(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119546628 A
(43)申请公布日 2025.02.28

(21)申请号 202380053256.6
(22)申请日 2023.05.10
(30)优先权数据
63/340,891 2022.05.11 US
63/481,291 2023.01.24 US
63/489,812 2023.03.13 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.01.10
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/066841 2023.05.10
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/220647 EN 2023.11.16
(71)申请人 再生元制药公司
地址 美国纽约州
(72)发明人 L·哈伯 A·克劳福德 T·张 E·史密斯 C-Y·林
(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 16/00(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
C07K 16/30(2006.01)

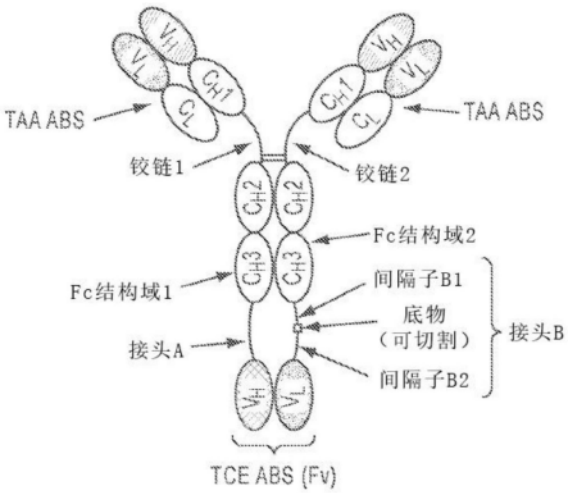
权利要求书3页 说明书84页
序列表（电子公布） 附图14页

(54)发明名称

多特异性结合分子前蛋白及其用途

(57)摘要

本公开提供了抗原结合分子,包括多特异性结合分子(MBM)的前蛋白。所述抗原结合分子前蛋白包含抗原结合位点、抑制所述抗原结合位点与其靶标的结合的一种或多种组分以及蛋白酶可切割接头,所述蛋白酶可切割接头能够被蛋白酶切割并且其切割消除对所述抗原结合位点与其靶标的结合的抑制。所述MBM前蛋白和由蛋白酶可切割接头的切割产生的MBM,例如串联Fab MBM,包含T细胞接合抗原结合位点和肿瘤相关抗原抗原结合位点。所述MBM前蛋白进一步包含抑制所述T细胞接合抗原结合位点与其靶标的结合的组分和蛋白酶可切割接头,所述蛋白酶可切割接头可被肿瘤环境中的蛋白酶切割并且其切割消除对所述T细胞接合抗原结合位点与其靶标的结合的所述抑制。本公开进一步提供了包含所述抗原结合分子前蛋白的药物组合物和在疗法中使用所述抗原结合分子前蛋白的方法,以及编码所述抗原结合分子前蛋白的核酸、表达所述抗原结合分子前蛋白的重组细胞,以及产生所述抗原结合分子前蛋白的方法。



CN 119546628 A

1.一种结合分子,其包含:

(a)第一Fc结构域;

(b)第二Fc结构域;以及

(c)通过蛋白酶可切割接头(PCL)连结至所述第一Fc结构域的第一抗原结合位点(ABS)的第一组分,

其中(i)所述PCL的长度为25个或更少的氨基酸,和/或(ii)所述第一ABS在空间上受到阻碍而不能结合其靶标。

2.根据权利要求1所述的结合分子,其中所述第一ABS与其靶标的所述结合在所述PCL的蛋白酶切割后增强。

3.根据权利要求1所述的结合分子,其中所述第一ABS在所述PCL的蛋白酶切割之前在空间上受到阻碍而不能结合其靶标,并且空间阻碍在所述PCL的蛋白酶切割之后被释放。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的结合分子,其中所述PCL的长度为20个或更少的氨基酸。

5.根据权利要求1至3中任一项所述的结合分子,其中所述PCL的长度为15个或更少的氨基酸。

6.根据权利要求1至3中任一项所述的结合分子,其中所述PCL的长度为10个或更少的氨基酸。

7.根据权利要求1至6中任一项所述的结合分子,其中在所述PCL的蛋白酶切割后,所述第一ABS与其靶标的结合增强至至少10倍。

8.根据权利要求1至6中任一项所述的结合分子,其中在所述PCL的蛋白酶切割后,所述第一ABS与其靶标的结合增强至至少100倍。

9.根据权利要求1至8中任一项所述的结合分子,其中所述第一ABS为Fab。

10.根据权利要求1至8中任一项所述的结合分子,其中所述第一ABS为Fv。

11.根据权利要求1至10中任一项所述的结合分子,其中所述第一组分为VH。

12.根据权利要求1至10中任一项所述的结合分子,其中所述第一组分为VL。

13.根据权利要求1至12中任一项所述的结合分子,其中所述结合分子包含至少两条多肽链,其中第一多肽链包含所述第一Fc结构域和所述第一ABS的所述第一组分,并且第二多肽链包含所述第二Fc结构域。

14.根据权利要求13所述的结合分子,其中所述第二多肽链包含所述第一ABS的第二组分。

15.根据权利要求14所述的结合分子,其中所述第一组分和所述第二组分缔合以形成所述第一ABS。

16.根据权利要求14或15所述的结合分子,其中所述第一组分为VH并且所述第二组分为VL。

17.根据权利要求16所述的结合分子,其中(1)所述第一多肽链进一步包含所述VH的CH1 C-末端,并且(2)所述第二多肽链进一步包含所述VL的CL C-末端。

18.根据权利要求13至15中任一项所述的结合分子,其进一步包含第三多肽链,所述第三多肽链包含所述第一ABS的第三组分。

19.根据权利要求1至18中任一项所述的结合分子,其为包含第二ABS的多特异性结合

分子。

20.根据权利要求19所述的结合分子,其中(a)所述第一ABS为TCE ABS并且所述第二ABS为TAA ABS或(b)所述第一ABS为TAA ABS并且所述第二ABS为TCE ABS。

21.根据权利要求20所述的结合分子,其中所述第一ABS为所述TCE ABS。

22.根据权利要求21所述的结合分子,其中所述TCE ABS能够与CD3、TCRαβ或TCRγδ结合。

23.根据权利要求20至22中任一项所述的结合分子,其中所述TAA ABS能够与以下各项结合:

(a)第6.6节中鉴别的任何TAA;或

(b)AFP、ALK、BAGE蛋白、BIRC5(存活蛋白)、BIRC7、β-连环蛋白、brc-abl、BRCA1、BORIS、CA9、碳酸酐酶IX、胱天蛋白酶-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、酪氨酸酶或尿路上皮特异性膜蛋白3。

24.根据权利要求1至23中任一项所述的结合分子,其中所述第一Fc结构域和所述第二Fc结构域缔合以形成Fc异二聚体。

25.根据权利要求24所述的结合分子,其中所述Fc异二聚体包含杵臼突变,例如,其中(i)所述第一Fc结构域包含一个或多个杵突变并且所述第二Fc结构域包含一个或多个臼突变,或者(ii)所述第一Fc结构域包含一个或多个臼突变并且所述第二Fc结构域包含一个或多个杵突变。

26.根据权利要求1至25中任一项所述的结合分子,其中所述第一Fc结构域和/或所述第二Fc结构域包含星形突变。

27.根据权利要求1至26中任一项所述的结合分子,其中串联Fab是在所述PCL的蛋白酶切割之后产生。

28.根据权利要求1至26中任一项所述的结合分子,其中包含所述第一Fc结构域和所述第二Fc结构域的多特异性结合分子是在所述PCL的蛋白酶切割之后产生。

29.根据权利要求1至28中任一项所述的结合分子,其中所述PCL包含可被表A中列出的任何蛋白酶切割的底物序列。

30.根据权利要求1至29中任一项所述的结合分子,其中所述PCL包含选自表B中列出的所述底物序列的一个或多个底物序列。

31.根据权利要求1至30中任一项所述的结合分子,其中所述PCL包含选自表D中列出的序列的PCL序列中的任一个的氨基酸序列。

32.根据权利要求1至31中任一项所述的结合分子,其中所述结合分子具有图3A中描绘的构型。

33.根据权利要求1至31中任一项所述的结合分子,其中所述结合分子具有图3B中描绘的构型。

34.根据权利要求1至31中任一项所述的结合分子,其中所述结合分子具有图3C中描绘的构型。

35.根据权利要求1至31中任一项所述的结合分子,其中所述结合分子具有图3D中描绘的构型。

36.根据权利要求1至31中任一项所述的结合分子,其中所述结合分子具有图3E中描绘的构型。

37.根据权利要求1至31中任一项所述的结合分子,其中所述结合分子具有图3F中描绘的构型。

38.根据权利要求1至31中任一项所述的结合分子,其中所述结合分子具有图7中描绘的构型。

39.根据权利要求1至38中任一项所述的结合分子,其中所述第一Fc结构域和/或所述第二Fc结构域与SEQ ID NO:335、336、337和338中的任一个具有至少约90%序列同一性。

40.根据权利要求1至38中任一项所述的结合分子,其中所述第一Fc结构域和/或所述第二Fc结构域与SEQ ID NO:335、336、337和338中的任一个具有至少约95%序列同一性。

41.根据权利要求1至38中任一项所述的结合分子,其中所述第一Fc结构域和/或所述第二Fc结构域与SEQ ID NO:335、336、337和338中的任一个具有至少约95%序列同一性。

42.根据权利要求1至41中任一项所述的结合分子,其中所述第一Fc结构域和/或所述第二Fc结构域包含降低效应子功能的一个或多个氨基酸取代(例如,如第6.10.1节中所述)。

43.根据权利要求1至41中任一项所述的结合分子,其中所述第一Fc结构域和/或所述第二Fc结构域包含促进异二聚化的一个或多个氨基酸取代(例如,如第6.10.2节中所述)。

44.一种药物组合物,其包含根据权利要求1至43中任一项所述的结合分子以及赋形剂。

45.一种治疗癌症的方法,其包括向罹患癌症的受试者施用有效量的根据权利要求1至43中任一项所述的结合分子或根据权利要求44所述的药物组合物。

46.根据权利要求45所述的方法,其中所述癌症与由例如,如表K中所示的TAA ABS结合的表位的表达相关。

47.一种核酸或多种核酸,其编码根据权利要求1至43中任一项所述的结合分子。

48.一种用一种或多种表达载体转染的细胞,其包含在一种或多种启动子的控制下编码根据权利要求1至43中任一项所述的结合分子的一个或多个核酸序列。

49.一种产生结合分子的方法,所述方法包括:

(a)在表达所述结合分子的条件下培养根据权利要求48所述的细胞;以及

(b)从细胞培养物中回收所述结合分子。

50.根据权利要求49所述的方法,所述方法进一步包括富集所述结合分子和/或纯化所述结合分子。

多特异性结合分子前蛋白及其用途

[0001] 1.相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2022年5月11日提交的美国临时申请号63/340,891、于2023年1月24日提交的美国临时申请号63/481,291和于2023年3月13日提交的美国临时申请号63/489,812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] 本申请含有已经以XML文件格式电子提交的序列表,并且该序列表特此通过对其援引以其全文并入。创建于2023年5月9日的所述XML副本命名为RGN-017WO_SL.xml并且大小为307,242字节。

3.背景技术

[0005] 选择性破坏肿瘤细胞,同时保持健康细胞和组织完好无损,是癌症免疫疗法的目标。双特异性抗体治疗剂已被开发出来,通过诱导针对肿瘤的免疫反应来实现这一目标。在这方面,双特异性抗体被设计为针对优先在肿瘤细胞上表达的肿瘤相关抗原(“TAA”)和T细胞受体(“TCR”)复合物的组分。这种抗体与其两个靶标的同时结合会导致细胞毒性T细胞的活化以及随后表达TAA的细胞的裂解。因此,免疫反应被重新定向至表达TAA的细胞。

[0006] 已经开发了几种双特异性抗体形式,并研究了它们对T细胞介导的免疫疗法的适用性。参见You等人,2021,Vaccines 9:724,doi.org/10.3390/vaccines9070724。

[0007] 生成适用于治疗的双特异性分子的任务提出了与毒性相关的若干技术挑战,因为TAA通常在正常细胞以及肿瘤细胞上表达。因此,需要在肿瘤环境中选择性地释放T细胞活化的有效的T细胞活化双特异性分子。

4.发明内容

[0008] 本发明大体上涉及新颖的蛋白酶可活化的抗原结合分子(“ABM”),在本文中称为抗原结合分子前蛋白。

[0009] 一般而言,在其活性状态下,抗原结合分子包含可与其靶标结合的抗原结合位点(ABS)。然而,在前蛋白形式中,ABS被掩蔽部分所掩蔽,从而使其与其靶标结合的能力大大减弱。抗原结合分子前蛋白被配置为使得在遇到蛋白酶,例如在肿瘤环境中过表达的蛋白酶时,掩蔽部分被切割并且产生具有增强的靶结合的结合分子。这是通过包含一个或多个蛋白酶可切割接头(“PCL”)来实现的,该接头包含一个或多个蛋白酶底物序列,例如,直接或间接地位于ABS与掩蔽部分之间。前蛋白可降低由于ABM与正常组织结合而产生的毒性和不良副作用。一般而言,抗原结合分子前蛋白描述于第6.2节和第A组编号的实施例1至43,以及第B组编号的实施例1至90中。

[0010] 在一些实施例中,本公开的抗原结合分子前蛋白为多特异性结合分子(MBM)前蛋白。一般而言,在其活性状态下,本公开的MBM包含与T细胞受体复合物的组分结合的T细胞接合抗原结合位点(“TCE ABS”)和肿瘤相关抗原结合位点(“TAA ABS”),该肿瘤相关抗原结合位点可同时结合至它们各自的靶标上,从而刺激由TCE ABS结合的T细胞以攻击由TAA ABS结合的表达TAA的肿瘤细胞。然而,当MBM处于前蛋白形式时,TCE ABS会被掩蔽部分所掩蔽,从而使其与其靶标结合的能力大大减弱。MBM前蛋白被配置为使得在遇到蛋白酶,例如

在肿瘤环境中过表达的蛋白酶时,掩蔽部分被切割并且TCE ABS结合的抑制被逆转。这是通过包含蛋白酶可切割接头("PCL")来实现的,这些接头包含MBM前蛋白中的一个或多个蛋白酶底物序列,例如,直接或间接地位于掩蔽部分与TCE ABS之间。前蛋白可降低由于MBM与正常组织结合而产生的毒性和不良副作用。一般而言,MBM前蛋白描述于第6.3节和第B组编号的实施例1至5、15、54和69至72中。

[0011] 在某些方面,MBM前蛋白(称为I型MBM)包含TCE ABS的抗独特型,其可逆地掩蔽TCE ABS与其靶标的结合,在本文中称为"抗TCE ABS"。因此,I型MBM包含抗TCE ABS掩蔽部分。在一些实施例中,MBM前蛋白被配置为使得MBM前蛋白的活化释放包含完整Fc区的MBM(例如,双特异性结合分子)。这种类型的MBM前蛋白被称为IA型MBM前蛋白并且IA型MBM的示例性实施例描绘于图1A至图1C中并且描述于第6.3.1.1节和第B组编号的实施例6至8和18至24中。在其他实施例中,MBM前蛋白被配置为使得MBM前蛋白的活化释放缺乏Fc区的MBM,诸如串联Fab或BiTe。这种类型的MBM前蛋白被称为IB型MBM前蛋白并且IB型MBM的示例性实施例描绘于图5A至图5B中并且描述于第6.3.1.2节和第B组编号的实施例16和34至40中。

[0012] 在其他方面,MBM前蛋白(称为II型MBM),TCE ABS由于其与相邻结构域(例如,Fc结构域)接近而受到空间阻碍而不能结合其靶标,该结构域在空间上阻碍其与其靶标的结合。在一些实施例中,MBM前蛋白被配置为使得MBM前蛋白的活化释放包含完整Fc区的MBM(例如,双特异性结合分子)。这种类型的MBM前蛋白被称为IIA型MBM前蛋白并且IIA型MBM的示例性实施例描绘于图3A至图3F中并且描述于第6.3.1.1节和第B组编号的实施例9至14和25至33中。在其他实施例中,MBM前蛋白被配置为使得MBM前蛋白的活化释放缺乏Fc区的MBM,诸如串联Fab或BiTe。这种类型的MBM前蛋白被称为IIB型MBM前蛋白并且IIB型MBM的示例性实施例描绘于图7中并且描述于第6.3.1.2节和第B组编号的实施例17和41至49中。

[0013] 第6.4节,第A组编号的实施例29至31和第B组编号的实施例50至53描述了可用于本公开的抗原结合分子前蛋白(包括MBM前蛋白)中的示例性蛋白酶可切割接头。

[0014] 本公开进一步提供了包含TAA ABS和TCE ABS的串联Fab MBM。串联Fab可通过IB型或IIB型MBM的活化作为前蛋白来产生,或者其可通过串联Fab蛋白(具有相关信号序列但不具有掩蔽部分)的表达来产生。在这种情况下,TAA ABS和TCE ABS优选地共享共同的轻链序列。第6.11节和第B组编号的实施例75至83描述了示例性串联Fab MBM。

[0015] 第6.5节和第B组编号的实施例55描述了可并入本公开的抗原结合分子前蛋白(包括MBM前蛋白)和串联Fab MBM中的示例性不可切割接头。第6.6节,第A组编号的实施例23和第B组编号的实施例56至64描述了可并入本公开的抗原结合分子前蛋白(包括MBM前蛋白)和串联Fab MBM中的示例性TAA ABS。第6.7节,第A组编号的实施例22和第B组编号的实施例64至68描述了可并入本公开的抗原结合分子前蛋白(包括MBM前蛋白)和串联Fab MBM中的示例性TCE ABS。第6.8节描述了可并入本公开的抗原结合分子前蛋白(包括MBM前蛋白)中的示例性抗TCE ABS。第6.9节描述了并入本公开的抗原结合分子前蛋白(包括MBM前蛋白)中的ABS的合适形式。第6.10节和第B组编号的实施例73和74描述了可并入本公开的抗原结合分子前蛋白(包括MBM前蛋白)中的合适的Fc结构域。

[0016] 本公开进一步提供了编码本公开的抗原结合分子前蛋白(包括MBM前蛋白)和串联Fab MBM(在单个核酸或多个核酸中)的核酸,以及被工程化以表达本公开的核酸和抗原结合分子前蛋白(包括MBM前蛋白)的重组宿主细胞和细胞系。示例性核酸、宿主细胞和细胞系

描述于第6.12节,第A组编号的实施例47和48,以及第B组编号的实施例87至92中。

[0017] 还提供了包含本公开的抗原结合分子前蛋白(包括MBM前蛋白)和串联Fab MBM的药物组合物。药物组合物的实例描述于第6.13节,第A组编号的实施例44和第B组编号的实施例84中。

[0018] 本文进一步提供了使用本公开的抗原结合分子前蛋白(包括MBM前蛋白)、串联Fab MBM和药物组合物的方法,例如用于治疗增殖性疾患(例如癌症),TAA在这些增殖性疾患上表达。示例性方法和适应症描述于第6.14节,第A组编号的实施例45和46,以及第b组编号的实施例85和86中。

5.附图说明

[0019] 图1A至图1C为IA型MBM前蛋白的实施例的图示,其中TCE ABS被抗TCE ABS掩蔽。在图1A和图1B的实施例中,由接头B的切割产生的MBM是二价的,具有一个TAA ABS和一个TCE ABS。在图1C的实施例中,由接头B的切割产生的MBM是三价的,具有两个TAA ABS和一个TCE ABS。在一些实施例中,三价MBM是双特异性的。尽管图1A至图1C中的ABS被图示为Fab,ABS可呈其他形式,例如scFv或第6.9节中描述的其他形式。在此图中描绘的所有实施例中,包含Fc结构域的MBM在接头B的切割后释放。

[0020] 图2图示了根据图1A至图1C的示例性MBM前蛋白的活化机制。

[0021] 图3A至图3G为IIA型MBM前蛋白的实施例的图示,其中Fc区通过在空间上阻碍TCE ABS与其靶标的结合而充当掩蔽部分。在图3A和图3B的实施例中,由接头B的切割产生的MBM是三价的,具有两个TAA ABS和一个TCE ABS。在一些实施例中,三价MBM是双特异性的。在图3C至图3F的实施例中,由接头B的切割产生的MBM是二价的,具有一个TAA ABS和一个TCE ABS。尽管图3A至图3F的TAA ABS被图示为Fab,ABS可呈其他形式,例如scFv或第6.9节中描述的其他形式。TCE ABS可呈Fab(例如,如图3A、3C和3E中所示)或Fv(例如,如图3B、3D和3G中所示)的形式。在此图中描绘的所有实施例中,包含Fc结构域的MBM在接头B的切割后释放。

[0022] 图4图示了根据图3A至图3G的示例性MBM前蛋白的活化机制。

[0023] 图5A至图5B描绘了IB型MBM前蛋白的实施例,其中TCE ABS被抗TCE ABS掩蔽。由接头B的切割产生的MBM是二价的,具有一个TAA ABS和一个TCE ABS,并且缺少Fc结构域。尽管图5A中的ABS被图示为Fab,ABS可呈其他形式,例如scFv或第6.9节中描述的其他形式。

[0024] 图6图示了根据图5A至图5B的示例性MBM前蛋白的活化机制。

[0025] 图7为IIB型MBM前蛋白的实施例的图示,其中Fc区通过在空间上阻碍TCE ABS与其靶标结合而充当掩蔽部分。由接头B的切割产生的MBM是二价的,具有一个TAA ABS和一个TCE ABS,并且缺少Fc结构域。尽管图7中的ABS被图示为Fab,ABS可呈其他形式,例如scFv或第6.9节中描述的其他形式。

[0026] 图8图示了根据图7的示例性MBM前蛋白的活化机制。

[0027] 图9显示了一项研究的结果,该研究表明,在具有如图3A至图3F和图7中所示配置的Fc结构域的TCE ABS C-末端的构建体中,接头长度与Fc区在空间上阻碍抗CD3TCE ABS与其靶标结合的能力之间存在相关性。为了证明接头长度的效应,本研究中的接头不包含底物并且是不可切割的。图9公开了SEQ ID NO:1(1xG4S)、156(3xG4S)和153(5xG4S)。

[0028] 图10显示了凝胶图像,其展示蛋白质A纯化后在非还原性和还原性SDS-聚丙烯酰

胺凝胶上运行的抗TAAxCD3抗体。所测试的抗TAAxCD3双特异性抗体具有图7中描绘的构型，其中接头A和B为如所示的可切割接头或被不可切割的G4S(SEQ ID NO:1)接头替代。

[0029] 图11显示了一项研究的结果，该研究证明由于如图7中所示配置的IIB型MBM前蛋白构建体中的Fc空间阻碍而抑制JURKAT细胞上的CD3结合。曲线显示了相对于IgG形式的抗TAAxCD3抗体，IIB型MBM前蛋白对CD3结合的抑制。

6.具体实施方式

[0030] 6.1.定义

[0031] 如本文所用，以下术语意欲具有以下含义：

[0032] ABM前蛋白：如本文所用，术语“ABM前蛋白”(或“抗原结合分子前蛋白”)是指与由其ABS中的至少一个识别的靶标结合的能力降低或消除的ABM，例如，由于掩蔽部分的存在。掩蔽部分阻碍ABS与其靶标的结合，并且通过蛋白水解切割与ABM分离，例如通过将掩蔽部分连结至ABM的蛋白酶可切割接头的蛋白水解切割。

[0033] ABS链：单个ABS可作为一条(例如，在scFv的情况下)多肽链存在，或通过多于一条多肽链(例如，在Fab的情况下)的缔合而形成。如本文所用，术语“ABS链”是指存在于单个多肽链上的ABS的全部或一部分。使用术语“ABS链”仅意欲出于方便和描述目的，并且并不意味着特定构型或产生方法。此外，当描述ABM、ABM前蛋白、MBM或MBM前蛋白时，提及ABS涵盖ABS链，除非上下文另有说明。因此，当描述其中Fc结构域可操作地连接至ABS的ABM、ABM前蛋白、MBM或MBM前蛋白时，Fc结构域可通过肽键直接或间接地共价连接(例如通过接头)至例如(1)Fab的第一ABS链(Fab的其他组分在第二缔合的ABS链上)或(2)包含scFv的单个ABS链。

[0034] 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，“约X”或“大约X”的公开内容，其中X是数字，也是“X”的公开内容。因此，例如，其中一个序列与另一序列具有“约X％序列同一性”的实施例的公开内容也是其中该序列与另一序列具有“X％序列同一性”的实施例的公开内容。

[0035] 活化(activate/activation)：与本公开的MBM前蛋白结合使用的术语“活化”等是指蛋白酶可切割接头的蛋白酶介导的酶促切割，其导致TCE ABS的去掩蔽，从而产生ABM或MBM，并增加TCE ABS与其靶标结合的能力，例如当蛋白酶可切割接头完整时，通过将TCE ABS从抗TCE ABS或Fc结构域中释放或分离，其在空间上阻碍TCE ABS与其靶标的结合。有时，活化在本文中称为MBM、掩蔽部分或TCE ABS的“释放”。

[0036] 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)。在文本中的某些地方，术语“和/或”用于相同目的，这不应被解释为暗示“或”用于指互斥的替代方案。

[0037] 抗独特型抗体(anti-idiotypeantibody/anti-idiotypicantibody)：术语“抗独特型抗体(anti-idiotype antibody/anti-idiotypic antibody)”等是指识别抗原结合位点(例如，对TCR组分(诸如CD3)具有特异性的抗原结合位点)的独特型的抗体。抗独特型抗体能够特异性地结合至抗原结合位点的可变区，从而减少或阻止抗原结合位点与其同源抗原的特异性结合。当与包含抗原结合位点的分子缔合时，抗独特型抗体可充当该分子的掩

蔽部分。抗独特型抗体(其识别T细胞接合抗体的可变区,例如识别CD3或T细胞受体的另一组分的抗体)的抗原结合组分在本文中通常称为“TCE ABS”。

[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,IgG类型的天然存在的“抗体”是一种包含通过二硫键互连的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的四聚体。每个重链包含一个重链可变区(本文缩写为VH)和一个重链恒定区。重链恒定区包含三个结构域,CH1、CH2和CH3。每个轻链包含一个轻链可变区(本文缩写为VL)和一个轻链恒定区。轻链恒定区包含一个结构域(在本文中缩写为CL)。VH区和VL区可进一步细分为被称作互补决定区(CDR)的超变区,这些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。抗体可具有任何同种型/类别(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)或亚类(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)。轻链和重链均分为结构区和功能同源区。术语“恒定”和“可变”是在功能上使用的。在这方面,应当了解轻链(VL)和重链(VH)部分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、经胎盘移动性、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位点或氨基末端而增加。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,否则提及抗体还指抗体片段以及工程化抗体,其包括非天然存在的抗原结合位点和/或具有非天然构型的抗原结合位点,例如,在CH3结构域的C-末端具有Fab或scFv结构域的分子。

[0039] 抗原结合分子,ABM:如本文所用,术语“抗原结合分子”和“ABM”是指包含一个或多个抗原结合位点的分子(例如,多条多肽链的组装体)。本公开的ABM可以是单特异性的或多特异性的(例如,双特异性的)。单特异性结合分子中的抗原结合位点均与相同表位结合,而多特异性结合分子具有与不同表位结合的至少两个抗原结合位点,这些表位可以是相同或不同的靶分子。在一些实施例中,抗原结合分子是抗体。

[0040] 抗原结合位点:如本文所用,术语“抗原结合位点”或“ABS”是指抗体、ABM或MBM前蛋白的在不存在掩蔽的情况下具有非共价地、可逆地并且特异性地结合至抗原的能力的部分。例如,在一些实施例中,ABS可在ABM或MBM前蛋白的上下文中被掩盖,但当ABM或MBM通过ABM或MBM前蛋白中的蛋白酶可切割接头的切割而产生时,ABS能够非共价地、可逆地并且特异性地结合至抗原。抗原结合位点的实例包括抗体片段,诸如但不限于单链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,包含在铰链区通过二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段;Fd片段,其由VH结构域和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;VHH抗体(也称为“VHH”或“纳米抗体®”,Vincke等人,2012,Methods Mol Biol.911:15-26);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(例如,scFv)的工程化蛋白

质。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)。

[0041] 缔合:在ABM或MBM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MBM前蛋白。可能存在于本公开的MBM前蛋白中的缔合的实例包括(但不限于)Fc结构域中的Fc区之间的缔合(同二聚体或更优选地,如第6.10.2节中所述的异二聚体)、Fab或Fv中的VH与VL区之间的缔合以及Fab中的CH1与CL之前的缔合。

[0042] 二价:如本文所用,在抗原结合分子的上下文中使用的术语“二价”是指具有两个抗原结合位点的抗原结合分子。这些结构域可以相同或不同。因此,二价抗原结合分子可以是单特异性的或双特异性的。

[0043] 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。癌细胞可局部扩散或通过血流和淋巴系统扩散到身体的其他部位。本文描述了各种癌症的实例,并且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、自主神经节癌、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、上呼吸消化道癌、尿路癌、阴道癌、外阴癌、淋巴瘤、白血病、肺癌等,例如,前述类型中的任一种的任何TAA阳性癌症。

[0044] CD3:术语“CD3”是指T细胞受体的分化3辅助受体(或辅助受体复合物,或辅助受体复合物的多肽链)的簇。人CD3的多肽链的氨基酸序列提供于NCBI登录号P04234、P07766和P09693中。

[0045] 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,一般来说,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)。通过组合Kabat和Chothia的CDR定义,CDR由人VH中的氨基酸残基26-35(CDR-H1)、50-65(CDR-H2)和95-102(CDR-H3)以及人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,可使用程序IMGT/DomainGap Align确定抗体的CDR区。

[0046] 效应子功能:术语“效应子功能”是指抗体分子通过抗体中除抗原结合位点之外的结构域结合所介导的活性,通常由效应分子的结合所介导。效应子功能包括补体介导的效应子功能,其通过例如补体的C1组分与抗体的结合介导。补体的活化对于细胞病原体的调理和裂解很重要。补体的活化也会刺激炎症反应,也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,其可在抗体的恒定结构域与Fc受体(FcR)结合时被触发。抗体与细胞表面上Fc受体的结合会触发许多重要且多样化的生物反应,包括吞噬和破坏抗体包被的颗粒、清除免疫复合物、杀伤细胞(称为抗体依赖性细胞介导的细胞毒性或ADCC)对抗体包被的靶细胞的裂解、炎症介质的释放、胎盘转移和免疫球蛋白产生的控制。抗体的效应子功能可通过改变,例如,增强或降低抗体对效应分子诸如Fc受体或补体组分的亲和力来改变。通常通过修饰效应分子结合位点来改变结合亲和力,并且在这种情况下,适当地定位感兴趣的位点并以合适的方式修饰该位点的至少一部分。还设想,效应分子的抗体上的结合位点的改变不需要显著改变整体结合亲和力,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,还可通过修饰不直接参与效应分子结合,但以其他方式参与效应子功能的性能的位点来改变效应子功能。

[0047] 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。

[0048] 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位于重链的第一个恒定结构域(CH1)的N-末端,并且VL位于轻链的恒定结构域(CL)的N-末端。本公开的Fab可根据天然取向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,有可能用CH3结构域对替换Fab中的CH1和CL结构域对,以促进异二聚体分子中的正确修饰的Fab链配对。还有可能反转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。

[0049] 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。术语“Fc区”是指通过两个重链Fc结构域缔合而形成的基于抗体的结合分子的区域。Fc区内的两个Fc结构域可彼此相同或不同。在天然抗体中,Fc结构域通常是同一的,但可有利地修饰一个或两个Fc结构域以允许例如通过杵臼相互作用进行异二聚化。

[0050] 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。该区域由紧密、非共价缔合的一个重链和一个轻链可变结构域的二聚体(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相互作用以在VH-VL二聚体的表面上限定靶结合位点。通常,六个CDR赋予抗体靶标结合特异性。然而,在一些情况下,甚至单个可变结构域(或仅包含三个针对靶标具有特异性的CDR的Fv的一半)也可具有识别并结合靶标的能力。本文提及的VH-VL二聚体并不旨在传达任何特定的构型。举例来说而非限制,VH和VL可以本文所述的任何构型聚集在一起以形成半抗体,或者可各自存在于单独的半抗体上并且当缔合单独的半抗体时聚集在一起以形成抗原结合结构域,例如以形成本公

开的ABM或MBM前蛋白。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。

[0051] 半抗体:术语“半抗体”是指包含至少一条ABS或ABS链并且可通过例如二硫桥或分子相互作用(例如,Fc异二聚体之间的杵臼相互作用)与包含ABS或ABS链的另一分子缔合的分子。半抗体可由一条多肽链或多于一条多肽链(例如,Fab的两条多肽链)构成。在一个优选的实施例中,半抗体包含Fc区。半抗体的实例为包含抗体(例如,IgG抗体)的重链和轻链的分子。半抗体的另一实例为包含含有VL结构域和CL结构域的第一多肽和含有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ABS。半抗体的又另一实例为包含scFv结构域、CH2结构域和CH3结构域的多肽。

[0052] 半抗体可包含多于一个ABS,例如包含(以N-末端到C-末端的顺序)VH1结构域、CH1结构域、CH2结构域、CH3结构域和另一VH1结构域或scFv结构域的半抗体。半抗体还可能包含一条ABS链,当与另一半抗体中的另一条ABS链缔合时,形成完整的ABS。

[0053] 因此,ABM或MBM前蛋白可包含一种、更典型地两种或甚至多于两种半抗体,并且半抗体可包含一条或多条ABS或ABS链。

[0054] 在一些ABM或MBM前蛋白中,第一半抗体将缔合,例如,与第二半抗体异二聚化。在其他ABM或MBM前蛋白中,第一半抗体将共价连接至第二半抗体,例如通过二硫桥或化学交联。在又其他ABM或MBM前蛋白中,第一半抗体将通过共价附接和非共价相互作用(例如二硫桥和杵臼相互作用)与第二半抗体缔合。

[0055] 术语“半抗体”仅用于描述目的,并且并不意味着特定的构型或产生方法。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性目的。

[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,此类术语不仅指特定的受试者细胞,还指这种细胞的子代。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,但仍包含在如本文所用的术语“宿主细胞”的范围内。宿主细胞可瞬时(例如,在染色体外异源表达载体上)或稳定地(例如,通过将异源核酸整合到宿主细胞基因组中)携带异源核酸。出于表达本公开的ABM或MBM前蛋白的目的,宿主细胞优选是哺乳动物起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)、幼仓鼠肾细胞(BHK,例如BHK21)、中国仓鼠卵巢细胞(CHO)、NSO、PerC6、BSC-1、人肝细胞癌细胞(例如Hep G2)、SP2/0、HeLa、马达氏牛肾(MDBK)细胞、骨髓瘤和淋巴瘤细胞或其衍生物和/或工程化变体。工程化变体包括例如以比原始细胞系更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] 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。

[0058] 掩蔽部分:如本文所用,与MBM前蛋白相关的术语“掩蔽部分”是指MBM前蛋白中的氨基酸序列,其抑制TCE ABS特异性结合其靶标的能力,这种抑制是通过与TCE ABS的特定相互作用(例如,在掩蔽部分是TCE ABS的抗独特型或“抗TCE ABS”的情况下),或通过将TCE ABS相对于MBM前蛋白的另一组分定位来实现的,该MBM前蛋白的另一组分在空间上阻碍TCE ABS与其靶标的结合(例如,透过通过短接头将TCE ABS连结至Fc区)。掩蔽部分和TCE ABS排列在MBM前蛋白中,使得蛋白酶可切割接头的切割降低了对TCE ABS与其靶标相互作用的抑

制,要么通过生成缺乏掩蔽部分的MBM,要么通过生成减轻TCE ABS与其靶标相互作用的能力的空间限制的MBM。当与抗原结合分子相关使用时,术语“掩蔽部分”更一般地指抗原结合分子前蛋白中的氨基酸序列,其抑制抗原结合分子中的抗原结合位点(ABS)特异性地结合其靶标的能力,这种抑制是通过与ABS的特定相互作用(例如,在掩蔽部分是ABS的抗独特型的情况下),或通过将ABS相对于抗原结合分子的另一组分定位来实现的,该抗原结合分子的另一组分在空间上阻碍ABS与其靶标的结合(例如,透过通过短接头将ABS连结至Fc区)。一般而言,掩蔽部分和ABS排列在抗原结合分子中,使得蛋白酶可切割接头的切割降低了对ABS与其靶标相互作用的抑制,要么通过生成缺乏掩蔽部分的抗原结合分子,要么通过生成减轻ABS与其靶标相互作用的能力的空间限制的抗原结合分子。

[0059] MBM前蛋白:如本文所用,术语“MBM前蛋白”是指与由至少一个其ABS识别的靶标结合的能力降低或消除的MBM,例如,由于掩蔽部分的存在。掩蔽部分阻碍ABS与其靶标的结合,通过蛋白水解切割,例如通过将掩蔽部分连结至MBM的蛋白酶可切割接头的蛋白水解切割,将其与MBM分离。通常,在本公开的MBM前蛋白中,TCE ABS被掩蔽,而TAA ABS则未被掩蔽。TAA ABS可充当靶向部分,将MBM前蛋白引导至肿瘤位点,其中在识别蛋白酶可切割接头中的底物的情况下,导致接头切割,恢复TCE ABS与其靶标的结合以及MBM活化T细胞针对表达TAA的肿瘤细胞的能力。

[0060] 单价:如本文所用,在抗原结合分子的上下文中使用的术语“单价”是指具有单个抗原结合位点的抗原结合分子。

[0061] 多特异性结合分子,MBM:术语“多特异性结合分子”和“MBM”是指包含两个或更多个抗原结合位点的分子。通常,MBM包含TAA ABS和TCE ABS。

[0062] 不可切割接头:不可切割接头是指其氨基酸序列缺乏蛋白酶(例如,一种如第6.4.1节中所述的蛋白酶,其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)的底物序列的肽。

[0063] 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”意指连接两个或更多个氨基酸区段以便产生功能性多肽。例如,在本公开的ABM或MBM前蛋白的上下文中,单独的ABS(或ABS的链)可通过肽接头序列可操作地连接。在编码融合蛋白的核酸(诸如本公开的ABM或MBM的多肽链)的上下文中,“可操作地连接”意指接合两个核酸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所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可操作地连接至编码序列。

[0064] 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。

[0065] 前蛋白:“前蛋白”是一种无活性的蛋白质前体并且其可通过蛋白酶的蛋白水解作用来活化。因此,前蛋白是“蛋白酶可活化的”。

[0066] 蛋白酶:如本文所用,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。

[0067] 蛋白酶可切割接头:如本文所用,术语“蛋白酶可切割接头”或“PCL”是指其氨基酸序列含有一种或多种蛋白酶的一个或多个(例如,两个或三个)底物序列的肽。

[0068] 识别:如本文所用,术语“识别”是指发现其表位并与其相互作用(例如结合)的ABS。

[0069] 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ABS。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。接头合适地是至少30个氨基酸、优选地32至50个氨基酸的不可切割接头。单链Fab片段通常通过CL结构域与CH1结构域之间的天然二硫键来稳定。另外,这些单链Fab分子可通过插入半胱氨酸残基(例如,在VH结构域的位置44和VL结构域的位置100处,根据Kabat编号)生成链间二硫键来进一步稳定。

[0070] 单链Fv或scFv:如本文所用,术语“单链Fv”或“scFv”是指包含抗体的VH和VL结构域的ABS,其中这些结构域存在于单条多肽链中。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以N-末端到C-末端的顺序VH-VL或VL-VH排列,通常由接头,例如表E中列出的接头间隔开。

[0071] 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ABS)分开。在一些方面,间隔子中的残基将氨肽酶和/或外肽酶作用降至最小以防止N-末端氨基酸的切割。

[0072] 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”并不排除跨物种反应性。例如,“特异性结合”至来自一个物种的抗原的抗原结合位点(例如,抗体的抗原结合片段)也可“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位点作为“特异性”结合物的分类。在某些实施例中,特异性结合至人抗原的本公开的抗原结合位点(例如,“TAA ABS”)与一种或多种非人哺乳动物物种(例如灵长类动物物种(包括但不限于食蟹猴、猕猴和豚尾猴中的一种或多种)或啮齿动物物种,例如小家鼠)具有跨物种反应性。

[0073] 受试者:术语“受试者”包括人和非人动物。非人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。

[0074] 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。

[0075] TAA ABS:术语“TAA ABS”是指识别或特异性结合至细胞外基质(“ECM”)蛋白、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”)、检查点抑制剂或TAA的ABS。技术人员将认识到,前述类别的靶分子不是相互排斥的,并且因此给定的靶分子可落入多于一种前述类别的靶分子中。例如,一些分子可被视为TAA和ECM蛋白,而其他分子可被视为TCA和检查点抑制剂。

[0076] 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者在T淋巴细胞上表达的检查点抑制剂。

[0077] TCE ABS:术语“TCE ABS”是指以可通过TCR复合物启动信号传导的方式识别或特异性结合至T细胞抗原的ABS。由TCE ABS识别或特异性结合的示例性T细胞抗原是CD3和TCR复合物的其他组分。

[0078] T细胞受体,TCR:“T细胞受体”或“TCR”是T细胞的组分,其负责与T细胞适应性免疫的靶标相互作用并对其进行感知。一般来说,TCR包含存在于细胞表面上的异二聚体蛋白质复合物。根据T细胞在其表面表达的体细胞重排TCR形式,T细胞可大致分为αβ或γδ。存在两种TCR链对形式;TCRα和TCRβ与TCRγ和TCRδ配对。成熟的αβ和γδTCR链对与许多附加CD3亚基(表示为ε、γ、δ和ζ)一起呈现于细胞表面。这些亚基与αβ或γδTCR缔合为三个二聚体(εγ、εδ、ζζ)。这种TCR复合物形成了TCRαβ或TCRγδ与同源抗原接合后启动细胞信号传导反应的单元。术语“T细胞受体复合物”和“TCR复合物”是指TCRαβ或TCRγδ与CD3的复合物。

[0079] 三价:如本文所用,在抗原结合分子的上下文中使用的术语“三价”是指具有三个抗原结合位点的抗原结合分子。抗原结合位点可全部相同、全部不同或包括两个相同的抗原结合位点和第三个不同的抗原结合位点。

[0080] 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。

[0081] 肿瘤相关抗原: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(通常是蛋白质、碳水化合物、脂质或其某种组合),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表达的标记,例如谱系标记。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)排他性地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”涵盖对癌细胞具有特异性的抗原,有时在本领域中称为肿瘤特异性抗原(“TSA”)。

[0082] TAA ABS:如本文所用,术语“TAA ABS”是指识别或特异性结合TAA的抗原结合位点。

[0083] 治疗(treat/treatment/treating):如本文所用,术语“治疗(treat/treatment/treating)”是指减少或改善增殖性病症的进展、严重程度和/或持续时间,或由施用本公开的一种或多种ABM或MBM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。在具体实施例中,术语“治疗(treat/treatment/treating)”是指增殖性病症的至少一种可测量的物理参数(诸如肿瘤的生长,患者未必可辨别)的改善。在其他实施例中,术语“治疗(treat/treatment/treating)”是指抑制增殖性病症的进展,无论是物理上,例如通过稳定可辨别的症状,还是生理上,例如通过稳定身体参数,或者两者兼而有之。在其他实施例中,术语“治疗(treat/treatment/treating)”是指肿瘤大小或癌细

胞计数的减少或稳定。

[0084] 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ABS的上下文中,术语“通用轻链”或“ULC”是指能够与ABS的重链区配对并且还能够与其他重链区配对的轻链多肽。ULC还可包含恒定结构域,例如,抗体的CL结构域。通用轻链也称为“共同轻链”。

[0085] 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。

[0086] 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。

[0087] 6.2.抗原结合分子前蛋白

[0088] 本公开涉及包含ABS、掩蔽部分和蛋白酶可切割接头(PCL)的抗原结合分子前蛋白,其被布置成使得掩蔽部分减少或阻断ABS与其靶标的结合,并且被配置为使得当遇到蛋白酶,例如在肿瘤环境中过表达的蛋白酶时,掩蔽部分被切割并且产生具有增强的靶标结合的结合分子。通常,抗原结合分子前蛋白的掩蔽部分通过空间阻碍(例如,Fc结构域掩蔽部分)和/或通过靶向部分与ABS的结合(例如,抗ABS结合部分)来掩蔽ABS。

[0089] 因此,本公开的抗原结合分子前蛋白通常包含:(a)掩蔽部分,和(b)通过PCL连结至掩蔽部分的ABS或其组分,其中ABS受到阻碍(例如,在空间上阻碍)而不能结合其靶标。示例性掩蔽部分包括Fc结构域和抗ABS结合部分。使用Fc结构域作为掩蔽部分提供了ABS的空间阻碍,该空间阻碍在PCL的蛋白酶切割(例如,通过肿瘤特异性蛋白酶)后释放。Fc结构域掩蔽的抗原结合分子前蛋白的特定实例包括IIA型和IIB型MBM前蛋白(例如,如第6.3.2节中所述)。使用抗ABS结合部分作为掩蔽部分阻断ABS与其靶标的结合,这种阻断在PCL的蛋白酶切割(例如,通过肿瘤特异性蛋白酶)后释放。抗ABS结合部分掩蔽的抗原结合分子前蛋白的特定实例包括IA型和IB型MBM前蛋白(例如,如第6.3.1.1节中所述)。抗原结合分子前蛋白可包含多个掩蔽部分,例如Fc结构域以及抗ABS结合部分,其中掩蔽部分中的一个或多个在PCL的蛋白酶切割后释放。

[0090] PCL包含由一种或多种蛋白酶(例如,第6.4.1节中所述的蛋白酶中的一种或多种)识别并切割的一种或多种底物。示例性底物序列在第6.4.2节中描述。PCL可进一步包括间隔子序列,例如,如第6.4.3节中所述。包含底物和间隔子序列的完整蛋白酶可切割接头的实例在第6.4.4节中提供。

[0091] 不受理论的束缚,据信连结ABS和掩蔽部分(特别是在空间上阻碍ABS与其靶标诸如Fc结构域结合的掩蔽部分)的PCL具有较小长度(例如,30或更少)在PCL的蛋白酶切割之前提供ABS结合的最大阻碍,从而将ABS的脱靶效应降至最小。因此,在某些方面,PCL的长度为30个或更少、29个或更少、28个或更少、27个或更少、26个或更少、25个或更少、24个或更少、23个或更少、22个或更少、21个或更少、20个或更少、19个或更少、18个或更少、17个或更少、16个或更少、15个或更少、14个或更少、13个或更少、12个或更少、11个或更少、10个或更少、9个或更少或者8个或更少的氨基酸。

[0092] 抗原结合分子前蛋白通常包含至少两条多肽链,其中第一条多肽链包含掩蔽部分、PCL和ABS的第一组分(例如,VH),并且第二条多肽链包含ABS的与第一组分配对以形成ABS的第二组分(例如,VL)。在掩蔽部分是Fc结构域的情况下,第二多肽可进一步包含与第一Fc结构域配对以形成Fc区(例如,Fc异二聚体)的额外Fc结构域。ABS可以是例如TAA ABS

(例如,如第6.6节中所述)或TCE ABS(例如,如第6.7节中所述)。

[0093] 在一些方面,抗原结合分子前蛋白进一步包含未被掩蔽部分掩蔽的额外ABS。在这种情况下,第一ABS可以是TCE ABS,而额外ABS是TAA ABS;替代地,第一ABS可以是TAA ABS,而额外ABS是TCE ABS。包含两个或更多个ABS的抗原结合分子前蛋白可在PCL的蛋白酶切割后释放多特异性结合分子(例如,双特异性或三特异性结合分子)。具有多个ABS的抗原结合分子前蛋白的某些实例在下文第6.3节中描述。

[0094] 6.3.MBM前蛋白

[0095] 在一些实施例中,本公开涉及MBM前蛋白,其包含TCE ABS、TAA ABS、掩蔽部分和蛋白酶可切割接头,它们被布置成使得掩蔽部分减少或阻断TCE ABS与其靶标的结合。MBM前蛋白被配置为使得在遇到蛋白酶,例如在肿瘤环境中过表达的蛋白酶时,掩蔽部分被切割并且产生其中TCE ABS结合的抑制被逆转的MBM。通常,本公开的MBM前蛋白进一步包含两个缔合形成Fc区的Fc结构域,并且TCE ABS位于Fc区的C-末端。

[0096] 因此,本公开的MBM前蛋白通常包含:(a)能够缔合形成Fc区的第一Fc结构域和第二Fc结构域;(b)第一Fc结构域和/或第二Fc结构域的C-末端的TCE ABS;(c)TAA ABS;以及(d)第一Fc结构域和/或第二Fc结构域的C-末端的蛋白酶可切割接头(PCL)。通常,无论蛋白酶可切割接头是否处于未切割状态,MBM前蛋白中的TAA ABS都能够与其靶标结合,而在蛋白酶可切割接头被蛋白酶切割后,TCE ABS与其靶标的结合显著增强。蛋白酶可切割接头切割后,例如,在肿瘤环境中,释放包含TAA ABS和TCE ABS的MBM。

[0097] 在I型MBM前蛋白中,TCE ABS被抗独特型抗体掩盖。在II型MBM前蛋白中,Fc区通过在空间上阻碍TCE ABS与其靶标结合来充当掩蔽部分。

[0098] IA型、IIA型、IB型和II型MBM前蛋白中的蛋白酶可切割接头包含被一种或多种蛋白酶识别并切割的一种或多种底物,例如,第6.4.1节中描述的蛋白酶中的一种或多种。示例性底物序列在第6.4.2节中描述。蛋白酶可切割接头通常进一步包括间隔子序列,例如,如第6.4.3节中所述。包含底物和间隔子序列的完整蛋白酶可切割接头的实例在第6.4.4节中提供。根据MBM前蛋白的构型,Fc区可在蛋白酶可切割接头切割之后(例如,在IA型和IIA型MBM前蛋白中的蛋白酶可切割接头切割之后)保留在所得MBM中,或者可在蛋白酶可切割接头切割之后(例如,在IB型和IIB型MBM前蛋白中的蛋白酶可切割接头切割之后)从所得MBM中释放。

[0099] 一般而言,本公开的MBM前蛋白含有多个接头。优选地,除了其切割释放MBM的蛋白酶可切割接头之外,其余接头是不可切割的。不可切割接头的实例在第6.5节中列出。

[0100] 可用于本公开的MBM前蛋白(例如,本公开的IA型、IIA型、IB型和II型MBM前蛋白)中的示例性TAA ABS在第6.6节中公开。可用于本公开的MBM前蛋白(例如,本公开的IA型、IIA型、IB型和II型MBM前蛋白)中的示例性TCE ABS在第6.7节中公开。可用于本公开的I型MBM前蛋白中的示例性抗TCE ABS在第6.8节中公开。第6.9节描述了并入本公开的MBM前蛋白中的ABS的合适形式。第6.10节描述了可并入本公开的MBM前蛋白中的合适的Fc结构域(并且其可用作本公开的II型MBM前蛋白中的掩蔽部分)。

[0101] 6.3.1.I型MBM前蛋白(具有抗独特型掩蔽部分)

[0102] 本公开提供了包含被抗TCE ABS掩蔽的TCE ABS的MBM前蛋白,在本文中称为“I型”MBM前蛋白。通常,TCE ABS和抗TCE ABS均布置在Fc区的C-末端,其中每个可操作地连接至

单独的Fc结构域。TCE ABS或抗TCE ABS可通过蛋白酶可切割接头(例如,如第6.4节中所述)与Fc区的一个Fc结构域分离。在IA型MBM前蛋白中,Fc区保留在通过蛋白酶可切割接头的切割而活化的MBM中。在IB型MBM前蛋白中,Fc区与通过蛋白酶可切割接头的切割而活化的MBM分离。

[0103] 6.3.1.1.IA型MBM前蛋白

[0104] 一般而言,IA型MBM前蛋白包含第一条多肽链,其在N-末端到C-末端取向上包含Fc结构域(在其N-末端具有任选的铰链结构域)、不可切割接头和TCE ABS(或TCE ABS链),以及第二条多肽链,其在N-末端到C-末端取向上包含Fc结构域(在其N-末端具有任选的铰链结构域)、蛋白酶可切割接头和抗TCE ABS(或抗TCE ABS链)。一个或两个Fc结构域优选在其N-末端进一步包含TAA ABS(或TAA ABS链)。当TCE ABS、TAA ABS和/或抗TCE ABS由多条多肽链构成时,MBM前蛋白将进一步包含其他链,例如Fab的轻链。

[0105] 蛋白酶可切割接头切割后,释放抗TCE ABS,产生包含第一条多肽链和第二条多肽链的MBM,该第一条多肽链在N-末端到C-末端取向上包含Fc结构域(在其N-末端具有任选的铰链结构域)、不可切割接头和TCE ABS,并且该第二条多肽链在N-末端到C-末端取向上包含Fc结构域(在其N-末端具有任选的铰链结构域)和蛋白酶可切割接头的一部分。一个或两个Fc结构域优选地在其N-末端进一步包含TAA ABS。当TCE ABS和/或TAA ABS由多条多肽链构成时,所得MBM将进一步包含其他链,例如Fab的轻链。

[0106] 优选地,所得MBM对于TAA和TCE ABS的靶标(例如,CD3)具有双特异性。

[0107] 图1A至图1C图示了IA型MBM前蛋白的示例性实施例。如图1A和图1B中所示,IA型MBM前蛋白可仅包含单个TAA ABS。替代地,如图1C中所示,IA型MBM前蛋白可包含两个TAA ABS。尽管出于说明的目的被描绘为Fab,但图1A至图1C的抗TCE ABS可以是来自抗独特型抗体的scFv、VHH、VH或其他片段或区域。图1A至图1C的蛋白酶可切割接头中的单个底物和两个间隔子的描述仅出于说明目的;如第6.4节中所述,蛋白酶可切割接头可包含多个底物和多于两个间隔子序列。

[0108] 6.3.1.2.IB型MBM前蛋白

[0109] 一般而言,IB型MBM前蛋白包含第一条多肽链,其在N-末端到C-末端取向上包含Fc结构域(在其N-末端具有任选的铰链结构域)、不可切割接头和抗TCE ABS(或抗TCE ABS链),以及第二条多肽链,其在N-末端到C-末端取向上包含Fc结构域(在其N-末端具有任选的铰链结构域)、蛋白酶可切割接头、TCE ABS(或TCE ABS链)和TAA ABS(或TAA ABS链),通常TCE ABS和TAA ABS由不可切割接头间隔开。当TCE ABS、TAA ABS和/或抗TCE ABS由多条多肽链构成时,MBM前蛋白将进一步包含其他链,例如Fab的轻链。

[0110] 蛋白酶可切割接头切割后,释放出包含TCE ABS、任选接头和TAA ABS的MBM。当TCE ABS和/或TAA ABS由多条多肽链构成时,所得MBM将进一步包含其他链,例如Fab的轻链。

[0111] 优选地,所得MBM对于TAA和TCE ABS的靶标(例如,CD3)具有双特异性。

[0112] 图5A至图5B图示了IB型MBM前蛋白的示例性实施例。尽管出于说明的目的被描绘为Fab,但图5A的抗TCE ABS可以是来自抗独特型抗体的scFv、VHH、VH或其他片段或区域。图5A至图5B的蛋白酶可切割接头中的单个底物和两个间隔子的描述仅出于说明目的;如第6.4节中所述,蛋白酶可切割接头可包含多个底物和多于两个间隔子序列。

[0113] 6.3.2.II型MBM前蛋白(具有空间阻碍的掩蔽部分)

[0114] 6.3.2.1.IIA型MBM前蛋白

[0115] 一般而言,IIA型MBM前蛋白包含第一条多肽链,其在N-末端到C-末端取向上包含Fc结构域(在其N-末端具有任选的铰链结构域)、不可切割接头和第一TCE ABS链,以及第二条多肽链,其在N-末端到C-末端取向上包含Fc结构域(在其N-末端具有任选的铰链结构域)、蛋白酶可切割接头和第二TCE ABS链。TCE ABS链可包括VH和VL,而不具有对应的CH1和CL结构域结构域,使得通过TCE ABS链的缔合而形成Fv形式的TCE ABS。TCE ABS链可包括VH和VL,具有对应的CH1和CL结构域结构域,使得通过TCE ABS链的缔合而形成Fab形式的TCE ABS。在一些实施例中,附接至Fc结构域的TCE ABS链的VH和/或VL包含在其N-末端处或附近的一个或多个氨基酸的缺失,例如,N-末端截短。VH或VL可精确地在N-末端具有这样的缺失(即,可以是截短),或者在一些情况下在N-末端的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸内具有这样的缺失。在一些实施例中,本公开的IIA型MBM前蛋白的TCE ABS的VH包含在参考VH(例如,野生型VH或TCE ABS所基于的VH,诸如表G中的抗体或抗体序列的VH)的N-末端处或附近(例如,在10个氨基酸内)的缺失(例如,截短)或1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸。在一些实施例中,本公开的IIA型MBM前蛋白的TCE ABS的VL包含在参考VL(例如,野生型VL或TCE ABS所基于的VL,诸如表G中的抗体或抗体序列的VL)的N-末端处或附近(例如,在10个氨基酸内)的缺失(例如,截短)或1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸。

[0116] 选择隔开Fc结构域和TCE ABS链的接头长度,以优化Fc结构域在空间上阻碍TCE ABS结合其靶标的能力。优选地,不可切割接头的长度通常在5至30个氨基酸之间的范围内,并且在各种实施例中为25个氨基酸或更少(例如,范围在5至25个氨基酸之间)、20个氨基酸或更少(例如,范围在5至20个氨基酸之间)、15个氨基酸或更少(例如,范围在5至15个氨基酸之间)或者10个氨基酸或更少(例如,范围在5至10个氨基酸之间)。在特定实施例中,不可切割接头的长度为5、6、7、8、9或10个氨基酸。

[0117] 一个或两个Fc结构域优选在其N-末端进一步包含TAA ABS(或TAA ABS链)。当TAA ABS由多条多肽链构成时,MBM前蛋白将进一步包含另一条链,例如Fab的轻链。

[0118] 在一些实施例中,相对于野生型Fc结构域,两个Fc结构域之一在C-末端处或附近可包含一个或多个氨基酸的缺失(例如,C-末端截短)。在一些实施例中,相对于野生型Fc结构域,本公开的IIA型MBM前蛋白的一个或两个Fc结构域在C-末端处或附近包含1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸的缺失(例如,截短)。Fc结构域可精确地在C-末端具有这样的缺失(即,可以是截短),或者在一些情况下在C-末端的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸内具有这样的缺失。

[0119] 在特定实施例中,相对于野生型Fc结构域,本公开的IIA型MBM前蛋白包含(1)在C-末端处或附近具有1、2、3、4、5或6个氨基酸的缺失(例如,截短)的Fc结构域;以及(2)具有在N-末端处或附近具有1、2、3、4、5或6个氨基酸的缺失(例如,截短)的VH和VL结构域的TCE ABS链。例如,IIA型MBM前蛋白可包含(1)两个Fc结构域,每个在C-末端处或附近具有4、5或6个氨基酸的缺失;以及(2)包含VH和VL的TCE ABS,每个VH和VL在N-末端处或附近具有1、2或3个氨基酸的缺失。

[0120] 蛋白酶可切割接头切割后,限制TCE ABS与其靶标结合的能力的空间阻碍被释放。

[0121] 优选地,所得MBM对于TAA和TCE ABS的靶标(例如,CD3)具有双特异性。

[0122] 图3A至图3F图示了IIA型MBM前蛋白的示例性实施例。如图3A和图3B中所示,IIA型

MBM前蛋白可仅包含单个TAA ABS。替代地,如图3C至图3F中所示,IIA型MBM前蛋白可包含两个TAA ABS。图3A至图3G的蛋白酶可切割接头中的单个底物和两个间隔子的描述仅出于说明目的;如第6.4节中所述,蛋白酶可切割接头可包含多个底物和多于两个间隔子序列。

[0123] 6.3.2.2.IIB型MBM前蛋白

[0124] 一般而言,IIB型MBM前蛋白包含第一条多肽链,其在N-末端到C-末端取向上包含Fc结构域(在其N-末端具有任选的铰链结构域)、第一蛋白酶可切割接头、抗TCE ABS链、任选的不可切割接头和TAA ABS(或TAA ABS链),以及第二条多肽链,其在N-末端到C-末端取向上包含Fc结构域(在其N-末端具有任选的铰链结构域)、蛋白酶可切割接头和TCE ABS链。当TAA ABS由多条多肽链构成时,MBM前蛋白将进一步包含其他链,例如Fab的轻链。TCE ABS链可包括VH和VL,具有对应的CH1和CL结构域结构域,使得通过TCE ABS链的缔合而形成Fab形式的TCE ABS。在一些实施例中,附接至Fc结构域的TCE ABS链的VH和/或VL包含在其N-末端处或附近的一个或多个氨基酸的缺失,例如,N-末端截短。VH或VL可精确地在N-末端具有这样的缺失(即,可以是截短),或者在一些情况下在N-末端的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸内具有这样的缺失。在一些实施例中,本公开的IIB型MBM前蛋白的TCE ABS的VH包含在参考VH(例如,野生型VH或TCE ABS所基于的VH,诸如表G中的抗体或抗体序列的VH)的N-末端处或附近(例如,在10个氨基酸内)的缺失(例如,截短)或1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸。在一些实施例中,本公开的IIB型MBM前蛋白的TCE ABS的VL包含在参考VL(例如,野生型VL或TCE ABS所基于的VL,诸如表G中的抗体或抗体序列的VL)的N-末端处或附近(例如,在10个氨基酸内)的缺失(例如,截短)或1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸。

[0125] 选择隔开Fc结构域和TCE ABS链的接头长度,以优化Fc结构域在空间上阻碍TCE ABS结合其靶标的能力。优选地,接头的长度通常在5至30个氨基酸之间的范围内,并且在各种实施例中为25个氨基酸或更少(例如,范围在5至25个氨基酸之间)、20个氨基酸或更少(例如,范围在5至20个氨基酸之间)、15个氨基酸或更少(例如,范围在5至15个氨基酸之间)或者10个氨基酸或更少(例如,范围在5至10个氨基酸之间)。

[0126] 在一些实施例中,相对于野生型Fc结构域,两个Fc结构域之一在C-末端处或附近可包含一个或多个氨基酸的缺失(例如,C-末端截短)。在一些实施例中,相对于野生型Fc结构域,本公开的IIB型MBM前蛋白的一个或两个Fc结构域在C-末端处或附近包含1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸的缺失(例如,截短)。Fc结构域可精确地在C-末端具有这样的缺失(即,可以是截短),或者在一些情况下在C-末端的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸内具有这样的缺失。

[0127] 在特定实施例中,相对于野生型Fc结构域,本公开的IIB型MBM前蛋白包含(1)在C-末端处或附近具有1、2、3、4、5或6个氨基酸的缺失(例如,截短)的Fc结构域;以及(2)具有在N-末端处或附近具有1、2、3、4、5或6个氨基酸的缺失(例如,截短)的VH和VL结构域的TCE ABS链。例如,IIB型MBM前蛋白可包含(1)两个Fc结构域,每个在C-末端处或附近具有4、5或6个氨基酸的缺失;以及(2)包含VH和VL的TCE ABS,每个VH和VL在N-末端处或附近具有1、2或3个氨基酸的缺失。

[0128] 蛋白酶可切割接头切割后,释放出包含TCE ABS、任选接头和TAA ABS的MBM。当TAA ABS由多条多肽链构成时,所得MBM将进一步包含另一TAA ABS链,例如Fab的轻链。

[0129] 优选地,所得MBM对于TAA和TCE ABS的靶标(例如,CD3)具有双特异性。

[0130] 图7图示了IIB型MBM前蛋白的示例性实施例。图7的蛋白酶可切割接头中的单个底物和两个间隔子的描述仅出于说明目的;如第6.4节中所述,蛋白酶可切割接头可包含多个底物和多于两个间隔子序列。

[0131] 6.4.蛋白酶可切割接头

[0132] 本公开的MBM前蛋白通常包含至少通过接头与蛋白酶的一种或多种底物彼此连结的组分,并且其切割导致MBM的活化。

[0133] 蛋白酶可切割接头的范围可以是20个氨基酸至80个或更多个氨基酸,并且在某些方面,不可切割肽接头的长度范围是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。

[0134] 蛋白酶可切割接头包含一种或多种蛋白酶(例如第6.4.1节中列出的蛋白酶中的一种或多种)的一个或多个底物序列。一个或多个底物序列(例如,第6.4.2节中列出的底物序列中的一个或多个)通常由一个或多个间隔子序列(例如,如第6.4.3节中所述的间隔子序列)侧接。每个蛋白酶可切割接头可包括一个、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间隔开。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。

[0135] 示例性蛋白酶可切割接头序列在第6.4.4节中列出

[0136] 6.4.1.蛋白酶

[0137] 底物序列可并入蛋白酶可切割接头中的示例性蛋白酶列于下表A中。

[0138]

表 A
用于底物切割的示例性蛋白酶

ADAMS、ADAMTS，*例如*	胱天蛋白酶，*例如*	MMP24
ADAM8	胱天蛋白酶 1	MMP26
ADAM9	胱天蛋白酶 2	MMP27
ADAM10	胱天蛋白酶 3	
ADAM12	胱天蛋白酶 4	
ADAM15	胱天蛋白酶 5	
ADAM17/TACE	胱天蛋白酶 6	
ADAMDEC1	胱天蛋白酶 7	
ADAMTS1	胱天蛋白酶 8	半胱氨酸蛋白酶，*例如*
ADAMTS4	胱天蛋白酶 9	克鲁兹蛋白酶(Cruzipain)
ADAMTS5	胱天蛋白酶 10	豆荚蛋白(Legumain)
	胱天蛋白酶 14	卵巢肿瘤去泛素化酶-2(Otubain-2)
天冬氨酸蛋白酶，*例如*		

[0139]

表 A 用于底物切割的示例性蛋白酶		
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
纤维蛋白溶解酶	MMP，*例如*	KLK14
PSA	MMP1	
tPA	MMP2	金属蛋白酶，*例如*
凝血酶	MMP3	穿膜肽酶(Meprin)
类胰蛋白酶		脑啡肽酶(Neprilysin)
uPA	MMP7	PSMA
	MMP8	BMP-1
II 型跨膜	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
蛋白裂解酶-2	MMP15	糜蛋白酶(Chymase)
MT/SP1/蛋白裂解酶	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	

[0140] 在特定实施例中，蛋白酶是基质金属蛋白酶(MMP)-2、MMP-9、legumain天冬酰胺酰内肽酶、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1型基质金属蛋白酶(MT1-MMP)、纤维蛋白溶解酶、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、胱天蛋白酶1、胱天蛋白酶2、胱天蛋白酶3、胱天蛋白酶4、胱天蛋白酶5、胱天蛋白酶6、胱天蛋白酶7、胱天蛋白酶8、胱天蛋白酶9、胱天蛋白酶10、胱天蛋白酶11、胱天蛋白酶12、胱天蛋白酶13、胱天蛋白酶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子(uPA)、去整合蛋白和金属蛋白酶(ADAM)10、ADAM12、ADAM17、含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、胍基苯甲酸酯酶(guanidinobenzoatase)、肝素、蛋白裂解酶、蛋白裂解酶2、穿膜肽酶、脑啡肽酶、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、肿瘤坏死因子转化酶(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)、组织纤溶酶原活化子(tPA)、钙蛋白酶(calpain)、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-分泌酶组分、抗纤溶酶切割酶(APCE)、decysin 1、凋亡相关半胱氨酸肽酶或N-乙酰化α连接的酸性二肽酶样1。

[0141] 6.4.2.基材

[0142] 可被肿瘤蛋白酶切割并且可并入蛋白酶可切割接头中的示例性底物序列在下表B中列出。

[0143]

表 B
蛋白酶可切割接头的底物序列

底物序列	名称	切割蛋白酶
$(DE)_8$RPLALWRS$(DR)_8$ (SEQ ID NO: 2)	SU1	MMP7
AARGPAIH (SEQ ID NO: 3)	SU2	
AAYHLVSQ (SEQ ID NO: 4)	SU3	胶原酶
AGLGISST (SEQ ID NO: 5)	SU4	胶原酶
AGLGVVER (SEQ ID NO: 6)	SU5	胶原酶
ALAL (SEQ ID NO: 7)	SU6	溶酶体酶
ALFFSSPP (SEQ ID NO: 8)	SU7	
ALFKSSFP (SEQ ID NO: 9)	SU8	
ALLLALL (SEQ ID NO: 10)	SU9	TOP
AQFVLTEG (SEQ ID NO: 11)	SU10	胶原酶
AQNLLGMV (SEQ ID NO: 12)	SU11	
AVGLLAPP (SEQ ID NO: 13)	SU12	丝氨酸蛋白酶
DAFK (SEQ ID NO: 14)	SU13	尿激酶纤溶酶原活化子(uPA)
DEVD (SEQ ID NO: 15)	SU14	胱天蛋白酶-3
DEVDP (SEQ ID NO: 16)	SU15	胱天蛋白酶-3
DPRSFL (SEQ ID NO: 17)	SU16	凝血酶
DVAQFVLT (SEQ ID NO: 18)	SU17	胶原酶
DVLK (SEQ ID NO: 19)	SU18	纤维蛋白溶解酶
DWLYWPGI (SEQ ID NO: 20)	SU19	
EDDDDKA (SEQ ID NO: 21)	SU20	肠激酶
EP(Cit)G(Hof)YL (SEQ ID NO: 22)	SU21	MMP2、MMP9、MMP14

[0144]

表 B 蛋白酶可切割接头的底物序列		
底物序列	**名称**	**切割蛋白酶**
EPQALAMS (SEQ ID NO: 23)	SU22	胶原酶
ESLPVVAV (SEQ ID NO: 24)	SU23	胶原酶
ESPAYYTA (SEQ ID NO: 25)	SU24	MMP
F(Pip)RS	SU25	凝血酶
FK	SU26	溶酶体酶
FPRPLGITGL (SEQ ID NO: 27)	SU27	
FRLLDWQW (SEQ ID NO: 28)	SU28	
GFLG (SEQ ID NO: 29)	SU29	溶酶体酶
GGAANLVRGG (SEQ ID NO: 30)	SU30	MMP11
GGGRR (SEQ ID NO: 31)	SU31	尿激酶纤溶酶原活化子 (uPA)
GGPRGLPG (SEQ ID NO: 32)	SU32	组织蛋白酶 K
GGQPSGMWGW (SEQ ID NO: 33)	SU33	
GGSIDGR (SEQ ID NO: 34)	SU34	因子 Xa
GGWHTGRN (SEQ ID NO: 35)	SU35	
GIAGQ (SEQ ID NO: 36)	SU36	胶原酶
GKAFRR (SEQ ID NO: 37)	SU37	激肽释放酶 2
GPAGLYAQ (SEQ ID NO: 38)	SU38	
GPAGMKGL (SEQ ID NO: 39)	SU39	
GPEGLRVG (SEQ ID NO: 40)	SU40	胶原酶
GPLGIAGI (SEQ ID NO: 41)	SU41	胶原酶
GPLGVRG (SEQ ID NO: 42)	SU42	
GPQGIAGQ (SEQ ID NO: 43)	SU43	胶原酶
GPQGLLGA (SEQ ID NO: 44)	SU44	胶原酶
GPRSFG (SEQ ID NO: 45)	SU45	
GPRSFGL (SEQ ID NO: 46)	SU46	
GPSHLVLT (SEQ ID NO: 47)	SU47	
GVSQNYPIVG (SEQ ID NO: 48)	SU48	HIV 蛋白酶
GVVQASCRLA (SEQ ID NO: 49)	SU49	CMV 蛋白酶
GWEHDG (SEQ ID NO: 50)	SU50	白细胞介素 1β 转化酶
HSSKLQ (SEQ ID NO: 51)	SU51	前列腺特异性抗原
HSSKLQEDA (SEQ ID NO: 52)	SU52	前列腺特异性抗原
HSSKLQL (SEQ ID NO: 53)	SU53	前列腺特异性抗原
HTGRSGAL (SEQ ID NO: 54)	SU54	
IDGR (SEQ ID NO: 55)	SU55	因子 Xa
IEGR (SEQ ID NO: 56)	SU56	因子 Xa
ILPRSPAF (SEQ ID NO: 57)	SU57	
IPVSLRSG (SEQ ID NO: 58)	SU58	MMP

[0145]

表 B 蛋白酶可切割接头的底物序列		
底物序列	**名称**	**切割蛋白酶**
ISSGL (SEQ ID NO: 59)	SU59	MMP
ISSGLL (SEQ ID NO: 60)	SU60	MMP
ISSGLLS (SEQ ID NO: 61)	SU61	MMP
ISSGLLSS (SEQ ID NO: 62)	SU62	MMP
ISSGLSS (SEQ ID NO: 63)	SU63	MMP
KGSGDVEG (SEQ ID NO: 64)	SU64	胱天蛋白酶-3
KQEQNPGST (SEQ ID NO: 65)	SU65	FAP
KRALGLPG (SEQ ID NO: 66)	SU66	MMP7
LAAPLGLL (SEQ ID NO: 67)	SU67	
LAPLGLQRR (SEQ ID NO: 68)	SU68	
LAQKLKSS (SEQ ID NO: 69)	SU69	
LAQRLRSS (SEQ ID NO: 70)	SU70	
LEATA (SEQ ID NO: 71)	SU71	MMP9
LKAAPRWA (SEQ ID NO: 72)	SU72	
LLAPSHRA (SEQ ID NO: 73)	SU73	
LPGGLSPW (SEQ ID NO: 74)	SU74	
LSGRSANI (SEQ ID NO: 75)	SU75	丝氨酸蛋白酶
LSGRSANP (SEQ ID NO: 76)	SU76	丝氨酸蛋白酶
LSGRSDDH (SEQ ID NO: 77)	SU77	丝氨酸蛋白酶
LSGRSDIH (SEQ ID NO: 78)	SU78	丝氨酸蛋白酶
LSGRSDNH (SEQ ID NO: 79)	SU79	丝氨酸蛋白酶
LSGRSDNI (SEQ ID NO: 80)	SU80	丝氨酸蛋白酶
LSGRSDNP (SEQ ID NO: 81)	SU81	丝氨酸蛋白酶
LSGRSDQG (SEQ ID NO: 82)	SU82	丝氨酸蛋白酶
LSGRSDQH (SEQ ID NO: 83)	SU83	丝氨酸蛋白酶
LSGRSDTH (SEQ ID NO: 84)	SU84	丝氨酸蛋白酶
LSGRSDYH (SEQ ID NO: 85)	SU85	丝氨酸蛋白酶
LSGRSGNH (SEQ ID NO: 86)	SU86	丝氨酸蛋白酶
LVLASSSFGY (SEQ ID NO: 87)	SU87	单纯疱疹病毒蛋白酶
MDAFLESS (SEQ ID NO: 88)	SU88	胶原酶
MGLFSEAG (SEQ ID NO: 89)	SU89	
MIAPVAYR (SEQ ID NO: 90)	SU90	
MVLGRSLL (SEQ ID NO: 91)	SU91	
NLL	SU92	组织蛋白酶 B
NTLSGRSENHSG (SEQ ID NO: 92)	SU93	
NTLSGRSGNHGS (SEQ ID NO: 93)	SU94	
PAGLWLDP (SEQ ID NO: 94)	SU95	
PGGPAGIG (SEQ ID NO: 95)	SU96	

[0146]

表 B 蛋白酶可切割接头的底物序列		
底物序列	**名称**	**切割蛋白酶**
PIC(Et)FF (SEQ ID NO: 96)	SU97	组织蛋白酶 D
PLGC(me)AG (SEQ ID NO: 97)	SU98	MMP
PLGL (SEQ ID NO: 98)	SU99	
PLGLAG (SEQ ID NO: 99)	SU100	MMP
PLGLAX (SEQ ID NO: 100)	SU101	MMP
PLGLWA (SEQ ID NO: 101)	SU102	MMP
PLGLWSQ (SEQ ID NO: 102)	SU103	MMP
PLTGRSGG (SEQ ID NO: 103)	SU104	
PMAKK (SEQ ID NO: 104)	SU105	
PPRSFL (SEQ ID NO: 105)	SU106	凝血酶
PR(S/T)(L/I)(S/T)	SU107	MMP9
PRFRIIGG (SEQ ID NO: 107)	SU108	纤维蛋白溶解酶
PVGYTSSL (SEQ ID NO: 108)	SU109	
PVQPIGPQ (SEQ ID NO: 109)	SU110	胶原酶
QALAMSAI (SEQ ID NO: 110)	SU111	胶原酶
QGRAITFI (SEQ ID NO: 111)	SU112	
QNQALRMA (SEQ ID NO: 112)	SU113	
RGPA (SEQ ID NO: 113)	SU114	
RGPAFNPM (SEQ ID NO: 114)	SU115	
RGPATPIM (SEQ ID NO: 115)	SU116	
RKSSIIIRMRDVVL (SEQ ID NO: 116)	SU117	纤维蛋白溶解酶
RLQLKAC (SEQ ID NO: 117)	SU118	MMP
RLQLKL (SEQ ID NO: 118)	SU119	MMP
RMHLRSLG (SEQ ID NO: 119)	SU120	
RPSPMWAY (SEQ ID NO: 120)	SU121	
RQARVVNG (SEQ ID NO: 121)	SU122	蛋白裂解酶
SAGFSLPA (SEQ ID NO: 122)	SU123	
SAPAVESE (SEQ ID NO: 123)	SU124	胶原酶
SARGPSRW (SEQ ID NO: 124)	SU125	
SGEPAYYTA (SEQ ID NO: 125)	SU126	
SGGPLGVR (SEQ ID NO: 126)	SU127	
SGRIGFLRTA (SEQ ID NO: 127)	SU128	MMP14
SGRSA (SEQ ID NO: 128)	SU129	尿激酶纤溶酶原活化子 (uPA)
SGRSANPRG (SEQ ID NO: 129)	SU130	
SMLRSMPL (SEQ ID NO: 130)	SU131	
SPLPLRVP (SEQ ID NO: 131)	SU132	
SPLTGRSG (SEQ ID NO: 132)	SU133	

[0147]

表 B 蛋白酶可切割接头的底物序列		
底物序列	**名称**	**切割蛋白酶**
SPRSIMLA (SEQ ID NO: 133)	SU134	
SSRGPAYL (SEQ ID NO: 134)	SU135	
SSRHRRALD (SEQ ID NO: 135)	SU136	纤维蛋白溶解酶
SSSFDKGKYKKGDDA (SEQ ID NO: 136)	SU137	纤维蛋白溶解酶
SSSFDKGKYKRGDDA (SEQ ID NO: 137)	SU138	纤维蛋白溶解酶
STFPFGMF (SEQ ID NO: 138)	SU139	
TARGPSFK (SEQ ID NO: 139)	SU140	
TGRGPSWV (SEQ ID NO: 140)	SU141	
TSGRSANP (SEQ ID NO: 141)	SU142	
TSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 142)	SU143	
VAGRSMRP (SEQ ID NO: 143)	SU144	
VAQFVLTE (SEQ ID NO: 144)	SU145	胶原酶
VHMPLGFLGP (SEQ ID NO: 145)	SU146	
VPLSLYSG (SEQ ID NO: 146)	SU147	MMP9
VVPEGRRS (SEQ ID NO: 147)	SU148	
WATPRPMR (SEQ ID NO: 148)	SU149	
YGAGLGVV (SEQ ID NO: 149)	SU150	胶原酶
HPVGLLAR (SEQ ID NO:260)	SU151	

[0148] 6.4.3.间隔子

[0149] 可并入蛋白酶可切割接头中的示例性间隔子序列在下表C中列出。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。

[0150]

表 C 蛋白酶可切割接头的间隔子序列	
间隔子序列	**名称**
$(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO: 150)	SP1
$(GGGS)_n$ (SEQ ID NO: 151)	SP2
$(GGS)_n$	SP3
$(GS)_n$	SP4
$(GSGGS)_n$ (SEQ ID NO: 154)	SP5
GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 155)	SP6
GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 156)	SP7
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 157)	SP8
GGGKSGGGKSGGGKS (SEQ ID NO: 158)	SP9

[0151]

表C 蛋白酶可切割接头的间隔子序列	
间隔子序列	**名称**
GGGKSGGKGSGKGGS (SEQ ID NO: 159)	SP10
GGGS (SEQ ID NO: 160)	SP11
GGGSG (SEQ ID NO: 161)	SP12
GGKGSGGKGSGGKGS (SEQ ID NO: 162)	SP13
GGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 163)	SP14
GGSGGS (SEQ ID NO: 164)	SP15
GGSGGSGGSGS (SEQ ID NO: 165)	SP16
GSGGG (SEQ ID NO: 166)	SP17
GSGSG (SEQ ID NO: 167)	SP18
GSS	SP19
GSSG (SEQ ID NO: 168)	SP20
GSSGGSGGSG (SEQ ID NO: 169)	SP21
GSSGGSGGSGG (SEQ ID NO: 170)	SP22
GSSGGSGGSGGS (SEQ ID NO: 171)	SP23
GSSGGSGGSGGSG (SEQ ID NO: 172)	SP24
GSSGGSGGSGGSGGGS (SEQ ID NO: 173)	SP25
GSSGGSGGSGS (SEQ ID NO: 174)	SP26
GSSGT (SEQ ID NO: 175)	SP27
GSSSG (SEQ ID NO: 176)	SP28
QGQSGQ (SEQ ID NO: 177)	SP29
QGQSGQG (SEQ ID NO: 178)	SP30
QGQSGS (SEQ ID NO: 179)	SP31
QSGQ (SEQ ID NO: 180)	SP32
QSGQG (SEQ ID NO: 181)	SP33
QSGS (SEQ ID NO: 182)	SP34
SGQ	SP35
SGQG (SEQ ID NO: 183)	SP36
SGS	SP37
$(G)_n$	SP38

[0152] 在一些实施例中,如上表C中所用,n是1至10的整数,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[0153] 6.4.4.示例性蛋白酶可切割接头

[0154] 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在下表D中列出。

[0155]

表 D
蛋白酶可切割接头序列

接头序列	名称	切割蛋白酶
GGGISSGLLSGRSDNHGGGISSGLLSGRSDNHGGS (SEQ ID NO: 184)	PCL1	
GGGISSGLLSGRSDNHGGGISSGLLSGRSDNHGGS GGGISSGLLSGRSDNHGGGISSGLLSGRSDNHGGS (SEQ ID NO: 185)	PCL2	
GGSGGSIPVSLRSGGGISSGLLSGRSDNHGGSGGS (SEQ ID NO: 186)	PCL3	
GGSGGSVPLSLYSGGGISSGLLSGRSDNHGGSGGS (SEQ ID NO: 187)	PCL4	
GGSHPVGLLARGGGHPVGLLARGGGHPVGLLARGS (SEQ ID NO: 188)	PCL5	
GGSHPVGLLARGGGHPVGLLARGGSGRSAGGSGRSA (SEQ ID NO: 189)	PCL6	
AVGLLAPPGGLSGRSANI (SEQ ID NO: 190)	PCL7	ADAM17_2、FAPa_1、CTSL1_1
AVGLLAPPGGLSGRSANP (SEQ ID NO: 191)	PCL8	FAPa_1、ADAM17_2、CTSL1_1
AVGLLAPPGGLSGRSDDH (SEQ ID NO: 192)	PCL9	MMP14_1、MMP14_1、MMP14_1
AVGLLAPPGGLSGRSDIH (SEQ ID NO: 193)	PCL10	MMP14_1、MMP14_1、MMP14_1
AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 194)	PCL11	MMP14_1、MMP14_1
AVGLLAPPGGLSGRSDNI (SEQ ID NO: 195)	PCL12	MMP14_1、CTSL1_1、ADAM17_2
AVGLLAPPGGLSGRSDNP (SEQ ID NO: 196)	PCL13	CTSL1_1、ADAM17_2、FAPa_1
AVGLLAPPGGLSGRSDQH (SEQ ID NO: 197)	PCL14	
AVGLLAPPGGLSGRSDTH (SEQ ID NO: 198)	PCL15	FAPa_1、CTSL1_1、ADAM17_2
AVGLLAPPGGLSGRSDYH (SEQ ID NO: 199)	PCL16	
AVGLLAPPGGTSTSGRSANPRG	PCL17	

[0156]

表 D 蛋白酶可切割接头序列		
接头序列	**名称**	**切割蛋白酶**
(SEQ ID NO: 200)		
AVGLLAPPSGRSANPRG (SEQ ID NO: 201)	PCL18	
AVGLLAPPTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 202)	PCL19	
GGALFKSSFPGPAGLYAQPLAQKLKSSGGK (SEQ ID NO: 203)	PCL20	CTSL1_1、MMP14_1、ADAM17_2
GGGGSGGGGSGGGGSFVGGTGGGGSGGGGSGGS (SEQ ID NO: 204)	PCL21	
GGGGSGGGGSGGGGSISSGLLSGRSDNHGGSGGS (SEQ ID NO: 205)	PCL22	
GGGGSGGGGSGGGGSVPLSLYSGGGSGGSGGSGS (SEQ ID NO: 206)	PCL23	
GGGGSGGGGSGPLGLWSQGGGGSGGGGSGGGGSGG (SEQ ID NO: 207)	PCL24	
GGGGSGGGGSKKAAPGGGGSGGGGSGGGGSGGS (SEQ ID NO: 208)	PCL25	
GGGGSGGGGSKKAAPVNGGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 209)	PCL26	
GGGGSGGGGSPMAKKGGGGSGGGGSGGGGSGGS (SEQ ID NO: 210)	PCL27	
GGGGSGGGGSPMAKKVNGGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 211)	PCL28	
GGGGSGGGGSQARAKGGGGSGGGGSGGGGSGGS (SEQ ID NO: 212)	PCL29	
GGGGSGGGGSQARAKVNGGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 213)	PCL30	
GGGGSGGGGSRQARVVNGGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 214)	PCL31	
GGGGSGGGGSRQARVVNGGGGGSVPLSLYSGGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 215)	PCL32	
GGGGSGGGGSRQARVVNSVPL	PCL33	

[0157]

表 D 蛋白酶可切割接头序列		
接头序列	**名称**	**切割蛋白酶**
SLYSGGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 216)		
GGGGSGGGGSVHMPLGFLGPG GGGSGGGGSGGS (SEQ ID NO: 217)	PCL34	
GGGGSVHMPLGFLGPGRSRGS FPGGGGS (SEQ ID NO: 218)	PCL35	
GGGGSVHMPLGFLGPPMAKKG GGGSGGGGSGGS (SEQ ID NO: 219)	PCL36	
GGGGSVHMPLGFLGPRQARVV NGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 220)	PCL37	
GGGGSVHMPLGFLGPRQARVV NGGGGSGGGGSGG (SEQ ID NO: 221)	PCL38	
GGPLAQKLKSSALFKSSFPGPA GLYAQGGR (SEQ ID NO: 222)	PCL39	ADAM17_2、CTSL1_1、MMP14_1
GLSGRSDNHGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 223)	PCL40	
GLSGRSDNHGGVHMPLGFLGP (SEQ ID NO: 224)	PCL41	
ISSGLLSGRSANI (SEQ ID NO: 225)	PCL42	MMP、丝氨酸蛋白酶
ISSGLLSGRSANP (SEQ ID NO: 226)	PCL43	MMP、丝氨酸蛋白酶
ISSGLLSGRSANPRG (SEQ ID NO: 227)	PCL44	MMP、丝氨酸蛋白酶
ISSGLLSGRSDDH (SEQ ID NO: 228)	PCL45	MMP、丝氨酸蛋白酶
ISSGLLSGRSDIH (SEQ ID NO: 229)	PCL46	MMP、丝氨酸蛋白酶
ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 230)	PCL47	MMP、丝氨酸蛋白酶
ISSGLLSGRSDNI (SEQ ID NO: 231)	PCL48	CTSL1_1、MMP14_1
ISSGLLSGRSDNP (SEQ ID NO: 232)	PCL49	MMP、丝氨酸蛋白酶
ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 233)	PCL50	MMP、丝氨酸蛋白酶
ISSGLLSGRSDTH (SEQ ID NO: 234)	PCL51	MMP、丝氨酸蛋白酶
ISSGLLSGRSDYH (SEQ ID NO: 235)	PCL52	MMP、丝氨酸蛋白酶

[0158]

表 D 蛋白酶可切割接头序列		
接头序列	**名称**	**切割蛋白酶**
ISSGLLSGRSGNH (SEQ ID NO: 236)	PCL53	MMP、丝氨酸蛋白酶
ISSGLLSSGGSGGSLSGRSDNH (SEQ ID NO: 237)	PCL54	
ISSGLLSSGGSGGSLSGRSGNH (SEQ ID NO: 238)	PCL55	
KGGPGGPAGIGPLAQRLRSSALFKSSFPGR (SEQ ID NO: 239)	PCL56	FAPa_1、ADAM17_1、CTSL1_1
KSGPGGPAGIGALFFSSPPLAQKLKSSGGR (SEQ ID NO: 240)	PCL57	FAPa_1、CTSL1_2、ADAM17_2
LSGRSDNHGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 241)	PCL58	
LSGRSDNHGGSGGSISSGLLSS (SEQ ID NO: 242)	PCL59	
LSGRSDNHGGSGGSQNQALRMA (SEQ ID NO: 243)	PCL60	
LSGRSDNHGGVHMPLGFLGP (SEQ ID NO: 244)	PCL61	
LSGRSGNHGGSGGSISSGLLSS (SEQ ID NO: 245)	PCL62	
LSGRSGNHGGSGGSQNQALRMA (SEQ ID NO: 246)	PCL63	
QNQALRMAGGSGGSLSGRSDNH (SEQ ID NO: 247)	PCL64	
QNQALRMAGGSGGSLSGRSGNH (SEQ ID NO: 248)	PCL65	
RGGALFKSSFPLAQKLKSSGPAGLYAQGGK (SEQ ID NO: 249)	PCL66	CTSL1_1、ADAM17_2、MMP14_1
RGGGPAGLYAQPLAQKLKSSALFKSSFPGG (SEQ ID NO: 250)	PCL67	MMP14_1、ADAM17_2、CTSL1_1
SGGFPRSGGSFNPRTFGSKRKRRGSRGGGG (SEQ ID NO: 251)	PCL68	凝血酶、因子 Xa、肝素
SGPLAQKLKSSGPAGLYAQALFKSSFPGSK (SEQ ID NO: 252)	PCL69	ADAM17_2、MMP14_1、CTSL1_1
TSTSGRSANPRGGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 253)	PCL70	
TSTSGRSANPRGGGVHMPLGFLGP (SEQ ID NO: 254)	PCL71	
VHMPLGFLGPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 255)	PCL72	
VHMPLGFLGPGGTSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 256)	PCL73	
SGRSAGGGSGRSAGGGSGRSA	PCL74	uPA

[0159]

表 D 蛋白酶可切割接头序列		
接头序列	**名称**	**切割蛋白酶**
(SEQ ID NO: 257)		
HPVGLLARGGGHPVGLLARGGGSGRSAGGGSGRSA (SEQ ID NO: 258)	PCL75	MPA（MMP-2 和 uPA）
GPLGVRGK (SEQ ID NO: 259)	PCL76	MMP-2
HPVGLLAR (SEQ ID NO: 260)	PCL77	MMP-2
GPQGIAGQ (SEQ ID NO: 43)	PCL78	MMP-2、MMP-9，以及某种程度上 MT1-MMP
VPMSMRGG (SEQ ID NO: 261)	PCL79	MMP-9 和 MMP-2
IPVSLRSG (SEQ ID NO: 58)	PCL80	MMP-2，以及某种程度上 MMP-9 或 MMP-7
RPFSMIMG (SEQ ID NO: 262)	PCL81	MMP-9 和 MMP-7，某种程度上 MMP-3
VPLSLTMG (SEQ ID NO: 263)	PCL82	MMP-7，某种程度上 MMP-9、MMP-2、MPT-1-MMP
VPLSLYSG (SEQ ID NO: 146)	PCL83	MMP-2、MMP-9、MMP-7
IPESLRAG (SEQ ID NO: 264)	PCL84	MMP-2、MMP-7、MMP-9，某种程度上 MPT-1-MMP
GGGISSGLLSGRSDNHGGGS (SEQ ID NO: 339)	PCL85	
GGGHPVGLLARGGGS (SEQ ID NO: 340)	PCL86	
GGGSGGGSGGGGISSGLLSGRSDNHGGGSGGGSGGS (SEQ ID NO: 341)	PCL87	
GGGGISSGLLSGRSDNHGGGISSGLLSGRSDNHGGS (SEQ ID NO: 342)	PCL88	
GGGSGGSIPVSLRSGGGISSGLLSGRSDNHGGSGGS (SEQ ID NO: 343)	PCL89	
GGGSGGSVPLSLYSGGGISSGLLSGRSDNHGGSGGS (SEQ ID NO: 344)	PCL90	
GGGSHPVGLLARGGGHPVGLLARGGGHPVGLLARGS (SEQ ID NO: 345)	PCL91	
GGGSHPVGLLARGGGHPVGLLARGGSGRSAGGSGRS (SEQ ID NO: 346)	PCL92	

[0160] 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。

[0161] 6.5.不可切割接头

[0162] 在某些方面，本公开提供了MBM前蛋白，其中MBM前蛋白的两个或更多个组分通过

肽接头彼此连结。作为实例而非限制,接头可用于连结(a)ABS和Fc结构域;(b)两个ABS;或(c)ABS内的不同结构域(例如,scFv中的VH和VL结构域)。

[0163] 优选地,除了其切割导致MBM活化的蛋白酶可切割接头之外,MBM前蛋白中的所有接头都是不可切割接头(NCL)。

[0164] 不可切割接头可在2个氨基酸至60个或更多个氨基酸范围内,并且在某些方面,不可切割肽接头的长度在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个氨基酸范围内。

[0165] 在特定方面,不可切割接头的长度为至少5个氨基酸、至少6个氨基酸或至少7个氨基酸,并且任选地长度为多达30个氨基酸、多达40个氨基酸、多达50个氨基酸或多达60个氨基酸。

[0166] 在前述的一些实施例中,不可切割接头的长度在5个氨基酸至50个氨基酸范围内,例如长度在5至50、5至45、5至40、5至35、5至30、5至25或5至20个氨基酸范围内。在前述的其他实施例中,不可切割接头的长度在6个氨基酸至50个氨基酸范围内,例如长度在6至50、6至45、6至40、6至35、6至30、6至25或6至20个氨基酸范围内。在前述的又其他实施例中,不可切割接头的长度在7个氨基酸至50个氨基酸范围内,例如长度在7至50、7至45、7至40、7至35、7至30、7至25或7至20个氨基酸范围内。

[0167] 带电荷的(例如,带电荷的亲水性接头)和/或柔性的不可切割接头是特别优选的。

[0168] 可用于本公开的MBM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为或包含甘氨酸和丝氨酸的重复序列,例如G_nS(SEQ ID NO:265)或SG_n(SEQ ID NO:266)的单聚体或多聚体,其中n为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,不可切割接头为或包含G_4S(SEQ ID NO:1)的重复序列的单聚体或多聚体,例如$(GGGGS)_n$(SEQ ID NO:150)。

[0169] 聚甘氨酸不可切割接头可适当地用于本公开的MBM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:267)、五个连续甘氨酸(5Gly)(SEQ ID NO:268)、六个连续甘氨酸(6Gly)(SEQ ID NO:269)、七个连续甘氨酸(7Gly)(SEQ ID NO:270)、八个连续甘氨酸(8Gly)(SEQ ID NO:271)或九个连续甘氨酸(9Gly)(SEQ ID NO:272)。

[0170] 示例性不可切割接头序列在下表E中列出。

[0171]

表 E 不可切割接头序列		
接头序列	**名称**	**SEQ ID NO:**
$(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO: 150)	NCL1	
$(GGGS)_n$ (SEQ ID NO: 151)	NCL2	
$(GGS)_n$	NCL3	
$(GS)_n$	NCL4	
$(GSGGS)_n$ (SEQ ID NO: 154)	NCL5	
ADAAP (SEQ ID NO: 273)	NCL6	
ADAAPTVSIFP (SEQ ID NO: 274)	NCL7	
ADAAPTVSIFPP (SEQ ID NO: 275)	NCL8	
AKTTAP (SEQ ID NO: 276)	NCL9	
AKTTAPSVYPLAP (SEQ ID NO: 277)	NCL10	
AKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO: 278)	NCL11	
AKTTPKLGG (SEQ ID NO: 279)	NCL12	
AKTTPP (SEQ ID NO: 280)	NCL13	
AKTTPPSVTPLAP (SEQ ID NO: 281)	NCL14	
ASTKGP (SEQ ID NO: 282)	NCL15	
ASTKGPSVFPLAPASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 283)	NCL16	
EGKSSGSGSESKST (SEQ ID NO: 284)	NCL17	
GEGESGEGESGEGES (SEQ ID NO: 285)	NCL18	
GEGESGEGESGEGESGEGES (SEQ ID NO: 286)	NCL19	
GEGGSGEGGSGEGGS (SEQ ID NO: 287)	NCL20	
GENKVEYAPALMALS (SEQ ID NO: 288)	NCL21	
GGEGSGGEGSGGEGS (SEQ ID NO: 289)	NCL22	
GGGESGGEGSGEGGS (SEQ ID NO: 290)	NCL23	
GGGESGGGESGGGES (SEQ ID NO: 291)	NCL24	
GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 155)	NCL25	
GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 156)	NCL26	

[0172]

表 E 不可切割接头序列		
接头序列	**名称**	**SEQ ID NO:**
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 157)	NCL27	
GGGKSGGGKSGGGKS (SEQ ID NO: 158)	NCL28	
GGGKSGGKGSGKGGS (SEQ ID NO: 159)	NCL29	
GGGS (SEQ ID NO: 160)	NCL30	
GGGSG (SEQ ID NO: 161)	NCL31	
GGKGSGGKGSGGKGS (SEQ ID NO: 162)	NCL32	
GGS	NCL33	
GGSG (SEQ ID NO: 292)	NCL34	
GGSGG (SEQ ID NO: 293)	NCL35	
GGSGG (SEQ ID NO: 293)	NCL36	
GGSGGGGSG (SEQ ID NO: 294)	NCL37	
GGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 163)	NCL38	
GHEAAAVMQVQYPAS (SEQ ID NO: 295)	NCL39	
GKGGSGKGGSGKGGS (SEQ ID NO: 296)	NCL40	
GKGKSGKGKSGKGKS (SEQ ID NO: 297)	NCL41	
GKGKSGKGKSGKGKSGKGKS (SEQ ID NO: 298)	NCL42	
GKPGSGKPGSGKPGS (SEQ ID NO: 299)	NCL43	
GKPGSGKPGSGKPGSGKPSGS (SEQ ID NO: 300)	NCL44	
GPAKELTPLKEAKVS (SEQ ID NO: 301)	NCL45	
GSAGSAAGSGEF (SEQ ID NO: 302)	NCL46	
GSGGG (SEQ ID NO: 166)	NCL47	
GSGSG (SEQ ID NO: 167)	NCL48	
GSS	NCL49	
GSSG (SEQ ID NO: 168)	NCL50	
GSSGGSGGSG (SEQ ID NO: 169)	NCL51	
GSSGGSGGSGG (SEQ ID NO: 170)	NCL52	
GSSGGSGGSGGS (SEQ ID NO: 171)	NCL53	
GSSGGSGGSGGSG (SEQ ID NO: 172)	NCL54	
GSSGGSGGSGGSGGGS (SEQ ID NO: 173)	NCL55	
GSSGGSGGSGS (SEQ ID NO: 174)	NCL56	
GSSGT (SEQ ID NO: 175)	NCL57	

[0173]

表 E 不可切割接头序列		
接头序列	**名称**	**SEQ ID NO:**
GSSSG (SEQ ID NO: 176)	NCL58	
GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 303)	NCL59	
GTAAAGAGAAGGAAAGAAG (SEQ ID NO: 304)	NCL60	
GTSGSSGSGSGGSGSGGGG (SEQ ID NO: 305)	NCL61	
IRPRAIGGSKPRVA (SEQ ID NO: 306)	NCL62	
KESGSVSSEQLAQFRSLD (SEQ ID NO: 307)	NCL63	
KTTPKLEEGEFSEAR (SEQ ID NO: 308)	NCL64	
PRGASKSGSASQTGSAPGS (SEQ ID NO: 309)	NCL65	
QPKAAP (SEQ ID NO: 310)	NCL66	
QPKAAPSVTLFPP (SEQ ID NO: 311)	NCL67	
RADAAAA$(G4S)_4$ (SEQ ID NO: 312)	NCL68	
RADAAAAGGPGS (SEQ ID NO: 313)	NCL69	
RADAAP (SEQ ID NO: 314)	NCL70	
RADAAPTVS (SEQ ID NO: 315)	NCL71	
SAKTTP (SEQ ID NO: 316)	NCL72	
SAKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO: 317)	NCL73	
SAKTTPKLGG (SEQ ID NO: 318)	NCL74	
STAGDTHLGGEDFD (SEQ ID NO: 319)	NCL75	
TVAAP (SEQ ID NO: 320)	NCL76	
TVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO: 321)	NCL77	
TVAAPSVFIFPPTVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO: 322)	NCL78	

[0174] 在某些方面,本公开的MBM前蛋白可包含多肽链,该多肽链在N-末端到C-末端取向上包含ABS(或ABS链)、铰链结构域和CH2结构域以及CH3结构域。因此,铰链结构域将ABS与CH2结构域连结起来,并且可以说构成了一种类型的接头。示例性铰链结构域在第6.10.3节中列出。

[0175] 6.6.TAA ABS

[0176] 本公开的MBM前蛋白包含至少一个ABS,其特异性结合至细胞外基质(“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”)、检查点抑制剂或肿瘤相关抗原(TAA),在本文中称为“TAA ABS”。技术人员将认识到,前述类别的靶分子不是相互排斥的,并且因此给定的靶分子可落入多于一种前述类别的靶分子中。例如,一些分子可被视为TAA和ECM蛋白,而其他分子可被视为TCA和检查点抑制剂。优选地,

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、TCA、检查点抑制剂或TAA为人抗原。抗原可能存在于正常细胞上,也可能不存在。特定方面涉及包含至少一个特异性结合至TAA的ABS的MBM前蛋白。在某些实施例中,与正常细胞相比,TAA优先在肿瘤细胞上表达或上调。在其他实施例中,TAA为谱系标记。

[0177] 预期任何类型的肿瘤和任何类型的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、TCA、检查点抑制剂或TAA可由本公开的MBM前蛋白靶向。可靶向的示例性癌症类型包括急性淋巴细胞性白血病、急性髓细胞性白血病、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、慢性骨髓性白血病、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、霍奇金氏淋巴瘤、肝癌、肺癌、甲状腺髓样癌、黑色素瘤、多发性骨髓瘤、卵巢癌、非霍奇金氏淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、肺部癌、肾癌、肉瘤、皮肤癌、睾丸癌、尿路上皮癌和尿膀胱癌。然而,本领域技术人员将认识到,TAA和与肿瘤微环境相关的其他靶分子对于几乎任何类型的癌症都是已知的。

[0178] ECM抗原的非限制性实例包括多配体蛋白聚糖(syndecan)、乙酰肝素酶(heparanase)、整联蛋白(integrin)、骨桥蛋白(osteopontin)、连接蛋白(link)、钙粘蛋白(cadherin)、层粘连蛋白(laminin)、层粘连蛋白型EGF、凝集素(lectin)、纤连蛋白(fibronectin)、缺口蛋白(notch)、连接蛋白(nectin)(例如,连接蛋白-4)、腱生蛋白(tenascin)、胶原蛋白(例如,X型胶原蛋白)和基质蛋白(matrixin)。

[0179] 其他靶分子为肿瘤或病毒淋巴细胞的细胞表面分子,例如T细胞共刺激蛋白,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。

[0180] 在特定实施例中,靶分子为检查点抑制剂,例如CTLA-4、PD1、PDL1、PDL2、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、TIM3、GAL9、LAG3、VISTA、KIR、2B4、CD160、CGEN-15049、CHK1、CHK2。在特定实施例中,靶分子为PD1。在其他实施例中,靶分子为LAG3。在一些实施例中,在靶分子是检查点抑制剂的情况下,TAA ABS为非阻断性或弱阻断性配体-受体结合。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。

[0181] 在某些实施例中,靶分子为TAA。下表F中列出了示例性TAA,以及对TAA ABS可以基于的示例性抗体或抗体序列的参考。

[0182]

表 F 示例性抗 TAA	
靶标	**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	比马格鲁单抗(Bimagrumab) VH：美国专利号 8,388,968 B2 的 SEQ ID NO:107、109 VL：美国专利号 8,388,968 B2 的 SEQ ID NO:93、95
B7-H3	奥布林达单抗(Obrindatamab) (MGD009)
BAFF/B 淋巴细胞刺激剂	Benlysta™（维木单抗(velimumab)）
BAFF/B 淋巴细胞刺激剂	VH：美国专利号 7,138,501 的 SEQ ID NO:327 的氨基酸 1-123 VL：美国专利号 7,138,501 的 SEQ ID NO:327 的氨基酸 139-249。
BAFF/B 淋巴细胞刺激剂	VH：美国专利号 7,605,236 的 SEQ ID NO:1321 的氨基酸 1-126； VL：美国专利号 7,605,236 的 SEQ ID NO:1049 的氨基酸 143-251。
BAFF/B 淋巴细胞刺激剂	贝利尤单抗(Belimumab)
BCMA	VH：US 2021/0206865 A1 的 SEQ ID NO.126 的重链的 VH 序列 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(Igobumab)
CA125	OvaRex™（奥瑞格单抗(oregobumab)）
CD11a	Raptiva™（依法珠单抗(efalizumab)） Werther 等人, 1996, The Journal of Immunology 157(11): 4986-4995 中的序列。
CD19	Blincyto™（布利纳吐单抗(blinatumomab)）
CD19	SGN-CD19A
CD20	Bexxar™（托西莫单抗(tositumomab)） VH:美国专利公开 US 2017/0002060 A1 的 SEQ ID NO:124

[0183]

表 F 示例性抗 TAA	
靶标	**抗体名称和/或结合序列**
	的重链的 VH 序列 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(ibritumomab tiuxetan)） VH：美国专利号 5,736,137 的 SEQ ID NO:9 VL：美国专利号 5,736,137 的 SEQ ID NO:6
CD20	Rituxan™（利妥昔单抗(rituximab)） VH：美国专利号 5,736,137 的 SEQ ID NO:9 VL：美国专利号 5,736,137 的 SEQ ID NO:6
CD20	Ocrevus™（奥瑞珠单抗(ocrelizumab)）
CD20	奥卡妥珠单抗(Okaratuzumab)
CD20	Arzerra™（奥法木单抗(ofatumumab)） VH：美国专利号 8,529,902 的 SEQ ID NO:2 VL：美国专利号 8,529,902 的 SEQ ID NO:4
CD20	Gazyva™（奥比妥珠单抗(obinutuzumab)）
CD20	VH：US 2021/0206870 A1 的 SEQ ID NO: 4 US 2021/0206870 A1 的 SEQ ID NO:6 的 VL
CD20	依普利他单抗(epcoritamab)
CD22	贝利尤单抗
CD22	依帕妥珠单抗(Epratuzumab)
CD22	Besponsa ™（奥加伊妥珠单抗(inotuzumab ozogamicin)）
CD22	Lumoxiti ™（帕莫塞妥莫单抗(moxetumumab pasudox)）
CD22	维品妥珠单抗(pinatuzumab vedotin)
CD25	Zenapax™（达珠单抗(daclizumab)） VH：美国专利号 7,060,269 的 SEQ ID NO:9 VL：美国专利号 7,060,269 的 SEQ ID NO:10
CD30	Adcetris™（维布妥昔单抗(brentuximab vedotin)） VH：美国专利号 7,090,843 的 SEQ ID NO:2 VL：美国专利号 7,090,843 的 SEQ ID NO:10
CD33	Myelotarg™（吉妥珠单抗(gemtuzumab)） Man Sung 等人, 1993, Molecular immunology 30:1361-1367 中的序列
CD33	林妥珠单抗(Lintuzumab)
CD38	Darzalex™（达雷妥尤单抗(daratumumab)）
CD40	卢卡木单抗(Lukatumumab)
CD40	达西珠单抗(Dacetuzumab)

[0184]

表 F 示例性抗 TAA	
靶标	**抗体名称和/或结合序列**
CD40L	Hu5c8（鲁普利珠单抗(ruplizumab)）
CD44v6	莫维妥单抗(vibatuzumab mertansine)
CD52	Campath™（阿仑单抗(alemtuzumab)） VH：美国专利公开 US 2017/0002060 A1 的 SEQ ID NO:1 VL：美国专利公开 US 2017/0002060 A1 的 SEQ ID NO:2
CD70	Blenrep ™（玛泊索珠单抗(borsetuzumab mafodotin)）
CD123	弗洛妥珠单抗(flotetuzumab)
CD221	Tepezza ™（替妥木单抗(teprotumumab)）
CEA	Hybri-Ceaker®（戊酸替木单抗(altumomab pentetate)）
CEA	Scintimun™（贝西索单抗(besilesomab)）
CEA	CEA-CIDE™（拉贝妥珠单抗(labetuzumab)）
CEA	CEA-Scan ™（阿西莫单抗(arcitumomab)）
CEA	hMN-15 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 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(Cibisatamab)
CEA	来自临床试验 NCT01284231 和 NCT02291614 的 MEDI-565/MT110/AMG211 的 CEA 结合部分 VH：PCT 公开号 WO 2013/012414 A1 的 SEQ ID NO:49 或 51 VL：PCT 公开号 WO 2013/012414 A1 的 SEQ ID NO:48。
CEA	雷贝珠单抗(Rabetuzumab)
CEA	阿特珠单抗(Atezolizumab)
CEA	西比沙他单抗(Cibisatamab)
CEA	MEDI-565（AMG211、MT111）
CEA	RO6958688
CEA	VH：WO2022/048883A1 中描述的 SEQ ID No. 9 VL：WO2022/048883A1 中描述的 SEQ ID No. 10
CLDN18.2	AMG910
补体 C5	Soliris™（依库珠单抗(eculizumab)） VH：美国专利号 6,355,245 的 SEQ ID NO: 10 的氨基酸 1-122 VL：美国专利号 6,355,245 的 SEQ ID NO: 9 的氨基酸 3-110

[0185]

表 F 示例性抗 TAA	
靶标	**抗体名称和/或结合序列**
CTLA-4	Yervoy™（伊匹单抗(ipilimumab)） VH：WO 2001/014424 A2 的 SEQ ID NO: 17 VL：WO 2001/014424 A2 的 SEQ ID NO: 7
CTLA-4	（曲美木单抗(tremelimumab)）
CTLA-4	Orencia™（阿巴西普(abatacept)）
DLL3	AMG757
EGFR	Erbitux™（西妥昔单抗(cetuximab)） VH：美国专利号 6,217,866 的 SEQ ID NO: 11 VL：美国专利号 6,217,866 的 SEQ ID NO: 13
EGFR	Vectibix™（帕尼单抗(panitumumab)） VH：美国专利号 6,235,883 的 SEQ ID NO: 37 VL：美国专利号 6,235,883 的 SEQ ID NO: 38
EGFR	扎鲁木单抗(Zalutumumab) VH：WO 2018/140831 A2 的 SEQ ID NO: 64 VL：WO 2018/140831 A2 的 SEQ ID NO: 69
EGFR	马帕木单抗(mapatumumab)
EGFR	马图珠单抗(Matuzumab)
EGFR	尼妥珠单抗(Nimotuzumab) VH：WO 2018/140831 A2 的 SEQ ID NO: 51 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 ™（依决洛单抗(edrecolomab)） VH：WO 2018/140831 A2 的 SEQ ID NO:129 VL：WO 2018/140831 A2 的 SEQ ID NO:134
EpCAM	阿迪卡单抗(Adecatumumab) VH：WO 2018/140831 A2 的 SEQ ID NO:142 VL：WO 2018/140831 A2 的 SEQ ID NO:147
EpCAM	西莫介白素图考珠单抗(tucotuzumab celmoleukin)
EpCAM	泊西他珠单抗(citatuzumab bogatox)
EpCAM	EP1629013 B1 VH：SEQ ID NO: 80、84、88、92 或 96 VL：SEQ ID NO: 82、86、90、94 或 98

[0186]

表 F 示例性抗 TAA	
靶标	**抗体名称和/或结合序列**
EpCAM	G8.8 HC：美国专利公开号 US 2020/0317806 A1 的 SEQ ID NO: 4 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。 VL：WO 2021/211510 A2 的 SEQ ID NO: 15-16。
EpCAM	Removab ™（卡妥昔单抗(catumaxomab)）
EpCAM	Vicineum ™（莫奥妥珠单抗(oportuzumab monatox)）
EpCAM	M701
RSV 的 F 蛋白	Synagic™（帕利珠单抗(palivizumab)）
GD2	3F8
糖蛋白受体 IIb/IIIa	ReoPro™（阿比昔单抗(abiciximab)）
gpA33	MGD007
GPC3	ERY974
GUCY2C	PF-07062119
Her2	Herceptin™（曲妥珠单抗(trastuzumab)）
Her2	阿地白介素(Aldesleukin) (proleukine)
Her2	沙格莫司亭(Sargramustim) (leukine)
Her2	M802
Her2	鲁尼莫他单抗(Runimotamab)（BTRC4017A、R07227780）
Her2	ISB1302
Her2-neu	Perjeta™（帕妥珠单抗(pertuzumab)） VH：WO 2013/096812 A1 的 SEQ ID NO:16。 VL：WO 2013/096812 A1 的 SEQ ID NO:15。
Her2-neu	Rexomun™（艾妥索单抗(ertumaxomab)）
IgE	Xolair™（奥马珠单抗(omalizumab)）
IGFIR	（菲格单抗(figitumumab)）
IL1β	Ilaris™（卡那单抗(canakinumab)） VH：美国专利号 7,446,175 的 SEQ ID NO:1。 VL：美国专利号 7,446,175 的 SEQ ID NO: 2
IL12/IL23	Stelara™（优特克单抗(ustekinumab)）
IL1Ra	Antril™、Kineret™ (ankinra)
IL2R	Simulect™（巴利昔单抗(basiliximab)） VH：美国专利号 6,383,487 的 SEQ ID NO: 3 VL：美国专利号 6,383,487 的 SEQ ID NO: 6
IL6	克拉扎珠单抗(Clazakizumab)

[0187]

表 F 示例性抗 TAA	
靶标	**抗体名称和/或结合序列**
IL6 受体	Actemra™（托珠单抗(tocilizumab)） VH：美国专利号 7,479,543 的 SEQ ID NO: 31 VL：美国专利号 7,479,543 的 SEQ ID NO: 29
IL12/IL23 p40 亚基	Stelara™（优特克单抗） VH：美国专利号 6,902,734 的 SEQ ID NO: 7 VL：美国专利号 6,902,734 的 SEQ ID NO: 8
整联蛋白 α4	Tysabri™（那他珠单抗(natalizumab)） VH：美国专利号 5,840,299 的 SEQ ID NO: 11-13 VL：美国专利号 5,840,299 的 SEQ ID NO: 7-8
整联蛋白 α4 β7	Entyvio™（维多珠单抗(vedolizumab)） HC：美国专利公开 US 2012/0282249 的 SEQ ID NO: 2 LC：美国专利公开 US 2012/0282249 的 SEQ ID NO: 4。
间皮素	阿马妥昔单抗(Amatuximab)
间皮素	HPN536
MUC1	泰坦克利妥珠单抗(civatuzumab tetraxetane)
MUC1	Pankomab ™（加替妥珠单抗(gatipotuzumab)）
MUC1	菲木单抗(femtumumab)
MUC1	瑞伐坦坎妥珠单抗(Cantuzumab ravtansine)
MUC16 (CA125)	具有 VH 和 VL 序列的抗 MUC16 抗体，这些 VH 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
NGF	（坦尼珠单抗(tanezumab)）
磷脂酰丝氨酸	（巴维妥昔单抗(avituximab)）
PSCA	GEM3PSCA
PSMA	huJ591
PSMA	具有 VH 和 VL 序列的抗 PSMA 抗体，这些 VH 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	抗体，诸如：WO2003034903A2 中描述的 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

[0188]

表 F 示例性抗 TAA	
靶标	**抗体名称和/或结合序列**
	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 Abgenix 4.152.1 杂交瘤细胞系，诸如：WO 2003/034903A2 中描述的 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)。 WO 2003/034903A2 中描述的 SEQ ID NO: 2-7 的 VH WO 2003/034903A2 中描述的 SEQ ID NO: 8-13 的 VL
PMSA	VH：WO 2011/121110A1 中描述的 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。 VL WO 2011/121110A1 中描述的 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。 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。

[0189]

表 F 示例性抗 TAA	
靶标	**抗体名称和/或结合序列**
PMSA	抗 PMSA 抗体，其具有 US 2022/0119525 A1 的 SEQ ID NO: 229-312 中任一者的 VL 氨基酸序列和 US 2022/0119525 A1 的 SEQ ID NO: 217 的 VH。
PMSA	ES414
PMSA	BAY2010112（帕索珠单抗(pasotuxizumab)）
PMSA	CCW702
PMSA	JNJ-63898081
PMSA	CC-1
PMSA	阿卡他单抗(Acapatamab)
PSMA	HPN424
RAAG12	RAV12
RANKL	Prolia™（地舒单抗(denosumab)） VH：美国专利公开 2017/0002060 的 SEQ ID NO:51 VL：美国专利公开 2017/0002060 的 SEQ ID NO:52
SLAMF7	Empliciti™（埃罗妥珠单抗(elotuzumab)）
SSTR2	XmAb®18087
STEAP1	VHCDR1 US20210179731A1 中描述的 SEQ ID NO: 14、33、182、184 或 185。 VHCDR2 US20210179731A1 中描述的 SEQ ID NO: 15、21、34、182、184 或 185。 VHCDR3 US20210179731A1 中描述的 SEQ ID NO: 16 和 35。 VH US20210179731A1 中描述的 SEQ ID NO: 182 或 184。 VLCDR1 US20210179731A1 中描述的 SEQ ID NO: 11 或 30。 VLCDR2 US20210179731A1 中描述的 SEQ ID NO: 12 或 31。 VLCDR3 US20210179731A1 中描述的 SEQ ID NO: 13 或 32。 VL US20210179731A1 中描述的 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)

[0190]

表 F 示例性抗 TAA	
靶标	**抗体名称和/或结合序列**
	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) 300-302-304-308-310-312；(23) 316-318-320-324-326-328；(24) 332-334-336-340-342-344；(25) 348-350-352-356-358-360；(26) 364-366-368-372-374-376；和(27) 380-382-384-388-390-392。 抗 STEAP 2 抗体，其具有(a)包含美国专利号 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)包含美国专利号 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。 抗 STEAP 2 抗体，其具有包含美国专利号 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。
TGFβ	GC1008
TNFR	Enbrel™（依那西普(etanercept)）
TNFα	Remicade™（英夫利昔单抗(infliximab)） VH：国际专利公开 WO201/3087911 A1 的 SEQ ID NO:2 VH：国际专利公开 WO2013/ A1087911 的 SEQ ID NO:3
TNFα	Humira™（阿达木单抗(adalimumab)） VH：美国专利号 6,258,562 的 SEQ ID NO:4

[0191]

表 F 示例性抗 TAA	
靶标	**抗体名称和/或结合序列**
	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(certolizumab pegol)） VH：美国专利号 7,012,135 的 SEQ ID NO:14 VL：美国专利号 7,012,135 的 SEQ ID NO:9
TNFα	Simponi ™（戈利木单抗(golimumab)） VH：美国专利号 7,250,165 的 SEQ ID NO:7 VL：美国专利号 7,250,165 的 SEQ ID NO:8
VEGF	Avastin™（贝伐珠单抗(bevacizumab)） VH：美国专利号 7,060,269 的 SEQ ID NO:9 VL：美国专利号 7,060,269 的 SEQ ID NO:10
VEGF	Lucentis™（雷珠单抗(ranibizumab)） VH：美国专利号 9,914,770 的 SEQ ID NO:4 VL：美国专利号 9,914,770 的 SEQ ID NO:2

[0192] 在一些方面,TAA ABS与表F中列出的抗体竞争与TAA的结合。在另外方面,TAA ABS包含具有表F中列出的抗TAA抗体的CDR序列的CDR。在一些实施例中,TAA ABS包含表F中列出的抗TAA抗体的所有6个CDR序列。在其他实施例中,TAA ABS至少包含重链CDR序列(CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3和通用轻链的轻链CDR序列。在另外方面,TAA ABS包含VH,该VH包含表F中列出的抗TAA抗体的VH的氨基酸序列。在一些实施例中,TAA ABS进一步包含VL,该VL包含表F中列出的抗TAA抗体的VL的氨基酸序列。在其他实施例中,TAA ABS进一步包含通用轻链VL序列。

[0193] 可被MBM前蛋白靶向的额外TAA公开于下表K中以及例如,Hafeez等人,2020,Molecules 25:4764,doi:10.3390/molecules25204764,特别是表1中。Hafeez等人的表1通过对其援引以其全文并入此处。

[0194] 再另外的示例性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)、亲环素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-ζ链、肿瘤抗原的MAGE家族(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)、肿瘤抗原的GAGE家族(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、甲胎蛋白、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、腺瘤样结肠息肉蛋白(APC)、胞衬蛋白(fodrin)、连接蛋白(Connexin)37、Ig独特型、p15、gp75、GM2和GD2神经节苷脂、病毒产物诸如人乳头状瘤病毒蛋白、Smad肿瘤家族抗原、

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缔合的异源多聚体)、CD22(B细胞受体)、CD23(低亲和力IgE受体)、CD30(细胞因子受体)、CD33(骨髓细胞表面抗原)、CD40(肿瘤坏死因子受体)、IL-6R-(IL6受体)、CD20、MCSP、PDGFβR(β-血小板衍生生长因子受体)、ErbB2上皮细胞粘附分子(EpCAM)、EGFR变体III(EGFRvIII)、CD19、双唾液酸神经节苷脂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、人端粒酶逆转录酶、RU1、RU2(AS)、肠羧酸酯酶、mut hsp70-2、M-CSF、前列腺酶、前列腺酶特异性抗原(PSA)、PAP、LAGA-1a、p53、前列腺特异性蛋白(prostein)、PSMA、存活酶和端粒酶、前列腺癌肿瘤抗原-1(PCTA-1)、ELF2M、中性粒细胞弹性蛋白酶、肝配蛋白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)以及腱生蛋白-C的A1结构域(TnC A1)。

[0195] 6.7.TCE ABS

[0196] 本公开的MBM前蛋白至少包含特异性结合至T细胞受体复合物组分的T细胞接合ABS,在本文中称为“TCE ABS”。TCE ABS的示例性靶标为CD3和T细胞受体(例如,TCRαβ或TCRγδ)。优选地,TCE ABS靶标为人T细胞受体复合物组分。TCE ABS的表位可为单个多肽(例如,CD3ε)或T细胞受体复合物的多聚体组分(例如,TCRαβ二聚体或TCRγδ二聚体)。

[0197] 示例性CD3和TCR抗体或抗体序列在下表G中列出,TAA ABS可基于这些抗体或抗体序列。

[0198]

表 G 示例性 T 细胞接合抗体	
靶标	**抗体名称和/或结合序列**
CD3	卡妥昔单抗
CD3	（艾妥索单抗）
CD3	WO2011121110A1 中描述的抗 PSMA/抗 CD3 抗体的 CD3 部分
CD3	US10266593B2 中的抗 CD3 抗体序列
CD3	US 8846042B2 中的抗 CD3 抗体序列
CD3	US 2016/0355600 中的抗 CD3 抗体序列
CD3	WO 2014/110601 中的抗 CD3 抗体序列
CD3	WO 2014/145806 中的抗 CD3 抗体序列
CD3	US 10,066,015 中的抗 CD3 抗体序列
CD3	WO 2019/034580 中的抗 CD3 抗体序列
CD3	WO 2014/056783 中的抗 CD3 抗体序列
CD3	WO 2013/055809 A1 中的抗 CD3 抗体序列
CD3	US 10,066,016 中的抗 CD3 抗体序列
CD3	US 2010/0150918 中的抗 CD3 抗体序列
CD3	MT110
CD3	阿卡他单抗(AMG160)
CD3	AMG199
CD3	AMG330
CD3	AMG427
CD3	AMG562
CD3	AMG596
CD3	AMG673
CD3	AMG701
CD3	塔拉妥单抗(Tarlatamab) (AMG757)
CD3	AMG910
CD3	BAY2010112
CD3	AMG420
CD3	AMG424
CD3	AMG509
CD3	AMV564
CD3	APVO436
CD3	阿努克他单抗(Alnuctamab) (CC-93269)
CD3	ERY974
CD3	A-319
CD3	GEM333

[0199]

表 G 示例性 T 细胞接合抗体	
靶标	**抗体名称和/或结合序列**
CD3	GEM3PSCA
CD3	西沃他单抗(Cevostamab)
CD3	鲁尼莫他单抗
CD3	GEN1044
CD3	依普利他单抗
CD3	HPN424
CD3	ISB1302
CD3	ISB1342
CD3	IGM-2323
CD3	IMC-F106C
CD3	IMC-C103C
CD3	IMCnyeso
CD3	JNJ-63709178
CD3	JNJ-63898081
CD3	特立妥单抗(Teclistamab)
CD3	塔奎妥单抗(Talquetamab)
CD3	JNJ-67571244
CD3	MGD007
CD3	奥洛他单抗(Orlotamab)
CD3	度妥昔珠单抗(Duvortuxizumab)
CD3	弗洛妥珠单抗
CD3	MCLA-117
CD3	PF-06671008
CD3	埃纳妥单抗(Elranatamab)
CD3	奥尼妥单抗(Odronextamab)
CD3	REGN5458
CD3	REGN5459
CD3	REGN4018
CD3	格菲妥单抗(Glofitamab)
CD3	RO6958688
CD3	SAR440234
CD3	TNB-383B
CD3	M802
CD3	Xmab13676
CD3	Xmab18087

[0200]

表 G 示例性 T 细胞接合抗体	
靶标	**抗体名称和/或结合序列**
CD3	维克妥单抗(Vibecotamab)
CD3	尼伐他单抗(Nivatrotamab)
CD3	US20190211100 中的抗 CD3 抗体序列
CD3	EP1629011B 中的抗 CD3 抗体序列
CD3	US 2021/0206865 A1 中公开的 SEQ ID NO. 90 和 98 的 VH US 2021/0206865 A1 中公开的 SEQ ID NO: 92 和 100 的 CDR-H1 US 2021/0206865 A1 中公开的 SEQ ID NO: 94 和 102 的 CDR-H2 US 2021/0206865 A1 中公开的 SEQ ID NO: 96 和 104 的 CDR-H3 US 2021/0206865 A1 中公开的 SEQ ID NO: 127 或 SEQ ID NO: 128 的 HC US 2021/0206865 A1 中公开的 SEQ ID NO: 129 或 SEQ ID NO: 132 的 LC
CD3	US 2021/0206870 A1 中公开的 SEQ ID NO: 2 的抗 CD3 重链 US 2021/0206870 A1 中公开的 SEQ ID NO: 5 的抗 CD3 VH US 2021/0206870 A1 中公开的 SEQ ID NO: 6 的抗 CD3 VL US 2021/0206870 A1 中公开的 SEQ ID NO: 10 的抗 CD3 CDR-H1 US 2021/0206870 A1 中公开的 SEQ ID NO: 11 的抗 CD3 CDR-H2 US 2021/0206870 A1 中公开的 SEQ ID NO: 12 的抗 CD3 CDR-H3
CD3	US 2022/0119525 A1 中公开的 SEQ ID NO: 92、102、112、122、132、142、156、166、176、186、196 或 206 的抗 CD3 VH US 2022/0119525 A1 中公开的 SEQ ID NO: 93、103、113、123、133、143、157、167、177、187、197 或 207 的抗 CD3 CDR-H1 US 2022/0119525 A1 中公开的 SEQ ID NO: 94、104、114、124、134、144、158、168、178、188、198 或 208 的抗 CD3 CDR-H2 US 2022/0119525 A1 中公开的 SEQ ID NO: 95、105、115、125、135、145、159、169、179、189、199 或 209 的抗 CD3 CDR-H3 US 2022/0119525 A1 中公开的 SEQ ID NO: 96、106、116、126、136、146、152、162、172、182、192 或 202 的抗 CD3 VL US 2022/0119525 A1 中公开的 SEQ ID NO: 97、107、117、127、137、147、153、163、173、183、193 或 203 的抗 CD3 CDR-L1 US 2022/0119525 A1 中公开的 SEQ ID NO. 98、108、118、128、138、148、154、164、174、184、194 或 204 的抗 CD3 CDR-L2 US 2022/0119525 A1 中公开的 SEQ ID NO. 99、109、119、129、139、149、155、165、175、185、195 或 205 的抗 CD3 CDR-L3
TCRαβ	US 2012/0034221 中公开的 BMA031 序列
TCRγδ	US 5,980,892 中公开的 6TCS1 抗体

[0201] 在一些方面,TCE ABS与表G中列出的T细胞接合(TCE)抗体竞争与TCE抗体的靶标(例如,CD3或T细胞受体)的结合。在另外方面,TCE ABS包含具有表G中列出的TCE抗体的CDR序列的CDR。在一些实施例中,TCE ABS包含表G中列出的TCE抗体的所有6个CDR序列。在其他实施例中,TCE ABS至少包含重链CDR序列(CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3)和通用轻链的轻链CDR序列。在另外方面,TCE ABS包含VH,该VH包含表G中列出的TCE抗体的VH的氨基酸序列。在一

些实施例中,TCE ABS进一步包含VL,该VL包含表G中列出的TCE抗体的VL的氨基酸序列。在其他实施例中,TCE ABS进一步包含通用轻链VL序列。

[0202] 6.8.抗TCE ABS

[0203] 在某些实施例中,本公开的MBM前蛋白包含抗TCE ABS。抗TCE ABS为能够特异性结合TCE-ABS的抗独特型抗体的片段。各种类型的抗体片段可用于本公开的抗TCE ABS的上下文中,包括例如scFv、Fab、VHH和VH。在一些实施例中,抗TCE ABS为抗独特性抗体的scFv。在一些实施例中,抗TCE ABS为源自抗独特型抗体的VHH。在一些实施例中,抗TCE ABS为源自抗独特型抗体的VH。

[0204] 抗TCE ABS可源自由单个VH或VL结构域构成的单结构域抗体,其对靶标展现出足够的亲和力。在一个具体实施例中,单结构域抗体为骆驼科动物VHH结构域(参见,例如,Riechmann,1999,Journal of Immunological Methods 231:25-38;WO 94/04678)。

[0205] 抗独特型抗体为针对另一种抗体分子的抗原组合区或可变区(称为独特型或Id)的抗体。原则上,用表达给定抗原的互补位(抗原组合位点)的抗体分子进行免疫应产生一组抗-抗体,其中一些抗-抗体与抗原共享互补位的互补结构。

[0206] 产生抗独特型抗体的示例性方法见于美国专利号10,150,817B2和WO 2017/162587A1的实例1中。

[0207] 可用作本公开的抗TCE ABS的示例性抗CD3抗独特型ABS为指定为4.15.64和4.32.63的scFv,其是指定为CH2527的抗CD3 ABS的抗独特型。4.15.64、4.32.63和CH2527的序列公开于WO 2017/162587 A1中。

[0208] 6.9.ABS形式

[0209] 在某些方面,本公开的MBM前蛋白中的ABS可以是保留与抗原决定簇特异性结合的任何类型的抗体或其片段。在一个实施例中,ABS为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、双体抗体、三体抗体和四体抗体。

[0210] 6.9.1.Fab

[0211] Fab结构域传统上是通过使用酶诸如木瓜蛋白酶对免疫球蛋白分子进行蛋白水解切割产生的。Fab结构域可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、人的或人源化的。

[0212] Fab结构域通常包含附接至VH结构域的CH1结构域,该VH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结构域配对以构成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进一步稳定Fab结构域。

[0213] 对于本公开的MBM前蛋白,特别是当ABS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ABS的Fab结构域的正确缔合并最小化属于不同ABS的Fab结构域的异常配对。例如,可使用下表H中所示的Fab异二聚化策略:

[0214]

表 H
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 VHVRD1CH1 CRD2 - VLVRD1CλC RD2	39K，62E	H172A、F174G	1R、38D、(36F)	L135Y、S176W	Lewis 等人, 2014, Nat Biotechnol 32:191-8
正交 Fab VHVRD2CH1 wt - 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。
DuetMab	WT	F126C	WT	S121C	Mazor 等人, 2015, MAbs 7:377-89; Mazor 等人, 2015, MAbs 7:461-669。
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

[0215] 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中所述。

[0216] 还可通过在Fab的CH1结构域中引入一个或多个氨基酸修饰和在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组分优先彼此配对,而非与其他Fab的组分配对。

[0217] 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编号所指示。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。

[0218] 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基于空间和疏水性接触、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、突出和空腔、供体和接受体等,所有这些都暗示着两个相互作用的表面之间的结构和化学匹配的性质。

[0219] 在一个实施例中,所引入的一种或多种修饰在Fab组分的界面上引入新的氢键。在

一个实施例中,所引入的一种或多种修饰在Fab组分的界面上引入新的盐桥。示例性取代描述于WO 2014/150973和WO 2014/082179中,两者的内容特此通过对其援引并入。

[0220] 在一些实施例中,Fab结构域包含CH1结构域中的192E取代以及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)。

[0221] 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,其用以交换CH1结构域与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)。

[0222] 在一些实施例中,Fab结构域可在一些或所有的VH、CH1、VL、CL结构域中包含修饰以引入促进Fab结构域的正确组装的正交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。

[0223] 还可修饰Fab结构域,用工程化的二硫键替换天然的CH1:CL二硫键,从而提高Fab组分配对的效率。例如,可通过在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)。

[0224] 还可通过用促进正确组装的替代结构域替换CH1结构域和CL结构域来修饰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,用T细胞受体的b结构域取代CL结构域,并将这些结构域替换与通过在VL结构域中引入38D修饰和在VH结构域中引入39K修饰实现的VL结构域与VH结构域之间的额外电荷-电荷相互作用进行配对。

[0225] 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MBM前蛋白中的每个独特的ABS。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MBM前蛋白中不适当物种的数量。在各种实施例中,ABS的VL结构域是从包含共同轻链的单特异性抗体中鉴别的。在各种实施例中,MBM前蛋白中ABS的VH区包含人重链可变基因区段,这些区段在小鼠B细胞内体内重排,这些小鼠B细胞先前已被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,并且回应于暴露于感兴趣的抗原,产生含有多个人VH的抗体库,该多个人VH与两种可能的人VL中的一者或一者同源,其中抗体库对感兴趣的抗原具有特异性。共同轻链为源自重排的人Vκ1-39Jκ5序列或重排的人Vκ3-20Jκ1序列的那些轻链,并包括体细胞突变(例如,亲和力成熟的)版本。参见,例如,美国专利第10,412,940号。

[0226] 6.9.2.scFv

[0227] 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,能够表达为单链多肽,并保留衍生其的完整抗体的特异性。通常,scFv多肽进一步包括VH与VL结构域之间的多肽接头,该接头使得scFv能够形成用于靶标结合的所需结构。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。

[0228] 除非另有说明,否则本文所用的scFv可具有任一顺序的VL和VH可变区,例如,相对于多肽的N-末端和C-末端,scFv可包含VL-接头-VH或可包含VH-接头-VL。

[0229] scFv可包含来自任何合适物种的VH和VL序列,诸如鼠、人或人源化VH和VL序列。

[0230] 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,编码第6.5节中描述的任何接头(通常是含有氨基酸甘氨酸和丝氨酸的序列的重复,诸如氨基酸序列(Gly4～Ser)3(SEQ ID NO:156),使得VH和VL序列可表达为邻接的单链蛋白,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.USA85:5879-5883;McCafferty等人,1990,Nature 348:552-554)。

[0231] 6.10.Fc区

[0232] 本公开的MBM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区在它们的N-末端包含铰链区以形成恒定结构域。贯穿本公开,除非另有说明,否则对Fc结构域的提及涵盖在其N-末端具有铰链结构域的Fc结构域。

[0233] Fc结构域可源自可操作地连接至ABS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Fc结构域。在优选实施例中,ABS或其组分与IgG Fc分子融合。ABS或其组分可与IgG Fc结构域的N-末端或C-末端或两者融合。

[0234] Fc结构域可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。下表Y中提供了来自IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的Fc结构域的示例性序列。

[0235]

表 Y
Fc 序列

Fc	序列	SEQ ID NO
hIgG1 Fc (UniprotKB P01857-1 的氨基酸 99-330)	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	335
hIgG2 Fc (UniprotKB P01859-1 的氨基酸 99-326)	ERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	336
hIgG3 Fc (UniprotKB P01860-1 的氨基酸 99-377)	ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK	337
hIgG4 Fc	ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT	338

[0236]

表 Y Fc 序列		
Fc	**序列**	**SEQ ID NO**
(UniprotKB P01861-1 的氨基酸 99-327)	CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	

[0237] 在一些方面,Fc结构域包含与SEQ ID NO:336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:336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:336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,如第6.10.1节中所述)和/或促进Fc异二聚化的一个或多个取代(例如,如第6.10.2节中所述)。

[0238] 在一些方面,Fc结构域包含与SEQ ID NO:337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:337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:337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,如第6.10.1节中所述)和/或促进Fc异二聚化的一个或多个取代(例如,如第6.10.2节中所述)。

[0239] 在一些方面,Fc结构域包含与SEQ ID NO:338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:338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:338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,如第6.10.1节中所述)和/或促进Fc异二聚化的一个或多个取代(例如,如第6.10.2节中所述)。

[0240] 在一些方面,Fc结构域包含与SEQ ID NO:339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:339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:339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,如第6.10.1节中所述)和/或促进Fc异二聚化的一个或多个取代(例如,如第6.10.2节中所述)。

[0241] Fc区内的两个Fc结构域可彼此相同或不同。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MBM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6.10.2节中所述。

[0242] 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)构成,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)构成。这些二聚产生Fc区。

[0243] 在本公开的MBM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。

[0244] 在一个实施例中,Fc区包含源自IgG1的CH2和CH3结构域。Fc区的一个或两个Fc结构域相对于天然存在的IgG1 CH3序列可具有一个或多个氨基酸的缺失。在一些实施例中,本公开的Fc结构域相对于天然存在的IgG1,在CH3结构域的C-末端处或附近具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个氨基酸的缺失(例如,截短)。

[0245] 在一个实施例中,Fc区包含源自IgG2的CH2和CH3结构域。Fc区的一个或两个Fc结构域相对于天然存在的IgG2 CH3序列可具有一个或多个氨基酸的缺失。在一些实施例中,本公开的Fc结构域相对于天然存在的IgG2,在CH3结构域的C-末端处或附近具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个氨基酸的缺失(例如,截短)。

[0246] 在一个实施例中,Fc区包含源自IgG3的CH2和CH3结构域。Fc区的一个或两个Fc结构域相对于天然存在的IgG3 CH3序列可具有一个或多个氨基酸的缺失。在一些实施例中,本公开的Fc结构域相对于天然存在的IgG3,在CH3结构域的C-末端处或附近具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个氨基酸的缺失(例如,截短)。

[0247] 在一个实施例中,Fc区包含源自IgG4的CH2和CH3结构域。Fc区的一个或两个Fc结构域相对于天然存在的IgG4 CH3序列可具有一个或多个氨基酸的缺失。在一些实施例中,本公开的Fc结构域相对于天然存在的IgG4,在CH3结构域的C-末端处或附近具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个氨基酸的缺失(例如,截短)。

[0248] 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。

[0249] 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。

[0250] 应当理解,用于产生本公开的MBM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区包含至少一个恒定结构域,其序列与野生型恒定结构域不同。应当理解,变体恒定结构域可比野生型恒定结构域更长或更短。优选地,变体恒定结构域与野生型恒定结构域至少60%同一或相似。在另一个实例中,变体恒定结构域至少70%同一或相似。在另一个实例中,变体恒定结构域至少80%同一或相似。在另一个实例中,变体恒定结构域至少90%同一或相似。在另一个实例中,变体恒定结构域至少95%同一或相似。

[0251] 本文考虑的某些变体恒定结构域包括相对于野生型恒定结构域在C-末端处或附近(例如,10个氨基酸内)具有一个或多个氨基酸的缺失(例如,截短)的那些恒定结构域。在一些实施例中,本公开的恒定结构域相对于野生型恒定结构域在C-末端处或附近包含1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸的缺失。

[0252] IgM和IgA作为共同H2L2抗体单元的共价多聚体天然存在于人体中。当IgM并入J链时,它会以五聚体形式出现;或者当IgM缺乏J链时,它会以六聚体形式出现。IgA以单体和二

聚体形式出现。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,称为尾片(tailpiece)。尾片包含半胱氨酸残基,该残基在聚合物中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。尾片还含有糖基化位点。在某些实施例中,本公开的MBM前蛋白不包含尾片。

[0253] 并入本公开的MBM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6.10.1节中描述。

[0254] 还可改变Fc结构域以包括提高不对称MBM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MBM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6.10.2节中举例说明。

[0255] 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MBM前蛋白的特性。

[0256] 6.10.1.具有改变的效应子功能的Fc结构域

[0257] 在一些实施例中,Fc结构域包含减少与Fc受体的结合和/或效应子功能的一个或多个氨基酸取代。

[0258] 在一个特定实施例中,Fc受体为Fcγ受体。在一个实施例中,Fc受体为人Fc受体。在一个实施例中,Fc受体为活化性Fc受体。在一个特定实施例中,Fc受体为活化性人Fcγ受体,更具体地人FcγRIIIa、FcγRI或FcγRIIa,最具体地人FcγRIIIa。在一个实施例中,效应子功能为选自以下组的一者或多者: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。在一个特定实施例中,效应子功能为ADCC。

[0259] 在一个实施例中,Fc结构域或Fc区(例如,可缔合形成Fc区的MBM前蛋白的一个或两个Fc结构域)在选自以下组的位置处包含氨基酸取代:E233、L234、L235、N297、P331和P329(根据Kabat EU索引的编号)。在一个更具体的实施例中,Fc结构域或Fc区在选自以下组的位置处包含氨基酸取代:L234、L235和P329(根据Kabat EU索引的编号)。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索引的编号)。在一个这样的实施例中,Fc结构域或区为Igd Fc结构域或区,特别是人Igd Fc结构域或区。在一个实施例中,Fc结构域或Fc区包含位置P329处的氨基酸取代。在一个更具体的实施例中,氨基酸取代为P329A或P329G,特别是P329G(根据Kabat EU索引的编号)。在一个实施例中,Fc结构域或Fc区包含位置P329处的氨基酸取代和选自E233、L234、L235、N297和P331(根据Kabat EU索引的编号)的位置处的另一氨基酸取代。在一个更具体的实施例中,另一氨基酸取代为E233P、L234A、L235A、L235E、N297A、N297D或P331S。在具体实施例中,Fc结构域或Fc区包含位置P329、L234和L235(根据Kabat EU索引的编号)处的氨基酸取代。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”)。

[0260] 通常,Fc区的两个Fc结构域中的每一个中均存在相同的一个或多个氨基酸取代。因此,在一个具体实施例中,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区中的第一和第二Fc结构域中,位置234处的亮氨酸残基被丙氨酸残基替换(L234A),位置235处的亮氨酸残基被丙氨酸残基替换(L235A)并且位置329处

的脯氨酸残基被甘氨酸残基替换(P329G)(根据Kabat EU索引编号)。

[0261] 在一个实施例中,Fc结构域为IgG1 Fc结构域,特别是人IgG1 Fc结构域。在一些实施例中,IgG1 Fc结构域为包含D265A、N297A突变(EU编号)以降低效应子功能的变体IgG1。

[0262] 在另一个实施例中,Fc结构域为与Fc受体的结合降低的IgG4 Fc结构域。与Fc受体的结合降低的示例性IgG4 Fc结构域可包含选自下表I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:

[0263]

表 I	
Fc 结构域	**序列**
SEQ ID NO: 323（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 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
SEQ ID NO: 324（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
SEQ ID NO: 325（WO2014/121087	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

[0264]

表 I	
Fc 结构域	**序列**
的 SEQ ID NO:30）	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 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**
SEQ ID NO: 326（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**

[0265]

表 I	
Fc 结构域	**序列**
	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
SEQ ID NO: 327（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 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**
SEQ ID NO: 328（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

[0266]

表 I	
Fc 结构域	**序列**
	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 Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys**

[0267] 在一个具体实施例中,具有降低的效应子功能的IgG4包含WO2014/121087的SEQ ID NO:31的氨基酸序列的粗体部分,有时在本文中称为IgG4或hIgG4。

[0268] 对于异二聚体Fc区,有可能并入上述变体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(或其粗体部分)的Fc结构域和含有WO2014/121087的SEQ ID NO:37的氨基酸序列(或其粗体部分)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(或其粗体部分)的Fc结构域和含有WO2014/121087的SEQ ID NO:38的氨基酸序列(或其粗体部分)的Fc结构域的Fc区。

[0269] 6.10.2.Fc异二聚化变体

[0270] 某些MBM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,这两个Fc结构域可操作地连接至非同一的N-末端区域,例如,一个Fc结构域连结至Fab,而另一个Fc结构域连结至ABS或其组分。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MBM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。

[0271] 本公开提供了包含Fc异二聚体(即包含异源、非同一的Fc结构域的Fc区)的MBM前蛋白。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IgG(IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)类别的抗体的恒定

区,如前一节所述。

[0272] CH3结构域处两条不同重链的异二聚化产生所需MBM前蛋白,而同一的重链的同二聚化将降低所需MBM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MBM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。

[0273] 在一个具体实施例中,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结构域中的一者中的“杵”修饰和另一个Fc结构域中的“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和Carter,2001,Immunol Meth 248:7-15中。一般而言,该方法涉及在第一多肽的界面处引入突起(“杵”)和在第二多肽的界面中的对应空腔(“臼”),使得突起可定位在空腔中,从而促进异二聚体形成并阻碍同二聚体形成。通过用较大侧链(例如,酪氨酸或色氨酸)替换第一多肽的界面的小氨基酸侧链来构建突起。通过用较小侧链(例如,丙氨酸或苏氨酸)替换较大氨基酸侧链,在第二多肽的界面上产生与突起大小同一或相似的补偿空腔。

[0274] 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被具有较大侧链体积的氨基酸残基替换,从而在第一亚基的CH3结构域内产生突起,其为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被具有较小侧链体积的氨基酸残基替换,从而在第二亚基的CH3结构域内产生空腔,第一亚基的CH3结构域内的突起可定位在该空腔中。优选地,具有较大侧链体积的所述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,具有较小侧链体积的所述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。突起和空腔可通过改变编码多肽的核酸,例如通过位点特异性诱变,或通过肽合成来制备。示例性取代是Y470T。

[0275] 在一个具体的这样的实施例中,在第一Fc结构域中,位置366处的苏氨酸残基被色氨酸残基替换(T366W),并且在Fc结构域中,位置407处的酪氨酸残基被缬氨酸残基替换(Y407V),并且任选地位置366处的苏氨酸残基被丝氨酸残基替换(T366S),并且位置368处的亮氨酸残基被丙氨酸残基替换(L368A)(根据Kabat EU索引编号)。在另一个实施例中,在第一Fe结构域中,另外地,位置354处的丝氨酸残基被半胱氨酸残基替换(S354C),或者位置356处的谷氨酸残基被半胱氨酸残基替换(E356C)(特别是位置354处的丝氨酸残基被半胱氨酸残基替换),并且在第二Fc结构域中,另外地,位置349处的酪氨酸残基被半胱氨酸残基替换(Y349C)(根据Kabat EU索引编号)。在一个具体实施例中,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)。

[0276] 在一些实施例中,静电转向(例如,如Gunasekaran等人,2010,J Biol Chem 285(25):19637-46中所述)可用于促进Fc区的第一和第二Fc结构域的缔合。

[0277] 替代或另外地,使用经修饰以促进异二聚化的Fc结构域,可修饰Fc结构域以允许使得能够选择Fc异二聚体的纯化策略。在一个这样的实施例中,一种多肽包含修饰的Fc结构域,其消除其与蛋白质A的结合,从而使得能够产生异二聚体蛋白的纯化方法。参见,例如,美国专利第8,586,713号。因而,MBM前蛋白包含第一CH3结构域和第二Ig CH3结构域,其中第一和第二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MBM前蛋白相比,至少一个氨基酸差异降低MBM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)。此类别的修饰在本文中称为"星"突变。

[0278] 在一些实施例中,Fc可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突变来促进纯化。

[0279] 6.10.3.铰链结构域

[0280] 本公开的MBM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饰的铰链区。铰链区通常见于Fc区的N-末端。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MBM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,两个缔合的铰链序列称为"铰链区"。

[0281] 天然铰链区是通常在天然存在的抗体中的Fab与Fc结构域之间发现的铰链区。修饰的铰链区是长度和/或组成不同于天然铰链区的任何铰链。此类铰链可包括来自其他物种的铰链区,诸如人、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。替代地,修饰的铰链区可包含天然铰链或重复单元的一部分,其中重复单元中的每个单元源自天然铰链区。在另一个替代方案中,可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增加或减少。其他修饰的铰链区可以是完全合成的并且可被设计为具有所需特性,诸如长度、半胱氨酸组成和柔性。

[0282] 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,并且这些专利通过对其援引并入本文。

[0283] 在一个实施例中,本公开的MBM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。

[0284] 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。

[0285] 在一些实施例中,本公开的MBM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。

[0286] 在一个实施例中,本公开的MBM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IgG4并且每个铰链结构域包含修饰的序列CPPC(SEQ ID NO:329)。与含有序列CPPC(SEQ ID NO:334)的IgG1相比,人IgG4的核心铰链区含有序列CPSC(SEQ ID NO:330)。IgG4序列中存在的丝氨酸残基导致该区域的柔性增加,因此一部分分子在同一蛋白链内形成二硫键(链内二硫键),而非桥接至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,得到与IgG1相同的核心序列,使得在IgG4铰链区完全形成链间二硫键,从而减少纯化产物的异质性。这种改变的同种型称为IgG4P。

[0287] 6.10.3.1.嵌合铰链序列

[0288] 铰链结构域可以是嵌合铰链结构域。

[0289] 例如,嵌合铰链可包含源自人IgG1、人IgG2或人IgG4铰链区的“上部铰链”序列与源自人IgG1、人IgG2或人IgG4铰链区的“下部铰链”序列的组合。

[0290] 在特定实施例中,嵌合铰链区包含氨基酸序列EPKSCDKTHTCPPCPAPPVA (SEQ ID NO:331)(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:332)(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6.10.1节中所述)。

[0291] 6.10.3.2.具有降低的效应子功能的铰链序列

[0292] 在另外实施例中,铰链区可被修饰以减少效应子功能,例如如WO2016161010A2中所描述,其通过对其援引以其全文并入本文。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)。这些区段可表示为GGG-、GG--、G---或----,其中“-”表示未被占据的位置。

[0293] 位置236在典型的人IgG2中未被占据,但在其他典型的人IgG同种型中被占据。在所有四种人同种型中,位置233-235被G以外的残基占据(如WO2016161010A2的图1中所示)。

[0294] 位置233-236内的铰链修饰可与被P占据的位置228组合。位置228在人IgG1和IgG2中天然地被P占据,但在人IgG4中被S占据,而在人IgG3中被R占据。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的重链轻链对的交换。优选地,位置226-229分别被C、P、P和C占据(如SEQ ID NO:329公开的“CPPC”)。

[0295] 示例性铰链区具有残基226-236,有时称为中硷(或核心)和下部铰链,被指定为GGG-(233-236)、GG--(233-236)、G---(233-236)和非G(233-236)的修饰的铰链序列占据。任选地,铰链结构域氨基酸序列包含CPPCPAPGGG-GPSVF(SEQ ID NO:333)(先前公开为WO2016161010A2的SEQ ID NO:1)、CPPCPAPGG--GPSVF(SEQ ID NO:26)(先前公开为WO2016161010A2的SEQ ID NO:2)、CPPCPAPG---GPSVF(SEQ ID NO:106)(先前公开为WO2016161010A2的SEQ ID NO:3)或CPPCPAP----GPSVF(SEQ ID NO:152)(先前公开为WO2016161010A2的SEQ ID NO:4)。

[0296] 上述修饰的铰链区可并入重链恒定区中,该重链恒定区通常包括CH2和CH3结构域,并且其可具有侧接指定区域的额外铰链区段(例如,上部铰链)。存在的此类额外恒定区区段通常具有相同的同种型,优选人同种型,尽管可以是不同同种型的杂合体。此类额外人恒定区区段的同种型优选是人IgG4,但也可以是人IgG1、IgG2或IgG3或其结构域具有不同同种型的杂合体。人IgG1、IgG2和IgG4的示例性序列显示于WO2016161010A2的图2至图4中。

[0297] 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6.10.1节中所述)。

[0298] 6.11.串联Fab

[0299] 本公开的某些方面涉及串联Fab MBM。串联Fab MBM包含TCE ABS(例如,如第6.7节

中所述的TCE ABS)和TAA ABS(例如,如第6.6节中所述的TAA ABS),两者都呈Fab的形式,例如,如第6.9.1节中所述的Fab结构域。TCE ABS和TAA ABS可通过不可切割接头间隔开,例如如第6.5节中所述。

[0300] 在一些方面,本公开提供了一种串联Fab MBM,其包含(1)第一多肽链,其从N-末端到C-末端取向包含可操作地连接至CH1结构域的TCE ABS的VH;任选的接头,例如不可切割接头;以及可操作地连接至CH1结构域的TAA ABS的VH;(2)第二多肽链,其包含可操作地连接至CL结构域的TAA ABS的VL;以及(3)第三多肽链,其包含可操作地连接至CL结构域的TCE ABS的VL。在一些实施例中,串联Fab MBM包含(1)第一多肽链,其从N-末端到C-末端取向包含(a)TCE ABS的VH;(b)CH1结构域;(c)不可切割接头;(d)TAA ABS的VH;以及(c)CH1结构域;(2)第二多肽链,其包含(a)TAA ABS的VL和(b)CL结构域;以及(3)第三多肽链,其包含(a)TCE ABS的VL和(b)CL结构域。

[0301] 在其他方面,本公开提供了一种串联Fab MBM,其包含(1)第一多肽链,其从N-末端到C-末端取向包含可操作地连接至CH1结构域的TAA ABS的VH;任选的接头,例如不可切割接头;以及可操作地连接至CH1结构域的TCE ABS的VH;(2)第二多肽链,其包含可操作地连接至CL结构域的TAA ABS的VL;以及(3)第三多肽链,其包含可操作地连接至CL结构域的TCE ABS的VL。在一些实施例中,串联Fab MBM包含(1)第一多肽链,其从N-末端到C-末端取向包含(a)TAA ABS的VH;(b)CH1结构域;(c)不可切割接头;(d)TCE ABS的VH;以及(c)CH1结构域;(2)第二多肽链,其包含(a)TAA ABS的VL和(b)CL结构域;以及(3)第三多肽链,其包含(a)TCE ABS的VL和(b)CL结构域。

[0302] 在一些实施例中,TCE ABS的CH1和TAA ABS的CH1是相同的。在其他实施例中,TCE ABS的CL和TAA ABS的CL是相同的。在又其他实施例中,TAA ABS和TCE ABS的VL是相同的并且是通用轻链VL。可并入TAA ABS和TCE ABS中的示例性通用轻链在下表J中列出。

[0303]

表 J 示例性通用轻链	
参考	**通用轻链名称和/或 SEQ ID NO**
WO 2021/244522 A1	SEQ ID NO: 38、39 和 40
WO 2021/173844 A1	抗 CD38003 的 VL
WO 2021/123090 A1	SEQ ID NO:101 和 103
US 2021/0206865 A1	SEQ ID NO: 129
US 2021/0206870 A1	SEQ ID NO: 3
WO 2020/229621 A1	0325L 和 0128L
US 2020/0199250 A1	SEQ ID NO: 405 和 SEQ ID NO: 414
US 2022/0090125 A1	SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2
US 11,254,736 B2	SEQ ID NO: 1 至 9
US 2021/0179731 A1	SEQ ID NO: 17、36、200 和 204
WO 2019/190327 A2	SEQ ID NO: 29、35、37 和 40
US 10,986,820 B2	ULC，由 SEQ ID NO: 1 的核苷酸 2362 至 2686 和 SEQ ID NO: 11 的核苷酸 2373 至 2697 编码。
US 2019/0100771 A1	SEQ ID NO:01
WO 2016/079081 A1	SEQ ID NO:31 和 SEQ ID NO:35
US 2021/0206865 A1	SEQ ID NO: 82 的 VL SEQ ID NO: 84 的 CDR-L1 SEQ ID NO: 86 的 CDR-L2 SEQ ID NO: 88 的 CDR-L3

[0304] 任选的接头优选选自第[0112]节中公开的接头。在一些实施例中,接头的长度小于50个氨基酸(例如,长度为5至45个氨基酸、长度为10至35个氨基酸或长度为5至25个氨基酸)并且包含甘氨酸-丝氨酸序列,例如G4S(SEQ ID NO:1)或其多聚体。

[0305] 6.12.核酸和宿主细胞

[0306] 在另一个方面,本公开提供了编码本公开的MBM前蛋白和串联Fab MBM的核酸。在一些实施例中,MBM前蛋白和串联Fab MBM由单一核酸编码。在其他实施例中,MBM前蛋白和串联Fab MBM可由多个(例如,两个、三个、四个或更多个)核酸编码。

[0307] 单个核酸可编码包含单条多肽链的MBM前蛋白或串联Fab MBM、包含两条或更多条多肽链的MBM前蛋白或串联Fab MBM或者包含多于两条多肽链的MBM前蛋白或串联Fab MBM的一部分(例如,单个核酸可编码包含三条、四条或更多条多肽链的MBM前蛋白或串联Fab MBM的两条多肽链,或者包含四条或更多条多肽链的MBM前蛋白的三条多肽链)。对于表达的单独控制,编码两条或更多条多肽链的开放阅读框可处于单独的转录调控元件(例如,启动子和/或增强子)的控制之下。编码两种或更多种多肽的开放阅读框也可由相同的转录调控元件控制,并且由内部核糖体进入位点(IRES)序列间隔开,从而允许翻译成单独的多肽。

[0308] 在一些实施例中,包含两条或更多条多肽链的MBM前蛋白或串联Fab MBM由两种或更多种核酸编码。编码MBM前蛋白或串联Fab MBM的核酸的数量可等于或小于MBM前蛋白或串联Fab MBM中的多肽链的数量(例如,当多于一条多肽链由单个核酸编码时)。

[0309] 本公开的核酸可以是DNA或RNA(例如,mRNA)。

[0310] 在另一个方面,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。

[0311] 6.12.1.载体

[0312] 本公开提供了载体,这些载体包含编码本文所述的MBM前蛋白、串联Fab MBM或其组分的核苷酸序列,例如MBM前蛋白的半抗体的一条或两条多肽链。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)。

[0313] 可采用多种载体系统。例如,一种类别的载体利用源自动物病毒的DNA元件,这些病毒诸如例如牛乳头状瘤病毒、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(Rous Sarcoma Virus)、MMTV或MOMLV)或SV40病毒。另一类别的载体利用源自RNA病毒的RNA元件,这些病毒诸如塞姆利基森林病毒(Semliki Forest virus)、东部马脑炎病毒(Eastern Equine Encephalitis virus)和黄病毒。

[0314] 另外,可通过引入一种或多种允许对转染宿主细胞选择的标记来选择已将DNA稳定整合至它们的染色体中的细胞。标记可提供例如对营养缺陷型宿主的原养(prototropy)、杀生物剂抗性(例如,抗生素)或对重金属诸如铜的抗性等。可选标记基因可直接连接至待表达的DNA序列,或者通过共转化来引入到相同的细胞中。另外的元件也可为mRNA的最优合成所需。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。

[0315] 一旦已制备用于表达的含有构建体的表达载体或DNA序列,表达载体可转染或引入到适当宿主细胞中。可采用各种技术以实现这个目的,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。用于培养所得的经转染细胞以及用于回收所表达多肽的方法和条件是本领域技术人员已知的,并且可以基于本发明描述,根据所采用的特定表达载体和哺乳动物宿主细胞而加以变化或优化。

[0316] 6.12.2.细胞

[0317] 本公开还提供了包含本公开的核酸的宿主细胞。

[0318] 在一个实施例中,宿主细胞被遗传工程化以包含本文所述的一种或多种核酸。

[0319] 在一个实施例中,通过使用表达盒对宿主细胞进行遗传工程化。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。

[0320] 本公开还提供了包含本文所述的载体的宿主细胞。

[0321] 细胞可以是但不限于真核细胞、细菌细胞、昆虫细胞或人细胞。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。

[0322] 6.13.药物组合物

[0323] 本公开的MBM前蛋白和串联Fab MBM可呈包含MBM前蛋白或串联Fab MBM以及一种或多种载剂、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体中的药物用途。组合物的形式(例如,干燥粉末、液体配制剂等)以及所使用的赋形剂、稀释剂和/或载剂将取决于MBM前蛋白和串联Fab MBM的预期用途以及用于治

疗用途的施用方式。

[0324] 对于治疗用途,组合物可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。该组合物可呈任何合适的形式(取决于将其施用于患者的所需方法)。药物组合物可通过多种途径施用于患者,诸如口服、透皮、皮下、鼻内、静脉内、肌内、瘤内、鞘内、外用或局部。在任何给定情况下最合适的施用途径将取决于特定的MBM前蛋白或串联Fab MBM、受试者以及疾病的性质和严重程度,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。

[0325] 药物组合物可方便地以每剂量含有预定量的本公开的MBM前蛋白或串联Fab MBM的单位剂型存在。单位剂量中包含的MBM前蛋白或串联Fab MBM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。此类单位剂量可呈含有适合于单次施用的量的MBM前蛋白或串联Fab MBM的冻干的干燥粉末形式,或者呈液体形式。干燥粉末单位剂型可与注射器、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MBM前蛋白的注射器的形式方便地提供。

[0326] 药物组合物还可以由含有适合于多次施用的量的MBM前蛋白或串联Fab MBM来批量供应。

[0327] 可通过将具有所需纯度的MBM前蛋白或串联Fab MBM与本领域通常采用的任选的药学上可接受的载剂、赋形剂或稳定剂(所有这些都称为本文中称为“载剂”)(即缓冲剂、稳定剂、防腐剂、等渗剂、非离子去污剂、抗氧化剂和其他杂项添加剂)混合来制备用于作为冻干配制剂或水溶液储存的药物组合物。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。

[0328] 缓冲剂有助于将pH值维持在接近生理条件的范围内。它们可以多种浓度存在,但通常以约2mM至约50mM范围内的浓度存在。用于本公开的合适的缓冲剂包括有机酸和无机酸及它们的盐,诸如柠檬酸盐缓冲液(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)、琥珀酸盐缓冲液(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)、酒石酸盐缓冲液(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)、富马酸盐缓冲液(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)和乙酸盐缓冲液(例如,乙酸-乙酸钠混合物、乙酸-氢氧化钠混合物等)。另外,可使用磷酸盐缓冲液、组氨酸缓冲液和三甲胺盐诸如Tris。

[0329] 可添加防腐剂以延缓微生物生长,并且可以约0.2%-1%(w/v)范围内的量添加。用于本公开的合适的防腐剂包括苯酚、苯甲醇、间甲酚、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、十八烷基二甲基苯甲基氯化铵、苯扎卤化物(例如,氯化物、溴化物和碘化物)、氯化六甲铵以及对羟基苯甲酸烷基酯诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯、儿茶酚、间苯二酚、环己醇和3-戊醇。可添加有时被称为“稳定剂”的等渗剂以确保本公开的液体组合物的等渗性,并且包括多元糖醇,例如三元或高级糖醇,诸如甘油、赤藓糖醇、阿拉伯糖醇、木

糖醇、山梨糖醇和甘露糖醇。稳定剂是指一大类赋形剂,其功能范围从增容剂到溶解治疗剂或有助于防止变性或粘附到容器壁的添加剂。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MBM前蛋白或串联Fab MBM的0.5wt%至10wt%范围内的量存在。

[0330] 可添加非离子表面活性剂或去污剂(也称为"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,这也允许配制剂暴露于剪切表面应力而不会导致蛋白质变性。合适的非离子表面活性剂包括聚山梨醇酯(20、80等)、泊洛沙姆(184、188等)和普朗尼克多元醇。非离子表面活性剂可以约0.05mg/mL至约1.0mg/mL,例如约0.07mg/mL至约0.2mg/mL的范围存在。

[0331] 额外杂项赋形剂包括增容剂(例如,淀粉)、螯合剂(例如,EDTA)、抗氧化剂(例如,抗坏血酸、甲硫氨酸、维生素E)和助溶剂。

[0332] 本公开的MBM前蛋白和串联Fab MBM可配制为包含MBM前蛋白或串联Fab MBM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MBM前蛋白和串联Fab MBM的药物或无菌组合物,MBM前蛋白或串联Fab MBM制剂可与一种或多种药学上可接受的赋形剂或载剂组合。

[0333] 例如,可通过将MBM前蛋白或串联Fab MBM与呈例如冻干的粉末、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MBM前蛋白和串联Fab MBM的配制剂(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 Wlkins,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.)。

[0334] 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)。

[0335] 本公开的组合物还可使用本领域已知的一种或多种方法通过一种或多种施用途径来施用。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。MBM前蛋白

和串联Fab MBM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。一般施用可代表除了肠内和外用施用以外的施用方式(通常通过注射进行施用),并且包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、气管内、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注。替代地,本公开的组合物可通过非一般途径施用,诸如外用、表皮或粘膜施用途径,例如鼻内、口服、阴道、直肠、舌下或外用。在一个实施例中,通过输注施用MBM前蛋白和串联Fab MBM。在另一个实施例中,皮下施用本公开的MBM前蛋白或串联Fab MBM。

[0336] 6.14.治疗适应症和治疗方法

[0337] 本公开的MBM前蛋白和串联Fab MBM可用于治疗表达TAA的任何增殖性病症(例如,癌症)。在特定实施例中,癌症为急性淋巴细胞性白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(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)、慢性髓细胞性白血病(CML)、慢性骨髓增殖性肿瘤、结肠癌、结直肠癌、颅咽管瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、导管癌、胚胎性癌、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(Ewing sarcoma)、眼癌、生殖细胞瘤、胆囊癌、胃癌、胃肠道类癌、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(histiocytosis)、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(Kaposi sarcoma)、肾癌、朗格汉斯细胞组织细胞增生症(Langerhans cell histiocytosis)、喉癌、白血病、唇癌和口腔癌、肝癌、小叶原位癌、肺癌、淋巴瘤、巨球蛋白血症(macroglobulinemia)、恶性纤维组织细胞瘤、黑色素瘤、默克尔细胞癌(Merkel cell carcinoma)、间皮瘤、伴有隐匿性原发性的转移性鳞状颈癌、涉及NUT基因的中线癌、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、鼻腔和鼻旁窦癌、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、咽喉癌、嗜铬细胞瘤、垂体肿瘤、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、肾盂和输尿管癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌样瘤、唾液腺癌、塞扎里综合征(Sezary syndrome)、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、畸胎样瘤、睾丸癌、喉癌、胸腺瘤和胸腺癌、甲状腺癌、尿道癌、子宫癌、阴道癌、外阴癌或威尔姆斯肿瘤(Wilms tumor)。

[0338] 下表K显示了可使用靶向特定TAA的MBM前蛋白和串联Fab MBM的示例性适应症。

[0339]

表 K 肿瘤相关抗原适应症的实例	
靶标	**示例性适应症**
ADRB3	尤文氏肉瘤
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、头颈部鳞状癌
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。在一个优选实施例中，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*，

[0340]

表 K 肿瘤相关抗原适应症的实例	
靶标	**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。在一个优选实施例中，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、头颈部小细胞癌
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*，霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤，*例如* DLBCL）；多发性骨髓瘤。在一个优选实施例中，适应症是 AML。
CS1 (SLAMF7)	多发性骨髓瘤
EGFR	肺鳞状细胞癌、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	卡波西氏肉瘤、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*，霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤，*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	尤文氏肉瘤、前列腺肉瘤、肾和肺肉瘤
GPRC5D	多发性骨髓瘤

[0341]

表 K 肿瘤相关抗原适应症的实例	
靶标	**示例性适应症**
HAVCR1	肾癌
HER2	胃食管结合部 HER-2 (+)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	骨髓性白血病、卡波西氏肉瘤、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、霍奇金氏淋巴瘤、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
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、威尔姆斯肿瘤、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
o-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	髓单核细胞白血病、慢性骨髓性白血病、急性髓细胞性白血病、急性淋巴细胞性白血病
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	转移癌、慢性淋巴细胞白血病、肺实体瘤、乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、胰腺癌、肉瘤
SLC34A2	膀胱癌
SLC39A6	乳腺癌、食管癌
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

[0342]

表K 肿瘤相关抗原适应症的实例	
靶标	**示例性适应症**
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，优选前列腺癌
TACSTD2	癌，*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

[0343] 额外TAA和对应适应症公开于例如Hafeez等人,2020,Molecules 25:4764,doi:10.3390/molecules25204764中,特别是在表1中。表1通过对其援引以其全文并入此处。

[0344] 7.编号的实施例

[0345] 尽管已经说明和描述了各种具体实施例,但应当了解,在不脱离本公开的精神和范围的情况下可在其中进行各种改变。本公开是通过下文阐述的编号的实施例来举例说明。

[0346] 在随后编号的实施例中,TAA ABS优选与哺乳动物TAA结合,TCE ABS优选与哺乳动物TCE结合,Fc结构域优选源自哺乳动物抗体,并且受试者优选是哺乳动物。更优选地,哺乳动物是人。

[0347] 本公开是通过下文阐述的第A组和第B组编号的实施例来举例说明。除非另有说明,特定组的编号的实施例中的任一个的特征经必要修改可适用于其他组的编号的实施例。

[0348] 第A组编号的实施例

[0349] 1.一种结合分子,其包含:

[0350] (a)第一Fc结构域;

[0351] (b)第二Fc结构域;以及

[0352] (c)通过蛋白酶可切割接头(PCL)连结至所述第一Fc结构域的第一抗原结合位点(ABS)的第一组分,

[0353] 其中(i)所述PCL的长度为25个或更少的氨基酸,和/或(ii)所述第一ABS在空间上受到阻碍而不能结合其靶标。

[0354] 2.根据实施例1所述的结合分子,其中所述第一ABS与其靶标的所述结合在所述PCL的蛋白酶切割后增强。

[0355] 3.根据实施例1所述的结合分子,其中所述第一ABS在所述PCL的蛋白酶切割之前在空间上受到阻碍而不能结合其靶标,并且所述空间阻碍在所述PCL的蛋白酶切割之后被释放。

[0356] 4.根据实施例1至3中任一项所述的结合分子,其中所述PCL的长度为20个或更少的氨基酸。

[0357] 5.根据实施例1至3中任一项所述的结合分子,其中所述PCL的长度为15个或更少的氨基酸。

[0358] 6.根据实施例1至3中任一项所述的结合分子,其中所述PCL的长度为10个或更少的氨基酸。

[0359] 7.根据实施例1至6中任一项所述的结合分子,其中在所述PCL的蛋白酶切割后,所述第一ABS与其靶标的结合增强至至少10倍。

[0360] 8.根据实施例1至6中任一项所述的结合分子,其中在所述PCL的蛋白酶切割后,所述第一ABS与其靶标的结合增强至至少100倍。

[0361] 9.根据实施例1至8中任一项所述的结合分子,其中所述第一ABS为Fab。

[0362] 10.根据实施例1至8中任一项所述的结合分子,其中所述第一ABS为Fv。

[0363] 11.根据实施例1至10中任一项所述的结合分子,其中所述第一组分为VH。

[0364] 12.根据实施例1至10中任一项所述的结合分子,其中所述第一组分为VL。

[0365] 13.根据实施例1至12中任一项所述的结合分子,其中所述结合分子包含至少两条多肽链,其中第一多肽链包含所述第一Fc结构域和所述第一ABS的所述第一组分,并且第二多肽链包含所述第二Fc结构域。

[0366] 14.根据实施例13所述的结合分子,其中所述第二多肽链包含所述第一ABS的第二组分。

[0367] 15.根据实施例14所述的结合分子,其中所述第一组分和所述第二组分缔合以形成所述第一ABS。

[0368] 16.根据实施例14或15所述的结合分子,其中所述第一组分为VH并且所述第二组分为VL。

[0369] 17.根据实施例16所述的结合分子,其中(1)所述第一多肽链进一步包含所述VH的CH1 C-末端,并且(2)所述第二多肽链进一步包含所述VL的CL C-末端。

[0370] 18.根据实施例13至15中任一项所述的结合分子,其进一步包含第三多肽链,所述第三多肽链包含所述第一ABS的第三组分。

[0371] 19.根据实施例1至18中任一项所述的结合分子,其为包含第二ABS的多特异性结合分子。

[0372] 20.根据实施例19所述的结合分子,其中(a)所述第一ABS为TCE ABS并且所述第二ABS为TAA ABS或(b)所述第一ABS为TAA ABS并且所述第二ABS为TCE ABS。

[0373] 21.根据实施例20所述的结合分子,其中所述第一ABS为TCE ABS。

[0374] 22.根据实施例21所述的结合分子,其中所述TCE ABS能够与CD3、TCRαβ或TCRγδ结合。

[0375] 23.根据实施例20至22中任一项所述的结合分子,其中所述TAA ABS能够与以下各项结合:

[0376] (a)第6.6节中鉴别的任何TAA;或者

[0377] (b)AFP、ALK、BAGE蛋白、BIRC5(存活蛋白)、BIRC7、β-连环蛋白、brc-abl、BRCA1、BORIS、CA9、碳酸酐酶IX、胱天蛋白酶-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、酪氨酸酶或尿路上皮特异性膜蛋白3(uroplakin-3)。

[0378] 24.根据实施例1至23中任一项所述的结合分子,其中所述第一Fc结构域和所述第二Fc结构域缔合以形成Fc异二聚体。

[0379] 25.根据实施例24所述的结合分子,其中所述Fc异二聚体包含杵臼突变,例如,其中(i)所述第一Fc结构域包含一个或多个杵突变并且所述第二Fc结构域包含一个或多个臼突变,或者(ii)所述第一Fc结构域包含一个或多个臼突变并且所述第二Fc结构域包含一个或多个杵突变。

[0380] 26.根据实施例1至25中任一项所述的结合分子,其中所述第一Fc结构域和/或所述第二Fc结构域包含星形突变。

[0381] 27.根据实施例1至26中任一项所述的结合分子,其中串联Fab是在所述PCL的蛋白酶切割之后产生。

[0382] 28.根据实施例1至26中任一项所述的结合分子,其中包含所述第一Fc结构域和所述第二Fc结构域的多特异性结合分子是在所述PCL的蛋白酶切割之后产生。

[0383] 29.根据实施例1至28中任一项所述的结合分子,其中所述PCL包含可被表A中列出的任何蛋白酶切割的底物序列。

[0384] 30.根据实施例1至29中任一项所述的结合分子,其中所述PCL包含选自表B中列出的所述底物序列的一个或多个底物序列。

[0385] 31.根据实施例1至30中任一项所述的结合分子,其中所述PCL包含选自表D中列出的序列的PCL序列中的任一个的氨基酸序列。

[0386] 32.根据实施例1至31中任一项所述的结合分子,其中所述结合分子具有图3A中描绘的构型。

[0387] 33.根据实施例1至31中任一项所述的结合分子,其中所述结合分子具有图3B中描绘的构型。

[0388] 34.根据实施例1至31中任一项所述的结合分子,其中所述结合分子具有图3C中描绘的构型。

[0389] 35.根据实施例1至31中任一项所述的结合分子,其中所述结合分子具有图3D中描绘的构型。

[0390] 36.根据实施例1至31中任一项所述的结合分子,其中所述结合分子具有图3E中描绘的构型。

[0391] 37.根据实施例1至31中任一项所述的结合分子,其中所述结合分子具有图3F中描绘的构型。

[0392] 38.根据实施例1至31中任一项所述的结合分子,其中所述结合分子具有图7中描绘的构型。

[0393] 39.根据实施例1至38中任一项所述的结合分子,其中所述第一Fc结构域和/或所述第二Fc结构域与SEQ ID NO:335、336、337和338中的任一个具有至少约90%序列同一性。

[0394] 40.根据实施例1至38中任一项所述的结合分子,其中所述第一Fc结构域和/或所述第二Fc结构域与SEQ ID NO:335、336、337和338中的任一个具有至少约95%序列同一性。

[0395] 41.根据实施例1至38中任一项所述的结合分子,其中所述第一Fc结构域和/或所述第二Fc结构域与SEQ ID NO:335、336、337和338中的任一个具有至少约95%序列同一性。

[0396] 42.根据实施例1至41中任一项所述的结合分子,其中所述第一Fc结构域和/或所述第二Fc结构域包含降低效应子功能的一个或多个氨基酸取代(例如,如第6.10.1节中所述)。

[0397] 43.根据实施例1至41中任一项所述的结合分子,其中所述第一Fc结构域和/或所述第二Fc结构域包含促进异二聚化的一个或多个氨基酸取代(例如,如第6.10.2节中所述)。

[0398] 44.一种药物组合物,其包含根据实施例1至43中任一项所述的结合分子和赋形剂。

[0399] 45.一种治疗癌症的方法,其包括向罹患癌症的受试者施用有效量的根据实施例1至43中任一项所述的结合分子或根据实施例44所述的药物组合物。

[0400] 46.根据实施例45所述的方法,其中所述癌症与由例如,如表K中所示的TAA ABS结合的表位的表达相关。

[0401] 47.一种核酸或多种核酸,其编码根据实施例1至43中任一项所述的结合分子。

[0402] 48.一种用一种或多种表达载体转染的细胞,其包含在一种或多种启动子的控制下编码根据实施例1至43中任一项所述的结合分子的一个或多个核酸序列。

[0403] 49.一种产生结合分子的方法,所述方法包括:

[0404] (a)在表达所述结合分子的条件下培养根据实施例48所述的细胞;以及

[0405] (b)从细胞培养物中回收所述结合分子。

[0406] 50.根据实施例49所述的方法,所述方法进一步包括富集所述结合分子和/或纯化所述结合分子。

[0407] 第B组编号的实施例

[0408] 1.一种多特异性结合分子(MBM)前蛋白,其包含

[0409] (a)第一Fc结构域和第二Fc结构域,其能够缔合以形成Fc区;

[0410] (b)所述第一Fc结构域和/或所述第二Fc结构域的C-末端的T细胞接合抗原结合位点(“TCE ABS”);

[0411] (c)能够与肿瘤相关抗原结合的至少一个抗原结合位点(“TAA ABS”);以及

[0412] (d)所述第一Fc结构域或所述第二Fc结构域的C-末端的蛋白酶可切割接头(PCL),其中当所述PCL处于未切割状态时,所述MBM前蛋白中的所述TAA ABS能够与其靶标结合,并且所述TCE ABS与其靶标的结合在所述PCL的蛋白酶切割后增强。

[0413] 2.根据实施例1所述的MBM前蛋白,其中所述PCL的切割释放包含所述TAA ABS和所述TCE ABS的MBM。

[0414] 3.根据实施例1或实施例2所述的MBM前蛋白,其中所述MBM前蛋白中的所述TCE ABS被抗独特型抗体掩蔽。

[0415] 4.根据实施例1或实施例2所述的MBM前蛋白,其中所述MBM前蛋白中的所述TCE ABS被所述Fc结构域在空间上阻碍与其靶标的结合。

[0416] 5.根据实施例1至4中任一项所述的MBM前蛋白,其中所述MBM包含第一和第二Fc结构域。

[0417] 6.根据实施例5所述的MBM前蛋白,其具有图1A中描绘的构型。

[0418] 7.根据实施例5所述的MBM前蛋白,其具有图1B中描绘的构型。

[0419] 8.根据实施例5所述的MBM前蛋白,其具有图1C中描绘的构型。

[0420] 9.根据实施例5所述的MBM前蛋白,其具有图3A中描绘的构型。

[0421] 10.根据实施例5所述的MBM前蛋白,其具有图3B中描绘的构型。

[0422] 11.根据实施例5所述的MBM前蛋白,其具有图3C中描绘的构型。

[0423] 12.根据实施例5所述的MBM前蛋白,其具有图3D中描绘的构型。

[0424] 13.根据实施例5所述的MBM前蛋白,其具有图3E中描绘的构型。

[0425] 14.根据实施例5所述的MBM前蛋白,其具有图3F中描绘的构型。

[0426] 15.根据实施例1至4中任一项所述的MBM前蛋白,其中所述MBM缺乏第一和第二Fc结构域。

[0427] 16.根据实施例15所述的MBM前蛋白,其具有图5中描绘的构型。

[0428] 17.根据实施例15所述的MBM前蛋白,其具有图7中描绘的构型。

[0429] 18.一种多特异性结合分子(MBM)前蛋白,其任选地为根据实施例1至8中任一项所述的MBM,其包含:

[0430] (a)第一多肽链,其在N-末端至C-末端方向上包含:

[0431] (i)任选的第一接头;

[0432] (ii)第一Fc结构域;

[0433] (iii)第二接头;以及

[0434] (iv)T细胞接合抗原结合位点(“TCE ABS”)或其组分;以及

[0435] (b)第二多肽链,其在N-末端至C-末端方向上包含:

[0436] (i)任选的第三接头;

[0437] (ii)第二Fc结构域,其能够与所述第一Fc结构域异二聚化以形成Fc异二聚体;

[0438] (iii)第四接头,其为蛋白酶可切割接头(“PCL”);以及

[0439] (iv)抗原结合位点,其为所述TCE ABS的抗独特型(“抗TCE ABS”)或其组分,

[0440] 其中所述第一多肽链和/或第二多肽链包含能够与肿瘤相关抗原结合的抗原结合位点(“TAA ABS”)或其组分。

[0441] 19.根据实施例18所述的MBM前蛋白,其中所述TAA ABS、TCE ABS和抗TCE ABS呈Fab的形式,并且其中所述TAA ABS链、TCE ABS链和抗TCE ABS链包含与单独的多肽链上的其各自的VL结构域缔合的VH结构域。

[0442] 20.根据实施例18所述的MBM前蛋白,其中所述VL结构域为通用轻链VL结构域。

[0443] 21.根据实施例1至18中任一项所述的MBM前蛋白,其中所述抗TCE ABS呈scFv的形式。

[0444] 22.根据实施例1至18中任一项所述的MBM前蛋白,其中所述抗TCE ABS呈VHH的形式。

[0445] 23.根据实施例1至18中任一项所述的MBM前蛋白,其中所述抗TCE ABS呈VH的形式。

[0446] 24.根据实施例18至20中任一项所述的MBM前蛋白,其中除了所述PCL之外的所述接头是不可切割接头(“NCL”)。

[0447] 25.一种多特异性结合分子(MBM)前蛋白,其任选地为根据实施例1至5和9至14中任一项所述的MBM,其包含:

[0448] (a)第一多肽链,其在N-末端至C-末端方向上包含:

[0449] (i)任选的第一接头;

[0450] (ii)第一Fc结构域;

[0451] (iii)第二接头;以及

[0452] (iv)包含VH的T细胞接合抗原结合位点(“TCE ABS”)组分;

[0453] (b)第二多肽链,其在N-末端至C-末端方向上包含:

[0454] (i)任选的第三接头;

[0455] (ii)第二Fc结构域,其能够与所述第一Fc结构域异二聚化以形成Fc异二聚体;

[0456] (iii)第四接头;以及

[0457] (iv)包含VL的T细胞接合抗原结合位点(“TCE ABS”)组分,其中(A)所述第二接头或第四接头为蛋白酶可切割接头(“PCL”),(B)所述第一多肽链和/或第二多肽链包含能够与肿瘤相关抗原结合的抗原结合位点(“TAA ABS”),和(C)所述TCE ABS与其靶标的结合在空间上受到阻碍。

[0458] 26.根据实施例25所述的MBM前蛋白,其中所述TCE ABS为Fab。

[0459] 27.根据实施例26所述的MBM前蛋白,其中所述第一多肽链包含所述TCE ABS的所述VH的C-末端的CH1结构域,并且所述第二多肽链包含所述TCE ABS的所述VL的C-末端的CL结构域。

[0460] 28.根据实施例25所述的MBM前蛋白,其中所述TCE ABS为Fv。

[0461] 29.根据实施例28所述的MBM前蛋白,其中所述第一多肽链缺乏所述TCE ABS的所述VH的C-末端的CH1结构域,并且所述第二多肽链缺乏所述TCE ABS的所述VL的C-末端的CL结构域。

[0462] 30.根据实施例25至29中任一项所述的MBM前蛋白,其中所述TAA ABS呈Fab的形式,并且其中所述TAA ABS链各自包含与单独的多肽链上的其各自的VL结构域缔合的VH结构域。

[0463] 31.根据实施例30所述的MBM前蛋白,其中单独的多肽链上的所述VL结构域为通用轻链VL结构域。

[0464] 32.根据实施例25至31中任一项所述的MBM前蛋白,其中除了所述PCL之外的所述接头是不可切割接头(“NCL”)。

[0465] 33.根据实施例25至32中任一项所述的MBM前蛋白,其中所述第二接头或第四接头为25个或更少的氨基酸、20个或更少的氨基酸、15个或更少的氨基酸或者10个或更少的氨基酸。

[0466] 34.一种多特异性结合分子(MBM)前蛋白,其任选地为根据实施例1至8、15和16中任一项所述的MBM,其包含:

[0467] (a)第一多肽链,其在N-末端至C-末端方向上包含:

[0468] (i)任选的第一接头;

[0469] (ii)第一Fc结构域;

[0470] (iii)第二接头;以及

[0471] (iv)抗原结合位点,其为所述第二多肽链的所述TCE ABS的抗独特型("抗TCE ABS")或其组分;以及

[0472] (b)第二多肽链,其在N-末端至C-末端方向上包含:

[0473] (i)任选的第三接头;

[0474] (ii)第二Fc结构域,其能够与所述第一Fc结构域异二聚化以形成Fc异二聚体;

[0475] (iii)第四接头,其为蛋白酶可切割接头("PCL");

[0476] (iv)T细胞接合抗原结合位点("TCE ABS")或其组分;

[0477] (v)任选的第五接头;以及

[0478] (vi)能够与肿瘤相关抗原结合的抗原结合位点("TAA ABS")或其组分。

[0479] 35.根据实施例34所述的MBM前蛋白,其中所述TAA ABS、TCE ABS和抗TCE ABS呈Fab的形式,并且其中所述TAA ABS链、TCE ABS链和抗TCE ABS链包含与单独的多肽链上的其各自的VL结构域缔合的VH结构域。

[0480] 36.根据实施例35所述的MBM前蛋白,其中所述VL结构域为通用轻链VL结构域。

[0481] 37.根据实施例34所述的MBM前蛋白,其中所述抗TCE ABS呈scFv的形式。

[0482] 38.根据实施例34所述的MBM前蛋白,其中所述抗TCE ABS呈VHH的形式。

[0483] 39.根据实施例34所述的MBM前蛋白,其中所述抗TCE ABS呈VH的形式。

[0484] 40.根据实施例34至39中任一项所述的MBM前蛋白,其中除了所述PCL之外的所述接头是不可切割接头("NCL")。

[0485] 41.一种多特异性结合分子(MBM)前蛋白,其任选地为根据实施例1至4、15和17中任一项所述的MBM,其包含:

[0486] (a)第一多肽链,其在N-末端至C-末端方向上包含:

[0487] (i)任选的第一接头;

[0488] (ii)第一Fc结构域;

[0489] (iii)第二接头,其为蛋白酶可切割接头("PCL");以及

[0490] (iv)包含VH的T细胞接合抗原结合位点("TCE ABS")组分;

[0491] (b)第二多肽链,其在N-末端至C-末端方向上包含:

[0492] (i)任选的第三接头;

[0493] (ii)第二Fc结构域,其能够与所述第一Fc结构域异二聚化以形成Fc异二聚体;

[0494] (iii)第四接头,其为蛋白酶可切割接头("PCL");以及

[0495] (iv)包含VL的T细胞接合抗原结合位点("TCE ABS")组分,其中所述第一多肽链或第二多肽链包含所述TCE ABS链的C-末端的能够与肿瘤相关抗原结合的抗原结合位点("TAA ABS")或其组分。

[0496] 42.根据实施例41所述的MBM前蛋白,其中所述TCE ABS为Fab。

[0497] 43.根据实施例42所述的MBM前蛋白,其中所述第一多肽链包含所述TCE ABS的所述VH的C-末端的CH1结构域,并且所述第二多肽链包含所述TCE ABS的所述VL的C-末端的CL结构域。

[0498] 44.根据实施例41所述的MBM前蛋白,其中所述TCE ABS为Fv。

[0499] 45.根据实施例44所述的MBM前蛋白,其中所述第一多肽链缺乏所述TCE ABS的所述VH的C-末端的CH1结构域,并且所述第二多肽链缺乏所述TCE ABS的所述VL的C-末端的CL结构域。

[0500] 46.根据实施例41至45中任一项所述的MBM前蛋白,其中所述TAA ABS呈Fab的形式,并且其中所述TAA ABS链包含与单独的多肽链上的VL结构域缔合的VH结构域。

[0501] 47.根据实施例46所述的MBM前蛋白,其中单独的多肽链上的所述VL结构域为通用轻链VL结构域。

[0502] 48.根据实施例41至47中任一项所述的MBM前蛋白,其中除了所述PCL之外的所述接头是不可切割接头(“NCL”)。

[0503] 49.根据实施例41至48中任一项所述的MBM前蛋白,其中所述第二接头或第四接头为25个或更少的氨基酸、20个或更少的氨基酸、15个或更少的氨基酸或者10个或更少的氨基酸。

[0504] 50.根据实施例1至49中任一项所述的MBM前蛋白,其中每个PCL包含可被表A中列出的任何蛋白酶切割的底物序列。

[0505] 51.根据实施例1至50中任一项所述的MBM前蛋白,其中每个PCL包含选自表B中列出的所述底物序列的一个或多个底物序列。

[0506] 52.根据实施例1至51中任一项所述的MBM前蛋白,其中每个PCL包含选自表C中列出的所述底物序列的一个或多个间隔子序列,任选地其中所述PCL包含以下氨基酸序列中的任一种或由以下氨基酸序列中的任一种组成:

[0507] (a)GGGGSGGGGSGGGGSISSGLLSGRSDNHGGSGGS(SEQ ID NO:205);

[0508] (b)GGGGSGGGGSGGGGSVPLSLYSGGGSGGSGGSGS(SEQ ID NO:206);

[0509] (c)ISSGLLSGRSDNH(SEQ ID NO:230);以及

[0510] (d)具有1-5个氨基酸取代的前述中的任一种的变体。

[0511] 53.根据实施例1至52中任一项所述的MBM前蛋白,其中每个PCL包含选自表D中列出的底物序列的PCL序列中的任一个的氨基酸序列。

[0512] 54.根据实施例1至53中任一项所述的MBM前蛋白,其中除了所述PCL之外的分子中的所有接头是不可切割接头(“NCL”)。

[0513] 55.根据实施例54所述的MBM前蛋白,其中所述NCL选自表E。

[0514] 56.根据实施例1至55中任一项所述的MBM前蛋白,其中所述TAA ABS能够与以下各项结合:

[0515] (a)第4.5节中鉴别的任何TAA;或者

[0516] (b)AFP、ALK、BAGE蛋白、BIRC5(存活蛋白)、BIRC7、β-连环蛋白、brc-abl、BRCA1、BORIS、CA9、碳酸酐酶IX、胱天蛋白酶-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、酪氨酸酶或尿路上皮特异性膜蛋白3。

[0517] 57.根据实施例1至56中任一项所述的MBM前蛋白,其中所述TAA ABS(a)包含表F中列出的抗体的(i)CDR或者(ii)VH和VL序列或(b)与表F中列出的抗体竞争与所述TAA结合。

[0518] 58.根据实施例1至57中任一项所述的MBM前蛋白,其中所述TAA为CEACAM5。

[0519] 59.根据实施例1至57中任一项所述的MBM前蛋白,其中所述TAA为EpCAM。

[0520] 60.根据实施例1至57中任一项所述的MBM前蛋白,其中所述TAA为HER2。

[0521] 61.根据实施例1至5571中任一项所述的MBM前蛋白,其中所述TAA为PMSA。

[0522] 62.根据实施例1至57中任一项所述的MBM前蛋白,其中所述TAA为STEAP2。

[0523] 63.根据实施例1至57中任一项所述的MBM前蛋白,其中所述TAA为EGFR。

[0524] 64.根据实施例1至57中任一项所述的MBM前蛋白,其中所述TCE ABS能够与所述T细胞受体(TCR)复合物的组分结合。

[0525] 65.根据实施例64所述的MBM前蛋白,其中所述TCR复合物的所述组分为CD3。

[0526] 66.根据实施例64所述的MBM前蛋白,其中所述TCR复合物的所述组分为TCRαβ。

[0527] 67.根据实施例64所述的MBM前蛋白,其中所述TCR复合物的所述组分为TCRγδ。

[0528] 68.根据实施例1至67中任一项所述的MBM前蛋白,其中所述TCE ABS(a)包含表G中列出的抗体的(i)CDR或者(ii)VH和VL序列或(b)与表G中列出的抗体竞争与其靶标结合。

[0529] 69.根据实施例1至68中任一项所述的MBM前蛋白,其在PCL的蛋白酶切割后产生双特异性结合分子(“BBM”)。

[0530] 70.根据实施例69所述的MBM前蛋白,其中所述BBM是二价的。

[0531] 71.根据实施例69所述的MBM前蛋白,其中所述BBM是三价的。

[0532] 72.根据实施例1至71中任一项所述的MBM前蛋白,其中所述Fc区是异二聚的。

[0533] 73.根据实施例72所述的MBM前蛋白,其中Fc异二聚体包含杵臼突变。

[0534] 74.根据实施例1至72中任一项所述的MBM前蛋白,其中与野生型Fc结构域相比,至少一个Fc结构域包含星形突变。

[0535] 75.根据实施例1至74中任一项所述的MBM前蛋白,其中所述TCE ABS包含在N-末端处具有一个或多个氨基酸缺失的VL。

[0536] 76.根据实施例1至74中任一项所述的MBM前蛋白,其中所述TCE ABS包含在N-末端处具有一个或多个氨基酸缺失的VH。

[0537] 77.根据实施例1至76中任一项所述的MBM前蛋白,其中相对于野生型Fc结构域,所述第一Fc结构域包含C-末端处的一个或多个氨基酸的缺失。

[0538] 78.根据实施例77所述的MBM前蛋白,其中相对于野生型Fc结构域,所述第一Fc结构域包含C-末端处的1个氨基酸的缺失。

[0539] 79.根据实施例77所述的MBM前蛋白,其中相对于野生型Fc结构域,所述第一Fc结

构域包含C-末端处的2个氨基酸的缺失。

[0540] 80.根据实施例77所述的MBM前蛋白,其中相对于野生型Fc结构域,所述第一Fc结构域包含C-末端处的3个氨基酸的缺失。

[0541] 81.根据实施例77所述的MBM前蛋白,其中相对于野生型Fc结构域,所述第一Fc结构域包含C-末端处的4个氨基酸的缺失。

[0542] 82.根据实施例77所述的MBM前蛋白,其中相对于野生型Fc结构域,所述第一Fc结构域包含C-末端处的5个氨基酸的缺失。

[0543] 83.根据实施例77所述的MBM前蛋白,其中相对于野生型Fc结构域,所述第一Fc结构域包含C-末端处的6个氨基酸的缺失。

[0544] 84.根据实施例1至83中任一项所述的MBM前蛋白,其中相对于野生型Fc结构域,所述第二Fc结构域包含C-末端处的一个或多个氨基酸的缺失。

[0545] 85.根据实施例84所述的MBM前蛋白,其中相对于野生型Fc结构域,所述第二Fc结构域包含C-末端处的1个氨基酸的缺失。

[0546] 86.根据实施例84所述的MBM前蛋白,其中相对于野生型Fc结构域,所述第二Fc结构域包含C-末端处的2个氨基酸的缺失。

[0547] 87.根据实施例84所述的MBM前蛋白,其中相对于野生型Fc结构域,所述第二Fc结构域包含C-末端处的3个氨基酸的缺失。

[0548] 88.根据实施例84所述的MBM前蛋白,其中相对于野生型Fc结构域,所述第二Fc结构域包含C-末端处的4个氨基酸的缺失。

[0549] 89.根据实施例84所述的MBM前蛋白,其中相对于野生型Fc结构域,所述第二Fc结构域包含C-末端处的5个氨基酸的缺失。

[0550] 90.根据实施例84所述的MBM前蛋白,其中相对于野生型Fc结构域,所述第二Fc结构域包含C-末端处的6个氨基酸的缺失。

[0551] 91.一种串联Fab MBM,其包含(1)第一多肽链,其从N-末端到C-末端取向包含可操作地连接至CH1结构域的TCE ABS的VH;任选的接头,例如不可切割接头;以及可操作地连接至CH1结构域的TAA ABS的VH;(2)第二多肽链,其包含可操作地连接至CL结构域的TAA ABS的VL;以及(3)第三多肽链,其包含可操作地连接至CL结构域的TCE ABS的VL。

[0552] 92.一种串联Fab MBM,其包含(1)第一多肽链,其从N-末端到C-末端取向包含(a)TCE ABS的VH;(b)CH1结构域;(c)不可切割接头;(d)TAA ABS的VH;以及(c)CH1结构域;(2)第二多肽链,其包含(a)TAA ABS的VL和(b)CL结构域;以及(3)第三多肽链,其包含(a)TCE ABS的VL和(b)CL结构域。

[0553] 93.一种包含串联Fab MBM的串联Fab MBM,其包含(1)第一多肽链,其从N-末端到C-末端取向包含可操作地连接至CH1结构域的TAA ABS的VH;任选的接头,例如不可切割接头;以及可操作地连接至CH1结构域的TCE ABS的VH;(2)第二多肽链,其包含可操作地连接至CL结构域的TAA ABS的VL;以及(3)第三多肽链,其包含可操作地连接至CL结构域的TCE ABS的VL。

[0554] 94.一种串联Fab MBM,其包含(1)第一多肽链,其从N-末端到C-末端取向包含(a)TAA ABS的VH;(b)CH1结构域;(c)不可切割接头;(d)TCE ABS的VH;以及(c)CH1结构域;(2)第二多肽链,其包含(a)TAA ABS的VL和(b)CL结构域;以及(3)第三多肽链,其包含(a)TCE

ABS的VL和(b)CL结构域。

[0555] 95.根据实施例91至94中任一项所述的串联Fab MBM,其中所述TCE ABS的所述CH1和所述TAA ABS的所述CH1是相同的。

[0556] 96.根据实施例91至95中任一项所述的串联Fab MBM,其中所述TCE ABS的所述CL和所述TAA ABS的所述CL是相同的。

[0557] 97.根据实施例91至9674中任一项所述的串联Fab MBM,其中所述TAA ABS和所述TCE ABS的所述VL是相同的并且是通用轻链VL。

[0558] 98.根据实施例91至97中任一项所述的串联Fab MBM,其中所述TAA ABS如实施例50至57中任一项所定义。

[0559] 99.根据实施例91至98中任一项所述的串联Fab MBM,其中所述TCE ABS如实施例64至68中任一项所定义。

[0560] 100.一种药物组合物,其包含根据实施例1至90中任一项所述的MBM前蛋白或根据实施例91至99中任一项所述的串联Fab MBM和赋形剂。

[0561] 101.一种治疗癌症的方法,其包括向罹患癌症的受试者施用有效量的根据实施例1至90中任一项所述的MBM前蛋白、根据实施例91至99中任一项所述的串联Fab MBM或根据实施例100所述的药物组合物。

[0562] 102.根据实施例101所述的方法,其中所述癌症与由例如,如表K中所示的TAA ABS结合的表位的表达相关。

[0563] 103.一种核酸或多种核酸,其编码根据实施例1至90中任一项所述的MBM前蛋白或根据实施例91至99中任一项所述的串联Fab MBM。

[0564] 104.一种细胞,其被工程化以表达根据实施例1至90中任一项所述的MBM前蛋白或根据实施例91至99中任一项所述的串联Fab MBM。

[0565] 105.一种用一种或多种表达载体转染的细胞,其包含在一种或多种启动子的控制下编码根据实施例1至90中任一项所述的MBM前蛋白或根据实施例91至99中任一项所述的串联Fab MBM的一个或多个核酸序列。

[0566] 106.一种产生MBM前蛋白或串联Fab MBM的方法,所述方法包括:

[0567] (a)在表达所述MBM的条件下培养根据实施例104或实施例105所述的细胞;以及

[0568] (b)从细胞培养物中回收所述MBM前蛋白或串联Fab MBM,若适用。

[0569] 107.根据实施例106所述的方法,其进一步包括富集所述MBM前蛋白或串联Fab MBM,若适用。

[0570] 108.根据实施例106或实施例107所述的方法,其进一步包括纯化所述MBM前蛋白或串联Fab MBM,若适用。

[0571] 8.实例

[0572] 8.1.实例1:接头长度对C-末端抗原结合位点的Fc掩蔽的效应

[0573] 产生具有图3B中绘示的构型的抗TAAxCD3双特异性抗体,其中Fc结构域的C-末端具有不同的接头长度(5、15和25个氨基酸),不同之处在于(参考图3B)接头B是不可切割接头。该研究的目的是确定将Fc结构域与C-末端ABS或ABS链分开的接头对ABS结合JURKAT细胞上的靶标(在本例中为CD3)的能力的效应。使用传统的双特异性抗TAAxCD3双特异性抗体作为CD3结合的对照。

[0574] 利用流式细胞术分析确定TAAxCD3双特异性抗体与JURKAT细胞的结合,接着用别藻蓝蛋白(APC)标记的抗人IgG抗体进行检测。简而言之,将1x 10^5个细胞/孔与系列稀释的抗TAAxCD3双特异性抗体一起在4℃下孵育30分钟。孵育后,用含有1%过滤的FBS的冷PBS洗涤细胞两次,并且向细胞中添加APC标记的抗人二抗,并再孵育30分钟。仅含有二抗的孔用作对照。

[0575] 孵育后,洗涤细胞,重悬于含有1%过滤的FBS的200μL冷PBS中,并且在BD FACS Canto II上通过流式细胞术进行分析。

[0576] 结果显示于图9中。如图9中所示,CD3 ABS结合其靶标的能力与接头长度相关,其中较短的接头长度使Fc的空间阻碍最大化,并且导致对CD3结合的最大抑制,而较长的接头长度更允许CD3结合(但与传统的双特异性抗体相比仍然减少)。

[0577] 8.2.实例2:Fc空间阻碍减少抗TAAxCD3双特异性抗体靶标结合

[0578] 产生具有图7中描绘的构型的抗TAAxCD3双特异性抗体,其中接头A和B为如所示的可切割接头或通过在Expi293细胞中瞬时转染被不可切割G4S接头(SEQ ID NO:1)替换。图10显示了在单步骤Pro A纯化后具有可切割接头A和B的抗TAAxCD3双特异性抗体(Fc-PCL-CD3-TAA)和不具有可切割接头A和B的抗TAAxCD3双特异性抗体(Fc-G4S-CD3-TAA)的表达。

[0579] 如第8.1节中所述,利用流式细胞术分析,评估TAAxCD3双特异性抗体与JURKAT细胞的结合。

[0580] 相对于呈IgG构型的抗TAAxCD3双特异性抗体,具有Fc空间阻碍的所有抗TAAxCD3双特异性抗体都表现出对CD3在JURKAT细胞上的结合的抑制(图11A)。在Fc的C-末端处截短4或6个氨基酸和/或在VH/VL的N-末端处截短1或2个氨基酸的类似构建体类似地抑制CD3与JURKAT细胞的结合(数据未显示)。

[0581] 9.参考文献的引用

[0582] 本申请中引用的所有出版物、专利、专利申请和其他文件出于所有目的特此通过对其援引以其全文并入,其程度就如同单独指明了每个单独的出版物、专利、专利申请或其他文件出于所有目的通过对其援引并入。如果本文并入的一篇或多篇参考文献的教导与本公开之间存在不一致,则旨在以本说明书的教导为准。

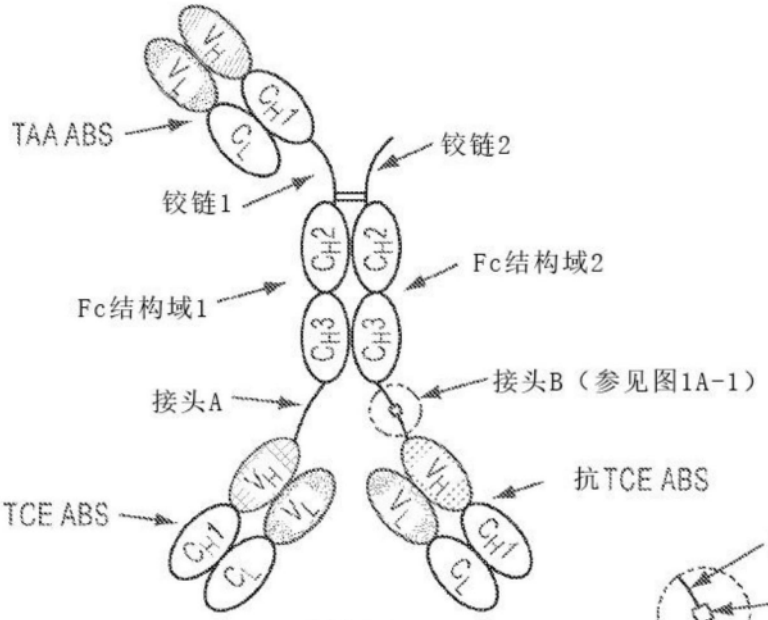


图1A

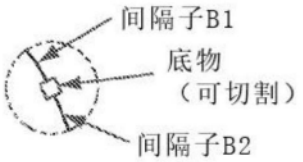


图1A-1

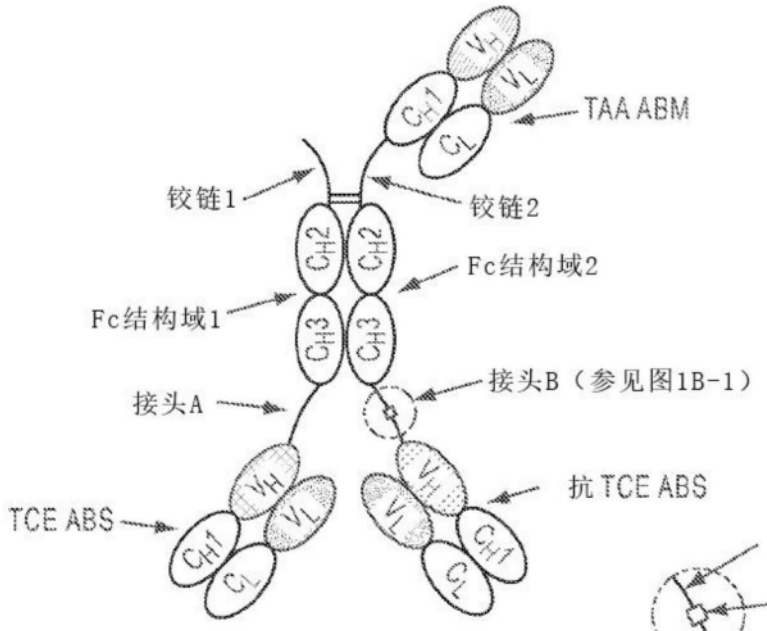


图1B

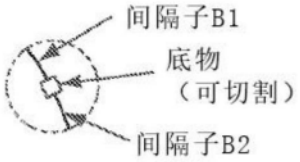


图1B-1

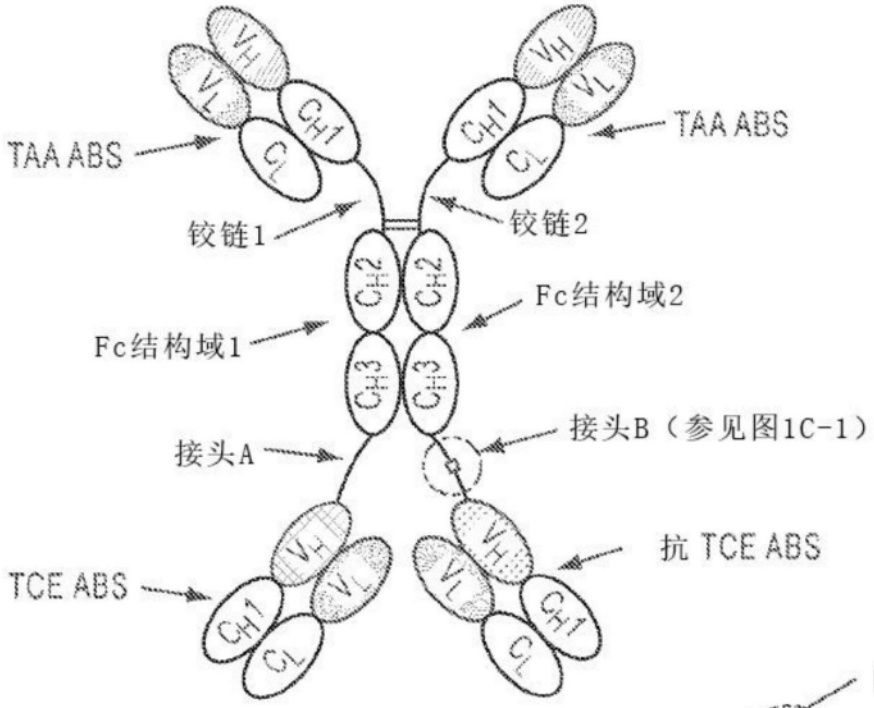

TAA ABS
TAA ABS
铰链1
铰链2
Fc结构域2
Fc结构域1
接头B（参见图1C-1）
接头A
抗 TCE ABS
TCE ABS

图1C

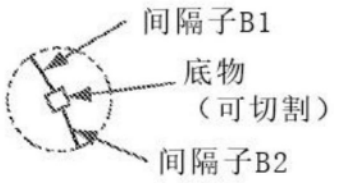

间隔子B1
底物
（可切割）
间隔子B2

图1C-1

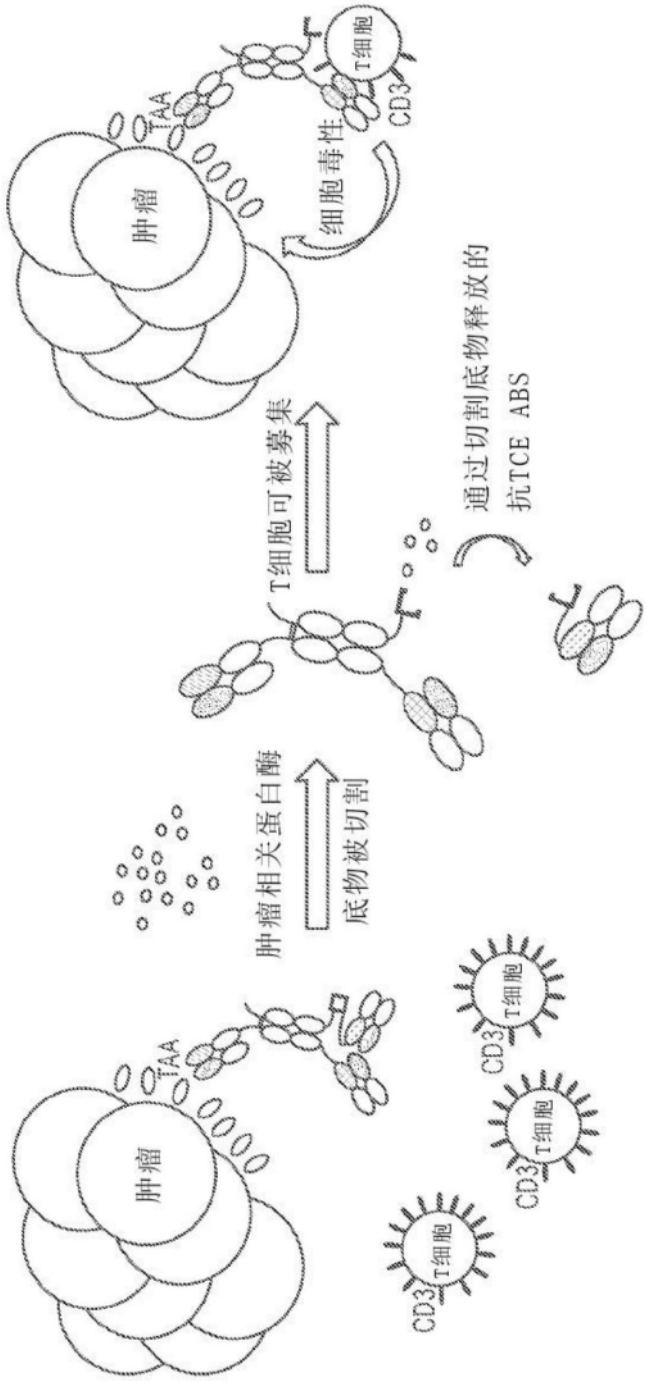

肿瘤
TAA
T细胞
CD3
细胞毒性
T细胞可被募集
通过切割底物释放的
抗TCE ABS
肿瘤相关蛋白酶
底物被切割
肿瘤
TAA
CD3
T细胞
CD3
T细胞
CD3
T细胞

图2

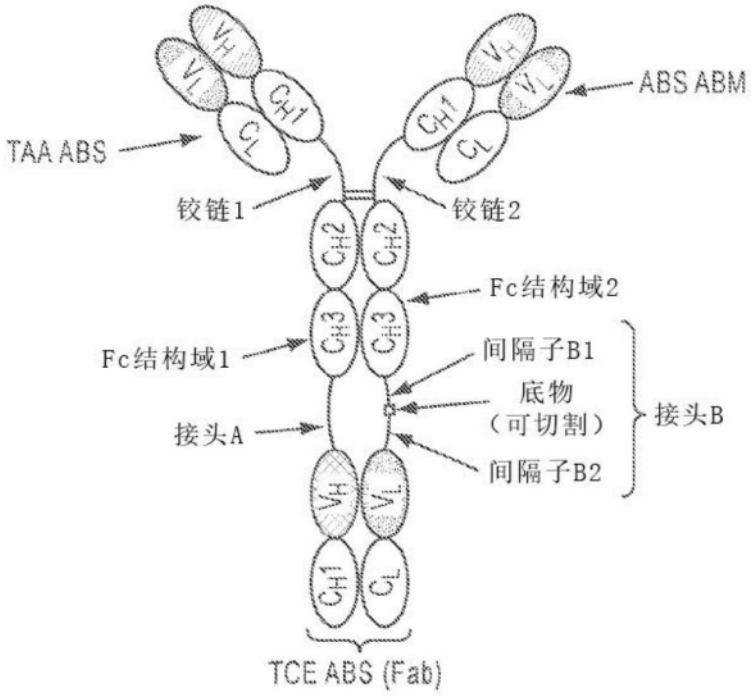

TAA ABS
ABS ABM
铰链1
铰链2
Fc结构域2
Fc结构域1
间隔子B1
底物
（可切割）
接头B
接头A
间隔子B2
TCE ABS (Fab)

图3A

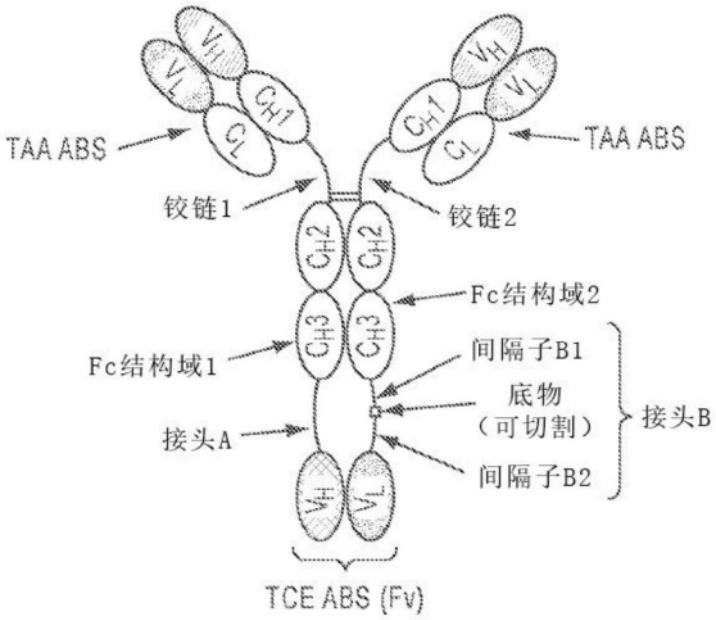

TAA ABS
TAA ABS
铰链1
铰链2
Fc结构域2
Fc结构域1
间隔子B1
底物
（可切割）
接头B
接头A
间隔子B2
TCE ABS (Fv)

图3B

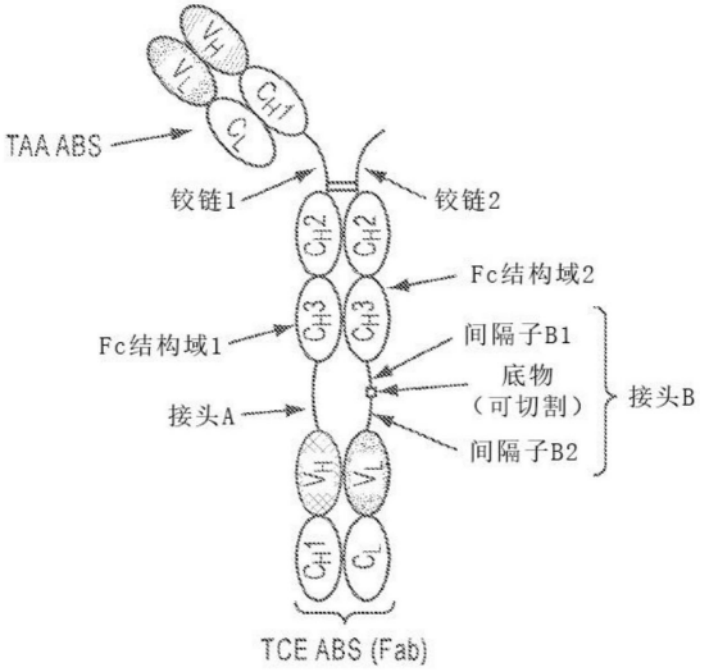

TAA ABS
铰链1
铰链2
Fc结构域2
Fc结构域1
间隔子B1
底物
（可切割）
接头B
接头A
间隔子B2
TCE ABS (Fab)

图3C

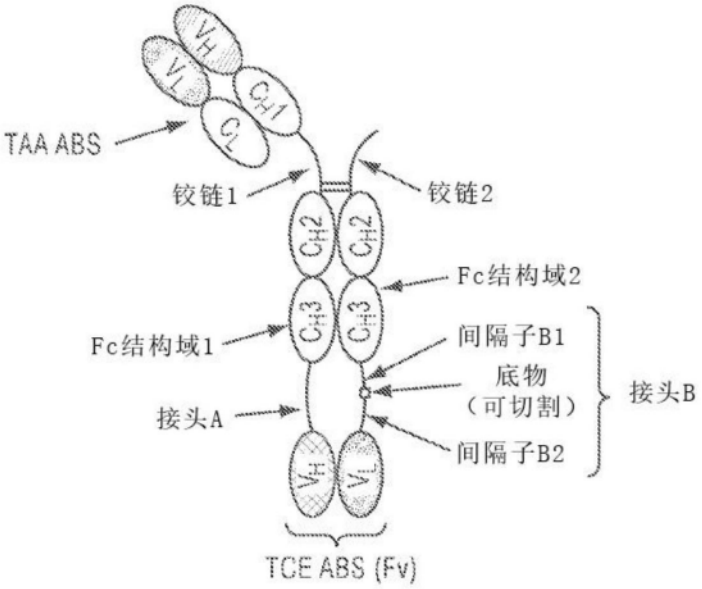

TAA ABS
铰链1
铰链2
Fc结构域2
Fc结构域1
间隔子B1
底物
（可切割）
接头B
接头A
间隔子B2
TCE ABS (Fv)

图3D

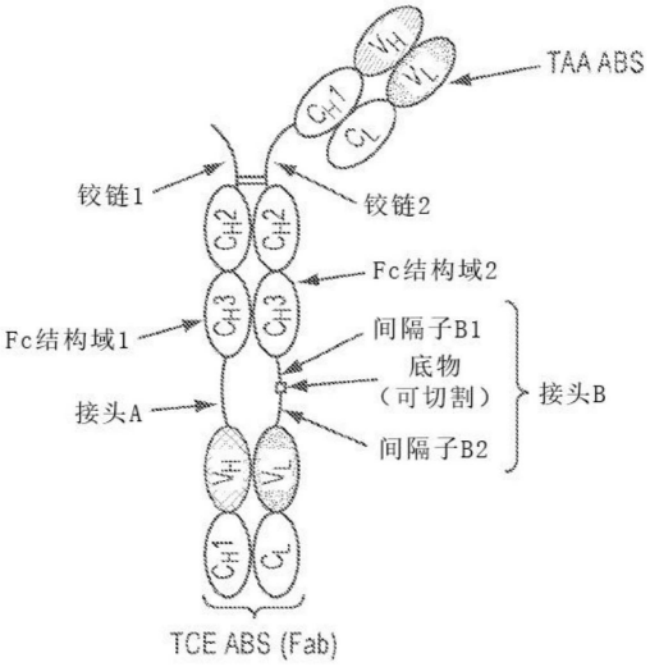

TAA ABS
铰链1
铰链2
Fc结构域2
Fc结构域1
间隔子B1
底物
（可切割）
接头B
接头A
间隔子B2
TCE ABS (Fab)

图3E

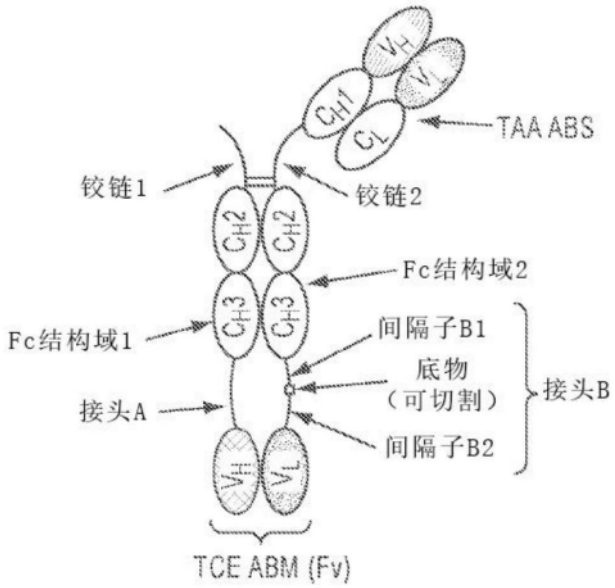

TAA ABS
铰链1
铰链2
Fc结构域2
Fc结构域1
间隔子B1
底物
（可切割）
接头B
接头A
间隔子B2
TCE ABM (Fv)

图3F

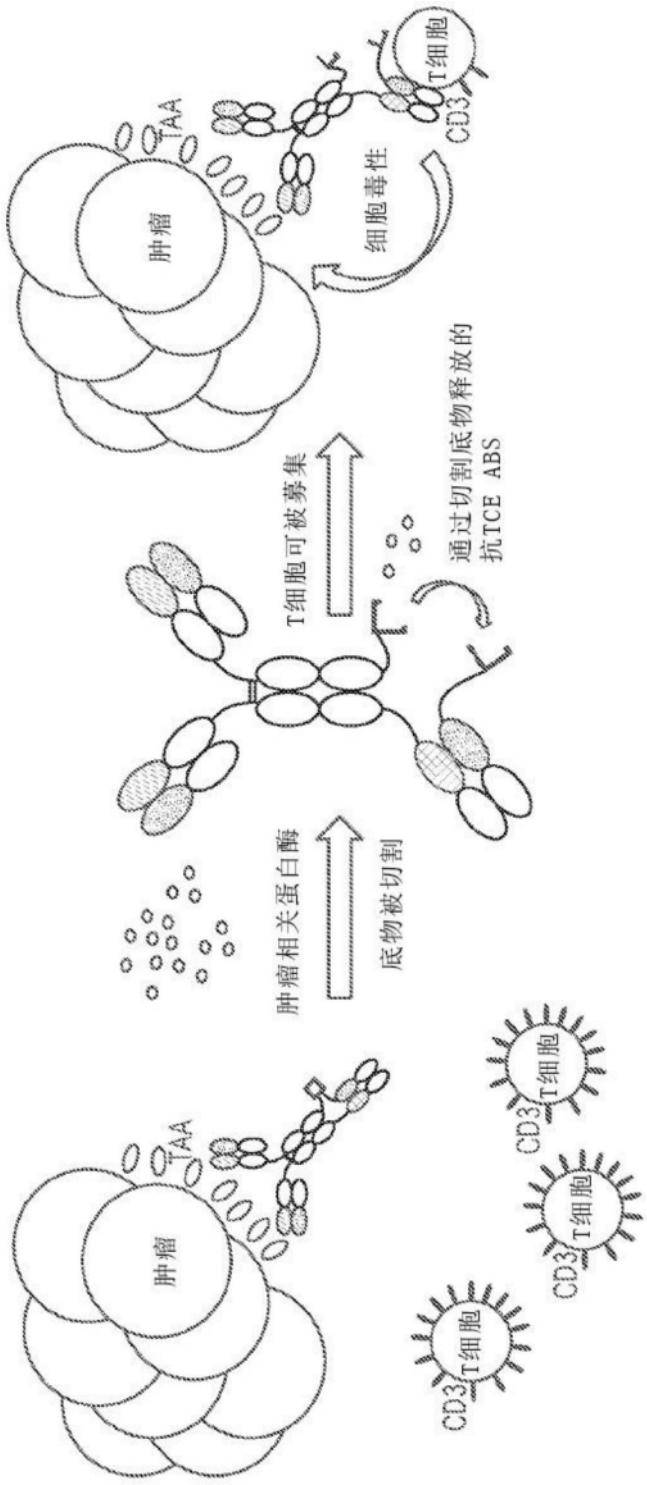

肿瘤
TAA
T细胞
CD3
细胞毒性
T细胞可被募集
通过切割底物释放的
抗TCE ABS
肿瘤相关蛋白酶
底物被切割
肿瘤
TAA
T细胞
CD3
T细胞
CD3
T细胞
CD3

图4

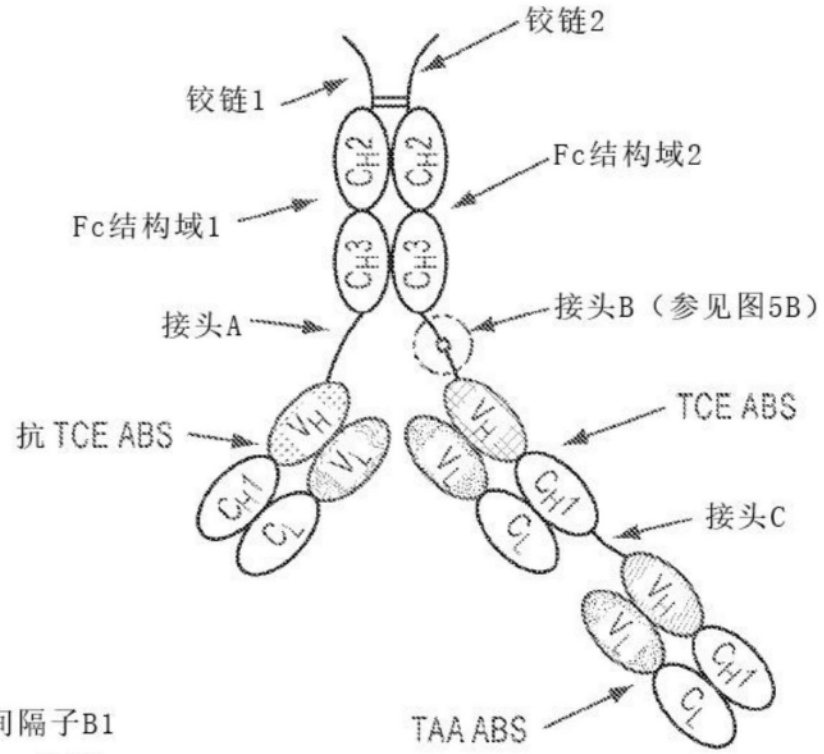

铰链2
铰链1
Fc结构域2
Fc结构域1
接头B（参见图5B）
接头A
TCE ABS
抗 TCE ABS
接头C
TAA ABS

图5A

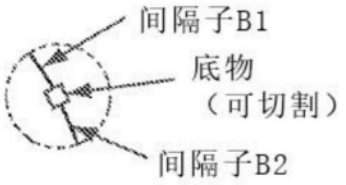

间隔子B1
底物
（可切割）
间隔子B2

图5B

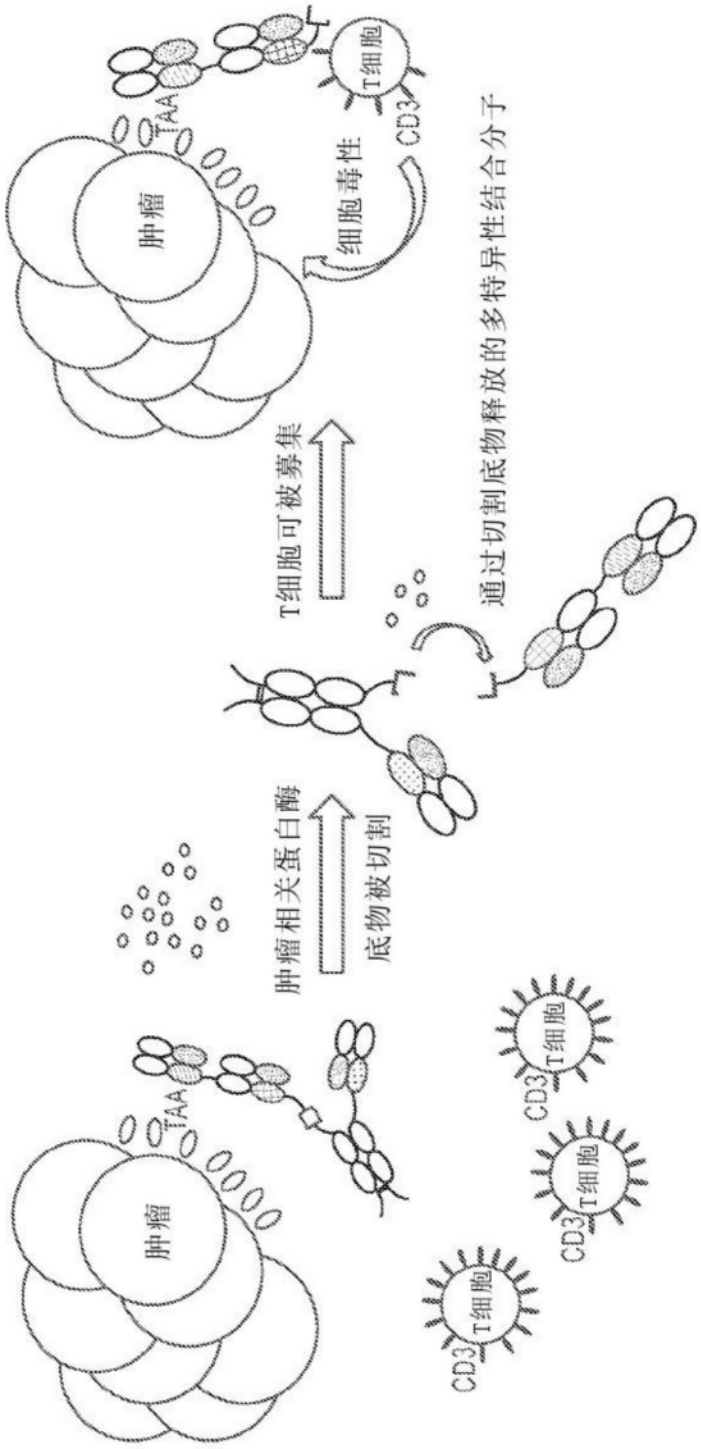

肿瘤
TAA
T细胞
CD3
细胞毒性
T细胞可被募集
通过切割底物释放的多特异性结合分子
肿瘤相关蛋白酶
底物被切割
肿瘤
TAA
CD3
T细胞
CD3
T细胞
CD3
T细胞

图6

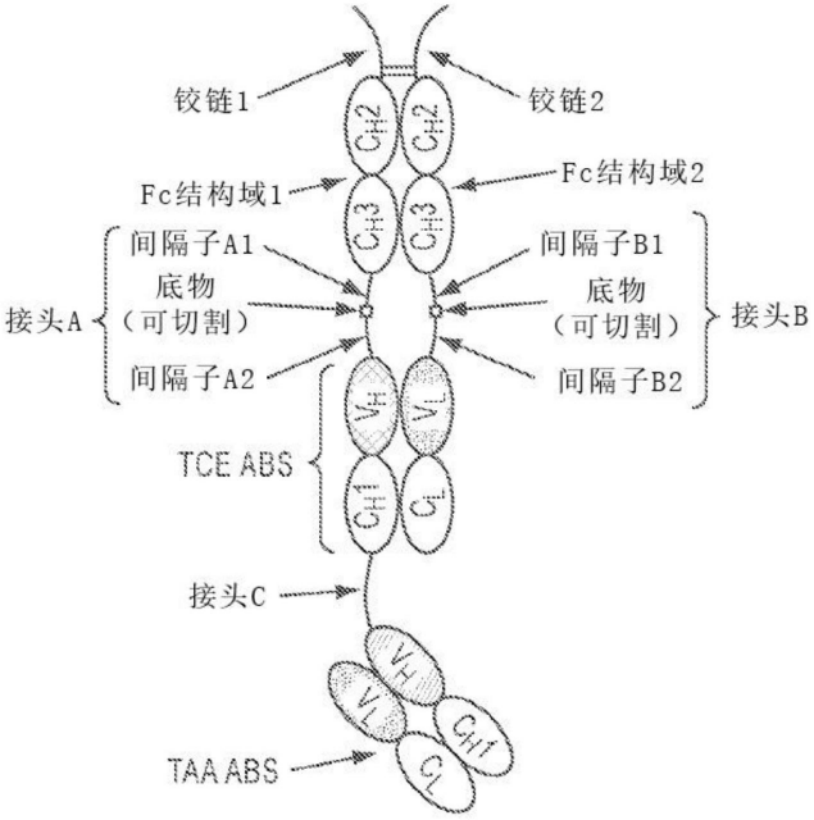

铰链1
铰链2
CH2
CH2
Fc结构域1
Fc结构域2
CH3
CH3
间隔子A1
底物
（可切割）
间隔子A2
接头A
间隔子B1
底物
（可切割）
间隔子B2
接头B
VH
VL
TCE ABS
CH1
CL
接头C
VH
VL
CH1
CL
TAA ABS

图7

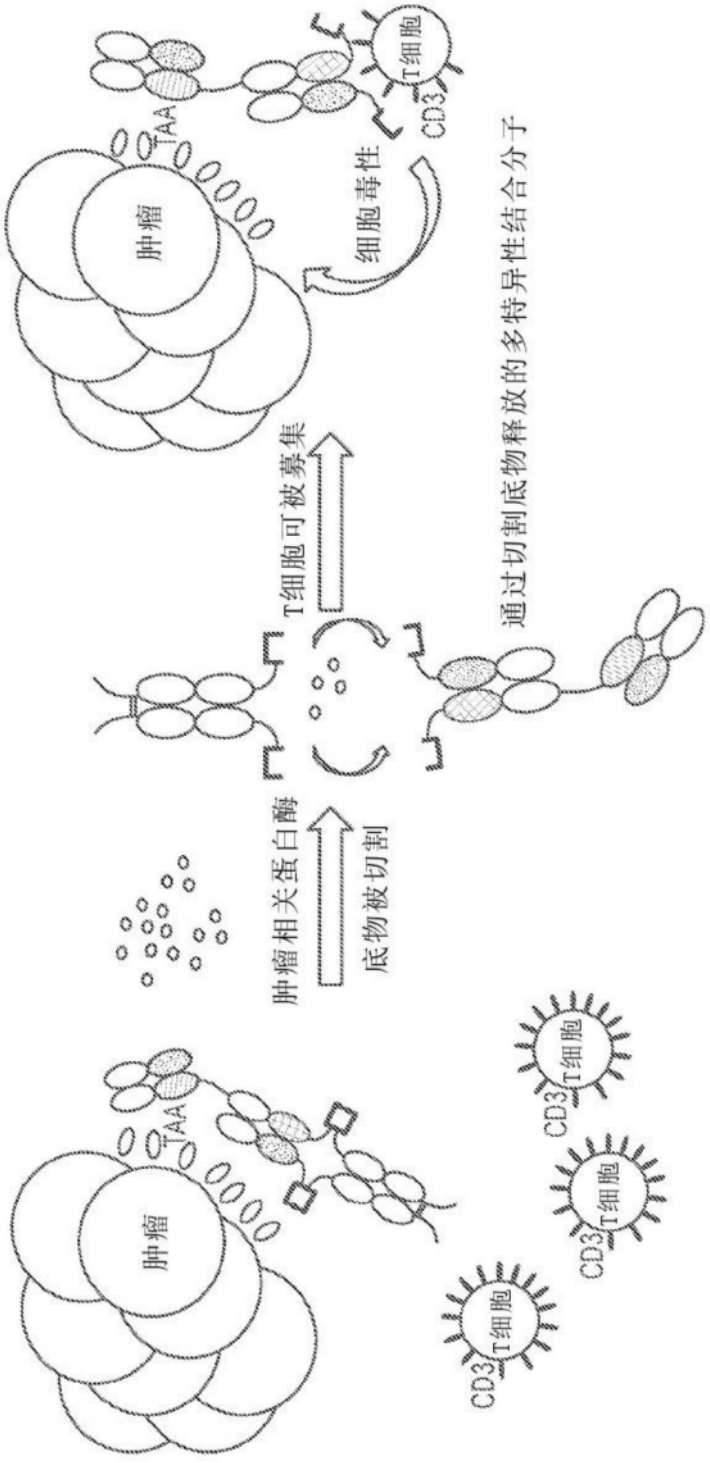

肿瘤
TAA
T细胞
CD3
细胞毒性
T细胞可被募集
通过切割底物释放的多特异性结合分子
肿瘤相关蛋白酶
底物被切割
肿瘤
TAA
CD3
T细胞
CD3
T细胞
CD3
T细胞

图8

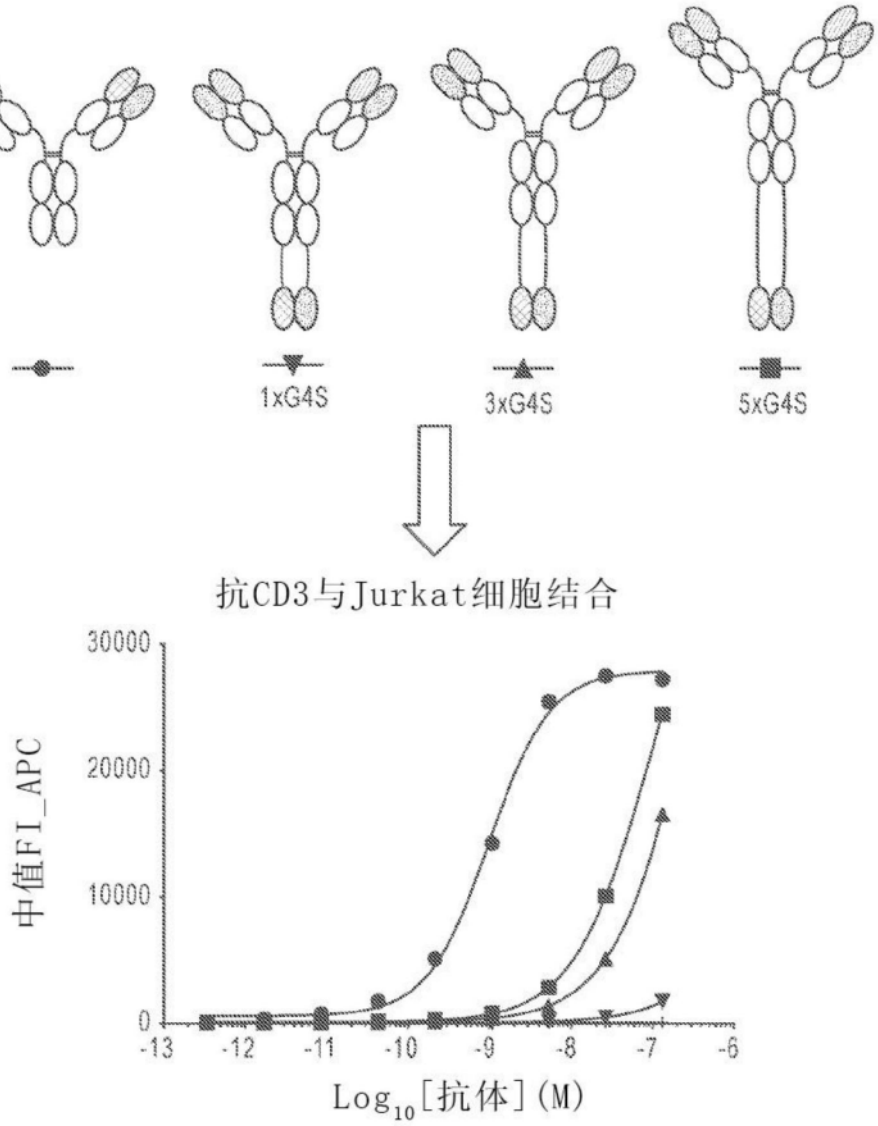
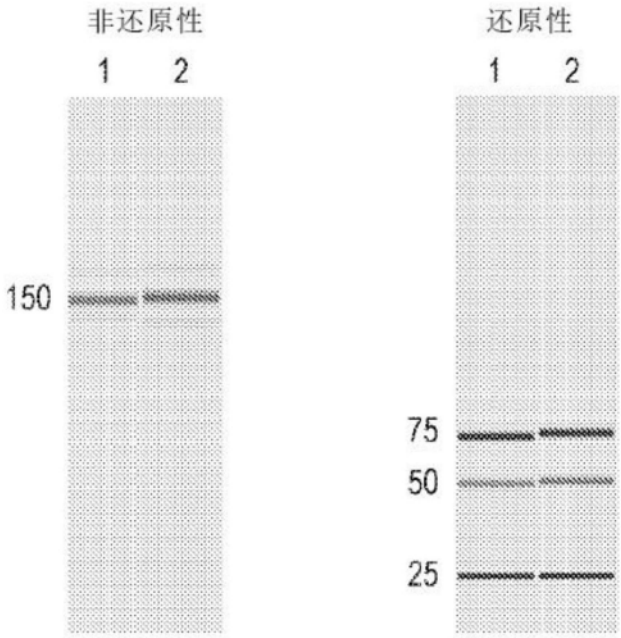

1xG4S
3xG4S
5xG4S
抗CD3与Jurkat细胞结合
中值FI_APC
30000
20000
10000
0
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
Log10[抗体](M)

图9



泳道	构建体
1	Fc-PCL-CD3-TAA
2	Fc-G4S-CD3-TAA

图10

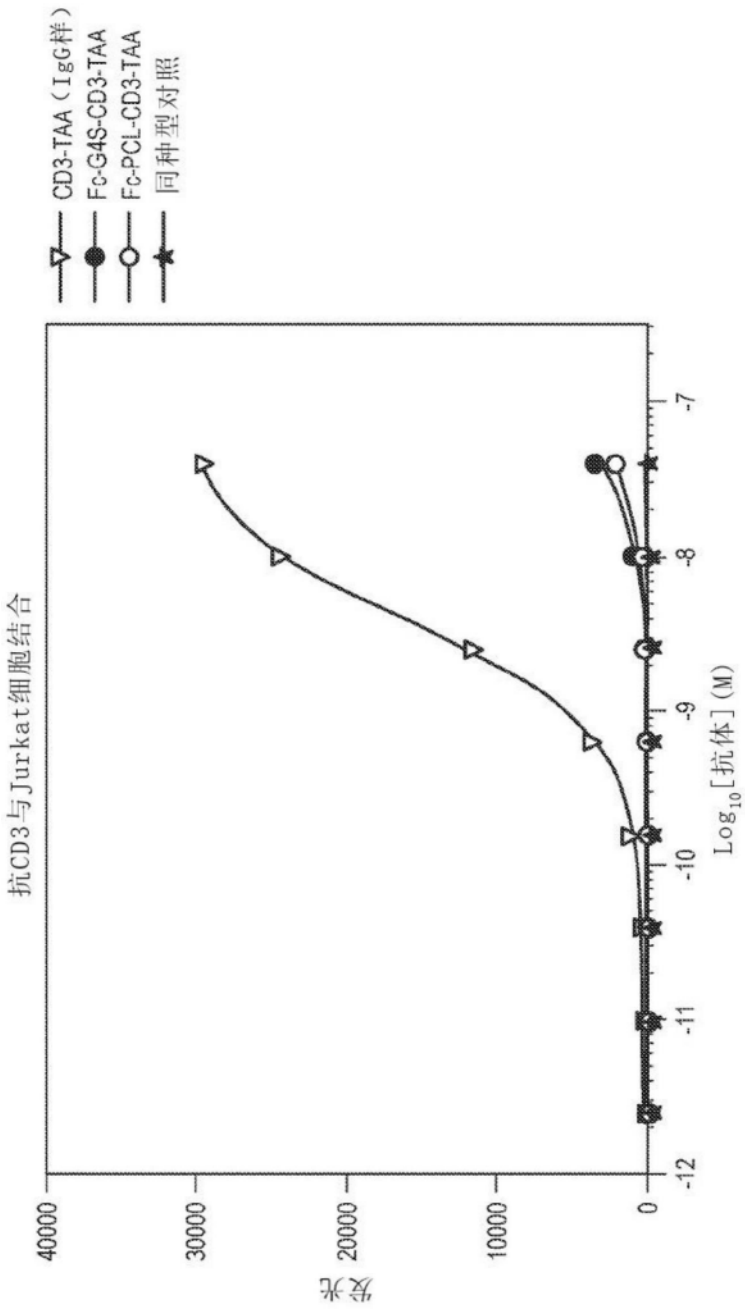

CD3-TAA（IgG样）
Fc-G4S-CD3-TAA
Fc-PCL-CD3-TAA
同种型对照
抗CD3与Jurkat细胞结合
荧光
40000
30000
20000
10000
0
-12
-11
-10
-9
-8
-7
Log10[抗体](M)

图11