



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110891605 A

(43)申请公布日 2020.03.17

(21)申请号 201880047508.3

(22)申请日 2018.06.07

(30)优先权数据

62/516,638 2017.06.07 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.01.16

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/036554 2018.06.07

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/227018 EN 2018.12.13

(71)申请人 希沃尔拜克治疗公司

地址 美国华盛顿

(72)发明人 彼得·阿姆斯特朗·汤普森

巴德尔丁·埃德里斯

克雷格·艾伦·科伯恩

彼得·罗伯特·鲍姆

瓦莱丽·奥德加德

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理  
有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.

A61K 39/395(2006.01)

A61K 47/68(2017.01)

C07K 16/28(2006.01)

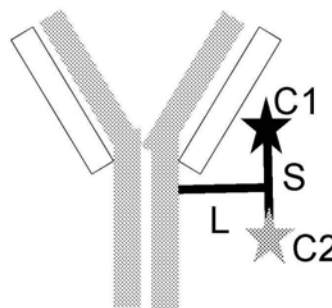
权利要求书24页 说明书158页 附图5页

(54)发明名称

免疫调节化合物的抗体缀合物及其用途

(57)摘要

本文公开了用于治疗疾病诸如纤维化疾病、自身免疫或自身炎症性疾病的免疫调节化合物的抗体缀合物和药物组合物。所公开的缀合物尤其用于诸如通过调节TGF  $\beta$  R1、TGF  $\beta$  R2、TNKS、TNIK或mTOR来治疗纤维化疾病、自身免疫疾病或自身炎症性疾病。



1. 缀合物,其包含:

a) 免疫调节化合物,其对选自以下的细胞具有活性:星形细胞、肌成纤维细胞、滑膜成纤维细胞、上皮细胞、足细胞和免疫细胞;

b) 抗体构建体,其包含第一抗原结合结构域和Fc结构域,其中:

所述第一抗原结合结构域能特异性结合第一抗原,其中所述第一抗原与选自以下的抗原具有至少80%的序列同一性:LRRC15、钙粘素11、PDPN、整联蛋白 $\alpha 4\beta 7$ 、整联蛋白 $\alpha 2\beta 1$ 、MADCAM、肾病蛋白、足蛋白、IFNAR1、BDCA2、CD30、c-KIT、FAP、CD73、CD38、PDGFR $\beta$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 1$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 3$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 8$ 、GARP、内皮唾酸蛋白、CTGF、整联蛋白 $\alpha v\beta 6$ 、CD40、PD-1、TIM-3、TNFR2、DEC205、DCIR、CD86、CD45RB、CD45RO、MHC II类、CD25、MMP14、GPX8和F2RL2;和

c) 接头,其将所述抗体构建体附接至所述免疫调节化合物,其中所述接头共价结合至所述抗体构建体并且所述接头共价结合至所述免疫调节化合物,并且任选地其中免疫调节化合物与抗体构建体的摩尔比小于8。

2. 缀合物,其包含:

a) 免疫调节化合物,其对选自以下的细胞具有活性:星形细胞、肌成纤维细胞、滑膜成纤维细胞、上皮细胞、足细胞和免疫细胞;

b) 第二化合物;

c) 包含1至100个直链非氢原子的间隔子,其共价附接至具有活性的所述免疫调节化合物和所述第二化合物;

d) 抗体构建体,其包含第一抗原结合结构域和Fc结构域,其中:

i) 所述第一抗原结合结构域能特异性结合第一抗原,其中所述第一抗原与选自以下的抗原具有至少80%的序列同一性:LRRC15、钙粘素11、PDPN、整联蛋白 $\alpha 4\beta 7$ 、整联蛋白 $\alpha 2\beta 1$ 、MADCAM、肾病蛋白、足蛋白、IFNAR1、BDCA2、CD30、c-KIT、FAP、CD73、CD38、PDGFR $\beta$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 1$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 3$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 8$ 、GARP、内皮唾酸蛋白、CTGF、整联蛋白 $\alpha v\beta 6$ 、CD40、PD-1、TIM-3、TNFR2、DEC205、DCIR、CD86、CD45RB、CD45RO、MHC II类、CD25、MMP14、GPX8和F2RL2;和

e) 接头,其将所述抗体构建体附接至所述免疫调节化合物、所述第二化合物或所述间隔子,其中所述接头共价结合至所述抗体构建体并且所述接头共价结合至所述免疫调节化合物、所述第二化合物或所述间隔子;并且任选地其中免疫调节化合物与抗体构建体的摩尔比小于8。

3. 如权利要求2所述的缀合物,其中所述第二化合物结合E3泛素连接酶。

4. 如权利要求2所述的缀合物,其中所述第二化合物是第二免疫调节化合物。

5. 如权利要求4所述的缀合物,其中所述第二免疫调节化合物和所述免疫调节化合物相同。

6. 缀合物,其包含:

a) 免疫调节化合物,其对选自以下的细胞有活性:星形细胞、肌成纤维细胞、滑膜成纤维细胞、上皮细胞、足细胞和免疫细胞;

b) 抗体构建体,其包含第一抗原结合结构域和Fc结构域,其中:

ii) 所述第一抗原结合结构域特异性结合第一抗原,其中所述第一抗原包含蛋白复合物、蛋白构象异构体、转录后修饰或翻译后修饰;和

c) 接头,其将所述抗体构建体附接至所述免疫调节化合物,其中所述接头共价结合至

所述抗体构建体并且所述接头共价结合至所述免疫调节化合物,并且任选地其中免疫调节化合物与抗体构建体的摩尔比小于8。

7.如权利要求6所述的缀合物,其中所述第一抗原包含融合蛋白的由剪接变体产生的转录后修饰。

8.如权利要求6所述的缀合物,其中所述第一抗原是翻译后修饰或蛋白构象异构体,任选地CD45RB剪接变体或CD45R0剪接变体。

9.如权利要求6所述的缀合物,其中所述第一抗原是整联蛋白对的蛋白复合物。

10.如权利要求9所述的缀合物,其中所述整联蛋白对是 $\alpha v\beta 6$ 。

11.如权利要求1或权利要求6-10中任一项所述的缀合物,其中所述免疫调节化合物包含结合至蛋白靶标的第一部分和结合至E3泛素连接酶的第二部分。

12.如权利要求11所述的缀合物,其中所述第一部分经由包含1至25个或5至20个直链非氢原子的间隔子共价附接至所述第二部分。

13.如权利要求1-12中任一项所述的缀合物,其中所述缀合物的第一抗原结合结构域结合至第一抗原的Kd小于约100nM并且不大于未缀合的抗体构建体的第一抗原结合结构域结合至第一抗原的Kd的约100倍。

14.如权利要求1-13中任一项所述的缀合物,其中所述缀合物的Fc结构域结合至Fc  $\gamma$  受体的Kd是未缀合的抗体构建体的Fc结构域结合至所述Fc  $\gamma$  受体的Kd的不大于2倍、5倍或10倍。

15.如权利要求1-13中任一项所述的缀合物,其中所述缀合物的Fc结构域结合至Fc  $\gamma$  受体的Kd是未缀合的抗体构建体结合至Fc  $\gamma$  受体的Kd的100倍以上,并且其中所述缀合物的Fc结构域结合至FcRn受体的Kd不大于未缀合的抗体构建体的Fc结构域结合至所述FcRn受体的Kd的约2倍、5倍或10倍。

16.如权利要求1-14中任一项所述的缀合物,其中所述缀合物的Fc结构域结合至FcRn受体的Kd不大于未缀合的抗体构建体的Fc结构域结合至所述FcRn受体的Kd的约2倍、5倍或10倍。

17.如权利要求1-13中任一项所述的缀合物,其中所述Fc结构域是Fc无效的。

18.如权利要求1-17中任一项所述的缀合物,其中所述抗体构建体还包含能结合第二抗原的第二结合结构域。

19.如权利要求11-18中任一项所述的缀合物,其中附接至所述缀合物的所述免疫调节化合物降低了所述蛋白靶标在所述细胞中的活性,所述细胞在细胞表面上表达所述第一抗原、所述第二抗原或两者。

20.如权利要求11-19中任一项所述的缀合物,其中所述缀合物的免疫调节化合物通过增加所述细胞中所述蛋白靶标的降解来降低所述蛋白靶标的活性,所述细胞在所述细胞表面上表达所述第一抗原、所述第二抗原或两者。

21.如权利要求11-18中任一项所述的缀合物,其中所述缀合物的免疫调节化合物增加了所述蛋白靶标在所述细胞中的活性,所述细胞在所述细胞表面上表达所述第一抗原、所述第二抗原或两者。

22.如权利要求11-18中任一项所述的缀合物,其中所述缀合物的免疫调节化合物改变了所述蛋白靶标在所述细胞中的活性,所述细胞在所述细胞表面上表达所述第一抗原、所

述第二抗原或两者。

23. 如权利要求11-18中任一项所述的缀合物,其中与不在所述细胞表面上表达所述第一抗原、所述第二抗原或两者的细胞相比,所述缀合物的免疫调节化合物改变了所述蛋白靶标在所述细胞中的活性,所述细胞在所述细胞表面上表达所述第一抗原、所述第二抗原或两者。

24. 如权利要求11-18或22-23中任一项所述的缀合物,其中所述缀合物增加了所述蛋白靶标在所述细胞中的活性,所述细胞在所述细胞表面上表达所述第一抗原、所述第二抗原或两者,并且其中第一部分是以下物质的激动剂:A2aR、PP2A、PPAR $\gamma$ 、维生素D受体(VDR)或KCA3.1。

25. 如权利要求11-19或22-23中任一项所述的缀合物,其中所述缀合物降低了所述蛋白靶标在所述细胞中的活性,所述细胞在所述细胞表面上表达所述第一抗原、所述第二抗原或两者,并且其中第一部分是激酶抑制剂、离子通道拮抗剂或PARP1抑制剂。

26. 如权利要求11-19或22-23中任一项所述的缀合物,其中所述缀合物通过增加所述细胞中所述蛋白靶标的降解来降低所述蛋白靶标的活性,所述细胞在所述细胞表面上表达所述第一抗原、所述第二抗原或两者,并且其中第一部分是激酶抑制剂、离子通道拮抗剂或PARP1抑制剂。

27. 如权利要求11-19或22-23中任一项所述的缀合物,其中所述免疫调节化合物降低了所述星形细胞或肌成纤维细胞的纤维发生活性。

28. 如权利要求11-19或22-23中任一项所述的缀合物,其中所述免疫调节化合物降低了所述免疫细胞的激活或降低了一种或多种促炎性介质的产生。

29. 如权利要求11-18或22-23中任一项所述的缀合物,其中所述缀合物增加了所述免疫细胞的免疫遏制活性或致耐受性活性。

30. 如权利要求1-5、12-19或22-23中任一项所述的缀合物,其中所述免疫调节化合物是以下物质的抑制剂:TGF $\beta$ RI、TGF $\beta$ RII、TNKS或TNIK。

31. 如权利要求17-30中任一项所述的缀合物,其中所述第二抗原是免疫细胞或组织上的免疫细胞免疫调节靶标的拮抗剂或免疫检查点靶标的激动剂。

32. 如权利要求17-31中任一项所述的缀合物,其中所述第二抗原包含与TNFR2、CD40、CD86、PD-1、TIM3、BTLA、DEC205、DCIR、CD45RB、CD45RO、HLA DR、CD38、CD73、GARP、BDCA2、PD-L1或CD30的至少80%的序列同一性。

33. 如权利要求17-31中任一项所述的缀合物,其中所述第二结合结构域在所述Fc结构域的C-末端处附接至所述抗体构建体。

34. 如权利要求17-31中任一项所述的缀合物,其中所述第二结合结构域附接至所述抗体构建体的轻链的C-末端。

35. 如权利要求1-34中任一项所述的缀合物,其中第一抗原选自:钙粘素11、LRRC15和FAP。

36. 如权利要求35所述的缀合物,其中所述免疫调节化合物是以下物质的抑制剂:TGF $\beta$ RI、TGF $\beta$ RII、TNKS或TNIK。

37. 如权利要求35-36中任一项所述的缀合物,其中Fc结构域是Fc无效的。

38. 如权利要求17-37中任一项所述的缀合物,其中所述第二抗原是CD40或PD-L1。



39. 如权利要求1-5或10-21中任一项所述的缀合物,其中所述第一抗原结合结构域是CD40拮抗剂。

40. 如权利要求18-32或35-39中任一项所述的缀合物,其中所述第二结合结构域附接至所述Fc结构域或所述第一抗原结合结构域的轻链:

- a) 作为Fc结构域-第二结合结构域融合蛋白;
- b) 作为轻链-第二结合结构域融合蛋白;或
- c) 通过经由第一多肽接头的缀合。

41. 如权利要求1-40中任一项所述的缀合物,其中所述Fc结构域附接至所述第一抗原结合结构域:

- a) 作为Fc结构域-第一抗原结合结构域融合蛋白;或
- b) 通过经由第二多肽接头的缀合。

42. 如权利要求17-40中任一项所述的缀合物,其中所述Fc结构域附接至所述第二结合结构域和所述第一抗原结合结构域两者,作为第二结合结构域-Fc结构域-第一抗原结合结构域融合蛋白。

43. 如权利要求17-40中任一项所述的缀合物,其中所述第一抗原结合结构域附接至所述Fc结构域和所述第二结合结构域两者,作为第二结合结构域-第一抗原结合结构域-Fc结构域融合蛋白。

44. 如权利要求17-40中任一项所述的缀合物,其中:

- a) 所述第一抗原结合结构域和所述Fc结构域包含抗体并且所述第二结合结构域包含单链可变片段(scFv);或
- b) 所述第二结合结构域和所述Fc结构域包含抗体并且所述第一抗原结合结构域包含单链可变片段(scFv)。

45. 如权利要求1-44中任一项所述的缀合物,其中所述Fc结构域是与所述Fc结构域的野生型序列相比,包含至少一种氨基酸残基变化的Fc结构域变体。

46. 如权利要求45所述的缀合物,其中与野生型Fc结构域相比,所述Fc结构域变体以改变的亲和力结合Fc受体。

47. 如权利要求45所述的缀合物,其中与野生型Fc结构域相比,所述Fc结构域变体以减小的亲和力结合Fc受体。

48. 如权利要求45所述的缀合物,其中所述Fc结构域变体对FcRn受体的亲和力比野生型Fc结构域对所述FcRn受体的亲和力低不小于10倍。

49. 如权利要求1-48中任一项所述的缀合物,其中所述Fc结构域包含选自以下的至少一种氨基酸残基变化:

- a) 如Kabat编号的EU索引中并相对于SEQ ID NO: 437的N297A、N297G、N297Q或N297G;
- b) 如Kabat编号的EU索引中并相对于SEQ ID NO: 437的K322A/L234A/L235A;
- c) 如Kabat编号的EU索引中并相对于SEQ ID NO: 437的L234F/L235E/P331S N296A;和
- d) 如Kabat编号的EU索引中并相对于SEQ ID NO: 437的P329G/L234A/L235A。

50. 如权利要求1-48所述的缀合物,其中所述Fc结构域包括包含如Kabat编号中的S228P/L235E/P329G的IgG4 Fc结构域。

51. 如权利要求1-23和27-50中任一项所述的缀合物,其中所述免疫调节化合物是PI3K

抑制剂、钙调磷酸酶抑制剂、mTOR抑制剂、BTK抑制剂、JAK抑制剂、CRAC抑制剂、PARP1拮抗剂、PPAR $\gamma$ 激动剂、Kv1.3拮抗剂、KCa3.1拮抗剂、PP2A激动剂、IRAK4抑制剂、MYD88抑制剂、BCL-2拮抗剂、A2aR激动剂、TLR7拮抗剂、c-KIT激酶抑制剂、KCA3.1激动剂、ACC拮抗剂、ASK1拮抗剂、GLI1拮抗剂、TGF $\beta$ RI抑制剂、TGF $\beta$ RII抑制剂、TNKS拮抗剂或TNIK拮抗剂。

52. 如权利要求1-23或26-51中任一项所述的缀合物,其中所述免疫调节化合物是他克莫司、雷帕霉素、依维莫司、AZD8055、菲格替尼、托法替尼、司隆色替、AMG1、AMG2、罗格列酮、洛贝格列酮或非-PO<sub>4</sub>接受芬戈莫德类似物。

53. 如权利要求1-52中任一项所述的缀合物,其中所述第一抗原结合结构域包含来自能特异性结合所述第一抗原的抗体的单链可变片段。

54. 如权利要求1-53中任一项所述的缀合物,其中所述第一抗原结合结构域包含一组六个CDR,所述CDR与表1所示的一组序列具有至少80%的序列同一性。

55. 如权利要求1-54中任一项所述的缀合物,其中所述第一抗原结合结构域包含一组CDR,所述CDR与以下具有至少80%的序列同一性:

a) 包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的LCDR3;

b) 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的LCDR3;

c) 包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的LCDR3;

d) 包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的LCDR3;

e) 包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的LCDR3;

f) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的LCDR3;

g) 包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的LCDR3;

h) 包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的LCDR3;

i) 包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的LCDR3;

j) 包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的LCDR3;

k) 包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的LCDR3;

l) 包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列的LCDR3;

m) 包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列的LCDR3;

n) 包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:84的氨基酸序列的LCDR3;

o) 包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:86的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的LCDR3;

p) 包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列的LCDR3;

q) 包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:101的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:102的氨基酸序列的

LCDR3;

r) 包含SEQ ID NO:103的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:104的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:105的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:106的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:107的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:108的氨基酸序列的LCDR3;

s) 包含SEQ ID NO:109的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:110的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:111的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:112的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:113的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:114的氨基酸序列的LCDR3;

t) 包含SEQ ID NO:109的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:110的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:111的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:115的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:116的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:117的氨基酸序列的LCDR3;

u) 包含SEQ ID NO:118的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:119的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:120的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:121的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:122的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:123的氨基酸序列的LCDR3;

v) 包含SEQ ID NO:124的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:125的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:126的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:127的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:128的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:129的氨基酸序列的LCDR3;

w) 包含SEQ ID NO:130的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:131的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:132的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:133的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:134的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:135的氨基酸序列的LCDR3;

x) 包含SEQ ID NO:136的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:137的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:138的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:139的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:140的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:141的氨基酸序列的LCDR3;

y) 包含SEQ ID NO:142的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:143的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:144的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:145的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:146的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:147的氨基酸序列的LCDR3;

z) 包含SEQ ID NO:148的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:149的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:150的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:151的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:152的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:153的氨基酸序列的LCDR3;

aa) 包含SEQ ID NO:154的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:155的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:156的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:157的氨基酸序列的

LCDR1、包含SEQ ID NO:158的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:159的氨基酸序列的LCDR3;

bb) 包含SEQ ID NO:160的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:161的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:162的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:163的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:164的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:165的氨基酸序列的LCDR3;

cc) 包含SEQ ID NO:166的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:167的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:168的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:169的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:170的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:171的氨基酸序列的LCDR3;

dd) 包含SEQ ID NO:172的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:173的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:174的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:175的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:176的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:177的氨基酸序列的LCDR3;

ee) 包含SEQ ID NO:178的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:179的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:180的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:181的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:182的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:183的氨基酸序列的LCDR3;

ff) 包含SEQ ID NO:184的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:185的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:186的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:187的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:188的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:189的氨基酸序列的LCDR3;

gg) 包含SEQ ID NO:190的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:191的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:192的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:193的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:194的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:195的氨基酸序列的LCDR3;

hh) 包含SEQ ID NO:196的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:197的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:198的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:199的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:200的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:201的氨基酸序列的LCDR3;

ii) 包含SEQ ID NO:202的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:203的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:204的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:205的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:207的氨基酸序列的LCDR3

jj) 包含SEQ ID NO:208的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:209的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:210的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:211的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:212的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:213的氨基酸序列的LCDR3;

kk) 包含SEQ ID NO:214的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:215的氨基酸序列的

HCDR2、包含SEQ ID NO:216的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:217的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:218的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:219的氨基酸序列的LCDR3;

ll) 包含SEQ ID NO:220的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:221的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:222的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:223的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:224的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:225的氨基酸序列的LCDR3;

mm) 包含SEQ ID NO:226的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:227的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:228的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:229的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:230的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:231的氨基酸序列的LCDR3;

nn) 包含SEQ ID NO:232的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:234的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:235的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:236的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:237的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:238的氨基酸序列的LCDR3;

oo) 包含SEQ ID NO:239的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:240的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:241的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:242的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:243的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:244的氨基酸序列的LCDR3;

pp) 包含SEQ ID NO:245的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:246的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:247的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:248的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:249的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:250的氨基酸序列的LCDR3;

qq) 包含SEQ ID NO:251的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:252的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:253的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:254的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:255的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:256的氨基酸序列的LCDR3;

rr) 包含SEQ ID NO:257的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:258的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:259的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:260的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:261的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:262的氨基酸序列的LCDR3;

ss) 包含SEQ ID NO:263的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:264的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:265的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:266的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:267的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:268的氨基酸序列的LCDR3;

tt) 包含SEQ ID NO:269的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:270的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:271的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:272的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:273的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:274的氨基酸序列的LCDR3;

uu) 包含SEQ ID NO:275的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:276的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:277的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:278的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:279的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:280的氨基酸序列的LCDR3;

vv) 包含SEQ ID NO:281的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:282的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:283的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:284的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:285的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:286的氨基酸序列的LCDR3;

ww) 包含SEQ ID NO:287的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:288的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:289的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:290的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:291的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:292的氨基酸序列的LCDR3;

xx) 包含SEQ ID NO:293的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:294的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:295的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:296的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:297的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:298的氨基酸序列的LCDR3;

yy) 包含SEQ ID NO:440的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:441的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:442的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:443的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:444的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:445的氨基酸序列的LCDR3;

zz) 包含SEQ ID NO:446的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:447的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:448的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:449的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:450的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:451的氨基酸序列的LCDR3;

aaa) 包含SEQ ID NO:452的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:453的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:454的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:455的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:456的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:457的氨基酸序列的LCDR3;

bbb) 包含SEQ ID NO:458的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:459的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:460的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:461的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:462的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:463的氨基酸序列的LCDR3;

ccc) 包含SEQ ID NO:464的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:465的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:466的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:467的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:468的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:469的氨基酸序列的LCDR3;

ddd) 包含SEQ ID NO:470的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:471的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:472的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:472的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:474的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:475的氨基酸序列的

LCDR3;或

eee) 包含SEQ ID NO:476的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:477的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:478的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:479的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:480的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:481的氨基酸序列的LCDR31。

56. 如权利要求18-55中任一项所述的缀合物,其中所述第二结合结构域包含来自对所述第二抗原具有特异性的抗体的单链可变片段。

57. 如权利要求18-56中任一项所述的缀合物,其中所述第二结合结构域包含一组六个CDR,所述CDR与表1中作为SEQ ID NO:85-SEQ ID NO:298示出的一组CDR具有至少80%的序列同一性。

58. 如权利要求18-57中任一项所述的缀合物,其中所述第二结合结构域包含一组六个CDR,所述CDR与以下具有至少80%的序列同一性:

a) 包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:86的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的LCDR3;

b) 包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列的LCDR3;

c) 包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:101的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:102的氨基酸序列的LCDR3;

d) 包含SEQ ID NO:103的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:104的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:105的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:106的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:107的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:108的氨基酸序列的LCDR3;

e) 包含SEQ ID NO:109的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:110的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:111的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:112的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:113的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:114的氨基酸序列的LCDR3;

f) 包含SEQ ID NO:109的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:110的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:111的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:115的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:116的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:117的氨基酸序列的LCDR3;

g) 包含SEQ ID NO:118的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:119的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:120的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:121的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:122的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:123的氨基酸序列的



LCDR3;

h) 包含SEQ ID NO:124的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:125的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:126的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:127的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:128的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:129的氨基酸序列的LCDR3;

i) 包含SEQ ID NO:130的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:131的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:132的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:133的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:134的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:135的氨基酸序列的LCDR3;

j) 包含SEQ ID NO:136的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:137的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:138的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:139的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:140的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:141的氨基酸序列的LCDR3;

k) 包含SEQ ID NO:142的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:143的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:144的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:145的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:146的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:147的氨基酸序列的LCDR3;

l) 包含SEQ ID NO:148的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:149的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:150的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:151的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:152的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:153的氨基酸序列的LCDR3;

m) 包含SEQ ID NO:154的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:155的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:156的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:157的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:158的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:159的氨基酸序列的LCDR3;

n) 包含SEQ ID NO:160的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:161的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:162的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:163的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:164的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:165的氨基酸序列的LCDR3;

o) 包含SEQ ID NO:166的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:167的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:168的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:169的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:170的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:171的氨基酸序列的LCDR3;

p) 包含SEQ ID NO:172的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:173的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:174的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:175的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:176的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:177的氨基酸序列的LCDR3;

q) 包含SEQ ID NO:178的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:179的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:180的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:181的氨基酸序列的

LCDR1、包含SEQ ID NO:182的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:183的氨基酸序列的LCDR3;

r) 包含SEQ ID NO:184的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:185的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:186的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:187的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:188的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:189的氨基酸序列的LCDR3;

s) 包含SEQ ID NO:190的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:191的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:192的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:193的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:194的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:195的氨基酸序列的LCDR3;

t) 包含SEQ ID NO:196的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:197的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:198的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:199的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:200的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:201的氨基酸序列的LCDR3;

u) 包含SEQ ID NO:202的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:203的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:204的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:205的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:207的氨基酸序列的LCDR3;

v) 包含SEQ ID NO:208的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:209的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:210的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:211的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:212的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:213的氨基酸序列的LCDR3;

w) 包含SEQ ID NO:214的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:215的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:216的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:217的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:218的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:219的氨基酸序列的LCDR3;

x) 包含SEQ ID NO:220的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:221的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:222的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:223的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:224的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:225的氨基酸序列的LCDR3;

y) 包含SEQ ID NO:226的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:227的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:228的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:229的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:230的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:231的氨基酸序列的LCDR3;

z) 包含SEQ ID NO:232的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:234的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:235的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:236的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:237的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:238的氨基酸序列的LCDR3;

aa) 包含SEQ ID NO:239的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:240的氨基酸序列的

HCDR2、包含SEQ ID NO:241的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:242的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:243的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:244的氨基酸序列的LCDR3;

bb) 包含SEQ ID NO:245的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:246的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:247的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:248的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:249的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:250的氨基酸序列的LCDR3;

cc) 包含SEQ ID NO:251的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:252的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:253的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:254的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:255的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:256的氨基酸序列的LCDR3;

dd) 包含SEQ ID NO:257的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:258的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:259的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:260的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:261的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:262的氨基酸序列的LCDR3;

ee) 包含SEQ ID NO:263的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:264的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:265的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:266的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:267的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:268的氨基酸序列的LCDR3;

ff) 包含SEQ ID NO:269的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:270的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:271的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:272的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:273的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:274的氨基酸序列的LCDR3;

gg) 包含SEQ ID NO:275的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:276的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:277的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:278的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:279的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:280的氨基酸序列的LCDR3;

hh) 包含SEQ ID NO:281的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:282的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:283的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:284的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:285的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:286的氨基酸序列的LCDR3;

ii) 包含SEQ ID NO:287的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:288的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:289的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:290的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:291的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:292的氨基酸序列的LCDR3;或

jj) 包含SEQ ID NO:293的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:294的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:295的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:296的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:297的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:298的氨基酸序列的LCDR3。

59. 如权利要求1-5或12-58中任一项所述的缀合物,其中所述第一抗原结合结构域包含抗体重链和轻链可变区,所述可变区与表2中所示的一对重链和轻链可变区具有至少80%的序列同一性。

60. 如权利要求1-5或12-59中任一项所述的缀合物,其中所述第一抗原结合结构域包含:

a) 与SEQ ID NO:300的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列,和与SEQ ID NO:299的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

b) 与SEQ ID NO:301的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列,和与SEQ ID NO:299的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

c) 与SEQ ID NO:302的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列,和与SEQ ID NO:303的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

d) 与SEQ ID NO:304的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列,和与SEQ ID NO:305的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

e) 与SEQ ID NO:306的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列,和与SEQ ID NO:307的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

f) 与SEQ ID NO:308的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列,和与SEQ ID NO:309的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

g) 与SEQ ID NO:310的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列,和与SEQ ID NO:311的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

h) 与SEQ ID NO:312的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列,和与SEQ ID NO:313的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

i) 与SEQ ID NO:314的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列,和与SEQ ID NO:315的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

j) 与SEQ ID NO:316的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列,和与SEQ ID NO:317的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

k) 与SEQ ID NO:318的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列,和与SEQ ID NO:320的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

l) 与SEQ ID NO:319的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列,和与SEQ ID NO:320的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

m) 与SEQ ID NO:321的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列,和与SEQ ID NO:322的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

n) 与SEQ ID NO:323的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列,和与SEQ ID NO:324的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

o) 与SEQ ID NO:325的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列,和与SEQ ID NO:326的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

p) 与SEQ ID NO:327的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列,和与SEQ ID NO:328的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

q) 与SEQ ID NO:329的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列,和与SEQ ID NO:330的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

r) 与SEQ ID NO:331的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:334的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

s) 与SEQ ID NO:331的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:335的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

t) 与SEQ ID NO:332的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:334的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

u) 与SEQ ID NO:332的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:335的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

v) 与SEQ ID NO:333的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:334的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

w) 与SEQ ID NO:333的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:335的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

x) 与SEQ ID NO:336的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:337的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

y) 与SEQ ID NO:338的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:339的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

z) 与SEQ ID NO:340的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:341的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

aa) 与SEQ ID NO:342的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:343的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

bb) 与SEQ ID NO:344的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:345的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

cc) 与SEQ ID NO:346的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:347的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

dd) 与SEQ ID NO:348的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:349的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

ee) 与SEQ ID NO:350的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:351的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

ff) 与SEQ ID NO:352的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:353的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

gg) 与SEQ ID NO:354的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:355的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

hh) 与SEQ ID NO:356的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:357的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

ii) 与SEQ ID NO:358的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:359的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

jj) 与SEQ ID NO:358的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:360的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

kk) 与SEQ ID NO:361的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID

N0:362的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

ll) 与SEQ ID N0:363的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID N0:364的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

mm) 与SEQ ID N0:365的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID N0:366的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

nn) 与SEQ ID N0:367的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID N0:368的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

oo) 与SEQ ID N0:367的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID N0:369的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

pp) 与SEQ ID N0:367的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID N0:370的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

qq) 与SEQ ID N0:367的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID N0:371的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

rr) 与SEQ ID N0:367的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID N0:372的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

ss) 与SEQ ID N0:374的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID N0:373的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

tt) 与SEQ ID N0:375的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID N0:376的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

uu) 与SEQ ID N0:377的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID N0:378的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

vv) 与SEQ ID N0:379的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID N0:380的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

ww) 与SEQ ID N0:381的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID N0:382的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

xx) 与SEQ ID N0:384的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID N0:383的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

yy) 与SEQ ID N0:385的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID N0:386的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

zz) 与SEQ ID N0:387的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID N0:388的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

aaa) 与SEQ ID N0:389的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID N0:390的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

bbb) 与SEQ ID N0:391的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID N0:392的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

ccc) 与SEQ ID N0:393的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID N0:394的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

ddd) 与SEQ ID N0:395的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID N0:396的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

eee) 与SEQ ID NO:397的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:398的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

fff) 与SEQ ID NO:399的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:400的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

ggg) 与SEQ ID NO:401的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:402的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

hhh) 与SEQ ID NO:403的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:404的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

iii) 与SEQ ID NO:405的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:406的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

jjj) 与SEQ ID NO:407的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:408的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

kkk) 与SEQ ID NO:409的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:410的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

lll) 与SEQ ID NO:411的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:412的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

mmm) 与SEQ ID NO:413的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:414的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

nnn) 与SEQ ID NO:415的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:416的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

ooo) 与SEQ ID NO:417的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:418的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

ppp) 与SEQ ID NO:419的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:420的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

qqq) 与SEQ ID NO:421的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:422的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

rrr) 与SEQ ID NO:423的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:424的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

sss) 与SEQ ID NO:425的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:426的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

ttt) 与SEQ ID NO:427的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:428的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

uuu) 与SEQ ID NO:429的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:430的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

vvv) 与SEQ ID NO:431的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:432的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

www) 与SEQ ID NO:433的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:434的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

xxx) 与SEQ ID NO:435的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID

N0:436的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

yyy)与SEQ ID N0:482的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列,和与SEQ ID N0:483的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

zzz)与SEQ ID N0:484的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列,和与SEQ ID N0:485的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

aaaa)与SEQ ID N0:486的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列,和与SEQ ID N0:487的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

bbbb)与SEQ ID N0:488的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列,和与SEQ ID N0:489的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;或

cccc)与SEQ ID N0:490的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列,和与SEQ ID N0:491的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列。

61.如权利要求18-60中任一项所述的缀合物,其中所述第二结合结构域包含与在表2中作为SEQ ID N0:352-SEQ ID N0:436示出的一对重链和轻链可变区具有至少80%序列同一性的重链和轻链可变区。

62.如权利要求18-61中任一项所述的缀合物,其中所述第二结合结构域包含:

a)与SEQ ID N0:352的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列,和与SEQ ID N0:353的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

b)与SEQ ID N0:354的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列,和与SEQ ID N0:355的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

c)与SEQ ID N0:356的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列,和与SEQ ID N0:357的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

d)与SEQ ID N0:358的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列,和与SEQ ID N0:359的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

e)与SEQ ID N0:358的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列,和与SEQ ID N0:360的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

f)与SEQ ID N0:361的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列,和与SEQ ID N0:362的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

g)与SEQ ID N0:363的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列,和与SEQ ID N0:364的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

h)与SEQ ID N0:365的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列,和与SEQ ID N0:366的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

i)与SEQ ID N0:367的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列,和与SEQ ID N0:368的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

j)与SEQ ID N0:367的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列,和与SEQ ID N0:369的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

k)与SEQ ID N0:367的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列,和与SEQ ID N0:370的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

l)与SEQ ID N0:367的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列,和与SEQ ID N0:371的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;



m) 与SEQ ID NO:367的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:372的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

n) 与SEQ ID NO:374的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:373的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

o) 与SEQ ID NO:375的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:376的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

p) 与SEQ ID NO:377的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:378的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

q) 与SEQ ID NO:379的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:380的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

r) 与SEQ ID NO:381的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:382的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

s) 与SEQ ID NO:384的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:383的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

t) 与SEQ ID NO:385的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:386的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

u) 与SEQ ID NO:387的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:388的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

v) 与SEQ ID NO:389的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:390的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

w) 与SEQ ID NO:391的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:392的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

x) 与SEQ ID NO:393的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:394的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

y) 与SEQ ID NO:395的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:396的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

z) 与SEQ ID NO:397的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:398的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

aa) 与SEQ ID NO:399的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:400的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

bb) 与SEQ ID NO:401的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:402的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

cc) 与SEQ ID NO:403的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:404的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

dd) 与SEQ ID NO:405的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:406的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

ee) 与SEQ ID NO:407的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:408的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

ff) 与SEQ ID NO:409的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID

NO:410的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

gg) 与SEQ ID NO:411的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:412的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

hh) 与SEQ ID NO:413的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:414的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

ii) 与SEQ ID NO:415的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:416的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

jj) 与SEQ ID NO:417的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:418的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

kk) 与SEQ ID NO:419的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:420的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

ll) 与SEQ ID NO:421的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:422的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

mm) 与SEQ ID NO:423的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:424的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

nn) 与SEQ ID NO:425的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:426的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

oo) 与SEQ ID NO:427的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:428的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

pp) 与SEQ ID NO:429的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:430的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

qq) 与SEQ ID NO:431的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:432的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;

rr) 与SEQ ID NO:433的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:434的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;或

ss) 与SEQ ID NO:435的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>H</sub>序列, 和与SEQ ID NO:436的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的V<sub>L</sub>序列。

63. 如权利要求42所述的第二结合结构域-Fc结构域-第一抗原结合结构域融合蛋白, 其中:

a) 所述第二结合结构域-Fc结构域-第一抗原结合结构域融合蛋白的第一抗原结合结构域包含与表1中作为SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:298示出的一组CDR具有至少80%序列同一性的一组六个CDR, 或者于表2中作为SEQ ID NO:299-SEQ ID NO:436示出的一对重链和轻链可变区。

b) 所述第二结合结构域-Fc结构域-第一抗原结合结构域融合蛋白的第二结合结构域包含与表中作为SEQ ID NO:85-SEQ ID NO:299示出的一组CDR具有至少80%序列同一性的一组六个CDR, 或者于表2中作为SEQ ID NO:352-SEQ ID NO:436示出的一对重链和轻链可变区;和

c) 所述第二结合结构域-Fc结构域-第一抗原结合结构域融合蛋白的Fc结构域包含:

i. (i) 与SEQ ID NO:437-SEQ ID NO:439中任一项具有至少80%的序列同一性;或

ii.选自以下的至少一种氨基酸残基变化:

- a) 如在Kabat编号的EU索引中并相对于SEQ ID NO:437的N297A、N297G、N297Q或N297G;
- b) 如在Kabat编号的EU索引中并相对于SEQ ID NO:437的K322A/L234A/L235A;
- c) 如在Kabat编号的EU索引中并相对于SEQ ID NO:437的L234F/L235E/P331S N296A;
- d) 如在Kabat编号的EU索引中并相对于SEQ ID NO:437的P329G/L234A/L235A;和
- e) 包含如Kabat编号中的S228P/L235E/P329G的IgG4 Fc结构域。

64. 如权利要求43所述的第二结合结构域-第一抗原结合结构域-Fc结构域融合蛋白, 其中:

a) 所述第二结合结构域-第一抗原结合结构域-Fc结构域融合蛋白的第一抗原结合结构域包含与表1中作为SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:299示出的一组CDR具有至少80%序列同一性的一组六个CDR, 或者于表2中作为SEQ ID NO:299-SEQ ID NO:436示出的一对重链和轻链可变区;

b) 所述第二结合结构域-第一抗原结合结构域-Fc结构域融合蛋白的第二结合结构域包含与表1中作为SEQ ID NO:85-SEQ ID NO:299示出的一组CDR具有至少80%序列同一性的一组六个CDR, 或者于表2中作为SEQ ID NO:352-SEQ ID NO:436示出的一对重链和轻链可变区;和

c) 所述第二结合结构域-第一抗原结合结构域-Fc结构域融合蛋白的Fc结构域包含:

i. (i) 与SEQ ID NO:437-SEQ ID NO:439中任一项具有至少80%序列的同一性;或

ii. 选自以下的至少一种氨基酸残基变化:

- a) 如在Kabat编号的EU索引中并相对于SEQ ID NO:437的N297A、N297G、N297Q或N297G;
- b) 如在Kabat编号的EU索引中并相对于SEQ ID NO:437的K322A/L234A/L235A;
- c) 如在Kabat编号的EU索引中并相对于SEQ ID NO:437的L234F/L235E/P331S N296A;
- d) 如在Kabat编号的EU索引中并相对于SEQ ID NO:437的P329G/L234A/L235A;和
- e) 包含如Kabat编号中的S228P/L235E/P329G的IgG4 Fc结构域。

65. 如权利要求1-64中任一项所述的缀合物, 其中所述第一抗原是由星形细胞、足细胞或肌成纤维细胞表达的抗原。

66. 如权利要求18-65中任一项所述的缀合物, 其中所述第二抗原是由星形细胞、足细胞或肌成纤维细胞表达的抗原。

67. 药物组合物, 其包含如权利要求1-66中任一项所述的缀合物和药学上可接受的载体。

68. 治疗有需要的受试者的方法, 其包括施用治疗有效剂量的如权利要求1-66中任一项所述的缀合物或如权利要求67所述的药物组合物。

69. 如权利要求68所述的方法, 其中所述受试者患有自身免疫疾病、炎症疾病或纤维化疾病。

70. 如权利要求68-69中任一项所述的方法, 其中静脉内施用、经皮施用、皮下施用或在病灶部位处注射所述缀合物。

71. 如权利要求68-70中任一项所述的方法, 其中在向受试者施用所述缀合物之后, 所述受试者中的炎症减少。

72. 如权利要求68-70中任一项所述的方法, 其中在向受试者施用所述缀合物之后, 所

述受试者中的纤维化减少。

73. 如权利要求68-70中任一项所述的方法,其中在向受试者施用所述缀合物之后,所述受试者中的免疫遏制增加。

74. 如权利要求68-70中任一项所述的方法,其中在向受试者施用所述缀合物之后,所述受试者中的免疫耐受性增加。

75. 如权利要求72所述的方法,其中第一抗原选自:钙粘素11、LRRC15和FAP。

76. 如权利要求72或75中任一项所述的方法,其中所述免疫调节化合物是以下物质的抑制剂:TGF $\beta$ RI、TGF $\beta$ RII、TNKS或TNIK。

77. 如权利要求68-76中任一项所述的方法,其中Fc结构域是Fc无效的。

78. 试剂盒,其包括药学上可接受剂量单位的药学上有效量的如权利要求1-66中任一项所述的缀合物或如权利要求67所述的药物组合物。

79. 治疗患有纤维化疾病的受试者的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效剂量的包含缀合物的药物组合物,所述缀合物包含:

a) 免疫调节化合物,其选自以下物质的抑制剂或拮抗剂:TGF $\beta$ RI、TGF $\beta$ RII、TNKS或TNIK;

b) 抗体构建体,其包含第一抗原结合结构域和Fc结构域,其中:所述第一抗原结合结构域能特异性结合第一抗原,其中所述第一抗原选自:LRRC15、PDGFR $\beta$ 、整联蛋白 $\alpha$ v $\beta$ 1、整联蛋白 $\alpha$ v $\beta$ 3、整联蛋白 $\alpha$ v $\beta$ 6、整联蛋白 $\alpha$ v $\beta$ 8、内皮唾酸蛋白、FAP、ADAM12、MMP14、PDPN、CDH11和F2RL2;和

c) 接头,其附接所述抗体构建体至所述免疫调节化合物,其中所述接头共价结合至所述抗体构建体并且所述接头共价结合至所述免疫调节化合物,并且其中免疫调节化合物与抗体构建体的摩尔比小于20。

80. 如权利要求79所述的方法,其中所述Fc结构域是Fc无效的。

81. 治疗患有纤维化疾病的受试者的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效剂量的包含缀合物的药物组合物,所述缀合物包含:

a) 免疫调节化合物;

b) 第二化合物;

c) 包含1至100个直链非氢原子的间隔子,其共价附接至具有活性的所述免疫调节化合物和所述第二化合物;

d) 抗体构建体,其包含第一抗原结合结构域和Fc结构域,其中:所述第一抗原结合结构域能特异性结合第一抗原,其中所述第一抗原选自:LRRC15、PDGFR $\beta$ 、整联蛋白 $\alpha$ v $\beta$ 1、整联蛋白 $\alpha$ v $\beta$ 3、整联蛋白 $\alpha$ v $\beta$ 6、整联蛋白 $\alpha$ v $\beta$ 8、内皮唾酸蛋白、FAP、ADAM12、MMP14、PDPN、CDH11和F2RL2;和

e) 接头,其将所述抗体构建体附接至所述免疫调节化合物、所述第二化合物或所述间隔子,其中所述接头共价结合至所述抗体构建体并且所述接头共价结合至所述免疫调节化合物、所述第二化合物或所述间隔子。

82. 如权利要求81所述的方法,其中所述Fc结构域是Fc无效的。

83. 如权利要求81-82中任一项所述的方法,其中所述第二化合物结合E3泛素连接酶。

84. 如权利要求83所述的方法,其中所述E3泛素连接酶选自:冯·希佩尔-林道E3泛素

连接酶 (VHL)、小脑蛋白、小鼠双微体2同源物 (MDM2)、AMFR、APC/Cdc20、APC/Cdh1、C6orf157、Cbl、CBLL1、CHFR、CHIP、DTL (Cdt2)、E6-AP、HACE1、HECTD1、HECTD2、HECTD3、HECW1、HECW2、HERC2、HERC3、HERC4、HERC5、HUWE1、HYD、ITCH、LNK1、红褐蛋白、MARCH-I、MARCH-II、MARCH-III、MARCH-IV、MARCH-VI、MARCH-VII、MARCH-VIII、MARCH-X、MEKK1、MIB1、MIB2、MycBP2、NEDD4、NEDD4L、Parkin、PELI1、Pirh2、PJA1、PJA2、RFFL、RFWD2、Rictor、RNF5、RNF8、RNF19、RNF190、RNF20、RNF34、RNF40、RNF125、RNF128、RNF138、RNF168、SCF/?-TrCP、SCF/FBW7、SCF/Skp2、SHPRH、SIAH1、SIAH2、SMURF1、SMURF2、TOPORS、TRAF6、TRAF7、TRIM63、UBE3B、UBE3C、UBR1、UBR2、UHRF2、WWP1、WWP2或ZNR1。

85. 如权利要求84所述的方法, 其中所述E3泛素连接酶是VHL或小脑蛋白。

86. 如权利要求81-85中任一项所述的方法, 其中所述第一抗原是钙粘素11、LRRC15或FAP。

87. 如权利要求79-86中任一项所述的方法, 其中所述纤维化疾病选自: 粘连性肩关节囊炎、动脉僵硬、关节纤维化、心房纤维化、肝硬化、克罗恩氏病、胶原性纤维瘤、囊性纤维化、韧带样型纤维瘤病、杜普伊特伦挛缩、弹力纤维瘤、心内膜心肌纤维化、腱鞘纤维瘤、胶质瘢痕、特发性肺纤维化、瘢痕疙瘩、纵隔纤维化、骨髓纤维化、项型纤维瘤、肾发生性系统纤维变性、陈旧性心肌梗死、佩罗尼氏病、肺纤维化、进行性大块纤维化、辐射-诱导的肺损伤、腹膜后纤维化、瘢痕和硬皮病/全身性硬化。

88. 如权利要求79-87中任一项所述的方法, 其中所述免疫调节化合物是TGFBR1拮抗剂或TGFBR2拮抗剂。

89. 如权利要求79-88中任一项所述的方法, 其中所述抗体构建体是抗体。

90. 如权利要求89所述的方法, 其中所述抗体能特异性结合LRRC15或FAP。

91. 如权利要求90所述的方法, 其中所述抗体包含重链和轻链可变区, 其具有选自SEQ ID NO:318至SEQ ID NO:335或SEQ ID NO:482-SEQ ID NO:491示出的重轻可变区序列的氨基酸序列。

92. 如权利要求1-66中任一项所述的缀合物在制备用于治疗自身免疫疾病、炎性疾病或纤维化的药物中的用途。

## 免疫调节化合物的抗体缀合物及其用途

[0001] 优先权

[0002] 本申请根据35U.S.C.§119(e) 要求2017年6月7日提交的美国临时申请No.62/516,638的优先权,其公开内容通过引用整体并入本文。

### 背景技术

[0003] 自身免疫和自身炎性疾病可能是由于免疫系统对身体正常部分的异常响应引起的。在自身免疫疾病中,适应性免疫系统可以攻击人体自身的组织。例如,自身免疫疾病的一个标志可能是产生针对患者正常组织中抗原的自身抗体。持续性炎症可能是自身免疫疾病的另一种症状,并可在类风湿性关节炎、炎性肠病、全身性红斑狼疮和多发性硬化的常见自身免疫疾病的发病机理中起作用。针对自身免疫疾病的治疗通常着重于降低免疫系统活性,但是许多患者对目前的疗法无响应,或者他们的疾病变得难以治疗。因此,需要新的更持久的治疗。

[0004] 纤维化可以是在修复或反应过程中在器官或组织中形成过量的纤维结缔组织或瘢痕组织。纤维化可通常会由于炎症或损害而发生在体内的许多组织中,所述组织可包括肺、肾、肝、心脏和大脑。瘢痕组织可阻塞动脉,使关节固定并损害内部器官,从而可对身体维持重要功能的能力产生负面影响。每年,由于纤维化的破坏作用,数百万人住院。然而,当前用于治疗纤维化疾病的治疗缺乏或具有缺点。因此,仍然非常需要纤维化疾病的替代或改进的治疗。

[0005] 发明概述

[0006] 在各个方面,提供了缀合物的组合物,其包含:免疫调节化合物;包含第一抗原结合结构域和Fc结构域的抗体构建体,其中:第一抗原结合结构域能特异性结合第一抗原,其中第一抗原与选自以下的抗原具有至少80%序列同一性:钙粘素11、PDPN、整联蛋白 $\alpha 4\beta 7$ 、整联蛋白 $\alpha 2\beta 1$ 、MADCAM、肾病蛋白、足蛋白、IFNAR1、BDCA2、CD30、c-KIT、FAP、CD73、CD38、PDGFR $\beta$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 1$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 3$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 8$ 、GARP、内皮唾液酸蛋白、CTGF、整联蛋白 $\alpha v\beta 6$ 、CD40、PD-1、TIM-3、TNFR2、DEC205、DCIR、CD86、CD45RB、CD45RO、MHC II类和CD25,及其片段;附接抗体构建体至免疫调节化合物的接头,其中接头共价结合至抗体构建体并且接头共价结合至免疫调节化合物,和任选地其中免疫调节化合物与抗体构建体的摩尔比小于8。在一些方面,第一抗原选自LRRC15、钙粘素11、PDPN、整联蛋白 $\alpha 4\beta 7$ 、整联蛋白 $\alpha 2\beta 1$ 、MADCAM、肾病蛋白、足蛋白、IFNAR1、BDCA2、CD30、c-KIT、FAP、CD73、CD38、PDGFR $\beta$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 1$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 3$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 8$ 、GARP、内皮唾液酸蛋白、CTGF、整联蛋白 $\alpha v\beta 6$ 、CD40、PD-1、TIM-3、TNFR2、DEC205、DCIR、CD86、CD45RB、CD45RO、MHC II类、CD25、MMP14、GPX8和F2RL2。在一些方面,第一抗原选自FAP、LRRC15、钙粘素11(CDH11)和TNFR2。在一些方面,免疫调节化合物对星形细胞、肌成纤维细胞、滑膜成纤维细胞、上皮细胞、足细胞或免疫细胞有活性。在一些方面,免疫调节化合物对星形细胞、肌成纤维细胞或免疫细胞有活性。

[0007] 在各个方面,缀合物包含:免疫调节化合物;第二化合物;包含1至100个直链非氢原子的间隔子,其共价附接至免疫调节化合物和第二化合物;抗体构建体,其包含第一抗原

结合结构域和Fc结构域,其中:第一抗原结合结构域能特异性结合第一抗原,其中第一抗原与选自以下的抗原具有至少80%序列同一性:钙粘素11、PDPN、LRRC15、整联蛋白 $\alpha 4\beta 7$ 、整联蛋白 $\alpha 2\beta 1$ 、MADCAM、肾病蛋白、足蛋白、IFNAR1、BDCA2、CD30、c-KIT、FAP、CD73、CD38、PDGFR $\beta$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 1$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 3$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 8$ 、GARP、内皮唾酸蛋白、CTGF、整联蛋白 $\alpha v\beta 6$ 、CD40、PD-1、TIM-3、TNFR2、DEC205、DCIR、CD86、CD45RB、CD45R0、MHC II类、CD25、LRRC15、MMP14、GPX8和F2RL2,及其片段;和接头,其附接抗体构建体至免疫调节化合物、第二化合物或间隔子,其中接头共价结合至抗体构建体并且接头共价结合至免疫调节化合物、第二化合物或间隔子。在一些方面,第二化合物结合至E3泛素连接酶。在一些方面,第二化合物是第二免疫调节化合物。在一些方面,第二免疫调节化合物和免疫调节化合物是相同的。在另外一些方面,第一抗原选自钙粘素11、PDPN、整联蛋白 $\alpha 4\beta 7$ 、整联蛋白 $\alpha 2\beta 1$ 、MADCAM、肾病蛋白、足蛋白、IFNAR1、BDCA2、CD30、c-KIT、FAP、CD73、CD38、PDGFR $\beta$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 1$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 3$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 8$ 、GARP、内皮唾酸蛋白、CTGF、整联蛋白 $\alpha v\beta 6$ 、CD40、PD-1、TIM-3、TNFR2、DEC205、DCIR、CD86、CD45RB、CD45R0、MHC II类、CD25和LRRC15。在一些方面,第一抗原选自FAP、LRRC15、钙粘素11和TNFR2。在一些方面,免疫调节化合物对星形细胞、肌成纤维细胞、滑膜成纤维细胞、上皮细胞、足细胞或免疫细胞有活性。在一些方面,免疫调节化合物对星形细胞、肌成纤维细胞或免疫细胞有活性。

[0008] 在各个方面,缀合物包含:免疫调节化合物;抗体构建体,其包含第一抗原结合结构域和Fc结构域,其中:第一抗原结合结构域能特异性结合第一抗原,其中第一抗原包含蛋白复合物、蛋白构象异构体、转录后修饰或翻译后修饰;接头,其附接抗体构建体至免疫调节化合物,其中接头共价结合至抗体构建体并且接头共价结合至免疫调节化合物,并且其中免疫调节化合物与抗体构建体的摩尔比小于8。在一些方面,第一抗原是翻译后修饰或蛋白构象异构体,诸如CD45RB剪接变体或CD45R0剪接变体。在一些方面,第一抗原是整联蛋白对的蛋白复合物。在一些方面,整联蛋白对包含 $\alpha v\beta 6$ 。

[0009] 在一些方面,免疫调节化合物包含结合至蛋白靶标的第一部分和结合至E3泛素连接酶的第二部分。在一些方面,第一部分经由包含5至20个直链非氢原子的间隔子共价附接至第二部分。在一些方面,在免疫调节化合物存在下(当免疫调节化合物附接至抗体构建体时)第一抗原结合结构域结合至第一抗原的Kd小于约100nM并且不大于在免疫调节化合物不存在下(即免疫调节化合物不附接至抗体构建体)第一抗原结合结构域结合至第一抗原的Kd的约100倍。在一些方面,在免疫调节化合物存在下(当免疫调节化合物附接至抗体构建体时)Fc结构域结合至Fc $\gamma$ 受体的Kd是在免疫调节化合物不存在下(即免疫调节化合物不附接至抗体构建体)Fc结构域结合至Fc $\gamma$ 受体的Kd的等于或不大于2倍、5倍或10倍。在一些方面,Fc结构域结合至Fc $\gamma$ 受体的Kd是在免疫调节化合物不存在下IgG1 Fc结构域结合至Fc $\gamma$ 受体的Kd的100倍以上,并且其中在免疫调节化合物存在下Fc结构域结合至FcRn受体的Kd是在免疫调节化合物不存在下Fc结构域结合至FcRn受体的Kd的至少等于或至少不大于约2倍、5倍或10倍。在一些方面,在免疫调节化合物存在下Fc结构域结合至FcRn受体的Kd是在免疫调节化合物不存在下Fc结构域结合至FcRn受体的Kd的至少等于或至少不大于约2倍、5倍或10倍。在一些实施方案中,Fc结构域是Fc无效的。

[0010] 在一些方面,抗体构建体还包含第二结合结构域。在一些方面,缀合物的免疫调节化合物降低了蛋白靶标在细胞中的活性,所述细胞在细胞表面上表达第一抗原、第二抗原

或两者。在一些方面,缀合物通过在细胞中增加靶蛋白的降解来降低蛋白的活性,所述细胞在细胞表面上表达第一抗原、第二抗原或两者。在一些方面,缀合物增加了蛋白靶标在细胞中的活性,所述细胞在细胞表面上表达第一抗原、第二抗原或两者。在一些方面,缀合物改变了蛋白靶标在细胞中的活性,所述细胞在细胞表面上表达第一抗原、第二抗原或两者。在一些方面,与不在细胞表面上表达第一抗原、第二抗原或两者的细胞相比,缀合物改变了蛋白靶标在细胞中的活性,所述细胞在细胞表面上表达第一抗原、第二抗原或两者。在一些方面,缀合物增加了蛋白靶标在细胞中的活性,所述细胞在细胞表面上表达第一抗原、第二抗原或两者,并且其中第一部分是以下物质的激动剂:A2aR、PP2A、PPAR $\gamma$ 、维生素D受体(VDR)或KCA3.1。在一些方面,缀合物降低了蛋白靶标在细胞中的活性,所述细胞在细胞表面上表达第一抗原、第二抗原或两者,并且其中第一部分是激酶抑制剂、离子通道拮抗剂或PARP1抑制剂。在一些方面,缀合物通过在于细胞表面上表达第一抗原、第二抗原或两者的细胞中增加靶蛋白的降解来降低蛋白的活性,并且其中第一部分是激酶抑制剂、离子通道拮抗剂或PARP1抑制剂。在一些方面,缀合物降低了星形细胞或肌成纤维细胞的纤维发生活性。在一些方面,缀合物降低了经激活的免疫细胞的激活或减少了一种或多种促炎性介质的产生。在一些方面,缀合物增加了免疫细胞的免疫遏制活性或致耐受性活性。在一些方面,第二结合结构域能特异性结合第二抗原。在一些方面,第二抗原是免疫细胞或组织上的免疫细胞免疫调节靶标的拮抗剂或免疫检查点靶标的激动剂。在一些方面,第二抗原包含与以下的至少80%序列同一性:TNFR2、CD40、CD86、PD-1、TIM3、BTLA、DEC205、DCIR、CD45RB、CD45RO、HLA DR、CD38、CD73、GARP、BDCA2或CD30。在一些方面,第二抗原包含与以下的至少80%序列同一性:TNFR2、CD40、CD86、PD-1、PD-L1、TIM3、BTLA、DEC205、DCIR、CD45RB、CD45RO、HLA DR、CD38、CD73、GARP、BDCA2或CD30。在一些方面,第二结合结构域在Fc结构域的C-末端处附接至抗体构建体。在一些方面,第二结合结构域附接至抗体构建体的C-末端。在一些方面,在向受试者施用缀合物之后,受试者中的炎症减少。在一些方面,在向受试者施用缀合物之后,受试者中的纤维化减少。在一些方面,在向受试者施用缀合物之后,受试者中的免疫遏制增加。在一些方面,在向受试者施用缀合物之后,受试者中的免疫耐受性增加。在一些方面,第一抗原结合结构域是CD40拮抗剂。在一些方面,第二结合结构域附接至Fc结构域或第一抗原结合结构域的轻链:a)作为Fc结构域-第二结合结构域融合蛋白;b)作为轻链-第二结合结构域融合蛋白;或c)通过经由第一接头的缀合。

[0011] 在一些方面,Fc结构域附接至第一抗原结合结构域:a)作为Fc结构域-第一抗原结合结构域融合蛋白;或b)通过经由第二接头的缀合。

[0012] 在一些方面,Fc结构域附接至第二结合结构域和第一抗原结合结构域两者,作为第二结合结构域-Fc结构域-第一抗原结合结构域融合蛋白。在一些方面,第一抗原结合结构域附接至Fc结构域和第二结合结构域两者,作为第二结合结构域-第一抗原结合结构域-Fc结构域融合蛋白。在一些方面,a)第一抗原结合结构域和Fc结构域包含抗体并且第二结合结构域包含单链可变片段(scFv);或b)第二结合结构域和Fc结构域包含抗体并且第一抗原结合结构域包含单链可变片段(scFv)。在一些方面,Fc结构域是与Fc结构域的野生型序列相比,包含至少一种氨基酸残基变化的Fc结构域变体。在一些方面,与野生型Fc结构域相比,Fc结构域变体以改变的亲和力结合Fc受体。在一些方面,与野生型Fc结构域相比,Fc结构域变体以减小的亲和力结合Fc受体。在一些方面,Fc结构域变体对FcRn受体的亲和力是



至少相等的亲和力或不比野生型Fc结构域对FcRn受体的亲和力低10倍。在一些方面,Fc结构域包含选自以下的至少一种氨基酸残基变化:a)如Kabat编号中并相对于SEQ ID NO:437的N297A;b)如Kabat编号中并相对于SEQ ID NO:437的N296G N297A;c)如Kabat编号中并相对于SEQ ID NO:437的K322A/L234A/L235A N296A;d)如Kabat编号中并相对于SEQ ID NO:437的L234F/L235E/P331S N296A。在一些方面,Fc结构域包括包含如Kabat编号中的S228P/L235E/P329G的IgG4 Fc结构域。

[0013] 在一些方面,在免疫调节化合物存在下第一抗原结合结构域结合至第一抗原的Kd不大于在免疫调节化合物不存在下第一抗原结合结构域结合至第一抗原的Kd的约两倍、五倍、十倍或十五倍。在一些方面,在免疫调节化合物存在下Fc结构域结合至Fc受体的Kd不大于在免疫调节化合物不存在下Fc结构域结合至Fc受体的Kd的约两倍、五倍、十倍或十五倍。在一些方面,在免疫调节化合物存在下第二结合结构域结合至第二抗原的Kd不大于在免疫调节化合物不存在下的第二结合结构域结合至第二抗原的Kd的约两倍、五倍、十倍或十五倍。在一些方面,免疫调节化合物是PI3K抑制剂、钙调磷酸酶抑制剂、mTOR抑制剂、BTK抑制剂、JAK抑制剂、CRAC抑制剂、PARP1拮抗剂、PPAR $\gamma$ 激动剂、Kv1.3拮抗剂、KCa3.1拮抗剂、PP2A激动剂、IRAK4抑制剂、MYD88抑制剂、BCL-2拮抗剂、A2aR激动剂、TLR7拮抗剂、c-KIT激酶抑制剂、KCa3.1激动剂、TGFBR抑制剂(如TGFBR1和/或TGFBR2抑制剂)、ACC拮抗剂、ASK1拮抗剂、GLI1拮抗剂、端锚聚合酶(TNKS)拮抗剂或TNIK拮抗剂。在一些方面,免疫调节化合物是他克莫司、雷帕霉素、依维莫司、AZD8055、菲格替尼、托法替尼、司隆色替、AMG1、AMG2、罗格列酮、洛贝格列酮或非-P04接受芬戈莫德类似物。在一些方面,第一抗原结合结构域包含来自对第一抗原有特异性的抗体的单链可变片段。在一些方面,抗体构建体的第一抗原结合结构域包含一组六个CDR,所述CDR与表1所示的一组CDR具有至少80%序列同一性,其中CDR残基的指定根据IMGT(国际ImMunoGeneTics信息系统)来定义。在一些方面,第一抗原结合结构域包含与以下具有至少80%序列同一性的一组CDR:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的LCDR3;包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的LCDR3;包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的LCDR3;包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的LCDR3;包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的LCDR3;包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的

[illegible]

[illegible]

[illegible]

LCDR1、包含SEQ ID NO:267的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:268的氨基酸序列的LCDR3;包含SEQ ID NO:269的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:270的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:271的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:272的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:273的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:274的氨基酸序列的LCDR3;包含SEQ ID NO:275的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:276的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:277的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:278的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:279的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:280的氨基酸序列的LCDR3;包含SEQ ID NO:281的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:282的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:283的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:284的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:285的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:286的氨基酸序列的LCDR3;包含SEQ ID NO:287的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:288的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:289的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:290的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:291的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:292的氨基酸序列的LCDR3;或包含SEQ ID NO:293的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:294的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:295的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:296的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:297的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:298的氨基酸序列的LCDR3;包含SEQ ID NO:440的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:441的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:442的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:443的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:444的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:445的氨基酸序列的LCDR3;包含SEQ ID NO:446的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:447的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:448的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:449的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:450的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:451的氨基酸序列的LCDR3;包含SEQ ID NO:452的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:453的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:454的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:455的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:456的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:457的氨基酸序列的LCDR3;包含SEQ ID NO:458的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:459的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:460的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:461的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:462的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:463的氨基酸序列的LCDR3;包含SEQ ID NO:464的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:465的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:466的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:467的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:468的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:469的氨基酸序列的LCDR3;包含SEQ ID NO:470的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:471的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:472的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:473的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:474的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:475的氨基酸序列的LCDR3;或包含SEQ ID NO:476的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:477的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:478的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:479的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:480的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:481的氨基酸序列的LCDR31。

[0014] 在一些方面,第二结合结构域包含来自对第二抗原有特异性的抗体的单链可变片

段。在一些方面,第二结合结构域包含一组六个CDR,所述CDR与表1中作为SEQ ID NO:85-SEQ ID NO:298示出的一组CDR具有至少80%序列同一性。在一些方面,第二结合结构域包含与以下的至少80%序列同一性:包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:86的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的LCDR3;包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列的LCDR3;包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:101的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:102的氨基酸序列的LCDR3;包含SEQ ID NO:103的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:104的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:105的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:106的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:107的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:108的氨基酸序列的LCDR3;包含SEQ ID NO:109的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:110的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:111的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:112的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:113的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:114的氨基酸序列的LCDR3;包含SEQ ID NO:109的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:110的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:111的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:115的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:116的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:117的氨基酸序列的LCDR3;包含SEQ ID NO:118的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:119的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:120的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:121的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:122的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:123的氨基酸序列的LCDR3;包含SEQ ID NO:124的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:125的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:126的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:127的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:128的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:129的氨基酸序列的LCDR3;包含SEQ ID NO:130的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:131的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:132的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:133的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:134的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:135的氨基酸序列的LCDR3;包含SEQ ID NO:136的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:137的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:138的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:139的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:140的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:141的氨基酸序列的LCDR3;包含SEQ ID NO:142的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:143的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:144的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:145的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:146的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:147的氨基酸序列的LCDR3;包含SEQ ID NO:148的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:149的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:150的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:151的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:152的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:153的氨基酸序列的LCDR3;包含SEQ ID NO:154的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:155的氨基酸序列的

35



HCDR2、包含SEQ ID NO:235的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:236的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:237的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:238的氨基酸序列的LCDR3;包含SEQ ID NO:239的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:240的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:241的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:242的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:243的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:244的氨基酸序列的LCDR3;包含SEQ ID NO:245的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:246的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:247的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:248的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:249的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:250的氨基酸序列的LCDR3;包含SEQ ID NO:251的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:252的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:253的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:254的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:255的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:256的氨基酸序列的LCDR3;包含SEQ ID NO:257的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:258的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:259的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:260的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:261的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:262的氨基酸序列的LCDR3;包含SEQ ID NO:263的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:264的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:265的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:266的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:267的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:268的氨基酸序列的LCDR3;包含SEQ ID NO:269的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:270的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:271的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:272的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:273的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:274的氨基酸序列的LCDR3;包含SEQ ID NO:275的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:276的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:277的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:278的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:279的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:280的氨基酸序列的LCDR3;包含SEQ ID NO:281的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:282的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:283的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:284的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:285的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:286的氨基酸序列的LCDR3;包含SEQ ID NO:287的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:288的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:289的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:290的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:291的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:292的氨基酸序列的LCDR3;或包含SEQ ID NO:293的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:294的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:295的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:296的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:297的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:298的氨基酸序列的LCDR3。

[0015] 在一些方面,第一抗原结合结构域包含与表2所示的一对可变区重链和轻链具有至少80%序列同一性的可变区重链和轻链。在一些方面,第一抗原结合结构域包含与表2所示的一对可变区重链和轻链具有至少80%序列同一性的一对可变区重链和轻链。在一些方面,第一抗原结合结构域与表2所示的一对可变区重链和轻链的非CDR区具有至少80%序列同一性的一对可变区重链和轻链。

[0016] 在一些方面,第一抗原结合结构域包含:与SEQ ID NO:300的氨基酸序列具有至少



[illegible]

[illegible]

[illegible]

与SEQ ID NO:482的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VH序列,和与SEQ ID NO:483的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VL序列;与SEQ ID NO:484的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VH序列,和与SEQ ID NO:485的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VL序列;与SEQ ID NO:486的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VH序列,和与SEQ ID NO:487的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VL序列;与SEQ ID NO:488的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VH序列,和与SEQ ID NO:489的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VL序列;或与SEQ ID NO:490的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VH序列,和与SEQ ID NO:491的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VL序列。

[0017] 在一些方面,第二结合结构域包含与表2中作为SEQ ID NO:352-SEQ ID NO:436示出的一对可变区重链和轻链具有至少80%序列同一性的可变区重链和轻链。在一些方面,第二结合结构域包含与表2中作为SEQ ID NO:352-SEQ ID NO:436示出的一对可变区重链和轻链的CDR序列具有至少80%序列同一性的可变区重链和轻链。在一些方面,第二结合结构域包含选自表2中作为SEQ ID NO:352-SEQ ID NO:436示出的可变区重链和轻链对的序列的可变区重链和轻链。

[0018] 在一些方面,第二结合结构域包含:与SEQ ID NO:352的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VH序列,和与SEQ ID NO:353的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VL序列;与SEQ ID NO:354的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VH序列,和与SEQ ID NO:355的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VL序列;与SEQ ID NO:356的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VH序列,和与SEQ ID NO:357的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VL序列;与SEQ ID NO:358的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VH序列,和与SEQ ID NO:359的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VL序列;与SEQ ID NO:358的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VH序列,和与SEQ ID NO:360的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VL序列;与SEQ ID NO:361的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VH序列,和与SEQ ID NO:362的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VL序列;与SEQ ID NO:363的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VH序列,和与SEQ ID NO:364的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VL序列;与SEQ ID NO:365的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VH序列,和与SEQ ID NO:366的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VL序列;与SEQ ID NO:367的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VH序列,和与SEQ ID NO:368的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VL序列;与SEQ ID NO:367的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VH序列,和与SEQ ID NO:369的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VL序列;与SEQ ID NO:367的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VH序列,和与SEQ ID NO:370的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VL序列;与SEQ ID NO:367的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VH序列,和与SEQ ID NO:371的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VL序列;与SEQ ID NO:367的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VH序列,和与SEQ ID NO:372的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VL序列;与SEQ ID NO:374的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VH序列,和与SEQ ID NO:373的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VL序列;与SEQ ID NO:375的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VH序列,和与SEQ ID NO:376的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VL序列;与SEQ ID NO:377的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VH序列,和与SEQ ID NO:378的氨基酸序列具有至少80%序列

[illegible]

429的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VH序列,和与SEQ ID NO:430的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VL序列;与SEQ ID NO:431的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VH序列,和与SEQ ID NO:432的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VL序列;与SEQ ID NO:433的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VH序列,和与SEQ ID NO:434的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VL序列;或与SEQ ID NO:435的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VH序列,和与SEQ ID NO:436的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的VL序列。

[0019] 在一些方面,第二结合结构域-Fc结构域-第一抗原结合结构域融合蛋白包括,第二结合结构域-Fc结构域-第一抗原结合结构域融合蛋白的第一抗原结合结构域包含与SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:436或SEQ ID NO:440-SEQ ID NO:481中任一种的至少80%序列同一性;第二结合结构域-Fc结构域-第一抗原结合结构域融合蛋白的第二结合结构域包含与SEQ ID NO:85-SEQ ID NO:299、SEQ ID NO:352-SEQ ID NO:436中任一种的至少80%序列同一性;并且第二结合结构域-Fc结构域-第一抗原结合结构域融合蛋白的Fc结构域包含与SEQ ID NO:437-SEQ ID NO:439或它们的任何片段或者如本文所述的Fc结构域或其片段中任一种的至少80%序列同一性。

[0020] 在一些方面,如本文所述的权利要求的第二结合结构域-第一抗原结合结构域-Fc结构域融合蛋白包括:第二结合结构域-第一抗原结合结构域-Fc结构域融合蛋白的第一抗原结合结构域包含与表1中作为SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:436或SEQ ID NO:440-SEQ ID NO:481示出的一组CDR具有至少80%序列同一性的一组六个CDR;第二结合结构域-第一抗原结合结构域-Fc结构域融合蛋白的第二结合结构域包含与表1中作为SEQ ID NO:85-SEQ ID NO:299、SEQ ID NO:352-SEQ ID NO:436或其任何片段示出的一组CDR具有至少80%序列同一性的一组CDR;和第二结合结构域-第一抗原结合结构域-Fc结构域融合蛋白的Fc结构域包含与SEQ ID NO:437-SEQ ID NO:439或它们的任何片段、或如本文所述的Fc结构域或其片段中任一种的至少80%序列同一性。

[0021] 在一些方面,第一抗原是由以下表达的抗原:星形细胞、肌成纤维细胞、滑膜成纤维细胞、上皮细胞、足细胞或免疫细胞。在一些方面,第一抗原是由以下表达的抗原:星形细胞、肌成纤维细胞、滑膜成纤维细胞、上皮细胞或足细胞。在一些方面,第一抗原是由星形细胞或肌成纤维细胞表达的抗原。在一些方面,第一抗原是由星形细胞、肌成纤维细胞或足细胞表达的抗原。在一些方面,第二抗原是由星形细胞或肌成纤维细胞表达的抗原。

[0022] 在各个方面,提供了经分离的核酸,其编码如本文所述的任何抗体构建体或部分的氨基酸序列。

[0023] 在一些方面,提供了载体,其包含编码如本文所述的抗体构建体的核酸。

[0024] 在一些方面,提供了宿主细胞,其包括包含编码如本文所述的抗体构建体的核酸的载体。

[0025] 在一些方面,提供的宿主细胞为哺乳动物细胞。

[0026] 在各个方面,提供了产生缀合物的方法,其包括培养宿主细胞使得产生抗体构建体并任意附接至少一种免疫调节化合物和接头至抗体构建体以形成缀合物。

[0027] 在各个方面,提供了药物组合物,其包含如本文所述的任何缀合物和药学上可接受的载体。

[0028] 在各个方面,向有需要的受试者提供了治疗方法,其包括施用治疗有效剂量的本文所述的缀合物或如本文所述的药物组合物。在一些方面,受试者患有纤维化疾病、自身免疫疾病或炎性疾病。在一些方面,静脉内施用、经皮施用、皮下施用或在病灶部位处注射药物组合物或缀合物。在一些方面,药物组合物或缀合物静脉内施用。在一些方面,药物组合物或缀合物皮下施用。

[0029] 在各个方面,试剂盒包括药学上可接受的剂量单位的药学有效量的本文所述的任何缀合物或本文所述的任何药物组合物。

[0030] 通过引用并入

[0031] 在本说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请都通过引用并入本文,其程度就好像每个单独的出版物、专利或专利申请被具体地和单独地指出通过引用并入一样。

[0032] 附图简述

[0033] 本公开的新特征在所附权利要求书中具体阐述。通过参考以下阐述了说明性方面的详述(其中利用了本公开的原理)和其附图,可以更好地理解本发明的特征和优点:

[0034] 图1A、图1B和图1C说明了包含抗体构建体、接头(L)、免疫调节化合物(C1)、间隔子(S)和第二化合物(C2)的数种形式的缀合物。

[0035] 图2显示了与单独的对照抗体和抗地高辛缀合物对照相比,LRRC15缀合物(经由可切割接头附接至TGF $\beta$ R抑制剂的LRRC15抗体)对TGF $\beta$ /SMAD信号传导途径的抑制。

[0036] 图3A、图3B和图3C显示了通过TGF $\beta$ R2-VHL PROTAC抗HER2抗体缀合物降解TGF $\beta$ R2的测定结果。

[0037] 图4A和图4B显示了用含具有VHL或小脑蛋白E3结合部分的PROTAC的抗体缀合物对TGF $\beta$ R2进行抗原靶向降解的测定结果。

[0038] 图5A和图5B显示了添加或不添加蛋白酶体抑制剂的情况下,在TGF $\beta$ R2/TGF $\beta$ R1-VHL PROTAC的存在下,TGF $\beta$ R2和TGF $\beta$ R1的细胞水平的测定结果。

[0039] 发明详述

[0040] 尽管已经在本文中示出和描述了本发明的优选实施例,但是对于本领域技术人员显而易见的是,此类实施方案仅以实例的方式提供。在不背离本发明的情况下,本领域技术人员现在将想到许多变化、改变和替代。应当理解,本文所述的本发明的实施方案的各种替代方案可以用于实施本发明。意图是所附权利要求限定本发明的范围,并且由此涵盖这些权利要求范围内的方法和结构及其等同物。

[0041] 每年由于纤维化、自身免疫疾病和自身炎症性疾病的破坏作用,数百万人住院。纤维化是指在修复或反应过程中,器官或组织中形成过量的纤维结缔组织或瘢痕组织。纤维化可通常由于炎症或损害而发生在体内的许多组织中,所述组织可包括肺、肝、肾、心脏和大脑。瘢痕组织阻塞动脉,使关节固定并损害内部器官,从而对身体维持重要功能的能力造成严重破坏。自身免疫和自身炎症性疾病可能是由于免疫系统对身体正常部分的异常响应或缺乏对例如感染的免疫响应所致。在自身免疫疾病中,免疫系统可以产生攻击身体自身组织的自身抗体,而不是与感染或外来入侵者作斗争。移植器官或组织的急性或慢性免疫介导排斥是另一个未得到满足的领域。移植排斥是一个过程,其中移植物接受者的免疫系统可以将移植的器官或组织识别为异物并且可以攻击移植的器官或组织,从而导致移植的器官或组织衰竭。尽管市场上有针对纤维化、自身免疫疾病、自身炎症性疾病和移植的治疗,但是

这些治疗效果有限。因此,仍然非常需要用于纤维化疾病、自身免疫疾病、自身炎症性疾病和移植排斥的替代或改进的治疗。

[0042] 本公开提供了用于治疗或预防自身免疫疾病、自身炎症性疾病和/或纤维化疾病的抗体构建体免疫调节化合物缀合物(还称为“缀合物”或“抗体缀合物”)和药物组合物。在某些实施方案中,抗体构建体免疫调节化合物缀合物和药物组合物用于治疗或预防纤维化疾病中。在某些实施方案中,抗体构建体免疫调节化合物缀合物和药物组合物用于治疗或预防自身免疫疾病。在某些实施方案中,抗体构建体免疫调节化合物缀合物和药物组合物用于治疗或预防自身炎症性疾病。

[0043] 开发靶向药物疗法的挑战包括实现对主要药理学靶标的高选择性,以及在降低毒性的同时保持对疾病的长期靶标抑制或调节。为了克服这两个挑战,有可能开发出具有最大治疗功效和最小全身毒性的药物产品。解决这两个挑战的一种方法是开发可以将药物递送到局部区域或靶向组织而不干扰缀合的药物的活性的缀合物。在一些实施方案中,缀合物的靶向方面还可以抑制或调节纤维化疾病、自身免疫疾病、自身炎症性疾病或移植排斥。

[0044] 由于当前需要可以抑制或调节纤维化疾病、自身免疫疾病、自身炎症性疾病或移植排斥的治疗剂,因此本公开提供了解决该需求和相关需求的缀合物、药物组合物以及方法。

[0045] 定义

[0046] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的技术人员通常所理解含义相同的含义。本文引用的所有专利和出版物均通过引用并入。

[0047] 如说明书和权利要求书中所使用的,单数形式“一”、“一个”和“该”包括复数引用,除非上下文另外明确指出。

[0048] 如本文所用,术语“抗体”是指与特定抗原能特异性结合或对特定抗原具有免疫反应性的免疫球蛋白分子。抗体可以包括例如其多克隆的、单克隆的、遗传工程的及其抗原结合片段。抗体可以是例如鼠、嵌合、人源化、异源缀合、双特异性、双抗体、三抗体或四抗体。抗原结合片段可包括例如Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fab、Fv、rIgG和scFv。

[0049] 如本文所用,“抗原结合结构域”是指分子的特异性结合抗原的区域。抗原结合结构域可以是抗体或抗体片段的抗原结合部分。抗原结合结构域可以是抗体的可以保留与抗原特异性结合的能力的一个或多个片段。抗原结合结构域可以是抗原结合片段。在一些实施方案中,抗原结合结构域可以识别单个抗原。抗原结合结构域可以识别例如两个或三个抗原。

[0050] 如本文所用,“靶结合结构域”是指含有来自抗体或来自非抗体的可结合至抗原的抗原结合结构域的构建体。

[0051] 术语“靶向部分”是指相对于其他非靶分子对靶分子具有选择性亲和力的结构。靶向部分结合至靶分子。靶向部分可包括例如抗体、肽、配体、受体或其结合部分。靶分子可以是抗原,诸如生物受体或细胞的其他结构。

[0052] “接头-有效载荷”或“LP”是指附接至接头的一种或多种免疫调节化合物。

[0053] 如本文所用,“Fc结构域”可以是来自抗体或非抗体的可结合至Fc受体的Fc结构域。

[0054] 如本文所用,“Fc无效”是指对任何Fc $\gamma$ 受体表现出弱至无结合的结构域。在一些实施方案中,Fc无效结构域或区域表现出与Fc $\gamma$ 受体的结合亲和力降低(如,K<sub>d</sub>增加)至少



1000倍。

[0055] 如本文所用,关于抗体相互作用的“识别”是指抗体或其部分的抗原结合结构域与抗原之间的特异性缔合或结合。

[0056] 如本文所用,“序列同一性”、“同一性”和“同一”是指根据上下文DNA、RNA、核苷酸、氨基酸或蛋白质序列分别与另一DNA、RNA、核苷酸、氨基酸或蛋白质序列之间的同一性。同一性可以根据第一序列与第二序列的序列同一性的百分比来表示。相对于参考DNA序列的序列同一性百分比(%)是在比对序列和引入空位(如有必要)后,候选序列中与参考DNA序列中的DNA核苷酸同一的DNA核苷酸的百分比。相对于参考氨基酸序列的序列同一性百分比(%)是在比对序列和引入空位(如有必要)以达到最大序列同一性百分比后并不考虑任何保守取代作为序列同一性的一部分,候选序列中与参考氨基酸序列中的氨基酸残基同一的氨基酸残基的百分比。

[0057] 如本文所用,天然L-对映异构体氨基酸的缩写是常规的并且可以如下:丙氨酸(A, Ala);精氨酸(R, Arg);天冬酰胺(N, Asn);天冬氨酸(D, Asp);半胱氨酸(C, Cys);谷氨酸(E, Glu);谷氨酰胺(Q, Gln);甘氨酸(G, Gly);组氨酸(H, His);异亮氨酸(I, Ile);亮氨酸(L, Leu);赖氨酸(K, Lys);甲硫氨酸(M, Met);苯丙氨酸(F, Phe);脯氨酸(P, Pro);丝氨酸(S, Ser);苏氨酸(T, Thr);色氨酸(W, Trp);酪氨酸(Y, Tyr);缬氨酸(V, Val)。除非另有说明,否则X可以表示任何氨基酸。在一些方面,X可以是天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、组氨酸(H)、赖氨酸(K)或精氨酸(R)。

[0058] 术语“盐”或“药学上可接受的盐”是指源自本领域众所周知的多种有机和无机抗衡离子的盐。药学上可接受的酸加成盐可以用无机酸和有机酸形成。可以衍生出盐的无机酸包括例如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等。可以衍生出盐的有机酸包括例如乙酸、丙酸、乙醇酸、丙酮酸、草酸、马来酸、丙二酸、琥珀酸、富马酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、甲磺酸、乙磺酸、对甲苯磺酸、水杨酸等。药学上可接受的碱加成盐可以用无机碱和有机碱形成。可以衍生出盐的无机碱包括例如钠、钾、锂、铵、钙、镁、铁、锌、铜、锰、铝等。可以衍生出盐的有机碱包括例如伯胺、仲胺和叔胺,经取代的胺包括天然存在的经取代的胺,环胺,碱性离子交换树脂等,特别是诸如异丙胺、三甲胺、二乙胺、三乙胺、三丙胺和乙醇胺。在一些实施方案中,药学上可接受的碱加成盐选自铵盐、钾盐、钠盐、钙盐和镁盐。

[0059] 当与化学部分诸如烷基、烯基或炔基结合使用时,术语“C<sub>x-y</sub>”意在包括在链中含有x至y个碳的基团。例如,术语“C<sub>x-y</sub>烷基”是指经取代或未取代的饱和烃基,包括在链中含有x至y个碳的直链烷基和支链烷基基团,包括卤代烷基基团诸如三氟甲基和2,2,2-三氟乙基等。

[0060] 术语“C<sub>x-y</sub>烯基”和“C<sub>x-y</sub>炔基”是指经取代的或未取代的不饱和脂族基团,其长度和可能的取代与上述烷基相似,但是分别含有至少一个双键或三键。

[0061] 如本文所用的术语“碳环”是指饱和、不饱和或芳族环,其中该环的每个原子是碳。碳环包括3-至10-元单环、6-至12-元双环和6-至12-元桥接环。双环碳环的每个环可选自饱和、不饱和和芳族环。在一个示例性的实施方案中,芳族环如苯基可以稠合至饱和或不饱和环,如环己烷、环戊烷或环己烯。在化合价允许的情况下,双环碳环包括饱和、不饱和和芳族双环的任何组合。双环碳环包括环大小的任何组合,诸如4-5元稠环体系、5-5元稠环体系、5-6元稠环体系和6-6元稠环体系。示例性碳环包括环戊基、环己基、环己烯基、金刚烷基、苯

基、茛满基和萘基。

[0062] 如本文所用的术语“杂环”是指包含一个或多个杂原子的饱和、不饱和或芳族环。示例性杂原子包括N、O、Si、P、B和S原子。杂环包括3-至10元-单环、6-至12-元双环和6-至12-元桥环。在化合价允许的情况下,双环杂环包括饱和、不饱和和芳族双环的任何组合。在一个示例性的实施方案中,芳族环如吡啶基可以稠合至饱和或不饱和环,如环己烷、环戊烷、吗啉、哌啶或环己烯。双环杂环包括环大小的任何组合,诸如4-5元稠环体系、5-5元稠环体系、5-6元稠环体系和6-6元稠环体系。

[0063] 术语“杂芳基”包括芳族单环结构,优选5-至7-元环,更优选5-至6-元环,其环结构包括至少一个杂原子,优选1-4个杂原子,更优选一个或两个杂原子。术语“杂芳基”还包括具有两个或更多个环状环的多环体系,其中两个或多个碳对于两个相邻环是共有的,其中至少一个环是杂芳族的,如,其他环可以是芳族或非-芳族碳环或杂环。杂芳基基团包括例如吡咯、呋喃、噻吩、咪唑、噁唑、噻唑、吡唑、吡啶、吡嗪、哒嗪和嘧啶等。

[0064] 术语“取代的”是指用取代基替代在一个或多个碳或可取代的杂原子(如化合物的NH或NH<sub>2</sub>)上的氢的部分。将理解的是,“取代”或“被...取代”包括隐含的条件,即此类取代是根据经取代的原子和取代基的允许化合价,并且该取代产生稳定的化合物,即不诸如通过重排、环化、消除等来自动进行转化的化合物。在某些实施方案中,取代的是指取代基替代了同一碳原子上的两个氢原子的部分,诸如用氧代基、亚氨基或硫代基基团取代单个碳原子上的两个氢原子。如本文所用,术语“取代的”预期包括有机化合物的所有允许的取代基。在广义上,允许的取代基包括有机化合物的非环状和环状、支链和非支链、碳环和杂环、芳族和非芳族取代基。对于适当的有机化合物,允许的取代基可以是一个或多个并且相同或不同。

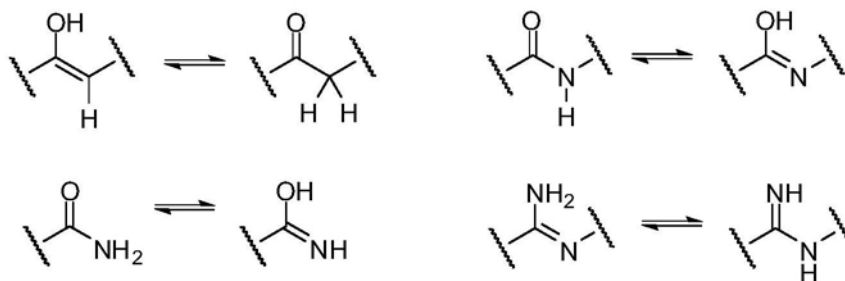
[0065] 在一些实施方案中,取代基可包括本文所述的任何取代基,例如:卤素、羟基、氧代基(=O)、硫代基(=S)、氰基(-CN)、硝基(-NO<sub>2</sub>)、亚氨基(=N-H)、胍基(=N-OH)、胍基(=N-NH<sub>2</sub>)、-R<sup>b</sup>-OR<sup>a</sup>、-R<sup>b</sup>-OC(O)-R<sup>a</sup>、-R<sup>b</sup>-OC(O)-OR<sup>a</sup>、-R<sup>b</sup>-OC(O)-N(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>、-R<sup>b</sup>-N(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>、-R<sup>b</sup>-C(O)R<sup>a</sup>、-R<sup>b</sup>-C(O)OR<sup>a</sup>、-R<sup>b</sup>-C(O)N(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>、-R<sup>b</sup>-O-R<sup>c</sup>-C(O)N(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>、-R<sup>b</sup>-N(R<sup>a</sup>)C(O)OR<sup>a</sup>、-R<sup>b</sup>-N(R<sup>a</sup>)C(O)R<sup>a</sup>、-R<sup>b</sup>-N(R<sup>a</sup>)S(O)<sub>t</sub>R<sup>a</sup>(其中t是1或2)、-R<sup>b</sup>-S(O)<sub>t</sub>R<sup>a</sup>(其中t是1或2)、-R<sup>b</sup>-S(O)<sub>t</sub>OR<sup>a</sup>(其中t是1或2)和-R<sup>b</sup>-S(O)<sub>t</sub>N(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>(其中t是1或2);和烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、芳烯基、芳炔基、环烷基、环烷基烷基、杂环烷基、杂环烷基烷基、杂芳基和杂芳基烷基,其中任一个可被以下基团任选地取代:烷基、烯基、炔基、卤素、卤代烷基、卤代烯基、卤代炔基、氧代基(=O)、硫代基(=S)、氰基(-CN)、硝基(-NO<sub>2</sub>)、亚氨基(=N-H)、胍基(=N-OH)、胍基(=N-NH<sub>2</sub>)、-R<sup>b</sup>-OR<sup>a</sup>、-R<sup>b</sup>-OC(O)-R<sup>a</sup>、-R<sup>b</sup>-OC(O)-OR<sup>a</sup>、-R<sup>b</sup>-OC(O)-N(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>、-R<sup>b</sup>-N(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>、-R<sup>b</sup>-C(O)R<sup>a</sup>、-R<sup>b</sup>-C(O)OR<sup>a</sup>、-R<sup>b</sup>-C(O)N(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>、-R<sup>b</sup>-O-R<sup>c</sup>-C(O)N(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>、-R<sup>b</sup>-N(R<sup>a</sup>)C(O)OR<sup>a</sup>、-R<sup>b</sup>-N(R<sup>a</sup>)C(O)R<sup>a</sup>、-R<sup>b</sup>-N(R<sup>a</sup>)S(O)<sub>t</sub>R<sup>a</sup>(其中t是1或2)、-R<sup>b</sup>-S(O)<sub>t</sub>R<sup>a</sup>(其中t是1或2)、-R<sup>b</sup>-S(O)<sub>t</sub>OR<sup>a</sup>(其中t是1或2)和-R<sup>b</sup>-S(O)<sub>t</sub>N(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>(其中t是1或2);其中每个R<sup>a</sup>独立选自氢、烷基、环烷基、环烷基烷基、芳基、芳烷基、杂环烷基、杂环烷基烷基、杂芳基或杂芳基烷基,其中每个R<sup>a</sup>在化合价允许的情况下可用以下基团任选取代:烷基、烯基、炔基、卤素、卤代烷基、卤代烯基、卤代炔基、氧代基(=O)、硫代基(=S)、氰基(-CN)、硝基(-NO<sub>2</sub>)、亚氨基(=N-H)、胍基(=N-OH)、胍基(=N-NH<sub>2</sub>)、-R<sup>b</sup>-OR<sup>a</sup>、-R<sup>b</sup>-OC(O)-R<sup>a</sup>、-R<sup>b</sup>-OC(O)-OR<sup>a</sup>、-R<sup>b</sup>-OC(O)-N(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>、-R<sup>b</sup>-N(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>、-R<sup>b</sup>-C(O)R<sup>a</sup>、-R<sup>b</sup>-C(O)OR<sup>a</sup>、-R<sup>b</sup>-C(O)N(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>、-R<sup>b</sup>-O-R<sup>c</sup>-C(O)N(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>、-R<sup>b</sup>-N(R<sup>a</sup>)C(O)OR<sup>a</sup>、-R<sup>b</sup>-N(R<sup>a</sup>)C(O)R<sup>a</sup>、-R<sup>b</sup>-N(R<sup>a</sup>)S(O)<sub>t</sub>R<sup>a</sup>(其中t

是1或2)、 $-R^b-S(O)_tR^a$  (其中 $t$ 是1或2)、 $-R^b-S(O)_tOR^a$  (其中 $t$ 是1或2) 和  $-R^b-S(O)_tN(R^a)_2$  (其中 $t$ 是1或2); 和其中每个 $R^b$ 独立选自直接键或者直链或支链的亚烷基链、亚烯基链或亚炔基链, 并且每个 $R^c$ 是直链或支链的亚烷基链、亚烯基链或亚炔基链。

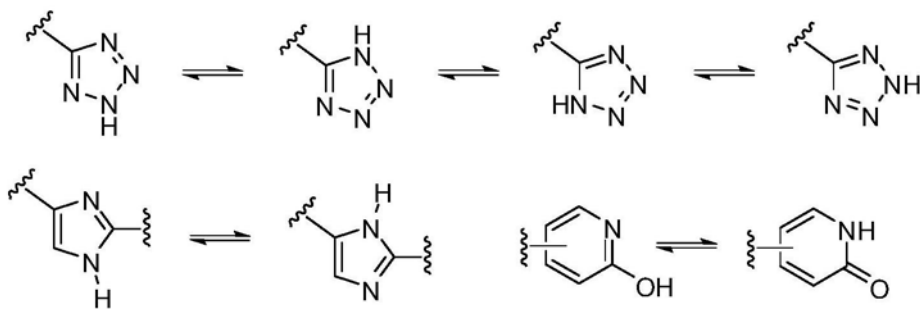
[0066] 本领域技术人员将理解, 如果适当, 取代基本身可以被取代。除非特别表明为“未取代的”, 否则对本文中的化学部分的提及应理解为包括经取代的变体。例如, 除非另有说明, 否则对“杂芳基”基团或部分的提及隐含包括取代和未取代的变体。

[0067] 具有碳-碳双键或碳-氮双键的化学实体可以 $Z$ -或 $E$ -形式(或顺式-或反式-形式)存在。此外, 一些化学实体可以各种互变异构形式存在。除非另有说明, 否则本文所述的化学实体也意在包括所有 $Z$ -、 $E$ -和互变异构形式。

[0068] “互变异构体”是指分子, 其中质子可能从一个分子的一个原子转移到同一分子的另一个原子。本文呈现的化合物在某些实施方案中, 作为互变异构体存在。在可能互变异构的情况下, 将存在互变异构体的化学平衡。互变异构体的精确比取决于几个因素, 包括物理状态、温度、溶剂和 $pH$ 。互变异构平衡的一些实例包括:



[0069]



[0070] 本文公开的化合物, 在一些实施方案中, 以不同的富集同位素形式使用, 如, 富集了 $^2H$ 、 $^3H$ 、 $^{11}C$ 、 $^{13}C$ 和/或 $^{14}C$ 内含物。在一个特定的实施方案中, 化合物在至少一个位置中被氘化。此类氘化形式可以通过美国专利No. 5,846,514和6,334,997中描述的程序来制备。如美国专利No. 5,846,514和6,334,997所述, 氘化可以提高代谢稳定性和/或功效, 从而增加药物作用的持续时间。

[0071] 除非另有说明, 否则本文描述的结构旨在包括仅在一个或多个同位素富集的原子存在下不同的化合物。例如, 除了氢被氘或氚替代或碳被富集了 $^{13}C$ -或 $^{14}C$ -的碳替代之外, 具有本发明结构的化合物在本公开的范围內。

[0072] 本公开的化合物在构成此类化合物的一个或多个原子处任选地含有非天然比例的原子同位素。例如, 化合物可以用同位素标记, 诸如例如氘( $^2H$ )、氚( $^3H$ )、碘-125( $^{125}I$ )或碳-14( $^{14}C$ )。用 $^2H$ 、 $^{11}C$ 、 $^{13}C$ 、 $^{14}C$ 、 $^{15}C$ 、 $^{12}N$ 、 $^{13}N$ 、 $^{15}N$ 、 $^{16}N$ 、 $^{16}O$ 、 $^{17}O$ 、 $^{14}F$ 、 $^{15}F$ 、 $^{16}F$ 、 $^{17}F$ 、 $^{18}F$ 、 $^{33}S$ 、 $^{34}S$ 、 $^{35}S$ 、 $^{36}S$ 、 $^{35}Cl$ 、 $^{37}Cl$ 、 $^{79}Br$ 、 $^{81}Br$ 、 $^{125}I$ 进行的同位素取代全都考虑在內。本发明化合物的所有同位素

变体,无论是否具有放射性,都包括在本发明的范围内。

[0073] 在某些实施方案中,本文公开的化合物具有用<sup>2</sup>H原子替代的一些或全部的<sup>1</sup>H原子。含氘化合物的合成方法是本领域已知的,并且仅作为非限制性实例包括以下合成方法。

[0074] 氘取代的化合物使用诸如以下中描述的各种方法合成:Dean,Dennis C.; Editor.Recent Advances in the Synthesis and Applications of Radiolabeled Compounds for Drug Discovery and Development.[In:Curr.,Pharm.Des.,2000;6(10)] 2000,第110页;George W.;Varma,Rajender S.The Synthesis of Radiolabeled Compounds via Organometallic Intermediates,Tetrahedron,1989,45(21),6601-21;以及Evans,E.Anthony.Synthesis of radiolabeled compounds,J.Radioanal.Chem.,1981,64(1-2),9-32。

[0075] 氘化的原料可容易获得的,并且经受本文所述的合成方法以提供含氘化合物的合成。大量的含氘试剂和结构单元可从化学供应商(诸如Aldrich Chemical Co.)商购获得。

[0076] 可用于本发明的化合物还包括这些化合物的结晶和无定形形式、药学上可接受的盐以及具有相同活性类型的这些化合物的活性代谢物,包括例如多晶型物、假多晶型物、溶剂化物、水合物、未溶剂化的多晶型物(包括无水物)、构象多晶型物和无定形形式化合物,以及它们的混合物。

[0077] 如本文所用的短语“肠胃外施用”和“肠胃外施用的”意指除肠内和局部施用以外的施用模式,通常通过注射,并且包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、包膜下、蛛网膜下、脊柱内和胸骨内注射和输注。

[0078] 短语“药学上可接受的”在本文中用于指代在合理的医学判断范围内适合于与人类和动物的组织接触而无过度的毒性、刺激性、过敏响应或其他问题或并发症且与合理的效益/风险比相当的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。

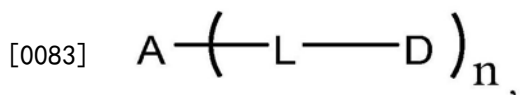
[0079] 如本文所用的短语“药学上可接受的赋形剂”或“药学上可接受的载体”意指药学上可接受的材料、组合物或媒介物,诸如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或囊封材料。在与制剂的其他成分相容并且对患者无害的意义上,每种载体必须是“可接受的”。可用作药学上可接受的载体的材料的一些实例包括:(1)糖,诸如乳糖、葡萄糖和蔗糖;(2)淀粉,诸如玉米淀粉和马铃薯淀粉;(3)纤维素及其衍生物,诸如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素;(4)黄蓍胶粉;(5)麦芽;(6)明胶;(7)滑石粉;(8)赋形剂,诸如可可脂和栓剂蜡;(9)油诸如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;(10)二醇诸如丙二醇;(11)多元醇,诸如甘油、山梨糖醇、甘露糖醇和聚乙二醇;(12)酯,诸如油酸乙酯和月桂酸乙酯;(13)琼脂;(14)缓冲剂,诸如氢氧化镁和氢氧化铝;(15)海藻酸;(16)无热原水;(17)等渗盐水;(18)林格氏液;(19)乙醇;(20)磷酸盐缓冲液;和(21)用于药物制剂的其他无毒相容性物质。

[0080] 如本文所用,“附接的”是指两个或更多个基团之间的键,即共价键。或者,附接的可指两个或多个基团经由接头(如,将抗原结合结构域结合至Fc结构域以形成抗体构建体的接头)缔合。融合可以指在框架中表达的两个分开的结构域的核酸序列。例如,结合结构域可以作为融合体或通过经由接头的缀合而附接以形成抗体构建体。例如,可以将抗体构建体的一部分与第二结合结构域融合,以产生包含第二结合结构域的抗体构建体作为融合

蛋白。融合蛋白可以是编码第二结合结构域的核酸序列与编码抗体构建体的其余部分的核酸序列在框内表达的结果。融合蛋白可以是编码具有结合结构域的抗体构建体的框内遗传核苷酸序列或将抗体构建体的一部分与结合结构域连接的连续蛋白序列的结果。作为另一个实例,第二结合结构域可以经由接头附接至抗体构建体,其中接头附接(如缀合)至结合结构域并且接头附接(如缀合)至抗体构建体的其余部分。结合结构域可通过化学缀合连接至接头,并且抗体构建体的其余部分可通过化学缀合连接至接头。结合结构域可为如本文所述的第二结合结构域和/或第三结合结构域。此外,结合结构域可以是附接至Fc结构域以产生如本文所述的抗体构建体的第一抗原结合结构域,其可以产生第一抗原结合结构域作为与Fc结构域的融合物,其中第一抗原结合结构域可连接至接头并且接头可连接至Fc结构域。如本文所用,“免疫调节化合物”可以指与靶标结合的小分子或实体。免疫调节化合物可以是与靶标结合并激活靶标功能的实体,或是与靶标结合并可抑制靶标功能的实体。靶标可以是蛋白质靶标。蛋白质靶标功能的抑制可以是泛素介导的降解增加的结果。泛素介导的降解可以是泛素介导的蛋白靶标降解。免疫调节化合物可以减少炎症、减少免疫响应、减少纤维化或其任何组合。

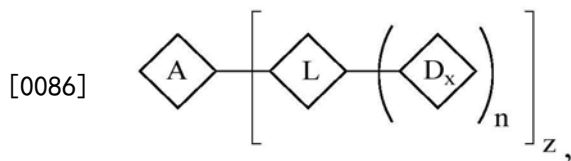
[0081] 抗体构建体免疫调节化合物缀合物的抗体构建体

[0082] 本文公开了可与免疫调节化合物一起用于缀合物中的抗体构建体。在某些实施方案中,本公开的免疫调节化合物直接或通过接头基团附接(如缀合)至免疫调节化合物,从而形成抗体缀合物。在某些实施方案中,抗体缀合物由以下表示:



[0084] 其中A是抗体构建体,L是接头,D是一种或多种免疫调节化合物,如1、2、3或4种化合物,并且n是1至20。在某些实施方案中,n是1至10,诸如1至9、诸如1至8、诸如2至8、诸如1至6、诸如3-5或诸如约2。在某些实施方案中,n是。在一些实施方案中,n是平均值。

[0085] 本文还公开了可以与如本文公开的免疫调节化合物一起使用的抗体构建体。在某些实施方案中,免疫调节化合物直接或通过接头基团附接至本公开的抗体构建体,从而形成抗体缀合物。在某些实施方案中,抗体缀合物可以由下式表示:

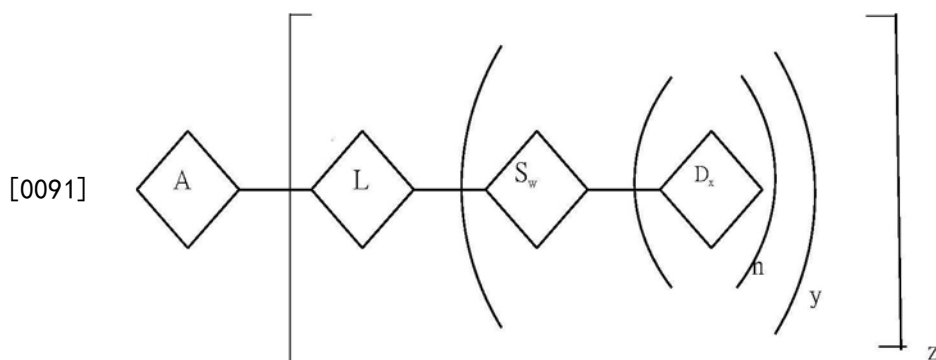


[0087] 其  $A$  是抗体构建体,L是接头,D是免疫调节化合物,x可以是1至20(其中每个此类x表示不同的免疫调节化合物),n可以是1-20和z可以是1至20。

[0088] 在一些实施方案中,x可以是1,n可以是1,并且z可以是1至10,诸如1至9、诸如1至8、诸如2至8、诸如1至6、诸如3-5或诸如约2。在某些实施方案中,z可以是4。

[0089] 在一些实施方案中,D可以是免疫调节化合物(IMC),x可以是1-20,n可以是1至20并且z可以是1至20。

[0090] 在某些实施方案中,抗体缀合物可以由下式表示:

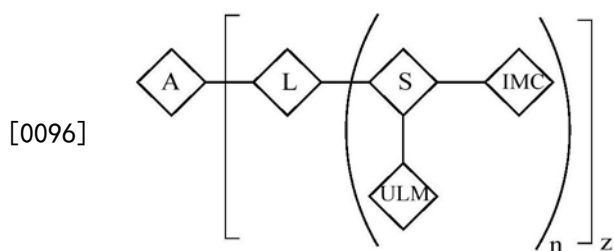


[0092] 其中  $\diamond A$  是抗体构建体, L是接头, S是间隔子, D是免疫调节化合物, x可以是1至20 (其中每个x表示不同的免疫调节化合物), n可以是1至20, w可以是1至20, y可以是1至20, 并且z可以是1至20。

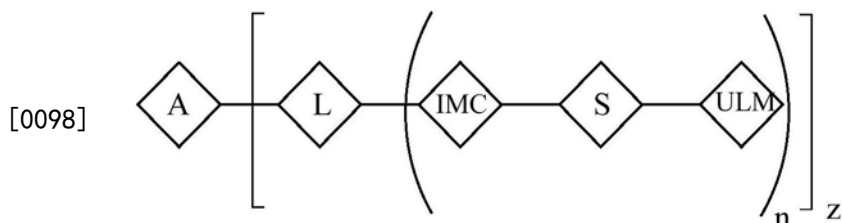
[0093] 在一些实施方案中, x可以是1, n是2, y可以是1, 并且z可以是1至10, 诸如1至9、诸如1至8、诸如2至8、诸如1至6、诸如3至5或诸如2。在某些实施方案中, z可以是4。

[0094] 在一些实施方案中, D可以是免疫调节化合物 (IMC), x可以是1-20, n可以是1-20, w可以是1至20, y可以是1至20, 并且z可以是1至20。

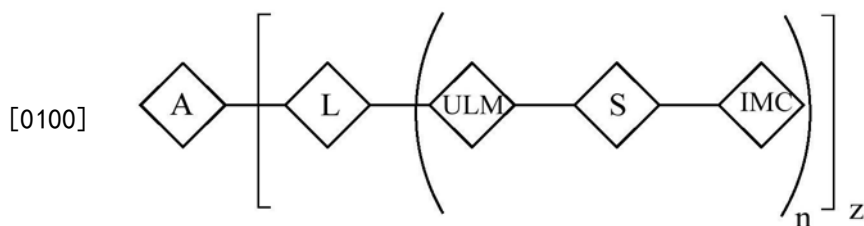
[0095] 在一些实施方案中, D可以是蛋白水解靶向嵌合体 (PROTAC), 其可以包含可以通过间隔子 (S) 共价附接至E3泛素连接酶结合部分 (ULM) 的免疫调节化合物 (IMC), 并且其中接头 (L) 可以共价附接至间隔子 (S)、n可以是1至20并且z可以是1至20, 如由下式表示:



[0097] 在一些实施方案中, D可以是蛋白水解靶向嵌合体 (PROTAC), 其可以包含可以通过间隔子 (S) 共价附接至E3泛素连接酶结合部分 (ULM) 的免疫调节化合物 (IMC), 并且其中接头 (L) 可以共价附接至免疫调节化合物 (IMC)、n可以是1至20并且z可以是1至20, 如由下式表示:



[0099] 在一些实施方案中, D可以是蛋白水解靶向嵌合体 (PROTAC), 其可以包含可以通过间隔子 (S) 共价附接至E3泛素连接酶结合部分 (ULM) 的免疫调节化合物 (IMC), 并且其中接头 (L) 可以共价附接至泛素E3连接酶部分、n可以是1至20并且z可以是1至20, 如由下式表示:



[0101] 在一些实施方案中,免疫调节化合物直接或通过接头基团间接缀合至抗体构建体,从而形成抗体缀合物(“缀合物”),并且可以采用如美国专利No.9254339、美国专利No.9144615、美国专利No.8821850、美国专利No.8808679、美国专利No.8685383、美国专利No.8524214或美国公开申请No.US 2011/0243892(美国申请No.13/163,080)公开的任何缀合物的形式,其中这些参考文献中的每一个均通过引用整体并入本文。如本文所用,“效力”通常可以被测量为生物活性并且可以被定量为EC50或IC50。效力可以指产生效应所需的缀合物或化合物的量。例如,与不同的免疫调节化合物相比,一定效力的需要较少量的免疫调节化合物才能达到效应的免疫调节化合物可以被认为具有更大的效力。此外,不同的免疫调节化合物需要大量的不同的免疫调节化合物来产生响应,并因此可以认为其效力较低。可以在浓度范围内测量生物活性组合物的效力,并且可以将其报告为引发或抑制所测量的生物响应的百分比所需的那些摩尔浓度。例如,可以将刺激测定中观察到的最大活性的50%所需的浓度报告为有效浓度50(EC50),刺激90%活性为EC90或刺激10%活性为EC10。例如,可以将对生物活性产生50%最大抑制所需的拮抗剂浓度报告为抑制浓度50(IC50),抑制90%为IC90或抑制10%为IC10。这可以使得通过比较给定生物测定的EC或IC值,以摩尔为基础比较生物活性化合物的效力。例如,其EC50或EC50是对照的EC50或IC50的大于300倍或更多的免疫调节化合物与对照相比需要高300倍或者高大于300倍才能达到50%的生物响应,并且其效力比对照弱至少300倍。因此,其EC50或EC50是对照化合物的EC50或IC50的不大于约300倍的免疫调节化合物与对照化合物相比可能需要高不大于300倍才能达到50%最大生物响应,是EC50或IC50的不大于100倍需要高不大于100倍的浓度,并且EC50或IC50的不大于10倍需要是对照浓度的不大于10倍。免疫调节化合物的效力可以在对照的效力的300倍或更高内,100倍或更高内,或10倍或更高内。

[0102] 如本文所用,“对照化合物”是指在接头附接和抗体缀合之前的免疫调节化合物,或者在包括E3泛素连接酶结合部分的缀合物的情况下,对照化合物是指附接至b)第二接头的a)免疫调节化合物,所述第二接头附接至c)E3泛素连接酶部分。在一些实施方案中,缀合物中的免疫调节化合物的效力或蛋白结合可以保留或增加。在一些实施方案中,作为缀合物的免疫调节化合物的蛋白靶标的 $K_d$ 是对照化合物的不大于100倍、25倍、10倍或2倍。在一些实施方案中,作为缀合物的免疫调节化合物的EC50或IC50是对照化合物的不大于300倍、50倍、10倍或2倍。在一些实施方案中,EC50或IC50等于或低于对照化合物,表明缀合物提高了免疫调节的效力。

[0103] 本公开的抗体构建体可以含有例如两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个抗原结合结构域。抗体构建体可以含有两个抗原结合结构域,其中每个抗原结合结构域都可以识别相同的抗原。抗体构建体可以含有两个抗原结合结构域,其中每个抗原结合结构域可以识别不同的抗原。抗原结合结构域可以在骨架中,其中骨架是抗原结合结构域的支持框架。抗原结合结构域可以在非抗体骨架中。抗原结合结构域可以在抗



体骨架中。抗体构建体可以在骨架中包含抗原结合结构域。抗体构建体可以包含Fc融合蛋白产物。在一些实施方案中,抗体构建体是Fc融合蛋白产物。抗原结合结构域可特异性结合与纤维化疾病、自身免疫疾病或自身炎性疾病相关的抗原。抗原结合结构域可特异性结合与纤维化疾病、自身免疫疾病或自身炎性疾病相关的抗原至少80%、至少90%、至少95%、至少99%或100%同一的抗原。抗原结合结构域可特异性结合至抗原呈递细胞上的抗原。抗原结合结构域可特异性结合至与抗原呈递细胞上的抗原至少80%、至少90%、至少95%、至少99%或100%同一的抗原。抗原结合结构域可特异性结合至T细胞上的抗原。抗原结合结构域可特异性结合至与T细胞上的抗原至少80%、至少90%、至少95%、至少99%或100%同一的抗原。

[0104] 本文所述的缀合物可含有例如免疫调节化合物、抗体构建体和附接抗体构建体至免疫调节化合物的接头。缀合物的抗体构建体可含有例如第一抗原结合结构域和Fc结构域,其中第一抗原结合结构域结合至第一抗原。第一抗原可与以下具有约50%、约60%、约70%、约80%、或约90%或约100%序列同一性:例如,钙粘素11、PDPN、整联蛋白 $\alpha 4\beta 7$ 、整联蛋白 $\alpha 2\beta 1$ 、MADCAM、肾病蛋白、足蛋白、IFNAR1、BDCA、CD30、c-KIT、FAP、CD73、CD38、PDGFRB、整联蛋白 $\alpha v\beta 1$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 3$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 8$ 、GARP、内皮唾酸蛋白、CTGF、整联蛋白 $\alpha v\beta 6$ 、CD40、PD-1、TIM-3、TNFR2、DEC205、DCIR、CD86、CD45RB、CD45RO、MHC II类或CD25。在一些方面,第一抗原选自钙粘素11、PDPN、整联蛋白 $\alpha 4\beta 7$ 、整联蛋白 $\alpha 2\beta 1$ 、MADCAM、肾病蛋白、足蛋白、IFNAR1、BDCA2、CD30、c-KIT、FAP、CD73、CD38、PDGFR $\beta$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 1$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 3$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 8$ 、GARP、内皮唾酸蛋白、CTGF、整联蛋白 $\alpha v\beta 6$ 、CD40、PD-1、TIM-3、TNFR2、DEC205、DCIR、CD86、CD45RB、CD45RO、MHC II类、CD25、LRRC15和钙粘素11。在一些实施方案中,第一抗原选自钙粘素11、PDPN、LRRC15、整联蛋白 $\alpha 4\beta 7$ 、整联蛋白 $\alpha 2\beta 1$ 、MADCAM、肾病蛋白、足蛋白、IFNAR1、BDCA2、CD30、c-KIT、FAP、CD73、CD38、PDGFR $\beta$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 1$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 3$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 8$ 、GARP、内皮唾酸蛋白、CTGF、整联蛋白 $\alpha v\beta 6$ 、CD40、PD-1、TIM-3、TNFR2、DEC205、DCIR、CD86、CD45RB、CD45RO、MHC II类、CD25、MMP14、GPX8和F2RL2。在一些实施方案中,第一抗原选自钙粘素11、FAP、TNFR2或LRRC15。在一些方面,第一抗原选自LRRC15、FAP、钙粘素11和TNFR2。

[0105] 在某些实施方案中,第一抗原结合结构域特异性结合至与免疫细胞(诸如T细胞、B细胞和APC)、星形细胞、内皮细胞、上皮细胞、肿瘤细胞、成纤维细胞、纤维细胞细胞、足细胞、肌成纤维细胞、滑膜成纤维细胞或与纤维化发病相关的其他细胞)上的抗原至少80%同一的抗原。在某些实施方案中,第一抗原结合结构域特异性结合至与T细胞、APC和/或B细胞上抗原至少80%同一的抗原。在某些实施方案中,第一抗原结合结构域可特异性结合与选自PD-1、GARP、CD25、PD-L1或TNFR2的抗原至少80%同一的抗原。在某些实施方案中,第一抗原结合结构域特异性结合至与星形细胞、内皮细胞、成纤维细胞、纤维细胞细胞、肌成纤维细胞、滑膜成纤维细胞、足细胞或与纤维化发病相关的细胞上的抗原至少80%同一的抗原。在某些实施方案中,第一抗原结合结构域可特异性结合与选自PDGFR $\beta$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 1$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 3$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 6$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 8$ 、内皮唾酸蛋白、FAP、ADAM12、LRRC15、MMP14、PDPN、CDH11和F2RL2的抗原至少80%同一的抗原。在某些实施方案中,第一抗原结合结构域可特异性结合与选自FAP、ADAM12、LRRC15、MMP14、PDPN、CDH11和F2RL2的抗原至少80%同一的抗原。



[0106] 在某些实施方案中,第一抗原结合结构域特异性结合至T细胞、B细胞、星形细胞、内皮细胞、肿瘤细胞、APC、成纤维细胞、纤维细胞细胞、肌成纤维细胞、滑膜成纤维细胞、足细胞或与纤维化发病相关的其他细胞上的抗原。在某些实施方案中,第一抗原结合结构域特异性结合至T细胞、APC和/或B细胞上的抗原。在某些实施方案中,第一抗原结合结构域可特异性结合选自以下的抗原:PD-1、GARP、CD25、PD-L1或TNFR2。在某些实施方案中,第一抗原结合结构域特异性结合至星形细胞、内皮细胞、成纤维细胞、纤维细胞细胞、肌成纤维细胞、滑膜成纤维细胞、足细胞或与纤维化发病相关的细胞上的抗原。在某些实施方案中,第一抗原结合结构域可特异性结合选自PDGFR $\beta$ 、整联蛋白 $\alpha$ v $\beta$ 1、整联蛋白 $\alpha$ v $\beta$ 3、整联蛋白 $\alpha$ v $\beta$ 6、整联蛋白 $\alpha$ v $\beta$ 8、内皮唾酸蛋白、FAP、ADAM12、LRRC15、MMP14、PDPN、CDH11和F2RL2的抗原。在某些实施方案中,第一抗原结合结构域特异性结合选自FAP、ADAM12、LRRC15、MMP14、PDPN、CDH11和F2RL2的抗原。

[0107] 抗体构建体的结合结构域不仅可以结合抗原上的特定氨基酸序列,而且对特定的蛋白质复合物、蛋白质构象、蛋白构象异构体、转录后修饰或翻译后修饰展现出特异性。例如,缀合物的结合结构域的抗原可以包含剪接点、蛋白质复合物、蛋白构象异构体或翻译后修饰。可由结合结构域特异性识别的剪接变体抗原的非限制性实例是用于EGFRviii剪接变体的结合结构域。用于由翻译后修饰或蛋白构象异构体生成的特定抗原的结合结构域的一些非限制性实例可为用于CD45RB或CD45R0的剪接变体的结合结构域。可结合至蛋白复合物的结合结构域的非限制性实例可结合至特异性整联蛋白对,诸如 $\alpha$ v $\beta$ 6。例如,结合结构域可紧密结合至 $\alpha$ v $\beta$ 6,但较弱或根本不结合至单个亚基或与不同亚基配对的一个亚基。这些类型的结合结构域的一些另外的非限制性实例可包括抗-CD45RB抗体、抗-CD45R0抗体、抗- $\alpha$ v $\beta$ 6抗体和抗- $\alpha$ v $\beta$ 8抗体。

[0108] 抗原可以是PDCD1。PDCD1基因编码程序性细胞死亡蛋白1,也称为PD-1和CD279(分化簇279),它是细胞表面受体,其通过遏制T细胞免疫活性在下调免疫系统和促进自我耐受中起着重要作用。PD-1是细胞表面受体,属于免疫球蛋白超家族,并在T细胞和原-B细胞上表达。PD-1是免疫检查点,并且通过促进淋巴结中抗原特异性T细胞凋亡(程序性细胞死亡)的双重机制并同时减少调节T细胞(抗炎、遏制性T细胞)的凋亡的双重机制来防御自身免疫。

[0109] 抗原可以是TNFRSF4。TNFRSF4基因编码OX40,也称为TNFRSF4(肿瘤坏死因子受体超家族,成员4),是受体TNFR超家族的成员,与CD28不同,在静息天然T细胞上不组成性表达。OX40是在激活后24至72小时表达的次级共刺激免疫检查点分子;其配体OX40L在静息的抗原呈递细胞上也不表达,但在其激活后表达。OX40的表达依赖于T细胞的完全激活;在无CD28的情况下,OX40的表达被延迟并且水平降低四倍。

[0110] 抗原可以是CD27。CD27是肿瘤坏死因子受体超家族的成员。由该基因编码的蛋白质是TNF受体超家族的成员。该受体是产生和长期维持T细胞免疫所需的。它结合至配体CD70,并在调节B细胞激活和免疫球蛋白合成中起关键作用。该受体转导导致NF- $\kappa$ B和MAPK8/JNK激活的信号。已显示衔接蛋白TRAF2和TRAF5介导该受体的信号传导过程。CD27结合蛋白(SIVA),一种促凋亡蛋白,可以与该受体结合并被认为在该受体诱导的细胞凋亡中起重要作用。

[0111] 抗原可以是IL2RA。IL2RA基因编码CD25,也称为IL2RA(白介素2受体 $\alpha$ 链),它是存

在于激活的T细胞、激活的B细胞、一些胸腺细胞、髓样前体和少突胶质细胞上的I型跨膜蛋白。IL2RA在大多数B细胞赘生物、一些急性非淋巴细胞性白血病、神经母细胞瘤、肥大细胞增多症和肿瘤浸润淋巴细胞中表达。它充当HTLV-1的受体,并因此在成体T细胞淋巴瘤/白血病中的赘生细胞上表达。在这些疾病中,其称为sIL-2R的可溶性形式可能升高,并偶尔用于追踪疾病进展。

[0112] 抗原可以是TNFRSF18。TNFRSF18基因编码GITR(糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白),也称为TNFRSF18(肿瘤坏死因子受体超家族成员18)和AITR(激活诱导型TNFR家族受体),是为肿瘤坏死因子受体(TNF-R)超家族成员的蛋白质。GITR(糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体)是表面受体分子,已被证明参与抑制T调节细胞的遏制活性和延长T效应细胞的存活。

[0113] 抗原可以是LAG-3。LAG-3(淋巴细胞激活基因3)基因编码对T细胞功能具有多种生物学作用的细胞表面分子。LAG-3是免疫检查点受体。属于免疫球蛋白(Ig)超家族的LAG3蛋白包含具有称为D1至D4的四个细胞外Ig样结构域的503个氨基酸的I型跨膜蛋白。LAG-3在激活的T细胞、自然杀伤细胞、B细胞和浆细胞样树突状细胞上表达。

[0114] 抗原可以是GARP。GARP(主要是糖蛋白A重复)是含富亮氨酸重复的跨膜蛋白,其存在于受刺激的Treg克隆的表面上,而不存在于Th克隆上。

[0115] 抗原可以是4-1BB。4-1BB是在激活的T淋巴细胞上表达的属于TNF超家族的2型跨膜糖蛋白。4-1BB可由激活的T细胞表达。在炎症部位处树突状细胞、B细胞、滤泡状树突状细胞、天然杀伤细胞、粒细胞和血管壁细胞上可以发现4-1BB的表达。

[0116] 抗原可以是ICOS。ICOS(诱导型T细胞COSTimulator)基因编码在激活的T细胞上表达的CD28超家族共刺激分子。由该基因编码的蛋白质属于CD28和CTLA-4细胞表面受体家族。ICOS形成同二聚体,并在细胞-细胞信号传导、免疫响应和细胞增殖调节中起重要作用。

[0117] 抗原可以是CD70。CD70在高度激活的淋巴细胞上,诸如在T-和B-细胞淋巴瘤中表达。CD70是属于肿瘤坏死因子(TNF)配体家族的细胞因子。该细胞因子是TNFRSF27/CD27的配体。它是激活的而非静息的T和B淋巴细胞上的表面抗原。CD70诱导共同刺激的T细胞增殖,增强溶细胞性T细胞的生成,并有助于T细胞激活。据报道,这种细胞因子在调节B细胞激活、天然杀伤细胞的细胞毒性功能以及免疫球蛋白合成中也发挥着作用。

[0118] 抗原可以是PDGFR $\beta$ 。PDGFR $\beta$ ( $\beta$ 型血小板来源的生长因子受体)基因编码典型的受体酪氨酸激酶,该受体酪氨酸激酶是由细胞外配体结合结构域、跨膜结构域和细胞内酪氨酸激酶结构域组成的跨膜蛋白。成熟的糖基化PDGFR $\beta$ 蛋白的分子量约为180kDa。

[0119] 抗原可以是CD73。CD73(分化簇73),称为外切-5'-核苷酸酶(外切-5'-NT, EC 3.1.3.5)是存在于大多数组织中的糖基磷脂酰肌醇(GPI)-连接的70kDa细胞表面酶。CD73通常用于将AMP转化为腺苷。外切-5'-核苷酸酶(5'-核糖核苷酸磷酸水解酶; EC 3.1.3.5)催化嘌呤5'单核苷酸在中性pH下向核苷的转化,优选底物为AMP。该酶由两个相同的70kD亚基的二聚体组成,所述亚基通过糖基磷脂酰肌醇键与质膜的外表面结合。该酶用作淋巴细胞分化的标记物。

[0120] 抗原可以是CD38。CD38(分化簇38),也称为环状ADP核糖水解酶,是存在于许多免疫细胞(白细胞)表面上的糖蛋白,包括CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、B淋巴细胞和自然杀伤细胞。CD38在细胞粘附、信号转导和钙信号传导中也起作用。CD38功能丧失与免疫响应受损、代谢紊乱以及包

括与自闭症可能相关的社交失忆在内的行为改变有关。CD38蛋白是细胞激活的标记物。它与HIV感染、白血病、骨髓瘤、实体瘤、II型糖尿病和骨代谢以及某些遗传确定的疾患有关。CD38产生一种调节中枢神经系统内催产素释放的酶。

[0121] 抗原可以是整联蛋白 $\alpha_v\beta_3$ 。整联蛋白 $\alpha_v\beta_3$ 是一种类型的整合素,是玻连蛋白的受体。整联蛋白 $\alpha_v\beta_3$ 由两种组分组成,即整联蛋白 $\alpha_v$ 和整联蛋白 $\beta_3$  (CD61),并由血小板表达。整联蛋白 $\alpha_v\beta_3$ 是巨噬细胞或树突状细胞吞噬作用的受体。

[0122] 抗原可以是整联蛋白 $\alpha_v\beta_8$ 。整联蛋白 $\alpha_v\beta_8$ ,一种VN受体,被鉴定为细胞生长的潜在负调节剂。 $\beta_8$ 的胞质结构域在序列上是相异的,缺少与其他 $\alpha_v$ -缔合的整联蛋白 $\beta$ 亚基( $\beta_1$ 、 $\beta_3$ 、 $\beta_5$ 和 $\beta_6$ )的高度同源的胞质结构域的所有氨基酸序列同一性。 $\beta_8$ 胞质结构域在功能上是相异的。 $\alpha_v\beta_8$ 具有受限的分布,并且在非增殖细胞类型中表达最高。

[0123] 抗原可以是CD248。CD248基因编码内皮唾酸蛋白。内皮唾酸蛋白是“XIV组”的成员,“XIV组”是新型的C型凝集素跨膜受体家族,不仅在细胞-细胞粘附过程中起作用,而且在宿主防御中起作用。内皮唾酸蛋白与胚胎、子宫以及肿瘤发展和生长中的血管生成有关。

[0124] 抗原可以是FAP。FAP (成纤维细胞激活蛋白 $\alpha$ ) 是170kDa黑色素瘤膜结合明胶酶蛋白,在人类中由FAP基因编码。由该基因编码的蛋白质是属于丝氨酸蛋白酶家族的同型二聚体整体膜明胶酶。它在上皮癌的反应性间质成纤维细胞、愈合伤口的肉芽组织以及骨肉瘤和软组织肉瘤的恶性细胞中选择性表达。该蛋白被认为参与发育、组织修复和上皮癌变过程中成纤维细胞生长或上皮-间质相互作用的控制。

[0125] 抗原可以是LRRC15。LRRC15,也称为含富亮氨酸重复的15或LIB,是单通道1型膜蛋白。

[0126] 抗原可以是ADAM12。ADAM12是解离素和金属蛋白酶。据报道它参与骨骼肌再生,特别是在细胞融合开始时。它与 $\alpha$ -辅肌动蛋白-2和Syndecan和与RACK1相互作用;这种相互作用是ADAM12 PKC依赖性转位至细胞膜所需的。

[0127] 抗原可以是MMP14。MMP14是降解细胞外基质的各种组分(诸如胶原蛋白)的内肽酶。它激活明胶酶A。MMP14可能通过切割PTK7参与肌动蛋白细胞骨架重组。MMP14经由激活MMP15来充当细胞生长和迁移的正向调节剂,并参与与原-MMP2相缔合的纤维血管组织的形成。

[0128] 抗原可以是F2RL2。F2RL2是偶联至刺激磷酸肌醇水解的G蛋白的经激活的凝血酶的受体。

[0129] 抗原可以是整联蛋白 $\alpha_v$ 。整联蛋白 $\alpha_v$ 亚基与五个整联蛋白 $\beta$ 亚基 $\beta_1$ 、 $\beta_3$ 、 $\beta_5$ 、 $\beta_6$ 或 $\beta_8$ 之一缔合,形成五种不同的 $\alpha_v\beta$ 异二聚体。细胞表面上的整联蛋白 $\alpha_v\beta$ 异二聚体与细胞粘附蛋白(诸如胶原蛋白、纤维蛋白原、纤连蛋白和玻连蛋白)相互作用。这些相互作用在细胞粘附或迁移,特别是在肿瘤转移中起重要作用。

[0130] 抗原可以是整联蛋白 $\alpha_v\beta_6$ 。整联蛋白 $\alpha_v\beta_6$ 是上皮特异性的整联蛋白,是细胞外基质(ECM)蛋白纤连蛋白、玻连蛋白、肌腱蛋白和TGF- $\beta$ 潜伏期相关肽(LAP)的受体。整联蛋白 $\alpha_v\beta_6$ 在健康的成体上皮中不表达,但在伤口愈合期间和癌症中被上调。整联蛋白 $\alpha_v\beta_6$ 已显示出调节侵袭、抑制凋亡、调节基质金属蛋白酶(MMP)表达并激活TGF- $\beta_1$ 。

[0131] 抗原可以是钙粘素11。钙粘素11是来自钙粘素超家族的II型经典钙粘素,是介导钙依赖性细胞-细胞粘附的完整膜蛋白。成熟的钙粘素蛋白由大的N端胞外结构域、跨膜结

构域和小的保守的C端胞质结构域组成。根据II型(非典型)钙粘素缺乏I型钙粘素特异性HAV细胞粘附识别序列来定义。钙粘素11在成骨细胞系中表达,并在成骨细胞分化过程中被上调。

[0132] 抗原可以是PDPN。PDPN(平足蛋白)是在人体组织中具有多种分布的I型整合膜糖蛋白。PDPN的生理功能可能与其粘蛋白类型特征有关。已经鉴定了编码不同同种型的可变剪接的转录物变体。

[0133] 抗原可以是MADCAM。MADCAM(粘膜血管地址素细胞粘附分子)是内皮细胞粘附分子,与髓样细胞上的白细胞 $\beta$ 7整联蛋白LPAM-1( $\alpha$ 4 $\beta$ 7)、L-选择素和VLA-4( $\alpha$ 4 $\beta$ 1)相互作用,以将白细胞引导进入粘膜组织和发炎组织中。MADCAM是免疫球蛋白家族的成员。

[0134] 抗原可以是肾病蛋白。肾病蛋白是细胞粘附分子的免疫球蛋白家族的成员,其在肾脏的肾小球滤过屏障中起作用。肾病蛋白在肾脏组织中表达,并且该蛋白是在肾小球足细胞裂孔隔膜上存在的I型跨膜蛋白。裂孔隔膜是可以在尿形成中排除白蛋白和其他血浆大分子的超滤器。编码肾病蛋白的基因中的突变可导致芬兰型先天性肾病1,其特征为严重的蛋白尿以及裂孔隔膜和足突丧失。

[0135] 抗原可以是足蛋白。足蛋白(NPHS2)是可以调节肾小球通透性的蛋白。编码足蛋白的基因的突变可引起类固醇抗性肾病综合征。

[0136] 抗原可以是IFNAR1。IFNAR1(干扰素 $\alpha$ 和 $\beta$ 受体亚基1)是I型膜蛋白,形成干扰素 $\alpha$ 和 $\beta$ 受体的两条链之一。IFNAR1的结合和激活刺激了Janus蛋白激酶,进而使包括STAT1和STAT2在内的数种蛋白磷酸化。IFNAR1也可以用作抗病毒因子。

[0137] 抗原可以是BDCA2。BDCA2(干扰素 $\alpha$ 和 $\beta$ 受体亚基1)是选择性地表达于浆细胞样树突细胞(PDC)上的II型C型凝集素受体,其中它参与抗原捕获和I型干扰素产生的调节。

[0138] 抗原可以是CD30。CD30(TNF受体超家族成员8)通过激活的T细胞和B细胞表达,但不通过静息的T细胞和B细胞表达。TRAF2和TRAF5可与CD30相互作用并介导导致NF- $\kappa$ B激活的信号转导。CD30是细胞凋亡的正调节剂,并且也已被证明限制自身反应性CD8效应T细胞的增殖潜能并保护身体免受自身免疫。据报道,编码CD30的基因的两个可变剪接的转录物变体导致CD30不同同种型的翻译。

[0139] c-KIT(KIT原癌基因受体酪氨酸激酶/CD117)是MGF(肥大细胞生长因子,也称为干细胞因子)的3型跨膜受体。编码c-KIT的基因突变与胃肠道间质瘤、肥大细胞疾病、急性骨髓性白血病和斑驳病有关。对于编码c-KIT的基因,已经发现了编码不同同种型的多种转录物变体。

[0140] 抗原可以是CTGF。CTGF(结缔组织生长因子)是由血管内皮细胞分泌的有丝分裂原。CTGF在软骨细胞增殖和分化、多种细胞类型中的细胞粘附中起作用,并且与血小板来源的生长因子有关。编码CTGF的基因中的某些多态性与更高的全身性硬化发生率有关。

[0141] 抗原可以是CD40。分化簇40(CD40)是肿瘤坏死因子受体(TNF-R)家族的成员。CD40可以是可以在正常细胞(诸如单核细胞、巨噬细胞、B淋巴细胞、树突细胞、内皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞和上皮)以及在肿瘤细胞(包括B-细胞淋巴瘤和许多类型的实体瘤)中组成型表达的50kDa细胞表面糖蛋白。响应于IL-1 $\beta$ p、IFN- $\gamma$ 、GM-CSF和LPS诱导的信号传导事件,CD40的表达可以在抗原呈递细胞中增加。

[0142] 抗原可以是TIM-3。TIM-3(T细胞免疫球蛋白和含有粘蛋白结构域的3)可以用作T

细胞抑制受体。半乳凝集素-9触发Tim-3可以诱导Tim-3+Th1细胞中的细胞死亡,并改善实验性自身免疫性脑脊髓炎。Tim-3也可需要诱导耐受性,因为Tim-3缺陷小鼠和用Tim-3-Ig融合蛋白治疗的小鼠在诱导抗原特异性耐受中均存在缺陷。总体而言,TIM-3是特别用作限制Th1和Tc1 T细胞响应的持续时间和幅度的免疫检查点受体。

[0143] 抗原可以是TNFR2。TNFR2(肿瘤坏死因子受体2),也称为TNFRSF1B(肿瘤坏死因子受体超家族1B)和CD120b,是单通道I型膜蛋白,和含有4个富半胱氨酸结构域(CRD)重复的TNFR超家族成员。除了全长膜锚定形式外,还可以经由两种不同的机制产生可溶性TNFR2:(1)经由蛋白水解处理完整膜锚定形式而脱落,和(2)从编码TNFR2的细胞外结构域的可变剪接的信息中翻译。TNFR2是对TNF- $\alpha$ 的亲合力高并且是对同型三聚体淋巴毒素- $\alpha$ 的亲合力低约5倍的受体。TNFR2(肿瘤坏死因子受体II型)和TNF-受体1形成异源复合物,所述异源复合物介导具有E3泛素连接酶活性的两种抗凋亡蛋白c-IAP1和c-IAP2的募集。c-IAP1可通过介导抗凋亡信号的TNF受体相关因子2的泛素化和降解来增强TNF诱导的凋亡。小鼠中的基因敲除研究表明,TNFR2通过刺激抗氧化途径在保护神经元免受凋亡中发挥作用。

[0144] 抗原可以是DEC205。DEC205是主要由树突细胞表达的I型细胞表面蛋白。DEC205发现于淋巴组织的T细胞区域中的指状树突状细胞、骨髓来源的DC、朗格罕细胞上,以及以低水平存在于巨噬细胞和T细胞上。DEC205可以在树突细胞成熟期间上调。DEC-205也已显示被B细胞以中等水平表达,并在前-B细胞向B细胞过渡期间被上调。在结构上,DEC205家族的特征是富含半胱氨酸的N端结构域,其后是纤连蛋白II型结构域和多个碳水化合物识别结构域(CRD)。DEC-205有十个CRD。单个跨膜结构域后是短的胞质尾。

[0145] 抗原可以是DCIR。DCIR(树突细胞免疫受体/CLEC4A)是C型凝集素/C型凝集素样结构域(CTL/CTLD)超家族的成员。DCIR可具有多种功能,诸如细胞粘附、细胞-细胞信号传导、糖蛋白周转以及在炎症和免疫响应中的作用。编码的2型跨膜蛋白可以在炎性和免疫响应中发挥作用。已经为编码DCIR的基因鉴定了编码不同同种型的多种转录物变体。

[0146] 抗原可以是CD86。CD86(分化簇86)是I型膜蛋白,是免疫球蛋白超家族的成员。CD86由抗原呈递细胞表达,并且是T细胞的细胞表面处的两种蛋白质(即CD28抗原和细胞毒性T-淋巴细胞-相关的蛋白质4)的配体。CD86与CD28抗原的结合是用于激活T细胞的共刺激信号。CD86蛋白与细胞毒性T-淋巴细胞相关蛋白4的结合负调节T细胞激活并减少免疫响应。

[0147] 抗原可以是CD45RB或CD45RB/R0。CD45RB是具有外显子5剪接的CD45的同种型。CD45RB是在外周B细胞、天然T细胞、胸腺细胞、巨噬细胞和树突细胞上表达的220kD糖蛋白。CD45RB可以在TCR和BCR信号传导中发挥作用。随着T细胞被激活并从天然细胞发展到记忆细胞,CD45RB表达被下调。此外,可以通过CD45RB强度分离分泌不同细胞因子谱的功能不同的CD4+T细胞亚群。CD45的主要配体是半乳凝集素-1、CD2、CD3、CD4和Thy-1。与CD45RB不同,CD45R0是效应子或记忆T细胞上表达的抗原同种型,因为它们下调CD45A和CD45B同种型。

[0148] 抗体的抗原结合结构域可包含一个或多个轻链(L)CDR和一个或多个重链(H)CDR。例如,抗体的抗体结合结构域可包含以下中的一种或多种:轻链互补决定区1(LCDR1)、轻链互补决定区2(LCDR2)或轻链互补决定区3(LCDR3)。对于另一个实例,抗体结合结构域可包含以下中的一种或多种:重链互补决定区1(HCDR1)、重链互补决定区2(HCDR2)或重链互补决定区3(HCDR3)。作为另外的实例,抗体的抗体结合结构域可包含以下中的一种或多种:

LCDR1、LCDR2、LCDR3、HCDR1、HCDR2和HCDR3。作为另一个实例,抗体的抗体结合结构域可包含以下全部六个:LCDR1、LCDR2、LCDR3、HCDR1、HCDR2和HCDR3。

[0149] 抗体构建体的抗原结合结构域可以选自特异性结合至抗原的任何结构域,包括但不限于:单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体或其功能性(抗原结合)片段,例如重链可变结构域( $V_H$ )和轻链可变结构域( $V_L$ ),或可以是DARPin、亲和体、亲合体、打结素、单体、亲和钳、胞外域、受体胞外域、受体、细胞因子、配体、免疫细胞因子、T细胞受体、双环肽、fynomer或重组T细胞受体。

[0150] 抗体构建体的抗原结合结构域可以与结合至抗原的特定抗原结合结构域至少80%同一,其中抗原结合结构域选自但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体或其功能片段,例如重链可变结构域( $V_H$ )和轻链可变结构域( $V_L$ ),或者可以是DARPin、亲和体、亲合体(avimer)、打结素、单体、亲和钳、胞外域、受体胞外域、受体、细胞因子、配体、免疫细胞因子、T细胞受体、双环肽、fynomer、抗运载蛋白(anticalin)、VNAR或重组T细胞受体。

[0151] 在某些实施方案中,抗体植入体包含含Fc结构域的Fc区,其中Fc结构域可以是与Fc受体相互作用的Fc区的一部分。抗体构建体的Fc结构域可与免疫细胞上重组的Fc-受体(FcR)相互作用。Fc结构域还可以介导效应分子和细胞之间的相互作用,这可以导致免疫系统的激活。Fc区可以源自IgG、IgA或IgD抗体同种型,并且可以包含分别源自抗体重链的第二和第三恒定结构域的两个相同的蛋白质片段。在源自IgG抗体同种型的Fc区域中,Fc区域可包含对于FcR介导的下游作用可能是必不可少的高度保守的N-糖基化位点。Fc区域可源自IgM或IgE抗体同种型,其中Fc区域可包含三个重链恒定结构域。

[0152] Fc结构域可以与不同类型的FcR相互作用。不同类型的FcR可以包括例如Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RIIA、Fc $\gamma$ RIIB、Fc $\gamma$ RIIIA、Fc $\gamma$ RIIIB、Fc $\alpha$ RI、Fc $\mu$ R、Fc $\epsilon$ RI、Fc $\epsilon$ RII和FcRn。FcR可以位于某些免疫细胞的膜上,包括例如B淋巴细胞、天然杀伤细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、滤泡树突细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、血小板和肥大细胞。一旦FcR由Fc结构域啮合,FcR可以启动功能,包括例如经由受体介导的内吞作用清除抗原-抗体复合物、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP),以及配体触发的跨质膜信号传输,这可能导致分泌、胞吐作用和细胞代谢发生变化。当FcR在细胞表面处被抗体和多价抗原聚集时,FcR可递送信号。具有基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)的FcR的聚集可依序激活SRC家族酪氨酸激酶和SYK家族酪氨酸激酶。ITAM包含侧接有七个可变残基的两次重复的YxxL序列。SRC和SYK激酶可以将转导的信号与常见的激活途径相连。

[0153] 在一些实施方案中,Fc结构域或区域可展现出对一种或多种Fc受体降低的结合亲和力。在一些实施方案中,Fc结构域或区域可展现出对一种或多种Fc $\gamma$ 受体降低的结合亲和力。在一些实施方案中,Fc结构域或区域可展现出对FcRn受体降低的结合亲和力。在一些实施方案中,Fc结构域或区域可展现出对Fc $\gamma$ 和FcRn受体降低的结合亲和力。在一些实施方案中,Fc结构域是Fc无效结构域或区域。如本文所用,“Fc无效”是指展现出对Fc $\gamma$ 受体的弱至无结合的结构域。在一些实施方案中,Fc无效结构域或区域展现出对Fc $\gamma$ 受体的结合亲和力降低(如Kd增加)至少1000倍。

[0154] Fc结构域可具有减少Fc结构域与Fc受体的结合的一种或多种、两种或多种、三种或多种或四种或多种氨基酸取代。在某些实施方案中,Fc结构域展现出与Fc $\gamma$ RI(CD64)、Fc

$\gamma$  RIIA (CD32)、Fc  $\gamma$  RIIIA (CD16a)、Fc  $\gamma$  RIIIB (CD16b) 或其任何组合的结合降低。为了降低Fc结构域或区域对Fc受体的结合亲和力,Fc结构域或区域可包含具有降低Fc结构域或区域对Fc受体的亲和力的作用的一种或多种取代。在某些实施方案中,一种或多种取代包含对应于根据Kabat编号的EU索引的E233P、L234V、L234A、L235A、L235E、 $\Delta$  G236、G237A、E318A、K320A、K322A、A327G、A330S或P331S的任一种或多种IgG1重链突变。

[0155] 在一些实施方案中,Fc结构域或区域可包含已经从野生型IgG1序列修饰的IgG1同种型的序列。修饰可包括在多于一个氨基酸残基处(诸如在5个不同氨基酸残基处)的取代,包括根据Kabat编号的EU索引的L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L (IgG1VLPLL)。修饰可包括在多于一个氨基酸残基处(诸如在2个不同氨基酸残基处)的取代,包括根据Kabat编号的EU索引的S239D/I332E (IgG1DE)。修饰可包括在多于一个氨基酸残基处(诸如在3个不同氨基酸残基处)的取代,包括根据Kabat编号的EU索引的S298A/E333A/K334A (IgG1AAA)。

[0156] 在一些实施方案中,Fc结构域或区域可包含已经从野生型IgG序列修饰的IgG同种型的序列。在一些实施方案中,Fc结构域或区域可以包含已经从野生型IgG1序列修饰的IgG1同种型的序列。在一些实施方案中,修饰包括降低IgG Fc结构域或区域对所有Fc  $\gamma$  受体的结合亲和力的一种或多种氨基酸的取代。修饰可以是E233、L234和L235,诸如根据Kabat的EU索引的E233P/L234V/L235A或E233P/L234V/L235A/ $\Delta$  G236。修饰可以是L235、F243、R292、Y300和P396的取代,诸如根据Kabat的EU索引的L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L (IgG1VLPLL)。修饰可以是P238的取代,诸如根据Kabat的EU索引的P238A。修饰可以是D265的取代,诸如根据Kabat的EU索引的D265A。修饰可以是D265的取代,诸如根据Kabat的EU索引的D265A。修饰可以是N297的取代,诸如根据Kabat的EU索引的N297A。修饰可以是A327的取代,诸如根据Kabat的EU索引的A327Q。修饰可以是P329的取代,诸如根据Kabat的EU索引的P239A。

[0157] 在一些实施方案中,IgG Fc结构域或区域包含与野生型或参考IgG Fc结构域相比减少了其对Fc  $\gamma$  R1的结合亲和力的至少一种氨基酸取代。修饰可包括在F241处的取代,诸如根据Kabat的EU索引的F241A。修饰可包括在F243处的取代,诸如根据Kabat的EU索引的F243A。修饰可包括在V264处的取代,诸如根据Kabat的EU索引的V264A。修饰可包括在D265处的取代,诸如根据Kabat的EU索引的D265A。

[0158] 在一些实施方案中,IgG Fc结构域或区域包含与野生型或参考IgG Fc结构域相比增加了其对Fc  $\gamma$  R1的结合亲和力的至少一种氨基酸取代。修饰可包括在A327和P329处的取代,诸如根据Kabat的EU索引的A327Q/P329A。

[0159] 在一些实施方案中,修饰包括减少了IgG Fc结构域或区域对Fc  $\gamma$  RII和Fc  $\gamma$  RIIIA受体的结合亲和力的一种或多种氨基酸取代。修饰可以是D270的取代,诸如根据Kabat的EU索引的D270A。修饰可以是Q295的取代,诸如根据Kabat的EU索引的Q295A。修饰可以是A327的取代,诸如根据Kabat的EU索引的A237S。

[0160] 在一些实施方案中,修饰包括增加了IgG Fc结构域或区域对Fc  $\gamma$  RII和Fc  $\gamma$  RIIIA受体的结合亲和力的一种或多种氨基酸取代。修饰可以是T256的取代,诸如根据Kabat的EU索引的T256A。修饰可以是K290的取代,诸如根据Kabat的EU索引的K290A。

[0161] 在一些实施方案中,修饰包括增加了IgG Fc结构域或区域对Fc  $\gamma$  RII受体的结合亲和力的一种或多种氨基酸取代。修饰可以是R255的取代,诸如根据Kabat的EU索引的

R255A。修饰可以是E258的取代,诸如根据Kabat的EU索引的E258A。修饰可以是S267的取代,诸如根据Kabat的EU索引的S267A。修饰可以是E272的取代,诸如根据Kabat的EU索引的E272A。修饰可以是N276的取代,诸如根据Kabat的EU索引的N276A。修饰可以是D280的取代,诸如根据Kabat的EU索引的D280A。修饰可以是H285的取代,诸如根据Kabat的EU索引的H285A。修饰可以是N286的取代,诸如根据Kabat的EU索引的N286A。修饰可以是T307的取代,诸如根据Kabat的EU索引的T307A。修饰可以是L309的取代,诸如根据Kabat的EU索引的L309A。修饰可以是N315的取代,诸如根据Kabat的EU索引的N315A。修饰可以是K326的取代,诸如根据Kabat的EU索引的K326A。修饰可以是P331的取代,诸如根据Kabat的EU索引的P331A。修饰可以是S337的取代,诸如根据Kabat的EU索引的S337A。修饰可以是A378的取代,诸如根据Kabat的EU索引的A378A。修饰可以是E430的取代,诸如根据Kabat的EU索引的E430。

[0162] 在一些实施方案中,修饰包括增加了IgG Fc结构域或区域对Fc  $\gamma$  RII受体的结合亲和力并减少对Fc  $\gamma$  RIIIA受体的结合亲和力的一种或多种氨基酸取代。修饰可以是H268的取代,诸如根据Kabat的EU索引的H268A。修饰可以是R301的取代,诸如根据Kabat的EU索引的R301A。修饰可以是K322的取代,诸如根据Kabat的EU索引的K322A。

[0163] 在一些实施方案中,修饰包括降低了IgG Fc结构域或区域对Fc  $\gamma$  RII受体的结合亲和力但不影响对Fc  $\gamma$  RIIIA受体的结合亲和力的一种或多种氨基酸取代。修饰可以是R292的取代,诸如根据Kabat的EU索引的R292A。修饰可以是K414的取代,诸如根据Kabat的EU索引的K414A。

[0164] 在一些实施方案中,修饰包括降低了IgG Fc结构域或区域对Fc  $\gamma$  RII受体的结合亲和力并增加对Fc  $\gamma$  RIIIA受体的结合亲和力的一种或多种氨基酸取代。修饰可以是S298的取代,诸如S239D/I332E/A330L。修饰可以是S239和I332的取代,诸如S239D/I332E。

[0165] 在一些实施方案中,修饰包括降低了IgG Fc结构域或区域对Fc  $\gamma$  RIIIA受体的结合亲和力并不影响对Fc  $\gamma$  RII受体的结合亲和力的一种或多种氨基酸取代。修饰可以是S239的取代,诸如根据Kabat的EU索引的S239A。修饰可以是E269的取代,诸如根据Kabat的EU索引的E269A。修饰可以是E293的取代,诸如根据Kabat的EU索引的E293A。修饰可以是Y296的取代,诸如根据Kabat的EU索引的Y296F。修饰可以是V303的取代,诸如根据Kabat的EU索引的V303A。修饰可以是A327的取代,诸如根据Kabat的EU索引的A327G。修饰可以是K338的取代,诸如根据Kabat的EU索引的K338A。修饰可以是D376的取代,诸如根据Kabat的EU索引的D376A。

[0166] 在一些实施方案中,修饰包括增加了IgG Fc结构域或区域对Fc  $\gamma$  RIIIA受体的结合亲和力并不影响对Fc  $\gamma$  RII受体的结合亲和力的一种或多种氨基酸取代。修饰可以是E333的取代,诸如根据Kabat的EU索引的E333A。修饰可以是K334的取代,诸如根据Kabat的EU索引的K334A。修饰可以是A339的取代,诸如根据Kabat的EU索引的A339T。修饰可以是S239和I332的取代,诸如S239D/I332E。

[0167] 在一些实施方案中,IgG Fc结构域或区域包含与野生型或参考IgG Fc结构域相比减少对FcRn的结合亲和力的至少一种氨基酸取代。修饰可包括在H435处的取代,诸如根据Kabat的EU索引的H435A。修饰可包括在I253处的取代,诸如根据Kabat的EU索引的I253A。修饰可包括在H310处的取代,诸如根据Kabat的EU索引的H310A。修饰可包括在I253、H310和



H435处的取代,诸如根据Kabat的EU索引的I253A/H310A/H435A。

[0168] 修饰可以包括相对于野生型或参考IgG Fc结构域增加了IgG Fc结构域对FcRn的结合亲和力的一个氨基酸残基的取代。修饰可包括在V308处的取代,诸如根据Kabat的EU索引的V308P。修饰可包括在M428处的取代,诸如根据Kabat的EU索引的M428L。修饰可包括在N434处的取代,诸如根据Kabat的EU索引的N434A或根据Kabat的EU索引的N434H。修饰可包括在T250和M428处的取代,诸如T250Q和M428L。修饰可包括在M428和N434处的取代,诸如根据Kabat的EU索引的M428L和N434S、N434A或N434H。修饰可包括在M252、S254和T256处的取代,诸如根据Kabat的EU索引的M252Y/S254T/T256E。修饰可以是选自P257L、P257N、P257I、V279E、V279Q、V279Y、A281S、E283F、V284E、L306Y、T307V、V308F、Q311V、D376V和N434H的一种或多种氨基酸取代。影响其与FcRn的相互作用的IgG Fc结构域中的其他取代公开在美国专利No. 9,803,023中(其公开内容通过引用并入本文)。

[0169] 本公开的抗体可以由两条相同的轻蛋白链和两条相同的重蛋白链组成,它们均通过二硫键共价结合在一起。轻链和重链的N-端区域可以一起形成抗体的抗原识别位点。在结构上,抗体的各种功能可以局限于离散的蛋白质结构域(即区域)。可以识别并可以结合抗原的位点是三个互补决定区(CDR),它们可以位于重链和轻链N末端处的可变重链区域和可变轻链区域内。恒定结构域提供了抗体的一般框架,并且可能不直接参与抗体与抗原的结合,但可能参与各种效应子功能,诸如抗体参与抗体依赖性细胞细胞毒性,并可以结合Fc受体。恒定结构域可以形成Fc区。恒定结构域可以包括Fc结构域。天然轻链和重链可变区的结构域可以具有相同的一般结构,并且每个可变结构域可以包含通过CDR连接的四个框架区,其序列在某种程度上可以是保守的。四个框架区可以主要采用 $\beta$ -折叠构象,并且CDR可以形成环,所述环连接 $\beta$ -折叠结构并且在一些方面形成 $\beta$ -折叠结构的一部分。每条链中的CDR可被框架区紧密地保持,并且与来自另一条链的CDR一起可有助于抗原结合位点的形成。

[0170] 抗体构建体可以包含具有相对于天然或原始氨基酸序列的至少一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个修饰和在某些实施方案中不大于40、35、30、25、20、15或10个氨基酸序列修饰的氨基酸序列轻链。抗体构建体可以包含具有相对于天然或原始氨基酸序列的至少一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个修饰和在某些实施方案中不大于40、35、30、25、20、15或10个氨基酸序列修饰的氨基酸序列重链。抗体构建体的抗体可包括任何类型的抗体,其可以被指定至不同类别的免疫球蛋白,如IgA、IgD、IgE、IgG和IgM。几种不同的类别可以进一步分为同种型,如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。抗体还可以包含轻链和重链,通常大于一条链。具有与野生型IgG4-铰链区配对的IgG4 Fc结构域的抗体可以进行链交换,其中二价抗体的一个臂解离并与另一种具有不同抗原特异性的IgG4抗体的链配对。可以通过将IgG4 Fc结构域与IgG4铰链的S228P突变配对来防止链交换。

[0171] 参考抗体的示例性重链序列可用于鉴定残基变体和突变体。人IgG1重链的示例性重链序列是人IgG1抗体的重链序列,并且可以包含:

[0172] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV  
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC  
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS

KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD  
KSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:437)。

[0173] 人IgG2重链的示例性重链参考序列可包含：

[0174] ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV  
VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPGPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD  
VSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG  
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW  
QQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:438)。

[0175] 人IgG4重链的示例性重链参考序列可包含：

[0176] ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV  
VTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV  
DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK  
GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR  
WQEGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:439)。

[0177] 对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定区 (Fc) 分别可以是 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$  和 $\mu$ 。基于恒定结构域的氨基酸序列,轻链可以是卡帕( $\kappa$ )或兰姆达( $\lambda$ )之一。Fc区域可含有Fc结构域。Fc受体可以结合Fc结构域。Fc结构域可包含人IgG1的氨基酸残基216至447,所述氨基酸残基被包含在SEQ ID NO:437中。Fc结构域可包含人IgG2的氨基酸残基216至442,所述氨基酸残基被包含在SEQ ID NO:438中。Fc结构域可包含IgG4的氨基酸残基216至44,所述氨基酸残基被包含在SEQ ID NO:439中。

[0178] 抗体构建体可以包含抗原结合抗体片段。抗体片段可以包括:(i) Fab片段,一种由 $V_L$ 、 $V_H$ 、 $C_L$ 和 $C_{H1}$ 结构域组成的单价片段;(ii)  $F(ab')_2$ 片段,一种包含在铰链区处由二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;和(iii)由抗体单臂的 $V_L$ 和 $V_H$ 结构域组成的 $F_v$ 片段。尽管 $F_v$ 片段的两个结构域 $V_L$ 和 $V_H$ 可以由单独的基因编码,但它们可以通过合成接头连接,以制成为单个蛋白链,其中 $V_L$ 和 $V_H$ 区域配对以形成单价分子。

[0179]  $F(ab')_2$ 和Fab'部分可以重组产生或通过用蛋白酶诸如胃蛋白酶和木瓜蛋白酶处理免疫球蛋白(如单克隆抗体)来产生,并且可以包括在两条H链的每一个中的铰链区之间存在的二硫键附近通过消化免疫球蛋白产生的抗体片段。Fab片段还可包含轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域( $C_{H1}$ )。Fab'片段与Fab片段的区别可能在于在重链 $C_{H1}$ 结构域的羧基末端添加了一些残基,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。

[0180]  $F_v$ 可以是含有完整抗原识别和抗原结合位点的最小抗体片段。该区域可以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组成。在这种构型中,每个可变结构域的三个CDR可以相互作用以在 $V_H$ - $V_L$ 二聚体的表面上限定抗原结合位点。尽管结合的亲和力可以低于整个结合位点的亲和力,但单个可变结构域(或仅包含三个对抗原具有特异性的CDR的 $F_v$ 的一半)可以识别并结合抗原。

[0181] 抗体可以包括含Fc结构域的Fc区域。抗体的Fc结构域可能与免疫细胞上存在的FcR相互作用。Fc结构域还可以介导效应分子和细胞之间的相互作用,这可能导致免疫系统激活。在IgG、IgA和IgD抗体同种型中,Fc区域可包含可以源自抗体重链的第二和第三恒定结构域的两个相同的蛋白质片段。在IgM和IgE抗体同种型中,Fc区域可包含三个重链恒定

结构域。在IgG抗体同种型中,Fc区域可包含高度保守的N-糖基化位点,这对于FcR介导的下游效应可能是重要的。

[0182] 本文使用的抗体可以是“嵌合的”或“人源化的”。非人(如鼠)抗体的嵌合或人源化形式可以是可含有源自非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(诸如Fv、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>或抗体的其他靶结合亚结构域)。通常,人源化抗体可包含至少一个并且通常是两个可变结构域可变域的基本上所有,其中所有或基本上所有的CDR区对应于非人免疫球蛋白的那些,并且所有或基本上所有的框架区是人免疫球蛋白序列的那些。人源化抗体还可包含至少一部分的免疫球蛋白恒定区(Fc),通常是人免疫球蛋白共有序列的一部分。

[0183] 本文所述的抗体可以是人抗体。如本文所用,“人抗体”可以包括具有例如人免疫球蛋白的氨基酸序列的抗体,并且可以包括从人免疫球蛋白文库或从对一种或多种人免疫球蛋白为转基因的不表达内源性免疫球蛋白的动物分离的抗体。人抗体可以使用不能表达功能性内源性免疫球蛋白但可以表达人免疫球蛋白基因的转基因小鼠产生。可以使用指导的选择来产生识别选择的表位的完全人抗体。在这种方法中,可以使用选择的非人单克隆抗体,如小鼠抗体,来指导识别相同表位的完全人抗体的选择。

[0184] 本文所述的抗体可以是双特异性抗体或双可变结构域抗体(DVD)。双特异性和DVD抗体是可以对至少两种不同的抗原具有结合特异性的单克隆抗体,通常是人抗体或人源化抗体。

[0185] 本文所述的抗体可以是衍生抗体。例如,衍生抗体可以通过糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、通过已知的保护/封闭基团衍生化、蛋白水解切割、与细胞配体或其他蛋白质连接来修饰。

[0186] 本文所述的抗体可以具有已相对于相应的野生型序列被修饰以改变至少一个恒定区介导的生物学效应子功能的序列。例如,在一些实施方案中,可以修饰抗体以相对于未修饰的抗体降低至少一种恒定区介导的生物学效应子功能,如减少的与Fc受体(FcR)的结合。FcR结合可以通过例如在FcR相互作用所必需的特定区域处突变抗体的免疫球蛋白恒定区区段而减少。

[0187] 如本文所述的抗体或Fc结构域可以被修饰以相对于未修饰的抗体或Fc结构域获得或改善至少一个恒定区介导的生物学效应子功能,如以增强Fc $\gamma$ R相互作用。例如,可以根据本文所述的方法产生具有以比相应的野生型恒定区更大的亲和力与Fc $\gamma$ RIIA、Fc $\gamma$ RIIB和/或Fc $\gamma$ RIIIA结合的恒定区的抗体。可以根据本文所述的方法产生以比相应的野生型Fc结构域更大的亲和力结合至Fc $\gamma$ RIIA、Fc $\gamma$ RIIB和/或Fc $\gamma$ RIIIA的Fc结构域。

[0188] 抗体构建体可以包含具有至少一个氨基酸残基的修饰的抗体。修饰可以是取代、添加、突变、缺失等。抗体修饰可以是非天然氨基酸的插入。

[0189] 抗体构建体可以包含抗原结合结构域,所述抗原结合结构域特异性结合至免疫细胞上的抗原,诸如免疫细胞(如T细胞、B细胞或APC)、星形细胞、上皮细胞、成纤维细胞、纤维细胞、肌成纤维细胞、滑膜成纤维细胞、足细胞或与纤维化发病相关的其他细胞。抗体构建体可包含含促进特异性结合至抗原的一个或多个CDR的抗原结合结构域。抗原结合结构域可以包含分别对表1或表2所示的一组CDR或一对可变区具有至少80%序列同一性的一组CDR或一对可变区。

[0190] 抗体构建体可包含结合至抗原的抗原结合结构域,其中抗原结合结构域包含与表1中所示的一组CDR具有至少80%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或至少100%序列同一性的一组CDR。抗体构建体可包含结合至抗原的抗原结合结构域,其中抗原结合结构域包含与以下序列的至少80%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或至少100%序列同一性:a)包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的LCDR3;b)包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的HCDR1,包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的HCDR2,包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HCDR3,包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的LCDR3;c)包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的LCDR3;d)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的LCDR3;e)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的LCDR3;f)包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的LCDR3;g)包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的LCDR3;h)包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的LCDR3;i)包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的LCDR3;j)包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的LCDR3;k)包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的LCDR3;l)包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列的

LCDR3;m) 包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列的LCDR3;n) 包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:84的氨基酸序列的LCDR3;o) 包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:86的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的LCDR3;p) 包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列的LCDR3;q) 包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:101的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:102的氨基酸序列的LCDR3;r) 包含SEQ ID NO:103的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:104的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:105的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:106的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:107的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:108的氨基酸序列的LCDR3;s) 包含SEQ ID NO:109的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:110的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:111的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:112的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:113的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:114的氨基酸序列的LCDR3;t) 包含SEQ ID NO:109的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:110的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:111的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:115的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:116的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:117的氨基酸序列的LCDR3;u) 包含SEQ ID NO:118的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:119的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:120的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:121的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:122的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:123的氨基酸序列的LCDR3;v) 包含SEQ ID NO:124的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:125的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:126的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:127的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:128的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:129的氨基酸序列的LCDR3;w) 包含SEQ ID NO:130的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:131的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:132的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:133的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:134的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:135的氨基酸序列的LCDR3;x) 包含SEQ ID NO:136的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:137的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:138的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:139的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:140的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:141的氨基酸序列的LCDR3;y) 包含SEQ ID NO:142的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:143的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:144的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:145的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:146的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:147的氨基酸序列的

LCDR3;z) 包含SEQ ID NO:148的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:149的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:150的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:151的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:152的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:153的氨基酸序列的LCDR3;aa) 包含SEQ ID NO:154的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:155的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:156的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:157的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:158的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:159的氨基酸序列的LCDR3;bb) 包含SEQ ID NO:160的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:161的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:162的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:163的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:164的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:165的氨基酸序列的LCDR3;cc) 包含SEQ ID NO:166的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:167的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:168的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:169的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:170的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:171的氨基酸序列的LCDR3;dd) 包含SEQ ID NO:172的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:173的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:174的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:175的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:176的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:177的氨基酸序列的LCDR3;ee) 包含SEQ ID NO:178的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:179的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:180的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:181的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:182的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:183的氨基酸序列的LCDR3;ff) 包含SEQ ID NO:184的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:185的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:186的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:187的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:188的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:189的氨基酸序列的LCDR3;gg) 包含SEQ ID NO:190的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:191的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:192的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:193的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:194的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:195的氨基酸序列的LCDR3;hh) 包含SEQ ID NO:196的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:197的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:198的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:199的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:200的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:201的氨基酸序列的LCDR3;ii) 包含SEQ ID NO:202的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:203的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:204的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:205的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:207的氨基酸序列的LCDR3 jj) 包含SEQ ID NO:208的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:209的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:210的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:211的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:212的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:213的氨基酸序列的LCDR3;kk) 包含SEQ ID NO:214的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:215的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:216的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:217的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:218的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:219的氨基酸序列的LCDR3;ll) 包含SEQ ID NO:220的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:221的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:222的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:223的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:224的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:225的氨基酸序列的

LCDR3;mm) 包含SEQ ID NO:226的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:227的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:228的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:229的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:230的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:231的氨基酸序列的LCDR3;nn) 包含SEQ ID NO:232的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:234的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:235的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:236的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:237的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:238的氨基酸序列的LCDR3;oo) 包含SEQ ID NO:239的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:240的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:241的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:242的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:243的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:244的氨基酸序列的LCDR3;pp) 包含SEQ ID NO:245的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:246的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:247的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:248的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:249的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:250的氨基酸序列的LCDR3;qq) 包含SEQ ID NO:251的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:252的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:253的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:254的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:255的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:256的氨基酸序列的LCDR3;rr) 包含SEQ ID NO:257的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:258的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:259的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:260的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:261的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:262的氨基酸序列的LCDR3;ss) 包含SEQ ID NO:263的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:264的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:265的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:266的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:267的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:268的氨基酸序列的LCDR3;tt) 包含SEQ ID NO:269的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:270的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:271的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:272的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:273的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:274的氨基酸序列的LCDR3;uu) 包含SEQ ID NO:275的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:276的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:277的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:278的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:279的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:280的氨基酸序列的LCDR3;vv) 包含SEQ ID NO:281的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:282的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:283的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:284的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:285的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:286的氨基酸序列的LCDR3;ww) 包含SEQ ID NO:287的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:288的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:289的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:290的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:291的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:292的氨基酸序列的LCDR3;xx) 包含SEQ ID NO:293的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:294的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:295的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:296的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:297的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:298的氨基酸序列的LCDR3;yy) 包含SEQ ID NO:440的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:441的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:442的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:443的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:444的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:445的氨基酸序列的

LCDR3;zz) 包含SEQ ID NO:446的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:447的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:448的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:449的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:450的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:451的氨基酸序列的LCDR3;aaa) 包含SEQ ID NO:452的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:453的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:454的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:455的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:456的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:457的氨基酸序列的LCDR3;bbb) 包含SEQ ID NO:458的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:459的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:460的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:461的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:462的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:463的氨基酸序列的LCDR3;ccc) 包含SEQ ID NO:464的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:465的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:466的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:467的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:468的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:469的氨基酸序列的LCDR3;ddd) 包含SEQ ID NO:470的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:471的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:472的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:473的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:474的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:475的氨基酸序列的LCDR3;或eee) 包含SEQ ID NO:476的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:477的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:478的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:479的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:480的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:481的氨基酸序列的LCDR31。

[0191] 抗体构建体可包含包括一种或多种可变结构域的抗原结合结构域。抗体构建体可包含包括轻链可变结构域( $V_L$ 结构域)的抗原结合结构域。结合结构域可包含与表2中的任何 $V_L$ 序列具有至少80%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或至少100%序列同一性的轻链可变区。抗体构建体可包含包括重链可变结构域( $V_H$ 结构域)的抗原结合结构域。抗原结合结构域可包含与表2中的任何 $V_H$ 序列具有至少80%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或至少100%序列同一性的重链可变区。抗原结合结构域可包含与表2所示的一对可变区具有至少80%序列同一性的一对重链和轻链可变区。抗原结合结构域可包含与表2所示的一对可变区的非-CDR区具有至少80%序列同一性的一对重链和轻链可变区。

[0192] 抗体构建体可包含特异性结合至抗原的抗原结合结构域,其中抗原结合结构域包含:a)与SEQ ID NO:300的氨基酸序列具有至少80%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或至少100%序列同一性的 $V_H$ 序列,和与SEQ ID NO:299的氨基酸序列具有至少80%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或至少100%序列同一性的 $V_L$ 序列;b)与SEQ ID NO:301的氨基酸序列具有至少80%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或至少100%序列同一性的 $V_H$ 序列,和与SEQ ID NO:299的氨基酸序列具有至少80%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或至少100%序列同一性的 $V_L$ 序列;c)与SEQ ID NO:302的氨基酸序列具有至少80%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或至少100%序列同一性的 $V_H$ 序列,和与SEQ ID NO:303的氨基酸序列具有至少80%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或至少100%序列同一性的 $V_L$ 序列;d)与SEQ ID NO:304的氨基酸序列具有至少80%、至少90%、至少95%、至



[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

序列同一性的V<sub>H</sub>序列,和与SEQ ID NO:489的氨基酸序列具有至少80%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或至少100%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;或dddd)与SEQ ID NO:490的氨基酸序列具有至少80%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或至少100%序列同一性的V<sub>H</sub>序列,和与SEQ ID NO:491的氨基酸序列具有至少80%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或至少100%序列同一性的V<sub>L</sub>序列。

[0193] 如本文所述的抗体构建体可包含来自表1和/或表2的序列。抗体构建体可包含选自表1中所示的一组CDR的一组六个CDR。抗体构建体可包含选自表2所示的可变区对的一对可变区。

[0194] 表1:抗体CDR

[0195]

抗体	区域	SEQ ID NO:	序列:
GITR 的抗体	HCDR1	1	SYGMH
	HCDR2	2	VIWYEGSNKYADSVKG
	HCDR3	3	GGSMVRGDYYYGMDV
	LCDR1	4	RASQGISSALA
	LCDR2	5	DASSLES
	LCDR3	6	QQFNSYPYT
LAG-3 的抗体	HCDR1	7	DYYWN
	HCDR2	8	EINHRGSTNSNPSLKS
	HCDR3	9	GYSDYEYNWFDP
	LCDR1	10	RASQSISSYLA
	LCDR2	11	DASNRAT
	LCDR3	12	QQRSNWPLT
尤托米鲁单抗 (CD137)	HCDR1	13	GYSFSTYW
	HCDR2	14	IYPGDSYT
	HCDR3	15	ARGYGIFDY
	LCDR1	16	NIGDQY
	LCDR2	17	QDK
	LCDR3	18	ATYTGFGSLAV

[0196]

抗体	区域	SEQ ID NO:	序列:
4G8	HCDR1	19	GFTFSSYA
	HCDR2	20	ISGSGGST
	HCDR3	21	AKGWLGNFDY
	LCDR1	22	QSVSRSY
	LCDR2	23	GAS
	LCDR3	24	QQGQVIPPT
4B9	HCDR1	25	GFTFSSYA
	HCDR2	26	IIGSGAST
	HCDR3	27	AKGWFGGFNY
	LCDR1	28	QSVTSSY
	LCDR2	29	VGS
	LCDR3	30	QQGIMLPPT
28H1	HCDR1	31	GFTFSSHA
	HCDR2	32	IWASGEQ
	HCDR3	33	AKGWLGNFDY
	LCDR1	34	QSVSRSY
	LCDR2	35	GAS
	LCDR3	36	QQGQVIPPT
欧特西珠单抗 (内皮唾酸蛋白)	HCDR1	37	GYTFTDYV
	HCDR2	38	INPYDDDT
	HCDR3	39	ARRGNSYDGYFDYSMDY
	LCDR1	40	QNVGTA
	LCDR2	41	SAS
	LCDR3	42	QQYTNYPMYT
利诺库单抗 (PDGFR $\beta$ )	HCDR1	43	GGSTITSSSY
	HCDR2	44	IYYRGST
	HCDR3	45	ARQNGAARPSWFDP
	LCDR1	46	QSISSY
	LCDR2	47	GAS
	LCDR3	48	QHYGISPFT
MADCAM 的抗体 1	HCDR1	49	GYTFTSYG
	HCDR2	50	ISVYSGNT
	HCDR3	51	AREGSSSSGDYYYGMDV
	LCDR1	52	QSLHTDGTTY
	LCDR2	53	EVS
	LCDR3	54	MQNIQLPWT
MADCAM 的抗体 2	HCDR1	55	GYTFTSYG
	HCDR2	56	ISVYSGNT
	HCDR3	57	AREGSSSSGDYYYGMDV
	LCDR1	58	QSLLYSDGKTY
	LCDR2	59	EVS
	LCDR3	60	MQSIQLPWT
帕姆雷单抗(CTGF)	HCDR1	61	GFTFSSYG
	HCDR2	62	IGTGGGT



[0197]

抗体	区域	SEQ ID NO:	序列:
	HCDR3	63	ARGDYYGSGSFFDC
	LCDR1	64	QGISSW
	LCDR2	65	AAS
	LCDR3	66	QQYNSYPPT
PDPN 的抗体 1	HCDR1	67	GYTFTSYTIH
	HCDR2	68	YINPGSGYTNYNEKFQD
	HCDR3	69	WDRGY
	LCDR1	70	RSSQTIVHSNGNTYLE
	LCDR2	71	KVSNRFS
	LCDR3	72	FQGSHVPYT
PDPN 的抗体 2	HCDR1	73	GFTFSNYG
	HCDR2	74	ISAGGDKT
	HCDR3	75	AKTSR
	LCDR1	76	TGNIGSNY
	LCDR2	77	RDD
	LCDR3	78	HSYSSGIV
那他珠单抗 (整联蛋白 $\alpha$ )	HCDR1	79	GFNIKDTY
	HCDR2	80	IDPANGYT
	HCDR3	81	AREGYYGNYGVYAMDY
	LCDR1	82	QDINKY
	LCDR2	83	YTS
	LCDR3	84	LQYDNLWT
Zinbryta™ (达克珠单抗)	HCDR1	85	GYTFTSYR
	HCDR2	86	INPSTGYT
	HCDR3	87	ARGGGVFDY
	LCDR1	88	SSSISY
	LCDR2	89	TTS
	LCDR3	90	HQRSTYPLT
TNFR2 变体 1 的抗体	HCDR1	91	GYTFTDYN
	HCDR2	92	INPNYEST
	HCDR3	93	RDKGWYFDV
	LCDR1	94	SSVKN
	LCDR2	95	YTS
	LCDR3	96	QQFTSSPYT
TNFR2 变体 2 的抗体	HCDR1	97	GFSLSTSGMG
	HCDR2	98	IWWDDDK
	HCDR3	99	ARLTGTRYFDY
	LCDR1	100	QDINKF
	LCDR2	101	YTS
	LCDR3	102	LQYGNLWT
TNFR2 变体 3 的抗体	HCDR1	103	GYTFTDYS
	HCDR2	104	INTETGEP
	HCDR3	105	ATYYGSSYVPDY
	LCDR1	106	QNVGTA

[0198]

抗体	区域	SEQ ID NO:	序列:
	LCDR2	107	WTS
	LCDR3	108	QYSDYPYT
TNFR2 变体 4 的抗体	HCDR1	109	GYTFTDY
	HCDR2	110	WVDPEYGS
	HCDR3	111	ARDDGSYSPFDY
	LCDR1 (大)	112	QNINKY
	LCDR2 (大)	113	YTS
	LCDR3 (大)	114	LQYVNLLT
	LCDR1 (小)	115	ENVVTY
	LCDR2 (小)	116	GAS
	LCDR3 (小)	117	QGYSYPYT
比勒斯单抗 (CD40)	HCDR1	118	GGSISSPGYY
	HCDR2	119	IYKSGST
	HCDR3	120	TRPVVRYFGWFDP
	LCDR1	121	QGISSA
	LCDR2	122	DAS
	LCDR3	123	QQFNSYPT
DEC-205 变体 1 的抗体	HCDR1	124	GFTFSNYG
	HCDR2	125	IWYDGSNK
	HCDR3	126	ARDLWGWFYFDY
	LCDR1	127	QSVSSY
	LCDR2	128	DAS
	LCDR3	129	QQRNWLPLT
DEC-205 变体 2 的抗体	HCDR1	130	GDSFTTYW
	HCDR2	131	IYPGDSDT
	HCDR3	132	TRGDRGVDY
	LCDR1	133	QGISRW
	LCDR2	134	AAS
	LCDR3	135	QQYNSYPRT
TNFR2 的抗体 5	HCDR1	136	GFSLSSTSGMG
	HCDR2	137	IWWDDDK
	HCDR3	138	ARITGTRYFDY
	LCDR1	139	QDINKF
	LCDR2	140	YTS
	LCDR3	141	LQYGNLWT
Fun1 (CD86)	HCDR1	142	GYSFTDYN
	HCDR2	143	IDPYYGGT
	HCDR3	144	ARWDYRYDDGRAYVVMDF
	LCDR1	145	QSVLYSSNQKNY
	LCDR2	146	WAS
	LCDR3	147	HQYLYSWT
hzFun1	HCDR1	148	GYSFTDYN
	HCDR2	149	IDPYYGGT

[0199]

抗体	区域	SEQ ID NO:	序列:
	HCDR3	150	ARWDYRYDDGRAYVVMDF
	LCDR1	151	QSVLYSSNQKNY
	LCDR2	152	WAS
	LCDR3	153	HQYLYSWT
CD45RB/RO 的抗体 1	HCDR1	154	GYTFTNYII
	HCDR2	155	FNPYNHGT
	HCDR3	156	ARSGPYAWFDT
	LCDR1	157	QNIGTS
	LCDR2	158	SSS
	LCDR3	159	QQSNTWPFT
CD45RB/RO 的抗体 2	HCDR1	160	GYTFTNYII
	HCDR2	161	FNPYNHGT
	HCDR3	162	ARSGPYAWFDT
	LCDR1	163	QNIGTS
	LCDR2	164	SSS
	LCDR3	165	QQSNTWPFT
CD45RB 的抗体	HCDR1	166	GFTFSNYG
	HCDR2	167	IWYDGSKK
	HCDR3	168	ARGGGDFDF
	LCDR1	169	QSVSGNY
	LCDR2	170	GAS
	LCDR3	171	QQYGKWPPLT
MHC-DR 的抗体 1	HCDR1	172	GFSLSTSGVG
	HCDR2	173	IDWDDDK
	HCDR3	174	ARSPRYRGAFDY
	LCDR1	175	ESNIGNNY
	LCDR2	176	DNN
	LCDR3	177	QSYDLIRHV
MHC-DR 的抗体 2	HCDR1	178	GFSLSTSGVG
	HCDR2	179	IDWDDDK
	HCDR3	180	ARSPRYRGAFDY
	LCDR1	181	ESNIGNNY
	LCDR2	182	DNN
	LCDR3	183	QSYDMNVH
DE8	HCDR1	184	GFSLSTSGMG
	HCDR2	185	IYWDDK
	HCDR3	186	ARSSHYYGYGYGGYFDV
	LCDR1	187	ESIHSYGNSF
	LCDR2	188	LAS
	LCDR3	189	QQNNEPWT
伊瑞西珠 (整联蛋白 $\alpha v\beta 3$ )	HCDR1	190	GFTFSSYD
	HCDR2	191	VSSGGGST
	HCDR3	192	ARHLHGSFAS
	LCDR1	193	QSISNFL

[0200]

抗体	区域	SEQ ID NO:	序列:
	LCDR2	194	YRS
	LCDR3	195	QQSGSWPLT
avb8 的抗体	HCDR1	196	GFVFSRYW
	HCDR2	197	INPDSSTI
	HCDR3	198	ASLITTEDY
	LCDR1	199	QDINSY
	LCDR2	200	YAN
	LCDR3	201	LQYDEFPYT
英妥木单抗	HCDR1	202	GFTFSRYT
	HCDR2	203	ISFDGSNK
	HCDR3	204	AREARGSYAFDI
	LCDR1	205	QSVSSY
	LCDR2	206	DAS
	LCDR3	207	QQRSNWPPFT
整联蛋白 $\alpha_v$ 的抗体	HCDR1	208	GYTFSSFW
	HCDR2	209	INPRSGYT
	HCDR3	210	ASFLGRGAMDY
	LCDR1	211	QDISNY
	LCDR2	212	YTS
	LCDR3	213	QQGNTFPYT
整联蛋白 $\alpha_v\beta_6$ 变体 1 的抗体	HCDR1	214	GGSISSGVYY
	HCDR2	215	IYYSGST
	HCDR3	216	AREGPLRGDYYYGLDV
	LCDR1	217	QTISSRY
	LCDR2	218	GAS
	LCDR3	219	QQYGSSPRT
Oleclumab (CD73)	HCDR1	220	GFTFSSYA
	HCDR2	221	ISGSGGRT
	HCDR3	222	ARLG YGRVDE
	LCDR1	223	LSNIGRNP
	LCDR2	224	LDN
	LCDR3	225	ATWDDSHPGWT
CD73 的抗体	HCDR1	226	GFTFSNYG
	HCDR2	227	ILYDGSNK
	HCDR3	228	ARGGSSWYPDSFDI
	LCDR1	229	QGISSW
	LCDR2	230	AAS
	LCDR3	231	QQYNSYPLT
达雷木单抗 (CD38)	HCDR1	232	GFTFNSFA
	HCDR2	234	ISGSGGGT
	HCDR3	235	AKDKILWFGEVFDY
	LCDR1	236	QSVSSY
	LCDR2	237	DAS
	LCDR3	238	QRSNWPPT

[0201]

抗体	区域	SEQ ID NO:	序列:
伐特珠单抗 (整联蛋白 $\alpha 2$ )	HCDR1	239	GFSLTNYG
	HCDR2	240	IWARGFT
	HCDR3	241	ARANDGVYYAMDY
	LCDR1	242	QSSVNY
	LCDR2	243	DTS
	LCDR3	244	QQWTTNPLT
维多珠单抗 (整联蛋白 $\alpha 4\beta 7$ )	HCDR1	245	GYTFTSYW
	HCDR2	246	IDPSESNT
	HCDR3	247	ARGGYDGWDYAIDY
	LCDR1	248	QSLAKSYGNTY
	LCDR2	249	GIS
	LCDR3	250	LQGTHQPYT
Etrolizumab	HCDR1	251	GFFITNNY
	HCDR2	252	ISYSGST
	HCDR3	253	ARTGSSGYFDF
	LCDR1	254	ESVDDL
	LCDR2	255	YAS
	LCDR3	256	QQGNSLPNT
Anifrolumab (IFNAR1)	HCDR1	257	GYIFTNYW
	HCDR2	258	IYPGDSDI
	HCDR3	259	ARHDIEGFDY
	LCDR1	260	QSVSSSF
	LCDR2	261	GAS
	LCDR3	262	QQYDSSAIT
BIIB059 (BDCA2)	HCDR1	263	GFTFTYTMS
	HCDR2	264	PGDSFGY
	HCDR3	265	TRDIYYNYGAWFAY
	LCDR1	266	QSVDDYDGDSY
	LCDR2	267	AAS
	LCDR3	268	QQANEDPRT
贝伦妥单抗维多汀 的贝伦妥单抗 (CD30)	HCDR1	269	GYTFTDYY
	HCDR2	270	IYPGSGNT
	HCDR3	271	ANYGNYWFAY
	LCDR1	272	QSVDFDGDY
	LCDR2	273	AAS
	LCDR3	274	QQSNEDPWT
伊妥木单抗 (CD30)	HCDR1	275	GGSFSAYY
	HCDR2	276	INHGGGT
	HCDR3	277	ASLTAY
	LCDR1	278	QGISSW
	LCDR2	279	AAS
	LCDR3	280	QQYDSYPIT
c-KIT 的抗体	HCDR1	281	GYTFTSYN
	HCDR2	282	IYSGNGDT

[0202]

抗体	区域	SEQ ID NO:	序列:
	HCDR3	283	ARERDTRFGN
	LCDR1	284	ESVDIYGNSF
	LCDR2	285	LAS
	LCDR3	286	QQNEDPYT
Opdivo™ (纳武单抗)	HCDR1	287	GITFSNSG
	HCDR2	288	IWYDGSKR
	HCDR3	289	ATNDDY
	LCDR1	290	QSVSSYL
	LCDR2	291	DAS
	LCDR3	292	QQSSNWPRT
Keytruda™ (帕博利珠单抗)	HCDR1	293	GYTFTNYY
	HCDR2	294	INPSNGGT
	HCDR3	295	ARRDYRFDMGFDY
	LCDR1	296	KGVSTSGYSY
	LCDR2	297	LAS
	LCDR3	298	QHSRDLPLT
LRRC15 的抗体 M25	HCDR1	440	SYWIE
	HCDR2	441	EILPGSDTTNYNEKFKD
	HCDR3	442	GNYRAWFGY
	LCDR1	443	RASQDISNYLN
	LCDR2	444	YTSRLHS
	LCDR3	445	QQGEALPWT
LRRC15 的抗体 huAD208.4.1	HCDR1	446	DYYIH
	HCDR2	447	LVYPYIGGTNYNQKFKG
	HCDR3	448	GDNKYDAMDY
	LCDR1	449	RASQSVSTSSYSYMH
	LCDR2	450	YASSLES
	LCDR3	451	EQSWEIRT
LRRC15 的抗体 huAD208.12.1	HCDR1	452	NYWMH
	HCDR2	453	MIHPNSGSTKHNEKFRG
	HCDR3	454	SDFGNRYWYFDV
	LCDR1	455	RASQSSSNLH
	LCDR2	456	YVSQSI
	LCDR3	457	QQSNSWPFT
LRRC15 的抗体 huAD208.14.1	HCDR1	458	DYYIH
	HCDR2	459	LVYPYIGGSSYNQQFKG
	HCDR3	460	GDNNYDAMDY
	LCDR1	461	RASQSVSTSTYNMH
	LCDR2	462	YASNLES
	LCDR3	463	HHTWEIRT
LRRC15 的抗体 hu139.10	HCDR1	464	SYGVH
	HCDR2	465	VIWAGGSTNYSALMS
	HCDR3	466	HMITEDYYGMDY
	LCDR1	467	KSSQSLLNSRTRKNYLA

[0203]

抗体	区域	SEQ ID NO:	序列:
LRRC15 的抗体 muAD210.40.9	LCDR2	468	WASTRES
	LCDR3	469	KQSYNLPT
	HCDR1	470	NYWLG
	HCDR2	471	DIYPGGGNTYYNEKLKG
	HCDR3	472	WGDKKGNFYFAY
	LCDR1	473	TASSSVYSSYLH
LRRC15 的抗体 muAD209.9.1	LCDR2	474	STSNLAS
	LCDR3	475	HQYHRSPT
	HCDR1	476	NFGMN
	HCDR2	477	WINLYTGEPTFADDFKG
	HCDR3	478	KGETYYRYDGFAY
	LCDR1	479	RSSKSLHSHNGNTHLY
	LCDR2	480	RMSNLAS
	LCDR3	481	MQLLEYPYT

[0204] 表2: 抗体V<sub>H</sub>序列和V<sub>L</sub>序列

[0205]

抗体	区域	SEQ ID NO	序列
TRX518 (G1TR)	V <sub>L</sub>	299	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQNVGTN VAWYQQKPGQAPRLLIYSASYRYSIGIPARFSG SGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNTDPLT FGGGTKVEIK
	V <sub>H</sub>	300	QVTLRSGPALVKPTQTLTCTFSGFSLSTSG MGVGWIRQPPGKALEWLAHIWDDDKYYN PSLKSRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDAT YYCARTRRYFPFAYWGQGLTVTVSS
	V <sub>H</sub>	301	QVTLRSGPALVKPTQTLTCTFSGFSLSTSG MGVGWIRQPPGKALEWLAHIWDDDKYYQ PSLKSRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDAT YYCARTRRYFPFAYWGQGLTVTVSS
LAG-3 的抗体	V <sub>H</sub>	302	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSD YYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHRGSTNSNPS LKSRLTSLDTSKNQFSLKLRVTAADTAVYY CAFGYSDYEYNWFDPPWGQGLTVTVSS
	V <sub>L</sub>	303	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSRASQSISSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSG SGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFG QGTNLEIK
4-1BB 变体 1 的抗体	V <sub>H</sub>	304	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSG YYWSWIRQSPEKGLEWIGEINHGYYVTYNPS LESRLTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYY CARDYGPNGYDWYFDLWGRGTLTVTVSS
	V <sub>L</sub>	305	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSRASQSVSSYL AWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGS SGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSNWPPA

[0206]

抗体	区域	SEQ ID NO	序列
			LTFGGGGTKVEIK
4-1BB 变体 2 的抗体	V <sub>H</sub>	306	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDY WMSWVRQAPGKGLEWVADIKNDGSYTNYA PSLTNRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARELTGTWGGQTMVTVSS
	V <sub>L</sub>	307	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLSSG NQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYYASTRQSGV PDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCLQ YDRYPFTFGQGTKLEIK
尤托米鲁单抗	V <sub>H</sub>	308	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYSFSTY WISWVRQMPGKGLEWMGKIYPGDSYTNYS SFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMY YCARGYGIFDYWGQGTLLTVSS
	V <sub>L</sub>	309	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIGDQYAH WYQQKPGQSPVLVIYQDKNRPSGIPERFSGSN SGNTATLTISGTQAMDEADYYCATYTGFGSLA VFGGGTKLTVL
伏司妥珠单抗 (CD70)	V <sub>H</sub>	310	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT NYGMNWVRQAPGQGLKWMGWINTYTGEPT YADAFKGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDT AVYYCARDYGDYGM DYWGQGTLLTVTVSS
	V <sub>L</sub>	311	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTS GYSFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVP DRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQHS REVPWTFGGQGTKVEIK
利诺库单抗	V <sub>H</sub>	312	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSITSSS YYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYRGSTNYPNS LKSRTVISVDSSKNQFYLVSSVTAVDTAVYY CARQNGAARPSWFDPWGQGTLLTVTVSS
	V <sub>L</sub>	313	EIVLTQSPDTISLSPGERATLSCRASQSISSIYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRVTGIPDRFSVSG SGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGISPFTFG PGTKVDIR
Oleclumab (CD73)	V <sub>H</sub>	314	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AYSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGRITYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARLGYGRVDEWGRGTLTVTVSS
	V <sub>L</sub>	315	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSLSNIGRNP VNWYQQLPGTAPKLLIYLDNLRLSGVPDRFS GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDS HPGWTFGGGTKLTVL
欧特西珠单抗(内皮啞酸蛋白)	V <sub>H</sub>	316	QVQLQESGPGLVRPSQTLSTCTASGYTFTDY VIHWVKQPPGRGLEWIGYINPYDDDTTYNQK FKGRVTMLVDTSNTAYLRLSSVTAEDTAVYY CARRGNSYDGYFDYSMDYWGSGTPVTVSS



[0207]

抗体	区域	SEQ ID NO	序列
	V <sub>L</sub>	317	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQNVGTA VAWLQQTPGKAPKLLIYSASNRYTGVPSRFSG SGSGTDYFTISSLQPEDATYYCQQYTNYPM YTFGQGTKVQIK
FAP 变体 1 的抗体	V <sub>H</sub>	318	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSN SVTWNWIRQSPSRGLEWLGRYYRSKWYND YAVSVKGRITINPDTSKNQFYLLQKSVTPEDA AVYYCARDSSILYGDYWGQGTLVTVSS
	V <sub>H</sub>	319	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSN SVTWNWIRQSPSRGLEWLGRYYRSKWYND YAVSVKGRITINPDTSKNQFYLLQKSVTPEDA AVYYCARDSSILYGDYWGQGTLVTVS
	V <sub>L</sub>	320	QAVLTQPSSLSASPGASASLTCTLPSGINVGTY RIFWFQQKPGSPPQYLLSYKSDSDNHQSGSV PSRFSGSKDASANAGILLISGLQSEDEADYYC MIWHSSAWVFGGGTKLTVL
FAP 变体 2 的抗体	V <sub>H</sub>	321	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFTD YYIHVVRQAPGQGLEWMGWINPNRGGTNY AQKFQGRVTMTRDTSIATAYMELSRRLSDDTA VYYCATASLKIAAVGTFDCWGQGTLVTVSS
	V <sub>L</sub>	322	SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALSKQYA FWFQQKPGQAPILVIYQDTRKPSGIPGRFSGSS SGTTVTLTISGAQADDEADYYCQSADSSGT YVFGTGKVTVL
FAP 变体 3 的抗体	V <sub>H</sub>	323	EVQLVETGGGVVQPGRLRLSCAASGFSFST HGMVWVRQPPGKGLEWVAVISYDGSDKKYA DSVKGRFTISRDNKNTVYLEMSSVRAEDTA LYYCFCRDAFDLWGQGTMTVTVSS
	V <sub>L</sub>	324	SYVLTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKKYA YWYQQKSGQAPVLVIYEDTKRPSGIPERFSGS SSGTMATLTISGAQVEDEADYYCYSTDSSGN YWVFGGGTEVTVL
FAP 变体 4 的抗体	V <sub>H</sub>	325	EVQLVESGGGLVEPGGSLRLSCAASGFTFSDA WMNWVRQAPGKGLEWVGRIKTKSDGGTTD YAAPVRGRFSISRDDSKNTLFLEMNSLKTEDT AIYYCFITVIVVSSESPLDHWGQGTLVTVSS
	V <sub>L</sub>	326	SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDELPAKQYA YWYQQKPGQAPVLVIYKDRQPSGIPERFSG SSSGTTVTLTISGVQAEDEADYYCQSAYSINT YVIFGGGTKLTVL
FAP 变体 5 的抗体	V <sub>H</sub>	327	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDY YMSWIRQAPGKGLEWISYISSGSSYTNADS VKGRFTISRDNKKSYLEVNGLTVEDTAVY YCARVRYGDREMATIGGFDFWGQGTLVTVSS
	V <sub>L</sub>	328	SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKQYA YWYQQSPGQAPVLVIYKDSERPSGIPERFSGS SSGTTVTLTISGVQAEDEADYYCQSADSGGTS

[0208]

抗体	区域	SEQ ID NO	序列
			RIFGGGTKLTVL
FAP 变体 6 的抗体	V <sub>H</sub>	329	QVQLQESGPGLVIRSTETLSLTCLVSGDSINSH YWSWLRQSPGRGLEWIGYIYYTGPTNYPNSL KSRVVISLGTSKDQFSLKLSSVTAADTARYYC ARNKVFWRGSDFYFYYMDVWGKGTTVTVSS
	V <sub>L</sub>	330	EIVLTQSPGTLSSLGERATLSCRASQSLANN YLAWYQQKPGQAPRLMYDASTRATGIPDRF SGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQFVTSH HMYIFGQGTKVEIK
FAP 变体 7 的抗体	V <sub>H</sub>	331	HVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSN NYYWGWIRQTPGKGLEWIGSIYYSGSTNYP SLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARGARWQARPATRIDGVAFDIWGQGTMV TVSS
	V <sub>H</sub>	332	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSN NYYWGWIRQTPGKGLEWIGSIYYSGSTNYP SLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARGARWQARPATRIDGVAFDIWGQGTMV TVSS
	V <sub>H</sub>	333	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTS YGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYA QKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTA VYYCARDWSRSGYYLPDYWGQGTTLTVSS
	V <sub>L</sub>	334	ETTLTQSPGTLSPGERATLSCRASQTVTRN YLAWYQQKPGQAPRLMYGASNRAAGVPD RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQFGS PYTFGQGTKVEIK
	V <sub>L</sub>	335	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLS NGYNYLDWYLQRPQGSPHLLIFLGSNRASGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYYCMQ ALQTPPTFGQGTKVEIK
GITR 的抗体	V <sub>H</sub>	336	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSS YGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWEYEGSNKYY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCARGGSMVRGDYYYGMDVWGQGT TVSS
	V <sub>L</sub>	337	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGISSAL AWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGS SGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCQQFNYPYTF GQGTKLEIK
4G8	V <sub>H</sub>	338	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAKGWLG NFDYWGQGTTLTVSS

[0209]

抗体	区域	SEQ ID NO	序列
	V <sub>L</sub>	339	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSRSY LAWYQQKPGQAPRLLIIGASTRATGIPDRFSG SGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGQVIPPT FGQGTKVEIK
4B9	V <sub>H</sub>	340	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWFGGFNYWGQGT LTVSS
	V <sub>L</sub>	341	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVTSSY LAWYQQKPGQAPRLLINVGSRRTATGIPDRFSG SGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPT FGQGTKVEIK
28H1	V <sub>H</sub>	342	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSH AMSWVRQAPGKGLEWVSAIWASGEQYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWLG NFDYWGQGT LTVSS
	V <sub>L</sub>	343	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSRSY LAWYQQKPGQAPRLLIIGASTRATGIPDRFSG SGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGQVIPPT FGQGTKVEIK
MADCAM 的抗体 1	V <sub>H</sub>	344	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTS YGINWVRQAPGQGLEWMGWISVYSGNTNYA QKVQGRVTMTADTSTSTAYMDLRSLRSDDTA VYYCAREGSSSSGDYYYGMDVWGQGT T V T VSS
	V <sub>L</sub>	345	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLHTD GTTYLYWYLQKPGQPPQLLIYEVS NRFS GVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYYCMQN IQLPWTFGQGTKVEIK
MADCAM 的抗体 2	V <sub>H</sub>	346	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCEASGYTFTS YGIDWVRQAPGQGLEWMGWISVYSGNTNYA QKLQGRVTMSTDTSTSTAYMELRSLRSDDTA VYYCAREGSSSSGDYYYGMDVWGQGT T V T VSS
	V <sub>L</sub>	347	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSNQSLLYSD GKTYLFWYLQKPGQPPQLLIYEVS NRFS GVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQ SIQLPWTFGQGTKVEIK
帕姆雷单抗 (CTGF)	V <sub>H</sub>	348	EGQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCAGSGFTFSSY GMHWVRQAPGKGLEWVSGIGTGGGTYSTDS VKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDMAVY YCARGDY YGSGSFFDCWGQGT LTVSS
	V <sub>L</sub>	349	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGISSW LAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPPT FGQGTKLEIK

[0210]

抗体	区域	SEQ ID NO	序列
那他珠单抗	V <sub>H</sub>	350	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKD TYIHWVRQAPGQRLEWMGRIDPANGYTKYD PKFQGRVTITADTSASTAYMELSSLRSEDEAV YYCAREGYGNYGVYAMDYWGQGTLLTVSS
	V <sub>L</sub>	351	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKTSQDINKY MAWYQQTPGKAPRLLIHYTSALQPGIPSRFSG SGSGRDYFTFTISLQPEDATYYCLQYDNLWT FGQGTKVEIK
TNFR2 变体 1 的抗体	V <sub>H</sub>	352	EVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTD YNMDWVKQSHGKSLEWIGDINPNYESTSYN QKFKGKATLTVDKSSSTAYMEVRSLSLSEDTAV FYCARDKGWYFDVWGAGTTVTVSS
	V <sub>L</sub>	353	ENVLTQSPAIMSASLGEKVTMSCRASSSVKN MYWYQQKSDASPKLWIYYTSNLA PGV PARFS GSGSGNSYSLTISSMEGEDAATYYCQQFTSSP YTFGGGKLELK
TNFR2 变体 2 的抗体	V <sub>H</sub>	354	QVTLKESGPGILQPSQTLSTLCSFSGFSLSTSG MGVGVIRQPSGKGLEWLAHIWWD DDKFYN PSLKSQLTISKDTSRNQVFLKLT SVVTADTATY YCARLTGTRYFDYWGQGTLLTVSS
	V <sub>L</sub>	355	DVQMTQSPSSLSASLGGKVTITCKASQDINKF IAWYQHKPGKGPRLLIHYTSTLQPGIPSKFSG SGSGRDYSFISISNLEPEDIATYYCLQYGNLWT FGGGTKLEIT
TNFR2 变体 3 的抗体	V <sub>H</sub>	356	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDY SMHWVKQAPGKGLKWMGWINTETGEPTYA DDFKGRFAFSSETSTSTAYLQINN LKNDDTTT YFCATYYGSSYVPDYWGQGTSLTVSS
	V <sub>L</sub>	357	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQNVGT AWAWYQHKPGQSPKLLIYWTSSRHTGVPDRF TGSGSGTEFTLTISNVQSEDLADYFCHQYSDY PYTFGGGKLEIK
TNFR2 变体 4 的抗体	V <sub>H</sub>	358	EVQLQQSGPEVGRPGSSVKISCKASGYTFTD YIMHWVKQSPGQGLEWIGWVDPEYGSTDYA EKFKKKATLTADTSSNTAYIQLSSLTSEDTATY FCARDDGSYSPFDYWGQGVMTVSS
	V <sub>L</sub> (大)	359	DIQMTQSPPSLSASLGDKVTITCQASQNINKYI AWYQQKPGKAPRLLIHYTSTLES GTPSRFSGS GSGRDYSFISISNVESEDIASYYCLQYVNL LTF GAGTKLEIK
	V <sub>L</sub> (小)	360	NIVMTQSPKSMMSVGERVTLTCKASENVVT YVSWYQQKPEQSPKLLIYGASNRYTGVPDRF TGSGSATDFTLTISVQAEDLADYHCGQGYSY PYTFGGGKLEIK

[0211]

抗体	区域	SEQ ID NO	序列
TNFR2 变体 5 的抗体	V <sub>H</sub>	361	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDY AMSWVRQAPGKGLEWVAVISENGSDTYAD SVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDRGGAVSFYFDVWGQGTLLTVSS
	V <sub>L</sub>	362	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVSSY LAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLESGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYNSLPYT FGQGTKVEIKRT
GARP 变体 1 的抗体	V <sub>H</sub>	363	MAVLALLFCLVTFPSCILSQVQLKESGPGLVA PSQSLSITCTVSGFSLTGYGINWVRQPPGKGL EWLGMIWSDGSTDYNSVLTSLRISKDNSNS QVFLKMNSLQVDDTARYYCARDRNYYDYD GAMDYWGQGTSTVTVSS
	V <sub>L</sub>	364	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTGY GINWVRQPPGKGLEWLGMIWSDGSTDYNSV LTSLRISKDNSNSQVFLKMNSLQVDDTARY YCARDRNYYDYDGAMDYWGQGTSTVTVSS
GARP 变体 2 的抗体	V <sub>H</sub>	365	MKFPSQLLLFLLFRITGHIIDIQVTQSSSYLSVS LGDRVTITCKASDHIKNWLAWYQQKPGIAPR LLVSGATSLEAGVPSRFSGSGSGKNFTLSITSL QTEDVATYYCQQYWSTPWTFGGGTTLEIR
	V <sub>L</sub>	366	DIQVTQSSSYLSVSLGDRVTITCKASDHIKNW LAWYQQKPGIAPRLLVSGATSLEAGVPSRFSG SGSGKNFTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSTP WTFGGGTLEIR
GARP 变体 3 的抗体	V <sub>H</sub>	367	EVQLVQPGAELRNSGASVKVSCKASGYRFTS YYIDWVRQAPGQGLEWMGRIDPEDGGTKYA QKFQGRVTFTADTSTSTAYVELSSLRSEDVAV YYCARNEWETVVVGDLMEYEEYWGQGTQV TVSS
	V <sub>L</sub>	368	DIQMTQSPTSLASLGDRVTITCQASQSISSYL AWYQQKPGQAPKLLIYGASRLQTGVPSRFSG SGSGTSFTLTISGLEAEDAGTYCQQYDSLPLV TFGQGTKVELK
	V <sub>L</sub>	369	DIQMTQSPSSLSASLGDRVTITCQASQSIVSYL AWYQQKPGQAPKLLIYGASRLQTGVPSRFSG SGSGTSFTLTISGLEAEDAGTYCQQYASAPV TFGQGTGVELK
	V <sub>L</sub>	370	DIQMTQSPSSLSASLGDRVTITCQASQSISSYL AWYQQKPGQAPKLLIYGTSRLKTGVPSRFSG SGSGTSFTLTISGLEAEDAGTYCQQYYSAPV TFGQGTKVELK
	V <sub>L</sub>	371	DIQMTQSPSSLSPSLGDRVTITCQASQTISSFL AWYHQKPGQPPKLLIYRASIPQTGVPSRFSGS SGSGTSFTLTIGGLEAEDAGTYCQQYVSAPPT FGQGTKVELK

[0212]

抗体	区域	SEQ ID NO	序列
	V <sub>L</sub>	372	DIQMTQSPSSLSASLGDRVITITCQASQSISSYL AWYQQKPGQAPNIIYGASRLKTGVPSRFSGS GSGTSFTLTISGLEAEDAGTYYCQQYASVPVT FGQGTKVELK
CD73 的抗体	V <sub>L</sub>	373	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSW LAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPLT FGGGTKVEIK
	V <sub>H</sub>	374	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSN YGMHWVRQAPGKGLEWVAVILYDGSNKYYYP DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGGSSWYPDSFDIWGQGTMTVTVSS
达雷木单抗 (CD38)	V <sub>H</sub>	375	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAVSGFTFNSF AMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGGTYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA YFCAKDKILWFGEPVFDYWGQGTTLTVTVSS
	V <sub>L</sub>	376	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYL AWYQQKPGQAPRLIYDASN RATGIPARFSGS GSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQRSNWPPT FGQGTKVEIK
伊瑞西珠	V <sub>H</sub>	377	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSS YDMSWVRQAPGKGLEWVAKVSSGGGSTYY LDTVQGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCARHLHGSFASWGQGTTVTVTVSS
	V <sub>L</sub>	378	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCQASQSISNFLH WYQQRPQGAPRLIYRSQSISGIPARFSGSGS GTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQSGSWPLTFG GGTKVEIK
英妥木单抗	V <sub>H</sub>	379	QVQLVESGGGVVQPGRSRRLSCAASGFTFSR YTMHWVRQAPGKGLEWVAVISFDGSNKYYV DSVKGRFTISRDN SENTLYLQVNILRAEDTA VYYCAREARGSYAFDIWGQGTMTVTVSS
	V <sub>L</sub>	380	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYL AWYQQKPGQAPRLIYDASN RATGIPARFSGS GSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQRSNWPPF TFGPGTKVDIK
整联蛋白 $\alpha v \beta 8$ 的抗体	V <sub>H</sub>	381	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAVSGFVFSRY WMSWVRQAPGKGLEWIGEINPDSSTINYTSS LKDRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCASLITTEDYWGQGTTVTVTVSS
	V <sub>L</sub>	382	EIVLTQSPSSLSLSPGERVTITCKASQDINSYLS WYQQKPGKAPKLLIYANRLVDGVPARFSGS GSGQDYTLTISLLEPEDFAVYYCLQYDEFPYT FGGGTKLEIKR
整联蛋白 $\alpha v$ 的抗体	V <sub>L</sub>	383	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDISNY LAWYQQKPGKAPKLLIYYTSKIHSGVPSRFSG SGSGTDYFTTISLQPEDATYYCQQGNTFPYT FGQGTKVEIK

[0213]

抗体	区域	SEQ ID NO	序列
	V <sub>H</sub>	384	QVQLQQSGGELAKPGASVKVSCKASGYTFSS FWMHWVRQAPGQGLEWIGYINPRSGYTEYN EIFRDKATMTTDTSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCASFLGRGAMDYWGQGTTVTVSS
整联蛋白 $\alpha\text{v}\beta 6$ 变体 1 的抗体	V <sub>H</sub>	385	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSG VYYWTWIRQHHPGNGLEWIGYIYYSGSTSYNP SLKSRVTISVDTSKKQFSLNLTSTVTAADTAVY YCAREGPLRGDYYYGLDVWGQGTTVTVSS
	V <sub>L</sub>	386	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRAGQTISSRY LAWYQQKPGQAPRPLIYGASSRATGIPDRFSG SGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQYQYSSPRT FGQGTKVEIK
整联蛋白 $\alpha\text{v}\beta 6$ 变体 2 的抗体	V <sub>H</sub>	387	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSG GYYWSWIRQHHPGKGLEWIGYIYYSGSTYYNP SLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAMY YCARYRGPAAGRGRDFYFYGMDVWGQGTTV TVSS
	V <sub>L</sub>	388	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASIFCKSSQSLNSD GKTYLCWYLQKPGQPPQLLIYEVSNRFSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQ GIQLPWAFGGQGTKVEIK
整联蛋白 $\alpha\text{v}\beta 6$ 变体 3 的抗体	V <sub>H</sub>	389	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSS YGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYGGSNKYY ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCARDLAARRGDYFYYGMDVWGQGTT VTVSS
	V <sub>L</sub>	390	SSELTQDPVVSVALGQTVRITCQGDLSRSYYL SWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSG SNSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSG NHLFGGGTKLTVL
整联蛋白 $\alpha\text{v}\beta 6$ 变体 4 的抗体	V <sub>H</sub>	391	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSG GYYWSWIRQHHPGKGLEWIGYIYYSGRTYNNP SLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARVATGRADYHFYAMDVWGQGTTVTVSS
	V <sub>L</sub>	392	SYELTQPSSVSVSPGQTARITCSGDVLAKKSA RWFHQKPGQAPVLVIYKDSERPSGIPERFSGS SSGTTVTLTISGAQVEDEAAYCYSAADNNL VFGGGTKLTVL
Zinbryta™ (达克珠单抗) (CD25)	V <sub>H</sub>	393	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTS YRMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSTGYTEYN QKFKDKATITADESTNTAYMELSSLRSED TAVYYCARGGGVFDYWGQGTLVTVSS
	V <sub>L</sub>	394	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCSASSSISYMH WYQQKPGKAPKLLIYTTSNLAAGVPARFSGS GSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCHQRSTYPLTF GQGTKVEVK



[0214]

抗体	区域	SEQ ID NO	序列
比勒斯单抗 (CD40)	V <sub>H</sub>	395	QLQLQESGPGLLKPSSETLSLTCTVSGGSISSPG YYGGWIRQPPGKGLEWIGSIYKSGSTYHNPS LKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY CTRPVVRVFGWFDPWGQGTTLTVSS
	V <sub>L</sub>	396	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSAL AWYQQKPGKAPKLLIYDASNLESGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSTPTF GQGTEKVEIK
DEC-205 变 体 1 的抗体	V <sub>H</sub>	397	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSN YGMVWRQAPGKGLEWVAVIWDGSKNY ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCARDLWGWFYFDYWGQGTTLTVSS
	V <sub>L</sub>	398	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYL AWYQQKPGQAPRLIYDASNRATGIPARFSGS GSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRNWLPT FGGTEKVEIK
DEC-205 变 体 2 的抗体	V <sub>H</sub>	399	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGDSFTTY WIGWVRQMPGKGLEWMGIHPGDSDTIYSPS FQQQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMY YCTRGRGVDFYWGQGTTLTVSS
	V <sub>L</sub>	400	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISRW LAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISGLQPEDFATYYCQQYNSTPR TFGQTEKVEIK
TNFR2 的抗 体 5	V <sub>H</sub>	401	QVTLEKSGPALVKPTQTLTCTFSGFSLSTSG MGVGVIRQPPGKALEWLAHIWDDDKFYN PSLKSRLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDTAT YYCARITGTRYFDYWGQGTTLTVSS
	V <sub>L</sub>	402	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINKFI AWYQQKPGKAPKLLIHYTSTLQPGVPSRFSG SGSGTDYFTISSLQPEDATYYCLQYGNLWT FGGTEKVEIK
Fun1	V <sub>H</sub>	403	EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTDY NMNWKQSNKSLWIGNIDPYYGGTSYNQ KFKGKATLTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVY FCARWDYRYDDGRAYVYVMDFWGQGTSTV SS
	V <sub>L</sub>	404	ELQMTQSPSSLAASAGEKVTMSCKSSQSVLY SSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRES GVPDRFTGSGSGTHFTLTVSSVQAEDLAVYY CHQYLYSWTFGGGTNLEIK
hzFun1	V <sub>H</sub>	405	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT DYNMNWVRQAPGQGLEWMGNIDPYYGGTS YNQKFKGRVTMTRDTSISTAYMELSLRSD TAVYYCARWDYRYDDGRAYVYVMDFWGQGT TVTVSS



[0215]

抗体	区域	SEQ ID NO	序列
	V <sub>L</sub>	406	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSS NQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESG VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCH QYLYSWTFGQGGTKLEIK
CD45RB/RO 的抗体 1	V <sub>H</sub>	407	EVQLVESGAIEVKKPGASVKVSCKASGYTFTN YIIHWVKQEPGQGLEWIGYFNPYNHGTKYNE KFKGRATLTANKSISTAYMELSSLRSEDVAVY YCARSGPYAWFDTWGQGTTTVTVSS
	V <sub>L</sub>	408	DILLTQSPATLSLSPGERATFSCRASQNIQTISI WYQQKTNIGAPRLIRSSSESISGIPSRFSGSGS GTDFTLTISLSEPEFAVYYCQQSNTWPFTFG QGKLEIK
CD45RB/RO 的抗体 2	V <sub>H</sub>	409	EVQLVESGAIEVKKPGASVKVSCKASGYTFTN YIIHWVKQEPGQGLEWIGYFNPYNHGTKYNE KFKGRATLTANKSISTAYMELSSLRSEDVAVY YCARSGPYAWFDTWGQGTTTVTVSS
	V <sub>L</sub>	410	DILLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQNIQTISI WYQQKPGQAPRLIRSSSESISGIPSRFSGSGS GTDFTLTISLSEPEFAVYYCQQSNTWPFTFG QGKLEIK
CD45RB 的 抗体	V <sub>H</sub>	411	QCQVQLVESGGGVVQPGRSLRVSCASGFTF SNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKK FYADSVKGRFTISRDNSTLQMSLRAED TAVYYCARGGGDFDFWGQGTLLTVTVSS
	V <sub>L</sub>	412	KIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSGN YLAWYQQRPQAPRLLIYGASTRATGIPARFS GSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYGKWP PLTFGGGTKEIK
MHC-DR 的 抗体 1	V <sub>H</sub>	413	QVQLKESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSG VGVGWIRQPPGKALEWLALIDWDDDKYYST SLKTRLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDAT YYCARSPRYRGAFDYWGQGTLLTVTVSS
	V <sub>L</sub>	414	DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSESNIGNNY VQWYQQLPGTAPKLLIYDNNQRPSGVPDRFS GSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCQSYDLIR HVFGGGTCLTVLG
MHC-DR 的 抗体 2	V <sub>H</sub>	415	QVQLKESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSG VGVGWIRQPPGKALEWLALIDWDDDKYYST SLKTRLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDAT YYCARSPRYRGAFDYWGQGTLLTVTVSS
	V <sub>L</sub>	416	DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSESNIGNNY VQWYQQLPGTAPKLLIYDNNQRPSGVPDRFS GSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCQSYDMN VHVFGGGTCLTVLG
伐特殊单抗	V <sub>H</sub>	417	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNY GIHWIRQPPGKLEWLGVWARGFTNYSAL MSRLTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYY CARANDGVYYAMDYWGQGTLLTVTVSS

[0216]

抗体	区域	SEQ ID NO	序列
	V <sub>L</sub>	418	DFVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCSAQSSVNYI HWYQQKPDQAPKKLIYDTSKLGSGVPSRFSG SGSGTDYFTTSSLEAEDAATYYCQQWTTNPL TFGQGTKVEIK
维多珠单抗	V <sub>H</sub>	419	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKGSGYTFTS YWMHWVRQAPGQRLEWIGEIDPSESNTNYN QKFKGRVTLTVDISASTAYMELSSLRSEDVAV YYCARGGYDGWDYAIDYWGQGTSLTVTVSS
	V <sub>L</sub>	420	DVVMTQSPSLSPVTPGEPASISCRSSQSLAKS YGNTYLSWYLQKPGQSPQLLIYGISNRFSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQ GTHQPYTFGQGTKVEIK
Etrolizumab	V <sub>H</sub>	421	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFFITNN YWGWRQAPGKGLEWVGYSYSGSTSYNPS LKSRTISRDTSKNTFYLMNSLRADTAVYY CARTGSSGYFDWVGQGTSLTVTVSS
	V <sub>L</sub>	422	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDDL LHWYQQKPGKAPKLLIKYASQSIGVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGNSLPNT FGQGTKVEIK
Anifrolumab	V <sub>H</sub>	423	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYIFTNY WIAWVRQMPGKGLESMGHIYPGDSDIRYSPSF QGQVTISADKSITTAYLQWSSLKASDTAMYY CARHDIIEGFDYWGRGTLTVTVSS
	V <sub>L</sub>	424	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSF AWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRLSGS GSGTDFTLTITRLEPEDFAVYYCQQYDSSAITF GQGTREIK
BIIB059	V <sub>H</sub>	425	DVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTY TMSWVRQAPGKGLEWVATISPGDSFGYYYPD SVQGRFTISRDNANKNSLYLMNSLRADTAV YYCTRDIYYNYGAWFAYWGQGTSLTVTVSS
	V <sub>L</sub>	426	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDDYD GDSYMNWYQQKPGKAPKLLIYAASLTESGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQAN EDPRTFGQGTKVEIK
贝伦妥单抗 维多汀的贝 伦妥单抗	V <sub>H</sub>	427	QIQLQQSGPEVVKPGASVKISCKASGYTFTDY YITWVKQKPGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNE KFKGKATLTVDTSSTAFMQLSSLTSEDVAV FCANYGNYWFAYWGQGTQVTVSA
	V <sub>L</sub>	428	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDFDG DSYMNWYQQKPGQPPKVLIIAASNLESGIPA RFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQQSN EDPWTFGGGGTKLEIK
伊妥木单抗	V <sub>H</sub>	429	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAYVGGSFSA YYWSWIRQPPGKGLEWIGDINHGGGTNYPNS LKSRTISVDTSKNQFSLKLSNVTAADTAVYY CASLTAYWGQGS�TVTVSS

[0217]

抗体	区域	SEQ ID NO	序列
	V <sub>L</sub>	430	DIQMTQSPTSLASVGDRTITCRASQGISSW LTWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYDSYPIT FGQGTRLEIK
c-KIT 的抗体	V <sub>H</sub>	431	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YNMHWVRQAPGQGLEWMGVIYSGNGDTSY NQKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARERDTRFGNWWGQGLTVTVSS
	V <sub>L</sub>	432	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDIY GNSFMHWYQQKPGQPPKLLIYASNLESQVP DRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQN NEDPYTFGGGKVEIK
Opdivo™ (纳武单抗)	V <sub>H</sub>	433	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSN SGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKRYY ADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDT AVYYCATNDDYWGQGLTVTVSS
	V <sub>L</sub>	434	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYL AWYQQKPGQAPRLIYDASNRATGIPARFSGS GSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTF GQGTKVEIK
Keytruda™ (帕博利珠单抗)	V <sub>H</sub>	435	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFT NYYMYWVRQAPGQGLEWMGINPSNGGTN FNEKFKNRVTLTDSSTTTAYMELKSLQFDD TAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGTITVTVSS
	V <sub>L</sub>	436	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSG YSYLHWYQQKPGQAPRLIYLAESYLGVP RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHSRD LPLTFGGGKVEIK
LRRC15 的 抗体 huM25	V <sub>H</sub>	482	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFSS YWIEWVKQAPGQGLEWIGELPGSDTTNYNE KFKDRATFTSDTSINTAYMELSRLRSDDTAVY YCARDRGNYRAWFGYWGQGLTVTVSS
	V <sub>L</sub>	483	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNY LNWYQQKPGGAVKFLIYYTSRLHSGVPSRFS GSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQGEALP WTFGGGKVEIK
LRRC15 的 抗体 huAD208.4.1	V <sub>H</sub>	484	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFTD YYIHWVKQAPGQGLEWIGLVYPYIGGTNYN QKFKGKATLTVDSTTTAYMEMSSLRSEDTA VYYCARGDNKYDAMDYWGQGTITVTVSS
	V <sub>L</sub>	485	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVSTSS YSYMHWYQQKPGQPPKLLIKYASSLESGVPD RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCEQSW EIRTFGGGKVEIK

[0218]

抗体	区域	SEQ ID NO	序列
LRRC15 的 抗体 huAD208.12.1	V <sub>H</sub>	486	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTN YWMHWVKQAPGQGLEWIGMIHPNSGSTKH NEKFRGKATLTVDSTTTAYMELSSLRSEDTA VYYCARSDFGNYRWYFDVWGQGTTVTVSS
	V <sub>L</sub>	487	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSSNNL HWYQQKPGQAPRVLIKYSQSIGIPARFSGS GSGTDFTLTISSLEPEDFAVYFCQQSNSWPFTF GQGTKLEIK
LRRC15 的 抗体 huAD208.14.1	V <sub>H</sub>	488	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFTD YYIHVWKQAPGQGLEWIGLVYPYIGSSYNQ QFKGKATLTVDSTSTAYMELSSLRSEDNAVY YCARGDNNYDAMDYWGQGTTVTVSS
	V <sub>L</sub>	489	DIVLTQSPDSLAVSLGERATISCRASQSVSTST YNYMHWYQQKPGQPPKLLVKYASNLESGVP DRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCHHT WEIRTFGGGKVEIK
LRRC15 的 抗体 hu139.10	V <sub>H</sub>	490	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLTSY GVHWVRQATGKGLEWLGVIWAGGSTNYNS ALMSRLTISKENAKSSVYLQMNSLRAGDTAM YYCATHMITEDYYGMDYWGQGTTVTVSS
	V <sub>L</sub>	491	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSR TRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGV PDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCKQ SYNLPFGGGTKVEIK

[0219] 在一些实施方案中,结合结构域可以通过结合其抗原来调节免疫响应。结合结构域可以通过结合至细胞类型上或组织中的其抗原来调节细胞类型或组织的活性。可以通过结合其抗原来调节免疫响应的结合结构域的一些非限制性实例是可以调节树突细胞的免疫活性的DEC-205结合结构域或DCIR结合结构域,或者可以调节肌成纤维细胞在纤维化组织位点处的免疫活性的FAP结合结构域。结合结构域的其他非限制性实例是LRRC15结合结构域、TNFR2结合结构域或钙粘素11结合结构域。

[0220] 在各个实施方案中,结合结构域可为如本文所述的抗体构建体中的第一抗原结合结构域。第一抗原结合结构域可结合患病组织上的抗原,其可从而靶向经附接或经连接的免疫调节化合物至体内的疾病位点。在一些实施方案中,第一抗原结合结构域可识别纤维化位点处星形细胞或肌成纤维细胞上表达的抗原。在一些实施方案中,第一抗原结合结构域可还识别在组织-特异性炎症和自身免疫的位点处在细胞(诸如滑膜成纤维细胞、肠上皮细胞和足细胞)上表达的抗原。在一些实施方案中,第一抗原结合结构域可识别在移植器官的细胞上表达的抗原。在一些实施方案中,第一抗原结合结构域的抗原可存在于星形细胞、肌成纤维细胞、滑膜成纤维细胞、上皮细胞或足细胞上,诸如钙粘素11、PDPN、整联蛋白 $\alpha 4\beta 7$ 、整联蛋白 $\alpha 2\beta$ 、肾病蛋白、足蛋白、FAP、CD73、CD38、PDGFR $\beta$ 、整联蛋白 $\alpha \nu \beta 1$ 、整联蛋白 $\alpha \nu \beta 3$ 、GARP、内皮唾酸蛋白、CTGF、c-KIT或整联蛋白 $\alpha \nu \beta 6$ 。在一些实施方案中,第一抗原结合结构域的抗原可存在于星形细胞、肌成纤维细胞、滑膜成纤维细胞、上皮细胞或足细胞上,诸如钙粘素11、LRRC15、PDPN、整联蛋白 $\alpha 4\beta 7$ 、整联蛋白 $\alpha 2\beta$ 、肾病蛋白、足蛋白、FAP、CD73、CD38、PDGFR $\beta$ 、整联蛋白 $\alpha \nu \beta 1$ 、整联蛋白 $\alpha \nu \beta 3$ 、GARP、内皮唾酸蛋白、CTGF、c-KIT或整联蛋白 $\alpha \nu \beta 6$ 。

在一些实施方案中,第一抗原结合结构域的抗原可存在于星形细胞、肌成纤维细胞、滑膜成纤维细胞、上皮细胞或足细胞上,诸如钙粘素11、LRRC15、PDPN、整联蛋白 $\alpha 4\beta 7$ 、整联蛋白 $\alpha 2\beta$ 、肾病蛋白、足蛋白、FAP、CD73、CD38、PDGFR $\beta$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 1$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 3$ 、GARP、内皮唾液蛋白、CTGF、c-KIT、整联蛋白 $\alpha v\beta 6$ 、MMP14、GPX8或F2RL2。在一些实施方案中,第一抗原结合结构域的抗原是钙粘素11、LRRC15或FAP。在一些实施方案中,第一抗原结合结构域的抗原是TNFR2。在其它实施方案中,第一抗原结合结构域可结合免疫细胞上的抗原,诸如BDCA2、CD30、CD40、PD-1、TIM-3、TNFR2、DEC205、DCIR、CD86、CD45RB、CD45RO、MHC II类或CD25。

[0221] 第二抗原结合结构域

[0222] 本文所述的缀合物可以含有抗体构建体,其中抗体构建体含有第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域。第二抗原结合结构域可以结合至与第一抗原结合结构域结合的抗原相同或不同的抗原。第二抗原结合结构域可以是抗体或抗体片段的抗原-结合部分。第二抗原结合结构域可以是抗体的可以保留与抗原特异性结合的能力的一个或多个片段。第二抗原结合结构域可以是任何抗原结合片段。第二抗原结合结构域可以在骨架中,其中骨架是第二抗原结合结构域的支撑框架。第二抗原结合结构域可以在骨架中包含抗原结合结构域。

[0223] 在一些实施方案中,第二抗原选自TNFR2、CD40、CD86、PD-1、TIM3、BTLA、DEC205、DCIR、CD45RB、CD45RO、HLA DR、CD38、CD73、GARP、BDCA2或CD30。在一些实施方案中,第二抗原选自TNFR2、CD40、CD86、PD-1、TIM3、BTLA、DEC205、DCIR、CD45RB、CD45RO、HLA DR、CD38、CD73、GARP、BDCA2、PD-L1或CD30。

[0224] 第二抗原结合结构域可以与TNFR2具有例如约50%、约60%、约70%、约80%或约90%序列同一性。第二抗原结合结构域可以是例如免疫细胞免疫调节靶标的拮抗剂,可以是例如在免疫细胞上存在的免疫检查点靶标的激动剂,或介导免疫细胞类型上(例如抗原呈递细胞和免疫组织上)细胞表面抗原的内化。第二抗原结合结构域可以是例如CD40、CD86的拮抗剂,PD-1、TIM-3或BTLA的激动剂,或至DEC-205的结合结构域。第二抗原结合结构域可以与CD40、CD86或PD-L1的拮抗剂,PD-1、TIM-3或BTLA的激动剂,或至DEC-205的结合结构域具有例如约50%、约60%、约70%、约80%或约90%序列同一性。第二抗原结合结构域可从编码抗体构建体和第一抗原结合结构域的单个构建体表达。

[0225] 第二抗原结合结构域可以包含抗原结合结构域,该抗原结合结构域可以指包含抗原识别部分的抗体的一部分,即足以赋予抗原识别部分对靶标(诸如抗原,即表位)的识别和结合的抗体的抗原决定可变区。第二抗原结合结构域可以包含抗体的抗原结合结构域。

[0226] Fv可以是含有完整的抗原识别和抗原结合位点的最小抗体片段。该区域可以由紧密非共价缔合的一条重链和一条轻链可变结构域的二聚体组成。在这种构型中,每个可变结构域的三个CDR可以相互作用以在V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>二聚体的表面上限定抗原结合位点。单个可变结构域(或仅包含三个对抗原具有特异性的CDR的Fv的一半)可以识别并结合抗原,尽管亲和力低于整个结合位点。

[0227] 第二抗原结合结构域可以与选自但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体或其功能片段(例如,重链可变结构域(V<sub>H</sub>)和轻链可变结构域(V<sub>L</sub>)、单链可变片段(scFv)、DARPin、亲和体、亲合体、打结素、单体、亲和钳、胞外域、受体胞外域、受体、细胞因子、配体、

免疫细胞因子、T细胞受体、anticalin、VNAR、双环肽或重组T细胞受体)的特异性抗原结合结构域至少80%同一性。

[0228] 第二抗原结合结构域可以附接至抗体构建体。例如,可以将抗体构建体的一部分与第二抗原结合结构域融合,以产生包含第二抗原结合结构域的抗体构建体作为融合蛋白。融合蛋白可以是编码第二抗原结合结构域的核酸序列与编码抗体构建体的其余部分的核酸序列在框内表达的结果。融合蛋白可以是编码具有抗原结合结构域的抗体构建体的框内遗传核苷酸序列或具有抗原结合结构域的抗体构建体的连续蛋白序列的结果。作为另一个实例,第二抗原结合结构域可连接至抗体构建体的一部分。第二抗原结合结构域可通过化学缔合连接至抗体构建体的一部分。第二抗原结合结构域可附接至Fc区域的末端。第二抗原结合结构域可附接至Fc结构域的末端。第二抗原结合结构域可附接至抗体构建体的一部分的末端。第二抗原结合结构域可附接至抗体的末端。第二抗原结合结构域可附接至抗体的轻链。第二抗原结合结构域可附接至抗体的轻链的末端。第二抗原结合结构域可附接至抗体的重链。第二抗原结合结构域可附接至抗体的重链的末端。末端可以是C-末端。抗体构建体可附接至1、2、3和/或4个第二抗原结合结构域。第二抗原结合结构域可以将抗体构建体引导至例如特定细胞或细胞类型。可以选择抗体构建的第二抗原结合结构域以识别抗原,如免疫细胞上表达的抗原或与纤维化疾病、自身免疫疾病或自身炎症疾病相关的抗原。抗原可以是肽或其片段。抗原可以在免疫细胞上表达。抗原可以在抗原呈递细胞上表达。抗原可以在树突细胞、巨噬细胞或B细胞上表达。当多个第二抗原结合结构域连接至抗体构建体时,第二抗原结合结构域可以结合至相同的抗原。当多个第二抗原结合结构域是抗体构建体的一部分时,第二抗原结合结构域可以结合至不同的抗原。

[0229] 在一些实施方案中,如本文所述的抗体构建体可以包含至对免疫细胞有特异性的第二抗原的第二结合结构域。在一些实施方案中,与如本文所述的没有第二结合结构域的缀合物相比,第二结合结构域还可以提高缀合物的免疫调节活性。第二结合结构域的一些非限制性实例是可以阻断CD40L与CD40结合的非激活CD40结合结构域,或者可以在不阻断PD-L1或PD-L2与PD-1结合的情况下增加PD-1信号的PD-1结合结构域。

[0230] 在一些实施方案中,第二结合结构域可在抗体构建体的Fc结构域的C端或第一抗原结合结构域的轻链的C端以scFv的形式结合至TNFRSF成员,其可以赋予激动作用缺乏,同时保留与TNFRSF结合结构域的结合,从而可以通过适当的免疫调节进行靶向。

[0231] 第二结合结构域可包含与表1中作为SEQ ID NO:85-SEQ ID NO:298示出的一组CDR具有至少80%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或至少100%序列同一性的一组六个CDR。第二结合结构域可包含一组CDR,其与以下序列具有至少80%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或至少100%序列同一性:a)包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:86的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的LCDR3;b)包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列的LCDR3;c)包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的

[illegible]



HCDR3、包含SEQ ID NO:175的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:176的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:177的氨基酸序列的LCDR3;q) 包含SEQ ID NO:178的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:179的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:180的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:181的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:182的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:183的氨基酸序列的LCDR3;r) 包含SEQ ID NO:184的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:185的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:186的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:187的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:188的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:189的氨基酸序列的LCDR3;s) 包含SEQ ID NO:190的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:191的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:192的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:193的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:194的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:195的氨基酸序列的LCDR3;t) 包含SEQ ID NO:196的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:197的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:198的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:199的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:200的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:201的氨基酸序列的LCDR3;u) 包含SEQ ID NO:202的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:203的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:204的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:205的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:207的氨基酸序列的LCDR3 v) 包含SEQ ID NO:208的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:209的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:210的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:211的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:212的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:213的氨基酸序列的LCDR3;w) 包含SEQ ID NO:214的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:215的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:216的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:217的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:218的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:219的氨基酸序列的LCDR3;x) 包含SEQ ID NO:220的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:221的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:222的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:223的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:224的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:225的氨基酸序列的LCDR3;y) 包含SEQ ID NO:226的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:227的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:228的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:229的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:230的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:231的氨基酸序列的LCDR3;z) 包含SEQ ID NO:232的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:234的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:235的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:236的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:237的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:238的氨基酸序列的LCDR3;aa) 包含SEQ ID NO:239的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:240的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:241的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:242的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:243的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:244的氨基酸序列的LCDR3;bb) 包含SEQ ID NO:245的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:246的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:247的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:248的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:249的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:250的氨基酸序列的LCDR3;cc) 包含SEQ ID NO:251的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:252的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:253的氨基酸序列的



HCDR3、包含SEQ ID NO:254的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:255的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:256的氨基酸序列的LCDR3;dd) 包含SEQ ID NO:257的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:258的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:259的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:260的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:261的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:262的氨基酸序列的LCDR3;ee) 包含SEQ ID NO:263的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:264的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:265的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:266的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:267的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:268的氨基酸序列的LCDR3;ff) 包含SEQ ID NO:269的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:270的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:271的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:272的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:273的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:274的氨基酸序列的LCDR3;gg) 包含SEQ ID NO:275的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:276的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:277的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:278的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:279的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:280的氨基酸序列的LCDR3;hh) 包含SEQ ID NO:281的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:282的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:283的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:284的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:285的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:286的氨基酸序列的LCDR3;ii) 包含SEQ ID NO:287的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:288的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:289的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:290的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:291的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:292的氨基酸序列的LCDR3;或jj) 包含SEQ ID NO:293的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:294的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:295的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:296的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:297的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:298的氨基酸序列的LCDR3。

[0232] 抗体构建体可包含特异性结合至抗原的第二结合结构域,其中第二结合结构域包含与在表2中作为SEQ ID NO:352-SEQ ID NO:436示出的一对可变区具有至少80%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或至少100%序列同一性的一对可变区。抗体构建体可包含特异性结合至抗原的第二结合结构域,其中第二结合结构域包含:a) 与SEQ ID NO:352的氨基酸序列具有至少80%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或至少100%序列同一性的V<sub>H</sub>序列,and与的氨基酸序列具有至少80%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或至少100%序列同一性的V<sub>L</sub>序列of SEQ ID NO:353; b) 与SEQ ID NO:354的氨基酸序列具有至少80%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或至少100%序列同一性的V<sub>H</sub>序列,和与SEQ ID NO:355的氨基酸序列具有至少80%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或至少100%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;c) 与SEQ ID NO:356的氨基酸序列具有至少80%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或至少100%序列同一性的V<sub>H</sub>序列,和与SEQ ID NO:357的氨基酸序列具有至少80%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或至少100%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;d) 与SEQ ID NO:358的氨基酸序列具有至少80%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或至少100%序列同一性的V<sub>H</sub>序列,和与SEQ ID NO:359的氨基酸序列具有至少80%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或至少100%序列

[illegible]

[illegible]

[illegible]

80%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或至少100%序列同一性的V<sub>H</sub>序列,和与SEQ ID NO:432的氨基酸序列具有至少80%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或至少100%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;rr)与SEQ ID NO:433的氨基酸序列具有至少80%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或至少100%序列同一性的V<sub>H</sub>序列,和与SEQ ID NO:434的氨基酸序列具有至少80%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或至少100%序列同一性的V<sub>L</sub>序列;或ss)与SEQ ID NO:435的氨基酸序列具有至少80%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或至少100%序列同一性的V<sub>H</sub>序列,和与SEQ ID NO:436的氨基酸序列具有至少80%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或至少100%序列同一性的V<sub>L</sub>序列。

[0233] 接头附接至抗体构建体

[0234] 抗体构建体免疫调节化合物缀合物还可被称为抗体缀合物。本文所述的抗体缀合物可包含接头,如肽接头。本文所述的缀合物的接头和方法可不影响缀合物(如,活性部分包括抗原结合结构域、Fc结构域、靶向结合结构域、抗体、免疫调节剂、抑制剂等)的活性部分结合至靶标,所述靶标可以是同源结合伴侣,诸如抗原。接头可以在缀合物的不同部分之间,如在抗体构建体和本公开的化合物(免疫调节化合物)之间形成键。在某些实施方案中,抗体缀合物包含多个接头。在某些实施方案中,其中抗体缀合物包含多个接,接头可以是相同的接头或不同的接头。

[0235] 接头可以通过抗体构建体和接头之间的键结合,即共价结合至抗体构建体。接头可通过抗纤维化相关抗原抗体构建体与接头之间的键共价结合至抗纤维化相关抗原抗体构建体。接头可通过抗自身免疫相关抗原抗体构建体与接头之间的键共价结合至抗自身免疫相关抗原抗体构建体。接头可以通过抗自身炎症相关抗原抗体构建体与接头之间的键共价结合至抗自身炎症相关抗原抗体构建体。接头可以通过抗APC分子抗体和接头之间的键共价结合至抗APC(抗原呈递细胞)分子抗体。例如,接头可以共价结合至抗体构建体的氨基酸序列的末端,或者可以共价结合至抗体构建体的侧链修饰,诸如赖氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬氨酸、非天然氨基酸残基、谷氨酰胺或谷氨酸残基的侧链。接头可以共价结合至抗体构建体的Fc区域的氨基酸序列的末端,或可以共价结合至抗体构建体的Fc区域的侧链修饰,诸如赖氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬氨酸、非天然氨基酸残基、谷氨酰胺或谷氨酸残基的侧链。接头可以共价结合至抗体构建体的Fc结构域的氨基酸序列末端,或者可以共价结合至抗体构建体的Fc结构域的侧链修饰,诸如赖氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬氨酸、非天然氨基酸残基、谷氨酰胺或谷氨酸残基的侧链。

[0236] 接头可以在铰链半胱氨酸处共价结合至抗体构建体。接头可以在轻链恒定结构域赖氨酸处共价结合至抗体构建体。接头可以在轻链中的经工程化的半胱氨酸处共价结合至抗体构建体。接头可以在Fc区赖氨酸处共价结合至抗体构建体。接头可以在Fc结构域赖氨酸处共价结合至抗体构建体。接头可在Fc区半胱氨酸处共价结合至抗体构建体。接头可在Fc结构域半胱氨酸处共价结合至抗体构建体。接头可以在经工程化的轻链谷氨酰胺处共价结合至抗体构建体。接头可以在经工程化至轻链中的非天然氨基酸处共价结合至抗体构建体。接头可以在经工程化至重链中的非天然氨基酸处共价结合至抗体构建体。接头可在重链中的赖氨酸处共价结合至抗体构建体。接头可以在重链中的经工程化的半胱氨酸处共价

结合至抗体构建体。可以将氨基酸工程化至如本文所述的抗体构建体的氨基酸序列中,例如附接缀合物的接头。可以将经工程化的氨基酸添加到现有氨基酸序列。经工程化的氨基酸可以取代氨基酸序列中的一个或多个现有氨基酸。

[0237] 接头可以经由巯基基团缀合至抗体构建体。接头可以经由伯胺缀合至抗体构建体。接头可以是在与胍键反应的抗体构建体上的非天然氨基酸之间建立的连接,所述胍键通过在免疫调节化合物上用烷氧基胺修饰酮基基团而形成。

[0238] 在一些实施方案中,将经工程化的半胱氨酸在抗体构建体中引入,使得接头可以在此类经工程化的半胱氨酸处附接。例如,可将经工程化的半胱氨酸在根据Kabat的EU编码的T114(重链)、A140(重链)、L174(重链)、L179(重链)、T187(重链)、T209(重链)、S239(重链)、V262(重链)、G371(重链)、Y373(重链)、E382(重链)、S400(重链)、S424(重链)、N434(重链)、Q438(重链)、I106(轻链)、R108(轻链)、A118(重链)、R142(轻链)、K149(轻链)和/或V205(轻链)处引入IgG(通常是IgG1)中。

[0239] 在一些实施方案中,当一个或多个接头在本文所述的位点处共价结合至抗体构建体时,抗体构建体的Fc结构域可结合至Fc受体。在某些实施方案中,结合至接头的抗体构建体或结合至与TGF $\beta$ R1抑制剂结合的接头的抗体构建体保留了抗体的Fc结构域与Fc受体结合的能力。在某些实施方案中,结合至接头的抗体构建体或结合至与TNKS抑制剂结合的接头的抗体构建体保留了抗体的Fc结构域与Fc受体结合的能力。在某些实施方案中,结合至接头的抗体构建体或结合至与TNIK结合的接头的抗体构建体保留了抗体的Fc结构域与Fc受体结合的能力。在某些实施方案中,当接头在本文所述的位点处连接至抗体构建体时,结合至接头的抗体构建体或者结合至与免疫调节化合物结合的接头的抗体构建体的抗原结合结构域可以结合其抗原。在某些实施方案中,当接头在本文所述的位点处连接至抗体构建体时,结合至接头的抗体构建体或者结合至与免疫调节化合物结合的接头的抗体构建体的第二抗原结合结构域可结合其抗原。

[0240] 在某些实施方案中,结合至本文公开的免疫调节化合物的一种或多种接头不可附接至选自以下的IgG1 Fc结构域的氨基酸残基:221、224、227、228、230、231、223、233、234、235、236、237、238、239、240、241、243、244、245、247、249、250、258、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、275、276、278、280、281、283、285、286、291、292、293、294、295、296、297、298、299、300、302、305、313、318、323、324、325、327、328、329、330、331、332、333、335、336、396或428,其中Fc结构域中的氨基酸残基的编号根据Kabat中的EU索引。

[0241] 在某些实施方案中,结合至本文公开的免疫调节化合物的一种或多种接头可附接至选自以下的IgG1 Fc结构域的氨基酸残基:221、224、227、228、230、231、223、233、234、235、236、237、238、239、240、241、243、244、245、247、249、250、258、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、275、276、278、280、281、283、285、286、291、292、293、294、295、296、297、298、299、300、302、305、313、318、323、324、325、327、328、329、330、331、332、333、335、336、396或428,其中Fc结构域中的氨基酸残基的编号根据Kabat中的EU索引。

[0242] 在一些实施方案中,当结合至免疫调节化合物的接头连接至抗体构建体时,可保留第一抗原结合结构域对第一抗原的 $K_d$ 。在免疫调节化合物的存在下抗体构建体免疫调节化合物缀合物的第一抗原结合结构域结合至第一抗原的 $K_d$ 可比第一抗原结合结构域结合至免疫调节化合物的第一抗原的 $K_d$ 大约2倍、约3倍、约4倍、约5倍、约6倍、约7倍、约8倍、约9

倍、约10倍、约15倍、约20倍、约25倍、约30倍、约35倍、约40倍、约45倍、约50倍、约60倍、约70倍、约80倍、约90倍、约100倍、约110倍或约120倍。在免疫调节化合物的存在下抗体构建体免疫调节化合物缀合物的第一抗原结合结构域结合至第一抗原的 $K_d$ 可为小于10nM。在免疫调节化合物的存在下抗体构建体免疫调节化合物缀合物的第一抗原结合结构域结合至第一抗原的 $K_d$ 可为小于100nM、小于50nM、小于20nM、小于5nM、小于1nM或小于0.1nM。

[0243] 当结合至免疫调节化合物的接头与抗体构建体连接时,第二抗原结合结构域对第二抗原的 $K_d$ 可保留。在免疫调节化合物的存在下抗体构建体免疫调节化合物缀合物的第二抗原结合结构域结合至第二抗原的 $K_d$ 可比在免疫调节化合物的不存在下第二抗原结合结构域结合至抗体构建体的第二抗原的 $K_d$ 大约2倍、约3倍、约4倍、约5倍、约6倍、约7倍、约8倍、约9倍、约10倍、约15倍、约20倍、约25倍、约30倍、约35倍、约40倍、约45倍、约50倍、约60倍、约70倍、约80倍、约90倍、约100倍、约110倍或约120倍。在免疫调节化合物的存在下抗体构建体免疫调节化合物缀合物的第二抗原结合结构域结合至第二抗原的 $K_d$ 可为小于10nM。在免疫调节化合物的存在下抗体构建体免疫调节化合物缀合物的第二抗原结合结构域结合至第二抗原的 $K_d$ 可为小于100nM、小于50nM、小于20nM、小于5nM、小于1nM或小于0.1nM。

[0244] 当结合至免疫调节化合物的接头与抗体构建体连接时,第一抗原结合结构域对第一抗原的 $K_d$ 可保留并且第二抗原结合结构域对第二抗原的 $K_d$ 可保留。在免疫调节化合物的存在下抗体构建体免疫调节化合物缀合物的第一抗原结合结构域结合至第一抗原的 $K_d$ 可比在免疫调节化合物的不存在下第一抗原结合结构域结合至抗体构建体的第一抗原的 $K_d$ 大约2倍、约3倍、约4倍、约5倍、约6倍、约7倍、约8倍、约9倍、约10倍、约15倍、约20倍、约25倍、约30倍、约35倍、约40倍、约45倍、约50倍、约60倍、约70倍、约80倍、约90倍、约100倍、约110倍、或约120倍,和在免疫调节化合物的存在下抗体构建体免疫调节化合物缀合物的第二抗原结合结构域结合至第二抗原的 $K_d$ 可比在免疫调节化合物的不存在下第二抗原结合结构域结合至抗体构建体的第二抗原的 $K_d$ 大约2倍、约3倍、约4倍、约5倍、约6倍、约7倍、约8倍、约9倍、约10倍、约15倍、约20倍、约25倍、约30倍、约35倍、约40倍、约45倍、约50倍、约60倍、约70倍、约80倍、约90倍、约100倍、约110倍或约120倍。在免疫调节化合物的存在下抗体构建体免疫调节化合物缀合物的第一抗原结合结构域结合至第一抗原的 $K_d$ 可为小于10nM,和在免疫调节化合物的存在下抗体构建体免疫调节化合物缀合物的第二抗原结合结构域结合至第二抗原的 $K_d$ 可为小于10nM。在免疫调节化合物的存在下抗体构建体免疫调节化合物缀合物的第一抗原结合结构域结合至第一抗原的 $K_d$ 可为小于100nM、小于50nM、小于20nM、小于5nM、小于1nM或小于0.1nM,和在免疫调节化合物的存在下抗体构建体免疫调节化合物缀合物的第二抗原结合结构域结合至第二抗原的 $K_d$ 可为小于100nM、小于50nM、小于20nM、小于5nM、小于1nM或小于0.1nM。

[0245] 在免疫调节化合物的存在下抗体构建体免疫调节化合物缀合物的Fc结构域结合至Fc受体的 $K_d$ 可以比在免疫调节化合物的不存在下Fc结构域结合至Fc受体的 $K_d$ 大约2倍、约3倍、约4倍、约5倍、约6倍、约7倍、约8倍、约9倍、约10倍、约15倍、约20倍、约25倍、约30倍、约35倍、约40倍、约45倍、约50倍、约60倍、约70倍、约80倍、约90倍、约100倍、约110倍或约120倍。在免疫调节化合物的存在下抗体构建体免疫调节化合物缀合物的Fc结构域结合至Fc受体的 $K_d$ 可为小于10nM。在免疫调节化合物的存在下抗体构建体免疫调节化合物缀合物的Fc结构域结合至Fc受体的 $K_d$ 可为小于10 $\mu$ M、小于1 $\mu$ M、小于100nM、小于50nM、小于20nM、小于

5nM、小于1nM或小于0.1nM。

[0246] 在免疫调节化合物的存在下抗体构建体免疫调节化合物缀合物的Fc结构域结合至Fc $\gamma$ 受体的K<sub>d</sub>可以是在免疫调节化合物的不存在下Fc结构域结合至Fc $\gamma$ 受体的K<sub>d</sub>的等于或不少于2倍、5倍或10倍。在免疫调节化合物的存在下抗体构建体免疫调节化合物缀合物的Fc结构域结合至Fc $\gamma$ 受体的K<sub>d</sub>是在免疫调节化合物的不存在下Fc结构域结合至Fc $\gamma$ 受体的K<sub>d</sub>的不小于约2倍、约3倍、约4倍、约5倍、约6倍、约7倍、约8倍、约9倍、约10倍、约15倍、约20倍、约25倍、约30倍、约35倍、约40倍、约45倍、约50倍、约60倍、约70倍、约80倍、约90倍、约100倍、约110倍或约120倍。在免疫调节化合物的存在下抗体构建体免疫调节化合物缀合物的Fc结构域结合至Fc $\gamma$ 受体的K<sub>d</sub>可为小于10nM。在免疫调节化合物的存在下抗体构建体免疫调节化合物缀合物的Fc结构域结合至Fc $\gamma$ 受体的K<sub>d</sub>可为小于10 $\mu$ M、小于1 $\mu$ M、小于100nM、小于50nM、小于20nM、小于5nM、小于1nM或小于0.1nM。

[0247] 在免疫调节化合物的存在下抗体构建体免疫调节化合物缀合物的Fc结构域结合至FcRn受体的K<sub>d</sub>可以是在免疫调节化合物的不存在下Fc结构域结合至FcRn受体的K<sub>d</sub>至少等于或至少不大于约2倍、5倍或10倍。在免疫调节化合物的存在下抗体构建体免疫调节化合物缀合物的Fc结构域结合至FcRn受体的K<sub>d</sub>可以是在免疫调节化合物的不存在下Fc结构域结合至FcRn受体的K<sub>d</sub>至少等于或至少不大于约2倍、约3倍、约4倍、约5倍、约6倍、约7倍、约8倍、约9倍、约10倍、约15倍、约20倍、约25倍、约30倍、约35倍、约40倍、约45倍、约50倍、约60倍、约70倍、约80倍、约90倍、约100倍、约110倍、或约120倍。在免疫调节化合物的存在下抗体构建体免疫调节化合物缀合物的Fc结构域结合至FcRn受体的K<sub>d</sub>可为小于10nM。在免疫调节化合物的存在下抗体构建体免疫调节化合物缀合物的Fc结构域结合至FcRn受体的K<sub>d</sub>可为小于10 $\mu$ M、小于1 $\mu$ M、小于100nM、小于50nM、小于20nM、小于5nM、小于1nM或小于0.1nM。

[0248] 在一些实施方案中,Fc结构域活性(如结合至特定情况的Fc受体)可在共价附接免疫调节化合物至抗体构建体之后保留。在各个实施方案中,如通过对FcR保留的K<sub>d</sub>或通过缀合物在动物中保留半衰期所确定的,Fc结构域可保留与FcRn的结合。在一些实施方案中,如通过对Fc $\gamma$ 受体保留的K<sub>d</sub>或通过表达特定组的Fc $\gamma$ 受体而不是缀合物的结合结构域的抗原的细胞中产生Fc $\gamma$ 受体介导的保留活性的能力所确定的,抗体构建体的Fc结构域可保留与Fc $\gamma$ 受体的结合。

[0249] 在一些实施方案中,可以选择缺乏对Fc $\gamma$ 受体结合的缀合物的抗体构建体的Fc结构域,这可以通过结合测定法、细胞基测定或其组合显示出保留这种缺乏结合。

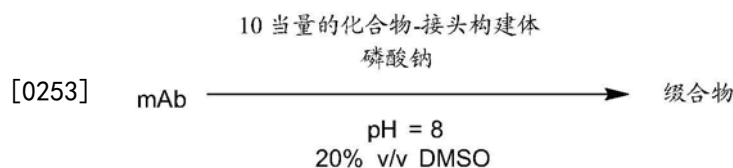
[0250] 基于赖氨酸的生物缀合

[0251] 抗体构建体可以通过经由基于赖氨酸的生物缀合而缀合至接头。可以将抗体构建体交换至适当的缓冲液中,例如约2mg/mL至约10mg/mL的浓度下的磷酸盐、硼酸盐、PBS、组氨酸、Tris-乙酸盐。可以在搅拌下以溶液的形式加入适当数量当量的如本文所述的氨基-吡啶甲酰胺化合物的构建体和接头-有效载荷。根据接头-有效载荷的物理性质,可以在添加接头-有效载荷之前引入共溶剂以促进溶解。可以在室温下将反应物搅拌2小时至约12小时,这取决于观察到的反应性。反应进程可以通过LC-MS监测。一旦认为反应完成,可以通过适用的方法去除剩余的接头-有效载荷,并且可以将抗体缀合物交换至所需的制剂缓冲液中。赖氨酸-连接的缀合物可以按照以下方案A从ab抗体(mAb)和接头-有效载荷如10当量开始合成(缀合物=抗体缀合物)。单体含量和药物-抗体构建体比率(摩尔比)可以通过



本文所述的方法确定。

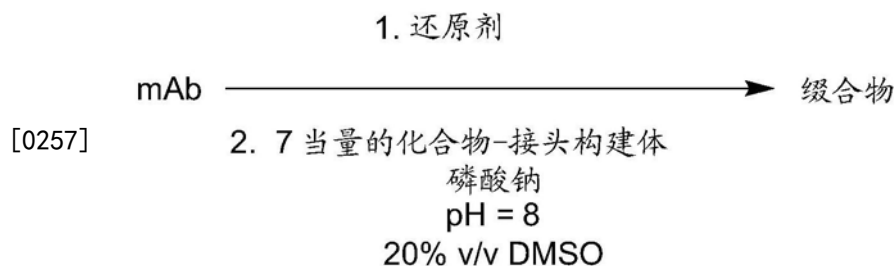
[0252] 方案A.



[0254] 基于半胱氨酸的生物缀合

[0255] 抗体构建体可以经由基于半胱氨酸的生物缀合而缀合至接头。可以将抗体构建体用适当当量的还原剂(例如二硫苏糖醇或三(2-羧乙基)膦)交换至适当的缓冲液中,例如约2mg/mL至约10mg/mL的浓度下的磷酸盐、硼酸盐、PBS、组氨酸、Tris-乙酸盐。可以将所得溶液搅拌适当量的时间和温度,以实现所需的还原。氨基-吡嗪甲酰胺化合物和接头的构建体可以在搅拌下作为溶液加入。根据接头-有效载荷的物理性质,可以在添加接头-有效载荷之前引入共溶剂以促进溶解。可以将反应物在室温下搅拌约1小时至约12小时,这取决于所观察到的反应性。反应的进程可以通过液相色谱-质谱(LC-MS)监测。一旦认为反应完成,可以通过适用的方法去除剩余的游离接头-有效载荷,并且可以将抗体缀合物交换至所需的制剂缓冲液中。此类半胱氨酸-基缀合物可以使用以下方案B中描述的条件,以抗体(mAb)和接头-有效载荷,例如7当量开始合成(缀合物=抗体缀合物)。单体含量和药物-抗体比可以通过本文描述的方法确定。

[0256] 方案B.



[0258] 免疫调节化合物

[0259] 免疫调节化合物可以是与蛋白质靶标结合并可以激活蛋白质靶标功能的化合物,诸如小分子、大分子或其他分子,或者可以是与蛋白质靶标结合并且可以抑制蛋白质靶标功能的实体。在一些实施方案中,免疫调节化合物不是核酸。在一些实施方案中,免疫调节化合物结合至细胞内蛋白质靶标。

[0260] 在一些实施方案中,可以设计免疫调节化合物以增加泛素-介导的蛋白靶标破坏。增加的泛素-介导的蛋白靶标破坏可以使用与E3泛素连接酶的蛋白质亚基结合的小分子。泛素蛋白酶体介导的细胞蛋白降解系统涉及多个泛素分子与靶蛋白上赖氨酸残基的共价附接,从而标记出靶蛋白被细胞蛋白酶体降解。将泛素分子附接至蛋白靶标的过程通常涉及3个酶和步骤:1) 激活泛素的E1酶,和2) 将激活的泛素转移的E2酶,3) 多亚基E3酶连接酶,其催化泛素附接至靶蛋白。

[0261] 可以结合特定E3连接酶的亚基蛋白的小分子的一些实例可以称为“PROTAC”,它们可以利用泛素蛋白酶体系统降解所选的蛋白靶标以进行治疗使用。PROTAC可以包含与蛋白质靶标结合的小分子,并可以通过接头共价附接至可以与E3连接酶亚基结合的小分子。利

用泛素蛋白酶体途径的酶促机制可以提高蛋白质靶标抑制的效力。然而,当前的PROTAC可能面临两个挑战:1)其大小可使有效递送至细胞更加困难,以及2)全身递送有效的蛋白质靶标抑制可加剧药物经常表现出的中靶或脱靶毒性。如本文所公开的缀合物可以被设计为克服这些困难,同时保持利用泛素蛋白酶体途径的益处。

[0262] 免疫调节化合物可以例如耐受、遏制、阻遏、转移免疫响应或降低针对患者组织、患者细胞或患者抗原的炎症响应。在一些实施方案中,本文所述的免疫调节化合物可为例如PI3K抑制剂、钙调磷酸酶抑制剂、mTOR抑制剂、BTK抑制剂、JAK抑制剂、CRAC抑制剂、PARP1拮抗剂、PPAR $\gamma$ 激动剂、Kv1.3拮抗剂、KCa3.1拮抗剂、PP2A激动剂、IRAK4抑制剂、MYD88抑制剂、BCL-2拮抗剂、A2ar激动剂、TLR7拮抗剂、c-KIT激酶抑制剂、KCa3.1激动剂、TGF $\beta$ R1抑制剂、TGF $\beta$ R2抑制剂、ACC拮抗剂、ASK1拮抗剂、GLI1抑制剂、TNKS拮抗剂或TNIK拮抗剂。

[0263] 在一些实施方案中,免疫调节化合物可为例如PI3K抑制剂、钙调磷酸酶抑制剂、mTOR抑制剂、BTK抑制剂、JAK抑制剂、CRAC (ORA11) 抑制剂、PARP1拮抗剂、PPAR  $\gamma$  激动剂、Kv1.3拮抗剂、KCa3.1拮抗剂、PP2A激动剂、IRAK4抑制剂、MYD88抑制剂、BCL-2、A2aR激动剂、维生素D受体 (VDR) 激动剂或GLI1抑制剂。

[0264] 在一些实施方案中,免疫调节化合物是TGF $\beta$ R1抑制剂TGF $\beta$ R2抑制剂、TNKS拮抗剂或TNIK拮抗剂。

[0265] 在一些实施方案中,TGF $\beta$ R1激酶的抑制剂包括以下中公开的那些:美国公开申请2018/0127426、美国专利No.8,080,568、WO 2012/002680、WO 2009/009059、WO 2007/076127、WO 2007076086、WO 2006026306、Bioorg.Med.Chem.,2014,22,2724-2732和J.Med.Chem.2014,57,4213-4238,其公开内容通过引用并入本文。

[0266] 在一些实施方案中,TGF $\beta$ R2激酶的抑制剂包括以下中公开的那些:WO 2015/136073、Bioorg.Med.Chem.Lett.,2013,23,3248-3252、Acta Cryst.,2016,D72,658-674、WO 2016/020864、美国公开申请2014/0249135、美国公开申请20120225061和化合物诸如3-氨基-6-(4-(氨基甲基)苯基)-N-(4-吗啉代吡啶-3-基)吡嗪-2-甲酰胺,其公开内容通过引用并入本文。

[0267] 在一些实施方案中,TNKS的抑制剂包括以下中公开的那些:CN 107226808、EP 3313177、美国专利No.9,505,749、美国公开申请No.2015/0045368、WO 2014/036022、WO 2017/076484、WO 2018/046933、WO 2018/003962、Eur.J.Med.Chem.,2017,142,506-522,其公开内容通过引用并入本文。

[0268] 在一些实施方案中,TNIK的抑制剂包括以下中公开的那些:美国公开申请2016/0264555、WO 2015/083833、美国公开申请2010/0216795、美国公开申请20100137386、Med.Chem.Comm.,2015,6,1564-1572和Bioorg.Med.Chem.Lett.,2013,23,569-573,其公开内容通过引用并入本文。

[0269] 在一些实施方案中,全身性红斑狼疮可使用本文所述的抗体缀合物治疗。在一些实施方案中,缀合至抗体缀合物的化合物可为TLR7拮抗剂。

[0270] 在一些实施方案中,肥大细胞增多症/色素性荨麻疹可使用本文所述的抗体缀合物治疗。在一些实施方案中,缀合至抗体构建体以形成的缀合物的化合物可为c-KIT激酶抑制剂。

[0271] 在一些实施方案中,本文所述的纤维化疾病可使用本文所述的抗体缀合物治疗。

在一些实施方案中,缀合至抗体构建体以形成缀合物的化合物可为KCa3.1激动剂。在一些实施方案中,缀合至抗体构建体以形成缀合物的化合物可为ACC抑制剂,诸如GS-0976。在一些实施方案中,缀合至抗体构建体以形成缀合物的化合物可为ASK1抑制剂。在一些实施方案中,缀合至抗体构建体以形成缀合物的化合物可为TGFBR1抑制剂。在一些实施方案中,缀合至抗体构建体以形成缀合物的化合物可为TGFBR2抑制剂。在一些实施方案中,缀合至抗体构建体以形成缀合物的化合物可为TNKS抑制剂。在一些实施方案中,缀合至抗体构建体以形成缀合物的化合物可为TNIK抑制剂。在一些实施方案中,缀合至抗体构建体以形成缀合物的化合物可为GLI1抑制剂。

[0272] 在一些实施方案中,多发性硬化可使用本文所述的抗体缀合物治疗。在一些实施方案中,缀合至抗体构建体以形成缀合物的化合物可为芬戈莫德。

[0273] 免疫调节化合物与其靶标或靶蛋白的结合可以增加在肌成纤维细胞、免疫细胞或两者中表达的蛋白的活性。一些非限制性实例可以包括作为腺嘌呤受体A2Ra的激动剂的免疫调节化合物,诸如CGS-21680或增加磷酸酶PP2A活性的鞘氨醇-1类似物,诸如FTY720和衍生的类似物。

[0274] 免疫调节化合物与其靶标或靶蛋白的结合可以抑制在肌成纤维细胞、免疫细胞或两者中表达的蛋白靶标的功能。免疫调节化合物的一些非限制性实例可以包括:免疫细胞中mTOR激酶的蛋白激酶抑制剂,诸如雷帕霉素,LIST;肌成纤维细胞、免疫细胞或两者中TGFBR2激酶的抑制剂,诸如3-氨基-6-(4-(氨基甲基)苯基)-N-(4-吗啉代吡啶-3-基)吡嗪-2-甲酰胺;免疫细胞中PI3K $\gamma$ 和PI3K $\delta$ 的一者或两者的抑制剂,诸如Duvelisib、TG 100713和PF 04691502;和肌成纤维细胞、免疫细胞或两者中的TNIK的抑制剂,诸如KY-05009和NCB-0846[4-((2-((4-(氨基甲基)-1H-苯并[d]咪唑-6-基)氨基)喹啉-8-基)氧基)环己-1-醇]。

[0275] 免疫调节化合物可以通过共价附接至靶标或靶蛋白来介导靶标抑制。可以抑制靶蛋白的免疫调节化合物的非限制性实例可以是结合至TGFBR1激酶的活性位点的化合物。可以抑制靶蛋白的免疫调节化合物的非限制性实例可以是结合至TGFBR2激酶的活性位点的化合物。可以抑制靶蛋白的免疫调节化合物的非限制性实例可以是结合至TNKS的活性位点的化合物。可以抑制靶蛋白的免疫调节化合物的非限制性实例可以是结合至TNIK的活性位点的化合物。

[0276] 免疫调节化合物可以通过介导在肌成纤维细胞、免疫细胞或两者中表达的靶蛋白的降解来结合至蛋白靶并且可以抑制蛋白靶标的功能。免疫调节化合物的非限制性实例可包括上述的TGFBR1、TGFBR2、TNKS和TNIK的抑制剂。免疫调节化合物的非限制实例还可包括共价附接或连接至E3泛素连接酶结合部分(诸如来自VHL结合部分)的上述的TGFBR1、TGFBR2、TNKS和TNIK的抑制剂,诸如(S)-2-氨基-N1-(4-(5-氨基-6-((4-吗啉代吡啶-3-基)氨基)吡嗪-2-基)苄基)-N5-(2-(3-(((S)-1-((2S,4R)-4-羟基-2-((4-(4-甲基噻唑-5-基)苄基)氨基)吡咯烷-1-基)-3,3-二甲基-1-氧代丁烷-2-基)氨基)-3-氧代丙氧基)乙基)戊二酰胺(化合物1.1)或小脑蛋白结合部分诸如3-氨基-6-(4-(2-((2S)-2-氨基-6-(2-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1,3-二氧代异吲哚啉-4-基)氧基)乙酰氨基)己酰氨基)乙基)苄基)-N-(4-吗啉代吡啶-3-基)吡嗪-2-甲酰胺(化合物1.2)。结合VHL的其他化合物可以是羟基脯氨酸化合物,诸如在W02013/106643中公开的那些,以及在US 2016/0045607、W02014/187777、US 2014/0356322和US 9,249,153中描述的其他化合物。结合至小脑蛋白的

其他化合物包括沙利度胺、来那度胺、泊马度胺及其类似物。结合至小脑蛋白的其他小分子化合物也是已知的,如,在US 2016/0058872和US2015/0291562中公开的化合物。

[0277] 在一些实施方案中,E3泛素连接酶结合部分可为第二部分。在一些实施方案中,E3泛素连接酶结合部分可结合至E3泛素连接酶,诸如冯·希佩尔-林道E3泛素连接酶(VHL)、小脑蛋白、小鼠双微体2同源物(MDM2)、AMFR、APC/Cdc20、APC/Cdh1、C6orf157、Cbl、CBLL1、CHFR、CHIP、DTL(Cdt2)、E6-AP、HACE1、HECTD1、HECTD2、HECTD3、HECW1、HECW2、HERC2、HERC3、HERC4、HERC5、HUWE1、HYD、ITCH、LNX1、红褐蛋白、MARCH-I、MARCH-II、MARCH-III、MARCH-IV、MARCH-VI、MARCH-VII、MARCH-VIII、MARCH-X、MEKK1、MIB1、MIB2、MycBP2、NEDD4、NEDD4L、Parkin、PELI1、Pirh2、PJA1、PJA2、RFFL、RFWD2、Rictor、RNF5、RNF8、RNF19、RNF190、RNF20、RNF34、RNF40、RNF125、RNF128、RNF138、RNF168、SCF/ $\beta$ -TrCP、SCF/FBW7、SCF/Skp2、SHPRH、SIAH1、SIAH2、SMURF1、SMURF2、TOPORS、TRAF6、TRAF7、TRIM63、UBE3B、UBE3C、UBR1、UBR2、UHRF2、WWP1、WWP2或ZNR1。

[0278] 如本文所述的缀合物可改变靶细胞内的免疫调节化合物的蛋白靶标的活性。

[0279] 在各个实施方案中,缀合物可增加包含第一抗原结合结构域、第二结合结构域或其组合的细胞中免疫调节化合物的蛋白靶标的活性。在各个实施方案中,缀合物可以增加包含第一抗原结合结构域、第二结合结构域相互作用组合的细胞中免疫调节化合物的蛋白质靶标的活性。

[0280] 在各个实施方案中,缀合物可以降低包含第一抗原结合结构域、第二结合结构域或其组合的细胞中免疫调节化合物的蛋白质靶标的活性。该缀合物可以通过增加包含第一抗原结合结构域、第二结合结构域或其组合的细胞中的靶蛋白降解来降低免疫调节化合物的蛋白靶标的活性。

[0281] 将缀合物的抗原靶向递送至免疫细胞、肌成纤维细胞或发炎组织可降低免疫调节化合物的全身毒性。一些非限制性实例是可以抑制TGF $\beta$ R1、TGF $\beta$ R2或mTOR激酶的免疫调节化合物。将缀合物的抗原靶向递送至免疫细胞或肌成纤维细胞可增加免疫调节的效力。一些非限制性实例可以包括缀合物,所述缀合物可以使用与第二部分或E3泛素连接酶结合部分连接的免疫调节化合物或第一部分来促进靶蛋白降解,因为较大的非附接免疫调节化合物或第一部分的细胞通透性相对低。

[0282] 在一些方面,本公开提供了用于治疗纤维化的方法,其包括将如本文所述的免疫调节化合物或盐施用给有需要的受试者。在一些方面,本公开提供了用于治疗纤维化的方法,其包括将包含如本文所述的免疫调节化合物或盐的缀合物施用给有需要的受试者。

[0283] 本公开包括本文所述的免疫调节化合物的盐,特别是药学上可接受的盐。具有足够的酸性、足够的碱性或两个官能团的本公开的免疫调节化合物可以与多种无机碱以及无机和有机酸中的任一种反应以形成盐。或者,固有地带电荷的免疫调节化合物,诸如具有季氮的那些,可以与适当的抗衡离子形成盐,如卤化物,例如溴化物、氯化物或氟化物,特别是溴化物。

[0284] 在某些情况下,本文所述的免疫调节化合物可以以非对映异构体、对映异构体或其他立体异构形式存在。本文提出的免疫调节化合物包括所有非对映异构体、对映异构体和差向异构体形式及其适当的混合物。立体异构体的分离可通过色谱或通过形成非对映异构体并通过重结晶或色谱或其任何组合进行分离来进行。(Jean Jacques, Andre Collet,

Samuel H.Wilen, "Enantiomers, Racemates and Resolutions", John Wiley And Sons, Inc., 1981, 通过引用将本公开内容并入本文)。立体异构体也可以通过立体选择性合成获得。

[0285] 本文所述的方法和缀合物和组合物包括使用免疫调节化合物的无定形形式以及结晶形式(也称为多晶型物)。本文所述的免疫调节化合物可以呈药学上可接受的盐的形式。同样,具有相同活性类型的这些免疫调节化合物的活性代谢物也包括在本公开的范围。另外,本文所述的免疫调节化合物可以以非溶剂化形式以及含药学上可接受的溶剂诸如水、乙醇等的溶剂化形式存在。本文提出的免疫调节化合物的溶剂化形式也被认为是本文公开的。

[0286] 在某些实施方案中,免疫调节化合物或盐可以是前药,如其中母体化合物中的羟基以酯或碳酸酯的形式存在,或母体化合物中存在的羧酸以酯的形式存在。术语“前药”旨在涵盖在生理条件下被转化为本公开的药剂的化合物。用于制备前药的一种方法是包括一个或多个选定的部分,所述部分在生理条件下水解以显示所需的分子。在其他实施方案中,前药通过宿主动物的酶促活性转化,诸如宿主动物中的特定靶细胞。例如,酯或碳酸酯(如,醇或羧酸的酯或碳酸酯和磷酸的酯)是本公开的优选前药。

[0287] 本文所述化合物的前药形式,其中前药在体内被代谢以产生免疫调节化合物,被包括在权利要求的范围内。在某些情况下,本文所述的某些免疫调节化合物可以是另一种衍生物或活性化合物的前药。

[0288] 前药通常是有用的,因为在一些情况下,它们可能比母体药物更易于施用。例如,通过经口施用它们可能是生物可利用的,而母体则不是。相对于母体药物,前药可以帮助增强化合物的细胞渗透性。与母体药物相比,前药还可以在药物组合物中具有提高的溶解度。前药可以被设计为可逆的药物衍生物,用作修饰剂以增强药物向位点特异性组织的运输或增加药物在细胞内的滞留。

[0289] 在某些实施方案中,前药可以在细胞内的条件下如通过酶促或化学方式转化为母体化合物。在某些实施方案中,母体化合物包含如由前药水解产生的酸性部分,其可以在细胞内的条件下带电。在特定的实施方案中,一旦前药已经通过细胞膜进入细胞,就将其转化为母体化合物。在某些实施方案中,母体化合物相对于前药具有减弱的细胞膜渗透性性质,诸如亲脂性降低和亲水性增加。

[0290] 在特定的实施方案中,具有酸性部分的母体化合物与没有酸性部分的相同化合物相比在细胞内保留的时间更长。

[0291] 具有酸性部分的母体化合物可以相对于不含酸性部分的同一化合物保留在细胞内,即药物滞留持续10%或更久,诸如15%或更久、诸如20%或更久、诸如25%或更久、诸如30%或更久、诸如35%或更久、诸如40%或更久、诸如45%或更久、诸如50%或更久、诸如55%或更久、诸如60%或更久、诸如65%或更久、诸如70%或更久、诸如75%或更久、诸如80%或更久、诸如85%或更久、或甚至90%或更久。

[0292] 在一些实施方案中,前药的设计增加了药剂的亲脂性。在一些实施方案中,前药的设计增加了有效的水溶性。参见,如,Fedorak等人,Am.J.Physiol.,269:G210-218(1995); McLoed等人,Gastroenterol,106:405-413(1994); Hochhaus等人,Biomed.Chrom.,6:283-286(1992); J.Larsen和H.Bundgaard,Int.J.Pharmaceutics,37,87(1987); J.Larsen等人,

Int.J.Pharmaceutics,47,103(1988);Sinkula等人,J.Pharm.Sci.,64:181-210(1975); T.Higuchi和V.Stella,Pro-drugs as Novel Delivery Systems,Vol.14of the A.C.S.Symposium Series;和Edward B.Roche,Bioreversible Carriers in Drug Design,American Pharmaceutical Association and Pergamon Press,1987,均已将此类公开内容并入本文。根据另一个实施方案,本公开提供了产生上述化合物的方法。可以使用常规技术合成化合物。有利地,这些化合物方便地从容易获得的原料合成。

[0293] 可用于合成本文所述化合物的合成化学转化和方法学是本领域已知的,并且包括例如以下中所述的那些:R.Larock,Comprehensive Organic Transformations(1989); T.W.Greene和P.G.M.Wuts,Protective Groups in Organic Synthesis,第2版(1991); L.Fieser和M.Fieser,Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis(1994); 和L.Paquette,编辑,Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis(1995)。

[0294] 接头

[0295] 本文所述的免疫调节化合物和盐共价结合至接头,如可切割的或不可切割的接头。在某些实施方案中,该接头也与抗体共价结合,并被称为抗体缀合物或缀合物。本文所述的缀合物的接头可能不影响缀合物或抗体构建体的活性部分(如第一抗原结合结构域、Fc结构域、第二抗原结合结构域、抗体、免疫调节化合物、拮抗剂、激动剂等)结合至靶标,所述靶标可以是同源结合伴侣诸如抗原。缀合物可以包含多个接头。这些接头可以是相同的接头,或是不同的接头。本文所述的接头可以是连接两个小分子结合部分并将连接的小分子连接至抗体的多功能接头。

[0296] 接头可以是短的、柔性的、刚性的、可切割的、不可切割的、亲水的或疏水的。接头可以含有具有不同特性的片段,诸如柔性片段或刚性片段。接头对于细胞外环境可以是化学稳定的,例如在血流中化学稳定的,或者可以包含不稳定的键联。接头可以包含被设计成特异性地或非特异性地在细胞内切割和/或牺牲或以其他方式分解的键联。可切割接头可对酶敏感。可切割接头可以被诸如蛋白酶的酶切割。可切割接头可以含有缬氨酸-瓜氨酸肽或缬氨酸-丙氨酸肽。含有缬氨酸-瓜氨酸或缬氨酸-丙氨酸的接头可以含有五氟苯基基团。含有缬氨酸-瓜氨酸或缬氨酸-丙氨酸的接头可以含有琥珀酰亚胺基团。含有缬氨酸-瓜氨酸或缬氨酸-丙氨酸的接头可以含有对氨基苯甲酸(PABA)基团。含有缬氨酸-瓜氨酸、缬氨酸-丙氨酸(VA)或甘氨酸-甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸(GGFG)四肽的接头可以含有PABA基团和五氟苯基基团。基于肽的接头可以含有PABA基团和琥珀酰亚胺基团。

[0297] 不可切割接头可以是蛋白酶不敏感的。不可切割接头可以是马来酰亚氨基己酰基接头。马来酰亚氨基己酰基接头可包含N-马来酰亚氨基甲基环己烷-1-羧酸酯。马来酰亚氨基己酰基接头可含有琥珀酰亚胺基团。接头可以是马来酰亚氨基己酰基基团和一个或多个聚乙二醇分子的组合。接头可以是马来酰亚胺-PEG4接头。接头可以是含有琥珀酰亚胺基的马来酰亚氨基己酰基接头和一个或多个聚乙二醇分子的组合。接头可以含有与聚乙二醇分子连接的马来酰亚胺,其中聚乙二醇可以使接头具有更大的柔性或可以使用马来酰亚氨基。

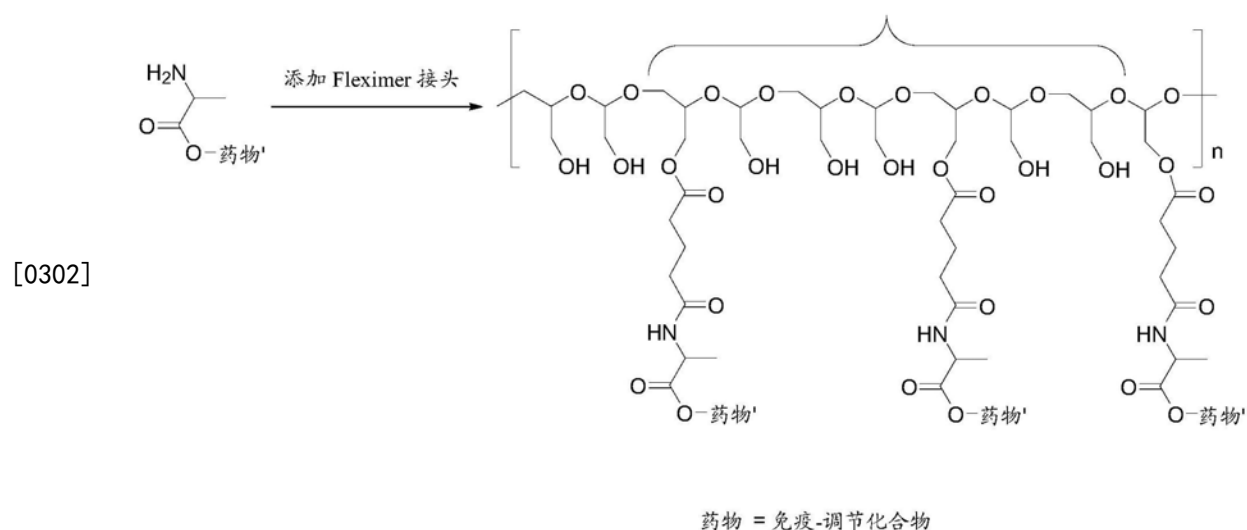
[0298] 接头还可以含有一个或多个亚烷基、亚烯基、亚炔基、聚醚、聚酯或聚酰胺基团和/或含有聚氨基酸、多肽、可切割肽或氨基苄基氨基甲酸酯。接头可以在一端含有马来酰亚胺,并且可以在另一端含有N-羟基琥珀酰亚胺基酯。接头可以含有其N端胺被乙酰化的赖氨酸。

酸和缬氨酸-瓜氨酸切割位点。接头可以由微生物转谷氨酰胺酶产生的连接,其中该连接可以在含胺的部分与经工程化以含有谷氨酰胺的部分之间产生,这是由于该酶催化了谷氨酰胺侧链的酰基基团和赖氨酸链的伯胺之间的键形成。接头可以含有反应性伯胺。接头可以是分选酶A接头。可以通过将LPXTG (SEQ ID NO:492) 识别基序与N-末端GGG基序融合以再生天然的酰胺键的分选酶A酶来产生分选酶A接头。因此,产生的接头可以将附接至LPXTG识别基序的部分与附接至N端GGG基序的部分连接。

[0299] 在本文所述的缀合物中,免疫调节化合物或盐通过接头连接至抗体构建体。将化合物或盐连接至缀合物的抗体的接头可以是短的、长的、疏水的、亲水的、柔性的或刚性的,或者可以由各自独立地具有一种或多种上述特性的区段组成,使得接头可包括具有不同特性的区段。接头可以是多价的,使得它们将多于一种的化合物或盐共价连接至抗体上的单个位点,或可以是单价的,使得它们共价连接单一的化合物或盐至抗体上的单个位点。

[0300] 如本领域技术人员将理解的,接头可通过接头与抗体构建体和化合物之间的共价键将免疫调节化合物连接至抗体。如本文所用,表述“接头”旨在包括(i)接头的未缀合形式,其包括能够将接头共价连接至免疫调节化合物的官能团和能够共价连接接头至抗体的官能团;(ii)接头的部分缀合形式,其包括能够将接头共价连接至抗体构建体并共价连接至免疫调节化合物的官能团,反之亦然;和(iii)接头的完全缀合形式,其共价连接至免疫调节化合物和抗体构建体。一个实施方案涉及通过在其中接头-免疫调节化合物共价连接至抗体的条件下使与肿瘤细胞上表达的细胞表面受体或肿瘤相关抗原结合的抗体与本文所述的接头或接头-免疫调节化合物接触而形成的缀合物。一个实施方案涉及制备通过在其中接头或接头-免疫调节化合物共价连接至抗体的条件下使本文所述的接头或接头-免疫调节化合物接触而形成的缀合物的方法。

[0301] 描述了可用于将许多免疫调节化合物连接至抗体构建体(如抗体)的示例性多价接头。例如, **Fleximer®** 接头技术有潜力使高DAR ADC具有良好的物理化学性质。如下所示, **Fleximer®** 接头技术基于经由一系列酯键将药物分子掺入可溶解的聚缩醛骨架中。该方法产生高负载的缀合物(DAR高达20),同时保持良好的物理化学性质。



[0303] 为了利用上述方案中描述的 **Fleximer®** 接头技术,可以存在脂肪醇或将脂肪醇引入免疫调节化合物中。然后将醇部分缀合至丙氨酸部分,然后将其合成性地掺入

**Fleximer®**接头中。ADC的脂质体加工在体外释放了母体含醇药物。

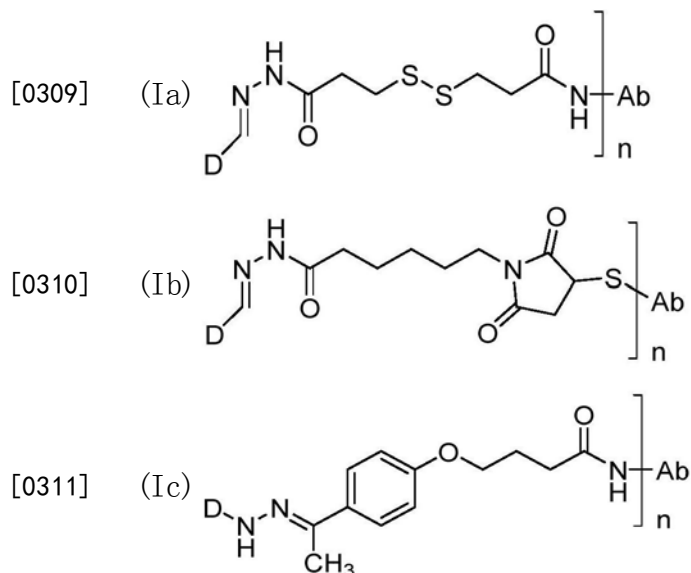
[0304] 通过举例而非限制,以下描述了可包括在本文所述的缀合物中的一些可切割和不可切割接头。

[0305] 可切割接头可以在体外和体内被切割。可切割接头可以包括化学或酶促不稳定或可降解的键联。可切割接头可以依靠细胞内的过程来释放免疫调节化合物,诸如在细胞质中还原、暴露于溶酶体的酸性条件或被细胞内特定的蛋白酶或其他酶切割。可切割接头可以掺入化学或酶促可切割的一个或多个化学键,而接头的其余部分则是不可切割的。

[0306] 接头可含有化学不稳定的基团诸如脰和/或二硫化物基团。包含化学不稳定基团的接头可以利用血浆和某些细胞质区室之间的差异性质。可以促进含脰接头的免疫调节化合物释放的细胞内条件可以是内体和溶酶体的酸性环境,而含二硫化物的接头可以在含有高硫醇浓度如谷胱甘肽的胞质溶胶中还原。通过使用化学不稳定基团附近的取代基引入空间位阻,可以提高含有化学不稳定基团的接头的血浆稳定性。

[0307] 酸不稳定基团诸如脰在血液中性pH环境 (pH 7.3-7.5) 中在全身循环期间可以保持完整,并且可以经历水解,并且一旦抗体构建体免疫调节化合物缀合物被内化到细胞的弱酸性内体 (pH 5.0-6.5) 和溶酶体 (pH 4.5-5.0) 区室中就可以释放免疫调节化合物。这种pH依赖性释放机制可能与药物的非特异性释放有关。为了增加接头的脰基团的稳定性,可以通过化学修饰如取代来改变接头,从而允许调节以在溶酶体中实现更有效的释放,同时使循环损失最小。

[0308] 含脰接头可以含有另外的切割位点,诸如另外的酸不稳定切割位点和/或酶促不稳定切割位点。包含示例性含脰接头的抗体构建体免疫调节化合物缀合物可以包括例如以下结构:



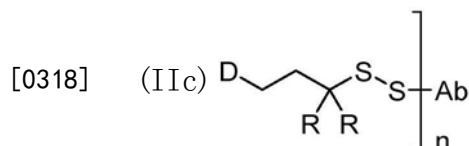
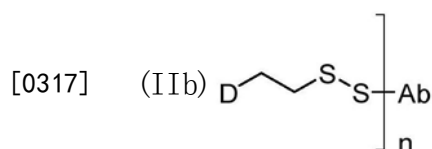
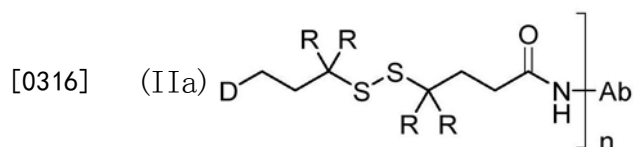
[0312] 其中分别地D是免疫调节化合物,并且Ab是抗体构建体,并且n表示结合至与抗体构建体结合的接头(LP)结合的-化合物的数目。在某些接头(诸如接头(Ia))中,该接头可包含两个可切割基团-二硫键和脰部分。对于此类接头,有效释放未修饰的游离免疫调节化合物可需要酸性pH或二硫化物还原和酸性pH。接头诸如(Ib)和(Ic)可以在单个脰切割位点的情况下有效。



[0313] 可以包含在接头中的其他酸不稳定基团包括含顺式-乌头酰基的接头。顺式-乌头酰基化学可使用与酰胺键并列的羧酸,以在酸性条件下加速酰胺水解。

[0314] 可切割接头也可包含二硫化物基团。二硫化物在生理pH下可以保持热力学稳定,并且可以被设计成在细胞内部被内化后释放免疫调节化合物,其中胞质溶胶与细胞外环境相比可以提供显著更还原的环境。切断二硫化物键可能需要存在胞质硫醇辅因子诸如(还原的)谷胱甘肽(GSH),使得含二硫化物的接头可以在循环中相当稳定,从而选择性地免疫调节化合物释放到细胞质中。细胞内酶蛋白二硫化物异构酶,或能够切割二硫化物键的类似酶,也可有助于细胞内二硫化物键的优先切割。GSH可以浓度范围为0.5-10mM存在于细胞中,而循环中大约为5μM的显著更低的GSH或半胱氨酸(最丰富的低分子量硫醇)浓度。其中血液不规则流动可导致缺氧状态的肿瘤细胞,可导致还原酶活性增强,并因此谷胱甘肽浓度甚至更高。含二硫化物的接头的体内稳定性可以通过接头的化学修饰,如使用与二硫化物键相邻的空间位阻来增强。

[0315] 包含示例性的含二硫化物的接头的抗体缀合物可以包括以下结构:



[0319] 其中分别地是免疫调节化合物,并且Ab是抗体构建体,n表示结合至与抗体构建体结合的接头(LP)结合的化合物的数目并且R在每次出现时独立地选自例如氢或烷基。增加与二硫化物键相邻的空间位阻可增加接头的稳定性

[0320] 可以使用的另一类接头是被酶特异性切割的接头。例如,接头可以被溶酶体酶切割。此类接头可以是基于肽的,或者可以包括可以充当酶的底物的肽区域。与化学不稳定接头相比,肽基接头可在血浆和细胞外环境中更稳定。

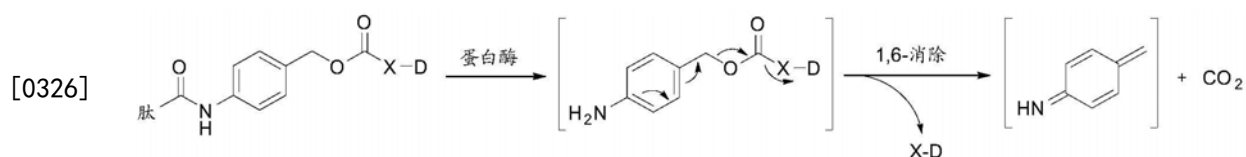
[0321] 肽键可以具有良好的血清稳定性,因为与溶酶体相比,溶酶体蛋白水解酶由于内源性抑制剂并且血液的pH值不利地较高而在血液中可能具有非常低的活性。由于溶酶体蛋白酶(如组织蛋白酶和纤溶酶)的作用,可能发生从抗体构建体释放免疫调节化合物。这些蛋白酶可以在某些肿瘤组织中以升高的水平存在。接头可以被溶酶体酶切割。溶酶体酶可以是例如组织蛋白酶B、β-葡萄糖醛酸酶或β-半乳糖苷酶。

[0322] 可切割肽可选自四肽,诸如Gly-Phe-Leu-Gly、Ala-Leu-Ala-Leu、Gly-Gly-Phe-Gly,或二肽诸如Val-Cit、Val-Ala和Phe-Lys。与更长的肽相比,二肽可以具有较低的疏水性。

[0323] 多种二肽基可切割接头可用于本文所述的抗体构建体免疫调节化合物缀合物中。

[0324] 酶促可切割接头可包含自消耗间隔子, 以将免疫调节化合物与酶促切割位点在空间上分开。免疫调节化合物直接附接至肽接头的可导致免疫调节化合物的氨基酸加合物发生蛋白水解释放, 从而削弱其活性。自消耗间隔子的使用可以允许消除酰胺键水解后完全活性的、化学未修饰的免疫调节化合物。

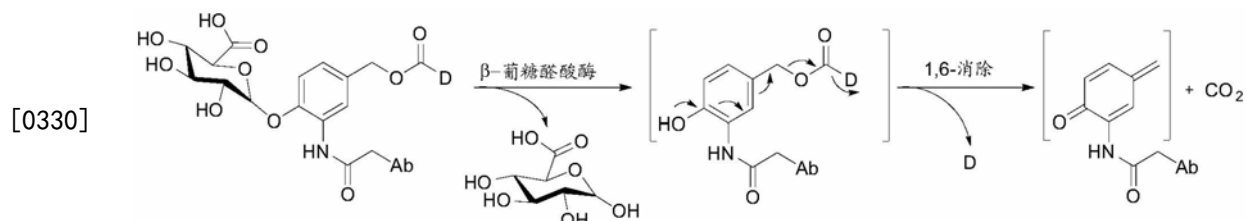
[0325] 一个自消耗间隔子可以是双官能对氨基苄基醇基团, 其可以通过氨基基团与肽连接, 从而形成酰胺键, 而含胺的免疫调节化合物可以通过氨基甲酸酯官能团附接至接头的苄基羟基基团 (以产生对酰氨基苄基氨基甲酸酯, PABC)。所得的原-免疫调节化合物可以在蛋白酶介导的切割后被激活, 从而导致1,6-消除反应, 释放出未修饰的免疫调节化合物、二氧化碳和接头基团的剩余部分。以下方案描绘了氨基甲酸对氨基苄酯的片段化和免疫调节化合物的释放:



[0327] 其中X-D表示未经修饰的免疫调节化合物。

[0328] 该自消耗基团的杂环变体也已被描述。

[0329] 酶促可切割接头可以是β-葡糖醛酸-基接头。通过溶酶体酶β-葡糖醛酸酶切割β-葡糖苷酸糖苷键可以实现免疫调节化合物的轻松释放。这种酶可以大量存在于溶酶体中, 并可在某些肿瘤类型中过表达, 而细胞外的酶活性可能较低。β-葡糖醛酸-基接头可用于避免抗体构建体免疫调节化合物缀合物发生由于β-葡糖苷酸的亲水性导致的聚集的趋势。在某些实施方案中, β-葡糖醛酸-基接头可以将抗体构建体连接至疏水性免疫调节化合物。以下方案描绘了从含有β-葡糖醛酸-基接头的抗体构建体 (Ab) 免疫调节化合物缀合物释放免疫调节化合物 (D) :



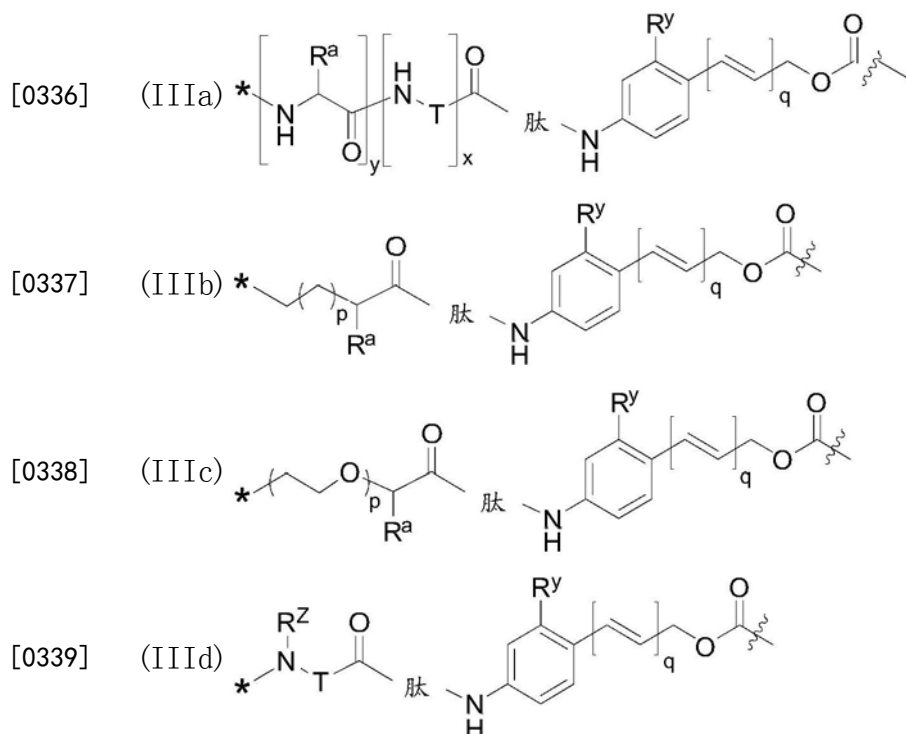
[0331] 已经描述了用于将药物诸如瑞奥西汀、喜树碱和多柔比星类似物、CBI小沟结合剂和普赛博林与抗体连接的多种可切割β-葡糖醛酸-基接头。这些β-葡糖醛酸-基接头可用于本文所述的缀合物中。在某些实施方案中, 酶促可切割接头是β-半乳糖苷-基接头。β-半乳糖苷大量存在于溶酶体内, 而细胞外的酶活性较低。

[0332] 另外, 含有酚基基团的化合物可以通过酚氧共价键合至接头。一种此类接头依赖于其中将二氨基-乙烷“Space Link”与传统的“PABO”-基自消耗基团结合使用以递送苯酚的方法。

[0333] 可切割接头可包含不可切割部分或区段, 和/或可切割区段或部分可被包含在以其他方式不可切割的接头中以使其可切割。仅作为实例, 聚乙二醇 (PEG) 和相关的聚合物可以在聚合物主链中包含可切割基团。例如, 聚乙二醇或聚合物接头可以包含一种或多种可切割基团, 例如二硫化物、脘或二肽。

[0334] 接头中可包含的其他可降解的键联可以包括通过PEG羧酸或激活的PEG羧酸与免疫调节化合物上的醇基团反应而形成的酯键联,其中此类酯基团可以在生理条件下水解以释放免疫调节化合物。可水解降解的键联可以包括但不限于碳酸根键联;由胺和醛反应产生的亚胺键联;通过使醇与磷酸根基团反应形成的磷酸酯键联;作为醛和醇的反应产物的缩醛键联;作为甲酸酯和醇的反应产物的原酸酯键联;以及由亚磷酰胺基团形成的寡核苷酸键联,包括但不限于,在聚合物的末端处和寡核苷酸的5'羟基基团处。

[0335] 接头可含有酶促可切割肽部分,例如包含结构式(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)或(IIId)的接头:

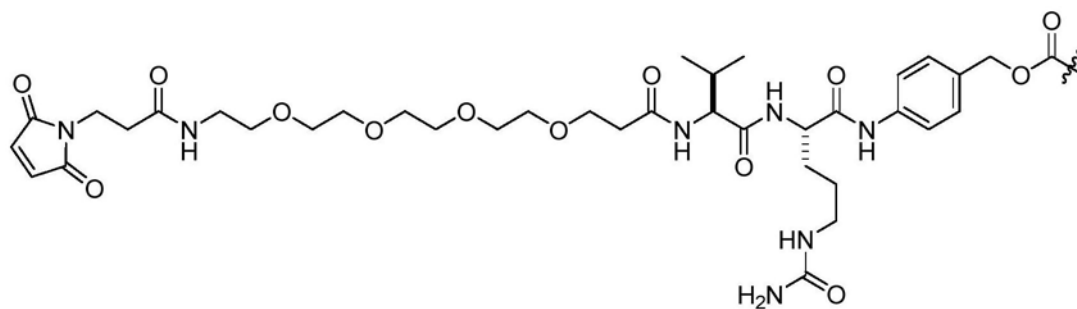


[0340] 或其盐,其中:肽表示可被溶酶体酶切割的肽(图示为N→C,其中肽包含氨基和羧基“末端”);T表示包含一个或多个乙二醇单元或亚烷基链或其组合的聚合物; $R^a$ 选自氢、烷基、磺酸酯和磺酸甲酯; $R^y$ 是氢或 $C_{1-4}$ 烷基-(O) $_r$ -( $C_{1-4}$ 亚烷基) $_s$ - $G^1$ 或 $C_{1-4}$ 烷基-(N)-[( $C_{1-4}$ 亚烷基)- $G^1$ ] $_2$ ;  $R^z$ 是 $C_{1-4}$ 烷基-(O) $_r$ -( $C_{1-4}$ 亚烷基) $_s$ - $G^2$ ;  $G^1$ 是 $SO_3H$ 、 $CO_2H$ 、PEG 4-32或糖部分;  $G^2$ 是 $SO_3H$ 、 $CO_2H$ 或PEG 4-32部分; $r$ 是0或1; $s$ 是0或1; $p$ 是0至5范围的整数; $q$ 是0或1; $x$ 是0或1; $y$ 是0或1; 表示接头与免疫调节化合物或其盐的附接点;并且\*表示与接头剩余部分的附接点。

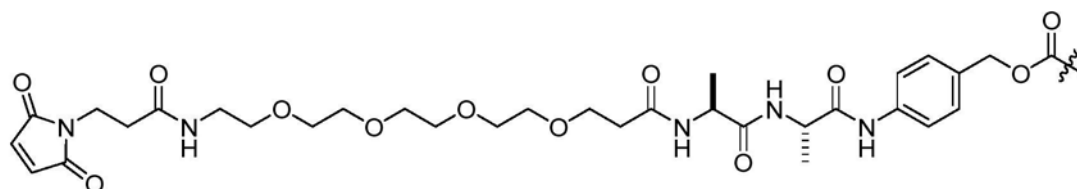
[0341] 在某些实施方案中,肽可选自三肽或二肽。在特定的实施方案中,二肽可选自: Val-Cit; Cit-Val; Ala-Ala; Ala-Cit; Cit-Ala; Asn-Cit; Cit-Asn; Cit-Cit; Val-Glu; Glu-Val; Ser-Cit; Cit-Ser; Lys-Cit; Cit-Lys; Asp-Cit; Cit-Asp; Ala-Val; Val-Ala; Phe-Lys; Lys-Phe; Val-Lys; Lys-Val; Ala-Lys; Lys-Ala; Phe-Cit; Cit-Phe; Leu-Cit; Cit-Leu; Ile-Cit; Cit-Ile; Phe-Arg; Arg-Phe; Cit-Trp; 和 Trp-Cit 或其盐。

[0342] 可包含在本文所述的缀合物中的根据结构式(IIIa)的接头的示例性实施方案可包括以下所示的接头(如所示,接头包含适用于将接头共价连接至抗体构建体的基团):

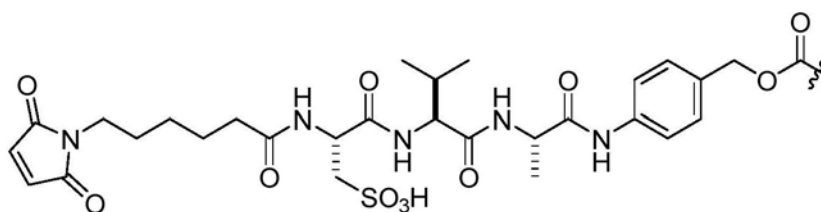
[0343] (IIIa.1)



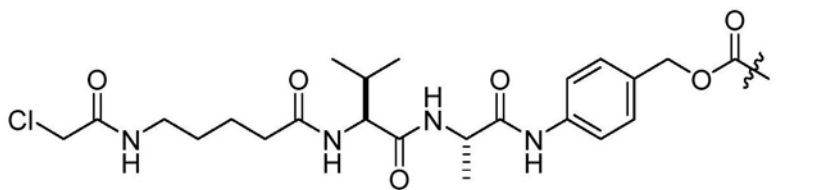
[0344] (IIIa.2)



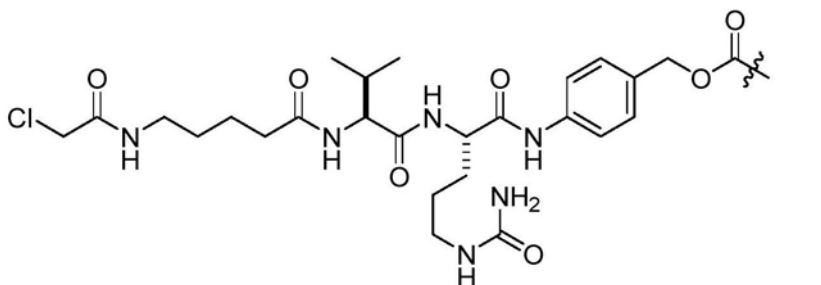
[0345] (IIIa.3)



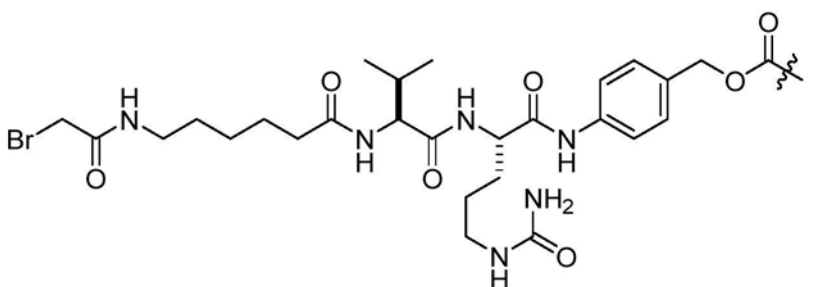
[0346] (IIIa.4)



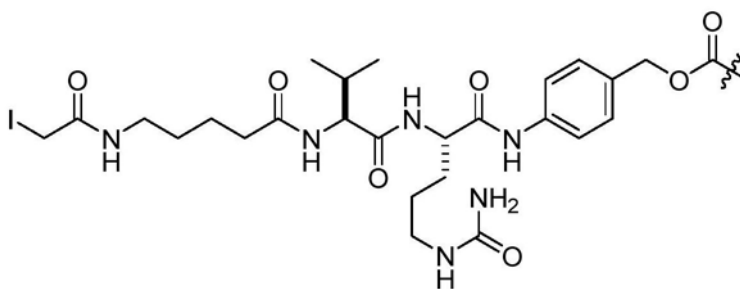
[0347] (IIIa.5)



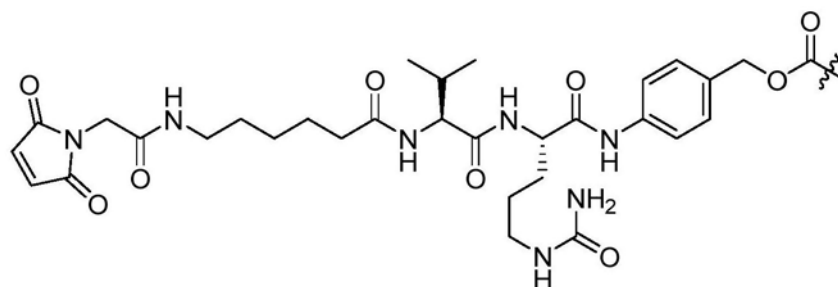
[0348] (IIIa.6)




[0349] (IIIa.7)



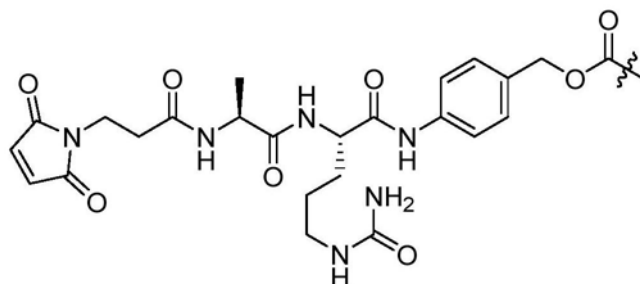
[0350] (IIIa.8)



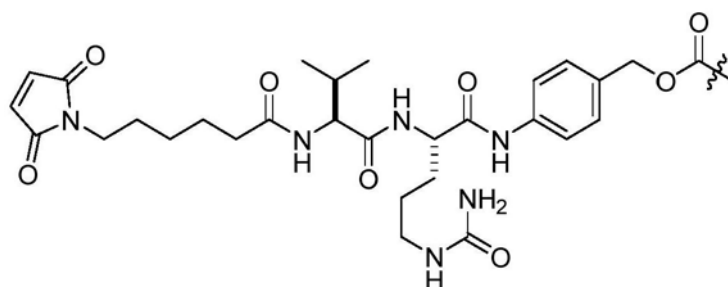
[0351] 其中  表示接头与免疫调节化合物或其盐的附接点。

[0352] 可包含在本文所述的缀合物中的根据结构式 (IIIb)、(IIIc) 或 (IIId) 的接头的示例性实施方案可包括以下所示的接头 (如所示, 接头可包含适用于将接头共价连接至抗体构建体的基团):

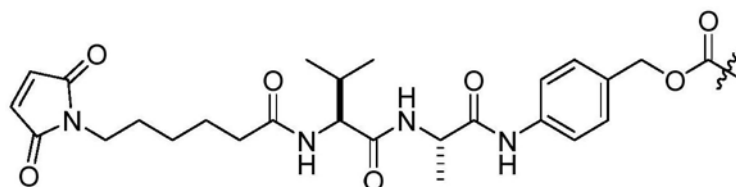
[0353] (IIIb.1)



[0354] (IIIb.2)

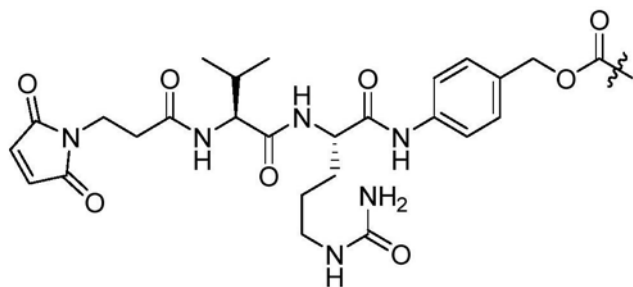


[0355] (IIIb.3)



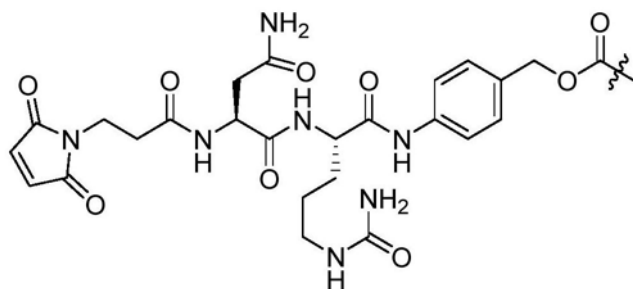
[0356]

(IIIb.4)



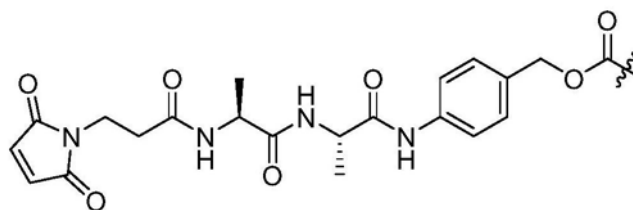
[0357]

(IIIb.5)



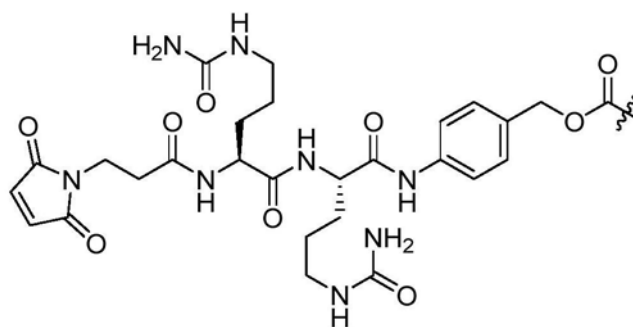
[0358]

(IIIb.6)



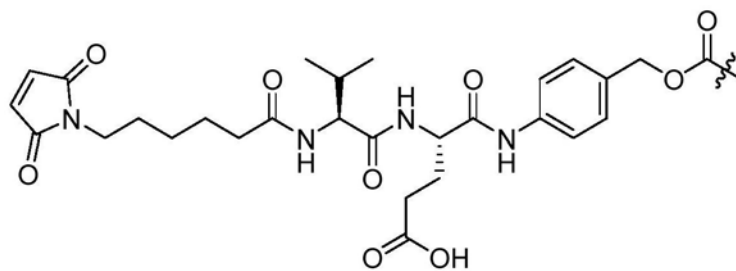
[0359]

(IIIb.7)



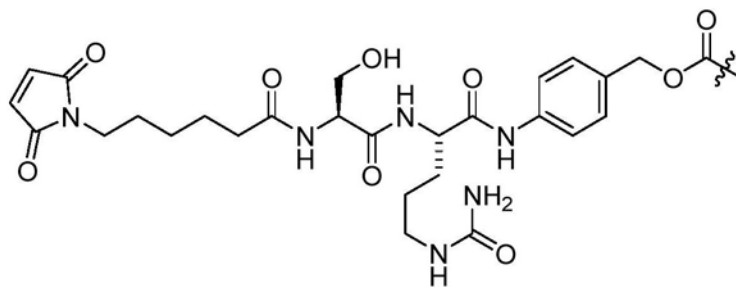
[0360]

(IIIb.8)

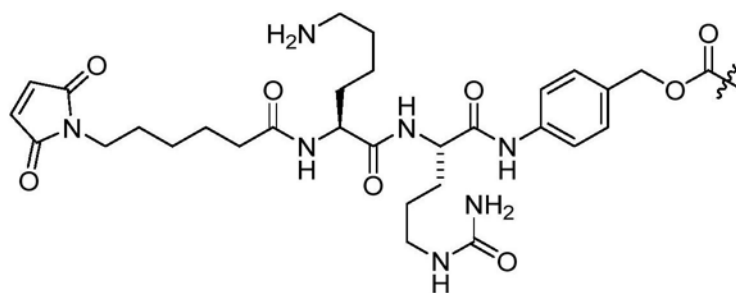


[0361]

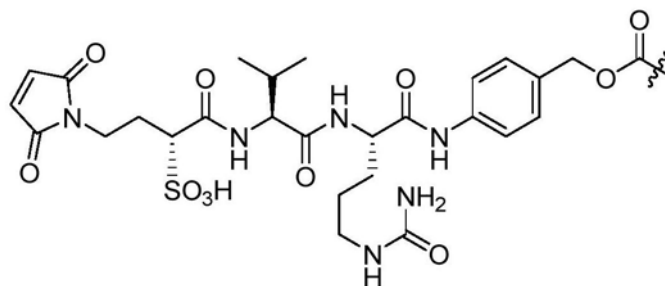
(IIIb.9)



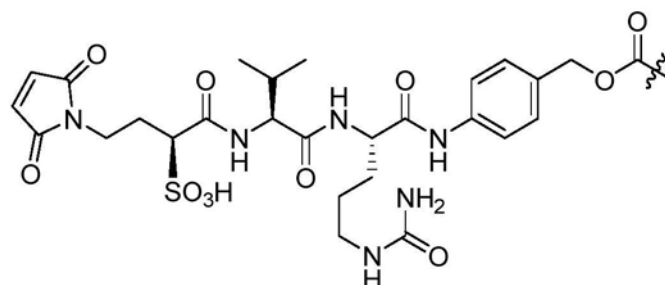
[0362] (IIIb.10)



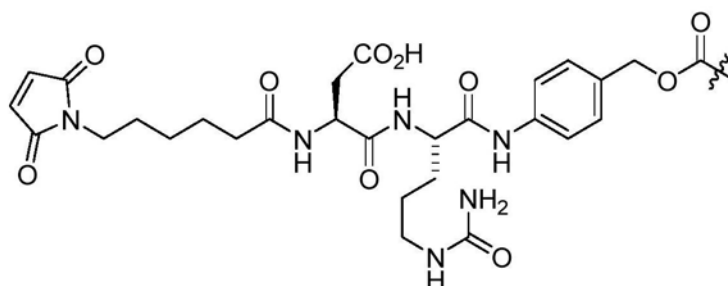
[0363] (IIIb.11)



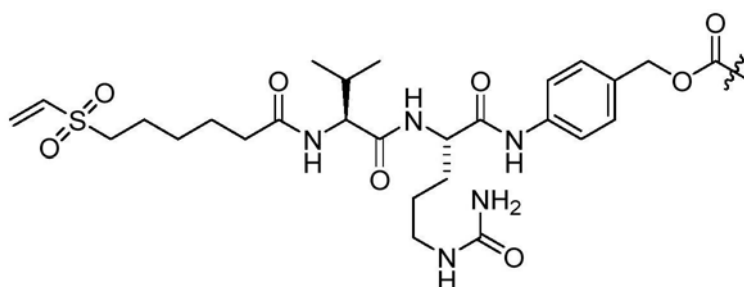
[0364] (IIIb.12)



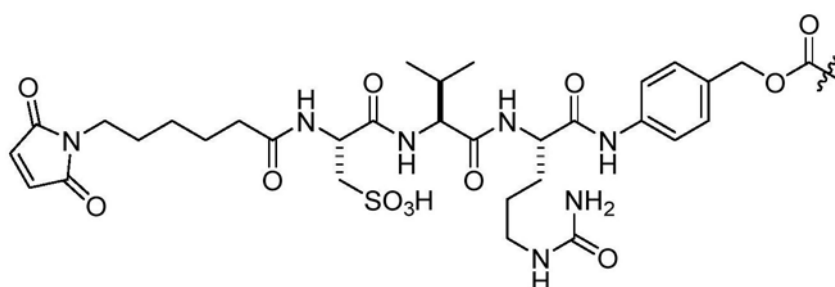
[0365] (IIIb.13)



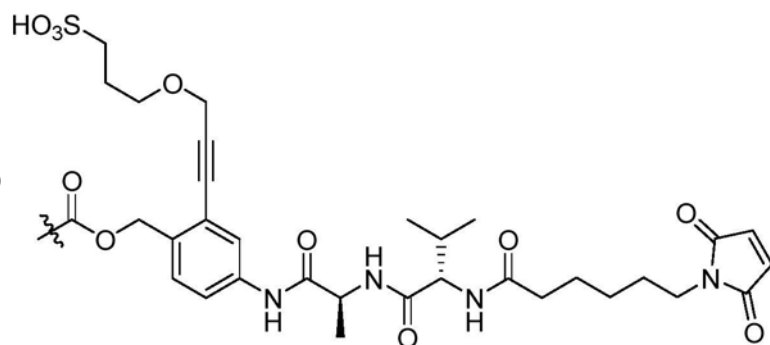
[0366] (IIIb.14)



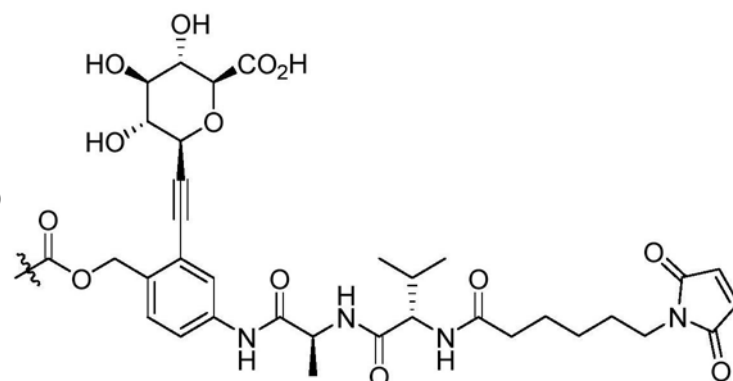
[0367] (IIIb.15)



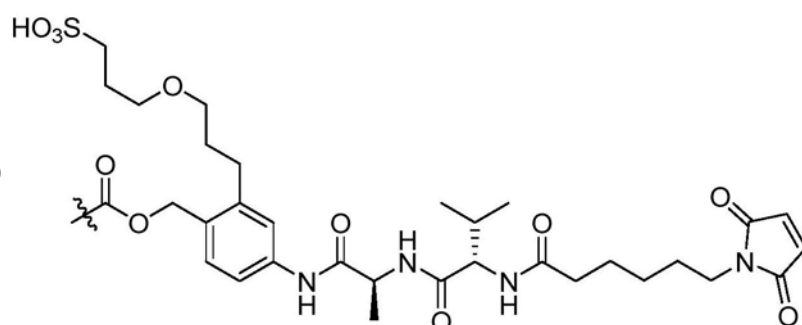
[0368] (IIIb.16)



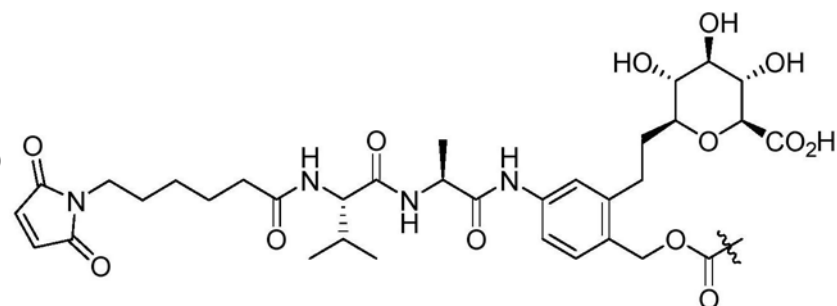
[0369] (IIIb.17)



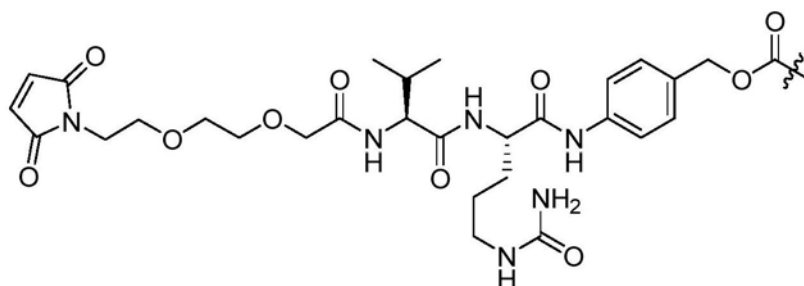
[0370] (IIIb.18)



[0371] (IIIb.19)

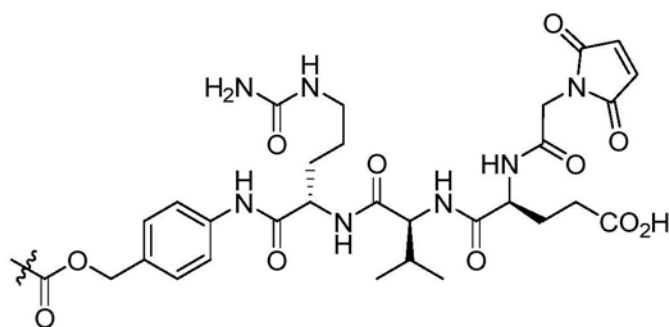


[0372] (IIIc.1)

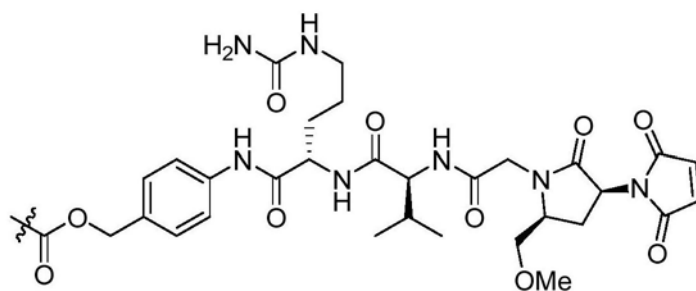




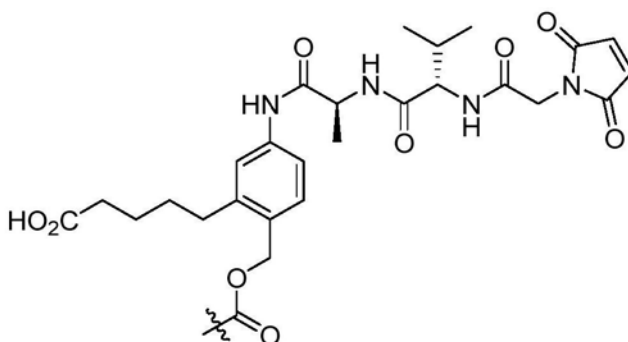
[0373] (IIIc.2)



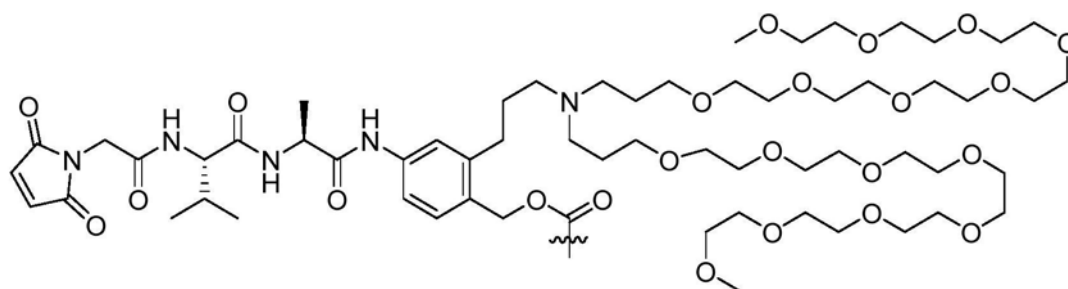
[0374] (IIIc.3)



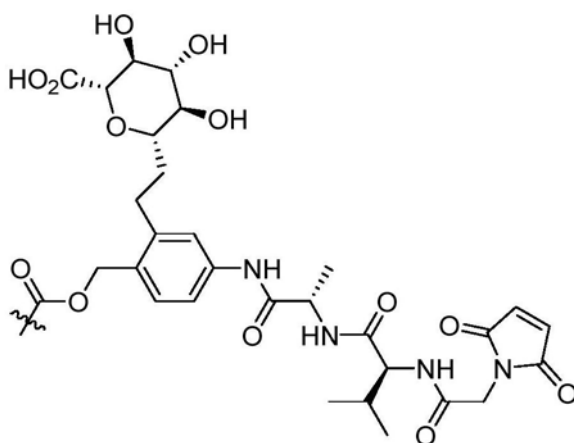
[0375] (IIIc.4)



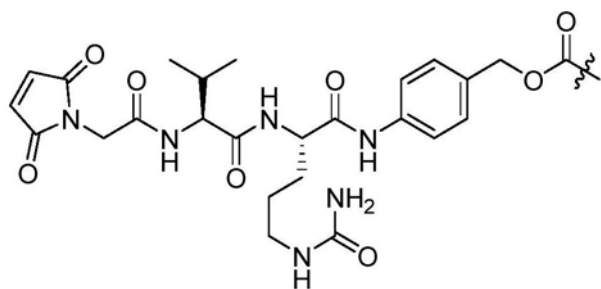
[0376] (IIIc.5)



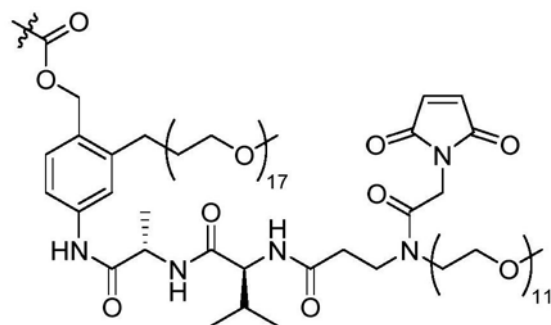
[0377] (IIIc.6)



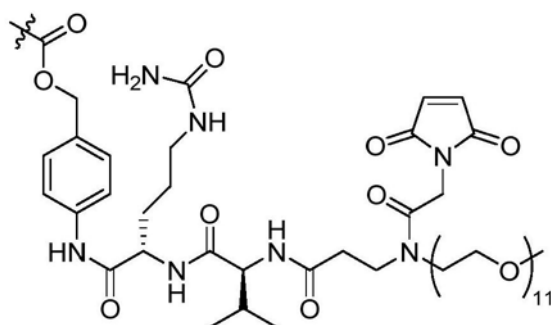
[0378] (IIIc.7)



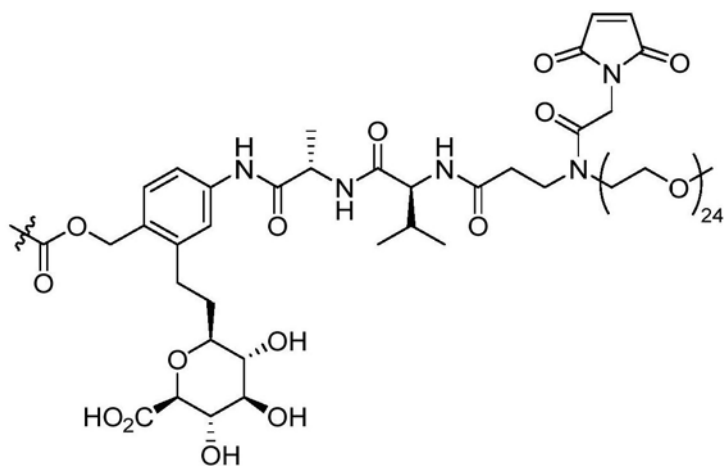
[0379] (IIIId.1)



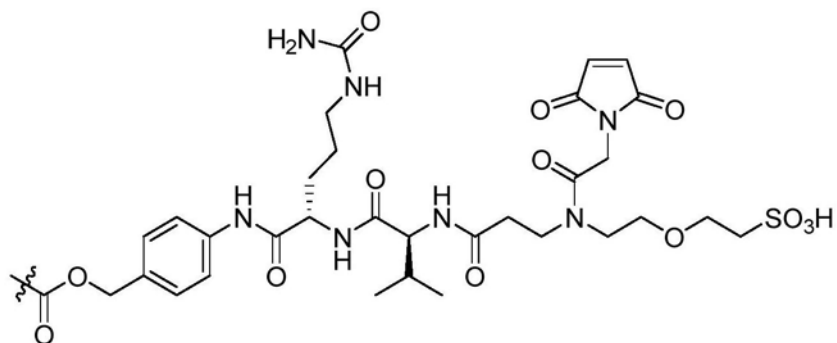
[0380] (IIIId.2)




[0381] (IIIc,3)

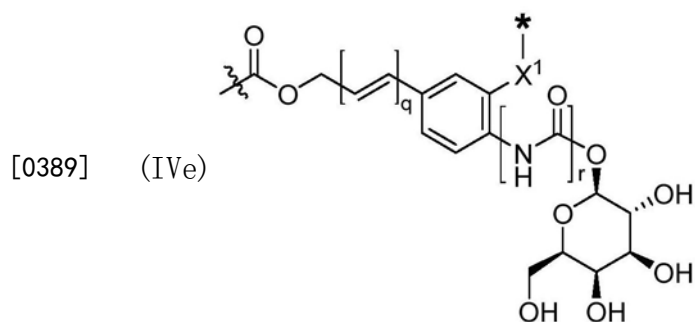
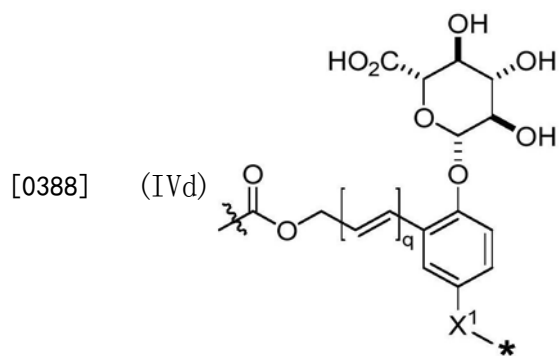
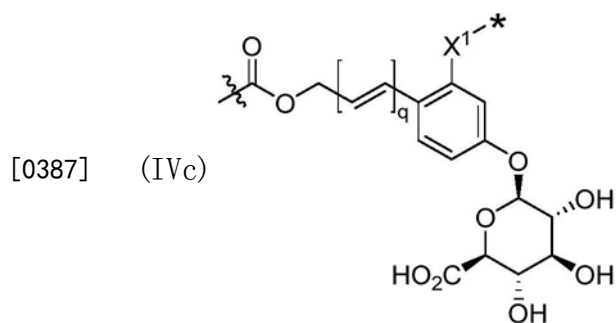
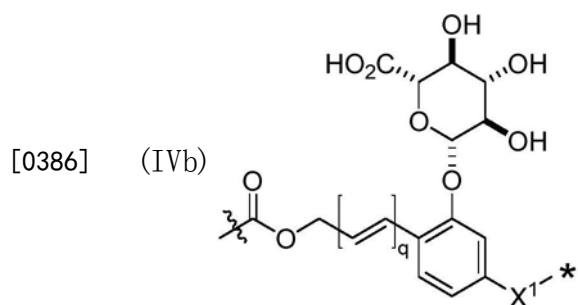
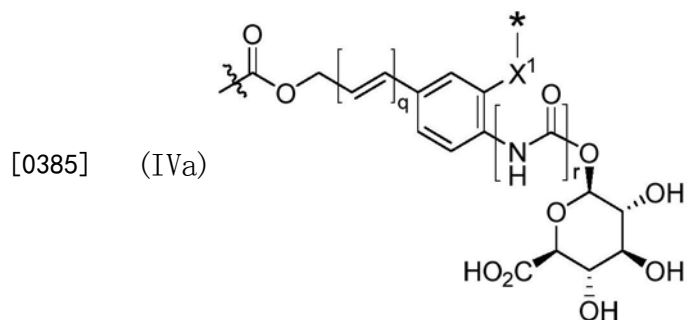



[0382] (IIIId.4)



[0383] 其中  表示接头与免疫调节化合物或其盐的附接点。

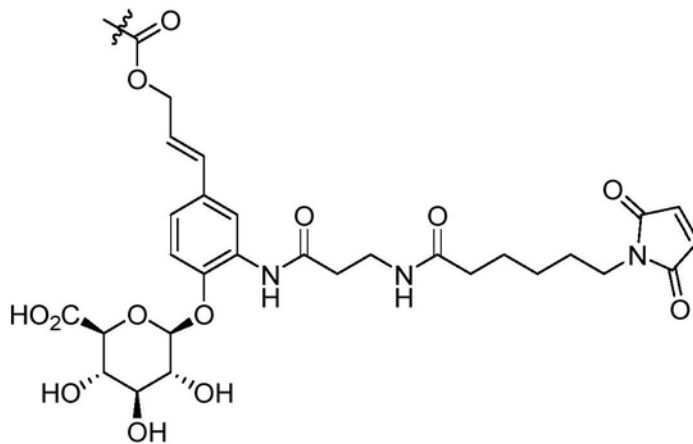
[0384] 接头可含有酶促可切割糖部分,例如包含结构式 (IVa)、(IVb)、(IVc)、(IVd) 或 (IVe) 的接头:



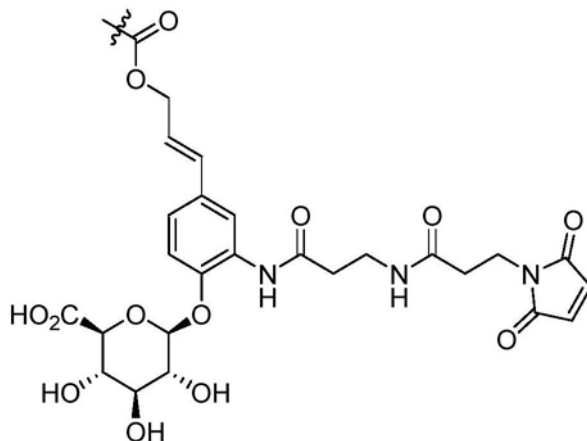
[0390] 或其盐,其中: $q$ 是0或1; $r$ 是0或1; $X^1$ 是 $CH_2$ 、O或NH;  表示接头与免疫调节化合物或其盐的附接点;并且\*表示至接头的剩余部分的附接点。

[0391] 可包含在本文所述的抗体构建体免疫调节化合物缀合物中的根据结构式(IVa)的接头的示例性实施方案可包括以下所示的接头(如所示,接头包含适用于将接头共价连接至抗体构建体的基团):

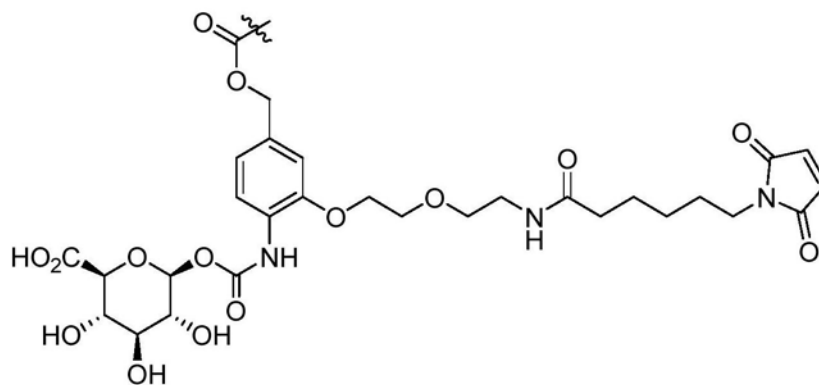
[0392] (IVa.1)



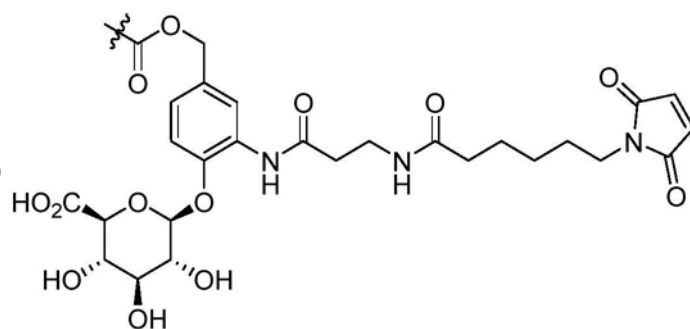
[0393] (IVa.2)



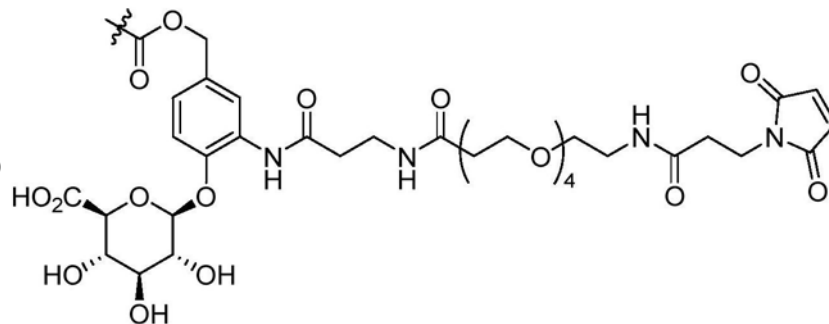
[0394] (IVa.3)



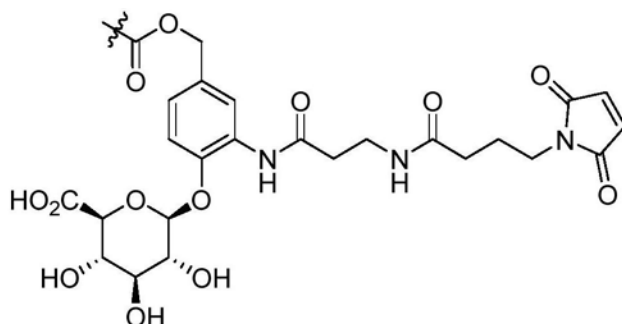
[0395] (IVa.4)



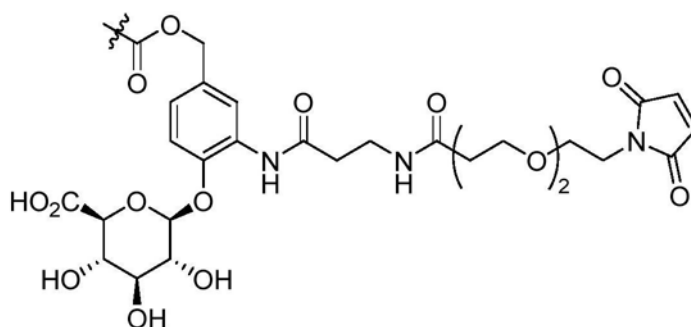
[0396] (IVa.5)



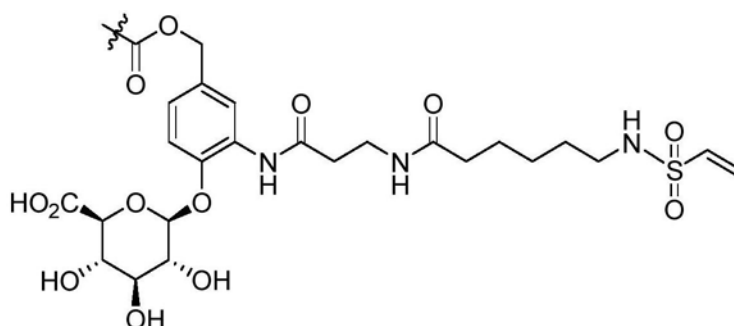
[0397] (IIIa.6)



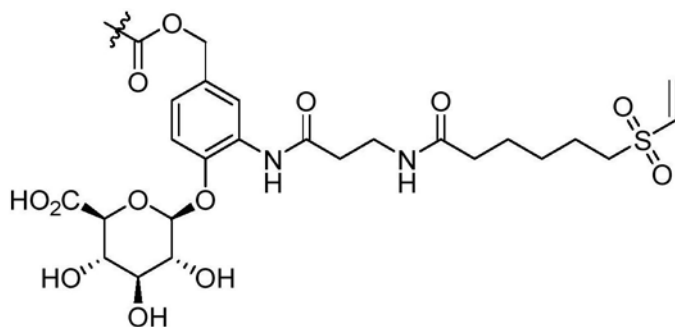
[0398] (IIIa.7)



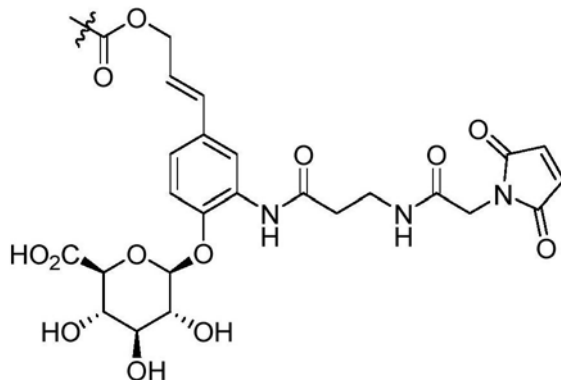
[0399] (IIIa.8)



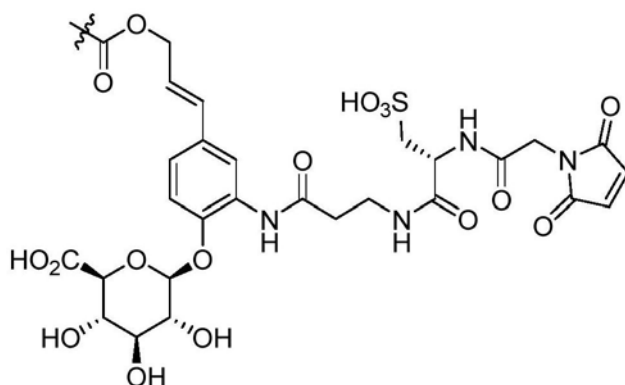
[0400] (IVa.9)



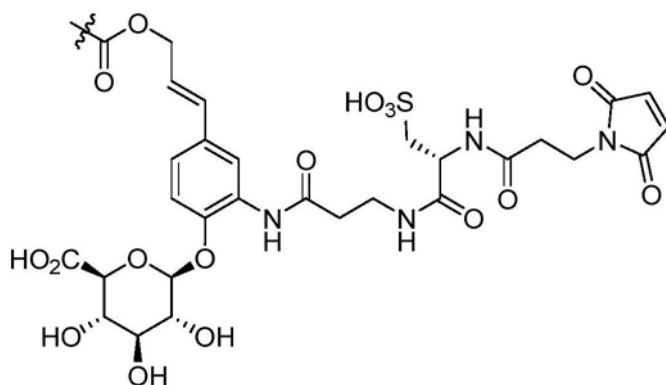
[0401] (IVa.10)




[0402] (IVa.11)

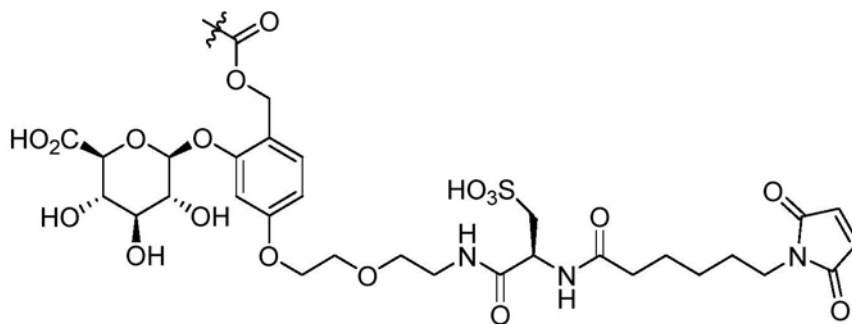
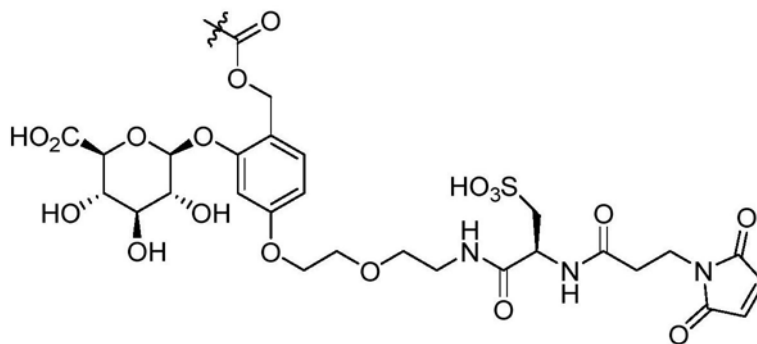
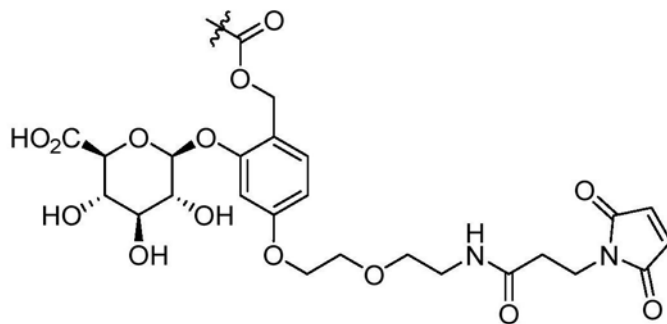
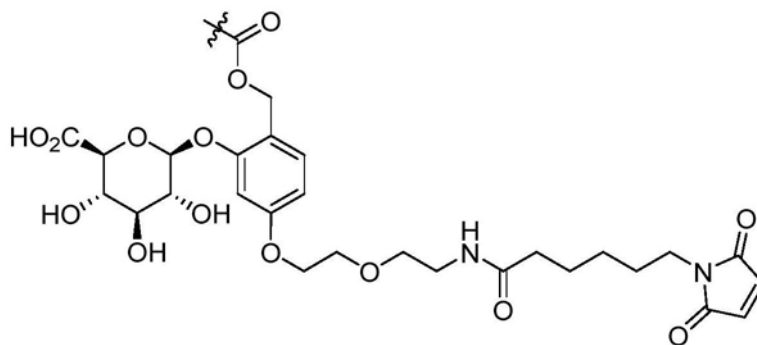
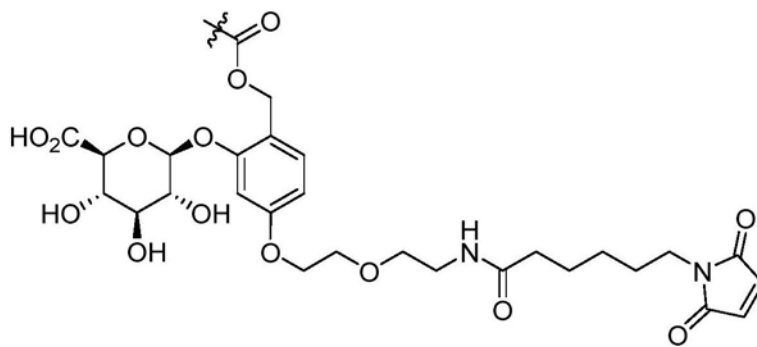


[0403] (IVa.12)

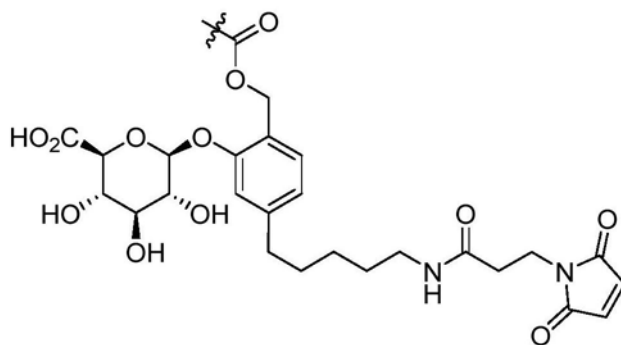


[0404] 其中  表示接头与免疫调节化合物或其盐的附接点。

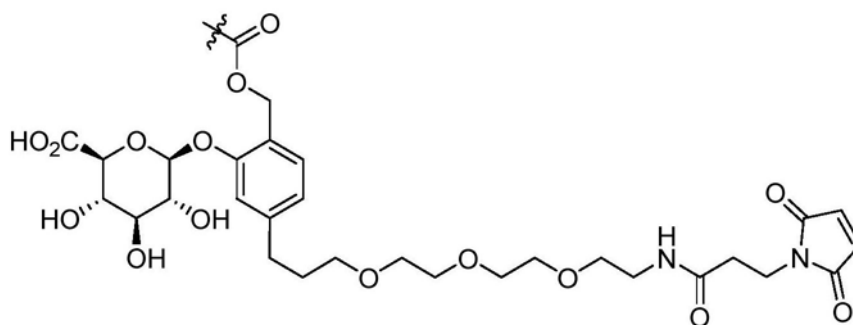
[0405] 可包含在本文所述的缀合物中的根据结构式 (IVb) 的接头的示例性实施方案包括以下所示的接头(如所示,接头包含适用于将接头共价连接至抗体构建体的基团):



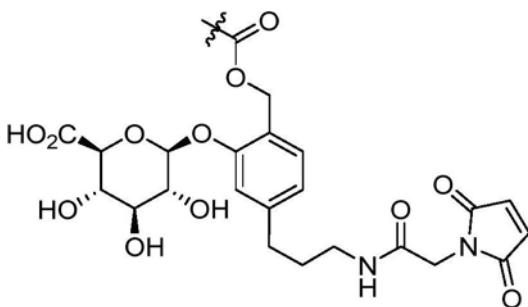
[0411] (IVb.5)



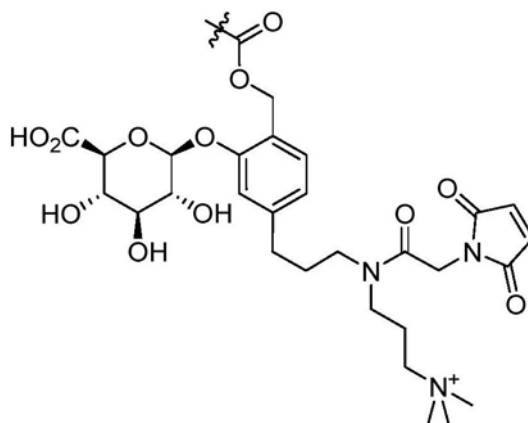
[0412] (IVb.6)



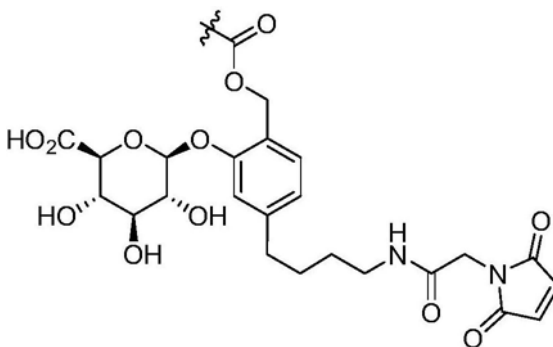
[0413] (IVb.7)



[0414] (IVb.8)

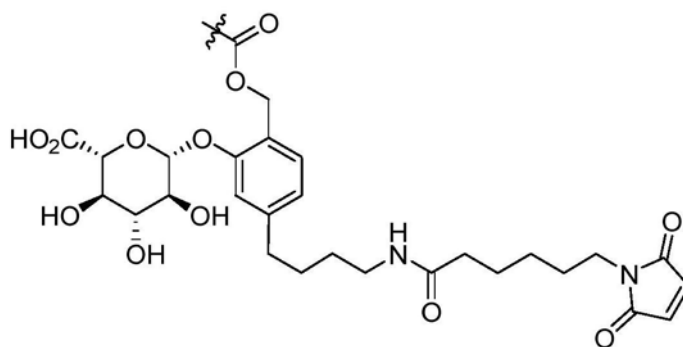



[0415] (IVb.9)





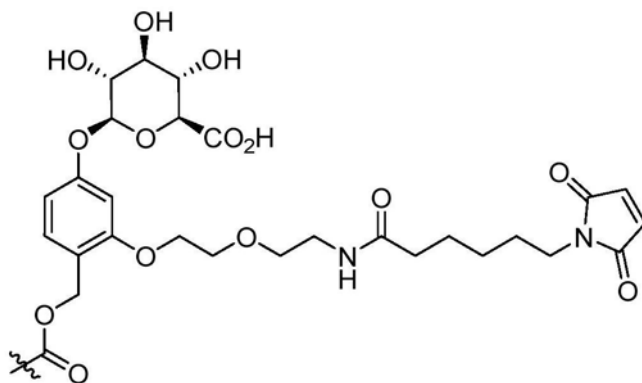
[0416] (IVb.10)



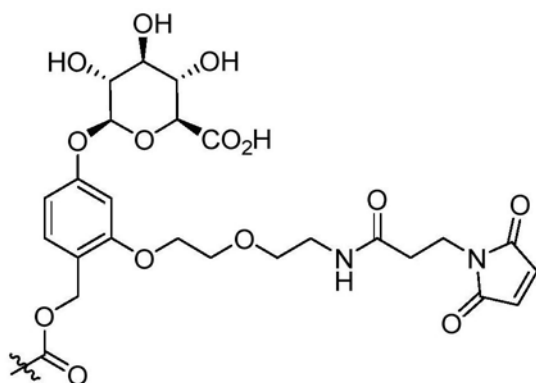
[0417] 其中  表示接头与免疫调节化合物或其盐的附接点。

[0418] 可包含在本文所述的缀合物中的根据结构式 (IVc) 的接头的示例性实施方案包括以下所示的接头 (如所示, 接头包含适用于将接头共价连接至抗体建构体的基团):

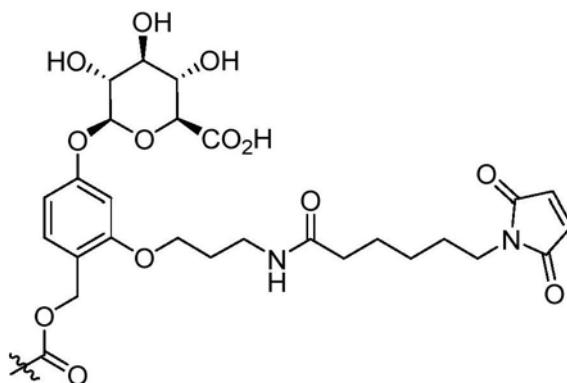
[0419] (IVc.1)



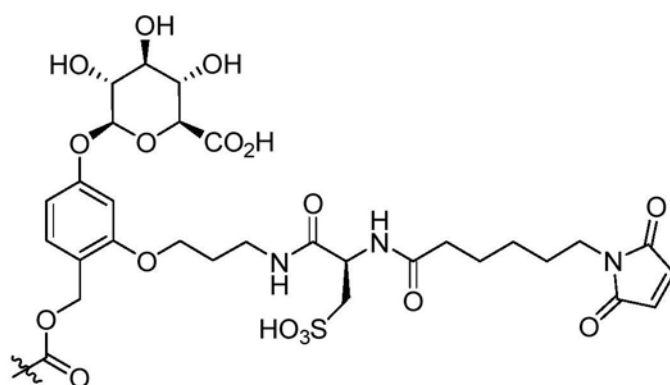
[0420] (IVc.2)



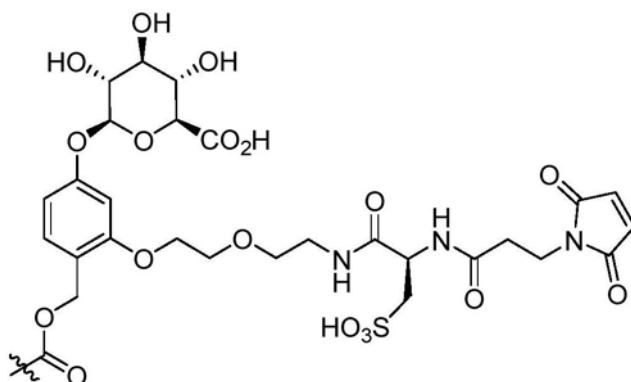
[0421] (IVc.3)



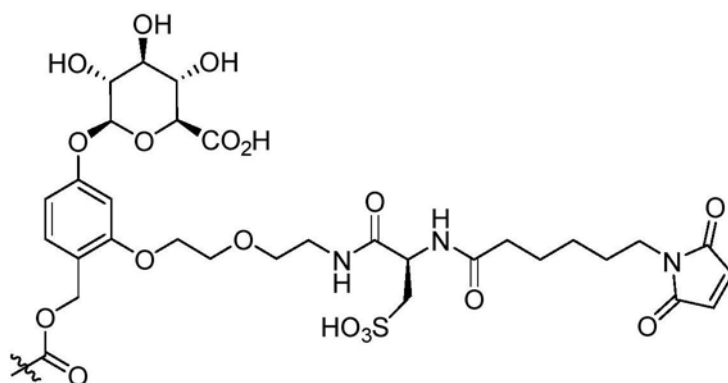
[0422] (IVc.4)



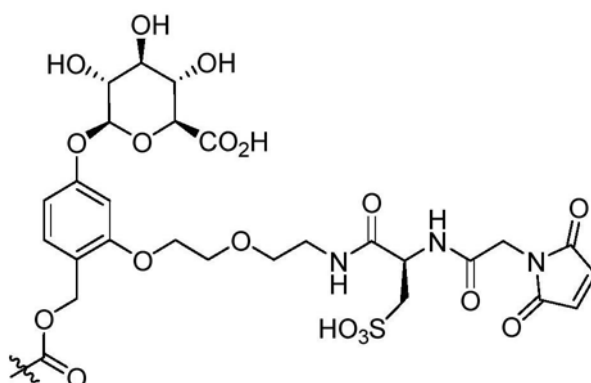
[0423] (IVc.5)



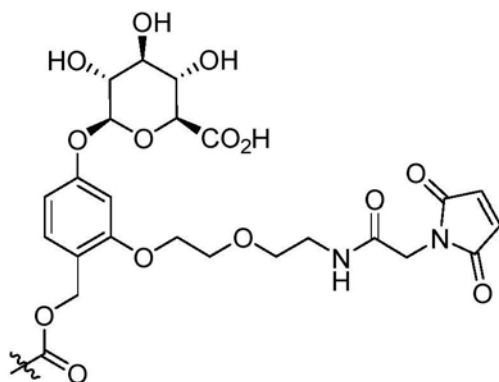
[0424] (IVc.6)



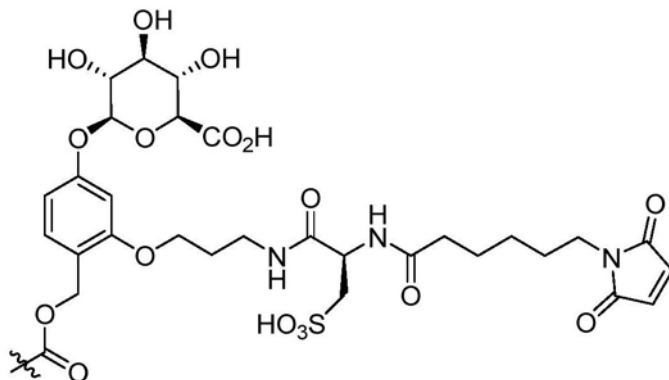
[0425] (IVc.7)



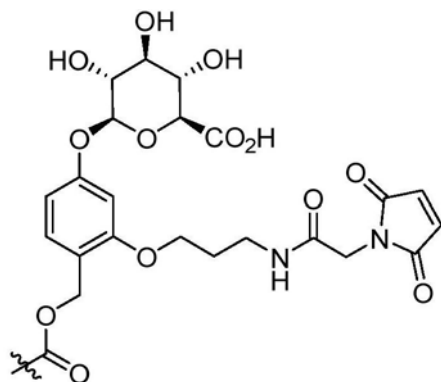
[0426] (IVc.8)



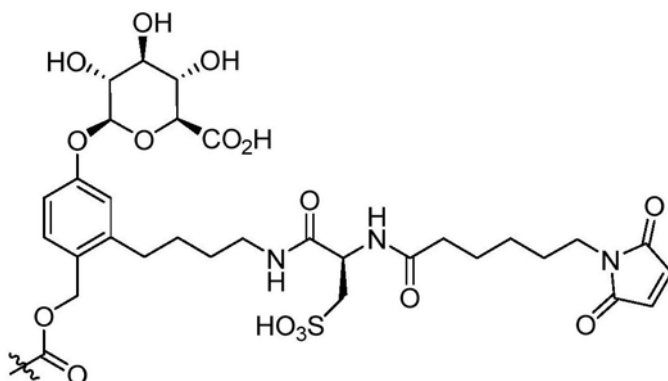
[0427] (IVc.9)




[0428] (IVc.10)

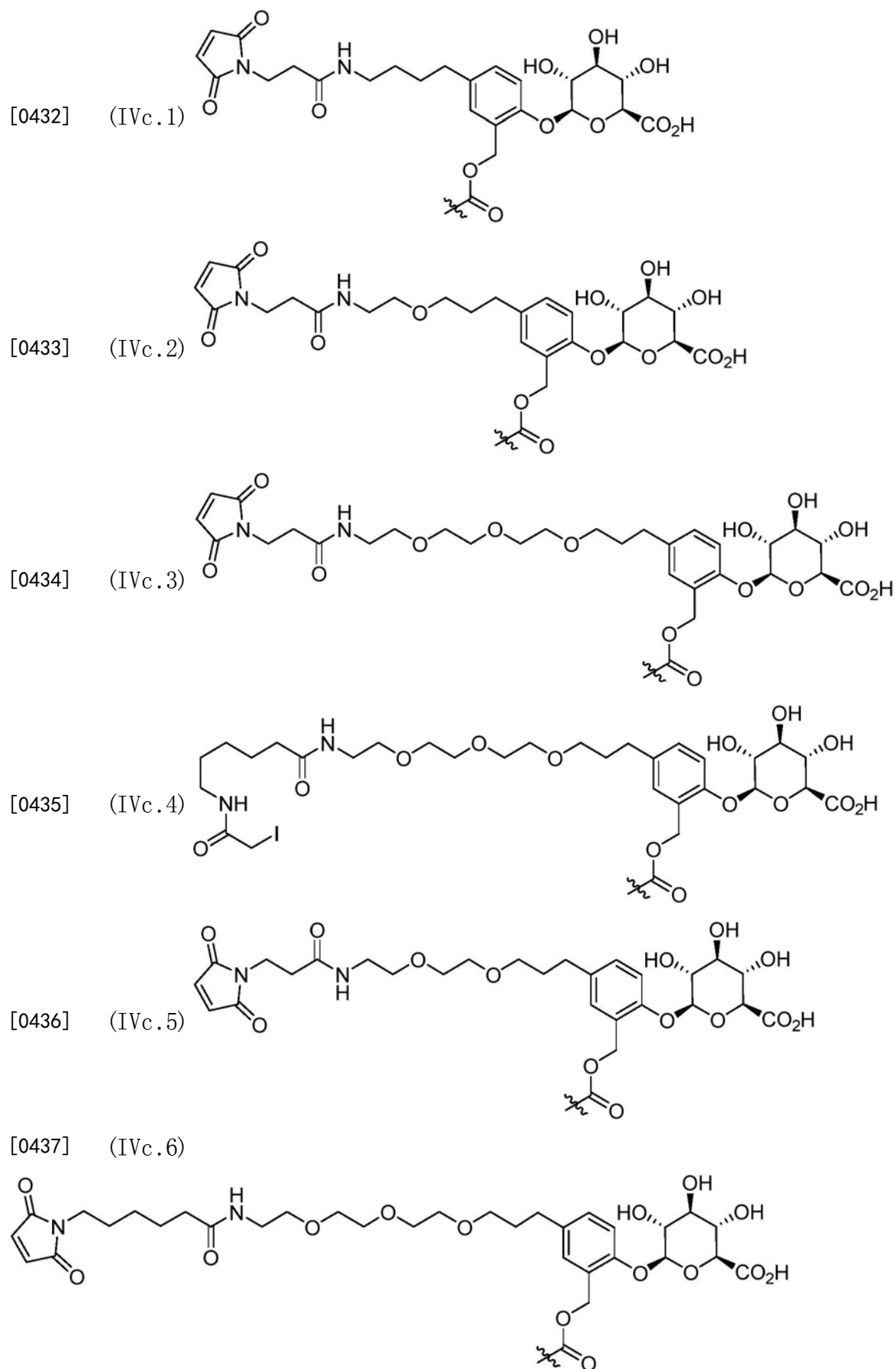


[0429] (IVc.11)



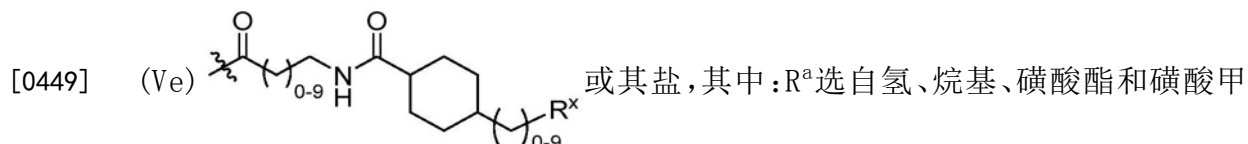
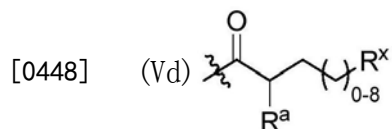
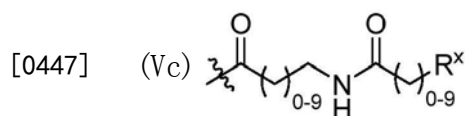
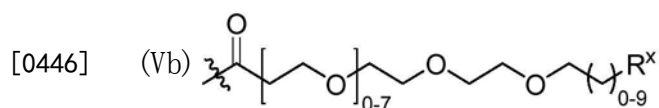
[0430] 其中  表示接头与免疫调节化合物或其盐的附接点。

[0431] 可包含在本文所述的缀合物中的根据结构式 (IVd) 的接头的示例性实施方案包含以下所示的接头 (如所示, 接头包含适用于将接头共价连接至抗体的基团):



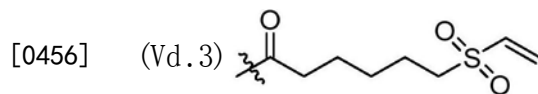
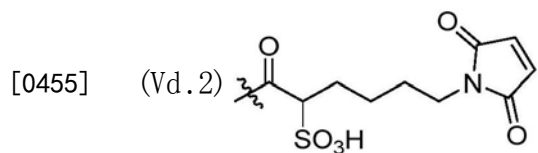
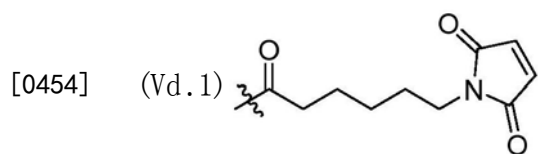
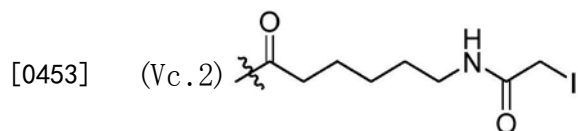
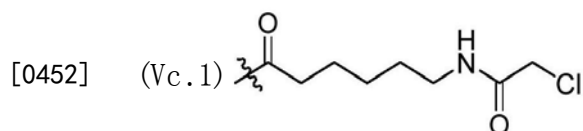
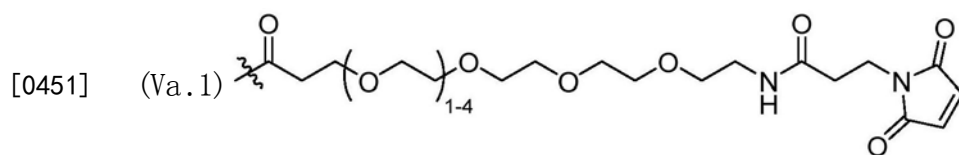
[0438] 其中 表示接头与免疫调节化合物或其盐的附接点。

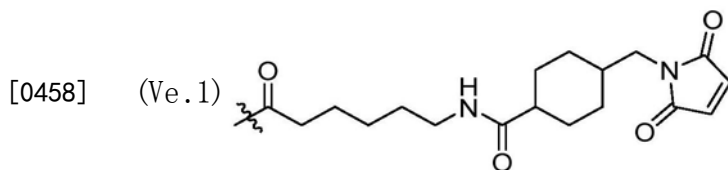
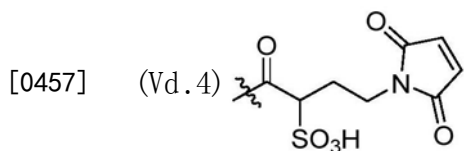




酯; R<sup>x</sup>是包含能够共价连接接头至抗体构建体的官能团的部分; 和 表示接头与免疫调节化合物或其盐的附接点。

[0450] 可包含在本文所述的缀合物中的根据结构式 (Va) - (Ve) 的接头的示例性实施方案包含以下所示的接头 (如所示, 接头包含适用于将接头共价连接至抗体建构体的基团, 并且 表示至免疫调节化合物或其盐的附接点:

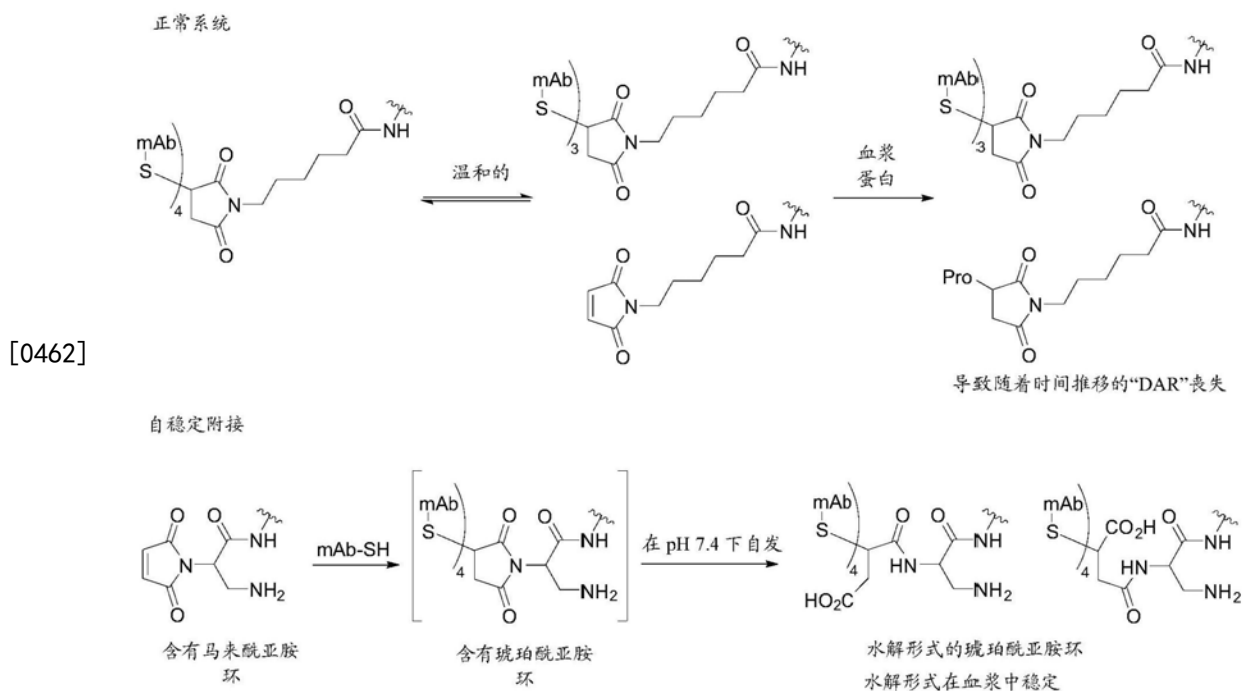




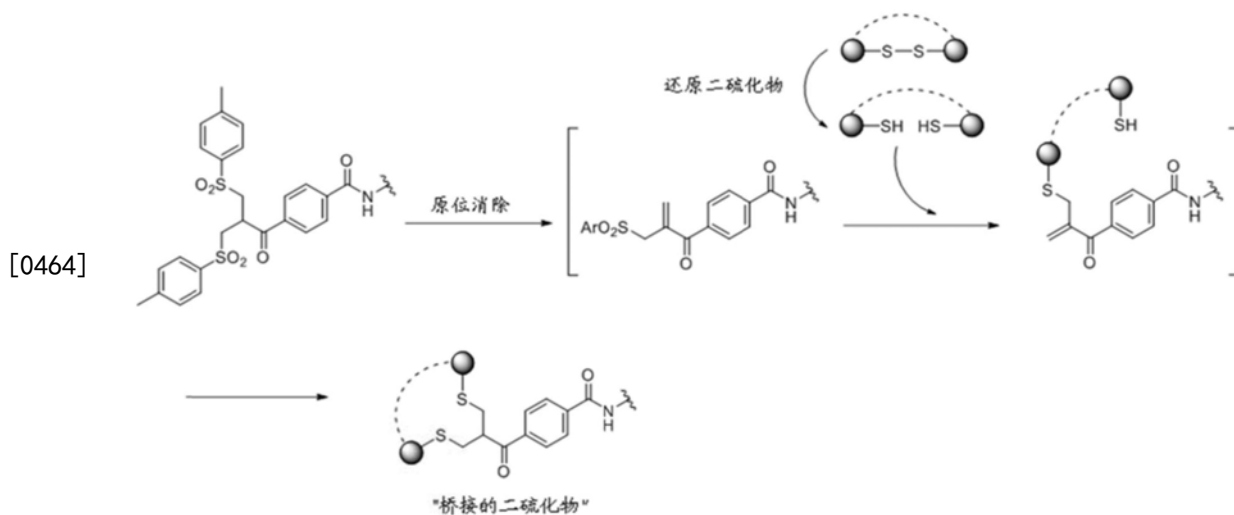
[0459] 其中  表示接头与免疫调节化合物或其盐的附接点。

[0460] 用于将接头附接至抗体的附接基团在性质上可以是亲电子的,并且包括例如马来酰亚胺基团、激活的二硫化物、激活的酯诸如NHS酯和HOBt酯、卤代甲酸酯、酰基卤、烷基卤和苄基卤诸如卤代乙酰胺。还可以根据本公开使用与“自稳定”马来酰亚胺和“桥联二硫化物”有关的新兴技术。

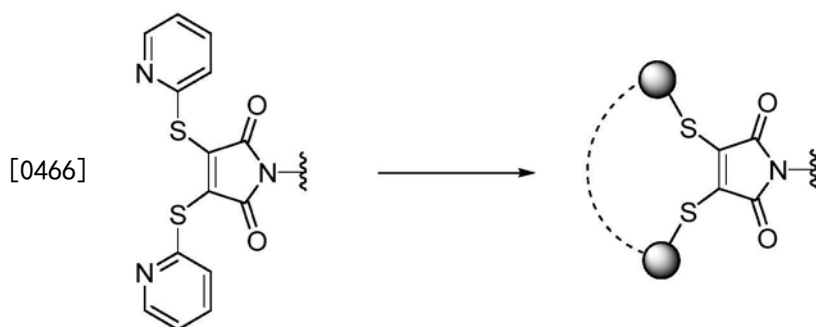
[0461] 在以下示意图中描绘了在抗体缀合条件下自发水解以产生具有提高的稳定性的缀合物的“自稳定”马来酰亚胺基团的一个实例。因此,马来酰亚胺附接基团与抗体的巯基反应以产生中间体琥珀酰亚胺环。附接基团的水解形式在血浆蛋白存在下对脱缀合(deconjugation)有抗性。



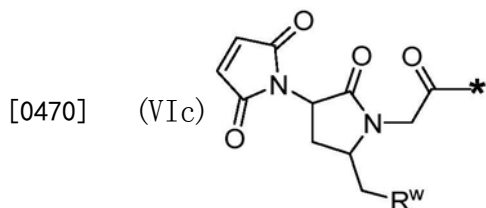
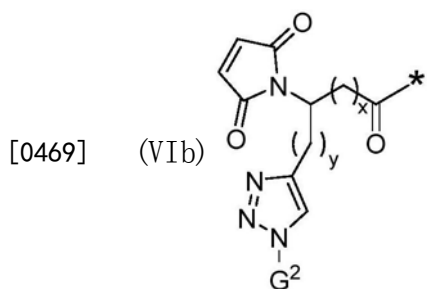
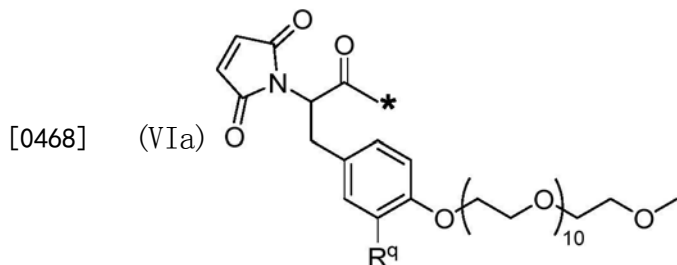
[0463] 已经公开了用于桥接一对源自天然铰链二硫化物键还原的巯基基团的方法,并在以下示意图中进行了描述。该方法的一个优点是能够通过完全还原IgG (产生4对巯基),然后与4当量的烷基化剂反应来合成同质的DAR4缀合物。还声称含有“桥接的二硫化物”的缀合物具有增加的稳定性。



[0465] 类似地,如下所述,已经开发了能够桥接一对巯基基团的马来酰亚胺衍生物。



[0467] 附接部分可以含有以下结构式 (VIa)、(VIb) 或 (VIc) :

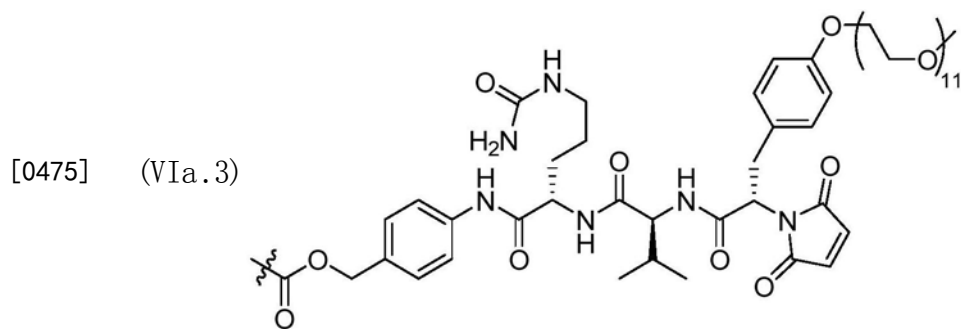
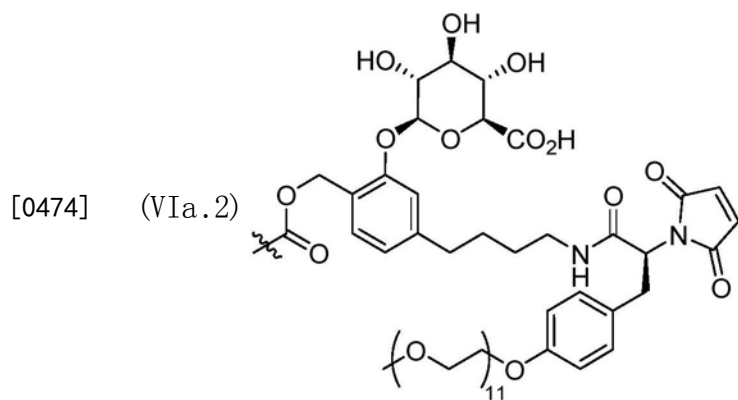
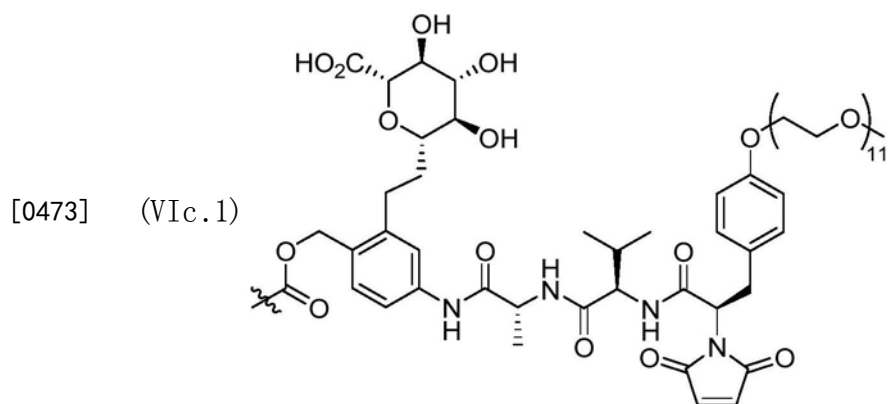


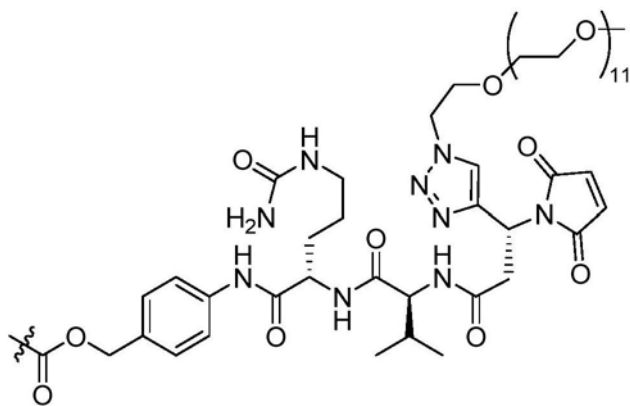
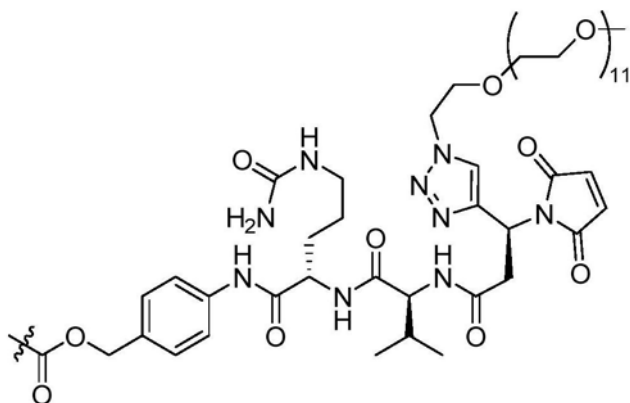
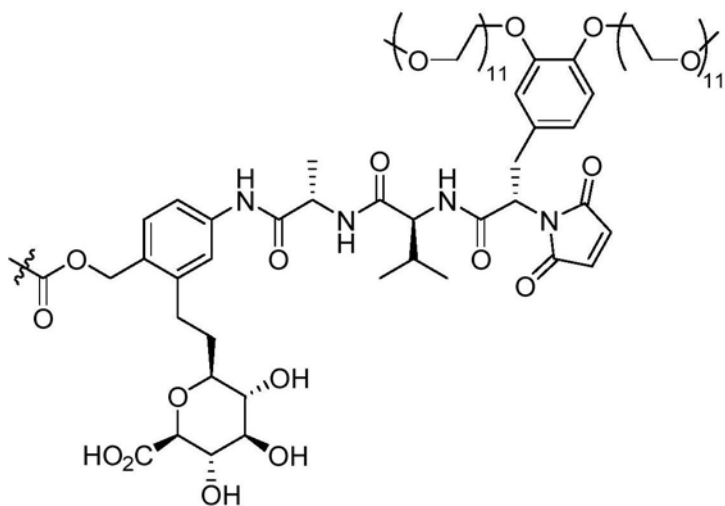
[0471] 或其盐,其中: $R^q$ 是H或 $-O-(CH_2CH_2O)_{11}-CH_3$ ;  $x$ 是0或1;  $y$ 是0或1;  $G^2$ 是 $-CH_2CH_2CH_2SO_3H$ 或 $-CH_2CH_2O-(CH_2CH_2O)_{11}-CH_3$ ;  $R^w$ 是 $-O-CH_2CH_2SO_3H$ 或 $-NH(CO)-CH_2CH_2O-(CH_2CH_2O)_{12}-CH_3$ ; 和\*表



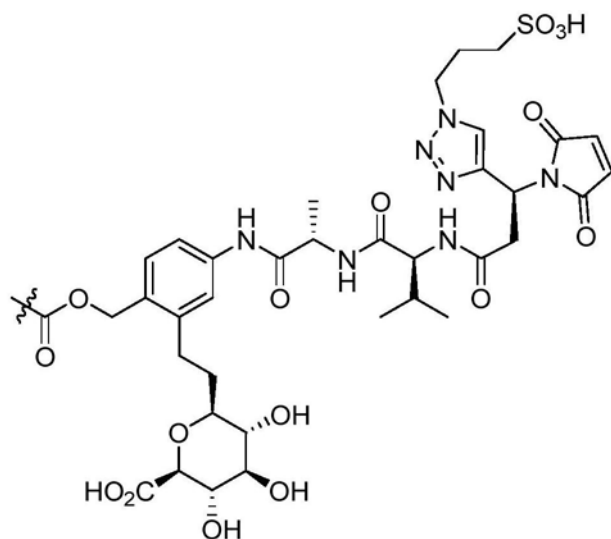
示至接头的剩余部分的附接点。

[0472] 可包含在本文所述的缀合物中的根据结构式 (VIa) 和 (VIb) 的接头的示例性实施方案可包含以下所示的接头 (如所示, 接头可包含适用于将接头共价连接至抗体建构体的基团):

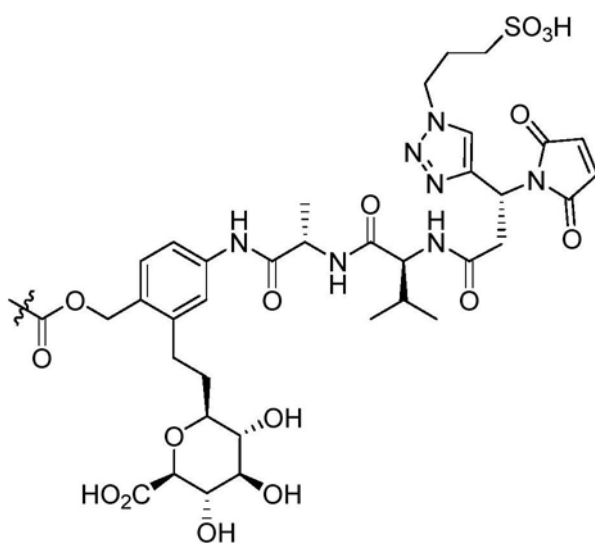




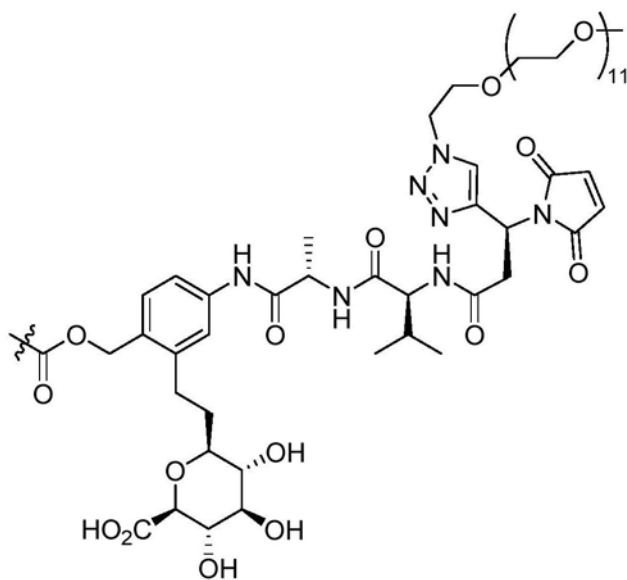
[0479] (VIb.3)



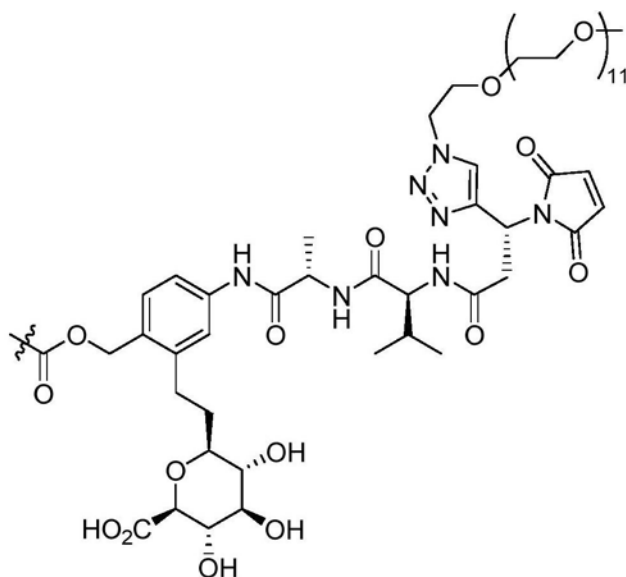
[0480] (VIb.)



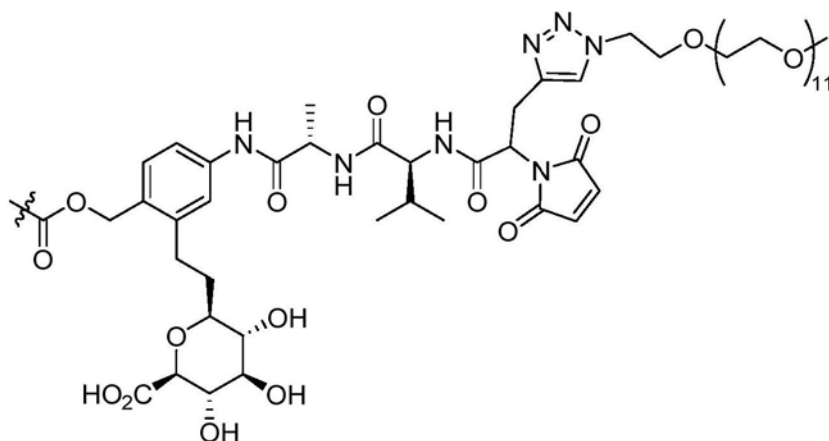
[0481] (VIb.6)




[0482] (VIIb.7)



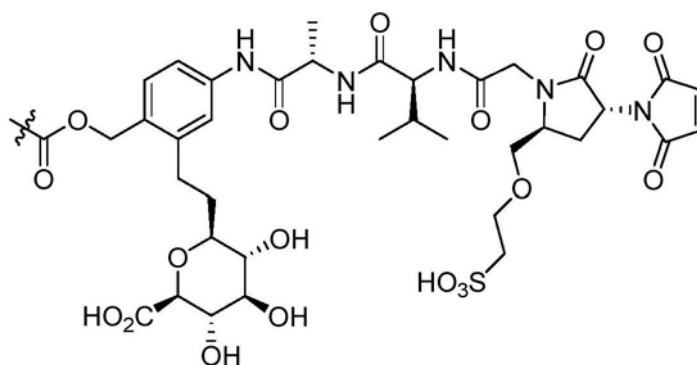
[0483] (VIIb.8)



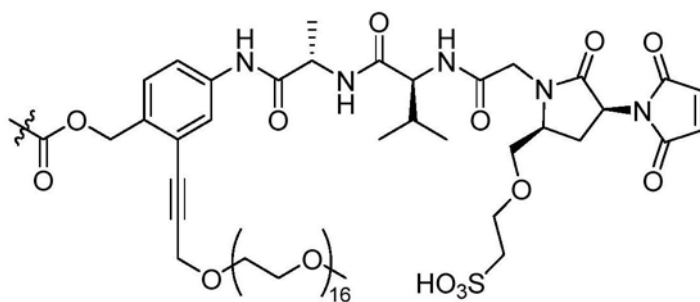
[0484] 其中  表示接头与免疫调节化合物或其盐的附接点。

[0485] 可包含在本文所述的抗体构建体免疫调节化合物缀合物中的根据结构式 (VIc) 的接头的示例性实施方案可包含以下所示的接头 (如所示, 接头可包含适用于将接头共价连接至抗体建构体的基团):

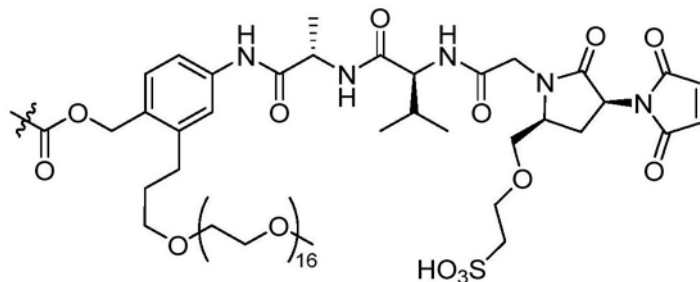
[0486] (VIc.1)



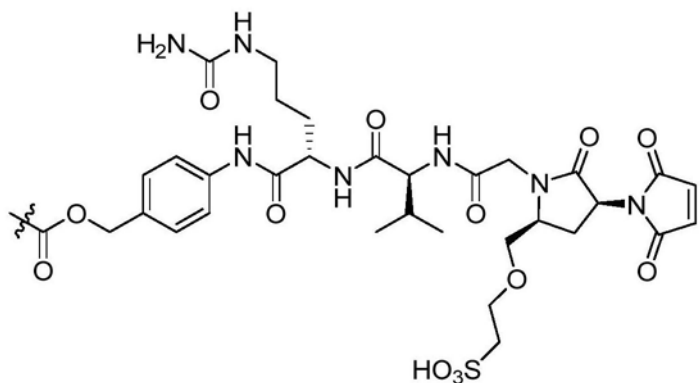
[0487] (VIc.2)



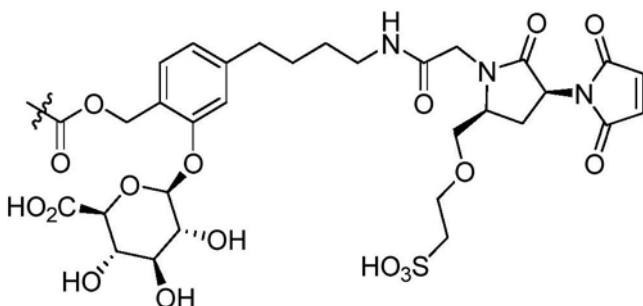
[0488] (VIc.3)



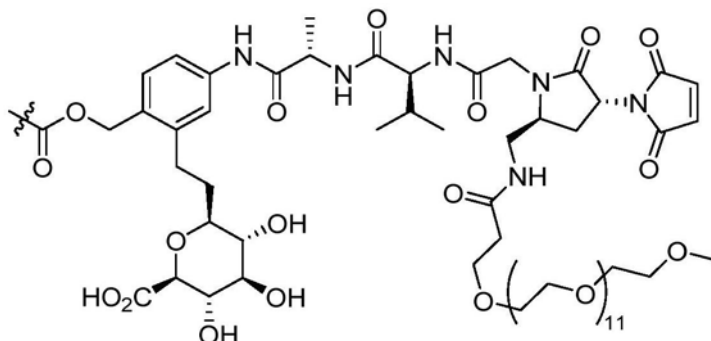
[0489] (VIc.4)




[0490] (VIc.5)



[0491] (VIc.6)



[0492] 其中  表示接头与免疫调节化合物或其盐的附接点。

[0493] 如本领域技术人员所知,选择用于特定缀合物的接头可能受多种因素影响,包括但不限于至抗体的附接位点(如,lys、cys或其他氨基酸残基)、药物药效团的结构限制和药

物的亲脂性。选择用于缀合缀合物的特定接头应设法平衡这些不同因素,以实现特定的抗体/药物组合。

[0494] 例如,已经观察到细胞毒性化合物的缀合物可杀伤存在于抗原阳性肿瘤细胞附近的旁观者抗原阴性细胞。缀合物杀伤旁观者细胞的机制表明,在缀合物的细胞内加工期间形成的代谢产物可能起作用。由抗原阳性细胞中缀合物代谢产生的中性细胞毒性代谢产物似乎在旁观者细胞杀伤中起作用,而带电荷的代谢产物可以防止跨膜扩散到培养基中,并因此不会影响旁观者杀伤。在某些实施方案中,选择接头以减弱由释放的免疫调节化合物或其衍生物(由缀合物的细胞代谢物产生的)引起的旁观者效应。在某些实施方案中,选择接头以增加免疫调节化合物的旁观者效应。在某些实施方案中,选择接头以增加由相同过程产生的旁观者效应,但该效应可应用于免疫调节化合物代谢物。增加的旁观者效应可能是对周围细胞的作用增加以治疗纤维化疾病、自身免疫疾病或自身炎症疾病。

[0495] 在使用和/或储存条件下,接头的性质也可影响缀合物的聚集。通常,文献中报道的缀合物每个抗体分子含有不大于3-4个药物分子。尤其是如果药物和接头均具有疏水性,由于缀合物的聚集,尝试获得更高的药物-与-抗体比(“DAR”)常常会失败。在许多情况下,大于3-4的DAR作为提高效率的一种手段可以是有益的。在免疫调节化合物本质上是疏水的情况下,可能希望选择相对亲水的接头作为减少缀合聚集的手段,尤其是在需要大于3-4的DAR的情况下。因此,在某些实施方案中,接头掺入在存储和/或使用期间减少缀合物聚集的化学部分。接头可掺入极性基团或亲水基团,诸如带电基团或在生理pH下带电的基团,以减少缀合物的聚集。例如,接头可以掺入带电基团,诸如在生理pH下去质子化如羧酸盐或质子化如胺的盐或基团。

[0496] 在特定的实施方案中,如通过尺寸排阻色谱(SEC)所确定的,在储存或使用期间,缀合物的聚集为小于约40%。在特定的实施方案中,如通过尺寸排阻色谱(SEC)所确定的,在储存或使用期间,缀合物的聚集为小于35%,诸如小于约30%、诸如小于约25%、诸如小于约20%、诸如小于约15%、诸如小于约10%、诸如小于约5%、诸如小于约4%或甚至更小。

[0497] 在某些实施方案中,可以将泛素连接酶结合部分或第二部分连接至如本文所述的缀合物中的免疫调节化合物或第一部分。泛素连接酶结合部分可以经由直链非氢原子数在1至20范围内的间隔子连接至免疫调节化合物。泛素连接酶结合部分可以经由具有官能团诸如醚、酰胺、烷烃、烯烃、炔烃、酮、羟基、羧酸、硫醚、亚砷和砷的间隔子连接至免疫调节化合物。泛素连接酶结合部分可以经由包含芳族、杂芳族、环状、双环和/或三环部分的接头连接至免疫调节化合物。

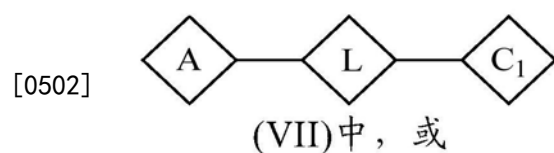
[0498] 接头及接头与免疫调节化合物的接头共价附接位点可以是可切割的或不可切割的。接头可以是在位点处附接至免疫调节化合物的不可切割接头,在位点中如通过Kd测量、通过细胞基测定中改变的靶蛋白功能或两者确定,免疫调节化合物可不失去靶标结合并且可不失去免疫调节活性。接头长度可以改变,以优化缀合物中免疫调节化合物对其靶蛋白的活性。此类接头可以是短的、柔性的、刚性的、亲水的或疏水的。接头可以含有具有不同特性的区段,诸如柔性区段或刚性区段。接头对细胞外环境可以是化学稳定的。非限制性实例可以是马来酰亚氨基己酰基接头。马来酰亚氨基己酰基接头可包含N-马来酰亚氨基甲基环己烷-1-羧酸酯。接头可以是马来酰亚氨基己酰基基团和一个或多个聚乙二醇分子的组合。

[0499] 接头(L)可以包含5至100个直链非氢原子,其可以共价附接至抗体构建体(如抗

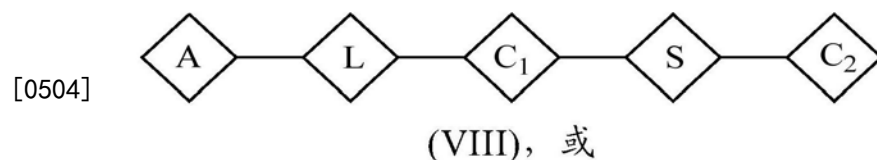
体),并且可以:a)共价附接至免疫调节化合物;b)共价附接至免疫调节化合物1(C<sub>1</sub>),所述免疫调节化合物1(C<sub>1</sub>)可共价附接至包含5至100个直链非氢原子的间隔子(S),其中间隔子可共价附接至第二化合物(C<sub>2</sub>)(图1C);c)共价附接至第二化合物(C<sub>2</sub>),其中第二化合物可共价附接至包含5至100个直链非氢原子的间隔子(S),其中间隔子可共价附接至免疫调节化合物(C<sub>1</sub>)(图1B);或d)共价附接至间隔子,其中间隔子可共价附接至C<sub>1</sub>和C<sub>2</sub>(图1A)。在b)-d)的一些实施方案中,C<sub>2</sub>可以是E3泛素连接酶结合部分。第二化合物具有活性,诸如结合活性、免疫调节活性或不同的生物活性。

[0500] 接头(L)可以包含5至100个直链非氢原子,其可以共价附接至抗体构建体(A)(诸如抗体),并且可以:

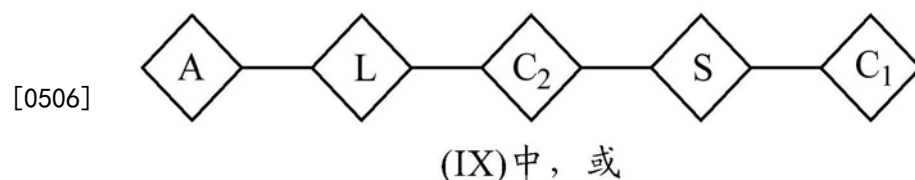
[0501] i)共价附接至免疫调节化合物(C<sub>1</sub>),如在



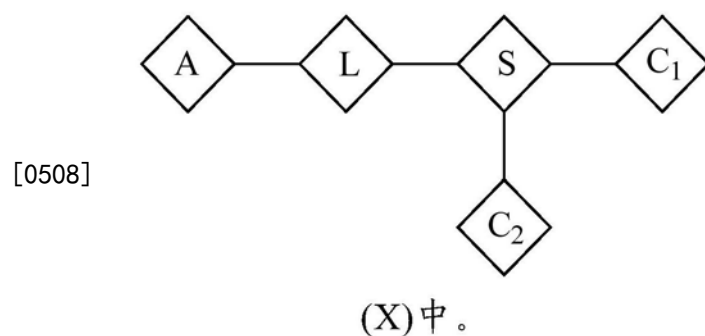
[0503] ii)共价附接至免疫调节化合物(C<sub>1</sub>),所述免疫调节化合物(C<sub>1</sub>)自身可共价附接至包含5至100个直链非氢原子的间隔子(S),所述间隔子(S)共价附接至第二免疫调节化合物(C<sub>2</sub>),如在



[0505] iii)共价附接至免疫调节化合物(C<sub>2</sub>),所述免疫调节化合物(C<sub>2</sub>)可共价附接至包含5至100个直链非氢原子的间隔子(S),所述间隔子(S)共价附接至第一免疫调节化合物(C<sub>1</sub>),如在

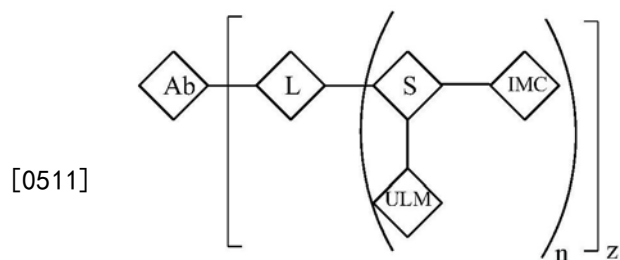


[0507] iv)共价附接至包含5至100个直链非氢原子的间隔子(S),所述间隔子(S)共价附接至两种免疫调节化合物(C<sub>1</sub>和C<sub>2</sub>),如在



[0509] 在一些实施方案中,C<sub>2</sub>是E3泛素连接酶结合部分,使得C<sub>1</sub>-S-C<sub>2</sub>一起可以形成蛋白水解靶向嵌合体(PROTAC)复合物(也称为蛋白水解靶向模块或PTM)。

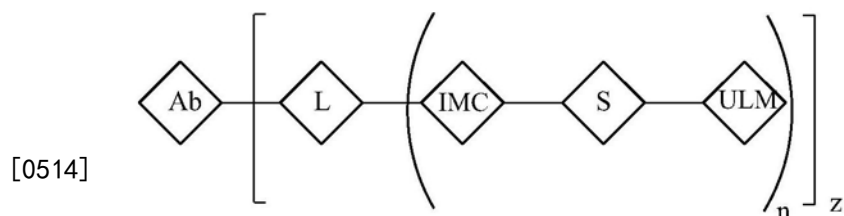
[0510] 在一些实施方案中,蛋白靶向部分,诸如免疫调节化合物(IMC),通过间隔子(S)共价附接至E3泛素连接酶结合部分(ULM),和接头(L)共价附接至间隔子(s),n为1-20,并且z为1至20,如由下式表示:



(XI)。

[0512] 在一些实施方案中,L是可切割的接头。可切割的接头可为以上在接头部分中描述的肽接头或其他可切割的接头。在一些实施方案中,L是不可切割的接头。在一些实施方案中,缀合物的Fc结构域是Fc无效的。在一些实施方案中,Fc结构域是可结合至Fc  $\gamma$  受体的野生型IgG。在一些实施方案中,Fc结构域可结合至Fc受体,其中缀合物的Fc结构域结合至Fc受体的 $K_d$ 是对照抗体构建体结合至Fc受体的 $K_d$ 的不大于约100倍,其中对照抗体构建体是未缀合的抗体构建体。在一些实施方案中,缀合物的IMC结合至蛋白活性位点的 $K_d$ 是对照化合物结合至蛋白活性位点的 $K_d$ 的不大于100倍,或其中缀合物的IMC的 $IC_{50}$ 是对照化合物的 $IC_{50}$ 的不大于300倍,其中对照化合物是游离的IMC。

[0513] 在一些实施方案中,蛋白靶向部分,诸如免疫调节化合物(IMC),通过间隔子(S)共价附接至E3泛素连接酶结合部分(ULM),和接头(L)共价附接至蛋白靶向部分,n为1-20,并且z为1至20,如由下式表示:



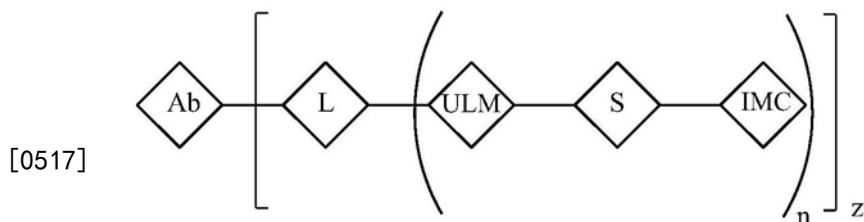
(XII)。

[0515] 在一些实施方案中,L是可切割接头。可切割接头可为以上在接头部分中描述的肽接头或其他可切割接头。在一些实施方案中,L是不可切割接头。在一些实施方案中,缀合物的Fc结构域是Fc无效的。在一些实施方案中,Fc结构域是可结合至Fc  $\gamma$  受体的野生型IgG。在一些实施方案中,Fc结构域可结合至Fc受体,其中缀合物的Fc结构域结合至Fc受体的 $K_d$ 是对照抗体构建体结合至Fc受体的 $K_d$ 的不大于约100倍,其中对照抗体构建体是未缀合的抗体构建体。在一些实施方案中,缀合物的IMC结合至蛋白活性位点的 $K_d$ 是对照化合物结合至蛋白活性位点的 $K_d$ 的不大于100倍,或其中缀合物的IMC的 $IC_{50}$ 是对照化合物的 $IC_{50}$ 的不大于300倍,其中对照化合物是游离的IMC。

[0516] 在一些实施方案中,蛋白靶向部分,诸如免疫调节化合物(IMC),通过间隔子(S)共价附接至E3泛素连接酶结合部分(ULM),和接头(L)共价附接至泛素E3连接酶部分(ULM),n



为1-20,并且z为1至20,如由下式表示:



(XIII)。

[0518] 在一些实施方案中,L是可切割接头。可切割接头可为以上在接头部分中描述的肽接头或其他可切割接头。在一些实施方案中,L是不可切割接头。在一些实施方案中,缀合物的Fc结构域是Fc无效的。在一些实施方案中,Fc结构域是可结合至Fc  $\gamma$  受体的野生型IgG。在一些实施方案中,Fc结构域可结合至Fc受体,其中缀合物的Fc结构域结合至Fc受体的 $K_d$ 是对照抗体构建体结合至Fc受体的 $K_d$ 的不大于约100倍,其中对照抗体构建体是未缀合的抗体构建体。在一些实施方案中,缀合物的IMC结合至蛋白活性位点的 $K_d$ 是对照化合物结合至蛋白活性位点的 $K_d$ 的不大于100倍,或其中缀合物的IMC的 $IC_{50}$ 是对照化合物的 $IC_{50}$ 的不大于300倍,其中对照化合物是游离的IMC。

[0519] 在某些实施方案中,E3泛素连接酶结合部分经由间隔子连接至如本文所述的缀合物中的蛋白靶向部分,诸如免疫调节化合物。在某些实施方案中,E3泛素连接酶结合部分可以经由间隔子连接至直链非氢原子数在1至25或1至20的范围内的蛋白靶向部分。在某些实施方案中,间隔子具有5至20或5至15个直链非氢原子。间隔子通常是不可切割的。

[0520] E3泛素连接酶结合部分可连接至具有官能团(醚、酰胺、烷烃、烯烃、炔烃、酮、羟基、羧酸、硫醚、亚砷和砷)的蛋白靶向部分的间隔子。E3泛素连接酶结合部分可经由包含芳族、杂芳族、环状、双环和/或三环部分的间隔子结合至蛋白靶向部分的间隔子。

[0521] 间隔子的长度可以改变以优化蛋白靶向部分对其靶蛋白的活性。在一些实施方案中,间隔子是不可切割的,并且包含长度为1-25、1-20、1-15、5-25、5-20或5-15个直链非氢原子的亚烷基、亚烯基、亚炔基、 $-(CH_2O)-$ 、 $-CH_2CH_2O-$ 、 $-(CH_2OCH_2)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-NH-$ 和 $-O-$ 的区段。间隔子可以被 $C_1-C_8$ 烷基、 $C_2-C_8$ 烯基、 $C_2-C_8$ 炔基、 $-(CH_2O)_{n1}H$ 、 $-(CH_2CH_2O)_{n1}H$ 、 $-(CH_2O)_{n1}CH_3$ 、 $-C(O)OH$ 或 $-NH_2$ 任选地取代,其中 $n_1$ 为1至8,并且还可以任选地包含反应性基团 $R^x$ ,以形成官能团,诸如醚、酰胺、烷烃、烯烃、炔烃、酮、羟基、羧酸、硫醚、亚砷和砷,从而形成与接头(L)的附接。在一些实施方案中,间隔子不是未被取代的。在一些实施方案中,间隔子被 $R^x$ 取代。

[0522] 间隔子可以是 $C_{1-25}$ 亚烷基或经任选取代的 $C_{1-25}$ 亚杂烷基,其中亚杂烷基是散布有一个或多个独立选自以下的基团的 $C_{1-24}$ 亚烷基链: $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NH_2-$ 和 $-C(O)NH-$ 。间隔子还可以被可形成官能团的反应性基团 $R^x$ 任选取代,所述官能团诸如酰胺键、酯键、醚键、碳酸酯键、氨基甲酸酯键或硫醚键;此类反应性基团可以是例如与离去基团诸如氰基和琥珀酰亚胺基和羟基基团键合的氨基基团;羧基基团;醛基基团;叠氮基基团;炔基基团和烯基基团;酮;碳酸酯;羰基官能团。在一些实施方案中, $R^x$ 可以是 $-NH_2$ 、 $-S$ 或马来酰亚胺。在一些实施方案中, $R^x$ 是 $-NH_2$ 。间隔子还可被 $C_1-C_8$ 烷基、 $C_2-C_8$ 烯基、 $C_2-C_8$ 炔基、 $-(CH_2O)_{n1}H$ 、 $-(CH_2CH_2O)_{n1}H$ 、 $-(CH_2O)_{n1}CH_3$ 、 $-C(O)OH$ 或 $-NH_2$ 任选取代,其中 $n_1$ 是1至8。在一些实施方案中,间隔子不是未被



KAPI、MARCH8、Mind Bomb 1/MIB1、Mind Bomb 2/MIB2、MuRF1/TRIM63、NDFIPI、NEDD4、NleL、Parkin、RNF2、RNF4、RNF8、RNF168、RNF43、SART1、Skp2、SMURF2、TRAF-1、TRAF-2、TRAF-3、TRAF-4、TRAF-5、TRAF-6、TRIMS、TRIM21、TRIM32、UBR5和ZNRK3。

[0527] 在另外的实施方案中，E3泛素连接酶可选自以下类型：HECT型、RING-型、PARKIN-指型、RING-变体型、U-盒型、A20-指型、PIAS-指型、PHD-指型、Skp1-样型、Cullin-型、F-盒型、SOCS-盒型、BTB-型、DDB1-样型和APC/细胞周期体型。

[0528] E3泛素连接酶结合部分可为VHL结合部分诸如(S)-2-氨基-N1-(4-(5-氨基-6-((4-吗啉代吡啶-3-基)氨甲酰基)吡嗪-2-基)苄基)-N5-(2-(3-((S)-1-((2S,4R)-4-羟基-2-((4-(4-甲基噻唑-5-基)苄基)氨甲酰基)吡咯烷-1-基)-3,3-二甲基-1-氧代丁烷-2-基)氨基)-3-氧代丙氧基)乙基)戊二酰胺(实施例1)或小脑蛋白结合部分诸如3-氨基-6-(4-(2-((2S)-2-氨基-6-(2-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1,3-二氧代异吲哚啉-4-基)氧基)乙酰氨基)己酰氨基)乙基)苄基)-N-(4-吗啉代吡啶-3-基)吡嗪-2-甲酰胺(实施例2)。

[0529] 在某些实施方案中，接头(L)在间隔子中的反应性位点R<sup>x</sup>处附接至PTM。在某些实施方案中，接头(L)经由E3泛素连接酶结合部分中的附接位点附接至PTM。在某些实施方案中，接头(L)经由蛋白靶向部分中的附接位点附接至PTM。

[0530] 接头(L)和/或接头(L)至蛋白水解靶向模块的一个或多个共价连接位点可以是可切割的或不可切割的。在某些实施方案中，接头是可切割的。在某些实施方案中，接头是不可切割接头。在一些实施方案中，接头是不可切割的，并在位点处附接至蛋白水解靶向模块，其中如通过Kd测量、通过细胞基测定中改变的靶蛋白功能或两者确定，蛋白靶向部分可结合至其蛋白靶标并且如果有活性则不丧失免疫调节活性。接头长度可以改变，以优化蛋白靶向部分对其靶蛋白的活性。此类接头可以是短的、柔性的、刚性的、亲水的或疏水的。接头可以含有具有不同特性的区段，诸如柔性区段或刚性区段。接头对细胞外环境可以是化学稳定的。非限制性实例可以是马来酰亚氨基己酰基接头。马来酰亚氨基己酰基接头可包含N-马来酰亚氨基甲基环己烷-1-羧酸酯。

[0531] 在一些实施方案中，接头(L)是可切割接头并且可以选自如上所示的式IIa、IIb、IIc、IIIa、IIIb、IIIc、IIId、Iva、IVb、IVc、IVd和IVe的接头和其中的具体结构。

[0532] 接头(L)可以是马来酰亚氨基己酰基基团和一个或多个聚乙二醇分子的组合。

[0533] 接头(L)可包含可共价附接至抗体构建体的5至100个直链非氢原子。

[0534] 在一些实施方案中，蛋白水解靶向模块的蛋白水解靶向部分可为拮抗剂，诸如PI3K抑制剂、钙调磷酸酶抑制剂、mTOR抑制剂、BTK抑制剂、JAK抑制剂、CRAC抑制剂、PARP1拮抗剂、PPAR $\gamma$ 激动剂、Kv1.3拮抗剂、KCa3.1拮抗剂、PP2A激动剂、IRAK4抑制剂、MYD88抑制剂、BCL-2拮抗剂、A2ar激动剂、TLR7拮抗剂、c-KIT激酶抑制剂、KCA3.1激动剂、TGF $\beta$ R1抑制剂、TGF $\beta$ R2抑制剂、ACC拮抗剂、ASK1拮抗剂、GLI1抑制剂、TNKS拮抗剂或TNIK拮抗剂或其任何组合。

[0535] 在一些实施方案中，蛋白靶向部分结合至CSFR1、RON/MST1、PI3Kd、PI3Kg、PARP1、PD-L1、PP2A、A2ar、TYRO3、AXL或MER。在某些实施方案中，蛋白靶向部分是以下物质的拮抗剂或抑制剂：CSFR1、RON/MST1、PI3Kd、PI3Kg、PARP1、PD-L1、PP2A、A2ar、TYRO3、AXL或MER。

[0536] 在其他实施方案中，蛋白靶向部分可为模式识别受体(PRR)激动剂，诸如PAMP分子或DAMP分子。在一些实施方案中，蛋白靶向部分可为Toll-样受体激动剂、RIG-I激动剂、

STING激动剂、GPCR激动剂、离子通道激动剂、膜转运激动剂或ER蛋白激动剂。

[0537] 在某些实施方案中,抗体构建体(诸如抗体)特异性结合选自以下的第一抗原:钙粘素11、PDPN、整联蛋白 $\alpha 4\beta 7$ 、整联蛋白 $\alpha 2\beta 1$ 、MADCAM、肾病蛋白、足蛋白、IFNAR1、BDCA、CD30、c-KIT、FAP、CD73、CD38、PDGFRB、整联蛋白 $\alpha v\beta 1$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 3$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 8$ 、GARP、内皮唾酸蛋白、CTGF、整联蛋白 $\alpha v\beta 6$ 、CD40、PD-1、TIM-3、TNFR2、DEC205、DCIR、CD86、CD45RB、CD45R0、MHC II类和CD25。在一些方面,第一抗原选自钙粘素11、PDPN、整联蛋白 $\alpha 4\beta 7$ 、整联蛋白 $\alpha 2\beta 1$ 、MADCAM、肾病蛋白、足蛋白、IFNAR1、BDCA2、CD30、c-KIT、FAP、CD73、CD38、PDGFR $\beta$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 1$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 3$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 8$ 、GARP、内皮唾酸蛋白、CTGF、整联蛋白 $\alpha v\beta 6$ 、CD40、PD-1、TIM-3、TNFR2、DEC205、DCIR、CD86、CD45RB、CD45R0、MHC II类、CD25、LRRC15和钙粘素11。在一些实施方案中,抗体构建体结合至选自以下的第一抗原:钙粘素11、PDPN、LRRC15、整联蛋白 $\alpha 4\beta 7$ 、整联蛋白 $\alpha 2\beta 1$ 、MADCAM、肾病蛋白、足蛋白、IFNAR1、BDCA2、CD30、c-KIT、FAP、CD73、CD38、PDGFR $\beta$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 1$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 3$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 8$ 、GARP、内皮唾酸蛋白、CTGF、整联蛋白 $\alpha v\beta 6$ 、CD40、PD-1、TIM-3、TNFR2、DEC205、DCIR、CD86、CD45RB、CD45R0、MHC II类、CD25、MMP14、GPX8和F2RL2。在一些实施方案中,抗体构建体结合至选自以下的第一抗原:钙粘素11、FAP、TNFR2或LRRC15。在一些方面,抗体构建体结合至选自FAP和钙粘素11的第一抗原。在一些方面,抗体构建体结合至选自LRRC15的第一抗原。

[0538] 在某些实施方案中,抗体构建体特异性结合至T细胞、B细胞、星形细胞、内皮细胞、肿瘤细胞、APC、成纤维细胞、纤维细胞细胞、肌成纤维细胞、滑膜成纤维细胞、足细胞或与纤维化发病相关的细胞上的抗原。在某些实施方案中,抗体构建体特异性结合至T细胞、APC和/或B细胞上的抗原。在某些实施方案中,抗体构建体特异性结合至选自以下的抗原:PD-1、GARP、CD25、PD-L1或TNFR2。在某些实施方案中,抗体构建体特异性结合至星形细胞、内皮细胞、成纤维细胞、纤维细胞细胞、足细胞或与纤维化发病相关的细胞上的抗原。在某些实施方案中,抗体构建体特异性结合选自以下的抗原:PDGFR $\beta$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 1$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 3$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 6$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 8$ 、内皮唾酸蛋白、FAP、ADAM12、LRRC15、MMP14、PDPN、CDH11和F2RL2。在某些实施方案中,抗体构建体特异性结合至选自以下的抗原:FAP、ADAM12、LRRC15、MMP14、PDPN、CDH11和F2RL2。

[0539] 药物制剂

[0540] 本文所述的缀合物和方法可被认为可用作药物组合物以施用给有需要的受试者。药物组合物可至少包含本文所述的缀合物和一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂、稳定剂、分散剂、助悬剂和/或增稠剂。药物组合物可包含缀合物,其具有抗体构建体、接头和PI3K抑制剂、钙调磷酸酶抑制剂、mTOR抑制剂、BTK抑制剂、JAK抑制剂、CRAC抑制剂、PARP1拮抗剂、PPAR $\gamma$ 激动剂、Kv1.3拮抗剂、KCa3.1拮抗剂、PP2A激动剂、IRAK4抑制剂、MYD88抑制剂、BCL-2拮抗剂、A2ar激动剂、TLR7拮抗剂、c-KIT激酶抑制剂、KCa3.1激动剂、TGF $\beta$ R1抑制剂、TGF $\beta$ R2抑制剂、ACC拮抗剂、ASK1拮抗剂、GLI1抑制剂、TNKS拮抗剂或TNIK拮抗剂。药物组合物可包含具有抗体构建体、接头和TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ R1或TGF $\beta$ R2抑制剂的缀合物。药物组合物可包含具有抗体构建体、接头和TGF $\beta$ R1或TGF $\beta$ R2抑制剂的缀合物。药物组合物可包含具有抗体构建体、接头和TGF $\beta$ R1抑制剂的缀合物。药物组合物可包含具有抗体构建体、接头和TGF $\beta$ R2抑制剂的缀合物。药物组合物可包含缀合物,其具有抗体构建体(包含第二抗原结合结构域)、接头和PI3K抑制剂、钙调磷酸酶抑制剂、mTOR抑制剂、BTK抑制剂、JAK抑制剂、

CRAC抑制剂、PARP1拮抗剂、PPAR $\gamma$ 激动剂、Kv1.3拮抗剂、KCa3.1拮抗剂、PP2A激动剂、IRAK4抑制剂、MYD88抑制剂、BCL-2拮抗剂、A2ar激动剂、TLR7拮抗剂、c-KIT激酶抑制剂、KCa3.1激动剂、TGF $\beta$ R1抑制剂、TGF $\beta$ R2抑制剂、ACC拮抗剂、ASK1拮抗剂、GLI1抑制剂、TNKS拮抗剂或TNIK拮抗剂。药物组合物可包含缀合物,其具有抗体构建体(包含第二抗原结合结构域)、接头和TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ R1或TGF $\beta$ R2抑制剂。药物组合物可包含缀合物,其具有抗体构建体(包含第二抗原结合结构域)、接头和TGF $\beta$ R2抑制剂。药物组合物可包含本文所述的任何缀合物。抗体构建体可为抗-LRRC15抗体。抗体构建体可为抗-FAP抗体。抗体构建体可为抗-CDH11抗体。抗体构建体可为抗-TNFR2抗体。抗体构建体可包含分别来自表1和/或表2的一组或一对序列,所述序列赋予对所选抗原的抗原结合特异性。缀合物可包含赋予对所选抗原的抗原结合特异性的分别来自表1和/或表2的一组或一对序列的抗体构建体,接头和PI3K抑制剂、钙调磷酸酶抑制剂、mTOR抑制剂、BTK抑制剂、JAK抑制剂、CRAC抑制剂、PARP1拮抗剂、PPAR $\gamma$ 激动剂、Kv1.3拮抗剂、KCa3.1拮抗剂、PP2A激动剂、IRAK4抑制剂、MYD88抑制剂、BCL-2拮抗剂、A2ar激动剂、TLR7拮抗剂、c-KIT激酶抑制剂、KCa3.1激动剂、TGF $\beta$ R1抑制剂、TGF $\beta$ R2抑制剂、ACC拮抗剂、ASK1拮抗剂、GLI1抑制剂、TNKS拮抗剂或TNIK拮抗剂。缀合物可包含一个或多个抗原结合结构域(其包含赋予对所选抗原的抗原结合特异性的分别来自表1和/或表2的一组或一对序列)的抗体构建体、接头和PI3K抑制剂、钙调磷酸酶抑制剂、mTOR抑制剂、BTK抑制剂、JAK抑制剂、CRAC抑制剂、PARP1拮抗剂、PPAR $\gamma$ 激动剂、Kv1.3拮抗剂、KCa3.1拮抗剂、PP2A激动剂、IRAK4抑制剂、MYD88抑制剂、BCL-2拮抗剂、A2ar激动剂、TLR7拮抗剂、c-KIT激酶抑制剂、KCa3.1激动剂、TGF $\beta$ R1抑制剂、TGF $\beta$ R2抑制剂、ACC拮抗剂、ASK1拮抗剂、GLI1抑制剂、TNKS拮抗剂或TNIK拮抗剂。药物组合物还可任选地包含缓冲剂、抗生素、类固醇、碳水化合物、药物(如化学疗法药物)、多肽、螯合剂、佐剂和/或防腐剂。

[0541] 药物组合物可以使用一种或多种包含赋形剂和助剂的生理上可接受的载体来配制。可以根据所选择的施用途径来改变制剂。包含如本文所述的缀合物的药物组合物可以例如通过冻干缀合物、混合、溶解、乳化、囊封或包埋缀合物来制造。药物组合物还可以包含如本文所述的呈游离碱形式或药学上可接受的盐形式的缀合物。

[0542] 用于配制缀合物以形成本文所述的药物组合物的方法可包括将任何缀合物与一种或多种惰性的、药学上可接受的赋形剂或载体一起配制以形成固体、半固体或液体组合物。固体组合物可包括例如粉剂、片剂、可分散颗粒剂和胶囊剂,并且在一些方面,固体组合物还含有无毒的辅助物质,例如湿润剂或乳化剂、pH缓冲剂和其他药学上可接受的添加剂。或者,本文所述的药物组合物可以冻干或为粉末形式,以在使用前用适合的媒介物如无菌的无热原水复溶。

[0543] 本文所述的缀合物的药物组合物还可以包含至少一种活性成分。活性成分可以包埋在例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中(如,分别是羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)、在胶体药物递送系统中(如,脂质体、白蛋白微球、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊)或在大乳剂中。

[0544] 如本文所述的药物组合物通常还可包含对于所治疗的特定适应症而言是必需的多于一种的活性化合物。活性化合物可以具有互不负面影响的互补活性。例如,该组合物可以包含化学治疗剂、细胞毒性剂、细胞因子、生长抑制剂、抗激素剂、抗血管生成剂和/或心脏保护剂。此类分子可以以对于预期目的有效的量组合存在。

[0545] 组合物和制剂可以被灭菌。灭菌可以经由通过无菌过滤进行过滤来实现。

[0546] 本文所述的缀合物可以配制成为用于作为注射剂施用。用于注射的制剂的非限制性实例可以包括在油性或水性媒介物中的无菌悬浮液、溶液或乳剂。适合的油性媒介物可包括但不限于亲脂性溶剂或媒介物,诸如脂肪油或合成脂肪酸酯或脂质体。水性注射悬浮液可包含增加悬浮液粘度的物质。悬浮液还可含有适合的稳定剂。可以配制用于团注注射或连续输注的注射剂。或者,在使用前,可以将本文所述的药物组合物冻干或制成粉末形式,以与适合的媒介物如无菌的无热原水复溶。

[0547] 对于肠胃外施用,可以将缀合物与药学上可接受的肠胃外媒介物结合配制成单位剂量注射形式(如溶液、悬浮液、乳剂)。此类媒介物可能固有地是无毒的和非治疗性的。媒介物可以是水、盐水、林格氏液、葡萄糖溶液和5%人血清白蛋白。也可以使用非水性媒介物,诸如非挥发性油和油酸乙酯。脂质体可用作载体。载体可以含有少量的添加剂,诸如可以增强等渗性和化学稳定性的物质(如缓冲剂和防腐剂)。

[0548] 也可以制备持续释放的制剂。持续释放制剂的实例可包括可含有缀合物的固体疏水性聚合物的半透性基质,并且这些基质可呈成形制品的形式(如,薄膜或微胶囊)。持续释放基质的实例可包括聚酯、水凝胶(如聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚丙交酯、L-谷氨酸和 $\gamma$ -乙基-L-谷氨酸的共聚物、不可降解的乙烯-醋酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物诸如LUPRON DEPO™(即,由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林组成的可注射微球)和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。

[0549] 本文所述的缀合物的药物制剂可以通过将缀合物与药学上可接受的载体、赋形剂和/或稳定剂混合来制备以进行储存。该制剂可以是冻干制剂或水溶液。可接受的载体、赋形剂和/或稳定剂在使用的剂量和浓度下对接受者无毒。可接受的载体、赋形剂和/或稳定剂可包括缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和蛋氨酸;防腐剂,多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白或明胶;亲水性聚合物;氨基酸;单糖,二糖,和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂诸如EDTA;糖诸如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐抗衡离子诸如钠;金属络合物;和/或非离子表面活性剂或聚乙二醇。

[0550] 治疗应用

[0551] 本公开的药物组合物、缀合物和方法可用于多个不同的受试者,包括但不限于哺乳动物、人类、非人类哺乳动物、驯养动物(如,实验动物、家养宠物或牲畜)、非驯养动物(如野生动物)、狗、猫、啮齿动物、小鼠、仓鼠、牛、鸟、鸡、鱼、猪、马、山羊、绵羊、兔子和其任何组合。

[0552] 本文所述的组合物、缀合物和方法可以用作治疗剂,例如可以施用给有需要的受试者的治疗。本公开的治疗效果可以通过减少、遏制、缓解或根除疾病状态(包括但不限于其症状)而在受试者中获得。可以通过减少、遏制、预防(如,复发)、缓解或根除疾患或疾病或者疾患前或疾病前状态来获得在患有疾病或疾患、或者先有患有疾病或疾患的倾向或者开始患有疾病或疾患的受试者中的治疗效果。

[0553] 在实施本文描述的方法中,本文所述的治疗有效量的药物组合物或缀合物可以施用给有需要的受试者,通常用于治疗 and/或预防疾患或其进展。药物组合物可影响受试者的生理,诸如免疫系统、炎症响应或其他生理影响。治疗有效量可根据疾病的严重程度、受试者的年龄和相对健康状况、所用化合物的效力以及其他因素而在很大范围内变化。

[0554] 治疗 (Treat) 和/或治疗 (treating) 可以指在疾病或疾患的治疗或改善中任何成功的标志。治疗可以包括,例如,减轻、延迟或减轻疾病或疾患的一种或多种症状的严重性,或者其可以包括减少疾病、缺陷、病症或不利疾患等的症状由患者经历的频率。治疗可以在本文中用来指导导致某种程度的疾病或疾患的治疗或改善的方法,并且可以考虑针对该目的的一系列结果,包括但不限于预防疾患或预防复发。

[0555] 预防 (Prevent)、预防 (preventing) 等可以指在患者中预防疾病或疾患,如纤维化的进展。例如,如果使用本公开的方法治疗处于发展纤维化、自身免疫疾病或自身炎性疾病风险的个体并且以后不发展纤维化、自身免疫疾病或自身炎性疾病,那么已至少在一段时间内在此个体中预防该疾病。预防 (Prevent)、预防 (preventing) 等也可以指预防已经治疗的个体中的复发。

[0556] 治疗有效量可以是足以向施用了该组合物或缀合物的个体提供有益作用或以其他方式减少有害的非有益事件的组合物或缀合物的量。治疗有效剂量可以是产生对其施用的一种或多种所需的或期望的(如,有益的)效果的剂量,此类施用在给定的时间段内发生一次或多次。确切的剂量可以取决于治疗目的,并且可以由本领域技术人员使用已知技术来确定。

[0557] 可以配制用于疗法中的本文所述的药物组合物和缀合物,并考虑到要治疗的病症、单个患者的疾患、组合物或缀合物的递送位点、施用方法和从业者已知的其他因素,以与良好医学实践一致的方式建立剂量。本文所述的缀合物可以根据本文所述的制剂的描述来制备。

[0558] 可以被认为对本文所述的缀合物和方法有用的药物组合物可以使用本领域普通技术人员已知的可适合作为针对影响受试者的疾病或疾患的疗法的技术施用给有需要的受试者。本领域普通技术人员将理解,向有需要的受试者施用本文所述的药物组合物的量、持续时间和频率取决于若干因素,包括例如但不限于受试者的健康、患者的特定疾病或疾患、患者的特定疾病或疾患的等级或水平、受试者正在或已经施用的另外治疗剂等。

[0559] 本文所述的方法和组合物以及缀合物可以用于施用给有需要的受试者。通常,本文所述的组合物和缀合物的施用可以包括施用途径,施用途径的非限制性实例包括静脉内、动脉内、皮下、硬膜下、肌内、颅内、胸骨内、肿瘤内或腹膜内。另外,可以通过另外的施用途径,例如通过吸入、经口、皮肤、鼻内或鞘内施用将药物组合物施用给受试者。

[0560] 本公开的组合物和缀合物可以在第一施用以及一次或多次另外施用中施用给有需要的受试者。可以例如在第一施用后的21天、14天、10天、7天、4天或1天的周期中将所述施用施用给有需要的受试者。第一施用后数分钟、数小时、数天、数周或数月,也可将一次或多次另外的施用施用给有需要的受试者。可以例如在第一施用后的小于21天、或小于14天、小于10天、小于7天、小于4天或小于1天将另外施用中的任一者施用给有需要的受试者。一次或多次施用可能每天发生多于一次、每周发生多于一次或每月发生多于一次。

[0561] 治疗方法

[0562] 本文提供的组合物、缀合物和方法可用于治疗受试者的多种疾病、疾患、预防疾病或疾患或有需要的受试者中的其他治疗应用。通常,本文提供的组合物、缀合物和方法可用于治疗自身免疫疾病、炎性疾病或纤维化疾病等。本文提供的组合物、缀合物和方法可用于特异性地靶向与纤维化疾病、自身免疫疾病或自身炎性疾病相关的细胞和/或组织。本文提

供的组合物、缀合物和方法可用于特异性靶向TGFβ1、TGFβR1或TGFβR2。本文提供的组合物、缀合物和方法可用于抑制TGFβR1或TGFβR2。在一个实施方案中,缀合物可以用作TGFβR1抑制剂。在另一个实施方案中,本公开的缀合物可以用作TGFβR2抑制剂。本文公开的疾患可以与抗原在与本文所述疾病有关的特定细胞上的表达相关。通常,细胞表达的抗原可以包含能够被缀合物的抗体构建体识别的细胞外部分。由细胞表达的抗原是可以被本文所述的抗体构建体识别的抗原。缀合物或组合物的抗体构建体可以识别纤维化相关抗原、自身免疫相关抗原或自身炎症相关抗原。例如,抗原可为钙粘素11、PDPN、整联蛋白α4β7、整联蛋白α2β1、MADCAM、肾病蛋白、足蛋白、IFNAR1、BDCA2、CD30、c-KIT、FAP、CD73、CD38、PDGFRβ、整联蛋白αvβ1、整联蛋白αvβ3、整联蛋白αvβ8、GARP、内皮唾酸蛋白、CTGF、整联蛋白αvβ6、CD40、PD-1、TIM-3、TNFR2、DEC205、DCIR、CD86、CD45RB、CD45RO、MHC II类、CD25或其任何片段。抗原可为钙粘素11、LRRC15、PDPN、整联蛋白α4β7、整联蛋白α2β1、MADCAM、肾病蛋白、足蛋白、IFNAR1、BDCA2、CD30、c-KIT、FAP、CD73、CD38、PDGFRβ、整联蛋白αvβ1、整联蛋白αvβ3、整联蛋白αvβ8、GARP、内皮唾酸蛋白、CTGF、整联蛋白αvβ6、CD40、PD-1、TIM-3、TNFR2、DEC205、DCIR、CD86、CD45RB、CD45RO、MHC II类、CD25或其任何片段。抗原可为钙粘素11、LRRC15或FAP。抗原可为钙粘素11、TNFR2或FAP。抗原可为TNFR2。

[0563] 如本文所述,缀合物的抗原结合结构域部分可以被配置为识别由疾病细胞表达的抗原,诸如例如疾病抗原。通常,此类抗原是本领域普通技术人员已知的,或者是新发现与此类疾患有关的、通常与此类疾患有关的和/或此类疾患特有的抗原。例如,疾病抗原是但不限于钙粘素11、PDPN、整联蛋白α4β7、整联蛋白α2β1、MADCAM、肾病蛋白、足蛋白、IFNAR1、BDCA2、CD30、c-KIT、FAP、CD73、CD38、PDGFRβ、整联蛋白αvβ1、整联蛋白αvβ3、整联蛋白αvβ8、GARP、内皮唾酸蛋白、CTGF、整联蛋白αvβ6、CD40、PD-1、TIM-3、TNFR2、DEC205、DCIR、CD86、CD45RB、CD45RO、MHC II类、CD25或其任何片段。疾病抗原还可为钙粘素11、LRRC15、PDPN、整联蛋白α4β7、整联蛋白α2β1、MADCAM、肾病蛋白、足蛋白、IFNAR1、BDCA2、CD30、c-KIT、FAP、CD73、CD38、PDGFRβ、整联蛋白αvβ1、整联蛋白αvβ3、整联蛋白αvβ8、GARP、内皮唾酸蛋白、CTGF、整联蛋白αvβ6、CD40、PD-1、TIM-3、TNFR2、DEC205、DCIR、CD86、CD45RB、CD45RO、MHC II类、CD25或其任何片段。疾病抗原还可为FAP、LRRC15或钙粘素11。疾病抗原可为钙粘素11、TNFR2或FAP。疾病抗原可为TNFR2。

[0564] 纤维化或纤维化疾病的非限制性实例包括粘连性肩关节囊炎、动脉僵硬、关节纤维化、心房纤维化、肝硬化、克罗恩氏病、胶原性纤维瘤、囊性纤维化、韧带样型纤维瘤病、杜普伊特伦挛缩、弹力纤维瘤、心内膜心肌纤维化、腱鞘纤维瘤、胶质瘢痕、特发性肺纤维化、瘢痕疙瘩、纵隔纤维化、骨髓纤维化、项型纤维瘤、肾发生性系统纤维变性、陈旧性心肌梗死、佩罗尼氏病、肺纤维化、进行性大块纤维化、辐射-诱导的肺损伤、腹膜后纤维化、瘢痕和硬皮病/全身性硬化。

[0565] 可以使用根据本公开的方法治疗的疾病的非限制性实例包括急性播散性脑脊髓炎(ADEM)、急性坏死性出血性白质脑炎、艾迪生氏病、无丙种球蛋白血症、脱发、淀粉样变性、强直性脊柱炎(AS)、抗-GBM/抗-TBM肾炎、抗磷脂综合征(APS)、关节炎、自身免疫性血管性水肿、自身免疫再生障碍性贫血、自身免疫性自主神经失调、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身免疫高脂血症、自身免疫性免疫缺陷、自身免疫性内耳病(AIED)、自身免疫性心肌炎、自身免疫性卵巢炎、自身免疫性胰腺炎、自身免疫性视网膜病、自身免疫性



血小板减少性紫癜(ATP)、自身免疫性甲状腺病、自身免疫性荨麻疹、无血管性坏死(骨坏死)\腰痛、轴突和神经元神经病(AMAN)、巴娄病、贝塞特氏病、滑囊炎和其他软组织疾病、大疱性类天疱疮、心肌病、腕管综合征、卡斯曼病(CD)、乳糜泻、查加斯病、慢性疲劳综合征、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病(CIDP)、慢性复发性多灶性骨髓炎(CRMO)、丘-施(Churg-Strauss)、瘢痕性类天疱疮/良性粘膜类天疱疮、科甘氏综合症、冷凝集素病、先天性心脏阻滞、柯萨奇心肌炎、CREST综合征、胶原血管病、CPDD(焦磷酸钙二水合物晶体沉积病)、克罗恩氏病、脱髓鞘性神经病、变性关节病、疱疹样皮炎、皮炎、迪维克氏病(视神经脊髓炎)、糖尿病(I型)、盘状狼疮、DISH(弥漫性特发性骨质增生)、德雷斯勒综合征、子宫内膜异位、嗜酸细胞性食管炎(EoE)、嗜酸细胞性筋膜炎、结节性红斑、原发性混合型冷球蛋白血症、迪皮特朗(dupuytren)、EDS(埃勒斯-当洛斯综合征)、EMS(嗜酸性粒细胞增多症-肌痛综合征)、伊万斯综合征、实验性变应性脑脊髓炎、费氏综合症、纤维肌痛、纤维肌炎、纤维化肺炎、巨细胞性动脉炎(颞动脉炎)、巨细胞性心肌炎、肾小球性肾炎、古德帕斯彻氏综合征、痛风、肉芽肿并多发性血管炎、格雷夫斯氏病、格林-巴利综合征、桥本氏甲状腺炎、溶血性贫血、Henoch-Schonlein紫癜(HSP)、妊娠疱疹或妊娠性类天疱疮(PG)、血丙种球蛋白过少、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜、IgA肾病、IgG4相关性硬化病、免疫调节性脂蛋白、包涵体肌炎(IBM)、感染性关节炎、炎性肠病、间质性膀胱炎(IC)、JH(关节过度活动)、关节炎症、青少年类风湿关节炎、青少年关节炎-其他类型和相关疾患、青少年皮炎、青少年糖尿病(1型糖尿病)、青少年特发性关节炎(JIA)、青少年(JM)肌炎、青少年非炎性病症、青少年银屑病性关节炎、青少年硬皮病、青少年脊柱关节病综合征、青少年全身性红斑狼疮(SLE)、青少年血管炎、川崎病、跖纤维瘤病(迪皮特朗氏足)、兰伯特-伊顿综合征、白细胞破碎性血管炎、扁平苔藓、硬化性苔藓、木样结膜炎、线状IgA病(LAD)、盘状狼疮、红斑狼疮、莱姆病、马凡综合征、MCTD(混合性结缔组织病)、梅尼埃氏病、显微镜下多脉管炎、混合性结缔组织病(MCTD)、摩尔氏溃疡、穆哈-哈伯曼病、多发性硬化、重症肌无力、心肌炎、肌筋膜痛、发作性睡病、视神经脊髓炎、嗜中性白血球减少症、眼疤痕性类天疱疮、视神经炎、骨关节炎、成骨不全症、骨坏死(无血管性坏死)、骨质疏松症、佩吉特氏病、回纹型风湿症(PR)、PANDAS(与链球菌相关的小儿自身免疫性神经精神疾病)、副肿瘤性小脑变性(PCD)、阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)、帕里罗姆贝格综合征、牧师特纳综合征、睫状体扁平部炎(外周葡萄膜炎)、天疱疮、天疱疮/类天疱疮、周围神经病变、静脉周脑脊髓炎、恶性贫血、佩罗尼氏病、POEMS综合征(多发性神经病、器官肿大、内分泌病、单克隆丙种球蛋白病、皮肤变化)、PMR(风湿性多肌痛)、结节性多动脉炎、多关节炎、风湿性多肌痛、多肌炎、心肌梗死后综合征、心包切开术后综合征、原发性胆汁性肝硬化、原发性硬化性胆管炎、黄体酮性皮炎、假痛风、弹性假黄瘤(PXE)、银屑病性关节炎、银屑病、纯红细胞再生障碍(PRCA)、坏疽性脓皮病、雷诺氏反应性关节炎、莱特尔氏(反应性关节炎)、复发性多软骨炎、腹膜后纤维化、风湿热、类风湿关节炎、RLD(躁动腿综合征)、RSD(反射交感性营养不良)、结节病、施密特综合征、巩膜炎、斯耶格伦氏综合征、软组织疾病、精子和睾丸自身免疫性、脊髓狭窄、僵硬人综合征(SPS)、斯蒂尔氏病、亚急性细菌性心内膜炎(SBE)、Susac综合征、交感性眼炎(SO)、高安氏动脉炎、颞动脉炎/巨细胞动脉炎、血小板减少性紫癜(TTP)、Tolosa-Hunt综合征(THS)、横贯性脊髓炎、颞动脉炎、TMJ(颞下颌关节)问题、甲状腺炎、I、II和III型自身免疫性多腺综合征、溃疡性结肠炎、未分化结缔组织病(UCTD)、未分化性血清阴性脊柱关节病、葡萄膜炎、

韦格纳氏肉芽肿病、血管炎、水疱性皮肤病和白癜风。

[0566] 在一些实施方案中,类风湿关节炎使用本文所述的缀合物治疗。在一些实施方案中,抗体缀合物特异性结合钙粘素11。在一些实施方案中,抗体缀合物特异性结合PDPN。

[0567] 在一些实施方案中,炎性肠病例如克罗恩氏病和溃疡性结肠炎使用本文所述的抗体缀合物治疗。在一些实施方案中,抗体缀合物结合至整联蛋白 $\alpha 4\beta 7$ 。在一些实施方案中,抗体缀合物结合至整联蛋白 $\alpha 2\beta 1$ 。在一些实施方案中,抗体缀合物结合至MADCAM。

[0568] 在一些实施方案中,全身性红斑狼疮使用本文所述的抗体缀合物治疗。在一些实施方案中,抗体缀合物结合至肾病蛋白。在一些实施方案中,抗体缀合物结合至足蛋白。在一些实施方案中,抗体缀合物结合至PDPN。在一些实施方案中,抗体缀合物结合至IFNAR1。在一些实施方案中,抗体缀合物结合至BDCA2。在一些实施方案中,抗体缀合物结合至CD30。

[0569] 在一些实施方案中,肥大细胞增多症或色素性荨麻疹使用本文所述的抗体缀合物治疗。在一些实施方案中,抗体缀合物结合至c-KIT。

[0570] 在一些实施方案中,多发性硬化使用本文所述的抗体缀合物治疗。

[0571] 在一些实施方案中,硬皮病或全身性硬化使用本文所述的抗体缀合物治疗。

[0572] 在一些实施方案中,移植物抗宿主疾病和移植排斥使用本文所述的抗体缀合物治疗。

[0573] 在一些实施方案中,哮喘使用本文所述的抗体缀合物治疗。

[0574] 在一些实施方案中,强直性脊柱炎使用本文所述的抗体缀合物治疗。

[0575] 在一些实施方案中,银屑病使用本文所述的抗体缀合物治疗。

[0576] 在一些实施方案中,1型糖尿病使用本文所述的抗体缀合物治疗。

[0577] 在一些实施方案中,纤维化使用本文所述的抗体缀合物治疗。在一些实施方案中,抗体缀合物特异性结合FAP、LRRC15或钙粘素11。在一些实施方案中,抗体缀合物特异性结合FAP。在一些实施方案中,抗体缀合物特异性结合LRRC15。在一些实施方案中,抗体缀合物特异性结合TNFR2。在一些实施方案中,抗体缀合物特异性结合钙粘素11。

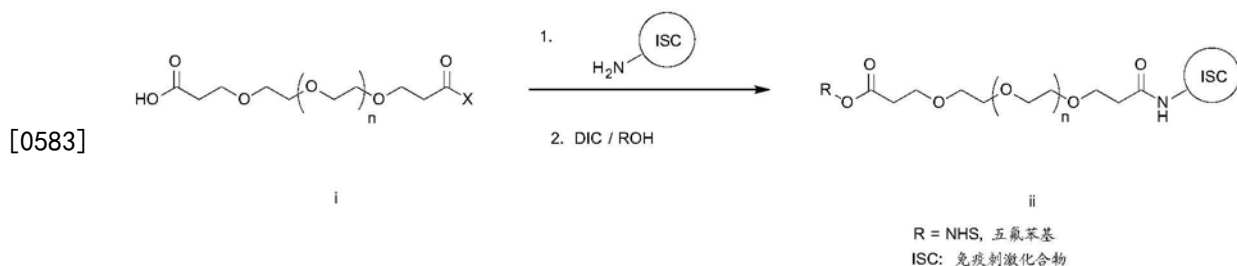
[0578] 本发明提供了本文公开的用于通过疗法治疗人体或动物体的方法的任何治疗性化合物或缀合物。疗法可以通过本文公开的任何机制,诸如通过刺激免疫系统进行。本发明提供了本文公开的用于刺激免疫系统、疫苗接种或免疫疗法(包括例如增强免疫响应)的任何治疗性化合物或缀合物。本发明还提供了本文公开的用于预防或治疗本文公开的任何疾患的任何治疗性化合物或缀合物,例如癌症、自身免疫疾病、炎症、败血症、过敏、哮喘、移植排斥、移植物抗宿主病、免疫缺陷或传染病(通常由传染病原体引起)。本发明还提供了本文公开的用于获得针对本文公开的任何疾患的本文公开的任何临床结果(诸如在体内减少肿瘤细胞)的任何治疗性化合物或缀合物。本发明还提供了本文公开的任何治疗性化合物或缀合物在制备用于预防或治疗本文公开的任何疾患的药物中的用途。

[0579] 一般方案

[0580] 合成免疫-刺激化合物-接头和免疫调节化合物-接头构建体

[0581] 接头和免疫刺激化合物或免疫调节化合物(命名为ISC)的构建体可以通过各种方法合成。例如,可以如方案B1所示合成ISC-接头构建体。

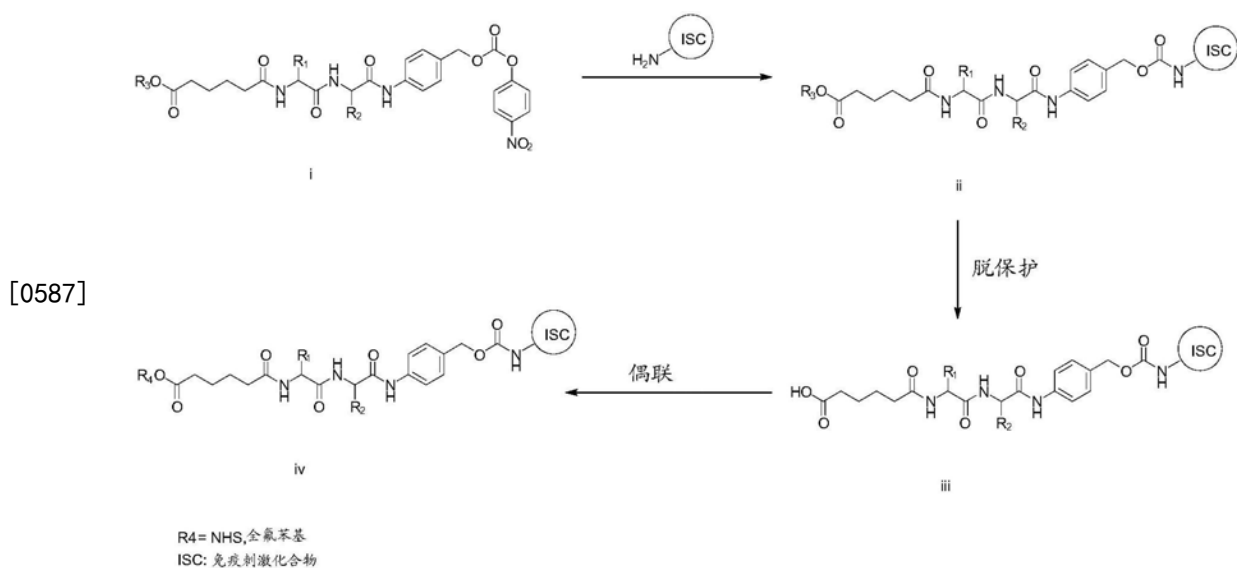
[0582] 方案B1:



[0584] 已被激活用于酰胺键形成的聚乙二醇化羧酸 (i) 可以与适当取代的含胺的免疫刺激化合物反应以提供中间体酰胺。激活的酯 (ii) 的形成可以通过在偶联剂诸如二异丙基碳二亚胺 (DIC) 的存在下, 使用试剂诸如N-羟基琥珀酰亚胺或五氟苯酚使中间体含酰胺的羧酸反应以提供化合物 (ii) 来实现。

[0585] 可以如方案B2中所示合成ISC-接头构建体。

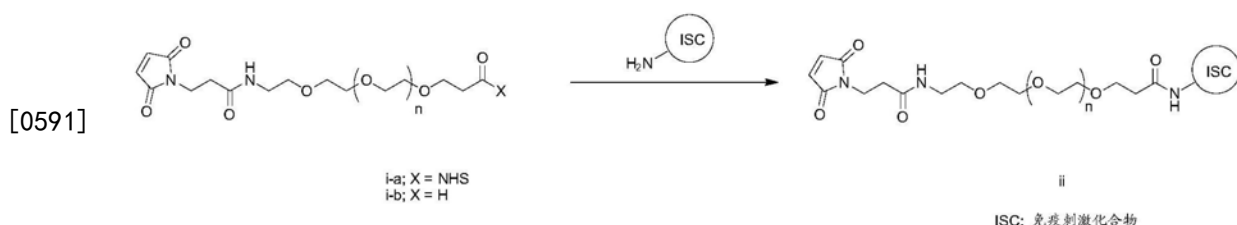
[0586] 方案B2:



[0588] 激活的碳酸酯可以 (i) 与适当取代的含胺免疫刺激化合物反应, 以提供可以基于R<sub>3</sub>酯基团的性质使用标准方法脱保护的氨基甲酸酯 (ii)。然后将所得的羧酸 (iii) 偶联至激活剂诸如N-羟基琥珀酰亚胺或五氟苯酚以提供化合物 (iv)。

[0589] 可以如方案B3中所示合成ISC-接头构建体。

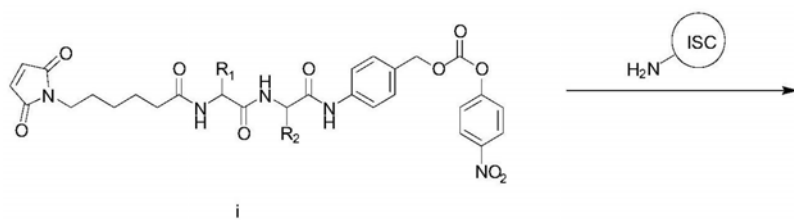
[0590] 方案B3:



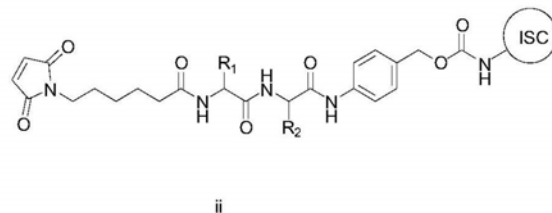
[0592] 激活的羧酸酯 (i-a) 可以与适当取代的含胺的免疫刺激化合物反应以得到酰胺 (ii)。或者, 可以在酰胺键形成剂诸如二环己基碳二亚胺 (DCC) 的存在下, 将类型 (i-b) 的羧酸偶联至适当取代的含胺的免疫刺激化合物, 以提供所需的ISC。

[0593] ISC-接头构建体可以通过诸如方案B4中所示的各种方法合成。

[0594] 方案B4:



[0595]

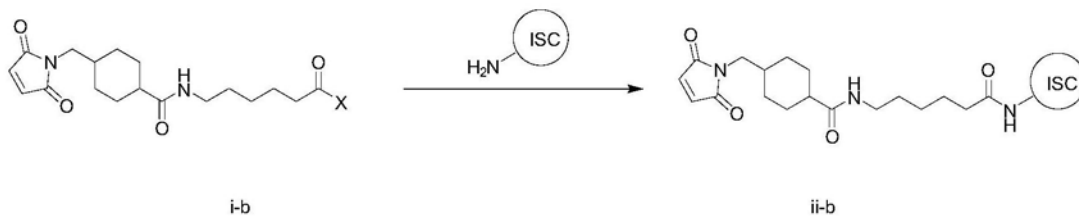
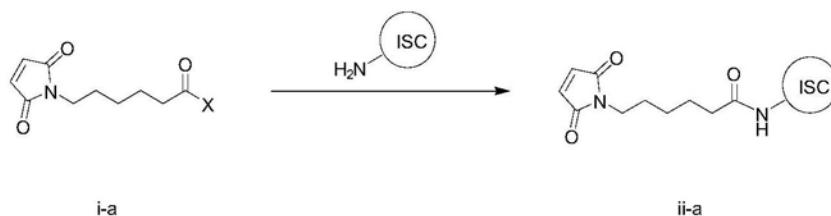


ISC: 免疫刺激化合物

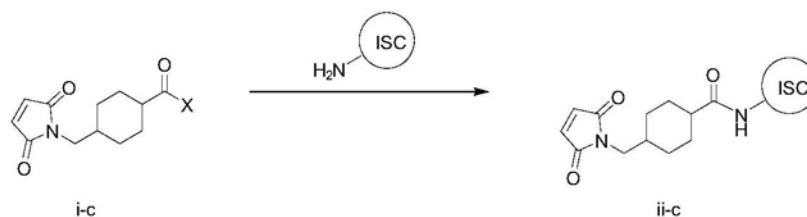
[0596] 激活的碳酸酯, 诸如: (i) 可以与适当取代的含胺的免疫刺激化合物反应, 以得到氨基甲酸酯 (ii) 作为靶ISC。

[0597] ISC-接头构建体也可以如方案B5中所示合成。

[0598] 方案B5:



[0599]



ISC: 免疫刺激化合物

[0600] 激活的羧酸诸如 (i-a、i-b、i-c) 可以与适当取代的含胺的免疫刺激化合物反应, 以得到酰胺 (ii-a、ii-b、ii-c) 作为目标连接的免疫-刺激性-化合物。

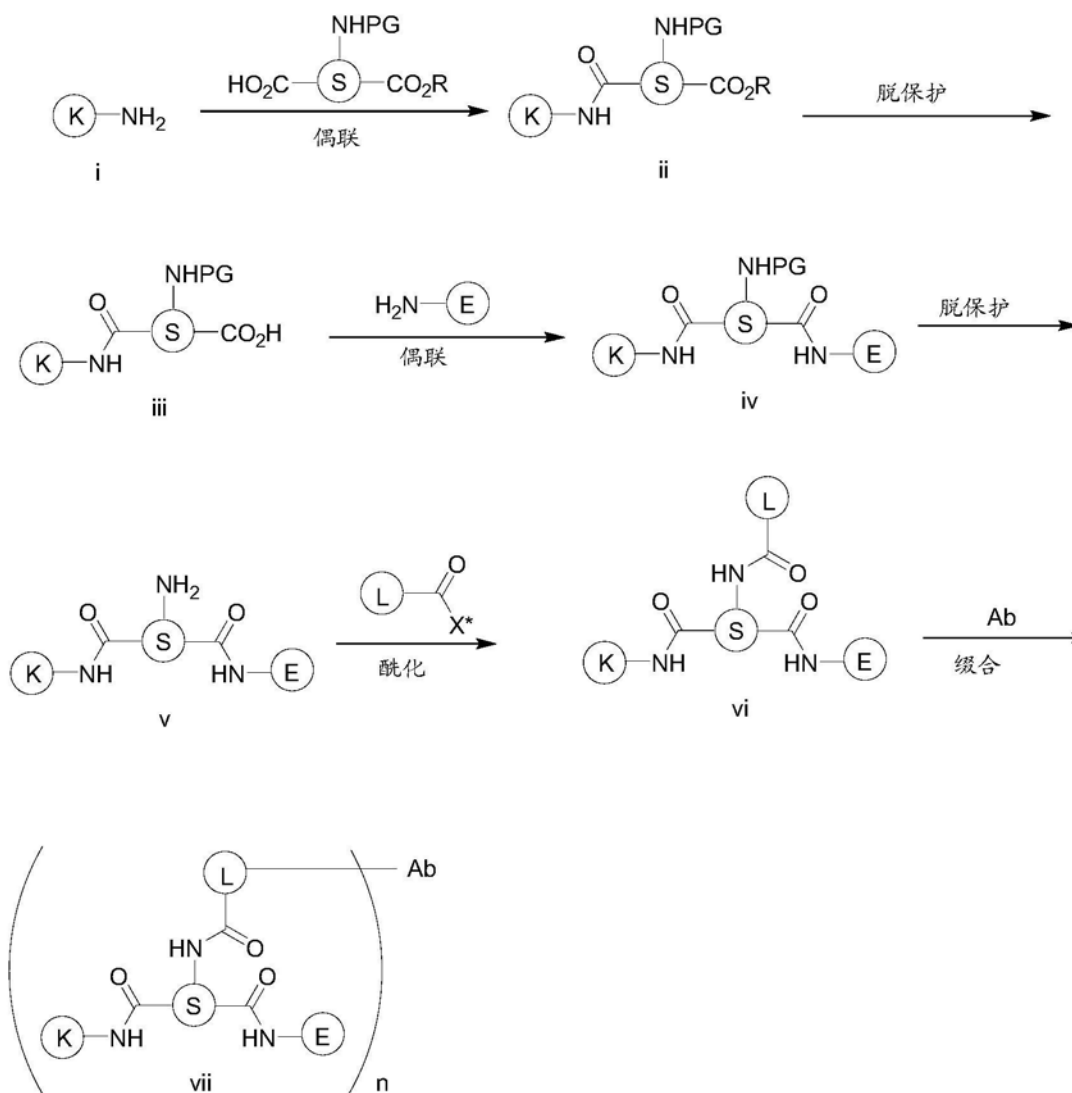
[0601] 用于合成含有PROTAC的免疫调节缀合物的一般方案

[0602] 含有如本文所述的PROTAC (或PTM) 的免疫调节缀合物可以包含经由接头 (L) 共价附接至PROTAC的抗体构建体Ab (诸如抗体), 其中PROTAC包含泛素E3连接酶结合基团 (E; 也

称为ULM)、间隔子(S)和免疫调节化合物(K;也称为IMC)(诸如激酶抑制剂)。通式是:Ab—(L—(C<sub>1</sub>—S—C<sub>2</sub>))<sub>n</sub>,其中Ab是抗体构建体,C<sub>1</sub>—S—C<sub>2</sub>是PROTAC或PTM,其中C<sub>2</sub>是共价结合至间隔子基团(s)的E3泛素连接酶结合基团(E或ULM),所述间隔子基团(s)共价结合至C<sub>1</sub>(一种免疫调节化合物(E或IMC)),并且L是共价键合至抗体构建体和至PROTAC的接头;并且n具有约1至约8的值。

[0603] 在以下示例性方案中,免疫调节化合物(该方案中的E)是激酶抑制剂。

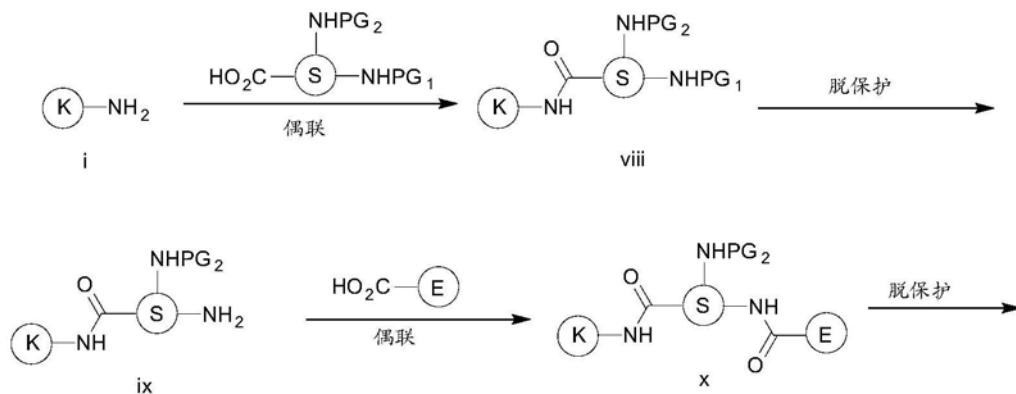
[0604] 方案1:



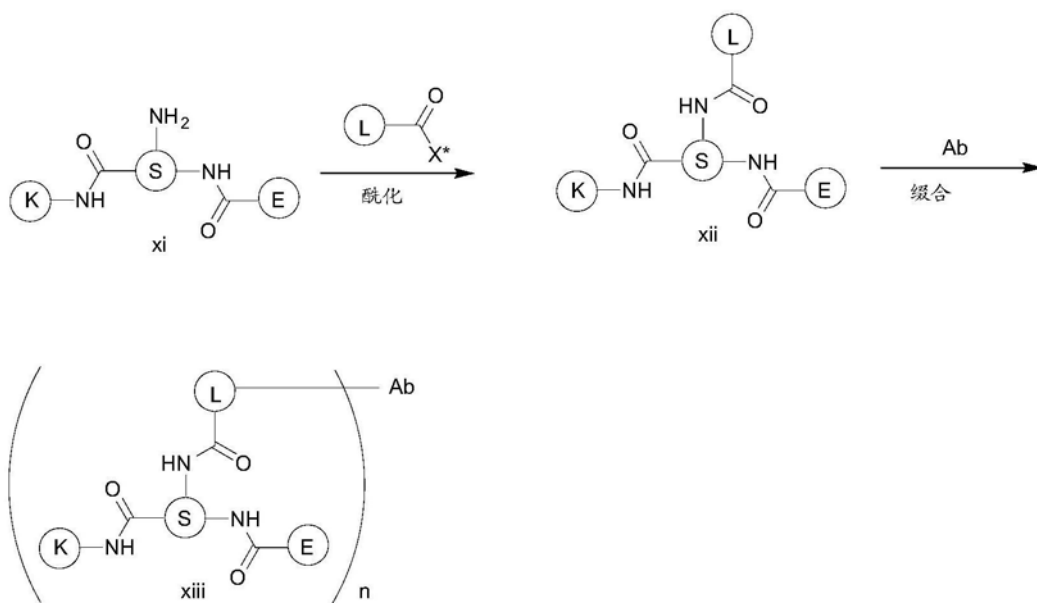
[0606] 可以使用标准酰胺键偶联反应诸如DMF中的HATU和胺碱,用多功能氨基酸衍生物诸如天冬氨酸或谷氨酸将含有游离胺官能团的激酶抑制剂酰化,以提供中间体(ii)。当R=Bn时使用已知的将羧酸酯转化为羧酸的方法(诸如氢化)对化合物(ii)进行脱保护,可提供化合物(iii),该化合物可偶联至E3泛素连接酶,诸如结合VHL或小脑蛋白以提供PROTAC(iv)的基团。结合VHL的化合物可以是羟脯氨酸化合物,诸如在WO 2013/106643中公开的那些,以及在US 2016/0045607、WO 2014/187777、US 2014/0356322和US 9,249,153中描述的其他化合物。结合至小脑蛋白的化合物包括沙利度胺、来那度胺、泊马度胺及其类似物。结合至小脑蛋白的其他小分子化合物也是已知的,例如,如在US 2016/0058872和US2015/0291562中公开的化合物。当PG=Boc时,可以使用适当的试剂(诸如TFA)将胺保护基转化为

中间体(v)。通过激活的接头试剂( $X^*=NHS$ )或通过直接的酰胺键偶联将胺(v)酰化可以提供连接的PROTAC(L-C)化合物(vi),其随后可以使用如本文所述的已知方法缀合至抗体。

[0607] 方案2:



[0608]



[0609] 可替代地,可以使用标准酰胺键偶联反应诸如DMF中的HATU和胺碱,用多功能氨基酸衍生物诸如赖氨酸将含有游离胺官能团的激酶抑制剂酰化,以提供中间体(vii)。当 $R=Cbz$ 时使用已知的方法诸如氢化对化合物(vii)进行脱保护可提供化合物(ix),该化合物可偶联至E3泛素连接酶,以提供PROTAC(x)。当 $PG=Boc$ 时,可以使用适当的试剂(诸如TFA)将第二个胺保护基( $PG_2$ )转化为中间体(v)。通过激活的接头试剂( $X^*=NHS$ )或通过直接酰胺键偶联将胺(xi)酰化可以提供连接的PROTAC化合物(xii),随后可以使用如本文所述的已知方法将其偶联至抗体。

[0610] 附图描述

[0611] 图1A描绘了包含抗体构建体、接头(L)、免疫调节化合物(C1;黑星)、间隔子(S)和第二化合物(C2;灰星)的示例性缀合物。缀合物的灰色部分是抗体的重链,而缀合物的白色部分是抗体的轻链。接头和间隔子之间以及间隔子与C1和C2之间的实心黑线表示共价键。

[0612] 图1B描绘了包含抗体构建体、接头(L)、免疫调节化合物(C1;黑星)、间隔子(S)和第二化合物(C2;灰星)的示例性缀合物。缀合物的灰色部分是抗体的重链,而缀合物的白色部分是抗体的轻链。接头和C2之间以及间隔子和C1之间的实心黑线表示共价键。

[0613] 图1C描绘了包含抗体构建体、接头(L)、免疫调节化合物(C1;黑星)、间隔子(S)和第二化合物(C2;灰星)的示例性缀合物。缀合物的灰色部分是抗体的重链,而缀合物的白色部分是抗体的轻链。接头和C1之间以及间隔子和C2之间的实心黑线表示共价键。

[0614] 图2显示了与单独的对照抗体和抗地高辛缀合物(经由可切割接头附接至TGF $\beta$ R抑制剂的抗地高辛抗体)对照相比,LRRC15缀合物(经由可切割接头附接至TGF $\beta$ R抑制剂的LRRC15抗体)对TGF $\beta$ /SMAD信号传导途径的抑制。对照(抗地高辛抗体通过可切割接头与TGF $\beta$ R抑制剂连接)。结果表明,LRRC15-TGF $\beta$ R抑制剂缀合物抑制TGF $\beta$ 诱导后的TGF $\beta$ /SMAD信号传导途径(最黑线;三角形),而LRRC15对照抗体(中线;实心圆)和抗地高辛抗体-TGF $\beta$ R抑制剂对照缀合物(最浅灰色线;空心圆)没有显著抑制该信号传导途径。y轴以5的间隔标记为0至25,以用于诱导倍数。x轴以对数间隔标记为1至1000以用于药物(nM)。

[0615] 图3A显示了通过TGF $\beta$ R2-VHL PROTAC抗-HER2抗体缀合物降解TGF $\beta$ R2的测定结果。将表达HER2的质粒转染到HEK293细胞中,并用DMSO、PROTAC T-20、HER2抗体(IgG1)或Her2抗体-Protac缀合物(050-T11020)处理细胞。在2小时(左印迹)、24小时(中间印迹)或48小时(右印迹)孵育后,从细胞中制备全细胞裂解物,并用BCA测定进行定量。将等量的裂解物在蛋白质凝胶上跑,转移到PVDF,并使用可商购获得的试剂检测TGF $\beta$ R2(上)、TGF $\beta$ R1(中)或对照肌动蛋白(下)。在两种测试的缀合物浓度下,如通过在含有050-T11020的泳道中TGF $\beta$ R2信号均降低证明的,在处理24和48小时时靶TGF $\beta$ R2的水平降低。对于2小时印迹,从左至右,泳道表示DMSO;T-20 5 $\mu$ M;050IgG 1 $\mu$ M;050-T11020 1 $\mu$ M;和050-T11020 0.5 $\mu$ M。对于24小时印迹,从左至右,泳道表示DMSO;T-20 5 $\mu$ M;050IgG 0.5 $\mu$ M;050IgG 1 $\mu$ M;050-T11020 0.5 $\mu$ M;和050-T11020 1 $\mu$ M。对于48小时印迹,从左至右,泳道表示PBS;050IgG 1 $\mu$ M;050-T11020 1 $\mu$ M;和050-T11020 0.5 $\mu$ M。

[0616] 图3B提供了图3A所示的TGF $\beta$ R2的蛋白质印迹数据的定量。为了定量蛋白质降解的量,将蛋白质印迹上的信号调整至肌动蛋白负载对照,并且数据以y轴上匹配对照的百分比表示,其以20为间隔标记为0至140。黑色粗线表示100%。每个数据集左侧的中灰条表示在处理2小时获得的数据。每个数据集中间的最深灰条表示在24小时获得的数据。每个数据集右侧的最浅灰条表示在48小时获得的数据。在x轴上,从左到右,数据集是T20 5 $\mu$ M;050-11020 0.5 $\mu$ M;以及050-11020 1 $\mu$ M。

[0617] 图3C提供了TGF $\beta$ R1的蛋白质印迹数据的定量。为了定量蛋白质降解的量,将蛋白质印迹上的信号调整至肌动蛋白上样对照,并且数据以y轴上匹配对照的百分比表示,其以20为间隔标记为0至200。每个数据集左侧的中灰条表示在处理2小时获得的数据。每个数据集中间的最深灰条表示在24小时获得的数据。每个数据集右侧的最浅灰条表示在48小时获得的数据。在x轴上,从左到右,数据集是T20 5 $\mu$ M;050-11020 0.5 $\mu$ M;和050-11020 1 $\mu$ M。与蛋白质印迹数据一致,在整个治疗期间,TGF $\beta$ R1蛋白的量保持相当恒定。

[0618] 图4A和图4B显示了通过含具有VHL或小脑蛋白E3结合部分的PROTAC的抗体缀合物对TGF $\beta$ R2进行抗原靶向降解的测定结果。将BT474细胞涂铺并在第二天用PROTAC(T-15或T-20)、HER2抗体-TGF $\beta$ R2-VHL结合PROTAC(050-T05020;T-20PROTAC)的缀合物、HER2抗体-TGF $\beta$ R2-小脑蛋白结合PROTAC(050-T05015;T-15PROTAC)的缀合物、或TROP2抗体-TGF $\beta$ R2-VHL结合PROTAC(130-T05020;T-20PROTAC)的缀合物处理。在处理24小时制备全细胞裂解物,并用BCA测定法定量。将等量的裂解物在蛋白质凝胶上跑,转移至PVDF,并使用可商购获得

的试剂检测TGF $\beta$ R2和肌动蛋白。图4A显示了在两种HER2结合PROTAC缀合物的情况下发现HER2-抗原特异性降解,但在对照TROP2-结合PROTAC缀合物或单独的T-15或T-20PROTACS的情况下均未发现HER2-抗原特异性降解,如通过TGF $\beta$ R2蛋白的保留信号(顶部印迹;肌动蛋白对照是底部印迹)所示。泳道从左到右表示DMSO;T-15 300nM;T-20 300nM;PBS;未标记;050-T05015 0.5mM;050-T05020 0.5 $\mu$ M;和130-T05020 0.5 $\mu$ M。

[0619] 图4B提供了来自图4A的TGF $\beta$ R2蛋白水平的定量,并且通过将TGF $\beta$ R2信号归一化至肌动蛋白负载对照来确定。数据表示为在y轴上的媒介物对照的百分比(100%),其以20为间隔标记为0至120。x轴从左到右代表T-15 300nM;T-20 300nM;050-T05015;050-T05020;和130-T05020。黑色粗线位于y轴的100%处。

[0620] 图5A和图5B显示了在添加或不添加蛋白酶体抑制剂的情况下,在存在TGF $\beta$ R2/TGF $\beta$ R1-VHL PROTAC的情况下对TGF $\beta$ R2和TGF $\beta$ R1的细胞水平进行测定的结果。将正常人肺成纤维细胞用或不用蛋白酶体抑制剂MG-132处理,然后添加DMSO或PROTAC T-20。制备全细胞裂解物,然后用BCA测定法定量。将等量的裂解物在蛋白质凝胶上跑,然后转移至PVDF膜。使用可商购获得的试剂检测TGF $\beta$ R1、TGF $\beta$ R2和肌动蛋白。图5A提供了测定法的蛋白质印迹结果。结果表明,蛋白酶体抑制剂的添加保护了TGF $\beta$ R1和TGF $\beta$ R2免受T-20诱导的降解,如通过在PROTAC T-20存在下添加MG-132挽救TGF $\beta$ R2和TGF $\beta$ R2信号所指示。TGF $\beta$ R2是最上行,TGF $\beta$ R1是中间行,肌动蛋白是最下行。左侧印迹泳道从左至右表示MG132浓度为0(显示为-);10;和50,然后添加DMSO。右侧印迹从左到右表示MG132浓度为0(显示为-);10;和50 $\mu$ M,然后添加5 $\mu$ M T-20。

[0621] 图5B提供了对图5A的结果的定量,并且通过将蛋白质信号调节至肌动蛋白负载对照而获得。数据以y轴上匹配的媒介物对照的百分比表示,以10为间隔标记为0至100。浅灰色条表示TGF $\beta$ R2的数据,并且深灰色条表示TGF $\beta$ R1的数据。x-轴从左到右标记为T-20;T-20+10 $\mu$ M MG132;和T-20+50 $\mu$ M MG132。

## 实施例

[0622] 以下实施例说明了制备本文所述的免疫调节化合物、接头、免疫调节化合物和接头的接头-有效载荷(LP)以及缀合物的各种方法。应当理解,本领域技术人员可以通过类似的方法或通过组合本领域技术人员已知的其他方法来制备这些化合物、LP和缀合物。还应理解,本领域技术人员将能够以如下所述的类似方式,通过使用适当的原料并根据需要改变合成途径来进行制备。通常,原料和试剂可以从商业销售商处获得或根据本领域技术人员已知的来源合成或如本文所述制备。

[0623] 实施例1

[0624] 合成免疫调节化合物、接头有效载荷和缀合物

[0625] 将接头与免疫调节化合物诸如PI3K抑制剂、钙调磷酸酶抑制剂、mTOR抑制剂、BTK抑制剂、JAK抑制剂、CRAC抑制剂、PARP1拮抗剂、PPAR $\gamma$ 激动剂、Kv1.3拮抗剂、KCa3.1拮抗剂、PP2A激动剂、IRAK4抑制剂、MYD88抑制剂、BCL-2拮抗剂、A2ar激动剂、TLR7拮抗剂、c-KIT激酶抑制剂、KCa3.1激动剂、TGF $\beta$ R1抑制剂、TGF $\beta$ R2抑制剂、ACC拮抗剂、ASK1拮抗剂、GLI1抑制剂、TNKS拮抗剂或TNIK拮抗剂连接。连接至免疫调节化合物的接头制备了接头-免疫调节化合物(LP)。随后,LP缀合至抗体构建体。诸如抗体以形成抗体构建体免疫调节化合物缀合物

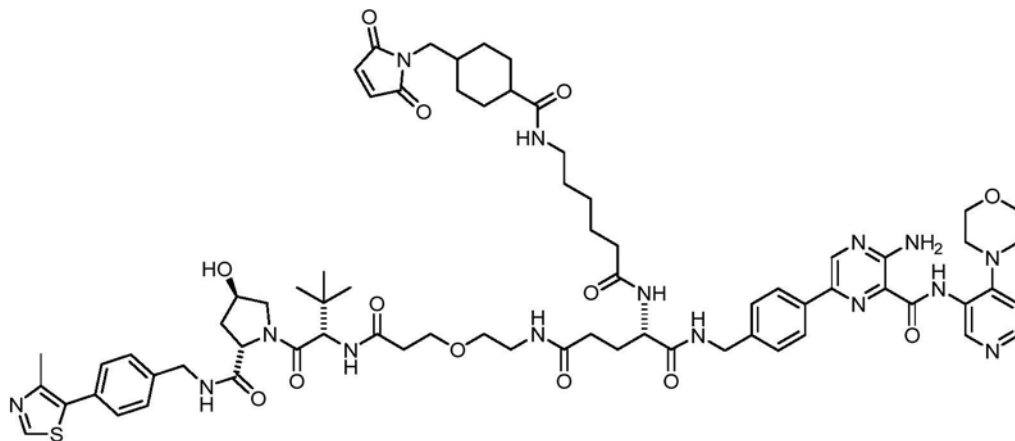


或缀合物。

[0626] TGF $\beta$ R2的抑制剂

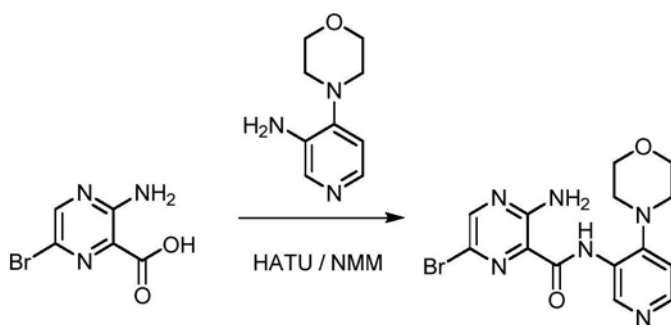
[0627] 实施例1.1合成(S)-N1-(4-(5-氨基-6-((4-吗啉代吡啶-3-基)氨甲酰基)吡嗪-2-基)苄基)-2-(6-(4-((2,5-二氧化-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)甲基)-环己烷-1-甲酰氨基)己酰氨基)-N5-(2-(3-(((S)-1-((2S,4R)-4-羟基-2-((4-(4-甲基噻唑-5-基)苄基)氨甲酰基)吡咯烷-1-基)-3,3-二甲基-1-氧代丁烷-2-基)氨基)-3-氧代丙氧基)乙基)戊二酰胺(化合物1-1)

[0628]



[0629] 步骤A:制备Int 1B-1

[0630]

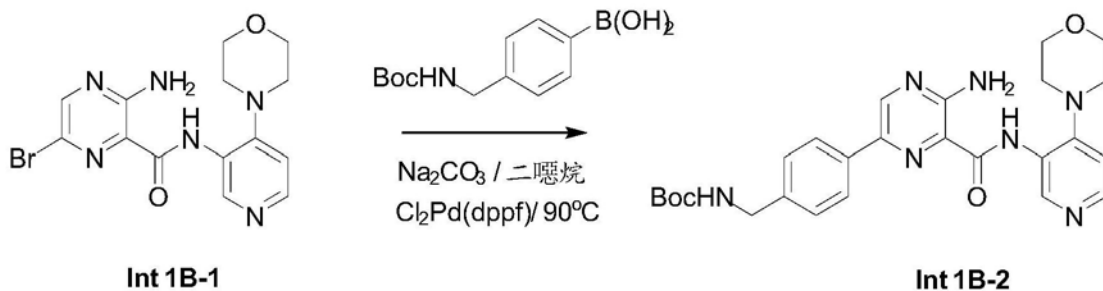


Int 1B-1

[0631] 将HATU (3.54g, 9.36mmol) 添加至含1.64g (7.5mmol) 3-氨基-6-溴吡嗪-2-羧酸的于25mL DMF中的溶液。将反应物搅拌5分钟,然后添加2.5mL (22.5mmol) N-甲基吗啉和1.68g (9.36mmol) 4-吗啉代吡啶-3-胺。将反应混合物搅拌16小时,然后用10mL饱和NH<sub>4</sub>Cl溶液和随后的10mL水猝灭。将混合物用EtOAc萃取3次;将合并的有机物用盐水洗涤,然后经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥。然后蒸发溶剂,并对残余物进行色谱(0%至20%CH<sub>3</sub>OH/二氯甲烷),得到化合物呈黄色固体的Int1B-1。

[0632] 步骤B:制备Int 1B-2

[0633]

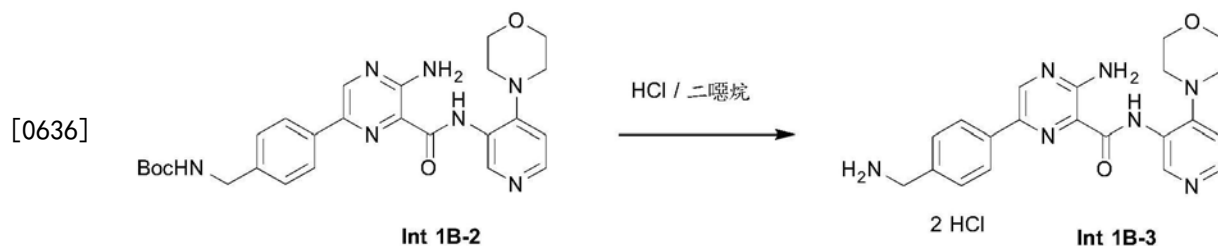


Int 1B-1

Int 1B-2

[0634] 将含有1.5g (4.0mmol) 3-氨基-6-溴-N-(4-吗啉代吡啶-3-基)吡嗪-2-甲酰胺和1.1g (4.4mmol) (4-(2-(((丁氧基)羰基)-氨基)甲基)苯基)硼酸的于25mL二噁烷和4.0mL 2N  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (8.0mmol) 中的溶液脱气并用氮气回充三次。添加295mg (0.4mmol)  $\text{PdCl}_2(\text{dppf})$ ，并将反应容器用氮气脱气两次。然后将反应混合物在90℃下加热3小时，然后冷却并搅拌过夜，然后通过**Celite**<sup>®</sup>塞过滤。将滤液用EtOAc稀释，用水和其后的盐水洗涤，并经 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥。然后蒸发溶剂，并对残余物进行色谱(0%至20%MeOH/二氯甲烷)，得到1.3g呈白色固体的化合物Int 1B-2。LCMS (M+H) = 506。

[0635] 步骤C: 制备Int 1B-3



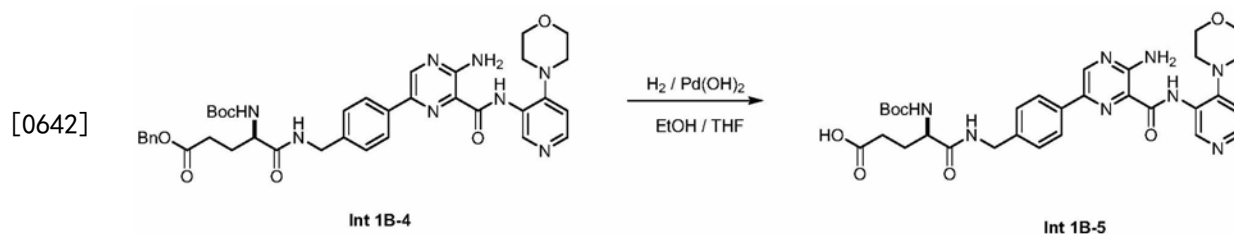
[0637] 在室温下向含有1.2g (2.4mmol) Int 1B-2的于25mL EtOAc中的溶液添加10mL 4N于二噁烷中的HCl。将反应物搅拌3小时，并蒸发溶剂。将所得固体与甲苯一起研磨三次，以提供所需的胺盐，其无需纯化即可使用。LCMS (M+H) = 406。

[0638] 步骤D: 制备Int 1B-4



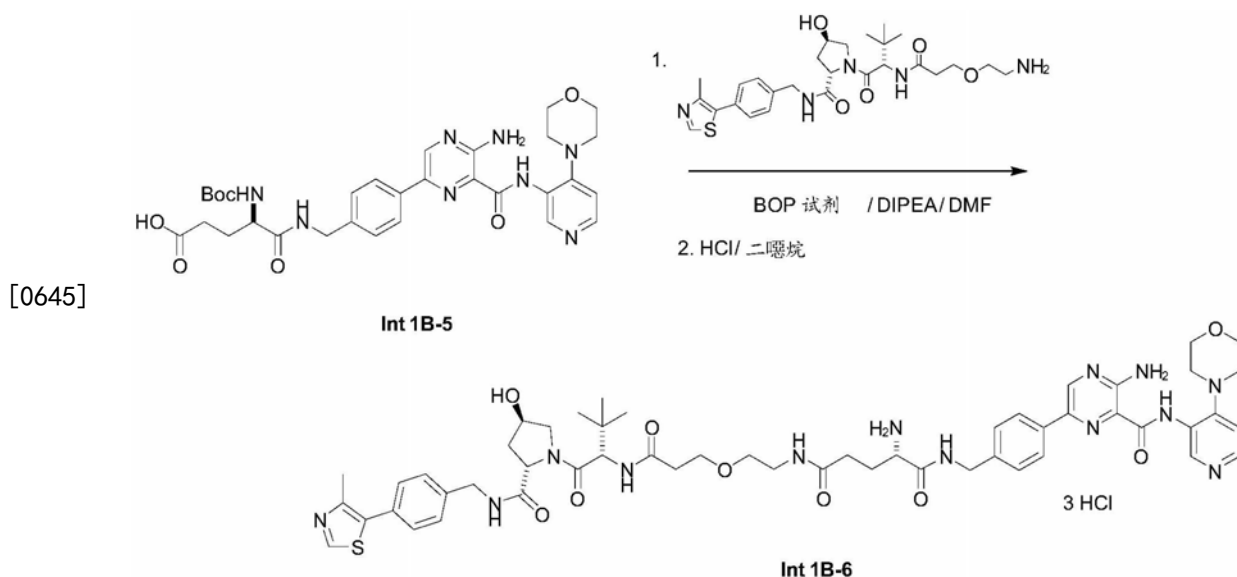
[0640] 向含有112mg (0.276mmol) Int 1B-3和93mg (0.276mmol) Boc-L-谷氨酸5-苄基酯的于2mL DMF中的溶液添加105mg (0.276mmol) HATU和0.06mL (0.55mmol) N-甲基吗啉。将反应混合物搅拌16小时，然后用1mL饱和 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 溶液和1mL水猝灭。将混合物用EtOAc萃取3次；将合并的有机物用盐水洗涤，然后经 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥。然后蒸发溶剂，并对残余物进行色谱(0%至20% $\text{CH}_3\text{OH}$ /二氯甲烷)，得到160mg呈黄色固体的化合物Int 1B-4。LCMS (M+H) = 725。

[0641] 步骤E: 制备Int 1B-5



[0643] 将含有100mg (0.14mmol) Int 1B-4的于20mL 1:1THF-EtOH中的溶液脱气并用氮气回填三次。添加100mg 20% $\text{Pd}(\text{OH})_2$ ，并将混合物再脱气两次。将反应混合物搅拌16小时，然后用EtOAc通过硅藻土过滤。去除溶剂并用甲苯研磨，得到75mg Int 1B-5，其直接用于下一步。LCMS (M+H) = 635。

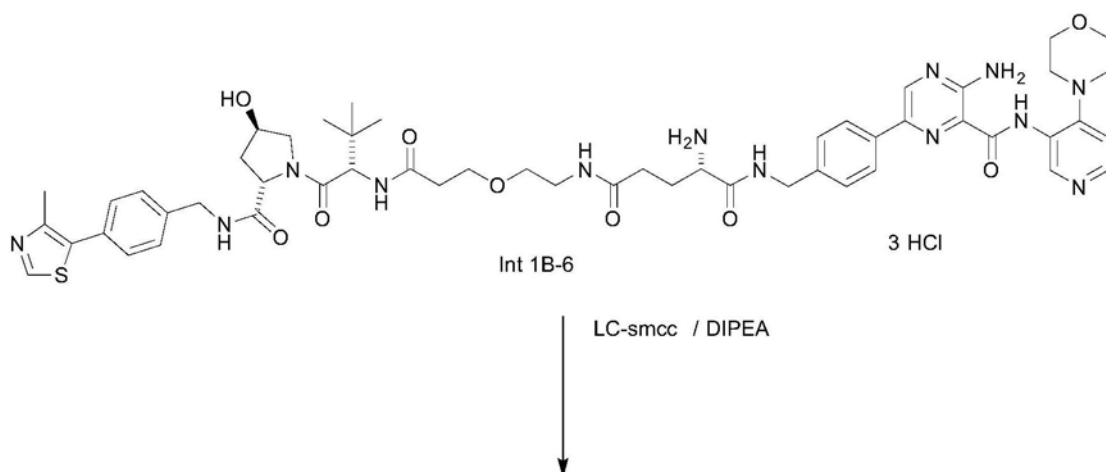
[0644] 步骤F: 制备Int 1B-6



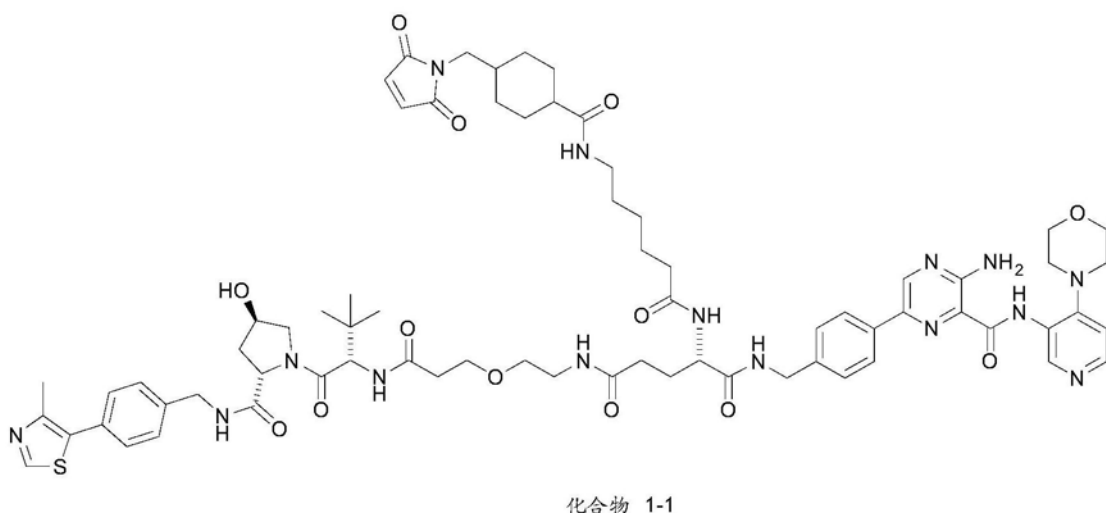
[0646] 向含有75mg (0.12mmol) Int 1B-5和82mg (0.15mmol) (2S,4R)-1-((S)-2-(3-(2-氨基乙氧基)丙酰氨基)-3,3-二甲基丁酰基)-4-羟基-N-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苄基)吡咯烷-2-甲酰胺的于1.0mL DMF中的溶液添加66mg (0.15mmol) BOP试剂和0.026mL (0.24mmol) 二异丙基乙胺。将反应混合物搅拌16小时,然后用1mL饱和 $\text{NaHCO}_3$ 溶液和mL水猝灭。将混合物用EtOAc萃取3次;将合并的有机萃取物用盐水洗涤,然后经 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥。然后蒸发溶剂,并对残余物进行色谱(0%至20% $\text{CH}_3\text{OH}$ /二氯甲烷),得到58mg呈黄色固体的所需化合物,将其立即溶于5mL EtOAc中,然后在室温下用1mL 4N于二噁烷中的HCl处理,并将反应物搅拌3小时。减压去除溶剂,并将残余物与甲苯共沸3次,然后用醚搅拌并过滤,得到43mg呈浅黄色结晶固体的(S)-2-氨基- $\text{N}^1$ -(4-(5-氨基-6-((4-吗啉代吡啶-3-基)氨甲酰基)吡嗪-2-基)苄基)-N5-(2-(3-(((S)-1-((2S,4R)-4-羟基-2-((4-(4-甲基噻唑-5-基)苄基)氨甲酰基)吡咯烷-1-基)-3,3-二甲基-1-氧代丁烷-2-基)氨基)-3-氧代丙氧基)-乙基)戊二酰胺三盐酸盐。LCMS (M+H) = 1062。

[0647] Int 1B-6是PROTAC T-015

[0648] 步骤G:制备化合物1-1



[0649]



[0650] 将含有43mg (0.037mmol) (S)-2-氨基-N<sup>1</sup>-(4-(5-氨基-6-((4-吗啉代吡啶-3-基)氨甲酰基)吡嗪-2-基)苄基)-N5-(2-(3-(((S)-1-((2S,4R)-4-羟基-2-((4-(4-甲基噻唑-5-基)苄基)氨甲酰基)吡咯烷-1-基)-3,3-二甲基-1-氧代丁烷-2-基)氨基)-3-氧代丙氧基)乙基)戊二酰胺三盐酸盐的溶液与(16mg, 0.037mmol) LC-smcc (琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1-羧基-(6-酰氨基己酸酯))在1.5mL DCM和DIPEA (0.064mL, 0.36mmol)中合并。搅拌过夜后,反应物变得浑浊,并且LCMS表明存在产物。将反应物浓缩,然后溶于最少量的THF和水中。将混合物用饱和NaHCO<sub>3</sub>中和,并对混合物进行色谱(30g, C18, H<sub>2</sub>O至CH<sub>3</sub>CN, 液体负载),以在CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O冻干后,提供呈黄色固体的化合物1-1 (31.8, mg)。<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ9.46 (s, 1H), 8.84 (s, 1H), 8.78 (s, 1H), 8.26 (d, J=8.5Hz, 1H), 8.03 (d, J=8.5Hz, 2H), 7.44 (d, J=8.5Hz, 2H), 7.41 (d, J=8.4Hz, 2H), 7.35 (d, J=8.4Hz, 2H), 7.26 (d, J=5.5Hz, 1H), 6.78 (s, 2H), 4.66 (s, 1H), 4.59 (m, 2H), 4.46 (t, J=7.0Hz, 4H), 4.37 (m, 2H), 3.88 (d, J=11.5Hz, 1H), 3.81-3.70 (m, 5H), 3.69 (t, J=5.5Hz, 2H), 3.55-3.49 (m, 3H), 3.11 (t, J=11.5Hz, 2H), 3.10-3.01 (m, 5H), 2.50 (t, J=15.0Hz, 2H), 2.33 (s, 3H), 2.35-2.22 (m, 6H), 2.11-2.01 (m, 4H), 1.94 (m, 1H), 1.76-1.58 (m, 8H), 1.50-1.25 (m, 8H), 1.11 (s, 9H), 1.05-0.95 (m, 4H)。LCMS (M+H) = 1395.6。

[0651] 表3、表4和表5中的以下化合物以类似于合成化合物1-1所述的方式通过在步骤B中取代适当芳基硼酸和在步骤E中取代E3连接酶配体/间隔子基团来制备。

[0652] 表3: 示例性化合物

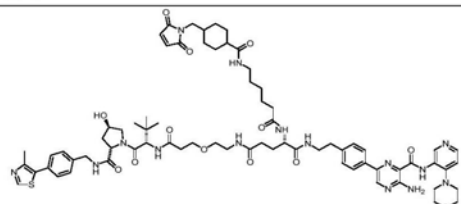
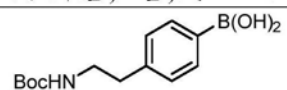
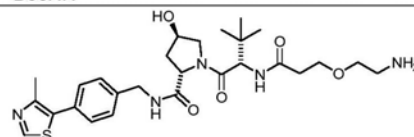
化合物	1-2	1-3
结构		
IUPAC 名称	(S)-N1-(4-(5-氨基-6-((4-吗啉代吡啶-3-基)氨基甲酰基)吡嗪-2-基)苄基)-2-(6-(4-((2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)甲基)环己烷-1-甲酰氨基)己酰氨基)-N5-(2-(((S)-1-((2S,4R)-4-羟基-2-((4-(4-甲基噻唑-5-基)苄基)氨基甲酰基)吡咯烷-1-基)-3,3-二甲基-1-氧代丁烷-2-基)氨基)-2-氧代乙基)戊二酰胺	(S)-N1-(4-(5-氨基-6-((4-吗啉代吡啶-3-基)氨基甲酰基)吡嗪-2-基)苄基)-2-(6-(4-((2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)甲基)环己烷-1-甲酰氨基)己酰氨基)-N5-(2-(2-(3-(((S)-1-((2S,4R)-4-羟基-2-((4-(4-甲基噻唑-5-基)苄基)氨基甲酰基)吡咯烷-1-基)-3,3-二甲基-1-氧代丁烷-2-基)氨基)-3-氧代丙基)乙氧基)乙基)戊二酰胺
ArB(OH) <sub>2</sub>		
E3 配体		
M+I	1336	1438

[0654] 表4: 示例性化合物

化合物	1-4	1-5
结构		
IUPAC 名称	(S)-N1-(4-(5-氨基-6-((4-吗啉代吡啶-3-基)氨基甲酰基)吡嗪-2-基)苄基)-2-(6-(4-((2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)甲基)环己烷-1-甲酰氨基)己酰氨基)-N5-(2-(((S)-1-((2S,4R)-4-羟基-2-((4-(4-甲基噻唑-5-基)苄基)氨基甲酰基)吡咯烷-1-基)-3,3-二甲基-1-氧代丁烷-2-基)氨基)-2-氧代乙基)戊二酰胺	(S)-N1-(4-(5-氨基-6-((4-吗啉代吡啶-3-基)氨基甲酰基)吡嗪-2-基)苄基)-2-(6-(4-((2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)甲基)环己烷-1-甲酰氨基)己酰氨基)-N5-(2-(2-(3-(((S)-1-((2S,4R)-4-羟基-2-((4-(4-甲基噻唑-5-基)苄基)氨基甲酰基)吡咯烷-1-基)-3,3-二甲基-1-氧代丁烷-2-基)氨基)-3-氧代丙基)乙氧基)乙基)戊二酰胺
ArB(OH) <sub>2</sub>		
E3 配体		
M+I	1350	1452

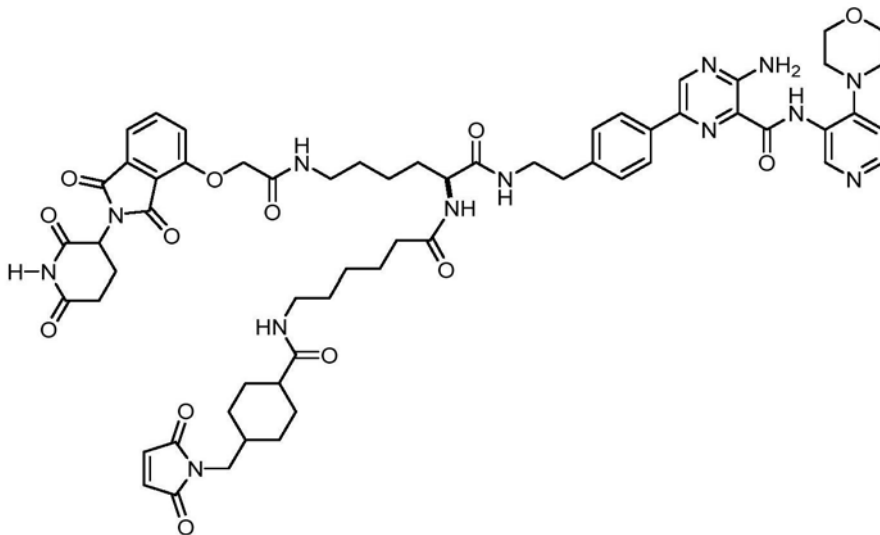
[0656] 表5: 示例性化合物

[0657]

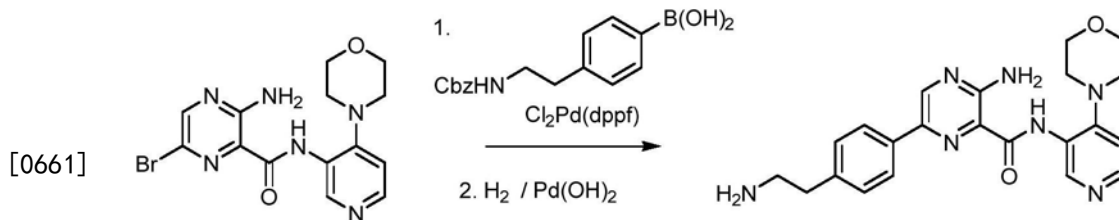
化合物	1-6	
结构		
IUPAC 名称	(S)-N1-(4-(5-氨基-6-((4-吗啉代吡啶-3-基)氨甲酰基)吡嗪-2-基)苯乙基)-2-(6-(4-((2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)甲基)环己烷-1-甲酰氨基)己酰氨基)-N5-(2-(3-(((S)-1-((2S,4R)-4-羟基-2-((4-(4-甲基噻唑-5-基)苄基)氨甲酰基)吡咯烷-1-基)-3,3-二甲基-1-氧代丁烷-2-基)氨基)-3-氧代丙氧基)乙基)戊二酰胺	
ArB(OH) <sub>2</sub>		
E3 配体		
M+1	1408	

[0658] 实施例1.2.合成3-氨基-6-(4-(2-((2S)-2-(6-(4-((2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)甲基)环己烷-1-甲酰氨基)己酰氨基)-6-(2-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1,3-二氧代异吲哚啉-4-基)氧基)乙酰氨基)己酰氨基)乙基)苯基)-N-(4-吗啉代吡啶-3-基)吡嗪-2-甲酰胺(化合物2-1)

[0659]



[0660] 步骤A:制备Int 7B-1

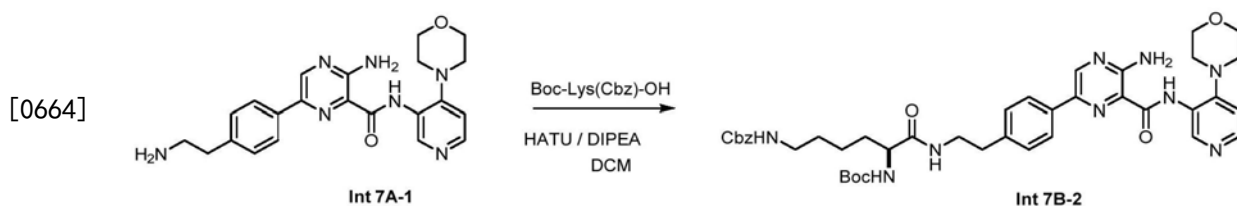


Int 1B-1

Int 7B-1

[0662] 将含有3.0g (8.0mmol) 3-氨基-6-溴-N-(4-吗啉代吡啶-3-基)吡嗪-2-甲酰胺和2.6g (8.8mmol) (4-(2-(((丁氧基)羰基)-氨基)乙基)苯基)硼酸的于50mL二噁烷和8mL 2N  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (16.0mmol) 中的溶液脱气,并用氮气回填三遍。添加600mg (0.8mmol)  $\text{PdCl}_2(\text{dppf})$ ,并将反应容器用氮气脱气两次。然后将反应混合物在90℃下加热3小时,然后冷却并搅拌过夜,然后通过**Celite**®塞过滤。将滤液用EtOAc稀释,用水洗涤,然后用盐水洗涤,并经 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥。然后蒸发溶剂,并对残余物进行色谱(0%至20%MeOH/二氯甲烷),得到2.5g呈棕色固体的化合物Int 1.2a。将该物质溶解在100mL的1:1THF:EtOH中,脱气并用氮气回填3次。添加500mg 20% $\text{Pd}(\text{OH})_2$ ,并将混合物再脱气两次。将反应混合物搅拌16小时,然后用EtOAc通过硅藻土过滤。去除溶剂,得到2.0g Int 7B-1,将其直接用于下一步。LCMS (M+H) = 420。

[0663] 步骤B:制备Int 7B-2

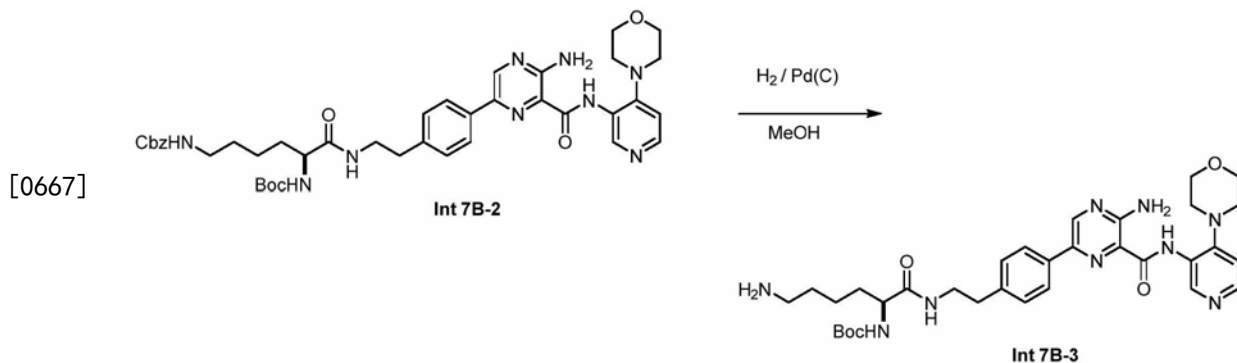


Int 7A-1

Int 7B-2

[0665] 向含有228mg (0.60mmol) Boc-L-Lys (Z)-OH的于5mL DMF中的溶液添加228mg (0.60mmol) HATU,并将反应物搅拌5分钟,然后添加210mg (0.50mmol) Int 7B-1和121mg (1.2mmol) N-甲基吗啉。将反应混合物搅拌3小时,然后用5mL饱和 $\text{NaHCO}_3$ 溶液和2mL水猝灭。将混合物用EtOAc萃取3次;将合并的有机物用盐水洗涤,然后经 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥。然后蒸发溶剂,并对残余物进行色谱(0%至20% $\text{CH}_3\text{OH}$ /二氯甲烷),得到190mg呈黄色固体的化合物Int 7B-2。LCMS (M+H) = 782。

[0666] 步骤C:制备Int 7B-3



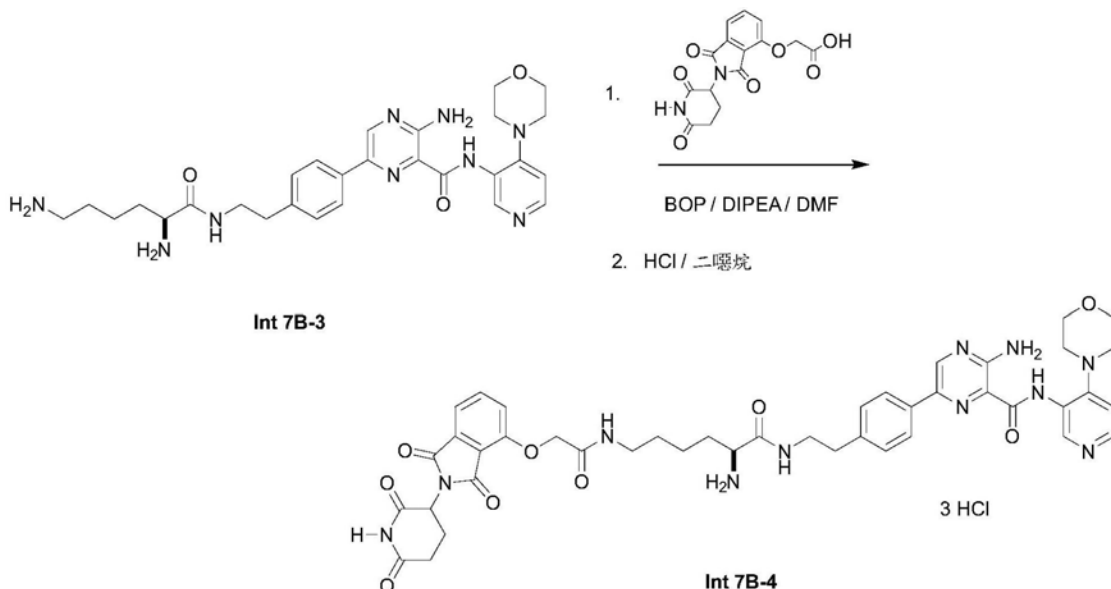
Int 7B-2

Int 7B-3

[0668] 将含有164mg (0.21mmol) Int 7B-2的于10mL甲醇中的溶液脱气3次,同时用氮气回填,然后添加50mg 5%的Pd/碳。加入氢气气球,并将反应物搅拌3小时,然后用EtOAc通过硅

藻土过滤。去除溶剂得到40mg呈黄色固体的Int 7B-3。<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ9.48 (s, 1H), 8.77 (s, 1H), 8.28 (d, J=5.6Hz, 1H), 8.02 (d, J=8.0Hz, 2H), 7.40 (d, J=8.0Hz, 2H), 7.28 (d, J=5.2Hz, 1H), 3.98-3.79 (m, 5H), 3.51 (m, 2H), 3.04 (t, J=4.8Hz, 4H), 2.90 (t, J=5.1Hz, 2H), 2.62 (t, J=7.2Hz, 2H), 1.68 (m, 1H), 1.51 (s, 9H), 1.44-1.22 (m, 5H)。LCMS (M+H)<sup>+</sup>=648.3。

[0669] 步骤D:制备Int 7B-4

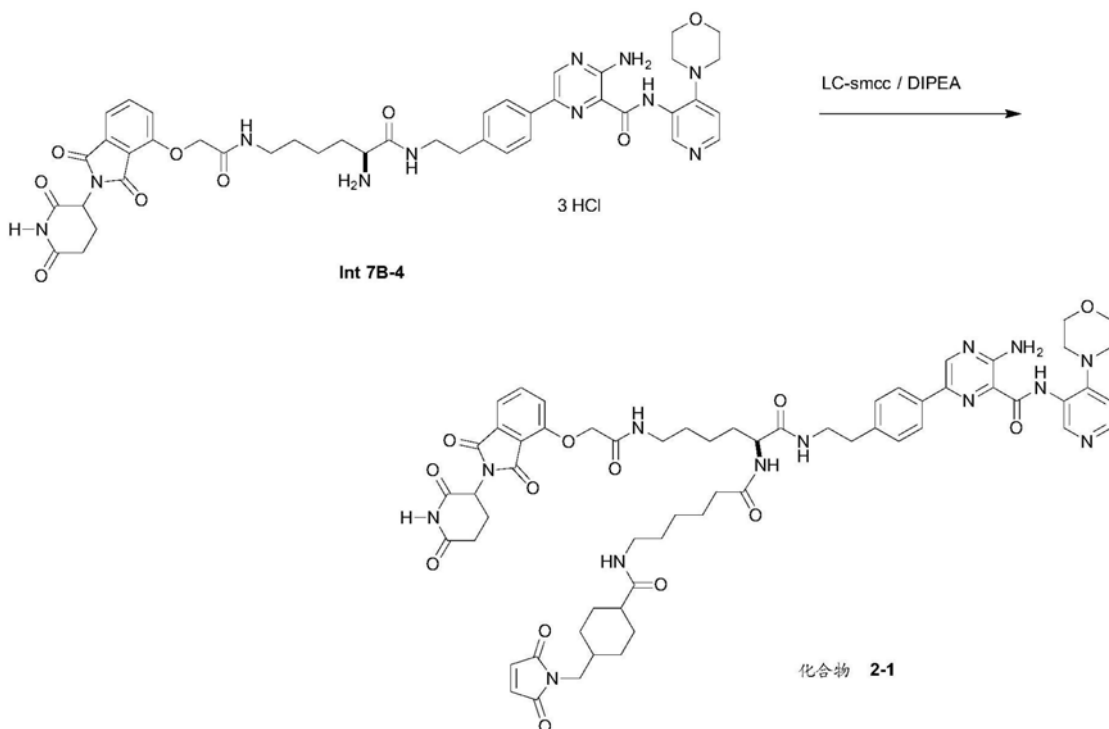


[0671] 向含有58mg (0.09mmol) Int 7B-3和30mg (0.09mmol) 2-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1,3-二氧代异吲哚啉-4-基)氧基)乙酸的于1mL DMF中的溶液添加48mg (0.11mmol) BOP试剂和0.047mL (0.27mmol) 二异丙基乙胺。将反应混合物搅拌16小时,然后用1mL饱和NaHCO<sub>3</sub>溶液和1mL水猝灭。将混合物用EtOAc萃取三次,并将合并的有机萃取物用盐水洗涤,然后经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥。然后蒸发溶剂,并对残余物进行色谱(0%至20%CH<sub>3</sub>OH/二氯甲烷),得到60mg所需化合物,将其立即溶于4mL EtOAc和1mL甲醇中,然后在室温下用2mL 4N于二噁烷中的HCl处理,并将反应物搅拌2小时。减压去除溶剂,并将黄色固体从二乙醚中蒸发3次,得到49mg呈亮黄色的Int 7B-4。LCMS (M+H) = 862。

[0672] Int 7B-4是PROTAC T-20。

[0673] 步骤E:制备化合物2-1





[0674]

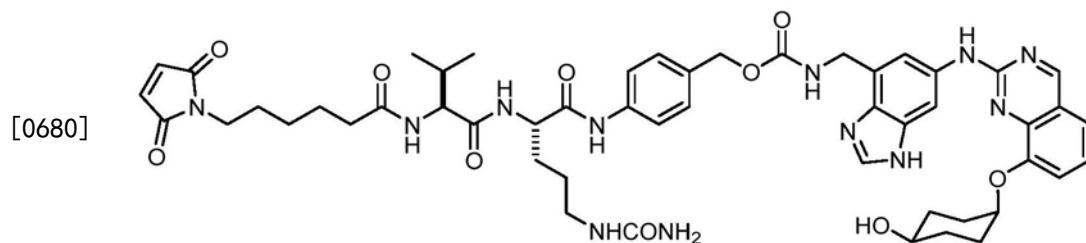
[0675] 向含有43mg (0.05mmol) (S)-2-氨基-N<sup>1</sup>-(4-(5-氨基-6-((4-吗啉代吡啶-3-基)氨甲酰基)吡嗪-2-基)苄基)-N5-(2-(3-(((S)-1-((2S,4R)-4-羟基-2-((4-(4-甲基噻唑-5-基)苄基)氨甲酰基)吡咯烷-1-基)-3,3-二甲基-1-氧代丁烷-2-基)氨基)-3-氧代丙氧基)乙基)戊二酰胺三盐酸盐(呈亮黄色结晶固体)的溶液,其与(32mg,0.07mmol) LC-smcc (琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1-羧基-(6-酰氨基己酸酯))于3mL DCM和DIPEA (0.13mL,0.7mmol)中合并。搅拌过夜后,反应物变得浑浊,并且LCMS表明存在产物。将反应物浓缩,然后溶于最少量的THF和水中。将混合物用饱和NaHCO<sub>3</sub>中和,并对混合物进行色谱(30g,C18,H<sub>2</sub>O至CH<sub>3</sub>CN,液体负载),以在从CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O冻干后,提供呈黄色固体的化合物2-1。LCMS (M+H) = 1194.3。

[0676] 实施例2

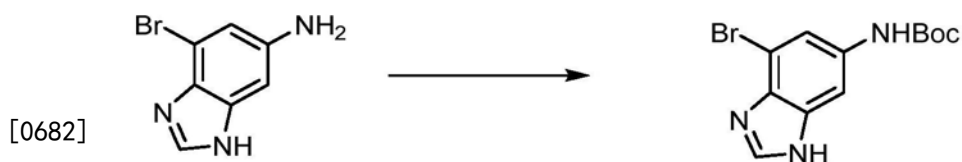
[0677] 合成中间体用于缀合至抗体

[0678] TRAF2和NCK相互作用激酶(TNIK)抑制剂

[0679] 实施例2.1合成((6-((8-(((1s,4s)-4-羟基-环己基)氧基)喹啉-2-基)氨基)-1H-苯并[d]咪唑-4-基)甲基)氨基甲酸4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧化-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰氨基)-3-甲基丁酰氨基)-5-脲基戊酰氨基)苄酯(化合物2.1)



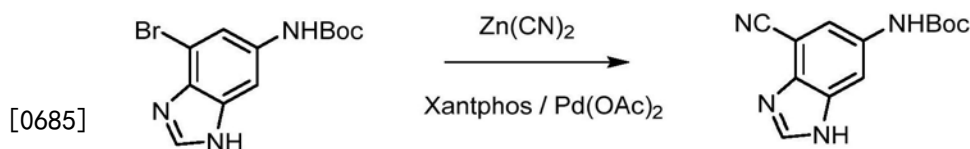
[0681] 步骤A:制备Int 2.1a



Int 2.1a

[0683] 将4-溴-1H-苯并[d]咪唑-6-胺(903mg, 4.26mmol)溶解于15mL THF、8mL H<sub>2</sub>O和20mL MeOH的混合物中。添加固体NaHCO<sub>3</sub>(716mg, 8.52mmol), 并将混合物搅拌15分钟, 然后添加1.4g (6.39mmol) Boc<sub>2</sub>O。将反应混合物浓缩, 并用MeOH覆盖, 得到深色细悬浮液。然后添加硅胶, 并将混合物浓缩至干。硅胶柱色谱 (ISCO 125g, DCM至20%MeOH/DCM) 提供了呈黄色固体的所需物质 (1.1g)。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ8.48 (s, 1H), 8.41 (s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.54 (s, 1H), 1.69 (s, 9H)。

[0684] 步骤B: 制备Int 2.1b

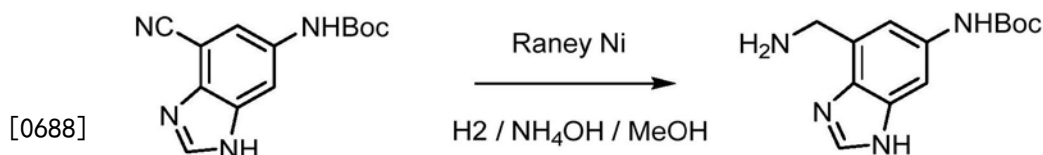


Int 2.1a

Int 2.1b

[0686] 向含有Int 2.1a (0.979g, 2.37mmol) 的于25mL DMF中的混合物添加4,5-双(二苯基膦基)-9,9-二甲基咕吨 (0.137g, 0.237mmol) 和Zn(CN)<sub>2</sub> (0.418g, 3.56mmol)。用N<sub>2</sub>吹扫混合物10分钟。然后添加乙酸钯 (II) (0.053g, 0.237mmol), 并将混合物用N<sub>2</sub>吹扫10分钟, 然后加热至80℃。5小时后, 将反应物冷却, 并用EtOAc稀释, 并通过硅藻土过滤。色谱 (24g金硅胶, DCM至20%MeOH/DCM) 得到 (4-氰基-1H-苯并[d]咪唑-6-基) 氨基甲酸叔丁酯, 得到呈浅粉色固体的所需产物, 其直接用于下一步。

[0687] 步骤C: 制备Int 2.1c

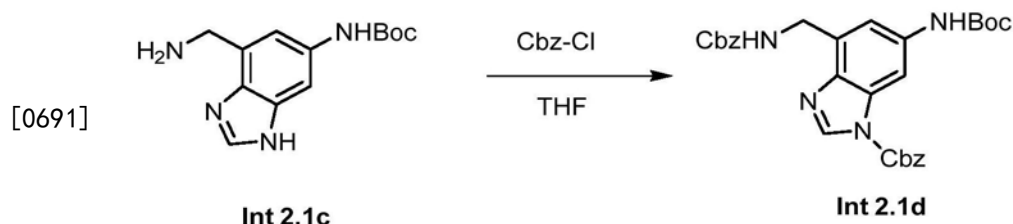


Int 2.1b

Int 2.1c

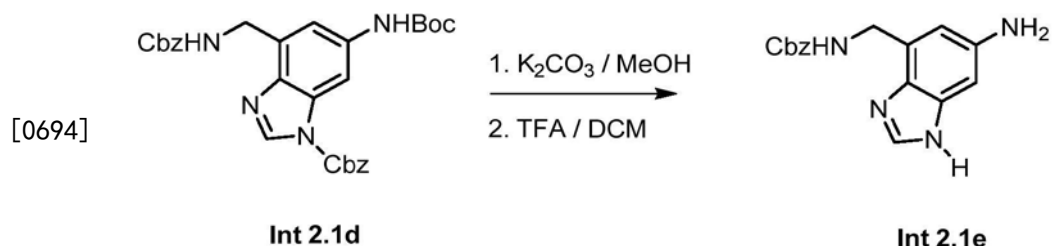
[0689] H立方体: 将22mL 30%浓NH<sub>4</sub>OH用MeOH稀释至200mL。该溶液的一半用于填装和洗涤H立方体线, 并且2N NH<sub>4</sub>OH的甲醇溶液 (88ml) 用于溶解样品。当LCMS显示产物具有一些SM保留时, 在H-立方体设备上使用70x 4mm Ra-Ni柱, 60℃, 10psi, 1ml/min, 0.026摩尔于NH<sub>4</sub>OH/MeOH中持续4h (再循环)。将样品浓缩并在高真空中放置16小时。色谱 (40g硅胶, 金, DCM至80:18:2DCM:MeOH:NH<sub>4</sub>OH) 得到部分分离, 并且440mg呈白色固体的所需产物无需进一步纯化即可直接用于下一步。LCMS (M+H) = 263。

[0690] 步骤D: 制备Int 2.1d



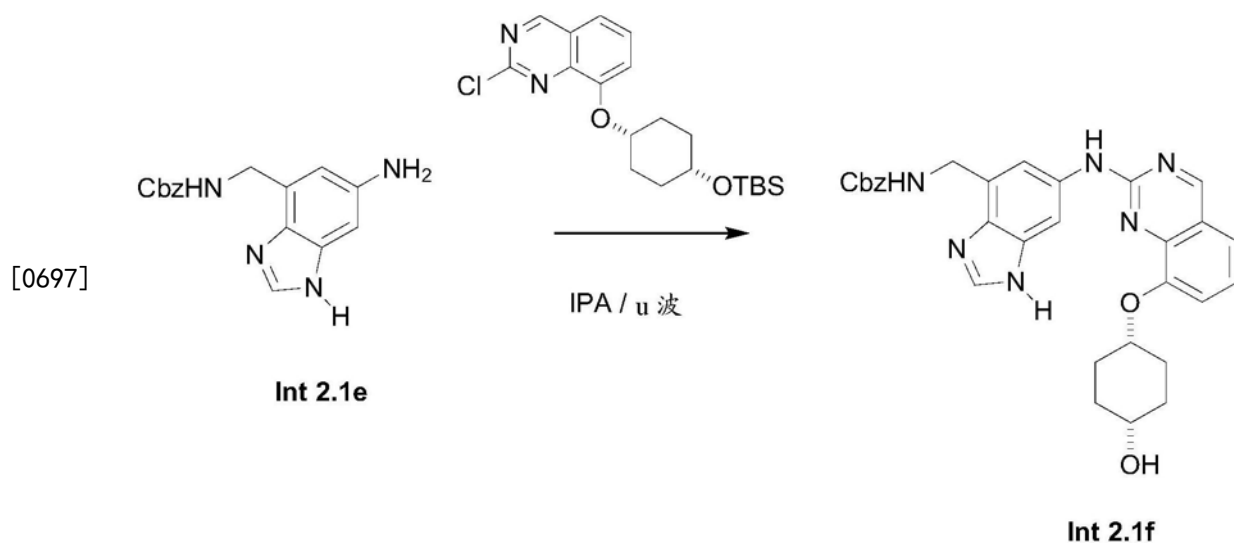
[0692] 向Int 2.1c和3mL饱和NaHCO<sub>3</sub>在17mL THF中的冰冷混合物中逐滴添加氯甲酸苄酯(0.29mL, 2.0mmol)。将反应混合物搅拌3小时, 然后浓缩, 用EtOAc覆盖, 并通过Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>过滤, 用硅胶浓缩, 并干燥负载至24g硅胶金柱上。用100%庚烷洗脱至100%EtOAc, 得到450mg呈白色固体的Int 2.1d。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 8.52 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 7.6–7.3 (m, 11H), 6.60 (bs, 1H), 5.55 (s, 2H), 5.25 (s, 2H), 4.61 (s, 2H), 1.56 (s, 9H)。

[0693] 步骤E: 制备Int 2.1e



[0695] 向4-(((苄基氧基)羰基)氨基)甲基)-6-((丁氧基羰基)氨基)-1H-苯并[d]咪唑-1-羧酸苄酯(161mg, 0.303mmol)于10mL MeOH中的悬浮液添加K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(84mg, 0.606mmol)。当TLC显示反应完成时, 将反应物在室温下搅拌1小时。色谱(4g硅胶, 金, DCM至20%MeOH/DCM), 得到呈白色固体的单脱保护的化合物(141.8, mg)。将该物质溶于9mL DCM中, 并用1mL TFA处理。将反应物在室温下搅拌1小时, 然后浓缩。将残余物溶解于DCM中, 并用1mL Et<sub>3</sub>N处理。浓缩反应物并对其进行色谱(4g硅胶, 金, DCM至80:18:2DCM:MeOH:NH<sub>4</sub>OH), 得到115mg呈浅黄色半固体的Int 2.1e。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 7.70 (s, 1H), 7.25 (m, 5H), 6.72 (s, 1H), 6.42 (s, 1H), 5.87 (bs, 1H), 5.05 (s, 2H), 4.44 (s, 2H)。

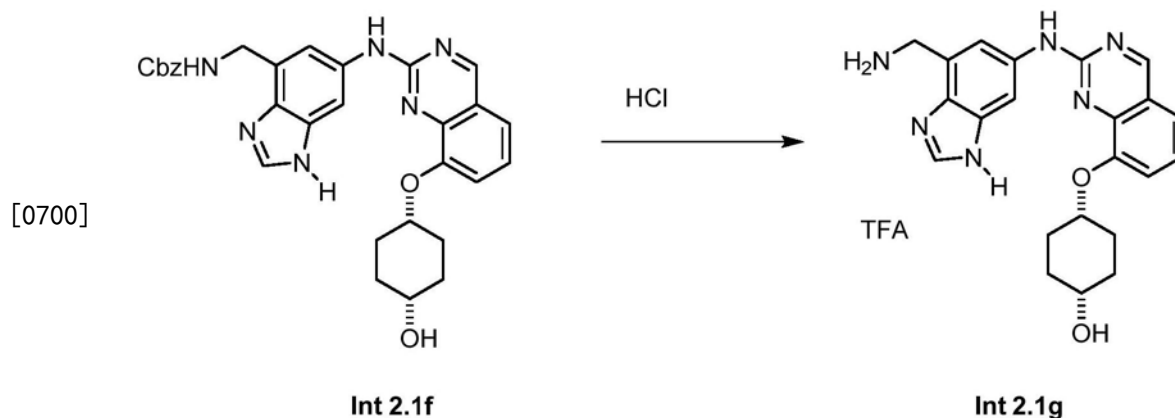
[0696] 步骤F: 制备Int 2.1f



[0698] 将含有56mg (0.188mmol) Int 2.1e和96mg (0.244mmol) 8-(((1s, 4s)-4-((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)环己基)氧基)-2-氯喹啉的于2mL异丙醇中的混合物在微波管中于

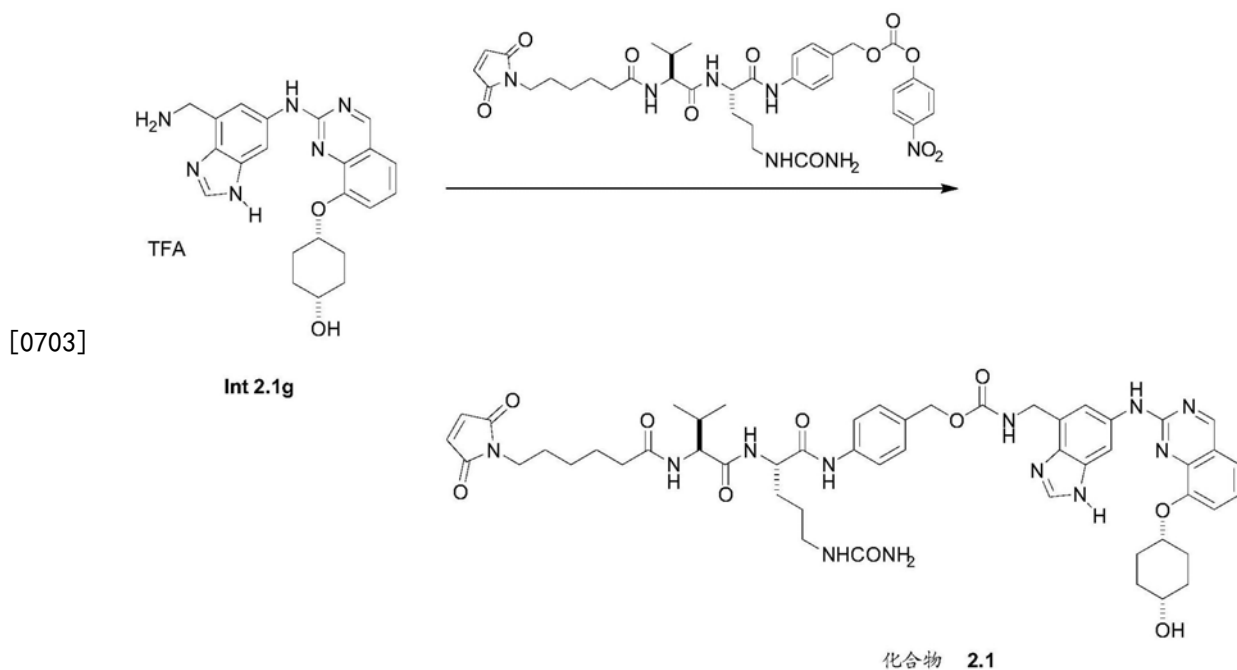
150℃下加热2小时。将反应物冷却,并添加0.5mL水。添加四丁基氟化铵(564μl, 0.564mmol),并将混合物搅拌2小时。浓缩溶剂,然后将其在EtOAc和NaHCO<sub>3</sub>之间分配。将EtOAc用水洗涤和然后用盐水洗涤,并干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>),过滤并浓缩。使用DCM将材料吸附到硅胶上,然后浓缩。色谱(24g硅胶,金,DCM至10%MeOH/DCM)得到41mg呈黄色固体的Int 2.1f。<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ9.12 (s, 1H), 9.05 (bs, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.41–7.06 (m, 9H), 5.13 (s, 2H), 4.89 (s, 1H), 4.71 (bs, 2H), 3.86 (bs, 1H), 2.20–2.07 (m, 4H), 1.89–1.80 (m, 2H), 1.73 (t, J=12Hz, 2H)。LCMS (M+H) = 539.6。

[0699] 步骤G:制备化合物2.1g



[0701] 将含有((6-((8-(((1s,4s)-4-羟环己基)氧基)喹啉-2-基)氨基)-1H-苯并[d]咪唑-4-基)甲基)氨基甲酸苄酯(181mg,0.336mmol)的混合物与水(2ml)和4N于二噁烷中的HCl(2ml)合并并在微波管中,然后在微波中在100℃下加热2小时。减压去除溶剂,并添加饱和NaHCO<sub>3</sub>以制备游离碱。使用最少的MeOH将该混合物负载至100g C18柱上以完成负载。与DCM和庚烷共蒸发后,用H<sub>2</sub>O至CH<sub>3</sub>CN(TFA改性剂)洗脱,得到121mg呈黄色固体的Int 2.1g。<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O) δ9.12 (s, 1H), 8.97 (s, 1H), 8.53 (s, 1H), 7.48 (d, J=2.0Hz, 1H), 7.42 (dd, J=2.0, 8.0Hz, 1H), 7.34 (d, J=8.0Hz, 1H), 7.30 (m, 3H), 4.70 (s, 1H), 4.44 (s, 2H), 3.80 (m, 1H), 1.94 (m, 2H), 1.67 (m, 6H)。LCMS (M+H) = 405.3。

[0702] 步骤H:制备化合物2.1

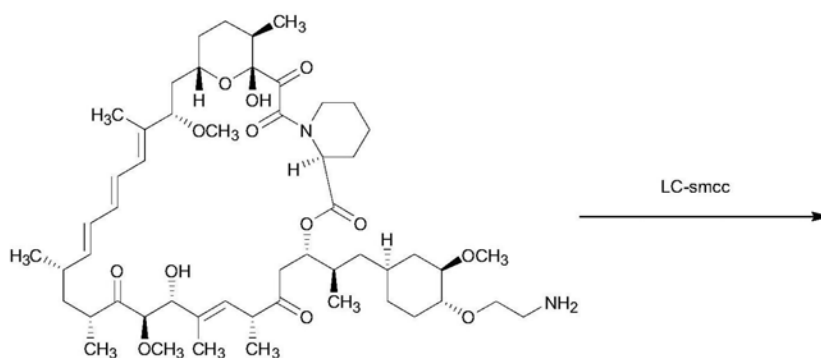


[0704] 向含有碳酸4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰氨基)-3-甲基丁酰氨基)-5-脲基戊酰氨基)苄酯(4-硝基苯基)酯(45.6mg, 0.062mmol)的于1mL DMF中的溶液添加618uL的(1s,4s)-4-((2-((4-(氨基甲基)-1H-苯并[d]咪唑-6-基)氨基)喹啉-8-基)氧基)环己-1-醇(618μL, 0.062mmol)和N,N-二异丙基乙胺(21.53μl, 0.124mmol)的0.1M溶液。将反应物搅拌16小时,然后浓缩。对残余物进行色谱(30g C18, H<sub>2</sub>O至CH<sub>3</sub>CN, 使用THF、饱和NaHCO<sub>3</sub>(水性)和H<sub>2</sub>O的混合物负载的液体),得到25mg呈黄色固体的化合物2.1。<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ9.12 (s, 1H), 9.07 (bs, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.56 (d, J=8.0Hz, 2H), 7.40 (d, J=8.0Hz, 1H), 7.33-7.22 (m, 4H), 7.12 (bs, 1H), 6.76 (s, 2H), 5.08 (s, 2H), 4.89 (m, 1H), 4.82 (s, 2H), 4.72 (m, 2H), 4.49 (m, 1H), 4.15 (d, J=7.5Hz, 1H), 3.86 (bs, 1H), 3.44 (m, 3H), 3.22-3.08 (m, 4H), 2.26 (t, J=7.5Hz, 2H), 2.18-2.03 (m, 6H), 1.89 (m, 3H), 1.73 (m, 3H), 1.65-1.51 (m, 7H), 1.30 (3H), 0.96 (m, 6H)。LCMS (M+H) = 1003.9。

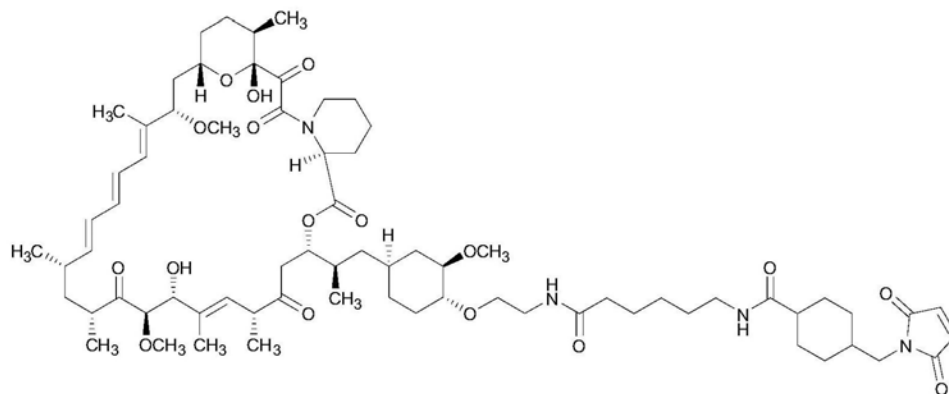
[0705] TGFBR2抑制剂

[0706] 实施例2.2以下化合物以与对化合物2.1所述的方式相似的方式制备:

[0707] 化合物2.3 42-O-(氨基乙基)雷帕霉素的LP



[0708]



化合物 2.3

[0709] 实施例3

[0710] 通过部分还原非工程化抗体的天然链内二硫化物键来生成抗体-TGFb抗体缀合物

[0711] 将mAb(在PBS中的3-8mg/mL)经由分子量截断离心过滤(Millipore, 30kDa)交换至HEPES(100mM, pH 7.0, 1mM DTPA)中。将所得的mAb溶液转移至去皮重的50mL锥形管。通过A<sub>280</sub>确定mAb浓度为3-8mg/mL。在室温下向mAb溶液中添加TCEP(2.0-4.0当量, 1mM原液), 并将所得混合物在37℃下在温和振荡下孵育30-90分钟。冷却至室温后, 将搅拌棒添加至反应管。在搅拌下, 逐滴加入来自实施例1和2的接头-有效载荷(5-10当量, 10mM DMSO)。将得到的反应混合物在环境温度下搅拌30-60分钟, 此时加入N-乙基马来酰亚胺(3.0当量, 100mM DMA)。再搅拌15分钟后, 添加N-乙酰基半胱氨酸(6.0-11.0当量, 50mM HEPES)。然后将粗ADC交换至PBS中, 并通过制备型SEC(如HiLoad 26/600, Superdex 200pg)使用PBS作为流动相进行纯化。将纯级分经由分子量截断离心过滤(Millipore, 30kDa)浓缩, 无菌过滤, 并转移至15mL锥形管。通过以下实施例4中描述的方法确定药物-抗体构建体比(摩尔比)。

[0712] 实施例4

[0713] 用于确定药物-抗体构建体比的一般程序

[0714] 疏水相互作用色谱

[0715] 将10μL的6mg/mL缀合物溶液注入连接有TOSOH TSK凝胶丁基-NPR™疏水相互作用色谱(HIC)柱(2.5μm粒径, 4.6mm x 35mm)的HPLC系统中。然后, 经18分钟的过程, 运行一种方法, 其中在12分钟的过程中将流动相梯度从100%流动相A转换为100%流动相B, 然后是在100%流动相A下的6分钟再平衡。流速为0.8mL/min, 并且检测器设置为280nm。流动相A为1.5M硫酸铵, 25mM磷酸钠(pH7)。流动相B是于25mM磷酸钠(pH 7)中的25%异丙醇。运行后, 对色谱图进行积分, 并通过对加权峰面积求和来确定摩尔比。

**[0716] 质谱**

[0717] 将一微克抗体缀合物(抗体构建体免疫调节化合物缀合物)注入LC/MS,诸如与Agilent 1290Infinity UHPLC系统耦合的配备有Agilent Dual Jet Stream ESI源的Agilent 6550iFunnel Q-TOF。获取原始数据,并用软件诸如带有BioConfirm的Agilent MassHunter定性分析软件使用最大熵反卷积算法进行反卷积。完整抗体缀合物的平均质量由软件计算,该软件使用25%的最高峰高度进行计算。然后将该数据导入到另一个程序中,以计算抗体缀合物的摩尔比,诸如Agilent摩尔比计算器。

**[0718] 实施例5****[0719] TGFβ报告基因测定**

[0720] 材料和一般程序.TGFβ/SMAD信号传导途径SBE报告细胞系获自BPS Bioscience。按照供应商的说明将细胞传代、扩增并储存在液氮中,不同之处在于将生长培养基改为含有遗传霉素的DMEM-C(补充有10%胎牛血清、1X NEAA、1mM丙酮酸盐、2mM谷氨酰胺、50μg/mL青霉素、50U/mL链霉素和400μg/mL遗传霉素的DMEM)。测定培养基是补充有0.5%胎牛血清、1X NEAA、1mM丙酮酸盐、50μg/mL青霉素和50U/mL链霉素的MEM。

[0721] 用于体外小分子筛选的一般程序.将测试样品(为在测定培养基中稀释的所需浓度)添加至96孔测定板,每孔20μL。在去除烧瓶中的培养基并用PBS冲洗细胞后,通过在37℃下在少量PBS中孵育两分钟,从组织培养瓶中收获报告细胞。对细胞进行计数并在测定培养基中以约 $0.5 \times 10^6$ 个细胞/mL稀释,然后将80μL/孔的细胞添加至含有20μL/孔测试样样品(或仅培养基)的测定板,并在37℃下在5%CO<sub>2</sub>湿润孵育箱中孵育约5-6小时。之后,将在测定培养基中稀释至12ng/mL的15μL TGFβ加入板。对照包括不含抑制剂的TGFβ滴定(50至0ng/mL)和仅培养基(无细胞、抑制剂或TGFβ)。将板在37℃下在5%CO<sub>2</sub>湿润孵育箱中孵育18小时。随后以每孔100μL添加萤光素酶底物溶液,在黑暗中于室温下孵育15分钟,并使用发光计测量发光。

**[0722] 实施例6****[0723] 测定K<sub>d</sub>值**

[0724] 使用表面等离子共振测定法,使用BIACORE®-2000或BIACORE®-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.), 在25℃下使用固定的抗原CM5芯片以约10个响应单位(RU)的-2000或-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)测量K<sub>d</sub>。简言之,羧甲基化的葡聚糖生物传感器芯片(CM5, BIACORE, Inc.)根据供应商的说明用N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)进行激活。抗原用10mM乙酸钠(pH 4.8)稀释至5μg/mL(~0.2μM),然后以5μL/分钟的流速注入,以获得约10个响应单位(RU)的偶联蛋白。注入抗原后,注入1M乙醇胺以封闭未反应的基团。为了进行动力学测量,将Fab的两倍连续稀释液(0.78nM至500nM)以约25μL/min的流速注入到含0.05%聚山梨酯20(TWEEN-20™)表面活性剂(PBST)的PBS中。通过同时拟合缔合和解离传感图,使用简单的一对一Langmuir结合模型(BIACORE®评价软件3.2版)计算缔合率(k<sub>on</sub>)和解离率(k<sub>off</sub>)。平衡解离常数(K<sub>d</sub>)被计算为比率k<sub>off</sub>/k<sub>on</sub>。参见,如,Chen等人,J.Mol.Biol.293:865-881(1999)。如果通过上面的表面等离子共振测定法测得的缔合率超过106M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>,则可以通过使用荧光猝灭技术确定缔合率,该技术测量在25℃的20nM于PBS, pH 7.2中的抗-抗原抗体(Fab形式)下在增加浓度的抗原的存在下荧光发射强度的增加或减少(激发=295nm;发射

=340nm,16nm带通),如在分光仪(诸如配有停止流的分光光度计(Aviv Instruments)或带搅拌比色皿的8000系列SLM-AMINCO™分光光度计(ThermoSpectronic))中测量。

#### [0725] 实施例7

##### [0726] FAP-TGFβR2靶向的缀合物抑制TGFβ信号

[0727] 为了检查TGFβ-介导的对成纤维细胞功能的作用的抑制,将表达FAP的GM05389肺成纤维细胞在无血清的情况下培养过夜。第二天,用滴定浓度的FAP抗体和TGFβR2免疫调节化合物LP的缀合物(FAP-TGFβR2缀合物)细胞处理1小时。然后用10ng/mL TGFβ刺激细胞,然后再培养72小时。收集上清液,并使用COL1A1 AlphaLISA或比色Sircol胶原蛋白测定法测定可溶性胶原蛋白浓度。对于一些情况,使用CellTiter-Glo发光细胞存活力测定定量了成纤维细胞增殖。为了分析α-SMA(平滑肌肌动蛋白)诱导,将GM05389细胞使用4%PFA固定,透化,并使用PE-缀合的抗-α-SMA抗体进行细胞内染色。然后使用流式细胞术分析确定α-SMA表达水平。对于缀合物-处理的细胞,MFI较低,表明较低的TGFβR2介导的信号传导。

#### [0728] 实施例8

##### [0729] FAP-TGFβR2缀合物增加经处理的细胞中的TGFβR2降解

[0730] 如下针对FAP-TGFβR2缀合物证明了在成纤维细胞中的靶向TGFβR2降解,所述FAP-TGFβR2缀合物由免疫调节化合物组成,所述免疫调节化合物被包含在E3泛素连接酶小脑蛋白的结合部分中。在没有血清的情况下,将表达FAP的GM05389肺成纤维细胞在6孔组织培养板中培养过夜。然后用滴定浓度的2种FAP-TGFβR2缀合物处理细胞24小时,一种其中免疫调节化合物含有E3泛素结合部分,并且一种缺乏E3泛素连接酶结合部分。另一个对照是用带有不识别GM05389细胞上的抗原的结合结构域的缀合物处理。孵育后,通过抽吸去除培养基,用通过抽吸去除的温热PBS缓冲液洗涤细胞,并将细胞通过添加100μl含蛋白酶抑制剂混合物的1x细胞裂解缓冲液(Cell Signaling Technologies, Inc.)来裂解,冰上孵育,置于板振荡器中2分钟,并通过上下移液匀化后来收集。去除等分试样,并使用标准程序使用BSA生成标准曲线通过BCA测定裂解物蛋白浓度。如下使裂解物的生物部分进行SDS-PAGE凝胶电泳和蛋白质印迹分析:1)使用标准4xSDS样品缓冲液并在100℃下加热来为SDS PAGE制备裂解物,2)对于每个裂解物,加入等量的裂解物蛋白至泳道并通过电泳分离,3)将分离的蛋白质转移到Immobilon-FL PVDF膜(Millipore, Inc.),4)在标准封闭缓冲液中向膜中添加特异性的抗-TGFβR2小鼠抗体,然后孵育,然后洗涤;5)添加HRP-标记的抗小鼠IgG抗体(Cell Signaling Technologies, Inc.),与膜孵育,然后洗涤;和6)使用HRP酶测定试剂盒产生化学发光信号,由BioRad Chemi Lab读板仪定量。与对照泳道的信号相比,发现随着含E3泛素结合部分的添加的FAP-TGFβR2缀合物水平高,化学发光水平降低,这通过得以缀合物降低经处理的细胞中的TGFβR2水平证明。

#### [0731] 实施例9

##### [0732] LRRC15-TGFβR2抑制剂缀合物抑制TGFβ/SMAD信号传导途径

[0733] 为了证明经由接头附接至TGFβR2抑制剂的LRRC15抗体的缀合物是活性的并且能够抑制TGFβ/SMAD信号传导途径,在TGFβ诱导之后,使用报告细胞系进行了测定。

[0734] 材料和一般程序:将亲本TGFβ/SMAD信号传导途径报告细胞系维持在补充有10%胎牛血清、1X NEAA、1mM丙酮酸盐、2mM谷氨酰胺、50μg/mL青霉素、50U/mL链霉素和400ug/mL遗传霉素的DMEM中。通过将报告细胞涂铺在6孔板中并且第二天按照制造商的说明使用



Lipofectamine 3000转染它们,来用编码LRRC15报告基因的载体瞬时转染报告细胞系。转染后二十四小时,通过去除烧瓶中的培养基并用PBS冲洗细胞后在室温下于少量Versene中孵育三到五分钟,从组织培养瓶中收获转染的LRRC15<sup>+</sup>报告细胞和对照报告细胞(不表达LRRC15)。对细胞进行计数并在测定培养基中稀释为 $\sim 0.8 \times 10^6$ 个细胞/mL,然后将50 $\mu$ L/孔添加至96孔测定板。(测定培养基是补充了0.5%胎牛血清、1X NEAA、1mM丙酮酸盐、50 $\mu$ g/mL青霉素和50U/mL链霉素的MEM。)将体积为50 $\mu$ L/孔的测试样品(在测定培养基中稀释的所需浓度)添加至含有细胞的测定板,并在37 $^{\circ}$ C下在5%CO<sub>2</sub>湿润孵育箱中孵育5-6小时。之后,将在测定培养基中稀释至12.5ng/mL的15 $\mu$ L TGF $\beta$ 加入板。对照包括单独的LRRC15抗体、抗地高辛-TGF $\beta$ R2抑制剂缀合物、TGF $\beta$ 滴定、仅使用TGF $\beta$ 处理的细胞和仅培养基(无细胞、抑制剂或TGF $\beta$ )。将板在37 $^{\circ}$ C下在5%CO<sub>2</sub>湿润孵育箱中孵育24小时。随后以每孔75 $\mu$ L添加萤光素酶底物溶液,在黑暗中于室温下在振荡下孵育10分钟,并使用发光计测量发光。

[0735] 参考图2,结果显示LRRC15-TGF $\beta$ R2抑制剂缀合物能够减少通过TGF $\beta$ /SMAD信号传导途径进行的信号传导。在图中,X轴表示添加的缀合物或抗体的浓度。

#### [0736] 实施例10

[0737] DEC205-雷帕霉素缀合物降低树突细胞对同种异体MLR反应的刺激

[0738] 为了证明DEC-205-雷帕霉素缀合物可以降低树突细胞刺激T细胞的能力,用DEC205-雷帕霉素缀合物处理人树突细胞,然后评价其在混合淋巴细胞反应(MLR)的背景下激活同种异体T细胞的能力。通过在补充有10%(v/v)热灭活胎牛血清(FCS)、2mM L-谷氨酰胺、50U/ml青霉素和50 $\mu$ g/mL链霉素(Invitrogen)的RPMI-1640培养基(补充了1000U/mL重组人(rh)GM-CSF(R&D Systems)和25ng/mL rh IL-4(R&D Systems))中培养5天,将树突细胞与从外周血中分离的单核细胞区分开。在第3天添加含有rhGM-CSF和rhIL-4的新鲜培养基。收获未成熟的DC,并用RPMI充分洗涤,然后重新涂铺在24孔板内的完全RPMI培养基中。将DEC205-雷帕霉素缀合物经浓度范围为200nM至0.1nM添加至树突细胞,并将树突细胞和缀合物在37 $^{\circ}$ C下孵育24小时。实验中包括对照治疗,诸如未处理的DEC-205mAb和雷帕霉素小分子。24小时后,将树突细胞收获,洗涤并在96孔板中用CFSE-标记的T细胞以1:1比率重新涂铺。3-5天时间后,通过流式细胞仪(Becton Dickinson, Fortessa)上的CFSE稀释评估T细胞分布。随着DEC205-雷帕霉素缀合物浓度增加,观察到T细胞增殖水平降低。

#### [0739] 实施例11

[0740] 用于确定通过含有蛋白水解靶向模块的缀合物进行的蛋白质降解的一般程序

[0741] 如上所述制备蛋白水解靶向模块(PTM)和免疫调节化合物。如实施例3中所述制备用于链间二硫化物缀合的PTM和抗体构建体的缀合物。平均DAR约为4。

[0742] 将细胞涂铺,使其附着并在存在或不存在蛋白酶体抑制剂诸如MG-132的情况下用媒介物、抑制剂、PROTAC或缀合物处理。处理后,吸出培养基,并用冰冷的PBS冲洗细胞。将含有磷酸酶和蛋白酶抑制剂的冰冷裂解缓冲液(20mM TrisHCl pH 7.5、150mM NaCl、1% Triton X-100、2mM EDTA和10%甘油)添加至孔,并使用细胞刮板将细胞从板去除。将裂解液转移至1.5ml管,并在4 $^{\circ}$ C下摇动一小时,约每15分钟涡旋一次。将管以8500xg旋转10分钟,并将上清液抽入胰岛素针头两次。将细胞裂解液冷冻在-80 $^{\circ}$ C下。使用BCA测定法确定蛋白质浓度,并用减少的上样缓冲液煮沸等量的样品。然后使样品在4-20%聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳,然后将其转移至PVDF膜。在具有0.05%Tween 20的5%w/v豆浆PBS中进行封闭

和染色,并使用具有0.05% Tween的PBS洗涤。对于靶向TGF $\beta$ R2的PROTAC及其缀合物,将印迹与1:200一级抗-TGF $\beta$ R2抗体(Santa Cruz, sc-17791)在4℃摇动孵育过夜。对于靶向TGF $\beta$ R1的PROTAC及其缀合物,将印迹与1:3000一级抗-TGF $\beta$ R1抗体(R&D, MAB5871)在4℃摇动孵育过夜。在室温下用1:15000稀释的一级抗体摇动孵育1小时(微管蛋白-Abcam, ab7291; 肌动蛋白-Abcam, ab8224)来检测上样对照。将二级抗体按1:10000稀释,并将印迹在室温下摇动孵育1小时(Jackson ImmunoResearch, 115-035-003或112-035-003)。使用ECL试剂检测信号,并使用ChemiDoc MP (Biorad)对印迹成像。使用ImageLab软件进行光密度分析,并根据上样对照调整信号。

#### [0743] 实施例12

[0744] 缀合至抗HER2抗体的TGF $\beta$ R2-VHL PROTAC对TGF $\beta$ R2的降解

[0745] 如实施例1中所述制备Protac T-20。将帕妥珠单抗用作Her2抗体。Her2抗体-Protac缀合物(050-T11020; 化合物2-1(实施例1))是通过以下来制备:将马来酰亚氨基甲基环己烷-1-羧酸酯接头附接至T-20以形成接头-T-20构建体(T11020),然后缀合T11020至Her2抗体,通常遵循实施例3中关于链间半胱氨酸缀合的方案。平均载药量约为4。

[0746] 使用可商购获得的材料和条件将表达HER2的质粒转染到HEK293细胞中。转染后二十四小时,将细胞用DMSO、PROTAC T-20、HER2抗体(IgG1)或Her2抗体-Protac缀合物(050-T11020)处理。孵育2、24或48小时后,从细胞中制备全细胞裂解物,并用BCA测定定量。将等量的裂解物在蛋白质凝胶上跑,转移至PVDF,并使用可商购获得的试剂检测TGF $\beta$ R2。为了定量蛋白质降解的量,将蛋白质印迹上的信号调整至肌动蛋白负载对照,并且数据以匹配对照的百分比表示。参照图3A、图3B和图3C,在两种测试浓度0.5 $\mu$ M和1 $\mu$ M缀合物下,在治疗24小时和48小时,目标TGF $\beta$ R2的水平降低,而TGF $\beta$ R2。

#### [0747] 实施例13

[0748] 具有VHL和小脑蛋白E3结合部分的抗体缀合物对TGF $\beta$ R2进行的抗原靶向降解

[0749] 使用HER2抗原阳性、TROP2抗原阴性细胞系BT474来证明PROTAC缀合物的抗原特异性递送。

[0750] 如上文实施例1中所述制备Protac T-15和T-20。将帕妥珠单抗用作Her2抗体。Sacituzumab用作Trop2抗体。Her2抗体-Protac缀合物(050-T05015和050-T05020)通过以下来制备:将MC-VC-PAB接头分别附接至T-15或T-20以形成T05015和T05020构建体,然后缀合至Her2抗体,通常遵循实施例3中关于链间半胱氨酸缀合的方案。平均载药量为约4。类似地制备Trop2-Protac缀合物(130-T05020)。

[0751] 将BT474细胞涂铺并在第二天用小分子(T-15或T-20)、HER2抗体TGF $\beta$ R2-VHL结合PROTAC(050-T05020)的缀合物、HER2抗体TGF $\beta$ R2-小脑蛋白结合PROTAC(050-T05015)的缀合物或TROP2抗体TGF $\beta$ R2-VHL结合PROTAC(130-T05020)的缀合物处理。在处理24小时后制备全细胞裂解物,并用BCA测定法定量。将等量的裂解物在蛋白质凝胶上跑,转移至PVDF,并使用可商购获得的试剂检测TGF $\beta$ R2和肌动蛋白。对蛋白条带进行定量,并将蛋白质信号调整至肌动蛋白负载对照,并且数据以媒介物对照百分比表示。参考图4A和图4B,HER2-抗原特异性降解在两种HER2结合PROTAC缀合物的情况下发现,但在对照TROP2结合PROTAC缀合物的情况下没有发现。

#### [0752] 实施例14

[0753] TGF $\beta$ R2/TGF $\beta$ R1-VHL PROTAC导致的降低细胞水平的TGF $\beta$ R2和TGF $\beta$ R1对蛋白酶体敏感

[0754] 用或不使用蛋白酶体抑制剂MG-132、然后添加DMSO或T-20来处理正常人肺成纤维细胞。制备全细胞裂解物,然后用BCA测定法定量。将等量的裂解物在蛋白质凝胶上跑,并转移至PVDF膜。使用可商购获得的试剂检测TGF $\beta$ R1、TGF $\beta$ R2和肌动蛋白。将蛋白质信号调整至肌动蛋白负载对照,并且数据以匹配的媒介物对照的百分比表示。参考图5A和图5B,添加蛋白酶体抑制剂保护了TGF $\beta$ R1和TGF $\beta$ R2免于T-20诱导的降解。

[0755] 尽管本文已经示出和描述了本公开的各方面,但是对于本领域技术人员而言显而易见的是,这些方面仅以实例的方式提供。在不脱离本公开的情况下,本领域技术人员现在将想到许多变型、改变和变化。应当理解,在实践本公开中可以采用本文所述的本公开的各种替代方案。意图是,以下权利要求限定本公开的范围,并且由此涵盖的这些权利要求的范围内的方法和结构及其等同物。

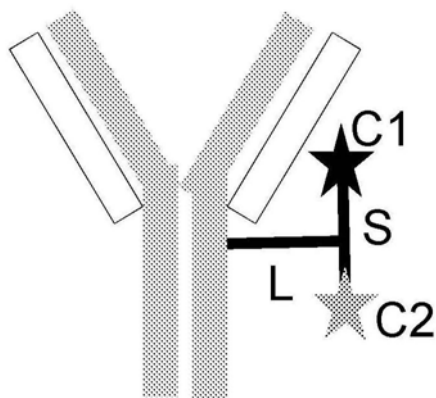


图1A

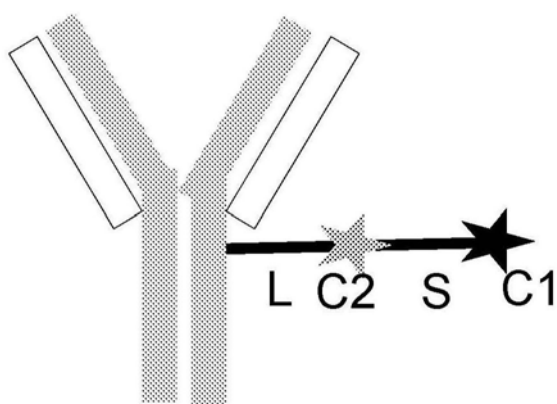


图1B

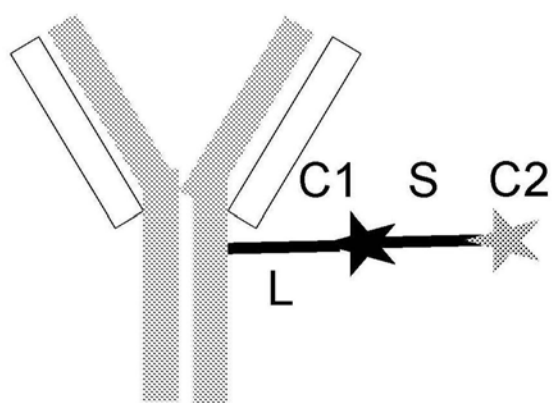


图1C

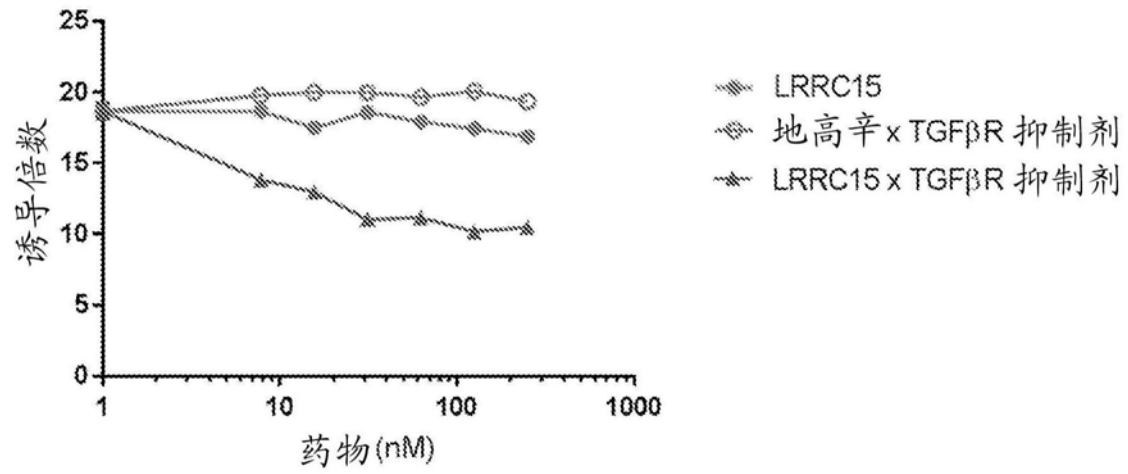


图2

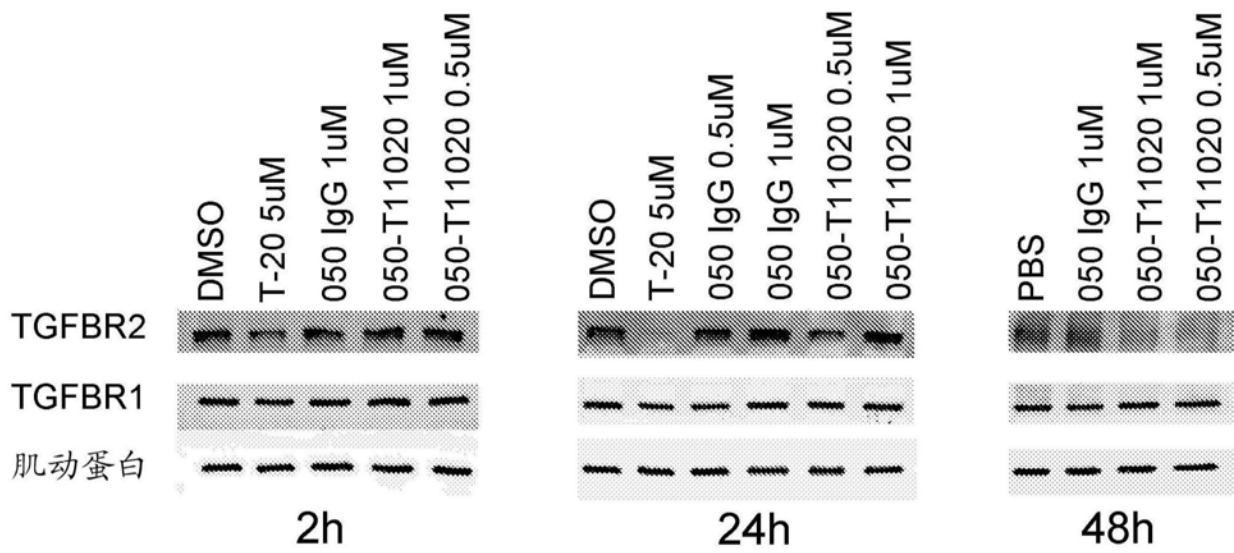


图3A

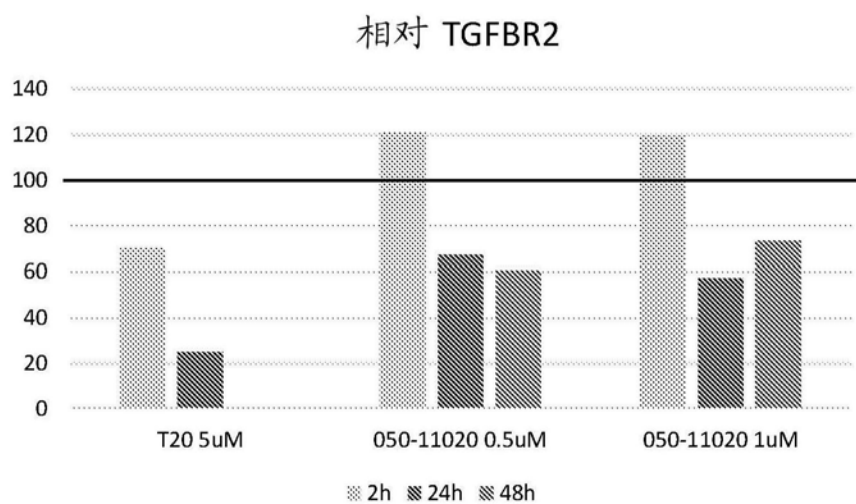


图3B

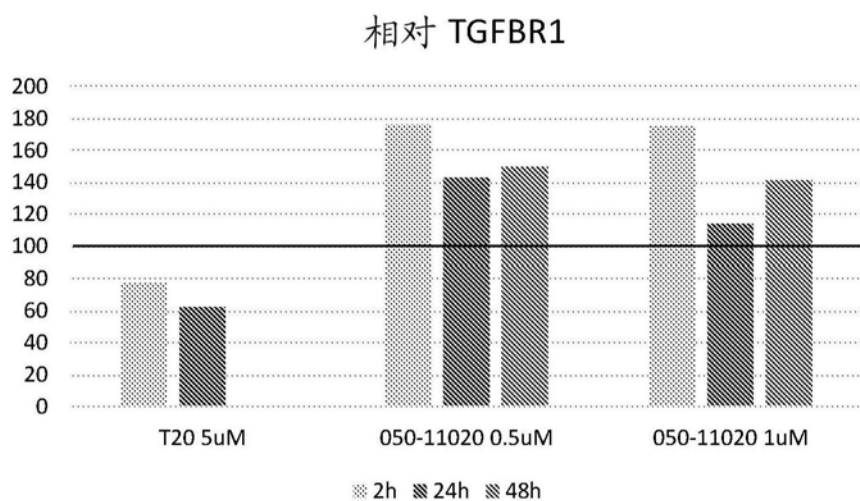


图3C

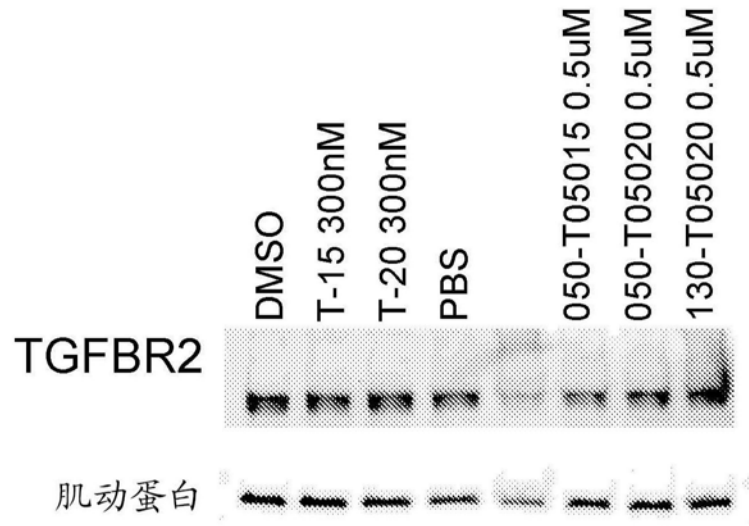


图4A

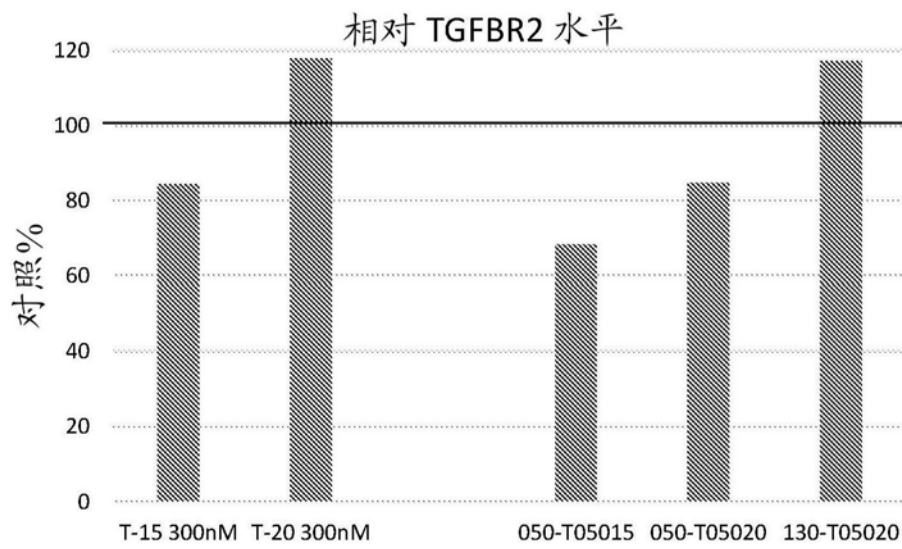


图4B

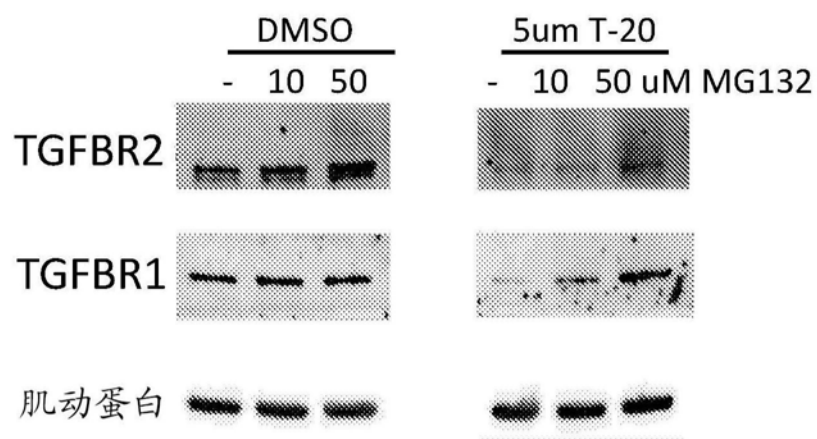


图5A

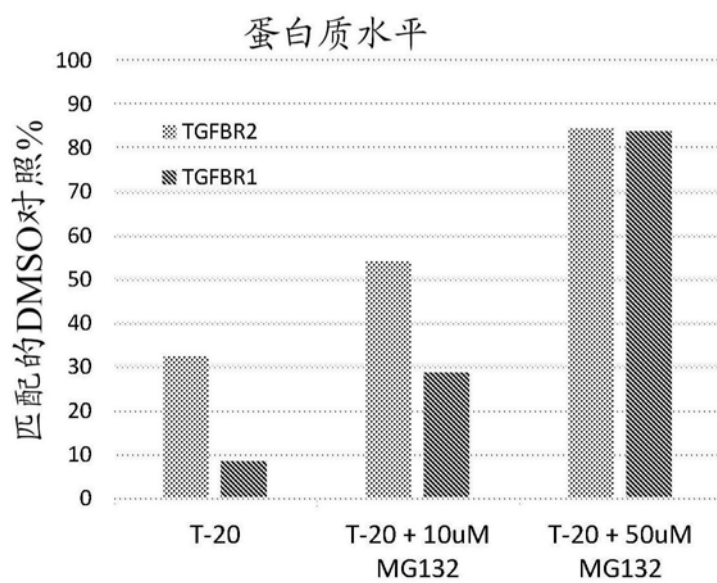


图5B