(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 120051483 A
(43)申请公布日 2025.05.27

(21)申请号 202380073299.0
(22)申请日 2023.08.18
(30)优先权数据
63/399,040 2022.08.18 US
63/383,804 2022.11.15 US
63/481,303 2023.01.24 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.04.16
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/072512 2023.08.18
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/040247 EN 2024.02.22
(71)申请人 再生元制药公司
地址 美国纽约州
(72)发明人 E-M·维克 N·布洛克 V·加格 E·乌尔曼 T·张 C-Y·林 吴家曦 E·史密斯
(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
专利代理师 秦剑
(51)Int.Cl.
*C07K 14/52*(2006.01)
*A61K 38/19*(2006.01)
*A61P 35/00*(2006.01)
*C07K 14/715*(2006.01)
*C07K 16/28*(2006.01)
*C07K 14/555*(2006.01)

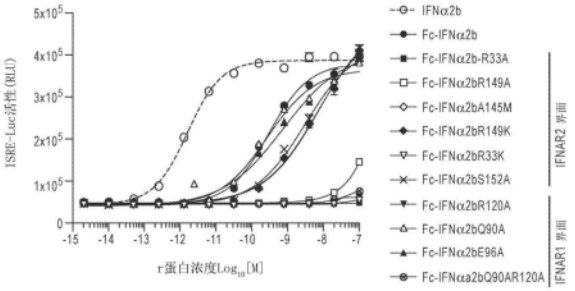
权利要求书4页 说明书111页
序列表（电子公布） 附图20页

(54)发明名称

# 干扰素前蛋白及其用途

(57)摘要

本公开提供了蛋白酶活化的IFN前蛋白。所述IFN前蛋白包含IFN部分，所述IFN部分通过经由蛋白酶可切割接头附接到Fc部分使得受到空间位阻而不能结合至其受体。在蛋白酶的作用下，例如，在肿瘤部位处，所述蛋白酶可切割接头被切割，从而释放并活化所述IFN部分。所述IFN前蛋白任选地进一步包含靶向部分，例如，识别肿瘤相关抗原并且将所述前蛋白引导至肿瘤部位的靶向部分。本公开进一步提供了包含所述IFN前蛋白的药物组合物和在疗法中使用所述IFN前蛋白的方法，以及编码所述IFN前蛋白的核酸、表达所述IFN前蛋白的重组细胞和产生所述IFN前蛋白的方法。




CN 120051483 A

1.一种I型干扰素(IFN)前蛋白,其包含:

(a)第一多肽链,其包含:

(i)第一免疫球蛋白恒定结构域;

(ii)第一接头;

(iii)第一I型干扰素(IFN)部分;

(iv)第二接头;和

(v)第一Fc结构域;

(b)第二多肽链,其包含:

(i)第二免疫球蛋白恒定结构域;

(ii)第三接头;

(iii)第二I型干扰素(IFN)部分;

(iv)第四接头;和

(v)第二Fc结构域,其与所述第一Fc结构域缔合以形成Fc区;

其中所述第一接头、所述第二接头、所述第三接头和所述第四接头中的至少两者是蛋白酶可切割接头(PCL),任选地其中所述IFN前蛋白中的所述IFN部分受到所述Fc结构域的空间位阻而不能结合至IFN受体。

2.根据权利要求1所述的IFN前蛋白,其中第一IFN部分和第二IFN部分各自包含与以下项具有至少约90%、至少约95%或至少约98%的序列同一性的氨基酸序列:(a)全长成熟人IFNα1、IFNα2b、IFNβ、IFNω、IFNε或IFNκ,或(b)成熟人IFNα1、IFNα2b、IFNβ、IFNω、IFNε或IFNκ,其在N-末端和/或C-末端处具有至多一个15个氨基酸截短。

3.根据权利要求1所述的IFN前蛋白,其中第一IFN部分和第二IFN部分各自包含与成熟人IFNα1或IFNα2b相比具有一个或多个弱化突变的氨基酸序列。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的IFN前蛋白,其中第一IFN部分和第二IFN部分各自包含选自以下项的一个或多个突变:L26A、F27A、R33A、R33K、L30A、D35E、H57Y、E58N、Q61S、H57S、E58S、H57A、E58A、Q61A、Q90A、E96A、R120A、L135A、R144A、R144S、R144T、R144Y、R144I、R144L、A145D、A145H、A145K、A145M、A145V、A145Y、R149A、R149K、S152A、R162A和E165D。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述第一接头、所述第二接头、所述第三接头和所述第四接头是蛋白酶可切割接头(PCL)。

6.根据权利要求1至4中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述第一接头和所述第三接头是蛋白酶可切割接头(PCL),任选地其中所述第二接头和所述第四接头是不可切割接头(NCL)。

7.根据权利要求1至4中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述第二接头和所述第四接头是蛋白酶可切割接头(PCL),任选地其中所述第一接头和所述第三接头是不可切割接头(NCL)。

8.根据权利要求1至7中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述PCL各自包含可被表A中列出的任何蛋白酶切割的底物序列。

9.根据权利要求1至8中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述PCL各自包含选自表B中列出的底物序列的一个或多个底物序列。

10.根据权利要求1至9中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述PCL各自包含选自表C中列出的序列的一个或多个间隔子序列。

11.根据权利要求1至10中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述PCL各自包含表D中列出的PCL序列中的任一者的氨基酸序列或其具有至多5个氨基酸取代的变体。

12.根据权利要求1至11中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述第一接头和所述第三接头是相同的并且/或者所述第三接头和所述第四接头是相同的。

13.根据权利要求1至12中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述第一Fc结构域和/或所述第二Fc结构域包含铰链结构域。

14.根据权利要求1至13中任一项所述的IFN前蛋白,其进一步包含第一靶向部分和第二靶向部分。

15.根据权利要求14所述的IFN前蛋白,其中所述第一靶向部分和所述第二靶向部分是抗体或其抗原结合片段。

16.根据权利要求15所述的IFN前蛋白,其中所述第一靶向部分和所述第二靶向部分包含Fab结构域。

17.根据权利要求14至16中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述第一靶向部分和所述第二靶向部分分别位于所述第一接头和所述第三接头的N-末端。

18.根据权利要求14至17中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述第一免疫球蛋白恒定结构域是所述第一靶向部分的一部分,并且所述第二免疫球蛋白恒定结构域是所述第二靶向部分的一部分。

19.根据权利要求18所述的IFN前蛋白,其中所述第一免疫球蛋白恒定结构域是CH3结构域或CH1结构域。

20.根据权利要求1至19中任一项所述的IFN前蛋白,其被构造成如图1A、图2A或图2D所示。

21.根据权利要求1至19中任一项所述的IFN前蛋白,其被构造成如图1B、图2B或图2E所示。

22.根据权利要求1至19中任一项所述的IFN前蛋白,其被构造成如图1C、图2C或图2F所示。

23.根据权利要求14至22中任一项所述的IFN前蛋白,本文中所述第一靶向部分和/或所述第二靶向部分能够结合至细胞外基质(ECM)抗原、肿瘤反应性淋巴细胞抗原、肿瘤或病毒淋巴细胞的细胞表面分子、T细胞抗原(TCA)、检查点抑制剂、肿瘤相关抗原(TAA)、树突状细胞(DC)或其他抗原呈递细胞(APC)抗原、或自然杀伤(NK)细胞抗原。

24.根据权利要求14至23中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述第一靶向部分和/或所述第二靶向部分(a)包含表F中列出的抗体的(i)CDR或(ii)VH序列和VL序列或者(b)与表F中列出的所述抗体竞争以结合至靶分子。

25.根据权利要求14至23中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述第一靶向部分和/或所述第二靶向部分能够结合至ECM抗原,所述ECM抗原任选地选自多配体聚糖、乙酰肝素酶、整联蛋白、骨桥蛋白、连接蛋白、钙粘蛋白、层粘连蛋白、层粘连蛋白型EGF、凝集素、纤连蛋白、缺口蛋白、粘连蛋白(例如,粘连蛋白-4)、腱生蛋白、胶原蛋白(例如,X型胶原蛋白)和基质蛋白。

26.根据权利要求14至23中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述第一靶向部分和/或所述第二靶向部分能够结合至肿瘤或病毒淋巴细胞的细胞表面分子。

27.根据权利要求26所述的IFN前蛋白,其中所述抗原是T细胞共刺激蛋白,所述T细胞共刺激蛋白任选地选自CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C和B7-H3。

28.根据权利要求14至23中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述第一靶向部分和/或所述第二靶向部分能够结合至检查点抑制剂。

29.根据权利要求28所述的IFN前蛋白,其中所述检查点抑制剂是PDL1。

30.根据权利要求28所述的IFN前蛋白,其中所述检查点抑制剂是PD1。

31.根据权利要求14至23中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述第一靶向部分和/或所述第二靶向部分能够结合至肿瘤相关抗原(TAA),所述TAA任选地选自AFP、ALK、BAGE蛋白、BIRC5(生存素)、BIRC7、β-连环蛋白、brc-abl、BRCA1、BORIS、CA9、碳酸酐酶IX、半胱天冬酶-8、CALR、CEACAM5(也称为癌胚抗原或CEA)、CCR5、CD19、CD20(MS4A1)、CD22、CD30、CD40、CDK4、CEA、CTLA4、细胞周期蛋白-B1、CYP1B1、EGFR、EGFRvIII、ErbB2/Her2、ErbB3、ErbB4、ETV6-AML、EpCAM、EphA2、Fra-1、FOLR1、GAGE蛋白(例如,GAGE-1或-2)、GD2、GD3、GloboH、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3、GM3、gp100、Her2、HLA/B-raf、HLA/k-ras、HLA/MAGE-A3、hTERT、LMP2、MAGE蛋白(例如,MAGE-1、-2、-3、-4、-6和-12)、MART-1、间皮素、ML-IAP、Muc1、Muc2、Muc3、Muc4、Muc5、Muc16(CA-125)、MUM1、NA17、NY-BR1、NY-BR62、NY-BR85、NY-ESO1、OX40、p15、p53、PAP、PAX3、PAX5、PCTA-1、PLAC1、PRLR、PRAME、PSMA(FOLH1)、RAGE蛋白、Ras、RGS5、Rho、SART-1、SART-3、STEAP1、STEAP2、TAG-72、TGF-β、TMPRSS2、Thompson-nouvelle抗原(Tn)、TRP-1、TRP-2、酪氨酸酶和尿斑蛋白-3。

32.根据权利要求14至23中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述第一靶向部分和/或所述第二靶向部分能够结合至树突状细胞(DC)抗原,所述DC抗原任选地选自XCR1、Clec9a、CD1c、CD11c、CD14、PDL1、巨噬细胞甘露糖受体(CD206)和DEC-205。

33.根据权利要求14至23中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述第一靶向部分和/或所述第二靶向部分能够结合至自然杀伤(NK)细胞抗原。

34.根据权利要求1至33中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述Fc区是同二聚体型的。

35.一种核酸或多种核酸,其编码根据权利要求1至34中任一项所述的IFN前蛋白。

36.一种宿主细胞,其经工程化以表达根据权利要求1至34中任一项所述的IFN前蛋白或根据权利要求35所述的核酸。

37.一种产生根据权利要求1至34中任一项所述的IFN前蛋白的方法,其包括培养根据权利要求36所述的宿主细胞并且回收由此表达的所述IFN前蛋白。

38.一种药物组合物,其包含根据权利要求1至34中任一项所述的IFN前蛋白以及赋形剂。

39.一种治疗癌症的方法,其包括向有此需要的受试者施用根据权利要求1至34中任一项所述的IFN前蛋白或根据权利要求38所述的药物组合物。

40.根据权利要求39所述的方法,其中所述IFN前蛋白包含能够结合至靶分子的至少一个靶向部分。

41.根据权利要求39所述的方法,其中所述癌症与所述靶分子的表达相关,例如,如表I

中列出的TAA和相关癌症。

42.根据权利要求39至41中任一项所述的方法,其中包含所述IFN部分的经活化的IFN蛋白是通过由所述癌组织表达的一个或多个蛋白酶切割所述IFN前蛋白中的一个或多个蛋白酶可切割接头而产生的。

43.一种IFN蛋白的局部递送的方法,其包括向受试者施用根据权利要求1至34中任一项所述的IFN前蛋白(或包含所述IFN前蛋白和赋形剂的药物组合物),所述IFN前蛋白具有一个或多个蛋白酶可切割接头,每个蛋白酶可切割接头包含用于由待向其局部递送所述IFN蛋白的组织表达的一种或多种蛋白酶的一个或多个底物。

44.一种用在癌组织中经选择性地活化的IFN蛋白治疗癌症的方法,其包括向有此需要的受试者施用根据权利要求1至34中任一项所述的IFN前蛋白(或包含所述IFN前蛋白和赋形剂的药物组合物),所述IFN前蛋白具有一个或多个蛋白酶可切割接头,每个蛋白酶可切割接头包含用于由所述IFN蛋白所靶向的癌组织表达的一种或多种蛋白酶的一个或多个底物。

45.一种向受试者施用具有降低的全身暴露和/或降低的全身毒性的IFN疗法的方法,其包括向受试者施用根据权利要求1至34中任一项所述的IFN前蛋白(或包含所述IFN前蛋白和赋形剂的药物组合物)形式的所述IFN疗法,所述IFN前蛋白具有一个或多个蛋白酶可切割接头,每个蛋白酶可切割接头包含用于由期望和/或预期对其进行IFN疗法的组织表达的一种或多种蛋白酶的一个或多个底物。

46.一种用在癌组织中经选择性地活化的IFN蛋白治疗癌症的方法,其包括向有此需要的受试者施用根据权利要求1至34中任一项所述的IFN前蛋白(或包含所述IFN前蛋白和赋形剂的药物组合物),所述IFN前蛋白具有一个或多个蛋白酶可切割接头,每个蛋白酶可切割接头包含用于由所述癌组织表达的一种或多种蛋白酶的一个或多个底物。

47.一种将经活化的IFN蛋白靶向递送至癌组织的方法,其包括向受试者施用根据权利要求1至34中任一项所述的IFN前蛋白(或包含所述IFN前蛋白和赋形剂的药物组合物),其中所述IFN前蛋白:

(a)包含识别由所述癌组织或相关免疫细胞表达的靶分子的一个或多个靶向部分;并且

(b)具有一个或多个蛋白酶可切割接头,每个蛋白酶可切割接头包含用于期望和/或预期对其进行IFN疗法的组织中表达的一种或多种蛋白酶的一个或多个底物。

48.一种在靶组织中局部诱导免疫应答的方法,其包括向受试者施用根据权利要求1至34中任一项所述的IFN前蛋白(或包含所述IFN前蛋白和赋形剂的药物组合物),所述IFN前蛋白具有能够结合在所述靶组织中表达的靶分子的一个或多个靶向部分以及一个或多个蛋白酶可切割接头,每个蛋白酶可切割接头包含用于在所述靶组织中表达的一种或多种蛋白酶的一个或多个底物。

49.一种增强针对抗原的免疫应答的方法,其包括向受试者施用引发针对所述抗原的免疫应答的免疫原性剂连同根据权利要求1至34中任一项所述的IFN前蛋白(或包含所述IFN前蛋白和赋形剂的药物组合物)或编码此类IFN前蛋白的核酸,例如,如在第6.10.1节中所描述)。

50.根据权利要求39至49中任一项所述的方法,其中所述施用是非局部的。

# 干扰素前蛋白及其用途

[0001] 1.相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2022年8月18日提交的美国临时申请号63/399,040、于2022年11月15日提交的美国临时申请号63/383,804和于2023年1月24日提交的美国临时申请号63/481,303的优先权权益,这些美国临时申请中的每一个的内容通过对其援引以其全文并入本文。

[0003] 2.序列表

[0004] 本申请含有已经电子提交的序列表,并且在此通过引用整体并入本文。创建于2023年8月15日的所述副本命名为RGN-020WO_SL.xml并且大小为361,113字节。

3.背景技术

[0005] I型干扰素(IFN)被认为直接抑制肿瘤细胞增殖。I型IFN在治疗几种类型的癌症中具有实用性,包括血液肿瘤(慢性骨髓性白血病、毛细胞白血病、多发性骨髓瘤和非霍奇金淋巴瘤)和实体瘤(黑色素瘤、肾癌和卡波西肉瘤)。参见,例如,Zitvogel等人,2015,Nat Rev Immunol 15:405-414和Antonelli等人,2015,Cytokine Growth Factor Rev26:121-131。

[0006] I型IFN治疗的一个特别优势是其在抗肿瘤免疫应答的产生中的多个点进行干预的能力,包括固有和适应性细胞毒性淋巴细胞群的刺激、抑制性细胞类型的负调节、通过抑制增殖以及调节细胞凋亡、分化、迁移和细胞表面抗原表达对肿瘤细胞的影响(Parker等人,2016,Nature Reviews Cancer 16:131-144)。

[0007] 在临床中使用I型IFN的最大障碍之一是与此类治疗相关联的严重副作用。最常见的副作用是流感样症状、血液毒性、转氨酶升高、恶心、疲劳和精神性后遗症。这些副作用妨碍达到和维持最大治疗效果所需的剂量,并且它们的发生可能完全超过I型IFN治疗的临床益处(Lotrich,2009,Dialogues Clin Neurosci 11:417-425)。I型IFN通过IFNAR1/IFNAR2复合体发出信号,该复合体在体内大多数细胞和组织上表达。因此,优先或特异性地将活性I型IFN递送至肿瘤反应性免疫细胞(参见,例如,Diamond等人,2011,J Exp Med.208(10):1989-2003;Cauwels等人,2018,Cancer Res.78(2):463-474)或至肿瘤微环境的能力对于I型IFN的持续临床使用是至关重要的。需要策略来修饰I型IFN,以获得优先对肿瘤反应性免疫细胞和/或在肿瘤处发挥其活性新形式的药物,并且还减少对正常IFNAR表达细胞的副作用。

[0008] 因此,本领域需要具有改善的治疗功效和安全特性的新I型IFN疗法。

4.发明内容

[0009] 本公开涉及由蛋白酶(例如,在肿瘤环境中表达的蛋白酶)活化的IFN前蛋白。

[0010] IFN前蛋白包含受到空间位阻而不能结合至其受体的IFN部分,其被构造成使得IFN部分由蛋白酶切割IFN前蛋白中的接头而被活化,从而导致该IFN部分的空间位阻的减轻。IFN前蛋白优选地进一步包含将该IFN前蛋白引导至特定组织或细胞类型的靶向部分。

[0011] 通常,本公开的IFN前蛋白包含两个多肽链,每个多肽链从N-末端到C-末端包含第一接头、干扰素(IFN)部分、第二接头和Fc结构域。在一些实施例中,第一接头和第二接头都

是蛋白酶可切割接头(PCL)。在其他实施例中,第一接头和第二接头中的仅一者是PCL,而另一个是不可切割接头(NCL)。因此,在一些实施例中,第一接头是PCL,并且第二接头是NCL。在其他实施例中,第一接头是NCL,并且第二接头是PCL。

[0012] IFN前蛋白可以在例如一个或两个Fc结构域的N-末端进一步包含靶向部分(或其组分,例如,Fab的一个链)。靶向部分包含抗原结合结构域("ABD"),该抗原结合位点可以例如结合至肿瘤表面上存在的靶分子(例如,肿瘤相关抗原)或肿瘤微环境中的其他组分(例如,细胞外基质)("ECM")或肿瘤淋巴细胞)。

[0013] 可用于本公开的IFN前蛋白中的示例性IFN部分描述于第6.3节中。

[0014] 可用于本公开的IFN前蛋白中的蛋白酶可切割接头描述于第6.4节中。

[0015] 可用于本公开的IFN前蛋白中的不可切割接头描述于第6.5节中。

[0016] 可用于本公开的IFN前蛋白中的靶向部分描述于第6.6节中,并且靶向部分形式公开于在第6.7节中。

[0017] 可掺入到本公开的IFN前蛋白中的Fc结构域描述于第6.8节中。

[0018] 本公开的示例性IFN前蛋白描述于第6.2节和编号实施例1至146中。

[0019] 本公开进一步提供了编码本公开的IFN前蛋白的核酸。编码IFN前蛋白的核酸可以是单个核酸(例如,编码IFN前蛋白的所有多肽链的载体)或多个核酸(例如,编码IFN前蛋白的不同多肽链的两个或更多个载体)。本公开进一步提供了经工程化以表达本公开的核酸和IFN前蛋白的宿主细胞和细胞系。本公开进一步提供了产生本公开的IFN前蛋白的方法。示例性核酸、宿主细胞和细胞系以及产生IFN前蛋白的方法描述于第6.9节和编号实施例147至149中。

[0020] 本公开进一步提供了包含本公开的IFN前蛋白的药物组合物。示例性药物组合物描述于第6.10节和编号实施例150中。

[0021] 本文进一步提供了使用本公开的IFN前蛋白和药物组合物例如以治疗癌症的方法。示例性方法描述于第6.11节和编号实施例151至201中。

5.附图说明

[0022] 图1A至1C是表示本公开的三种IFN前蛋白的构型的草图,其中蛋白酶可切割接头侧接干扰素部分。图1A表示具有整体构型抗体-PCL-IFN-PCL-Fc的IFN前蛋白;图1B表示具有构型Fab-PCL-IFN-PCL-铰链-Fc的单铰链IFN前蛋白;并且图1C表示具有Fab-铰链-PCL-IFN-PCL-铰链-Fc构型的双铰链IFN前蛋白。尽管显示为具有Fab的形式的靶向部分,但Fab的VH、VL和CL结构域对于非靶向的IFN前蛋白是任选的,或者可以被其他靶向部分(诸如scFv)替代。

[0023] 图2A至2F是表示本公开的六种IFN前蛋白的构型的草图,其中仅蛋白酶可切割接头(PCL)位于干扰素部分的一侧,并且不可切割接头(NCL)位于干扰素部分的另一侧。图2A表示具有整体构型抗体-NCL-IFN-PCL-Fc的IFN前蛋白;图2B表示具有构型Fab-NCL-IFN-PCL-铰链-Fc的单铰链IFN前蛋白;图2C表示具有构型Fab-铰链-NCL-IFN-PCL-铰链-Fc的双铰链IFN前蛋白;图2D表示具有整体构型抗体-PCL-IFN-NCL-Fc的IFN前蛋白;图2E表示具有构型Fab-PCL-IFN-NCL-铰链-Fc的单铰链IFN前蛋白;并且图2F表示具有Fab-铰链-PCL-IFN-NCL-铰链-Fc构型的双铰链IFN前蛋白。尽管显示为具有Fab的形式的靶向部分,但Fab的VH、VL和CL结构域对于非靶向的IFN前蛋白是任选的,或者可以被其他靶向部分(诸如

scFv)替代。

[0024] 图3是根据图1的示例性靶向IFN前蛋白及其组成多肽链的表。TM是指靶向部分;HC指抗体重链;LC是指抗体轻链;IFN是指干扰素(IFN)部分,并且ΔN和ΔC分别是指IFN部分的IFN序列中的N-末端和C-末端截短(例如,如在第6.3节中所描述);PCL是指蛋白酶可切割接头(例如,如在第6.4节中描述的),Fc是指Fc结构域(例如,如在第6.8节中所描述);铰链是指抗体的铰链序列,并且长铰链和短铰链是指免疫球蛋白铰链序列的全长或截短版本(例如,如在第6.8.3节中所描述)。进一步地,虽然示出具有侧接IFN部分的蛋白酶可切割接头(PCL),但链1和链2中的每一者中的PCL中的一个PCL可以被不可切割接头(NCL)替代,例如,如在第6.5节中所描述。

[0025] 图4A至4C是可掺入本公开的IFN前蛋白构建体中的示例性IFN分子的尺寸排阻超高效液相色谱(SE-UPLC)图谱。图4A绘示了具有N-末端Fc结构域和C-末端IFN部分的IFN分子Fc-IFNα1的SEC图谱;图4B绘示了具有N-末端Fc和C-末端IFN部分的IFN分子Fc-IFNα2b的SEC图谱;并且图4C绘示了具有N-末端IFN部分和C-末端Fc结构域的IFN分子IFNα2b-Fc的SEC图谱。

[0026] 图5A至5C描绘了在N-末端或C-末端连接至Fc分子的示例性IFN分子的体外活性。图5A中的草图图像表示IFN的N-末端和C-末端Fc融合体。Fc-IFN是具有N-末端Fc结构域和C-末端IFN部分的IFN分子的整体表示,而IFN-Fc是具有N-末端IFN部分和C-末端Fc结构域的IFN分子的整体表示。图5B是示出示例性IFN分子、Fc-IFNα2b和IFNα2b-Fc与未连接的IFNα2b相比的体外活性的图。图5C是示出Fc-IFN分子与不同的未连接的IFN相比的活性的图。

[0027] 图6A至6D是可掺入到本公开的IFN前蛋白构建体中的示例性突变型IFN分子的SE-UPLC图谱。图6A绘示了突变型IFN分子Fc-IFNα2bR33A的SE-UPLC图谱。图6B绘示了突变型IFN分子Fc-IFNα2bR149A的SE-UPLC图谱。图6C绘示了突变型IFN分子Fc-IFNα2bR120A的SE-UPLC图谱。图6D绘示了突变型IFN分子Fc-IFNα2bS152A的SE-UPLC图谱。

[0028] 图7A至7B描绘了可掺入到本公开的IFN前蛋白构建体中的示例性突变型IFN分子的体外活性。图7A中的草图图像表示野生型(WT)或突变型(Mut)Fc-IFN分子的总体结构。图7B是示出具有影响IFNAR1或IFNAR2界面的突变的Fc-IFNα2b分子的体外活性的图。

[0029] 图8A至8C是示例性IFN前蛋白构建体的SE-UPLC图谱。图8A绘示了单铰链全长IFN前蛋白aPD1-单铰链-FLIFN的SE-UPLC图谱。图8B绘示了双铰链IFN前蛋白aPD1-双铰链长-IFN的SE-UPLC图谱。图8C绘示了具有两个Fc区的IFN前蛋白的SEC图谱。

[0030] 图9A至9B示出了单和双铰链IFN前蛋白的体外酶促切割。图9A是绘示了uPA对三种单铰链前蛋白、两种双铰链IFN前蛋白和阳性对照的切割的凝胶图像。类似地,图9B是绘示了MMP2和MMP9对相同的单和双IFN前蛋白的切割的凝胶图像。

[0031] 图10A至10B描绘了示例性IFN前蛋白与IFNα2b和Fc-IFNα2b相比的体外活性。图10A是示出两种单铰链IFN前蛋白(全长和截短的)和一种双铰链IFN前蛋白的体外活性的图。图10B是绘示了图10A中相同的IFN前蛋白通过添加仅MMP缓冲液(虚线)或MMP缓冲液和酶混合物(虚线)的活性变化的图。

6.具体实施方式

[0032] 6.1.定义

[0033] 如本文所用的下列术语具有以下含义:

[0034] ABD链,靶向部分链:靶向部分和其内的抗原结合位点(ABD)可以作为一个(例如,在scFv或scFab的情况下)多肽链存在或者通过多于一个多肽链的缔合而形成(例如,在Fab或Fv的情况下)。如本文所用,术语“ABD链”和“靶向部分链”是指存在于单个多肽链上的ABD或靶向部分的全部或部分。术语“ABD链”或“靶向部分链”的使用仅旨在方便和描述性目的,并不意味着特定的配置或生产的方法。此外,当描述IFN前蛋白时对ABD或靶向部分的提及涵盖ABD链或靶向部分链,除非上下文另有说明。因此,当描述Fc结构域可操作地连接至靶向部分的IFN前蛋白时,Fc结构域可以通过肽键(例如,经由接头)直接或间接共价连接至例如(1)Fab或Fv的第一ABD或靶向部分链(其中Fab或Fv的其他组分在第二相关ABD或靶向部分链上)或(2)含有scFv或scFab的ABD或靶向部分链。

[0035] 约、大约:贯穿整个说明书,在数字前面使用术语“约”、“大约”等,以表明该数字不一定准确(例如,考虑分数、测量准确度和/或精密度的变化、计时等)。应当理解,X是数字的“约X”或“大约X”的公开也是“X”的公开。因此,例如,一个序列与另一序列具有“约X%序列同一性”的实施例的公开也是该序列与另一序列具有“X%序列同一性”的实施例的公开。

[0036] 活化(activate,activation):与本公开的IFN前蛋白连用的术语“活化”等是指蛋白酶可切割接头的蛋白酶介导的酶促切割,该酶促切割导致IFN部分从空间阻断恒定结构域中释放。

[0037] 和、或:除非另有说明,否则“或”连词应以其正确的含义用作布尔逻辑运算符(Boolean logical operator),涵盖替代方案中的特征选择(A或B,其中A的选择与B是互斥的)和联合特征的选择(A或B,其中A和B均被选择)。在本文本中的一些地方,术语“和/或”用于相同目的,这不应被解释为暗示“或”用于指互斥的替代物。

[0038] 抗体:如本文所用,术语“抗体”是指能够非共价地、可逆地并且特异性地结合抗原的免疫球蛋白家族的多肽(或多肽组)。例如,天然存在的IgG类型的“抗体”是包含通过二硫键互连的至少两个重(H)链和两个轻(L)链的四聚体。每个重链包含重链可变区(本文缩写为VH)和重链恒定区。重链恒定区包含三个结构域:CH1、CH2和CH3。每个轻链包含轻链可变区(本文缩写为VL)和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个结构域(本文缩写为CL)。VH区和VL区可以进一步细分为被称作互补决定区(CDR)的超变区,该超变区散布有更保守的被称作框架区(FR)的区。每个VH和VL由三个CDR和四个FR构成,从氨基末端至羧基末端按以下次序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,包含免疫系统的各种细胞(例如,效应子细胞)以及经典补体系统的第一组分(C1q)。术语“抗体”包括但不限于单克隆抗体、人抗体、人源化抗体、骆驼化抗体、嵌合抗体、双特异性或多特异性抗体和抗独特型(抗id)抗体。抗体可以是任何同种型/类(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)或亚类(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)。轻链和重链两者分为结构和功能同源区。术语“恒定”和“可变”是在功能上使用的。在这方面,应当理解,轻链(VL)和重链(VH)部分两者的可变结构域决定抗原识别和特异性。相反,轻链(CL)和重链(CH1、CH2或CH3)的恒定结构域赋予重要的生物学特性,诸如分泌、经胎盘迁移性、Fc受体结合、补体结合等。按照惯例,恒定区结构域的编号随着它们变得更远离抗体的抗原结合结构域或氨基末端而增加。N-末端是可变区,并且在C-末端处是恒定区;CH3和CL结构域分别代表天然抗体的重链和轻链的羧基末端。为了方便起见,并且除非上下文另有规定,对抗体的提及也是指抗体片段以及包括

非天然存在的抗原结合结构域和/或具有非天然结构的抗原结合结构域的经工程化抗体。

[0039] 抗原结合结构域:如本文所使用的术语“抗原结合结构域”或“ABD”是指具有非共价地、可逆地和特异性地结合至抗原的能力的抗体或抗体片段(例如,靶向部分)的部分。可包含ABD的抗体片段的实例包括但不限于单链Fv(scFv)、Fab片段,由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;F(ab)2片段,其是包含在铰链区处通过二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段;Fd片段,其由VH和CH1结构域组成;Fv片段,其由抗体的单臂的VL和VH结构域组成;dAb片段(Ward等人,1989,Nature 341:544-546),其由VH结构域组成;以及分离的互补决定区(CDR)。因此,术语“抗体片段”涵盖抗体的蛋白水解片段(例如,Fab和$F(ab)_2$片段)和包含抗体的一个或多个部分的经工程化蛋白质(例如,scFv)。抗体片段还可并入单结构域抗体、巨型抗体、微型抗体、胞内抗体、双体抗体、三体抗体、四体抗体、v-NAR和双-scFv(参见,例如,Hollinger和Hudson,2005,Nature Biotechnology 23:1126-1136)。

[0040] 缔合:在IFN前蛋白的上下文中,术语“缔合”是指两个或更多个多肽链之间的功能关系。具体地,术语“缔合”意指两种或更多种多肽彼此缔合(例如,通过分子相互作用非共价地或通过一个或多个二硫桥或化学交联共价地),从而产生功能性IFN前蛋白。可能存在于本公开的IFN前蛋白中的缔合的实例包括(但不限于)待形成Fc区的Fc结构域之间的缔合(如描述于第6.8节中的同二聚体型或异二聚体型)、Fab或Fv中的VH区与VL区之间的缔合以及Fab中的CH1与CL之间的缔合。

[0041] 癌症:术语“癌症”是指以异常细胞不受控制(且通常快速)生长为特征的疾病。癌细胞可以局部扩散或通过血流和淋巴系统扩散至身体的其他部位。本文描述了各种癌症的实例,并且这些实例包括但不限于乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、胰腺癌、结直肠癌、肾癌、肝癌、脑癌、肾上腺癌、神经节癌、胆道癌、骨癌、子宫内膜癌、眼癌、输卵管癌、生殖道癌、大肠癌、脑膜癌、食管癌、腹膜癌、垂体癌、阴茎癌、胎盘癌、胸膜癌、唾液腺癌、小肠癌、胃癌、睾丸癌、胸腺癌、甲状腺癌、上呼吸道消化系统癌症、尿路癌、阴道癌、外阴癌、淋巴瘤、白血病、肺癌等,例如,前述类型中的任何类型的任何TAA阳性癌症。

[0042] 互补决定区:如本文所用,术语“互补决定区”或“CDR”是指抗体可变区内赋予抗原特异性和结合亲和力的氨基酸的序列。例如,通常,每个重链可变区中存在三个CDR(例如,CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3),并且每个轻链可变区中存在三个CDR(CDR-L1、CDR-L2、和CDR-L3)。给定CDR的精确氨基酸序列边界可使用许多众所周知的方案中的任一个来确定,包括由Kabat等人,1991,“Sequences of Proteins of Immunological Interest,”第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(“Kabat”编号方案)、Al-Lazikani等人,1997,JMB 273:927-948(“Chothia”编号方案)和ImMunoGenTics(IMGT)编号(Lefranc,1999,The Immunologist7:132-136;Lefranc等人,2003,Dev.Comp.Immunol.27:55-77(“IMGT”编号方案)描述的那些方案。例如,对于经典形式,在Kabat下,重链可变结构域(VH)中的CDR氨基酸残基编号为31-35(CDR-H1)、50-65(CDR-H2)和95-102(CDR-H3);并且轻链可变结构域(VL)中的CDR氨基酸残基编号为24-34(CDR-L1)、50-56(CDR-L2)和89-97(CDR-L3)。在Chothia下,VH中的CDR氨基酸编号为26-32(CDR-H1)、52-56(CDR-H2)和95-102(CDR-H3);并且VL中的氨基酸残基编号为26-32(CDR-L1)、50-52(CDR-L2)和91-96(CDR-L3)。通过结合Kabat和Chothia两者的CDR定义,CDR由人类VH中的氨基酸残基26-35(CDR-H1)、50-65(CDR-H2)和95-102(CDR-H3)和人类VL中的氨基酸残基24-

34(CDR-L1)、50-56(CDR-L2)和89-97(CDR-L3)组成。在IMGT下,VH中的CDR氨基酸残基编号为大约26-35(CDR-H1)、51-57(CDR-H2)和93-102(CDR-H3),并且VL中的CDR氨基酸残基编号为大约27-32(CDR-L1)、50-52(CDR-L2)和89-97(CDR-L3)(根据"Kabat"编号)。在IMGT下,抗体的CDR区可以使用程序IMGT/DomainGap Align来确定。

[0043] 恒定结构域:术语"恒定结构域"是指免疫球蛋白的CH1、CH2、CH3或CL结构域。

[0044] 术语"CH1结构域"是指将可变结构域连接至重链恒定结构域中的铰链的重链恒定区。在一些实施例中,术语"CH1结构域"是指跨越氨基酸118至215(EU编号)的免疫球蛋白分子的区。术语"CH1结构域"涵盖野生型CH1结构域以及其变体(例如,非天然存在的CH1结构域或经修饰的CH1结构域)。例如,术语"CH1结构域"包括野生型IgG1、IgG2、IgG3和IgG4 CH1结构域及其具有1个、2个、3个、4个、5个、1至3个、1至5个、3至5个和/或最多5个、4个、3个、2个或1个突变(例如,取代、缺失和/或添加)的变体。示例性CH1结构域包括具有改变抗体的生物活性(诸如ADCC、CDC或半衰期)的突变的CH1结构域。

[0045] 术语"CH2结构域"是指在重链恒定结构域中将铰链连接至CH3结构域的重链恒定区。在一些实施例中,术语"CH2结构域"是指跨越氨基酸238至340(EU编号)的免疫球蛋白分子的区。术语"CH2结构域"涵盖野生型CH2结构域以及其变体(例如,非天然存在的CH2结构域或经修饰的CH2结构域)。例如,术语"CH2结构域"包括野生型IgG1、IgG2、IgG3和IgG4 CH2结构域及其具有1个、2个、3个、4个、5个、1至3个、1至5个、3至5个和/或最多5个、4个、3个、2个或1个突变(例如,取代、缺失和/或添加)的变体。示例性CH2结构域包括具有改变抗体的生物活性(诸如ADCC、CDC、纯化、二聚化和半衰期)的突变的CH2结构域。

[0046] 术语"CH3结构域"是指在重链恒定结构域中位于CH2结构域的C-末端的重链恒定区。在一些实施例中,术语"CH3结构域"是指跨越氨基酸341至447(EU编号)的免疫球蛋白分子的区。术语"CH3结构域"涵盖野生型CH3结构域以及其变体(例如,非天然存在的CH3结构域或经修饰的CH3结构域)。例如,术语"CH3结构域"包括野生型IgG1、IgG2、IgG3和IgG4 CH3结构域及其具有1个、2个、3个、4个、5个、1至3个、1至5个、3至5个和/或最多5个、4个、3个、2个或1个突变(例如,取代、缺失和/或添加)的变体。示例性CH3结构域包括具有改变抗体的生物活性(诸如ADCC、CDC、纯化、二聚化和半衰期)的突变的CH3结构域。

[0047] 术语"CL结构域"是指免疫球蛋白轻链的恒定区。术语"CL结构域"涵盖野生型CL结构域(例如,κ或λ轻链恒定区)以及其变体(例如,非天然存在的CL结构域或经修饰的CL结构域)。例如,术语"CL结构域"包括野生型κ和λ恒定结构域及其具有1个、2个、3个、4个、5个、1至3个、1至5个、3至5个和/或最多5个、4个、3个、2个或1个突变(例如,取代、缺失和/或添加)的变体。

[0048] 效应子功能:术语"效应子功能"是指抗体分子由抗体的除抗原结合结构域之外的结构域的结合所介导(通常由效应子分子的结合所介导)的活性。效应子功能包括补体介导的效应子功能,该效应子功能是通过例如将补体的C1组分结合至抗体介导的。补体的活化在细胞病原体的调理和裂解中很重要。补体的活化也会刺激炎症反应并且还可能参与自身免疫性超敏反应。效应子功能还包括Fc受体(FcR)介导的效应子功能,该效应子功能可以在将抗体的恒定结构域结合至Fc受体(FcR)时被触发。将抗体结合至细胞表面上的Fc受体会引发许多重要并且多样化的生物反应,这些生物反应包括吞噬和破坏抗体包被的颗粒、清除免疫复合物、由杀伤细胞(称为抗体依赖性细胞介导的细胞毒性或ADCC)裂解抗体包被的

靶细胞、释放炎症介质、控制胎盘转移和免疫球蛋白产生。抗体的效应子功能可以通过改变(例如,增强或降低)抗体对诸如Fc受体或补体组分等效应子分子的亲和力来改变。通常通过修饰效应子分子结合位点来改变结合亲和力,并且在这种情况中,定位所关注的位点并且以合适的方式修饰该位点的至少一部分是合适的。还设想,针对效应子分子的抗体上的结合位点中的改变不需要显著改变总体结合亲和力,但可能改变相互作用的几何形状,使得效应子机制如在非生产性结合中那样无效。进一步设想,效应子功能还可以通过修饰不直接参与效应子分子结合、但以其他方式参与效应子功能的执行的位点来改变。

[0049] 表位:表位或抗原决定子为由如本文所述的抗体或其他抗原结合部分识别的抗原的一部分。表位可以是线性的或构象的。

[0050] Fab:术语"Fab"是指一对多肽链,第一条多肽链包含抗体的可变重链(VH)结构域,其可操作地连接(通常在N-末端)至第一恒定结构域(在本文中称为C1),并且第二条多肽链包含抗体N-末端的可变轻链(VL)结构域,其可操作地连接(通常在N-末端)至能够与第一恒定结构域配对的第二恒定结构域(在本文中称为C2)。在天然抗体中,VH位于重链的第一恒定结构域(CH1)的N-末端,并且VL位于轻链(CL)的恒定结构域的N-末端。本公开的Fab可以根据天然取向进行排列或包括促进正确的VH和VL配对的结构域取代或交换。例如,可以用CH3结构域对替代Fab中的CH1和CL结构域对以促进异二聚体型分子中正确的经修饰Fab链配对。还可以颠倒CH1和CL,使得CH1附接至VL并且CL附接至VH,这种构型通常被称为Crossmab。术语"Fab"涵盖单链Fab。

[0051] Fc结构域和Fc区:术语"Fc结构域"是指重链的一部分,其与另一重链的对应部分配对。在一些实施例中,Fc结构域包含后跟CH3结构域的CH2结构域,其在CH2结构域N-末端具有或不具有铰链区。术语"Fc区"是指由两个重链Fc结构域缔合形成的区域。Fc区内的两个Fc结构域可以彼此相同或不同。在天然抗体中,Fc结构域通常是相同的,但一个或两个Fc结构域可能被修饰以允许异二聚化,例如,经由杵臼相互作用。

[0052] Fv:术语"Fv"是指可衍生自含有完整靶标识别和结合位点的免疫球蛋白的最小抗体片段。该区由一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域呈紧密非共价缔合的二聚体(VH-VL二聚体)组成。正是在这种构型中,每个可变结构域的三个CDR相互作用以限定VH-VL二聚体的表面上的靶结合位点。通常,六个CDR赋予抗体的靶结合特异性。然而,在一些情况下,甚至单个可变结构域(或仅包含靶特异性的三个CDR的Fv的一半)也可以具有识别和结合靶的能力。本文提及VH-VL二聚体并不意指表达任何特定的配置。当存在于单个多肽链(例如,scFv)上时,VH位于VL的N-末端或C-末端。

[0053] 半抗体:术语"半抗体"是指包含至少一个Fc结构域并且可以通过例如二硫桥或分子相互作用与包含Fc的另一分子缔合的分子。半抗体可以由一个多肽链或多于一个多肽链(例如,Fab的两个多肽链)组成。半抗体的实例是包含抗体(例如,IgG抗体)的重链和轻链的分子。半抗体的另一个实例是包含包含VL结构域和CL结构域的第一多肽和包含VH结构域、CH1结构域、铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域的第二多肽的分子,其中所述VL和VH结构域形成ABD。半抗体的又一实例是包含scFv结构域、CH2结构域和CH3结构域的多肽。

[0054] 本公开的IFN前蛋白通常包含两个半抗体,每个半抗体包含由蛋白酶可切割接头侧接的IFN部分,其Fc结构域位于C-末端蛋白酶可切割接头的C-末端,并且恒定结构域位于N-末端蛋白酶可切割接头的N-末端。IFN前蛋白中的一个或两个半抗体可进一步包含靶向

部分。

[0055] 术语“半抗体”仅用于描述目的,并不意味着特定的配置或生产的方法。将半抗体描述为“第一”半抗体、“第二”半抗体、“左”半抗体、“右”半抗体等仅仅是为了方便和描述的目的。

[0056] 宿主细胞或重组宿主细胞:术语“宿主细胞”或“重组宿主细胞”是指例如,通过引入异源核酸来遗传工程化的细胞。应当理解,此类术语不仅意指特定的受试者细胞,而且意指此类细胞的子代。因为由于突变或环境影响,某些修饰可能在后代中发生,这种子代实际上可能与亲代细胞不同,但仍包含在本文所用术语“宿主细胞”的范围内。宿主细胞可以例如在染色体外异源表达载体上瞬时携带异源核酸,或者例如通过将异源核酸整合到宿主细胞基因组中而稳定地携带异源核酸。为了表达本公开的IFN前蛋白的目的,宿主细胞优选地是哺乳动物来源或哺乳动物样特征的细胞系,诸如猴肾细胞(COS,例如,COS-1、COS-7)、HEK293)、幼仓鼠肾(BHK,例如,BHK21)、中国仓鼠卵巢(CHO)、NSO、PerC6、BSC-1、人肝细胞癌细胞(例如,Hep G2)、SP2/0、HeLa、Madin-Darby牛肾(MDBK)、骨髓瘤和淋巴瘤细胞或其衍生物和/或经工程化的变体。工程化变体包括例如以比原始细胞系高的密度生长的衍生物和/或聚糖谱修饰的衍生物和/或位点特异性整合位点衍生物。

[0057] 干扰素:本文所使用的术语“干扰素”是指全长干扰素或经修饰的干扰素,例如截短型和/或突变型干扰素。在一些实施例中,与对应的野生型干扰素相比,经修饰的干扰素被弱化(例如,如第8.2.4节所述,在体外荧光素酶报告基因测定中保留小于50%、小于40%、小于30%、小于20%或小于10%、小于1%、小于0.1%或小于0.05%的活性)。在一些实施例中,经修饰的干扰素弱化了由前述值中的任何两个值限定的范围,例如,0.05%至50%、0.1%至20%、0.1%至10%、0.05%至5%、1%至20%等等。在其他实施例中,经修饰的干扰素基本上保留了对应的野生型干扰素的生物活性(例如,如在第8.2.4节中描述的,在体外萤光素酶报告基因测定中保留至少50%的活性)。干扰素包括I型干扰素(例如,干扰素-α和干扰素-β)以及II型干扰素(例如,干扰素-γ)。

[0058] 接头:如本文所用,术语“接头”是指蛋白酶可切割接头或不可切割接头。

[0059] 不可切割接头:如本文所使用的不可切割接头是指其氨基酸序列缺乏蛋白酶(例如,如描述于第6.4.1节中的蛋白酶,其识别并切割特定序列基序,例如,如描述于第6.4.2节中的底物)的底物序列的肽。

[0060] 可操作地连接:术语“可操作地连接”是指两个或更多个肽或多肽结构域或核酸(例如DNA)区段之间的功能关系。在融合蛋白或其他多肽的上下文中,术语“可操作地连接”是指两个或更多个氨基酸片段被连接以产生功能性多肽。例如,在本公开的IFN前蛋白的上下文中,单独的组分(例如,Fc结构域和IFN部分)可以直接或通过肽接头序列可操作地连接。在编码融合蛋白(诸如本公开的IFN前蛋白的半抗体)的核酸的上下文中,“可操作地连接”意指两个核酸被连接使得由两个核酸编码的氨基酸序列保持在框内。在转录调控的上下文中,该术语是指转录调控序列与转录序列的功能关系。例如,如果启动子或增强子序列刺激或调节编码序列在适当的宿主细胞或其他表达系统中的转录,则该启动子或增强子序列与编码序列可操作地连接。

[0061] 多肽、肽和蛋白质:术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中互换使用,是指氨基酸残基的聚合物。

[0062] 前蛋白:“前蛋白”是一种无活性的蛋白前体,并且其可通过蛋白酶的蛋白水解作用来活化。因此,前蛋白质是“蛋白酶可活化的”。

[0063] 蛋白酶:如本文所使用的术语“蛋白酶”是指催化肽键水解的任何酶。一般而言,可用于本公开的蛋白酶,例如,第6.4.1节中所述的蛋白酶,识别并切割特定序列基序,例如,如第6.4.2节中所述的底物。优选地,与正常组织相比,蛋白酶在癌组织中以更高水平表达。

[0064] 蛋白酶可切割接头:如本文所使用,术语“蛋白酶可切割接头”或“PCL”是指其氨基酸序列含有一个或多个蛋白酶的一个或多个(例如,两个、三个或更多个)底物序列的肽。示例性蛋白酶可切割接头描述于第6.4节中,并且示例性蛋白酶可切割接头序列公开于第6.4.4节中。

[0065] 识别:如本文所使用的术语“识别”是指发现其表位并且与该表位相互作用(例如,结合)的抗体或抗体片段(例如,靶向部分)。

[0066] 单链Fab或scFab:如本文所用,术语“单链Fab”或“scFab”是指包含VH结构域、CH1结构域、VL结构域、CL结构域和接头的ABD。在一些实施例中,前述结构域和接头在N-末端到C-末端取向上按以下顺序之一进行排列:(a)VH-CH1-接头-VL-CL、(b)VL-CL-接头-VH-CH1、(c)VH-CL-接头-VL-CH1或(d)VL-CH1-接头-VH-CL。接头适宜为至少30个氨基酸、优选介于32个和50个之间的氨基酸的不可切割接头。单链Fab片段通常经由CL结构域与CH1结构域之间的天然二硫键稳定。此外,这些单链Fab分子可以通过经由插入半胱氨酸残基(例如,根据Kabat编号在VH结构域中的位置44和VL结构域中的位置100处)生成链间二硫键来进一步稳定。

[0067] 单链Fv或scFv:如本文所使用的术语“单链Fv”或“scFv”是指包含抗体的VH和VL结构域的ABD,其中这些结构域存在于单个多肽链中。优选地,Fv多肽进一步包括VH与VL结构域之间的多肽接头,其使得scFv能够形成用于抗原结合的所需结构。关于scFv的综述,参见Pluckthun在The Pharmacology of Monoclonal Antibodies中,第113卷,Rosenburg和Moore编(1994),Springer-Verlag,New York,第269-315页。VH和VL可以按N-末端至C-末端(即,VH-VL或VL-VH)的顺序进行排列,通常由接头隔开,例如,如在表E中列出的接头。

[0068] 间隔子:如本文所用,术语“间隔子”是指并入含有底物的接头中的肽,该肽的氨基酸序列不是蛋白酶的底物。间隔子可用于将底物与分子中的其他结构域(例如ABD)分离。在一些方面中,间隔子中的残基最小化氨肽酶和/或外肽酶作用以防止N-末端氨基酸的裂解。

[0069] 特异性(或选择性)结合:术语“特异性(或选择性)结合”至抗原或表位是指确定蛋白质和其他分子的异质群体中同源抗原或表位的存在的结合反应。结合反应可以但不必由抗体或抗体片段介导。术语“特异性结合”不排除跨物种反应性。例如,“特异性结合”至来自一种物种的抗原的抗原结合结构域(例如,抗体的抗原结合片段)也可以“特异性结合”至一种或多种其他物种中的该抗原。因此,这种跨物种反应性本身并不改变抗原结合结构域作为“特异性”结合物的分类。在某些实施例中,本公开的特异性结合人类抗原的抗原结合结构域与一种或多种非人类哺乳动物物种(例如,灵长类物种(包括但不限于食蟹猴、猕猴和豚尾猴中的一种或多种))或啮齿类动物(例如,小家鼠)具有跨物种反应性。

[0070] 受试者:术语“受试者”包括人和非人动物。非人类动物包括所有脊椎动物,例如,哺乳动物和非哺乳动物,诸如非人类灵长类动物、绵羊、狗、牛、鸡、两栖动物和爬行动物。在优选的实施例中,受试者是人。

[0071] 底物:术语“底物”是指蛋白酶将作用于其上并且蛋白酶将在其中切割肽键的肽序列。

[0072] 靶分子:如本文所使用的术语“靶分子”是指在细胞表面上或在可以由本公开的IFN前蛋白中的靶向部分特异性结合的细胞外基质中表达的任何生物分子(例如,蛋白、碳水化合物、脂质或它们的组合)。

[0073] 靶向部分:如本文所使用的术语“靶向部分”是指可以在本公开的IFN前蛋白待被定位至的位点(例如,在肿瘤细胞上或肿瘤微环境中的淋巴细胞上)处结合至细胞表面或细胞外基质分子的任何分子或结合部分(例如,免疫球蛋白或抗原结合片段)。在一些实施例中,靶向部分结合至TAA。在其他实施例中,靶向部分结合至TCA。除了将IFN前蛋白定位于特定位点之外,靶向部分还可以具有功能活性。例如,结合至检查点抑制剂诸如PD1的靶向部分也可以表现出抗肿瘤活性或例如通过抑制PD1信号传导来增强IFN的抗肿瘤活性。

[0074] T细胞抗原,TCA:术语“T细胞抗原”或“TCA”是指在T淋巴细胞表面上表达的分子(通常是蛋白质、碳水化合物、脂质或它们的某种组合),并且可用于将药剂优先靶向特定位点。在一些实施例中,该位点是癌组织和/或T细胞抗原是肿瘤反应性淋巴细胞抗原、肿瘤或病毒淋巴细胞的细胞表面分子或在T淋巴细胞上表达的检查点抑制剂。

[0075] 肿瘤:术语“肿瘤”在本文中与术语“癌症”互换使用,例如,这两个术语都涵盖固体和液体,例如,弥漫性或循环性肿瘤。如本文所用,术语“癌症”或“肿瘤”包括癌前以及恶性癌症和肿瘤。

[0076] 肿瘤相关抗原,TAA:术语“肿瘤相关抗原”或“TAA”是指完全或作为片段(例如,MHC/肽)在癌细胞表面上表达的分子(通常是蛋白、碳水化合物、脂质或它们的某种组合),并且其可用于将药剂优先靶向癌细胞。在一些实施例中,TAA是由正常细胞和癌细胞(例如,谱系标记物)表达的标记物。在一些实施例中,TAA是与正常细胞相比在癌细胞中过表达的细胞表面分子,例如与正常细胞相比1倍过表达、2倍过表达、3倍过表达或更多。在一些实施例中,TAA是在癌细胞中不适当合成的细胞表面分子,例如与正常细胞上表达的分子相比含有缺失、添加或突变的分子。在一些实施例中,TAA将完全或作为片段(例如,MHC/肽)专门在癌细胞的细胞表面上表达,并且不在正常细胞的表面上合成或表达。因此,术语“TAA”涵盖癌细胞特异性的抗原,有时在本领域中称为肿瘤特异性抗原(“TSA”)。

[0077] 治疗(treat/treatment/treating):如本文所使用,术语“治疗(treat、treatment和treating)”是指增殖性病症的进展、严重程度和/或持续时间的减少或改善,或由施用本公开的一种或多种IFN受体激动剂(例如,能够例如在活化后使IFN受体激动的IFN前蛋白)引起的增殖性病症的一种或多种症状(优选地,一种或多种可辨别的症状)的改善。在一些实施例中,病症是增殖性病症,并且术语“治疗(treat、treatment和treating)”是指不一定可由患者辨别的增殖性疾病(诸如肿瘤的生长)的至少一种可测量的物理参数的改善。在其他实施例中,术语“治疗(treat、treatment和treating)”是指在物理上通过例如稳定可辨别的症状、在生理上通过例如稳定物理参数或两者兼而有之来抑制增殖性疾病的进展。在其他实施例中,术语“治疗(treat、treatment和treating)”是指肿瘤大小或癌细胞计数的减小或稳定。

[0078] 通用轻链,UCL:如本文所用,术语“通用轻链”或“ULC”是指可与多于一个重链可变区(VL)配对的轻链可变区(VL)。在靶向部分的上下文中,术语“通用轻链”或“ULC”是指能够

与靶向部分的重链区域配对并且还能够与其他重链区域配对的轻链多肽。ULC还可以包括恒定结构域,例如抗体的CL结构域。通用轻链也称为“普通轻链”。

[0079] VH:术语“VH”是指抗体的免疫球蛋白重链(包括Fv、scFv、dsFv或Fab的重链)的可变区。

[0080] VL:术语“VL”是指免疫球蛋白轻链(包括Fv、scFv、dsFv或Fab的轻链)的可变区。

[0081] 6.2.IFN前蛋白

[0082] 本公开涉及IFN前蛋白,其包含通过来自侧接恒定结构域的空间位阻弱化的IFN部分。IFN前蛋白被构造成使得在遇到蛋白酶,例如在肿瘤环境中过表达的蛋白酶时,蛋白酶可切割接头被切割,并且释放IFN。这是通过在抗体的恒定/Fc结构域之间掺入IFN部分来实现的,该IFN部分由蛋白酶可切割接头(PCL)侧接。因此,这些前蛋白有时被称为“内部”IFN构建体。能够例如在活化后使IFN受体激动的IFN前蛋白在本文中有时被称为“IFN受体激动剂”。

[0083] 通常,IFN前蛋白由两个半抗体组成,这些IFN前蛋白包含一对缔合形成Fc区(通常包含铰链序列)的Fc结构域,位于其N-末端的是可能可切割或不可切割的接头、IFN部分和可能可切割或不可切割的另外的接头。在一些实施例中,每个半抗体包含位于IFN部分侧翼的两个蛋白酶可切割接头。在每个半抗体中具有两个蛋白酶可切割接头的示例性IFN前蛋白绘示于图1A至1C中。在其他实施例中,每个半抗体在IFN部分的一侧包含单个蛋白酶可切割接头,而在IFN部分的另一侧的接头是不可切割接头。在每个半抗体中具有一个蛋白酶可切割接头的示例性IFN前蛋白绘示于图2A至2F中。蛋白酶可切割接头的N-末端进一步是抗体恒定结构域,或者是包含Fc结构域的整个恒定结构域,其缔合形成另一个Fc区,或者仅仅是恒定结构域的一部分(例如,CH1结构域)。

[0084] 本公开的IFN前蛋白的示例性构型描绘于图1A至1C和图2A至2F中。如图所示,IFN部分和周围的接头可仅在其C-末端(“单铰链”,例如,如图1A、图1B、2A、2B、2D和2E中所示)或在其N-末端和C-末端两者处包含铰链结构域(“双铰链”,例如,如图1C、2C和2F中所示)。

[0085] 通常,IFN前蛋白包含:

[0086] a)第一多肽链,其包含:

[0087] i)第一免疫球蛋白恒定结构域;

[0088] ii)第一接头;

[0089] iii)第一I型干扰素(IFN)部分;

[0090] iv)第二接头和

[0091] v)第一Fc结构域;以及

[0092] b)第二多肽链,其包含:

[0093] i)第二免疫球蛋白恒定结构域;

[0094] ii)第三接头;

[0095] iii)第二I型干扰素(IFN)部分;

[0096] iv)第四接头;以及

[0097] v)第二Fc结构域,其与该第一Fc结构域缔合以形成Fc区;

[0098] 在一些实施例中,第一接头、第二接头、第三接头和第四接头都是蛋白酶可切割接头。在其他实施例中,第一接头、第二接头、第三接头和第四接头中仅两者是蛋白酶可切割

接头。例如,在某些实施例中,第一接头和第三接头是蛋白酶可切割接头,并且第二接头和四个接头是不可切割接头。在其他实施例中,第一接头和第三接头是不可切割接头,并且第二接头和四个接头是蛋白酶可切割接头。

[0099] 优选地,IFN前蛋白中的IFN部分受到Fc结构域和/或恒定结构域的空间位阻而不能结合至IFN受体。

[0100] 示例性IFN前蛋白描绘于图1A中,其中靶向部分(描绘为由与VL-CL配对的VH-CH1表示的Fab结构域)是任选的。图1A的IFN前蛋白包含第一多肽链、第二多肽链、任选的第三多肽链和任选的第四多肽链,其中:

[0101] a)该第一多肽链包含:

[0102] i)任选的第一VH1域;

[0103] ii)第一CH1结构域;

[0104] iii)第一Fc结构域,其包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域,其中该CH3结构域是该第一免疫球蛋白恒定结构域;

[0105] iv)第一蛋白酶可切割接头(PCL);

[0106] v)第一I型干扰素(IFN)部分;

[0107] vi)第二蛋白酶可切割接头(PCL);以及

[0108] vii)第二Fc结构域;

[0109] b)该第二多肽链包含:

[0110] i)任选的第二VH1域;

[0111] ii)第二CH1结构域;

[0112] iii)第三Fc结构域,其包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域,其中该CH3结构域是该第二免疫球蛋白恒定结构域;

[0113] iv)第三蛋白酶可切割接头(PCL);

[0114] v)第二I型干扰素(IFN)部分;

[0115] vi)第四蛋白酶可切割接头(PCL);以及

[0116] vii)第四Fc结构域;

[0117] c)该任选的第三多肽链包含:

[0118] i)第一VL结构域;

[0119] ii)第一CL结构域;并且

[0120] d)该第四多肽链包含:

[0121] i)第二VL结构域;以及

[0122] ii)第二CL结构域;

[0123] 其中该第一多肽链与该第二多肽链缔合,使得该第一Fc结构域和该第三Fc结构域缔合形成Fc区,并且该第二Fc结构域和该第四Fc结构域形成另一个Fc区。

[0124] 当存在时,第三多肽链与第一多肽链缔合,使得第一VH、CH1、VL和CL形成第一靶向部分,并且第四多肽链与第二多肽链多肽缔合,使得第二VH、CH1、VL和CL形成第二靶向部分。替代性地,第一多肽链和第二多肽链可在其N-末端包含scFv。

[0125] 因此,第一多肽链(连同第三多肽链,如果存在)代表第一半抗体,并且第二多肽链(连同第四多肽链,如果存在)代表第二半抗体。

[0126] 另一个示例性IFN前蛋白描绘于图1B中,其中该靶向部分(描绘为由与VL-CL配对的VH-CH1表示的Fab结构域)是任选的。图1B的IFN前蛋白包含第一多肽链、第二多肽链、任选的第三多肽链和任选的第四多肽链,其中:

[0127] a)该第一多肽链包含:

[0128] i)任选的第一VH1域;

[0129] ii)第一CH1结构域;

[0130] iii)第一蛋白酶可切割接头(PCL);

[0131] iv)第一I型干扰素(IFN)部分;

[0132] v)第二蛋白酶可切割接头(PCL);以及

[0133] vi)第一Fc结构域;

[0134] b)该第二多肽链包含:

[0135] i)任选的第二VH1域;

[0136] ii)第二CH1结构域;

[0137] iii)第三蛋白酶可切割接头(PCL);

[0138] iv)第二I型干扰素(IFN)部分;

[0139] v)第四蛋白酶可切割接头(PCL);以及

[0140] vi)第二Fc结构域;

[0141] c)该任选的第三多肽链包含:

[0142] i)第一VL结构域;

[0143] ii)第一CL结构域;并且

[0144] d)该第四多肽链包含:

[0145] i)第二VL结构域;以及

[0146] ii)第二CL结构域;

[0147] 其中该第一多肽链与该第二多肽链缔合,使得该第一Fc结构域和该第二Fc结构域形成Fc区。

[0148] 当存在时,第三多肽链与第一多肽链缔合,使得第一VH、CH1、VL和CL形成第一靶向部分,并且第四多肽链与第二多肽链多肽缔合,使得第二VH、CH1、VL和CL形成第二靶向部分。替代性地,第一多肽链和第二多肽链可在其N-末端包含scFv。

[0149] 因此,第一多肽链(连同第三多肽链,如果存在)代表第一半抗体,并且第二多肽链(连同第四多肽链,如果存在)代表第二半抗体。

[0150] 图1B的IFN前蛋白的变体描绘于图1C中。图1C的IFN前蛋白进一步包含第一CH1结构域和第一蛋白酶可切割接头之间的第一铰链结构域以及第二CH1结构域和第三蛋白酶可切割接头之间的第二铰链结构域。

[0151] 另一个示例性IFN前蛋白描绘于图2A中,其中该靶向部分(描绘为由与VL-CL配对的VH-CH1表示的Fab结构域)是任选的。图2A的IFN前蛋白包含第一多肽链、第二多肽链、任选的第三多肽链和任选的第四多肽链,其中:

[0152] a)该第一多肽链包含:

[0153] i)任选的第一VH1域;

[0154] ii)第一CH1结构域;

[0155] iii)第一Fc结构域,其包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域,其中该CH3结构域是该第一免疫球蛋白恒定结构域;

[0156] iv)第一不可切割接头(NCL);

[0157] v)第一I型干扰素(IFN)部分;

[0158] vi)第一蛋白酶可切割接头(PCL);以及

[0159] vii)第二Fc结构域;

[0160] b)该第二多肽链包含:

[0161] i)任选的第二VH1域;

[0162] ii)第二CH1结构域;

[0163] iii)第三Fc结构域,其包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域,其中该CH3结构域是该第二免疫球蛋白恒定结构域;

[0164] iv)第二不可切割接头(NCL);

[0165] v)第二I型干扰素(IFN)部分;

[0166] vi)第二蛋白酶可切割接头(PCL);以及

[0167] vii)第四Fc结构域;

[0168] c)该任选的第三多肽链包含:

[0169] i)第一VL结构域;

[0170] ii)第一CL结构域;并且

[0171] d)该第四多肽链包含:

[0172] i)第二VL结构域;以及

[0173] ii)第二CL结构域;

[0174] 其中该第一多肽链与该第二多肽链缔合,使得该第一Fc结构域和该第三Fc结构域缔合形成Fc区,并且该第二Fc结构域和该第四Fc结构域形成另一个Fc区。

[0175] 当存在时,第三多肽链与第一多肽链缔合,使得第一VH、CH1、VL和CL形成第一靶向部分,并且第四多肽链与第二多肽链多肽缔合,使得第二VH、CH1、VL和CL形成第二靶向部分。替代性地,第一多肽链和第二多肽链可在其N-末端包含scFv。

[0176] 因此,第一多肽链(连同第三多肽链,如果存在)代表第一半抗体,并且第二多肽链(连同第四多肽链,如果存在)代表第二半抗体。

[0177] 另一个示例性IFN前蛋白描绘于图2B中,其中该靶向部分(描绘为由与VL-CL配对的VH-CH1表示的Fab结构域)是任选的。图2B的IFN前蛋白包含第一多肽链、第二多肽链、任选的第三多肽链和任选的第四多肽链,其中:

[0178] a)该第一多肽链包含:

[0179] i)任选的第一VH1域;

[0180] ii)第一CH1结构域;

[0181] iii)第一不可切割接头(NCL);

[0182] iv)第一I型干扰素(IFN)部分;

[0183] v)第一蛋白酶可切割接头(PCL);以及

[0184] vi)第一Fc结构域;

[0185] b)该第二多肽链包含:

[0186] i)任选的第二VH1域;

[0187] ii)第二CH1结构域;

[0188] iii)第二不可切割接头(NCL);

[0189] iv)第二I型干扰素(IFN)部分;

[0190] v)第二蛋白酶可切割接头(PCL);以及

[0191] vi)第二Fc结构域;

[0192] c)该任选的第三多肽链包含:

[0193] i)第一VL结构域;

[0194] ii)第一CL结构域;并且

[0195] d)该第四多肽链包含:

[0196] i)第二VL结构域;以及

[0197] ii)第二CL结构域;

[0198] 其中该第一多肽链与该第二多肽链缔合,使得该第一Fc结构域和该第二Fc结构域形成Fc区。

[0199] 当存在时,第三多肽链与第一多肽链缔合,使得第一VH、CH1、VL和CL形成第一靶向部分,并且第四多肽链与第二多肽链多肽缔合,使得第二VH、CH1、VL和CL形成第二靶向部分。替代性地,第一多肽链和第二多肽链可在其N-末端包含scFv。

[0200] 因此,第一多肽链(连同第三多肽链,如果存在)代表第一半抗体,并且第二多肽链(连同第四多肽链,如果存在)代表第二半抗体。

[0201] 图2B的IFN前蛋白的变体描绘于图2C中。图2C的IFN前蛋白进一步包含第一CH1结构域和第一不可切割接头之间的第一铰链结构域以及第二CH1结构域和第二不可切割接头之间的第二铰链结构域。

[0202] 另一个示例性IFN前蛋白描绘于图2D中,其中该靶向部分(描绘为由与VL-CL配对的VH-CH1表示的Fab结构域)是任选的。图2D的IFN前蛋白包含第一多肽链、第二多肽链、任选的第三多肽链和任选的第四多肽链,其中:

[0203] a)该第一多肽链包含:

[0204] i)任选的第一VH1域;

[0205] ii)第一CH1结构域;

[0206] iii)第一Fc结构域,其包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域,其中该CH3结构域是该第一免疫球蛋白恒定结构域;

[0207] iv)第一蛋白酶可切割接头(PCL);

[0208] v)第一I型干扰素(IFN)部分;

[0209] vi)第一不可切割接头(NCL);以及

[0210] vii)第二Fc结构域;

[0211] b)该第二多肽链包含:

[0212] i)任选的第二VH1域;

[0213] ii)第二CH1结构域;

[0214] iii)第三Fc结构域,其包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域,其中该CH3结构域是该第二免疫球蛋白恒定结构域;

[0215] iv)第二蛋白酶可切割接头(PCL);

[0216] v)第二I型干扰素(IFN)部分;

[0217] vi)第二不可切割接头(NCL);以及

[0218] vii)第四Fc结构域;

[0219] c)该任选的第三多肽链包含:

[0220] i)第一VL结构域;

[0221] ii)第一CL结构域;并且

[0222] d)该第四多肽链包含:

[0223] i)第二VL结构域;以及

[0224] ii)第二CL结构域;

[0225] 其中该第一多肽链与该第二多肽链缔合,使得该第一Fc结构域和该第三Fc结构域缔合形成Fc区,并且该第二Fc结构域和该第四Fc结构域形成另一个Fc区。

[0226] 当存在时,第三多肽链与第一多肽链缔合,使得第一VH、CH1、VL和CL形成第一靶向部分,并且第四多肽链与第二多肽链多肽缔合,使得第二VH、CH1、VL和CL形成第二靶向部分。替代性地,第一多肽链和第二多肽链可在其N-末端包含scFv。

[0227] 因此,第一多肽链(连同第三多肽链,如果存在)代表第一半抗体,并且第二多肽链(连同第四多肽链,如果存在)代表第二半抗体。

[0228] 另一个示例性IFN前蛋白描绘于图2E中,其中该靶向部分(描绘为由与VL-CL配对的VH-CH1表示的Fab结构域)是任选的。图2E的IFN前蛋白包含第一多肽链、第二多肽链、任选的第三多肽链和任选的第四多肽链,其中:

[0229] a)该第一多肽链包含:

[0230] i)任选的第一VH1域;

[0231] ii)第一CH1结构域;

[0232] iii)第一蛋白酶可切割接头(PCL);

[0233] iv)第一I型干扰素(IFN)部分;

[0234] v)第一不可切割接头(NCL);以及

[0235] vi)第一Fc结构域;

[0236] b)该第二多肽链包含:

[0237] i)任选的第二VH1域;

[0238] ii)第二CH1结构域;

[0239] iii)第二蛋白酶可切割接头(PCL);

[0240] iv)第二I型干扰素(IFN)部分;

[0241] v)第二不可切割接头(NCL);以及

[0242] vi)第二Fc结构域;

[0243] c)该任选的第三多肽链包含:

[0244] i)第一VL结构域;

[0245] ii)第一CL结构域;并且

[0246] d)该第四多肽链包含:

[0247] i)第二VL结构域;以及

[0248] ii)第二CL结构域;

[0249] 其中该第一多肽链与该第二多肽链缔合,使得该第一Fc结构域和该第二Fc结构域形成Fc区。

[0250] 当存在时,第三多肽链与第一多肽链缔合,使得第一VH、CH1、VL和CL形成第一靶向部分,并且第四多肽链与第二多肽链缔合,使得第二VH、CH1、VL和CL形成第二靶向部分。替代性地,第一多肽链和第二多肽链可在其N-末端包含scFv。

[0251] 因此,第一多肽链(连同第三多肽链,如果存在)代表第一半抗体,并且第二多肽链(连同第四多肽链,如果存在)代表第二半抗体。

[0252] 图2E的IFN前蛋白的变体描绘于图2F中。图2E的IFN前蛋白进一步包含第一CH1结构域和第一蛋白酶可切割接头之间的第一铰链结构域以及第二CH1结构域和第二蛋白酶可切割接头之间的第二铰链结构域。

[0253] 通常,描绘于图1A至1C和图2A至2F中的IFN前蛋白中的Fc结构域包括铰链结构域。

[0254] 因此,IFN前蛋白通常包含二至四个蛋白酶可切割接头。对具有四个蛋白酶可切割接头的IFN前蛋白中的所有蛋白酶可切割接头的切割导致经活化的IFN蛋白的释放,该经活化的IFN蛋白包含IFN部分且缺乏C-末端Fc部分、N-末端恒定结构域和靶向部分(如果存在)。对具有两个蛋白酶可切割接头的IFN前蛋白中的所有蛋白酶可切割接头的切割导致空间阻断部分中的一者的去除并产生包含靶向部分(抗体-IFN)或Fc结构域(IFN-Fc)的IFN分子。

[0255] 在一些实施例中,这种构型有利地用于包含结合至在肿瘤环境中表达的TAA或ECM靶分子的靶向部分的IFN前蛋白。在不打算受理论的束缚的情况下,发明人相信,在这种构型中,靶向部分将IFN前蛋白靶向至肿瘤环境,其中蛋白酶裂解蛋白酶可切割接头,导致包含IFN部分和接头序列的IFN蛋白的释放。这种经局部活化的IFN蛋白随后诱导针对癌细胞的免疫应答。

[0256] 铰链和接头序列的顺序和长度可以变化,IFN部分(含有全长或N-末端和/或C-末端截短的IFN序列)的顺序也可以变化。示例性IFN部分描述于第6.3节中,并且包括如描述于下文第6.3.1和6.3.2节中的基于IFNα和IFNβ的部分。如公开于第6.4节中的示例性蛋白酶可切割接头序列。示例性不可切割接头和铰链序列分别公开于第6.5和6.8.3节中。示例性靶向部分公开于第6.6节中。

[0257] 6.3.IFN部分

[0258] IFN有两大类:I型(IFN-α亚型、IFN-β等)和II型(IFN-γ)。另外的IFN(IFN样细胞因子;IFN-λ亚型)也已被鉴定。

[0259] 本公开的IFN部分可包括任何野生型或经修饰的(例如,截短型和/或突变型)IFN或IFN样细胞因子序列,但优选地是I型IFN部分。I型IFN结合由IFNAR1和IFNAR2构成的异二聚体型质膜受体IFNAR,其在所有有核细胞中广泛表达。配体结合由高亲和力受体亚基IFNAR2启动(Piehler等人,2012,Immunological Reviews,doi.org/10.1111/imr.12001)。因此,I型IFN能够作用于身体的几乎所有细胞。已鉴定出十六种I型干扰素亚型,它们对IFNAR2的亲和力和活性的内在变异性各不相同。

[0260] 在一些实施例中,I型IFN部分是干扰素-α(IFNα)部分。在其他实施例中,I型IFN部分是干扰素-β(IFNβ)部分。

[0261] 在其他实施例中,I型IFN部分是干扰素-ω(IFNω)、干扰素-ε(IFNε)或干扰素-κ(IFNκ)部分。

[0262] I型IFN部分可以包括因一个或多个突变(例如,取代、缺失或插入)而不同于野生型IFN序列的序列。可以适当地使用通过减少受体结合来弱化IFN活性的取代。也可以使用具有N-末端或C-末端缺失(或截短)的氨基酸,例如,来自成熟I型IFN的N-末端和/或C-末端的1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个或15个氨基酸的截短。不受理论的束缚,本发明人相信,末端截短对IFN部分施加额外的空间限制并降低IFN活性,直到切割IFN前蛋白中的蛋白酶可切割接头为止。

[0263] 下文提供了示例性I型IFN部分的进一步细节。

[0264] 6.3.1.干扰素-α部分

[0265] IFNα基因是9号染色体上的α干扰素基因簇的成员。经编码的细胞因子是I型干扰素家族的成员,其是响应于病毒感染而产生的,是先天免疫应答的关键部分,具有有效的抗病毒、抗增殖和免疫调节特性。IFNα是蛋白家族,其具有至少15种已知的人IFNα亚型。已鉴定的主要亚型是IFNα1、IFNα2、IFNα8、IFNα10、IFNα14和IFNα21。

[0266] IFNα1基因具有两个等位基因变体:IFNα1a和IFNα1b。人IFNα1a的氨基酸序列被分配UniProtKB登录号P01562,在下文重现,其中信号肽加下划线:

[0267] MASPFALLMVLVVLSCKSSCSLGCDLPETH SLDNRRTLML LAQMSRISPS

[0268] SCLMDRHDFG FPQEEFDGNQ FQKAPAISVL HELIQQIFNL FTTKDSSAAW

[0269] DEDLLDKFCT ELYQQLNDLE ACVMQEERVG ETPLMNADSI LAVKKYFRRI

[0270] TLYLTEKKYS PCAWEVVRAE IMRSLSLSTN LQERLRRKE(SEQ ID NO:1)

[0271] 人IFNα1b基因与IFNα1a等位基因变体的区别在于编码区的一个碱基变化,导致氨基酸序列的单一变化(成熟蛋白中的Val114而不是Ala114,对应于全长多肽中的Val137而不是Ala137)。

[0272] IFNα2等位基因有3个等位基因变体:IFNα2a、IFNα2b和IFNα2c。等位基因IFNα2b是优势等位基因,而等位基因IFNα2a是次优势的,并且IFNα2c只是次要等位基因变体。人IFNα2的氨基酸序列被分配UniProtKB登录号P01563。IFNα2b等位基因的序列在下文重现,其中信号肽加下划线:

[0273] MALTFALLVALLVLSCKSSCSVGCDLPQTH SLGSRRTLML LAQMRRISLF

[0274] SCLKDRHDFG FPQEEFGNQF QKAETIPVLH EMIQQIFNLF STKDSSAAWD

[0275] ETLLDKFYTE LYQQLNDLEA CVIQGVGVTE TPLMKEDSIL AVRKYFQRIT LYLKEKKYSP CAWEVVRAEI MRSFSLSTNL QESLRSKE(SEQ ID NO:2)

[0276] IFNα2b在成熟蛋白的位置23处具有精氨酸(R),而IFNα2a具有赖氨酸(K)。因此,在一些实施例中,IFNα2部分在对应于成熟蛋白的位置23的位置处具有精氨酸。在其他实施例中,IFNα2部分在对应于成熟蛋白的位置23的位置处具有赖氨酸。

[0277] 在各个方面,IFNα部分包含与成熟IFNα1a、IFNα1b和/或IFNα2b、IFNα2a或IFNα2c或其在其N-末端和/或C-末端处具有至多15个氨基酸的截短(例如,来自成熟IFNα1a、IFNα1b和/或IFNα2b、IFNα2a或IFNα2c的N-末端和/或C-末端的1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个或15个氨基酸的截短)的片段的氨基酸序列具有至少约90%、至少约91%、至少约92%、约至少93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少

约97％、至少约98％、至少约99％或100％序列同一性的氨基酸序列。

[0278] 在一些实施例中,IFNα部分具有一个或多个氨基酸取代,例如,改变IFNAR结合和/或激动作用的取代。示例性取代见于WO 2013/107791、美国专利号8,258,263、WO2007/000769A2、WO2008/124086、WO2010/030671、WO2018/144999A1和WO2015/007520、WO 2013/059885、WO2020156467A1、WO2021/126929A1。在一些实施例中,该IFNα部分包含:

[0279] a)选自以下项的一个或多个取代:L15A、A19W、R22A、R23A、L26A、F27A、

[0280] L30A、L30V、K31A、D32A、R33K或R33A或R33Q、H34A、D35A、Q40A、

[0281] H57Y、E58N、Q61S、F64A、N65A、T69A、L80A、D82E、Y85A、T86I、Y89A、

[0282] D114R或D114A、L117A、R120A或R120E或R120K、K121E、R125A、K133A、

[0283] K134A、R144A、A145G或A145M、M148A、R149A、R149K、S152A、L153A、

[0284] N156A;和/或

[0285] b)描述于WO2007000769A2中的在氨基酸57至89和159至165处的一个或多个取代;和/或

[0286] c)描述于WO2021126929A1中的丙氨酸、甘氨酸或苏氨酸在9、17、47、65、66、

[0287] 117、123、128、147和157处的一个或多个氨基酸取代。

[0288] 前述取代的氨基酸位置是参考成熟IFNα2b给出的。

[0289] 在进一步的实施例中,IFNα部分包含在表1中列出的一个或多个氨基酸取代。表1列出了参照IFNα2序列内的氨基酸位置鉴定的IFNα取代。

[0290]

**表 1**
**示例性 IFNα 突变（参考成熟 IFNα2 的序列）**

| IFNα 序列突变 | 取代的来源/影响 |
|---|---|
| L15A | WO2018014068A9 |
| R22A | WO2018014068A9 |
| R23A | WO2018014068A9 |
| S25A | WO2018014068A9 |
| L26A | Thomas 等人, 2011, Cell, 146(4):621-632 |
| F27A | Thomas 等人, 2011, Cell, 146(4):621-632 |
| L30A | Thomas 等人, 2011, Cell, 146(4):621-632 |
| L30V | WO2018014068A9 |
| K31A | WO2018014068A9 |
| D32A | WO2018014068A9 |
| R33K | WO2018014068A9 |
| R33Q | WO2018014068A9 |
| R33A | WO2013059885A2 |
| H34A | WO2018014068A9 |
| D35E | WO2016201337A1 |
| Q40A | WO2018014068A9 |
| H57A | Thomas 等人, 2011, Cell, 146(4):621-632 |
| H57S | WO2013134138A1 |
| E58A | Thomas 等人, 2011, Cell, 146(4):621-632 |
| Q61A | WO2016201337A1 |
| Q90A | Piehler 等人, 2012, Immunological Reviews, doi.org/10.1111/imr.12001 |

[0291]

| 表 1<br>示例性 IFNα 突变（参考成熟 IFNα2 的序列） | |
|---|---|
| **IFNα 序列突变** | **取代的来源/影响** |
| E96A | Piehler 等人, 2012, Immunological Reviews, doi.org/10.1111/imr.12001 |
| D114R | WO2018014068A9 |
| L117A | WO2018014068A9 |
| R120A | WO2018014068A9 |
| R120E | WO2018014068A9 |
| Q124R | WO2022015711A1 |
| R125A | WO2018014068A9 |
| R125E | WO2018014068A9 |
| K131A | WO2018014068A9 |
| E132A | WO2018014068A9 |
| K133A | WO2018014068A9 |
| K134A | WO2018014068A9 |
| L135A | WO2013134138A1 |
| R144A | WO2022015711A1 |
| R144D | WO2018014068A9 |
| R144E | WO2018014068A9 |
| R144G | WO2018014068A9 |
| R144H | WO2018014068A9 |
| R144I | WO2018014068A9 |
| R144K | WO2018014068A9 |
| R144L | WO2013059885A2 |
| R144N | WO2018014068A9 |
| R144Q | WO2018014068A9 |
| R144S | WO2013059885A2 |
| R144T | WO2013059885A2 |
| R144V | WO2018014068A9 |
| R144Y | WO2013059885A2 |
| A145D | WO2013059885A2 |
| A145E | WO2018014068A9 |
| A145G | WO2018014068A9、WO2022015711A1 |
| A145H | WO2013059885A2 |
| A145I | WO2018014068A9 |
| A145K | WO2013059885A2 |
| A145L | WO2018014068A9 |
| A145M | WO2018014068A9 |
| A145N | WO2018014068A9 |
| A145Q | WO2018014068A9 |
| A145S | WO2018014068A9 |
| A145T | WO2018014068A9 |
| A145V | WO2018014068A9 |
| A145Y | WO2013059885A2 |
| M148A | WO2018014068A9 |

[0292]

| 表 1<br>示例性 IFNα 突变（参考成熟 IFNα2 的序列） | |
|---|---|
| **IFNα 序列突变** | **取代的来源/影响** |
| R149A | WO2022015711A1，Piehler 等人, 2012, Immunological Reviews, doi.org/10.1111/imr.12001 |
| R149K | Piehler 等人, 2012, Immunological Reviews, doi.org/10.1111/imr.12001 |
| S152A | Piehler 等人, 2012, Immunological Reviews, doi.org/10.1111/imr.12001, WO2022015711A1 |
| L153A | WO2018014068A9 |
| N156A | WO2018014068A9 |
| R162A | WO2016201337A1 |
| E165D | WO2016201337A1 |
| L30A、H57Y、E58N、Q61S | WO2018014068A9 |
| R33A、H57Y、E58N、Q61S | WO2013059885A2 |
| H57S、E58S、Q61S | 改变位点 1 处的 IFNα-IFNAR1 结合亲和力 |
| H57Y、E58N、Q61S | WO2007000769A2 |
| N65A、L80A、Y85A、Y89A | WO2018014068A9 |
| N65A、L80A、Y85A、Y89A、D114A | WO2018014068A9 |
| N65A、L80A、Y85A、Y89A、L174A | WO2018014068A9 |
| N65A、L80A、Y85A、Y89A、R120A | WO2018014068A9 |
| Y85A、Y89A、D114A | WO2018014068A9 |
| Q90A、R120A | Piehler 等人, 2012, Immunological Reviews, doi.org/10.1111/imr.12001 |
| D114A、R120A | WO2018014068A9 |
| L117A、R120A | WO2018014068A9 |
| L117A、R120A、K121A | WO2018014068A9 |
| R120A、K121A | WO2018014068A9 |
| R120E、K121E | WO2018014068A9 |
| R144A、H57Y、E58N、Q61S | WO2013059885A2 |
| M148A、H57Y、E58N、Q61S | WO2018014068A9 |
| R149A、R162A | WO2013134138A1 |
| L153A、H57Y、E58N、Q61S | WO2018014068A9 |
| 残基 L161 至 E165 的缺失 | WO2018014068A9 |

[0293] 在一些实施例中,IFNα部分包括氨基酸序列,该氨基酸序列包含氨基酸取代R33A或R33K、Q90A、E96A、R120A、A145M、R149A或R149K、S152A、或前述中的两者或更多者的任何组合,例如,Q90A+R120A或A145M+R149K。

[0294] 可用于本公开的IFN前蛋白中的示例性IFNα部分的序列在下表2中列出:

[0295]

表 2
示例性 IFNα 部分

| 构建体 | 序列 | SEQ ID NO: |
|---|---|---|
| IFNα1a | CDLPETHSLDNRRTLMLLAQMSRISPSSCLMDRHDFGFPQEE FDGNQFQKAPAISVLHELIQQIFNLFTTKDSSAAWDEDLLDK FCTELYQQLNDLEACVMQEERVGETPLMNADSILAVKKYFR RITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIMRSLSLSTNLQERLRRKE | |
| IFNα1b | CDLPETHSLDNRRTLMLLAQMSRISPSSCLMDRHDFGFPQEE FDGNQFQKAPAISVLHELIQQIFNLFTTKDSSAAWDEDLLDK FCTELYQQLNDLEACVMQEERVGETPLMNVDSILAVKKYFR RITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIMRSLSLSTNLQERLRRKE | 3 |
| IFNα2a | CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFGFPQEE FGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKF YTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRI TLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE | 4 |
| IFNα2b | CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEE FGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKF YTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRI TLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE | 5 |
| IFNα2b (R33A) | CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDAHDFGFPQEE FGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKF YTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRI TLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE | 6 |
| IFNα2b (R33K) | CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDKHDFGFPQEE FGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKF YTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRI TLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE | 7 |
| IFNα2b (Q90A) | CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEE FGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKF YTELYAQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRI TLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE | 8 |
| IFNα2b (E96A) | CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEE FGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKF YTELYQQLNDLAACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQR ITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE | 9 |
| IFNα2b (R120A) | CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEE FGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKF YTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVAKYFQRI TLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE | 10 |
| IFNα2b (A145M) | CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEE FGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKF YTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRI TLYLKEKKYSPCAWEVVRMEIMRSFSLSTNLQESLRSKE | 11 |
| IFNα2b (R149A) | CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEE FGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKF YTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRI TLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMASFSLSTNLQESLRSKE | 12 |
| IFNα2b | CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEE | 13 |

[0296]

表 2
示例性 IFNα 部分

| 构建体 | 序列 | SEQ ID NO: |
|---|---|---|
| (R149K) | FGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKF YTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRI TLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMKSFSLSTNLQESLRSKE | |
| IFNα2b (S152A) | CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEE FGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKF YTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRI TLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFALSTNLQESLRSKE | 14 |
| ΔN-IFN-ΔC | THSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQF QKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELY QQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLK EKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQ | 15 |
| IFN-ΔC | CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEE FGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKF YTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRI TLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQ | 16 |

[0297] 6.3.2.干扰素1-β部分

[0298] 干扰素1-β(IFN1β或IFN 1-β)是响应于生物和化学刺激由免疫系统自然产生的细胞因子。IFN1β是分子量约为22kDa的糖基化分泌单体,其由成纤维细胞大量产生,因此其也被称为成纤维细胞干扰素。IFN1β结合至由IFNAR1和IFNAR2二聚体组成的IFNAR受体,以经由JAK/STAT通路和其他通路诱导信号传导。IFN1β也可以通过单独结合至IFNAR1发挥作用,并独立于Jak-STAT通路发出信号(参见,例如,Stanifer等人,2019,Int.J Mol.Sci.20(6):1445)。

[0299] IFN1β含有5个α-螺旋,其被命名为A(YNLLGFLQRSSNFQCQKLL(SEQ ID NO:18)),B(KEDAALTIYEMLQNIFAIF(SEQ ID NO:19)),C(ETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKL(SEQ ID NO:20)),D(SSLHLKRYYGRILHYLKA(SEQ ID NO:21))和E(HCAWTIVRVEILRNFYFINRLT(SEQ ID NO:22))。五个α-螺旋通过被命名为AB、BC、CD和DE环的2至28个残基的环相互连接。据报道,AB环中的A螺旋和DE环中的E螺旋参与IFN1β至IFNAR受体的结合。

[0300] 已描述了两种类型的IFN1β:干扰素1-β1(IFN1β1)和干扰素1-β3(IFN1β3)。

[0301] 人IFNβ前体的氨基酸序列列于GenBank下:登录号AAA36040.1,并且在下文重现(其中信号肽加下划线):

[0302] MTNKCLLQIALLLCFSTTALSMSYNLLGFL QRSSNFQCQK LLWQLNGRLE YCLKDRMNFD IPEEIKQLQQ FQKEDAALTI YEMLQNIFAI FRQDSSSTGW NETIVENLLA NVYHQINHLK TVLEEKLEKE DFTRGKLMSS LHLKRYYGRI LHYLKAKEYS HCAWTIVRVE ILRNFYFINR LTGYLRN(SEQ ID NO:23)

[0303] 在各个方面,IFNβ部分包含与成熟IFN1β1或其在其N-末端和/或C-末端具有至多15个氨基酸的截短(例如,来自IFN1β1的N-末端和/或C-末端的1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个或15个氨基酸的截短)的片段的氨基酸序列具有至少约90%、至少约91%、至少约92%、约至少93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%序列同一性的氨基酸序列。

[0304] 在各种实施例中,与IFN1β1相比,IFNβ部分包含一个或多个氨基酸取代和/或缺失。在一些实施例中,取代是C17S(参考成熟IFN1β1),并且缺失是描述于US2009/0025106A1

中的C-末端截短中的一个C-末端截短,如IFN-ΔI、IFNA2、IFNA3、IFNA4、IFNA5、IFNA6、IFN-Δ7、IFN-Δδ、IFNA9和IFN-ΔIO。

[0305] 6.3.3.其他I型干扰素

[0306] 在某些方面,I型IFN部分不同于IFNα或IFNβ部分,例如,干扰素-ω(IFNω)、干扰素-ε(IFNε)或干扰素-κ(IFNκ)部分。

[0307] 人IFNω由UniProt登录号P05000标识,并且IFNω1等位基因具有下文列出的氨基酸序列,其中信号序列加下划线:

[0308] MALLFPLLAALVMTSYSPVGSLGCDLPQNHGLLSRNTLVLLHQMRRISPFLCLKD

[0309] RRDFRFPQEMVKGSQLQKAHVMSVLHEMLQQIFSLFHTERSSAAWNMTLLDQL

[0310] HTGLHQQLQHLETCLLQVVGEGESAGAISSPALTLRRYFQGIRVYLKEKKYSDCAWEVVRMEIMKSLFLSTNMQERLRSKDRDLGSS(SEQ ID NO:24)

[0311] 在各个方面,IFNω部分包含与成熟IFN1ω1或其在其N-末端和/或C-末端具有至多15个氨基酸的截短(例如,来自IFN1ω1的N-末端和/或C-末端的1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个或15个氨基酸的截短)的片段的氨基酸序列具有至少约90%、至少约91%、至少约92%、约至少93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%序列同一性的氨基酸序列。

[0312] 人IFNε由UniProt登记号Q86WN2标识,并且具有下文列出的氨基酸序列,其中信号序列加下划线:

[0313] MIIKHFFGTVLVLLASTTIFSLDLKLIIFQQRQVNQESLKLLNKLQTLSIQQCLPHR

[0314] KNFLLPQKSLSPQQYQKGHTLAILHEMLQQIFSLFRANISLDGWEENHTEKFLIQL

[0315] HQQLEYLEALMGLEAEKLSGTLGSDNLRLQVKMYFRRIHDYLENQDYSTCAWAI VQVEISRCLFFVFSLTEKLSKQGRPLNDMKQELTTEFRSPR(SEQ ID NO:25)

[0316] 在各个方面,IFNε部分包含与成熟IFN1ε或其在其N-末端和/或C-末端具有至多15个氨基酸的截短(例如,来自IFN1ε的N-末端和/或C-末端的1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个或15个氨基酸的截短)的片段的氨基酸序列具有至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%序列同一性的氨基酸序列。

[0317] 人IFNκ由UniProt登记号Q9P0W0标识,并且具有下文列出的氨基酸序列,其中信号序列加下划线:

[0318] MSTKPDMIQKCLWLEILMGIFIAGTLSLDCNLLNVHLRRVTWQNLRHLSSMSNSF

[0319] PVECLRENIAFELPQEFLQYTQPMKRDIKKAFYEMSLQAFNIFSQHTFKYWKERH

[0320] LKQIQIGLDQQAEYLNQCLEEDKNENEDMKEMKENEMKPSEARVPQLSSLELRR

[0321] YFHRIDNFLKEKKYSDCAWEIVRVEIRRCLYYFYKFTALFRRK(SEQ ID NO:26)

[0322] 在各个方面,IFNκ部分包含与成熟IFN1κ或其在其N-末端和/或C-末端具有至多15个氨基酸的截短(例如,来自IFN1κ的N-末端和/或C-末端的1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个或15个氨基酸的截短)的片段的氨基酸序列具有至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%序列同一性的氨基酸序列。

[0323] 6.4.蛋白酶可切割接头

[0324] 本公开的IFN前蛋白通常包含四个接头,在下面编号实施例中被称为第一接头、第二接头、第三接头和第四接头,其中第一接头和第二接头位于一个多肽链上并且第三接头和第四接头位于另一个多肽链上。接头中两至四个接头是蛋白酶可切割接头。在一些实施例中,第一接头、第二接头、第三接头和第四接头都是蛋白酶可切割接头。在其他实施例中,第一接头、第二接头、第三接头和第四接头中仅两者是蛋白酶可切割接头。例如,在某些实施例中,第一接头和第三接头是蛋白酶可切割接头,并且第二接头和第四接头是不可切割接头。在其他实施例中,第一接头和第三接头是不可切割接头,并且第二接头和第四接头是蛋白酶可切割接头。

[0325] 蛋白酶可切割接头的范围可以是8个氨基酸至100个或更多个氨基酸。在各种实施例中,蛋白酶可切割接头的范围可以是8个氨基酸至15个氨基酸、10个氨基酸至20个氨基酸、20个氨基酸至80个,并且在某些方面中,不可切割肽接头在长度上范围可以为20个氨基酸至60个氨基酸、20个氨基酸至40个氨基酸、30个氨基酸至50个氨基酸、20个氨基酸至80个氨基酸或30个氨基酸至70个氨基酸。

[0326] 蛋白酶可切割接头包括用于一个或多个蛋白酶(例如,在第6.4.1节中列出的蛋白酶中的一个或多个蛋白酶)的一个或多个底物序列。一个或多个底物序列(例如,在第6.4.2节中列出的底物序列中的一个或多个底物序列)通常(但不一定)由一个或多个间隔子序列(例如,如描述于第6.4.3节中的间隔子序列)侧接。每个蛋白酶可切割接头可以包括一个、两个、三个或更多个底物序列。间隔子序列可以是邻接的、重叠的或由间隔子序列分离的。优选地,蛋白酶可切割接头的C末端和N末端含有间隔子序列。

[0327] 在包含四个蛋白酶可切割接头的IFN前蛋白的各个方面,第一蛋白酶可切割接头和第三蛋白酶可切割接头可被相同的蛋白酶切割且/或第二蛋白酶可切割接头和第四蛋白酶可切割接头可被相同的蛋白酶切割。在一些实施例中,蛋白酶是表A中列出的蛋白酶。

[0328] 在包含四个蛋白酶可切割接头的IFN前蛋白的进一步的方面,第一蛋白酶可切割接头和第三蛋白酶可切割接头包含相同的底物序列且/或第二蛋白酶可切割接头和第四蛋白酶可切割接头包含相同的底物序列。在一些实施例中,底物序列在表B中列出。在进一步的实施例中,第一蛋白酶可切割接头和第三蛋白酶可切割接头也包括相同的间隔子序列且/或第二蛋白酶可切割接头和第四蛋白酶可切割接头也包括相同的间隔子序列。在一些实施例中,间隔子序列在表C中列出。

[0329] 在进一步的方面包含四个蛋白酶可切割接头的IFN前蛋白,第一接头和第三接头包括相同的接头序列且/或第二接头和第四接头包括相同的接头序列。在一些实施例中,接头序列在表D中列出。

[0330] 在包含四个蛋白酶可切割接头的IFN前蛋白的一些实施例中,第一蛋白酶可切割接头和第三蛋白酶可切割接头与第二蛋白酶可切割接头和第四蛋白酶可切割接头相同。

[0331] 在其他实施例中,第一蛋白酶可切割接头和第三蛋白酶可切割接头不同于第二蛋白酶可切割接头和第四蛋白酶可切割接头。

[0332] 在前述方面和实施例中,不同的接头可能可被相同的蛋白酶、不同的蛋白酶切割,或者当接头包括多个底物序列时,不同的接头可能可被多个蛋白酶切割,其中一个或多个蛋白酶是常见的,并且其中一个或多个蛋白酶是不同的。

[0333] 示例性蛋白酶可切割接头序列在第6.4.4节中列出

[0334] 6.4.1.蛋白酶

[0335] 下面的表A中列出了其底物序列可以掺入蛋白酶可切割接头中的示例性蛋白酶。

[0336]

| 表 A<br>用于底物裂解的示例性蛋白酶 | | |
|---|---|---|
| ADAMS、ADAMTS，*例如* | 半胱天冬酶，*例如，* | MMP24 |
| ADAM8 | 半胱天冬酶 1 | MMP26 |
| ADAM9 | 半胱天冬酶 2 | MMP27 |
| ADAM10 | 半胱天冬酶 3 | |
| ADAM12 | 半胱天冬酶 4 | |
| ADAM15 | 半胱天冬酶 5 | |
| ADAM17/TACE | 半胱天冬酶 6 | |
| ADAMDEC1 | 半胱天冬酶 7 | |
| ADAMTS1 | 半胱天冬酶 8 | 半胱氨酸蛋白酶，*例如，* |
| ADAMTS4 | 半胱天冬酶 9 | 克氏蛋白酶(Cruzipain) |
| ADAMTS5 | 半胱天冬酶 10 | 豆荚蛋白 |
| | 半胱天冬酶 14 | Otubain-2 |
| 天冬氨酸蛋白酶，*例如，* | | |
| BACE | 半胱氨酸组织蛋白酶，*例如，* | KLK，*例如，* |
| 肾素 | 组织蛋白酶 B | KLK4 |
| | 组织蛋白酶 C | KLK5 |
| 天冬氨酸组织蛋白酶，*例如，* | 组织蛋白酶 K | KLK6 |
| 组织蛋白酶 D | 组织蛋白酶 L | KLK7 |
| 组织蛋白酶 E | 组织蛋白酶 S | KLK8 |
| | 组织蛋白酶 V/L2 | KLK10 |
| NS3/4A | 组织蛋白酶 X/Z/P | KLK11 |
| PACE4 | | KLK13 |
| 纤溶酶 | MMP，*例如，* | KLK14 |
| PSA | MMP1 | |
| tPA | MMP2 | 金属蛋白酶，*例如，* |
| 凝血酶 | MMP3 | 穿膜肽酶 |
| 类胰蛋白酶 | | 脑啡肽酶 |
| uPA | MMP7 | PSMA |
| | MMP8 | BMP-1 |
| II 型横跨膜 | MMP9 | |
| 丝氨酸蛋白酶(TTSP)，*例如，* | MMP10 | |
| DESC1 | MMP11 | 丝氨酸蛋白酶，*例如，* |
| DPP-4 | MMP12 | 活化蛋白 C |
| FAP | MMP13 | 组织蛋白酶 A |
| 肝素 | MMP14 | 组织蛋白酶 G |
| 基质酶-2 | MMP15 | 食糜酶 |
| MT/SP1/基质酶 | MMP16 | 凝血因子蛋白酶 |
| | MMP17 | （*例如*，FVIIa、FIXa、FXa、FXIa、FXIIa） |
| TMPRSS2 | MMP19 | 人中性粒细胞弹性蛋白酶 |
| TMPRSS3 | MMP20 | 乳铁蛋白 |
| TMPRSS4 | MMP23 | |

[0337] 在特定的实施例中,蛋白酶是基质金属蛋白酶(MMP)-2、MMP-9、天冬酰胺内切酶、

凝血酶、成纤维细胞活化蛋白酶(FAP)、MMP-1、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-12、MMP-13、MMP-14、膜型1基质金属蛋白酶(MT1-MMP)、纤溶酶、跨膜蛋白酶、丝氨酸(TMPRSS-3/4)、组织蛋白酶A、组织蛋白酶B、组织蛋白酶D、组织蛋白酶E、组织蛋白酶F、组织蛋白酶H、组织蛋白酶K、组织蛋白酶L、组织蛋白酶L2、组织蛋白酶O、组织蛋白酶S、半胱天冬酶1、半胱天冬酶2、半胱天冬酶3、半胱天冬酶4、半胱天冬酶5、半胱天冬酶6、半胱天冬酶7、半胱天冬酶8、半胱天冬酶9、半胱天冬酶10、半胱天冬酶11、半胱天冬酶12、半胱天冬酶13、半胱天冬酶14、人中性粒细胞弹性蛋白酶、尿激酶/尿激酶型纤溶酶原活化剂(uPA)、解整合素和金属蛋白酶(ADAM)10、ADAM12、ADAM17、具有血小板反应蛋白基序的ADAM(ADAMTS)、ADAMTS5、β分泌酶(BACE)、颗粒酶A、颗粒酶B、胍基苯甲酸酶、丝氨酸蛋白酶、蛋白裂解酶、蛋白裂解酶2、穿膜肽酶、中性溶酶、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、肿瘤坏死因子转换酶(TACE)、激肽释放酶相关肽酶(KLK)3、KLK5、KLK7、KLK11、丙型肝炎病毒的NS3/4蛋白酶(HCV-NS3/4)、组织纤溶酶原活化剂(tPA)、钙蛋白酶、钙蛋白酶2、谷氨酸羧肽酶II、血浆激肽释放酶、AMSH样蛋白酶、AMSH、γ-分泌酶成分、抗纤溶酶裂解酶(APCE)、脱胱氨酸1、凋亡相关半胱氨酸肽酶或N-乙酰化α连接酸性二肽酶样1。

[0338] 6.4.2.底物

[0339] 下面的表B中列出了可被肿瘤蛋白酶裂解并且可掺入蛋白酶可切割接头的示例性底物序列。

[0340]

表 B
蛋白酶可切割接头的底物序列

| 底物序列 | 名称 | 裂解蛋白酶 | SEQ ID NO: |
|---|---|---|---|
| $(DE)_8$RPLALWRS$(DR)_8$ | SU1 | MMP7 | 27 |
| AARGPAIH | SU2 | | 28 |
| AAYHLVSQ | SU3 | 胶原酶 | 29 |
| AGLGISST | SU4 | 胶原酶 | 30 |
| AGLGVVER | SU5 | 胶原酶 | 31 |
| ALAL | SU6 | 溶酶体酶 | 32 |
| ALFFSSPP | SU7 | | 33 |
| ALFKSSFP | SU8 | | 34 |
| ALLLALL | SU9 | TOP | 35 |
| AQFVLTEG | SU10 | 胶原酶 | 36 |
| AQNLLGMV | SU11 | | 37 |
| AVGLLAPP | SU12 | 丝氨酸蛋白酶 | 38 |
| DAFK | SU13 | 尿激酶纤溶酶原活化剂(uPA) | 39 |
| DEVD | SU14 | 半胱天冬酶-3 | 40 |

[0341]

| 表 B<br>蛋白酶可切割接头的底物序列 | | | |
|---|---|---|---|
| **底物序列** | **名称** | **裂解蛋白酶** | **SEQ ID NO:** |
| DEVDP | SU15 | 半胱天冬酶-3 | 41 |
| DPRSFL | SU16 | 凝血酶 | 42 |
| DVAQFVLT | SU17 | 胶原酶 | 43 |
| DVLK | SU18 | 纤溶酶 | 44 |
| DWLYWPGI | SU19 | | 45 |
| EDDDDKA | SU20 | 肠激酶 | 46 |
| EP(Cit)G(Hof)YL | SU21 | MMP2、MMP9、MMP14 | 47 |
| EPQALAMS | SU22 | 胶原酶 | 48 |
| ESLPVVAV | SU23 | 胶原酶 | 49 |
| ESPAYYTA | SU24 | MMP | 50 |
| F(Pip)RS | SU25 | 凝血酶 | |
| FK | SU26 | 溶酶体酶 | |
| FPRPLGITGL | SU27 | | 51 |
| FRLLDWQW | SU28 | | 52 |
| GFLG | SU29 | 溶酶体酶 | 53 |
| GGAANLVRGG | SU30 | MMP11 | 54 |
| GGGRR | SU31 | 尿激酶纤溶酶原活化剂(uPA) | 55 |
| GGPRGLPG | SU32 | 组织蛋白酶 K | 56 |
| GGQPSGMWGW | SU33 | | 57 |
| GGSIDGR | SU34 | Xa 因子 | 58 |
| GGWHTGRN | SU35 | | 59 |
| GIAGQ | SU36 | 胶原酶 | 60 |
| GKAFRR | SU37 | 激肽释放酶 2 | 61 |
| GPAGLYAQ | SU38 | | 62 |
| GPAGMKGL | SU39 | | 63 |
| GPEGLRVG | SU40 | 胶原酶 | 64 |
| GPLGIAGI | SU41 | 胶原酶 | 65 |
| GPLGVRG | SU42 | | 66 |
| GPQGIAGQ | SU43 | 胶原酶 | 67 |
| GPQGLLGA | SU44 | 胶原酶 | 68 |
| GPRSFG | SU45 | | 69 |
| GPRSFGL | SU46 | | 70 |
| GPSHLVLT | SU47 | | 71 |
| GVSQNYPIVG | SU48 | HIV 蛋白酶 | 72 |
| GVVQASCRLA | SU49 | CMV 蛋白酶 | 73 |
| GWEHDG | SU50 | 白细胞介素 1β 转换酶 | 74 |
| HSSKLQ | SU51 | 前列腺特异性抗原 | 75 |
| HSSKLQEDA | SU52 | 前列腺特异性抗原 | 76 |
| HSSKLQL | SU53 | 前列腺特异性抗原 | 77 |
| HTGRSGAL | SU54 | | 78 |
| IDGR | SU55 | Xa 因子 | 79 |
| IEGR | SU56 | Xa 因子 | 80 |
| ILPRSPAF | SU57 | | 81 |

[0342]

表 B
蛋白酶可切割接头的底物序列

| 底物序列 | 名称 | 裂解蛋白酶 | SEQ ID NO: |
|---|---|---|---|
| IPVSLRSG | SU58 | MMP | 82 |
| ISSGL | SU59 | MMP | 83 |
| ISSGLL | SU60 | MMP | 84 |
| ISSGLLS | SU61 | MMP | 85 |
| ISSGLLSS | SU62 | MMP | 86 |
| ISSGLSS | SU63 | MMP | 87 |
| KGSGDVEG | SU64 | 半胱天冬酶-3 | 88 |
| KQEQNPGST | SU65 | FAP | 89 |
| KRALGLPG | SU66 | MMP7 | 90 |
| LAAPLGLL | SU67 | | 91 |
| LAPLGLQRR | SU68 | | 92 |
| LAQKLKSS | SU69 | | 93 |
| LAQRLRSS | SU70 | | 94 |
| LEATA | SU71 | MMP9 | 95 |
| LKAAPRWA | SU72 | | 96 |
| LLAPSHRA | SU73 | | 97 |
| LPGGLSPW | SU74 | | 98 |
| LSGRSANI | SU75 | 丝氨酸蛋白酶 | 99 |
| LSGRSANP | SU76 | 丝氨酸蛋白酶 | 100 |
| LSGRSDDH | SU77 | 丝氨酸蛋白酶 | 101 |
| LSGRSDIH | SU78 | 丝氨酸蛋白酶 | 102 |
| LSGRSDNH | SU79 | 丝氨酸蛋白酶 | 103 |
| LSGRSDNI | SU80 | 丝氨酸蛋白酶 | 104 |
| LSGRSDNP | SU81 | 丝氨酸蛋白酶 | 105 |
| LSGRSDQG | SU82 | 丝氨酸蛋白酶 | 106 |
| LSGRSDQH | SU83 | 丝氨酸蛋白酶 | 107 |
| LSGRSDTH | SU84 | 丝氨酸蛋白酶 | 108 |
| LSGRSDYH | SU85 | 丝氨酸蛋白酶 | 109 |
| LSGRSGNH | SU86 | 丝氨酸蛋白酶 | 110 |
| LVLASSSFGY | SU87 | 单纯疱疹病毒蛋白酶 | 111 |
| MDAFLESS | SU88 | 胶原酶 | 112 |
| MGLFSEAG | SU89 | | 113 |
| MIAPVAYR | SU90 | | 114 |
| MVLGRSLL | SU91 | | 115 |
| NLL | SU92 | 组织蛋白酶 B | |
| NTLSGRSENHSG | SU93 | | 116 |
| NTLSGRSGNHGS | SU94 | | 117 |
| PAGLWLDP | SU95 | | 118 |
| PGGPAGIG | SU96 | | 119 |
| PIC(Et)FF | SU97 | 组织蛋白酶 D | 120 |
| PLGC(me)AG | SU98 | MMP | 121 |
| PLGL | SU99 | | 122 |
| PLGLAG | SU100 | MMP | 123 |
| PLGLAX | SU101 | MMP | 124 |

[0343]

表 B
蛋白酶可切割接头的底物序列

| 底物序列 | 名称 | 裂解蛋白酶 | SEQ ID NO: |
|---|---|---|---|
| PLGLWA | SU102 | MMP | 125 |
| PLGLWSQ | SU103 | MMP | 126 |
| PLTGRSGG | SU104 | | 127 |
| PMAKK | SU105 | | 128 |
| PPRSFL | SU106 | 凝血酶 | 129 |
| PR(S/T)(L/I)(S/T) | SU107 | MMP9 | |
| PRFRIIGG | SU108 | 纤溶酶 | 130 |
| PVGYTSSL | SU109 | | 131 |
| PVQPIGPQ | SU110 | 胶原酶 | 132 |
| QALAMSAI | SU111 | 胶原酶 | 133 |
| QGRAITFI | SU112 | | 134 |
| QNQALRMA | SU113 | | 135 |
| RGPA | SU114 | | 136 |
| RGPAFNPM | SU115 | | 137 |
| RGPATPIM | SU116 | | 138 |
| RKSSIIIRMRDVVL | SU117 | 纤溶酶 | 139 |
| RLQLKAC | SU118 | MMP | 140 |
| RLQLKL | SU119 | MMP | 141 |
| RMHLRSLG | SU120 | | 142 |
| RPSPMWAY | SU121 | | 143 |
| RQARVVNG | SU122 | 蛋白裂解酶 | 144 |
| SAGFSLPA | SU123 | | 145 |
| SAPAVESE | SU124 | 胶原酶 | 146 |
| SARGPSRW | SU125 | | 147 |
| SGEPAYYTA | SU126 | | 148 |
| SGGPLGVR | SU127 | | 149 |
| SGRIGFLRTA | SU128 | MMP14 | 150 |
| SGRSA | SU129 | 尿激酶纤溶酶原活化剂(uPA) | 151 |
| SGRSANPRG | SU130 | | 152 |
| SMLRSMPL | SU131 | | 153 |
| SPLPLRVP | SU132 | | 154 |
| SPLTGRSG | SU133 | | 155 |
| SPRSIMLA | SU134 | | 156 |
| SSRGPAYL | SU135 | | 157 |
| SSRHRRALD | SU136 | 纤溶酶 | 158 |
| SSSFDKGKYKKGDDA | SU137 | 纤溶酶 | 159 |
| SSSFDKGKYKRGDDA | SU138 | 纤溶酶 | 160 |
| STFPFGMF | SU139 | | 161 |
| TARGPSFK | SU140 | | 162 |
| TGRGPSWV | SU141 | | 163 |
| TSGRSANP | SU142 | | 164 |
| TSTSGRSANPRG | SU143 | | 165 |
| VAGRSMRP | SU144 | | 166 |
| VAQFVLTE | SU145 | 胶原酶 | 167 |
| VHMPLGFLGP | SU146 | | 168 |

[0344]

| 表 B<br>蛋白酶可切割接头的底物序列 | | | |
|---|---|---|---|
| **底物序列** | **名称** | **裂解蛋白酶** | **SEQ ID NO:** |
| VPLSLYSG | SU147 | MMP9 | 169 |
| VVPEGRRS | SU148 | | 170 |
| WATPRPMR | SU149 | | 171 |
| YGAGLGVV | SU150 | 胶原酶 | 172 |
| HPVGLLAR | SU151 | | 173 |

[0345] 6.4.3.间隔子

[0346] 下面的表C中列出了可以掺入蛋白酶可切割接头中的示例性间隔子序列。除了表C中列出的间隔子序列之外,第6.5节中描述的任何不可切割接头序列(例如,表E中列出的不可切割接头序列)或其部分可用作间隔子序列。在一些实施例中,蛋白酶可切割接头中完全不存在间隔子序列。

[0347]

| 表 C<br>用于蛋白酶可切割接头的间隔子序列 | | |
|---|---|---|
| **间隔子序列** | **名称** | **SEQ ID NO:** |
| $(GGGGS)_n$ | SP1 | 174 |
| $(GGGS)_n$ | SP2 | 175 |
| $(GGS)_n$ | SP3 | 176 |
| $(GS)_n$ | SP4 | 177 |
| $(GSGGS)_n$ | SP5 | 178 |
| GGGGSGGGGS | SP6 | 179 |
| GGGGSGGGGSGGGGS | SP7 | 180 |
| GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS | SP8 | 181 |
| GGGKSGGGKSGGGKS | SP9 | 182 |
| GGGKSGGKGSGKGGS | SP10 | 183 |
| GGGS | SP11 | 184 |
| GGGSG | SP12 | 185 |
| GGKGSGGKGSGGKGS | SP13 | 186 |
| GGSGGGGSGGGGS | SP14 | 187 |
| GGSGGS | SP15 | 188 |
| GGSGGSGGSGS | SP16 | 189 |
| GSGGG | SP17 | 190 |
| GSGSG | SP18 | 191 |
| GSS | SP19 | |
| GSSG | SP20 | 192 |
| GSSGGSGGSG | SP21 | 193 |
| GSSGGSGGSGG | SP22 | 194 |
| GSSGGSGGSGGS | SP23 | 195 |
| GSSGGSGGSGGSG | SP24 | 196 |
| GSSGGSGGSGGSGGGS | SP25 | 197 |
| GSSGGSGGSGS | SP26 | 198 |
| GSSGT | SP27 | 199 |
| GSSSG | SP28 | 200 |
| QGQSGQ | SP29 | 201 |
| QGQSGQG | SP30 | 202 |

[0348]

| 表 C<br>用于蛋白酶可切割接头的间隔子序列 | | |
|---|---|---|
| **间隔子序列** | **名称** | **SEQ ID NO:** |
| QGQSGS | SP31 | 203 |
| QSGQ | SP32 | 204 |
| QSGQG | SP33 | 205 |
| QSGS | SP34 | 206 |
| SGQ | SP35 | |
| SGQG | SP36 | 207 |
| SGS | SP37 | |
| $(G)_n$ | SP38 | 208 |

[0349] 在一些实施例中,如上述表C中所使用的,n是1至10的整数,例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[0350] 6.4.4.示例性蛋白酶可切割接头

[0351] 下面的表D中列出了包含一个或多个底物序列以及间隔子序列的示例性蛋白酶可切割接头。

[0352]

| 表 D<br>蛋白酶可切割接头序列 | | | |
|---|---|---|---|
| **接头序列** | **名称** | **裂解蛋白酶** | **SEQ ID NO:** |
| GGGISSGLLSGRSDNHGGGISSGLLSGRSDNHGGS | PCL1 | | 209 |
| GGGISSGLLSGRSDNHGGGISSGLLSGRSDNHGGS | PCL2 | | 209 |
| GGSGGSIPVSLRSGGGISSGLLSGRSDNHGGSGGS | PCL3 | | 210 |
| GGSGGSVPLSLYSGGGISSGLLSGRSDNHGGSGGS | PCL4 | | 211 |
| GGSHPVGLLARGGGHPVGLLARGGGHPVGLLARGS | PCL5 | | 212 |
| GGSHPVGLLARGGGHPVGLLARGGSGRSAGGSGRSA | PCL6 | | 213 |
| AVGLLAPPGGLSGRSANI | PCL7 | ADAM17_2、FAPa_1、CTSL1_1 | 214 |
| AVGLLAPPGGLSGRSANP | PCL8 | FAPa_1、ADAM17_2、CTSL1_1 | 215 |
| AVGLLAPPGGLSGRSDDH | PCL9 | MMP14_1、MMP14_1、MMP14_1 | 216 |
| AVGLLAPPGGLSGRSDIH | PCL10 | MMP14_1、MMP14_1、MMP14_1 | 217 |
| AVGLLAPPGGLSGRSDNH | PCL11 | MMP14_1、MMP14_1 | 218 |
| AVGLLAPPGGLSGRSDNI | PCL12 | MMP14_1、CTSL1_1、ADAM17_2 | 219 |
| AVGLLAPPGGLSGRSDNP | PCL13 | CTSL1_1、ADAM17_2、FAPa_1 | 220 |
| AVGLLAPPGGLSGRSDQH | PCL14 | | 221 |

[0353]

| 表 D<br>蛋白酶可切割接头序列 | | | |
|---|---|---|---|
| **接头序列** | **名称** | **裂解蛋白酶** | **SEQ ID NO:** |
| AVGLLAPPGGLSGRSDTH | PCL15 | FAPa_1、CTSL1_1、ADAM17_2 | 222 |
| AVGLLAPPGGLSGRSDYH | PCL16 | | 223 |
| AVGLLAPPGGTSTSGRSANPRG | PCL17 | | 224 |
| AVGLLAPPSGRSANPRG | PCL18 | | 225 |
| AVGLLAPPTSGRSANPRG | PCL19 | | 226 |
| GGALFKSSFPGPAGLYAQPLAQKLKSSGGK | PCL20 | CTSL1_1、MMP14_1、ADAM17_2 | 227 |
| GGGGSGGGGSGGGGSFVGGTGGGGSGGGGSGGS | PCL21 | | 228 |
| GGGGSGGGGSGGGGSISSGLLSGRSDNHGGSGGS | PCL22 | | 229 |
| GGGGSGGGGSGGGGSVPLSLYSGGGSGGSGGSGS | PCL23 | | 230 |
| GGGGSGGGGSGPLGLWSQGGGGSGGGGSGGGGSGG | PCL24 | | 231 |
| GGGGSGGGGSKKAAPGGGGSGGGGSGGGGSGGS | PCL25 | | 232 |
| GGGGSGGGGSKKAAPVNGGGGGSGGGGSGGGGS | PCL26 | | 233 |
| GGGGSGGGGSPMAKKGGGGSGGGGSGGGGSGGS | PCL27 | | 234 |
| GGGGSGGGGSPMAKKVNGGGGGSGGGGSGGGGS | PCL28 | | 235 |
| GGGGSGGGGSQARAKGGGGSGGGGSGGGGSGGS | PCL29 | | 236 |
| GGGGSGGGGSQARAKVNGGGGGSGGGGSGGGGS | PCL30 | | 237 |
| GGGGSGGGGSRQARVVNGGGGGSGGGGSGGGGS | PCL31 | | 238 |
| GGGGSGGGGSRQARVVNGGGGGSVPLSLYSGGGGGSGGGGS | PCL32 | | 239 |
| GGGGSGGGGSRQARVVNSVPLSLYSGGGGGSGGGGS | PCL33 | | 240 |
| GGGGSGGGGSVHMPLGFLGPGGGGSGGGGSGGS | PCL34 | | 241 |
| GGGGSVHMPLGFLGPGRSRGSFPGGGGS | PCL35 | | 242 |
| GGGGSVHMPLGFLGPPMAKKGGGGSGGGGSGGS | PCL36 | | 243 |
| GGGGSVHMPLGFLGPRQARVVNGGGGSGGGGS | PCL37 | | 244 |
| GGGGSVHMPLGFLGPRQARVVNGGGGSGGGGSGG | PCL38 | | 245 |
| GGPLAQKLKSSALFKSSFPGPAGLYAQGGR | PCL39 | ADAM17_2、CTSL1_1、MMP14_1 | 246 |

[0354]

| 表 D<br>蛋白酶可切割接头序列 | | | |
|---|---|---|---|
| **接头序列** | **名称** | **裂解蛋白酶** | **SEQ ID NO:** |
| GLSGRSDNHGGAVGLLAPP | PCL40 | | 247 |
| GLSGRSDNHGGVHMPLGFLGP | PCL41 | | 248 |
| ISSGLLSGRSANI | PCL42 | MMP、丝氨酸蛋白酶 | 249 |
| ISSGLLSGRSANP | PCL43 | MMP、丝氨酸蛋白酶 | 250 |
| ISSGLLSGRSANPRG | PCL44 | MMP、丝氨酸蛋白酶 | 251 |
| ISSGLLSGRSDDH | PCL45 | MMP、丝氨酸蛋白酶 | 252 |
| ISSGLLSGRSDIH | PCL46 | MMP、丝氨酸蛋白酶 | 253 |
| ISSGLLSGRSDNH | PCL47 | MMP、丝氨酸蛋白酶 | 254 |
| ISSGLLSGRSDNI | PCL48 | CTSL1_1、MMP14_1 | 255 |
| ISSGLLSGRSDNP | PCL49 | MMP、丝氨酸蛋白酶 | 256 |
| ISSGLLSGRSDQH | PCL50 | MMP、丝氨酸蛋白酶 | 257 |
| ISSGLLSGRSDTH | PCL51 | MMP、丝氨酸蛋白酶 | 258 |
| ISSGLLSGRSDYH | PCL52 | MMP、丝氨酸蛋白酶 | 259 |
| ISSGLLSGRSGNH | PCL53 | MMP、丝氨酸蛋白酶 | 260 |
| ISSGLLSSGGSGGSLSGRSDNH | PCL54 | | 261 |
| ISSGLLSSGGSGGSLSGRSGNH | PCL55 | | 262 |
| KGGPGGPAGIGPLAQRLRSSALFKSSFPGR | PCL56 | FAPa_1、ADAM17_1、CTSL1_1 | 263 |
| KSGPGGPAGIGALFFSSPPLAQKLKSSGGR | PCL57 | FAPa_1、CTSL1_2、ADAM17_2 | 264 |
| LSGRSDNHGGAVGLLAPP | PCL58 | | 265 |
| LSGRSDNHGGSGGSISSGLLSS | PCL59 | | 266 |
| LSGRSDNHGGSGGSQNQALRMA | PCL60 | | 267 |
| LSGRSDNHGGVHMPLGFLGP | PCL61 | | 268 |
| LSGRSGNHGGSGGSISSGLLSS | PCL62 | | 269 |
| LSGRSGNHGGSGGSQNQALRMA | PCL63 | | 270 |
| QNQALRMAGGSGGSLSGRSDNH | PCL64 | | 271 |
| QNQALRMAGGSGGSLSGRSGNH | PCL65 | | 272 |
| RGGALFKSSFPLAQKLKSSGPAGLYAQGGK | PCL66 | CTSL1_1、ADAM17_2、MMP14_1 | 273 |
| RGGGPAGLYAQPLAQKLKSSALFKSSFPGG | PCL67 | MMP14_1、ADAM17_2、CTSL1_1 | 274 |
| SGGFPRSGGSFNPRTFGSKRKRRGSRGGGG | PCL68 | 凝血酶、Xa 因子、hepsin | 275 |
| SGPLAQKLKSSGPAGLYAQALFKSSFPGSK | PCL69 | ADAM17_2、MMP14_1、CTSL1_1 | 276 |
| TSTSGRSANPRGGGAVGLLAPP | PCL70 | | 277 |
| TSTSGRSANPRGGGVHMPLGFLGP | PCL71 | | 278 |
| VHMPLGFLGPGGLSGRSDNH | PCL72 | | 279 |

[0355]

| 表 D<br>蛋白酶可切割接头序列 | | | |
|---|---|---|---|
| **接头序列** | **名称** | **裂解蛋白酶** | **SEQ ID NO:** |
| VHMPLGFLGPGGTSTSGRSANPRG | PCL73 | | 280 |
| SGRSAGGGSGRSAGGGSGRSA | PCL74 | uPA | 281 |
| HPVGLLARGGGHPVGLLARGGGSGRSAGGGSGRSA | PCL75 | MPA（MMP-2 和 uPA） | 282 |
| GPLGVRGK | PCL76 | MMP-2 | 283 |
| HPVGLLAR | PCL77 | MMP-2 | 173 |
| GPQGIAGQ | PCL78 | MMP-2、MMP-9 以及某种程度上 MT1-MMP | 67 |
| VPMSMRGG | PCL79 | MMP-9 和 MMP-2 | 284 |
| IPVSLRSG | PCL80 | MMP-2 以及在某种程度上 MMP-9 或 MMP-7 | 82 |
| RPFSMIMG | PCL81 | MMP-9 和 MMP-7，某种程度上 MMP-3 | 285 |
| VPLSLTMG | PCL82 | MMP-7、在某种程度上 MMP-9、MMP-2、MPT-1-MMP | 286 |
| VPLSLYSG | PCL83 | MMP-2、MMP-9、MMP-7 | 169 |
| IPESLRAG | PCL84 | MMP-2、MMP-7、MMP-9，某种程度上 MPT-1-MMP | 287 |
| VPLSLYSGGGISSGLLSGRSDNH | PCL85 | | 288 |
| GGGISSGLLSGRSDNHGGGS | PCL86 | | 289 |
| GGGHPVGLLARGGGS | PCL87 | | 290 |
| GGGSGGGSGGGGISSGLLSGRSDNHGGGSGGGSGGS | PCL88 | | 291 |
| GGGGISSGLLSGRSDNHGGGISSGLLSGRSDNHGGS | PCL89 | | 292 |
| GGGSGGSIPVSLRSGGGISSGLLSGRSDNHGGSGGS | PCL90 | | 293 |
| GGGSGGSVPLSLYSGGGISSGLLSGRSDNHGGSGGS | PCL91 | | 294 |
| GGGSHPVGLLARGGGHPVGLLARGGGHPVGLLARGS | PCL92 | | 295 |
| GGGSHPVGLLARGGGHPVGLLARGGSGRSAGGSGRS | PCL93 | | 296 |
| GISSGLLSGRSDNHG | PCL94 | | 297 |
| GGGSISSGLLSGRSDNHGGGS | PCL95 | | 298 |

[0356] 在某些方面,蛋白酶可切割接头包含与表D中列出的序列相比具有多达5个、多达4个、多达3个、多达2个或多达1个氨基酸取代的氨基酸序列。因此,在一些实施例中,蛋白酶可切割接头包含表D中的任何氨基酸序列或由其组成,这些氨基酸序列与表D中列出的序列相比具有1-5个氨基酸取代。

[0357] 6.5.不可切割接头

[0358] 在某些方面,本公开提供了IFN前蛋白,其中IFN前蛋白的两个或更多个组分通过肽接头彼此连结。通过实例而非限制,接头可用于连接Fc结构域和靶向部分或靶向部分内

的不同结构域(例如,scFv中的VH和VL结构域)。

[0359] 优选地,除了其切割导致IFN活化的蛋白酶可切割接头之外,IFN前蛋白中的所有接头都是不可切割接头(NCL)。

[0360] 不可切割接头的范围可以是2个氨基酸至60个或更多个氨基酸,并且在某些方面中,不可切割肽接头在长度上范围可以为3个氨基酸至50个氨基酸、4至30个氨基酸、5至25个氨基酸、10至25个氨基酸、10个氨基酸至60个氨基酸、12个氨基酸至20个氨基酸、20个氨基酸至50个氨基酸或25个氨基酸至35个氨基酸。

[0361] 在特定方面中,不可切割接头在长度上为至少5个氨基酸、至少6个氨基酸或至少7个氨基酸,并且任选地在长度上为最多30个氨基酸、最多40个氨基酸、最多50个氨基酸或最多60个氨基酸。

[0362] 在前述的一些实施例中,不可切割接头在长度上范围为5个氨基酸至50个氨基酸,例如,在长度上范围为5至50个氨基酸、5至45个氨基酸、5至40个氨基酸、5至35个氨基酸、5至30个氨基酸、5至25个氨基酸或5至20个氨基酸。在前述的其他实施例中,不可切割接头在长度上范围为6个氨基酸至50个氨基酸,例如,在长度上范围为6至50个氨基酸、6至45个氨基酸、6至40个氨基酸、6至35个氨基酸、6至30个氨基酸、6至25个氨基酸或6至20个氨基酸。在又其他实施例中,不可切割接头在长度上范围为7个氨基酸至50个氨基酸,例如,在长度上范围为7至50个氨基酸、7至45个氨基酸、7至40个氨基酸、7至35个氨基酸、7至30个氨基酸、7至25个氨基酸或7至20个氨基酸。

[0363] 带电的(例如,带电的亲水性接头)和/或柔性的不可切割接头是特别优选的。

[0364] 可用于本公开的IFN前蛋白中的柔性不可切割接头的实例包括由Chen等人,2013,Adv Drug Deliv Rev.65(10):1357-1369和Klein等人,2014,Protein Engineering,Design&Selection 27(10):325-330公开的那些。特别有用的柔性不可切割接头是或包括甘氨酸和丝氨酸的重复序列,例如,$G_nS$(SEQ ID NO:299)或$SG_n$(SEQ ID NO:300)的单体或多聚体,其中n是1至10的整数,例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一个实施例中,不可切割接头是或包含$G_4S$(SEQ ID NO:301)重复序列的单体或多聚体,例如,$(GGGGS)_n$(SEQ ID NO:301)。

[0365] 聚甘氨酸不可切割接头可适当地用于本公开的IFN前蛋白中。在一些实施例中,肽不可切割接头包含两个连续甘氨酸(2Gly)、三个连续甘氨酸(3Gly)、四个连续甘氨酸(4Gly(SEQ ID NO:302))、五个连续甘氨酸(5Gly(SEQ ID NO:303))、六个连续甘氨酸(6Gly(SEQ ID NO:304))、七个连续甘氨酸(7Gly(SEQ ID NO:305))、八个连续甘氨酸(8Gly(SEQ ID NO:306))或九个连续甘氨酸(9Gly(SEQ ID NO:307))。

[0366] 下面的表E中列出了示例性不可切割接头序列。

[0367]

| 表 E<br>不可切割接头序列 | | |
|---|---|---|
| **接头序列** | **名称** | **SEQ ID NO:** |
| GGGGSLALGPGGGGGSLALGPGGGGGSLALGPGGS | NCL1 | 308 |
| GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS | NCL2 | 309 |
| $(GGGGS)_n$，任选地，其中 n=1-10，*例如*，1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 | NCL3 | 174 |
| $(GGGS)_n$，任选地，其中 n=1-10，*例如*，1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 | NCL4 | 175 |
| $(GGS)_n$，任选地，其中 n=1-10，*例如*，1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 | NCL5 | 176 |
| $(GS)_n$，任选地，其中 n=1-10，*例如*，1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 | NCL6 | 177 |
| $(GSGGS)_n$，任选地，其中 n=1-10，*例如*，1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 | NCL7 | 178 |
| ADAAP | NCL8 | 310 |
| ADAAPTVSIFP | NCL9 | 311 |
| ADAAPTVSIFPP | NCL10 | 312 |
| AKTTAP | NCL11 | 313 |
| AKTTAPSVYPLAP | NCL12 | 314 |
| AKTTPKLEEGEFSEARV | NCL13 | 315 |
| AKTTPKLGG | NCL14 | 316 |
| AKTTPP | NCL15 | 317 |
| AKTTPPSVTPLAP | NCL16 | 318 |
| ASTKGP | NCL17 | 319 |
| ASTKGPSVFPLAPASTKGPSVFPLAP | NCL18 | 320 |
| EGKSSGSGSESKST | NCL19 | 321 |
| GEGESGEGESGEGES | NCL20 | 322 |
| GEGESGEGESGEGESGEGES | NCL21 | 323 |
| GEGGSGEGGSGEGGS | NCL22 | 324 |
| GENKVEYAPALMALS | NCL23 | 325 |
| GGEGSGGEGSGGEGS | NCL24 | 326 |
| GGGESGGEGSGEGGS | NCL25 | 327 |
| GGGESGGGESGGGES | NCL26 | 328 |
| GGGGSGGGGS | NCL27 | 179 |
| GGGGSGGGGSGGGGS | NCL28 | 180 |
| GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS | NCL29 | 181 |
| GGGKSGGGKSGGGKS | NCL30 | 182 |
| GGGKSGGKGSGKGGS | NCL31 | 183 |
| GGGS | NCL32 | 184 |

[0368]

| 表 E<br>不可切割接头序列 | | |
|---|---|---|
| **接头序列** | **名称** | **SEQ ID NO:** |
| GGGSG | NCL33 | 185 |
| GGKGSGGKGSGGKGS | NCL34 | 186 |
| GGSG | NCL35 | 329 |
| GGSGG | NCL36 | 330 |
| GGSGGGGSG | NCL37 | 331 |
| GGSGGGGSGGGGS | NCL38 | 187 |
| GHEAAAVMQVQYPAS | NCL39 | 332 |
| GKGGSGKGGSGKGGS | NCL40 | 333 |
| GKGKSGKGKSGKGKS | NCL41 | 334 |
| GKGKSGKGKSGKGKSGKGKS | NCL42 | 335 |
| GKPGSGKPGSGKPGS | NCL43 | 336 |
| GKPGSGKPGSGKPGSGKPSGS | NCL44 | 337 |
| GPAKELTPLKEAKVS | NCL45 | 338 |
| GSAGSAAGSGEF | NCL46 | 339 |
| GSGGG | NCL47 | 190 |
| GSGSG | NCL48 | 191 |
| GSS | NCL49 | |
| GSSG | NCL50 | 192 |
| GSSGGSGGSG | NCL51 | 193 |
| GSSGGSGGSGG | NCL52 | 194 |
| GSSGGSGGSGGS | NCL53 | 195 |
| GSSGGSGGSGGSG | NCL54 | 196 |
| GSSGGSGGSGGSGGGS | NCL55 | 197 |
| GSSGGSGGSGS | NCL56 | 198 |
| GSSGT | NCL57 | 199 |
| GSSSG | NCL58 | 200 |
| GSTSGSGKPGSGEGSTKG | NCL59 | 340 |
| GTAAAGAGAAGGAAAGAAG | NCL60 | 341 |
| GTSGSSGSGSGGSGSGGGG | NCL61 | 342 |
| IRPRAIGGSKPRVA | NCL62 | 343 |
| KESGSVSSEQLAQFRSLD | NCL63 | 344 |
| KTTPKLEEGEFSEAR | NCL64 | 345 |
| PRGASKSGSASQTGSAPGS | NCL65 | 346 |
| QPKAAP | NCL66 | 347 |
| QPKAAPSVTLFPP | NCL67 | 348 |
| RADAAAA$(G4S)_4$ | NCL68 | 349 |
| RADAAAAGGPGS | NCL69 | 350 |
| RADAAP | NCL70 | 351 |
| RADAAPTVS | NCL71 | 352 |
| SAKTTP | NCL72 | 353 |
| SAKTTPKLEEGEFSEARV | NCL73 | 354 |
| SAKTTPKLGG | NCL74 | 355 |
| STAGDTHLGGEDFD | NCL75 | 356 |
| TVAAP | NCL76 | 357 |
| TVAAPSVFIFPP | NCL77 | 358 |
| TVAAPSVFIFPPTVAAPSVFIFPP | NCL78 | 359 |
| AGSGNSSGSGGSGGSGNSSGSGGSPVPSTPPTPSPSTPPT | NCL79 | 360 |

[0369]

| 表 E<br>不可切割接头序列 | | |
|---|---|---|
| **接头序列** | **名称** | **SEQ ID NO:** |
| PSPSAS | | |
| GGGGSAS | NCL80 | 361 |
| GGGGSGGGGSAS | NCL81 | 362 |
| GGGGSGGGGSGGGGSAS | NCL82 | 363 |
| GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSAS | NCL83 | 364 |
| GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSAS | NCL84 | 365 |
| AGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSAS | NCL85 | 366 |
| AGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSAS | NCL86 | 367 |
| AGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSAS | NCL87 | 368 |

[0370] 在某些方面,本公开的IFN前蛋白可包含在N-末端至C-末端取向上包含靶向部分(或靶向部分链)、铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域的多肽链(例如,如图1A中描绘的),或包含靶向部分(或靶向部分链)、铰链结构域、随后是蛋白酶可切割接头的多肽链(例如,如图1C中描绘的)。因此,铰链结构域可以说构成一种类型的接头。示例性铰链结构域在第6.8.3节中列出。

[0371] 6.6.靶向部分

[0372] 在本公开的IFN前蛋白中掺入靶向部分允许将高浓度的IFN递送至肿瘤微环境中,同时减少全身暴露,导致比用未被靶向的IFN分子获得的副作用少。

[0373] 预期在特定病灶或组织处存在或能够驱动IFN前蛋白的任何类型的靶分子可以由本公开的IFN前蛋白靶向。在一些实施例中,IFN前蛋白旨在例如通过诱导针对肿瘤组织的局部免疫应答来治疗癌症。因此,靶向分子可以是任何局部肿瘤和相关的靶分子。由本公开的IFN前蛋白的靶向部分识别的靶分子通常存在于,例如,经活化的T细胞表面上、肿瘤细胞的表面上、树突状细胞或其他抗原呈递细胞的表面上、自然杀伤(NK)细胞的表面上、病毒感染细胞的表面上、其他患病细胞的表面上、血清中游离状存在、存在于细胞外基质(ECM)中或靶位点中存在的免疫细胞中,例如,肿瘤反应性淋巴细胞。

[0374] 在各种实施例中,靶分子是细胞外基质(“ECM”)抗原、肿瘤反应性淋巴细胞抗原、肿瘤或病毒淋巴细胞的细胞表面分子、T细胞抗原(“TCA”)、检查点抑制剂、肿瘤相关抗原(“TAA)、树突状细胞(DC)或其他抗原呈递细胞(APC)抗原、或自然杀伤(NK)细胞抗原。技术人员将认识到,前述类别的靶分子不是相互排斥的,因此给定的靶分子可以落入多于一种前述类别的靶分子中。例如,一些分子可以被视为TAA和ECM蛋白,而其他分子可以被视为TCA和检查点抑制剂。

[0375] 可被靶向的示例性癌症类型包括急性淋巴细胞白血病、急性髓性白血病、胆管癌、B细胞白血病、B细胞淋巴瘤、胆管癌、骨癌、脑癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌、宫颈癌、伯基特淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、慢性粒细胞白血病、结直肠癌、子宫内膜癌、食道癌、胆囊癌、胃癌、胃肠道癌、神经胶质瘤、毛细胞白血病、头颈癌、霍奇金淋巴瘤、肝癌、肺癌、甲状腺髓样癌、黑色素瘤、多发性骨髓瘤、卵巢癌、非霍奇金淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、肺癌、肾癌、肉瘤、皮肤癌、睾丸癌、尿路上皮癌和其他膀胱癌。然而,本领域技术人员将认识到,与肿瘤微环境相关的TAA和其他靶分子对于几乎任何类型的癌症都是已知的。

[0376] ECM抗原的非限制性实例包括多配体聚糖、乙酰肝素酶、整联蛋白、骨桥蛋白、连接蛋白、钙粘蛋白、层粘连蛋白、层粘连蛋白型EGF、凝集素、纤连蛋白、缺口蛋白、粘连蛋白(例如,粘连蛋白-4)、腱生蛋白、胶原蛋白(例如,X型胶原蛋白)和基质蛋白。

[0377] 其他靶分子是肿瘤或病毒淋巴细胞的细胞表面分子,例如诸如CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C和B7-H3等T细胞共刺激蛋白。

[0378] 在特定的实施例中,靶分子是检查点抑制剂,例如CTLA-4、PD1、PDL1、PDL2、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、TIM3、GAL9、LAG3、VISTA、KIR、2B4、CD160、CGEN-15049、CHK1、CHK2。在具体实施例中,靶分子是PD1。在其他实施例中,靶分子是LAG3。在又其他实施例中,靶分子是PDL1。

[0379] 在某些实施例中,靶分子位于树突状细胞或其他抗原呈递细胞的表面上,诸如XCR1、Clec9a、CD1c、CD11c、CD14、PDL1、巨噬细胞甘露糖受体(CD206)和DEC-205。

[0380] 在进一步的实施例中,靶分子位于自然杀伤(NK)细胞的表面上,诸如CD335、CD38、CD2、NKG2D、NKp44、NKp30、CD16、LFA-1、CD27、KIR、NKH1A和NKp46。

[0381] 抗体和抗原结合部分通常结合至特定抗原决定簇并且能够将IFN前蛋白引导至靶位点,例如引导至携带抗原决定簇的特定类型的肿瘤细胞或肿瘤基质。在具体实施例中,靶向部分识别肿瘤相关抗原(TAA)。优选地,TAA是人类TAA。抗原可能存在于正常细胞上,也可能不存在于正常细胞上。在某些实施例中,与正常细胞相比,TAA优先地在肿瘤细胞上表达或上调。在其他实施例中,TAA是谱系标记。示例性TAA包括成纤维细胞活化蛋白(FAP)、腱生蛋白-C的A1结构域(TNC A1)、腱生蛋白-C的A2结构域(TNC A2)、纤连蛋白的额外结构域B(EDB)、黑色素瘤相关硫酸软骨素蛋白多糖(MCSP)、MART-1/Melan-A、gp100、二肽基肽酶IV(DPPIV)、腺苷脱氨酶结合蛋白(ADAbp)、环丝氨酸蛋白酶b、结直肠相关抗原(CRC)-C017-1A/GA733、癌胚抗原(CEA)及其免疫原性表位CAP-1和CAP-2、etv6、aml1、前列腺特异性抗原(PSA)及其免疫原性表位PSA-1、PSA-2和PSA-3、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、T细胞受体/CD3-zeta链、MAGE家族肿瘤抗原(例如,MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、MAGE-Xp2(MAGE-B2)、MAGE-Xp3(MAGE-B3)、MAGE-Xp4(MAGE-B4)、MAGE-C1、MAGE-C2、MAGE-C3、MAGE-C4、MAGE-C5)、GAGE家族肿瘤抗原(例如,GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、GAGE-8、GAGE-9)、BAGE、RAGE、LAGE-1、NAG、GnT-V、MUM-1、CDK4、酪氨酸酶、p53、MUC家族、HER2/neu、p21ras、RCAS1、α-胎蛋白、E-钙粘蛋白、α-连环蛋白、β-连环蛋白和γ-连环蛋白、p120ctn、gp100 Pmel117、PRAME、NY-ESO-1、cdc27、腺瘤性息肉病蛋白(APC)、胞衬蛋白、连接蛋白37、Ig-独特型、p15、gp75、GM2和GD2神经节苷脂、病毒产物(如人乳头瘤病毒蛋白)、Smad肿瘤抗原家族、Imp-1、P1A、EBV编码的核抗原(EBNA)-1、脑糖原磷酸化酶、SSX-1、SSX-2(HOM-MEL-40)、SSX-1、SSX-4、SSX-5、SCP-1和CT-7、c-erbB-2、Her2、EGFR、IGF-1R、CD2(T细胞表面抗原)、CD3(与TCR相关的异多聚体)、CD22(B细胞受体)、CD23(低亲和力IgE受体)、CD30(细胞因子受体)、CD33(髓细胞表面抗原)、CD40(肿瘤坏死因子受体)、IL-6R-(IL6受体)、CD20、MCSP、PDGFβR(β-血小板衍生的生长因子受体)、ErbB2上皮细胞粘附分子(EpCAM)、EGFR变体III(EGFRvIII)、CD19、二唾液酸神经节苷脂GD2、导管上皮粘蛋白、gp36、TAG-72、神经胶质瘤相关抗原、β-人绒毛膜促性腺激素、甲胎蛋白(AFP)、凝集素反应性AFP、

甲状腺球蛋白、MN-CA IX、人类端粒酶逆转录酶、RU1、RU2(AS)、肠羧基酯酶、mut hsp70-2、M-CSF、前列腺酶、前列腺酶特异性抗原(PSA)、PAP、LAGA-1a、p53、前列腺、PSMA、存活和端粒酶、前列腺癌肿瘤抗原-1(PCTA-1)、ELF2M、中性粒细胞弹性蛋白酶、ephrin B2、胰岛素生长因子(IGF1)-I、IGF-II、IGFI受体、5T4、ROR1、Nkp30、NKG2D、肿瘤基质抗原、纤连蛋白的额外结构域A(EDA)和额外结构域B(EDB)以及腱糖蛋白-C(TnC A1)的A1结构域。

[0382] 合适的靶向部分形式描述于第6.7节中。靶向部分优选是抗原结合部分,例如抗体或抗体的抗原结合部分,例如,如在第6.7.2节中描述的scFv或如在第6.7.1节中描述的Fab。

[0383] 在一些实施例中,靶向部分靶向下面的表F中列出的示例性靶分子,同时参考靶向部分可以基于的示例性抗体或抗体序列。

[0384]

| 表 F<br>示例性靶分子 | |
|---|---|
| **靶** | **抗体名称和/或结合序列** |
| 1-92-LFA-3 | Amevive™（阿法西普） |
| 5T4 | GEN1044 |
| II 型活化素受体 | Bimagrumab<br>VH：美国专利号 8,388,968 B2 的 SEQ ID No:107、109<br>VL：美国专利号 8,388,968 B2 的 SEQ ID No:93、95 |
| B7-H3 | 奥瑞达妥单抗(Obrindatamab) (MGD009) |
| B7-H3 (CD276) | 依布妥组单抗(MGA271) |
| B7-H3 (CD276) | MGC018 |
| B7-H3 (CD276) | MGA012 |
| B7-H3 (CD276) | 8H9 |
| B7-H3 (CD276) | VH：US 2021/0171641 A1 的 SEQ ID NO:21、26 或 31 的重链的 VH 序列。<br>VL：US 2021/0171641 A1 的 SEQ ID NO：20、22 或 30 的轻链的 VL 序列。 |
| B7-H3 (CD276) | VH：US 2019/0002563 A1 的 SEQ ID NO:21、29 或 37 的重链的 VH 序列。<br>VL：US 2019/0002563 A1 的 SEQ ID NO：17、25 或 33 的轻链的 VL 序列。 |
| B7-H3 (CD276) | VH：美国专利号 10,640,563 的 SEQ ID NO:146、147 或 148 的重链的 VH 序列。<br>VL：美国专利号 10,640,563 的 SEQ ID NO:143、144 或 145 的轻链的 VL 序列。 |
| BAFF/B 淋巴细胞刺激器 | Benlysta™ (velimumab) |
| BAFF/B 淋巴细胞刺激器 | VH：美国专利号 7,138,501 的 SEQ ID NO:327 的氨基酸 1-123<br>VL：美国专利号 7,138,501 的 SEQ ID NO:327 的氨基酸 139-249。 |
| BAFF/B 淋巴细胞刺激器 | VH：美国专利号 7,605,236 的 SEQ ID NO:1321 的氨基酸 1-126；<br>VL：美国专利号 7,605,236 的 SEQ ID NO:1049 的氨基酸 143-251。 |
| BAFF/B 淋巴细胞刺激器 | 贝利木单抗 |
| BCMA | VH：US 2021/0206865 A1 的 SEQ ID NO.126 的重链的 VH 序列<br>VL：US 2021/0206865 A1 的 SEQ ID NO.129 或 SEQ ID NO.132 的轻链的 VL 序列 |
| CA125 | 伊戈布单抗 |
| CA125 | OvaRex™（奥瑞布单抗） |
| 钙粘蛋白 | 描述于美国公开号 US 2006/0039915 中的抗体。 |
| N-钙粘蛋白 | 与美国公开号 US 2010/0278821 的 SEQ ID NO: 10、17 或 18 的氨基酸序列结合的抗体。 |
| CD11a | Raptiva™（依法珠单抗）<br>Werther 等人, 1996, The Journal of Immunology |

[0385]

| 表 F<br>示例性靶分子 | |
|---|---|
| **靶** | **抗体名称和/或结合序列** |
| | 157(11): 4986-4995 中的序列。 |
| CD19 | Blincyto™（博纳吐单抗） |
| CD19 | SGN-CD19A |
| CD20 | Bexxar™（托西莫单抗）<br>VH：美国专利公开 US 2017/0002060 A1 的 SEQ ID NO:124 的重链的 VH 序列<br>VL：美国专利公开 US 2017/0002060 A1 的 SEQ ID NO:125 的轻链的 VL 序列 |
| CD20 | Zevalin™（替伊莫单抗）<br>VH：美国专利号 5,736,137 的 SEQ ID NO:9<br>VL：美国专利号 5,736,137 的 SEQ ID NO:6 |
| CD20 | Rituxan™（利妥昔单抗）<br>VH：美国专利号 5,736,137 的 SEQ ID NO:9<br>VL：美国专利号 5,736,137 的 SEQ ID NO:6 |
| CD20 | Ocrevus™（奥瑞珠单抗） |
| CD20 | 奥卡妥珠单抗 |
| CD20 | Arzerra™（奥法木单抗）<br>VH：美国专利号 8,529,902 的 SEQ ID NO:2<br>VL：美国专利号 8,529,902 的 SEQ ID NO:4 |
| CD20 | Gazyva™（奥比妥珠单抗） |
| CD20 | VH：US 2021/0206870 A1 的 SEQ ID NO: 4<br>US 2021/0206870 A1 的 SEQ ID NO:6 的 VL |
| CD20 | 依普利他单抗 |
| CD22 | 贝利木单抗 |
| CD22 | 依帕珠单抗 |
| CD22 | Besponsa ™（伊妥珠单抗奥佐米星） |
| CD22 | Lumoxiti ™（莫西妥尤单抗 pasudox） |
| CD22 | 匹那珠单抗维多丁 |
| CD25 | Zenapax™（达珠单抗）<br>VH：美国专利号 7,060,269 的 SEQ ID NO:9<br>VL：美国专利号 7,060,269 的 SEQ ID NO:10 |
| CD30 | Adcetris™（本妥昔单抗）<br>VH：美国专利号 7,090,843 的 SEQ ID NO:2<br>VL：美国专利号 7,090,843 的 SEQ ID NO:10 |
| CD33 | Myelotarg™（吉妥珠单抗）<br>Man Sung 等人, 1993, Molecular immunology 30:1361-1367 中的序列 |
| CD33 | 林妥珠单抗 |
| CD38 | Darzalex™（达雷妥尤单抗） |
| CD38 | 如 PCT 公开 WO2015/009726A2 和其中引用的参考文献中公开的 IB4、HB7 CS/2、克隆 90 和 NIM-R5。 |
| CD40 | 卢卡木单抗 |

[0386]

| 表 F<br>示例性靶分子 | |
|---|---|
| **靶** | **抗体名称和/或结合序列** |
| CD40 | 达赛珠单抗 |
| CD40L | Hu5c8（鲁普利珠单抗） |
| CD44v6 | 维巴珠单抗美坦辛 |
| CD52 | Campath™（阿仑单抗）<br>VH：美国专利公开 US 2017/0002060 A1 的 SEQ ID NO:1<br>VL：美国专利公开 US 2017/0002060 A1 的 SEQ ID NO:2 |
| CD70 | Blenrep ™ (borsetuzumab mafodotin) |
| CD123 | 弗洛妥珠单抗 |
| CD206 | 具有 WO2003/040169A2 的 SEQ ID NO.2 的 VH 和 SEQ ID NO:4 的 VL 的抗 CD206 抗体 |
| CD221 | Tepezza ™（替妥木单抗） |
| CEA | Hybri-Ceaker®（阿图莫单抗喷替酯） |
| CEA | Scintimun™（贝索索单抗） |
| CEA | CEA-CIDE™（拉贝珠单抗）） |
| CEA | CEA-Scan ™（阿西莫单抗） |
| CEA | hMN-15<br>美国专利号 8,771,690 B2 的 SEQ ID No:4-6 的 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3 序列<br>美国专利号 8,771,690 B2 的 SEQ ID No:1-3 的 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3 序列 |
| CEA | 来自临床试验 NCT02324257 的 RO6958688/RG7802 的 CEA 结合部分 |
| CEA | 西比沙他单抗 |
| CEA | 来自临床试验 NCT01284231 和 NCT02291614 的 MEDI-565/MT110/AMG211 的 CEA 结合部分<br>VH：PCT 公开号 WO 2013/012414 A1 的 SEQ ID NO:49 或 51<br>VL：PCT 公开号 WO 2013/012414 A1 的 SEQ ID NO:48。 |
| CEA | 拉贝珠单抗 |
| CEA | 阿替珠单抗 |
| CEA | 西比沙他单抗 |
| CEA | MEDI-565（AMG211、MT111） |
| CEA | RO6958688 |
| CEA | VH：WO2022/048883A1 中描述的 SEQ ID No. 9<br>VL：WO2022/048883A1 中描述的 SEQ ID No. 10 |
| CLDN18.2 | AMG910 |
| Clec9a | 具有 PCT 公开号 WO2009/026660A1 的 SEQ ID No.43 和 48 的 VH 和 VL 氨基酸的抗 Clec9a 抗体 |
| Clec9a | 具有 PCT 公开号 WO2022/073062A1 的 SEQ ID NO.38 的 VH 和 SEQ ID NO:37 或 SEQ ID NO:43 的 VL 的抗 Clec9a 抗体 |

[0387]

| 表 F<br>示例性靶分子 | |
|---|---|
| **靶** | **抗体名称和/或结合序列** |
| | 具有 PCT 公开号 WO2022/073062A1 的 SEQ ID NO.8 的 VH 和 SEQ ID NO:7 的 VL 的抗 Clec9a 抗体 |
| 胶原蛋白 α-4 链 | TRC093 (MT293) |
| 胶原蛋白 | 胶原蛋白结合抗体片段，描述于 Liang 等人, 2016, Sci.Rep.5, 18205; doi: 10.1038/srep18205 (2016)。 |
| I 型胶原蛋白 | 西妥昔单抗（爱必妥） |
| X 型胶原蛋白 | PCT 公开号 WO 2019/020797 的 SEQ ID NO: 1 或 2 的氨基酸序列。 |
| X 型胶原蛋白 | PCT 公开号 WO 2014/180992 的 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列。 |
| X 型胶原蛋白 | 如 I. Girkontaite 等人，“Immunolocalization of type X collagen in normal fetal and adult osteoarthritic cartilage with monoclonal antibodies,” Matrix Biol 15, 231-238 (1996)中描述的抗体 X34。 |
| X 型胶原蛋白 | 从 ThermoFisher Scientific 根据目录号 PA5-115039 或 PA5-116871 或 PA5-97603 或 PA5-49198 出售的抗体 X53 或 1H8 或 ARC0659 或 JF0961 胶原蛋白 X 多克隆抗体。 |
| X 型胶原蛋白 | 从 RDI 根据目录号 RDI-COLL10abr 出售的抗体。 |
| 补体 C5 | Soliris™（依库丽单抗）<br>VH：美国专利号 6,355,245 的 SEQ ID NO: 10 的氨基酸 1-122<br>VL：美国专利号 6,355,245 的 SEQ ID NO: 9 的氨基酸 3-110 |
| CTLA-4 | Yervoy™（伊匹单抗）<br>VH：WO 2001/014424 A2 的 SEQ ID NO: 17<br>VL：WO 2001/014424 A2 的 SEQ ID NO: 7 |
| CTLA-4 | （曲美木单抗） |
| CTLA-4 | Orencia™（阿巴西普） |
| DEC-205 | 具有 PCT 公开 WO2009/061996A2 的 SEQ ID NO.4/10、16/22、28/34、40/46、52/58 和 76/82 的 VH/VL 对的抗 DEC-205 抗体 |
| DLL3 | AMG757 |
| EGFR | 爱必妥™（西妥昔单抗）<br>VH：美国专利号 6,217,866 的 SEQ ID NO: 11<br>VL：美国专利号 6,217,866 的 SEQ ID NO: 13 |
| EGFR | Vectibix™（帕尼单抗）<br>VH：美国专利号 6,235,883 的 SEQ ID NO: 37<br>VL：美国专利号 6,235,883 的 SEQ ID NO: 38 |
| EGFR | 扎鲁木单抗<br>VH：WO 2018/140831 A2 的 SEQ ID NO: 64<br>VL：WO 2018/140831 A2 的 SEQ ID NO: 69 |

[0388]

| 表 F<br>示例性靶分子 | |
|---|---|
| **靶** | **抗体名称和/或结合序列** |
| EGFR | 马帕木单抗 |
| EGFR | 马图珠单抗 |
| EGFR | 尼妥珠单抗<br>VH：WO 2018/140831 A2 的 SEQ ID NO: 51<br>VL：WO 2018/140831 A2 的 SEQ ID NO: 56 |
| EGFR | ICR62 |
| EGFR | mAb 528 |
| EGFR | CH806 |
| EGFRv3 | AMG596 |
| EGFRv3 | AMG404 |
| EGFR/CD64 | MDX-447 |
| EpCAM | Panorex ™（依德可洛单抗）<br>VH：WO 2018/140831 A2 的 SEQ ID NO:129<br>VL：WO 2018/140831 A2 的 SEQ ID NO:134 |
| EpCAM | 阿德卡木单抗<br>VH：WO 2018/140831 A2 的 SEQ ID NO:142<br>VL：WO 2018/140831 A2 的 SEQ ID NO:147 |
| EpCAM | 妥妥珠单抗细胞白细胞介素 |
| EpCAM | 泊西他组单抗 |
| EpCAM | EP1629013 B1<br>VH：SEQ ID No: 80、84、88、92 或 96<br>VL：SEQ ID No: 82、86、90、94 或 98 |
| EpCAM | G8.8<br>HC：美国专利公开号 US 2020/0317806 A1 的 SEQ ID NO: 4<br>HL：美国专利公开号 US 2020/0317806 A1 的 SEQ ID NO: 3 |
| EpCAM | VH：WO 2021/211510 A2 的 SEQ ID No: 17-22。<br>VL：WO 2021/211510 A2 的 SEQ ID NO: 15-16。 |
| EpCAM | Removab ™（卡妥索单抗） |
| EpCAM | Vicineum ™（莫奥珠单抗） |
| EpCAM | M701 |
| RSV 的 F 蛋白 | Synagic™（帕利珠单抗） |
| GD2 | 3F8 |
| 糖蛋白受体 IIb/IIIa | ReoPro™（阿昔单抗） |
| gpA33 | MGD007 |
| GPC3 | ERY974 |
| GUCY2C | PF-07062119 |
| 乙酰肝素酶 | 选自 HP130、HP 239、HP 108.264、HP 115.140、HP 152.197、HP 110.662、HP 144.141、HP 108.371、HP 135.108、HP 151.316、HP 117.372、HP 37/33、HP3/17、HP 201 或 HP 102 的抗体或描述于美国专利公开 US 2004/0170631 中的 SEQ ID NO: 1-11 的氨基酸序列。 |
| Her2 | Herceptin™（曲妥珠单抗） |

[0389]

| 表 F<br>示例性靶分子 | |
|---|---|
| **靶** | **抗体名称和/或结合序列** |
| Her2 | 阿地白介素（白介素原） |
| Her2 | 沙格莫司亭(Sargramustim)（亮氨酸） |
| Her2 | M802 |
| Her2 | 鲁尼莫他单抗（BTRC4017A，R07227780） |
| Her2 | ISB1302 |
| Her2-neu | Perjeta™（帕妥珠单抗）<br>VH：WO 2013/096812 A1 的 SEQ ID NO:16。<br>VL：WO 2013/096812 A1 的 SEQ ID NO:15。 |
| Her2-neu | Rexomun™（艾妥索单抗） |
| IgE | Xolair™（奥马珠单抗） |
| IGFIR | （芬妥木单抗） |
| IL1β | Ilaris™（卡那单抗）<br>VH：美国专利号 7,446,175 的 SEQ ID NO:1。<br>VL：美国专利号 7,446,175 的 SEQ ID NO: 2 |
| IL12/IFN3 | Stelara™（优特克单抗） |
| IL1Ra | Antril™、Kineret™（安金拉） |
| IFNR | Simulect™（巴利昔单抗）<br>VH：美国专利号 6,383,487 的 SEQ ID NO: 3<br>VL：美国专利号 6,383,487 的 SEQ ID NO: 6 |
| IL6 | 克拉扎珠单抗 |
| IL6 受体 | Actemra™（托珠单抗）<br>VH：美国专利号 7,479,543 的 SEQ ID NO: 31<br>VL：美国专利号 7,479,543 的 SEQ ID NO: 29 |
| IL12/IFN3 p40 亚基 | Stelara™（优特克单抗）<br>VH：美国专利号 6,902,734 的 SEQ ID NO: 7<br>VL：美国专利号 6,902,734 的 SEQ ID NO: 8 |
| 整合素 α4 | Tysabri™（那他珠单抗）<br>VH：美国专利号 5,840,299 的 SEQ ID No: 11-13<br>VL：美国专利号 5,840,299 的 SEQ ID No: 7-8 |
| 整合素 α4 β7 | Entyvio ™（维多珠单抗）<br>HC：美国专利公开 US 2012/0282249 的 SEQ ID NO: 2。<br>LC：美国专利公开 US 2012/0282249 的 SEQ ID NO:4。 |
| 整合素 α5 β1 | VH：欧洲专利号 1 755 659 的 SEQ ID NO: 2。<br>VL：欧洲专利号 1 755 659 的 SEQ ID NO: 4。 |
| 整合素 β1 | VH：美国专利公开 US 2022/0089744 的 SEQ ID NO:2、6、8、10、12、14、29-43 或 91-100。<br>VL：美国专利公开 US 2022/0089744 的 SEQ ID NO:4、16、18、20、22、44-57 或 107-116。 |
| KIR | 具有 PCT 公开 WO2014/066532A1 的 SEQ ID NO: 5 的 VH 和 SEQ ID NO: 3 的 VL 的抗 KIR 抗体 |
| KIR | 具有 PCT 公开 WO2012/160448A2 的 SEQ ID NO: 1 的 VH 和 SEQ ID NO: 2 的 VL 的抗 KIR 抗体 |

[0390]

| 表 F<br>示例性靶分子 | |
|---|---|
| **靶** | **抗体名称和/或结合序列** |
| | 具有 PCT 公开 WO2012/160448A2 的 SEQ ID NO: 3 的 VH 和 SEQ ID NO: 4 的 VL 的抗 KIR 抗体 |
| LAG3 | 瑞拉利单抗(BMS-98016) |
| LAG3 | Sym022 |
| LAG3 | HLX26 |
| LAG3 | TSR-033 |
| LAG3 | ABL501 |
| LAG3 | INCAGN02385 |
| LAG3 | 弗安利单抗(REGN3767) |
| LAG3 | RO7247669 |
| LAG3 | EMB-02 |
| LAG3 | FS118 |
| LAG3 | GSK2831781 |
| LAG3 | IBI323 |
| LAG3 | IBI110 |
| LAG3 | LAG525 |
| LAG3 | XmAb®22841 |
| LAG3 | LBL-007 |
| LAG3 | VH：美国专利号 9,902,772 的 SEQ ID NO:1、8、10 或 12。<br>VL：美国专利号 9,902,772 的 SEQ ID NO:2、3、4、5、6、7、9、11、13 或 14。 |
| LAG3 | VH：美国专利公开 US 2021/0095026 的 SEQ ID NO: 182。<br>VL:美国专利公开 US 2021/0095026 的 SEQ ID NO: 88。 |
| LAG3 | 具有美国公开 US2022/0056126A1 的 SEQ ID No 23/24、¾和 11/12 的 VH/VL 氨基酸序列的抗体。 |
| 层粘连蛋白 | 来自 Sigma Aldrich 的 Lam-89 |
| 间皮素 | 阿马妥昔单抗 |
| 间皮素 | HPN536 |
| MUC1 | 西伐珠单抗四环乙烷 |
| MUC1 | Pankomab ™（加替妥珠单抗） |
| MUC1 | 菲木单抗(Femtumumab) |
| MUC1 | 坎妥珠单抗拉坦辛 |
| MUC16 (CA125) | 具有 VH 和 VL 序列的抗 MUC16 抗体，这些 VH 序列和 VL 序列具有来自 US 2018/0118848A1 的以下 SEQ ID NO:对中的任一者的氨基酸序列：18/26；82/858；98/170 |
| MUC17 | AMG199 |
| 粘连蛋白-4 | 恩诺单抗（ASP7465、ASG-22CE、ASG-22ME）<br>VH：PCT 公开 WO 2021/151984 的 SEQ ID NO:3。<br>VL：PCT 公开 WO 2021/151984 的 SEQ ID NO: 4。 |
| 粘连蛋白-4 | SBT290 |

[0391]

| 表 F<br>示例性靶分子 | |
|---|---|
| **靶** | **抗体名称和/或结合序列** |
| 粘连蛋白-4 | VH：美国专利号 11,274,160 的 SEQ ID NO:1。<br>VL：美国专利号 11,274,160 的 SEQ ID NO:2。 |
| NGF | （坦尼珠单抗） |
| NKH1A | 保藏于 ATCC 并被分配登录号 HB8564 的单克隆抗体，如在美国专利号 4,772,552A 中描述的 |
| NKP46 | 具有 PCT 公开 WO2018/047154A1 的 SEQ ID No: 4、6 和 8 的 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3 序列以及 SEQ ID No: 12、14 和 16 的 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3 序列的抗 NKP46 抗体 |
| 骨桥蛋白 | HC：PCT 公开 WO 2021/030209 的 SEQ ID NO: 22。<br>LC：PCT 公开 WO 2021/030209 的 SEQ ID NO: 24。 |
| PD1 | MDX-1106 / BMS-936558（纳武单抗），人 IgG4 mAb，其结构描述于 WHO Drug Information，第 27 卷，第 1 期，第 68-69 页(2013)中，并且其重链和轻链序列公开于美国公开号 US20190270812A1 的图 7 中<br>HC：美国公开号 US20190270812A1 的 SEQ ID NO: 23<br>LC：美国公开号 US20190270812A1 的 SEQ ID NO: 24 |
| PD1 | MK-3475（派姆单抗），人源化 IgG4 mAb，其结构描述于 WHO Drug Information，第 27 卷，第 2 期，第 161-162 页(2013)中，并且其重链和轻链序列公开于美国公开号 US20190270812A1 的图 6 中<br>HC：美国公开号 US20190270812A1 的 SEQ ID NO: 21<br>LC：美国公开号 US20190270812A1 的 SEQ ID NO: 22 |
| PD1 | REGN2810（在美国公开号 20150203579 中公开为 H4H7798N）<br>HC：美国公开号 20150203579 的 SEQ ID NO: 330<br>LC：美国公开号 20150203579 的 SEQ ID NO: 331 |
| PD1 | 具有对应于美国专利号 11,034,765 B2 的以下 SEQ ID No.的 CDR H1-H3 和 CDR L1-L3 序列的抗 PD1 抗体：<br>a)分别是 SEQ ID No: 18、19、20、21、22 和 23；<br>b)分别是 SEQ ID No: 24、25、26、27、28 和 29；<br>c)分别是 SEQ ID No: 30、31、32、33、34 和 35；<br>d)分别是 SEQ ID No: 36、37、38、39、40 和 41；<br>e)分别是 SEQ ID No: 42、43、44、45、46 和 47；<br>f)分别是 SEQ ID No: 48、49、50、51、52 和 53；<br>g)分别是 SEQ ID No: 54、55、56、57、58 和 59；以及<br>h)分别是 SEQ ID No: 60、61、62、63、64 和 65。 |
| PD1 | 公开于 PCT 公开 WO2015112800A1 的表 1 至 3 中的抗 PD1 抗体，包括但不限于具有 VH/VL 对的抗 PD1 抗体，这些 VH/VL 对具有 PCT 公开 WO2015112800A1 的 SEQ ID No: 2/10、18/26、34/42、50/58、66/74、82/90、98/106、1 14/122、130/138、146/154、162/170、178/186、194/202、 |

[0392]

| 表 F<br>示例性靶分子 | |
|---|---|
| **靶** | **抗体名称和/或结合序列** |
| | 210/202、218/202、226/202、234/202、242/202、250/202、258/202、266/202、274/202、282/202、290/202、298/186、306/186 和 314/186。 |
| PD1 | 抗 PD1 抗体，在美国专利号 10,294,299 B2 中公开为具有以下关于重链和轻链可变结构域的 SEQ ID NO.对：<br>SEQ ID No. 164/178<br>SEQ ID No. 165/179<br>SEQ ID No. 166/180<br>SEQ ID No. 167/181<br>SEQ ID No. 168/182<br>SEQ ID No. 169/183<br>SEQ ID No. 170/184<br>SEQ ID No. 171/185<br>SEQ ID No. 172/186<br>SEQ ID No. 173/187<br>SEQ ID No. 174/188<br>SEQ ID No. 175/189<br>SEQ ID No. 176/190<br>SEQ ID No. 177/190 |
| PD1 | MEDI-0680 (AMP-514) |
| PD1 | PDR001（斯巴达珠单抗），人源化 IgG4 mAb，其重链和轻链序列在美国专利号 9683048 B2 中公开为 BAP049-Clone-E。<br>HC：美国专利号 9,683,048 的 SEQ ID NO: 91<br>LC：美国专利号 9,683,048 的 SEQ ID NO: 72 |
| PD1 | BGB-108 |
| PD1 | h409A11，描述于 WO2008/156712 中<br>HC：PCT 公开 WO2008/156712 的 SEQ ID NO: 31<br>LC：PCT 公开 WO2008/156712 的 SEQ ID NO: 36 |
| PD1 | h409A16，描述于 WO2008/156712 中<br>HC：PCT 公开 WO2008/156712 的 SEQ ID NO: 31<br>LC：PCT 公开 WO2008/156712 的 SEQ ID NO: 37 |
| PD1 | h409A17，描述于 WO2008/156712 中<br>HC：PCT 公开 WO2008/156712 的 SEQ ID NO: 31<br>LC：PCT 公开 WO2008/156712 的 SEQ ID NO: 38 |
| PD1 | 抗 PD1 抗体，在美国专利号 7,488,802 中描述为具有以下关于重链和轻链可变结构域的 SEQ ID NO.对：<br>SEQ ID No. 2/4<br>SEQ ID No. 6/8<br>SEQ ID No. 10/12<br>SEQ ID No. 14/16<br>SEQ ID No. 47/49 |
| PD1 | 美国专利号 7521051 中描述的抗 PD1 抗体为具有以下关于重链和轻链可变结构域的 SEQ ID NO.对： |

[0393]

| 表 F<br>示例性靶分子 | |
|---|---|
| **靶** | **抗体名称和/或结合序列** |
| | SEQ ID No. 2/4<br>SEQ ID No. 6/8<br>SEQ ID No. 10/12<br>SEQ ID No. 14/16<br>SEQ ID No. 47/49 |
| PD1 | 美国专利号 8008449 中描述的抗 PD1 抗体<br>为具有以下关于重链和轻链可变结构域的 SEQ ID NO.对：<br>SEQ ID No. 1/8<br>SEQ ID No. 2/9<br>SEQ ID No. 3/10<br>SEQ ID No. 4/11<br>SEQ ID No. 5/12<br>SEQ ID No. 6/13<br>SEQ ID No. 7/14 |
| PD1 | 抗 PD1 抗体，在美国专利号 8,354,509 中描述为具有以下关于重链和轻链全长结构域的 SEQ ID NO.对：<br>SEQ ID No. 31/36<br>SEQ ID No. 31/37<br>SEQ ID No. 31/38 |
| PD1 | 抗 PD1 抗体，在美国专利号 8,168,757 中描述为具有以下关于重链和轻链可变结构域的 SEQ ID NO.对：<br>SEQ ID No. 4/5<br>SEQ ID No. 12/13<br>SEQ ID No. 18/19<br>SEQ ID No.40/41<br>SEQ ID No.47/48<br>SEQ ID No.26/27<br>SEQ ID No.34/35<br>SEQ ID No.55/56<br>SEQ ID No.67/68 |
| PD1 | PCT 公开号 WO2004/004771 中描述的抗 PD1 抗体 |
| PD1 | PCT 公开号 WO2004/056875 中描述为具有以下关于重链和轻链可变结构域的 SEQ ID NO.对的抗 PD1 抗体：<br>SEQ ID No. 2/4<br>SEQ ID No. 6/8<br>SEQ ID No. 10/12<br>SEQ ID No. 14/16<br>SEQ ID No. 47/49 |
| PD1 | PCT 公开号 WO2004/072286 中描述的抗 PD1 抗体 |
| PD1 | VH：美国公开号 US2011/0271358 的 SEQ ID NO: 25、26、27、28 或 29<br>VL：美国公开号 US2011/0271358 的 SEQ ID NO: 30、31、32 或 33 |
| PD1 | SHR-1210 卡瑞利珠单抗，在 PCT 公开号 WO 2015/085847 中描述为具有以下重链和轻链可变结构 |

[0394]

| 表 F<br>示例性靶分子 | |
|---|---|
| **靶** | **抗体名称和/或结合序列** |
| | 域：<br>HC：SEQ ID NO: 9<br>LC：SEQ ID NO: 10 |
| PDL1 | 度伐利尤单抗(MEDI4736)<br>HC：PCT 申请号 WO2020225552 的 SEQ ID NO: 26<br>LC：PCT 申请号 WO2020225552 的 SEQ ID NO: 27 |
| PDL1 | 阿替利珠单抗（Tecentriq，MPDL3280A，RG7446）<br>HC：美国专利号 8,217,149 的 SEQ ID NO: 20<br>LC：美国专利号 8,217,149 的 SEQ ID NO: 21 |
| PDL1 | MDX 1105 (BMS-936559) |
| PDL1 | 抗 PD-L1 抗体，在美国专利号 7,943,743 中描述为具有以下关于重链和轻链可变结构域的 SEQ ID NO.对：<br>SEQ ID No: 1/11<br>SEQ ID No: 2/12<br>SEQ ID No: 3/13<br>SEQ ID No: 4/14<br>SEQ ID No: 5/15<br>SEQ ID No: 6/16<br>SEQ ID No: 7/17<br>SEQ ID No: 8/18<br>SEQ ID No: 9/19<br>SEQ ID No: 10/20 |
| PDL1 | 阿维鲁单抗，在美国专利号 9,624,298 中描述为具有以下重链和轻链可变结构域：<br>HC：SEQ ID NO: 24<br>LC：SEQ ID NO: 25 |
| PDL1 | ZKAB001（索卡佐利单抗） |
| PDL1 | TQB2450（APL-502 或 CBT-502） |
| PDL1 | HLX20<br>PCT 公开号 2018/080812 的 SEQ ID No: 52、56 和 77 的 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3 序列<br>PCT 公开号 2018/080812 的 SEQ ID No: 65、42 和 71 的 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3 序列 |
| PDL1 | KN035（恩沃利单抗(Envafolimab)），其是在美国专利号 11,225,522 中描述为 Hu56V2 的具有 VHH SEQ ID NO: 34 的纳米抗体 |
| PDL1 | LY3434172 |
| PDL1 | LY3300054（洛达利单抗），在 PCT 公开号 WO 2017/034916 中描述为具有以下重链和轻链可变结构域：<br>HC：SEQ ID NO: 10<br>L：SEQ ID NO: 11 |
| PDL1 | LDP（莱沙贝利单抗，ADG104），在中国专利号 114225023 中描述为具有以下重链和轻链可变结构域： |

[0395]

| 表 F<br>示例性靶分子 | |
|---|---|
| **靶** | **抗体名称和/或结合序列** |
| | HC：SEQ ID NO: 10<br>LC：SEQ ID NO: 9 |
| PDL1 | EMB-09 |
| PDL1 | ABL501 |
| PDL1 | INBRX-105 |
| PDL1 | STI-3031 (IMC-001)，在美国专利号 10,118,963 中描述为具有以下重链和轻链可变结构域：<br>HC：SEQ ID NO: 1<br>LC：SEQ ID NO: 2 |
| PDL1 | BGB-A333（加维莫单抗），在美国专利号 11,512,132 中描述为具有以下重链和轻链可变结构域：<br>HC：SEQ ID NO: 22<br>LC：SEQ ID NO: 23 |
| PDL1 | HLX301 |
| PDL1 | Y101D |
| PDL1 | ES101 |
| PDL1 | IBI322 |
| PDL1 | VH：美国专利号 11,168,144 的 SEQ ID NO:46、48、50 或 52。<br>VL：美国专利号 11,168,144 的 SEQ ID NO:58、137 或 12。 |
| PDL1 | VH：美国专利号 11,208,486 的 SEQ ID NO:23、124、126、127、128、130、140 或 145。<br>VL：美国专利号 11,208,486 的 SEQ ID NO:24 或 125。 |
| 磷脂酰丝氨酸 | （巴维妥昔单抗） |
| PSCA | GEM3PSCA |
| PSMA | huJ591 |
| PSMA | 具有 VH 和 VL 序列的抗 PSMA 抗体，这些 VH 序列和 VL 序列具有来自 WO 2017/023761A1 的以下 SEQ ID NO:对中的任一者的氨基酸序列：2/1642；10/1642；18/1642；26/1642；34/1642；42/1642；50/1642；58/1642；66/1642；74/1642；82/1642；90/1642；98/1642；106/1642；1 14/1642；122/130；和 138/146。 |
| PSMA | WO2003034903A2 中描述的抗体，诸如：PSMA 3.7、PSMA 3.8、PSMA 3.9、PSMA 3.11、PSMA 5.4、PSMA 7.1、PSMA 7.3、PSMA 10.3、PSMA 1.8.3、PSMA A3.1.3、PSMA A3.3.1、Abgenix 4.248.2、Abgenix 4.360.3、Abgenix 4.7.1、Abgenix 4.4.1、Abgenix 4.177.3、Abgenix 4.16.1、Abgenix 4.22.3、Abgenix 4.28.3、Abgenix 4.40.2、Abgenix 4.48.3、Abgenix 4.49.1、Abgenix 4.209.3、Abgemx 4.219.3、Abgenix 4.288.1、Abgenix 4.333.1、Abgemx 4.54.1、Abgenix 4.153.1、Abgenix 4.232.3、Abgenix 4.292.3、Abgenix 4.304.1、Abgenix 4.78.1 和 |

[0396]

| 表 F<br>示例性靶分子 | |
|---|---|
| **靶** | **抗体名称和/或结合序列** |
| | Abgenix 4.152.1<br>WO 2003/034903A2 中描述的杂交瘤细胞系，诸如：PSMA 3.7 (PTA-3257)、PSMA 3.8、PSMA 3.9 (PTA-3258)、PSMA 3.11 (PTA-3269)、PSMA 5.4 (PTA-3268)、PSMA 7.1 (PTA-3292)、PSMA 7.3 (PTA-3293)、PSMA 10.3 (PTA-3247)、PSMA 1.8.3 (PTA-3906)、PSMA A3.1.3 (PTA- 3904)、PSMA A3.3.1 (PTA-3905)、Abgenix 4.248.2 (PTA-4427)、Abgenix 4.360.3 (PTA- 4428)、Abgenix 4.7.1 (PTA-4429)、Abgenix 4.4.1 (PTA-4556)、Abgenix 4.177.3 (PTA-4557)、Abgenix 4.16.1 (PTA-4357)、Abgenix 4.22.3 (PTA-4358)、Abgenix 4.28.3 (PTA-4359)、Abgenix 4.40.2 (PTA-4360)、Abgenix 4.48.3 (PTA-4361)、Abgenix 4.49.1 (PTA-4362)、Abgenix 4.209.3 (PTA-4365)、Abgenix 4.219.3 (PTA-4366)、Abgenix 4.288.1 (PTA-4367)、Abgenix 4.333.1 (PTA-4368)、Abgenix 4.54.1 (PTA-4363)、Abgenix 4.153.1 (PTA-4388)、Abgenix 4.232.3 (PTA-4389)、Abgenix 4.292.3 (PTA-4390)、Abgenix 4.304.1 (PTA-4391)、Abgenix 4.78.1 (PTA-4652)和 Abgemx 4.152.1(PTA-4653)。<br>描述于 WO 2003/034903A2 中的 SEQ ID No: 2-7 的 VH<br>描述于 WO 2003/034903A2 中的 SEQ ID No: 8-13 的 VL |
| PMSA | VH：描述于 WO 2011/121110A1 中的 SEQ ID No: 225、239、253、267、281、295、309、323、337、351、365、379、393、407、421、435、449、463、477、491、505、519、533、547、561、575、589、603 或 617。<br>VL 描述于 WO 2011/121110A1 中的 SEQ ID No: 230、244、258、272、286、300、314、328、342、356、370、384、398、412、426、440、454、468、482、496、510、524、538、552、566、580、594、608 或 622。<br>VH 和 VL WO 2011/121110A1 中描述的 SEQ ID No: 235、249、263、277、291、305、319、333、347、361、375、389、403、417、431、445、459、473、487、501、515、529、543、557、571、585、599、613 或 627。 |
| PMSA | 抗 PMSA 抗体，其具有 US 2022/0119525 A1 的 SEQ ID No: 229-312 和 US 2022/0119525 A1 的 SEQ ID NO: 217 的 VH 中的任一者的 VL 氨基酸序列。 |
| PMSA | ES414 |
| PMSA | BAY2010112（帕索珠单抗） |
| PMSA | CCW702 |
| PMSA | JNJ-63898081 |
| PMSA | CC-1 |
| PMSA | 阿卡帕他单抗 |

[0397]

| 表 F<br>示例性靶分子 | |
|---|---|
| **靶** | **抗体名称和/或结合序列** |
| PSMA | HPN424 |
| RAAG12 | RAV12 |
| RANKL | Prolia™（狄诺塞麦）<br>VH：美国专利公开 2017/0002060 的 SEQ ID NO:51<br>VL：美国专利公开 2017/0002060 的 SEQ ID NO:52 |
| SLAMF7 | Empliciti™（埃洛妥珠单抗） |
| SSTR2 | XmAb®18087 |
| STEAP1 | VHCDR1 描述于 US20210179731A1 中的 SEQ ID No: 14、33、182、184 或 185。<br>VHCDR2 描述于 US20210179731A1 中的 SEQ ID No: 15、21、34、182、184 或 185。<br>VHCDR3 描述于 US20210179731A1 中的 SEQ ID No: 16 和 35。<br>VH 描述于 US20210179731A1 中的 SEQ ID No: 182 或 184。<br>VLCDR1 描述于 US20210179731A1 中的 SEQ ID No: 11 或 30。<br>VLCDR2 描述于 US20210179731A1 中的 SEQ ID No: 12 或 31。<br>VLCDR3 描述于 US20210179731A1 中的 SEQ ID No: 13 或 32。<br>VL 描述于 US20210179731A1 中的 SEQ ID No: 183 或 186。 |
| STEAP1 | AMG509 |
| STEAP2 | 抗 STEAP 2 抗体，其具有选自以下的 CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3 序列：美国专利号 10,772,972 B2 的 SEQ ID NO: (1) 4-6-8-12-14-16；(2) 20-22-24-28-30-32；(3) 36-38-40-44-46-48；(4) 52-54-56-60-62-64；(5) 68-70-72-60-62-64；(6) 76-78-80-60-62-64；(7) 84-86-88-60-62-64；(8) 92-94-96-60-62-64；(9) 100-102-104-60-62-64；(10) 108-110-112-116-118-120；(11) 124-126-128-132-134-136；(12) 140-142-144-148-150-152；(13) 156-158-160-164-166-168；(14) 172-174-176-180-182-184；(15) 188-190-192-196-198-200；(16) 204-206-208-212-214-216；(17) 220-222-224-228-230-232；(18) 236-238-240-244-246-248；(19) 252-254-256-260-262-264；(20) 268-270-272-276-278-280；(21) 284-286-288-292-294-296；(22) |

[0398]

| 表 F<br>示例性靶分子 | |
|---|---|
| **靶** | **抗体名称和/或结合序列** |
| | 300-302-304-308-310-312；(23)<br>316-318-320-324-326-328；(24)<br>332-334-336-340-342-344；(25)<br>348-350-352-356-358-360；(26)<br>364-366-368-372-374-376；和(27)<br>380-382-384-388-390-392。<br><br>抗 STEAP 2 抗体，其具有(a)包括美国专利号 10,772,972 B2 的 SEQ ID No: 2、18、34、50、66、74、82、90、98、106、122、138、154、170、186、202、218、234、250、266、282、298、314、330、346、362 和 378 中的任一者的氨基酸的 VH；以及(b)包括美国专利号 10,772,972 B2 的 SEQ ID No: 10；26；42；58；114；130；146；162；178；194；210；226、242；258；274；290；306；322；338；354；370；和 386 中的任一者的氨基酸序列的 VL。<br><br>抗 STEAP 2 抗体，其具有包括美国专利号 10,772,972 B2 的 SEQ ID No 的以下对中的任一者的氨基酸序列的 VH/VL 对：2/10；18/26；34/42；50/58；66/58；74/58；82/58；90/58；98/58；106/114；122/130；138/146；154/162；170/178；186/194；202/210；218/226；234/242；250/258；266/274；282/290；298/306；314/322；330/338；346/354；362/370；和 378/386。 |
| 多配体聚糖-1 (CD 138) | B-B4 抗体，描述于 Wijdenes 等人(1996) Br. J. Haematol., 94: 318-323 中 |
| 多配体聚糖-4 | 描述于欧洲专利公开 EP 2 603 236 中描述的 SEQ ID NO: 1 的氨基酸 93 和 121 的氨基酸序列或 SEQ ID NO:2 的氨基酸 92 和 122 的氨基酸序列。 |
| TGFβ | GC1008 |
| TNFR | Enbrel™（依那西普） |
| TNFα | Remicade™（英夫利昔单抗）<br>VH：国际专利公开 WO201/3087911 A1 的 SEQ ID NO:2<br>VH：国际专利公开 WO2013/ A1087911 的 SEQ ID NO:3 |
| TNFα | Humira™（阿达木单抗）<br>VH：美国专利号 6,258,562 的 SEQ ID NO:4<br>VL：美国专利号 6,258,562 的 SEQ ID NO:3 |
| TNFα | Cimzia ™（聚乙二醇赛妥珠单抗）<br>VH：美国专利号 7,012,135 的 SEQ ID NO:14<br>VL：美国专利号 7,012,135 的 SEQ ID NO:9 |
| TNFα | Simponi™（戈利木单抗）<br>VH：美国专利号 7,250,165 的 SEQ ID NO:7<br>VL：美国专利号 7,250,165 的 SEQ ID NO:8 |

[0399]

| 表 F<br>示例性靶分子 | |
|---|---|
| **靶** | **抗体名称和/或结合序列** |
| VEGF | Avastin™（贝伐珠单抗）<br>VH：美国专利号 7,060,269 的 SEQ ID NO:9<br>VL：美国专利号 7,060,269 的 SEQ ID NO:10 |
| VEGF | Lucentis™（雷珠单抗）<br>VH：美国专利号 9,914,770 的 SEQ ID NO:4<br>VL：美国专利号 9,914,770 的 SEQ ID NO:2 |
| XCR1 | 描述于美国专利号 9,371, 389 B2 中的抗 XCR1 抗体，其包括：<br>- 被命名为 2H6、5G7、11H2、HK1L2 和 HK5L5 的抗体<br>- 具有 SEQ ID No:53-55 的 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3 序列以及 SEQ ID No:56-58 的 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3 序列的抗体。<br>- 具有 SEQ ID No:41-43 的 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3 序列以及 SEQ ID No:44-46 的 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3 序列的抗体。 |

[0400] 在一些方面中,靶向部分与表F中列出的抗体竞争以结合至靶分子。在进一步的方面,靶向部分包括具有表F中列出的抗体的CDR序列的CDR。在一些实施例中,靶向部分包括在表F中列出的抗体的所有6个CDR序列。在其他实施例中,靶向部分至少包括在表F中列出的重链CDR序列(CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3)和通用轻链的轻链CDR序列。在进一步的方面,靶向部分包含包括在表F中列出的抗体的VH的氨基酸序列的VH。在一些实施例中,靶向部分还包含包括在表F中列出的抗体的VL的氨基酸序列的VL。在其他实施例中,靶向部分进一步包括通用轻链VL序列。

[0401] 在一些实施例中,靶分子是PDL1。下表F-1提供了靶向部分可以基于的示例性抗PDL1抗体和/或抗体序列,例如,它们可掺入到用于本公开的干扰素前蛋白中的靶向部分中。

[0402]

| 表 F-1<br>示例性 PDL1 抗体和/或结合序列 | |
|---|---|
| **靶** | **抗体名称和/或结合序列** |
| PDL1 | 度伐利尤单抗(MEDI4736)<br>HC：PCT 申请号 WO2020225552 的 SEQ ID NO: 26<br>LC：PCT 申请号 WO2020225552 的 SEQ ID NO: 27 |
| PDL1 | 阿替利珠单抗（Tecentriq，MPDL3280A，RG7446）<br>HC：美国专利号 8,217,149 的 SEQ ID NO: 20<br>LC：美国专利号 8,217,149 的 SEQ ID NO: 21 |
| PDL1 | MDX 1105 (BMS-936559) |
| PDL1 | 抗 PD-L1 抗体，在美国专利号 7,943,743 中描述为具有以下关于重链 |

[0403]

| 表 F-1<br>示例性 PDL1 抗体和/或结合序列 | |
|---|---|
| **靶** | **抗体名称和/或结合序列** |
| | 和轻链可变结构域的 SEQ ID NO.对：<br>SEQ ID No: 1/11<br>SEQ ID No: 2/12<br>SEQ ID No: 3/13<br>SEQ ID No: 4/14<br>SEQ ID No: 5/15<br>SEQ ID No: 6/16<br>SEQ ID No: 7/17<br>SEQ ID No: 8/18<br>SEQ ID No: 9/19<br>SEQ ID No: 10/20 |
| PDL1 | 阿维鲁单抗，在美国专利号 9,624,298 中描述为具有以下重链和轻链可变结构域：<br>HC：SEQ ID NO: 24<br>LC：SEQ ID NO: 25 |
| PDL1 | ZKAB001（索卡佐利单抗） |
| PDL1 | TQB2450（APL-502 或 CBT-502） |
| PDL1 | HLX20<br>PCT 公开号 2018/080812 的 SEQ ID No: 52、56 和 77 的 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3 序列<br>PCT 公开号 2018/080812 的 SEQ ID No: 65、42 和 71 的 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3 序列 |
| PDL1 | KN035(恩沃利单抗)，其是在美国专利号 11,225,522 中描述为 Hu56V2 的具有 VHH SEQ ID NO: 34 的纳米抗体 |
| PDL1 | LY3434172 |
| PDL1 | LY3300054（洛达利单抗），在 PCT 公开号 WO 2017/034916 中描述为具有以下重链和轻链可变结构域：<br>HC：SEQ ID NO: 10<br>L：SEQ ID NO: 11 |
| PDL1 | LDP（莱沙贝利单抗，ADG104），在中国专利号 114225023 中描述为具有以下重链和轻链可变结构域：<br>HC：SEQ ID NO: 10<br>LC：SEQ ID NO: 9 |
| PDL1 | EMB-09 |
| PDL1 | ABL501 |
| PDL1 | INBRX-105 |
| PDL1 | STI-3031 (IMC-001)，在美国专利号 10,118,963 中描述为具有以下重链和轻链可变结构域：<br>HC：SEQ ID NO: 1<br>LC：SEQ ID NO: 2 |
| PDL1 | BGB-A333（加维莫单抗），在美国专利号 11,512,132 中描述为具有以下重链和轻链可变结构域：<br>HC：SEQ ID NO: 22<br>LC：SEQ ID NO: 23 |

[0404]

| 表 F-1<br>示例性 PDL1 抗体和/或结合序列 | |
|---|---|
| **靶** | **抗体名称和/或结合序列** |
| PDL1 | HLX301 |
| PDL1 | Y101D |
| PDL1 | ES101 |
| PDL1 | IBI322 |
| PDL1 | VH：美国专利号 11,168,144 的 SEQ ID NO:46、48、50 或 52。<br>VL：美国专利号 11,168,144 的 SEQ ID NO:58、137 或 12。 |
| PDL1 | VH：美国专利号 11,208,486 的 SEQ ID NO:23、124、126、127、128、130、140 或 145。<br>VL：美国专利号 11,208,486 的 SEQ ID NO:24 或 125。 |

[0405] 在一些方面中,靶向部分与在表F-1中列出的抗PDL1抗体竞争以结合至PDL1。在进一步的方面,靶向部分包括具有在表F-1中列出的抗PDL1抗体的CDR序列的CDR。在一些实施例中,靶向部分包括在表F-1中列出的抗PDL1抗体的所有6个CDR序列。在其他实施例中,靶向部分至少包括在表F-1中列出的抗PDL1抗体的重链CDR序列(CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3)和通用轻链的轻链CDR序列。在进一步的方面,靶向部分包含包括在表F-1中列出的抗PDL1抗体的VH的氨基酸序列的VH。在一些实施例中,靶向部分进一步包含包括在表F-1中列出的抗PDL1抗体的VL的氨基酸序列的VL。在其他实施例中,靶向部分进一步包括通用轻链VL序列。

[0406] 在一些实施例中,靶分子是PD1。下表F-2提供了靶向部分可以基于的示例性抗PD1抗体和/或抗体序列,例如,它们可掺入到用于本公开的干扰素前蛋白中的靶向部分中。

[0407]

| 表 F-2<br>示例性 PD1 抗体和/或结合序列 | |
|---|---|
| **靶** | **抗体名称和/或结合序列** |
| PD1 | MDX-1106 / BMS-936558（纳武单抗），人 IgG4 mAb，其结构描述于 WHO Drug Information，第 27 卷，第 1 期，第 68-69 页(2013)中，并且其重链和轻链序列公开于美国公开号 US20190270812A1 的图 7 中<br>HC：美国公开号 US20190270812A1 的 SEQ ID NO: 23<br>LC：美国公开号 US20190270812A1 的 SEQ ID NO: 24 |
| PD1 | MK-3475（派姆单抗），人源化 IgG4 mAb，其结构描述于 WHO Drug Information，第 27 卷，第 2 期，第 161-162 页(2013)中，并且其重链和轻链序列公开于美国公开号 US20190270812A1 的图 6 中<br>HC：美国公开号 US20190270812A1 的 SEQ ID NO: 21<br>LC：美国公开号 US20190270812A1 的 SEQ ID NO: 22 |
| PD1 | REGN2810（在美国公开号 20150203579 中公开为 H4H7798N）<br>HC：美国公开号 20150203579 的 SEQ ID NO: 330<br>LC：美国公开号 20150203579 的 SEQ ID NO: 331 |
| PD1 | 具有对应于美国专利号 11,034,765 B2 的以下 SEQ ID No.的 CDR H1-H3 和 CDR L1-L3 序列的抗 PD1 抗体：<br>a)分别是 SEQ ID No: 18、19、20、21、22 和 23； |

[0408]

| 表 F-2<br>示例性 PD1 抗体和/或结合序列 | |
|---|---|
| **靶** | **抗体名称和/或结合序列** |
| | b)分别是 SEQ ID No: 24、25、26、27、28 和 29；<br>c)分别是 SEQ ID No: 30、31、32、33、34 和 35；<br>d)分别是 SEQ ID No: 36、37、38、39、40 和 41；<br>e)分别是 SEQ ID No: 42、43、44、45、46 和 47；<br>f)分别是 SEQ ID No: 48、49、50、51、52 和 53；<br>g)分别是 SEQ ID No: 54、55、56、57、58 和 59；以及<br>h)分别是 SEQ ID No: 60、61、62、63、64 和 65。 |
| PD1 | 公开于 PCT 公开 WO2015112800A1 的表 1 至 3 中的抗 PD1 抗体，包括但不限于具有 VH/VL 对的抗 PD1 抗体，这些 VH/VL 对具有 PCT 公开 WO2015112800A1 的 SEQ ID No: 2/10、18/26、34/42、50/58、66/74、82/90、98/106、1 14/122、130/138、146/154、162/170、178/186、194/202、210/202、218/202、226/202、234/202、242/202、250/202、258/202、266/202、274/202、282/202、290/202、298/186、306/186 和 314/186。 |
| PD1 | 抗 PD1 抗体，在美国专利号 10,294,299 B2 中公开为具有以下关于重链和轻链可变结构域的 SEQ ID NO.对：<br>SEQ ID No. 164/178<br>SEQ ID No. 165/179<br>SEQ ID No. 166/180<br>SEQ ID No. 167/181<br>SEQ ID No. 168/182<br>SEQ ID No. 169/183<br>SEQ ID No. 170/184<br>SEQ ID No. 171/185<br>SEQ ID No. 172/186<br>SEQ ID No. 173/187<br>SEQ ID No. 174/188<br>SEQ ID No. 175/189<br>SEQ ID No. 176/190<br>SEQ ID No. 177/190 |
| PD1 | MEDI-0680 (AMP-514) |
| PD1 | PDR001（斯巴达珠单抗），人源化 IgG4 mAb，其重链和轻链序列在美国专利号 9683048 B2 中公开为 BAP049-Clone-E。<br>HC：美国专利号 9,683,048 的 SEQ ID NO: 91<br>LC：美国专利号 9,683,048 的 SEQ ID NO: 72 |
| PD1 | BGB-108 |
| PD1 | h409A11，描述于 WO2008/156712 中<br>HC：PCT 公开 WO2008/156712 的 SEQ ID NO: 31<br>LC：PCT 公开 WO2008/156712 的 SEQ ID NO: 36 |
| PD1 | h409A16，描述于 WO2008/156712 中<br>HC：PCT 公开 WO2008/156712 的 SEQ ID NO: 31<br>LC：PCT 公开 WO2008/156712 的 SEQ ID NO: 37 |
| PD1 | h409A17，描述于 WO2008/156712 中<br>HC：PCT 公开 WO2008/156712 的 SEQ ID NO: 31<br>LC：PCT 公开 WO2008/156712 的 SEQ ID NO: 38 |

[0409]

| 表 F-2<br>示例性 PD1 抗体和/或结合序列 | |
|---|---|
| **靶** | **抗体名称和/或结合序列** |
| PD1 | 抗 PD1 抗体，在美国专利号 7,488,802 中描述为具有以下关于重链和轻链可变结构域的 SEQ ID NO.对：<br>SEQ ID No. 2/4<br>SEQ ID No. 6/8<br>SEQ ID No. 10/12<br>SEQ ID No. 14/16<br>SEQ ID No. 47/49 |
| PD1 | 美国专利号 7521051 中描述的抗 PD1 抗体<br>为具有以下关于重链和轻链可变结构域的 SEQ ID NO.对：<br>SEQ ID No. 2/4<br>SEQ ID No. 6/8<br>SEQ ID No. 10/12<br>SEQ ID No. 14/16<br>SEQ ID No. 47/49 |
| PD1 | 美国专利号 8008449 中描述的抗 PD1 抗体<br>为具有以下关于重链和轻链可变结构域的 SEQ ID NO.对：<br>SEQ ID No. 1/8<br>SEQ ID No. 2/9<br>SEQ ID No. 3/10<br>SEQ ID No. 4/11<br>SEQ ID No. 5/12<br>SEQ ID No. 6/13<br>SEQ ID No. 7/14 |
| PD1 | 抗 PD1 抗体，在美国专利号 8,354,509 中描述为具有以下关于重链和轻链全长结构域的 SEQ ID NO.对：<br>SEQ ID No. 31/36<br>SEQ ID No. 31/37<br>SEQ ID No. 31/38 |
| PD1 | 抗 PD1 抗体，在美国专利号 8,168,757 中描述为具有以下关于重链和轻链可变结构域的 SEQ ID NO.对：<br>SEQ ID No. 4/5<br>SEQ ID No. 12/13<br>SEQ ID No. 18/19<br>SEQ ID No.40/41<br>SEQ ID No.47/48<br>SEQ ID No.26/27<br>SEQ ID No.34/35<br>SEQ ID No.55/56<br>SEQ ID No.67/68 |
| PD1 | PCT 公开号 WO2004/004771 中描述的抗 PD1 抗体 |
| PD1 | PCT 公开号 WO2004/056875 中描述为具有以下关于重链和轻链可变结构域的 SEQ ID NO.对的抗 PD1 抗体：<br>SEQ ID No. 2/4<br>SEQ ID No. 6/8<br>SEQ ID No. 10/12<br>SEQ ID No. 14/16 |

[0410]

| 表 F-2<br>示例性 PD1 抗体和/或结合序列 | |
|---|---|
| **靶** | **抗体名称和/或结合序列** |
| | SEQ ID No. 47/49 |
| PD1 | PCT 公开号 WO2004/072286 中描述的抗 PD1 抗体 |
| PD1 | VH：美国公开号 US2011/0271358 的 SEQ ID NO: 25、26、27、28 或 29<br>VL：美国公开号 US2011/0271358 的 SEQ ID NO: 30、31、32 或 33 |
| PD1 | SHR-1210 卡瑞利珠单抗，在 PCT 公开号 WO 2015/085847 中描述为具有以下重链和轻链可变结构域：<br>HC：SEQ ID NO: 9<br>LC：SEQ ID NO: 10 |

[0411] 在一些方面中,靶向部分与在表F-2中列出的抗PD1抗体竞争以结合至PD1。在进一步的方面,靶向部分包括具有在表F-2中列出的抗PD1抗体的CDR序列的CDR。在一些实施例中,靶向部分包括在表F-2中列出的抗PD1抗体的所有6个CDR序列。在其他实施例中,靶向部分至少包括在表F-2中列出的抗PD1抗体的重链CDR序列(CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3)和通用轻链的轻链CDR序列。在进一步的方面,靶向部分包含包括在表F-2中列出的抗PD1抗体的VH的氨基酸序列的VH。在一些实施例中,靶向部分进一步包含包括在表F-2中列出的抗PD1抗体的VL的氨基酸序列的VL。在其他实施例中,靶向部分进一步包括通用轻链VL序列。

[0412] 在靶分子是检查点抑制剂的情况下,在一些实施例中,检查点抑制剂靶向部分对配体-受体结合是非阻断性或弱阻断性的。非阻断性或弱阻断性抗PD1抗体的实例包括具有PCT公开号WO2015/112800A1的SEQ ID No:2/10;美国专利号11,034,765B2的SEQ ID No:16/17;美国专利号10,294,299B2的SEQ ID No.164/178、165/179、166/180、167/181、168/182、169/183、170/184、171/185、172/186、173/187、174/188、175/189、176/190和177/190的VH/VL氨基酸序列的抗体。非阻断性或弱阻断性抗LAG3抗体的实例包括具有美国公开US2022/0056126A1的SEQ ID No 23/24、3/4和11/12的VH/VL氨基酸序列的抗体。

[0413] 在表I中以及在例如,Hafeez等人,2020,Molecules 25:4764,doi:10.3390/molecules25204764中(特别是在表1中)公开了可以由IFN前蛋白靶向的其他靶分子。Hafeez等人的表1的全部内容通过引用并入本文。

[0414] 6.7.靶向部分格式

[0415] 在某些方面,本公开的IFN前蛋白的靶向部分可以是保留特异性结合至抗原决定簇的任何类型的抗体或其片段。在一个实施例中,靶向部分是免疫球蛋白分子或其片段,特别是IgG类免疫球蛋白分子,更特别是$IgG_1$或$IgG_4$免疫球蛋白分子。抗体片段包括但不限于VH(或$V_H$)片段、VL(或$V_L$)片段、Fab片段、$F(ab')_2$片段、scFv片段、Fv片段、微型抗体、双抗体、三抗体和四抗体。

[0416] 6.7.1.Fab

[0417] Fab结构域传统上是通过使用木瓜蛋白酶等酶对免疫球蛋白分子进行蛋白水解裂解来产生的。Fab结构域可以包含来自任何合适物种的恒定结构域和可变区序列,并且因此可以是鼠的、嵌合的、人类的或人源化的。

[0418] Fab结构域通常包含附接至VH结构域的CH1结构域,该CH1结构域与附接至VL结构域的CL结构域配对。在野生型免疫球蛋白中,VH结构域与VL结构域配对构成Fv区,并且CH1

结构域与CL结构域配对以进一步稳定结合位点。两个恒定结构域之间的二硫键可以进一步稳定Fab结构域。当靶向部分是Fab时,Fab的CH1可以代表位于IFN部分的N-末端的恒定结构域,例如,如图1B和1C中所示的。

[0419] 对于本公开的IFN前蛋白,特别是当靶向部分的轻链不是共同或通用轻链时,有利的是使用Fab异二聚化策略以允许属于相同靶向部分的Fab结构域的正确缔合并且最小化属于不同靶向部分的Fab结构域的异常配对。例如,可以使用下面的表G中所示的Fab异二聚化策略:

[0420]

表 G
Fab 异二聚化策略

| 策略 | VH | CH1 | VL | CL | 参考文献 |
|---|---|---|---|---|---|
| CrossMabCH1-CL | WT | CL 结构域 | WT | CH1 结构域 | Schaefer 等人, 2011, Cancer Cell 2011; 20:472-86; PMID:22014573。 |
| 正交 Fab VHVRD1CH1CRD2 – VLVRD1CλCRD2 | 39K、62E | H172A、F174G | 1R、38D、(36F) | L135Y、S176W | Lewis 等人, 2014, Nat Biotechnol 32 :191-8 |
| 正交 Fab VHVRD2CH1wt – VLVRD2CλwT | 39Y | WT | 38R | WT | Lewis 等人, 2014, Nat Biotechnol 32 :191-8 |
| TCR CαCβ | 39K | TCR Cα | 38D | TCR Cβ | Wu 等人, 2015, Mabs 7:364-76 |
| CR3 | WT | T192E | WT | N137K、S114A | Golay 等人, 2016, J Immunol 196:3199-211。 |
| MUT4 | WT | L143Q、S188V | WT | V133T、S176V | Golay 等人, 2016, J Immunol 196:3199-211。 |

[0421]

表 G
Fab 异二聚化策略

| 策略 | VH | CH1 | VL | CL | 参考文献 |
|---|---|---|---|---|---|
| 杜埃特单抗 | WT | F126C | WT | S121C | Mazor 等人, 2015, Mabs 7 :377-89 ; Mazor 等人, 2015, Mabs 7 :461-669。 |
| 已交换的结构域 | WT | CH3 + 杵或臼突变 | WT | CH3 + 臼或杵突变 | Wozniak-Knopp 等人, 2018, PLoSONE13(4) :e0195442 |

[0422] 因此,在某些实施例中,通过彼此交换Fab的VL和VH结构域或彼此交换CH1和CL结构域来促进Fab的两个多肽之间的正确缔合,例如,如WO 2009/080251中描述的。

[0423] 还可以通过在Fab的CH1结构域中引入一个或多个氨基酸修饰、在Fab的CL结构域中引入一个或多个氨基酸修饰和/或在VH结构域中引入一个或多个氨基酸修饰、以及在VL

结构域中引入一个或多个氨基酸修饰来促进正确的Fab配对。被修饰的氨基酸通常是VH:VL和CH1:CL界面的一部分,使得Fab组件优先地彼此配对,而不是与其他Fab的组件配对。

[0424] 在一个实施例中,一个或多个氨基酸修饰限于可变结构域(VH、VL)和恒定结构域(CH1、CL)的保守框架残基,如残基的Kabat编号所示。Almagro,2008,Frontiers In Bioscience 13:1619-1633基于Kabat、Chothia和IMGT编号方案提供了框架残基的定义。

[0425] 在一个实施例中,在VH和CH1和/或VL和CL结构域中引入的修饰是彼此互补的。重链和轻链界面处的互补性可以基于空间和疏水接触、静电/电荷相互作用或各种相互作用的组合来实现。蛋白质表面之间的互补性在文献中广泛描述为锁和钥匙配合、杵入臼、突起和空腔、供体和受体等,所有这些都意味着两个相互作用表面之间结构和化学匹配的性质。

[0426] 在一个实施例中,一种或多种所引入的修饰在Fab组分的界面上引入新的氢键。在一个实施例中,一种或多种所引入的修饰引入了跨Fab组分的界面的新盐桥。示例性取代描述于WO 2014/150973和WO 2014/082179中,其内容通过引用并入本文。

[0427] 在一些实施例中,Fab结构域包含CH1结构域中的192E取代和CL结构域中的114A和137K取代,其在CH1结构域与CL结构域之间引入盐桥(参见例如Golay等人,2016,J Immunol 196:3199-211)。

[0428] 在一些实施例中,Fab结构域包含CH1结构域中的143Q和188V取代以及CL结构域中的113T和176V取代,其用于交换CH1与CL结构域之间接触的疏水性和极性区域(参见例如Golay等人,2016,J Immunol 196:3199-211)。

[0429] 在一些实施例中,Fab结构域可以在一些或全部VH、CH1、VL、CL结构域中包含修饰以引入促进Fab结构域正确组装的正交Fab界面(Lewis等人,2014Nature Biotechnology 32:191-198)。在一个实施例中,在VH结构域中引入39K、62E修饰,在CH1结构域中引入H172A、F174G修饰,在VL结构域中引入1R、38D、(36F)修饰,并且在CL结构域中引入L135Y、S176W修饰。在另一个实施例中,在VH结构域中引入39Y修饰并且在VL结构域中引入38R修饰。

[0430] 还可以修饰Fab结构域以用工程化的二硫键取代天然的CH1:CL二硫键,从而提高Fab组件配对的效率。例如,可以通过在CH1结构域中引入126C和在CL结构域中引入121C来引入工程化的二硫键(参见,例如,Mazor等人,2015,Mabs 7:377-89)。

[0431] 还可以通过用促进正确组装的替代结构域替换CH1结构域和CL结构域来修改Fab结构域。例如,Wu等人,2015,Mabs 7:364-76,描述了用T细胞受体的恒定结构域取代CH1结构域并且用T细胞受体的b结构域取代CL结构域,以及通过在VL结构域中引入38D修饰和在VH结构域中引入39K修饰,将这些结构域替换与VL与VH结构域之间的附加电荷-电荷相互作用配对。

[0432] 代替或另外使用Fab异二聚化策略来促进正确的VH-VL配对,共同轻链(也称为通用轻链)的VL可用于本公开的IFN前蛋白中的每个独特的ABD。在各种实施例中,与采用原始同源VL相比,采用本文所述的共同轻链减少了IFN前蛋白中不适当物种的数量。在各种实施例中,ABD的VL结构域从包含共同轻链的单特异性抗体中鉴定。在各种实施例中,IFN前蛋白中的ABD的VH区包含人重链可变基因节段,这些节段在小鼠B细胞内体内重排,这些小鼠B细胞先前已经工程化以表达有限的人轻链库,或与人重链同源的单一人轻链,并且响应于暴露于所关注的抗原,产生含有多个人VH的抗体库,该多个人VH与一个可能的人VL或两个可

能的人VL中的一者同源,其中抗体库对所关注的抗原具有特异性。常见轻链是源自重排的人Vκ1-39Jκ5序列或重排的人Vκ3-20Jκ1序列的,并且包括体细胞突变的(例如,亲和力成熟)版本。参见,例如,美国专利号10,412,940。

[0433] 6.7.2.scFv

[0434] 单链Fv或“scFv”抗体片段在单个多肽链中包含抗体的VH和VL结构域,能够表达为单个多肽链,并且保留其来源的完整抗体的特异性。一般而言,scFv多肽进一步包含VH与VL结构域之间的多肽接头,该多肽接头使得scFv能够形成用于靶结合的所需结构。适合于连结scFv的VH和VL链的接头的实例是第6.5节中鉴别的不可切割接头。

[0435] 除非另有说明,如本文所用,scFv可以以任一顺序具有VL和VH可变区,例如,相对于多肽的N-末端和C-末端,scFv可以包含VL-接头-VH或可以包含VH-接头-VL。

[0436] scFv可以包含来自任何合适物种的VH序列和VL序列,诸如鼠、人类或人源化VH和VL序列。

[0437] 为了产生编码scFv的核酸,将编码VH和VL的DNA片段可操作地连接至编码接头的另一片段,例如,编码描述于第6.5节中的接头中的任何接头(通常是含有氨基酸甘氨酸和丝氨酸的序列的重复序列,诸如氨基酸序列(Gly4～Ser)3(SEQ ID NO:180),使得VH序列和VL序列可被表达为连续单链蛋白,其中VL和VH区通过柔性接头连接(参见,例如,Bird等人,1988,Science 242:423-426;Huston等人,1988,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883;McCafferty等人,1990,Nature 348:552-554)。

[0438] 6.8.Fc区

[0439] 本公开的IFN前蛋白通常包括一对缔合形成Fc区的Fc结构域。在天然抗体中,Fc区在其N末端处包含铰链区以形成恒定结构域。在整个本公开中,除非另有说明,对Fc结构域的提及涵盖在其N末端处具有铰链结构域的Fc结构域。

[0440] Fc结构域可以源自可操作地连接至ABD或其组分的任何合适的物种。在一个实施例中,Fc结构域源自人类Fc结构域。在优选的实施例中,靶向部分或其组分融合至IgG Fc分子。靶向部分或其组分可以融合至IgG Fc结构域的N末端或C末端或两者。

[0441] Fc结构域可以源自任何合适类别的抗体,包括IgA(包括亚类IgA1和IgA2)、IgD、IgE、IgG(包括亚类IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)和IgM。在一个实施例中,Fc结构域源自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。在一个实施例中,Fc结构域源自IgG1。在一个实施例中,Fc结构域源自IgG4。下面的表Y中提供了来自IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的Fc结构域的示例性序列。

[0442]

表 Y
Fc 序列

| Fc | 序列 | SEQ ID NO |
|---|---|---|
| hIgG1 Fc（UniprotKB P01857-1 的氨基酸 99-330） | EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK | 392 |
| hIgG2 Fc（UniprotKB P01859-1 的 | ERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP | 393 |

[0443]

表 Y
Fc 序列

| Fc | 序列 | SEQ ID NO |
|---|---|---|
| 氨基酸 99-326） | REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNG QPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK | |
| hIgG3 Fc（UniprotKB P01860-1 的氨基酸 99-377） | ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCP RCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK | 394 |
| hIgG4 Fc（UniprotKB P01861-1 的氨基酸 99-327） | ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK | 395 |

[0444] 在一些方面,Fc结构域包含与SEQ ID NO:410具有至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%、或100%序列同一性的氨基酸序列。在Fc结构域与SEQ ID NO:410包含至少90%序列同一性和小于100%序列同一性(例如,与SEQ ID NO:410具有90%至99%之间的序列同一性)的情况下,Fc结构域还可包含本文所述的一个或多个氨基酸取代,例如降低效应子功能的一个或多个取代(例如,如在第6.8.1节中描述的)和/或促进Fc异二聚化的一个或多个取代(例如,如在第6.8.2节中描述的)。

[0445] 在一些方面,Fc结构域包含与SEQ ID NO:411具有至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%、或100%序列同一性的氨基酸序列。在Fc结构域与SEQ ID NO:411包含至少90%序列同一性和小于100%序列同一性(例如,与SEQ ID NO:411具有90%至99%之间的序列同一性)的情况下,Fc结构域还可包含本文所述的一个或多个氨基酸取代,例如降低效应子功

能的一个或多个取代(例如,如在第6.8.1节中描述的)和/或促进Fc异二聚化的一个或多个取代(例如,如在第6.8.2节中描述的)。

[0446] 在一些方面,Fc结构域包含与SEQ ID NO:412具有至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%、或100%序列同一性的氨基酸序列。在Fc结构域与SEQ ID NO:412包含至少90%序列同一性和小于100%序列同一性(例如,与SEQ ID NO:412具有90%至99%之间的序列同一性)的情况下,Fc结构域还可包含本文所述的一个或多个氨基酸取代,例如降低效应子功能的一个或多个取代(例如,如在第6.8.1节中描述的)和/或促进Fc异二聚化的一个或多个取代(例如,如在第6.8.2节中描述的)。

[0447] 在一些方面,Fc结构域包含与SEQ ID NO:413具有至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%、或100%序列同一性的氨基酸序列。在Fc结构域与SEQ ID NO:413包含至少90%序列同一性和小于100%序列同一性(例如,与SEQ ID NO:413具有90%至99%之间的序列同一性)的情况下,Fc结构域还可包含本文所述的一个或多个氨基酸取代,例如降低效应子功能的一个或多个取代(例如,如在第6.8.1节中描述的)和/或促进Fc异二聚化的一个或多个取代(例如,如在第6.8.2节中描述的)。

[0448] Fc区内的两个Fc结构域可以彼此相同或不同。在天然抗体中,Fc结构域通常是同一的,但出于产生多特异性结合分子,例如本公开的IFN前蛋白和通过它们的活化产生的MBM的目的,Fc结构域可能有利地不同以允许异二聚化,如下文第6.8.2节中所述。

[0449] 在天然抗体中,IgA、IgD和IgG的重链Fc结构域由两个重链恒定结构域(CH2和CH3)组成,而IgE和IgM的重链Fc结构域由三个重链恒定结构域(CH2、CH3和CH4)组成。这些二聚体形成Fc区域。

[0450] 在本公开的IFN前蛋白中,Fc区和/或其内的Fc结构域可包含来自一种或多种不同类别(例如一种、两种或三种不同类别)的抗体的重链恒定结构域。

[0451] 在一个实施例中,Fc区包含源自IgG1的CH2和CH3结构域。

[0452] 在一个实施例中,Fc区包含源自IgG2的CH2和CH3结构域。

[0453] 在一个实施例中,Fc区包含源自IgG3的CH2和CH3结构域。

[0454] 在一个实施例中,Fc区包含源自IgG4的CH2和CH3结构域。

[0455] 在一个实施例中,Fc区包含来自IgM的CH4结构域。IgM CH4结构域通常位于CH3结构域的C末端。

[0456] 在一个实施例中,Fc区包含源自IgG的CH2和CH3结构域以及源自IgM的CH4结构域。

[0457] 应当理解,用于产生本公开的IFN前蛋白的Fc区的重链恒定结构域可包括上述天然存在的恒定结构域的变体。与野生型恒定结构域相比,此类变体可包含一种或多种氨基酸变异。在一个实例中,本公开的Fc区包含在序列上与野生型恒定结构域不同的至少一个恒定结构域。应当理解,变体恒定结构域可以比野生型恒定结构域长或短。优选地,变体恒定结构域与野生型恒定结构域至少60%相同或相似。在另一个实例中,变体恒定结构域至少70%相同或相似。在另一个实例中,变体恒定结构域至少80%相同或相似。在另一个实例中,变体恒定结构域至少90%相同或相似。在另一个实例中,变体恒定结构域至少95%相同或相似。

[0458] IgM和IgA作为常见H2L2抗体单元的共价多聚体天然存在于人体中。当IgM掺入J链时,它作为五聚体出现;或者当IgM缺少J链时,它作为六聚体出现。IgA作为单体和二聚体出现。IgM和IgA的重链具有延伸至C-末端恒定结构域的18个氨基酸,称为尾段。尾段包含半胱氨酸残基,该残基在聚合物的重链之间形成二硫键,并且被认为在聚合中具有重要作用。尾段还包含糖基化位点。在某些实施例中,本公开的IFN前蛋白不包含尾片。

[0459] 并入本公开的IFN前蛋白中的Fc结构域可包括一种或多种修饰,这些修饰改变蛋白质,例如结合至Fc受体诸如FcRn或白细胞受体、结合至补体、修饰的二硫键键结构或改变的糖基化模式的功能特性。改变效应子功能的示例性Fc修饰在第6.8.1节中描述。

[0460] 还可改变Fc结构域以包括提高不对称IFN前蛋白的可制造性的修饰,例如通过允许异二聚化,该异二聚化是非同一Fc结构域相对于同一Fc结构域的优先配对。异二聚化允许产生IFN前蛋白,其中不同的多肽组分通过含有序列不同的Fc结构域的Fc区彼此连结。异二聚化策略的实例在第6.8.2节中举例说明。

[0461] 应当理解,上述修饰中的任一者可以任何合适的方式组合以实现所需功能特性和/或与其他修饰组合以改变IFN前蛋白的特性。

[0462] 6.8.1.效应子功能改变的Fc结构域

[0463] 在一些实施例中,Fc结构域包含减少结合至Fc受体和/或效应子功能的一个或多个氨基酸取代。

[0464] 在特定实施例中,Fc受体是Fcγ受体。在一个实施例中,Fc受体是人类Fc受体。在一个实施例中,Fc受体是活化的Fc受体。在具体实施例中,Fc受体是活化的人类Fcγ受体,更具体地人类FcγRIIIa、FcγRI或FcγRIIa,最具体地人类FcγRIIIa。在一个实施例中,效应子功能是选自补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)和细胞因子分泌的组中的一者或多者。在具体实施例中,效应子功能是ADCC。

[0465] 在一个实施例中,Fc结构域(例如,IFN前蛋白半抗体的Fc结构域)或Fc区(例如,可以缔合以形成Fc区的IFN前蛋白的一个或两个Fc结构域)在选自E233、L234、L235、N297、P331和P329(根据Kabat EU索引的编号)的组的位置处包含氨基酸取代。在更具体的实施例中,Fc结构域或Fc区在选自L234、L235和P329(根据Kabat EU索引的编号)的位置处包含氨基酸取代。在一些实施例中,Fc结构域或Fc区包含氨基酸取代L234A和L235A(根据Kabat EU索引编号)。在一个此类实施例中,Fc结构域或区域是Igd Fc结构域或区域,特别是人类Igd Fc结构域或区域。在一个实施例中,Fc结构域或Fc区在位置P329处包含氨基酸取代。在更具体的实施例中,氨基酸取代是P329A或P329G,特别是P329G(根据Kabat EU索引编号)。在一个实施例中,Fc结构域或Fc区在位置P329处包含氨基酸取代和在选自E233、L234、L235、N297和P331(根据Kabat EU索引的编号)的位置处包含进一步的氨基酸取代。在更具体的实施例中,进一步的氨基酸取代是E233P、L234A、L235A、L235E、N297A、N297D或P331S。在具体实施例中,Fc结构域或Fc区在位置P329、L234和L235处包含氨基酸取代(根据Kabat EU索引编号)。在更具体的实施例中,Fc结构域包含氨基酸突变L234A、L235A和P329G(“P329G LALA”、“PGLALA”或“LALAPG”)。

[0466] 通常,Fc区的两个Fc结构域中的每一个Fc结构域中存在相同的一个或多个氨基酸取代。因此,在具体实施例中,Fc区的每个Fc结构域包含氨基酸取代L234A、L235A和P329G

(Kabat EU索引编号),即在Fc区的第一Fc结构域和第二Fc结构域中的每一者中,在234位置处的亮氨酸残基经丙氨酸残基(L234A)取代,在235位置处的亮氨酸残基经丙氨酸残基(L235A)取代,并且在329位置处的脯氨酸残基经甘氨酸残基(P329G)取代(根据Kabat EU索引编号)。

[0467] 在一个实施例中,Fc结构域是IgG1 Fc结构域,特别是人类IgG1 Fc结构域。在一些实施例中,IgG1 Fc结构域是包含D265A、N297A突变(EU编号)以降低效应子功能的变体IgG1。

[0468] 在另一个实施例中,Fc结构域是降低结合至Fc受体的IgG4 Fc结构域。降低结合至Fc受体的示例性IgG4 Fc结构域可以包含选自下面表H的氨基酸序列。在一些实施例中,Fc结构域仅包括如下所示序列的粗体部分:

[0469]

**表 H**

| Fc 结构域 | 序列 | SEQ ID NO: |
|---|---|---|
| WO2014/121087 的 SEQ ID NO:1 | Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu | 369 |

[0470]

| 表 H | | |
|---|---|---|
| **Fc 结构域** | **序列** | **SEQ ID NO:** |
| | Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys | |
| WO2014/121087 的 SEQ ID NO:2 | Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys | 370 |
| WO2014/121087 的 SEQ ID NO:30 | Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val **Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr** | 371 |

[0471]

| 表 H | | |
|---|---|---|
| **Fc 结构域** | **序列** | **SEQ ID NO:** |
| | **Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys** | |
| WO2014/121087 的 SEQ ID NO:31 | Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val **Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys** | 372 |
| WO2014/121087 的 SEQ ID NO:37 | Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser | 373 |

[0472]

| 表 H | | |
|---|---|---|
| **Fc 结构域** | **序列** | **SEQ ID NO:** |
| | Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val **Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys** | |
| WO2014/121087 的 SEQ ID NO:38 | Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val **Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr** | 374 |

[0473]

| 表 H | | |
|---|---|---|
| **Fc 结构域** | **序列** | **SEQ ID NO:** |
| | **Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys** | |

[0474] 在特定的实施例中,效应子功能降低的IgG4包括WO2014/121087的SEQ ID NO:31的氨基酸序列的粗体部分,有时在本文中被称为IgG4或hIgG4,其具有以下氨基酸序列:ESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK(SEQ ID NO:396)。

[0475] 对于异二聚体Fc区,可以并入上述变体IgG4 Fc序列的组合,例如包含含有WO2014/121087的SEQ ID NO:30的氨基酸序列(或其加粗部分)的Fc结构域和含有WO2014/121087的SEQ ID NO:37的氨基酸序列(或其加粗部分)的Fc结构域的Fc区,或包含含有WO2014/121087的SEQ ID NO:31的氨基酸序列(或其加粗部分)的Fc结构域和含有WO2014/121087的SEQ ID NO:38的氨基酸序列(或其加粗部分)的Fc结构域的Fc区。

[0476] 6.8.2.Fc异二聚化变体

[0477] 某些IFN前蛋白需要两个Fc结构域之间的二聚化,与天然免疫球蛋白不同,它们可操作地连接至不相同的N-末端或C-末端区。两个Fc结构域形成Fc区的不充分异二聚化可能成为增加所需异二聚体分子产量的障碍,并且对纯化提出了挑战。本领域可用的多种方法可用于增强可能存在于本公开的IFN前蛋白中的Fc结构域的二聚化,例如如EP 1870459A1;美国专利号5,582,996;美国专利号5,731,168;美国专利号5,910,573;美国专利号5,932,448;美国专利号6,833,441;美国专利号7,183,076;美国专利申请公开号2006204493A1;和PCT公开号WO 2009/089004A1中公开的。

[0478] 在一些实施例中,本公开提供IFN前蛋白,其包含Fc异二聚体,即,包含异源、不相同的Fc结构域的Fc区。通常,Fc异二聚体中的每个Fc结构域包含抗体的CH3结构域。CH3结构域源自任何同种型、类别或亚类的抗体的恒定区,并且优选地IgG(IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)类别的抗体的恒定区,如前一节所述。

[0479] CH3结构域处两条不同重链的异二聚化产生所需IFN前蛋白,而同一的重链的同二聚化将降低所需IFN前蛋白的产量。因此,在一个优选实施例中,缔合形成本公开的IFN前蛋白的多肽将含有具有相对于未修饰的Fc结构域有利于异二聚体缔合的修饰的CH3结构域。

[0480] 在具体实施例中,促进Fc异二聚体形成的所述修饰是所谓的“杵入臼”或“杵臼”修饰,包含Fc结构域中的一个Fc结构域中的“杵”修饰和另一个Fc结构域的“臼”修饰。杵入臼技术描述于例如,美国专利号5,731,168;US 7,695,936;Ridgway等人,1996,Prot Eng 9:617-621,以及Carter,2001,Immunol Meth 248:7-15。通常,该方法包括在第一多肽的界面处引入突起(“杵”)以及在第二多肽的界面中引入对应的空腔(“臼”),使得突起可以定位在该空腔中,从而促进异二聚体形成并阻碍同二聚体形成。通过用较大侧链(例如,酪氨酸或

色氨酸)替代来自第一多肽界面的小氨基酸侧链来构建突起。通过用较小氨基酸侧链(例如,丙氨酸或苏氨酸)替代大氨基酸侧链,在第二多肽的界面中产生与突起大小相同或相似的补偿空腔。

[0481] 因此,在一些实施例中,Fc结构域的第一亚基的CH3结构域中的氨基酸残基经具有较大侧链体积的氨基酸残基取代,从而在第一亚基的CH3结构域内产生突起,该突起可定位在第二亚基的CH3结构域内的空腔中,并且Fc结构域的第二亚基的CH3结构域中的氨基酸残基经具有较小侧链体积的氨基酸残基取代,从而在第二亚基的CH3结构域内产生空腔,在该空腔内可定位第一亚基的CH3结构域内的突起。优选地,所述具有较大侧链体积的氨基酸残基选自由精氨酸(R)、苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)和色氨酸(W)组成的组。优选地,所述具有较小侧链体积的氨基酸残基选自由丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)和缬氨酸(V)组成的组。突起和空腔可以通过改变编码多肽的核酸来制备,例如,通过位点特异性诱变或通过肽合成。示例性取代是Y470T。

[0482] 在具体的此类实施例中,在第一Fc结构域中,位置366处的苏氨酸残基经色氨酸残基(T366W)取代,并且在Fc结构域中,位置407处的酪氨酸残基经缬氨酸残基(Y407V)取代,并且任选地,位置366处的苏氨酸残基经丝氨酸残基(T366S)取代并且位置368处的亮氨酸残基经丙氨酸残基(L368A)(根据Kabat EU索引编号)取代。在进一步的实施例中,在第一Fc结构域中,位置354处的丝氨酸残基另外被半胱氨酸残基(S354C)取代,或位置356处的谷氨酸残基被半胱氨酸残基(E356C)取代(特别是位置354处的丝氨酸残基经半胱氨酸残基取代),并且在第二Fc结构域中,位置349处的酪氨酸残基另外经半胱氨酸残基(Y349C)取代(根据Kabat EU索引编号)。在具体实施例中,第一Fc结构域包含氨基酸取代S354C和T366W,并且第二Fc结构域包含氨基酸取代Y349C、T366S、L368A和Y407V(根据Kabat EU索引编号)。

[0483] 在一些实施方案中,静电转向(例如,如Gunasekaran等人,2010,J Biol Chem 285(25):19637-46中描述的)可用于促进Fc区的第一和第二Fc结构域的结合。

[0484] 作为使用经修饰以促进异二聚化的Fc结构域的替代或附加,可修饰Fc结构域以允许能够选择Fc异二聚体的纯化策略。在一个此类实施例中,一种多肽包含修饰的Fc结构域,该Fc结构域消除其结合至蛋白A,从而使得能够产生异二聚体蛋白的纯化方法。参见例如美国专利号8,586,713。因而,IFN前蛋白包含第一CH3结构域和第二Ig CH3结构域,其中第一Ig CH3结构域和第二Ig CH3结构域彼此有至少一个氨基酸的不同,并且其中与缺乏氨基酸差异的对应IFN前蛋白相比,至少一个氨基酸差异降低IFN前蛋白与蛋白质A的结合。在一个实施例中,第一CH3结构域结合蛋白质A并且第二CH3结构域含有减少或消除蛋白质A结合的突变/修饰,诸如H95R修饰(通过IMGT外显子编号;通过EU编号的H435R)。第二CH3可进一步包含Y96F修饰(通过IMGT;通过EU的Y436F)。这类修饰在本文中被称为“星形”突变。

[0485] 在一些实施例中,Fc可以含有一个或多个突变(例如,杵和臼突变)以促进异二聚化以及星形突变以促进纯化。

[0486] 6.8.3.铰链域

[0487] 本公开的IFN前蛋白可包含Fc结构域,该Fc结构域在其N-末端包含铰链结构域。铰链区可以是天然的或修改的铰链区。铰链区通常位于Fc区的N末端处。除非上下文另有规定,术语“铰链结构域”是指天然或非天然存在的铰链序列,其在单一或单体多肽链的上下文中是单体铰链结构域并且在二聚体多肽(例如,由两个Fc结构域缔合形成的同二聚体或

异二聚体IFN前蛋白)的上下文中可包含位于单独的多肽链上的两个缔合的铰链序列。有时,两个相关铰链序列被称为“铰链区”。在IFN前蛋白的某些实施例中,铰链区的另外的迭代可以掺入到多肽序列中。

[0488] 天然铰链区是通常在天然存在的抗体的Fab和Fc结构域之间发现的铰链区。修饰的铰链区是在长度和/或组分中不同于天然铰链区的任何铰链。此类铰链可以包括来自其他物种的铰链区,诸如人类、小鼠、大鼠、兔、鲨鱼、猪、仓鼠、骆驼、美洲驼或山羊铰链区。其他修饰的铰链区可包含源自与重链Fc结构域或Fc区不同类别或亚类的抗体的完整铰链区。或者,修饰的铰链区可包含天然铰链或重复单元的一部分,其中重复中的每个单元源自天然铰链区。在另外的替代方案中,可以通过将一个或多个半胱氨酸或其他残基转化为中性残基,诸如丝氨酸或丙氨酸,或通过将适当放置的残基转化为半胱氨酸残基来改变天然铰链区。通过这种方式,铰链区中半胱氨酸残基的数量可以增加或减少。其他修饰的铰链区可以是完全合成的并且可以被设计为具有所需的性质,诸如长度、半胱氨酸组成和柔性。

[0489] 许多修饰的铰链区已经描述于例如美国专利号5,677,425、WO 99/15549、WO 2005/003170、WO 2005/003169、WO 2005/003170、WO 98/25971和WO 2005/003171中并且这些内容通过引用并入本文。

[0490] 在一个实施例中,本公开的IFN前蛋白包含Fc区,其中一个或两个Fc结构域在其N-末端具有完整的铰链结构域。

[0491] 在各种实施例中,铰链区内的位置233-236可以是G、G、G以及未被占据;G、G、未被占据以及未被占据;G、未被占据、未被占据以及未被占据;或全部未被占据,其中位置通过EU编号进行编号。

[0492] 在一些实施例中,本公开的IFN前蛋白包含相对于相同同种型(例如,人IgG1或人IgG4)的野生型铰链区降低对Fc γ受体的结合亲和力的修饰的铰链区。

[0493] 在一个实施例中,本公开的IFN前蛋白包含Fc区,其中每个Fc结构域在其N-末端处具有完整的铰链结构域,其中每个Fc结构域和铰链结构域源自lgG4并且每个铰链结构域包含修饰的序列CPPC(SEQ ID NO:375)。与含有序列CPPC(SEQ ID NO:375)的IgG1相比,人IgG4的核心铰链区含有序列CPSC(SEQ ID NO:376)。IgG4序列中存在的丝氨酸残基导致该区域的灵活性增加,因此一部分分子在同一蛋白链内形成二硫键(链内二硫键),而不是桥接到IgG分子中的其他重链以形成链间二硫键。(Angel等人,1993,Mol Immunol 30(1):105-108)。将丝氨酸残基改为脯氨酸以得到与IgG1相同的核心序列可以在IgG4铰链区中完全形成链间二硫键,从而减少纯化产物中的异质性。这种改变的同种型被称为IgG4P。

[0494] 掺入到本公开的IFN前蛋白中的铰链序列可以是全长(“长”)或截短的(“短”)。全长铰链序列的实例是ESKYGPPCPPCPAPPVA(SEQ ID NO:377)。截短的铰链序列的实例是ESKYGPPCPPC(SEQ ID NO:378)。与全长铰链序列ESKYGPPCPPCPAPPCA(SEQ ID NO:379)相比,ESKYGPPCPPC(SEQ ID NO:378)被截短6个氨基酸。在各个方面,与全长铰链序列,例如,本文公开的全长铰链序列中的任一者相比,截短的铰链可具有1、2、3、4、5或6个氨基酸的C-末端缺失。不受理论的束缚,据信截短的铰链序列可能对IFN部分赋予改进的空间约束。在每个半抗体中包含两个铰链结构域的IFN前蛋白(例如,具有图1C、2C和2F中描绘的构型的IFN前蛋白)中,两个铰链结构域可以都是全长的、截短的或它们的组合。因此,N-末端铰链结构域可以被截短,C-末端铰链结构域可以被截短,或者N-末端铰链结构域和C-末端铰链

结构域两者都可以被截短。

[0495] 6.8.3.1.嵌合铰链序列

[0496] 铰链结构域可以是嵌合铰链结构域。

[0497] 例如,嵌合铰链可包含源自人类IgG1、人类IgG2或人类IgG4铰链区的“上部铰链”序列,该序列与源自人类IgG1、人类IgG2或人类IgG4铰链区的“下部铰链”序列组合。

[0498] 在特定实施例中,嵌合铰链区包含氨基酸序列EPKSCDKTHTCPPCPAPPVA(SEQ ID NO:380)(先前公开为WO2014/121087的SEQ ID NO:8,其通过对其援引以其全文并入本文)或ESKYGPPCPPCPAPPVA(SEQ ID NO:377)(先前公开为WO2014/121087的SEQ ID NO:9)。此类嵌合铰链序列可适当地连接至IgG4 CH2区(例如通过并入IgG4 Fc结构域,例如人或鼠Fc结构域,其可在CH2和/或CH3结构域中进一步修饰以降低效应子功能,例如如第6.8.1节中所述)。

[0499] 6.8.3.2.具有降低的效应子功能的铰链序列

[0500] 在进一步的实施例中,铰链区可以被修饰以减少效应子功能,例如如WO2016161010A2中描述的,其整体通过引用并入本文。在各种实施例中,修饰的铰链区的位置233-236是G、G、G以及未被占据;G、G、未被占据以及未被占据;G、未被占据、未被占据以及未被占据;或全部未被占据,其中位置通过EU编号进行编号(如WO2016161010A2的图1中所示)。这些片段可以表示为GGG-、GG--、G---或----,其中“-”表示未占用的位置。

[0501] 位置236在规范人类IgG2中未占用,但在其他规范人类IgG同种型中被占用。在所有四种人类同种型中,位置233-235被G以外的残基占用(如WO2016161010A2的图1所示)。

[0502] 位置233-236内的铰链修饰可以与由P占用的位置228组合。位置228在人类IgG1和IgG2中天然地由P占用,但在人类IgG4中由S占用,而在人类IgG3中被R占用。IgG4抗体中的S228P突变有利于稳定IgG4抗体并且减少外源抗体与内源抗体之间重链轻链对的交换。优选地,位置226-229分别由C、P、P和C占用。

[0503] 示例性铰链区具有残基226-236,有时称为中部(或核心)和下部铰链,由指定为GGG-(233-236)、GG--(233-236)、G---(233-236)和没有G(233-236)的修饰铰链序列占用。任选地,铰链结构域氨基酸序列包括CPPCPAPGGG-GPSVF(SEQ ID NO:381)(先前披露为WO2016161010A2的SEQ ID NO:1)、CPPCPAPGG--GPSVF(SEQ ID NO:382)(先前披露为WO2016161010A2的SEQ ID NO:2)、CPPCPAPG---GPSVF(SEQ ID NO:383)(先前披露为WO2016161010A2的SEQ ID NO:3)或CPPCPAP----GPSVF(SEQ ID NO:384)(先前披露为WO2016161010A2的SEQ ID NO:4)。

[0504] 上述修饰的铰链区可以并入重链恒定区,其通常包括CH2和CH3结构域,并且其可以具有位于指定区域侧翼的附加铰链区段(例如,上铰链)。存在的此类另外的恒定区片段通常具有相同的同种型,优选地人类同种型,尽管可以是不同同种型的杂合体。此类另外的人类恒定区片段的同种型优选地是人类IgG4,但也可以是人类IgG1、IgG2或IgG3或其结构域具有不同同种型的杂合体。人类IgG1、IgG2和IgG4的示例性序列显示于WO2016161010A2的图2至图4中。

[0505] 在具体实施例中,修饰的铰链序列可连接至IgG4 CH2区(例如通过并入IgG4 Fc结构域,例如人或鼠Fc结构域,其可在CH2和/或CH3结构域中进一步修饰以降低效应子功能,例如如第6.8.1节中所述)。

[0506] 6.9.核酸和宿主细胞

[0507] 在另一个方面,本公开提供了核酸,其编码本公开的IFN前蛋白。在一些实施例,IFN前蛋白由单一核酸编码。在其他实施例,IFN前蛋白可由多个(例如,两个、三个、四个或更多个)核酸编码。

[0508] 单个核酸可编码包含单个多肽链的IFN前蛋白、包含两个或更多个多肽链的IFN前蛋白、或包含两个以上多肽链的IFN前蛋白的一部分(例如,单个核酸可编码包含三个、四个或更多个多肽链的IFN前蛋白的两个多肽链,或包含四个或更多个多肽链的IFN前蛋白的三个多肽链)。对于表达的单独控制,编码两个或更多个多肽链的开放阅读框可以处于单独的转录调节元件(例如,启动子和/或增强子)的控制之下。编码两个或更多个多肽的开放阅读框也可以由相同的转录调控元件控制,并由内部核糖体进入位点(IRES)序列分开,从而允许翻译成单独的多肽。

[0509] 在一些实施例中,包含两个或更多个多肽链的IFN前蛋白由两个或更多个核酸编码。编码IFN前蛋白的核酸的数量可以等于或小于IFN前蛋白中的多肽链的数量(例如,当多于一个的多肽链由单个核酸编码时)。

[0510] 本公开内容的核酸可以是DNA或RNA(例如,mRNA)。

[0511] 在另一个方面中,本公开提供了含有本公开的核酸的宿主细胞和载体。核酸可存在于单一载体中或存在于相同宿主细胞或单独宿主细胞中的单独载体中,如下文更详细地描述。

[0512] 6.9.1.载体

[0513] 本公开提供了载体,其包含编码本文所述的IFN前蛋白或其组分的核苷酸序列,例如IFN前蛋白的半抗体的一个或两个多肽链。载体包括但不限于病毒、质粒、粘粒、λ噬菌体或酵母人工染色体(YAC)。

[0514] 可以采用多种载体系统。例如,一类载体利用源自动物病毒的DNA元件,诸如,例如,牛乳头瘤病毒、多瘤病毒、腺病毒、牛痘病毒、杆状病毒、逆转录病毒(劳斯肉瘤病毒、MMTV或MOMLV)或SV40病毒。另一类载体利用源自RNA病毒的RNA元件,诸如塞姆利基森林病毒、东部马脑炎病毒和黄病毒。

[0515] 另外,可以通过引入一个或多个允许选择所转染的宿主细胞的标记物来选择已将DNA稳定整合到其染色体中的细胞。标记可以提供例如对营养缺陷型宿主的原质性、杀生物剂抗性(例如,抗生素)或对重金属(例如铜)的抗性等。选择性标记物基因可以直接连接至待表达的DNA序列,或通过共转化引入同一细胞中。mRNA的最佳合成可能还需要另外的元件。这些元件可包括剪接信号以及转录启动子、增强子和终止信号。

[0516] 一旦为表达制备好表达载体或含有构建体的DNA序列,就可以将表达载体转染或引入适当的宿主细胞中。可以采用各种技术来实现这一点,诸如,例如,原生质体融合、磷酸钙沉淀、电穿孔、逆转录病毒转导、病毒转染、基因枪、基于脂质的转染或其他常规技术。用于培养所得到的转染细胞和用于回收所表达的多肽的方法和个件是本领域技术人员已知的,并且可以基于本说明书根据所使用的具体表达载体和哺乳动物宿主细胞而变化或优化。

[0517] 6.9.2.细胞

[0518] 本公开内容还提供了包含本公开内容的核酸的宿主细胞。

[0519] 在一个实施例中,宿主细胞经基因工程化以包含本文所述的一种或多种核酸。

[0520] 在一个实施例中,通过使用表达盒对宿主细胞进行基因工程化。短语“表达盒”是指能够影响基因在与此类序列相容的宿主中表达的核苷酸序列。此类盒可包括启动子、具有或不具有内含子的开放阅读框和终止信号。还可以使用影响表达所必需的或有帮助的额外因子,诸如例如诱导型启动子。

[0521] 本公开内容还提供了包含本文描述的载体的宿主细胞。

[0522] 细胞可以是但不限于真核细胞、细菌细胞、昆虫细胞或人类细胞。合适的真核细胞包括但不限于Vero细胞、HeLa细胞、COS细胞、CHO细胞、HEK293细胞、BHK细胞和MDCKII细胞。合适的昆虫细胞包括但不限于Sf9细胞。

[0523] 6.10.药物组合物

[0524] 本公开的IFN前蛋白可以是包含IFN前蛋白和一个或多个载剂、赋形剂和/或稀释剂的组合物的形式。组合物可被配制用于特定用途,诸如用于兽医用途或人药物用途。所使用的组合物的形式(例如,干粉、液体制剂等)和赋形剂、稀释剂和/或载剂将取决于IFN前蛋白的预期用途以及对于治疗用途而言的施用模式。

[0525] 对于治疗用途,组合物可以作为包含药学上可接受的载剂的无菌药物组合物的一部分来提供。该组合物可以是任何合适的形式(取决于将其施用于患者的期望的方法)。药物组合物可以通过多种途径施用于患者,诸如口服、经皮、皮下、鼻内、静脉内、肌内、瘤内、鞘内、局部(topically)或局部(locally)施用。在任何给定情况下最合适的施用途径将取决于具体的IFN前蛋白、受试者以及疾病的性质和严重性以及受试者的身体状况。通常,药物组合物将静脉内或皮下施用。

[0526] 药物组合物可以方便地以每剂量含有预定量的本公开的IFN前蛋白的单位剂型存在。单位剂量中包含的IFN前蛋白的量将取决于所治疗的疾病以及本领域众所周知的其他因素。此类单位剂量可以是含有适合单次施用的一定量的IFN前蛋白的冻干干粉形式,或者是液体形式。干粉单位剂型可以与注射器、适量的稀释剂和/或用于施用的其他组分一起包装在试剂盒中。呈液体形式的单位剂量可以预先填充有适合于单次施用的一定量的IFN前蛋白的注射器的形式方便地提供。

[0527] 药物组合物还可以由含有适合多次施用的一定量的IFN前蛋白来批量供应。

[0528] 可以通过将具有期望的纯度的IFN前蛋白与本领域通常使用的任选的药学上可接受的载剂、赋形剂或稳定剂(所有这些在本文中都被称为“载剂”)(即,缓冲剂、稳定剂、防腐剂、等渗剂、非离子洗涤剂、抗氧化剂和其他各种添加剂)混合来制备药物组合物以作为冻干制剂或水溶液储存。参见Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版(Osol,编辑1980)。此类添加剂在所采用的剂量和浓度下应当对接受者无毒。

[0529] 缓冲剂有助于将pH值维持在接近生理状况的范围内。它们可以以多种浓度存在,但通常以约2mM至约50mM范围内的浓度存在。适用于本公开内容的缓冲剂包括有机和无机酸及其盐,诸如柠檬酸盐缓冲剂(例如,柠檬酸一钠-柠檬酸二钠混合物、柠檬酸-柠檬酸三钠混合物、柠檬酸-柠檬酸一钠混合物等)、琥珀酸盐缓冲剂(例如,琥珀酸-琥珀酸一钠混合物、琥珀酸-氢氧化钠混合物、琥珀酸-琥珀酸二钠混合物等)、酒石酸盐缓冲剂(例如,酒石酸-酒石酸钠混合物、酒石酸-酒石酸钾混合物、酒石酸-氢氧化钠混合物等)、富马酸盐缓冲剂(例如,富马酸-富马酸一钠混合物、富马酸-富马酸二钠混合物、富马酸一钠-富马酸二钠

混合物等)、葡萄糖酸盐缓冲液(例如,葡萄糖酸-葡萄糖酸钠混合物、葡萄糖酸-氢氧化钠混合物、葡萄糖酸-葡萄糖酸钾混合物等)、草酸盐缓冲液(例如,草酸-草酸钠混合物、草酸-氢氧化钠混合物、草酸-草酸钾混合物等)、乳酸盐缓冲液(例如,乳酸-乳酸钠混合物、乳酸-氢氧化钠混合物、乳酸-乳酸钾混合物等)和醋酸盐缓冲液(例如,醋酸-醋酸钠混合物、醋酸-氢氧化钠混合物等)。另外,还可以使用磷酸盐缓冲液、组氨酸缓冲液和三甲胺盐(诸如Tris)。

[0530] 可以添加防腐剂以延缓微生物生长,并且可以以约0.2%至1%(w/v)范围内的量添加。适用于本公开的防腐剂包括苯酚、苯甲醇、间甲酚、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、十八烷基二甲基苄基氯化铵、苯扎氯铵卤化物(例如,氯化物、溴化物和碘化物)、六甲氯铵和烷基对羟基苯甲酸酯(诸如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯)、儿茶酚、间苯二酚、环己醇和3-戊醇。可以添加等渗剂(有时称为"稳定剂")以确保本公开的液体组合物的等渗性,并且等渗剂包括多元糖醇,例如三元或更高级的糖醇,例如甘油、赤藓糖醇、阿拉伯糖醇、木糖醇、山梨糖醇和甘露醇。稳定剂是指一大类赋形剂,其功能范围包括从填充剂到添加剂,可以溶解治疗剂或有助于防止变性或粘附在容器壁上。典型的稳定剂可为多元糖醇(上文列举的);氨基酸类诸如精氨酸、赖氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、丙氨酸、鸟氨酸、L-亮氨酸、2-苯丙氨酸、谷氨酸、苏氨酸等,有机糖或糖醇,诸如乳糖、海藻糖、水苏糖、甘露糖醇、山梨糖醇、木糖醇、核糖醇、肌醇、半乳糖醇、甘油等,包括环多醇类诸如肌醇;聚乙二醇;氨基酸聚合物;含硫还原剂,诸如脲、谷胱甘肽、硫辛酸、硫代乙酸钠、硫代甘油、α-单硫代甘油和硫代硫酸钠;低分子量多肽(例如,10个残基或更少的肽);蛋白质,诸如人血清白蛋白、牛血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮单糖,诸如木糖、甘露糖、果糖、葡萄糖;二糖类,诸如乳糖、麦芽糖、蔗糖和海藻糖;和三糖类,诸如棉子糖;以及多糖类,诸如葡聚糖。稳定剂可以每重量IFN前蛋白的0.5至10重量%范围内的量存在。

[0531] 可以添加非离子表面活性剂或去污剂(也被称为"润湿剂")以帮助溶解糖蛋白以及保护糖蛋白免受搅拌引起的聚集,这也允许制剂暴露于剪切表面应力而不会导致蛋白的变性。合适的非离子表面活性剂包括聚山梨醇酯(20、80等)、聚氧沙姆(184、188等)和普朗尼克多元醇。非离子表面活性剂可以以约0.05mg/mL至约1.0mg/mL(例如约0.07mg/mL至约0.2mg/mL)的范围存在。

[0532] 其他杂项赋形剂包括填充剂(例如,淀粉)、螯合剂(例如,EDTA)、抗氧化剂(例如,抗坏血酸、蛋氨酸、维生素E)和共溶剂。

[0533] 本公开的IFN前蛋白可被配制为包含IFN前蛋白的药物组合物,例如含有一种或多种药学上可接受的赋形剂或载剂。为了制备包含本公开的IFN前蛋白的药物或无菌组合物,IFN前蛋白制剂可以与一种或多种药学上可接受的赋形剂或载剂组合。

[0534] 例如,可通过将IFN前蛋白与呈例如,冻干粉、浆液、水溶液、洗剂或悬浮液形式的生理上可接受的载剂、赋形剂或稳定剂混合来制备IFN前蛋白的制剂(参见,例如,Hardman等人,2001,Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics,McGraw-Hill,New York,N.Y.;Gennaro,2000,Remington:The Science and Practice of Pharmacy,Lippincott,Williams,and Wilkins,New York,N.Y.;Avis等人(编辑),1993,Pharmaceutical Dosage Forms:General Medications,Marcel Dekker,NY;Lieberman等

人(编辑),1990,Pharmaceutical Dosage Forms:Tablets,Marcel Dekker,NY;Lieberman等人(编辑),1990,Pharmaceutical Dosage Forms:Disperse Systems,Marcel Dekker,NY;Weiner和Kotkoskie,2000,Excipient Toxicity and Safety,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.)。

[0535] 对于特定受试者的有效量可根据多种因素而变化,诸如所治疗的疾患、受试者的整体健康状况、施用的方法途径和剂量以及副作用的严重程度(参见,例如,Maynard等人(1996)A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice,Interpharm Press,Boca Raton,Fla.;Dent(2001)Good Laboratory and Good Clinical Practice,Urch Publ.,London,UK)。

[0536] 本公开的组合物还可以使用本领域已知的多种方法中的一种方法或多种方法通过一种或多种施用途径施用。如技术人员将理解的,施用途径和/或模式将根据期望的结果而变化。IFN前蛋白的选定施用途径包括静脉内、肌内、皮内、腹膜内、皮下、脊髓或其他一般施用途径,例如通过注射或输注。一般施用可以代表除肠内和局部施用之外的施用模式,通常通过注射,并且包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眼眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下腔、椎管内、硬膜外和胸骨内注射和输注。或者,本公开的组合物可以通过非一般途径施用,诸如局部、表皮或粘膜施用途径,例如,鼻内、口服、阴道、直肠、舌下或局部。在一个实施例中,IFN前蛋白通过输注施用。在另一个实施例中,皮下施用本公开的IFN前蛋白。

[0537] 6.10.1.用于递送编码核酸的IFN前蛋白的药物组合物

[0538] 本公开的IFN前蛋白(例如,IFN受体激动剂)可通过可用于基因疗法的任何方法来递送,例如作为mRNA或通过在合适的启动子控制下编码IFN前蛋白(例如,IFN受体激动剂)的病毒载体来递送。

[0539] 示例性病毒载体包括重组腺病毒和腺相关病毒载体(rAAV)。rAAV载体基于有缺陷且非致病性的细小病毒腺相关2型病毒。大多数此类载体源自仅保留转基因表达盒侧翼的AAV反向末端重复序列的质粒。由于整合到转导细胞的基因组中而实现高效的基因转移和稳定的转基因递送是该载体系统的关键特征。AAV血清型可用于递送IL27转基因AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV8、AAV 8.2、AAV9和AAV rh10以及假型AAV,诸如AAV2/8、AAV2/5和AAV2/6。

[0540] 可以通过许多不同的工艺在临床规模上生产AAV。可以使用的系统的实例包括(1)哺乳动物细胞中的质粒DNA转染、(2)稳定的哺乳动物细胞系的Ad感染、(3)用重组单纯疱疹病毒(rHSV)感染哺乳动物细胞、以及(4)用重组杆状病毒感染昆虫细胞(Sf9细胞)(由Penaud-Budloo等人,2018,Mol Ther Methods Clin Dev.8:166-180综述)。

[0541] 复制缺陷型重组腺病毒载体(Ad)可以高滴度进行生产,并且很容易感染许多不同的细胞类型。大多数腺病毒载体经工程化使得用转基因替代Ad Ela、Elb和/或E3基因;随后,复制缺损型载体在人293细胞中繁殖,这些细胞提供缺失的反式基因功能。Ad载体可以在体内转导多种类型的组织,包括非分裂的分化细胞,诸如肝脏、肾脏和肌肉中发现的细胞。常规Ad载体具有较大的承载能力。

[0542] 包装细胞用于形成能够感染宿主细胞的病毒颗粒。此类细胞包括包装腺病毒的293细胞,以及包装逆转录病毒的w2细胞或PA317细胞。基因疗法中使用的病毒载体通常由

将核酸载体包装到病毒颗粒中的生产者细胞系产生。载体通常含有包装和随后整合到宿主中所需的最小病毒序列(如果适用),其他病毒序列被编码待表达的蛋白质的表达盒所代替。缺失的病毒功能由包装细胞系反式提供。例如,用于基因疗法的AAV载体通常仅具有来自AAV基因组的倒置末端重复(ITR)序列,这些序列是包装和整合到宿主基因组中所必需的。病毒DNA被包装在细胞系中,该细胞系含有编码其他AAV基因的辅助质粒,即rep和cap,但缺少ITR序列。该细胞系还感染了腺病毒作为辅助。辅助病毒促进AAV载体的复制和来自辅助质粒的AAV基因的表达。由于缺乏ITR序列,辅助质粒并没有大量包装。可以通过例如热处理来减少腺病毒的污染,腺病毒对热处理比AAV更敏感。

[0543] 核酸分子(例如,mRNA)或病毒可被配制成药物组合物中唯一的药物活性成分,或者可与用于所治疗的特定病症的其他活性剂组合。可选地,本文提供的组合物中可包含其他药剂、药物剂、载体、佐剂、稀释剂。例如,润湿剂、乳化剂和润滑剂(诸如十二烷基硫酸钠和硬脂酸镁)以及着色剂、脱模剂、包衣剂、甜味剂、调味剂和香味剂、防腐剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体中的任一者或多者也可存在于组合物中。可以被包含在组合物中的示例性其他试剂和赋形剂包括,例如,水溶性抗氧化剂,诸如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠;油溶性抗氧化剂,诸如抗坏血酸棕榈酸酯、丁基化羟基苯甲醚(BHA)、丁基化羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、α-生育酚;以及金属螯合剂,诸如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨糖醇、酒石酸和磷酸。

[0544] 6.11.治疗适应症和使用方法

[0545] 本公开提供了用于本公开的IFN前蛋白的使用方法和应用。

[0546] 本公开的IFN前蛋白(例如IFN受体激动剂)可用于在多种应用中刺激免疫应答。

[0547] 在某些方面,本公开提供了一种治疗癌症的方法,其包括向有此需要的受试者施用本文所述的IFN前蛋白或药物组合物。在一些实施例中,包含IFN部分的经活化的IFN蛋白是通过由癌组织表达的一个或多个蛋白酶切割IFN前蛋白中的一个或多个蛋白酶可切割接头而产生的。因此,IFN前蛋白在癌组织中被选择性地活化。

[0548] 在一些实施例中,本公开提供了一种用在癌组织中被选择性地活化的IFN蛋白治疗癌症的方法,其包括向有此需要的受试者施用如本文所述的IFN前蛋白或药物组合物,其中该IFN前蛋白具有一个或多个蛋白酶可切割接头,每个蛋白酶可切割接头包含用于由IFN蛋白所预期的癌组织表达的一种或多种蛋白酶的一个或多个底物。因此,包含IFN部分的经活化的IFN蛋白是通过癌组织中的一种或多种蛋白酶切割IFN前蛋白中的一个或多个蛋白酶可切割接头而产生的。

[0549] 本公开进一步提供了一种IFN蛋白的局部递送的方法,其包括向受试者施用如本文所述的IFN前蛋白或药物组合物,其中该IFN前蛋白具有一个或多个蛋白酶可切割接头,每个蛋白酶可切割接头包含用于由待向其局部递送IFN蛋白的组织表达的一种或多种蛋白酶的一个或多个底物。如本文所使用,术语“局部递送”不需要局部施用,而是表示IFN前蛋白的活性组分是指通过在预期位点处有活性的蛋白酶在所关注的病灶处活化该蛋白,任选地结合与用识别由组织表达的靶分子的靶向部分靶向到所关注的病灶。

[0550] 本公开进一步提供了向受试者施用具有降低的全身暴露和/或降低的全身毒性的IFN疗法的方法,其包括向受试者施用如本文所述的IFN前蛋白或药物组合物形式的IFN疗法,其中该IFN前蛋白具有一个或多个蛋白酶可切割接头,每个蛋白酶可切割接头包含用于

由期望和/或预期对其进行IFN疗法的组织表达的一种或多种蛋白酶的一个或多个底物。

[0551] 因此,由于在预期进行IFN治疗的病灶处优先活化IFN前蛋白,前述方法允许IFN疗法的脱靶副作用降低。

[0552] 在前述方法的一些实施例中,IFN前蛋白也是靶向的,并且包含识别在预期进行治疗的部位中表达(例如,由组织表达)的靶分子的一个或多个靶向部分。

[0553] 因此,本公开提供了一种将经活化的IFN蛋白靶向递送至预期进行治疗的部位(例如,癌组织)的方法,其包括向受试者施用如本文所述的IFN前蛋白或药物组合物,其中该IFN包含识别在病灶中或由预期进行治疗的组织(例如,癌组织)表达的靶分子的一个或多个靶向部分,并且该IFN具有一个或多个蛋白酶可切割接头,每个蛋白酶可切割接头包含用于由期望和/或预期对其进行IFN疗法的组织表达的一种或多种蛋白酶的一个或多个底物。

[0554] 本公开进一步提供了在靶组织中局部诱导免疫应答的方法,其包括向受试者施用如本文所述的IFN前蛋白或药物组合物,该IFN前蛋白或药物组合物具有能够结合在靶组织中表达的靶分子的一个或多个靶向部分、以及一个或多个蛋白酶可切割接头,每个蛋白酶可切割接头包含用于在该靶组织中表达的一种或多种蛋白酶的一个或多个底物。包含IFN部分的经活化的IFN蛋白可随后通过靶组织中的一种或多种蛋白酶切割IFN前蛋白中的一个或多个蛋白酶可切割接头而产生。所得经活化的IFN蛋白随后可以诱导针对靶组织中的至少一种细胞类型的免疫应答。

[0555] 在一些实施例中,施用不是对组织局部的。例如,当靶组织是癌组织时,施用可以是全身的或皮下的。

[0556] 本公开的IFN前蛋白可用于治疗表达靶分子(在肿瘤细胞上或在肿瘤微环境中,例如,细胞外基质或肿瘤淋巴细胞)的任何增殖性疾病(例如,癌症)。在具体实施例中,癌症是急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓细胞白血病(AML)、肾上腺皮质癌、肛门癌、阑尾癌、星形细胞瘤、基底细胞癌、脑肿瘤、胆管癌、膀胱癌、骨癌、乳腺癌、支气管肿瘤、伯基特淋巴瘤、原发性不明癌、心脏肿瘤、宫颈癌、脊索瘤、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性髓性白血病(CML)、慢性骨髓增生性肿瘤、结肠癌、结直肠癌、颅咽管瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、导管癌、胚胎性肿瘤、子宫内膜癌、室管膜瘤、食道癌、嗅神经母细胞瘤、纤维组织细胞瘤、尤文氏肉瘤、眼癌、生殖细胞肿瘤、胆囊癌、胃癌、胃肠道类癌瘤、胃肠道间质瘤、妊娠滋养细胞疾病、神经胶质瘤、头颈癌、毛细胞白血病、肝细胞癌、组织细胞增生症、霍奇金淋巴瘤、下咽癌、眼内黑色素瘤、胰岛细胞瘤、卡波西肉瘤、肾癌、朗格汉斯细胞组织细胞增生症、喉癌、白血病、唇和口腔癌、肝癌、小叶原位癌、肺癌、淋巴瘤、巨球蛋白血症、恶性纤维组织细胞瘤、黑色素瘤、默克尔细胞癌、间皮瘤、具有隐匿性原发性的转移性鳞状颈癌、涉及NUT基因的中线道癌、口腔癌、多发性内分泌肿瘤综合征、多发性骨髓瘤、蕈样肉芽肿、骨髓增生异常综合征、骨髓增生异常/骨髓增生性肿瘤、鼻腔及鼻旁窦癌、鼻咽癌、神经母细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小细胞肺癌、口咽癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳头状瘤病、副神经节瘤、甲状旁腺癌、阴茎癌、咽癌、嗜铬细胞瘤、垂体瘤、胸膜肺母细胞瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、前列腺癌、直肠癌、肾细胞癌、肾盂及输尿管癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌样瘤、唾液腺癌、塞扎里综合征、皮肤癌、小细胞肺癌、小肠癌、软组织肉瘤、脊髓肿瘤、胃癌、T细胞淋巴瘤、畸胎瘤、睾丸癌、咽喉癌、胸腺瘤及胸腺癌、甲状腺癌、尿道癌、子宫癌、阴道癌、外阴癌或威尔姆斯肿瘤。

[0557] 下表I示出了可以使用靶向特定靶分子的IFN前蛋白的示例性适应症。

[0558]

| 表 I<br>靶分子适应症的实例 | |
|---|---|
| **靶** | **示例性适应症** |
| ADRB3 | 尤文肉瘤 |
| ALK | NSCLC、ALCL、IMT、神经母细胞瘤 |
| B7H3 | 黑色素瘤、骨肉瘤、白血病、乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、胰腺癌、结直肠癌 |
| BCMA | 多发性骨髓瘤、白血病（*例如*，急性淋巴细胞性白血病（“ALL”）、急性骨髓性白血病（“AML”）、慢性淋巴细胞白血病（“CLL”）、慢性骨髓性白血病（“CML”）和毛细胞白血病（“HCL”））；淋巴瘤（*例如*，霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤，包括弥漫性大 B 细胞淋巴瘤（“DLBCL”）） |
| 钙粘蛋白 17 | 胃、胰腺和结直肠腺癌 |
| CAIX | 透明细胞肾细胞癌、缺氧实体瘤、头颈鳞癌 |
| CD123 | 白血病（*例如*，ALL、CLL、AML、CML、HCL）；淋巴瘤（*例如*，霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤，*例如* DLBCL）；多发性骨髓瘤。在优选实施例中，适应症是 AML。 |
| CD171 | 神经母细胞瘤、副神经节瘤 |
| CD179a | B 细胞恶性肿瘤 |
| CD19 | 白血病（*例如*，ALL、CLL、AML、CML、HCL）；淋巴瘤（*例如*，霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤，*例如* DLBCL）；多发性骨髓瘤。 |
| CD20 | 白血病（*例如*，ALL、CLL、AML、CML、HCL）；淋巴瘤（*例如*，霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤，*例如* DLBCL）；多发性骨髓瘤。 |
| CD22 | 白血病（*例如*，ALL、CLL、AML、CML、HCL）；淋巴瘤（*例如*，霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤，*例如* DLBCL）；多发性骨髓瘤；肺癌 |
| CD24 | 卵巢癌、乳腺癌、前列腺癌、膀胱癌、肾癌、非小细胞癌 |
| CD30 | 间变性大细胞淋巴瘤、胚胎癌、霍奇金淋巴瘤 |
| CD32b | B 细胞恶性肿瘤、胃癌、胰腺癌、食管癌、胶质母细胞瘤、乳腺癌、结直肠癌 |
| CD33 | 白血病（*例如*，ALL、CLL、AML、CML、HCL）；淋巴瘤（*例如*，霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤，*例如* DLBCL）；多发性骨髓瘤。在优选实施例中，适应症是 AML。 |
| CD38 | 白血病（*例如*，ALL、CLL、AML、CML、HCL）；淋巴瘤（*例如*，霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤，*例如* DLBCL）；多发性骨髓瘤 |
| CD44v6 | 结肠癌、头颈小细胞癌 |
| CD97 | B 细胞恶性肿瘤、胃癌、胰腺癌、食管癌、胶质母细胞瘤、乳腺癌、结直肠癌 |
| CEA (CEACAM5) | 结直肠癌、胃癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、甲状腺髓样癌 |
| CLDN6 | 卵巢癌、乳腺癌、肺癌 |
| CLL-1 | 白血病（*例如*，ALL、CLL、AML、CML、HCL）；淋巴瘤（*例如*， |

[0559]

| 表 I<br>靶分子适应症的实例 | |
|---|---|
| **靶** | **示例性适应症** |
| | 霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤，*例如* DLBCL）；多发性骨髓瘤。在优选实施例中，适应症是 AML。 |
| CS1 (SLAMF7) | 多发性骨髓瘤 |
| EGFR | 肺癌鳞状细胞癌、肛门癌、胶质母细胞瘤、头颈部上皮性肿瘤、结肠癌 |
| EGFRvIII | 胶质母细胞瘤 |
| EPCAM | 胃肠癌、结直肠癌 |
| EphA2 | 卡波西肉瘤、胶质母细胞瘤、实体瘤、神经胶质瘤 |
| 肝配蛋白 B2 | 甲状腺癌、乳腺癌、恶性黑色素瘤 |
| ERBB2 (Her2/neu) | 乳腺癌、卵巢癌、胃癌、肺腺癌、非小细胞肺癌、子宫癌、子宫浆液性子宫内膜癌、唾液管癌 |
| FAP | 胰腺癌、结直肠癌、转移瘤、上皮癌、软组织肉瘤 |
| FCRL5 | 多发性骨髓瘤 |
| FLT3 | 白血病（*例如*，ALL、CLL、AML、CML、HCL）；淋巴瘤（*例如*，霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤，*例如*，DLBCL）、多发性骨髓瘤 |
| 叶酸受体 α | 卵巢癌、乳腺癌、肾癌、肺癌、结直肠癌、脑癌 |
| 叶酸受体 β | 卵巢癌 |
| 岩藻糖基 GM1 | AML、骨髓瘤 |
| GD2 | 恶性黑色素瘤、神经母细胞瘤 |
| GD3 | 黑色素瘤 |
| GloboH | 卵巢癌、胃癌、前列腺癌、肺癌、乳腺癌和胰腺癌 |
| gp100 | 黑色素瘤 |
| GPNMB | 乳腺癌、头颈癌 |
| GPR20 | GIST |
| GPR64 | 尤文肉瘤、前列腺肉瘤、肾肉瘤和肺肉瘤 |
| GPRC5D | 多发性骨髓瘤 |
| HAVCR1 | 肾癌 |
| HER2 | HER-2 (+)胃食管结合部腺癌、HER-2 阳性胃腺癌、HER2 阳性乳腺癌 |
| HER3 | 结肠癌和胃癌 |
| HMWMAA | 黑色素瘤、胶质母细胞瘤、乳腺癌 |
| IGF-I 受体 | 乳腺癌、前列腺癌、肺癌 |
| IL11Rα | 甲状腺乳头状癌、骨肉瘤、结直肠腺癌、淋巴细胞白血病 |
| IL13Rα2 | 肾细胞癌、前列腺癌、神经胶质瘤、头颈癌、星形细胞瘤 |
| KIT | 粒细胞白血病、卡波西肉瘤、红白血病、胃肠道间质瘤 |
| KLRG2 | 乳腺癌、肺癌和卵巢癌。 |
| LewisY | 鳞状细胞肺癌、肺腺癌、卵巢癌和结直肠腺癌 |
| LMP2 | 前列腺癌、霍奇金淋巴瘤、鼻咽癌 |
| LRP6 | 乳腺癌 |
| LY6K | 乳腺癌、肺癌、卵巢癌和宫颈癌 |
| LYPD8 | 结直肠癌和胃癌 |

[0560]

| 表 I<br>靶分子适应症的实例 | |
|---|---|
| **靶** | **示例性适应症** |
| 间皮素 | 间皮瘤、胰腺癌、卵巢癌、胃癌、肺癌、子宫内膜癌 |
| MUC1 | 乳腺癌和卵巢癌、肺癌、胃癌、胰腺癌、前列腺癌 |
| NCAM | 黑色素瘤、肾母细胞瘤、小细胞肺癌、神经母细胞瘤、骨髓瘤、副神经节瘤、胰腺腺泡细胞癌、骨髓性白血病 |
| NY-BR-1 | 乳腺癌 |
| 邻乙酰基GD2 | 神经母细胞瘤、黑色素瘤 |
| OR51E2 | 前列腺癌 |
| PANX3 | 骨肉瘤 |
| PLAC1 | 肝细胞癌 |
| 聚唾液酸 | 小细胞肺癌 |
| PDGFR-β | 粒单核细胞白血病、慢性粒细胞白血病、急性粒细胞白血病、急性淋巴细胞白血病 |
| PRSS21 | 结肠癌、睾丸癌、卵巢癌 |
| PSCA | 前列腺癌、胃癌和膀胱癌 |
| PSMA | 前列腺癌 |
| ROR1 | 转移性癌症、慢性淋巴细胞白血病、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、胰腺癌、肉瘤实体瘤 |
| SLC34A2 | 膀胱癌 |
| SLC39A6 | 乳腺癌、食道癌 |
| SLITRK6 | 乳腺癌、尿路上皮癌、肺癌 |
| SSEA-4 | 乳腺癌、癌症干细胞、上皮性卵巢癌 |
| STEAP1 | 前列腺癌 |
| STEAP2 | 前列腺癌（包括去势抵抗性前列腺癌）、膀胱癌、宫颈癌、肺癌、结肠癌、肾癌、乳腺癌、胰腺癌、胃癌、子宫癌、卵巢癌，优选地前列腺癌 |
| TACSTD2 | 癌症，*例如*，非小细胞肺癌 |
| TAG72 | 卵巢癌、乳腺癌、结肠癌、肺癌、胰腺癌、胃癌 |
| TEM1/CD248 | 结直肠癌 |
| TEM7R | 结直肠癌 |
| Tn | 结直肠癌、乳腺癌、宫颈癌、肺癌、胃癌 |
| TSHR | 甲状腺癌、多发性骨髓瘤 |
| 酪氨酸酶 | 前列腺癌、黑色素瘤 |
| UPK2 | 膀胱癌 |
| VEGFR2 | 卵巢癌和胰腺癌、肾细胞癌、结直肠癌、甲状腺髓样癌 |

[0561] 其他靶分子和相应的适应症在例如,Hafeez等人,2020,Molecules 25:4764,doi:10.3390/molecules25204764中公开,特别是在表1中。表1整体通过引用并入本文。

[0562] 在进一步的实施例中,IFN前蛋白(例如,IFN受体激动剂)可用于增强由另一种试剂引发的免疫应答。因此,在一些实施例中,本公开的IFN前蛋白(例如,IFN受体激动剂)作为免疫原性剂的辅助疗法而施用。在一些实施例中,免疫原性剂是有佐剂的或无佐剂的疫苗。因此,IFN前蛋白(例如,IFN受体激动剂)可以增强由疫苗引发的抗原特异性免疫应答。在各种实施例中,疫苗是预防性或治疗性癌症疫苗或针对传染原(例如病毒、细菌或寄生

虫)的预防性或治疗性疫苗。

[0563] 7.编号实施例

[0564] 尽管已经示出和描述了各种具体实施例,但是应当理解,在不脱离本公开的精神和范围的情况下可以进行各种改变。本公开通过下面阐述的编号的实施例来举例说明。

[0565] 在随后的编号实施例中,靶向部分优选地结合至哺乳动物靶分子,IFN部分优选地源自哺乳动物IFN,Fc结构域优选地源自哺乳动物抗体,并且受试者优选为哺乳动物。更优选地,哺乳动物是人类。

[0566] 1.一种I型干扰素(IFN)前蛋白,其包含:

[0567] (a)第一多肽链,其包含:

[0568] (i)第一免疫球蛋白恒定结构域;

[0569] (ii)第一接头;

[0570] (iii)第一I型干扰素(IFN)部分;

[0571] (iv)第二接头;以及

[0572] (v)第一Fc结构域;

[0573] (b)第二多肽链,其包含:

[0574] (i)第二免疫球蛋白恒定结构域;

[0575] (ii)第三接头;

[0576] (iii)第二I型干扰素(IFN)部分;

[0577] (iv)第四接头;以及

[0578] (v)第二Fc结构域,其与该第一Fc结构域缔合以形成Fc区;

[0579] 其中所述第一接头、第二接头、第三接头和第四接头中的至少两者是蛋白酶可切割接头(PCL),任选地其中所述IFN前蛋白中的所述IFN部分受到所述Fc结构域的空间位阻而不能结合至IFN受体。

[0580] 2.根据实施例1所述的IFN前蛋白,其中所述第一IFN部分和第二IFN部分各自包含与以下项具有至少约90%序列同一性的氨基酸序列:(a)全长成熟人IFNα1、IFNα2b、IFNβ、IFNω、IFNε或IFNκ,或(b)成熟人IFNα1、IFNα2b、IFNβ、IFNω、IFNε或IFNκ,其在N-末端和/或C-末端处具有至多一个15个氨基酸截短。

[0581] 3.根据实施例1所述的IFN前蛋白,其中所述第一IFN部分和第二IFN部分各自包含与以下项具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列:(a)全长成熟人IFNα1、IFNα2b、IFNβ、IFNω、IFNε或IFNκ,或(b)成熟人IFNα1、IFNα2b、IFNβ、IFNω、IFNε或IFNκ,其在N-末端和/或C-末端处具有至多一个15个氨基酸截短。

[0582] 4.根据实施例1所述的IFN前蛋白,其中所述第一IFN部分和第二IFN部分各自包含与以下项具有至少约98%序列同一性的氨基酸序列:(a)全长成熟人IFNα1、IFNα2b、IFNβ、IFNω、IFNε或IFNκ,或(b)成熟人IFNα1、IFNα2b、IFNβ、IFNω、IFNε或IFNκ,其在N-末端和/或C-末端处具有至多一个15个氨基酸截短。

[0583] 5.根据实施例1至4中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述第一IFN部分和第二IFN部分各自包含与成熟人IFNα1或IFNα2b相比具有一个或多个弱化突变的氨基酸序列。

[0584] 6.根据实施例1至5中任一项所述的IFN前蛋白,其具有选自以下项的一个或多个突变:L26A、F27A、R33A、R33K、L30A、D35E、H57Y、E58N、Q61S、H57S、E58S、H57A、E58A、Q61A、

Q90A、E96A、R120A、L135A、R144A、R144S、R144T、R144Y、R144I、R144L、A145D、A145H、A145K、A145M、A145V、A145Y、R149A、R149K、S152A、R162A和E165D。

[0585] 7.根据实施例1至6中任一项所述的IFN前蛋白,其包含氨基酸取代R33A。

[0586] 8.根据实施例1至6中任一项所述的IFN前蛋白,其包含氨基酸取代R33K。

[0587] 9.根据实施例1至6中任一项所述的IFN前蛋白,其包含氨基酸取代Q90A。

[0588] 10.根据实施例1至6中任一项所述的IFN前蛋白,其包含氨基酸取代E96A。

[0589] 11.根据实施例1至6中任一项所述的IFN前蛋白,其包含氨基酸取代R120A。

[0590] 12.根据实施例1至6中任一项所述的IFN前蛋白,其包含氨基酸取代A145M。

[0591] 13.根据实施例1至6中任一项所述的IFN前蛋白,其包含氨基酸取代R149A。

[0592] 14.根据实施例1至6中任一项所述的IFN前蛋白,其包含氨基酸取代R149K。

[0593] 15.根据实施例1至6中任一项所述的IFN前蛋白,其包含氨基酸取代S152A。

[0594] 16.根据实施例1至6中任一项所述的IFN前蛋白,其包含氨基酸取代R33A、H57Y、E58N和Q61S。

[0595] 17.根据实施例1至6中任一项所述的IFN前蛋白,其包含氨基酸取代H57Y、E58N、Q61S和R144A。

[0596] 18.根据实施例1至6中任一项所述的IFN前蛋白,其包含氨基酸取代Q90A和R120A。

[0597] 19.根据实施例1至6中任一项所述的IFN前蛋白,其包含氨基酸取代A145M和R149K。

[0598] 20.根据实施例1至19中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述第一接头、第二接头、第三接头和第四接头是蛋白酶可切割接头(PCL)。

[0599] 21.根据实施例1至19中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述第一接头和第三接头是蛋白酶可切割接头(PCL),任选地其中所述第二接头和第四接头是不可切割接头(NCL)。

[0600] 22.根据实施例1至19中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述第二接头和第四接头是蛋白酶可切割接头(PCL),任选地其中所述第一接头和第三接头是不可切割接头(NCL)。

[0601] 23.根据实施例1至22中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述PCL各自包括可被在表A中列出的任何蛋白酶切割的底物序列。

[0602] 24.根据实施例1至23中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述PCL各自包括选自在表B中列出的所述底物序列的一个或多个底物序列。

[0603] 25.根据实施例1至24中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述PCL各自包括选自在表C中列出的所述底物序列的一个或多个间隔子序列。

[0604] 26.根据实施例1至25中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述PCL各自包括在表D中列出的PCL序列中的任一者的氨基酸序列或其具有至多5个氨基酸取代的变体,例如,其具有1个氨基酸取代、2个氨基酸取代、3个氨基酸取代、4个氨基酸取代或5个氨基酸取代的变体。

[0605] 27.根据实施例1至26中任一项所述的IFN前蛋白,其包含两个或四个PCL,所述PCL包括氨基酸序列ISSGLLSGRSDNH或由其组成。

[0606] 28.根据实施例1至26中任一项所述的IFN前蛋白,其包含两个或四个PCL,所述PCL包括氨基酸序列GGGISSGLLSGRSDNHGGGISSGLLSGRSDNHGGS或由其组成。

[0607] 29.根据实施例1至26中任一项所述的IFN前蛋白,其包含两个或四个PCL,所述PCL

包括氨基酸序列GGSGGSIPVSLRSGGGISSGLLSGRSDNHGGSGGS或由其组成。

[0608] 30.根据实施例1至26中任一项所述的IFN前蛋白,其包含两个或四个PCL,所述PCL包括氨基酸序列GGSGGSVPLSLYSGGGISSGLLSGRSDNHGGSGGS或由其组成。

[0609] 31.根据实施例1至26中任一项所述的IFN前蛋白,其包含两个或四个PCL,所述PCL包括氨基酸序列GGSHPVGLLARGGGHPVGLLARGGGHPVGLLARGS或由其组成。

[0610] 32.根据实施例1至26中任一项所述的IFN前蛋白,其包含两个或四个PCL,所述PCL包括氨基酸序列GGSHPVGLLARGGGHPVGLLARGGSGRSAGGSGRSA或由其组成。

[0611] 33.根据实施例1至32中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述第一接头和第三接头是相同的并且/或者所述第三和第四接头是相同的。

[0612] 34.根据实施例33所述的IFN前蛋白,其中所述第一接头、第二接头、第三接头和第四接头是相同的。

[0613] 35.根据实施例1至33中任一项所述的IFN前蛋白,其中(i)所述第一接头和第三接头是不可切割接头,或(ii)所述第二接头和第四接头是不可切割接头。

[0614] 36.根据实施例35所述的IFN前蛋白,其中所述不可切割接头包括在表E中列出的所述NCL序列中的任一者或由其组成。

[0615] 37.根据实施例1至33中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述第一Fc结构域和/或所述第二Fc结构域包含铰链结构域。

[0616] 38.根据实施例1至37中任一项所述的IFN前蛋白,其进一步包含结合至一个或多个靶分子的一个或多个靶向部分。

[0617] 39.根据实施例38所述的IFN前蛋白,其包含第一靶向部分和第二靶向部分。

[0618] 40.根据实施例39所述的IFN前蛋白,其中所述第一靶向部分和第二靶向部分是抗体或其抗原结合片段。

[0619] 41.根据实施例40所述的IFN前蛋白,其中所述第一靶向部分和第二靶向部分是Fab。

[0620] 42.根据实施例40或实施例41所述的IFN前蛋白,其中所述第一靶向部分和第二靶向部分包含Fab结构域。

[0621] 43.根据实施例42所述的IFN前蛋白,其中所述第一靶向部分和第二靶向部分进一步包含铰链序列。

[0622] 44.根据实施例43所述的IFN前蛋白,其中所述第一靶向部分和第二靶向部分进一步包含Fc结构域,每个Fc结构域包含CH2结构域和CH3结构域。

[0623] 45.根据实施例44所述的IFN前蛋白,其中所述第一靶向部分的所述Fc结构域和所述第二靶向部分的所述Fc结构域彼此缔合。

[0624] 46.根据实施例39至45中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述第一靶向部分和第二靶向部分分别位于所述第一接头和第三接头的N-末端。

[0625] 47.根据实施例38至46中任一项所述的IFN前蛋白,其中第一免疫球蛋白恒定结构域是第一靶向部分的一部分并且第二免疫球蛋白恒定结构域是第二靶向部分的一部分。

[0626] 48.根据实施例40所述的IFN前蛋白,其中所述第一免疫球蛋白恒定结构域是CH3结构域。

[0627] 49.根据实施例40所述的IFN前蛋白,其中所述第一免疫球蛋白恒定结构域是CH1

结构域。

[0628] 50.根据实施例1至49中任一项所述的IFN前蛋白,其被构造成如图1A、图2A或图2D所示。

[0629] 51.根据实施例50所述的IFN前蛋白,其包含所述第一多肽链、所述第二多肽链、第三多肽链和第四多肽链,其中:

[0630] (a)所述第一多肽链包含:

[0631] (i)第一VH1结构域;

[0632] (ii)第一CH1结构域;

[0633] (iii)第三Fc结构域,其包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域,其中所述CH3结构域是所述第一免疫球蛋白恒定结构域;

[0634] (iv)所述第一接头;

[0635] (v)所述第一I型干扰素(IFN)部分;

[0636] (vi)所述第二接头;以及

[0637] (vii)所述第一Fc结构域;

[0638] (b)所述第二多肽链包含:

[0639] (i)第二VH1结构域;

[0640] (ii)第二CH1结构域;

[0641] (iii)第四Fc结构域,其包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域,其中所述CH3结构域是所述第二免疫球蛋白恒定结构域;

[0642] (iv)所述第三接头;

[0643] (v)所述第二I型干扰素(IFN)部分;

[0644] (vi)所述第四接头;以及

[0645] (vii)所述第三Fc结构域;

[0646] (c)所述第三多肽链包含:

[0647] (i)第一VL结构域;

[0648] (ii)第一CL结构域;并且

[0649] (d)所述第四多肽链包含:

[0650] (i)第二VL结构域;以及

[0651] (ii)第二CL结构域;

[0652] 其中所述第一多肽链与所述第三多肽链缔合,使得所述第一VH、CH1、VL和CL形成所述第一靶向部分,并且其中所述第二多肽链与所述第四多肽链缔合,使得所述第二VH、CH1、VL和CL形成所述第二靶向部分。

[0653] 52.根据实施例51所述的IFN前蛋白,其中所述第一接头、第二接头、第三接头和第四接头是蛋白酶可切割接头(PCL)。

[0654] 53.根据实施例51所述的IFN前蛋白,其中所述第一接头和第三接头是不可切割接头(NCL),并且所述第二接头和第四接头是蛋白酶可切割接头(PCL)。

[0655] 54.根据实施例51所述的IFN前蛋白,其中所述第一接头和第三接头是蛋白酶可切割接头(PCL),并且所述第二接头和第四接头是不可切割接头(NCL)。

[0656] 55.根据实施例1至49中任一项所述的IFN前蛋白,其被构造成如图1B、图2B或图2E

所示。

[0657] 56.根据实施例55所述的IFN前蛋白,其中:

[0658] (a)所述第一多肽链包含:

[0659] (i)第一VH1结构域;

[0660] (ii)第一CH1结构域;

[0661] (iii)所述第一接头;

[0662] (iv)所述第一I型干扰素(IFN)部分;

[0663] (v)所述第二接头;以及

[0664] (vi)所述第一Fc结构域;

[0665] (b)所述第二多肽链包含:

[0666] (i)第二VH1结构域;

[0667] (ii)第二CH1结构域;

[0668] (iii)所述第三接头;

[0669] (iv)所述第二I型干扰素(IFN)部分;

[0670] (v)所述第四接头;以及

[0671] (vi)所述第二Fc结构域;

[0672] (c)所述第三多肽链包含:

[0673] (i)第一VL结构域;

[0674] (ii)第二CL结构域;并且

[0675] (d)所述第四多肽链包含:

[0676] (i)第二VL结构域;

[0677] (ii)第二CL结构域;

[0678] 其中所述第一多肽链与所述第三多肽链缔合,使得所述第一VH、CH1、VL和CL形成所述第一靶向部分,并且其中所述第二多肽链与所述第四多肽链缔合,使得所述第二VH、CH1、VL和CL形成所述第二靶向部分。

[0679] 57.根据实施例56所述的IFN前蛋白,其中所述第一接头、第二接头、第三接头和第四接头是蛋白酶可切割接头(PCL)。

[0680] 58.根据实施例56所述的IFN前蛋白,其中所述第一接头和第三接头是不可切割接头(NCL),并且所述第二接头和第四接头是蛋白酶可切割接头(PCL)。

[0681] 59.根据实施例56所述的IFN前蛋白,其中所述第一接头和第三接头是蛋白酶可切割接头(PCL),并且所述第二接头和第四接头是不可切割接头(NCL)。

[0682] 60.根据实施例1至49中任一项所述的IFN前蛋白,其被构造成如图1C、图2C或图2F所示。

[0683] 61.根据实施例60所述的IFN前蛋白,其包含所述第一多肽链、所述第二多肽链、第三多肽链和第四多肽链,其中:

[0684] (a)所述第一多肽链包含:

[0685] (i)第一VH1结构域;

[0686] (ii)第一CH1结构域;

[0687] (iii)第一铰链结构域;

[0688] (iv)所述第一接头;

[0689] (v)所述第一I型干扰素(IFN)部分;

[0690] (vi)所述第二接头;以及

[0691] (vii)所述第一Fc结构域;

[0692] (b)所述第二多肽链包含:

[0693] (i)第二VH1结构域;

[0694] (ii)第二CH1结构域;

[0695] (iii)第二铰链结构域;

[0696] (iv)所述第三接头;

[0697] (v)所述第二I型干扰素(IFN)部分;

[0698] (vi)所述第四接头;以及

[0699] (vii)所述第二Fc结构域;

[0700] (c)所述第三多肽链包含:

[0701] (i)第一VL结构域;

[0702] (ii)第一CL结构域;并且

[0703] (d)所述第四多肽链包含:

[0704] (i)第二VL结构域;以及

[0705] (ii)第二CL结构域;

[0706] 其中所述第一多肽链与所述第三多肽链缔合,使得所述第一VH、CH1、VL和CL形成所述第一靶向部分,并且其中所述第二多肽链与所述第四多肽链缔合,使得所述第二VH、CH1、VL和CL形成所述第二靶向部分。

[0707] 62.根据实施例61所述的IFN前蛋白,其中所述第一接头、第二接头、第三接头和第四接头是蛋白酶可切割接头(PCL)。

[0708] 63.根据实施例61所述的IFN前蛋白,其中所述第一接头和第三接头是不可切割接头(NCL),并且所述第二接头和第四接头是蛋白酶可切割接头(PCL)。

[0709] 64.根据实施例61所述的IFN前蛋白,其中所述第一接头和第三接头是蛋白酶可切割接头(PCL),并且所述第二接头和第四接头是不可切割接头(NCL)。

[0710] 65.根据实施例38至61中任一项所述的IFN前蛋白,本文中所述第一靶向部分和/或第二靶向部分能够结合至细胞外基质(ECM)抗原、肿瘤反应性淋巴细胞抗原、肿瘤或病毒淋巴细胞的细胞表面分子、T细胞抗原(TCA)、检查点抑制剂、肿瘤相关抗原(TAA)、树突状细胞(DC)或其他抗原呈递细胞(APC)抗原、或自然杀伤(NK)细胞抗原。

[0711] 66.根据实施例38至65中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述第一靶向部分和/或第二靶向部分能够结合至第6.7节中鉴定的任何靶分子。

[0712] 67.根据实施例38至66任一项所述的IFN前蛋白,其中所述第一靶向部分和/或第二靶向部分(a)包含在表F中列出的抗体的(i)CDR或(ii)VH序列和VL序列或(b)与表F中列出的所述抗体竞争以结合至所述靶分子。

[0713] 68.根据实施例38至66中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述第一靶向部分和/或第二靶向部分能够结合至ECM抗原,所述ECM抗原任选地选自多配体聚糖、乙酰肝素酶、整联蛋白、骨桥蛋白、连接蛋白、钙粘蛋白、层粘连蛋白、层粘连蛋白型EGF、凝集素、纤连蛋白、缺

口蛋白、粘连蛋白(例如,粘连蛋白-4)、腱生蛋白、胶原蛋白(例如,X型胶原蛋白)和基质蛋白。

[0714] 69.根据实施例68所述的IFN前蛋白,其中所述第一靶向部分和/或第二靶向部分能够结合至粘连蛋白,例如,粘连蛋白4。

[0715] 70.根据实施例68所述的IFN前蛋白,其中所述第一靶向部分和/或第二靶向部分能够结合至胶原蛋白,例如,胶原蛋白X。

[0716] 71.根据实施例38至66中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述第一靶向部分和/或第二靶向部分能够结合至肿瘤或病毒淋巴细胞的细胞表面分子。

[0717] 72.根据实施例71所述的IFN前蛋白,其中所述抗原是T细胞共刺激蛋白。

[0718] 73.根据实施例72所述的IFN前蛋白,其中所述T细胞共刺激蛋白是CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C或B7-H3。

[0719] 74.根据实施例73所述的IFN前蛋白,其中所述T细胞共刺激蛋白是B7-H3。

[0720] 75.根据实施例38至66中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述第一靶向部分和/或第二靶向部分能够结合至检查点抑制剂。

[0721] 76.根据实施例75所述的IFN前蛋白,其中所述检查点抑制剂是CTLA-4、PD1、PDL1、PDL2、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、TIM3、GAL9、LAG3、VISTA、KIR、2B4、CD160、CGEN-15049、CHK1或CHK2。

[0722] 77.根据实施例76所述的IFN前蛋白,其中所述检查点抑制剂是PDL1。

[0723] 78.根据实施例76所述的IFN前蛋白,其中所述检查点抑制剂是PD1。

[0724] 79.根据实施例76所述的IFN前蛋白,其中所述检查点抑制剂是LAG3。

[0725] 80.根据实施例38至66中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述第一靶向部分和/或第二靶向部分能够结合至肿瘤相关抗原(TAA)。

[0726] 81.根据实施例80所述的IFN前蛋白,其中所述第一靶向部分和/或第二靶向部分能够结合至AFP、ALK、BAGE蛋白、BIRC5(生存素)、BIRC7、β-连环蛋白、brc-abl、BRCA1、BORIS、CA9、碳酸酐酶IX、半胱天冬酶-8、CALR、CEACAM5(也称为癌胚抗原或CEA)、CCR5、CD19、CD20(MS4A1)、CD22、CD30、CD40、CDK4、CEA、CTLA4、细胞周期蛋白-B1、CYP1B1、EGFR、EGFRvIII、ErbB2/Her2、ErbB3、ErbB4、ETV6-AML、EpCAM、EphA2、Fra-1、FOLR1、GAGE蛋白(例如,GAGE-1或-2)、GD2、GD3、GloboH、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3、GM3、gp100、Her2、HLA/B-raf、HLA/k-ras、HLA/MAGE-A3、hTERT、LMP2、MAGE蛋白(例如,MAGE-1、-2、-3、-4、-6和-12)、MART-1、间皮素、ML-IAP、Muc1、Muc2、Muc3、Muc4、Muc5、Muc16(CA-125)、MUM1、NA17、NY-BR1、NY-BR62、NY-BR85、NY-ESO1、OX40、p15、p53、PAP、PAX3、PAX5、PCTA-1、PLAC1、PRLR、PRAME、PSMA(FOLH1)、RAGE蛋白、Ras、RGS5、Rho、SART-1、SART-3、STEAP1、STEAP2、TAG-72、TGF-β、TMPRSS2、Thompson-nouvelle抗原(Tn)、TRP-1、TRP-2、酪氨酸酶或尿斑蛋白-3。

[0727] 82.根据实施例81所述的IFN前蛋白,其中所述TAA是EGFR。

[0728] 83.根据实施例81所述的IFN前蛋白,其中所述TAA是HER2。

[0729] 84.根据实施例81所述的IFN前蛋白,其中所述TAA是EPCAM。

[0730] 85.根据实施例81所述的IFN前蛋白,其中所述TAA是CEACAM5。

[0731] 86.根据实施例81所述的IFN前蛋白,其中所述TAA是CD20。

[0732] 87.根据实施例38至66中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述第一靶向部分和/或第二靶向部分能够结合至树突状细胞(DC)抗原,所述DC抗原任选地选自XCR1、Clec9a、CD1c、CD11c、CD14、PDL1、巨噬细胞甘露糖受体(CD206)和DEC-205。

[0733] 88.根据实施例87所述的IFN前蛋白,其中所述树突状细胞抗原是XCR1。

[0734] 89.根据实施例87所述的IFN前蛋白,其中所述树突状细胞抗原是Clec9a。

[0735] 90.根据实施例87所述的IFN前蛋白,其中所述树突状细胞抗原是DEC-205。

[0736] 91.根据实施例38至66中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述第一靶向部分和/或第二靶向部分能够结合至自然杀伤(NK)细胞抗原。

[0737] 92.根据实施例1至37中任一项所述的IFN前蛋白,其进一步包含一个或多个靶向部分,每个靶向部分包括用于结合至一个或多个靶分子的工具。

[0738] 93.根据实施例92所述的IFN前蛋白,其包含第一靶向部分和第二靶向部分,所述第一靶向部分和所述第二靶向部分各自包括用于结合至靶分子的工具。

[0739] 94.根据实施例93所述的IFN前蛋白,其中第一靶向部分和第二靶向部分是抗体或其抗原结合片段。

[0740] 95.根据实施例94所述的IFN前蛋白,其中所述第一靶向部分和所述第二靶向部分是Fab。

[0741] 96.根据实施例94所述的IFN前蛋白,其中所述第一靶向部分和所述第二靶向部分包含Fab结构域。

[0742] 97.根据实施例92至96中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述第一靶向部分和第二靶向部分进一步包含铰链序列。

[0743] 98.根据实施例97所述的IFN前蛋白,其中所述第一靶向部分和第二靶向部分进一步包含Fc结构域,每个Fc结构域包含CH2结构域和CH3结构域。

[0744] 99.根据实施例98所述的IFN前蛋白,其中所述第一靶向部分的所述Fc结构域和所述第二靶向部分的所述Fc结构域彼此缔合。

[0745] 100.根据实施例92至99中任一项所述的IFN前蛋白,其中第一靶向部分和第二靶向部分分别位于第一接头和第三接头的N-末端。

[0746] 101.根据实施例92至100中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述第一免疫球蛋白恒定结构域是所述第一靶向部分的一部分,并且所述第二免疫球蛋白恒定结构域是所述第二靶向部分的一部分。

[0747] 102.根据实施例101所述的IFN前蛋白,其中所述第一免疫球蛋白恒定结构域是CH3结构域。

[0748] 103.根据实施例101所述的IFN前蛋白,其中所述第一免疫球蛋白恒定结构域是CH1结构域。

[0749] 104.根据实施例92至103中任一项所述的IFN前蛋白,其被构造成如图1A、图2A或图2D所示。

[0750] 105.根据实施例104所述的IFN前蛋白,其包含所述第一多肽链、所述第二多肽链、第三多肽链和第四多肽链,其中:

[0751] (a)所述第一多肽链包含:

[0752] (i)第一VH1结构域;

[0753] (ii)第一CH1结构域;

[0754] (iii)第三Fc结构域,其包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域,其中所述CH3结构域是所述第一免疫球蛋白恒定结构域;

[0755] (iv)所述第一接头;

[0756] (v)所述第一I型干扰素(IFN)部分;

[0757] (vi)所述第二接头;以及

[0758] (vii)所述第一Fc结构域;

[0759] (b)所述第二多肽链包含:

[0760] (i)第二VH1结构域;

[0761] (ii)第二CH1结构域;

[0762] (iii)第四Fc结构域,其包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域,其中所述CH3结构域是所述第二免疫球蛋白恒定结构域;

[0763] (iv)所述第三接头;

[0764] (v)所述第二I型干扰素(IFN)部分;

[0765] (vi)所述第四接头;以及

[0766] (vii)所述第三Fc结构域;

[0767] (c)所述第三多肽链包含:

[0768] (i)第一VL结构域;

[0769] (ii)第一CL结构域;并且

[0770] (d)所述第四多肽链包含:

[0771] (i)第二VL结构域;以及

[0772] (ii)第二CL结构域;

[0773] 其中所述第一多肽链与所述第三多肽链缔合,使得所述第一VH、CH1、VL和CL形成所述第一靶向部分,并且其中所述第二多肽链与所述第四多肽链缔合,使得所述第二VH、CH1、VL和CL形成所述第二靶向部分。

[0774] 106.根据实施例105所述的IFN前蛋白,其中所述第一接头、第二接头、第三接头和第四接头是蛋白酶可切割接头(PCL)。

[0775] 107.根据实施例105所述的IFN前蛋白,其中所述第一接头和第三接头是不可切割接头(NCL),并且所述第二接头和第四接头是蛋白酶可切割接头(PCL)。

[0776] 108.根据实施例105所述的IFN前蛋白,其中所述第一接头和第三接头是蛋白酶可切割接头(PCL),并且所述第二接头和第四接头是不可切割接头(NCL)。

[0777] 109.根据实施例92至103中任一项所述的IFN前蛋白,其被构造成如图1B、图2B或图2E所示。

[0778] 110.根据实施例109所述的IFN前蛋白,其中:

[0779] (a)所述第一多肽链包含:

[0780] (i)第一VH1结构域;

[0781] (ii)第一CH1结构域;

[0782] (iii)所述第一接头;

[0783] (iv)所述第一I型干扰素(IFN)部分;

[0784] (v)所述第二接头;以及

[0785] (vi)所述第一Fc结构域;

[0786] (b)所述第二多肽链包含:

[0787] (i)第二VH1结构域;

[0788] (ii)第二CH1结构域;

[0789] (iii)所述第三接头;

[0790] (iv)所述第二I型干扰素(IFN)部分;

[0791] (v)所述第四接头;以及

[0792] (vi)所述第二Fc结构域;

[0793] (c)所述第三多肽链包含:

[0794] (i)第一VL结构域;

[0795] (ii)第二CL结构域;并且

[0796] (d)所述第四多肽链包含:

[0797] (i)第二VL结构域;

[0798] (ii)第二CL结构域;

[0799] 其中所述第一多肽链与所述第三多肽链缔合,使得所述第一VH、CH1、VL和CL形成所述第一靶向部分,并且其中所述第二多肽链与所述第四多肽链缔合,使得所述第二VH、CH1、VL和CL形成所述第二靶向部分。

[0800] 111.根据实施例110所述的IFN前蛋白,其中所述第一接头、第二接头、第三接头和第四接头是蛋白酶可切割接头(PCL)。

[0801] 112.根据实施例110所述的IFN前蛋白,其中所述第一接头和第三接头是不可切割接头(NCL),并且所述第二接头和第四接头是蛋白酶可切割接头(PCL)。

[0802] 113.根据实施例110所述的IFN前蛋白,其中所述第一接头和第三接头是蛋白酶可切割接头(PCL),并且所述第二接头和第四接头是不可切割接头(NCL)。

[0803] 114.根据实施例92至103中任一项所述的IFN前蛋白,其被构造成如图1C、图2C或图2F所示。

[0804] 115.根据实施例114所述的IFN前蛋白,其包含所述第一多肽链、所述第二多肽链、第三多肽链和第四多肽链,其中:

[0805] (a)所述第一多肽链包含:

[0806] (i)第一VH1结构域;

[0807] (ii)第一CH1结构域;

[0808] (iii)第一铰链结构域;

[0809] (iv)所述第一接头;

[0810] (v)所述第一I型干扰素(IFN)部分;

[0811] (vi)所述第二接头;以及

[0812] (vii)所述第一Fc结构域;

[0813] (b)所述第二多肽链包含:

[0814] (i)第二VH1结构域;

[0815] (ii)第二CH1结构域;

[0816] (iii)第二铰链结构域;

[0817] (iv)所述第三接头;

[0818] (v)所述第二I型干扰素(IFN)部分;

[0819] (vi)所述第四接头;以及

[0820] (vii)所述第二Fc结构域;

[0821] (c)所述第三多肽链包含:

[0822] (i)第一VL结构域;

[0823] (ii)第一CL结构域;并且

[0824] (d)所述第四多肽链包含:

[0825] (i)第二VL结构域;以及

[0826] (ii)第二CL结构域;

[0827] 其中所述第一多肽链与所述第三多肽链缔合,使得所述第一VH、CH1、VL和CL形成所述第一靶向部分,并且其中所述第二多肽链与所述第四多肽链缔合,使得所述第二VH、CH1、VL和CL形成所述第二靶向部分。

[0828] 116.根据实施例115所述的IFN前蛋白,其中所述第一接头、第二接头、第三接头和第四接头是蛋白酶可切割接头(PCL)。

[0829] 117.根据实施例115所述的IFN前蛋白,其中所述第一接头和第三接头是不可切割接头(NCL),并且所述第二接头和第四接头是蛋白酶可切割接头(PCL)。

[0830] 118.根据实施例115所述的IFN前蛋白,其中所述第一接头和第三接头是蛋白酶可切割接头(PCL),并且所述第二接头和第四接头是不可切割接头(NCL)。

[0831] 119.根据实施例92至119中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述第一靶向部分和/或第二靶向部分包括用于结合至细胞外基质(ECM)抗原、肿瘤反应性淋巴细胞抗原、肿瘤或病毒淋巴细胞的细胞表面分子、T细胞抗原(TCA)、检查点抑制剂、肿瘤相关抗原(TAA)、树突状细胞(DC)或其他抗原呈递细胞(APC)抗原或自然杀伤(NK)细胞抗原的工具。

[0832] 120.根据实施例92至119中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述第一靶向部分和/或第二靶向部分包括用于结合至第6.6节中鉴定的任何靶分子的工具。

[0833] 121.根据实施例92至119中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述第一靶向部分和/或第二靶向部分包括用于结合至ECM抗原的工具,所述ECM抗原任选地选自多配体聚糖、乙酰肝素酶、整联蛋白、骨桥蛋白、连接蛋白、钙粘蛋白、层粘连蛋白、层粘连蛋白型EGF、凝集素、纤连蛋白、缺口蛋白、粘连蛋白(例如,粘连蛋白-4)、腱生蛋白、胶原蛋白(例如,X型胶原蛋白)和基质蛋白。

[0834] 122.根据实施例121所述的IFN前蛋白,其中所述第一靶向部分和/或第二靶向部分包括用于结合至粘连蛋白,例如,粘连蛋白4的工具。

[0835] 123.根据实施例121所述的IFN前蛋白,其中所述第一靶向部分和/或第二靶向部分包括用于结合至胶原蛋白,例如,胶原蛋白X的工具。

[0836] 124.根据实施例92至119中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述第一靶向部分和/或第二靶向部分包括用于结合至肿瘤或病毒淋巴细胞的细胞表面分子的工具。

[0837] 125.根据实施例124所述的IFN前蛋白,其中所述细胞表面分子是T细胞共刺激蛋白。

[0838] 126.根据实施例125所述的IFN前蛋白,其中所述T细胞共刺激蛋白是CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C或B7-H3。

[0839] 127.根据实施例126所述的IFN前蛋白,其中所述T细胞共刺激蛋白是B7-H3。

[0840] 128.根据实施例92至119中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述第一靶向部分和/或第二靶向部分包括用于结合至检查点抑制剂的工具。

[0841] 129.根据实施例128所述的IFN前蛋白,其中所述检查点抑制剂是CTLA-4、PD1、PDL1、PDL2、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、TIM3、GAL9、LAG3、VISTA、KIR、2B4、CD160、CGEN-15049、CHK1或CHK2。

[0842] 130.根据实施例129所述的IFN前蛋白,其中所述检查点抑制剂是PDL1。

[0843] 131.根据实施例129所述的IFN前蛋白,其中所述检查点抑制剂是PD1。

[0844] 132.根据实施例129所述的IFN前蛋白,其中所述检查点抑制剂是LAG3。

[0845] 133.根据实施例92至119中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述第一靶向部分和/或第二靶向部分包括用于结合至肿瘤相关抗原(TAA)的工具。

[0846] 134.根据实施例133所述的IFN前蛋白,其中所述TAA是AFP、ALK、BAGE蛋白、BIRC5(生存素)、BIRC7、β-连环蛋白、brc-abl、BRCA1、BORIS、CA9、碳酸酐酶IX、半胱天冬酶-8、CALR、CEACAM5(也被称为癌胚抗原或CEA)、CCR5、CD19、CD20(MS4A1)、CD22、CD30、CD40、CDK4、CEA、CTLA4、细胞周期蛋白-B1、CYP1B1、EGFR、EGFRvIII、ErbB2/Her2、ErbB3、ErbB4、ETV6-AML、EpCAM、EphA2、Fra-1、FOLR1、GAGE蛋白(例如,GAGE-1或-2)、GD2、GD3、GloboH、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3、GM3、gp100、Her2、HLA/B-raf、HLA/k-ras、HLA/MAGE-A3、hTERT、LMP2、MAGE蛋白(例如,MAGE-1、-2、-3、-4、-6和-12)、MART-1、间皮素、ML-IAP、Muc1、Muc2、Muc3、Muc4、Muc5、Muc16(CA-125)、MUM1、NA17、NY-BR1、NY-BR62、NY-BR85、NY-ESO1、OX40、p15、p53、PAP、PAX3、PAX5、PCTA-1、PLAC1、PRLR、PRAME、PSMA(FOLH1)、RAGE蛋白、Ras、RGS5、Rho、SART-1、SART-3、STEAP1、STEAP2、TAG-72、TGF-β、TMPRSS2、Thompson-nouvelle抗原(Tn)、TRP-1、TRP-2、酪氨酸酶或尿斑蛋白-3。

[0847] 135.根据实施例134所述的IFN前蛋白,其中所述TAA是EGFR。

[0848] 136.根据实施例134所述的IFN前蛋白,其中所述TAA是HER2。

[0849] 137.根据实施例134所述的IFN前蛋白,其中所述TAA是EPCAM。

[0850] 138.根据实施例134所述的IFN前蛋白,其中所述TAA是CEACAM5。

[0851] 139.根据实施例134所述的IFN前蛋白,其中所述TAA是CD20。

[0852] 140.根据实施例92至119中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述第一靶向部分和/或第二靶向部分包括用于结合至树突状细胞(DC)抗原的工具,所述DC抗原任选地选自XCR1、Clec9a、CD1c、CD11c、CD14、PDL1、巨噬细胞甘露糖受体(CD206)和DEC-205。

[0853] 141.根据实施例140所述的IFN前蛋白,其中所述树突状细胞抗原是XCR1。

[0854] 142.根据实施例140所述的IFN前蛋白,其中所述树突状细胞抗原是Clec9a。

[0855] 143.根据实施例140所述的IFN前蛋白,其中所述树突状细胞抗原是DEC-205。

[0856] 144.根据实施例92至119中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述第一靶向部分和/或第二靶向部分包括用于结合至自然杀伤(NK)细胞抗原的工具。

[0857] 145.根据实施例1至144中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述Fc区是同二聚体型

的。

[0858] 146.根据实施例1至144中任一项所述的IFN前蛋白,其中所述Fc区是异二聚体型的。

[0859] 147.一种核酸或多种核酸,其编码根据实施例1至146中任一项所述的IFN前蛋白。

[0860] 148.一种宿主细胞,其经工程化以表达根据实施例1至146中任一项所述的IFN前蛋白或根据实施例147所述的核酸。

[0861] 149.一种产生根据实施例1至146中任一项所述的IFN前蛋白的方法,其包括培养根据实施例148所述的宿主细胞并且回收由此表达的所述IFN前蛋白。

[0862] 150.一种药物组合物,其包含根据实施例1至146中任一项所述的IFN前蛋白以及赋形剂。

[0863] 151.一种治疗癌症的方法,其包括向有此需要的受试者施用根据实施例1至146中任一项所述的IFN前蛋白或根据实施例150所述的药物组合物。

[0864] 152.根据实施例151所述的方法,其中所述IFN前蛋白包含能够结合至靶分子的至少一个靶向部分。

[0865] 153.根据实施例151所述的方法,其中所述IFN前蛋白包含用于结合靶分子的至少一个工具。

[0866] 154.根据实施例150至153中任一项所述的方法,其中所述癌症与所述靶分子的表达相关,例如,如在表I中列出的TAA和相关癌症。

[0867] 155.根据实施例150至154中任一项所述的方法,其中包含所述IFN部分的经活化的IFN蛋白是通过由所述癌组织表达的一种或多种蛋白酶切割所述IFN前蛋白中的一个或多个蛋白酶可切割接头而产生的。

[0868] 156.根据实施例155所述的方法,其中所述IFN蛋白在所述癌组织中被选择性地活化。

[0869] 157.一种IFN蛋白的局部递送的方法,其包括向受试者施用根据实施例1至146中任一项所述的IFN前蛋白(或包含所述IFN前蛋白和赋形剂的药物组合物),所述IFN前蛋白具有一个或多个蛋白酶可切割接头,每个蛋白酶可切割接头包含用于由待向其局部递送所述IFN蛋白的组织表达的一种或多种蛋白酶的一个或多个底物。

[0870] 158.根据实施例157所述的方法,其中所述IFN前蛋白包含识别由所述组织表达的靶分子的一个或多个靶向部分。

[0871] 159.根据实施例158所述的方法,其中所述IFN前蛋白包含各自识别由所述组织表达的靶分子的两个靶向部分。

[0872] 160.根据实施例157所述的方法,其中所述IFN前蛋白包括用于结合由所述组织表达的靶分子的一个或多个工具。

[0873] 161.根据实施例160所述的方法,其中所述IFN前蛋白包括用于结合由所述组织表达的靶分子的两个工具。

[0874] 162.根据实施例157至161中任一项所述的方法,其中所述组织是癌组织。

[0875] 163.根据实施例162所述的方法,其中由所述组织表达的所述靶分子是细胞外基质(ECM)抗原、肿瘤反应性淋巴细胞抗原、肿瘤或病毒淋巴细胞的细胞表面分子、T细胞抗原(TCA)、检查点抑制剂、肿瘤相关抗原(TAA)、树突状细胞(DC)或其他抗原呈递细胞(APC)抗

原、或自然杀伤(NK)细胞抗原。

[0876] 164.根据实施例157至163中任一项所述的方法,其中包含所述IFN部分的经活化的IFN蛋白是通过所述组织中的一种或多种蛋白酶切割所述IFN前蛋白中的一个或多个蛋白酶可切割接头而产生的。

[0877] 165.一种用在癌组织中被选择性地活化的IFN蛋白治疗癌症的方法,其包括向有此需要的受试者施用根据实施例1至146中任一项所述的IFN前蛋白(或包含所述IFN前蛋白和赋形剂的药物组合物),所述IFN前蛋白具有一个或多个蛋白酶可切割接头,每个蛋白酶可切割接头包含用于由所述IFN蛋白所靶向的癌组织表达的一种或多种蛋白酶的一个或多个底物。

[0878] 166.根据实施例165所述的方法,其中所述IFN前蛋白包含识别由所述癌组织或相关免疫细胞表达的靶分子的一个或多个靶向部分。

[0879] 167.根据实施例166所述的方法,其中所述IFN前蛋白包含各自识别由所述癌组织或相关免疫细胞表达的靶分子的两个靶向部分。

[0880] 168.根据实施例165所述的方法,其中所述IFN前蛋白包括用于结合由所述癌组织或相关免疫细胞表达的靶分子的一个或多个工具。

[0881] 169.根据实施例168所述的方法,其中所述IFN前蛋白包含用于结合由所述癌组织或相关免疫细胞表达的靶分子的两个工具。

[0882] 170.根据实施例165至169中任一项所述的方法,其中由所述癌组织或相关免疫细胞表达的所述靶分子是细胞外基质(ECM)抗原、肿瘤反应性淋巴细胞抗原、肿瘤或病毒淋巴细胞的细胞表面分子、T细胞抗原(TCA)、检查点抑制剂、肿瘤相关抗原(TAA)、树突状细胞(DC)或其他抗原呈递细胞(APC)抗原、或自然杀伤(NK)细胞抗原。

[0883] 171.根据实施例165至170中任一项所述的方法,其中包含所述IFN部分的经活化的IFN蛋白是通过所述癌组织中的一种或多种蛋白酶切割所述IFN前蛋白中的一个或多个蛋白酶可切割接头而产生的。

[0884] 172.一种向受试者施用具有降低的全身暴露和/或降低的全身毒性的IFN疗法的方法,其包括向受试者施用根据实施例1至146中任一项所述的IFN前蛋白(或包含所述IFN前蛋白和赋形剂的药物组合物)形式的所述IFN疗法,所述IFN前蛋白具有一个或多个蛋白酶可切割接头,每个蛋白酶可切割接头包含用于由期望和/或预期对其进行IFN疗法的组织表达的一种或多种蛋白酶的一个或多个底物。

[0885] 173.根据实施例172所述的方法,其中所述IFN前蛋白包含识别由所述组织表达的靶分子的一个或多个靶向部分。

[0886] 174.根据实施例173所述的方法,其中所述IFN前蛋白包含各自识别由所述组织表达的靶分子的两个靶向部分。

[0887] 175.根据实施例172所述的方法,其中所述IFN前蛋白包括用于结合由所述组织表达的靶分子的一个或多个工具。

[0888] 176.根据实施例175所述的方法,其中所述IFN前蛋白包括用于结合由所述组织表达的靶分子的两个工具。

[0889] 177.根据实施例172至176中任一项所述的方法,其中所述组织是癌组织或相关免疫细胞。

[0890] 178.根据实施例177所述的方法,其中由所述组织表达的所述靶分子是细胞外基质(ECM)抗原、肿瘤反应性淋巴细胞抗原、肿瘤或病毒淋巴细胞的细胞表面分子、T细胞抗原(TCA)、检查点抑制剂、肿瘤相关抗原(TAA)、树突状细胞(DC)或其他抗原呈递细胞(APC)抗原、或自然杀伤(NK)细胞抗原。

[0891] 179.根据实施例172至178中任一项所述的方法,其中包含所述IFN部分的经活化的IFN蛋白是通过所述组织中的一种或多种蛋白酶切割所述IFN前蛋白中的一个或多个蛋白酶可切割接头而产生的。

[0892] 180.一种用在癌组织中经选择性地活化的IFN蛋白治疗癌症的方法,其包括向有此需要的受试者施用根据实施例1至146中任一项所述的IFN前蛋白(或包含所述IFN前蛋白和赋形剂的药物组合物),所述IFN前蛋白具有一个或多个蛋白酶可切割接头,每个蛋白酶可切割接头包含用于由所述癌组织表达的一种或多种蛋白酶的一个或多个底物。

[0893] 181.根据实施例180所述的方法,其中所述IFN前蛋白包含识别由所述癌组织或相关免疫细胞表达的靶分子的一个或多个靶向部分。

[0894] 182.根据实施例181所述的方法,其中所述IFN前蛋白包含各自识别由所述癌组织或相关免疫细胞表达的靶分子的两个靶向部分。

[0895] 183.根据实施例180所述的方法,其中所述IFN前蛋白包含识别由所述组织表达的靶分子的一种或多种靶向部分。

[0896] 184.根据实施例183所述的方法,其中所述IFN前蛋白包含用于结合由所述癌组织或相关免疫细胞表达的靶分子的两个工具。

[0897] 185.根据实施例180至184中任一项所述的方法,其中由所述癌组织或相关免疫细胞表达的所述靶分子是细胞外基质(ECM)抗原、肿瘤反应性淋巴细胞抗原、肿瘤或病毒淋巴细胞的细胞表面分子、T细胞抗原(TCA)、检查点抑制剂、肿瘤相关抗原(TAA)、树突状细胞(DC)或其他抗原呈递细胞(APC)抗原、或自然杀伤(NK)细胞抗原。

[0898] 186.根据实施例179至184中任一项所述的方法,其中包含所述IFN部分的经活化的IFN蛋白是通过所述癌组织中的一种或多种蛋白酶切割所述IFN前蛋白中的一个或多个蛋白酶可切割接头而产生的。

[0899] 187.一种将经活化的IFN蛋白靶向递送至癌组织的方法,其包括向受试者施用根据实施例1至146中任一项所述的IFN前蛋白(或包含所述IFN前蛋白和赋形剂的药物组合物),其中所述IFN前蛋白:

[0900] (a)包含(i)识别由所述癌组织或相关免疫细胞表达的靶分子的一个或多个靶向部分,或(ii)用于结合由所述癌组织或相关免疫细胞表达的靶分子的工具;以及

[0901] (b)具有一个或多个蛋白酶可切割接头,每个蛋白酶可切割接头包含用于期望和/或预期对其进行IFN疗法的组织中表达的一种或多种蛋白酶的一个或多个底物。

[0902] 188.根据实施例187所述的方法,其中所述IFN前蛋白包含(i)各自识别由所述癌组织或相关免疫细胞表达的靶分子的两个靶向部分,或(ii)用于结合由所述癌组织或相关免疫细胞表达的靶分子的两个工具。

[0903] 189.根据实施例187或188所述的方法,其中由所述癌组织或相关免疫细胞表达的所述靶分子是细胞外基质(ECM)抗原、肿瘤反应性淋巴细胞抗原、肿瘤或病毒淋巴细胞的细胞表面分子、T细胞抗原(TCA)、检查点抑制剂、肿瘤相关抗原(TAA)、树突状细胞(DC)或其他

抗原呈递细胞(APC)抗原、或自然杀伤(NK)细胞抗原。

[0904] 190.根据实施例187至189中任一项所述的方法,其中包含所述IFN部分的经活化的IFN蛋白是通过所述癌组织中的一种或多种蛋白酶切割所述IFN前蛋白中的一个或多个蛋白酶可切割接头而产生的。

[0905] 191.一种在靶组织中局部诱导免疫应答的方法,其包括向受试者施用根据实施例1至146中任一项所述的IFN前蛋白(或包含所述IFN前蛋白和赋形剂的药物组合物),所述IFN前蛋白具有(i)能够结合在所述靶组织中表达的靶分子的一个或多个靶向部分,或(ii)用于结合在所述靶组织中表达的靶分子的一个或多个工具、以及一个或多个蛋白酶可切割接头,每个蛋白酶可切割接头包含用于在所述靶组织中表达的一种或多种蛋白酶的一个或多个底物。

[0906] 192.根据实施例191所述的方法,其中IFN前蛋白包含(i)各自识别靶组织或相关免疫细胞中表达的靶分子的两个靶向部分,或(ii)用于结合靶组织或相关免疫细胞中表达的靶分子的两种手段。

[0907] 193.根据实施例191或192所述的方法,其中所述靶组织是癌组织。

[0908] 194.根据实施例191至193中任一项所述的方法,其中在所述靶组织或相关免疫细胞中表达的所述靶分子是细胞外基质(ECM)抗原、肿瘤反应性淋巴细胞抗原、肿瘤或病毒淋巴细胞的细胞表面分子、T细胞抗原(TCA)、检查点抑制剂、肿瘤相关抗原(TAA)、树突状细胞(DC)或其他抗原呈递细胞(APC)抗原、或自然杀伤(NK)细胞抗原。

[0909] 195.根据实施例190至194中任一项所述的方法,其中包含所述IFN部分的经活化的IFN蛋白是通过所述靶组织中的一种或多种蛋白酶切割所述IFN前蛋白中的一个或多个蛋白酶可切割接头而产生的。

[0910] 196.根据实施例195所述的方法,其中所述IFN蛋白诱导针对所述靶组织中的至少一种细胞类型的所述免疫应答。

[0911] 197.一种增强针对抗原的免疫应答的方法,其包括向受试者施用引发针对所述抗原的免疫应答的免疫原性剂连同根据权利要求1至146中任一项所述的IFN前蛋白(例如,IFN受体激动剂)(或包含所述IFN受体激动剂和赋形剂的药物组合物)或编码此类IFN前蛋白(例如,IFN受体激动剂)的核酸,例如,如在第6.10.1节中描述的)。

[0912] 198.根据实施例197所述的方法,其中所述免疫原性剂和所述IFN前蛋白(例如,IFN受体激动剂)的施用是并行的、分开但同时的或依次的。

[0913] 199.根据实施例197或198或实施例1所述的方法,其中所述免疫原性剂是疫苗,任选地其中所述疫苗是癌症疫苗或针对传染原的疫苗。

[0914] 200.根据实施例151至199中任一项所述的方法,其中所述施用是非局部的。

[0915] 201.根据实施例200所述的方法,其中所述施用是全身的。

[0916] 8.实例

[0917] 8.1.前蛋白构建体序列

[0918] 下表3提供了本文所述的研究中使用的IFN前蛋白和对照构建体的序列。

[0919]

表 3

| 构建体 | 序列 |
| --- | --- |
| 抗 PD1-PCL-IFN-PCL-Fc<br><br>链 1：抗 hPD1-VH-CH1-CH2-CH3-PCL-IFN-PCL-CH2-CH3<br><br>链 2：抗 hPD1-VH-CH1-CH2-CH3-PCL-IFN-PCL-CH2-CH3<br><br>链 3：抗 hPD1 轻 | 链 1：<br>QVQLVQSGAEVKRPGSSVKVSCKVSGVTFRNFAIIWVRQAPGQ<br>GLEWMGGIIPFFSAANYAQSFQGRVTITPDESTSTAFMELASLRS<br>EDTAVYYCAREGERGHTYGFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFP<br>LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP<br>AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV<br>ESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV<br>DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL<br>TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT<br>LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT<br>PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT<br>QKSLSLSLGKISSGLLSGRSDNHCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQM<br>RRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLF<br>STKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPL<br>MKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLS<br>TNLQESLRSKEISSGLLSGRSDNHESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVF<br>LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV |

[0920]

表 3

| 构建体 | 序列 |
| --- | --- |
| 链<br><br>链 4：抗 hPD1 轻链 | HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 385)<br><br>链 2：<br>QVQLVQSGAEVKRPGSSVKVSCKVSGVTFRNFAIIWVRQAPGQ GLEWMGGIIPFFSAANYAQSFQGRVTITPDESTSTAFMELASLRS EDTAVYYCAREGERGHTYGFDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHK PSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGKISSGLLSGRSDNHCDLPQTHSLGS RRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPV LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACV IQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVV RAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEISSGLLSGRSDNHESKYGPPCPPC PAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 385)<br><br>链 3：<br>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ SYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO: 386)<br><br>链 4：<br>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ SYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO: 386) |
| 抗 PD1-VH-CH1-PCL-IFN-PCL-铰链 | 链 1：<br>QVQLVQSGAEVKRPGSSVKVSCKVSGVTFRNFAIIWVRQAPG QGLEWMGGIIPFFSAANYAQSFQGRVTITPDESTSTAFMELAS |

[0921]

表 3

| 构建体 | 序列 |
| --- | --- |
| -Fc<br><br>链 1：抗 PD1-VH-CH1-PCL-IFN-PCL-铰链-CH2-CH3<br><br>链 1：抗 PD1-VH-CH1-PCL-IFN-PCL-铰链-CH2-CH3<br><br>链 3：抗 hPD1 轻链<br><br>链 4：抗 hPD1 轻链 | LRSEDTAVYYCAREGERGHTYGFDYWGQGTLVTVSSASTKG<br>PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS<br>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSN<br>TKVDKRVESKYISSGLLSGRSDNHCDLPQTHSLGSRRTLMLL<br>AQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQ<br>QIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGV<br>GVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRA<br>EIMRSFSLSTNLQESLRSKEISSGLLSGRSDNHGPPCPPCPAPPV<br>AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW<br>YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK<br>EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK<br>NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG<br>SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS<br>LGK (SEQ ID NO: 387)<br><br>链 2：<br>QVQLVQSGAEVKRPGSSVKVSCKVSGVTFRNFAIIWVRQAPG<br>QGLEWMGGIIPFFSAANYAQSFQGRVTITPDESTSTAFMELAS<br>LRSEDTAVYYCAREGERGHTYGFDYWGQGTLVTVSSASTKG<br>PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS<br>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSN<br>TKVDKRVESKYISSGLLSGRSDNHCDLPQTHSLGSRRTLMLL<br>AQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQ<br>QIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGV<br>GVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRA<br>EIMRSFSLSTNLQESLRSKEISSGLLSGRSDNHGPPCPPCPAPPV<br>AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW<br>YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK<br>EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK<br>NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG<br>SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS<br>LGK (SEQ ID NO: 387)<br><br>链 3：<br>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAP<br>KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ<br>SYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL<br>LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST<br>LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO: 386)<br><br>链 4：<br>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKA<br>PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY<br>CQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA<br>SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS<br>TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE<br>C* (SEQ ID NO: 386) |

[0922]

表 3

| 构建体 | 序列 |
| --- | --- |
| 抗 PD1-VH-CH1-PCL-ΔN-IFN-ΔC-PCL-铰链-Fc<br><br>链 1：抗 PD1-VH-CH1-PCL-ΔN-IFN-ΔC-PCL-铰链-CH2-CH3<br><br>链 2：抗 PD1-VH-CH1-PCL-ΔN-IFN-ΔC-PCL-铰链-CH2-CH3<br><br>链 3：抗 hPD1 轻链<br><br>链 4：抗 hPD1 轻链 | 链 1：<br>QVQLVQSGAEVKRPGSSVKVSCKVSGVTFRNFAIIWVRQAPG<br>QGLEWMGGIIPFFSAANYAQSFQGRVTITPDESTSTAFMELAS<br>LRSEDTAVYYCAREGERGHTYGFDYWGQGTLVTVSSASTKG<br>PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS<br>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSN<br>TKVDKRVESKYISSGLLSGRSDNHTHSLGSRRTLMLLAQMRR<br>ISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLF<br>STKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETP<br>LMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSF<br>SLSTNLQISSGLLSGRSDNHGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKP<br>KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK<br>TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP<br>SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF<br>YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS<br>RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 388)<br><br>链 2：<br>QVQLVQSGAEVKRPGSSVKVSCKVSGVTFRNFAIIWVRQAPG<br>QGLEWMGGIIPFFSAANYAQSFQGRVTITPDESTSTAFMELAS<br>LRSEDTAVYYCAREGERGHTYGFDYWGQGTLVTVSSASTKG<br>PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS<br>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSN<br>TKVDKRVESKYISSGLLSGRSDNHTHSLGSRRTLMLLAQMRR<br>ISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLF<br>STKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETP<br>LMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSF<br>SLSTNLQISSGLLSGRSDNHGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKP<br>KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK<br>TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP<br>SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF<br>YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS<br>RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 388)<br><br>链 3：<br>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKA<br>PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY<br>CQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA<br>SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS<br>TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE<br>C* (SEQ ID NO: 386)<br>链 4：<br>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKA<br>PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY<br>CQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA<br>SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS<br>TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE |

[0923]

表 3

| 构建体 | 序列 |
| --- | --- |
| | C* (SEQ ID NO: 386) |
| 抗 PD1-VH-CH1-PCL-IFN-ΔC-PCL-铰链-Fc<br><br>链 1：抗 PD1-VH-CH1-PCL-IFN-ΔC-PCL-铰链-CH2-CH3<br><br>链 2：抗 PD1-VH-CH1-PCL-IFN-ΔC-PCL-铰链-CH2-CH3<br><br>链 3：抗 hPD1 轻链<br><br>链 4：抗 hPD1 轻链 | 链 1：<br>QVQLVQSGAEVKRPGSSVKVSCKVSGVTFRNFAIIWVRQAPG<br>QGLEWMGGIIPFFSAANYAQSFQGRVTITPDESTSTAFMELAS<br>LRSEDTAVYYCAREGERGHTYGFDYWGQGTLVTVSSASTKG<br>PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS<br>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSN<br>TKVDKRVESKYISSGLLSGRSDNHCDLPQTHSLGSRRTLMLL<br>AQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQ<br>QIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGV<br>GVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRA<br>EIMRSFSLSTNLQISSGLLSGRSDNHGPPCPPCPAPPVAGPSVF<br>LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE<br>VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS<br>NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTC<br>LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRL<br>TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 389)<br><br>链 2：<br>QVQLVQSGAEVKRPGSSVKVSCKVSGVTFRNFAIIWVRQAPG<br>QGLEWMGGIIPFFSAANYAQSFQGRVTITPDESTSTAFMELAS<br>LRSEDTAVYYCAREGERGHTYGFDYWGQGTLVTVSSASTKG<br>PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS<br>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSN<br>TKVDKRVESKYISSGLLSGRSDNHCDLPQTHSLGSRRTLMLL<br>AQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQ<br>QIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGV<br>GVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRA<br>EIMRSFSLSTNLQISSGLLSGRSDNHGPPCPPCPAPPVAGPSVF<br>LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE<br>VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS<br>NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTC<br>LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRL<br>TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 389)<br><br>链 3：<br>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAP<br>KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ<br>SYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL<br>LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST<br>LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO: 386)<br><br>链 4：<br>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKA<br>PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY |

[0924]

表 3

| 构建体 | 序列 |
| --- | --- |
| | CQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO: 386) |
| 抗 PD1-VH-CH1-长铰链-PCL-IFN-PCL-长铰链-Fc<br><br>链 1：抗 PD1-VH-CH1-长铰链-PCL-IFN-PCL-长铰链-CH2-CH3<br><br>链 2：抗 PD1-VH-CH1-长铰链-PCL-IFN-PCL-长铰链-CH2-CH3<br><br>链 3：抗 hPD1 轻链<br><br>链 4：抗 hPD1 轻链 | 链 1：<br>QVQLVQSGAEVKRPGSSVKVSCKVSGVTFRNFAIIWVRQAPGQGLEWMGGIIPFFSAANYAQSFQGRVTITPDESTSTAFMELASLRSEDTAVYYCAREGERGHTYGFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPPVAISSGLLSGRSDNHCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEISSGLLSGRSDNHESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 390)<br><br>链 2：<br>QVQLVQSGAEVKRPGSSVKVSCKVSGVTFRNFAIIWVRQAPGQGLEWMGGIIPFFSAANYAQSFQGRVTITPDESTSTAFMELASLRSEDTAVYYCAREGERGHTYGFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPPVAISSGLLSGRSDNHCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEISSGLLSGRSDNHESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 390)<br><br>链 3：<br>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO: 386) |

[0925]

表 3

| 构建体 | 序列 |
| --- | --- |
| | 链 4：<br>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKA<br>PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY<br>CQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA<br>SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS<br>TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE<br>C* (SEQ ID NO: 386) |
| 抗 PD1-VH-CH1-短铰链<br>-PCL-IFN-PCL-短铰链-Fc<br><br>链 1：抗 PD1-VH-CH1-短铰链<br>-PCL-IFN-PCL-短铰链-CH2-CH3<br><br>链 2：抗 PD1-VH-CH1-短铰链<br>-PCL-IFN-PCL-短铰链-CH2-CH3<br><br>链 3：抗 hPD1 轻链<br><br>链 4：抗 hPD1 轻链 | 链 1：<br>QVQLVQSGAEVKRPGSSVKVSCKVSGVTFRNFAIIWVRQAPG<br>QGLEWMGGIIPFFSAANYAQSFQGRVTITPDESTSTAFMELAS<br>LRSEDTAVYYCAREGERGHTYGFDYWGQGTLVTVSSASTKG<br>PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS<br>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSN<br>TKVDKRVESKYGPPCPPCISSGLLSGRSDNHCDLPQTHSLGSR<br>RTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPV<br>LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEA<br>CVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCA<br>WEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEISSGLLSGRSDNHCPPCP<br>APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ<br>FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL<br>NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE<br>MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD<br>SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS<br>LSLSLGK (SEQ ID NO: 391)<br><br>链 2：<br>QVQLVQSGAEVKRPGSSVKVSCKVSGVTFRNFAIIWVRQAPG<br>QGLEWMGGIIPFFSAANYAQSFQGRVTITPDESTSTAFMELAS<br>LRSEDTAVYYCAREGERGHTYGFDYWGQGTLVTVSSASTKG<br>PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS<br>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSN<br>TKVDKRVESKYGPPCPPCISSGLLSGRSDNHCDLPQTHSLGSR<br>RTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPV<br>LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEA<br>CVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCA<br>WEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEISSGLLSGRSDNHCPPCP<br>APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ<br>FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL<br>NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE<br>MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD<br>SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS<br>LSLSLGK (SEQ ID NO: 391)<br><br>链 3：<br>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAP<br>KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ<br>SYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL<br>LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST |

[0926]

| 表 3 | |
|---|---|
| 构建体 | 序列 |
| | LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO: 386)<br><br>链 4:<br>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C* (SEQ ID NO: 386) |

[0927] 8.2.材料与方法

[0928] 8.2.1.I型IFN构建体的产生

[0929] 在标准哺乳动物蛋白表达DNA载体(pcDNA3.4或相似载体)中产生编码抗体和空间弱化的IFN融合蛋白的构建体,这些载体适合高产量蛋白生产并含有标准元件,诸如启动子序列、polyA序列、调控元件和抗性基因。在适用的情况下,对序列进行密码子优化。来自小鼠失活酪氨酸蛋白激酶跨膜受体ROR1(mROR1)的29个氨基酸信号序列被添加到构建体的N-末端作为用于分泌的信号。所有IFN融合蛋白都被表达为含有信号序列的前蛋白,该信号序列通过胞内加工被切割以产生成熟蛋白。通过瞬时转染(Thermo Fisher Scientific)在Expi293FTM细胞中表达构建体。使用ProteinMaker系统(马里兰州盖瑟斯堡的Protein BioSolutions)和HiTrapTM Protein G HP或MabSelect SuRe pcc柱(Cytiva)纯化Expi293F上清液中的蛋白质。单步洗脱后,中和蛋白,将其渗析到含5%甘油的磷酸盐缓冲盐水(PBS)的最终缓冲液中,等分并储存在-80℃下。通过SE-UPLC进一步分析样品,以确定相对于所关注的物质的高分子量或低分子量物质的存在。

[0930] 8.2.2.IFN构建体的体外切割

[0931] 或通过将前蛋白构建体与uPA或MMP酶一起温育,对蛋白酶可切割接头进行酶促切割。对于用uPA进行的酶促切割,将8μg的蛋白构建体与100ng的uPA酶在37℃下在200μL体积的uPA缓冲液(50mM Tris pH8.5、0.01%(v/v)吐温20)中温育20小时。对于用MMP进行的酶促切割,将8μg的蛋白构建体与200MMP2和MMP9分别在37℃下在200μL体积的MMP缓冲液(50mM Tris pH7.5、150mM NaCl、10mM$CaCl_2$、0.05%Brij35)中温育20小时。

[0932] 8.2.3.报告基因KG-1a细胞的工程化

[0933] 用ISRE驱动的荧光素酶报告基因构建体转导早幼粒细胞巨噬细胞系KG-1a,并将早幼粒细胞巨噬细胞系维持在补充有2mM L-谷氨酰胺/青霉素/链霉素+20% FBS+1μg/mL嘌呤霉素的Iscove改良的Dulbecco培养基中。鉴定出对IFNα2b具有高反应性的单细胞克隆,并将其重命名为KG-1a/ISRE-Luc cl.2F5,并用于如上所述的测定。

[0934] 8.2.4.荧光素酶测定设置

[0935] 使用补充有2mM L-谷氨酰胺/青霉素/链霉素+10% FBS的RPMI1640培养基作为测定培养基来制备细胞悬浮液和融合蛋白稀释液。

[0936] 测定当天,将细胞离心并以5x $10^5$/mL的密度重悬于测定培养基中。IFNα2b和或IFN融合蛋白按照11点稀释范围(对于重组干扰素,范围为100nM至10.2fM,并且对于融合蛋

白,范围为500nM至51.2fM)以1:5进行稀释,其中第12个点不含重组蛋白。将2.5x $10^4$报告基因细胞添加到96孔白色平底板中,并与连续稀释的重组IFN或IFN融合蛋白一起温育。将板在37℃和5% $CO_2$下温育5小时,然后添加100μL ONE-Glo™(Promega)试剂裂解细胞并检测荧光素酶活性。以相对光单位(RLU)在多标记板读取器Envision(PerkinElmer)上捕获发射光。

[0937] 8.3.实例1:Fc连接的干扰素分子的SE-UPLC图谱

[0938] 进行SE-UPLC以评估在C-末端或N-末端上Fc结构域连接的IFN分子。用SE-UPLC、Fc-IFNα1(图4A)、Fc-IFNα2b(图4B)和IFNα2b-Fc(图4C)分析的三个示例性构建体显示了不同水平的高分子量物质的离散主峰。Fc-IFNα1的主峰面积百分比经计算为37.43,而针对Fc-IFNα2b和IFNα2b-Fc而言,这些百分比值较大,经计算分别为57.66和56.4。

[0939] 8.4.实例2:干扰素分子的活性

[0940] 如在第8.2.3节中描述的,将干扰素刺激的应答元件(ISRE)驱动的荧光素酶报告基因掺入到早幼粒细胞巨噬细胞系KG-1a中,并如在第8.2.4节中描述的用于评价IFN受体激动剂构建体诱导ISRE的能力。

[0941] 图5所示的结果表明,重组蛋白和IFN变体的Fc融合体在干扰素敏感反应元件(ISRE)的体外荧光素酶测定中表现出不同程度的弱化。第一次评估涉及测试在N-末端或C-末端与Fc分子连接的IFN分子中是否存在活性上的差异(图5A)。相对于IFNα2b,Fc-IFNα2b和IFNα2b-Fc均表现出较弱的干扰素信号传导。然而,对于两种分子,弱化水平相似(图5B)。接下来,将两种Fc-IFN构建体Fc-IFNα2b和Fc-IFNα1的体外活性与三种IFN变体IFNα2b、IFNα1和IFNβ的活性进行比较(图5C)。在IFN变体中,用IFNβ和IFNα2b观察到活性水平最高,而IFNα1的活性相对较弱。与IFN变体相比,具有Fc融合体的重组蛋白表现出弱化的活性水平。总之,Fc融合体导致干扰素信号传导相对于游离干扰素弱化。

[0942] 8.5.实例3:突变型IFN构建体的SE-UPLC图谱

[0943] 进行SE-UPLC以评估与C-末端上Fc结构域连接的突变型IFN分子。用SE-UPLC、Fc-IFNα2bR33A(图6A)、Fc-IFNα2bR149A(图6B)、Fc-IFNα2bR120A(图6C)和Fc-IFNα2bS152A(图6D)分析的四个示例性构建体显示了不同水平的高分子量物质的离散主峰。

[0944] 8.6.实例4:突变型IFN构建体的活性

[0945] 如在第8.2.3节中描述的,将ISRE驱动的荧光素酶报告基因掺入到早幼粒细胞巨噬细胞系KG-1a中,并如在第8.2.4节中描述的用于评价突变型IFN受体激动剂构建体诱导ISRE的能力。

[0946] IFN变体的活性与其对IFNAR的亲和力有关。因此,影响IFN-IFNAR结合的突变可以影响Fc-IFN构建体的活性。在IFNα2b的IFNAR1或IFNAR2界面上引入一系列突变(图7A和7B)。相对于野生型Fc-IFNα2b,干扰Fc-IFNα2b的IFNAR1或IFNAR2结合的大多数突变弱化了ISRE-荧光素酶活性。而且,这种弱化的程度各不相同;尽管一些突变仅引起活性的轻微弱化,但其他突变导致非常高水平的弱化。尽管如此,对于弱化水平的这些差异,干扰IFNAR1或IFNAR2结合的突变之间的区别最小。

[0947] 8.7.实例5:示例性干扰素前蛋白构建体的SE-UPLC图谱

[0948] 在产生编码空间弱化的IFN融合蛋白的构建体后,进行SE-UPLC以评估样品中高或低分子量物质的存在,如在第8.2.1节中描述的。图8绘示了三种示例性IFN前蛋白构建体的

图谱:单铰链IFN构建体(图8A)、双铰链IFN构建体(图8B)和具有两个Fc结构域的IFN构建体(图8C)。尽管单铰链和双铰链构建体显示出离散主峰,但具有两个Fc结构域的IFN构建体的SEC图谱不太清晰。因此,用单和双铰链IFN构建体进行随后的分析,并且排除具有两个Fc结构域的IFN构建体。

[0949] 8.8.实例6:IFN前蛋白构建体的酶促切割

[0950] 如在第8.2.2节中描述的,用uPA和MMP酶切割示例性IFN前蛋白构建体。(图9)。通过对应于Fc和Fab组分的条带的存在来评估前蛋白构建体的切割,这两种组分的分子量都预期出现在38和49kDa之间。通过蛋白印迹检测Fc部分进一步证实了不同片段的同一性。

[0951] uPA对单铰链和双铰链IFN前蛋白构建体的切割导致在SDS-PAGE图像中出现以比预期条带更高的分子量出现的另外的条带(图9A),表明uPA在体外对这些构建体的切割不完全。相比之下,MMP2/9完全切割单铰链IFN前蛋白。然而,在装载有MMP2/9切割的双铰链IFN前蛋白的泳道中,存在另外的高分子量条带(图9B),表明对双铰链构建体的MMP切割不完全。

[0952] 8.9.实例7:IFN前蛋白构建体的活性

[0953] 与IFNα2b和Fc-IFNα2b相比,评估了三种IFN前蛋白的ISRE-荧光素酶活性。相对于Fc-IFNα2b,单铰链全长IFN和双铰链IFN构建体表现出适度的弱化水平。然而,最好的弱化与单铰链截短的IFN相关(图10A)。

[0954] 为了评估IFN前蛋白构建体的体外切割是否恢复了IFN活性,首先将相同的三个IFN蛋白构建体与MMP缓冲液对照或MMP缓冲液中的MMP2和MMP9酶一起温育,如在第8.2.2节中描述的。仅用MMP缓冲液温育的构建体弱化了IFN前蛋白构建体的活性(图10B,虚线),这类似于图10A中所见的未切割的构建体对活性的弱化。MMP缓冲液的存在与生物测定信号的普遍降低相关。然而,当构建体与MMP酶在相同缓冲液中温育时,IFN的释放与相对于未切割的构建体的活性效力的增加相关(图10B,虚线)。更具体地,单铰链全长IFN和双铰链IFN构建体的活性与IFNα2b的活性相似,而单铰链截短的IFN的活性介于IFNα2b和Fc-IFNα2b的活性之间。

[0955] 9.参考文献的引用

[0956] 本申请中引用的所有出版物、专利、专利申请和其他文件特此出于所有目的通过引用以其整体并入,其程度如同每个单独的出版物、专利、专利申请或其他文献被单独地指示出于所有目的通过引用并入本文。如果本文并入的一篇或多篇参考文献的教导与本公开内容之间存在不一致,则旨在以本说明书的教导为准。

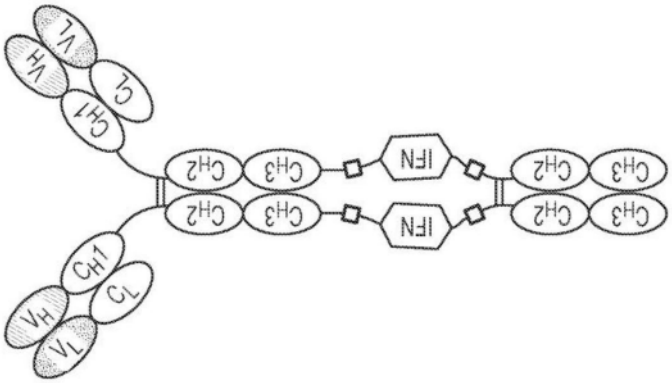

VL
VH
CL
CH1
CH2
CH3
IFN
IFN
CH2
CH3
CH2
CH3
CH1
CL
VH
VL

图1A

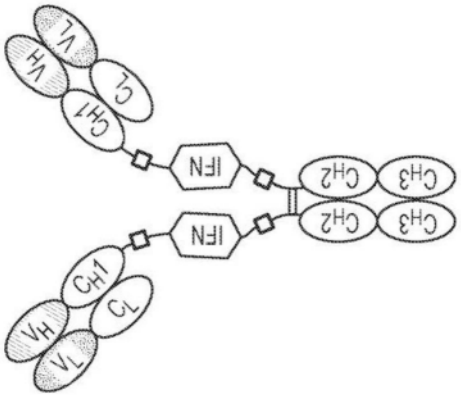

VL
VH
CL
CH1
IFN
IFN
CH2
CH3
CH2
CH3
CH1
CL
VH
VL

图1B

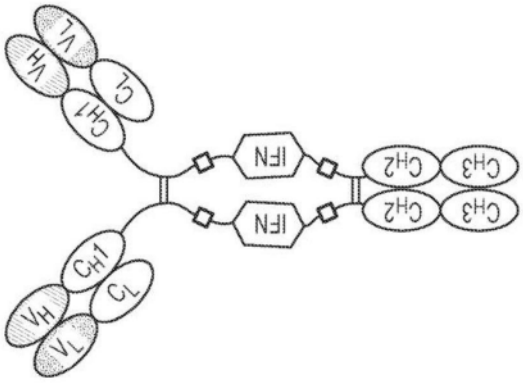

VL
VH
CL
CH1
IFN
IFN
CH2
CH3
CH2
CH3
CH1
CL
VH
VL

图1C

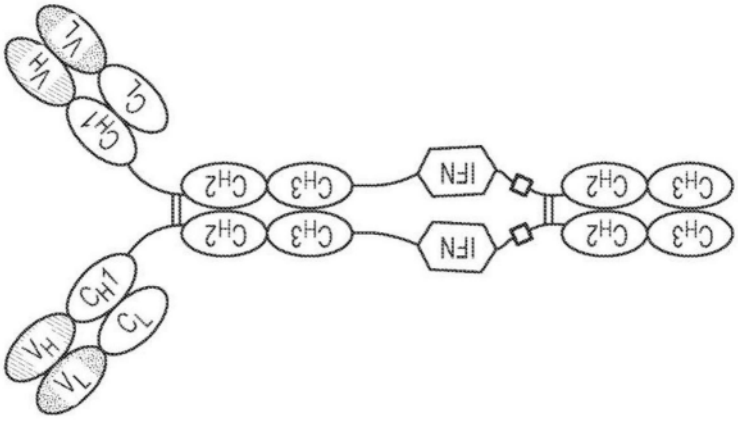

VL
VH
CL
CH1
CH2
CH3
IFN
CH2
CH3
CH2
CH3
IFN
CH1
CL
VH
VL

图2A

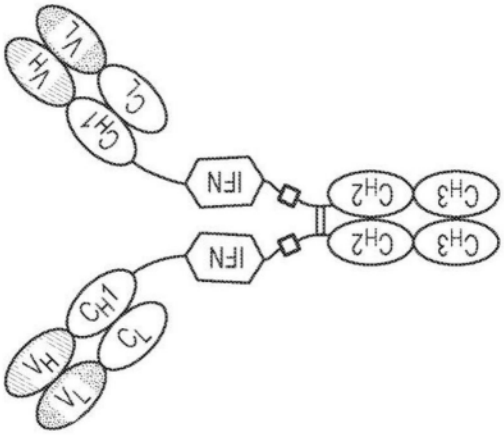

VL
VH
CL
CH1
IFN
CH2
CH3
IFN
CH2
CH3
CH1
CL
VH
VL

图2B

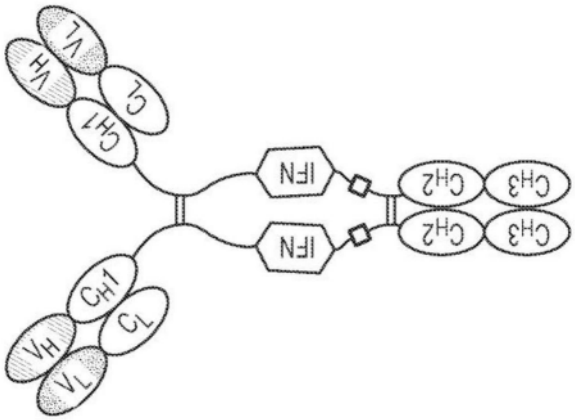

VL
VH
CL
CH1
IFN
CH2
CH3
IFN
CH2
CH3
CH1
CL
VH
VL

图2C

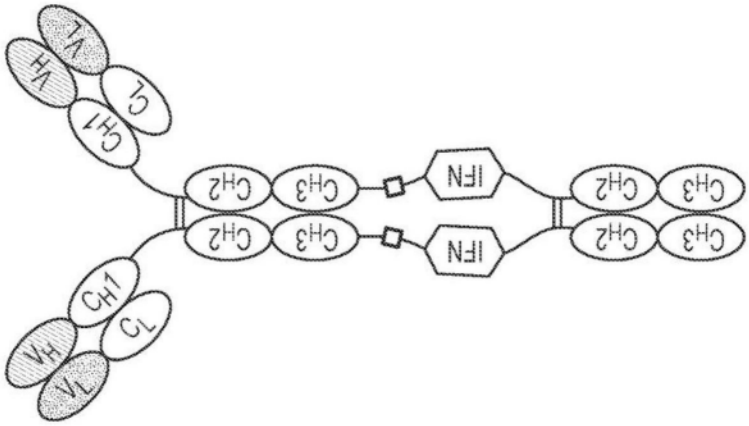

VL
VH
CL
CH1
CH2
CH3
IFN
IFN
CH2
CH3
CH2
CH3
CH1
CL
VH
VL

图2D

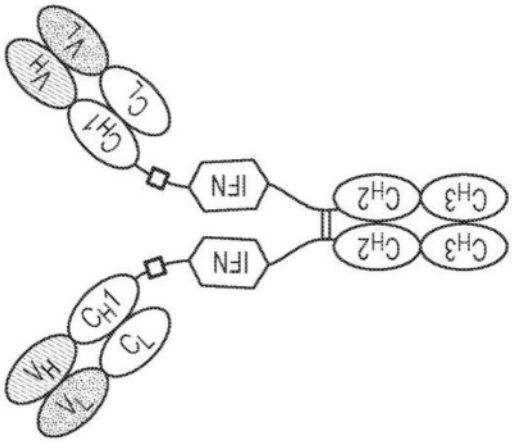

VL
VH
CL
CH1
IFN
IFN
CH2
CH3
CH2
CH3
CH1
CL
VH
VL

图2E

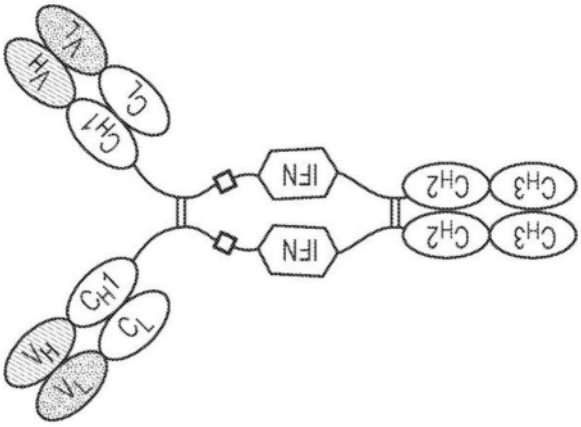

VL
VH
CL
CH1
IFN
IFN
CH2
CH3
CH2
CH3
CH1
CL
VH
VL

图2F

| 靶向、掩蔽IFN分子 | 链1 | 链2 | 链3 | 链4 |
|---|---|---|---|---|
| TM-PCL-IFN-PCL- Fc | TM (HC)-PCL-IFN-PCL- Fc | TM (HC)-PCL-IFN-PCL- Fc | TM (LC) | TM (LC) |
| TM (VH-CH1)-PCL-IFN-PCL-铰链-Fc | TM (VH-CH1)-PCL-IFN-PCL-铰链-Fc | TM (VH-CH1)-PCL-IFN-PCL-铰链-Fc | TM (LC) | TM (LC) |
| TM (VH-CH1)-PCL-ΔN-IFN-ΔC-PCL-铰链-Fc | TM (VH-CH1)-PCL-ΔN-IFN-ΔC-PCL-铰链-Fc | TM (VH-CH1)-PCL-ΔN-IFN-ΔC-PCL-铰链-Fc | TM (LC) | TM (LC) |
| TM (VH-CH1)-PCL-IFN-ΔC-PCL-铰链-Fc | TM (VH-CH1)-PCL-IFN-ΔC-PCL-铰链-Fc | TM (VH-CH1)-PCL-IFN-ΔC-PCL-铰链-Fc | TM (LC) | TM (LC) |
| TM (VH-CH1)-长铰链-PCL-IFN-PCL- 长铰链 -Fc | TM (VH-CH1)-长铰链-PCL-IFN-PCL- 长铰链 -Fc | TM (VH-CH1)-长铰链-PCL-IFN-PCL- 长铰链 -Fc | TM (LC) | TM (LC) |
| TM (VH-CH1)-短铰链-PCL-IFN-PCL- 短铰链 -Fc | TM (VH-CH1)-短铰链-PCL-IFN-PCL- 短铰链 -Fc | TM (VH-CH1)-短铰链-PCL-IFN-PCL- 短铰链 -Fc | TM (LC) | TM (LC) |

图3

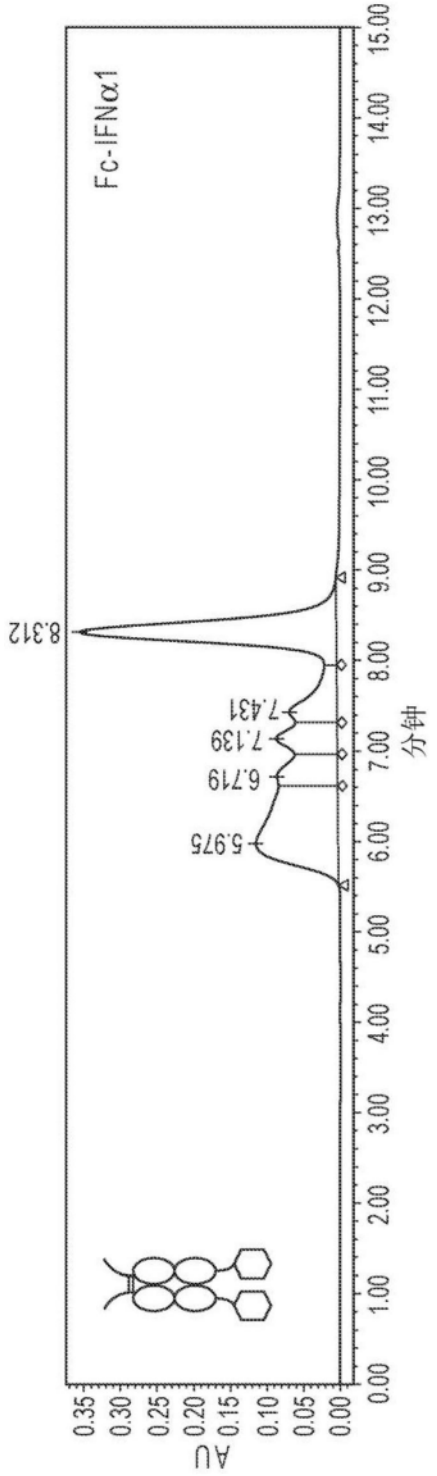

Fc-IFNα1
8.312
7.431
7.139
6.719
5.975
分钟
AU
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
0.00
1.00
2.00
3.00
4.00
5.00
6.00
7.00
8.00
9.00
10.00
11.00
12.00
13.00
14.00
15.00

图4A

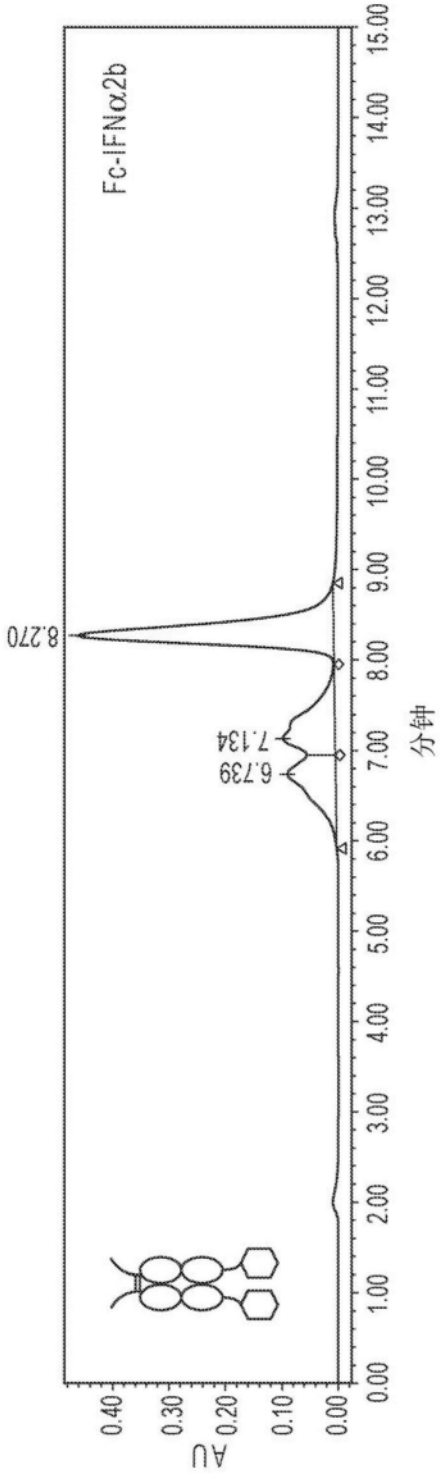

Fc-IFNα2b
8.270
7.134
6.739
AU
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
0.00
1.00
2.00
3.00
4.00
5.00
6.00
7.00
8.00
9.00
10.00
11.00
12.00
13.00
14.00
15.00
分钟

图4B

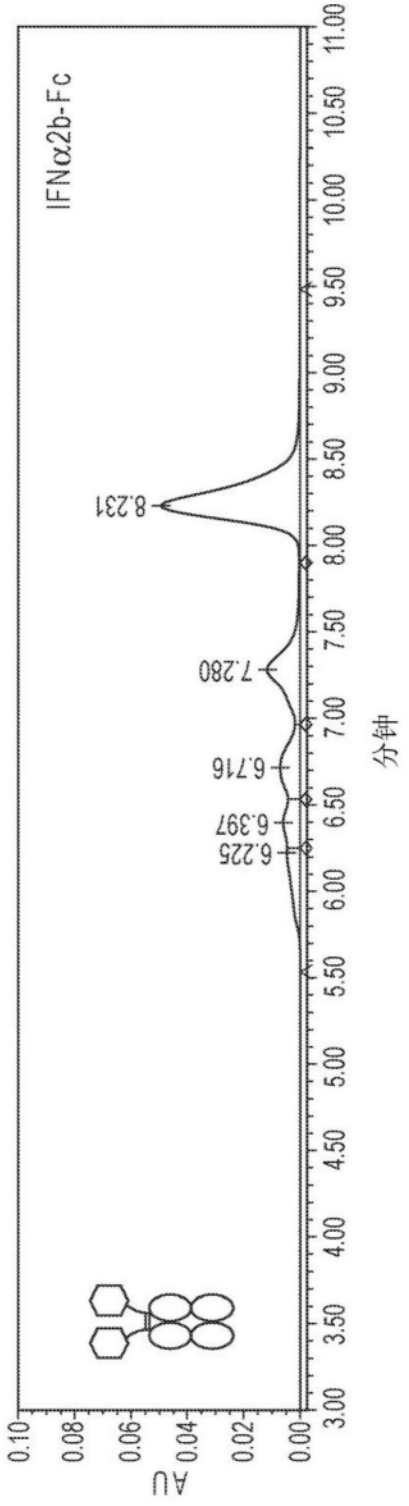

IFNα2b-Fc
8.231
7.280
6.716
6.397
6.225
分钟
AU
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
3.00
3.50
4.00
4.50
5.00
5.50
6.00
6.50
7.00
7.50
8.00
8.50
9.00
9.50
10.00
10.50
11.00

图4C

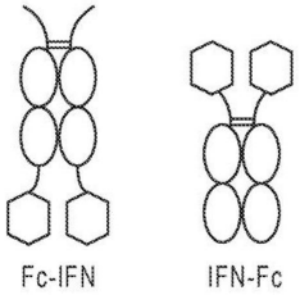

Fc-IFN
IFN-Fc

图5A

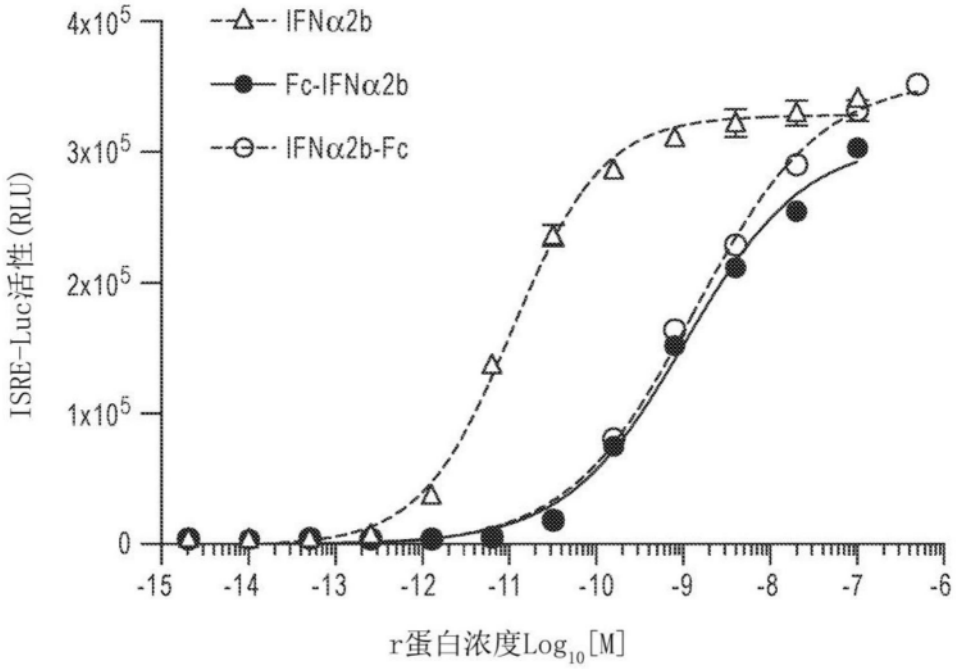

4x10^5
3x10^5
2x10^5
1x10^5
0
IFNα2b
Fc-IFNα2b
IFNα2b-Fc
ISRE-Luc活性(RLU)
-15
-14
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
r蛋白浓度Log10[M]

图5B

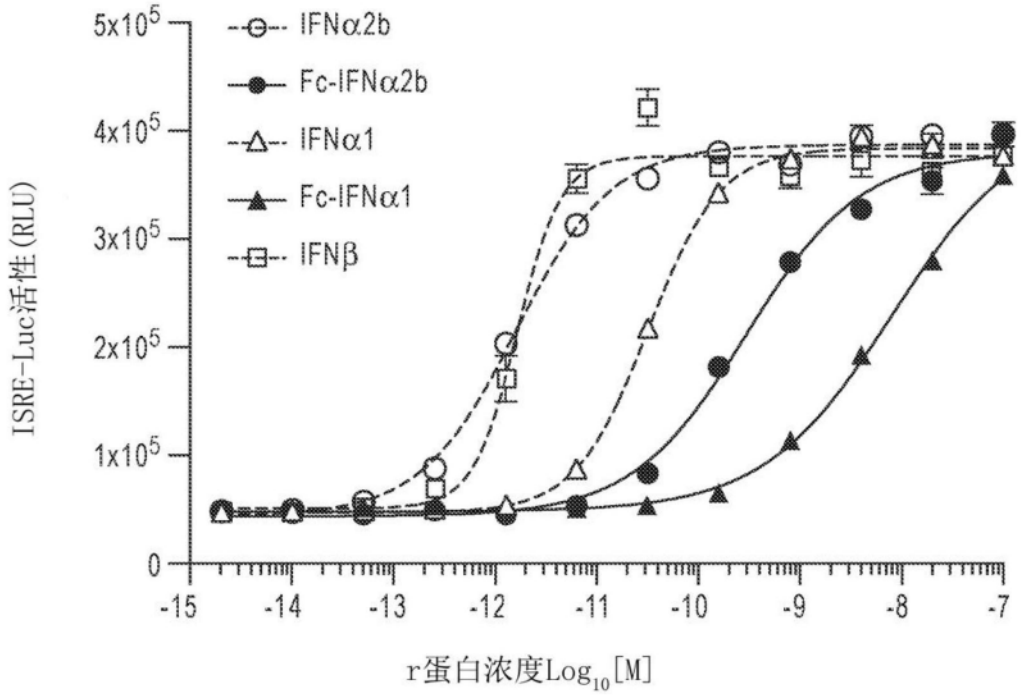

5x10^5
4x10^5
3x10^5
2x10^5
1x10^5
0
ISRE-Luc活性(RLU)
IFNα2b
Fc-IFNα2b
IFNα1
Fc-IFNα1
IFNβ
-15
-14
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
r蛋白浓度Log10[M]

图5C

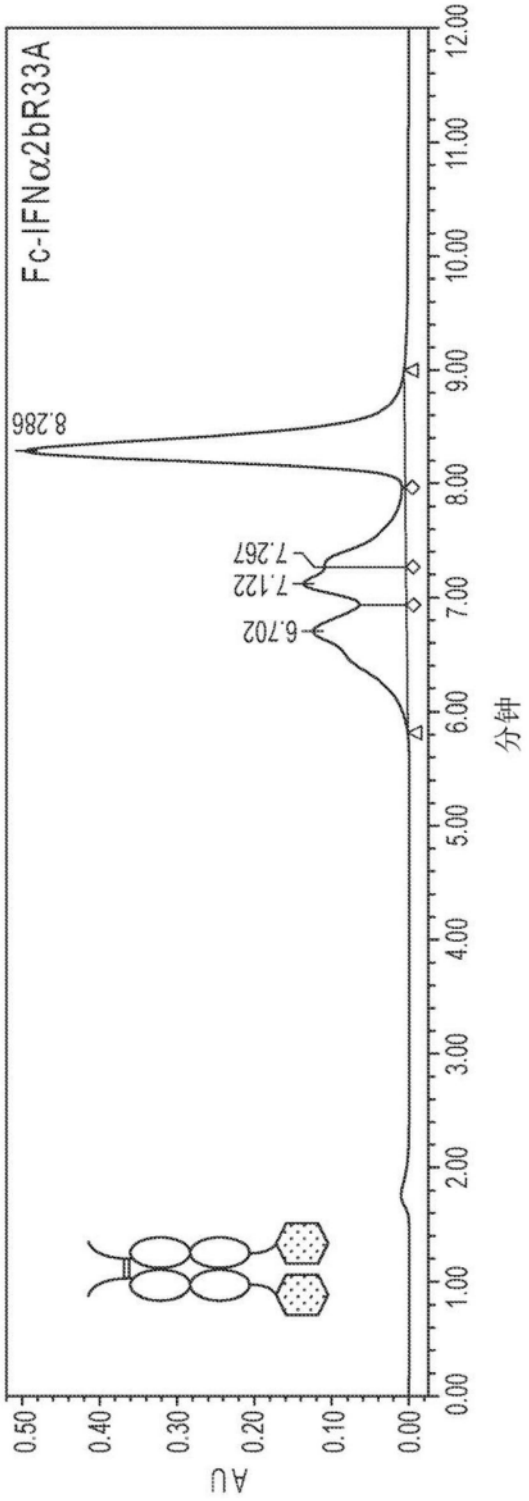

Fc-IFNα2bR33A
8.286
7.267
7.122
6.702
0.00
1.00
2.00
3.00
4.00
5.00
6.00
7.00
8.00
9.00
10.00
11.00
12.00
分钟
AU
0.00
0.10
0.20
0.30
0.40
0.50

图6A

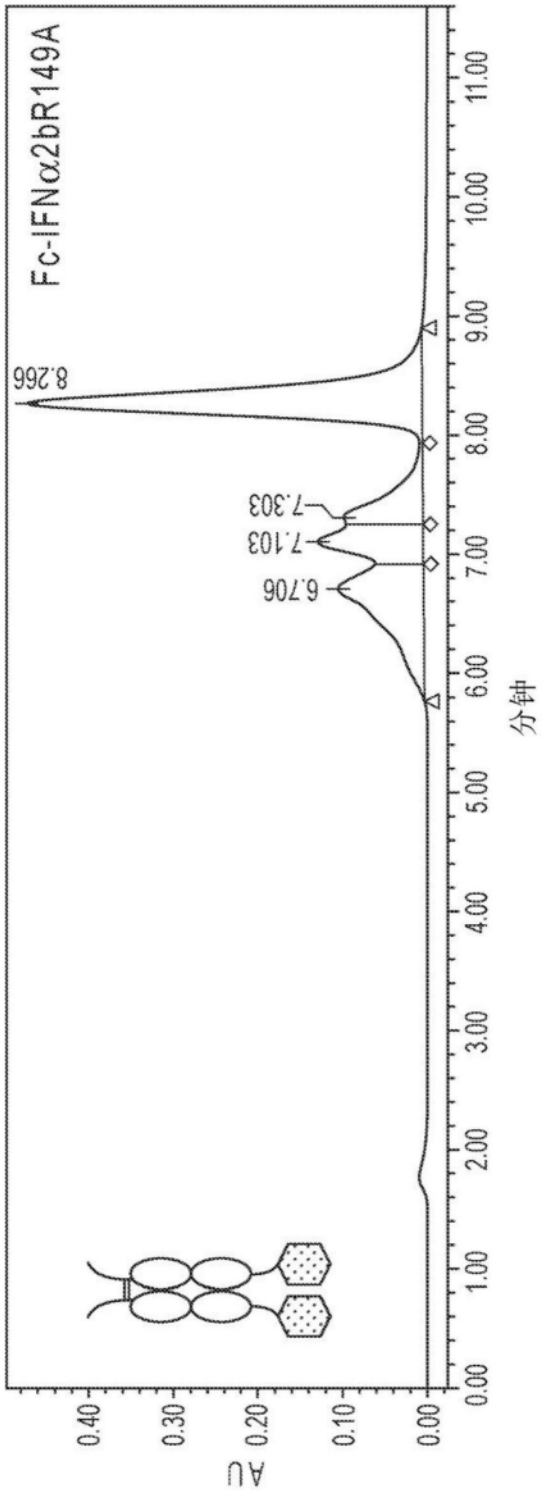

Fc-IFNα2bR149A
8.266
7.303
7.103
6.706
0.00
1.00
2.00
3.00
4.00
5.00
6.00
7.00
8.00
9.00
10.00
11.00
分钟
AU
0.00
0.10
0.20
0.30
0.40

图6B

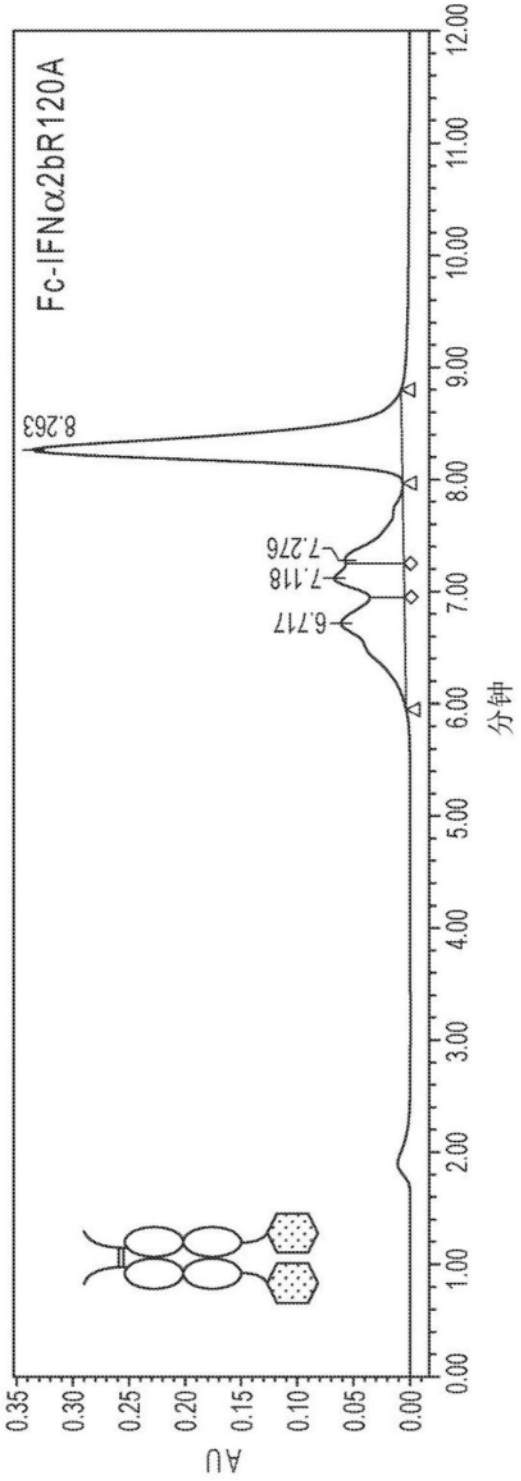

Fc-IFNα2bR120A
8.263
7.276
7.118
6.717
AU
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
0.00
1.00
2.00
3.00
4.00
5.00
6.00
7.00
8.00
9.00
10.00
11.00
12.00
分钟

图6C

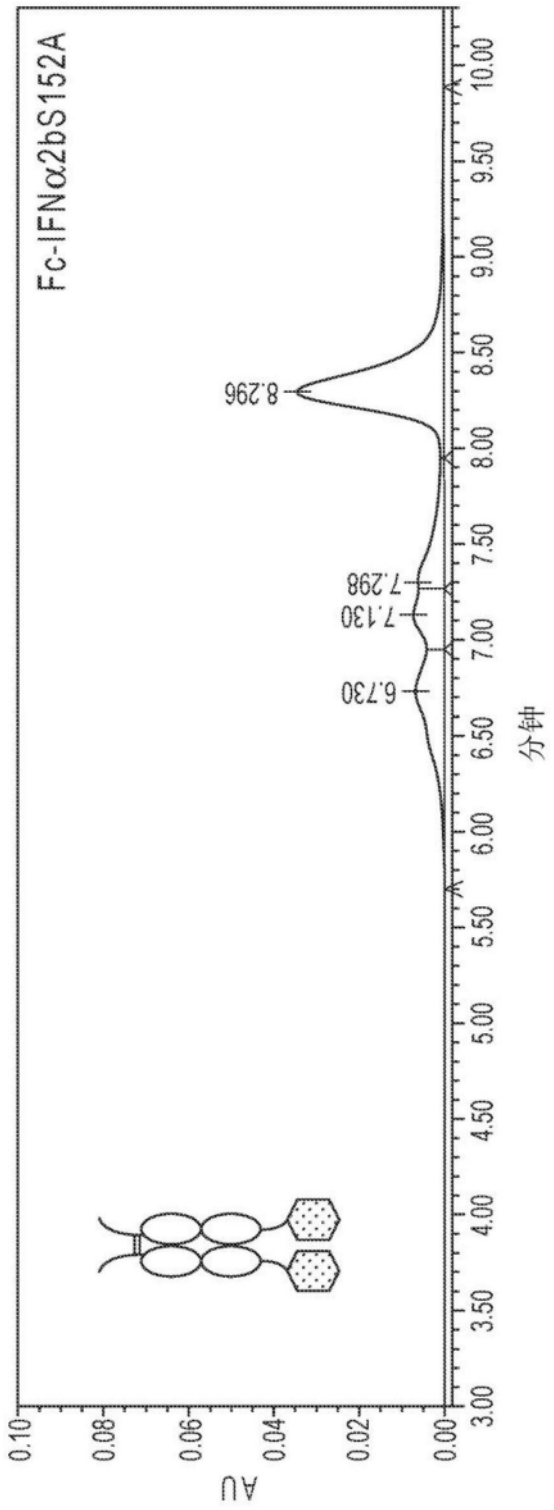

Fc-IFNα2bS152A
8.296
7.298
7.130
6.730
AU
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
3.00
3.50
4.00
4.50
5.00
5.50
6.00
6.50
7.00
7.50
8.00
8.50
9.00
9.50
10.00
分钟

图6D

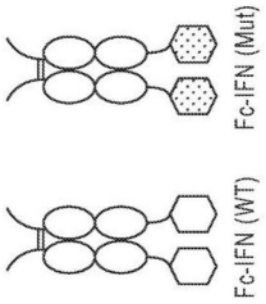

Fc-IFN (Mut)
Fc-IFN (WT)

图7A

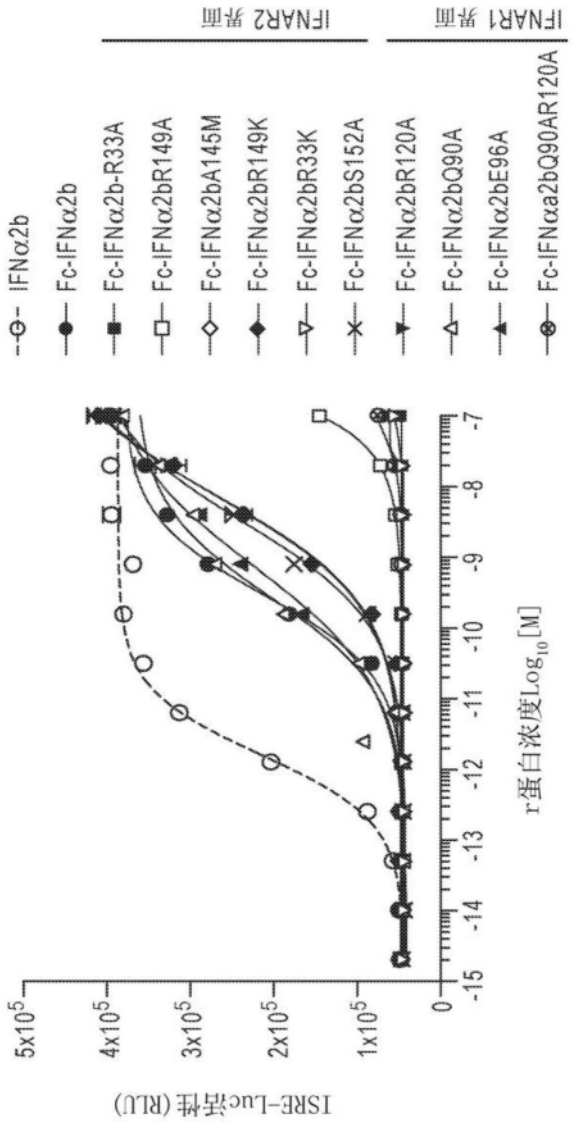

IFNAR1 界面
IFNAR2 界面
IFNα2b
Fc-IFNα2b
Fc-IFNα2b-R33A
Fc-IFNα2bR149A
Fc-IFNα2bA145M
Fc-IFNα2bR149K
Fc-IFNα2bR33K
Fc-IFNα2bS152A
Fc-IFNα2bR120A
Fc-IFNα2bQ90A
Fc-IFNα2bE96A
Fc-IFNαa2bQ90AR120A
ISRE-Luc活性(RLU)
5x10^5
4x10^5
3x10^5
2x10^5
1x10^5
0
-15
-14
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
r蛋白浓度Log10[M]

图7B

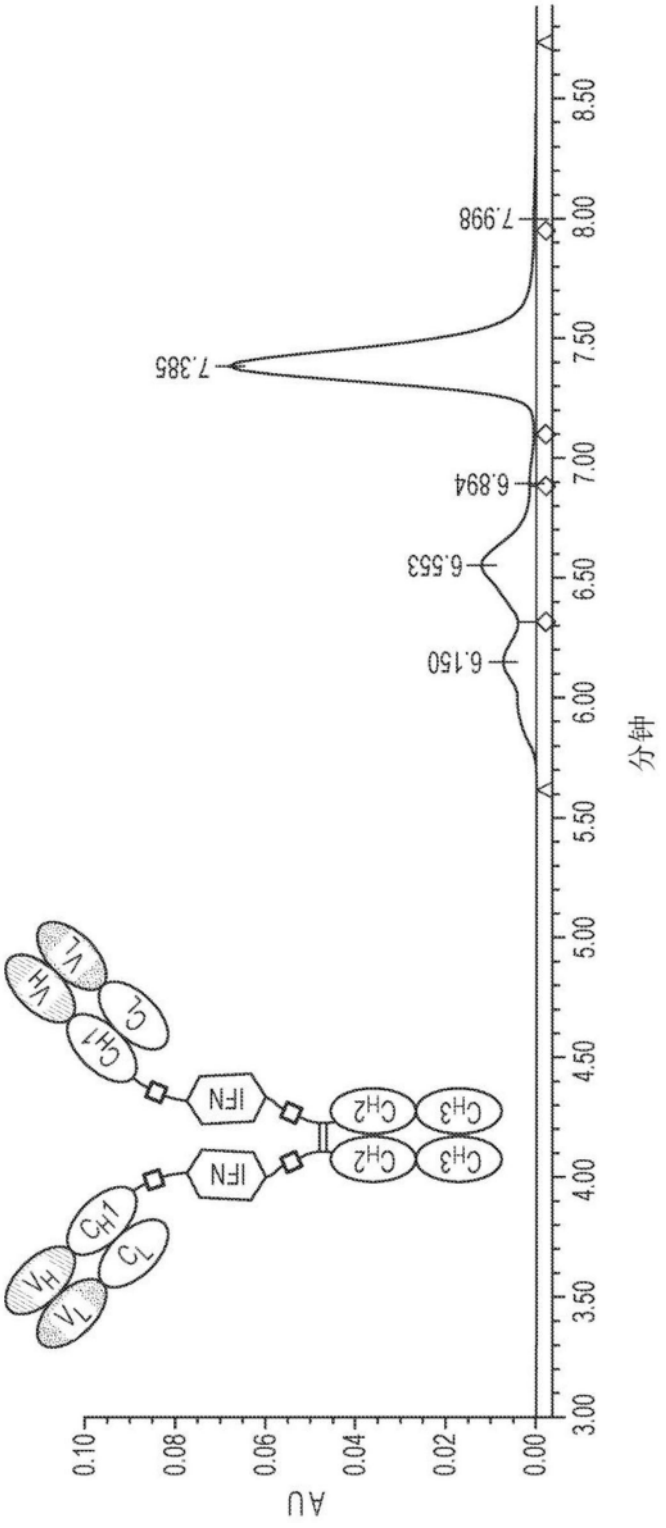

AU
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
3.00
3.50
4.00
4.50
5.00
5.50
6.00
6.50
7.00
7.50
8.00
8.50
分钟
6.150
6.553
6.894
7.385
7.998
IFN
IFN
CH1
CL
VH
VL
CH2
CH3
CH2
CH3
CH1
CL
VH
VL

图8A

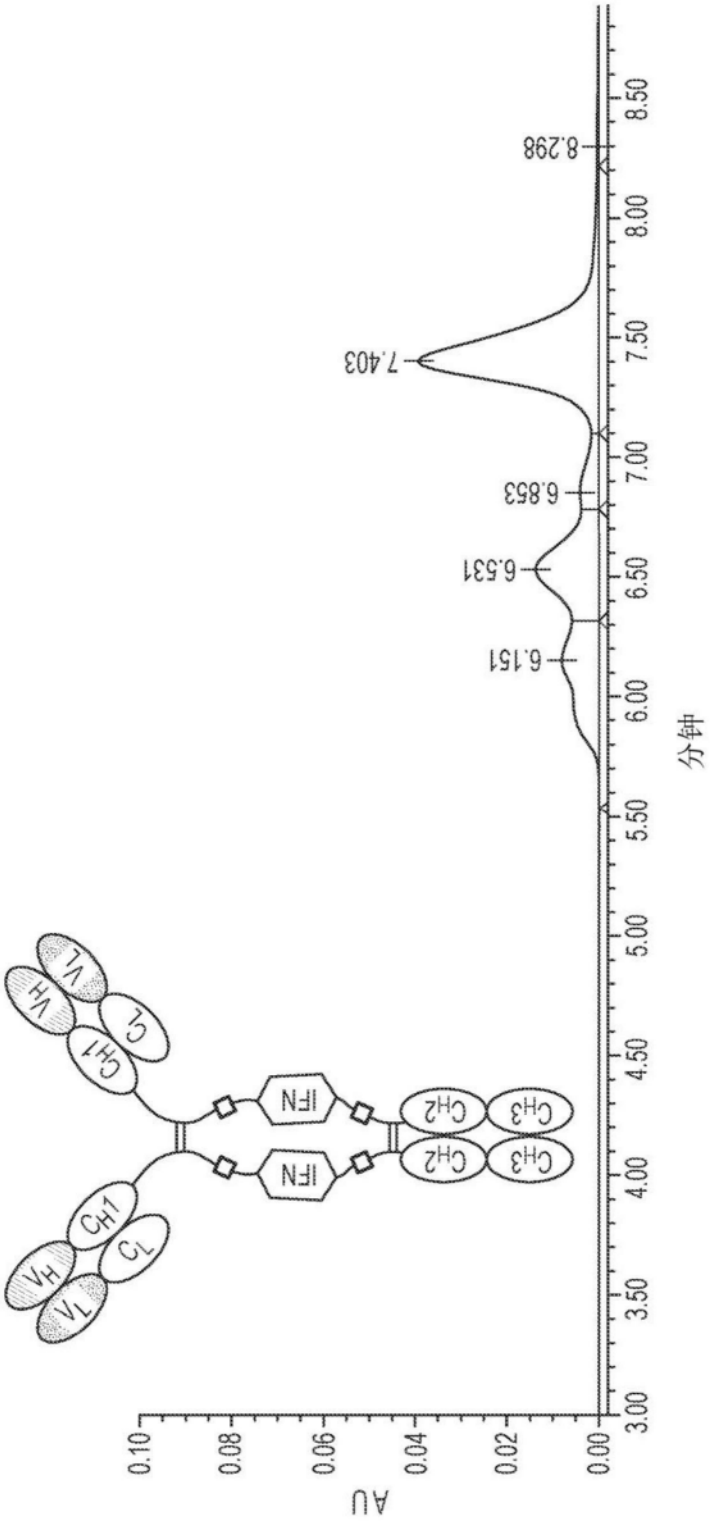

AU
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
3.00
3.50
4.00
4.50
5.00
5.50
6.00
6.50
7.00
7.50
8.00
8.50
分钟
6.151
6.531
6.853
7.403
8.298
IFN
IFN
$C_{H1}$
$C_L$
$V_H$
$V_L$
$C_{H2}$
$C_{H3}$

图8B

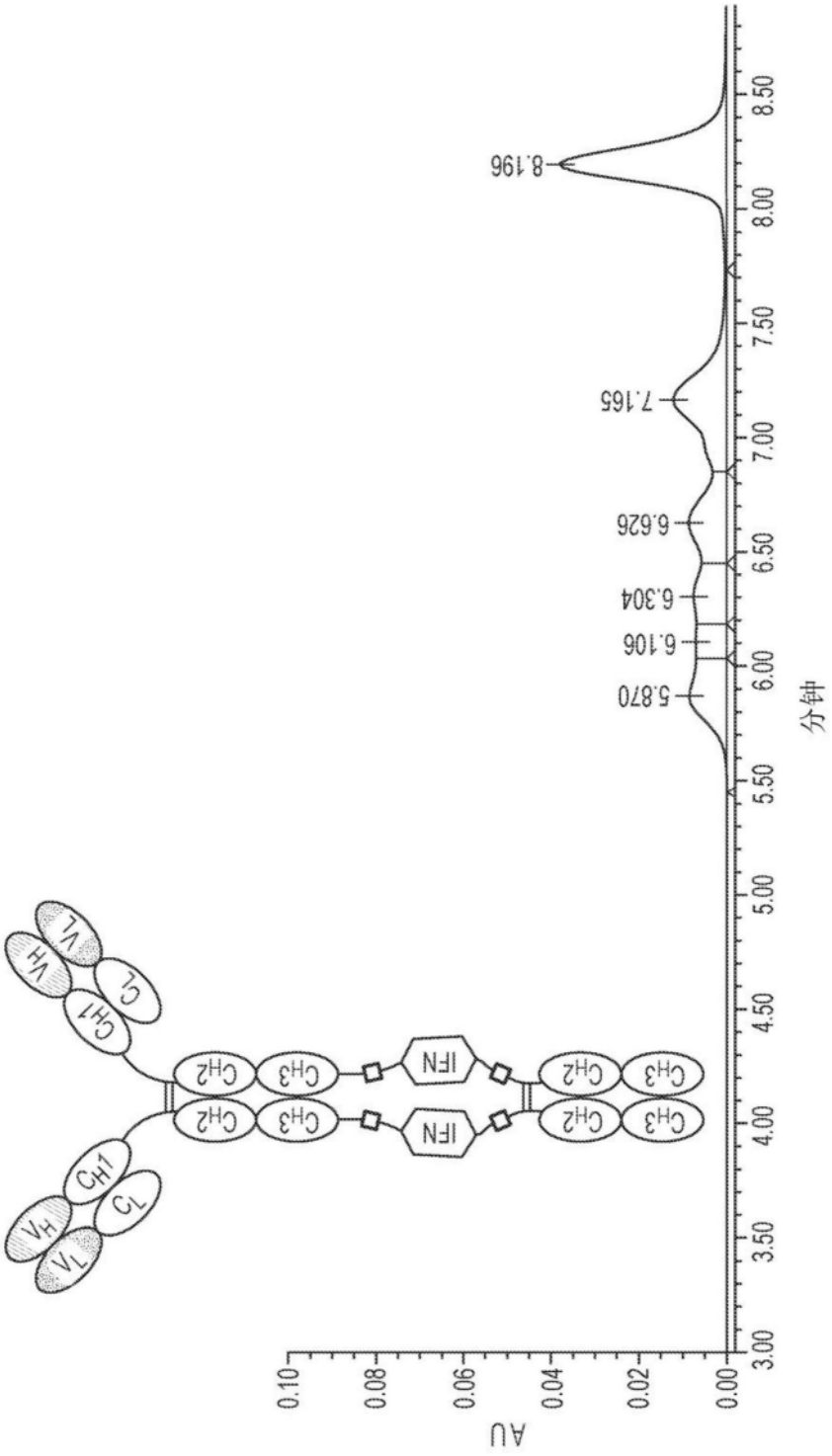

8.196
7.165
6.626
6.304
6.106
5.870
分钟
AU
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
3.00
3.50
4.00
4.50
5.00
5.50
6.00
6.50
7.00
7.50
8.00
8.50
IFN
IFN
CH2
CH3
VL
VH
CL
CH1

图8C

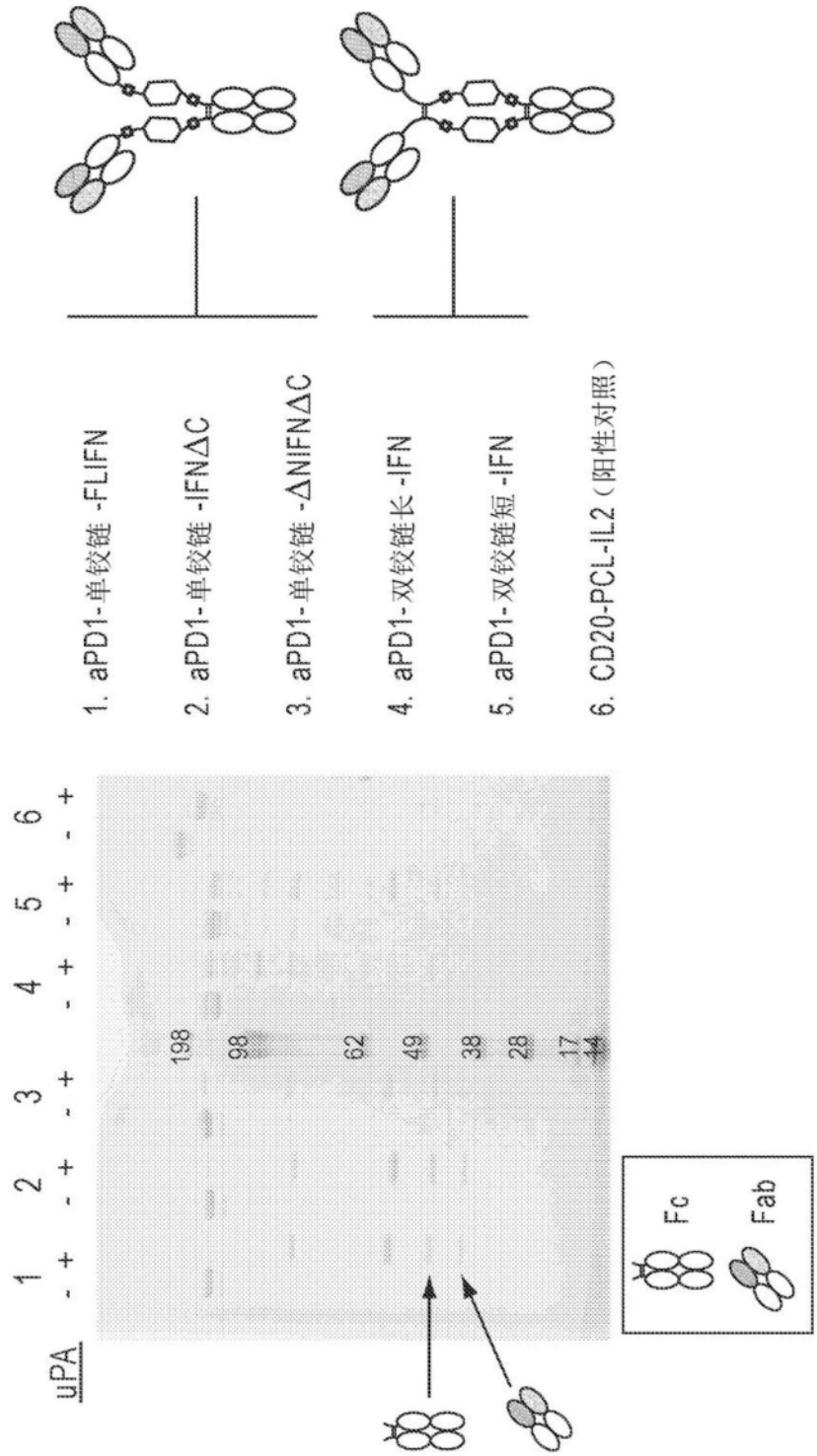

1. aPD1-单铰链 -FLIFN
2. aPD1-单铰链 -IFNΔC
3. aPD1-单铰链 -ΔNIFNΔC
4. aPD1-双铰链长 -IFN
5. aPD1-双铰链短 -IFN
6. CD20-PCL-IL2（阳性对照）
uPA
1 2 3 4 5 6
- + - + - + - + - + - +
198
98
62
49
38
28
17
14
Fc
Fab

图9A

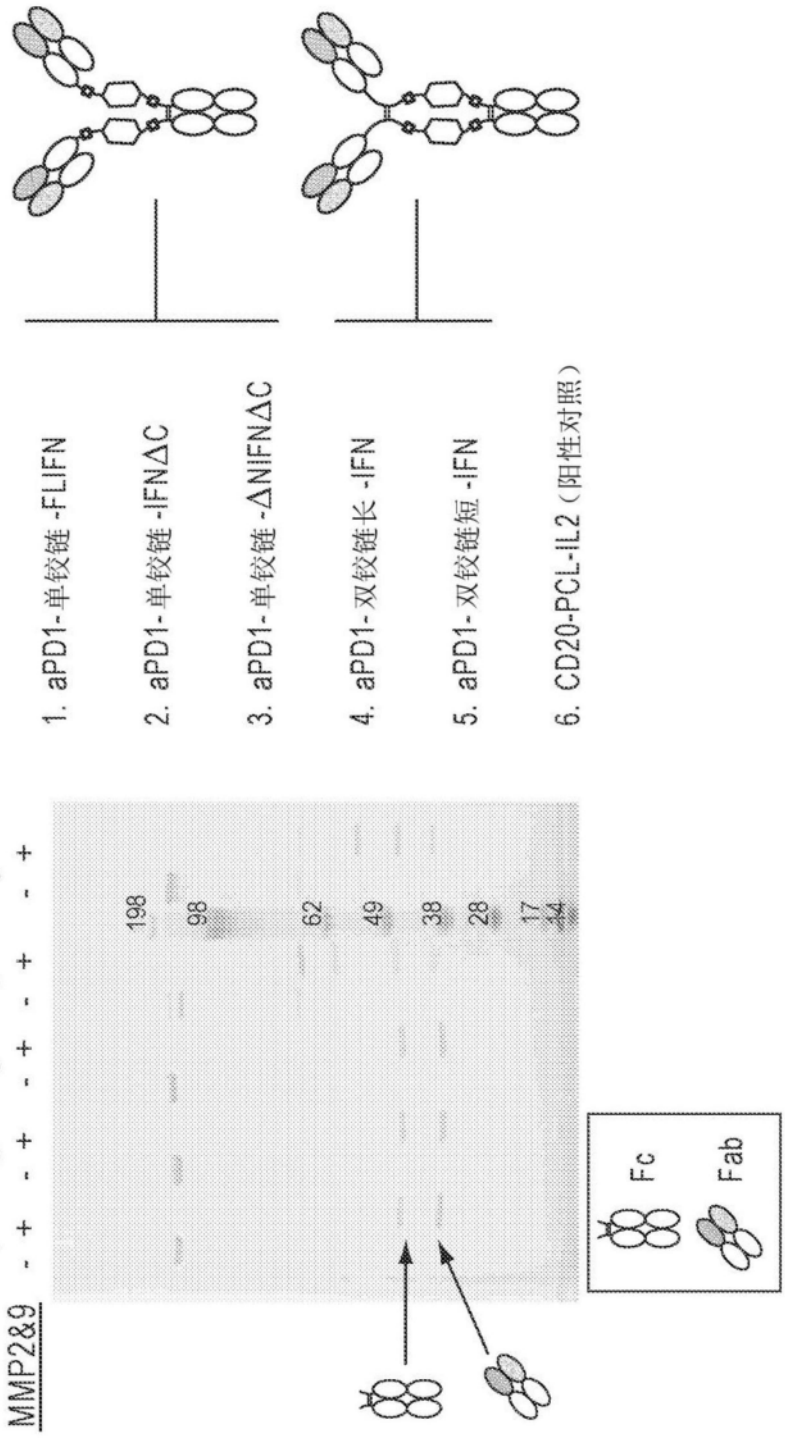

1. aPD1-单铰链-FLIFN
2. aPD1-单铰链-IFNΔC
3. aPD1-单铰链-ΔNIFNΔC
4. aPD1-双铰链长-IFN
5. aPD1-双铰链短-IFN
6. CD20-PCL-IL2（阳性对照）
MMP2&9
1 2 3 4 5
- + - + - + - + - +
198
98
62
49
38
28
17
14
Fc
Fab

图9B

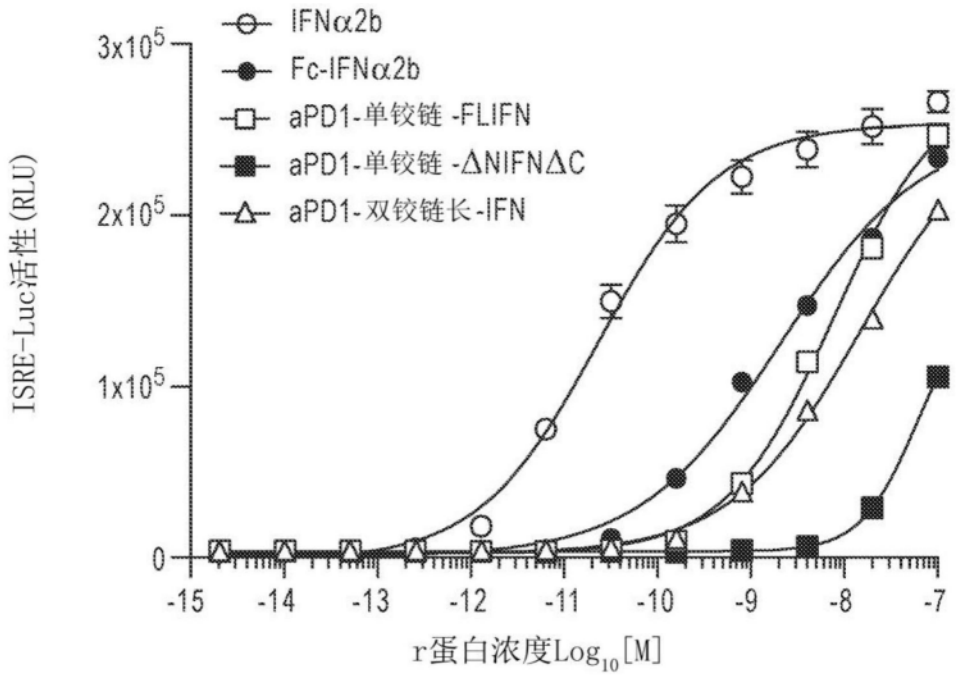

IFNα2b
Fc-IFNα2b
aPD1-单铰链 -FLIFN
aPD1-单铰链 -ΔNIFNΔC
aPD1-双铰链长-IFN
ISRE-Luc活性(RLU)
3x10^5
2x10^5
1x10^5
0
-15 -14 -13 -12 -11 -10 -9 -8 -7
r蛋白浓度Log10[M]

图10A

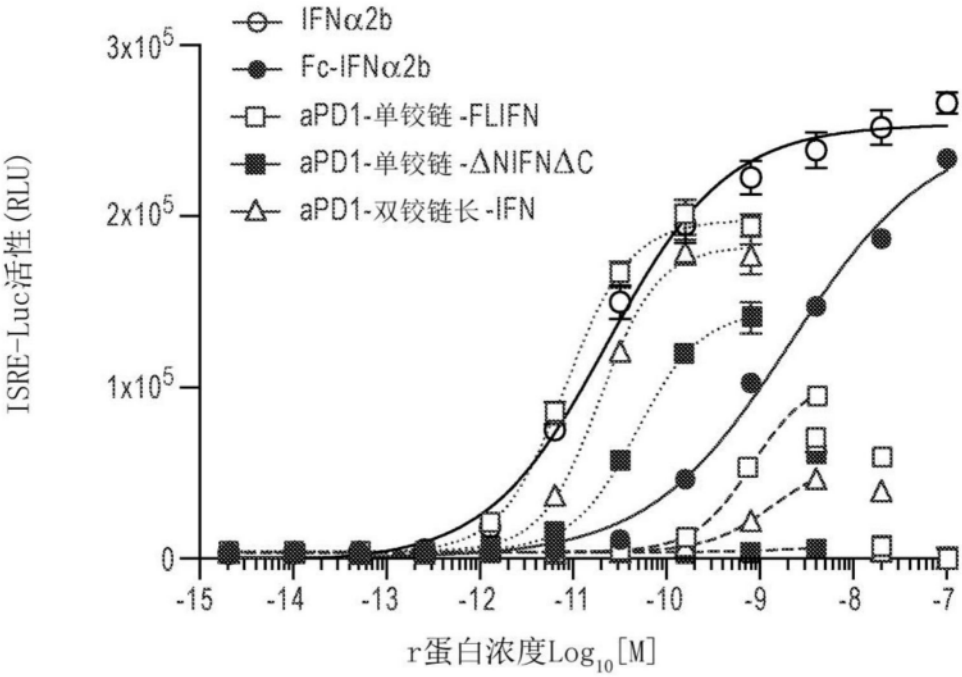

IFNα2b
Fc-IFNα2b
aPD1-单铰链 -FLIFN
aPD1-单铰链 -ΔNIFNΔC
aPD1-双铰链长-IFN
ISRE-Luc活性(RLU)
3x10^5
2x10^5
1x10^5
0
-15 -14 -13 -12 -11 -10 -9 -8 -7
r蛋白浓度Log10[M]

图10B