



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117756928 A

(43) 申请公布日 2024.03.26

(21) 申请号 202311237972.8

C12N 15/62 (2006.01)

(22) 申请日 2023.09.22

A61K 39/395 (2006.01)

(66) 本国优先权数据

A61K 47/68 (2017.01)

202211165661.0 2022.09.23 CN

A61P 35/00 (2006.01)

(71) 申请人 天辰生物医药(苏州)有限公司

地址 201203 上海市浦东新区碧波路518号
317室

(72) 发明人 马海立 刘运华 刘恒

(74) 专利代理机构 上海巛石知识产权代理事务
所(普通合伙) 31309

专利代理师 张琤 蒋舫玮

(51) Int. Cl.

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

权利要求书1页 说明书22页
序列表(电子公布) 附图13页

(54) 发明名称

Fc ε RI结合蛋白

(57) 摘要

本申请提供了一种结合蛋白,所述结合蛋白包含IgG的Fc区或其片段,其能够结合Fc ε RI。本申请还提供了所述编码所述结合蛋白的核酸分子,包含所述核酸分子的载体、细胞,包含所述结合蛋白的药物组合物,以及其在制备药物中的用途。

1. 结合蛋白,其能够结合FcεRI,所述结合蛋白包含IgG的Fc区或其片段,所述IgG的Fc区或其片段包含源自IgE Fc区CH3中的BC-LOOP、DE-TURN和/或FG-LOOP或其片段,且所述IgG的Fc区CH2中与IgE Fc区CH3中的BC-LOOP、DE-TURN和/或FG-LOOP或其片段相应的区域被所述IgE Fc区CH3中的BC-LOOP、DE-TURN和/或FG-LOOP或其片段所替换或取代。
2. 结合蛋白,其包含IgG的Fc区或其片段,与野生型IgG Fc区相比,所述IgG Fc区或其片段包含一个或多个氨基酸突变,突变后的所述IgG的Fc区或其片段能够结合FcεRI。
3. 根据权利要求2所述的结合蛋白,其中IgG的Fc区的氨基酸的区域位置通过IMGT unique numbering for C-DOMAIN编码方式确定。
4. 根据权利要求2所述的结合蛋白,其还包含IgE的恒定区片段。
5. 根据权利要求2所述的结合蛋白,其包含SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:31中任一项所示的氨基酸序列。
6. 融合蛋白,其包含权利要求1-5中任一项所述的结合蛋白,以及一种或多种其他功能活性蛋白。
7. 药物分子,其包含权利要求1-5中任一项所述的结合蛋白、或权利要求6所述的融合蛋白。
8. 分离的一种或多种核酸分子,其编码权利要求1-5中任一项所述的结合蛋白、或权利要求6所述的融合蛋白。
9. 药物组合物,其包含权利要求1-5中任一项所述的结合蛋白、权利要求6所述的融合蛋白、权利要求7所述的药物分子、或权利要求8所述的核酸分子,以及任选地药学上可接受的载体。
10. 权利要求1-5中任一项所述的结合蛋白、权利要求6所述的融合蛋白、权利要求7所述的药物分子、权利要求8所述的核酸分子、或权利要求9所述的药物组合物在制备药物中的用途,所述药物用于预防或治疗疾病和/或病症。

FcεRI结合蛋白

技术领域

[0001] 本申请涉及生物医药领域,具体的涉及一种FcεRI结合蛋白。

背景技术

[0002] 新生儿Fc受体(FcRn)属于广泛且功能上相异的MHC分子家族。与经典的MHC家族成员相反,FcRn几乎没有多样性并且不能呈递抗原。相反,通过它在低pH值下以高亲和力结合IgG和白蛋白的能力,它调节这两种蛋白的血清半衰期。IgG的血清半衰期明显长于类似大小的球状蛋白,包括不与FcRn结合的IgE(IgG约为21天,IgE约为<2天)。此外,FcRn通过其影响IgG寿命的能力以及其在先天性和适应性免疫应答中的参与,在粘膜和全身部位的免疫中起重要作用。

[0003] IgE受体FcεRI参与IgE介导的多种免疫细胞的激活,导致多种免疫疾病,例如过敏性疾病,通过FcεRI结合蛋白阻断IgE与FcεRI受体的结合具有治疗免疫疾病的潜力。另外,通过靶向FcεRI受体募集相关免疫细胞也可用于肿瘤治疗。因此,FcεRI结合蛋白具有多种治疗潜力。

[0004] 天然IgE抗体具有很强的FcεRI结合活性,但对其作为药物开发仍有诸多缺陷,例如,天然IgE有约14个潜在的糖基化位点(见图1A),不利于大规模生产后的质量控制;IgE Fc无法与Protein A或G结合,无法使用现有的成熟IgG类药物的纯化方法进行大规模纯化;IgE Fc不具有FcRn结合能力,因此天然IgE的血浆半衰期较短;另外重组IgE与FcεRI的亲和力过高, 10^{-10} M(Metzger H.The receptor with high affinity for IgE.Immunol Rev.1992;125:37-48),可能会在作为药物施用时引起严重过敏反应等。综上所述,需要与IgE和IgG两者相比具有改善特性的蛋白。

发明内容

[0005] 本申请提供了一种结合蛋白,其既具有与FcεRIa结合的能力,又能够保持IgE Fc相关的良好成药性特质。本申请所述的结合蛋白具有以下性质中的一种或多种:(1)能够结合FcεRIa;(2)能够结合FcRn;(3)具有良好的表达质量;(4)可以使用Protein A或G直接纯化;以及(5)比IgE Fc具有减少的潜在糖基化位点。

[0006] 一方面,本申请提供了一种结合蛋白,其能够结合FcεRI,所述结合蛋白包含IgG的Fc区或其片段,所述IgG的Fc区或其片段包含源自IgE Fc区CH3中的BC-LOOP、DE-TURN和/或FG-LOOP或其片段,且所述IgG的Fc区CH2中与IgE Fc区CH3中的BC-LOOP、DE-TURN和/或FG-LOOP或其片段相应的区域被所述IgE Fc区CH3中的BC-LOOP、DE-TURN和/或FG-LOOP或其片段所替换或取代。

[0007] 在某些实施方式中,所述IgG为人IgG。

[0008] 在某些实施方式中,所述IgG为IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

[0009] 在某些实施方式中,所述野生型IgE Fc区CH2包含SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27中任一项所示的氨基酸序列。

- [0010] 在某些实施方式中,所述IgG Fc区的片段至少包含IgG Fc区CH2或其片段。
- [0011] 在某些实施方式中,所述源自IgE Fc区CH3中的BC-LOOP、DE-TURN和/或FG-LOOP或其片段能够与FcεRI相结合。
- [0012] 在某些实施方式中,所述IgG Fc区CH2中的BC-LOOP包含IgG Fc区CH2的第27-38位氨基酸序列。
- [0013] 在某些实施方式中,所述IgG Fc区CH2中的BC-LOOP包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。
- [0014] 在某些实施方式中,所述IgG Fc区CH2中的DE-TURN包含IgG Fc区CH2的第84.1-84.4和85.4-85.1位氨基酸序列。
- [0015] 在某些实施方式中,所述IgG Fc区CH2中的DE-TURN包含SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40中任一项所示的氨基酸序列。
- [0016] 在某些实施方式中,所述IgG Fc区CH2中的FG-LOOP包含IgG Fc区CH2的第105-117位氨基酸序列。
- [0017] 在某些实施方式中,所述IgG Fc区CH2中的FG-LOOP包含SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列。
- [0018] 在某些实施方式中,所述IgE Fc区CH3中的BC-LOOP包含IgE Fc区CH3的第27-38位氨基酸序列。
- [0019] 在某些实施方式中,所述IgE Fc区CH3中的BC-LOOP包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列。
- [0020] 在某些实施方式中,所述IgE Fc区CH3中的DE-TURN包含IgE Fc区CH3的第84.1-84.4和85.4-85.1位氨基酸序列所述IgE Fc区CH3中的DE-TURN包含IgE Fc区CH3的第84.1-84.4和85.4-85.1位氨基酸序列。
- [0021] 在某些实施方式中,所述IgE Fc区CH3中的DE-TURN包含SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列。
- [0022] 在某些实施方式中,所述IgE Fc区CH3中的FG-LOOP包含IgE Fc区CH3的第105-117位氨基酸序列。
- [0023] 在某些实施方式中,所述IgE Fc区CH3中的FG-LOOP包含SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列。
- [0024] 在某些实施方式中,所述氨基酸的区域位置通过IMGT unique numbering for C-DOMAIN编码方式确定。
- [0025] 在某些实施方式中,所述IgG Fc区CH2包含SEQ ID NO:11、或SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列。
- [0026] 另一方面,本申请提供了一种结合蛋白,其包含IgG的Fc区或其片段,与野生型IgG Fc区相比,所述IgG Fc区或其片段包含一个或多个氨基酸突变,突变后的所述IgG的Fc区或其片段能够结合FcεRI。
- [0027] 在某些实施方式中,所述IgG包含人IgG。
- [0028] 在某些实施方式中,所述IgG包含IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。
- [0029] 在某些实施方式中,所述野生型IgG的Fc区CH2包含SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27中任一项所示的氨基酸序列。

- [0030] 在某些实施方式中,所述IgG Fc区至少包含IgG Fc区CH2。
- [0031] 在某些实施方式中,所述IgG的Fc区CH2的BC-LOOP具有一个或多个氨基酸突变。
- [0032] 在某些实施方式中,所述IgG的Fc区CH2的BC-LOOP在选自下组的一个或多个位点具有氨基酸突变:V28、S29、H30、E31、D34、P35和/或K/Q38。
- [0033] 在某些实施方式中,所述IgG的Fc区CH2的BC-LOOP具有选自下组的一个或多个氨基酸突变:V28L、S29A、H30P、E31S、D34K、P35G、E36T和/或K/Q38N。
- [0034] 在某些实施方式中,所述突变后的IgG的Fc区CH2的BC-LOOP包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列。
- [0035] 在某些实施方式中,所述IgG的Fc区CH2的DE-TURN在选自下组的一个或多个位点具有氨基酸突变:E84.1、Y/F84.3、S85.4、Y/F85.2和/或R85.1。
- [0036] 在某些实施方式中,所述IgG的Fc区CH2的DE-TURN具有选自下组的一个或多个氨基酸突变:E84.1K、Y/F84.3R、S85.4G、Y/F85.2L和/或R85.1T。
- [0037] 在某些实施方式中,所述突变后的IgG的Fc区CH2的DE-TURN包含SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列。
- [0038] 在某些实施方式中,所述IgG的Fc区CH2的FG-LOOP在选自下组的一个或多个位点具有氨基酸突变:K105、S107、N108、K109、A/G110、A/S115、P/S116和/或I117。
- [0039] 在某些实施方式中,所述IgG的Fc区CH2的FG-LOOP具有选自下组的一个或多个氨基酸突变:K105R、S107T、N108H、K109P、A/G110H、A/S115R、P/S116A和/或I117L。
- [0040] 在某些实施方式中,所述突变后的IgG的Fc区CH2的FG-LOOP包含SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列。
- [0041] 在某些实施方式中,所述IgG的Fc区包含SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:38或SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列。
- [0042] 在某些实施方式中,所述IgG的Fc区CH2的N端在选自下组的一个或多个位点具有氨基酸突变:P1.5、E1.4、L/P/F1.3、L/V1.2、G/A1.1、G1和/或P2。
- [0043] 在某些实施方式中,所述IgG的Fc区CH2的N端具有选自下组的一个或多个氨基酸突变:P1.5D、E1.4S、L/P/F1.3N、L/V1.2P、G/A1.1R和/或P2V。
- [0044] 在某些实施方式中,所述氨基酸的区域位置通过IMGT unique numbering for C-DOMAIN编码方式确定。
- [0045] 在某些实施方式中,所述突变后的IgG Fc区CH2包含SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列。
- [0046] 在某些实施方式中,所述结合蛋白还包含IgG Fc区CH3。
- [0047] 在某些实施方式中,所述结合蛋白包含SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列。
- [0048] 在某些实施方式中,所述结合蛋白还包含IgE的恒定区CH2或其片段。
- [0049] 在某些实施方式中,所述结合蛋白的IgG Fc区包含SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:31中任一项所示的氨基酸序列。
- [0050] 在某些实施方式中,所述结合蛋白包含SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:31中任一项所示的氨基酸序列。
- [0051] 在某些实施方式中,所述结合蛋白具有下述性质中的一种或多种:

- [0052] (1) 能够结合FcεRIa;
- [0053] (2) 能够结合FcRn;
- [0054] (3) 具有良好的表达质量;
- [0055] (4) 可以使用Protein A或G直接纯化;以及
- [0056] (5) 比IgE Fc具有减少的潜在糖基化位点。
- [0057] 另一方面,本申请提供了多肽,其包含所述结合蛋白。
- [0058] 另一方面,本申请提供融合蛋白,其包含所述结合蛋白。
- [0059] 在某些实施方式中,所述融合蛋白包含一种或多种其他功能活性蛋白。
- [0060] 在某些实施方式中,所述其他功能活性蛋白选自下组中的一种或多种:Fab、scFv、VHH、细胞因子、可溶性受体或配体和药物多肽。
- [0061] 在某些实施方式中,所述融合蛋白为类IgG分子。
- [0062] 在某些实施方式中,所述融合蛋白能特异性结合肿瘤相关抗原。
- [0063] 在某些实施方式中,所述肿瘤相关抗原包括Her2。
- [0064] 在某些实施方式中,所述类IgG分子的重链包含SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列。
- [0065] 在某些实施方式中,所述类IgG分子的轻链包含SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列。
- [0066] 在某些实施方式中,所述肿瘤相关抗原包括GPC3。
- [0067] 在某些实施方式中,所述类IgG分子的重链包含SEQ ID NO:32或SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列。
- [0068] 在某些实施方式中,所述类IgG分子的轻链包含SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列。
- [0069] 在某些实施方式中,所述肿瘤相关抗原包括CD20。
- [0070] 在某些实施方式中,所述类IgG分子的重链包含SEQ ID NO:35或SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列。
- [0071] 在某些实施方式中,所述类IgG分子的轻链包含SEQ ID NO:37所示的氨基酸序列。
- [0072] 另一方面,本申请还提供了药物分子,其包含所述结合蛋白、所述多肽或所述融合蛋白。
- [0073] 另一方面,本申请还提供了分离的一种或多种核酸分子,其编码所述结合蛋白、所述多肽或所述融合蛋白。
- [0074] 另一方面,本申请还提供了载体,其包含所述核酸分子。
- [0075] 另一方面,本申请还提供了细胞,其包含所述核酸分子、或所述载体。
- [0076] 另一方面,本申请还提供了药物组合物,其包含所述结合蛋白、所述多肽、所述融合蛋白、所述药物分子、所述核酸分子、所述载体或所述细胞,以及任选地药学上可接受的载体。
- [0077] 另一方面,本申请还提供了制备所述结合蛋白、所述多肽、或所述融合蛋白的方法,所述方法包括在使得所述结合蛋白、所述多肽或所述融合蛋白表达的条件下,培养所述细胞。
- [0078] 另一方面,本申请还提供了所述结合蛋白、所述多肽、所述融合蛋白、所述药物分子、所述核酸分子、所述载体、所述细胞或所述药物组合物在制备药物中的用途,所述药物用于预防或治疗疾病和/或病症。

- [0079] 在某些实施方式中,所述疾病和/或病症包括肿瘤。
- [0080] 在某些实施方式中,所述肿瘤包括实体瘤和/或血液瘤。
- [0081] 本领域技术人员能够从下文的详细描述中容易地洞察到本申请的其它方面和优势。下文的详细描述中仅显示和描述了本申请的示例性实施方式。如本领域技术人员将认识到的,本申请的内容使得本领域技术人员能够对所公开的具体实施方式进行修改而不脱离本申请所涉及发明的精神和范围。相应地,本申请的附图和说明书中的描述仅仅是示例性的,而非为限制性的。

附图说明

[0082] 本申请所涉及的发明的具体特征如所附权利要求书所显示。通过参考下文中详细描述 of 示例性实施方式和附图能够更好地理解本申请所涉及发明的特点和优势。对附图简要说明如下:

- [0083] 图1显示的是IgE和IgG结构及潜在糖基化修饰位点示意图。
- [0084] 图2显示的是结合蛋白结构及潜在糖基化修饰位点示意图。
- [0085] 图3显示的是Fab与结合蛋白融合的结构及潜在糖基化修饰位点示意图。
- [0086] 图4A显示的是人IgE重链恒定区CH3 IMGT编码及区域划分;图4B显示的是人IgG重链恒定区CH2 IMGT编码及区域划分;编码方式为IMGT unique numbering for C-DOMAIN。
- [0087] 图5显示的是不同结合蛋白的氨基酸序列及序列比对结果。
- [0088] 图6显示的是不同结合蛋白与重组人FcεRIa的亲合力检测结果。
- [0089] 图7显示的是结合蛋白DB177、DB364、DB365的SEC-HPLC检测结果图谱。
- [0090] 图8显示的是结合蛋白DB366、DB-B63、DB-B64的SEC-HPLC检测结果图谱。
- [0091] 图9显示的是Her2特异性结合蛋白DB871、DB872的SEC-HPLC检测结果图谱。
- [0092] 图10显示的是GPC3特异性结合蛋白DB-B229、DB-B230的SEC-HPLC检测结果图谱。
- [0093] 图11显示的是CD20特异性结合蛋白DB-B232、DB-B233的SEC-HPLC检测结果图谱。
- [0094] 图12A-12C显示的是本申请的结合蛋白阻断人IgE与受体FcεRIa结合的阻断活性ELISA检测结果。
- [0095] 图13A-13C显示的是结合蛋白介导的激活肥大细胞表达荧光素酶报告基因的活性检测结果。图13A,Her2特异性结合蛋白DB871、DB872介导NCI-N87细胞激活肥大细胞表达荧光素酶报告基因的活性检测结果;图13B,GPC3特异性结合蛋白DB-B229、DB-B230介导HepG2细胞激活肥大细胞表达荧光素酶报告基因的活性检测结果;图13C,CD20特异性结合蛋白DB-B232、DB-B233介导Raji细胞激活肥大细胞表达荧光素酶报告基因的活性检测结果。
- [0096] 图14显示的是对照抗体、结合蛋白与重组人FcRn结合的检测检测结果。

具体实施方式

[0097] 以下由特定的具体实施例说明本申请发明的实施方式,熟悉此技术的人士可由本说明书所公开的内容容易地了解本申请发明的其他优点及效果。

[0098] 术语定义

[0099] 在本申请中,术语“氨基酸突变”通常是指涵盖氨基酸取代、缺失、插入和修饰。可以进行取代、缺失、插入和修饰的任意组合来实现最终构建体,只要最终构建体拥有期望的

属性。特定的一种氨基酸突变是氨基酸取代。例如,为了改变例如Fc区的结合属性,可以选择非保守性的氨基酸取代,即将一个氨基酸用具有不同结构和/或化学特性的另一种氨基酸替换。氨基酸取代包括由非天然存在的氨基酸或由20种标准氨基酸的天然存在的氨基酸衍生物(例如4-羟脯氨酸、3-甲基组氨酸、鸟氨酸、高丝氨酸、5-羟赖氨酸)替换。可以使用本领域中公知的遗传或化学方法生成氨基酸突变。遗传方法可以包括定点诱变、PCR、基因合成等。通过遗传工程化以外的方法如化学修饰来改变氨基酸侧链基团的方法也是可用的。

[0100] 在本申请中,“X_n”是指相应于野生型IgG Fc区的氨基酸序列中第n位的残基X,其中n为正整数,X为任意氨基酸残基的缩写,其中序列的位置通过IMGT unique numbering for C-DOMAIN编号方案确定,该编号方案是本领域技术人员已知通常使用的编号方案。例如,“K105”表示相应于IgG Fc区CH₂序列,使用IMGT unique numbering for C-DOMAIN编号方案的第105位氨基酸K。

[0101] 在本申请中,氨基酸取代“X/Y_nZ”是指按照本申请所述的编号方案,氨基酸序列中第n位的残基X或Y被取代为氨基酸残基Z,其中n为正整数,X、Y和Z分别独立地为任意氨基酸残基的缩写。

[0102] 在本申请中,术语“BC-LOOP”、“DE-TURN”、“FG-LOOP”通常指免疫球蛋白分子Fc区的一段氨基酸序列,其可以通过IMGT unique numbering for C-DOMAIN的编码方式确定。这样的定义对本领域技术人员是清楚的。例如,所述IgG Fc区CH₂的BC-LOOP包含IgG Fc区CH₂的第27-38位氨基酸序列。例如,所述IgG Fc区CH₂的DE-TURN包含IgG Fc区CH₂的第84.1-84.4和85.4-85.1位氨基酸序列。例如,所述IgG Fc区CH₂中的FG-LOOP包含IgG Fc区CH₂的第105-117位氨基酸序列。例如,所述IgE Fc区CH₃中的BC-LOOP包含IgE Fc区CH₃的第27-38位氨基酸序列。例如,所述IgE Fc区CH₃中的DE-TURN包含IgE Fc区CH₃的第84.1-84.4和85.4-85.1位氨基酸序列。例如,所述IgE Fc区CH₃中的FG-LOOP包含IgE Fc区CH₃的第105-117位氨基酸序列。

[0103] 在本申请中,术语“多肽”通常是指氨基酸残基的聚合物。该术语也适用于其中一个或多个氨基酸残基是相应的天然存在的氨基酸的类似物或模拟物的氨基酸聚合物、以及天然存在的氨基酸聚合物。该术语也可包括例如通过添加糖残基以形成糖蛋白或被磷酸化而被修饰的氨基酸聚合物。多肽可由天然存在的和非重组的细胞或由遗传工程改造的或重组的细胞产生,并且可包含具有天然蛋白质的氨基酸序列的分子、或具有天然序列的一个或多个氨基酸的缺失、添加和/或取代的分子。术语“多肽”可以包括抗原结合片段、抗体或具有抗原结合片段的一个或多个氨基酸的缺失、添加和/或取代的序列。术语“多肽”可以指与全长蛋白质相比具有氨基末端缺失、羧基末端缺失和/或内部缺失的多肽。与全长蛋白质相比,这类片段也可含有经修饰的氨基酸。

[0104] 在本申请中,术语“VHH”通常是指包含重链抗体的可变抗原结合结构域的抗体。VHH也可称为纳米抗体(Nanobody)(Nb)和/或单域抗体。

[0105] 术语“Fab”指由一条完整L链(V_L 和 C_L)连同一条H链的可变区结构域(V_H)和一条重链的第一恒定域(C_H1)组成的抗体片段。完整抗体的木瓜蛋白酶消化法可以用来产生两个Fab片段,其中每一者含有单一抗原结合位点。一般,由木瓜蛋白酶消化法产生的Fab的L链和H链片段由一个链间二硫键连接。

[0106] 在本申请中,术语“scFv”通常是指使用重组方法或通过合成性接头连接在一起的

VL和VH,其中所述合成性接头可以将它们作为单一蛋白链而产生,其中VL和VH区配对以形成单价分子(称作单链Fv(scFv);可参见,例如,Bird等人,Science242:423-426(1988)和Huston等人,Proc.Natl.Acad.Sci USA 85:5879-5883(1988))。

[0107] 在本申请中,术语“Fc ϵ RI”通常是指是免疫球蛋白E(IgE)的Fc区的高亲和受体(Fc ϵ RI,也称作Fc epsilon RI,)。Fc ϵ RI是能够结合IgE的 ϵ 重链的Fc区的四聚体受体复合物,其由一个 α 链(即Fc ϵ RI α),一个 β 链(Fc ϵ RI β)和两个 γ 链(Fc ϵ RI γ)组成。通常情况下, α 链可以作为抗体(例如,IgE)的结合位点, γ 链能够作为下游信号起始的位点, β 链能够起到放大下游信号的作用。Fc ϵ RI在表皮朗格汉斯细胞,嗜酸性粒细胞,肥大细胞和嗜碱性粒细胞上均有表达。由于其细胞分布,该受体在过敏反应中起主要作用。Fc ϵ RI也可在抗原呈递细胞上表达,并参与促进炎症的重要免疫介质(例如,细胞因子,白介素,白三烯和前列腺素等)的产生。

[0108] 在本申请中,术语“特异性结合”或“特异性的”通常指可测量的和可再现的相互作用,例如靶标和抗体之间的结合,可在分子(包括生物分子)的异质群体存在的情况决定靶标的存在。例如,特异性结合靶标(其可以为表位)的抗体可以是以比它结合其它靶标更大的亲和性、亲合力、更容易、和/或以更长的持续时间结合该靶标的抗体。在某些实施方案中,抗体特异性结合蛋白质上的表位,所述表位在不同种属的蛋白质中是保守的。在某些实施方案中,特异性结合可以包括但不要求排他性地结合。

[0109] 在本申请中,术语“核酸”通常指核苷酸(例如核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸)的聚合物,并且可包括天然存在的(腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶和胸腺嘧啶)、非天然存在的和经修饰的核酸。术语“核酸”可包括基因,cDNA或mRNA。例如,核酸分子可以是合成的(例如化学合成的)或重组的。核酸可以包括含有天然核苷酸的类似物或衍生物的核酸,其具有与参考试酸相似的结合特性并且以类似于天然存在的核苷酸的方式进行代谢。核酸序列还可以包括其保守修饰的变体(例如简并密码子取代),等位基因,直向同源物,SNP和互补序列以及明确指出的序列。该术语不受聚合物的长度限制。核酸可以是单链或双链的,并且一般含有5'-3'磷酸二酯键,核苷酸类似物可以具有其他连接。

[0110] 在本申请中,术语“细胞”通常是指可以或已经含有包括本申请所述的核酸分子的质粒或载体,或者能够表达本申请所述的融合蛋白或其抗原结合片段的个体细胞,细胞系或细胞培养物。所述细胞可以包括单个细胞的子代。由于天然的,意外的或故意的突变,子代细胞与原始亲本细胞在形态上或在基因组上可能不一定完全相同,但能够表达本申请所述的融合蛋白或其抗原结合片段即可。所述细胞可以通过使用本申请所述的载体体外转染细胞而得到。所述细胞可以是原核细胞(例如大肠杆菌),也可以是真核细胞(例如酵母细胞,例如COS细胞,中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,HeLa细胞,HEK293细胞,COS-1细胞或骨髓瘤细胞)。

[0111] 在本申请中,术语“载体”通常是指能够在合适的宿主中自我复制的核酸分子,其将插入的核酸分子转移到细胞(例如,宿主细胞)中和/或细胞之间。所述载体可包括主要用于将DNA或RNA插入细胞中的载体、主要用于复制DNA或RNA的载体,以及主要用于DNA或RNA的转录和/或翻译的表达的载体。所述载体还包括具有多种上述功能的载体。所述载体可以是当引入合适的细胞时能够转录并翻译成多肽的多核苷酸。通常,通过培养包含所述载体的合适的细胞,所述载体可以产生期望的表达产物。在本申请中,所述载体可以为质粒。

[0112] 在本申请中,术语“药物组合物”通常是指涉及适合施用于患者、可以是人患者的组合物。例如,本申请所述的药物组合物,其可以包含本申请所述的抗原结合蛋白、本申请所述的免疫缀合物、本申请所述的核酸分子、本申请所述的载体和/或本申请所述的细胞,以及任选地药学上可接受的载剂。此外,所述药物组合物还可以包含一种或多种(药学上有效的)载剂、稳定剂、赋形剂、稀释剂、增溶剂、表面活性剂、乳化剂和/或防腐剂的合适的制剂。组合物的可接受成分在所用剂量和浓度下对接受者无毒。本发明的药物组合物可以包括但不限于液体、冷冻和冻干组合物。

[0113] 在本申请中,术语“受试者”通常指人类或非人类动物,包括但不限于猫、狗、马、猪、奶牛、羊、兔、小鼠、大鼠或猴。

[0114] 在本申请中,术语“IgG”通常是指免疫球蛋白G(Immunoglobulin G)。IgG是人的免疫球蛋白之一,其他还有IgA、IgM、IgD和IgE。根据IgG分子中的 γ 链抗原性差异,人IgG有四个亚型:IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。在本申请中,术语“IgG1”通常是指IgG中占比最高的一类亚型,与Fc受体有较高亲和性。例如,所述IgG可为人IgG。又例如,所述IgG可选自下组:IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。

[0115] 在本申请中,术语“类IgG分子”通常指结构与IgG样分子相似的分子。例如,所述类IgG分子可包含恒定区和可变区。例如,所述类IgG分子可包含轻链和重链。在所述类IgG分子中,其基本包含IgG分子各结构域组成(不限靶标),但各结构域可能会经过改造,使其具有新的功能,或其活性改变。

[0116] 在本申请中,术语“融合蛋白”通常是指包括两种或更多种不同蛋白质的氨基酸序列的嵌合蛋白质。典型地,融合蛋白可以由本领域熟知的体外重组技术产生。

[0117] 在本申请中,术语“药物分子”通常是指具有所需生物学效力的分子。药物可以是预防性或治疗性的。药物分子可以包括但不限于:蛋白分子,包括但不限于肽,多肽,蛋白质,包括翻译后修饰的蛋白质、融合蛋白、抗体等;小分子,包括无机或有机化合物;核酸分子,包括但不限于双链或单链DNA、或双链或单链RNA(如反义(分子)、RNAi等)、内含子序列、三螺旋核酸分子和适体;或疫苗。

[0118] 在本申请中,涉及的蛋白质、多肽和/或氨基酸序列,还应理解为至少包含以下的范围:与该所述蛋白质或多肽具备相同或类似功能的变体或同源物。

[0119] 在本申请中,所述变体可以为,例如在所述蛋白质和/或所述多肽的氨基酸序列中经过取代、缺失或添加一个或多个氨基酸的蛋白质或多肽。例如,所述功能性变体可包含已经通过至少1个,例如1-30个、1-20个或1-10个,又例如1个、2个、3个、4个或5个氨基酸取代、缺失和/或插入而具有氨基酸改变的蛋白质或多肽。所述功能性变体可基本上保持改变(例如取代、缺失或添加)之前的所述蛋白质或所述多肽的生物学特性。例如,所述功能性变体可保持改变之前的所述蛋白质或所述多肽的至少60%,70%,80%,90%,或100%的生物学活性(例如抗原结合能力)。例如,所述取代可以为保守取代。

[0120] 在本申请中,所述同源物可以为与所述蛋白质和/或所述多肽的氨基酸序列具有至少约85%(例如,具有至少约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或更高的)序列同源性的蛋白质或多肽。

[0121] 在本申请中,所述同源性通常是指两个或多个序列之间的相似性、类似或关联。可以通过以下方式计算“序列同源性百分比”:将两条待比对的序列在比较窗中进行比较,确

定两条序列中存在相同核酸碱基(例如,A、T、C、G、I)或相同氨基酸残基(例如,Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys和Met)的位置的数目以得到匹配位置的数目,将匹配位置的数目除以比较窗中的总位置数(即,窗大小),并且将结果乘以100,以产生序列同源性百分比。为了确定序列同源性百分数而进行的比对,可以按本领域已知的多种方式实现,例如,使用可公开获得的计算机软件如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可以确定用于比对序列的适宜参数,包括为实现正在比较的全长序列范围内或目标序列区域内最大比对所需要的任何算法。所述同源性也可以通过以下的方法测定:FASTA和BLAST。对FASTA算法的描述可以参见W.R.Pearson和D.J.Lipman的“用于生物学序列比较的改进的工具”,美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.),85:2444-2448,1988;和D.J.Lipman和W.R.Pearson的“快速灵敏的蛋白质相似性搜索”,Science,227:1435-1441,1989。对BLAST算法的描述可参见S.Altschul、W.Gish、W.Miller、E.W.Myers和D.Lipman的“一种基本的局部对比(alignment)搜索工具”,分子生物学杂志,215:403-410,1990。

[0122] 在本申请中,术语“包含”通常是指包括明确指定的特征,但不排除其他要素。

[0123] 在本申请中,术语“约”通常是指在指定数值以上或以下0.5%-10%的范围内变动,例如在指定数值以上或以下0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、或10%的范围内变动。

[0124] 发明详述

[0125] 本申请涉及的结合蛋白,可以通过将位于IgE Fc CH3结构域的BC-LOOP、DE-TURN和FG-LOOP区的氨基酸,移植替换IgG Fc CH2结构域对应的BC-LOOP、DE-TURN和FG-LOOP区的对应的氨基酸获得(上述区域及氨基酸位置参考抗体恒定区IMGT unique编码,即IMGT unique numbering for C-DOMAIN,和strand,turn and loop范围划分,即Range of strand,turn and loop lengths in C-DOMAIN and C-LIKE-DOMAIN,https://www.imgt.org/)。通过移植替换获得经改造的IgG Fc CH2。本申请所述的结合蛋白能够和FcεRIa结合。

[0126] 本申请涉及的结合蛋白,可以通过将位于IgE Fc CH3结构域的BC-LOOP、DE-TURN和FG-LOOP区的部分氨基酸,移植替换给IgG Fc CH2结构域对应的BC-LOOP、DE-TURN和FG-LOOP区的对应的氨基酸获得。例如,将IgG Fc CH2结构域中对应的BC-LOOP、DE-TURN和FG-LOOP区的氨基酸,替换为位于IgE Fc CH3结构域的BC-LOOP、DE-TURN和FG-LOOP区的部分氨基酸,获得经改造的IgG Fc CH2。

[0127] 在本申请中,所述结合蛋白还可以在移植区域进行突变。

[0128] 在本申请涉及的结合蛋白,还可以通过将位于IgG Fc CH2结构域的BC-LOOP、DE-TURN和FG-LOOP区的氨基酸进行突变获得。

[0129] 本申请所述的结合蛋白在获得了与FcεRIa结合能力的同时,又保持了IgG Fc相关的良好成药性特质:1.表达质量良好,一步纯化单体纯度可达90%以上;2.去除了天然IgE过多的糖基化位点,便于质量控制;3.纯化方便,可以使用Protein A或G直接纯化;4.可与FcRn结合,半衰期长;5.分子量小,组织渗透性好;6.可以方便地与其它蛋白融合构建类IgG分子,如Fab,scFv,VHH,细胞因子,可溶性受体或配体,多肽等。

[0130] 一方面,本申请提供一种结合蛋白,其能够结合FcεRI,所述结合蛋白包含IgG的Fc

区或其片段,所述IgG的Fc区或其片段包含源自IgE Fc区CH3中的BC-LOOP、DE-TURN和/或FG-LOOP或其片段,且所述IgG的Fc区CH2中与IgE Fc区CH3中的BC-LOOP、DE-TURN和/或FG-LOOP或其片段相应的区域被所述IgE Fc区CH3中的BC-LOOP、DE-TURN和/或FG-LOOP或其片段所替换或取代。

[0131] 在本申请中,所述IgG可以为人IgG。

[0132] 在本申请中,所述IgG可以为IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

[0133] 在本申请中,移植替换前的人IgG Fc区CH2可包含SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27中任一项所示的氨基酸序列。在本申请中,不同的IgG Fc区的CH2序列可能会有不同,但根据本申请所述的编号方案都能对应到确定的氨基酸中。

[0134] 在本申请中,所述IgG Fc区的片段可至少包含IgG Fc区CH2或其片段。在本申请中,移植替换的主要区域集中在IgG Fc区的CH2上。

[0135] 在本申请中,所述源自IgE Fc区CH3中的BC-LOOP、DE-TURN和/或FG-LOOP或其片段能够与FcεRI相结合。

[0136] 在本申请中,所述IgG Fc区CH2中的BC-LOOP包含IgG Fc区CH2的第27-38位氨基酸序列。例如,所述IgG Fc区CH2中的BC-LOOP可包含DVSHEDEPEV(K/Q)所示的氨基酸序列(SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2)。

[0137] 在本申请中,所述IgG Fc区CH2中的DE-TURN可包含IgG Fc区CH2的第84.1-84.4和85.4-85.1位氨基酸序列。例如,所述IgG Fc区CH2中的DE-TURN可包含EQ(Y/F)NST(Y/F)R所示的氨基酸序列(SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:39或SEQ ID NO:40)。

[0138] 在本申请中,所述IgG Fc区CH2中的FG-LOOP包含IgG Fc区CH2的第105-117位氨基酸序列。例如,所述IgG Fc区CH2中的FG-LOOP可包含KVSNK(A/G)LP(A/S)(P/S)I所示的氨基酸序列(SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7)。

[0139] 在本申请中,所述IgG Fc区的CH2中的BC-LOOP、DE-TURN和/或FG-LOOP或其部分可以被IgE Fc区CH3中相应的BC-LOOP、DE-TURN和/或FG-LOOP或其部分替换。

[0140] 在本申请中,所述IgE Fc区CH3中的BC-LOOP可包含IgE Fc区CH3的第27-38位氨基酸序列。例如,所述IgE Fc区CH3中的BC-LOOP可包含DLAPSKGTVN所示的氨基酸序列(SEQ ID NO:8)。

[0141] 在本申请中,所述IgE Fc区CH3中的DE-TURN可包含IgE Fc区CH3的第84.1-84.4和85.4-85.1位氨基酸序列。例如,所述IgE Fc区CH3中的DE-TURN可包含KQRNGTLT所示的氨基酸序列(SEQ ID NO:9)。

[0142] 在本申请中,所述IgE Fc区CH3中的FG-LOOP可包含IgE Fc区CH3的第105-117位氨基酸序列。例如,所述IgE Fc区CH3中的FG-LOOP可包含RVTHPLPRAL所示的氨基酸序列(SEQ ID NO:10)。

[0143] 在本申请中,所述移植替换后的IgG Fc区CH2可包含SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列。

[0144] 另一方面,本申请所述的结合蛋白可以通过在IgG Fc区的CH2片段上进行氨基酸突变获得。本申请提供所述结合蛋白,其包含IgG的Fc区或其片段,与野生型IgG Fc区相比,所述IgG Fc区或其片段包含一个或多个氨基酸突变,突变后的所述IgG的Fc区或其片段能够结合FcεRI。

[0145] 在本申请中,所述FcεRI可包含FcεRIa。

[0146] 在本申请中,所述IgG可包含人IgG。

[0147] 在本申请中,所述IgG包含IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

[0148] 在本申请中,所述野生型IgG Fc区CH2可包含SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27中任一项所示的氨基酸序列。

[0149] 在本申请中,所述IgG Fc区可至少包含IgG Fc区CH2。

[0150] 在本申请中,所述IgG的Fc区CH2的BC-LOOP具有一个或多个氨基酸突变。

[0151] 在本申请中,所述IgG的Fc区CH2的BC-LOOP可具有V28、S29、H30、E31、D34、P35和/或K/Q38的氨基酸突变。其中K/Q38指的是,对应于不同的IgG Fc CH2序列,第38位突变前的氨基酸可以对应于氨基酸K或Q。

[0152] 在本申请中,所述IgG的Fc区CH2的BC-LOOP可具有V28L、S29A、H30P、E31S、D34K、P35G、E36T和/或K/Q38N的氨基酸突变。

[0153] 在本申请中,所述IgG的Fc区CH2的BC-LOOP可具有V28L、S29A、H30P、E31S、D34K、P35G、E36T和K/Q38N的氨基酸突变。

[0154] 在本申请中,所述IgG的Fc区CH2的BC-LOOP可具有下表中的突变:

IMGT unique numbering for C-DOMAIN	27	28	29	30	31	34	35	36	37	38
野生型	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K/Q
突变型		L	A	P	S	K	G	T		N

[0156] 在本申请中,所述突变后的IgG的Fc区CH2的BC-LOOP可包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列。

[0157] 在本申请中,所述IgG的Fc区CH2的DE-TURN可具有E84.1、Y/F84.3、S85.4、Y/F85.2和/或R85.1的氨基酸突变。

[0158] 在本申请中,所述IgG的Fc区CH2的DE-TURN可具有E84.1、Y/F84.3、S85.4、Y/F85.2和R85.1的氨基酸突变。

[0159] 在本申请中,所述IgG的Fc区CH2的DE-TURN可具有E84.1K、Y/F84.3R、S85.4G、Y/F85.2L和/或R85.1T的氨基酸突变。

[0160] 在本申请中,所述IgG的Fc区CH2的DE-TURN可具有E84.1K、Y/F84.3R、S85.4G、Y/F85.2L和R85.1T的氨基酸突变。

[0161] 在本申请中,所述IgG的Fc区CH2的DE-TURN可具有下表中的突变:

IMGT unique numbering for C-DOMAIN	84.1	84.2	84.3	84.4	85.4	85.3	85.2	85.1
野生型	E	Q	Y/F	N	S	T	Y/F	R
突变型	K		R		G		L	T

[0163] 在本申请中,所述突变后的IgG的Fc区CH2的DE-TURN可包含SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列。

[0164] 在本申请中,所述IgG的Fc区CH2的DE-TURN可具有E84.1K、Y/F84.3R、S85.4G、Y/F85.2L和/或R85.1T的氨基酸突变。

[0165] 在本申请中,所述IgG的Fc区CH2的FG-LOOP可具有K105、S107、N108、K109、A/G110、A/S115、P/S116和/或I117的氨基酸突变。

[0166] 在本申请中,所述IgG的Fc区CH2的FG-LOOP可具有K105、S107、N108、K109、A/G110、A/S115、P/S116和I117的氨基酸突变。

[0167] 在本申请中,所述IgG的Fc区CH2的FG-LOOP可具有K105R、S107T、N108H、K109P、A/G110H、A/S115R、P/S116A和/或I117L的氨基酸突变。

[0168] 在本申请中,所述IgG的Fc区CH2的FG-LOOP可具有K105R、S107T、N108H、K109P、A/G110H、A/S115R、P/S116A和I117L的氨基酸突变。

[0169] 在本申请中,所述IgG的Fc区CH2的FG-LOOP可具有下表中的突变:

IMGT unique numbering for C-DOMAIN	105	106	107	108	109	110	113	114	115	116	117
	野生型	K	V	S	N/H	K	A/G	L	P	A/S	P/S
突变型	R		T	H	P	H			R	A	L

[0171] 在本申请中,所述突变后的IgG的Fc区CH2的FG-LOOP可包含SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列。

[0172] 在本申请中,所述IgG的Fc区CH2的N端可具有P1.5、E1.4、L/P/F1.3、L/V1.2、G/A1.1、G1和/或P2处的氨基酸突变。

[0173] 在本申请中,所述IgG的Fc区CH2的N端可具有P1.5、E1.4、L/P/F1.3、L/V1.2、G/A1.1、G1和P2处的氨基酸突变。

[0174] 在本申请中,所述IgG的Fc区CH2的N端可具有P1.5D、E1.4S、L/P/F1.3N、L/V1.2P、G/A1.1R和/或P2V的氨基酸突变。

[0175] 在本申请中,所述IgG的Fc区CH2的N端可具有P1.5D、E1.4S、L/P/F1.3N、L/V1.2P、G/A1.1R和P2V的氨基酸突变。

[0176] 在本申请中,所述IgG的Fc区CH2的N端可具有下表中的氨基酸突变:

IMGT unique numbering for C-DOMAIN	1.5	1.4	1.3	1.2	1.1	1	2
野生型	P	E	L/P/F	L/V	G/A	G	P
突变型	D	S	N	P	R	G	V

[0178] 在本申请中,所述突变后的IgG的Fc区CH2可包含SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列。

[0179] 在本申请中,所述结合蛋白还可包含IgG Fc区CH3。例如,所述结合蛋白可包含SEQ

ID NO:29或SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列。

[0180] 在本申请中,所述结合蛋白还可包含IgE的恒定区CH2或其片段。

[0181] 在本申请中,所述IgG Fc区可包含SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:31中任一项所示的氨基酸序列。

[0182] 另一方面,本申请还提供了一种多肽,其包含所述结合蛋白。

[0183] 另一方面,本申请还提供了融合蛋白,其包含所述结合蛋白。在本申请中,所述融合蛋白还可包含一种或多种其他功能活性分子。例如,所述其他功能活性蛋白可选自下组中的一种或多种:Fab、scFv、VHH、细胞因子、可溶性受体或配体和药物多肽。

[0184] 例如,所述融合蛋白可以为类IgG分子。例如,所述融合蛋白可以包含所述结合蛋白和Fab分子。

[0185] 在本申请中,所述融合蛋白能够特异性结合肿瘤相关抗原。

[0186] 例如,所述肿瘤相关抗原可以包含Her2。例如,所述融合蛋白可以包含轻链和重链。例如,所述轻链可包含SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列。例如,所述重链可包含SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列。例如,所述轻链可包含SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列且所述重链可包含SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列。例如,所述轻链可包含SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列且所述重链可包含SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列。

[0187] 例如,所述肿瘤相关抗原可以包含GPC3。例如,所述融合蛋白可以包含轻链和重链。例如,所述轻链可包含SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列。例如,所述重链可包含SEQ ID NO:32或SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列。例如,所述轻链可包含SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列且所述重链可包含SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列。例如,所述轻链可包含SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列且所述重链可包含SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列。

[0188] 例如,所述肿瘤相关抗原可以包含CD20。例如,所述融合蛋白可以包含轻链和重链。例如,所述轻链可包含SEQ ID NO:37所示的氨基酸序列。例如,所述重链可包含SEQ ID NO:35或SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列。例如,所述轻链可包含SEQ ID NO:37所示的氨基酸序列且所述重链可包含SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列。例如,所述轻链可包含SEQ ID NO:37所示的氨基酸序列且所述重链可包含SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列。

[0189] 另一方面,本申请提供了药物分子,其包含所述结合蛋白、所述多肽或所述融合蛋白。

[0190] 另一方面,本申请提供了分离的一种或多种核酸分子,其编码所述结合蛋白、所述多肽、或所述融合蛋白。

[0191] 另一方面,本申请提供了分离的一种或多种核酸分子,其编码所述结合蛋白、所述多肽或所述融合蛋白。本申请所述的分离的一种或多种核酸分子可以为任何长度的分离形式的核苷酸,脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸,或从其天然环境分离的或人工合成的类似物,但可以编码本申请所述的结合蛋白。

[0192] 另一方面,本申请还提供了载体,其可以包含本申请所述的核酸分子。所述载体可通过转化、转导或转染宿主细胞,使其携带的遗传物质元件在宿主细胞内表达得以表达。例如,载体可以包括:质粒;噬菌粒;柯斯质粒;人工染色体如酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或P1来源的人工染色体(PAC);噬菌体如λ噬菌体或M13噬菌体及动物病毒等。用作载体的动物病毒种类有逆转录酶病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒

(如单纯疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒(如SV40)。又例如,所述载体可以含有多种控制表达的元件,包括启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外,所述载体还可以含有复制起始位点。此外,所述载体还可以包括有协助其进入细胞的成分,如病毒颗粒、脂质体或蛋白外壳,但不仅仅只有这些物质。

[0193] 另一方面,本申请还提供了细胞,其可以包含本申请所述的核酸分子或本申请所述的载体。所述细胞可以包括单个细胞的后代。由于天然、偶然或有意的突变,后代可以不一定与原始母细胞完全相同(在总DNA互补体的形态上或在基因组上)。在某些实施方式中,所述细胞还可以包括用本发明所述的载体在体外转染的细胞。在某些实施方式中,所述细胞可以是细菌细胞(例如,大肠杆菌)、酵母细胞或其它真核细胞。

[0194] 另一方面,本申请还提供了药物组合物,其可以包含本申请所述的结合蛋白、本申请所述的多肽、本申请所述的融合蛋白、本申请所述的核酸分子、本申请所述的载体和/或本申请所述的细胞,以及任选地药学上可接受的载剂。

[0195] 在某些实施方案中,所述药物组合物还可以包含一种或多种(药学上有效的)载剂、稳定剂、赋形剂、稀释剂、增溶剂、表面活性剂、乳化剂和/或防腐剂的合适的制剂。组合物的可接受成分在所用剂量和浓度下优选地对接受者无毒。本发明的药物组合物包括但不限于液体、冷冻和冻干组合物。

[0196] 在某些实施方案中,所述药学上可接受的佐剂可以包括与药物给药相容的任何和所有的溶剂、分散介质、包衣、等渗剂和吸收延迟剂,通常安全、无毒,且既不是生物学上也非其它方面不合需要的。

[0197] 在某些实施方案中,所述药物组合物可以包含肠胃外、经皮、腔内、动脉内、鞘内和/或鼻内施用或直接注射到组织中。例如,所述药物组合物可以通过输注或注射施用于患者或者受试者。在某些实施方案中,所述药物组合物的施用可以通过不同的方式进行,例如静脉内、腹膜内、皮下、肌肉内、局部或真皮内施用。在某些实施方案中,所述药物组合物可以不间断施用。所述不间断(或连续)施用可以通过患者佩戴的小泵系统来实现,以测量流入患者体内的治疗剂,如W02015/036583所述。

[0198] 另一方面,本申请还提供了制备本申请所述结合蛋白、所述多肽、所述融合蛋白的方法,所述方法可以包括在使得本申请所述结合蛋白表达的条件下,培养本申请所述的细胞。

[0199] 另一方面,本申请提供了所述结合蛋白、所述多肽、所述融合蛋白、所述药物分子、所述核酸分子、所述载体、所述细胞、和/或所述药物组合物在制备药物中的用途,所述药物用于预防和/或治疗疾病和/或病症。

[0200] 另一方面,本申请提供了所述结合蛋白、所述多肽、所述融合蛋白、所述药物分子、所述核酸分子、所述载体、所述细胞、和/或所述药物组合物,其用于预防和/或治疗疾病和/或病症。

[0201] 另一方面,本申请提供了一种预防和/或治疗疾病和/或病症的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的所述结合蛋白、所述多肽、所述融合蛋白、所述药物分子、所述核酸分子、所述载体、所述细胞、和/或所述药物组合物。

[0202] 在本申请中,所述施用可以通过不同的方式进行,例如静脉内、瘤内、腹膜内、皮下、肌肉内、局部或真皮内施用。

- [0203] 在某些实施方式中,所述疾病和/或病症包括肿瘤。
- [0204] 在某些实施方式中,所述肿瘤包括实体瘤和/或血液瘤。
- [0205] 本申请还提供了以下实施方案:
- [0206] 1. 结合蛋白,其能够结合Fc ϵ RI,所述结合蛋白包含IgG的Fc区或其片段,所述IgG的Fc区或其片段包含源自IgE Fc区CH3中的BC-LOOP、DE-TURN和/或FG-LOOP或其片段,且所述IgG的Fc区CH2中与IgE Fc区CH3中的BC-LOOP、DE-TURN和/或FG-LOOP或其片段相应的区域被所述IgE Fc区CH3中的BC-LOOP、DE-TURN和/或FG-LOOP或其片段所替换或取代。
- [0207] 2. 根据实施方案1所述的结合蛋白,其中所述IgG为人IgG。
- [0208] 3. 根据实施方案1-2中任一项所述的结合蛋白,其中所述IgG为IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。
- [0209] 4. 根据实施方案1-3中任一项所述的结合蛋白,其中野生型的IgG Fc区CH2包含SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27中任一项所示的氨基酸序列。
- [0210] 5. 根据实施方案1-4中任一项所述的结合蛋白,其中所述IgG Fc区的片段至少包含IgG Fc区CH2或其片段。
- [0211] 6. 根据实施方案1-5中任一项所述的结合蛋白,其中所述源自IgE Fc区CH3中的BC-LOOP、DE-TURN和/或FG-LOOP或其片段能够与Fc ϵ RI相结合。
- [0212] 7. 根据实施方案1-6中任一项所述的结合蛋白,其中所述IgG Fc区CH2中的BC-LOOP包含IgG Fc区CH2的第27-38位氨基酸序列。
- [0213] 8. 根据实施方案1-7中任一项所述的结合蛋白,其中所述IgG Fc区CH2中的BC-LOOP包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。
- [0214] 9. 根据实施方案1-8中任一项所述的结合蛋白,其中所述IgG Fc区CH2中的DE-TURN包含IgG Fc区CH2的第84.1-84.4和85.4-85.1位氨基酸序列。
- [0215] 10. 根据实施方案1-9中任一项所述的结合蛋白,其中所述IgG Fc区CH2中的DE-TURN包含SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40中任一项所示的氨基酸序列。
- [0216] 11. 根据实施方案1-10中任一项所述的结合蛋白,其中所述IgG Fc区CH2中的FG-LOOP包含IgG Fc区CH2的第105-117位氨基酸序列。
- [0217] 12. 根据实施方案1-11中任一项所述的结合蛋白,其中所述IgG Fc区CH2中的FG-LOOP包含SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列。
- [0218] 13. 根据实施方案1-12中任一项所述的结合蛋白,其中所述IgE Fc区CH3中的BC-LOOP包含IgE Fc区CH3的第27-38位氨基酸序列。
- [0219] 14. 根据实施方案1-13中任一项所述的结合蛋白,其中所述IgE Fc区CH3中的BC-LOOP包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列。
- [0220] 15. 根据实施方案1-14中任一项所述的结合蛋白,其中所述IgE Fc区CH3中的DE-TURN包含IgE Fc区CH3的第84.1-84.4和85.4-85.1位氨基酸序列。
- [0221] 16. 根据实施方案1-15中任一项所述的结合蛋白,其中所述IgE Fc区CH3中的DE-TURN包含SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列。
- [0222] 17. 根据实施方案1-16中任一项所述的结合蛋白,其中所述IgE Fc区CH3中的FG-LOOP包含IgE Fc区CH3的第105-117位氨基酸序列。

- [0223] 18. 根据实施方案1-17中任一项所述的结合蛋白,其中所述IgE Fc区CH3中的FG-LOOP包含SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列。
- [0224] 19. 根据实施方案1-18中任一项所述的结合蛋白,其中所述氨基酸的区域位置通过IMGT unique numbering for C-DOMAIN编码方式确定。
- [0225] 20. 根据实施方案1-19中任一项所述的结合蛋白,其中所述IgG Fc区CH2包含SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列。
- [0226] 21. 结合蛋白,其包含IgG的Fc区或其片段,与野生型IgG Fc区相比,所述IgG Fc区或其片段包含一个或多个氨基酸突变,突变后的所述IgG的Fc区或其片段能够结合FcεRI。
- [0227] 22. 根据实施方案21所述的结合蛋白,其中所述IgG包含人IgG。
- [0228] 23. 根据实施方案21-22中任一项所述的结合蛋白,其中所述IgG包含IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。
- [0229] 24. 根据实施方案21-23中任一项所述的结合蛋白,其中所述野生型IgG Fc区CH2包含SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27中任一项所示的氨基酸序列。
- [0230] 25. 根据实施方案21-24中任一项所述的结合蛋白,其中所述IgG Fc区至少包含IgG Fc区CH2。
- [0231] 26. 根据实施方案25所述的结合蛋白,其中所述IgG的Fc区CH2的BC-LOOP具有一个或多个氨基酸突变。
- [0232] 27. 根据实施方案25-26中任一项所述的结合蛋白,其中所述IgG的Fc区CH2的BC-LOOP在选自下组的一个或多个位点具有氨基酸突变:V28、S29、H30、E31、D34、P35和/或K/Q38。
- [0233] 28. 根据实施方案25-27中任一项所述的结合蛋白,其中所述IgG的Fc区CH2的BC-LOOP具有选自下组的一个或多个氨基酸突变:V28L、S29A、H30P、E31S、D34K、P35G、E36T和/或K/Q38N。
- [0234] 29. 根据实施方案25-28中任一项所述的结合蛋白,其中所述突变后的IgG的Fc区CH2的BC-LOOP包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列。
- [0235] 30. 根据实施方案25-29中任一项所述的结合蛋白,其中所述IgG的Fc区CH2的DE-TURN在选自下组的一个或多个位点具有氨基酸突变:E84.1、Y/F84.3、S85.4、Y/F85.2和/或R85.1。
- [0236] 31. 根据实施方案25-30中任一项所述的结合蛋白,其中所述IgG的Fc区CH2的DE-TURN具有选自下组的一个或多个氨基酸突变:E84.1K、Y/F84.3R、S85.4G、Y/F85.2L和/或R85.1T。
- [0237] 32. 根据实施方案25-31中任一项所述的结合蛋白,其中所述突变后的IgG的Fc区CH2的DE-TURN包含SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列。
- [0238] 33. 根据实施方案25-32中任一项所述的结合蛋白,其中所述IgG的Fc区CH2的FG-LOOP在选自下组的一个或多个位点具有氨基酸突变:K105、S107、N108、K109、A/G110、A/S115、P/S116和/或I117。
- [0239] 34. 根据实施方案25-33中任一项所述的结合蛋白,其中所述IgG的Fc区CH2的FG-LOOP具有选自下组的一个或多个氨基酸突变:K105R、S107T、N108H、K109P、A/G110H、A/

S115R、P/S116A和/或I117L。

[0240] 35. 根据实施方案25-34中任一项所述的结合蛋白,其中所述突变后的IgG的Fc区CH2的FG-LOOP包含SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列。

[0241] 36. 根据实施方案1-35中任一项所述的结合蛋白,其中所述IgG的Fc区CH2的N端在选自下组的一个或多个位点具有氨基酸突变:P1.5、E1.4、L/P/F1.3、L/V1.2、G/A1.1、G1和/或P2。

[0242] 37. 根据实施方案36所述的结合蛋白,其中所述IgG的Fc区CH2的N端具有选自下组的一个或多个氨基酸突变:P1.5D、E1.4S、L/P/F1.3N、L/V1.2P、G/A1.1R和/或P2V。

[0243] 38. 根据实施方案37所述的结合蛋白,其中所述突变后的IgG的Fc区CH2包含SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列。

[0244] 39. 根据实施方案21-38中任一项所述的结合蛋白,其中所述氨基酸的区域位置通过IMGT unique numbering for C-DOMAIN编码方式确定。

[0245] 40. 根据实施方案1-38中任一项所述的结合蛋白,其还包含IgG Fc区CH3。

[0246] 41. 根据实施方案40所述的结合蛋白,其包含SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列。

[0247] 42. 根据实施方案1-41中任一项所述的结合蛋白,其还包含IgE的恒定区片段。

[0248] 43. 根据实施方案1-42中任一项所述的结合蛋白,其还包含IgE的恒定区CH2或其片段。

[0249] 44. 根据实施方案1-43中任一项所述的结合蛋白,其中所述IgE的恒定区片段包含SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15中任一项所示的氨基酸序列。

[0250] 45. 根据实施方案1-44中任一项所述的结合蛋白,其包含SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:31中任一项所示的氨基酸序列。

[0251] 46. 根据实施方案1-45中任一项所述的结合蛋白,其具有下述性质中的一种或多种:

[0252] (1) 能够结合FcεRIa;

[0253] (2) 能够结合FcRn;

[0254] (3) 具有良好的表达质量;

[0255] (4) 可以使用Protein A或G直接纯化;以及

[0256] (5) 比IgE Fc具有减少的潜在糖基化位点。

[0257] 47. 多肽,其包含实施方案1-46中任一项所述的结合蛋白。

[0258] 48. 融合蛋白,其包含实施方案1-47中任一项所述的结合蛋白。

[0259] 49. 根据实施方案48所述的融合蛋白,其还包含一种或多种其他功能活性蛋白。

[0260] 50. 根据实施方案47所述的融合蛋白,其中所述其他功能活性蛋白选自下组中的一种或多种:Fab、scFv、VHH、细胞因子、可溶性受体或配体和药物多肽。

[0261] 51. 根据实施方案48-50中任一项所述的融合蛋白,其为类IgG分子。

[0262] 52. 根据实施方案48-51中任一项所述的融合蛋白,其能特异性结合肿瘤相关抗原。

[0263] 53. 根据实施方案52所述的融合蛋白,其中所述肿瘤相关抗原包括Her2。

- [0264] 54. 根据实施方案51-53中任一项所述的融合蛋白,其包含重链,所述重链包含SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列。
- [0265] 55. 根据实施方案51-54中任一项所述的融合蛋白,其包含轻链,所述轻链包含SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列。
- [0266] 56. 根据实施方案52所述的融合蛋白,其中所述肿瘤相关抗原包括GPC3。
- [0267] 57. 根据实施方案56所述的融合蛋白,其包含重链,所述重链包含SEQ ID NO:32或SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列。
- [0268] 58. 根据实施方案56-57中任一项所述的融合蛋白,其包含轻链,所述轻链包含SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列。
- [0269] 59. 根据实施方案52所述的融合蛋白,其中所述肿瘤相关抗原包括CD20。
- [0270] 60. 根据实施方案59所述的融合蛋白,其包含重链,所述重链包含SEQ ID NO:35或SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列。
- [0271] 61. 根据实施方案59-60中任一项所述的融合蛋白,其包含轻链,所述轻链包含SEQ ID NO:37所示的氨基酸序列。
- [0272] 62. 药物分子,其包含实施方案1-46中任一项所述的结合蛋白、实施方案47所述的多肽或实施方案48-61中任一项所述的融合蛋白。
- [0273] 63. 分离的一种或多种核酸分子,其编码实施方案1-46中任一项所述的结合蛋白、实施方案47所述的多肽或实施方案48-61中任一项所述的融合蛋白。
- [0274] 64. 载体,其包含实施方案63所述的核酸分子。
- [0275] 65. 细胞,其包含实施方案63所述的核酸分子,或实施方案64所述的载体。
- [0276] 66. 药物组合物,其包含实施方案1-46中任一项所述的结合蛋白、实施方案47所述的多肽、实施方案48-61中任一项所述的融合蛋白、实施方案62所述的药物分子、实施方案63所述的核酸分子、实施方案64所述的载体或实施方案65所述的细胞,以及任选地药学上可接受的载体。
- [0277] 67. 制备实施方案1-46中任一项所述的结合蛋白、实施方案47所述的多肽或实施方案48-61中任一项所述的融合蛋白的方法,所述方法包括在使得所述结合蛋白、所述多肽或所述融合蛋白表达的条件下,培养实施方案59所述的细胞。
- [0278] 68. 实施方案1-46中任一项所述的结合蛋白、实施方案47所述的多肽、实施方案48-61中任一项所述的融合蛋白、实施方案62所述的药物分子、实施方案63所述的核酸分子、实施方案64所述的载体、实施方案65所述的细胞或实施方案66所述的药物组合物在制备药物中的用途,所述药物用于预防或治疗疾病和/或病症。
- [0279] 69. 根据实施方案68所述的用途,其中所述疾病和/或病症包括肿瘤。
- [0280] 70. 根据实施方案68-69中任一项所述的用途,其中所述肿瘤包括实体瘤和/或血液瘤。
- [0281] 不欲被任何理论所限,下文中的实施例仅仅是为了阐释本申请的结合蛋白、制备方法和用途等,而不用于限制本申请发明的范围。
- [0282] 实施例
- [0283] 实施例1分子构建、蛋白表达、纯化及纯度分析
- [0284] 1.1分子构建

[0285] 结合蛋白的Fc区的设计由将位于IgE Fc CH3结构域的BC-LOOP、DE-TURN和FG-LOOP区的氨基酸,移植替换IgG Fc CH2结构域对应的BC-LOOP、DE-TURN和FG-LOOP区的对应的氨基酸获得,或者将IgG Fc CH2结构域对应的BC-LOOP、DE-TURN和FG-LOOP区的氨基酸,替换为位于IgE Fc CH3结构域的BC-LOOP、DE-TURN和FG-LOOP区的部分氨基酸获得。其中,移植替换后的IgG Fc区CH2可包含SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:41或SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列。编码结合蛋白基因由苏州金唯智生物和南京擎科生物合成,为在哺乳动物细胞中进行分泌表达,结合蛋白的N端均加入了信号肽,序列为:MGWSCIIILFLVATATGVHS (SEQ ID NO:28)。采用标准的分子生物学技术将基因克隆至真核表达载体中(如pCDNA3.1,购自淼灵生物),经测序验证正确后使用质粒中提试剂盒(NucleoBond Xtra Midi Plus,MACHEREY-NAGEL)准备质粒(具体流程参见制造商说明书),用于蛋白表达。其中,图1显示的是IgE和IgG结构及潜在糖基化修饰位点示意图。图2显示的是结合蛋白结构设计及潜在糖基化修饰位点示意图,图中示意图表示IgG Fc CH2结构域中发生了移植替换,部分氨基酸替换为了IgE Fc CH3中的相应氨基酸,根据图2中结合蛋白1的结构,发生了移植替换后的IgG Fc区可进一步包含IgE的CH2结构域或其片段;在图2中,结合蛋白DB177、DB364采用结合蛋白1结构;结合蛋白DB365、DB366、DB-B63、DB-B64采用结合蛋白2结构。图3显示的是Fab与结合蛋白融合的结构及潜在糖基化修饰位点示意图,其中,结合蛋白DB871、DB-B229、DB-B232采用结合蛋白3结构;结合蛋白DB872、DB-B230、DB-B233采用结合蛋白4结构。图4A显示的是人IgE重链恒定区CH3IMGT编码及区域划分;图4B显示的是人IgG重链恒定区CH2 IMGT编码及区域划分;编码方式为IMGT unique numbering for C-DOMAIN。其中,本申请构建的结合蛋白的氨基酸序列如表1所示。

[0286] 1.2蛋白表达、纯化及纯度分析

[0287] 蛋白表达使用Expi293(购自Thermo fisher)细胞瞬时转染表达,将制备好的重链和轻链质粒使用PEI-MW40000(PolySciences)共转Expi293细胞,瞬时表达所需蛋白,PEI配制及使用方法可参见PolySciences PEI MAX使用说明(也可参考Jäger, V.,等.BMC Biotechnol 13,52,2013.)。Expi293细胞培养及转染流程可参见Thermofisher Expi293表达系统使用说明。瞬时转染后5-7天离心收获细胞上清,上清经0.45 μ m滤器过滤后准备蛋白纯化。

[0288] 使用protein A预装柱(GE Lifesciences)纯化瞬时表达的蛋白,使用流程可参见制造商使用说明。收获的洗脱液蛋白样品经透析或超滤换液至PBS缓冲体系,再通过0.22 μ m滤器将样品过滤除菌,以获得待测试的蛋白样品。使用NanoDropTM分光光度计(Thermo Scientific),结合蛋白的理论消光系数对蛋白样品进行定量。蛋白表达纯化的结果显示,结合蛋白表达良好,可以使用Protein A直接进行纯化,保留了IgG Fc或IgG类抗体类似的表达和纯化特性。

[0289] 蛋白纯度分析使用尺寸排阻色谱法(SEC),将在PBS中的纯化的样品施加于TSKgelSuperSW3000的300 \times 4.6mm,5 μ m柱(TOSOH)上。使用U3000型HPLC仪器(DIONEX)进行SEC。所有蛋白质都使用UV检测,在280nm和214nm下测定。洗脱是以0.25mL/min流速进行的等度洗脱。分析结果显示,使用Protein A一步纯化的结合蛋白在溶液状态下的单体纯度均良好(图7-11及表1),其中,DB364(SEQ ID NO:17)、DB365(SEQ ID NO:18)和DB366(SEQ ID NO:19)均超过了90%,说明对结合蛋白非结合区的序列进行选择优化能明显提高蛋白的纯

度。而在DB177和DB366基础上,融合Her2抗体Pertuzumab Fab的结合蛋白DB871和DB872、融合GPC3抗体Codrituzumab Fab的结合蛋白DB-B229和DB-B230、融合CD20抗体Rituximab Fab的结合蛋白DB-B229和DB-B230经Protein A一步纯化的单体纯度均超过了95%(图7-11及表1),说明与Fab融合的结合蛋白也具有优异的纯度。

[0290] 表1结合蛋白SEC-HPLC纯度

蛋白编号	单体纯度%(SEC)	序列
DB177	84.5	SEQ ID NO: 16
DB364	91.9	SEQ ID NO: 17
DB365	97.2	SEQ ID NO: 18
DB366	94.8	SEQ ID NO: 19
DB-B63	96.2	SEQ ID NO: 30
[0291] DB-B64	97.2	SEQ ID NO: 31
DB871	97.1	重链 SEQ ID NO: 20 轻链 SEQ ID NO: 22
DB872	98.4	重链 SEQ ID NO: 21 轻链 SEQ ID NO: 22
DB-B229	97.63	重链 SEQ ID NO: 32 轻链 SEQ ID NO: 34
DB-B230	99.11	重链 SEQ ID NO: 33 轻链 SEQ ID NO: 34
[0292] DB-B232	98.77	重链 SEQ ID NO: 35 轻链 SEQ ID NO: 37
DB-B233	99.3	重链 SEQ ID NO: 36 轻链 SEQ ID NO: 37

[0293] 实施例2结合蛋白与FcεRIa的亲合力检测(Bio-layer Interferometry, BLI)

[0294] 为验证结合蛋白与FcεRIa的结合能力,使用生物膜干涉法(BLI, GatorBio)分别检测结合蛋白与FcεRIa的亲合力,详细亲合力检测方法可参见GatorBio仪器使用或应用说明,简述如下:使用Anti-HIS探针(20-5066, GatorBio)装载(loading, 120s)重组表达的FcεRIa-mG2Ahis蛋白(40nM, 重组人FcεRIa胞外区-小鼠IgG2a Fc-6xHis融合蛋白, 自行生产, 蛋白编号DB967, 氨基酸序列参见SEQ ID NO:), 然后与梯度稀释的结合蛋白进行亲和(Association, 300s), 结合蛋白的稀释浓度为200、50、12.5和0(参考线)nM, 然后在PBST缓冲液中进行解离(Dissociation, 500s), 数据采集完成后使用机器自带软件进行亲合力计算。

[0295] 亲合力检测结果显示, 各结合蛋白均能高效地与重组人FcεRIa蛋白结合, 且结合能力较为一致, 亲合力均在1E-09M左右(图6), 说明非结合区的序列长度选择和是否融合

Fab不影响亲和力。另一方面,结合蛋白DB-B64的亲和力则略有下降,说明融合蛋白N端位于CH2第1.1-1.6和第2位的氨基酸对亲和力有影响。

[0296] 实施例3结合蛋白阻断FcεRIa的活性检测

[0297] 为验证结合蛋白阻断FcεRIa的活性,使用ELISA方法检测结合蛋白阻断FcεRIa与其配体IgE结合的活性。具体方法为,将重组表达的人FcεRIa-Fc蛋白用PBS稀释到1μg/mL,100μL/孔包被酶标板(Corning,货号:42592),4℃孵育过夜。第二天弃去包被液,使用含2.5%脱脂牛奶的PBS25℃封闭1小时,结束后用PBST(PBS+0.05% Tween 20)洗涤3次,之后加入预先混合1小时、含有0.5nM的人IgE或IgE-Fc(生物素标记的)和梯度稀释的待检结合蛋白的预混液,25℃孵育1小时,待检结合蛋白终浓度从50、200或1200nM起,3或4倍连续稀释,再加0nM的点,结束后用PBST洗3次。加入1:2000稀释的streptavidin-HRP(上海生工)孵育30分钟,PBST缓冲液洗去未结合的二抗,加入TMB进行显色反应,待显色完成后加入终止液终止反应。测得OD₄₅₀值用四参数回归模型分析,计算抗体的IC₅₀。

[0298] 检测结果显示,各结合蛋白均能有效地阻断FcεRIa与其配体IgE的结合(图12A-C),说明各结合蛋白均具有阻断活性。另外,以DB366为参照,比较各结合蛋白的阻断活性,除DB-B64外,其余各结合蛋白的阻断活性基本一致。尽管不同组别的实验间具有一定的差异,但实验结果可以看出DB-B64的阻断活性则略有下降,这样的结果也与亲和力检测的结果一致。

[0299] 实施例4结合蛋白激活FcεRI受体的活性检测

[0300] 为验证结合蛋白是否具有介导FcεRI受体激活的活性,使用大鼠肥大细胞系RBL-2H3荧光素酶报告基因法进行检测。

[0301] 表达人FcεRIα和NFAT驱动的荧光素酶报告基因细胞株(RBL-2H3-FcεRIα-NFATLuc细胞)的构建:在大鼠嗜碱性细胞RBL-2H3细胞系(购买自中国科学院细胞库)基础上,构建了表达人FcεRIα受体和NFAT驱动的荧光素酶(Luciferase)报告基因细胞株,命名为:RBL-2H3-FcεRIα-NFATLuc。构建过程参见:Analytical and Bioanalytical Chemistry volume 412, pages1901-1914(2020);Allergy 2010;65:1266-1273;J Immunol July 1,1996,157(1)221-230。

[0302] 为验证本申请所述的结合蛋白是否具有激活FcεRI受体的能力,将RBL-2H3-FcεRIα-NFATLuc细胞与抗原表达细胞混合后,再分别加入梯度稀释的抗原特异性结合蛋白,共同孵育约20小时后进行荧光素酶活性检测,以检测各结合蛋白介导的激活FcεRI受体的能力。具体地,取40000个RBL-2H3-FcεRIα-NFATLuc细胞(25μL)与4000个抗原表达细胞(25μL,Her2表达细胞是NCI-N87,GPC3表达细胞是HepG2,CD20表达细胞是Raji,均采购自中科院细胞库)于96孔板中混匀,分别加入50μL梯度稀释的抗原特异性结合蛋白(Her2特异性结合蛋白DB871和DB872,5nM起始5倍稀释;GPC3特异性结合蛋白DB-B229和DB-B230,10nM起始5倍稀释;CD20特异性结合蛋白DB-B232和DB-B233,10nM起始5倍稀释),37℃5% CO₂培养箱共孵育约20小时后,加入100μL/孔荧光素酶底物(DD1203-03,Vazyme),使用酶标仪(Molecular Devices)进行检测。

[0303] 检测结果显示,各抗原特异性结合蛋白均能高效介导FcεRI受体激活,EC50均在16-40pM之间(图13A-C),具有很强的激活活性,且通过DB871和DB872,DB-B229和DB-B230,DB-B232和DB-B233的实验数据可以看出,采用结合蛋白3和4结构活性差异不大。

[0304] 实施例5与FcRn的结合检测

[0305] 为验证本申请所述的结合蛋白是否保留了IgG Fc与FcRn结合的能力,使用生物膜干涉法(BLI)进行检测,并以Pertuzumab(具体序列参见Recommended INN list R51)作为阳性和人IgE作为阴性对照。检测方法简述如下:使用Anti-HIS探针(20-5066,GatorBio)装载(loading,120s)重组表达的人FcRn蛋白(100nM,带有6xHis标签,FCN-H52W7,ACROBiosystems),然后与梯度稀释的对照或结合蛋白在pH6.0缓冲液条件下进行亲和(Association,300s),对照或结合蛋白的稀释浓度为9000、3000、1000、333.33和0(参考线)nM,然后在pH6.0缓冲液中进行解离(Dissociation,300s),数据采集完成后使用机器自带软件进行绘图分析。

[0306] 根据检测结果,本申请所述的结合蛋白DB366和DB872均具有与阳性对照Pertuzumab类似的与FcRn结合的能力,而人IgE则基本无与FcRn结合的能力,说明本申请结合蛋白保留了IgG与FcRn结合的能力,且不受是否融合Fab的影响(图14)。

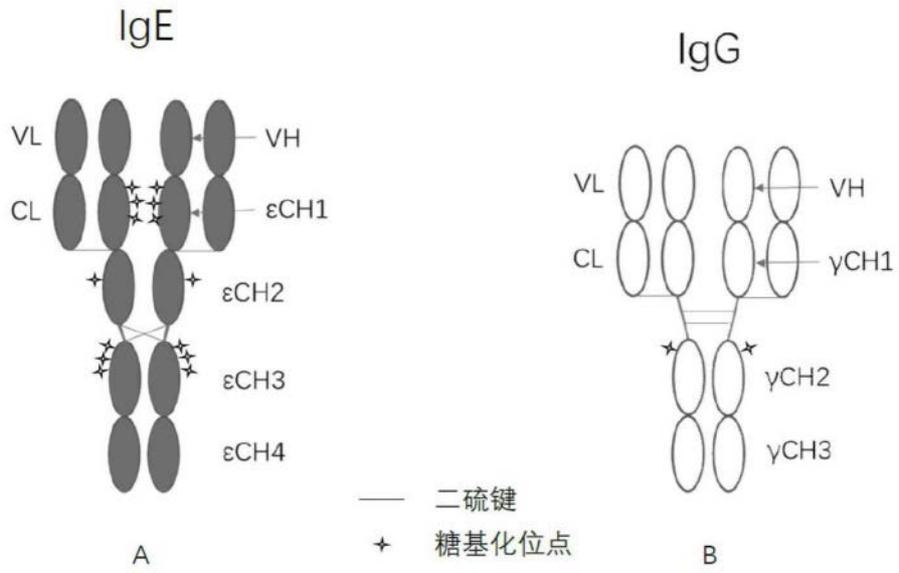


图1

结合蛋白 1

结合蛋白 2

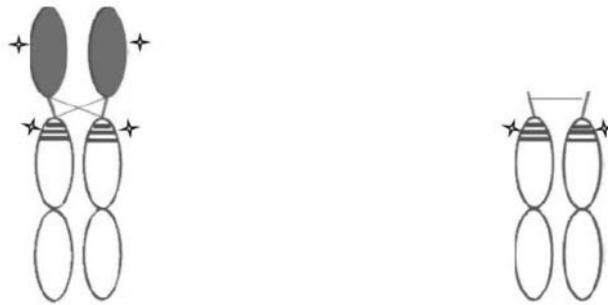


图2

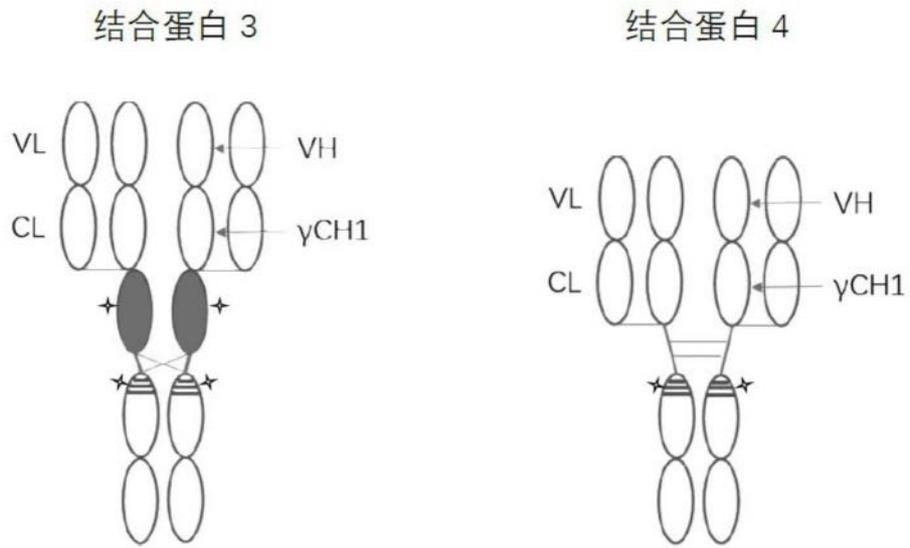


图3


```

DB177 1 csrdftpptvkilqsscdggghfppctiqlclvsgytpgtinitwledgqvmvdlstasttqge lastqseltsqkhwlsdrttccqvtqgghcfedstkkcadsnprgvsvflfpp
DB364 1 ---dftpptvkilqsscdggghfppctiqlclvsgytpgtinitwledgqvmvdlstasttqge lastqseltsqkhwlsdrttccqvtqgghcfedstkkcadsnprgvsvflfpp
DB365 1 -----tkcadsnprgvsvflfpp
DB366 1 -----cadsnprgvsvflfpp
DB-B63 1 -----cadsnprgvsvflfpp
DB-B64 1 -----cpapelligppsvflfpp

DB177 121 kp kdt lmi srt pevt cvv d l ap skgt v kfn w y d g ve v h n a k t k p r e k q r n g t l t v v s v i t v l h q d w l n g k e y k c k v t h p h l p r a l e k t i s k a k g a p r e p q v y t l p p s r e e m t k n q v s l
DB364 118 kp kdt lmi srt pevt cvv d l ap skgt v kfn w y d g ve v h n a k t k p r e k q r n g t l t v v s v i t v l h q d w l n g k e y k c k v t h p h l p r a l e k t i s k a k g a p r e p q v y t l p p s r e e m t k n q v s l
DB365 20 kp kdt lmi srt pevt cvv d l ap skgt v kfn w y d g ve v h n a k t k p r e k q r n g t l t v v s v i t v l h q d w l n g k e y k c k v t h p h l p r a l e k t i s k a k g a p r e p q v y t l p p s r e e m t k n q v s l
DB366 17 kp kdt lmi srt pevt cvv d l ap skgt v kfn w y d g ve v h n a k t k p r e k q r n g t l t v v s v i t v l h q d w l n g k e y k c k v t h p h l p r a l e k t i s k a k g a p r e p q v y t l p p s r e e m t k n q v s l
DB-B63 17 kp kdt lmi srt pevt cvv d l ap skgt v kfn w y d g ve v h n a k t k p r e k q r n g t l t v v s v i t v l h q d w l n g k e y k c k v t h p h l p r a l e k t i s k a k g a p r e p q v y t l p p s r e e m t k n q v s l
DB-B64 16 kp kdt lmi srt pevt cvv d l ap skgt v kfn w y d g ve v h n a k t k p r e k q r n g t l t v v s v i t v l h q d w l n g k e y k c k v t h p h l p r a l e k t i s k a k g a p r e p q v y t l p p s r e e m t k n q v s l

DB177 241 tc l v k g f y p s d i a v e s n g a p e n n y k t t p p v l d s d g s f f l y s k i t v d k s r w q q n v f s c s v m h e a l h n h y t q k s l s l s p g k
DB364 238 tc l v k g f y p s d i a v e s n g a p e n n y k t t p p v l d s d g s f f l y s k i t v d k s r w q q n v f s c s v m h e a l h n h y t q k s l s l s p g k
DB365 140 tc l v k g f y p s d i a v e s n g a p e n n y k t t p p v l d s d g s f f l y s k i t v d k s r w q q n v f s c s v m h e a l h n h y t q k s l s l s p g k
DB366 137 tc l v k g f y p s d i a v e s n g a p e n n y k t t p p v l d s d g s f f l y s k i t v d k s r w q q n v f s c s v m h e a l h n h y t q k s l s l s p g k
DB-B63 137 tc l v k g f y p s d i a v e s n g a p e n n y k t t p p v l d s d g s f f l y s k i t v d k s r w q q n v f s c s v m h e a l h n h y t q k s l s l s p g k
DB-B64 138 tc l v k g f y p s d i a v e s n g a p e n n y k t t p p v l d s d g s f f l y s k i t v d k s r w q q n v f s c s v m h e a l h n h y t q k s l s l s p g k

```

图5

Loading	Association	kon(1/Ms)	koff(1/s)	KD(M)
DB967 (FceRIa-mG2Ahis)	DB177	9.75E+004	9.99E-005	1.03E-009
	DB364	9.64E+004	1.72E-004	1.78E-009
	DB365	2.35E+005	1.69E-004	7.19E-010
	DB366	2.22E+005	3.73E-004	1.68E-009
	DB-B63	2.90E+005	2.87E-004	9.91E-010
	DB-B64	2.42E+005	1.13E-003	4.68E-009
	DB871	7.64E+004	1.46E-004	1.91E-009
	DB872	8.88E+004	1.61E-004	1.81E-009

图6

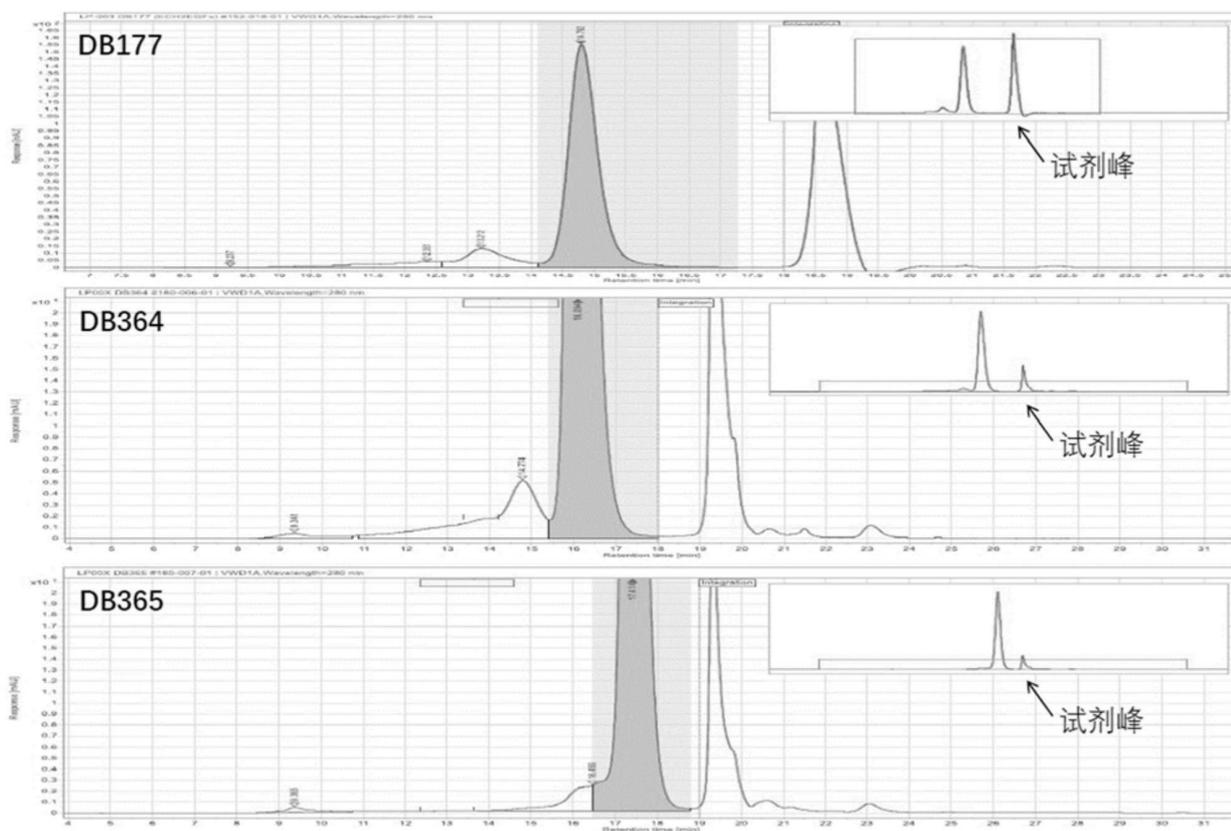


图7

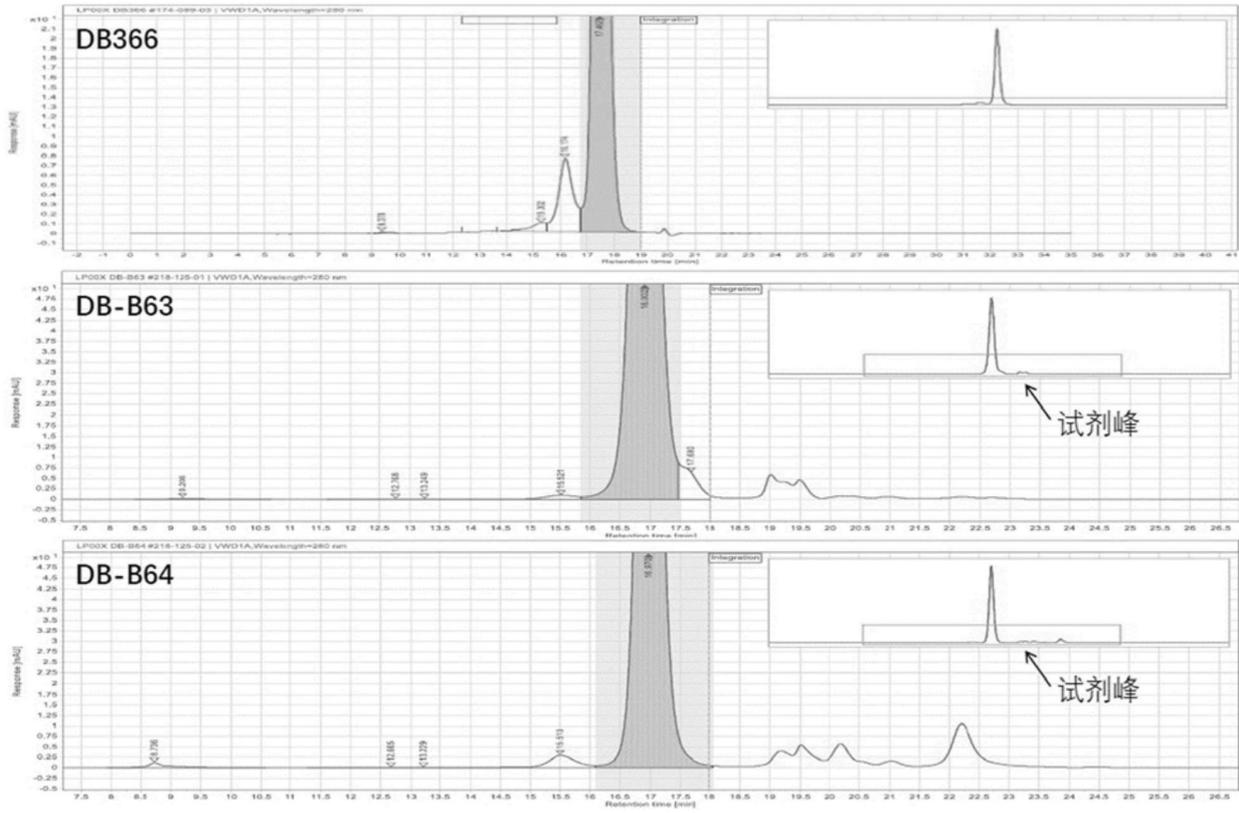


图8

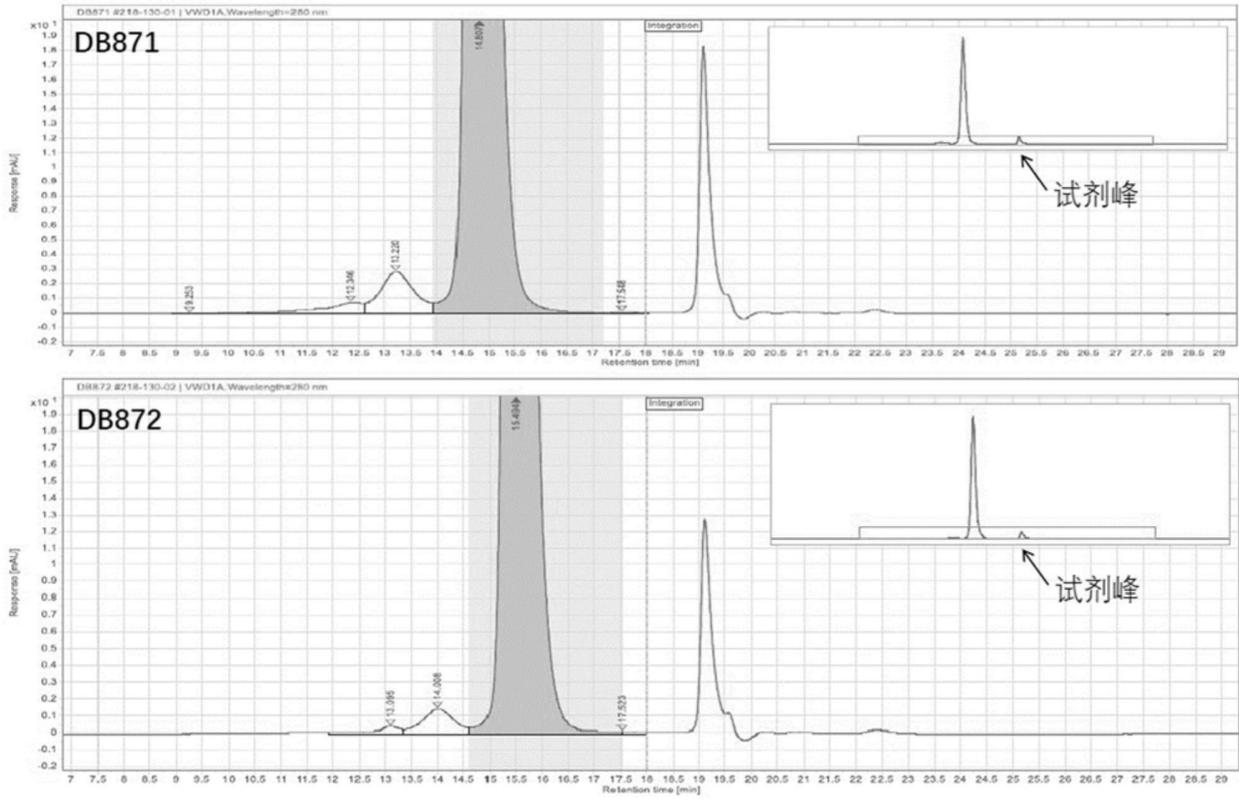


图9

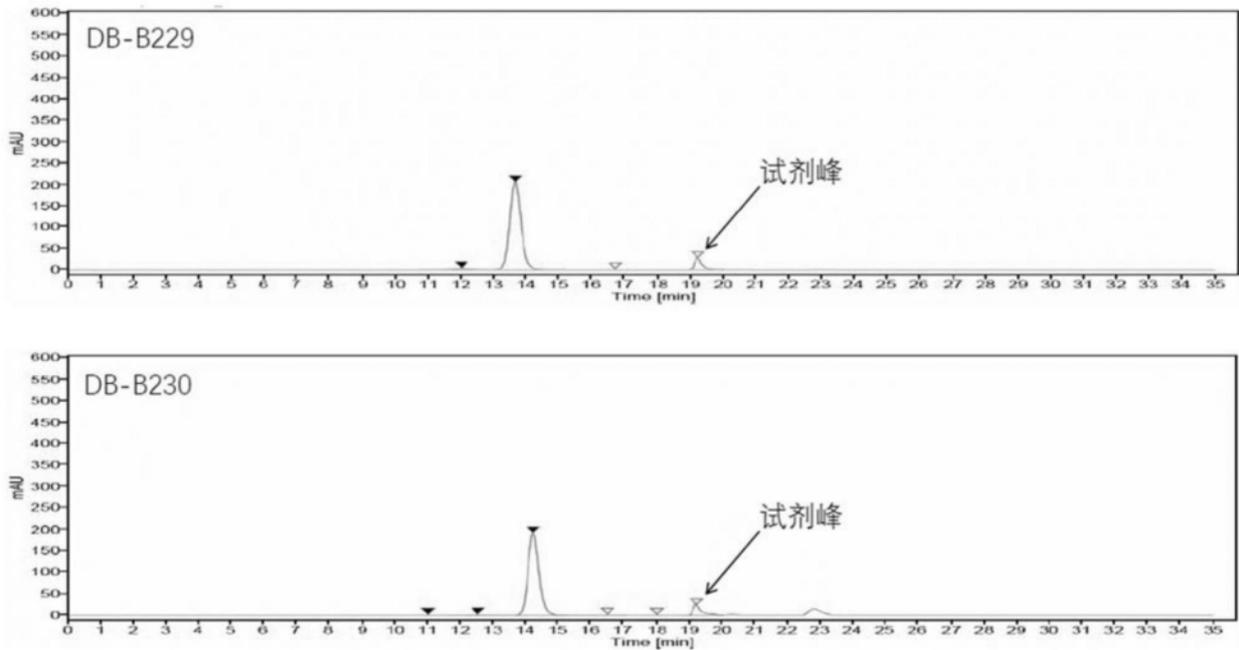


图10

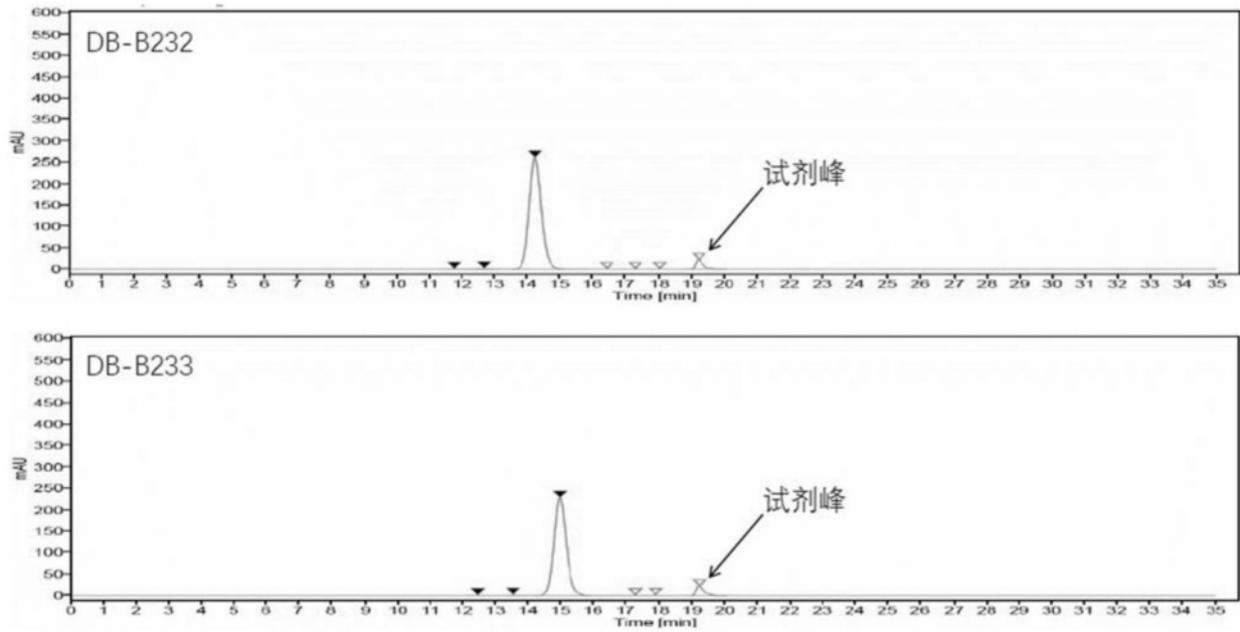
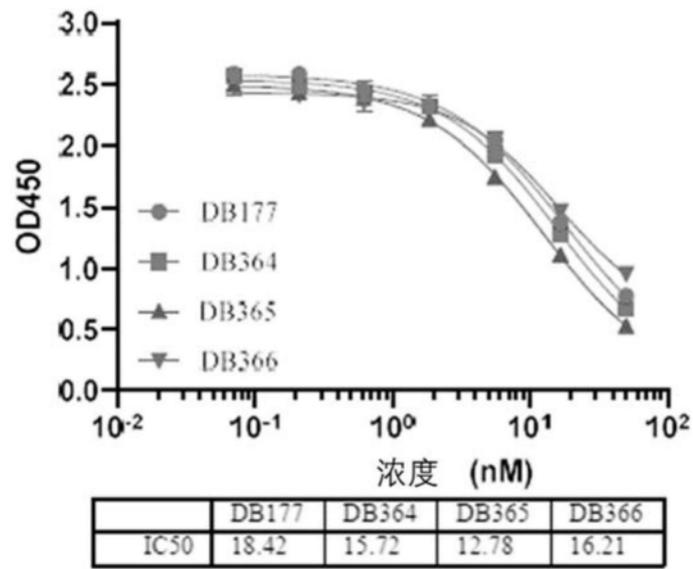
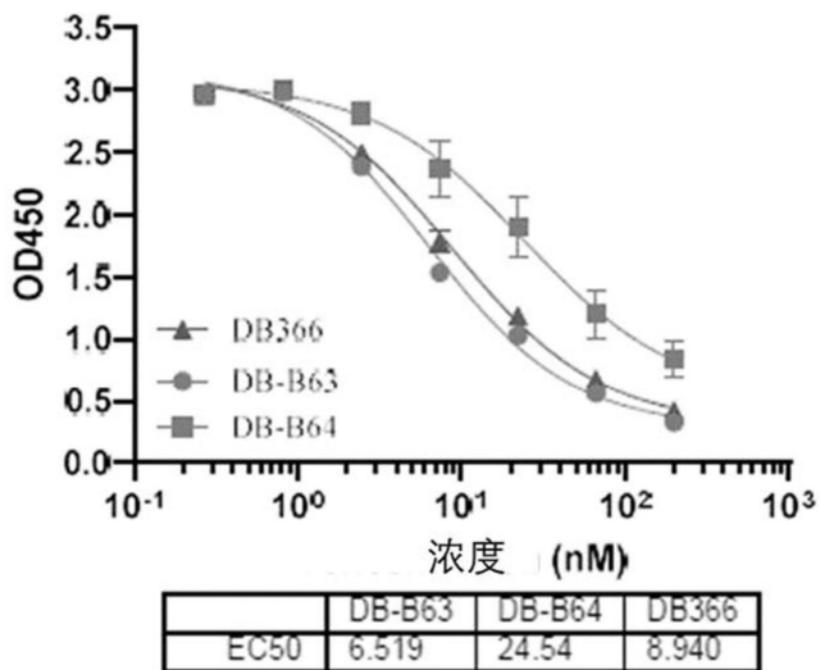


图11



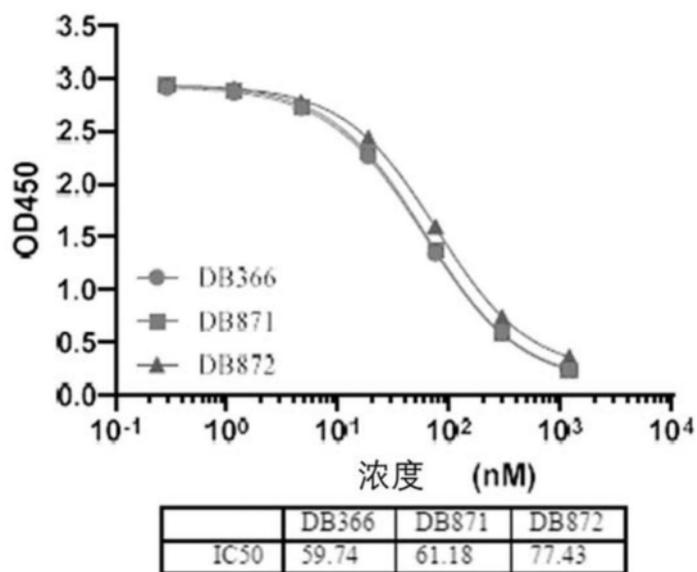
A

图12A



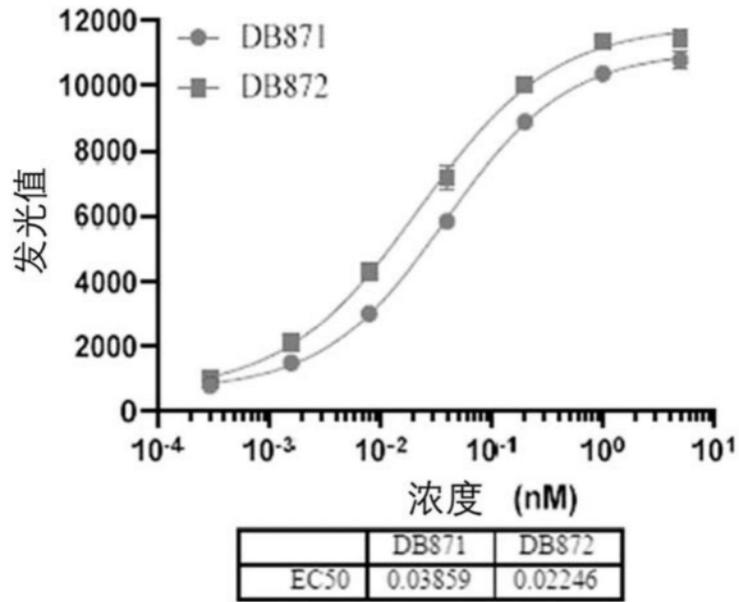
B

图12B



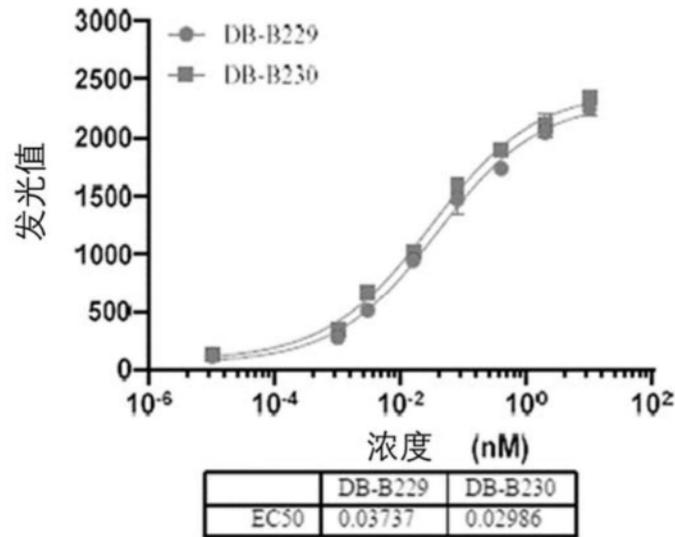
C

图12C



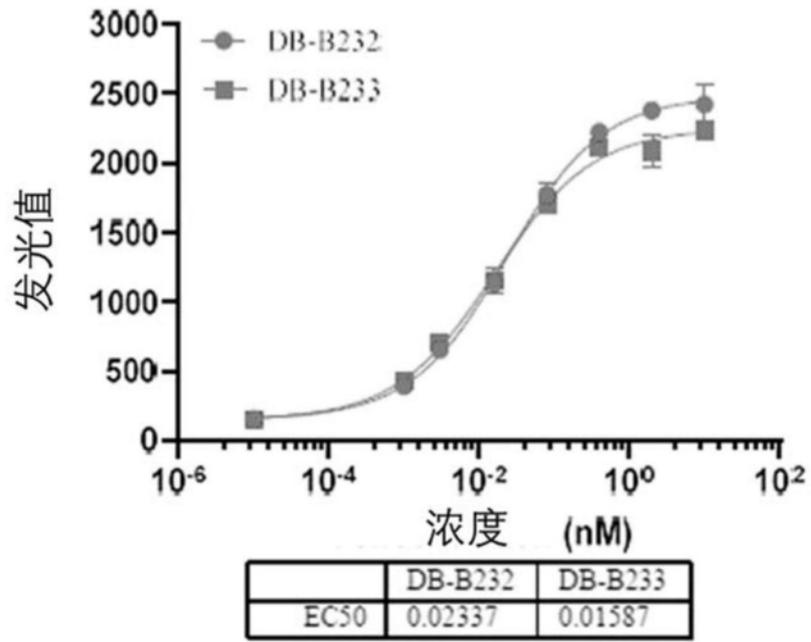
A

图13A



B

图13B



C

图13C

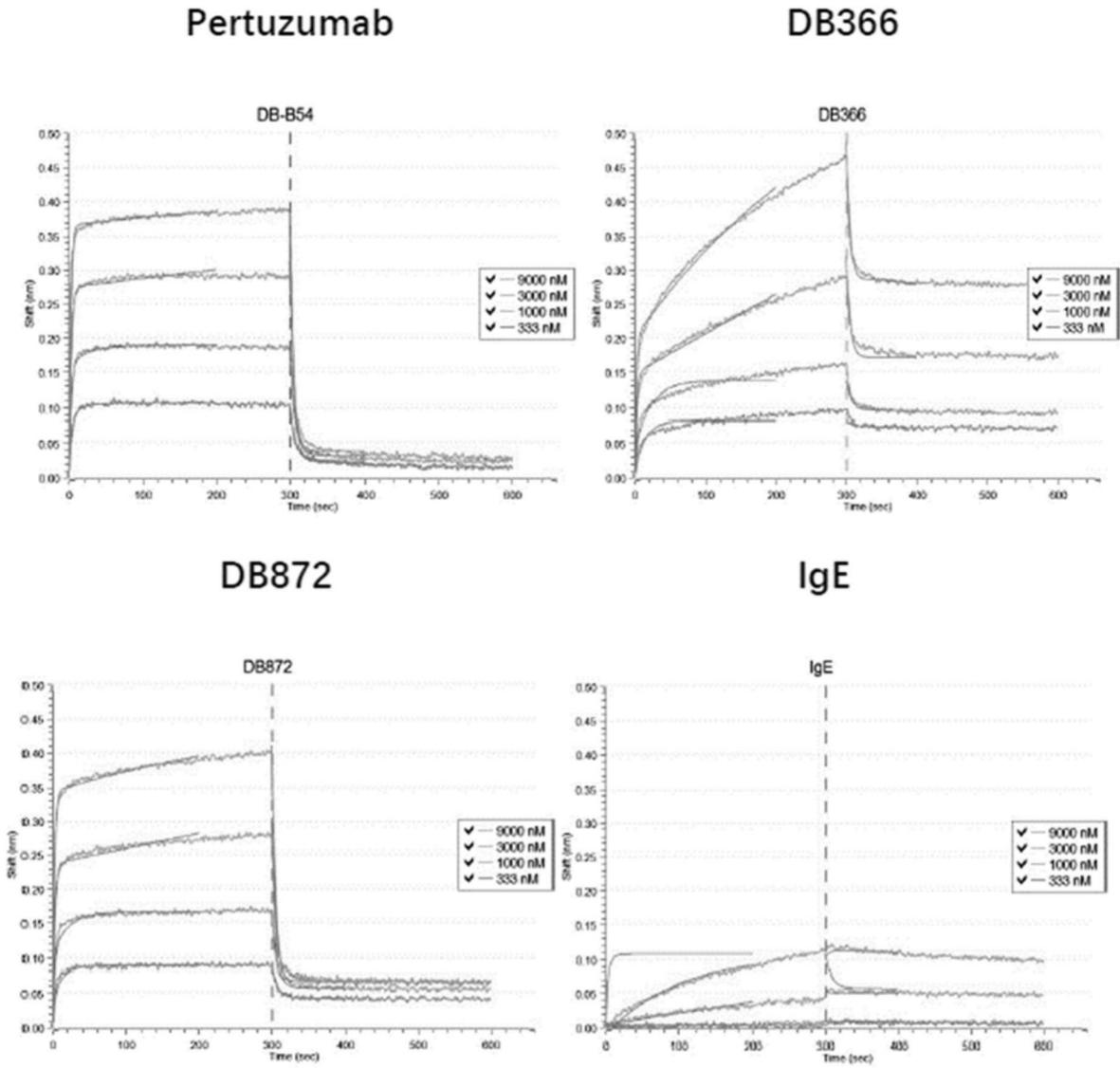


图14