDR是非人哺乳动物序列,包括但不限于小鼠、大鼠、仓鼠、兔、骆驼、驴和山羊序列,FR是人序列。人源化抗体更详细地论述于美国专利号6,407,213中,其教导的全部内容通过引用并入本文。在各种实施方式中,来自一种物种的FR的部分或特定序列被用于替代另一种物种的FR的部分或特定序列。

[0133] 6.4.2.CH1和CL结构域

[0134] 在各种实施方式中,抗体构建体的第一和第二多肽链中的至少一个进一步包含免疫球蛋白CH1结构域。在各种实施方式中,异二聚化蛋白质的第一和第二多肽链中的至少一个进一步包含免疫球蛋白CL结构域。

[0135] 在各种实施方式中,第一多肽进一步包含CH1结构域,第二多肽进一步包含CL结构域。在各种实施方式中,第二多肽进一步包含CH1结构域,第一多肽进一步包含CL结构域。

[0136] 在各种实施方式中,CH1序列是内源序列。在多种实施方式中,CH1序列是哺乳动物序列,包括但不限于小鼠、大鼠、仓鼠、兔、骆驼、驴、山羊和人序列。在一个优选的实施方式中,CH1序列是人序列。在某些实施方式中,CH1序列来自IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或IgM同种型。在一个优选的实施方式中,CH1序列来自IgG1同种型。在优选的实施方式中,CH1序列是UniProt登录号P01857的氨基酸1-98。

[0137] 本文所述的抗体构建体的CL结构域是抗体轻链恒定结构域。在某些实施方式中,CL结构域具有为内源序列的序列。在多种实施方式中,CL序列是哺乳动物序列,包括但不限于小鼠、大鼠、仓鼠、兔、犬、猫、骆驼、驴、山羊和人序列。在一个优选的实施方式中,CL序列是人序列。

[0138] 在某些实施方式中,CL氨基酸序列是 λ 轻链恒定结构域序列。在特定的实施方式中,CL氨基酸序列是人 λ 轻链恒定结构域序列。在优选的实施方式中, λ 轻链序列是UniProt登录号P0CG04。

[0139] 在某些实施方式中,CL氨基酸序列是 κ 轻链恒定结构域序列。在优选的实施方式中,CL氨基酸序列是人 κ 轻链恒定结构域序列。在优选的实施方式中, κ 轻链序列是UniProt登录号P01834。

[0140] 在某些实施方式中,CH1序列和CL序列都是内源序列。

[0141] CH1结构域折叠通常是IgG分泌中的限速步骤(Feige et al.Mol Cell.2009Jun 12;34(5):569-79;其全部内容通过引用并入本文)。因此,基于包含CH1的多肽链的限速组分纯化本文所述的抗体构建体可提供从不完整的链纯化完整复合物的方法,例如从仅具有一个或多个包含非CH1的链的复合物纯化具有限制性CH1结构域的复合物。

[0142] 正如所讨论的,虽然CH1限制表达在某些方面可能是有益的,但CH1有可能限制完整抗体构建体的总体表达。因此,在某些实施方式中,调节了包含CH1序列的多肽链的表达以改善抗体构建体形成完整复合物的效率。在一个示例性实例中,构建为表达包含CH1序列的多肽链的质粒载体的比例可以相对于构建为表达其他多肽链的质粒载体增加。在另一个示例性实例中,当与包含CL序列的多肽链相比时,包含CH1序列的多肽链可以是两条多肽链中较小的一条。在另一个具体的实施方式中,包含CH1序列的多肽链的表达可以通过控制哪个多肽链具有CH1序列来调节。例如,工程化抗体构建体使得CH1结构域存在于二结构域多肽链(例如,本文所述的第四多肽链)中,而不是在四结构域多肽链(例如,本文所述的第三多肽链)中CH1序列的天然位置,可用于控制包含CH1序列的多肽链的表达。然而,在其他方面,与其他链相比过高的含CH1链的相对表达水平可导致具有CH1链但不具有每一个其他链的不完全复合物。因此,在某些实施方式中,调节了包含CH1序列的多肽链的表达以减少形成不具有含CH1的链的不完全复合物,并减少形成具有含CH1的链但不具有存在于完全复合物中的其他链的不完全复合物。

[0143] 在某些实施方式中,如下文更详细讨论的,CH1序列和CL序列分别地包含内源CH1和CL序列中的各自正交的修饰。优选地,CH1序列中的正交突变不消除用于纯化的CH1结构域和CH1特异性结合试剂之间的特异性结合相互作用。

[0144] 6.4.2.1CH1和CL正交修饰

[0145] 在某些实施方式中,CH1序列和CL序列进一步分别包含内源CH1和CL序列的正交修饰。CH1/CL正交修饰可通过CH1结构域中的修饰残基与CL结构域中的相应修饰或未修饰残基之间的相互作用影响CH1/CL结构域配对。

[0146] 在特定的实施方式中,正交修饰可以与降低免疫原性的氨基酸置换(例如同种-同种异型突变)组合。

[0147] 在其他实施方式中,CH1/CL对的一个序列包含至少一个修饰,而CH1/CL对的另一个序列在相应的正交氨基酸位置不包含修饰。

[0148] CH1和CL序列也可以是其内源或修饰序列的部分,使得具有CH1序列或其部分的结构域可以与具有CH1序列或其部分的结构域缔合。此外,具有本文所述CH1序列的部分的抗体构建体可被CH1结合试剂结合。

[0149] 6.4.2.1.1示例性CH1/CL正交修饰:工程化二硫键

[0150] CH1/CL正交修饰的一些实施方式包含CH1和CL中工程化半胱氨酸之间的工程化二硫键。这种工程化的二硫键可以稳定包含修饰的CH1的多肽和包含相应的修饰的CL的多肽之间的相互作用。

[0151] 仅举例来说,包含工程化二硫键的正交CH1/CL修饰可包含在如通过EU索引编号的128、129、138、141、168或171位具有工程化半胱氨酸的CH1结构域。仅举例来说,这种包含工程化二硫键的正交CH1/CL修饰可进一步包含在如通过EU索引编号的116、118、119、164、162或210位具有工程化半胱氨酸的CL结构域。

[0152] 例如,如在美国专利号8,053,562和美国专利号9,527,927中更详细地编号和讨论的(每个都通过引用以其全文并入本文),CH1/CL正交修饰可以选自在CH1序列的138位和CL序列的116位,在CH1序列的128位和CL序列的119位,或在CH1序列的129位和CL序列的210位的工程化半胱氨酸。在一些实施方式中,CH1/CL正交修饰包含在如通过EU索引编号的CH1序列的141位和CL序列的118位的工程化半胱氨酸。

[0153] 在一些实施方式中,CH1/CL正交修饰包含在如通过EU索引编号的CH1序列的168位和CL序列的164位的工程化半胱氨酸。在一些实施方式中,CH1/CL正交修饰包含在如通过EU索引编号的CH1序列的128位和CL序列的118位的工程化半胱氨酸。在一些实施方式中,CH1/CL正交修饰包含在如通过EU索引编号的CH1序列的171位和CL序列的162位的工程化半胱氨酸。在一些实施方式中,CL序列是CL- λ 序列。在优选的实施方式中,CL序列是CL- κ 序列。在一些实施方式中,工程化半胱氨酸是在如通过EU索引编号的CH1序列的128位和CL κ 序列的118位。

[0154] 下表1提供了示例性CH1/CL正交修饰,其包含根据EU索引编号的CH1和CL之间的工程化二硫键。

表 1 示例性 CH1/CL 工程化二硫键	
CH1 突变	CL 突变
[0155] A141C	F118C
H168C	T164C
L128C	F118C
P171C	S162C

[0156] 在一系列优选的实施方式中,如通过Eu索引编号的,提供非内源(工程化)半胱氨酸氨基酸的突变是在CL序列中的F118C突变与在CH1序列中相应的A141C,或在CL序列中的F118C突变与在CH1序列中相应的L128C,在CL序列中的T164C突变与在CH1序列中相应的H168C突变,或在CL序列中的S162C突变与在CH1序列中相应的P171C突变。

[0157] 6.4.2.1.2CH1/CL正交修饰:工程化电荷对突变

[0158] 在多种实施方式中,在CL序列和CH1序列中的正交修饰是电荷对突变。

[0159] 在具体的实施方式中,如通过Eu索引编号并在Bonisch等中更详细地描述的(Protein Engineering, Design&Selection, 2017, pp.1-12)(其教导的全部内容通过引用

并入本文),电荷对突变是在CL序列中的F118S、F118A或F118V突变与在CH1序列中相应的A141L,或在CL序列中的T129R突变与在CH1序列中相应的K147D。

[0160] 在一些情况下,如通过Eu索引编号的,CH1/CL电荷对突变是在CL序列中的N138K突变与在CH1序列中相应的G166D,或在CL序列中的N138D突变与在CH1序列中相应的G166K。在一些实施方式中,电荷对突变是在CH1序列中的P127E突变与在相应CL序列中相应的E123K突变。在一些实施方式中,电荷对突变是在CH1序列中的P127K突变与在相应CL序列中相应的E123(未突变)。

[0161] 下表2提供了示例性CH1/CL正交电荷对修饰。

表 2: 示例性 CH1/CL 正交电荷对修饰	
CH1 突变	CL 突变
G166K	N138K
G166K	N138D
P127E	E123K
P127E	无突变 (E123)
P127K	E123K
P127K	无突变 (E123)

[0163] 6.4.2.1.3CH1/CL正交修饰的组合

[0164] 在某些实施方式中,单个CH1/CL对的CH1和CL结构域在内源CH1和CL序列中分别地含有两个或更多个各自正交的修饰。例如,CH1和CL序列可以在内源CH1和CL序列中含有第一正交修饰和第二正交修饰。内源CH1和CL序列中的两个或更多个各自正交的修饰可选自本文所述的任何CH1/CL正交修饰。

[0165] 在一些实施方式中,第一正交修饰是正交电荷对突变,第二正交修饰是正交工程化二硫键。在一些实施方式中,第一正交修饰是如表2中所述的正交电荷对突变,如在美国专利号8,053,562和美国专利号9,527,927中更详细地编号和讨论的(每一个都以其全文通过引用并入本文),另外的正交修饰包含选自以下的工程化二硫键:在CH1序列的138位和CL序列的116位,在CH1序列的128位和CL序列的119位,或在CH1序列的129位和CL序列的210位的工程化半胱氨酸。

[0166] 在一些实施方式中,第一正交修饰是如表2中所述的正交电荷对突变,另外的正交修饰包含如表1中所述的工程化二硫键。在一些实施方式中,第一正交修饰包含CH1序列中的L128C突变和CL序列中的F118C突变,第二正交修饰包含相同CH1序列中的残基166的修饰和相同CL序列中的残基138的修饰。

[0167] 在一些实施方式中,第一正交修饰包含CH1序列中的L128C突变和CL序列中的F118C突变,第二正交修饰包含CH1序列中的G166D突变和CL序列中的N138K突变。在一些实施方式中,第一正交修饰包含CH1序列中的L128C突变和CL序列中的F118C突变,第二正交修饰包含CH1序列中的G166K突变和CL序列中的N138D突变。

[0168] 6.4.3.CH2结构域

[0169] 在各种实施方式中,抗体构建体的第一和第二多肽链中的至少一个进一步包含CH2结构域。在各种实施方式中,第一多肽和第二多肽都包含CH2结构域。

[0170] 在一些实施方式中,抗体构建体具有多于一个配对组的CH2结构域。在这些实施方式的各种实施方式中,第一组配对的CH2结构域具有来自第一同种型的CH2氨基酸序列和来自另一同种型的CH2氨基酸序列的一个或多个直系同源组。如本文所述,直系同源CH2氨基酸序列能够与来自共同同种型的CH2氨基酸序列相互作用,但不与来自存在于抗体构建体中的另一同种型的CH2氨基酸序列显著相互作用。

[0171] 在具体的实施方式中,第一组CH2氨基酸序列来自与抗体构建体中其他非CH2结构域相同的同种型。在特定的实施方式中,第一组具有来自IgG同种型的CH2氨基酸序列,一个或多个直系同源组具有来自IgM或IgE同种型的CH2氨基酸序列。

[0172] 在某些实施方式中,一组或多组CH2氨基酸序列是内源CH2序列。在其他实施方式中,一组或多组CH2氨基酸序列是具有一个或多个突变的内源CH2序列。在具体的实施方式中,一个或多个突变是正交杵臼突变、正交电荷对突变或正交疏水突变。可用于本文所述抗体构建体的直系同源CH2氨基酸序列更详细地描述于国际PCT申请W02017/011342和W02017/106462中,通过引用将其全文并入本文。

[0173] 在具体的实施方式中,所有组的CH2氨基酸序列来自相同的物种。在优选的实施方式中,所有组的CH2氨基酸序列都是人CH2氨基酸序列。在其他实施方式中,CH2氨基酸序列组来自不同物种。

[0174] 6.4.4.特异性二价抗体构建体

[0175] 在各种实施方式中,抗体构建体具有图2所示的结构。

[0176] 6.4.4.1结构域A

[0177] 参考图2,在本文所述抗体构建体的各种实施方式中,结构域A具有可变区结构域氨基酸序列。在一个优选的实施方式中,结构域A具有VL抗体结构域序列,结构域F具有VH抗体结构域序列。在一些实施方式中,结构域A具有VH抗体结构域序列,结构域F具有VL抗体结构域序列。

[0178] 在本文所述的抗体构建体中,结构域A的C末端被连接到结构域B的N末端。在某些实施方式中,结构域A具有在其在结构域A和结构域B之间连接处的C末端突变的VL氨基酸序列。

[0179] 6.4.4.2结构域B

[0180] 参考图2,在本文所述抗体构建体的各种实施方式中,结构域B具有恒定区结构域序列。

[0181] 在一些实施方式中,结构域B具有CH3序列。

[0182] 在某些实施方式中,结构域B具有包含“杵臼”(“KIH”)正交突变的CH3序列。

[0183] 在某些实施方式中,结构域B具有CH3序列和与含有正交突变的CH3结构域形成工程化二硫键的S354C或Y349C突变。

[0184] 在某些实施方式中,结构域B具有第一CH3结构域序列,其中第一CH3结构域的Y349被半胱氨酸(C)置换(Y349C),其中根据Eu索引对位置进行编号。

[0185] 在某些实施方式中,结构域B具有第二CH3结构域序列,其中第二CH3结构域的S354

被半胱氨酸(C)置换(S354C),并且第二CH3结构域的E357被疏水性或芳族氨基酸置换,其中根据Eu索引对位置进行编号。在具体的实施方式中,第二CH3结构域具有E357W突变。

[0186] 在某些实施方式中,结构域B具有带有以下突变改变的人IgG1 CH3氨基酸序列:P343V;Y349C;和三肽插入,445P、446G、447K。在其他优选的实施方式中,结构域B具有带有以下突变改变的人IgG1 CH3序列:T366K;和三肽插入,445K、446S、447C。在其他优选的实施方式中,结构域B具有带有以下突变改变的人IgG1 CH3序列:Y349C和三肽插入,445P、446G、447K。

[0187] 在某些实施方式中,结构域B具有人IgG1 CH3序列,其中K447C突变被纳入另外的内源CH3序列中。

[0188] 在一些实施方式中,恒定区序列是直系同源CH2序列。在一些实施方式中,结构域B具有来自IgE的CH2序列。在一些实施方式中,结构域B具有来自IgM的CH2序列。

[0189] 在一些实施方式中,例如其中结合分子的效价为3或大于3,恒定区序列为CH1或CL序列。在一些实施方式中,结构域B具有CH1序列。在一些实施方式中,恒定区序列是CL序列。在一些实施方式中,CH1或CL序列包含本文所述的一个或多个CH1或CL正交修饰。

[0190] 在本文所述的抗体构建体中,结构域B的N末端被连接到结构域A的C末端。在某些实施方式中,结构域B具有在其在结构域A和结构域B之间连接处的N末端突变的CH3氨基酸序列。

[0191] 在本文所述的抗体构建体中,结构域B的C末端被连接到结构域D的N末端。在某些实施方式中,结构域B具有在结构域B和结构域D之间连接处的C末端延伸的CH3氨基酸序列。

[0192] 在一些实施方式中,结构域B包含人IgA CH3序列。在一些实施方式中,IgA CH3序列包含CH3接头序列。

[0193] 6.4.4.3结构域D

[0194] 参考图2,在本文所述抗体构建体的各种实施方式中,结构域D具有恒定区氨基酸序列。

[0195] 在优选的一系列实施方式中,结构域D具有CH2氨基酸序列。在某些实施方式中,CH2序列是内源序列。在具体的实施方式中,序列是UniProt登录号P01857的氨基酸111-223。在优选的实施方式中,CH2序列具有将N末端可变结构域-恒定结构域区段连接到CH2结构域的N末端铰链区肽。在一些实施方式中,CH2序列包含一个或多个调节效应子功能的突变。在某些实施方式中,CH2序列包含一个或多个降低效应子功能的突变。在一些实施方式中,CH2序列包含一个或多个调节FcRN结合的突变。在某些实施方式中,CH2序列包含一个或多个减少FcRN结合的突变。

[0196] 在本文所述的抗体构建体中,结构域D的N末端被连接到结构域B的C末端。在某些实施方式中,结构域B具有在结构域D和结构域B之间连接处的C末端延伸的CH3氨基酸序列。

[0197] 6.4.4.4结构域E

[0198] 参考图2,在本文所述抗体构建体的各种实施方式中,结构域E具有恒定区结构域氨基酸序列。

[0199] 在某些实施方式中,恒定区序列是CH3序列。

[0200] 在某些实施方式中,结构域E具有包含“杵臼”(“KIH”)正交突变的CH3序列。

[0201] 在某些实施方式中,结构域E具有CH3序列和与含有正交突变的CH3结构域形成工

程化二硫键的S354C或Y349C突变。

[0202] 在某些实施方式中,结构域E具有第一CH3结构域序列,其中第一CH3结构域的Y349被半胱氨酸(C)置换(Y349C)。

[0203] 在某些实施方式中,结构域E具有第二CH3结构域序列,其中第二CH3结构域的S354被半胱氨酸(C)置换(S354C),第二CH3结构域的E357被疏水性或芳族氨基酸置换,其中根据Eu索引对位置进行编号。在具体的实施方式中,第二CH3结构域具有E357W突变。

[0204] 在某些实施方式中,恒定区结构域序列是CH1序列。在具体的实施方式中,结构域E的CH1氨基酸序列是在结合分子中仅有的CH1氨基酸序列。在某些实施方式中,CH1结构域的N末端被连接到CH2结构域的C末端。

[0205] 在某些实施方式中,恒定区序列是CL序列。在某些实施方式中,CL结构域的N末端被连接到CH2结构域的C末端。

[0206] 6.4.4.5结构域F

[0207] 参考图2,在本文所述抗体构建体的各种实施方式中,结构域F具有可变区结构域氨基酸序列。在一个优选的实施方式中,结构域F具有VH抗体结构域序列。在一些实施方式中,结构域F具有VL抗体结构域序列。

[0208] 6.4.4.6结构域G

[0209] 参考图2,在本文所述抗体构建体的各种实施方式中,结构域G具有恒定区氨基酸序列。

[0210] 在一些实施方式中,结构域G具有CH3氨基酸序列。

[0211] 在某些实施方式中,结构域G具有带有以下突变改变的人IgG1 CH3序列:S354C;和三肽插入,445P、446G、447K。在一些实施方式中,结构域G具有带有以下突变改变的人IgG1 CH3序列:S354C;和445P、446G、447K三肽插入。在一些优选的实施方式中,结构域G具有带有以下改变的人IgG1 CH3序列:L351D和445G、446E、447C的三肽插入。

[0212] 在某些实施方式中,结构域G具有包含“杵臼”(“KIH”)正交突变的CH3序列。

[0213] 在某些实施方式中,结构域G具有CH3序列和与含有正交突变的CH3结构域形成工程化二硫键的S354C或Y349C突变。

[0214] 在某些实施方式中,结构域G具有第一CH3结构域序列,其中第一CH3结构域的Y349被半胱氨酸(C)置换(Y349C)。

[0215] 在某些实施方式中,结构域G具有第二CH3结构域序列,其中第二CH3结构域的S354被半胱氨酸(C)置换(S354C),第二CH3结构域的E357被疏水性或芳族氨基酸置换,其中根据Eu索引对位置进行编号。在具体的实施方式中,第二CH3结构域具有E357W突变。

[0216] 在一些实施方式中,结构域G具有人IgA CH3序列。

[0217] 在一些实施方式中,结构域G具有CL序列。

[0218] 在一些实施方式中,结构域G具有来自IgE的CH2序列。在一些实施方式中,结构域G具有来自IgM的CH2序列。

[0219] 在具体的实施方式中,例如其中结合分子的效价是3或大于3,恒定区序列是CH1或CL序列。在一些实施方式中,其中结构域B是CL序列,结构域G是CH1序列。在一些实施方式中,CH1或CL序列包含本文所述的一个或多个CH1或C1正交修饰。

[0220] 在一些实施方式中,结构域G的C末端被连接到结构域D的N末端。在某些实施方式

中,结构域G具有在结构域G和结构域D之间连接处的C末端延伸的CH3氨基酸序列。

[0221] 6.4.4.7结构域H

[0222] 参考图2,在本文所述抗体构建体的各种实施方式中,结构域H具有可变区结构域氨基酸序列。在一个优选的实施方式中,结构域H具有VL抗体结构域序列。在一些实施方式中,结构域H具有VH抗体结构域序列。

[0223] 6.4.4.8结构域I

[0224] 参考图2,在本文所述抗体构建体的各种实施方式中,结构域I具有恒定区结构域氨基酸序列。

[0225] 在结合分子的一系列优选实施方式中,结构域I具有CL氨基酸序列。在另一系列实施方式中,结构域I具有CH1氨基酸序列。

[0226] 6.4.4.9结构域J

[0227] 参考图2,在本文所述抗体构建体的各种实施方式中,结构域J具有CH2氨基酸序列。在优选的实施方式中,CH2氨基酸序列具有将结构域J连接至结构域I的N末端铰链区。在一些实施方式中,CH2序列包含一个或多个调节效应子功能的突变。在某些实施方式中,CH2序列包含一个或多个降低效应子功能的突变。在一些实施方式中,CH2序列包含一个或多个调节FcRN结合的突变。在某些实施方式中,CH2序列包含一个或多个减少FcRN结合的突变。

[0228] 结构域J的C末端被连接到结构域K的N末端。在具体的实施方式中,结构域J被连接到具有CH1氨基酸序列或CL氨基酸序列的结构域K的N末端。

[0229] 6.4.4.10结构域K

[0230] 参考图2,在本文所述抗体构建体的各种实施方式中,结构域K具有恒定区结构域氨基酸序列。

[0231] 在一些实施方式中,结构域K具有CH3序列。

[0232] 在某些实施方式中,结构域K具有包含“杵臼”(“KIH”)正交突变的CH3序列。

[0233] 在某些实施方式中,结构域K具有CH3序列和与含有正交突变的CH3结构域形成工程化二硫键的S354C或Y349C突变。

[0234] 在某些实施方式中,结构域K具有第一CH3结构域序列,其中第一CH3结构域的Y349被半胱氨酸(C)置换(Y349C)。

[0235] 在某些实施方式中,结构域K具有第二CH3结构域序列,其中第二CH3结构域的S354被半胱氨酸(C)置换(S354C),第二CH3结构域的E357被疏水性或芳族氨基酸置换,其中根据Eu索引对位置进行编号。在具体的实施方式中,第二CH3结构域具有E357W突变。

[0236] 在一些实施方式中,杵臼正交突变与同种-同种异型突变组合。在某些实施方式中,杵突变是T366W或T366Y。在某些实施方式中,臼突变选自T366S、L368A、F405T、Y407V或Y407T。在一个特定的实施方式中,臼突变是F405T。

[0237] 在某些实施方式中,恒定区结构域序列是CH1序列。在具体的实施方式中,结构域K的CH1氨基酸序列是结合分子中仅有的CH1氨基酸序列。在某些实施方式中,CH1结构域的N末端被连接到CH2结构域的C末端。在某些实施方式中,恒定区序列是CL序列。在某些实施方式中,CL结构域的N末端被连接到CH2结构域的C末端。

[0238] 6.4.4.11结构域L

[0239] 参考图2,在本文所述抗体构建体的各种实施方式中,结构域L具有可变区结构域

氨基酸序列。在一个优选的实施方式中,结构域L具有VH抗体结构域序列。在一些实施方式中,结构域L具有VL抗体结构域序列。

[0240] 6.4.4.12结构域M

[0241] 参考图2,在本文所述抗体构建体的各种实施方式中,结构域M具有恒定区结构域氨基酸序列。在一系列优选的实施方式中,结构域I具有CH1氨基酸序列,结构域M具有CL氨基酸序列。在另一系列优选的实施方式中,结构域I具有CL氨基酸序列,结构域M具有CH1氨基酸序列。

[0242] 6.4.4.13结构域A&F的配对

[0243] 在图2所示的抗体构建体中,结构域“A”VL或VH氨基酸序列和同源结构域“F”VH或VL氨基酸序列缔合并形成抗原结合位点(ABS)。A:F抗原结合位点(ABS)能够特异性结合抗原的表位。

[0244] 在多种多价实施方式中,由结构域A和F形成的ABS(A:F)在序列上与结合分子内的一种或多种其他ABS相同,因此具有与结合分子内的一种或多种其他序列相同的ABS相同的识别特异性。

[0245] 在多种多价实施方式中,A:F ABS在序列上与结合分子内的一种或多种其他ABS不相同。在某些实施方式中,A:F ABS具有与结合分子中一种或多种其他序列不相同的ABS不同的识别特异性。在具体的实施方式中,A:F ABS识别与结合分子中至少一种其他序列不相同的ABS所识别的抗原不同的抗原。在具体的实施方式中,A:F ABS识别也被结合分子中至少一个其他序列不相同的ABS识别的抗原的不同表位。在这些实施方式中,由结构域A和F形成的ABS识别抗原的表位,其中结合分子内的一个或多个其他ABS识别相同的抗原,但不识别相同的表位。

[0246] 6.4.4.14结构域B&G配对

[0247] 在图2所示的抗体构建体中,结构域“B”恒定区氨基酸序列与结构域“G”恒定区氨基酸序列缔合。

[0248] 在一些实施方式中,结构域B和结构域G具有CH3氨基酸序列。

[0249] 在某些实施方式中,结构域B是第一CH3结构域,结构域G是第二CH3结构域,其中第一CH3结构域的Y349被半胱氨酸(C)置换(Y349C),第二CH3结构域的S354被半胱氨酸(C)置换(S354C),第二CH3结构域的E357被疏水性或芳族氨基酸置换,其中根据Eu索引对位置进行编号。

[0250] 在某些实施方式中,结构域B是第二CH3结构域,结构域G是第一CH3结构域,其中第一CH3结构域的Y349被半胱氨酸(C)置换(Y349C),第二CH3结构域的S354被半胱氨酸(C)置换(S354C),第二CH3结构域的E357被疏水性或芳族氨基酸置换,其中根据Eu索引对位置进行编号。

[0251] 在各种实施方式中,B和G结构域的氨基酸序列是相同的。在这些实施方式的某些中,序列是内源CH3序列。序列可以是来自人IgG1的CH3序列。序列可以是来自人IgA的序列。

[0252] 在多种实施方式中,B和G结构域的氨基酸序列是不同的,并且分别地包含内源CH3序列中的各自正交的修饰,其中B结构域与G结构域相互作用,并且其中B结构域和G结构域均不与缺乏正交修饰的CH3结构域显著地相互作用。

[0253] 在具体的实施方式中,期望减少含有CH3序列的结构域B或G与也含有CH3序列的结

构域E和K的不期望的缔合。在这种情况下,在结构域B和/或G中使用来自人IgA(IgA-CH3)的CH3序列可以通过减少这种不期望的缔合来改善抗体组装和稳定性。在其中结构域E和K包含IgG-CH3序列的结合分子的一些实施方式中,结构域B和G包含IgA-CH3序列。

[0254] 6.4.4.15结构域E&K配对

[0255] 在某些实施方式中,结构域E是第一CH3结构域,结构域K是第二CH3结构域,其中第一CH3结构域的Y349被半胱氨酸(C)置换(Y349C),第二CH3结构域的S354被半胱氨酸(C)置换(S354C),第二CH3结构域的E357被疏水性或芳族氨基酸置换,其中根据Eu索引对位置进行编号。

[0256] 在某些实施方式中,结构域E是第二CH3结构域,结构域K是第一CH3结构域,其中第一CH3结构域的Y349被半胱氨酸(C)置换(Y349C),第二CH3结构域的S354被半胱氨酸(C)置换(S354C),第二CH3结构域的E357被疏水性或芳族氨基酸置换,其中根据Eu索引对位置进行编号。

[0257] 在某些实施方式中,不同序列分别地包含内源CH3序列中各自正交的修饰,其中E结构域与K结构域相互作用,并且其中E结构域和K结构域均不与缺乏正交修饰的CH3结构域显著地相互作用。在某些实施方式中,正交修饰包括但不限于工程化二硫键、杵臼突变和电荷对突变。在具体的实施方式中,正交修饰包括选自但不限于工程化二硫键、杵臼突变和电荷对突变的正交修饰的组合。

[0258] 在具体的实施方式中,正交修饰可以与降低免疫原性的氨基酸置换组合,例如同种-同种异型突变。

[0259] 在各种实施方式中,E和K结构域的氨基酸序列是相同的。

[0260] 6.4.4.16结构域H&L配对

[0261] 在多种实施方式中,结构域H具有VL序列,结构域L具有VH序列,结构域“H”VL和结构域“L”VH氨基酸序列缔合并形成抗原结合位点(ABS)。H:L抗原结合位点(ABS)能够特异性结合抗原的表位。

[0262] 在优选的实施方式中,结构域H具有VL氨基酸序列,结构域I具有CL氨基酸序列,结构域L具有VH氨基酸序列,且结构域M具有CH1氨基酸序列。

[0263] 在多种实施方式中,H结构域和L结构域的氨基酸序列分别地包含内源序列中各自正交的修饰,其中H结构域与L结构域相互作用,并且其中H结构域和L结构域均不与缺乏正交修饰的结构域显著地相互作用。在一系列实施方式中,H结构域中的正交突变在VL序列中,L结构域中的正交突变在VH序列中。在特定的实施方式中,正交突变是VH/VL界面处的电荷对突变。在优选的实施方式中,如Igawa等更详细描述(Protein Eng.Des.Sel.,2010,第23卷,667-677)(通过引用整体并入本文),在VH/VL界面处的电荷对突变是VH中的Q39E与VL中相应的Q38K,或VH中的Q39K与VL中相应的Q38E。

[0264] 在某些实施方式中,A结构域和F结构域之间的相互作用形成特异于第一抗原的第一抗原结合位点,H结构域和L结构域之间的相互作用形成特异于第二抗原的第二抗原结合位点。在某些实施方式中,A结构域和F结构域之间的相互作用形成特异于第一抗原的第一抗原结合位点,H结构域和L结构域之间的相互作用形成特异于第一抗原的第二抗原结合位点。

[0265] 6.4.4.17结构域I&M配对

[0266] 在多种实施方式中,结构域I具有CL序列,结构域M具有CH1序列。

[0267] 在多种实施方式中,I结构域和M结构域的氨基酸序列分别地包含内源序列中各自正交的修饰,其中I结构域与M结构域相互作用,并且其中I结构域和M结构域均不与缺乏正交修饰的结构域显著地相互作用。在一系列实施方式中,I结构域中的正交突变在CL序列中,M结构域中的正交突变在CH1序列中。

[0268] 6.4.4.18结构域连接点

[0269] 6.4.4.18.1连接VL和CH3结构域的连接点

[0270] 在多种实施方式中,在VL结构域的C末端和CH3结构域的N末端之间形成连接点的氨基酸序列是工程化序列。

[0271] 在某些实施方式中,在VL结构域的C末端缺失或添加一个或多个氨基酸。在具体的实施方式中,A111在VL结构域的C末端缺失。在某些实施方式中,在CH3结构域的N末端缺失或添加一个或多个氨基酸。在具体的实施方式中,P343在CH3结构域的N末端缺失。在具体的实施方式中,P343和R344在CH3结构域的N末端缺失。在某些实施方式中,在VL结构域的C末端和CH3结构域的N末端均缺失或添加一个或多个氨基酸。在具体的实施方式中,A111在VL结构域的C末端缺失,P343在CH3结构域的N末端缺失。在一个优选的实施方式中,A111和V110在VL结构域的C末端缺失。在另一个优选的实施方式中,A111和V110在VL结构域的C末端缺失,CH3结构域的N末端具有P343V突变。

[0272] 6.4.4.18.2连接VH和CH3结构域的连接点

[0273] 在多种实施方式中,在VH结构域的C末端和CH3结构域的N末端之间形成连接点的氨基酸序列是工程化序列。

[0274] 在某些实施方式中,在VH结构域的C末端缺失或添加一个或多个氨基酸。在具体的实施方式中,K117和G118在VH结构域的C末端缺失。在某些实施方式中,在CH3结构域的N末端缺失或添加一个或多个氨基酸。在具体的实施方式中,P343在CH3结构域的N末端缺失。在具体的实施方式中,P343和R344在CH3结构域的N末端缺失。在具体的实施方式中,P343、R344和E345在CH3结构域的N末端缺失。在某些实施方式中,在VH结构域的C末端和CH3结构域的N末端均缺失或添加一个或多个氨基酸。在优选的实施方式中,T116、K117和G118在VH结构域的C末端缺失。

[0275] 6.4.4.18.3将CH3的C末端连接到CH2的N末端的连接点(铰链)

[0276] 在本文所述抗体构建体的一些实施方式中,CH2结构域的N末端具有“铰链”区氨基酸序列。如本文所用,铰链区是连接抗体的N末端可变结构域-恒定结构域区段和抗体的CH2结构域的抗体重链的序列。此外,铰链区通常提供N末端可变结构域-恒定结构域区段和CH2结构域之间的柔性,以及在重链(例如第一和第三多肽链)之间形成二硫键的氨基酸序列基序。

[0277] 在多种实施方式中,CH3氨基酸序列在CH3结构域的C末端和CH2结构域的N末端之间的连接点的C末端延伸。在某些实施方式中,CH3氨基酸序列在CH3结构域的C末端和铰链区之间的连接点的C末端延伸,而铰链区又被连接到CH2结构域的N末端。在优选的实施方式中,通过插入CH3氨基酸延伸序列(“CH3接头序列”或“CH3接头”)来延伸CH3氨基酸序列。在一些实施方式中,CH3氨基酸延伸序列后面是IgG1铰链区的DKTHT基序。在一些实施方式中,CH3氨基酸延伸序列长度为3-10个氨基酸。在一些实施方式中,CH3氨基酸延伸序列长度为

3-8个氨基酸。在一些实施方式中,CH3氨基酸延伸序列长度为3-6个氨基酸。

[0278] 在一些实施方式中,CH3氨基酸延伸序列是PGK三肽。在一些实施方式中,CH3氨基酸延伸序列是AGC三肽。在一些实施方式中,CH3氨基酸延伸序列是GEC三肽。在一些实施方式中,CH3氨基酸延伸序列是AGKC。在一些实施方式中,CH3氨基酸延伸序列是PGKC。在一些实施方式中,CH3氨基酸延伸序列是AGKGC。在一些实施方式中,CH3氨基酸延伸序列是AGKGSC。

[0279] 在具体的实施方式中,CH3结构域C末端的延伸纳入了可与另一个CH3结构域的正交C末端延伸形成二硫键的氨基酸序列。在优选的实施方式中,CH3结构域C末端的延伸纳入KSC三肽序列,其后面是IgG1铰链区的DKTHT基序,其与纳入κ轻链GEC基序的另一CH3结构域的正交C末端延伸形成二硫键。

[0280] 在其中结构域B和G包含CH3氨基酸序列的结合分子的一些实施方式中,结构域B包含第一CH3接头序列,结构域G包含第二CH3接头序列。在一些实施方式中,第一CH3接头序列通过在第一和第二CH3接头序列的半胱氨酸残基之间形成二硫键而与第二CH3接头序列缔合。在一些实施方式中,第一CH3接头和第二CH3接头是相同的。在一些实施方式中,第一CH3接头和第二CH3接头是不相同的。在一些实施方式中,第一CH3接头和第二CH3接头的长度相差1-6个氨基酸。在一些实施方式中,第一CH3接头和第二CH3接头的长度相差1-3个氨基酸。

[0281] 在优选的实施方式中,第一CH3接头是AGC,第二CH3接头是AGKGSC。在一些实施方式中,第一CH3接头是AGKGC,第二CH3接头是AGC。在一些实施方式中,第一CH3接头是AGKGSC,第二CH3接头是AGC。在一些实施方式中,第一CH3接头是AGKC,第二CH3接头是AGC。

[0282] 6.4.4.18.4连接CL的C末端和CH2的N末端的连接点(铰链)

[0283] 在多种实施方式中,CL氨基酸序列通过其C末端被连接到铰链区,而铰链区又被连接到CH2结构域的N末端。

[0284] 6.4.4.18.5将CH2的C末端连接到恒定区结构域的连接点

[0285] 在多种实施方式中,CH2氨基酸序列通过其C末端被连接到恒定区结构域的N末端。在优选的实施方式中,CH2序列通过其内源序列被连接到CH3序列。在其他实施方式中,CH2序列被连接到CH1或CL序列。讨论将CH2序列连接到CH1或CL序列的实例更详细地描述于美国专利号8,242,247号中,其通过引用整体并入本文。

[0286] 6.4.4.19二价双特异性B-体“BC1”

[0287] 参考图2和图3,在一系列实施方式中,抗体构建体具有第一、第二、第三和第四多肽链,其中(a)第一多肽链包含结构域A、结构域B、结构域D和结构域E,其中结构域以A-B-D-E取向从N末端至C末端排列,结构域A具有第一VL氨基酸序列,结构域B具有人IgG1 CH3氨基酸序列,其带有T366K突变和纳入KSC三肽序列的C末端延伸,KSC三肽序列后接IgG1铰链区的DKTHT基序,结构域D具有人IgG1CH2氨基酸序列,结构域E具有带有S354C和T366W突变的人IgG1 CH3氨基酸; (b) 第二多肽链具有结构域F和结构域G,其中结构域以F-G取向从N末端至C末端排列,其中结构域F具有第一VH氨基酸序列,结构域G具有人IgG1 CH3氨基酸序列,其带有L351D突变和纳入GEC氨基酸二硫化物基序的C末端延伸; (c) 第三多肽链具有结构域H、结构域I、结构域J和结构域K,其中结构域以H-I-J-K取向从N末端至C末端排列,且其中结构域H具有第二VL氨基酸序列,结构域I具有人CLκ氨基酸序列,结构域J具有人IgG1 CH2氨基酸序列,K具有带有Y349C、D356E、L358M、T366S、L368A和Y407V突变的人IgG1 CH3氨基酸

序列；(d) 第四多肽链具有结构域L和结构域M，其中结构域以L-M取向从N末端至C末端排列，其中结构域L具有第二VH氨基酸序列，结构域M具有人IgG1 CH1氨基酸序列；(e) 第一和第二多肽通过A和F结构域之间的相互作用与B和G结构域之间的相互作用缔合；(f) 第三和第四多肽通过H和L结构域之间的相互作用与I和M结构域之间的相互作用缔合；(g) 第一和第三多肽通过D和J结构域之间的相互作用与E和K结构域之间的相互作用缔合以形成结合分子；(h) 结构域A和结构域F形成特异于第一抗原的第一抗原结合位点；以及(i) 结构域H和结构域L形成特异于第二抗原的第二抗原结合位点。

[0288] 本文所述的正交突变可以进一步工程化到该构建体的E:K配对结构域。

[0289] 6.4.4.20二价双特异性B-体“BC6”

[0290] 参考图2和图4，在一系列实施方式中，结合分子具有第一、第二、第三和第四多肽链，其中(a) 第一多肽链包含结构域A、结构域B、结构域D和结构域E，其中结构域以A-B-D-E取向从N末端至C末端排列，结构域A具有第一VL氨基酸序列，结构域B具有人IgG1 CH3氨基酸序列，其具有纳入KSC三肽序列的C末端延伸，KSC三肽序列后接IgG1铰链区的DKTHT基序，结构域D具有人IgG1 CH2氨基酸序列，结构域E具有带有S354C和T366W突变的人IgG1 CH3氨基酸；(b) 第二多肽链具有结构域F和结构域G，其中结构域以F-G取向从N末端至C末端排列，其中结构域F具有第一VH氨基酸序列，结构域G具有人IgG1 CH3氨基酸序列，其带有纳入GEC氨基酸二硫化物基序的C末端延伸；(c) 第三多肽链具有结构域H、结构域I、结构域J和结构域K，其中结构域以H-I-J-K取向从N末端至C末端排列，且其中结构域H具有第二VL氨基酸序列，结构域I具有人CL κ 氨基酸序列，结构域J具有人IgG1 CH2氨基酸序列，K具有带有Y349C、D356E、L358M、T366S、L368A和Y407V突变的人IgG1 CH3氨基酸序列；(d) 第四多肽链具有结构域L和结构域M，其中结构域以L-M取向从N末端至C末端排列，其中结构域L具有第二VH氨基酸序列，结构域M具有人IgG1氨基酸序列；(e) 第一和第二多肽通过A和F结构域之间的相互作用与B和G结构域之间的相互作用缔合；(f) 第三和第四多肽通过H和L结构域之间的相互作用与I和M结构域之间的相互作用缔合；(g) 第一和第三多肽通过D和J结构域之间的相互作用与E和K结构域之间的相互作用缔合以形成结合分子；(h) 结构域A和结构域F形成特异于第一抗原的第一抗原结合位点；和(i) 结构域H和结构域L形成特异于第二抗原的第二抗原结合位点。

[0291] 本文所述的正交突变可以进一步工程化到E:K配对结构域。

[0292] 6.4.4.21二价双特异性B-体“BC28”

[0293] 参考图2和图5，在一系列实施方式中，结合分子具有第一、第二、第三和第四多肽链，其中(a) 第一多肽链包含结构域A、结构域B、结构域D和结构域E，其中结构域以A-B-D-E取向从N末端至C末端排列，结构域A具有第一VL氨基酸序列，结构域B具有人IgG1 CH3氨基酸序列，其带有Y349C突变和纳入PGK三肽序列的C末端延伸，PGK三肽序列后接IgG1铰链区的DKTHT基序，结构域D具有人IgG1 CH2氨基酸序列，结构域E具有带有S354C和T366W突变的人IgG1 CH3氨基酸；(b) 第二多肽链具有结构域F和结构域G，其中结构域以F-G取向从N末端至C末端排列，其中结构域F具有第一VH氨基酸序列，结构域G具有人IgG1 CH3氨基酸序列，其带有S354C突变和纳入PGK三肽序列的C末端延伸；(c) 第三多肽链具有结构域H、结构域I、结构域J和结构域K，其中结构域以H-I-J-K取向从N末端至C末端排列，且其中结构域H具有第二VL氨基酸序列，结构域I具有人CL κ 氨基酸序列，结构域J具有人IgG1 CH2氨基酸序列，K

具有带有Y349C、D356E、L358M、T366S、L368A和Y407V的人IgG1 CH3氨基酸序列；(d) 第四多肽链具有结构域L和结构域M，其中结构域以L-M取向从N末端至C末端排列，其中结构域L具有第二VH氨基酸序列，结构域M具有人IgG1 CH1氨基酸序列；(e) 第一和第二多肽通过A和F结构域之间的相互作用与B和G结构域之间的相互作用缔合；(f) 第三和第四多肽通过H和L结构域之间的相互作用与I和M结构域之间的相互作用缔合；(g) 第一和第三多肽通过D和J结构域之间的相互作用与E和K结构域之间的相互作用缔合以形成结合分子；(h) 结构域A和结构域F形成特异于第一抗原的第一抗原结合位点；和(i) 结构域H和结构域L形成特异于第二抗原的第二抗原结合位点。

[0294] 本文所述的正交突变可以进一步工程化到B:G配对结构域或E:K配对结构域。

[0295] 6.4.4.22二价双特异性B-体“BC44”

[0296] 参考图2和图6，在一系列实施方式中，结合分子具有第一、第二、第三和第四多肽链，其中(a) 第一多肽链包含结构域A、结构域B、结构域D和结构域E，其中结构域以A-B-D-E取向从N末端至C末端排列，结构域A具有第一VL氨基酸序列，结构域B具有人IgG1 CH3氨基酸序列，其带有Y349C突变、P343V突变和纳入PGK三肽序列的C末端延伸，PGK三肽序列后接IgG1铰链区的DKTHT基序，结构域D具有人IgG1 CH2氨基酸序列。结构域E具有带有S354C突变和T366W突变的人IgG1 CH3氨基酸；(b) 第二多肽链具有结构域F和结构域G，其中结构域以F-G取向从N末端至C末端排列，其中结构域F具有第一VH氨基酸序列，结构域G具有人IgG1 CH3氨基酸序列，其带有S354C突变和纳入PGK三肽序列的C末端延伸；(c) 第三多肽链具有结构域H、结构域I、结构域J和结构域K，其中结构域以H-I-J-K取向从N末端至C末端排列，且其中结构域H具有第二VL氨基酸序列，结构域I具有人CL κ 氨基酸序列，结构域J具有人IgG1 CH2氨基酸序列，K具有带有Y349C、T366S、L368A和Y407V的人IgG1 CH3氨基酸序列；(d) 第四多肽链具有结构域L和结构域M，其中结构域以L-M取向从N末端至C末端排列，其中结构域L具有第二VH氨基酸序列，结构域M具有人IgG1氨基酸序列；(e) 第一和第二多肽通过A和F结构域之间的相互作用与B和G结构域之间的相互作用缔合；(f) 第三和第四多肽通过H和L结构域之间的相互作用与I和M结构域之间的相互作用缔合；和(g) 第一和第三多肽通过D和J结构域之间的相互作用与E和K结构域之间的相互作用缔合以形成结合分子；(h) 结构域A和结构域F形成特异于第一抗原的第一抗原结合位点；以及(i) 结构域H和结构域L形成特异于第二抗原的第二抗原结合位点。本文所述的正交突变可以进一步工程化到B:G配对结构域或E:K配对结构域。

[0297] 6.5. 实施例

[0298] 以下是用于实施本发明的特定实施方式的实施例。所提供的实施例仅用于说明的目的，并不旨在以任何方式限制本发明的范围。已努力确保所用数字(例如，数量、温度等)的准确性，但当然应考虑一些实验误差和偏差。

[0299] 除非另有说明，本发明的实践将采用本领域技术范围内的蛋白质化学、生物化学、重组DNA技术和药理学的常规方法。这些技术在文献中有充分的解释。

[0300] 6.5.1. 实施例1-“BC96”二价抗体构建体

[0301] 我们构建了一种新的二价双特异性构建体，被称为“BC96”，特异于第一抗原“抗原A”和第二抗原“抗原B”，纳入各种正交突变以驱动特异性异二聚化。图7示出了示例性“BC96”结构的显著特征。

[0302] 更详细地,参考根据图2、来自括号中指示的野生型序列的突变和在以下第5节中阐述的序列的结构域和多肽链,结构是:

[0303] 第一多肽链(SEQ ID NO:1)

[0304] 结构域A=VL(“抗原A”)

[0305] 结构域B=CH3(Y349C;K370R)(SEQ ID NO:5)

[0306] 结构域D=CH2(SEQ ID NO:6)

[0307] 结构域E=CH3(T366W)(SEQ ID NO:7)

[0308] 第二多肽链(SEQ ID NO:2)

[0309] 结构域F=VH(“抗原A”)

[0310] 结构域G=CH3(G341A;S354C;E357W)(SEQ ID NO:8)

[0311] 第三多肽链(SEQ ID NO:3)

[0312] 结构域H=VL(“抗原B”)

[0313] 结构域I=CL(κ)(SEQ ID NO:9)

[0314] 结构域J=CH2(SEQ ID NO:10)

[0315] 结构域K=CH3(D356E、L358M、T366S、L368A、Y407V)(SEQ ID NO:11)

[0316] 第四多肽链(SEQ ID NO:4):

[0317] 结构域L=VH(“抗原B”)

[0318] 结构域M=CH1(SEQ ID NO:12)。

[0319] A结构域和F结构域形成特异于“抗原A”的抗原结合位点(A:F)。H结构域和L结构域缔合形成特异于“抗原B”的抗原结合位点(H:L)。B结构域(SEQ ID NO:5)具有带有两个突变(Y349C和K370R)的人IgG1 CH3的序列。Y349C突变引入能够与结构域G中的同源C354突变形成二硫化物的半胱氨酸,而K370R突变当被包括在链G中的357W突变的背景中时可以增加正确形成的分子的产量。

[0320] 结构域D(SEQ ID NO:6)具有人IgG1 CH2的序列。

[0321] 结构域E(SEQ ID NO:7)具有带有突变T366W的人IgG1 CH3的序列。366W是“杵”突变。

[0322] 结构域G(SEQ ID NO:8)具有带有以下突变的人IgG1 CH3的序列:G341A、S354C和E357W。G341A突变可以增加正确形成的分子的产量,354C突变引入能够与结构域B中的同源349C突变形成二硫键的半胱氨酸,E357W突变改善异二聚体界面的正交性并且可以增加正确形成的分子的产量。

[0323] 结构域I(SEQ ID NO:9)具有人C κ 轻链(C κ)的序列。

[0324] 结构域J(SEQ ID NO:10)具有人IgG1 CH2结构域的序列,并且与结构域D的序列相同。

[0325] 结构域K(SEQ ID NO:11)具有带有如下改变的人IgG1 CH3的序列:D356E、L358M、T366S、L368A、Y407V。356E和L358M引入降低免疫原性的同种-同种异型氨基酸。366S、368A和407V是“臼”突变。

[0326] 结构域M(SEQ ID NO:12)具有人IgG1 CH1区的序列。

[0327] 序列在下面的第5节中提供,在SEQ ID NO:1-12中用下划线标出了从野生型突变的所有位置。四个可变结构域的序列没有完整提供,而是分别以<VL-A>、<VH-A>和<VL-B>、<

VH-B>表示抗原结合位点“A”和“B”。为了表示连接融合点,典型的人κVL结构域中的最后三个氨基酸“EIK”被包括在内并以斜体显示,典型的人VH结构域中的最后三个氨基酸“VSS”被包括在内并以斜体显示。

[0328] 与构建体BC-1、BC-6、BC-28和BC-44相反,图7中描绘的BC-96的实施方式省略了结构域E:K中的工程化二硫化物。不同于所描绘的结构体的替代实施方式包括:(a)在结构域E:K中包括工程化二硫键;(b)翻转结构域E:K之间的杵臼突变;(c)翻转结构域B:G中的Y+K:S+E对;或其任何子集或组合。此外,在结构域E:K中,除了或代替杵臼突变,还可以使用CH3结构域中的其他已知正交突变。在大于100μg/ml的浓度下使用哺乳动物表达,“BC96”可以容易地以高水平表达。我们发现,使用来自ThermoFisher的CH1-特异性CaptureSelect™亲和树脂,二价双特异性“BC96”蛋白可以很容易地在单个步骤中被纯化。

[0329] 将BC96蛋白与替代物一起表达,以探索各种突变对BC96正确装配的贡献。每个构建体的CH1纯化后的尺寸排阻色谱(SEC)分析的结果表明,在第一CH3结构域中E357W突变的存在和在与第一CH3结构域相对的第二CH3结构域中K370R突变的存在,对于产生更高纯度的正确装配的产物是重要的(图8A-8D)。将在结构域B中缺少K370突变且在结构域G中缺少E357W突变(图8A),在结构域B中缺少K370突变但在结构域G中含有E357W突变(图8B),以及在结构域B中含有K370R突变但在结构域G中缺少E357W突变(图8C)的BC96变体与在结构域B中含有K370R突变且在结构域G中含有E357W突变(图8D)的BC96进行比较。结果表明在第一CH3结构域中E357W突变的存在和在相对的CH3结构域中K370R突变的存在显著改善了两个结构域的二聚化效率和BC96抗体构建体的正确组装。

[0330] 6.5.2. 实施例2-评价用于改善的CH3二聚化的CH3修饰

[0331] 为了评价由单个突变赋予的正交性程度,产生了由具有明显不同质量的两侧组成的不对称抗体构建体(图9)。在Fc区的CH3结构域(结构域E和K)中进行突变。构成构建体每一侧的多肽被共表达,SDS-PAGE和尺寸排阻色谱用于评价所需异二聚体产物和同源二聚体污染物的装配(图10A-10C和11A-11B)。

[0332] 每个评估的构建体含有带有Y349C突变的CH3结构域(结构域E)和带有S354C突变的相对CH3结构域(结构域K),导致在正确组装的产物中两个CH3结构域之间的工程化二硫化物(图9)。在结构域K的CH3序列中进行另外的置换以产生还含有E357W和/或S364R突变的构建体。纯化后,大的同源二聚体污染物(污染物1)和小的同源二聚体污染物(污染物2)的存在可以使用SDS-PAGE凝胶通过大小容易地与所需的异二聚体区分开。

[0333] 结果表明在结构域K的CH3序列中不存在E357和S364突变二者的情况下两种同源二聚体污染物的显著组装(图10A)。当结构域K的CH3序列含有E357W突变但不含S364突变时,产生较少的污染物1同源二聚体(图10B和图11A)。相反,当结构域K的CH3序列含有E357W和S364R突变二者时,几乎检测不到污染物1同源二聚体(图10C和图11B)。

[0334] 图10A-10C中的结果显示了用蛋白A纯化后通过SEC和SDS-PAGE的产物的分析。图11A-11B中的结果显示了用CH1纯化后通过SEC和SDS-PAGE的产物的分析。

[0335] 这些结果表明在第一CH3结构域中S354C、E357W和S364R突变以及在与第一CH3结构域相对的第二CH3结构域中Y349C突变的存在可以显著改善需要第一和第二CH3结构域二聚化的产物的组装效率。

[0336] 7. 序列

- [0337] BC96链1SEQ ID NO:1
 <VL-A>EIKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLTCLVRGFYPSDIAVEWESNGQPE
 NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSP
 GKDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF
- [0338] NNYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
 NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
 K
- [0339] BC96链2SEQ ID NO:2
 <VH-A>VSSAQPREPQVYTLPPCRDWLTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
- [0340] NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSP
 GK
- [0341] BC96链3SEQ ID NO:3
 <VL-B>EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
 SGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
 ECDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF
- [0342] NNYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
 NNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
 K
- [0343] BC96链4SEQ ID NO:4
 <VH-B>VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
- [0344] GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
- [0345] BC96结构域B SEQ ID NO:5
 GQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLTCLVRGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
- [0346] LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0347] BC96结构域D SEQ ID NO:6
 APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
- [0348] KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
- [0349] BC96结构域E SEQ ID NO:7
 GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
- [0350] LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0351] BC96结构域G SEQ ID NO:8
AQPREPQVYTLPPCRDWLTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
- [0352] LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0353] BC96结构域I SEQ ID NO:9
 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
- [0354] EQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0355] BC96结构域J SEQ ID NO:10
 APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
- [0356] KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
- [0357] BC96结构域K SEQ ID NO:11
 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
- [0358] LDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

- [0359] BC96结构域M SEQ ID NO:12
- [0360] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
- [0361] BC96链1DNA序列(不包括VL)SEQ ID NO:13
- GAGATCAAGGGCCAGCCCCGGGAGCCCCAGGTCTGTACCCTGCCGCCGTACACGGGAC
GAACTCACTAAGAACCAAGTGTCCCTGaCTTGCCTGGTCAGAGGATTCTATCCGAGC
GACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGCCAGCCCCGAGAACAACACTACAAGACGACA
CCCCCGGTGCTTGACAGCGACGGTTCCTTCTTTTTGTACTCGAAGTTGACCGTCGAT
AAGTCACGCTGGCAACAGGGAAACGTGTTACGCTGCTCCGTGATGCACGAAGCCCTG
CACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTGAGCCTCTCCCCGGGAAAGGACAAGACTCAC
ACGTGCCCCGCCGTGCCACGACCTGAGCTGTTGGGAGGTCCTAGCGTGTTCTGTTC
CCGCCGAAGCCCAAGGACACCCTGATGATTTTCGAGGACTCCGGAAGTGACCTGTGTG
[0362] GTGGTGGATGTGTCCCATGAGGACCCCGAAGTCAAATTCAATTGGTACGTGGATGGA
GTGGAAGTGCACAATGCCAAGACTAAGCCAGAGAAGAACAGTACAACCTCGACCTAC
CGCGTGGTGTCCGTGCTGACTGTGTTGCATCAGGACTGGCTCAACGGAAAAGAGTAC
AAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTCCCGGCACCGATCGAGAAAACCATCTCGAAA
GCCAAGGGCCAGCCCCGGGAGCCTCAGGTCTACACCCTGCCACCATCGCGGGATGAA
CTCACCAAGAACCAAGTGTGCTGTGGTGTCTCGTGAAGGGCTTTTACCCTTCCGAC
ATTGCCGTGGAGTGGGAATCCAACGGGCAGCCTGAAAACAACACTACAAGACCACCCCG
CCCGTGCTCGACTCGGATGGAAGCTTCTTCCTGTACTCTAAGCTGACCGTGGACAAG
TCCCGGTGGCAGCAGGGAAACGTGTTACGCTGCTCGGTCATGCACGAAGCCCTGCAT
AACCCTACACCCAGAAGTCACTGTCCCTGAGCCCGGGGAAG
- [0363] BC96链2DNA序列(不包括VH)SEQ ID NO:14
- GTGTCCAGCGCCCAGCCCCGGGAGCCCCAGGTCTACACCCTGCCGCCGTGTCTGGGAC
TGGCTCACTAAGAACCAAGTGTCCCTGACTTGCCTGGTCAAGGGATTCTATCCGAGC
[0364] GACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGCCAGCCCCGAGAACAACACTACAAGACGACA
CCCCCGGTGCTTGACAGCGACGGTTCCTTCTTTTTGTACTCGAAGTTGACCGTCGAT
AAGTCACGCTGGCAACAGGGAAACGTGTTACGCTGCTCCGTGATGCACGAAGCCCTG
CACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTGAGCCTCTCCCCGGGAAAG
- [0365] 链3DNA序列(不包括VH)SEQ ID NO:15
- GAGATTAAGAGAACCGTCGCAGCCCCCTCCGTGTTTCATCTTCCCTCCCTCGGATGAG
CAGCTGAAGTCCGGCACCGCGAGCGTGGTCTGCCTGCTCAACAACCTTCTATCCGCGG
GAAGCGAAGGTCCAGTGGAAAGGTGCACAACGCCCTGCAGTCGGGAAACTCCCAGGAG
TCCGTGACTGAGCAGGATTCAAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCGTCTACCCCTACC
CTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTCTACGCCTGCGAAGTCACGCACCAA
GGCCTTAGCTCCCCTGTGACCAAGTCATTCAACCGGGGGGAGTGCGACAAGACTCAC
ACGTGCCCCGCCGTGCCACGACCTGAGCTGTTGGGAGGTCCTAGCGTGTTCTGTTC
CCGCCGAAGCCCAAGGACACCCTGATGATTTTCGAGGACTCCGGAAGTGACCTGTGTG
[0366] GTGGTGGATGTGTCCCATGAGGACCCCGAAGTCAAATTCAATTGGTACGTGGATGGA
GTGGAAGTGCACAATGCCAAGACTAAGCCAGAGAAGAACAGTACAACCTCGACCTAC
CGCGTGGTGTCCGTGCTGACTGTGTTGCATCAGGACTGGCTCAACGGAAAAGAGTAC
AAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTCCCGGCACCGATCGAGAAAACCATCTCGAAA
GCCAAGGGCCAGCCCCGGGAACCTCAAGTCTACACTCTGCCACCCTCGCGGGAAGAA
ATGACCAAGAACCAAGTGTCCCTGAGCTGTGCCGTGAAGGGCTTCTACCCGTCCGAC
ATCGCCGTGGAATGGGAATCGAACGGGCAGCCGGAGAACAATTACAAGACCACCCCT
CCCGTGCTGGACAGCGATGGATCGTTCTTCCTGGTGTCCAAGCTCACTGTGGACAAG
TCGCGGTGGCAGCAGGGAAACGTGTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCAT
AACCCTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTCTCACCCGGGAAG

- [0367] 链4DNA序列(不包括VH)SEQ ID NO:16
GTATCAAGCGCCTCAACTAAGGGCCCCCTCGGTGTTCCCTCTGGCCCCGAGCTCCAAG
TCGACCTCCGGCGGTACAGCCGCTCTGGGTTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCTGAA
[0368] CCAGTGACCGTGTCTTGGAAGTCTGGGGCGCTGACCAGCGGGGTGCACACTTCCCCG
GCGGTGCTGCAGTCGTCGGGACTGTACTCCCTGTCCTCCGTCGTGACGGTGCCCTCC
TCCTCACTGGGCACCCAGACTTACATTTGCAACGTGAACCACAAGCCGAGCAACACC
AAGGTCGACAAGAAGGTCGAGCCCAAGTCCTGT
- [0369] BC96-A链1SEQ ID NO:17
<VL-A>EIKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GKD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF
[0370] NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K
- [0371] BC96-A链2SEQ ID NO:18
<VH-A>VSSAQPREPQVYTLPPCRDWLTKNQVRLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
[0372] NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK
- [0373] BC96-A结构域B SEQ ID NO:19
GQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
[0374] LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0375] BC96-A结构域G SEQ ID NO:20
AQPREPQVYTLPPCRDWLTKNQVRLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
[0376] NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0377] 8. 等同物和通过引用的并入
- [0378] 虽然已经参考优选实施方式和各种替代实施方式具体示出和描述了本发明,但是相关领域的技术人员将理解,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可以在其中进行形式和细节上的各种改变。
- [0379] 出于所有目的,在本说明书的正文中引用的所有参考文献、授权的专利和专利申请通过引用整体并入本文。

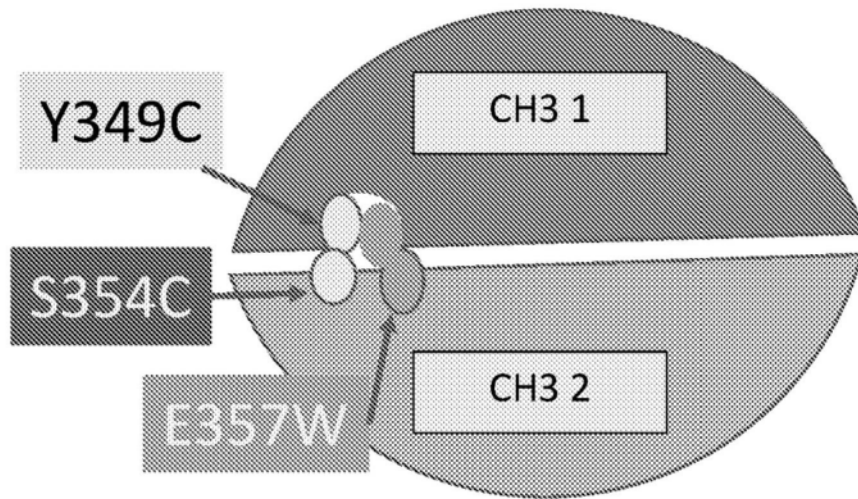


图1A

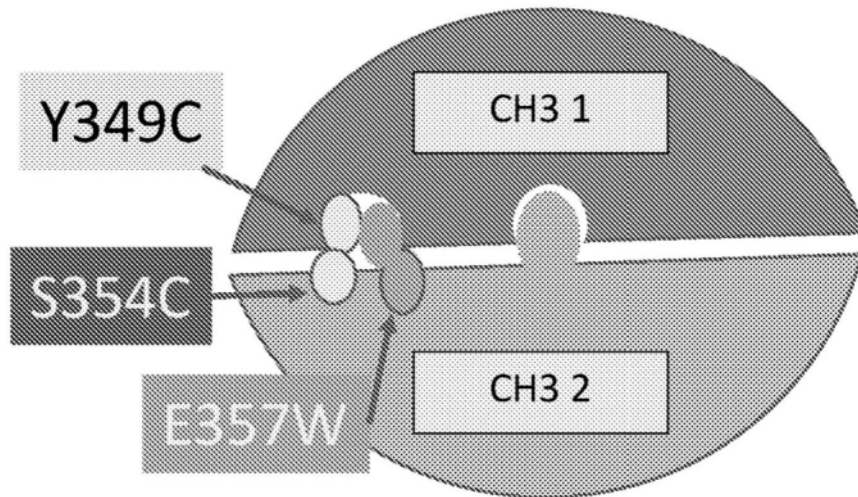


图1B

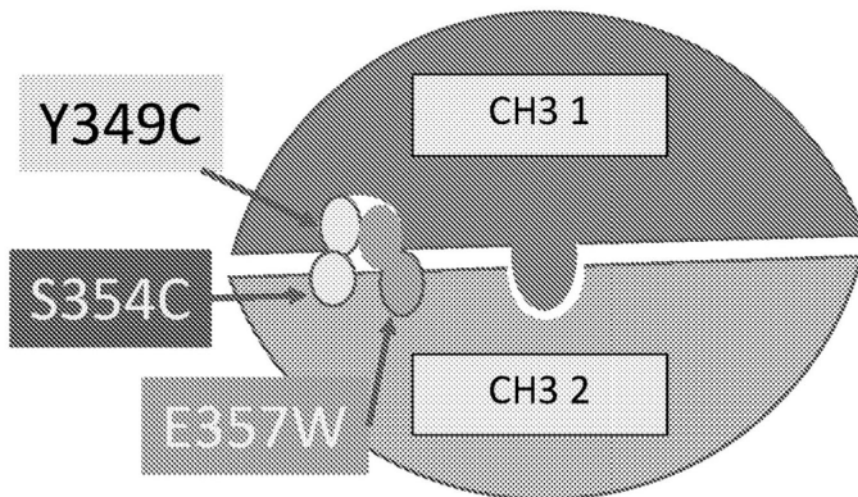
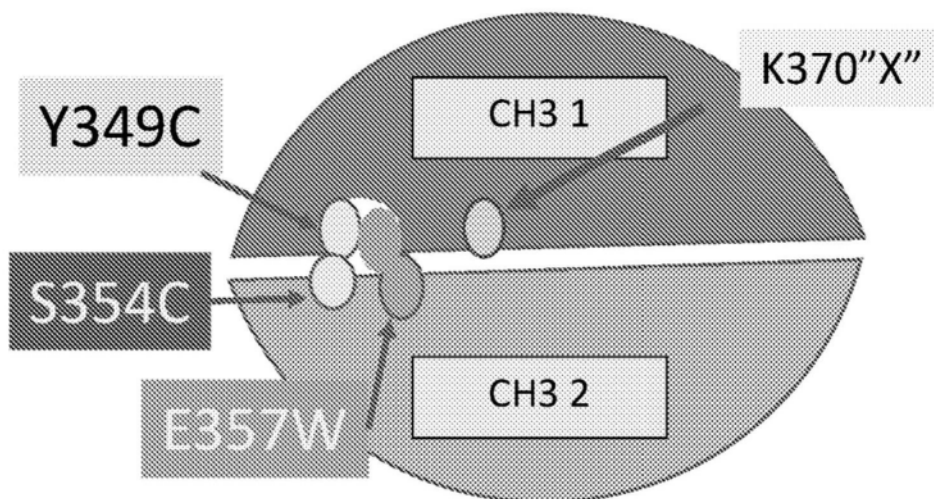


图1C

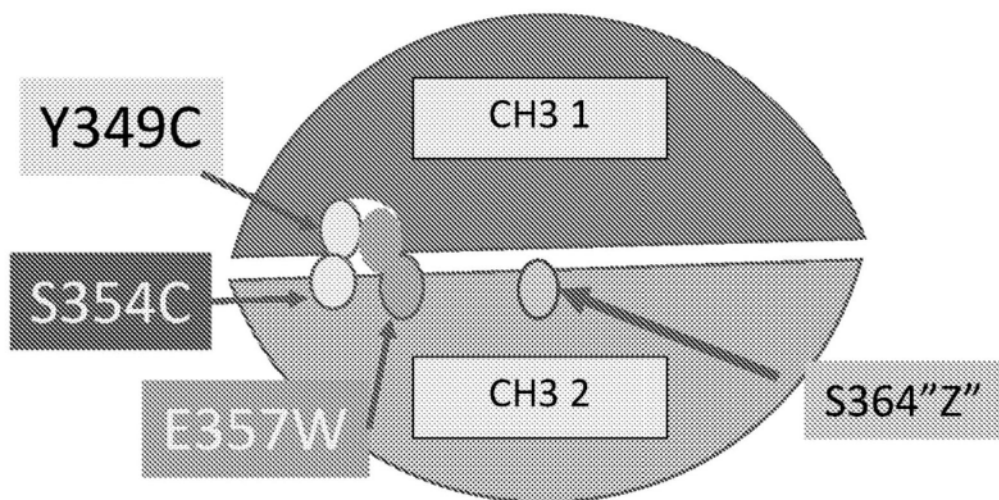


"X" = D,E,F,H,M,N,Q,R,S,T,W, 或 Y

或

"X" = A,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W, 或 Y

图1D



“Z” = A,D,E,H,K,L,N,Q,T,W, 或 Y

或

“Z” = A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,T,V,W, 或 Y

图1E

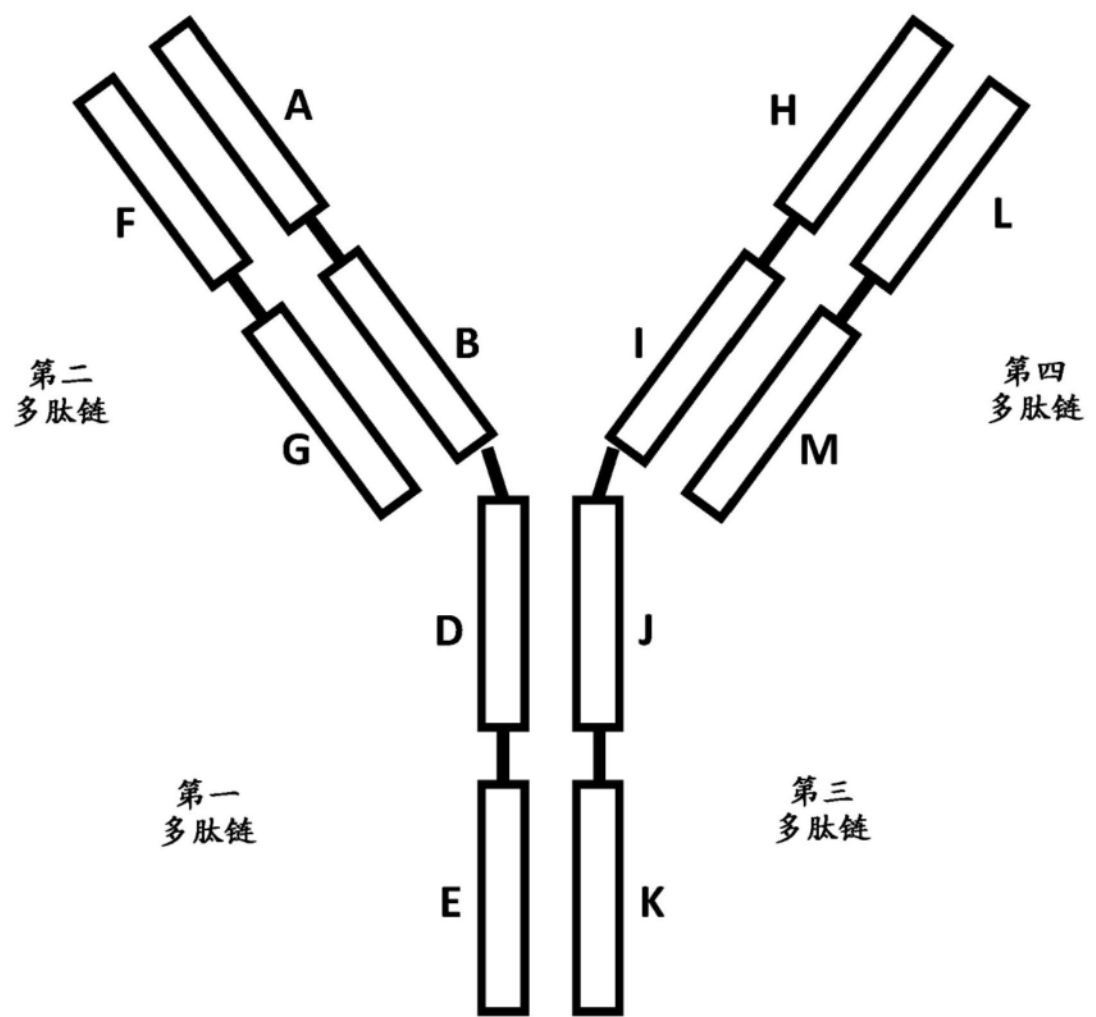
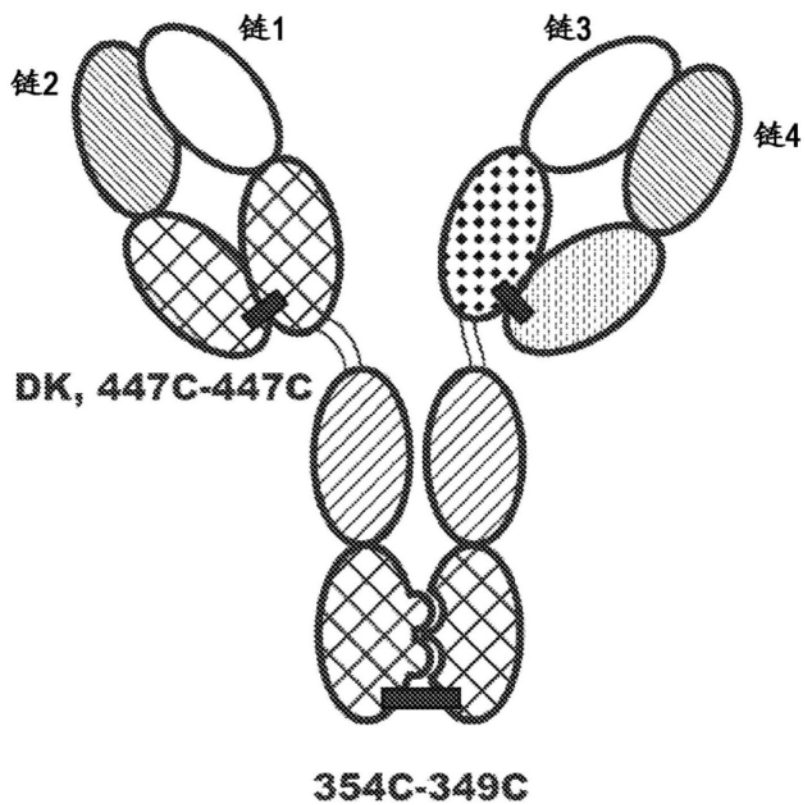


图2

BC-1



图例:

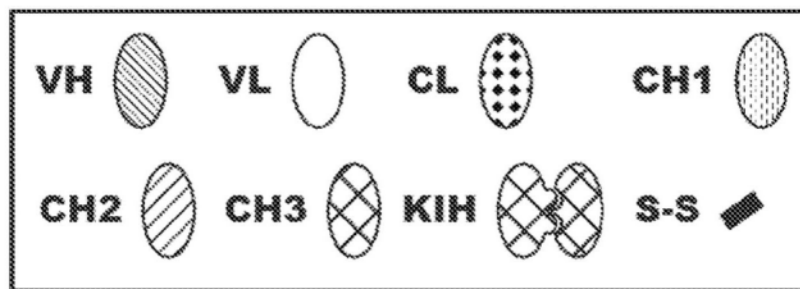
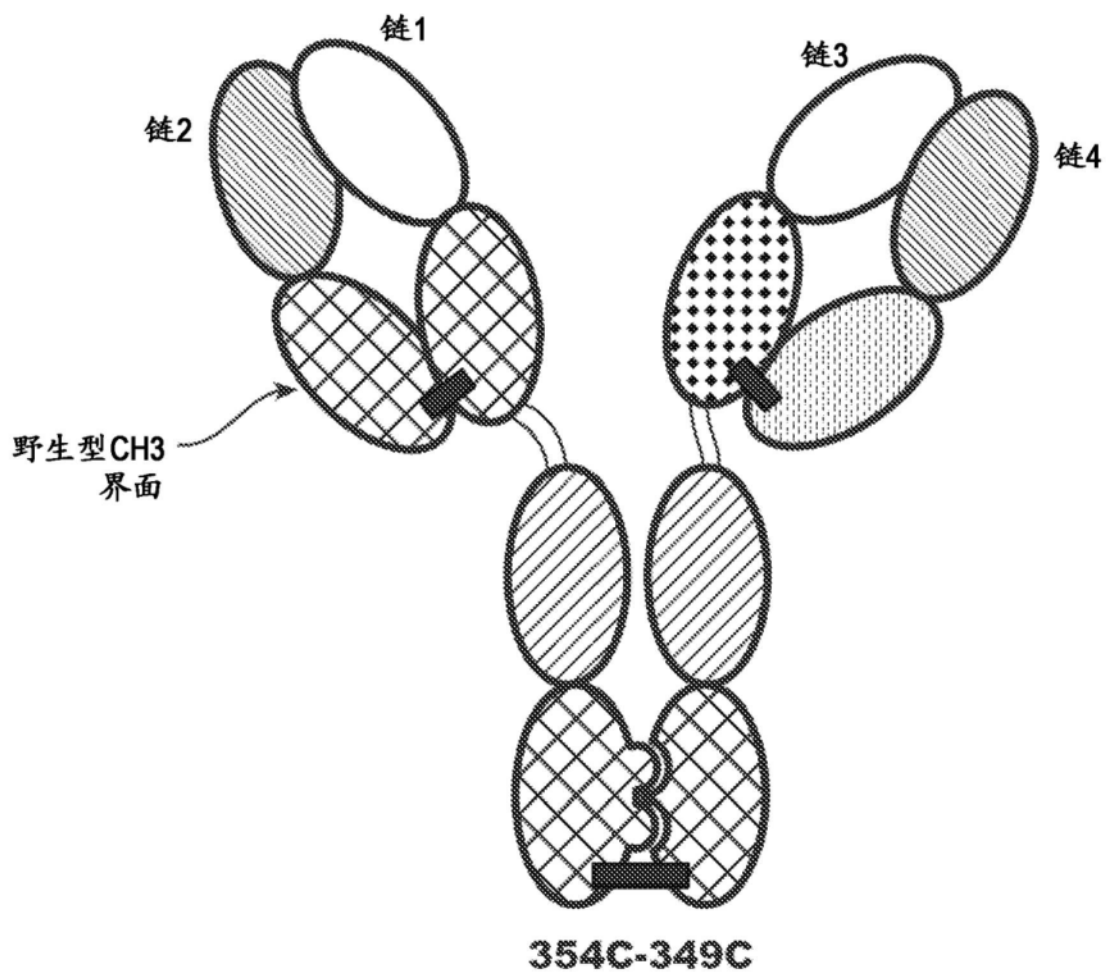


图3

BC-6



图例:

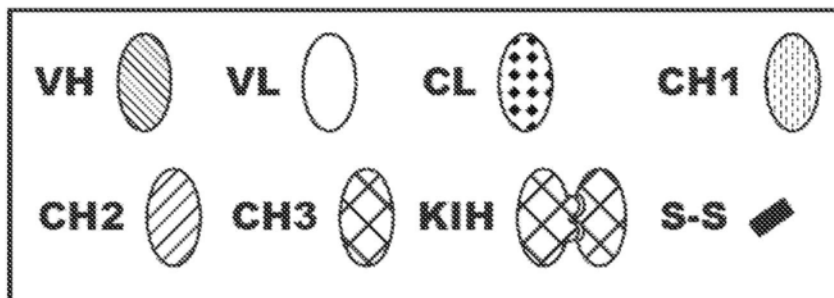
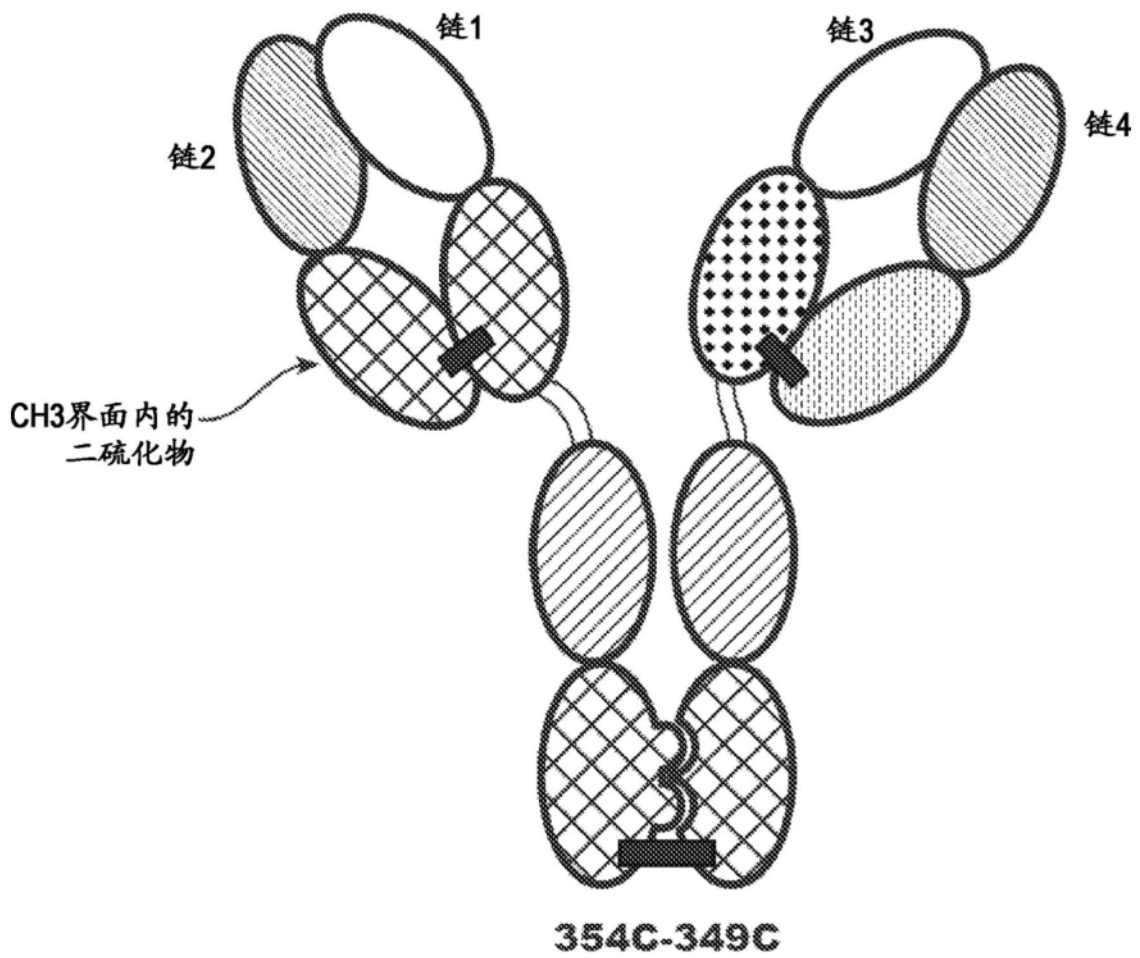


图4

BC-28



图例:

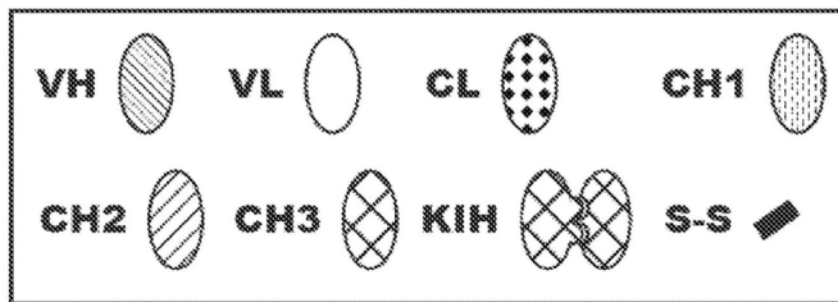
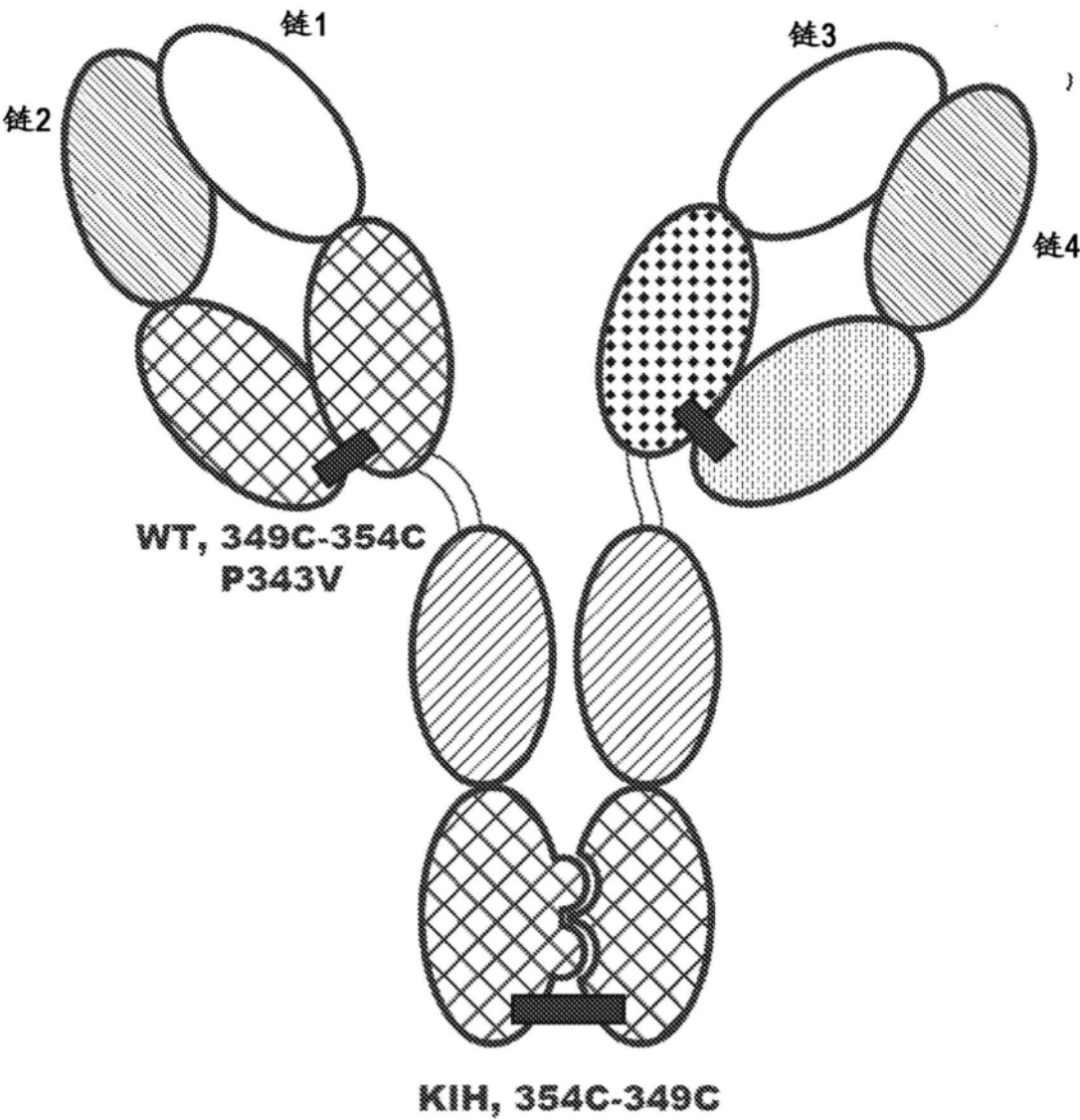


图5

BC-44



图例:

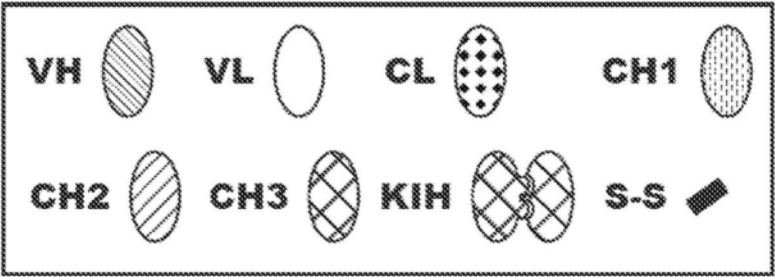
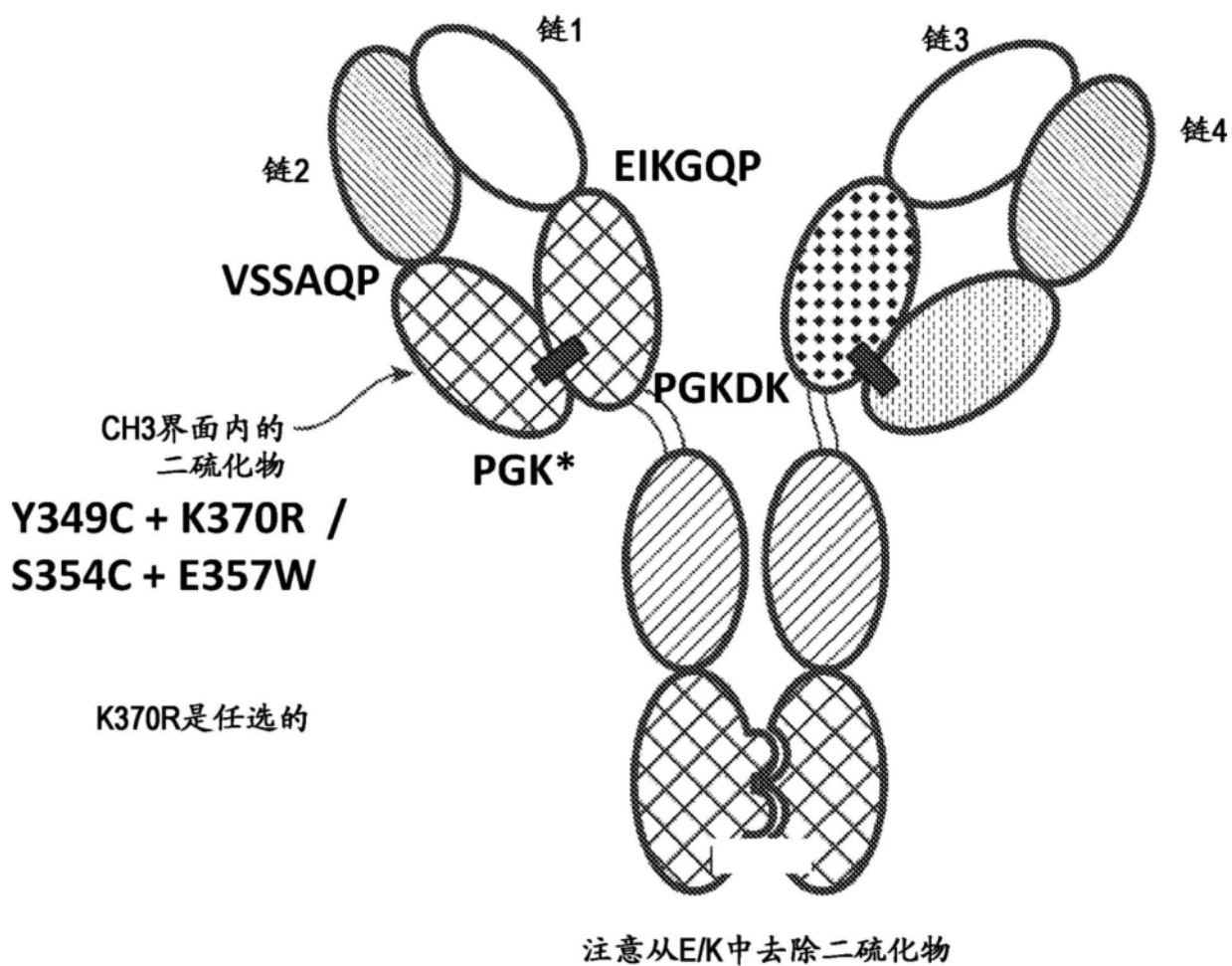


图6

BC-96



图例:

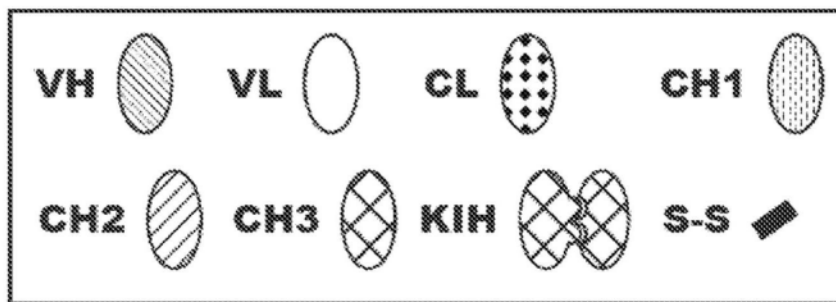


图7

修饰的BC96（无E357突变，无K370突变）

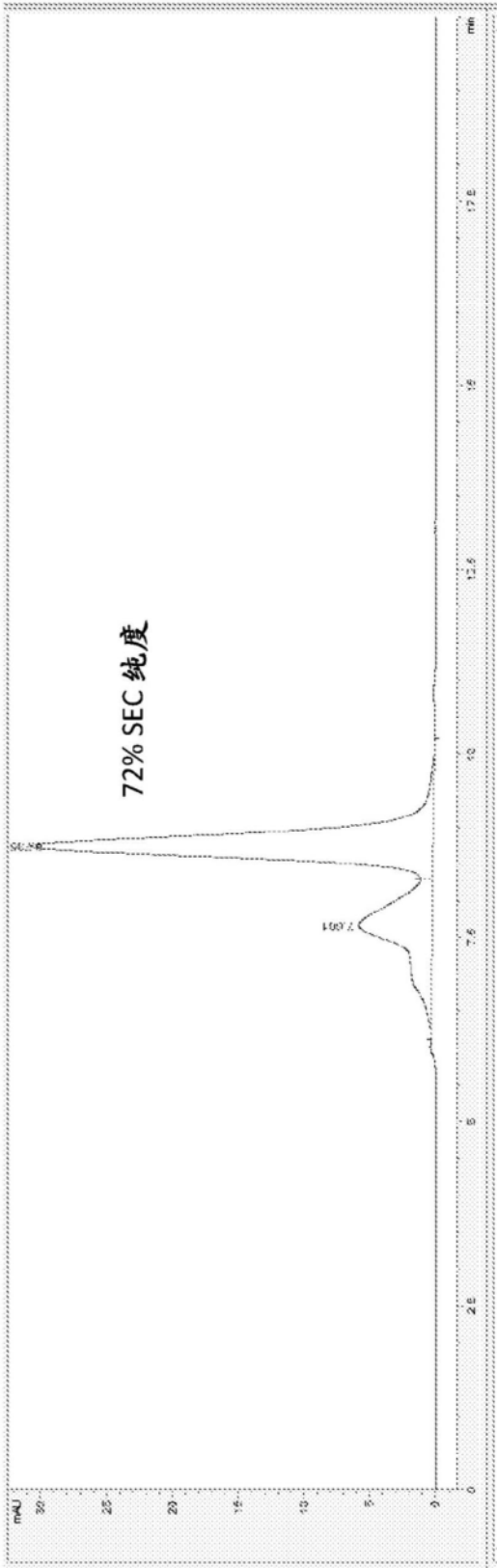


图8A

修饰的BC96 (E357W, 无K370突变)

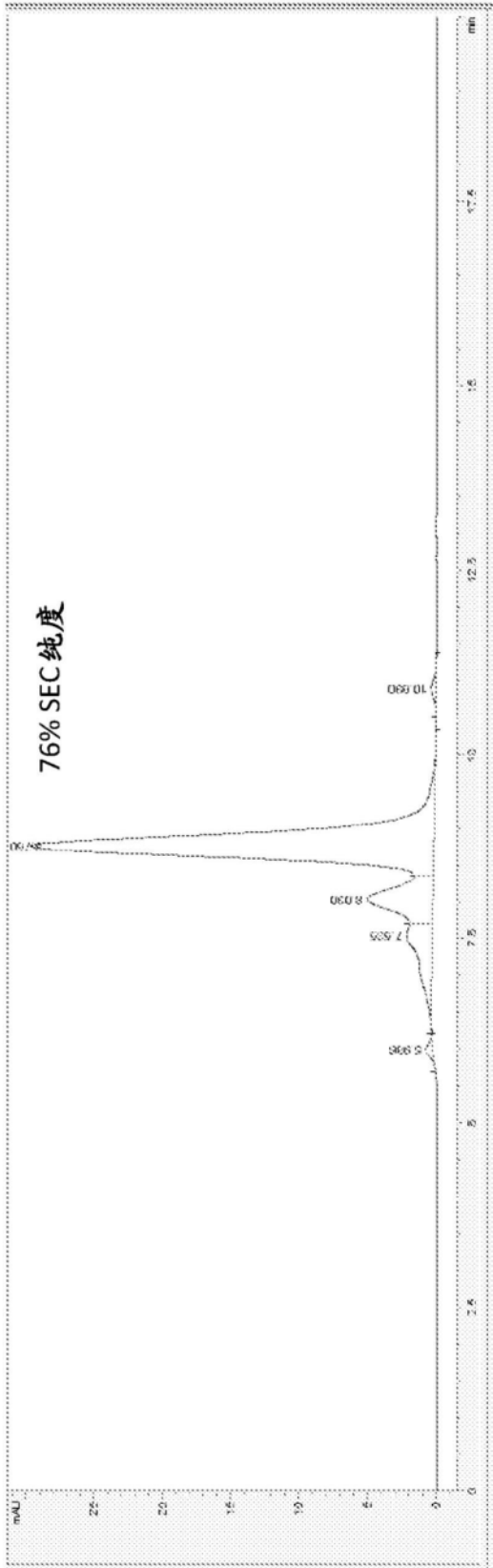


图8B

修饰的BC96（无E357突变，K370R）

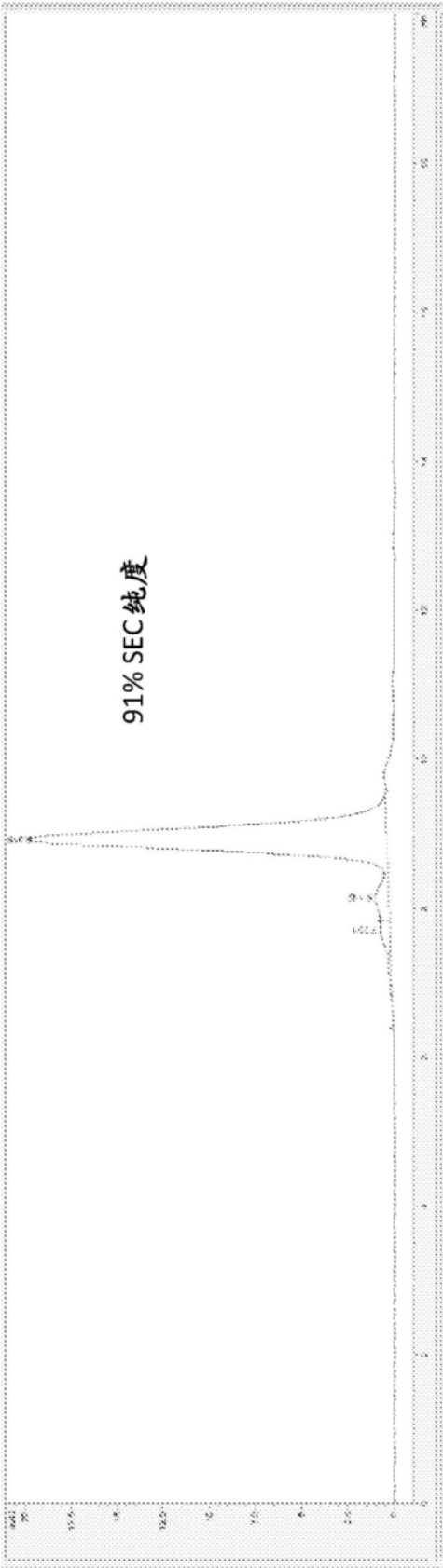


图8C

BC96 (E357W, K370R)

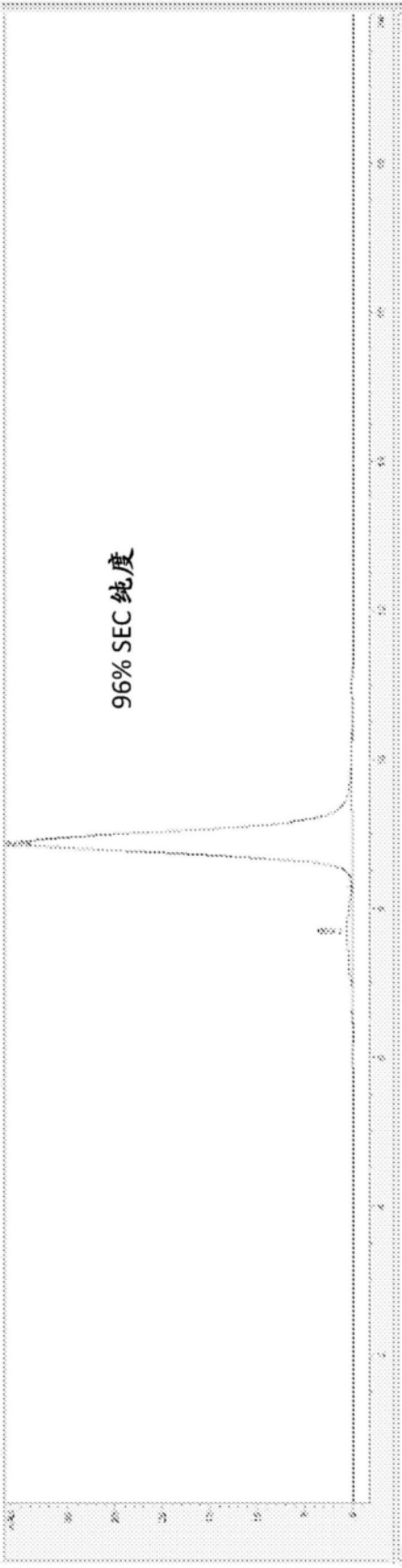


图8D

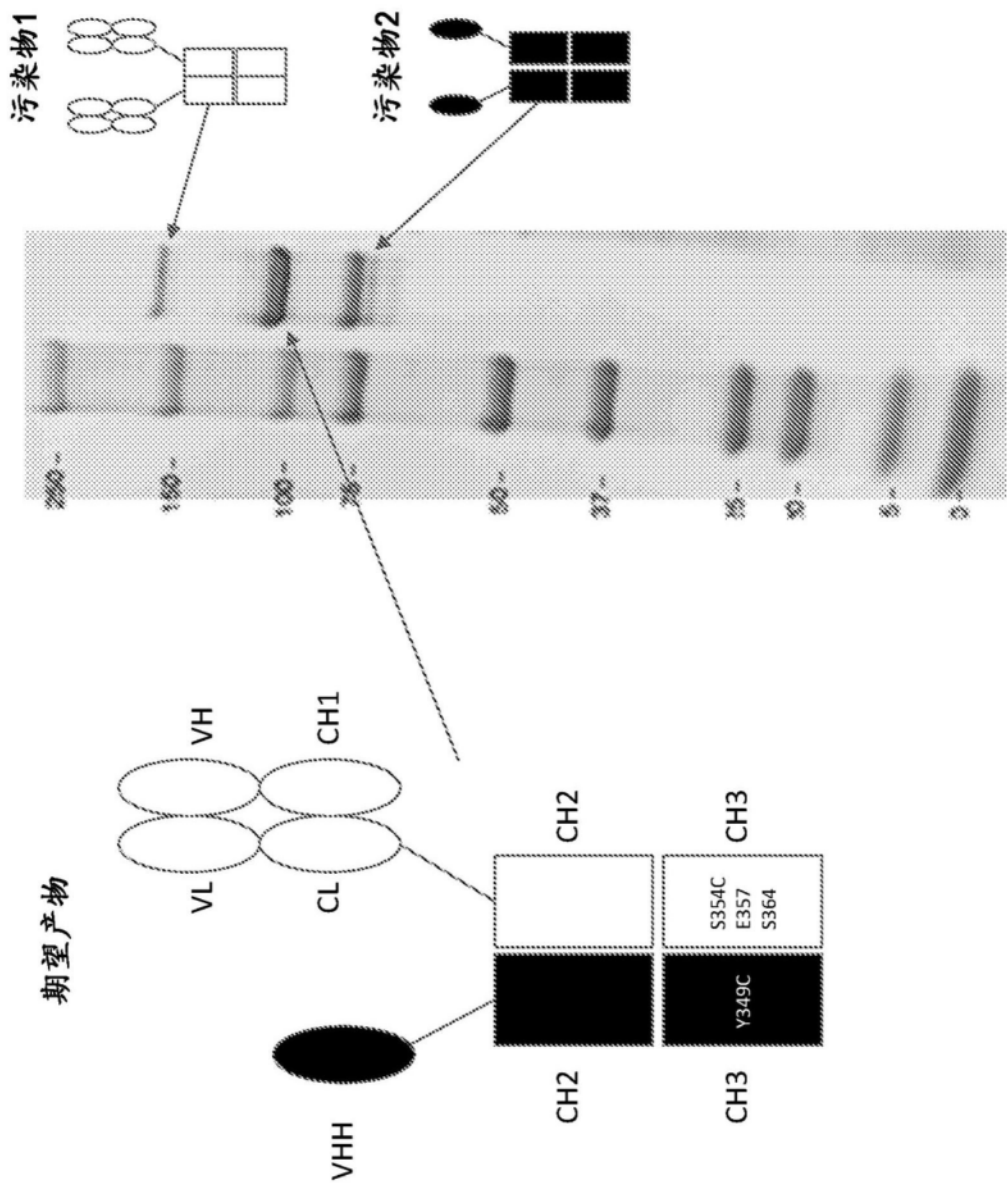


图9

对照 (无E357突变, 无S364突变)

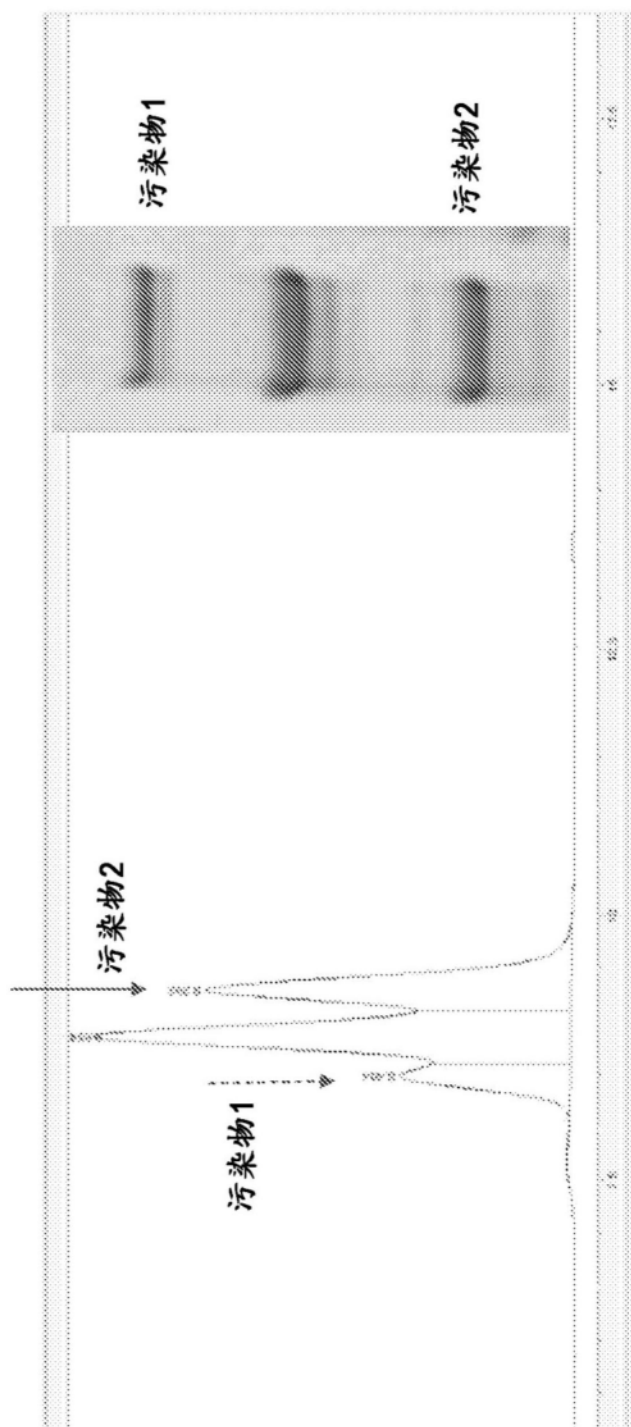


图10A

E357W, 无S364突变

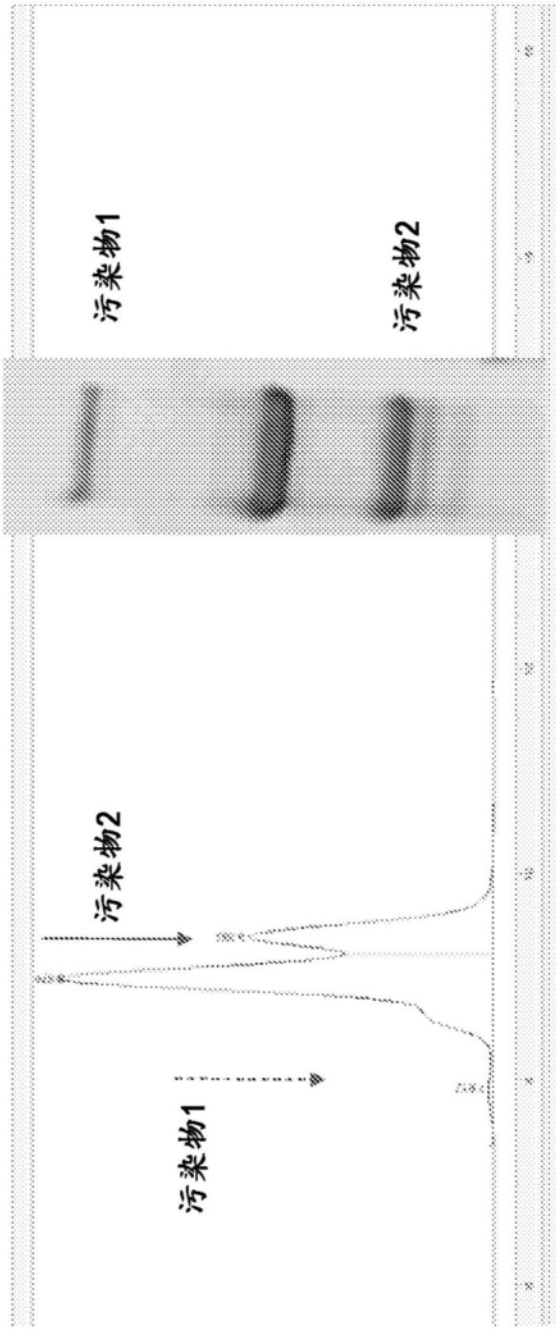


图10B

E357W, S364R

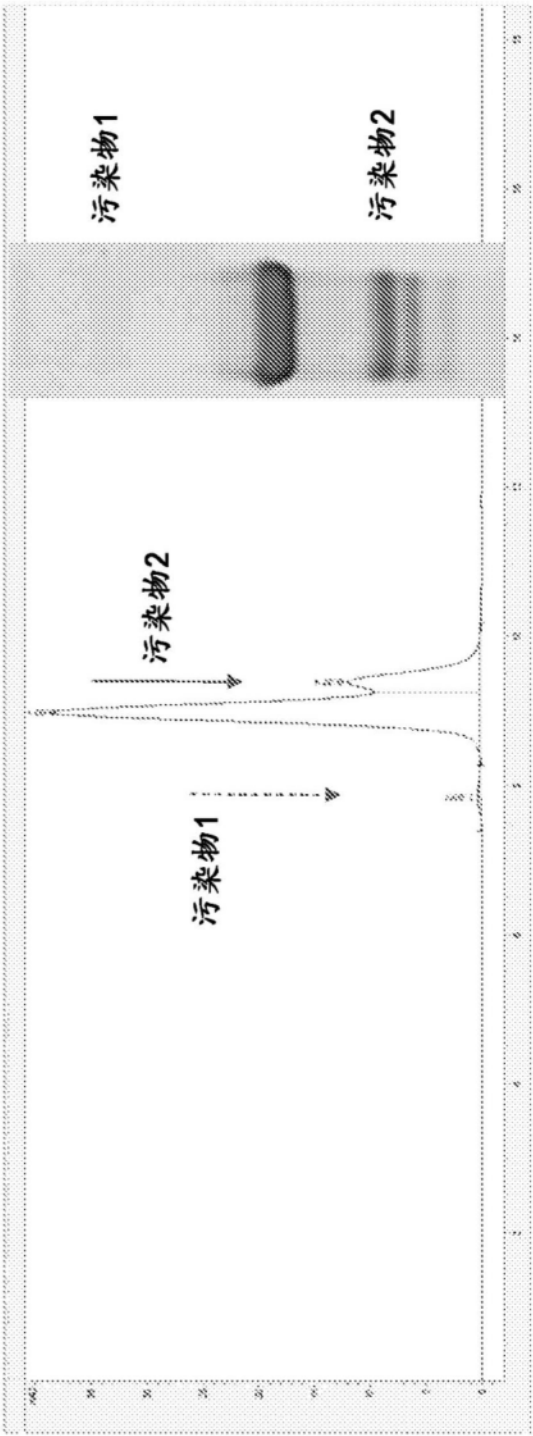


图10C

E357W

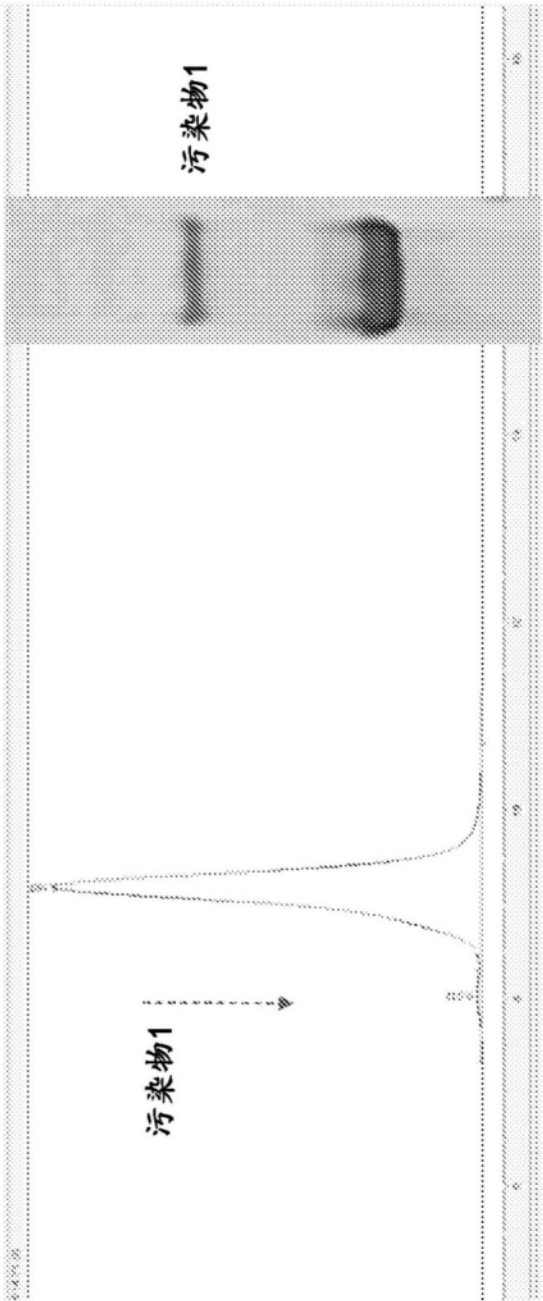


图11A

E357W, S364R

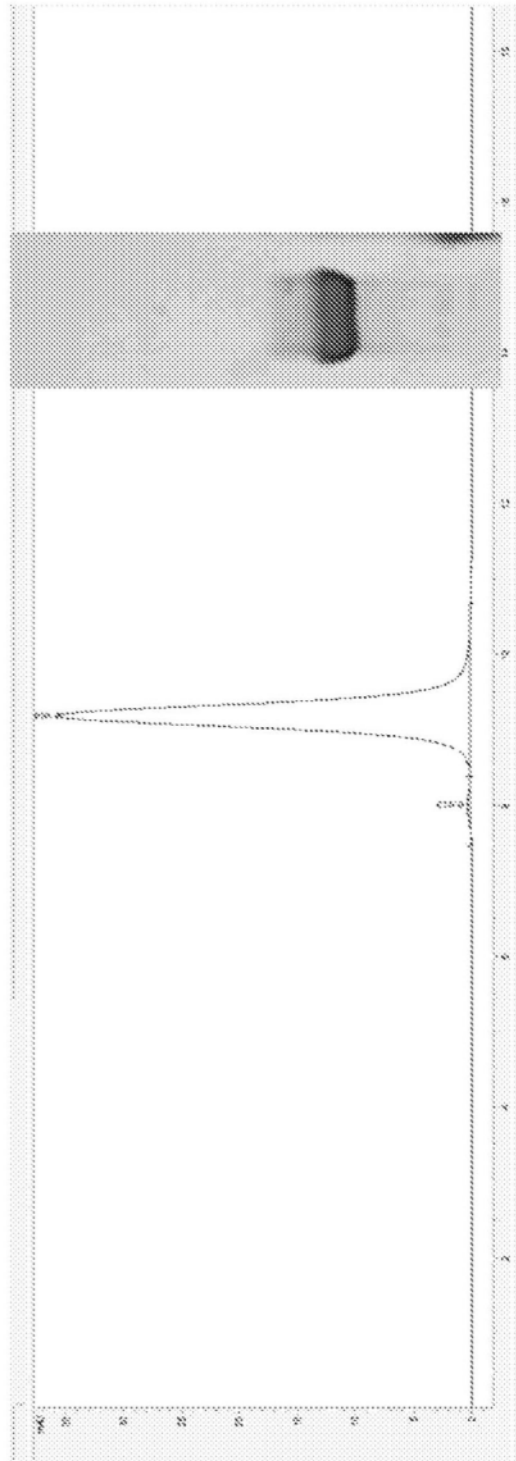


图11B