(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119451979 A
(43)申请公布日 2025.02.14

(21)申请号 202380053261.7

(22)申请日 2023.05.26

(30)优先权数据
63/346,593 2022.05.27 US
63/349,078 2022.06.04 US
63/355,375 2022.06.24 US
63/386,999 2022.12.12 US
63/501,434 2023.05.11 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.01.10

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/067532 2023.05.26

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/230594 EN 2023.11.30

(71)申请人 再生元制药公司
地址 美国纽约州

(72)发明人 S·帕特尔 T·张 J·吴 A·常 E·史密斯 C-Y·林 S·戴维斯

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
专利代理师 秦剑

(51)Int.Cl.
C07K 14/55(2006.01)
C07K 14/715(2006.01)

权利要求书5页 说明书83页
序列表（电子公布） 附图20页

(54)发明名称

白细胞介素-2蛋白质原及其用途

(57)摘要

本公开提供了包含用IL2Rα部分掩蔽的IL2部分以及蛋白酶可裂解接头的IL2蛋白质原，所述IL2蛋白质原配置成使得所述IL2Rα部分在蛋白酶的作用下从所述IL2部分被释放，例如，在肿瘤位点处。所述IL2蛋白质原任选地进一步包含靶向部分，例如，识别肿瘤相关抗原并且将所述蛋白质原引导至肿瘤位点的靶向部分。本公开进一步提供了包含所述IL2蛋白质原的药物组合物和在疗法中使用所述IL2蛋白质原的方法，以及编码所述IL2蛋白质原的核酸、表达所述IL2蛋白质原的重组细胞和产生所述IL2蛋白质原的方法。

CN 119451979 A

1.一种IL2蛋白质原,其包含:

(a)第一多肽链,其按N末端至C末端的顺序包含:

(i)第一靶向部分或其组分;

(ii)第一Fc结构域;

(iii)任选的第一不可裂解接头(NCL);

(iv)第一IL2Rα部分;

(v)第一蛋白酶可裂解接头(PCL);以及

(vi)第一IL2部分;以及

(b)第二多肽链,其按N末端至C末端的顺序包含:

(i)第二靶向部分或其组分;

(ii)第二Fc结构域,其能够与所述第一Fc结构域缔合以形成Fc区;

(iii)任选的第二不可裂解接头(NCL);

(iv)第二IL2Rα部分;

(v)第二蛋白酶可裂解接头(PCL);以及

(vi)第二IL2部分。

2.根据权利要求1所述的IL2蛋白质原,其中所述IL2部分包含与成熟人类IL2具有至少约90%或至少约95%序列同一性的氨基酸序列。

3.根据权利要求1或2所述的IL2蛋白质原,其中所述IL2部分包含与成熟人类IL2相比具有N末端丙氨酸缺失的氨基酸序列。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述IL2部分包含与野生型IL2相比具有(a)在位置N88处的氨基酸取代的氨基酸序列,任选地其中所述氨基酸取代是N88D,和/或(b)与野生型IL2相比具有氨基酸取代C125S、C125A或C125V的氨基酸序列。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述IL2Rα部分包含与人类IL2Rα的IL2结合部分具有至少约90%、至少约95%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%序列同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

6.根据权利要求5所述的IL2蛋白质原,其中所述IL2Rα部分包含与(a) IL2Rα的氨基酸22-186、(b) IL2Rα的氨基酸22-240和/或(c)人类IL2Rα的氨基酸22-272具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%序列同一性的氨基酸序列。

7.根据权利要求1至6中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一PCL和/或第二PCL(a)包含由表A中列出的任何蛋白酶可裂解的底物序列,(b)包含选自表B中列出的底物序列的一个或多个底物序列,(c)包含选自表C中列出的底物序列的一个或多个间隔子序列,和/或(d)包含表D中列出的PCL序列中的任一PCL序列的氨基酸序列或其具有至多5个氨基酸取代的变体,例如,其具有1个氨基酸取代、2个氨基酸取代、3个氨基酸取代、4个氨基酸取代或5个氨基酸取代的变体。

8.根据权利要求1至7中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一NCL和/或第二NCL包含表E中列出的NCL序列中的任一NCL序列的氨基酸序列或其具有至多5个氨基酸取代的变体,例如,其具有1个氨基酸取代、2个氨基酸取代、3个氨基酸取代、4个氨基酸取代或5个氨基酸取代的变体。

9.根据权利要求1至7中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一不可裂解接头和第

二不可裂解接头(a)在长度上范围为5个至25个氨基酸或7个至20个氨基酸,或(b)在长度上为至少5个氨基酸或至少7个氨基酸。

10.根据权利要求1至9中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一蛋白酶可裂解接头和第二蛋白酶可裂解接头在长度上范围为20个氨基酸至80个氨基酸或20个至60个氨基酸。

11.根据权利要求1至10中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一Fc结构域和/或所述第二Fc结构域包含铰链结构域。

12.根据权利要求1至11中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一靶向部分和/或所述第二靶向部分是Fab。

13.根据权利要求1至11中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一靶向部分和/或所述第二靶向部分是scFv。

14.根据权利要求1至13中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一靶向部分和/或第二靶向部分能够结合至第6.7节中鉴定的任何靶分子。

15.根据权利要求1至14中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一靶向部分和/或第二靶向部分能够结合至ECM抗原,所述ECM抗原任选地选自多配体聚糖、乙酰肝素酶、整联蛋白、骨桥蛋白、连接蛋白、钙粘蛋白、层粘连蛋白、层粘连蛋白型EGF、凝集素、纤连蛋白、缺口蛋白、粘连蛋白(例如,粘连蛋白-4)、腱生蛋白、胶原蛋白(例如,X型胶原蛋白)和基质蛋白。

16.根据权利要求1至14中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一靶向部分和/或第二靶向部分能够结合至肿瘤或病毒淋巴细胞的细胞表面分子。

17.根据权利要求16所述的IL2蛋白质原,其中所述抗原是T细胞共刺激蛋白,所述T细胞共刺激蛋白任选地选自CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C和B7-H3。

18.根据权利要求1至14中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一靶向部分和/或第二靶向部分能够结合至检查点抑制剂,所述检查点抑制剂任选地选自CTLA-4、PD1、PDL1、PDL2、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、TIM3、GAL9、LAG3、VISTA、KIR、2B4、CD160、CGEN-15049、CHK1和CHK2。

19.根据权利要求1至14中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一靶向部分和/或第二靶向部分能够结合至肿瘤相关抗原(“TAA”),所述肿瘤相关抗原任选地选自AFP、ALK、BAGE蛋白、BIRC5(生存素)、BIRC7、β-连环蛋白、bcr-abl、BRCA1、BORIS、CA9、碳酸酐酶IX、caspase-8、CALR、CEACAM5(也称为癌胚抗原或CEA)、CCR5、CD19、CD20 (MS4A1)、CD22、CD30、CD40、CDK4、CEA、CTLA4、细胞周期蛋白-B1、CYP1B1、EGFR、EGFRvIII、ErbB2/Her2、ErbB3、ErbB4、ETV6-AML、EpCAM、EphA2、Fra-1、FOLR1、GAGE蛋白(例如,GAGE-1或-2)、GD2、GD3、GloboH、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3、GM3、gp100、Her2、HLA/B-raf、HLA/k-ras、HLA/MAGE-A3、hTERT、LMP2、MAGE蛋白(例如,MAGE-1、-2、-3、-4、-6和-12)、MART-1、间皮素、ML-IAP、Muc1、Muc2、Muc3、Muc4、Muc5、Muc16 (CA-125)、MUM1、NA17、NY-BR1、NY-BR62、NY-BR85、NY-ESO1、OX40、p15、p53、PAP、PAX3、PAX5、PCTA-1、PLAC1、PRLR、PRAME、PSMA (FOLH1)、RAGE蛋白、Ras、RGS5、Rho、SART-1、SART-3、STEAP1、STEAP2、TAG-72、TGF-β、TMPRSS2、Thompson-nouvelle抗原(Tn)、TRP-1、TRP-2、酪氨酸酶和尿斑蛋白-3。

20.根据权利要求1至19中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述Fc区是同二聚体。

21.根据权利要求1至19中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述Fc区是异二聚体。

22.根据权利要求1至21中任一项所述的IL2蛋白质原,其具有图1A中描绘的构型。

23.一种IL2蛋白质原,其任选地是根据权利要求1至22中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述IL2蛋白质原包含:

(a)第一多肽链,其按N末端至C末端的顺序包含:

(i)第一氨基酸序列,其与SEQ ID NO: 346、347、348、349、350和351中的任一者的氨基酸序列具有至少约95%序列同一性;

(ii)第二氨基酸序列,其包含不可裂解接头序列或由所述不可裂解接头序列组成;

(iii)第三氨基酸序列,其与SEQ ID NO: 3、4和5中的任一者的氨基酸序列具有至少约95%序列同一性;

(iv)第四氨基酸序列,其包含表B或表D中列出的一个或多个氨基酸序列;以及

(v)第五氨基酸序列,其与SEQ ID NO: 2的氨基酸序列具有至少约95%序列同一性;以及

(b)第二多肽链,其按N末端至C末端的顺序包含:

(i)第六氨基酸序列,其与SEQ ID NO: 346、347、348、349、350和351中的任一者具有至少约95%序列同一性;

(ii)第七氨基酸序列,其包含不可裂解接头序列或由所述不可裂解接头序列组成;

(iii)第八氨基酸序列,其与SEQ ID NO: 3、4和5中的任一者具有至少约95%序列同一性;

(iv)第九氨基酸序列,其包含表B或表D中列出的一个或多个氨基酸序列;以及

(v)第十氨基酸序列,其与SEQ ID NO: 2的氨基酸序列具有至少约95%序列同一性。

24.根据权利要求23所述的IL2蛋白质原,其中所述第一多肽在所述第一氨基酸序列的N末端包含第十一氨基酸序列,所述第十一氨基酸序列与SEQ ID NO: 352、353、354和355中的任一者具有至少约95%、至少约98%或100%序列同一性。

25.根据权利要求23或24的IL2蛋白质原,其中所述第二多肽在所述第一氨基酸序列的N末端包含第十二氨基酸序列,所述第十二氨基酸序列与SEQ ID NO: 352、353、354和355中的任一者具有至少约95%、至少约98%或100%序列同一性。

26.根据权利要求23至25中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一氨基酸序列与SEQ ID NO: 346、347、348、349、350和351中的任一者具有至少约98%或100%序列同一性。

27.根据权利要求23至26中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一氨基酸序列在长度上为350个或更少个或者330个或更少个氨基酸。

28.根据权利要求23至27中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第六氨基酸序列与SEQ ID NO: 346、347、348、349、350和351中的任一者具有至少约98%或100%序列同一性。

29.根据权利要求23至28中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第六氨基酸序列在长度上为350个或更少个或者330个或更少个氨基酸。

30.根据权利要求23至29中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第二氨基酸序列是表E中列出的氨基酸序列。

31.根据权利要求23至30中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第二氨基酸序列在长度上为25个或更少个、15个或更少个或者6个或更少个氨基酸。

32.根据权利要求23至31中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第七氨基酸序列是表

E中列出的氨基酸序列。

33.根据权利要求23至32中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第七氨基酸序列在长度上为25个或更少个、15个或更少个或者6个或更少个氨基酸。

34.根据权利要求23至33中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第三氨基酸序列与SEQ ID NO: 3、4和5中的任一者具有至少约98%或100%序列同一性。

35.根据权利要求23至34中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第八氨基酸序列与SEQ ID NO: 3、4和5中的任一者具有至少约98%或100%序列同一性。

36.根据权利要求23至35中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第四氨基酸序列包含(a)表B中列出的一个或多个氨基酸序列或(b)表D中列出的氨基酸序列。

37.根据权利要求23至36中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第九氨基酸序列包含(a)表B中列出的一个或多个氨基酸序列或(b)表D中列出的氨基酸序列。

38.根据权利要求23至37中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第五氨基酸序列与SEQ ID NO: 2具有至少约98%或100%序列同一性。

39.根据权利要求23至38中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第十氨基酸序列与SEQ ID NO: 2具有至少约98%或100%序列同一性。

40.根据权利要求23至39中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一多肽链在所述第一氨基酸序列的C末端缺少附加序列。

41.根据权利要求23至40中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一多肽链(a)在所述第一氨基酸序列与第二氨基酸序列之间缺少附加序列,(b)在所述第二氨基酸序列与第三氨基酸序列之间缺少附加序列,(c)在所述第三氨基酸序列与第二氨基酸序列之间缺少附加序列,和/或(d)在所述第四氨基酸序列与第五氨基酸序列之间缺少附加序列。

42.根据权利要求23至41中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第二多肽链在所述第六氨基酸序列的C末端缺少附加序列。

43.根据权利要求23至42中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第二多肽链(a)在所述第六氨基酸序列与第七氨基酸序列之间缺少附加序列,(b)在所述第七氨基酸序列与第八氨基酸序列之间缺少附加序列,(c)在所述第八氨基酸序列与第九氨基酸序列之间缺少附加序列,和/或(d)在所述第九氨基酸序列与第十氨基酸序列之间缺少附加序列。

44.一种核酸或多种核酸,其编码根据权利要求1至43中任一项所述的IL2蛋白质原。

45.一种宿主细胞,其经工程化以表达根据权利要求1至43中任一项所述的IL2蛋白质原或根据权利要求44所述的核酸。

46.一种产生根据权利要求1至43中任一项所述的IL2蛋白质原的方法,所述方法包括培养根据权利要求45所述的所述宿主细胞并且回收由此表达的所述IL2蛋白质原。

47.一种药物组合物,其包含根据权利要求1至43中任一项所述的IL2蛋白质原以及赋形剂。

48.一种治疗癌症的方法,所述方法包括向有此需要的受试者施用根据权利要求1至43中任一项所述的IL2蛋白质原或根据权利要求47所述的药物组合物。

49.一种IL2蛋白的局部递送、用在癌症组织中选择性活化的IL2蛋白治疗癌症、向所述受试者施用具有降低的全身暴露和/或降低的全身毒性的IL2疗法、将活化的IL2蛋白靶向递送至癌症组织、或在靶组织中局部诱导免疫反应的方法,所述方法包括向受试者施用根

据权利要求1至43中任一项所述的IL2蛋白质原(或包含所述IL2蛋白质原和赋形剂的药物组合物),所述IL2蛋白质原具有一个或多个蛋白酶可裂解接头,每个蛋白酶可裂解接头包含用于由待向其局部递送所述IL2蛋白的组织(例如,癌症组织)表达的一种或多种蛋白酶的一种或多种底物。

50.根据权利要求48或49所述的方法,其中施用是非局部的。

白细胞介素-2蛋白质原及其用途

[0001] 1.相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求以下美国临时申请号的优先权:于2022年5月27日提交的美国临时申请号63/346,593;于2022年6月4日提交的美国临时申请号63/349,078;于2022年6月24日提交的美国临时申请号63/355,375;于2022年12月12日提交的美国临时申请号63/386,999;于2023年5月11日提交的美国专利号63/501,434,这些申请中的每一个申请的内容都通过引用整体并入本文中。

[0003] 2.序列表

[0004] 本申请含有已经电子提交的序列表,并且在此通过引用整体并入本文。创建于2023年5月9日的所述副本命名为RGN-021WO_SL.xml并且大小为316,721字节。

背景技术

[0005] 白细胞介素2(IL-2或IL2)是一种主要由CD4+辅助T细胞产生的多能细胞因子。它刺激T细胞的增殖和分化,诱导细胞毒性T淋巴细胞(CTL)的生成以及外周血淋巴细胞向细胞毒性细胞和淋巴因子活化杀伤(LAK)细胞的分化,促进T细胞表达细胞因子和溶细胞分子,促进B细胞的增殖和分化以及B细胞合成免疫球蛋白,并且刺激自然杀伤(NK)细胞的生成、增殖和活化(参见Waldmann, 2009, Nat Rev Immunol 6:595-601和Malek, 2008, Annu Rev Immunol 26:453-79)。

[0006] 由于其多效性,IL2并不是抑制肿瘤生长的最佳选择。IL2作为抗肿瘤剂的使用受到肿瘤反应所需剂量所伴随的严重毒性的限制。Proleukin®(由加利福尼亚州圣地亚哥的Prometheus Laboratories销售)是IL2的重组形式,已被批准用于治疗转移性黑色素瘤和转移性肾癌,但其副作用非常严重,因此仅建议在提供重症监护的医院环境中进行使用。接受高剂量IL2治疗的患者经常会出现严重的心血管、肺、肾、肝、胃肠道、神经、皮肤、血液和全身不良事件,这些不良事件需要严密监测和住院治疗。IL2疗法的主要副作用是血管渗漏综合征(VLS),它会导致肺和肝脏中积聚间质液,从而引发肺水肿和肝损伤。除了停用IL2之外,没有其他治疗VLS的方法。低剂量IL2方案已在患者中进行了测试以避免VLS,但代价是治疗结果不佳。已经表明,IL2诱导的肺水肿是由IL2与肺内皮细胞直接结合引起的,该肺内皮细胞表达低至中等水平的功能性高亲和力IL2受体(Krieg等人, 2010, Proc Nat Acad Sci USA 107:11906-11)。

[0007] 为了降低IL2癌症疗法的毒性,已经生成了多种IL2变体和前药。然而,令人惊讶地发现此类分子对于癌症疗法具有差的治疗指数。例如,聚乙二醇化IL2前药bempegaldesleukin在3期临床研究中未能提高PD1检查点抑制剂对黑色素瘤患者的治疗效果(Mullard, 2022, Nature Reviews Drug Discovery 21:327 (doi: https://doi.org/10.1038/d41573-022-00069-3)。

[0008] 因此,本领域需要具有改善的治疗功效和安全性概况的新型IL2疗法。

发明内容

[0009] 本公开涉及由蛋白酶(例如,在肿瘤环境中表达的蛋白酶)活化的IL2蛋白质原。

[0010] IL2蛋白质原包含由IL2Rα部分掩蔽的IL2部分,该IL2蛋白质原配置成使得该掩蔽在由蛋白酶裂解后被释放。IL2蛋白质原优选地进一步包含将该IL2蛋白质原引导至特定组织或细胞类型的靶向部分。

[0011] 在某些实施例中,本公开的IL2蛋白质原包含两个多肽链,每个多肽链从N末端至C末端包含Fc结构域、任选的接头(其如果存在,优选为不可裂解接头)、IL2Rα部分、蛋白酶可裂解接头和IL2部分。IL2蛋白质原可以在例如一个或两个Fc结构域的N末端进一步包含靶向部分(或其组分,例如,Fab的一个链)。靶向部分包含抗原结合位点("ABS"),该抗原结合位点可以例如结合至肿瘤表面上存在的靶分子(例如,肿瘤相关抗原)或肿瘤微环境中的其他组分(例如,细胞外基质)("ECM")或肿瘤淋巴细胞)。

[0012] 可用于本公开的IL2蛋白质原中的示例性IL2部分描述于第6.3节中。

[0013] 可用于本公开的IL2蛋白质原中的示例性IL2Rα部分描述于第6.4节中。

[0014] 可用于本公开的IL2蛋白质原中的蛋白酶可裂解接头描述于第6.5节中。

[0015] 可用于本公开的IL2蛋白质原中的不可裂解接头描述于第6.6节中。

[0016] 可用于本公开的IL2蛋白质原中的靶向部分描述于第6.7节中并且靶向部分格式在第6.8节中公开。

[0017] 可掺入本公开的IL2蛋白质原中的Fc结构域描述于第6.9节中。

[0018] 本公开的示例性IL2蛋白质原描述于第6.2节和编号实施例1至157中。

[0019] 本公开进一步提供了编码本公开的IL2蛋白质原的核酸。编码IL2蛋白质原的核酸可以是单个核酸(例如,编码IL2蛋白质原的所有多肽链的载体)或多个核酸(例如,编码IL2蛋白质原的不同多肽链的两个或更多个载体)。本公开进一步提供了经工程化以表达本公开的核酸和IL2蛋白质原的宿主细胞和细胞系。本公开进一步提供了产生本公开的IL2蛋白质原的方法。示例性核酸、宿主细胞和细胞系以及产生IL2蛋白质原的方法描述于第6.10节和具体实施例158至160中。

[0020] 本公开进一步提供了包含本公开的IL2蛋白质原的药物组合物。示例性药物组合物描述于第6.11节和编号实施例161中。

[0021] 本文进一步提供了使用本公开的IL2蛋白质原和药物组合物例如以治疗癌症的方法。示例性方法描述于第6.12节和编号实施例162至200中。

附图说明

[0022] 图1A至图1B。图1A是本公开的示例性靶向IL2蛋白质原的图示,其中两个多肽链包含靶向部分-Fc结构域-接头-IL2Rα部分-可裂解接头-IL2部分格式。尽管图1A中的靶向部分被示出为Fab,但靶向部分可以处于其他格式中,例如,scFv或第6.8节中描述的其他格式。图1A-1和图1A-2示出了接头B和接头D的实施例的特写视图,该接头B和接头D分别包含在可裂解底物的任一侧上的间隔子(分别为B1、B2和D1、D2)。底物和间隔子序列的数量仅用于说明目的,并且预期蛋白酶可裂解接头将通常具有如第6.5节中描述的多个底物和间隔子序列。图1B示出了根据图1A的示例性靶向IL2蛋白质原的活化的机制。

[0023] 图2是来自靶向部分-IL2Rα部分-接头-IL2部分格式中的几个蛋白酶可裂解接头

的重组蛋白酶消化的SDS-PAGE分析的凝胶的图像。

[0024] 图3是来自靶向部分-IL2Rα部分-接头-IL2部分格式中的几个蛋白酶可裂解接头的重组蛋白酶消化的SDS-PAGE分析的凝胶的图像。

[0025] 图4A至图4C涉及CD20靶向的IL2蛋白质原。图4A示出了来自CD20-IL2Rα-PCL-IL2的IL2的蛋白酶介导的裂解导致YT/STAT5 luc/CL4荧光素酶测定中改善的活性。图4B是IL2与IL2受体结合的图示以及图4C是不与IL2受体结合的IL2蛋白质原的图示。

[0026] 图5A至图5N示出了具有蛋白酶可裂解接头的肿瘤靶向IL2Rα-IL2的体内功效。

[0027] 图6A至图6B示出了蛋白酶可裂解接头在体内的稳定性。

[0028] 图7示出了确定MC38/hCD20模型中肿瘤靶向在具有蛋白酶可裂解接头的IL2蛋白质原的抗肿瘤功效中的贡献的研究设计。

[0029] 图8示出了根据图7的研究设计进行治疗后肿瘤体积中的变化。

[0030] 图9A至图9G示出了MC38/hCD20小鼠模型中与具有可裂解接头的非靶向IL2Rα-IL2蛋白和具有不可裂解G4S接头(SEQ ID NO: 1)的CD20靶向IL2Rα-IL2相比具有可裂解接头的CD20靶向IL2Rα-IL2蛋白显示显著更好的抗肿瘤功效和无肿瘤存活。

具体实施方式

[0031] 6.1.定义

[0032] 如本文所用的下列术语具有以下含义:

[0033] ABD链,靶向部分链:靶向部分和其内的抗原结合位点(ABD)可以作为一个(例如,在scFv或scFab的情况下)多肽链存在或者通过多于一个多肽链的缔合而形成(例如,在Fab或Fv的情况下)。如本文所用,术语“ABD链”和“靶向部分链”是指存在于单个多肽链上的ABD或靶向部分的全部或部分。术语“ABD链”或“靶向部分链”的使用仅旨在方便和描述性目的,并不意味着特定的配置或生产的方法。此外,当描述IL2蛋白质原时对ABD或靶向部分的提及涵盖ABD链或靶向部分链,除非上下文另有说明。因此,当描述其中Fc结构域可操作地连接至靶向部分的IL2蛋白质原时,Fc结构域可以通过肽键直接或间接(例如,通过接头)共价连接至例如(1) Fab或Fv的第一ABD或靶向部分链(其中Fab或Fv的其他组分在第二相关ABD或靶向部分链上)或(2)含有scFv或scFab的ABD或靶向部分链。

[0034] 约,大约:在整个说明书中,在数字前面使用术语“约”、“大约”等以表明该数字不一定准确(例如,考虑小数、测量准确度和/或精确度的变化、计时等)。应当理解,“约X”或“大约X”的公开,其中X是数字,也是“X”的公开。因此,例如,其中一个序列与另一序列具有“约X%序列同一性”的实施例的公开,也是其中该序列与另一序列具有“X%序列同一性”的实施例的公开。

[0035] 活化(activate,activation):与本公开的IL2蛋白质原连用的术语“活化”等是指蛋白酶可裂解接头的蛋白酶介导的酶促裂解,该酶促裂解导致IL2部分从IL2Rα部分中未掩蔽或释放。

[0036] 和,或:除非另有说明,“或”连词旨在以其正确的含义用作布尔逻辑运算符,涵盖特征的替代选择(A或B,其中A的选择与B互斥)和特征的联合选择(A或B,其中A和B两者被选择)。在文本中的某些地方,术语“和/或”用于相同目的,这不应被解释为暗示“或”用于指互斥的替代。

[0037] 抗体:如本文所用的术语“抗体”是指能够非共价地、可逆地和特异性地结合抗原的免疫球蛋白家族的多肽(或多肽组)。例如,天然存在的IgG类型的“抗体”是包含通过二硫键互连的至少两个重(H)链和两个轻(L)链的四聚体。每个重链包含重链可变区(本文缩写为VH)和重链恒定区。重链恒定区包含三个结构域:CH1、CH2和CH3。每个轻链包含轻链可变区(本文缩写为VL)和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个结构域(本文缩写为CL)。VH区和VL区可以进一步细分为被称作互补决定区(CDR)的超变区,该超变区散布有更保守的被称作框架区(FR)的区。每个VH和VL由按照以下顺序从氨基末端到羧基末端排列的三个CDR和四个FR构成:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,包含免疫系统的各种细胞(例如,效应子细胞)以及经典补体系统的第一组分(Clq)。术语“抗体”包括但不限于单克隆抗体、人抗体、人源化抗体、骆驼化抗体、嵌合抗体、双特异性或多特异性抗体和抗独特型(抗id)抗体。抗体可以是任何同种型/类(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)或亚类(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)。轻链和重链两者分为结构和功能同源区。术语“恒定”和“可变”是在功能上使用的。在这方面,应当理解,轻链(VL)和重链(VH)部分两者的可变结构域决定抗原识别和特异性。相反,轻链(CL)和重链(CH1、CH2或CH3)的恒定结构域赋予重要的生物学特性,诸如分泌、经胎盘迁移性、Fc受体结合、补体结合等。按照惯例,恒定区结构域的编号随着它们变得更远离抗体的抗原结合结构域或氨基末端而增加。N末端是可变区并且C末端是恒定区;CH3和CL结构域分别代表天然抗体的重链和轻链的羧基末端。为了方便起见,并且除非上下文另有规定,对抗体的提及也是指抗体片段以及包括非天然存在的抗原结合结构域和/或具有非天然结构的抗原结合结构域的经工程化抗体。

[0038] 抗原结合结构域:如本文所用的术语“抗原结合结构域”或“ABD”是指具有非共价地、可逆地和特异性地结合至抗原的能力的抗体或抗体片段(例如,靶向部分)的部分。可以包含ABD的抗体片段的实例包括但不限于单链Fv (scFv)、Fab片段、由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;F(ab)2片段,包含在铰链区处由二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段;由VH和CH1结构域组成的Fd片段;由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段;由VH结构域组成的dAb片段(Ward等人, 1989, Nature 341:544-546);以及分离的互补决定区(CDR)。因此,术语“抗体片段”涵盖抗体的蛋白水解片段(例如,Fab和$F(ab)_2$片段)和包含抗体的一个或多个部分的经工程化蛋白质(例如,scFv)。抗体片段还可以掺入单结构域抗体、大抗体、小抗体、胞内抗体、双抗体、三抗体、四抗体、v-NAR和双-scFv中(参见例如Hollinger和Hudson, 2005, Nature Biotechnology 23: 1126-1136)。

[0039] 缔合:在IL2蛋白质原的上下文中,术语“缔合”是指两个或更多个多肽链之间的功能关系。特别地,术语“缔合”意指两个或更多个多肽彼此缔合,例如,通过分子相互作用非共价地或通过一个或多个二硫桥或化学交联共价地缔合,以便产生功能性IL2蛋白质原。可能存在于本公开的IL2蛋白质原中的缔结的实例包括(但不限于)待形成Fc区的Fc结构域之间的缔结(如第6.9节中描述的同二聚体或异二聚体)、Fab或Fv中的VH区与VL区之间的缔结以及Fab中的CH1与CL之间的缔结。

[0040] 癌症:术语“癌症”是指以异常细胞的不受控制(并且通常快速)生长为特征的疾病。癌细胞可以局部扩散或通过血流和淋巴系统扩散至身体的其他部位。本文描述了各种癌症的实例,这些实例包括但不限于乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、胰腺癌、结

直肠癌、肾癌、肝癌、脑癌、肾上腺癌、、神经节癌、胆道癌、骨癌、子宫内膜癌、眼癌、输卵管癌、生殖道癌、大肠癌、脑膜癌、食道癌、腹膜癌、垂体癌、阴茎癌、胎盘癌、胸膜癌、唾液腺癌、小肠癌、胃癌、睾丸癌、胸腺癌、甲状腺癌、上呼吸道消化系统癌症、尿路癌、阴道癌、外阴癌、淋巴瘤、白血病、肺癌等,例如,前述类型中的任一类型的任何TAA阳性癌症。

[0041] 互补决定区:如本文所用,术语“互补决定区”或“CDR”是指抗体可变区内赋予抗原特异性和结合亲和力的氨基酸的序列。例如,通常,每个重链可变区中存在三个CDR(例如,CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3)并且每个轻链可变区中存在三个CDR(CDR-L1、CDR-L2、和CDR-L3)。给定CDR的精确氨基酸序列边界可以使用许多众所周知的方案中的任一方案来确定,包括由Kabat等人, 1991, “Sequences of Proteins of Immunological Interest,” 第5版Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(“Kabat”编号方案), Al-Lazikani等人, 1997, JMB 273:927-948(“Chothia”编号方案)和ImMunoGenTics (IMGT)编号(Lefranc, 1999, The Immunologist 7:132-136; Lefranc等人, 2003, Dev. Comp. Immunol. 27:55-77(“IMGT”编号方案)。例如,对于经典格式,在Kabat下,重链可变结构域(VH)中的CDR氨基酸残基编号为31-35 (CDR-H1)、50-65 (CDR-H2)和95-102 (CDR-H3);并且轻链可变结构域(VL)中的CDR氨基酸残基编号为24-34 (CDR-L1)、50-56 (CDR-L2)和89-97 (CDR-L3)。在Chothia下,VH中的CDR氨基酸编号为26-32 (CDR-H1)、52-56 (CDR-H2) 和95-102 (CDR-H3);并且VL中的氨基酸残基编号为26-32 (CDR-L1)、50-52 (CDR-L2)和91-96 (CDR-L3)。通过结合Kabat和Chothia两者的CDR定义,CDR由人类VH中的氨基酸残基26-35 (CDR-H1)、50-65 (CDR-H2) 和95-102 (CDR-H3)和人类VL中的氨基酸残基24-34 (CDR-L1)、50-56 (CDR-L2)和89-97 (CDR-L3)组成。在IMGT下,VH中的CDR氨基酸残基编号为大约26-35 (CDR-H1)、51-57 (CDR-H2)和93-102 (CDR-H3),并且VL中的CDR氨基酸残基编号为大约27-32 (CDR-L1)、50-52 (CDR-L2) 和89-97 (CDR-L3)(根据“Kabat”编号)。在IMGT下,抗体的CDR区可以使用程序IMGT/DomainGap Align来确定。

[0042] 效应子功能:术语“效应子功能”是指通过通过抗体的除抗原结合结构域之外的结构域的结合介导(通常由效应子分子的结合介导)的抗体分子的活性。效应子功能包括补体介导的效应子功能,该效应子功能是通过例如将补体的C1组分结合至抗体介导的。补体的活化在细胞病原体的调理和裂解中很重要。补体的活化也会刺激炎症反应并且还可能参与自身免疫性超敏反应。效应子功能还包括Fc受体(FcR)介导的效应子功能,该效应子功能可以在将抗体的恒定结构域结合至Fc受体(FcR)时被触发。将抗体结合至细胞表面上的Fc受体会引发许多重要并且多样化的生物反应,这些生物反应包括吞噬和破坏抗体包被的颗粒、清除免疫复合物、由杀伤细胞(称为抗体依赖性细胞介导的细胞毒性或ADCC)裂解抗体包被的靶细胞、释放炎症介质、控制胎盘转移和免疫球蛋白产生。抗体的效应子功能可以通过改变(例如,增强或降低)抗体对诸如Fc受体或补体组分等效应子分子的亲和力来改变。通常通过修饰效应子分子结合位点来改变结合亲和力,并且在这种情况中,适当地定位感兴趣的位点并且以合适的方式修饰该位点的至少部分。还设想,针对效应子分子的抗体上的结合位点中的改变不需要显著改变总体结合亲和力,但可能改变相互作用的几何形状,使得效应子机制如在非生产性结合中那样无效。进一步设想,效应子功能还可以通过修饰不直接参与效应子分子结合、但以其他方式参与效应子功能的执行的位点来改变。

[0043] 表位:表位或抗原决定簇是经本文所述的抗体或其他抗原结合部分识别的抗原的部分。表位可以是线性的或构象的。

[0044] Fab:术语“Fab”是指一对多肽链,第一个多肽链包含可操作地连接(通常在N末端)至第一恒定结构域(本文称为C1)的抗体重链可变(VH)结构域,并且第二个多肽链包含可操作地连接(通常在N末端)至第二恒定结构域(本文称为C2)的抗体轻链可变(VL)结构域,该第二恒定结构域能够与该第一恒定结构域配对。在天然抗体中,VH位于重链的第一恒定结构域(CH1)的N末端并且VL位于轻链(CL)的恒定结构域的N末端。本公开的Fab可以根据天然方向排列或包括有利于正确的VH和VL配对的结构域取代或交换。例如,可以用CH3结构域对替换Fab中的CH1和CL结构域对以促进异二聚体分子中正确的修饰Fab链配对。还可以颠倒CH1和CL,使得CH1附接至VL并且CL附接至VH,这种配置通常被称为Crossmab。术语“Fab”涵盖单链Fab。

[0045] Fc结构域和Fc区:术语“Fc结构域”是指与另一重链的相应部分配对的重链的部分。术语“Fc区”是指由两个重链Fc结构域缔合形成的区域。Fc区内的两个Fc结构域可以彼此相同或不同。在天然抗体中,Fc结构域通常是相同的,但一个或两个Fc结构域可能被修饰以允许异二聚化,例如,经由杵臼相互作用。

[0046] Fv:术语“Fv”是指源自免疫球蛋白的最小抗体片段,该最小抗体片段含有完整的靶识别和结合位点。该区域由一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域组成的二聚体组成,该二聚体呈紧密的非共价缔结(VH-VL二聚体)。正是在这种构型中,每个可变结构域的三个CDR相互作用以限定VH-VL二聚体的表面上的靶结合位点。通常,六个CDR赋予抗体的靶结合特异性。然而,在一些情况下,甚至单个可变结构域(或仅包含靶特异性的三个CDR的Fv的一半)也可以具有识别和结合靶的能力。本文提及VH-VL二聚体并不意指表达任何特定的配置。当存在于单个多肽链(例如,scFv)上时,VH位于VL的N末端或C末端。

[0047] 半抗体:术语“半抗体”是指包含至少一个Fc结构域并且可以通过例如二硫桥或分子相互作用与包含Fc的另一分子缔合的分子。半抗体可以由一个多肽链或多于一个多肽链(例如,Fab的两个多肽链)组成。半抗体的实例是包含抗体(例如,IgG抗体)的重链和轻链的分子。半抗体的另一个实例是包含包含VL结构域和CL结构域的第一多肽和包含VH结构域、CH1结构域、铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域的第二多肽的分子,其中所述VL和VH结构域形成ABD。半抗体的又一实例是包含scFv结构域、CH2结构域和CH3结构域的多肽。本公开的IL2蛋白质原通常包含两个半抗体,每个半抗体包含Fc结构域、在Fc结构域的C末端的IL2Rα部分、在IL2Rα部分的C末端的蛋白酶可裂解接头和在蛋白酶可裂解接头的C末端的IL2部分。IL2蛋白质原中的一个或两个半抗体可以进一步包含靶向部分,例如,在Fc结构域的N末端。

[0048] 术语“半抗体”仅用于描述目的,并不意味着特定的配置或生产的方法。将半抗体描述为“第一”半抗体、“第二”半抗体、“左”半抗体、“右”半抗体等仅仅是为了方便和描述的目的。

[0049] 宿主细胞或重组宿主细胞:术语“宿主细胞”或“重组宿主细胞”是指例如通过引入异源核酸进行基因工程化的细胞。应当理解,此类术语不仅意指特定的受试者细胞,而且意指此类细胞的后代。因为由于突变或环境影响,某些修饰可能在后代中发生,这种子代实际上可能与亲代细胞不同,但仍包含在本文所用术语“宿主细胞”的范围内。宿主细胞可以例

如在染色体外异源表达载体上瞬时携带异源核酸,或者例如通过将异源核酸整合到宿主细胞基因组中而稳定地携带异源核酸。为了表达本公开的IL2蛋白质原的目的,宿主细胞优选地是哺乳动物来源或哺乳动物样特征的细胞系,诸如猴肾细胞(COS,例如,COS-1、COS-7)、HEK293),小仓鼠肾(BHK,例如,BHK21)、中国仓鼠卵巢(CHO)、NSO、PerC6、BSC-1、人类肝细胞癌细胞(例如,Hep G2)、SP2/0、HeLa、Madin-Darby牛肾(MDBK)、骨髓瘤和淋巴瘤细胞或其衍生物和/或工程化变体。工程化变体包括例如以比原始细胞系高的密度生长的衍生物和/或聚糖谱修饰的衍生物和/或位点特异性整合位点衍生物。

[0050] 接头:如本文所用的术语“接头”是指蛋白酶可裂解接头或不可裂解接头。

[0051] 不可裂解接头:不可裂解接头是指其氨基酸序列缺少蛋白酶(例如,第6.5.1节中描述的蛋白酶)的底物序列的肽,该肽识别并且裂解特定序列基序(例如,第6.5.2节中描述的底物)。

[0052] 可操作地连接:术语“可操作地连接”是指两个或更多个肽或多肽结构域或核酸(例如,DNA)片段之间的功能关系。在融合蛋白或其他多肽的上下文中,术语“可操作地连接”是指两个或更多个氨基酸片段被连接以产生功能性多肽。例如,在本公开的IL2蛋白质原的背景下,单独的组分(例如,Fc结构域和IL2Rα部分)可以直接或通过肽接头序列可操作地连接。在编码融合蛋白(诸如本公开的IL2蛋白质原的半抗体)的核酸的上下文中,“可操作地连接”意指两个核酸被连接使得由两个核酸编码的氨基酸序列保留框内。在转录调节的上下文中,术语是指转录调节序列与转录序列的功能关系。例如,如果启动子或增强子序列刺激或调节编码序列在适当的宿主细胞或其他表达系统中的转录,则该启动子或增强子序列可操作地连接至编码序列。

[0053] 多肽、肽和蛋白质:术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,是指氨基酸残基的聚合物。

[0054] 蛋白质原:“蛋白质原”是无活性并且可以通过蛋白酶的蛋白水解而活化的蛋白质前体。因此,蛋白质原是“蛋白酶可活化的”。

[0055] 蛋白酶:如本文所用的术语“蛋白酶”是指催化肽键水解的任何酶。一般而言,可用于本公开的蛋白酶,例如,第6.5.1节中描述的蛋白酶,识别并且裂解特定序列基序,例如,第6.5.2节中描述的底物。 优选地,与正常组织相比,蛋白酶在癌症组织中以更高水平表达。

[0056] 蛋白酶可裂解接头:如本文所用,术语“蛋白酶可裂解接头”或“PCL”是指其氨基酸序列含有用于一个或多个蛋白酶的一个或多个(例如,两个、三个或更多个)底物序列的肽。示例性蛋白酶可裂解接头在第6.5节中描述并且示例性蛋白酶可裂解接头序列在第6.5.4节中公开。

[0057] 识别:如本文所用的术语“识别”是指发现其表位并且与该表位相互作用(例如,结合)的抗体或抗体片段(例如,靶向部分)。

[0058] 单链Fab或scFab:如本文所用的术语“单链Fab”或“scFab”是指包含VH结构域、CH1结构域、VL结构域、CL结构域和接头的ABD。在一些实施例中,前述结构域和接头以以下顺序之一沿N末端至C末端方向排列:(a) VH-CH1-接头-VL-CL,(b) VL-CL-接头-VH-CH1,(c) VH-CL-接头-VL-CH1或(d) VL-CH1-接头-VH-CL。连接子合适地是至少30个氨基酸、优选32个至50个氨基酸的不可裂解连接子。单链Fab片段通常经由CL结构域与CH1结构域之间的天

然二硫键稳定。此外,这些单链Fab分子可以通过经由插入半胱氨酸残基(例如,根据Kabat编号在VH结构域中的位置44和VL结构域中的位置100处)生成链间二硫键来进一步稳定。

[0059] 单链Fv或scFv:如本文所用的术语“单链Fv”或“scFv”是指包含抗体的VH和VL结构域的ABD,其中这些结构域存在于单个多肽链中。优选地,Fv多肽进一步包括VH与VL结构域之间的多肽接头,其使得scFv能够形成用于抗原结合的所需结构。关于scFv的综述,参见Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 第113卷, Rosenburg和Moore编辑(1994), Springer-Verlag, New York, 第269-315页。VH和VL可以按N末端到C末端(即,VH-VL或VL-VH)的顺序排列,通常由接头隔开,例如表E中列出的接头。

[0060] 间隔子:如本文所用,术语“间隔子”是指掺入含有底物的接头中的肽,该钛的氨基酸序列不是蛋白酶的底物。间隔子可用于将底物与分子中的其他结构域(例如ABD)分离。在一些方面中,间隔子中的残基最小化氨肽酶和/或外肽酶作用以防止N末端氨基酸的裂解。

[0061] 具体(或选择性)结合:术语“特异性(或选择性)结合”至抗原或表位是指决定异质蛋白质和其他分子群体中同源抗原或表位的存在的结合反应。结合反应可以但不必由抗体或抗体片段介导。术语“特异性结合”不排除跨物种反应性。例如,“特异性结合”至来自一种物种的抗原的抗原结合结构域(例如,抗体的抗原结合片段)也可以“特异性结合”至一种或多种其他物种中的该抗原。因此,这种跨物种反应性本身并不改变抗原结合结构域作为“特异性”结合物的分类。在某些实施例中,本公开的特异性结合人类抗原的抗原结合结构域与一种或多种非人类哺乳动物物种(例如,灵长类物种(包括但不限于食蟹猴、猕猴和豚尾猴中的一种或多种))或啮齿类动物(例如,小家鼠)具有跨物种反应性。

[0062] 受试者:术语“受试者”包括人类和非人类动物。非人类动物包括所有脊椎动物,例如,哺乳动物和非哺乳动物,诸如非人类灵长类动物、绵羊、狗、牛、鸡、两栖动物和爬行动物。在优选的实施例中,受试者是人类。

[0063] 底物:术语“底物”是指蛋白酶将作用于其上并且蛋白酶将在其中裂解肽键的肽序列。

[0064] 靶分子:如本文所用的术语“靶分子”是指在细胞表面上或在可以由本公开的IL2蛋白质原中的靶向部分特异性结合的细胞外基质中表达的任何生物分子(例如,蛋白质、碳水化合物、脂质或其组合)。

[0065] 靶向部分:如本文所用的术语“靶向部分”是指可以在本公开的IL2蛋白质原待被定位至的位点处结合至细胞表面或细胞外基质分子(例如肿瘤微环境中的肿瘤细胞上或淋巴细胞上)的任何分子或结合部分(例如,免疫球蛋白或抗原结合片段)。在一些实施例中,靶向部分结合至TAA。在其他实施例中,靶向部分结合至TCA。除了将IL2蛋白质原定位于特定位点之外,靶向部分还可以具有功能活性。例如,结合至诸如PD1等检查点抑制剂的靶向部分也可以表现出抗肿瘤活性或增强IL2的抗肿瘤活性,例如通过抑制PD1信号传导。

[0066] T细胞抗原,TCA:术语“T细胞抗原”或“TCA”是指在T淋巴细胞的表面上表达并且可用于将药剂优先地靶向至特定位点的分子(通常是蛋白质、碳水化合物、脂质或其一些组合)。在一些实施例中,该位点是癌症组织和/或T细胞抗原是肿瘤反应性淋巴细胞抗原、肿瘤或病毒淋巴细胞的细胞表面分子或在T淋巴细胞上表达的检查点抑制剂。

[0067] 肿瘤:术语“肿瘤”在本文中与术语“癌症”互换使用,例如,两个术语涵盖固体和液体,例如,弥漫性或循环性肿瘤。如本文所用,术语“癌症”或“肿瘤”包括癌前以及恶性癌症

和肿瘤。

[0068] 肿瘤相关抗原,TAA:术语“肿瘤相关抗原”或“TAA”是指在癌细胞表面上表达的分子(通常是蛋白质、碳水化合物、脂质或它们的某种组合),该分子可以全部或作为片段(例如,MHC/肽)表达,并且可用于将药剂优先地靶向至癌细胞。在一些实施例中,TAA是由正常细胞和癌细胞(例如,谱系标记物)表达的标记物。在一些实施例中,TAA是与正常细胞相比在癌细胞中过表达的细胞表面分子,例如与正常细胞相比1倍过表达、2倍过表达、3倍过表达或更多。在一些实施例中,TAA是在癌细胞中不适当合成的细胞表面分子,例如与正常细胞上表达的分子相比含有缺失、添加或突变的分子。在一些实施例中,TAA将完全或作为片段(例如,MHC/肽)专门在癌细胞的细胞表面上表达,并且不在正常细胞的表面上合成或表达。因此,术语“TAA”涵盖癌细胞特异性的抗原,有时在本领域中称为肿瘤特异性抗原(“TSA”)。

[0069] 治疗(treat、treatment、treating):如本文所用的术语“治疗(treat、treatment和treating)”是指通过施用一种或多种本公开的IL2蛋白质原来减少或改善增殖性疾病的进展、严重程度和/或持续时间,或改善增殖性疾病的一种或多种症状(优选地,一种或多种可辨别的症状)。在具体实施例中,术语“治疗(treat、treatment和treating)”是指改善不一定可由患者辨别的增殖性疾病(诸如肿瘤的生长)的至少一种可测量的物理参数。在其他实施例中,术语“治疗”是指在物理上通过例如稳定可辨别的症状、在生理上通过例如稳定物理参数或两者兼而有之来抑制增殖性疾病的进展。在其他实施例中,术语“治疗(treat、treatment和treating)”是指肿瘤大小或癌细胞计数的减小或稳定。

[0070] 通用轻链,ULC:如本文所用的术语“通用轻链”或“ULC”是指可以与多个重链可变区(VL)配对的轻链可变区(VL)。在靶向部分的上下文中,术语“通用轻链”或“ULC”是指能够与靶向部分的重链区域配对并且还能够与其他重链区域配对的轻链多肽。ULC还可以包括恒定结构域,例如抗体的CL结构域。通用轻链也称为“普通轻链”。

[0071] VH:术语“VH”是指抗体的免疫球蛋白重链的可变区,包括Fv、scFv、dsFv或Fab的重链。

[0072] VL:术语“VL”是指免疫球蛋白轻链的可变区,包括Fv、scFv、dsFv或Fab的轻链。

[0073] 6.2.IL2蛋白质原

[0074] 本公开涉及包含IL2部分、IL2Rα部分和蛋白酶可裂解接头的IL2蛋白质原,该IL2蛋白质原被排列使得IL2Rα减少或阻断IL2部分的活性。IL2蛋白质原被配置为使得在遇到蛋白酶(例如在肿瘤环境中过表达的蛋白酶)时,蛋白酶可裂解接头被裂解并且IL2被释放并且刺激针对肿瘤细胞的细胞毒性T细胞活性。通常,本公开的IL2蛋白质原是二聚体并且包含两个Fc结构域,这些Fc结构域缔合形成Fc区,IL2Rα部分、蛋白酶可裂解接头和IL2部分在该Fc区的C末端按N末端至C末端的顺序排列。IL2蛋白质原可以进一步包含Fc结构域与IL2Rα部分之间的接头,优选地是不可裂解接头。

[0075] 因此,本公开的IL2蛋白质原通常包含:(a)能够缔合形成Fc区的第一Fc结构域和第二Fc结构域;(b)在Fc结构域C末端的任选地前面有接头的两个IL2Rα部分,优选地是不可裂解接头;(c)在IL2Rα部分C末端的两个蛋白酶可裂解接头;以及(d)在蛋白酶可裂解接头的C末端的两个IL2部分。IL2蛋白质原中的IL2部分由于被IL2Rα部分掩蔽而处于无活性形式,但在蛋白酶可裂解接头的蛋白酶裂解后被释放,例如,在肿瘤环境中。合适的IL2部分的

实例描述于第6.3节中,合适的IL2Rα部分的实例描述于第6.4节中,并且合适的蛋白酶可裂解接头的实例描述于第6.5节中。

[0076] 一般而言,本公开的IL2蛋白质原含有多个接头。优选地,除了其裂解释放IL2部分的蛋白酶可裂解接头之外,其余接头是不可裂解的。不可裂解连接子的实例阐述于第6.6节中。

[0077] IL2蛋白质原可进一步包含一个或多个靶向部分,并且在一些实施例中包含两个位于Fc结构域的N末端的靶向部分。靶向部分的实例描述于第6.7节中并且合适的靶向部分格式描述于第6.8节中。在一些实施例中,Fc结构域在其N末端包含铰链结构域。具有或不具有铰链序列的合适Fc结构域描述于第6.9节中。

[0078] 图1A中描绘了示例性IL2蛋白质原。IL2蛋白质原包含:

[0079] a)第一多肽链,其包含与单独的多肽链上的Fab的轻链缔合的Fab的重链,一起形成第一靶向部分,随后是包含铰链结构域的Fc结构域,随后是优选地是不可裂解接头的接头(“接头A”),随后是IL2Rα部分,随后是蛋白酶可裂解接头(“接头B”),随后是IL2部分;以及

[0080] b)第二多肽链,其包含与单独的多肽链上的Fab的轻链缔合的Fab的重链的,一起形成第二靶向部分,随后是包含铰链结构域的Fc结构域,随后是优选地是不可裂解接头的接头(“接头C”),随后是IL2Rα部分,随后是蛋白酶可裂解接头(“接头D”),随后是IL2部分。

[0081] 6.3.IL2部分

[0082] 本公开的IL2蛋白质原的IL2部分包含野生型或变体IL2部分。

[0083] 在真核细胞中,人类IL2被合成为153个氨基酸的前体多肽,其中20个氨基酸被除去以生成成熟的分泌性IL2(Taniguchi等人, 1983, Nature 302(5906):305-10)。成熟的人类IL2具有以下氨基酸序列:

[0084] APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:2)

[0085] 在一些实施例中,本公开的IL2部分不是CD122定向的,例如,它们在IL2部分中不具有使得它们与IL2Rα相比优先地结合IL2Rβ的氨基酸取代。

[0086] 在一些实施例中,本公开的IL2部分是CD25定向的,例如,它们在IL2部分中具有使得它们与IL2Rβ相比优先地结合IL2Rα的一个或多个氨基酸取代。

[0087] 在某些实施例中,本公开的IL2蛋白质原在IL2部分中具有减少结合至IL2Rβ的一个或多个氨基酸取代。例如,在一些实施例中,IL2部分可以具有与野生型人类IL2相比结合至人类IL2Rβ减弱的高达50倍(并且在一些实施例中高达100倍)至1,000倍。

[0088] 结合至IL2Rβ降低的IL2部分可以保留其对IL2Rα的亲和力,或结合至IL2Rα降低。例如,在一些实施例中,IL2部分可以具有与野生型人类IL2相比结合至人类ffα减弱的高达50倍。

[0089] 有用的IL2变体的其他特征可包括诱导肿瘤中的携带IL2Rα的CD8+T细胞的增殖的能力、诱导肿瘤中的携带IL2Rα的CD8+T细胞中的IL2信号传导的能力以及改善的治疗指数。

[0090] 在一个实施例中,IL2部分包含一个或多个氨基酸取代,这些氨基酸取代降低对IL2Rβ的亲和力并且保留对IL2Rα的亲和力。示例性氨基酸取代是N88D。降低或消除IL2对

IL2Rβ亲和力的其他氨基酸取代是D20T、N88R、N88D或Q126D(参见例如美国专利公开号US 2007/0036752)。

[0091] 在一个实施例中,IL2部分包含一个或多个氨基酸取代,这些氨基酸取代降低对IL2Rα的亲和力并且保留或较小程度地降低对IL2Rβ的亲和力,产生CD122定向的IL2部分。示例性CD122导向的IL2部分是包含H16A和F42A取代的那些。因此,在一些实施例中,IL2部分包含具有H16A和F42A取代的人类IL2的氨基酸序列,如下所示:

[0092] SAPTSSSTKKTQLQLEALLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:124)

[0093] 在某些实施例中,IL2部分包含消除在对应于人类IL2的残基3的位置处的IL2的O-糖基化位点的氨基酸取代。T3处的示例性氨基酸取代是T3A、T3G、T3Q、T3E、T3N、T3D、T3R、T3K和T3P。在具体实施例中,取代是T3A。

[0094] IL2部分优选基本上是全长IL2分子,例如,人类IL2分子。在某些实施例中,IL2部分是人类IL-2分子。

[0095] C125可以用S、V或A取代以减少蛋白质聚集,如美国专利号4,518,584中描述的。

[0096] 如本文所述,还可以删除IL2的N末端丙氨酸残基,产生des-A1 IL2。

[0097] 此外,IL2部分可以包括用诸如丙氨酸等中性氨基酸取代甲硫氨酸104,如美国专利号5,206,344中描述的。

[0098] 因此,除了其他变异改变了将IL2结合至其受体之外,本公开的IL2部分还可以具有选自des-A1 M104A IL2、des-A1 M104A C125S IL2、M104A IL2、M104A C125A IL2、des-A1 M104A C125A IL2或M104A C125S IL2的氨基酸缺失和/或取代。这些和其他突变体可以在美国专利号5,116,943中和在Weiger等人, 1989, Eur J Biochem 180:295-300中找到。

[0099] 在各个方面中,前述IL2部分中的任一前述IL2部分包含与成熟人类IL2具有至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%序列同一性的氨基酸序列。

[0100] 6.4.IL2Rα部分

[0101] 本公开的IL2蛋白质原包含IL2Rα部分,该IL2Rα部分包含IL2Rα的IL2结合结构域或由该IL2Rα的该IL2结合结构域组成,例如,IL2Rα的胞外结构域。成熟人类IL2Rα胞外结构域(对应于人类IL2Rα的氨基酸22-272)的序列是:

[0102] Glu Leu Cys Asp Asp Asp Pro Pro Glu Ile Pro His Ala Thr Phe Lys

[0103] Ala Met Ala Tyr Lys Glu Gly Thr Met Leu Asn Cys Glu Cys Lys Arg

[0104] Gly Phe Arg Arg Ile Lys Ser Gly Ser Leu Tyr Met Leu Cys Thr Gly

[0105] Asn Ser Ser His Ser Ser Trp Asp Asn Gln Cys Gln Cys Thr Ser Ser

[0106] Ala Thr Arg Asn Thr Thr Lys Gln Val Thr Pro Gln Pro Glu Glu Gln

[0107] Lys Glu Arg Lys Thr Thr Glu Met Gln Ser Pro Met Gln Pro Val Asp

[0108] Gln Ala Ser Leu Pro Gly His Cys Arg Glu Pro Pro Pro Trp Glu Asn

[0109] Glu Ala Thr Glu Arg Ile Tyr His Phe Val Val Gly Gln Met Val Tyr

[0110] Tyr Gln Cys Val Gln Gly Tyr Arg Ala Leu His Arg Gly Pro Ala Glu

[0111] Ser Val Cys Lys Met Thr His Gly Lys Thr Arg Trp Thr Gln Pro Gln

[0112] Leu Ile Cys Thr Gly Glu Met Glu Thr Ser Gln Phe Pro Gly Glu Glu

[0113] Lys Pro Gln Ala Ser Pro Glu Gly Arg Pro Glu Ser Glu Thr Ser Cys

[0114] Leu Val Thr Thr Thr Asp Phe Gln Ile Gln Thr Glu Met Ala Ala Thr

[0115] Met Glu Thr Ser Ile Phe Thr Thr Glu Tyr Gln Val Ala Val Ala Gly

[0116] Cys Val Phe Leu Leu Ile Ser Val Leu Leu Leu Ser Gly Leu Thr Trp

[0117] Gln Arg Arg Gln Arg Lys Ser Arg Arg Thr Ile (SEQ ID NO: 3)

[0118] 人类IL2Rα胞外结构域(包含两个“sushi”结构域,其对应于人类IL2Rα的氨基酸22-186)的IL2结合部分的序列是:

[0119] Glu Leu Cys Asp Asp Asp Pro Pro Glu Ile Pro His Ala Thr Phe Lys

[0120] Ala Met Ala Tyr Lys Glu Gly Thr Met Leu Asn Cys Glu Cys Lys Arg

[0121] Gly Phe Arg Arg Ile Lys Ser Gly Ser Leu Tyr Met Leu Cys Thr Gly

[0122] Asn Ser Ser His Ser Ser Trp Asp Asn Gln Cys Gln Cys Thr Ser Ser

[0123] Ala Thr Arg Asn Thr Thr Lys Gln Val Thr Pro Gln Pro Glu Glu Gln

[0124] Lys Glu Arg Lys Thr Thr Glu Met Gln Ser Pro Met Gln Pro Val Asp

[0125] Gln Ala Ser Leu Pro Gly His Cys Arg Glu Pro Pro Pro Trp Glu Asn

[0126] Glu Ala Thr Glu Arg Ile Tyr His Phe Val Val Gly Gln Met Val Tyr

[0127] Tyr Gln Cys Val Gln Gly Tyr Arg Ala Leu His Arg Gly Pro Ala Glu

[0128] Ser Val Cys Lys Met Thr His Gly Lys Thr Arg Trp Thr Gln Pro Gln

[0129] Leu Ile Cys Thr Gly (SEQ ID NO: 4)

[0130] 人类IL2Rα胞外结构域(对应于人类IL2Rα的氨基酸22-240)的替代IL2结合部分的序列是:

[0131] Glu Leu Cys Asp Asp Asp Pro Pro Glu Ile Pro His Ala Thr Phe Lys

[0132] Ala Met Ala Tyr Lys Glu Gly Thr Met Leu Asn Cys Glu Cys Lys Arg

[0133] Gly Phe Arg Arg Ile Lys Ser Gly Ser Leu Tyr Met Leu Cys Thr Gly

[0134] Asn Ser Ser His Ser Ser Trp Asp Asn Gln Cys Gln Cys Thr Ser Ser

[0135] Ala Thr Arg Asn Thr Thr Lys Gln Val Thr Pro Gln Pro Glu Glu Gln

[0136] Lys Glu Arg Lys Thr Thr Glu Met Gln Ser Pro Met Gln Pro Val Asp

[0137] Gln Ala Ser Leu Pro Gly His Cys Arg Glu Pro Pro Pro Trp Glu Asn

[0138] Glu Ala Thr Glu Arg Ile Tyr His Phe Val Val Gly Gln Met Val Tyr

[0139] Tyr Gln Cys Val Gln Gly Tyr Arg Ala Leu His Arg Gly Pro Ala Glu

[0140] Ser Val Cys Lys Met Thr His Gly Lys Thr Arg Trp Thr Gln Pro Gln

[0141] Leu Ile Cys Thr Gly Glu Met Glu Thr Ser Gln Phe Pro Gly Glu Glu

[0142] Lys Pro Gln Ala Ser Pro Glu Gly Arg Pro Glu Ser Glu Thr Ser Cys

[0143] Leu Val Thr Thr Thr Asp Phe Gln Ile Gln Thr Glu Met Ala Ala Thr

[0144] Met Glu Thr Ser Ile Phe Thr Thr Glu Tyr Gln (SEQ ID NO: 5)

[0145] IL2Rα部分优选地包含与上述任何序列具有至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%序列同一性的氨基酸序列,即,IL2Rα的氨基酸22-186、IL2Rα的氨基酸22-240或IL2Rα的氨基酸22-272中的任一者或其任何IL2结合部分。

[0146] 在某些方面中,IL2Rα部分可以包含与人类IL2Rα的IL2结合部分具有至少约90%、

至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%序列同一性的氨基酸序列或由该氨基酸序列组成,任选地其中该结合部分具有(a)至少160个氨基酸、至少161个氨基酸、至少162个氨基酸、至少164个氨基酸或至少165个氨基酸和/或(b)人类IL2Rα胞外结构域的至多251个、至多240个、至多230个、至多220个、至多210个、至多200个、至多190个、至多180个或至多170个氨基酸的氨基酸序列。在具体实施例中,人类IL2Rα的部分由前一句中的(a)和(b)中的任一者界定,例如,来自人类IL2Rα的至少160个和至多180个氨基酸、来自人类IL2Rα的氨基酸的至少162个和至多200个氨基酸、来自人类IL2Rα的至少160个和至多220个氨基酸、来自人类IL2Rα的至少164个和至多190个氨基酸,等等。

[0147] 在一些实施例中,IL2Rα部分包含与氨基酸22-186具有至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%序列同一性的氨基酸序列或由该氨基酸序列组成,其中有或没有IL2Rα的在氨基酸残基186的C末端的额外至多5个氨基酸、至多10个氨基酸、至多15个氨基酸、至多20个氨基酸、至多30个氨基酸或至多40个氨基酸。

[0148] 在某些实施例中,IL2Rα部分与天然IL2Rα的胞外结构域相比具有至少一个较少的O-糖基化和/或N-糖基化,例如通过在氨基酸N49、氨基酸N68、氨基酸T74、氨基酸T85、氨基酸T197、氨基酸T203、氨基酸T208和氨基酸T216中的一者或多者处的取代。在一些实施例中,一个或多个取代是从天冬酰胺到选自由以下项组成的组的氨基酸:丙氨酸、苏氨酸、丝氨酸、精氨酸、天冬氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸。在一些实施方案中,一个或多个取代是从苏氨酸到选自由以下项组成的组的氨基酸:丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸。在一些实施例中,一个或多个取代位于氨基酸S50(例如,S50P)、氨基酸S51(例如,S51R、S51N、S51D、S51C、S51Q、S51E、S51G、S51H、S51I、S51L、S51K、S51M、S51F、S51P、S51W、S51Y或S51V)、氨基酸T69(例如,T69P)、氨基酸T70(例如,T70R、T70N、T70D、T70C、T70Q、T70E、T70G、T70H、T70I、T70L、T70K、T70M、T70F、T70P、T70W、T70Y或T70V)、氨基酸C192(例如,C192R、C192N、C192D、C192Q、C192E、C192G、C192H、C192I、C192L、C192K、C192M、C192F、C192P、C192W、C192Y或C192V)或其任何组合。

[0149] 6.5.蛋白酶可裂解接头

[0150] 本公开的IL2蛋白质原包含具有一个或多个蛋白酶底物并且其裂解导致IL2活化的接头,该接头通常位于IL2Rα部分与IL2部分之间。

[0151] 蛋白酶可裂解接头的范围可以是20个氨基酸至80个或更多个氨基酸,并且在某些方面中,不可裂解肽接头在长度上范围可以为20个氨基酸至60个氨基酸、20个氨基酸至40个氨基酸、30个氨基酸至50个氨基酸、20个氨基酸至80个氨基酸或30个氨基酸至70个氨基酸。

[0152] 蛋白酶可裂解接头包含用于一个或多个蛋白酶的一个或多个底物序列,例如第6.5.1节中列出的一个或多个蛋白酶。一个或多个底物序列,例如,第6.5.2节中列出的一个或多个底物序列,通常侧翼有一个或多个间隔子序列,例如第6.5.3节中描述的间隔子序列。每个蛋白酶可裂解接头可以包括一个、两个、三个或更多个底物序列。间隔子序列可以是邻接的、重叠的或由间隔子序列分离的。优选地,蛋白酶可裂解接头的C末端和N末端含有间隔子序列。

[0153] 第0节中列出的示例性蛋白酶可裂解接头序列

[0154] 6.5.1.蛋白酶

[0155] 下面的表A中列出了其底物序列可以掺入蛋白酶可裂解接头中的示例性蛋白酶。

[0156]

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

[0157]

表A 用于底物裂解的示例性蛋白酶		
	MMP17	（*例如*，FVIIa、FIXa、FXa、FXIa、FXIIa）
TMPRSS2	MMP19	人中性粒细胞弹性蛋白酶
TMPRSS3	MMP20	乳铁蛋白
TMPRSS4	MMP23	

[0158] 在具体实施例中,蛋白酶为基质金属蛋白酶(MMP)-2、MMP-9、天冬酰胺内切酶、凝血酶、成纤维细胞活化蛋白酶(FAP)、MMP-1、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-12、MMP-13、MMP-14、膜型1基质金属蛋白酶(MT1-MMP)、纤溶酶、跨膜蛋白酶、丝氨酸(TMPRSS-3/4)、组织蛋白酶A、组织蛋白酶B、组织蛋白酶D、组织蛋白酶E、组织蛋白酶F、组织蛋白酶H、组织蛋白酶K、组织蛋白酶L、组织蛋白酶L2、组织蛋白酶O、组织蛋白酶S、caspase 1、caspase 2、caspase 3、caspase 4、caspase 5、caspase 6、caspase 7,caspase 8、caspase 9、caspase 10、caspase 11、caspase 12、caspase 13、caspase 14、人中性粒细胞弹性蛋白酶、尿激酶/尿激酶型纤溶酶原激活剂(uPA)、解整合素和金属蛋白酶(ADAM)10、ADAM12、ADAM17、具有血小板反应蛋白基序的ADAM (ADAMTS)、ADAMTS5、β分泌酶(BACE)、颗粒酶A、颗粒酶B、胍基苯甲酸酶、hepsin、matriptase、matriptase 2、meprin、中性溶酶、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、肿瘤坏死因子转换酶(TACE)、激肽释放酶相关肽酶(KLK)3、KLK5、KLK7、KLK11、丙型肝炎病毒的NS3/4蛋白酶(HCV-NS3/4)、组织纤溶酶原激活剂(tPA)、钙蛋白酶、钙蛋白酶2、谷氨酸羧肽酶II、血浆激肽释放酶、AMSH样蛋白酶、AMSH、γ-分泌酶成分、抗纤溶酶裂解酶(APCE)、脱胱氨酸1、凋亡相关半胱氨酸肽酶或N-乙酰化α连接酸性二肽酶样1。

[0159] 6.5.2.底物

[0160] 下面的表B中列出了可被肿瘤蛋白酶裂解并且可掺入蛋白酶可裂解接头的示例性底物序列。

[0161]

表 B 蛋白酶可裂解接头的底物序列		
底物序列	名称	裂解蛋白酶
$(DE)_8$RPLALWRS$(DR)_8$ (SEQ ID NO: 6)	SU1	MMP7
AARGPAIH (SEQ ID NO: 7)	SU2	
AAYHLVSQ (SEQ ID NO: 8)	SU3	胶原酶
AGLGISST (SEQ ID NO: 9)	SU4	胶原酶
AGLGVVER (SEQ ID NO: 10)	SU5	胶原酶
ALAL (SEQ ID NO: 11)	SU6	溶酶体酶
ALFFSSPP (SEQ ID NO: 12)	SU7	
ALFKSSFP (SEQ ID NO: 13)	SU8	
ALLLALL (SEQ ID NO: 14)	SU9	TOP
AQFVLTEG (SEQ ID NO: 15)	SU10	胶原酶
AQNLLGMV (SEQ ID NO: 16)	SU11	
AVGLLAPP (SEQ ID NO: 17)	SU12	丝氨酸蛋白酶
DAFK (SEQ ID NO: 18)	SU13	尿激酶纤溶酶原活化剂(uPA)
DEVD (SEQ ID NO: 19)	SU14	Caspase-3
DEVDP (SEQ ID NO: 20)	SU15	Caspase-3
DPRSFL (SEQ ID NO: 21)	SU16	凝血酶
DVAQFVLT (SEQ ID NO: 22)	SU17	胶原酶
DVLK (SEQ ID NO: 23)	SU18	纤溶酶
DWLYWPGI (SEQ ID NO: 24)	SU19	
EDDDDKA (SEQ ID NO: 25)	SU20	肠激酶
EP(Cit)G(Hof)YL (SEQ ID NO: 26)	SU21	MMP2、MMP9、MMP14
EPQALAMS (SEQ ID NO: 27)	SU22	胶原酶
ESLPVVAV (SEQ ID NO: 28)	SU23	胶原酶
ESPAYYTA (SEQ ID NO: 29)	SU24	MMP
F(Pip)RS	SU25	凝血酶
FK	SU26	溶酶体酶
FPRPLGITGL (SEQ ID NO: 30)	SU27	
FRLLDWQW (SEQ ID NO: 31)	SU28	
GFLG (SEQ ID NO: 32)	SU29	溶酶体酶
GGAANLVRGG (SEQ ID NO: 33)	SU30	MMP11
GGGRR (SEQ ID NO: 34)	SU31	尿激酶纤溶酶原活化剂(uPA)
GGPRGLPG (SEQ ID NO: 35)	SU32	组织蛋白酶 K
GGQPSGMWGW (SEQ ID NO: 36)	SU33	
GGSIDGR (SEQ ID NO: 37)	SU34	Xa 因子
GGWHTGRN (SEQ ID NO: 38)	SU35	
GIAGQ (SEQ ID NO: 39)	SU36	胶原酶
GKAFRR (SEQ ID NO: 40)	SU37	激肽释放酶 2
GPAGLYAQ (SEQ ID NO: 41)	SU38	

[0162]

表 B
蛋白酶可裂解接头的底物序列

底物序列	名称	裂解蛋白酶
GPAGMKGL (SEQ ID NO: 42)	SU39	
GPEGLRVG (SEQ ID NO: 43)	SU40	胶原酶
GPLGIAGI (SEQ ID NO: 44)	SU41	胶原酶
GPLGVRG (SEQ ID NO: 45)	SU42	
GPQGIAGQ (SEQ ID NO: 46)	SU43	胶原酶
GPQGLLGA (SEQ ID NO: 47)	SU44	胶原酶
GPRSFG (SEQ ID NO: 48)	SU45	
GPRSFGL (SEQ ID NO: 49)	SU46	
GPSHLVLT (SEQ ID NO: 50)	SU47	
GVSQNYPIVG (SEQ ID NO: 51)	SU48	HIV 蛋白酶
GVVQASCRLA (SEQ ID NO: 52)	SU49	CMV 蛋白酶
GWEHDG (SEQ ID NO: 53)	SU50	白细胞介素 1β 转换酶
HSSKLQ (SEQ ID NO: 54)	SU51	前列腺特异性抗原
HSSKLQEDA (SEQ ID NO: 55)	SU52	前列腺特异性抗原
HSSKLQL (SEQ ID NO: 56)	SU53	前列腺特异性抗原
HTGRSGAL (SEQ ID NO: 57)	SU54	
IDGR（SEQ ID NO： 58)	SU55	Xa 因子
IEGR (SEQ ID NO: 59)	SU56	Xa 因子
ILPRSPAF (SEQ ID NO: 60)	SU57	
IPVSLRSG (SEQ ID NO: 61)	SU58	MMP
ISSGL (SEQ ID NO: 62)	SU59	MMP
ISSGLL (SEQ ID NO: 63)	SU60	MMP
ISSGLLS (SEQ ID NO: 64)	SU61	MMP
ISSGLLSS (SEQ ID NO: 65)	SU62	MMP
ISSGLSS (SEQ ID NO: 66)	SU63	MMP
KGSGDVEG (SEQ ID NO: 67)	SU64	Caspase-3
KQEQNPGST (SEQ ID NO: 68)	SU65	FAP
KRALGLPG (SEQ ID NO: 69)	SU66	MMP7
LAAPLGLL (SEQ ID NO: 70)	SU67	
LAPLGLQRR (SEQ ID NO: 71)	SU68	
LAQKLKSS (SEQ ID NO: 72)	SU69	
LAQRLRSS (SEQ ID NO: 73)	SU70	
LEATA (SEQ ID NO: 74)	SU71	MMP9
LKAAPRWA (SEQ ID NO: 75)	SU72	
LLAPSHRA (SEQ ID NO: 76)	SU73	
LPGGLSPW (SEQ ID NO: 77)	SU74	
LSGRSANI (SEQ ID NO: 78)	SU75	丝氨酸蛋白酶
LSGRSANP (SEQ ID NO: 79)	SU76	丝氨酸蛋白酶
LSGRSDDH (SEQ ID NO: 80)	SU77	丝氨酸蛋白酶
LSGRSDIH (SEQ ID NO: 81)	SU78	丝氨酸蛋白酶

[0163]

表 B 蛋白酶可裂解接头的底物序列		
底物序列	名称	裂解蛋白酶
LSGRSDNH (SEQ ID NO: 82)	SU79	丝氨酸蛋白酶
LSGRSDNI (SEQ ID NO: 83)	SU80	丝氨酸蛋白酶
LSGRSDNP (SEQ ID NO: 84)	SU81	丝氨酸蛋白酶
LSGRSDQG (SEQ ID NO: 85)	SU82	丝氨酸蛋白酶
LSGRSDQH (SEQ ID NO: 86)	SU83	丝氨酸蛋白酶
LSGRSDTH (SEQ ID NO: 87)	SU84	丝氨酸蛋白酶
LSGRSDYH (SEQ ID NO: 88)	SU85	丝氨酸蛋白酶
LSGRSGNH (SEQ ID NO: 89)	SU86	丝氨酸蛋白酶
LVLASSSFGY (SEQ ID NO: 90)	SU87	单纯疱疹病毒蛋白酶
MDAFLESS (SEQ ID NO: 91)	SU88	胶原酶
MGLFSEAG (SEQ ID NO: 92)	SU89	
MIAPVAYR (SEQ ID NO: 93)	SU90	
MVLGRSLL (SEQ ID NO: 94)	SU91	
NLL	SU92	组织蛋白酶 B
NTLSGRSENHSG (SEQ ID NO: 95)	SU93	
NTLSGRSGNHGS (SEQ ID NO: 96)	SU94	
PAGLWLDP (SEQ ID NO: 97)	SU95	
PGGPAGIG (SEQ ID NO: 98)	SU96	
PIC(Et)FF (SEQ ID NO: 99)	SU97	组织蛋白酶 D
PLGC(me)AG (SEQ ID NO: 100)	SU98	MMP
PLGL (SEQ ID NO: 101)	SU99	
PLGLAG (SEQ ID NO: 102)	SU100	MMP
PLGLAX (SEQ ID NO: 103)	SU101	MMP
PLGLWA (SEQ ID NO: 104)	SU102	MMP
PLGLWSQ (SEQ ID NO: 105)	SU103	MMP
PLTGRSGG (SEQ ID NO: 106)	SU104	
PMAKK (SEQ ID NO: 107)	SU105	
PPRSFL (SEQ ID NO: 108)	SU106	凝血酶
PR(S/T)(L/I)(S/T)	SU107	MMP9
PRFRIIGG (SEQ ID NO: 109)	SU108	纤溶酶
PVGYTSSL (SEQ ID NO: 110)	SU109	
PVQPIGPQ (SEQ ID NO: 111)	SU110	胶原酶
QALAMSAI (SEQ ID NO: 112)	SU111	胶原酶
QGRAITFI (SEQ ID NO: 113)	SU112	
QNQALRMA (SEQ ID NO: 114)	SU113	
RGPA (SEQ ID NO: 115)	SU114	
RGPAFNPM (SEQ ID NO: 116)	SU115	
RGPATPIM (SEQ ID NO: 117)	SU116	
RKSSIIIRMRDVVL (SEQ ID NO:	SU117	纤溶酶

[0164]

表 B 蛋白酶可裂解接头的底物序列		
底物序列	名称	裂解蛋白酶
118)		
RLQLKAC (SEQ ID NO: 119)	SU118	MMP
RLQLKL (SEQ ID NO: 120)	SU119	MMP
RMHLRSLG (SEQ ID NO: 121)	SU120	
RPSPMWAY (SEQ ID NO: 122)	SU121	
RQARVVNG (SEQ ID NO: 123)	SU122	Matripase
SAGFSLPA (SEQ ID NO: 125)	SU123	
SAPAVESE (SEQ ID NO: 126)	SU124	胶原酶
SARGPSRW (SEQ ID NO: 127)	SU125	
SGEPAYYTA (SEQ ID NO: 128)	SU126	
SGGPLGVR (SEQ ID NO: 129)	SU127	
SGRIGFLRTA (SEQ ID NO: 130)	SU128	MMP14
SGRSA (SEQ ID NO: 131)	SU129	尿激酶纤溶酶原活化剂(uPA)
SGRSANPRG (SEQ ID NO: 132)	SU130	
SMLRSMPL (SEQ ID NO: 133)	SU131	
SPLPLRVP (SEQ ID NO: 134)	SU132	
SPLTGRSG (SEQ ID NO: 135)	SU133	
SPRSIMLA (SEQ ID NO: 136)	SU134	
SSRGPAYL (SEQ ID NO: 137)	SU135	
SSRHRRALD (SEQ ID NO: 138)	SU136	纤溶酶
SSSFDKGKYKKGDDA (SEQ ID NO: 139)	SU137	纤溶酶
SSSFDKGKYKRGDDA (SEQ ID NO: 140)	SU138	纤溶酶
STFPFGMF (SEQ ID NO: 141)	SU139	
TARGPSFK (SEQ ID NO: 142)	SU140	
TGRGPSWV (SEQ ID NO: 143)	SU141	
TSGRSANP (SEQ ID NO: 144)	SU142	
TSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 145)	SU143	
VAGRSMRP (SEQ ID NO: 146)	SU144	
VAQFVLTE (SEQ ID NO: 147)	SU145	胶原酶
VHMPLGFLGP (SEQ ID NO: 148)	SU146	
VPLSLYSG (SEQ ID NO: 149)	SU147	MMP9
VVPEGRRS (SEQ ID NO: 150)	SU148	
WATPRPMR (SEQ ID NO: 151)	SU149	
YGAGLGVV (SEQ ID NO: 152)	SU150	胶原酶
HPVGLLAR (SEQ ID NO: 261)	SU151	

[0165] 6.5.3.间隔子

[0166] 下面的表C中列出了可以掺入蛋白酶可裂解接头中的示例性间隔子序列。除了表C中列出的间隔子序列之外,第6.6节中描述的任何不可裂解接头序列,例如,表E中列出的不可裂解接头序列或其部分可以用作间隔子序列。

[0167]

表 C 用于蛋白酶可裂解接头的间隔子序列	
间隔子序列	名称
$(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO: 153)	SP1
$(GGGS)_n$ (SEQ ID NO: 154)	SP2
$(GGS)_n$	SP3
$(GS)_n$	SP4
$(GSGGS)_n$ (SEQ ID NO: 155)	SP5
GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 156)	SP6
GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 157)	SP7
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 158)	SP8
GGGKSGGGKSGGGKS (SEQ ID NO: 159)	SP9
GGGKSGGKGSGKGGS (SEQ ID NO: 160)	SP10
GGGS (SEQ ID NO: 161)	SP11
GGGSG (SEQ ID NO: 162)	SP12
GGKGSGGKGSGGKGS (SEQ ID NO: 163)	SP13
GGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 164)	SP14
GGSGGS (SEQ ID NO: 165)	SP15
GGSGGSGGSGS (SEQ ID NO: 166)	SP16
GSGGG (SEQ ID NO: 167)	SP17
GSGSG (SEQ ID NO: 168)	SP18
GSS	SP19
GSSG (SEQ ID NO: 169)	SP20

[0168]

表C 用于蛋白酶可裂解接头的间隔子序列	
间隔子序列	名称
GSSGGSGGSG (SEQ ID NO: 170)	SP21
GSSGGSGGSGG (SEQ ID NO: 171)	SP22
GSSGGSGGSGGS (SEQ ID NO: 172)	SP23
GSSGGSGGSGGSG (SEQ ID NO: 173)	SP24
GSSGGSGGSGGSGGGS (SEQ ID NO: 174)	SP25
GSSGGSGGSGS (SEQ ID NO: 175)	SP26
GSSGT (SEQ ID NO: 176)	SP27
GSSSG (SEQ ID NO: 177)	SP28
QGQSGQ (SEQ ID NO: 178)	SP29
QGQSGQG (SEQ ID NO: 179)	SP30
QGQSGS (SEQ ID NO: 180)	SP31
QSGQ (SEQ ID NO: 181)	SP32
QSGQG (SEQ ID NO: 182)	SP33
QSGS (SEQ ID NO: 183)	SP34
SGQ	SP35
SGQG (SEQ ID NO: 184)	SP36
SGS	SP37
$(G)_n$	SP38

[0169] 在一些实施例中,如上述表C中所用,n是1至10的整数,例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[0170] 6.5.4.示例性蛋白酶可裂解接头

[0171] 下面的表D中列出了包含一个或多个底物序列以及间隔子序列的示例性蛋白酶可裂解接头。

[0172]

表 D 蛋白酶可裂解接头序列		
接头序列	名称	裂解蛋白酶
GGGISSGLLSGRSDNHGGGISSGLLSGRSDNHGGS (SEQ ID NO: 185)	PCL1	
GGGISSGLLSGRSDNHGGGISSGLLSGRSDNHGGS GGGISSGLLSGRSDNHGGGISSGLLSGRSDNHGGS (SEQ ID NO: 186)	PCL2	
GGSGGSIPVSLRSGGGISSGLLSGRSDNHGGSGGS (SEQ ID NO: 187)	PCL3	
GGSGGSVPLSLYSGGGISSGLLSGRSDNHGGSGGS (SEQ ID NO: 188)	PCL4	
GGSHPVGLLARGGGHPVGLLARGGGHPVGLLARGS (SEQ ID NO: 189)	PCL5	
GGSHPVGLLARGGGHPVGLLARGGSGRSAGGSGRSA (SEQ ID NO: 190)	PCL6	
AVGLLAPPGGLSGRSANI (SEQ ID NO: 191)	PCL7	ADAM17_2、FAPa_1、CTSL1_1
AVGLLAPPGGLSGRSANP (SEQ ID NO: 192)	PCL8	FAPa_1、ADAM17_2、CTSL1_1
AVGLLAPPGGLSGRSDDH (SEQ ID NO: 193)	PCL9	MMP14_1、MMP14_1、MMP14_1
AVGLLAPPGGLSGRSDIH (SEQ ID NO: 194)	PCL10	MMP14_1、MMP14_1、MMP14_1
AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 195)	PCL11	MMP14_1、MMP14_1
AVGLLAPPGGLSGRSDNI (SEQ ID NO: 196)	PCL12	MMP14_1、CTSL1_1、ADAM17_2
AVGLLAPPGGLSGRSDNP (SEQ ID NO: 197)	PCL13	CTSL1_1、ADAM17_2、FAPa_1
AVGLLAPPGGLSGRSDQH (SEQ ID NO: 198)	PCL14	
AVGLLAPPGGLSGRSDTH (SEQ ID NO: 199)	PCL15	FAPa_1、CTSL1_1、ADAM17_2
AVGLLAPPGGLSGRSDYH (SEQ ID NO: 200)	PCL16	
AVGLLAPPGGTSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 201)	PCL17	
AVGLLAPPSGRSANPRG (SEQ ID NO: 202)	PCL18	
AVGLLAPPTSGRSANPRG	PCL19	

[0173]

表 D 蛋白酶可裂解接头序列		
接头序列	名称	裂解蛋白酶
(SEQ ID NO: 203)		
GGALFKSSFPGPAGLYAQPLAQKLKSSGGK (SEQ ID NO: 204)	PCL20	CTSL1_1、MMP14_1、ADAM17_2
GGGGSGGGGSGGGGSFVGGTGGGGSGGGGSGGS (SEQ ID NO: 205)	PCL21	
GGGGSGGGGSGGGGSISSGLLSGRSDNHGGSGGS (SEQ ID NO: 206)	PCL22	
GGGGSGGGGSGGGGSVPLSLYSGGGSGGSGGSGS (SEQ ID NO: 207)	PCL23	
GGGGSGGGGSGPLGLWSQGGGGGSGGGGSGGGGSGG (SEQ ID NO: 208)	PCL24	
GGGGSGGGGSKKAAPGGGGSGGGGSGGGGSGGS (SEQ ID NO: 209)	PCL25	
GGGGSGGGGSKKAAPVNGGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 210)	PCL26	
GGGGSGGGGSPMAKKGGGGSGGGGSGGGGSGGS (SEQ ID NO: 211)	PCL27	
GGGGSGGGGSPMAKKVNGGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 212)	PCL28	
GGGGSGGGGSQARAKGGGGSGGGGSGGGGSGGS (SEQ ID NO: 213)	PCL29	
GGGGSGGGGSQARAKVNGGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 214)	PCL30	
GGGGSGGGGSRQARVVNGGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 215)	PCL31	
GGGGSGGGGSRQARVVNGGGGGSVPLSLYSGGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 216)	PCL32	
GGGGSGGGGSRQARVVNSVPLSLYSGGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 217)	PCL33	
GGGGSGGGGSVHMPLGFLGPGGGGSGGGGSGGS (SEQ ID	PCL34	

[0174]

表 D 蛋白酶可裂解接头序列		
接头序列	名称	裂解蛋白酶
NO: 218)		
GGGGSVHMPLGFLGPGRSRG SFPGGGGS (SEQ ID NO: 219)	PCL35	
GGGGSVHMPLGFLGPPMAKK GGGGSGGGGSGGS (SEQ ID NO: 220)	PCL36	
GGGGSVHMPLGFLGPRQARV VNGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 221)	PCL37	
GGGGSVHMPLGFLGPRQARV VNGGGGSGGGGSGG (SEQ ID NO: 222)	PCL38	
GGPLAQKLKSSALFKSSFPGP AGLYAQGGR (SEQ ID NO: 223)	PCL39	ADAM17_2、CTSL1_1、MMP14_1
GLSGRSDNHGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 224)	PCL40	
GLSGRSDNHGGVHMPLGFLG P (SEQ ID NO: 225)	PCL41	
ISSGLLSGRSANI (SEQ ID NO: 226)	PCL42	MMP、丝氨酸蛋白酶
ISSGLLSGRSANP (SEQ ID NO: 227)	PCL43	MMP、丝氨酸蛋白酶
ISSGLLSGRSANPRG (SEQ ID NO: 228)	PCL44	MMP、丝氨酸蛋白酶
ISSGLLSGRSDDH (SEQ ID NO: 229)	PCL45	MMP、丝氨酸蛋白酶
ISSGLLSGRSDIH (SEQ ID NO: 230)	PCL46	MMP、丝氨酸蛋白酶
ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 231)	PCL47	MMP、丝氨酸蛋白酶
ISSGLLSGRSDNI (SEQ ID NO: 232)	PCL48	CTSL1_1、MMP14_1
ISSGLLSGRSDNP (SEQ ID NO: 233)	PCL49	MMP、丝氨酸蛋白酶
ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 234)	PCL50	MMP、丝氨酸蛋白酶
ISSGLLSGRSDTH (SEQ ID NO: 235)	PCL51	MMP、丝氨酸蛋白酶
ISSGLLSGRSDYH (SEQ ID NO: 236)	PCL52	MMP、丝氨酸蛋白酶
ISSGLLSGRSGNH (SEQ ID NO: 237)	PCL53	MMP、丝氨酸蛋白酶
ISSGLLSSGGSGGSLSGRSDNH (SEQ ID NO: 238)	PCL54	

[0175]

表 D 蛋白酶可裂解接头序列		
接头序列	名称	裂解蛋白酶
ISSGLLSSGGSGGSLSGRSGNH (SEQ ID NO: 239)	PCL55	
KGGPGGPAGIGPLAQRLRSSALFKSSFPGR (SEQ ID NO: 240)	PCL56	FAPa_1、ADAM17_1、CTSL1_1
KSGPGGPAGIGALFFSSPPLAQKLKSSGGR (SEQ ID NO: 241)	PCL57	FAPa_1、CTSL1_2、ADAM17_2
LSGRSDNHGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 242)	PCL58	
LSGRSDNHGGSGGSISSGLLSS (SEQ ID NO: 243)	PCL59	
LSGRSDNHGGSGGSQNQALRMA (SEQ ID NO: 244)	PCL60	
LSGRSDNHGGVHMPLGFLGP (SEQ ID NO: 245)	PCL61	
LSGRSGNHGGSGGSISSGLLSS (SEQ ID NO: 246)	PCL62	
LSGRSGNHGGSGGSQNQALRMA (SEQ ID NO: 247)	PCL63	
QNQALRMAGGSGGSLSGRSDNH (SEQ ID NO: 248)	PCL64	
QNQALRMAGGSGGSLSGRSGNH (SEQ ID NO: 249)	PCL65	
RGGALFKSSFPLAQKLKSSGPAGLYAQGGK (SEQ ID NO: 250)	PCL66	CTSL1_1、ADAM17_2、MMP14_1
RGGGPAGLYAQPLAQKLKSSALFKSSFPGG (SEQ ID NO: 251)	PCL67	MMP14_1、ADAM17_2、CTSL1_1
SGGFPRSGGSFNPRTFGSKRKRRGSRGGGG (SEQ ID NO: 252)	PCL68	凝血酶、Xa 因子、hepsin
SGPLAQKLKSSGPAGLYAQALFKSSFPGSK (SEQ ID NO: 253)	PCL69	ADAM17_2、MMP14_1、CTSL1_1
TSTSGRSANPRGGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 254)	PCL70	
TSTSGRSANPRGGGVHMPLGFLGP (SEQ ID NO: 255)	PCL71	
VHMPLGFLGPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 256)	PCL72	
VHMPLGFLGPGGTSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 257)	PCL73	
SGRSAGGGSGRSAGGGSGRSA (SEQ ID NO: 258)	PCL74	uPA

[0176]

表 D 蛋白酶可裂解接头序列		
接头序列	名称	裂解蛋白酶
HPVGLLARGGGHPVGLLARGGGSGRSAGGGSGRSA (SEQ ID NO: 259)	PCL75	MPA（MMP-2 和 uPA）
GPLGVRGK (SEQ ID NO: 260)	PCL76	MMP-2
HPVGLLAR (SEQ ID NO: 261)	PCL77	MMP-2
GPQGIAGQ (SEQ ID NO: 46)	PCL78	MMP-2、MMP-9 以及某种程度上 MT1-MMP
VPMSMRGG (SEQ ID NO: 262)	PCL79	MMP-9 和 MMP-2
IPVSLRSG (SEQ ID NO: 61)	PCL80	MMP-2，以及某种程度上的 MMP-9 或 MMP-7
RPFSMIMG (SEQ ID NO: 263)	PCL81	MMP-9 和 MMP-7，某种程度上 MMP-3
VPLSLTMG (SEQ ID NO: 264)	PCL82	MMP-7，某种程度上 MMP-9，MMP-2，MPT-1-MMP
VPLSLYSG (SEQ ID NO: 149)	PCL83	MMP-2、MMP-9、MMP-7
IPESLRAG (SEQ ID NO: 265)	PCL84	MMP-2、MMP-7、MMP-9，某种程度上 MPT-1-MMP
GGGISSGLLSGRSDNHGGGS (SEQ ID NO: 338)	PCL85	
GGGHPVGLLARGGGS (SEQ ID NO: 339)	PCL86	
GGGSGGGSGGGGISSGLLSGRSDNHGGGSGGGSGGS (SEQ ID NO: 340)	PCL87	
GGGGISSGLLSGRSDNHGGGISSGLLSGRSDNHGGS (SEQ ID NO: 341)	PCL88	
GGGSGGSIPVSLRSGGGISSGLLSGRSDNHGGSGGS (SEQ ID NO: 342)	PCL89	
GGGSGGSVPLSLYSGGGISSGLLSGRSDNHGGSGGS (SEQ ID NO: 343)	PCL90	
GGGSHPVGLLARGGGHPVGLLARGGGHPVGLLARGS (SEQ ID NO: 344)	PCL91	
GGGSHPVGLLARGGGHPVGLLARGGSGRSAGGSGRS (SEQ ID NO: 345)	PCL92	
GISSGLLSGRSDNHG (SEQ ID NO: 354)	PCL93	

[0177]

表 D 蛋白酶可裂解接头序列		
接头序列	名称	裂解蛋白酶
GGGSISSGLLSGRSDNHGGGS (SEQ ID NO: 355)	PCL94	

[0178] 在某些方面中,蛋白酶可裂解接头包含与表D中列出的序列相比具有至多5个、至多4个、至多3个、至多2个或至多1个氨基酸取代的氨基酸序列。因此,在一些实施例中,蛋白酶可裂解接头包含表D中与表D中列出的序列相比具有1-5个氨基酸取代的任一氨基酸序列或由该氨基酸序列组成。

[0179] 6.6.不可裂解接头

[0180] 在某些方面中,本公开提供了其中IL2蛋白质原的两个或更多个组分通过肽接头彼此连接的IL2蛋白质原。通过实例而非限制,接头可用于连接Fc结构域和IL2Rα部分或靶向部分内的不同结构域(例如,scFv中的VH和VL结构域)。

[0181] 优选地,除了其裂解导致IL2活化的蛋白酶可裂解接头之外,IL2蛋白质原中的所有接头都是不可裂解接头(NCL)。

[0182] 不可裂解接头的范围可以是2个氨基酸至60个或更多个氨基酸,并且在某些方面中,不可裂解肽接头在长度上范围可以为3个氨基酸至50个氨基酸、4至30个氨基酸、5至25个氨基酸、10至25个氨基酸、10个氨基酸至60个氨基酸、12个氨基酸至20个氨基酸、20个氨基酸至50个氨基酸或25个氨基酸至35个氨基酸。

[0183] 在特定方面中,不可裂解接头在长度上为至少5个氨基酸、至少6个氨基酸或至少7个氨基酸,并且任选地在长度上为最多30个氨基酸、最多40个氨基酸、最多50个氨基酸或最多60个氨基酸。

[0184] 在前述的一些实施例中,不可裂解接头在长度上范围为5个氨基酸至50个氨基酸,例如,在长度上范围为5至50个氨基酸、5至45个氨基酸、5至40个氨基酸、5至35个氨基酸、5至30个氨基酸、5至25个氨基酸或5至20个氨基酸。在前述的其他实施例中,不可裂解接头在长度上范围为6个氨基酸至50个氨基酸,例如,在长度上范围为6至50个氨基酸、6至45个氨基酸、6至40个氨基酸、6至35个氨基酸、6至30个氨基酸、6至25个氨基酸或6至20个氨基酸。在又其他实施例中,不可裂解接头在长度上范围为7个氨基酸至50个氨基酸,例如,在长度上范围为7至50个氨基酸、7至45个氨基酸、7至40个氨基酸、7至35个氨基酸、7至30个氨基酸、7至25个氨基酸或7至20个氨基酸。

[0185] 带电的(例如,带电的亲水性接头)和/或柔性的不可裂解接头是特别优选的。

[0186] 可用于本公开的IL2蛋白质原中的柔性不可裂解接头的实例包括由Chen等人, 2013, Adv Drug Deliv Rev. 65(10): 1357-1369以及Klein等人, 2014, Protein Engineering, Design & Selection 27(10): 325-330披露的那些。特别有用的柔性不可裂解接头是或包含甘氨酸和丝氨酸的重复,例如,G_nS (SEQ ID NO: 266)或SG_n (SEQ ID NO: 267)的单体或多聚体,其中n是1至10的整数,例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一个实施例中,不可裂解接头是或包含G_4S (SEQ ID NO: 1)重复的单体或多聚体,例如,$(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO: 153)。

[0187] 聚甘氨酸不可裂解接头可以适当地用于本公开的IL2蛋白质原中。在一些实施例中,肽不可裂解接头包含两个连续甘氨酸(2Gly)、三个连续甘氨酸(3Gly)、四个连续甘氨酸(4Gly)(SEQ ID NO: 268)、五个连续甘氨酸(5Gly)(SEQ ID NO: 269)、六个连续甘氨酸(6Gly)(SEQ ID NO: 270)、七个连续甘氨酸(7Gly)(SEQ ID NO: 271)、八个连续甘氨酸(8Gly)(SEQ ID NO: 272)或九个连续甘氨酸 (9Gly) (SEQ ID NO: 273)。

[0188] 下面的表E中列出了示例性不可裂解接头序列。

[0189]

表 E 不可裂解接头序列	
接头序列	名称
GGGGSLALGPGGGGGSLALGPGGGGGSLALGPGGS (SEQ ID NO: 274)	NCL1
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 275)	NCL2
$(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO: 153)	NCL3
$(GGGS)_n$ (SEQ ID NO: 154)	NCL4
$(GGS)_n$	NCL5
$(GS)_n$	NCL6
$(GSGGS)_n$ (SEQ ID NO: 155)	NCL7
ADAAP (SEQ ID NO: 276)	NCL8
ADAAPTVSIFP (SEQ ID NO: 277)	NCL9
ADAAPTVSIFPP (SEQ ID NO: 278)	NCL10
AKTTAP (SEQ ID NO: 279)	NCL11
AKTTAPSVYPLAP (SEQ ID NO: 280)	NCL12
AKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO: 281)	NCL13
AKTTPKLGG (SEQ ID NO: 282)	NCL14
AKTTPP (SEQ ID NO: 283)	NCL15
AKTTPPSVTPLAP (SEQ ID NO: 284)	NCL16
ASTKGP (SEQ ID NO: 285)	NCL17
ASTKGPSVFPLAPASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 286)	NCL18
EGKSSGSGSESKST (SEQ ID NO: 287)	NCL19
GEGESGEGESGEGES (SEQ ID NO: 288)	NCL20
GEGESGEGESGEGESGEGES (SEQ ID NO: 289)	NCL21
GEGGSGEGGSGEGGS (SEQ ID NO: 290)	NCL22
GENKVEYAPALMALS (SEQ ID NO: 291)	NCL23
GGEGSGGEGSGGEGS (SEQ ID NO: 292)	NCL24
GGGESGGEGSGEGGS (SEQ ID NO: 293)	NCL25
GGGESGGGESGGGES (SEQ ID NO: 294)	NCL26
GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 156)	NCL27
GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 157)	NCL28
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 158)	NCL29
GGGKSGGGKSGGGKS (SEQ ID NO: 159)	NCL30
GGGKSGGKGSGKGGS (SEQ ID NO: 160)	NCL31
GGGS (SEQ ID NO: 161)	NCL32
GGGSG (SEQ ID NO: 162)	NCL33
GGKGSGGKGSGGKGS (SEQ ID NO: 163)	NCL34
GGS	NCL35
GGSG (SEQ ID NO: 295)	NCL36
GGSGG (SEQ ID NO: 296)	NCL37
GGSGG (SEQ ID NO: 296)	NCL38
GGSGGGGSG (SEQ ID NO: 297)	NCL39
GGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 164)	NCL40

[0190]

表 E 不可裂解接头序列	
接头序列	名称
GHEAAAVMQVQYPAS (SEQ ID NO: 298)	NCL41
GKGGSGKGGSGKGGS (SEQ ID NO: 299)	NCL42
GKGKSGKGKSGKGKS (SEQ ID NO: 300)	NCL43
GKGKSGKGKSGKGKSGKGKS (SEQ ID NO: 301)	NCL44
GKPGSGKPGSGKPGS (SEQ ID NO: 302)	NCL45
GKPGSGKPGSGKPGSGKPSGS (SEQ ID NO: 303)	NCL46
GPAKELTPLKEAKVS (SEQ ID NO: 304)	NCL47
GSAGSAAGSGEF (SEQ ID NO: 305)	NCL48
GSGGG (SEQ ID NO: 167)	NCL49
GSGSG (SEQ ID NO: 168)	NCL50
GSS	NCL51
GSSG (SEQ ID NO: 169)	NCL52
GSSGGSGGSG (SEQ ID NO: 170)	NCL53
GSSGGSGGSGG (SEQ ID NO: 171)	NCL54
GSSGGSGGSGGS (SEQ ID NO: 172)	NCL55
GSSGGSGGSGGSG (SEQ ID NO: 173)	NCL56
GSSGGSGGSGGSGGGS (SEQ ID NO: 174)	NCL57
GSSGGSGGSGS (SEQ ID NO: 175)	NCL58
GSSGT (SEQ ID NO: 176)	NCL59
GSSSG (SEQ ID NO: 177)	NCL60
GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 306)	NCL61
GTAAAGAGAAGGAAAGAAG (SEQ ID NO: 307)	NCL62
GTSGSSGSGSGGSGSGGGG (SEQ ID NO: 308)	NCL63
IRPRAIGGSKPRVA (SEQ ID NO: 309)	NCL64
KESGSVSSEQLAQFRSLD (SEQ ID NO: 310)	NCL65
KTTPKLEEGEFSEAR (SEQ ID NO: 311)	NCL66
PRGASKSGSASQTGSAPGS (SEQ ID NO: 312)	NCL67
QPKAAP (SEQ ID NO: 313)	NCL68
QPKAAPSVTLFPP (SEQ ID NO: 314)	NCL69
RADAAAA$(G4S)_4$ (SEQ ID NO: 315)	NCL70
RADAAAAGGPGS (SEQ ID NO: 316)	NCL71
RADAAP (SEQ ID NO: 317)	NCL72
RADAAPTVS (SEQ ID NO: 318)	NCL73
SAKTTP (SEQ ID NO: 319)	NCL74
SAKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO: 320)	NCL75
SAKTTPKLGG (SEQ ID NO: 321)	NCL76
STAGDTHLGGEDFD (SEQ ID NO: 322)	NCL77
TVAAP (SEQ ID NO: 323)	NCL78
TVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO: 324)	NCL79
TVAAPSVFIFPPTVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO: 325)	NCL80

[0192] 在某些方面中,本公开的IL2蛋白质原可包含多肽链,该多肽链在N末端至C末端方向包含靶向部分(或靶向部分链)、铰链结构域和CH2结构域以及CH3结构域。因此,铰链结构域将靶向部分与CH2结构域连接并且可以说构成一种接头类型。示例性铰链结构域阐述于第6.9.3节中。

[0193] 6.7.靶向部分

[0194] 本公开的IL2蛋白质原中的靶向部分的掺入允许将高浓度的IL2递送至肿瘤微环境中,同时减少全身暴露,导致比用未掩蔽的IL2分子获得的副作用少。

[0195] 预期在特定部位或组织处存在或能够驱动IL2蛋白质原的任何类型的靶分子可以由本公开的IL2蛋白质原靶向。在一些实施例中,IL2蛋白质原旨在例如通过诱导针对肿瘤组织的局部免疫应答来治疗癌症。因此,靶向分子可以是任何局部肿瘤和相关的靶分子。由本公开的IL2蛋白质原的靶向部分识别的靶分子通常存在于例如活化的T细胞表面上、肿瘤细胞表面上、病毒感染细胞表面上、其他患病细胞表面上、血清中游离态、细胞外基质(ECM)中或靶位点存在的免疫细胞中,例如肿瘤反应性淋巴细胞。

[0196] 在各个方面中,靶向部分可以结合至细胞外基质("ECM")抗原、肿瘤反应性淋巴细胞抗原、肿瘤或病毒淋巴细胞的细胞表面分子、T细胞抗原("TCA")、检查点抑制剂或肿瘤相关抗原("TAA")。技术人员将认识到,前述类别的靶分子不是相互排斥的,因此给定的靶分子可以落入多于一种前述类别的靶分子中。例如,一些分子可以被视为TAA和ECM蛋白,而其他分子可以被视为TCA和检查点抑制剂。

[0197] 可被靶向的示例性癌症类型包括急性淋巴细胞白血病、急性髓性白血病、胆管癌、B细胞白血病、B细胞淋巴瘤、胆管癌、骨癌、脑癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌、宫颈癌、伯基特淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、慢性粒细胞白血病、结直肠癌、子宫内膜癌、食道癌、胆囊癌、胃癌、胃肠道癌、神经胶质瘤、毛细胞白血病、头颈癌、霍奇金淋巴瘤、肝癌、肺癌、甲状腺髓样癌、黑色素瘤、多发性骨髓瘤、卵巢癌、非霍奇金淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、肺癌、肾癌、肉瘤、皮肤癌、睾丸癌、尿路上皮癌和其他膀胱癌。然而,本领域技术人员将认识到,与肿瘤微环境相关的TAA和其他靶分子对于几乎任何类型的癌症都是已知的。

[0198] ECM抗原的非限制性实例包括多配体聚糖、乙酰肝素酶、整联蛋白、骨桥蛋白、连接蛋白、钙粘蛋白、层粘连蛋白、层粘连蛋白型EGF、凝集素、纤连蛋白、缺口蛋白、粘连蛋白(例如,粘连蛋白-4)、腱生蛋白、胶原蛋白(例如,X型胶原蛋白)和基质蛋白。

[0199] 其他靶分子是肿瘤或病毒淋巴细胞的细胞表面分子,例如诸如CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C和B7-H3等T细胞共刺激蛋白。

[0200] 在具体实施例中,靶分子是检查点抑制剂,例如CTLA-4、PD1、PDL1、PDL2、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、TIM3、GAL9、LAG3、VISTA、KIR、2B4、CD160、CGEN-15049、CHK1、CHK2。在具体实施例中,靶分子是PD1。在其他实施例中,靶分子是LAG3。

[0201] 抗体和抗原结合部分通常结合至特定抗原决定簇并且能够将IL2蛋白质原引导至靶位点,例如引导至携带抗原决定簇的特定类型的肿瘤细胞或肿瘤基质。在具体实施例中,靶向部分识别肿瘤相关抗原(TAA)。优选地,TAA是人类TAA。抗原可能存在于正常细胞上,也可能不存在于正常细胞上。在某些实施例中,与正常细胞相比,TAA优先地在肿瘤细胞上表达或上调。在其他实施例中,TAA是谱系标记。示例性TAA包括成纤维细胞活化蛋白(FAP)、腱生蛋白-C的A1结构域(TNC A1)、腱生蛋白-C的A2结构域(TNC A2)、纤连蛋白的额外结构域B(EDB)、黑色素瘤相关硫酸软骨素蛋白多糖(MCSP)、MART-1/Melan-A、gp100、二肽基肽酶IV(DPPIV)、腺苷脱氨酶结合蛋白(ADAbp)、环丝氨酸蛋白酶b、结直肠相关抗原(CRC)-C017-1A/GA733、癌胚抗原(CEA)及其免疫原性表位CAP-1和CAP-2、etv6、aml1、前列腺特异性抗原(PSA)及其免疫原性表位PSA-1、PSA-2和PSA-3、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、T细胞受体/

CD3-zeta链、MAGE家族肿瘤抗原(例如,MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、MAGE-Xp2 (MAGE-B2)、MAGE-Xp3 (MAGE-B3)、MAGE-Xp4 (MAGE-B4)、MAGE-C1、MAGE-C2、MAGE-C3、MAGE-C4、MAGE-C5)、GAGE家族肿瘤抗原(例如,GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、GAGE-8、GAGE-9)、BAGE、RAGE、LAGE-1、NAG、GnT-V、MUM-1、CDK4、酪氨酸酶、p53、MUC家族、HER2/neu、p21ras、RCAS1、α-胎蛋白、E-钙粘蛋白、α-连环蛋白、β-连环蛋白和γ-连环蛋白、p120ctn、gp100 Pmel117、PRAME、NY-ESO-1、cdc27、腺瘤性息肉病蛋白(APC)、胞衬蛋白、连接蛋白37、Ig-独特型、p15、gp75、GM2和GD2神经节苷脂、病毒产物(如人乳头瘤病毒蛋白)、Smad肿瘤抗原家族、Imp-1、P1A、EBV编码的核抗原(EBNA)-1、脑糖原磷酸化酶、SSX-1、SSX-2 (HOM-MEL-40)、SSX-1、SSX-4、SSX-5、SCP-1和CT-7、c-erbB-2、Her2、EGFR、IGF-1R、CD2(T细胞表面抗原)、CD3(与TCR相关的异多聚体)、CD22(B细胞受体)、CD23(低亲和力IgE受体)、CD30(细胞因子受体)、CD33(髓细胞表面抗原)、CD40(肿瘤坏死因子受体)、IL-6R-(IL6受体)、CD20、MCSP、PDGFβR(β-血小板衍生的生长因子受体)、ErbB2上皮细胞粘附分子(EpCAM)、EGFR变体III (EGFRvIII)、CD19、二唾液酸神经节苷脂GD2、导管上皮粘蛋白、gp36、TAG-72、神经胶质瘤相关抗原、β-人绒毛膜促性腺激素、甲胎蛋白(AFP)、凝集素反应性AFP、甲状腺球蛋白、MN-CA IX、人类端粒酶逆转录酶、RU1、RU2 (AS)、肠羧基酯酶、muthsp70-2、M-CSF、前列腺酶、前列腺酶特异性抗原(PSA)、PAP、LAGA-1a、p53、前列腺、PSMA、存活和端粒酶、前列腺癌肿瘤抗原-1 (PCTA-1)、ELF2M、中性粒细胞弹性蛋白酶、ephrin B2、胰岛素生长因子(IGF1)-I、IGF-II、IGFI受体、5T4、ROR1、Nkp30、NKG2D、肿瘤基质抗原、纤连蛋白的额外结构域A (EDA)和额外结构域B (EDB)以及腱糖蛋白-C(TnC A1)的A1结构域。

[0202] 合适的靶向部分格式描述于第6.8节中。靶向部分优选是抗原结合部分,例如抗体或抗体的抗原结合部分,例如,如在第6.8.2节中描述的scFv或如在第6.8.1节中描述的Fab。

[0203] 在一些实施例中,靶向部分靶向下面的表F中列出的示例性靶分子,同时参考靶向部分可以基于的示例性抗体或抗体序列。

[0204]

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

[0205]

表 F 示例性靶分子	
靶	**抗体名称和/或结合序列**
N-钙粘蛋白	与美国公开号 US 2010/0278821 的 SEQ ID NO: 10、17 或 18 的氨基酸序列结合的抗体。
CD11a	Raptiva™（依法珠单抗） Werther 等人，1996, The Journal of Immunology 157(11): 4986-4995 中的序列。
CD19	Blincyto™（博纳吐单抗）
CD19	SGN-CD19A
CD20	Bexxar™（托西莫单抗） VH：美国专利公开 US 2017/0002060 A1 的 SEQ ID NO:124 重链的 VH 序列 VL：美国专利公开 US 2017/0002060 A1 的 SEQ ID NO:125 的轻链 VL 序列
CD20	Zevalin™（替伊莫单抗） VH：美国专利号 5,736,137 的 SEQ ID NO:9 VL：美国专利号 5,736,137 的 SEQ ID NO:6
CD20	Rituxan™（利妥昔单抗） VH：美国专利号 5,736,137 的 SEQ ID NO:9 VL：美国专利号 5,736,137 的 SEQ ID NO:6
CD20	Ocrevus™（奥瑞珠单抗）
CD20	奥卡妥珠单抗
CD20	Arzerra™（奥法木单抗） VH：美国专利号 8,529,902 的 SEQ ID NO:2 VL：美国专利号 8,529,902 的 SEQ ID NO:4
CD20	Gazyva™（奥比妥珠单抗）
CD20	VH：US 2021/0206870 A1 的 SEQ ID NO: 4 US 2021/0206870 A1 的 SEQ ID NO:6 的 VL
CD20	依普利他单抗
CD22	贝利木单抗
CD22	依帕珠单抗
CD22	Besponsa ™（伊妥珠单抗奥佐米星）
CD22	Lumoxiti ™（莫西妥尤单抗 pasudox）
CD22	匹那珠单抗维多丁
CD25	Zenapax™（达珠单抗） VH：美国专利号 7,060,269 的 SEQ ID NO:9 VL：美国专利号 7,060,269 的 SEQ ID NO:10
CD30	Adcetris™（本妥昔单抗） VH：美国专利号 7,090,843 的 SEQ ID NO:2 VL：美国专利号 7,090,843 的 SEQ ID NO:10
CD33	Myelotarg™（吉妥珠单抗） Man Sung 等人，1993, Molecular immunology

[0206]

表 F 示例性靶分子	
靶	抗体名称和/或结合序列
	30:1361-1367 中的序列
CD33	林妥珠单抗
CD38	Darzalex™（达雷妥尤单抗）
CD40	卢卡木单抗
CD40	达赛珠单抗
CD40L	Hu5c8（鲁普利珠单抗）
CD44v6	维巴珠单抗美坦辛
CD52	Campath™（阿仑单抗） VH：美国专利公开 US 2017/0002060 A1 的 SEQ ID NO:1 VL：美国专利公开 US 2017/0002060 A1 的 SEQ ID NO:2
CD70	Blenrep ™ (borsetuzumab mafodotin)
CD123	弗洛妥珠单抗
CD221	Tepezza ™（替妥木单抗）
CEA	Hybri-Ceaker®（阿图莫单抗喷替酯）
CEA	Scintimun™（贝索索单抗）
CEA	CEA-CIDE™（拉贝珠单抗））
CEA	CEA-Scan ™（阿西莫单抗）
CEA	hMN-15 美国专利号 8,771,690 B2 的 SEQ ID NO:4-6 的 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3 序列 美国专利号 8,771,690 B2 的 SEQ ID NO:1-3 的 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3 序列
CEA	来自临床试验 NCT02324257 的 RO6958688/RG7802 的 CEA 结合部分
CEA	西比沙他单抗
CEA	来自临床试验 NCT01284231 和 NCT02291614 的 MEDI-565/MT110/AMG211 的 CEA 结合部分 VH：PCT 公开号 WO 2013/012414 A1 的 SEQ ID NO:49 或 51 VL：PCT 公开号 WO 2013/012414 A1 的 SEQ ID NO:48。
CEA	拉贝珠单抗
CEA	阿替珠单抗
CEA	西比沙他单抗
CEA	MEDI-565（AMG211、MT111）
CEA	RO6958688
CEA	VH：WO2022/048883A1 中描述的 SEQ ID No. 9 VL：WO2022/048883A1 中描述的 SEQ ID No. 10
CLDN18.2	AMG910

[0207]

表 F 示例性靶分子	
靶	**抗体名称和/或结合序列**
胶原蛋白 α-4 链	TRC093 (MT293)
胶原蛋白	Liang, H.等人描述的胶原蛋白结合抗体片段。一种胶原蛋白结合 EGFR 抗体片段，其靶向具有富含胶原蛋白的细胞外基质的肿瘤。Sci. Rep. 5, 18205; doi: 10.1038/srep18205 (2016)。
I 型胶原蛋白	西妥昔单抗（爱必妥）
X 型胶原蛋白	PCT 公开号 WO 2019/020797 的 SEQ ID NO: 1 或 2 的氨基酸序列。
X 型胶原蛋白	PCT 公开号 WO 2014/180992 的 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列。
X 型胶原蛋白	如 I. Girkontaite 等人，“Immunolocalization of type X collagen in normal fetal and adult osteoarthritic cartilage with monoclonal antibodies,” Matrix Biol 15, 231-238 (1996)中描述的抗体 X34。
X 型胶原蛋白	从 ThermoFisher Scientific 根据目录号 PA5-115039 或 PA5-116871 或 PA5-97603 或 PA5-49198 出售的抗体 X53 或 1H8 或 ARC0659 或 JF0961 胶原蛋白 X 多克隆抗体。
X 型胶原蛋白	从 RDI 根据目录号 RDI-COLL10abr 出售的抗体。
补体 C5	Soliris™（依库丽单抗） VH：美国专利号 6,355,245 的 SEQ ID NO: 10 的氨基酸 1-122 VL：美国专利号 6,355,245 的 SEQ ID NO: 9 的氨基酸 3-110
CTLA-4	Yervoy™（伊匹单抗） VH：WO 2001/014424 A2 的 SEQ ID NO: 17 VL：WO 2001/014424 A2 的 SEQ ID NO: 7
CTLA-4	（曲美木单抗）
CTLA-4	Orencia™（阿巴西普）
DLL3	AMG757
EGFR	爱必妥™（西妥昔单抗） VH：美国专利号 6,217,866 的 SEQ ID NO: 11 VL：美国专利号 6,217,866 的 SEQ ID NO: 13
EGFR	Vectibix™（帕尼单抗） VH：美国专利号 6,235,883 的 SEQ ID NO: 37 VL：美国专利号 6,235,883 的 SEQ ID NO: 38
EGFR	扎鲁木单抗 VH：WO 2018/140831 A2 的 SEQ ID NO: 64 VL：WO 2018/140831 A2 的 SEQ ID NO: 69
EGFR	马帕木单抗
EGFR	马图珠单抗

[0208]

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

[0209]

表 F 示例性靶分子	
靶	**抗体名称和/或结合序列**
Her2	Herceptin™（曲妥珠单抗）
Her2	阿地白介素（白介素原）
Her2	沙格莫司亭（白细胞）
Her2	M802
Her2	鲁尼莫他单抗（BTRC4017A，R07227780）
Her2	ISB1302
Her2-neu	Perjeta™（帕妥珠单抗） VH：WO 2013/096812 A1 的 SEQ ID NO:16。 VL：WO 2013/096812 A1 的 SEQ ID NO:15。
Her2-neu	Rexomun™（艾妥索单抗）
IgE	Xolair™（奥马珠单抗）
IGFIR	（芬妥木单抗）
IL1β	Ilaris™（卡那单抗） VH：美国专利号 7,446,175 的 SEQ ID NO:1。 VL：美国专利号 7,446,175 的 SEQ ID NO: 2
IL12/IL23	Stelara™（优特克单抗）
IL1Ra	Antril™、Kineret™（安金拉）
IL2R	Simulect™（巴利昔单抗） VH：美国专利号 6,383,487 的 SEQ ID NO: 3 VL：美国专利号 6,383,487 的 SEQ ID NO: 6
IL6	克拉扎珠单抗
IL6 受体	Actemra™（托珠单抗） VH：美国专利号 7,479,543 的 SEQ ID NO: 31 VL：美国专利号 7,479,543 的 SEQ ID NO: 29
IL12/IL23 p40 亚基	Stelara™（优特克单抗） VH：美国专利号 6,902,734 的 SEQ ID NO: 7 VL：美国专利号 6,902,734 的 SEQ ID NO: 8
整合素 α4	Tysabri™（那他珠单抗） VH：美国专利号 5,840,299 的 SEQ ID NO: 11-13 VL：美国专利号 5,840,299 的 SEQ ID NO: 7-8
整合素 α4 β7	Entyvio ™（维多珠单抗） HC:美国专利公开 US 2012/0282249 的 SEQ ID NO: 2。 LC:美国专利公开 US 2012/0282249 的 SEQ ID NO: 4。
整合素 α5 β1	VH：欧洲专利号 1 755 659 的 SEQ ID NO: 2。 VL：欧洲专利号 1 755 659 的 SEQ ID NO: 4。
整合素 β1	VH:美国专利公开 US 2022/0089744 的 SEQ ID NO:2、6、8、10、12、14、29-43 或 91-100。 VL:美国专利公开 US 2022/0089744 的 SEQ ID NO:4、16、18、20、22、44-57 或 107-116。
LAG-3	瑞拉利单抗(BMS-98016)
LAG-3	Sym022

[0210]

表 F 示例性靶分子	
靶	抗体名称和/或结合序列
LAG-3	HLX26
LAG-3	TSR-033
LAG-3	ABL501
LAG-3	INCAGN02385
LAG-3	弗安利单抗(REGN3767)
LAG-3	RO7247669
LAG-3	EMB-02
LAG-3	FS118
LAG-3	GSK2831781
LAG-3	IBI323
LAG-3	IBI110
LAG-3	LAG525
LAG-3	XmAb®22841
LAG-3	LBL-007
LAG-3	VH：美国专利号 9,902,772 的 SEQ ID NO:1、8、10 或 12。 VL：美国专利号 9,902,772 的 SEQ ID NO:2、3、4、5、6、7、9、11、13 或 14。
LAG-3	VH:美国专利号US 2021/0095026的SEQ ID NO: 182。 VL：美国专利号 US 2021/0095026 的 SEQ ID NO: 88。
层粘连蛋白	来自 Sigma Aldrich 的 Lam-89
间皮素	阿马妥昔单抗
间皮素	HPN536
MUC1	西伐珠单抗四环乙烷
MUC1	Pankomab ™（加替妥珠单抗）
MUC1	菲木单抗
MUC1	坎妥珠单抗拉坦辛
MUC16 (CA125)	抗 MUC16 抗体，其具有 VH 和 VL 序列，所述 VH 和 VL 序列具有来自 US 2018/0118848A1 的以下 SEQ ID NO:对中的任一对的氨基酸序列：18/26；82/858；98/170
MUC17	AMG199
粘连蛋白-4	恩诺单抗（ASP7465、ASG-22CE、ASG-22ME） VH：PCT 公开 WO 2021/151984 的 SEQ ID NO:3。 VL：PCT 公开 WO 2021/151984 的 SEQ ID NO:4。
粘连蛋白-4	SBT290
粘连蛋白-4	VH：美国专利号 11,274,160 的 SEQ ID NO:1。 VL：美国专利号 11,274,160 的 SEQ ID NO:2。
NGF	（坦尼珠单抗）
骨桥蛋白	HC：PCT 公开 WO 2021/030209 的 SEQ ID NO: 22。 LC：PCT 公开 WO 2021/030209 的 SEQ ID NO: 24。
PD1	MDX-1106 / BMS-936558（纳武单抗），人类 IgG4

[0211]

表 F 示例性靶分子	
靶	抗体名称和/或结合序列
	mAb，其结构在 WHO Drug Information，第 27 卷，第 1 期，第 68-69 页 (2013)中描述，其重链和轻链序列在美国公开号 US20190270812A1 的图 7 中披露
PD1	MK-3475（派姆单抗），人源化 IgG4 mAb，其结构在 WHO Drug Information，第 27 卷，第 2 期，第 161-162 页 (2013)中描述，其重链和轻链序列在美国公开号 US20190270812A1 的图 6 中披露
PD1	REGN2810（在美国公开号 20150203579 中公开为 H4H7798N）
PD1	PCT 公开 WO2015112800A1 的表 1-3 中公开的抗-PD1 抗体，包括但不限于具有 VH/VL 对的抗 PD1 抗体，所述 VH/VL 对具有 PCT 公开 WO2015112800A1 的 SEQ ID NO: 2/10、18/26、34/42、50/58、66/74、82/90、98/106、114/122、130/138、146/154、162/170、178/186、194/202、210/202、218/202、226/202、234/202、242/202、250/202、258/202、266/202、274/202、282/202、290/202、298/186、306/186 和 314/186。
PD1	MEDI-0680 (AMP-514)
PD1	PDR001
PD1	BGB-108
PD1	h409A11，描述于 WO2008/156712 中
PD1	h409A16，描述于 WO2008/156712 中
PD1	h409A17，描述于 WO2008/156712 中
PD1	美国专利号 7488802 中描述的抗 PD1 抗体
PD1	美国专利号 7521051 中描述的抗 PD1 抗体
PD1	美国专利号 8008449 中描述的抗 PD1 抗体
PD1	美国专利号 8354509 中描述的抗 PD1 抗体
PD1	美国专利号 8168757 中描述的抗 PD1 抗体
PD1	PCT 公开号 W02004/004771 中描述的抗 PD1 抗体
PD1	PCT 公开号 W02004/056875 中描述的抗 PD1 抗体
PD1	PCT 公开号 W02004/072286 中描述的抗 PD1 抗体
PD1	美国专利号 US2011/0271358 中描述的抗 PD1 抗体
PDL1	度伐利尤单抗(MEDI4736)
PDL1	阿替利珠单抗(Tecentriq, MPDL3280A))
PDL1	MDX 1105 (BMS-936559)
PDL1	阿维鲁布
PDL1	ZKAB001（索卡佐利单抗）
PDL1	TQB2450
PDL1	MEDI4736
PDL1	HLX20

[0212]

表 F 示例性靶分子	
靶	抗体名称和/或结合序列
PDL1	KN035
PDL1	LY3434172
PDL1	LY3300054
PDL1	LDP
PDL1	EMB-09
PDL1	ABL501
PDL1	INBRX-105
PDL1	SHR-1210
PDL1	STI-3031 (IMC-001)
PDL1	MPDL3280A (RG7446)
PDL1	KN035
PDL1	BGB-A333
PDL1	HLX301
PDL1	Y101D
PDL1	ES101
PDL1	IBI322
PDL1	恩伐福利单抗
PDL1	VH：美国专利号 11,168,144 的 SEQ ID NO:46、48、50 或 52。 VL：美国专利号 11,168,144 的 SEQ ID NO:58、137 或 12。
PDL1	VH：美国专利号 11,208,486 的 SEQ ID NO:23、124、126、127、128、130、140 或 145。 VL：美国专利号 11,208,486 的 SEQ ID NO:24 或 125。
磷脂酰丝氨酸	（巴维妥昔单抗）
PSCA	GEM3PSCA
PSMA	huJ591
PSMA	抗 PSMA 抗体，其具有 VH 和 VL 序列，所述 VH 和 VL 序列具有来自 WO 2017/023761A1 的以下 SEQ ID NO:对的任何一者的氨基酸序列：2/1642；10/1642；18/1642；26/1642；34/1642；42/1642；50/1642；58/1642；66/1642；74/1642；82/1642；90/1642；98/1642；106/1642；114/1642；122/130；和 138/146。
PSMA	WO2003034903A2 中描述的抗体，诸如：PSMA 3.7、PSMA 3.8、PSMA 3.9、PSMA 3.11、PSMA 5.4、PSMA 7.1、PSMA 7.3、PSMA 10.3、PSMA 1.8.3、PSMA A3.1.3、PSMA A3.3.1、Abgenix 4.248.2、Abgenix 4.360.3、Abgenix 4.7.1、Abgenix 4.4.1、Abgenix 4.177.3、Abgenix 4.16.1、Abgenix 4.22.3、Abgenix 4.28.3、Abgenix 4.40.2、Abgenix 4.48.3、Abgenix 4.49.1、Abgenix 4.209.3、Abgemx 4.219.3、Abgenix 4.288.1、

[0213]

表 F
示例性靶分子

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

[0214]

表 F 示例性靶分子	
靶	**抗体名称和/或结合序列**
	217 的 VH 中的任一者的 VL 氨基酸序列。
PMSA	ES414
PMSA	BAY2010112（帕索珠单抗）
PMSA	CCW702
PMSA	JNJ-63898081
PMSA	CC-1
PMSA	阿卡帕他单抗
PSMA	HPN424
RAAG12	RAV12
RANKL	Prolia™（狄诺塞麦） VH：美国专利公开 2017/0002060 的 SEQ ID NO:51 VL：美国专利公开 2017/0002060 的 SEQ ID NO:52
SLAMF7	Empliciti™（埃洛妥珠单抗）
SSTR2	XmAb®18087
STEAP1	VHCDR1 US20210179731A1 中描述的 SEQ ID NO: 14、33、182、184 或 185。 VHCDR2 US20210179731A1 中描述的 SEQ ID NO: 15、21、34、182、184 或 185。 VHCDR3 US20210179731A1 中描述的 SEQ ID NO: 16 和 35。 VH US20210179731A1 中描述的 SEQ ID NO: 182 或 184。 VLCDR1 US20210179731A1 中描述的 SEQ ID NO: 11 或 30。 VLCDR2 US20210179731A1 中描述的 SEQ ID NO: 12 或 31。 VLCDR3 US20210179731A1 中描述的 SEQ ID NO: 13 或 32。 VL US20210179731A1 中描述的 SEQ ID NO: 183 或 186。
STEAP1	AMG509
STEAP2	抗 STEAP 2 抗体，其具有选自美国专利号 10,772,972 B2 的以下 SEQ ID NO 的 CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3 序列：(1) 4-6-8-12-14-16；(2) 20-22-24-28-30-32；(3) 36-38-40-44-46-48；(4) 52-54-56-60-62-64；(5) 68-70-72-60-62-64；(6)76-78-80-60-62-64；(7) 84-86-88-60-62-64；(8) 92-94-96-60-62-64；(9) 100-102-104-60-62-64；(10) 108-110-112-116-118-120；(11) 124-126-128-132-134-136；(12) 140-142-144-148-150-152；(13) 156-158-160-164-166-168；(14)

[0215]

表 F
示例性靶分子

靶	抗体名称和/或结合序列
	172-174-176-180-182-184 ; (15) 188-190-192-196-198-200 ; (16) 204-206-208-212-214-216 ; (17) 220-222-224-228-230-232 ; (18) 236-238-240-244-246-248 ; (19) 252-254-256-260-262-264 ; (20) 268-270-272-276-278-280 ; (21) 284-286-288-292-294-296 ; (22) 300-302-304-308-310-312 ; (23) 316-318-320-324-326-328 ; (24) 332-334-336-340-342-344 ; (25) 348-350-352-356-358-360 ; (26) 364-366-368-372-374-376 ; 和 (27) 380-382-384-388-390-392。 抗 STEAP 2 抗体，其具有(a)包含美国专利号 10,772,972 B2 的 SEQ ID NO: 2、18、34、50、66、74、82、90、98、106、122、138、154、170、186、202、218、234、250、266、282、298、314、330、346、362 和 378 中的任一者的氨基酸的 VH；和(b)包含美国专利号 10,772,972 B2 中的 SEQ ID NO: 10；26；42；58；114；130；146；162；178；194；210；226、242；258；274；290；306；322；338；354；370；和 386 中的任一者的氨基酸序列的 VL。 抗 STEAP 2 抗体，其具有 VH/VL 对，所述 VH/VL 对包含美国专利号 10,772,972 B2 的以下 SEQ ID NO 对中的任一者的氨基酸序列：2/10；18/26；34/42；50/58；66/58；74/58；82/58；90/58；98/58；106/114；122/130；138/146；154/162；170/178；186/194；202/210；218/226；234/242；250/258；266/274；282/290；298/306；314/322；330/338；346/354；362/370；和 378/386。
多配体聚糖-1 (CD 138)	Wijdenes 等人(1996) Br. J. Haematol., 94: 318-323 中描述的 B-B4 抗体
多配体聚糖-4	欧洲专利公开 EP 2 603 236 中描述的 SEQ ID NO: 1 的氨基酸 93 和氨基酸 121 的氨基酸序列或 SEQ ID NO:2 的氨基酸 92 和氨基酸 122 的氨基酸序列。
TGFβ	GC1008
TNFR	Enbrel™（依那西普）
TNFα	Remicade™（英夫利昔单抗）

[0216]

表F 示例性靶分子	
靶	抗体名称和/或结合序列
	VH：国际专利公开 WO201/3087911 A1 的 SEQ ID NO:2 VH:国际专利公开WO2013/A1087911的SEQ ID NO:3
TNFα	Humira™（阿达木单抗） VH：美国专利号 6,258,562 的 SEQ ID NO:4 VL：美国专利号 6,258,562 的 SEQ ID NO:3
TNFα	Cimzia™（聚乙二醇赛妥珠单抗） VH：美国专利号 7,012,135 的 SEQ ID NO:14 VL：美国专利号 7,012,135 的 SEQ ID NO:9
TNFα	Simponi™（戈利木单抗） VH：美国专利号 7,250,165 的 SEQ ID NO:7 VL：美国专利号 7,250,165 的 SEQ ID NO:8
VEGF	Avastin™（贝伐珠单抗） VH：美国专利号 7,060,269 的 SEQ ID NO:9 VL：美国专利号 7,060,269 的 SEQ ID NO:10
VEGF	Lucentis™（雷珠单抗） VH：美国专利号 9,914,770 的 SEQ ID NO:4 VL：美国专利号 9,914,770 的 SEQ ID NO:2

[0217] 在一些方面中,靶向部分与表F中列出的抗体竞争以结合至靶分子。在进一步的方面中,靶向部分包含具有表F中列出的抗体的CDR序列的CDR。在一些实施例中,靶向部分包含表F中列出的抗体的所有6个CDR序列。在其他实施例中,靶向部分包含至少重链CDR序列(CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3和通用轻链的轻链CDR序列。在进一步的方面中,靶向部分包含VH,该VH包含表F中所示的抗体的VH的氨基酸序列。在一些实施方案中,靶向部分还包含VL,该VL包含表F中列出的抗体的VL的氨基酸序列。在其他实施例中,靶向部分进一步包含通用轻链VL序列。

[0218] 在一些实施例中,靶向部分是配体-受体结合的不阻断性或弱阻断性。非阻断性或弱阻断性抗PD1抗体的实例包括具有以下VH/VL氨基酸序列的抗体:PCT公开号WO2015/112800A1的SEQ ID No: 2/10;美国专利号11,034,765 B2的SEQ ID No: 16/17;美国专利号10,294,299 B2的SEQ ID No. 164/178、165/179、166/180、167/181、168/182、169/183、170/184、171/185、172/186、173/187、174/188、175/189、176/190和177/190。非阻断性或弱阻断性抗LAG3抗体的实例包括具有美国公开US2022/0056126A1的SEQ ID No 23/24、3/4和11/12的VH/VL氨基酸序列的抗体。

[0219] 在下面的表I中以及在例如,Hafeez等人, 2020, Molecules 25:4764, doi: 10.3390/molecules25204764中(特别是在表1中)公开了可以由IL2蛋白质原靶向的其他靶分子。Hafeez等人的表1的全部内容通过引用并入本文。

[0220] 6.8.靶向部分格式

[0221] 在某些方面中,本公开的IL2蛋白质原的靶向部分可以是保留特异性结合至抗原决定簇的任何类型的抗体或其片段。在一个实施例中,靶向部分是免疫球蛋白分子或其片段,特别是IgG类免疫球蛋白分子,更特别是IgG_1或IgG_4免疫球蛋白分子。抗体片段包括但不

限于VH(或V_H)片段、VL(或V_L)片段、Fab片段、F(ab')$_2$片段、scFv片段、Fv片段、微型抗体、双抗体、三抗体和四抗体。

[0222] 6.8.1.Fab

[0223] Fab结构域传统上是通过使用木瓜蛋白酶等酶对免疫球蛋白分子进行蛋白水解裂解来产生的。Fab结构域可以包含来自任何合适物种的恒定结构域和可变区序列,并且因此可以是鼠的、嵌合的、人类的或人源化的。

[0224] Fab结构域通常包含附接至VH结构域的CH1结构域,该CH1结构域与附接至VL结构域的CL结构域配对。在野生型免疫球蛋白中,VH结构域与VL结构域配对构成Fv区,并且CH1结构域与CL结构域配对以进一步稳定结合位点。两个恒定结构域之间的二硫键可以进一步稳定Fab结构域。

[0225] 对于本公开的IL2蛋白质原,特别是当靶向部分的轻链不是共同或通用轻链时,有利的是使用Fab异二聚化策略以允许属于相同靶向部分的Fab结构域的正确缔结并且最小化属于不同靶向部分的Fab结构域的异常配对。例如,可以使用下面的表G中所示的Fab异二聚化策略:

[0226]

表 G
Fab 异二聚化策略

策略	VH	CH1	VL	CL	参考文献
CrossMabCH1-CL	WT	CL 结构域	WT	CH1 结构域	Schaefer 等人, 2011, Cancer Cell 2011; 20:472-86; PMID:22014573。
正交 Fab VHVRD1CH1CRD2 - VLVRD1CλCRD2	39K、62E	H172A、F174G	1R、38D、(36F)	L135Y、S176W	Lewis 等人, 2014, Nat Biotechnol 32:191-8
正交 Fab VHVRD2CH1wt - VLVRD2Cλwt	39Y	WT	38R	WT	Lewis 等人, 2014, Nat Biotechnol 32:191-8
TCR CαCβ	39K	TCR Cα	38D	TCR Cβ	Wu 等人, 2015, MAbs 7:364-76
CR3	WT	T192E	WT	N137K、S114A	Golay 等人, 2016, J Immunol 196:3199-211。
MUT4	WT	L143Q、S188V	WT	V133T、S176V	Golay 等人, 2016, J Immunol 196:3199-211。
杜埃特单抗	WT	F126C	WT	S121C	Mazor 等人, 2015, MAbs 7:377-89; Mazor 等人, 2015, MAbs 7:461-669。
已交换的结构域	WT	CH3 + 杵或臼突变	WT	CH3 + 臼或杵突变	Wozniak-Knopp 等人, 2018, PLoSONE13(4):e0195442

[0227] 因此,在某些实施例中,通过彼此交换Fab的VL和VH结构域或彼此交换CH1和CL结构域来促进Fab的两个多肽之间的正确缔合,例如,如WO 2009/080251中描述的。

[0228] 还可以通过在Fab的CH1结构域中引入一个或多个氨基酸修饰、在Fab的CL 结构域中引入一个或多个氨基酸修饰和/或在VH结构域中引入一个或多个氨基酸修饰、以及在VL结构域中引入一个或多个氨基酸修饰来促进正确的Fab配对。被修饰的氨基酸通常是VH:VL和CH1:CL界面的一部分,使得Fab组件优先地彼此配对,而不是与其他Fab的组件配对。

[0229] 在一个实施例中,一个或多个氨基酸修饰限于可变结构域(VH、VL)和恒定结构域(CH1、CL)的保守框架残基,如残基的Kabat编号所示。Almagro, 2008, Frontiers In Bioscience 13:1619-1633基于Kabat、Chothia和IMGT编号方案提供了框架残基的定义。

[0230] 在一个实施例中,在VH和CH1和/或VL和CL结构域中引入的修饰是彼此互补的。重链和轻链界面处的互补性可以基于空间和疏水接触、静电/电荷相互作用或各种相互作用的组合来实现。蛋白质表面之间的互补性在文献中广泛描述为锁和钥匙配合、杵入臼、突起和空腔、供体和受体等,所有这些都意味着两个相互作用表面之间结构和化学匹配的性质。

[0231] 在一个实施例中,一种或多种所引入的修饰在Fab组分的界面上引入新的氢键。在一个实施例中,一种或多种所引入的修饰引入了跨Fab组分的界面的新盐桥。示例性取代描述于WO 2014/150973和WO 2014/082179中,其内容通过引用并入本文。

[0232] 在一些实施例中,Fab结构域包含CH1结构域中的192E取代和CL结构域中的114A和137K取代,其在CH1结构域与CL结构域之间引入盐桥(参见例如Golay等人, 2016, J Immunol 196:3199-211)。

[0233] 在一些实施例中,Fab结构域包含CH1结构域中的143Q和188V取代以及CL结构域中的113T和176V取代,其用于交换CH1与CL结构域之间接触的疏水性和极性区域(参见例如Golay等人, 2016, J Immunol 196:3199-211)。

[0234] 在一些实施例中,Fab结构域可以在一些或全部VH、CH1、VL、CL结构域中包含修饰以引入促进Fab结构域正确组装的正交Fab界面(Lewis等人, 2014 Nature Biotechnology 32:191-198)。在一个实施例中,在VH结构域中引入39K、62E修饰,在CH1结构域中引入H172A、F174G修饰,在VL结构域中引入1R、38D、(36F)修饰,并且在CL结构域中引入L135Y、S176W修饰。在另一个实施例中,在VH结构域中引入39Y修饰并且在VL结构域中引入38R修饰。

[0235] 还可以修饰Fab结构域以用工程化的二硫键取代天然的CH1:CL二硫键,从而提高Fab组件配对的效率。例如,可以通过在CH1结构域中引入126C和在CL结构域中引入121C来引入工程化的二硫键(参见例如Mazor等人, 2015, MAbs 7:377-89)。

[0236] 还可以通过用促进正确组装的替代结构域替换CH1结构域和CL结构域来修改Fab结构域。例如,Wu等人, 2015, MAbs 7:364-76,描述了用T细胞受体的恒定结构域取代CH1结构域并且用T细胞受体的b结构域取代CL结构域,并且通过在VL结构域中引入38D修饰和在VH结构域中引入39K修饰,将这些结构域替换与VL与VH结构域之间的附加电荷-电荷相互作用配对。

[0237] 代替或补充使用Fab异二聚化策略来促进正确的VH-VL配对,共同轻链(也称为通用轻链)的VL可用于公开的IL2蛋白质原中的每个独特ABD。在各种实施例中,与采用原始同源VL相比,采用本文所述的共同轻链减少了IL2蛋白质原中不适当种类的数量。在各种实施

例中,ABD的VL结构域从包含共同轻链的单特异性抗体中鉴定。在各种实施例中,IL2蛋白质原中的ABD的VH区包含在小鼠B细胞内体内重排的人类重链可变基因片段,这些小鼠B细胞先前经工程化以表达有限的人类轻链库(或单个人类轻链)与人类重链同源,并且响应于暴露于感兴趣的抗原,产生包含多个人类VH的抗体库,这些多个人类VH与两种可能的人类VL中的一种或一种人类VL同源,其中所述抗体具有对感兴趣的抗原特异性的库。常见轻链是源自重排的人Vκ1-39Jκ5序列或重排的人类Vκ3-20Jκ1序列的,并且包括体细胞突变(例如,亲和力成熟)版本。参见例如美国专利号10,412,940。

[0238] 6.8.2.scFv

[0239] 单链Fv或“scFv”抗体片段在单个多肽链中包含抗体的VH和VL结构域,能够表达为单个多肽链,并且保留其来源的完整抗体的特异性。一般而言,scFv多肽进一步包含VH与VL结构域之间的多肽接头,该多肽接头使得scFv能够形成用于靶结合的所需结构。适合连接scFv的VH和VL链的接头的实例是第v节中确定的不可裂解接头。

[0240] 除非另有说明,如本文所用,scFv可以以任一顺序具有VL和VH可变区,例如,相对于多肽的N末端和C末端,scFv可以包含VL-接头-VH或可以包含VH-接头-VL。

[0241] scFv可以包含来自任何合适物种的VH和VL序列,诸如鼠、人类或人源化VH和VL序列。

[0242] 为了产生scFv编码核酸,将VH和VL编码DNA片段可操作地连接至编码接头的另一个片段,例如,编码第6.6节中描述的任何接头(通常是含有氨基酸甘氨酸和丝氨酸的序列的重复,诸如氨基酸序列(Gly4~Ser)3 (SEQ ID NO: 157),使得VH和VL序列可以表达为连续的单链蛋白质,其中VL和VH区由柔性接头连接(参见例如Bird等人, 1988, Science 242:423-426;Huston等人, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty等人, 1990, Nature 348:552-554)。

[0243] 6.9.Fc区

[0244] 本公开的IL2蛋白质原通常包括缔合以形成Fc区的一对Fc结构域。在天然抗体中,Fc区在其N末端处包含铰链区以形成恒定结构域。在整个本公开中,除非另有说明,对Fc结构域的提及涵盖在其N末端处具有铰链结构域的Fc结构域。

[0245] Fc结构域可以源自可操作地连接至ABD或其组分的任何合适的物种。在一个实施例中,Fc结构域源自人类Fc结构域。在优选的实施例中,靶向部分或其组分融合至IgG Fc分子。靶向部分或其组分可以融合至IgG Fc结构域的N末端或C末端或两者。

[0246] Fc结构域可以源自任何合适类别的抗体,包括IgA(包括亚类IgA1和IgA2)、IgD、IgE、IgG(包括亚类IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)和IgM。在一个实施例中,Fc结构域源自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。在一个实施例中,Fc结构域源自IgG1。在一个实施例中,Fc结构域源自IgG4。下面的表Y中提供了来自IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的Fc结构域的示例性序列。

[0247]

表Y
Fc序列

Fc	序列	SEQ ID NO
hIgG1 Fc（UniprotKB P01857-1的氨基酸99-330）	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	346
hIgG2 Fc（UniprotKB P01859-1的氨基酸99-326）	ERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQD WLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	347
hIgG3 Fc（UniprotKB P01860-1的氨基酸99-377）	ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPE PKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK	348
hIgG4 Fc（UniprotKB P01861-1的氨基酸99-327）	ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	349

[0248] 在一些方面,Fc结构域包含与SEQ ID NO: 346具有至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%、或100%序列同一性的氨基酸序列。在Fc结构域与SEQ ID NO: 346具有至少90%序列同一性并且具有小于100%序列同一性(例如,与SEQ ID NO: 346具有90%至99%之间的序列同一性)的情况下,Fc结构域还可包含本文所述的一个或多个氨基酸取代,例如降低效应子功能的一个或多个取代(例如,如第6.9.1节中所述)和/或促进Fc异二聚化的一个或多个取代(例如,如第6.9.2节中所述)。

[0249] 在一些方面,Fc结构域包含与SEQ ID NO: 347具有至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%、或100%序列同一性的氨基酸序列。在Fc结构域与SEQ ID NO: 347具有至少90%序列同一性并且具有小于100%序列同一性(例如,与SEQ ID NO: 347具有90%至99%之间的序列同一性)的情况下,Fc结构域还可包含本文所述的一个或多个氨基酸取代,例如降低效应子功能的一个或多个取代(例如,如第6.9.1节中所述)和/或促进Fc异二聚化的一个或多个取代(例如,如第6.9.2节中所述)。

[0250] 在一些方面,Fc结构域包含与SEQ ID NO: 348具有至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%、或100%序列同一性的氨基酸序列。在Fc结构域与SEQ ID NO: 348具有至少90%序列同一性并且具有小于100%序列同一性(例如,与SEQ ID NO: 348具有90%至99%之间的序列同一性)的情况下,Fc结构域还可包含本文所述的一个或多个氨基酸取代,例如降低效应子功能的一个或多个取代(例如,如第6.9.1节中所述)和/或促进Fc异二聚化的一个或多个取代(例如,

如第6.9.2节中所述)。

[0251] 在一些方面,Fc结构域包含与SEQ ID NO: 349具有至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%、或100%序列同一性的氨基酸序列。在Fc结构域与SEQ ID NO: 349具有至少90%序列同一性并且具有小于100%序列同一性(例如,与SEQ ID NO: 349具有90%至99%之间的序列同一性)的情况下,Fc结构域还可包含本文所述的一个或多个氨基酸取代,例如降低效应子功能的一个或多个取代(例如,如第6.9.1节中所述)和/或促进Fc异二聚化的一个或多个取代(例如,如第6.9.2节中所述)。

[0252] Fc区内的两个Fc结构域可以彼此相同或不同。在天然抗体中,Fc结构域通常是相同的,但为了产生多特异性结合分子,例如,本公开的IL2蛋白质原和通过其活化产生的MBM,Fc结构域可能有利地不同以允许异二聚化,如下面的第6.9.2节中描述的。

[0253] 在天然抗体中,IgA、IgD和IgG的重链Fc结构域由两个重链恒定结构域(CH2和CH3)组成,而IgE和IgM的重链Fc结构域由三个重链恒定结构域(CH2、CH3和CH4)组成。这些二聚体形成Fc区域。

[0254] 在本公开的IL2蛋白质原中,Fc区和/或其内的Fc结构域可以包含来自一种或多种不同类型的抗体,例如一种、两种或三种不同类型的重链恒定结构域。

[0255] 在一个实施例中,Fc区包含源自IgG1的CH2和CH3结构域。

[0256] 在一个实施例中,Fc区包含源自IgG2的CH2和CH3结构域。

[0257] 在一个实施例中,Fc区包含源自IgG3的CH2和CH3结构域。

[0258] 在一个实施例中,Fc区包含源自IgG4的CH2和CH3结构域。

[0259] 在一个实施例中,Fc区包含来自IgM的CH4结构域。IgM CH4结构域通常位于CH3结构域的C末端。

[0260] 在一个实施例中,Fc区包含源自IgG的CH2和CH3结构域以及源自IgM的CH4结构域。

[0261] 应当理解,用于产生本公开的IL2蛋白质原的Fc区的重链恒定结构域可以包括上述天然存在的恒定结构域的变体。与野生型恒定结构域相比,此类变体可包含一种或多种氨基酸变异。在一个实例中,本公开的Fc区包含其序列与野生型恒定结构域不同的至少一个恒定结构域。应当理解,变体恒定结构域可以比野生型恒定结构域长或短。优选地,变体恒定结构域与野生型恒定结构域至少60%相同或相似。在另一个实例中,变体恒定结构域至少70%相同或相似。在另一个实例中,变体恒定结构域至少80%相同或相似。在另一个实例中,变体恒定结构域至少90%相同或相似。在另一个实例中,变体恒定结构域至少95%相同或相似。

[0262] IgM和IgA作为常见H2L2抗体单元的共价多聚体天然存在于人体中。当IgM掺入J链时,它作为五聚体出现;或者当IgM缺少J链时,它作为六聚体出现。IgA作为单体和二聚体出现。IgM和IgA的重链具有延伸至C末端恒定结构域的18个氨基酸,称为尾段。尾段包含半胱氨酸残基,该残基在聚合物的重链之间形成二硫键,并且被认为在聚合中具有重要作用。尾段还包含糖基化位点。在某些实施例中,本公开的IL2蛋白质原不包含尾段。

[0263] 掺入本公开的IL2蛋白质原中的Fc结构域可包含改变蛋白质功能特性的一种或多种修饰,例如,结合至诸如FcRn或白细胞受体、结合至补体、修饰的二硫键结构或改变的糖基化模式等Fc受体。改变效应子功能的示例性Fc修饰描述于第6.9.1节中。

[0264] 还可以改变Fc结构域以包括提高不对称IL2蛋白质原的可制造性的修饰,例如通过允许异二聚化,该异二聚化是不同Fc结构域相对于相同Fc结构域的优先配对。异二聚化允许产生IL2蛋白质原,其中不同的多肽组分通过含有序列不同的Fc结构域的Fc区彼此连接。异二聚化策略的实例在第6.9.2节中举例说明。

[0265] 应当理解,上述任何修饰可以以任何合适的方式组合以实现所需的功能特性和/或与其他修饰组合以改变IL2蛋白质原的特性。

[0266] 6.9.1.效应子功能改变的Fc结构域

[0267] 在一些实施例中,Fc结构域包含减少结合至Fc受体和/或效应子功能的一个或多个氨基酸取代。

[0268] 在特定实施例中,Fc受体是Fc γ 受体。在一个实施例中,Fc受体是人类Fc受体。在一个实施例中,Fc受体是活化的Fc受体。在具体实施例中,Fc受体是活化的人类Fc γ 受体,更具体地人类Fc γ RIIIa、Fc γ RI或Fc γ RIIa,最具体地人类Fc γ RIIIa。在一个实施例中,效应子功能是选自补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)和细胞因子分泌的组中的一者或多者。在具体实施例中,效应子功能是ADCC。

[0269] 在一个实施例中,Fc结构域(例如,IL2蛋白质原半抗体的Fc结构域)或Fc区(例如,可以缔合以形成Fc区的IL2蛋白质原的一个或两个Fc结构域)在选自E233、L234、L235、N297、P331和P329(根据Kabat EU索引的编号)的组的位置处包含氨基酸取代。在更具体的实施例中,Fc结构域或Fc区在选自L234、L235和P329(根据Kabat EU索引的编号)的位置处包含氨基酸取代。在一些实施例中,Fc结构域或Fc区包含氨基酸取代L234A和L235A(根据Kabat EU索引编号)。在一个此类实施例中,Fc结构域或区域是Igd Fc结构域或区域,特别是人类Igd Fc结构域或区域。在一个实施例中,Fc结构域或Fc区在位置P329处包含氨基酸取代。在更具体的实施例中,氨基酸取代是P329A或P329G,特别是P329G(根据Kabat EU索引编号)。在一个实施例中,Fc结构域或Fc区在位置P329处包含氨基酸取代和在选自E233、L234、L235、N297和P331(根据Kabat EU索引的编号)的位置处包含进一步的氨基酸取代。在更具体的实施例中,进一步的氨基酸取代是E233P、L234A、L235A、L235E、N297A、N297D或P331S。在具体实施例中,Fc结构域或Fc区在位置P329、L234和L235处包含氨基酸取代(根据Kabat EU索引编号)。在更具体的实施例中,Fc结构域包含氨基酸突变L234A、L235A和P329G(“P329G LALA”、“PGLALA”或“LALAPG”)。

[0270] 通常,Fc区的两个Fc结构域中的每一个Fc结构域中存在相同的一个或多个氨基酸取代。因此,在具体实施例中,Fc区的每个Fc结构域包含氨基酸取代L234A、L235A和P329G(Kabat EU索引编号),即在Fc区的第一Fc结构域和第二Fc结构域中的每一者中,在234位置处的亮氨酸残基经丙氨酸残基(L234A)取代,在235位置处的亮氨酸残基经丙氨酸残基(L235A)取代,并且在329位置处的脯氨酸残基经甘氨酸残基(P329G)取代(根据Kabat EU索引编号)。

[0271] 在一个实施例中,Fc结构域是IgG1 Fc结构域,特别是人类IgG1 Fc结构域。在一些实施例中,IgG1 Fc结构域是包含D265A、N297A突变(EU编号)以降低效应子功能的变体IgG1。

[0272] 在另一个实施例中,Fc结构域是降低结合至Fc受体的IgG4 Fc结构域。降低结合至

Fc受体的示例性IgG4 Fc结构域可以包含选自下面表H的氨基酸序列:在一些实施例中,Fc结构域仅包括如下所示序列的粗体部分:

[0273]

表 H	
Fc 结构域	**序列**
SEQ ID NO: 332（WO2014/121087 的 SEQ ID NO:1）	Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
SEQ ID NO: 333（WO2014/121087 的 SEQ ID NO:2）	Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
SEQ ID NO: 334（WO2014/121087 的 SEQ ID NO:30）	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val **Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln**

[0274]

表 H	
Fc 结构域	**序列**
	Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn **Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys**
SEQ ID NO: 335（WO2014/121087 的 SEQ ID NO:31）	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val **Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn** **Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys**
SEQ ID NO: 336（WO2014/121087 的 SEQ ID NO:37）	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro

表 H

Fc 结构域	序列
	Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val **Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn** **Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys**
SEQ ID NO: 337（WO2014/121087 的 SEQ ID NO:38）	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val **Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn** **Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys**

[0275]

[0276] 在具体实施例中,效应子功能降低的IgG4包含WO2014/121087的SEQ ID NO:31的氨基酸序列的粗体部分,有时在本文中称为IgG4或hIgG4。

[0277] 对于异二聚体Fc区,可以并入上述变体IgG4 Fc序列的组合,例如包含含有

WO2014/121087的SEQ ID NO:30的氨基酸序列(或其加粗部分)的Fc结构域和含有WO2014/121087的SEQ ID NO:37的氨基酸序列(或其加粗部分)的Fc结构域的Fc区,或包含含有WO2014/121087的SEQ ID NO:31的氨基酸序列(或其加粗部分)的Fc结构域和含有WO2014/121087的SEQ ID NO:38的氨基酸序列(或其加粗部分)的Fc结构域的Fc区。

[0278] 6.9.2.Fc异二聚化变体

[0279] 某些IL2蛋白质原需要两个Fc结构域之间的二聚化,与天然免疫球蛋白不同,它们可操作地连接至不相同的N末端或C末端区。两个Fc结构域形成Fc区的不充分异二聚化可能是增加所需异二聚体分子产量的障碍,并且对纯化提出了挑战。本领域可用的多种方法可用于增强可能存在于本公开的IL2蛋白质原中的Fc结构域的二聚化,例如如EP 1870459A1中公开的;美国专利号5,582,996;美国专利号5,731,168;美国专利号5,910,573;美国专利号5,932,448;美国专利号6,833,441;美国专利号7,183,076;美国专利申请公开号2006204493A1;和PCT公开号WO 2009/089004A1。

[0280] 在一些实施例中,本公开提供包含Fc异二聚体的IL2蛋白质原,即包含异源、不相同的Fc结构域的Fc区。通常,Fc异二聚体中的每个Fc结构域包含抗体的CH3结构域。CH3结构域源自任何同种型、类别或亚类的抗体的恒定区,并且优选地IgG(IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)类别的抗体的恒定区,如前一节所述。

[0281] CH3结构域两个不同重链的异二聚化产生所需的IL2蛋白质原,而相同重链的同二聚化将降低所需IL2蛋白质原的产量。因此,在优选的实施例中,缔合以形成本公开的IL2蛋白质原的多肽将含有具有相对于未修饰的Fc结构域有利于异二聚体缔合的修饰的CH3结构域。

[0282] 在具体实施例中,促进Fc异二聚体形成的所述修饰是所谓的“杵入臼”或“杵臼”修饰,包含Fc结构域中的一个Fc结构域中的“杵”修饰和另一个Fc结构域的“臼”修饰。杵入臼技术例如描述于美国专利号5,731,168;US 7,695,936;Ridgway等人, 1996, Prot Eng 9:617-621,以及Carter, 2001, Immunol Meth 248:7-15中。一般而言,该方法包括在第一多肽的界面处引入突起(“杵”)和在第二多肽的界面中相应的空腔(“臼”),使得突起可以定位在空腔中,从而促进异二聚体形成并且阻碍同二聚体形成。通过用较大侧链(例如,酪氨酸或色氨酸)替换来自第一多肽界面的小氨基酸侧链来构建突起。通过用较小氨基酸侧链(例如,丙氨酸或苏氨酸)替换大氨基酸侧链,在第二多肽的界面中产生与突起大小相同或相似的补偿空腔。

[0283] 因此,在一些实施例中,Fc结构域的第一亚基的CH3结构域中的氨基酸残基经具有较大侧链体积的氨基酸残基取代,从而在第一亚基的CH3结构域内产生突起,该突起可定位在第二亚基的CH3结构域内的空腔中,并且Fc结构域的第二亚基的CH3结构域中的氨基酸残基经具有较小侧链体积的氨基酸残基取代,从而在第二亚基的CH3结构域内产生空腔,在该空腔内可定位第一亚基的CH3结构域内的突起。优选地,所述具有较大侧链体积的氨基酸残基选自由精氨酸(R)、苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)和色氨酸(W)组成的组。优选地,所述具有较小侧链体积的氨基酸残基选自由丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)和缬氨酸(V)组成的组。突起和空腔可以通过改变编码多肽的核酸来制备,例如,通过位点特异性诱变或通过肽合成。示例性取代是Y470T。

[0284] 在具体的此类实施例中,在第一Fc结构域中,位置366处的苏氨酸残基经色氨酸残

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

[0285] 在一些实施方案中,静电转向(例如,如Gunasekaran等人, 2010, J Biol Chem 285(25): 19637-46中描述的)可用于促进Fc区的第一和第二Fc结构域的结合。

[0286] 作为使用经修饰以促进异二聚化的Fc结构域的替代或附加,可修饰Fc结构域以允许能够选择Fc异二聚体的纯化策略。在一个此类实施例中,一种多肽包含修饰的Fc结构域,该Fc结构域消除其结合至蛋白A,从而使得能够产生异二聚体蛋白的纯化方法。参见例如美国专利号8,586,713。因此,IL2蛋白质原包含第一CH3结构域和第二Ig CH3结构域,其中第一和第二Ig CH3结构域彼此具有至少一个氨基酸不同,并且其中与缺少氨基酸差异的相应IL2蛋白质原相比,至少一个氨基酸差异降低了IL2蛋白质原与蛋白A的结合。在一个实施例中,第一CH3结构域结合蛋白A并且第二CH3结构域含有减少或消除蛋白A结合的诸如H95R修饰等突变/修饰(通过IMGT外显子编号;通过EU编号的H435R)。第二CH3可进一步包含Y96F修饰(通过IMGT;通过EU的Y436F)。此类修饰在本文中称为“星形”突变。

[0287] 在一些实施例中,Fc可以含有一种或多种突变(例如,杵和臼突变)以促进异二聚化以及星形突变以促进纯化。

[0288] 6.9.3.铰链域

[0289] 本公开内容的IL2蛋白质原可以包含Fc结构域,该Fc结构域在其N末端处包含铰链结构域。铰链区可以是天然的或修改的铰链区。铰链区通常位于Fc区的N末端处。除非上下文另有规定,术语“铰链结构域”是指天然或非天然存在的铰链序列,该铰链序列在单链或单体多肽链的上下文中是单体铰链结构域并且在二聚体多肽(例如,由两个Fc结构域的缔合形成的同二聚体或异二聚体IL2蛋白质原)的上下文中可以包含单独多肽链上的两个相关铰链序列。有时,两个相关铰链序列被称为“铰链区”。

[0290] 天然铰链区是通常在天然存在的抗体的Fab和Fc结构域之间发现的铰链区。修饰的铰链区是在长度和/或组分中不同于天然铰链区的任何铰链。此类铰链可以包括来自其他物种的铰链区,诸如人类、小鼠、大鼠、兔、鲨鱼、猪、仓鼠、骆驼、美洲驼或山羊铰链区。其他修饰的铰链区可包含源自与重链Fc结构域或Fc区不同类别或亚类的抗体的完整铰链区。或者,修饰的铰链区可包含天然铰链或重复单元的一部分,其中重复中的每个单元源自天然铰链区。在另外的替代方案中,可以通过将一个或多个半胱氨酸或其他残基转化为中性残基,诸如丝氨酸或丙氨酸,或通过将适当放置的残基转化为半胱氨酸残基来改变天然铰链区。通过这种方式,铰链区中半胱氨酸残基的数量可以增加或减少。其他修饰的铰链区可以是完全合成的并且可以被设计为具有所需的性质,诸如长度、半胱氨酸组成和柔性。

[0291] 许多修饰的铰链区已经描述于例如美国专利号5,677,425、WO 99/15549、WO 2005/003170、WO 2005/003169、WO 2005/003170、WO 98/25971和WO 2005/003171中并且这

些内容通过引用并入本文。

[0292] 在一个实施例中,本公开的IL2蛋白质原包含Fc区,其中一个或两个Fc结构域在其N末端处具有完整的铰链结构域。

[0293] 在各种实施例中,铰链区内的位置233-236可以是G,G,G和未占用;G,G,未占用和未占用;G,未占用,未占用和未占用;或全部未占用,其中位置按EU编号进行编号。

[0294] 在一些实施例中,本公开的IL2蛋白质原包含修饰的铰链区,其相对于相同同种型(例如,人类IgG1或人类IgG4)的野生型铰链区降低对Fc γ受体的结合亲和力。

[0295] 在一个实施例中,本公开的IL2蛋白质原包含Fc区,其中每个Fc结构域在其N末端处具有完整的铰链结构域,其中每个Fc结构域和铰链结构域源自IgG4并且每个铰链结构域包含修饰的序列CPPC。与包含序列CPPC的IgG1相比,人类IgG4的核心铰链区包含序列CPSC。IgG4序列中存在的丝氨酸残基导致该区域的灵活性增加,因此一部分分子在同一蛋白链内形成二硫键(链内二硫键),而不是桥接到IgG分子中的其他重链以形成链间二硫键。(Angel等人, 1993, Mol Immunol 30(1):105-108)。将丝氨酸残基改为脯氨酸以得到与IgG1相同的核心序列可以在IgG4铰链区中完全形成链间二硫键,从而减少纯化产物中的异质性。这种改变的同种型被称为IgG4P。

[0296] 6.9.3.1.嵌合铰链序列

[0297] 铰链结构域可以是嵌合铰链结构域。

[0298] 例如,嵌合铰链可包含源自人类IgG1、人类IgG2或人类IgG4铰链区的“上部铰链”序列,该序列与源自人类IgG1、人类IgG2或人类IgG4铰链区的“下部铰链”序列组合。

[0299] 在具体实施例中,嵌合铰链区包含氨基酸序列EPKSCDKTHTCPPCPAPPVA (SEQ ID NO: 326)(之前披露为WO2014/121087的SEQ ID NO:8,其通过引用整体并入本文)或ESKYGPPCPPCPAPPVA (SEQ ID NO: 327)(之前披露为WO2014/121087的SEQ ID NO:9)。此类嵌合铰链序列可适当地连接至IgG4 CH2区(例如通过并入IgG4 Fc结构域,例如人类或鼠类Fc结构域,其可在CH2和/或CH3结构域中进一步修饰以降低效应子功能,例如如第6.9.1节中描述的)。

[0300] 6.9.3.2.具有降低的效应子功能的铰链序列

[0301] 在进一步的实施例中,铰链区可以被修饰以减少效应子功能,例如如WO2016161010A2中描述的,其整体通过引用并入本文。在各种实施方案中,修饰的铰链区的位置233-236为G,G,G和未占用;G,G,未占用和未占用;G,未占用,未占用和未占用;或全部未占用,其中位置按EU编号进行编号(如WO2016161010A2的图1所示)。这些片段可以表示为GGG-、GG--、G---或----,其中“-”表示未占用的位置。

[0302] 位置236在规范人类IgG2中未占用,但在其他规范人类IgG同种型中被占用。在所有四种人类同种型中,位置233-235被G以外的残基占用(如WO2016161010A2的图1所示)。

[0303] 位置233-236内的铰链修饰可以与由P占用的位置228组合。位置228在人类IgG1和IgG2中天然地由P占用,但在人类IgG4中由S占用,而在人类IgG3中被R占用。IgG4抗体中的S228P突变有利于稳定IgG4抗体并且减少外源抗体与内源抗体之间重链轻链对的交换。优选地,位置226-229分别由C、P、P和C占用。

[0304] 示例性铰链区具有残基226-236,有时称为中部(或核心)和下部铰链,由指定为GGG-(233-236)、GG--(233-236)、G---(233-236)和没有G(233-236)的修饰铰链序列占用。

任选地,铰链结构域氨基酸序列包括CPPCPAPGGG-GPSVF (SEQ ID NO: 328)(先前披露为WO2016161010A2的SEQ ID NO:1)、CPPCPAPGG--GPSVF (SEQ ID NO: 329)(先前披露为WO2016161010A2的SEQ ID NO:2)、CPPCPAPG---GPSVF (SEQ ID NO: 330)(先前披露为WO2016161010A2的SEQ ID NO:3)或CPPCPAP----GPSVF (SEQ ID NO: 331)(先前披露为WO2016161010A2的SEQ ID NO:4)。

[0305] 上述修饰的铰链区可以并入重链恒定区,其通常包括CH2和CH3结构域,并且其可以具有位于指定区域侧翼的附加铰链区段(例如,上铰链)。存在的此类另外的恒定区片段通常具有相同的同种型,优选地人类同种型,尽管可以是不同同种型的杂合体。此类另外的人类恒定区片段的同种型优选地是人类IgG4,但也可以是人类IgG1、IgG2或IgG3或其结构域具有不同同种型的杂合体。人类IgG1、IgG2和IgG4的示例性序列显示于WO2016161010A2的图2至图4中。

[0306] 在特定实施方案中,修饰的铰链序列可以连接到IgG4 CH2区(例如通过掺入IgG4 Fc结构域,例如人类或鼠Fc结构域,其可以在CH2和/或CH3结构域中进一步修饰以降低效应功能,例如如第6.9.1节中描述的)。

[0307] 6.10.核酸和宿主细胞

[0308] 在另一个方面中,本公开提供了编码本公开的IL2蛋白质原的核酸。在一些实施例中,IL2蛋白质原由单一核酸编码。在其他实施例中,IL2蛋白质原可由多个(例如,两个、三个、四个或更多个)核酸编码。

[0309] 单个核酸可编码包含单个多肽链的IL2蛋白质原、包含两个或更多个多肽链的IL2蛋白质原、或包含两个以上多肽链的IL2蛋白质原的一部分(例如,单个核酸可编码包含三个、四个或更多个多肽链的IL2蛋白质原的两条多肽链,或包含四个或更多个多肽链的IL2蛋白质原的三条多肽链)。对于表达的单独控制,编码两个或更多个多肽链的开放阅读框可以处于单独的转录调节元件(例如,启动子和/或增强子)的控制之下。编码两种或更多种多肽的开放阅读框也可以由相同的转录调控元件控制,并由内部核糖体进入位点(IRES)序列分开,从而允许翻译成单独的多肽。

[0310] 在一些实施例中,包含两个或更多个多肽链的IL2蛋白质原由两个或更多个核酸编码。编码IL2蛋白质原的核酸的数量可以等于或小于IL2蛋白质原中的多肽链的数量(例如,当多于一个的多肽链由单个核酸编码时)。

[0311] 本公开内容的核酸可以是DNA或RNA(例如,mRNA)。

[0312] 在另一个方面中,本公开提供了含有本公开的核酸的宿主细胞和载体。核酸可存在于单一载体中或存在于相同宿主细胞或单独宿主细胞中的单独载体中,如下文更详细地描述。

[0313] 6.10.1.载体

[0314] 本公开内容提供了载体,其包含编码本文所述的IL2蛋白质原或其组分的核苷酸序列,例如IL2蛋白质原的半抗体的一个或两个多肽链。载体包括但不限于病毒、质粒、粘粒、λ噬菌体或酵母人工染色体(YAC)。

[0315] 可以采用多种载体系统。例如,一类载体利用源自动物病毒的DNA元件,诸如例如牛乳头状瘤病毒、多瘤病毒、腺病毒、牛痘病毒、杆状病毒、逆转录病毒(劳斯肉瘤病毒、MMTV或MOMLV)或SV40病毒。另一类载体利用源自RNA病毒的RNA元件,诸如塞姆利基森林病毒、东

部马脑炎病毒和黄病毒。

[0316] 另外,可以通过引入一种或多种允许选择转染宿主细胞的标记来选择已将DNA稳定整合到其染色体中的细胞。标记可以提供例如对营养缺陷型宿主的原质性、杀生物剂抗性(例如,抗生素)或对重金属(例如铜)的抗性等。选择标记基因可以直接连接至待表达的DNA序列,或通过共转化引入同一细胞中。mRNA的最佳合成可能还需要其他元件。这些元件可能包括剪接信号以及转录启动子、增强子和终止信号。

[0317] 一旦制备好用于表达的表达载体或含有构建体的DNA序列,就可以将表达载体转染或引入合适的宿主细胞中。可以采用各种技术来实现这一点,诸如例如原生质体融合、磷酸钙沉淀、电穿孔、逆转录病毒转导、病毒转染、基因枪、基于脂质的转染或其他常规技术。用于培养所得到的转染细胞和用于回收所表达的多肽的方法和个件是本领域技术人员已知的,并且可以基于本说明书根据所使用的具体表达载体和哺乳动物宿主细胞而变化或优化。

[0318] 6.10.2.细胞

[0319] 本公开内容还提供了包含本公开内容的核酸的宿主细胞。

[0320] 在一个实施例中,宿主细胞经基因工程化以包含本文所述的一种或多种核酸。

[0321] 在一个实施例中,通过使用表达盒对宿主细胞进行基因工程化。短语“表达盒”是指能够影响基因在与此类序列相容的宿主中表达的核苷酸序列。此类盒可包括启动子、具有或不具有内含子的开放阅读框和终止信号。还可以使用影响表达所必需的或有帮助的额外因子,诸如例如诱导型启动子。

[0322] 本公开内容还提供了包含本文描述的载体的宿主细胞。

[0323] 细胞可以是但不限于真核细胞、细菌细胞、昆虫细胞或人类细胞。合适的真核细胞包括但不限于Vero细胞、HeLa细胞、COS细胞、CHO细胞、HEK293细胞、BHK细胞和MDCKII细胞。合适的昆虫细胞包括但不限于Sf9细胞。

[0324] 6.11.药物组合物

[0325] 本公开的IL2蛋白质原可以是包含IL2蛋白质原和一种或多种载体、赋形剂和/或稀释剂的组合物的形式。组合物可以配制用于特定用途,诸如用于兽医用途或人类药物用途。所使用的组合物的形式(例如,干粉、液体制剂等)和赋形剂、稀释剂和/或载体将取决于IL2蛋白质原的预期用途以及对于治疗用途而言的施用模式。

[0326] 对于治疗用途,组合物可以作为包含药学上可接受的载体的无菌药物组合物的一部分来提供。该组合物可以是任何合适的形式(取决于将其施用于患者的所需方法)。药物组合物可以通过多种途径施用于患者,诸如口服、透皮、皮下、鼻内、静脉内、肌内、瘤内、鞘内、局部或局部。在任何给定情况下最合适的施用途径将取决于具体的IL2蛋白质原、受试者以及疾病的性质和严重性以及受试者的身体状况。通常,药物组合物将静脉内或皮下施用。

[0327] 药物组合物可以方便地以每剂量含有预定量的本公开的IL2蛋白质原的单位剂型存在。单位剂量中包含的IL2蛋白质原的量将取决于所治疗的疾病以及本领域众所周知的其他因素。此类单位剂量可以是含有适合单次施用的一定量的IL2蛋白质原的冻干干粉形式,或者是液体形式。干粉单位剂型可以与注射器、适量的稀释剂和/或用于施用的其他组分一起包装在试剂盒中。液体形式的单位剂量可以以预先填充有适合单次施用的一定量的

IL2蛋白质原的注射器的形式方便地供应。

[0328] 药物组合物还可以由含有适合多次施用的一定量的IL2蛋白质原来批量供应。

[0329] 可以通过将具有所需纯度的IL2蛋白质原与本领域通常使用的任选的药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂(即缓冲剂、稳定剂、防腐剂、等渗剂、非离子洗涤剂、抗氧化剂和其他各种添加剂)(所有这些都在本文中称为“载体”)混合来制备药物组合物以作为冻干制剂或水溶液储存。参见Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版(Osol编辑1980)。此类添加剂在所使用的剂量和浓度处应当对接受者无毒。

[0330] 缓冲剂有助于将pH值维持在接近生理状况的范围内。它们可以以多种浓度存在,但通常以约2 mM至约50 mM范围内的浓度存在。适用于本公开内容的缓冲剂包括有机和无机酸及其盐,诸如柠檬酸盐缓冲剂(例如,柠檬酸一钠-柠檬酸二钠混合物、柠檬酸-柠檬酸三钠混合物、柠檬酸-柠檬酸一钠混合物等)、琥珀酸盐缓冲剂(例如,琥珀酸-琥珀酸一钠混合物、琥珀酸-氢氧化钠混合物、琥珀酸-琥珀酸二钠混合物等)、酒石酸盐缓冲剂(例如,酒石酸-酒石酸钠混合物、酒石酸-酒石酸钾混合物、酒石酸-氢氧化钠混合物等)、富马酸盐缓冲剂(例如,富马酸-富马酸一钠混合物、富马酸-富马酸二钠混合物、富马酸一钠-富马酸二钠混合物等)、葡萄糖酸盐缓冲液(例如,葡萄糖酸-葡萄糖酸钠混合物、葡萄糖酸-氢氧化钠混合物、葡萄糖酸-葡萄糖酸钾混合物等)、草酸盐缓冲液(例如,草酸-草酸钠混合物、草酸-氢氧化钠混合物、草酸-草酸钾混合物等)、乳酸盐缓冲液(例如,乳酸-乳酸钠混合物、乳酸-氢氧化钠混合物、乳酸-乳酸钾混合物等)和醋酸盐缓冲液(例如,醋酸-醋酸钠混合物、醋酸-氢氧化钠混合物等)。另外,还可以使用磷酸盐缓冲液、组氨酸缓冲液和三甲胺盐(诸如Tris)。

[0331] 可以添加防腐剂以延缓微生物生长,并且可以以约0.2%-1% (w/v)范围内的量添加。适用于本公开的防腐剂包括苯酚、苯甲醇、间甲酚、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、十八烷基二甲基苄基氯化铵、苯扎氯铵卤化物(例如,氯化物、溴化物和碘化物)、六甲氯铵和烷基对羟基苯甲酸酯(诸如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯)、儿茶酚、间苯二酚、环己醇和3-戊醇。可以添加等渗剂(有时称为“稳定剂”)以确保本公开的液体组合物的等渗性,并且等渗剂包括多元糖醇,例如三元或更高级的糖醇,例如甘油、赤藓糖醇、阿拉伯糖醇、木糖醇、山梨糖醇和甘露醇。稳定剂是指一大类赋形剂,其功能范围包括从填充剂到添加剂,可以溶解治疗剂或有助于防止变性或粘附在容器壁上。典型的稳定剂可以是多元糖醇(上面列举的);氨基酸,例如精氨酸、赖氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、丙氨酸、鸟氨酸、L-亮氨酸、2-苯丙氨酸、谷氨酸、苏氨酸等,有机糖或糖醇,例如乳糖、海藻糖、水苏糖、甘露醇、山梨醇、木糖醇、核糖醇、肌醇、半乳糖醇、甘油等,包括环多醇例如肌醇;聚乙二醇;氨基酸聚合物;含硫还原剂,例如尿素、谷胱甘肽、硫辛酸、巯基乙酸钠、硫代甘油、a-单硫代甘油和硫代硫酸钠;低分子量多肽(例如,10个或更少残基的肽);蛋白质,例如人血清白蛋白、牛血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,例如聚乙烯吡咯烷酮单糖,例如木糖、甘露糖、果糖、葡萄糖;二糖,例如乳糖、麦芽糖、蔗糖和海藻糖;和三糖,例如棉子糖;和多糖,例如葡聚糖。稳定剂的存在量范围可以是每wt IL2蛋白质原0.5至10 wt%。

[0332] 可以添加非离子表面活性剂或去污剂(也称为“润湿剂”)以帮助溶解糖蛋白并且保护糖蛋白免受搅拌引起的聚集,这也允许制剂暴露于剪切表面应力而不会导致蛋白质变性。合适的非离子表面活性剂包括聚山梨醇酯(20、80等)、聚氧沙姆(184、188等)和普朗尼

克多元醇。非离子表面活性剂可以以约0.05 mg/mL至约1.0 mg/mL(例如约0.07 mg/mL至约0.2 mg/mL)的范围存在。

[0333] 其他杂项赋形剂包括填充剂(例如,淀粉)、螯合剂(例如,EDTA)、抗氧化剂(例如,抗坏血酸、蛋氨酸、维生素E)和共溶剂。

[0334] 本公开的IL2蛋白质原可以配制为包含IL2蛋白质原的药物组合物,例如含有一种或多种药学上可接受的赋形剂或载体。为了制备包含本公开的IL2蛋白质原的药物或无菌组合物,IL2蛋白质原制剂可以与一种或多种药学上可接受的赋形剂或载体组合。

[0335] 例如,IL2蛋白质原的制剂可以通过将IL2蛋白质原与生理学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂混合来制备,所述载体、赋形剂或稳定剂的形式例如为冻干粉、浆液、水溶液、洗剂或悬浮液(参见例如,Hardman等人, 2001 , Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y.;Gennaro, 2000, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wlkins, New York, N.Y.;Avis, 等人(编辑),1993, Pharmaceutical Dosage Forms: General Medications, Marcel Dekker, NY;Lieberman, 等人(编辑), 1990, Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY;Lieberman, 等人(编辑), 1990, Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner和Kotkoskie, 2000, Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.)。

[0336] 对于特定受试者的有效量可能有所不同,这取决于诸如所治疗的病症、受试者的整体健康状况、施用的方法途径和剂量以及副作用的严重程度等多种因素(参见例如, Maynard, 等人(1996) A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice, Interpharm Press, Boca Raton, Fla.;Dent (2001) Good Laboratory and Good Clinical Practice, Urch Publ., London, UK)。

[0337] 本公开的组合物还可以使用本领域已知的多种方法中的一种方法或多种方法通过一种或多种施用途径施用。如技术人员将理解的,施用途径和/或模式将根据期望的结果而变化。IL2蛋白质原的选定施用途径包括静脉内、肌内、皮内、腹膜内、皮下、脊髓或其他一般施用途径,例如通过注射或输注。一般施用可以代表除肠内和局部施用之外的施用模式,通常通过注射,并且包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眼眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下腔、椎管内、硬膜外和胸骨内注射和输注。或者,本公开的组合物可以通过非一般途径施用,诸如局部、表皮或粘膜施用途径,例如,鼻内、口服、阴道、直肠、舌下或局部。在一个实施例中,IL2蛋白质原通过输注施用。在另一个实施例中,皮下施用本公开的IL2蛋白质原。

[0338] 6.12.治疗适应症和使用方法

[0339] 本公开提供了本公开的IL2蛋白质原的使用方法和应用。

[0340] 在某些方面中,本公开提供了治疗癌症的方法,包括向有此需要的受试者施用本文所述的IL2蛋白质原或药物组合物。在一些实施例中,包含IL2部分的活化的IL2蛋白是通过由癌症组织表达的一个或多个蛋白酶裂解IL2蛋白质原中的一个或多个蛋白酶可裂解接头而产生的。因此,IL2蛋白质原在癌症组织中被选择性活化。

[0341] 在一些实施例中,本公开提供了用在癌症组织中选择性活化的IL2蛋白治疗癌症

的方法,包括向有此需要的受试者施用本文所述的IL2蛋白质原或药物组合物,其中IL2蛋白质原具有一个或多个蛋白酶可裂解接头,各自包含由IL2蛋白所针对的癌症组织表达的一个或多个蛋白酶的一个或多个底物。因此,包含IL2部分的活化的IL2蛋白是通过癌症组织中的一个或多个蛋白酶裂解IL2蛋白质原中的一个或多个蛋白酶可裂解接头而产生的。

[0342] 本公开还提供了一种局部递送IL2蛋白的方法,包括向受试者施用本文所述的IL2蛋白质原或药物组合物,其中IL2蛋白质原具有一个或多个蛋白酶可裂解接头,每个接头包含一个或多个用于由待向其局部递送IL2蛋白的组织表达的一个或多个蛋白酶。如本文所用,术语“局部递送”不需要局部施用,而是表示IL2蛋白质原的活性组分是指通过在预期位点有活性的蛋白酶在感兴趣的部位活化蛋白质,任选地与使用识别组织表达的靶分子的靶向部分靶向感兴趣的部位。

[0343] 本公开进一步提供了向受试者施用具有降低的全身暴露和/或降低的全身毒性的IL2疗法的方法,包括向受试者施用本文所述的IL2蛋白质原或药物组合物形式的IL2疗法,其中IL2蛋白质原具有一个或多个蛋白酶可裂解接头,每个接头包含由针对其需要和/或预期进行IL2疗法的组织表达的一个或多个蛋白酶的一个或多个底物。

[0344] 因此,上述方法通过在用于IL2治疗的部位优先地活化IL2蛋白质原,允许IL2疗法具有降低的脱靶副作用。

[0345] 在前述方法的一些实施方案中,IL2蛋白质原也是靶向的,并且包含一个或多个靶向部分,该靶向部分识别在预期治疗的部位(例如,通过组织)表达的靶分子。

[0346] 因此,本公开提供了将活化的IL2蛋白靶向递送至预期治疗的部位(例如,癌症组织)的方法,包括向受试者施用如本文所述的IL2蛋白质原或药物组合物,其中IL2包含一个或多个靶向部分,这些靶向部分识别在局部中或由预期治疗的组织(例如,癌症组织)表达的靶分子并且具有一个或多个蛋白酶可裂解接头,每个接头包含一个或多个蛋白酶的底物,该蛋白酶由针对其需要和/或预期进行IL2疗法的组织表达。

[0347] 本公开进一步提供了在靶组织中局部诱导免疫应答的方法,包括向受试者施用本文所述的IL2蛋白质原或药物组合物,该IL2蛋白质原或药物组合物具有能够结合在靶组织中表达的靶分子的一个或多个靶向部分和一个或多个蛋白酶可裂解接头,每个接头包含用于在靶组织中表达的一个或多个蛋白酶的一个或多个底物。然后可以通过靶组织中的一个或多个蛋白酶裂解IL2蛋白质原中的一个或多个蛋白酶可裂解接头来产生包含IL2部分的活化的IL2蛋白。由此产生的活化的IL2蛋白可以诱导针对靶组织中的至少一种细胞类型的免疫应答。

[0348] 在一些实施例中,施用不是对组织局部的。例如,当靶组织是癌症组织时,施用可以是全身的或皮下的。

[0349] 本公开的IL2蛋白质原可用于治疗表达靶分子(在肿瘤细胞上或在肿瘤微环境中,例如,细胞外基质或肿瘤淋巴细胞)的任何增殖性疾病(例如,癌症)。在具体实施例中,癌症是急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓细胞白血病(AML)、肾上腺皮质癌、肛门癌、阑尾癌、星形细胞瘤、基底细胞癌、脑肿瘤、胆管癌、膀胱癌、骨癌、乳腺癌、支气管肿瘤、伯基特淋巴瘤、原发性不明癌、心脏肿瘤、宫颈癌、脊索瘤、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性髓性白血病(CML)、慢性骨髓增生性肿瘤、结肠癌、结直肠癌、颅咽管瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、导管癌、胚胎性肿瘤、子宫内膜癌、室管膜瘤、食道癌、嗅神经母细胞瘤、纤维组织细胞瘤、尤文氏肉瘤、眼

癌、生殖细胞肿瘤、胆囊癌、胃癌、胃肠道类癌瘤、胃肠道间质瘤、妊娠滋养细胞疾病、神经胶质瘤、头颈癌、毛细胞白血病、肝细胞癌、组织细胞增生症、霍奇金淋巴瘤、下咽癌、眼内黑色素瘤、胰岛细胞瘤、卡波西肉瘤、肾癌、朗格汉斯细胞组织细胞增生症、喉癌、白血病、唇和口腔癌、肝癌、小叶原位癌、肺癌、淋巴瘤、巨球蛋白血症、恶性纤维组织细胞瘤、黑色素瘤、默克尔细胞癌、间皮瘤、具有隐匿性原发性的转移性鳞状颈癌、涉及NUT基因的中线道癌、口腔癌、多发性内分泌肿瘤综合征、多发性骨髓瘤、蕈样肉芽肿、骨髓增生异常综合征、骨髓增生异常/骨髓增生性肿瘤、鼻腔及鼻旁窦癌、鼻咽癌、神经母细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小细胞肺癌、口咽癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳头状瘤病、副神经节瘤、甲状旁腺癌、阴茎癌、咽癌、嗜铬细胞瘤、垂体瘤、胸膜肺母细胞瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、前列腺癌、直肠癌、肾细胞癌、肾盂及输尿管癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌样瘤、唾液腺癌、塞扎里综合征、皮肤癌、小细胞肺癌、小肠癌、软组织肉瘤、脊髓肿瘤、胃癌、T细胞淋巴瘤、畸胎瘤、睾丸癌、咽喉癌、胸腺瘤及胸腺癌、甲状腺癌、尿道癌、子宫癌、阴道癌、外阴癌或威尔姆斯肿瘤。

[0350] 下面的表I显示了可以使用靶向特定靶分子的IL2蛋白质原的示例性适应症。

[0351]

表 I
靶分子适应症的实例

靶	示例性适应症
ADRB3	尤文肉瘤
ALK	NSCLC、ALCL、IMT、神经母细胞瘤
B7H3	黑色素瘤、骨肉瘤、白血病、乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、胰腺癌、结直肠癌
BCMA	多发性骨髓瘤、白血病（*例如*，急性淋巴细胞白血病（“ALL”）、急性粒细胞白血病（“AML”）、慢性淋巴细胞白血病（“CLL”）、慢性粒细胞白血病（“CML”）和毛细胞白血病（“HCL”））；淋巴瘤（*例如*，霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤，包括弥漫性大B细胞淋巴瘤（“DLBCL”））
钙粘蛋白 17	胃、胰腺和结直肠腺癌
CAIX	透明细胞肾细胞癌、缺氧实体瘤、头颈鳞癌
CD123	白血病（*例如*，ALL、CLL、AML、CML、HCL）；淋巴瘤（*例如*，霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤，*例如*，DLBCL）；多发性骨髓瘤。在优选实施例中，适应症是 AML。
CD171	神经母细胞瘤、副神经节瘤
CD179a	B 细胞恶性肿瘤
CD19	白血病（*例如*，ALL、CLL、AML、CML、HCL）；淋巴瘤（*例如*，霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤，*例如*，DLBCL）；多发性骨髓瘤。
CD20	白血病（*例如*，ALL、CLL、AML、CML、HCL）；淋巴瘤（*例如*，霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤，*例如*，DLBCL）；多发性骨髓瘤。
CD22	白血病（*例如*，ALL、CLL、AML、CML、HCL）；淋巴瘤（*例如*，霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤，*例如*，DLBCL）；多发性骨髓瘤；肺癌
CD24	卵巢癌、乳腺癌、前列腺癌、膀胱癌、肾癌、非小细胞癌
CD30	间变性大细胞淋巴瘤、胚胎癌、霍奇金淋巴瘤
CD32b	B 细胞恶性肿瘤、胃癌、胰腺癌、食管癌、胶质母细胞瘤、乳腺癌、结直肠癌
CD33	白血病（*例如*，ALL、CLL、AML、CML、HCL）；淋巴瘤（*例如*，霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤，*例如*，DLBCL）；多发性骨髓瘤。在优选实施例中，适应症是 AML。
CD38	白血病（*例如*，ALL、CLL、AML、CML、HCL）；淋巴瘤（*例如*，霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤，*例如*，DLBCL）；多发性骨髓瘤
CD44v6	结肠癌、头颈小细胞癌
CD97	B 细胞恶性肿瘤、胃癌、胰腺癌、食管癌、胶质母细胞瘤、乳腺癌、结直肠癌
CEA (CEACAM5)	结直肠癌、胃癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、甲状腺髓样癌
CLDN6	卵巢癌、乳腺癌、肺癌
CLL-1	白血病（*例如*，ALL、CLL、AML、CML、HCL）；淋巴瘤（*例如*，霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤，*例如*，DLBCL）；多发性骨髓瘤。在优选实施例中，适应症是 AML。
CS1 (SLAMF7)	多发性骨髓瘤
EGFR	肺癌鳞状细胞癌、肛门癌、胶质母细胞瘤、头颈部上皮性肿瘤、结肠癌

[0352]

表 I
靶分子适应症的实例

靶	示例性适应症
EGFRvIII	胶质母细胞瘤
EPCAM	胃肠癌、结直肠癌
EphA2	卡波西肉瘤、胶质母细胞瘤、实体瘤、神经胶质瘤
肝配蛋白 B2	甲状腺癌、乳腺癌、恶性黑色素瘤
ERBB2 (Her2/neu)	乳腺癌、卵巢癌、胃癌、肺腺癌、非小细胞肺癌、子宫癌、子宫浆液性子宫内膜癌、唾液管癌
FAP	胰腺癌、结直肠癌、转移瘤、上皮癌、软组织肉瘤
FCRL5	多发性骨髓瘤
FLT3	白血病（*例如*，ALL、CLL、AML、CML、HCL）；淋巴瘤（*例如*，霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤，*例如*，DLBCL）、多发性骨髓瘤
叶酸受体 α	卵巢癌、乳腺癌、肾癌、肺癌、结直肠癌、脑癌
叶酸受体 β	卵巢癌
岩藻糖基 GM1	AML、骨髓瘤
GD2	恶性黑色素瘤、神经母细胞瘤
GD3	黑色素瘤
GloboH	卵巢癌、胃癌、前列腺癌、肺癌、乳腺癌和胰腺癌
gp100	黑色素瘤
GPNMB	乳腺癌、头颈癌
GPR20	GIST
GPR64	尤文肉瘤、前列腺肉瘤、肾肉瘤和肺肉瘤
GPRC5D	多发性骨髓瘤
HAVCR1	肾癌
HER2	HER-2 (+)胃食管结合部腺癌、HER-2 阳性胃腺癌、HER2 阳性乳腺癌
HER3	结肠癌和胃癌
HMWMAA	黑色素瘤、胶质母细胞瘤、乳腺癌
IGF-I 受体	乳腺癌、前列腺癌、肺癌
IL11Rα	甲状腺乳头状癌、骨肉瘤、结直肠腺癌、淋巴细胞白血病
IL13Rα2	肾细胞癌、前列腺癌、神经胶质瘤、头颈癌、星形细胞瘤
KIT	粒细胞白血病、卡波西肉瘤、红白血病、胃肠道间质瘤
KLRG2	乳腺癌、肺癌和卵巢癌。
LewisY	鳞状细胞肺癌、肺腺癌、卵巢癌和结直肠腺癌
LMP2	前列腺癌、霍奇金淋巴瘤、鼻咽癌
LRP6	乳腺癌
LY6K	乳腺癌、肺癌、卵巢癌和宫颈癌
LYPD8	结直肠癌和胃癌
间皮素	间皮瘤、胰腺癌、卵巢癌、胃癌、肺癌、子宫内膜癌
MUC1	乳腺癌和卵巢癌、肺癌、胃癌、胰腺癌、前列腺癌
NCAM	黑色素瘤、肾母细胞瘤、小细胞肺癌、神经母细胞瘤、骨髓瘤、副神经节瘤、胰腺腺泡细胞癌、骨髓性白血病
NY-BR-1	乳腺癌

表 I
靶分子适应症的实例

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

[0353]

[0354] 其他靶分子和相应的适应症在例如,Hafeez等人, 2020, Molecules 25:4764, doi:10.3390/molecules25204764中公开,特别是在表1中。表1整体通过引用并入本文。

[0355] 7.序列

[0356] 下面的表S中提供了本公开的某些IL2蛋白质原的序列。

[0357]

表 S
IL2 蛋白质原组分序列实例

组分	序列	SEQ ID NO
hIgG1 Fc（UniprotKB P01857-1 的氨基酸 99-330）	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	346
hIgG2 Fc（UniprotKB P01859-1 的氨基酸 99-326）	ERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	347
hIgG3 Fc（UniprotKB P01860-1 的氨基酸 99-377）	ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK	348
hIgG4 Fc（UniprotKB P01861-1 的氨基酸 99-327）	ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	349
hIgG4 Fc	ESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	350
hIgG1 PVA Fc	EPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	351
hIL2	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT	2
hIL2Rα 胞外结构域	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSCLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQVAVAGCVFLLISVLLLSGLTWQRRQRKSRRTI	3

[0358]

hIL2Rα 的氨基酸 22-186	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYML CTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQS PMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGY RALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTG	4
hIL2Rα 的氨基酸 22-240	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYML CTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQS PMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGY RALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQA SPEGRPESETSCLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQ	5
hIgG1 CH1（UniprotKB P01857-1 的氨基酸 1-98）	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKV	352
hIgG2 CH1（UniprotKB P01859-1 的氨基酸 1-98）	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPS NTKVDKTV	353
hIgG3 CH1（UniprotKB P01860-1 的氨基酸 1-98）	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPS NTKVDKRV	354
hIgG4 CH1（UniprotKB P01861-1 的氨基酸 1-98）	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPS NTKVDKRV	355

[0359] 8.编号实施例

[0360] 尽管已经说明和描述了各种具体实施例,但是应当理解,在不脱离本公开的精神和范围的情况下可以做出各种改变。本公开通过下面阐述的编号实施例来举例说明。

[0361] 在随后的编号实施例中,靶向部分优选地结合至哺乳动物靶分子,IL2和IL2Rα部分优选地源自哺乳动物IL2和IL2Rα,Fc结构域优选地源自哺乳动物抗体,并且受试者优选地哺乳动物。更优选地,哺乳动物是人类。

[0362] 1.一种IL2蛋白质原,其包含:

[0363] (a)第一多肽链,其包含:

[0364] (i)第一Fc结构域;

[0365] (ii)任选的第一不可裂解接头(NCL);

[0366] (iii)第一IL2Rα部分;

[0367] (iv)第一蛋白酶可裂解接头(PCL);以及

[0368] (v)第一IL2部分;以及

[0369] (b)第二多肽链,其包含:

[0370] (i)第二Fc结构域,其能够与所述第一Fc结构域缔合以形成Fc区;

[0371] (ii)任选的第二不可裂解接头(NCL);

[0372] (iii)第二IL2Rα部分;

[0373] (iv)第二蛋白酶可裂解接头(PCL);以及

[0374] (v)第二IL2部分。

[0375] 2.根据实施例1所述的IL2蛋白质原,其中所述IL2部分包含与成熟人类IL2具有至少约90%序列同一性的氨基酸序列。

[0376] 3.根据实施例1所述的IL2蛋白质原,其中所述IL2部分包含与成熟人类IL2具有约95%序列同一性的氨基酸序列。

[0377] 4.根据实施例1至3中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述IL2部分包含与成熟人类IL2相比具有N末端丙氨酸缺失的氨基酸序列。

[0378] 5.根据实施例1至4中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述IL2部分包含与野生型IL2相比具有在位置N88处的氨基酸取代的氨基酸序列,任选地其中所述氨基酸取代是N88D。

[0379] 6.根据实施例1至5中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述IL2部分包含与野生型IL2相比具有氨基酸取代C125S、C125A或C125V的氨基酸序列。

[0380] 7.根据实施例1至6中任一项所述的IL2蛋白质原,其中IL2Rα部分包含与人类IL2Rα的IL2结合部分具有至少约90%序列同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

[0381] 8.根据实施例1至6中任一项所述的IL2蛋白质原,其中IL2Rα部分包含与人类IL2Rα的IL2结合部分具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

[0382] 9.根据实施例1至6中任一项所述的IL2蛋白质原,其中IL2Rα部分包含与人类IL2Rα的IL2结合部分具有至少约97%序列同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

[0383] 10.根据实施例1至6中任一项所述的IL2蛋白质原,其中IL2Rα部分包含与人类IL2Rα的IL2结合部分具有至少约98%序列同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

[0384] 11.根据实施例1至6中任一项所述的IL2蛋白质原,其中IL2Rα部分包含与人类IL2Rα的IL2结合部分具有至少约99%序列同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

[0385] 12.根据实施例1至6中任一项所述的IL2蛋白质原,其中IL2Rα部分包含与人类IL2Rα的IL2结合部分具有100%序列同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

[0386] 13.根据实施例7至12中任一项所述的IL2蛋白质原,其中IL2Rα部分包含与(a)IL2Rα的氨基酸22-186、(b) IL2Rα的氨基酸22-240和/或(c)人类IL2Rα的氨基酸22-272具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

[0387] 14.根据实施例7至12中任一项所述的IL2蛋白质原,其中IL2Rα部分包含与(a)IL2Rα的氨基酸22-186、(b) IL2Rα的氨基酸22-240和/或(c)人类IL2Rα的氨基酸22-272具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

[0388] 15.根据实施例7至12中任一项所述的IL2蛋白质原,其中IL2Rα部分包含与(a)IL2Rα的氨基酸22-186、(b) IL2Rα的氨基酸22-240和/或(c)人类IL2Rα的氨基酸22-272具有至少96%序列同一性的氨基酸序列。

[0389] 16.根据实施例7至12中任一项所述的IL2蛋白质原,其中IL2Rα部分包含与(a)IL2Rα的氨基酸22-186、(b) IL2Rα的氨基酸22-240和/或(c)人类IL2Rα的氨基酸22-272具有至少97%序列同一性的氨基酸序列。

[0390] 17.根据实施例7至12中任一项所述的IL2蛋白质原,其中IL2Rα部分包含与(a)IL2Rα的氨基酸22-186、(b) IL2Rα的氨基酸22-240和/或(c)人类IL2Rα的氨基酸22-272具有至少98%序列同一性的氨基酸序列。

[0391] 18.根据实施例7至12中任一项所述的IL2蛋白质原,其中IL2Rα部分包含与(a)IL2Rα的氨基酸22-186、(b) IL2Rα的氨基酸22-240和/或(c)人类IL2Rα的氨基酸22-272具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0392] 19.根据实施例1至18中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一PCL和/或第二PCL包含由表A中列出的任何蛋白酶裂解可裂解的底物序列。

[0393] 20.根据实施例1至19中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一PCL和/或第二PCL包含选自表B中列出的底物序列的一个或多个底物序列。

[0394] 21.根据实施例1至20中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一PCL和/或第二PCL包含选自表C中列出的亚状态序列的一个或多个间隔子序列。

[0395] 22.根据实施例1至21中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一PCL和/或第二PCL包含表D中列出的任一PCL序列的氨基酸序列或其具有至多5个氨基酸取代的变体,例如,其具有1个氨基酸取代、2个氨基酸取代、3个氨基酸取代、4个氨基酸取代或5个氨基酸取代的变体。

[0396] 23.根据实施例1至22中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一PCL和/或所述第二PCL包含氨基酸序列GGGISSGLLSGRSDNHGGGISSGLLSGRSDNHGGS (SEQ ID NO:185)或由所述氨基酸序列组成。

[0397] 24.根据实施例1至22中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一PCL和/或所述第二PCL包含氨基酸序列GGGISSGLLSGRSDNHGGGISSGLLSGRSDNHGGS GGGISSGLLSGRSDNHGGGISSGLLSGRSDNHGGS (SEQ ID NO: 186)或由所述氨基酸序列组成。

[0398] 25.根据实施例1至22中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一PCL和/或所述第二PCL包含氨基酸序列GGSGGSIPVSLRSGGGISSGLLSGRSDNHGGSGGS (SEQ ID NO: 187)或由所述氨基酸序列组成。

[0399] 26.根据实施例1至22中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一PCL和/或所述第二PCL包含氨基酸序列GGSGGSVPLSLYSGGGISSGLLSGRSDNHGGSGGS (SEQ ID NO: 188)或由所述氨基酸序列组成。

[0400] 27.根据实施例1至22中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一PCL和/或所述第二PCL包含氨基酸序列GGSHPVGLLARGGGHPVGLLARGGGHPVGLLARGS (SEQ ID NO: 189)或由所述氨基酸序列组成。

[0401] 28.根据实施例1至22中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一PCL和/或所述第二PCL包含氨基酸序列GGSHPVGLLARGGGHPVGLLARGGSGRSAGGSGRSA (SEQ ID NO: 190)或由所述氨基酸序列组成。

[0402] 29.根据实施例1至28中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一NCL和/或第二NCL包含表E中列出的任一NCL序列的氨基酸序列或其具有至多5个氨基酸取代的变体,例如,其具有1个氨基酸取代、2个氨基酸取代、3个氨基酸取代、4个氨基酸取代或5个氨基酸取代的变体。

[0403] 30.根据实施例1至28中任一项所述的IL2蛋白质原,其中第一不可裂解接头和第二不可裂解接头在长度上范围为5至25个氨基酸。

[0404] 31.根据实施例1至28中任一项所述的IL2蛋白质原,其中第一不可裂解接头和第二不可裂解接头在长度上范围为7至20个氨基酸。

[0405] 32.根据实施例1至28中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一不可裂解接头和第二不可裂解接头在长度上为至少5个氨基酸。

[0406] 33.根据实施例1至28中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一不可裂解接头

和第二不可裂解接头在长度上为至少7个氨基酸。

[0407] 34.根据实施例1至34中任一项所述的IL2蛋白质原,其中第一蛋白酶不可裂解接头和第二蛋白酶不可裂解接头在长度上范围为20个氨基酸至80个氨基酸。

[0408] 35.根据实施例1至34中任一项所述的IL2蛋白质原,其中第一蛋白酶不可裂解接头和第二蛋白酶不可裂解接头在长度上范围为20个氨基酸至60个氨基酸。

[0409] 36.根据实施例1至35中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一Fc结构域和/或所述第二Fc结构域包含铰链结构域。

[0410] 37.根据实施例1至30中任一项所述的IL2蛋白质原,其进一步包含结合至一个或多个靶分子的一个或多个靶向部分。

[0411] 38.根据实施例37所述的IL2蛋白质原,其包含第一靶向部分和/或第二靶向部分。

[0412] 39.根据实施例38所述的IL2蛋白质原,其在第一Fc结构域的N末端包含第一靶向部分或其组分(例如,Fab的VH)和/或在第二Fc结构域的N末端包含第二靶向部分或其组分(例如,Fab的VH)。

[0413] 40.根据实施例37或实施例39所述的IL2蛋白质原,其中所述第一靶向部分和/或所述第二靶向部分是Fab。

[0414] 41.根据实施例37或实施例39所述的IL2蛋白质原,其中所述第一靶向部分和/或所述第二靶向部分是scFv。

[0415] 42.根据实施例37至41中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一靶向部分和/或第二靶向部分能够结合至细胞外基质(“ECM”)抗原、肿瘤反应性淋巴细胞抗原、肿瘤的细胞表面分子或病毒淋巴细胞或者检查点抑制剂或肿瘤相关抗原(“TAA”)。

[0416] 43.根据实施例37至42中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一靶向部分和/或第二靶向部分能够结合至第6.7节中鉴定的任何靶分子。

[0417] 44.根据实施方案37至43中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一靶向部分和/或第二靶向部分(a)包含表F中列出的抗体的(i) CDR或(ii) VH和VL序列或(b)与表F中列出的抗体竞争以结合至所述靶分子。

[0418] 45.根据实施例37至43中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一靶向部分和/或第二靶向部分能够结合至ECM抗原,所述ECM抗原任选地选自多配体聚糖、乙酰肝素酶、整联蛋白、骨桥蛋白、连接蛋白、钙粘蛋白、层粘连蛋白、层粘连蛋白型EGF、凝集素、纤连蛋白、缺口蛋白、粘连蛋白(例如,粘连蛋白-4)、腱生蛋白、胶原蛋白(例如,X型胶原蛋白)和基质蛋白。

[0419] 46.根据实施例45所述的IL2蛋白质原,其中所述第一靶向部分和/或第二靶向部分能够结合至连蛋白,例如,粘连蛋白4。

[0420] 47.根据实施例45所述的IL2蛋白质原,其中所述第一靶向部分和/或第二靶向部分能够结合至胶原蛋白,例如,胶原蛋白X。

[0421] 48.根据实施例37至43中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一靶向部分和/或第二靶向部分能够结合至肿瘤或病毒淋巴细胞的细胞表面分子。

[0422] 49.根据实施例48所述的IL2蛋白质原,其中所述抗原是T细胞共刺激蛋白。

[0423] 50.根据实施例49所述的IL2蛋白质原,其中所述T细胞共刺激蛋白是CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、

LIGHT、NKG2C或B7-H3。

[0424] 51.根据实施例50所述的IL2蛋白质原,其中所述T细胞共刺激蛋白是B7-H3。

[0425] 52.根据实施例37至43中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一靶向部分和/或第二靶向部分能够结合至检查点抑制剂。

[0426] 53.根据实施例52所述的IL2蛋白质原,其中所述检查点抑制剂是CTLA-4、PD1、PDL1、PDL2、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、TIM3、GAL9、LAG3、VISTA、KIR、2B4、CD160、CGEN-15049、CHK1或CHK2。

[0427] 54.根据实施例53所述的IL2蛋白质原,其中所述检查点抑制剂是PDL1。

[0428] 55.根据实施例37至43中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一靶向部分和/或第二靶向部分能够结合至肿瘤相关抗原(“TAA”)。

[0429] 56.根据实施例55所述的IL2蛋白质原,其中所述第一靶向部分和/或第二靶向部分能够结合至AFP、ALK、BAGE蛋白、BIRC5(生存素)、BIRC7、β-连环蛋白、brc-abl、BRCA1、BORIS、CA9、碳酸酐酶IX、caspase-8、CALR、CEACAM5(也称为癌胚抗原或CEA)、CCR5、CD19、CD20 (MS4A1)、CD22、CD30、CD40、CDK4、CEA、CTLA4、细胞周期蛋白-B1、CYP1B1、EGFR、EGFRvIII、ErbB2/Her2、ErbB3、ErbB4、ETV6-AML、EpCAM、EphA2、Fra-1、FOLR1、GAGE蛋白(例如,GAGE-1或-2)、GD2、GD3、GloboH、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3、GM3、gp100、Her2、HLA/B-raf、HLA/k-ras、HLA/MAGE-A3、hTERT、LMP2、MAGE蛋白(例如,MAGE-1、-2、-3、-4、-6和-12)、MART-1、间皮素、ML-IAP、Muc1、Muc2、Muc3、Muc4、Muc5、Muc16 (CA-125)、MUM1、NA17、NY-BR1、NY-BR62、NY-BR85、NY-ESO1、OX40、p15、p53、PAP、PAX3、PAX5、PCTA-1、PLAC1、PRLR、PRAME、PSMA(FOLH1)、RAGE蛋白、Ras、RGS5、Rho、SART-1、SART-3、STEAP1、STEAP2、TAG-72、TGF-β、TMPRSS2、Thompson-nouvelle抗原(Tn)、TRP-1、TRP-2、酪氨酸酶和尿斑蛋白-3。

[0430] 57.根据实施例56所述的IL2蛋白质原,其中所述TAA是EGFR。

[0431] 58.根据实施例56所述的IL2蛋白质原,其中所述TAA是HER2。

[0432] 59.根据实施例56所述的IL2蛋白质原,其中所述TAA是EPCAM。

[0433] 60.根据实施例56所述的IL2蛋白质原,其中所述TAA是CEACAM5。

[0434] 61.根据实施例56所述的IL2蛋白质原,其中所述TAA是CD20。

[0435] 62.根据实施例1至61中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述Fc区是同二聚体。

[0436] 63.根据实施例1至61中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述Fc区是异二聚体。

[0437] 64.根据实施例1至63中任一项所述的IL2蛋白质原,其中:

[0438] (a)所述第一多肽链在N末端至C末端方向包含:

[0439] (i)所述第一Fc结构域;

[0440] (ii)任选地,所述第一不可裂解接头,

[0441] (iii)所述第一IL2Rα部分;

[0442] (iv)所述第一蛋白酶可裂解接头;以及

[0443] (v)所述第一IL2部分;以及

[0444] (b)所述第二多肽链在N末端至C末端方向包含:

[0445] (i)所述第二Fc结构域;

[0446] (ii)任选地,所述第二不可裂解接头,

[0447] (iii)所述第二IL2Rα部分;

[0448] (iv)所述第二蛋白酶可裂解接头;以及

[0449] (v)所述第二IL2部分;以及

[0450] 65.IL2蛋白质原,其任选地是根据实施例1至64中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述IL2蛋白质原包含:

[0451] (a)第一Fc结构域和第二Fc结构域,所述第一Fc结构域和第二Fc结构域能够缔合以形成Fc区;

[0452] (b)两个IL2Rα部分,其位于Fc结构域的C末端,所述两个IL2Rα部分任选地前面有接头,任选地不可裂解接头;

[0453] (c)两个蛋白酶可裂解接头,其位于IL2Rα部分的C末端;以及

[0454] (d)两个IL2部分,其位于蛋白酶可裂解接头的C末端

[0455] 66.根据实施例1至64中任一项所述的IL2蛋白质原,其中:

[0456] (a)所述第一多肽包含:所述第一Fc结构域,任选地接着是所述第一不可裂解接头,接着是所述第一IL2Rα部分,接着是所述第一蛋白酶可裂解接头,接着是所述第一IL2部分;并且

[0457] (b)第二多肽包含:所述第二Fc结构域,任选地接着是所述第二不可裂解接头,接着是所述第二IL2Rα部分,接着是所述第二蛋白酶可裂解接头,接着是所述第二IL2部分。

[0458] 67.根据实施例1至64中任一项所述的IL2蛋白质原,其具有图1A中描绘的构型。

[0459] 68.IL2蛋白质原,其任选地是根据实施例1至64中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述IL2蛋白质原包含:

[0460] (a)第一多肽链,其按N末端至C末端的顺序包含:

[0461] (i)第一氨基酸序列,其与SEQ ID NO: 346、347、348、349、350和351中的任一者的所述氨基酸序列具有至少约95%序列同一性;

[0462] (ii)不可裂解接头/不可裂解工具,其用于将所述第一氨基酸序列连接至第三氨基酸序列,任选地其中所述接头/工具包含包含表E中列出的氨基酸序列的第二氨基酸序列或由所述第二氨基酸序列组成;

[0463] (iii)所述第三氨基酸序列,其与SEQ ID NO: 3、4和5中的任一者的所述氨基酸序列具有至少约95%序列同一性;

[0464] (iv)第四氨基酸序列,其包含表B或表D中列出的一个或多个氨基酸序列;以及

[0465] (v)第五氨基酸序列,其与SEQ ID NO: 2的所述氨基酸序列具有至少约95%序列同一性;以及

[0466] (b)第二多肽链,其按N末端至C末端的顺序包含:

[0467] (i)第六氨基酸序列,其与SEQ ID NO: 346、347、348、349、350和351中的任一者具有至少约95%序列同一性;

[0468] (ii)不可裂解接头/不可裂解工具,其用于将所述第六氨基酸序列连接至第八氨基酸序列,任选地其中所述接头/工具包含包含表E中列出的氨基酸序列的第七氨基酸序列或由所述第七氨基酸序列组成;

[0469] (iii)所述第八氨基酸序列,其与SEQ ID NO: 3、4和5中的任一者具有至少约95%序列同一性;

[0470] (iv)第九氨基酸序列,其包含表B或表D中列出的一个或多个氨基酸序列;以及

[0471] (v)第十氨基酸序列,其与SEQ ID NO: 2的所述氨基酸序列具有至少约95%序列同一性。

[0472] 69.根据实施例68所述的IL2蛋白质原,其中所述第一多肽在所述第一氨基酸序列的N末端包含第十一氨基酸序列,所述第十一氨基酸序列与SEQ ID NO: 352、353、354和355中的任一者具有至少约95%序列同一性。

[0473] 70.根据实施例69所述的IL2蛋白质原,其中所述第十一氨基酸序列是SEQ ID NO: 352的氨基酸序列。

[0474] 71.根据实施例69所述的IL2蛋白质原,其中所述第十一氨基酸序列是SEQ ID NO: 353的氨基酸序列。

[0475] 72.根据实施例69所述的IL2蛋白质原,其中所述第十一氨基酸序列是SEQ ID NO: 354的氨基酸序列。

[0476] 73.根据实施例69所述的IL2蛋白质原,其中所述第十一氨基酸序列是SEQ ID NO: 355的氨基酸序列。

[0477] 74.根据实施例68至73中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第二多肽在所述第一氨基酸序列的N末端包含第十二氨基酸序列,所述第十二氨基酸序列与SEQ ID NO: 352、353、354和355中的任一者具有至少约95%序列同一性。

[0478] 75.根据实施例74所述的IL2蛋白质原,其中所述第十二氨基酸序列是SEQ ID NO: 352的氨基酸序列。

[0479] 76.根据实施例74所述的IL2蛋白质原,其中所述第十二氨基酸序列是SEQ ID NO: 353的氨基酸序列。

[0480] 77.根据实施例74所述的IL2蛋白质原,其中所述第十二氨基酸序列是SEQ ID NO: 354的氨基酸序列。

[0481] 78.根据实施例74所述的IL2蛋白质原,其中所述第十二氨基酸序列是SEQ ID NO: 355的氨基酸序列。

[0482] 79.根据实施例68至78中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一氨基酸序列与SEQ ID NO: 346、347、348、349、350和351中的任一者具有至少约98%序列同一性。

[0483] 80.根据实施例68至78中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一氨基酸序列是SEQ ID NO: 346、347、348、349、350和351中的任一者的氨基酸序列。

[0484] 81.根据实施例80所述的IL2蛋白质原,其中所述第一氨基酸序列是SEQ ID NO: 350的氨基酸序列。

[0485] 82.根据实施例80所述的IL2蛋白质原,其中所述第一氨基酸序列是SEQ ID NO: 351的氨基酸序列。

[0486] 83.根据实施例68至82中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一氨基酸序列在长度上为350个或更少个氨基酸。

[0487] 84.根据实施例68至82中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一氨基酸序列在长度上为330个或更少个氨基酸。

[0488] 85.根据实施例68至84中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第六氨基酸序列与SEQ ID NO: 346、347、348、349、350和351中的任一者具有至少约98%序列同一性。

[0489] 86.根据实施例68至84中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第六氨基酸序列是

SEQ ID NO: 346、347、348、349、350和351中的任一者的氨基酸序列。

[0490] 87.根据实施例86所述的IL2蛋白质原,其中所述第六氨基酸序列是SEQ ID NO: 350的氨基酸序列。

[0491] 88.根据实施例86所述的IL2蛋白质原,其中所述第六氨基酸序列是SEQ ID NO: 351的氨基酸序列。

[0492] 89.根据实施例68至88中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第六氨基酸序列在长度上为350个或更少个氨基酸。

[0493] 90.根据实施例68至88中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第六氨基酸序列在长度上为330个或更少个氨基酸。

[0494] 91.根据实施例68至90中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第二氨基酸序列是表E中列出的氨基酸序列。

[0495] 92.根据实施例91所述的IL2蛋白质原,其中所述第二氨基酸序列是氨基酸序列$(GGGGS)_n$,其中n是1、2、3、4或5。

[0496] 93.根据实施例68至92中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第二氨基酸序列在长度上为25个或更少个氨基酸。

[0497] 94.根据实施例68至92中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第二氨基酸序列在长度上为15个或更少个氨基酸。

[0498] 95.根据实施例68至92中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第二氨基酸序列在长度上为6个或更少个氨基酸。

[0499] 96.根据实施例68至95中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第七氨基酸序列是表E中列出的氨基酸序列。

[0500] 97.根据实施例96所述的IL2蛋白质原,其中所述第七氨基酸序列是氨基酸序列$(GGGGS)_n$,其中n是1、2、3、4或5。

[0501] 98.根据实施例68至97中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第七氨基酸序列在长度上为25个或更少个氨基酸。

[0502] 99.根据实施例68至97中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第七氨基酸序列在长度上为15个或更少个氨基酸。

[0503] 100.根据实施例68至97中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第七氨基酸序列在长度上为6个或更少个氨基酸。

[0504] 101.根据实施例68至100中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第三氨基酸序列与SEQ ID NO: 3、4和5中的任一者具有至少约98%序列同一性。

[0505] 102.根据实施例68至100中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第三氨基酸序列是SEQ ID NO: 3、4和5中的任一者的氨基酸序列。

[0506] 103.根据实施例102所述的IL2蛋白质原,其中所述第三氨基酸序列是SEQ ID NO: 3的氨基酸序列。

[0507] 104.根据实施例102所述的IL2蛋白质原,其中所述第三氨基酸序列是SEQ ID NO: 4的氨基酸序列。

[0508] 105.根据实施例102所述的IL2蛋白质原,其中所述第三氨基酸序列是SEQ ID NO: 5的氨基酸序列。

[0509] 106.根据实施例68至105中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第三氨基酸序列在长度上为255个或更少个氨基酸。

[0510] 107.根据实施例68至105中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第三氨基酸序列在长度上为225个或更少个氨基酸。

[0511] 108.根据实施例68至105中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第三氨基酸序列在长度上为170个或更少个氨基酸。

[0512] 109.根据实施例68至108中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第八氨基酸序列与SEQ ID NO: 3、4和5中的任一者具有至少约98%序列同一性。

[0513] 110.根据实施例68至109中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第八氨基酸序列是SEQ ID NO: 3、4和5中的任一者的氨基酸序列。

[0514] 111.根据实施例110所述的IL2蛋白质原,其中所述第八氨基酸序列是SEQ ID NO: 3的氨基酸序列。

[0515] 112.根据实施例110所述的IL2蛋白质原,其中所述第八氨基酸序列是SEQ ID NO: 4的氨基酸序列。

[0516] 113.根据实施例110所述的IL2蛋白质原,其中所述第八氨基酸序列是SEQ ID NO: 5的氨基酸序列。

[0517] 114.根据实施例68至113中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第八氨基酸序列在长度上为255个或更少个氨基酸。

[0518] 115.根据实施例68至113中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第八氨基酸序列在长度上为225个或更少个氨基酸。

[0519] 116.根据实施例68至113中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第八氨基酸序列在长度上为170个或更少个氨基酸。

[0520] 117.根据实施例68至116中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第四氨基酸序列包含表B中列出的一个或多个氨基酸序列。

[0521] 118.根据实施例117所述的IL2蛋白质原,其中所述第四氨基酸序列包含氨基酸序列HPVGLLAR (SEQ ID NO: 261)。

[0522] 119.根据实施例117所述的IL2蛋白质原,其中所述第四氨基酸序列包含氨基酸序列VPLSLYSG (SEQ ID NO: 149)。

[0523] 120.根据实施例117所述的IL2蛋白质原,其中所述第四氨基酸序列包含氨基酸序列ISSGLLS (SEQ ID NO: 64)。

[0524] 121.根据实施例117所述的IL2蛋白质原,其中所述第四氨基酸序列包含氨基酸序列PLGLWSQ (SEQ ID NO: 105)。

[0525] 122.根据实施例68至116中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第四氨基酸序列是表D中列出的氨基酸序列。

[0526] 123.根据实施例122所述的IL2蛋白质原,其中所述第四氨基酸序列是氨基酸序列GGGISSGLLSGRSDNHGGGISSGLLSGRSDNHGGS (SEQ ID NO: 185)。

[0527] 124.根据实施例122所述的IL2蛋白质原,其中所述第四氨基酸序列是氨基酸序列GGSHPVGLLARGGGHPVGLLARGGGHPVGLLARGS (SEQ ID NO: 189)。

[0528] 125.根据实施例122所述的IL2蛋白质原,其中所述第四氨基酸序列是氨基酸序列

GGGHPVGLLARGGGS (SEQ ID NO: 339)。

[0529] 126.根据实施例122所述的IL2蛋白质原,其中所述第四氨基酸序列是氨基酸序列GGGISSGLLSGRSDNHGGGS (SEQ ID NO: 338)。

[0530] 127.根据实施例122所述的IL2蛋白质原,其中所述第四氨基酸序列是氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSVPLSLYSGGGSGGSGGSGS (SEQ ID NO: 207)。

[0531] 128.根据实施例68至127中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第九氨基酸序列包含表B中列出的一个或多个氨基酸序列。

[0532] 129.根据实施例128所述的IL2蛋白质原,其中所述第九氨基酸序列包含氨基酸序列HPVGLLAR (SEQ ID NO: 261)。

[0533] 130.根据实施例128所述的IL2蛋白质原,其中所述第九氨基酸序列包含氨基酸序列VPLSLYSG (SEQ ID NO: 149)。

[0534] 131.根据实施例128所述的IL2蛋白质原,其中所述第九氨基酸序列包含氨基酸序列ISSGLLS (SEQ ID NO: 64)。

[0535] 132.根据实施例128所述的IL2蛋白质原,其中所述第九氨基酸序列包含氨基酸序列PLGLWSQ (SEQ ID NO: 105)。

[0536] 133.根据实施例68至127中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第九氨基酸序列是表D中列出的氨基酸序列。

[0537] 134.根据实施例133所述的IL2蛋白质原,其中所述第九氨基酸序列是氨基酸序列GGGISSGLLSGRSDNHGGGISSGLLSGRSDNHGGS (SEQ ID NO: 185)。

[0538] 135.根据实施例133所述的IL2蛋白质原,其中所述第九氨基酸序列是氨基酸序列GGSHPVGLLARGGGHPVGLLARGGGHPVGLLARGS (SEQ ID NO: 189)。

[0539] 136.根据实施例133所述的IL2蛋白质原,其中所述第九氨基酸序列是氨基酸序列GGGHPVGLLARGGGS (SEQ ID NO: 339)。

[0540] 137.根据实施例133所述的IL2蛋白质原,其中所述第九氨基酸序列是氨基酸序列GGGISSGLLSGRSDNHGGGS (SEQ ID NO: 338)。

[0541] 138.根据实施例133所述的IL2蛋白质原,其中所述第九氨基酸序列是氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSVPLSLYSGGGSGGSGGSGS (SEQ ID NO: 207)。

[0542] 139.根据实施例68至138中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第五氨基酸序列与SEQ ID NO:2具有至少约98%序列同一性。

[0543] 140.根据实施例68至138中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第五氨基酸序列是SEQ ID NO:2的氨基酸序列。

[0544] 141.根据实施例68至140中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第五氨基酸序列在长度上为150个或更少个氨基酸。

[0545] 142.根据实施例68至140中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第五氨基酸序列在长度上为135个或更少个氨基酸。

[0546] 143.根据实施例68至142中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第十氨基酸序列与SEQ ID NO:2具有至少约98%序列同一性。

[0547] 144.根据实施例68至142中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第十氨基酸序列是SEQ ID NO:2的氨基酸序列。

[0548] 145.根据实施例68至144中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第十氨基酸序列在长度上为150个或更少个氨基酸。

[0549] 146.根据实施例68至144中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第十氨基酸序列在长度上为135个或更少个氨基酸。

[0550] 147.根据实施例68至146中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一多肽链在所述第一氨基酸序列的C末端缺少附加序列。

[0551] 148.根据实施例68至147中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一多肽链在所述第一氨基酸序列与第二氨基酸序列之间缺少附加序列。

[0552] 149.根据实施例68至148中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一多肽链在所述第二氨基酸序列与第三氨基酸序列之间缺少附加序列。

[0553] 150.根据实施例68至149中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一多肽链在所述第三氨基酸序列与所述第四氨基酸序列之间缺少附加序列。

[0554] 151.根据实施例68至150中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一多肽链在所述第四氨基酸序列与所述第五氨基酸序列之间缺少附加序列。

[0555] 152.根据实施例68至151中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第二多肽链在所述第六氨基酸序列的C末端缺少附加序列。

[0556] 153.根据实施例68至152中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第二多肽链在所述第六氨基酸序列与所述第七氨基酸序列之间缺少附加序列。

[0557] 154.根据实施例68至153中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第二多肽链在所述第七氨基酸序列与所述第八氨基酸序列之间缺少附加序列。

[0558] 155.根据实施例68至154中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第二多肽链在所述第八氨基酸序列与所述第九氨基酸序列之间缺少附加序列。

[0559] 156.根据实施例68至155中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第二多肽链在所述第九氨基酸序列与所述第十氨基酸序列之间缺少附加序列。

[0560] 157.根据实施例68至156中任一项所述的IL2蛋白质原,其中所述第一多肽和所述第二多肽是相同的。

[0561] 158.一种核酸或多种核酸,其编码根据实施例1至157中任一项所述的IL2蛋白质原。

[0562] 159.一种宿主细胞,其经工程化以表达根据实施例1至157中任一项所述的IL2蛋白质原或根据实施例64所述的核酸。

[0563] 160.一种产生根据实施例1至157中任一项所述的IL2蛋白质原的方法,所述方法包括培养根据实施例159所述的所述宿主细胞并且回收由此表达的所述IL2蛋白质原。

[0564] 161.一种药物组合物,其包含根据实施例1至157中任一项所述的IL2蛋白质原和赋形剂。

[0565] 162. 一种治疗癌症的方法,所述方法包括向有此需要的受试者施用根据实施例1至157中任一项所述的IL2蛋白质原或根据实施例161所述的药物组合物。

[0566] 163.根据实施例162所述的方法,其中所述IL2蛋白质原包含能够结合至靶分子的至少一个靶向部分并且其中所述癌症与所述靶分子的表达相关,例如,表I中列出的TAA和相关癌症。

[0567] 164.根据实施例 163所述的方法,其中包含IL2部分的活化的IL2蛋白是通过由所述癌症组织表达的一个或多个蛋白酶裂解所述IL2蛋白质原中的一个或多种蛋白酶可裂解接头而产生的。

[0568] 165.根据实施例 164所述的方法,其中所述IL2蛋白在所述癌症组织中选择性活化。

[0569] 166.一种IL2蛋白的局部递送的方法,包括向受试者施用根据实施例1至157中任一项所述的IL2蛋白质原(或包含IL2蛋白质原和赋形剂的药物组合物),所述IL2蛋白质原具有一个或多个蛋白酶可裂解接头,每个蛋白酶可裂解接头包含用于由待向其局部递送所述IL2蛋白的组织表达的一个或多个蛋白酶的一个或多个底物。

[0570] 167.根据实施例166所述的方法,其中所述IL2蛋白质原包含识别由所述组织表达的靶分子的一种或多种靶向部分。

[0571] 168.根据实施例167所述的方法,其中所述IL2蛋白质原包含两个靶向部分,每个靶向部分识别由所述组织表达的靶分子。

[0572] 169.根据实施例167或实施例 168所述的方法,其中所述组织是癌症组织。

[0573] 170.根据实施例 169所述的方法,其中所述一个或多个靶向部分能够结合至细胞外基质(“ECM”)抗原、肿瘤反应性淋巴细胞抗原、肿瘤或病毒淋巴细胞的细胞表面分子、T细胞抗原(“TCA”)、检查点抑制剂或肿瘤相关抗原(“TAA”)。

[0574] 171.根据实施例 166至 170中任一项所述的方法,其中包含IL2部分的活化的IL2蛋白是通过所述组织中的一个或多个蛋白酶裂解所述IL2蛋白质原中的一个或多个蛋白酶可裂解接头而产生的。

[0575] 172.一种用在癌症组织中选择性活化的IL2蛋白治疗癌症的方法,其包括向有此需要的受试者施用根据实施例1至157中任一项所述的IL2蛋白质原(或包含IL2蛋白质原和赋形剂的药物组合物),所述IL2蛋白质原具有一个或多个蛋白酶可裂解接头,每个蛋白酶可裂解接头包含由IL2蛋白所针对的癌症组织表达的一个或多个蛋白酶的一个或多个底物。

[0576] 173.根据实施例172所述的方法,其中所述IL2蛋白质原包含识别由所述组织表达的靶分子的一种或多种靶向部分。

[0577] 174.根据实施例 173所述的方法,其中所述IL2蛋白质原包含两个靶向部分,每个靶向部分识别由所述癌症组织表达的靶分子。

[0578] 175.根据实施例 173或实施例174所述的方法,其中所述一个或多个靶向部分能够结合至细胞外基质(“ECM”)抗原、肿瘤反应性淋巴细胞抗原、肿瘤或病毒淋巴细胞的细胞表面分子、T细胞抗原(“TCA”)、检查点抑制剂或肿瘤相关抗原(“TAA”)。

[0579] 176.根据实施例 172至 175中任一项所述的方法,其中包含IL2部分的活化的IL2蛋白是通过所述癌症组织中的一个或多个蛋白酶裂解所述IL2蛋白质原中的一个或多个蛋白酶可裂解接头而产生的。

[0580] 177.一种向受试者施用具有降低的全身暴露和/或降低的全身毒性的IL2疗法的方法,其包括向受试者施用根据实施例1至157中任一项所述的IL2蛋白质原形式的IL2疗法(或包含IL2蛋白质原和赋形剂的药物组合物),所述IL2蛋白质原具有一个或多个蛋白酶可裂解接头,每个蛋白酶可裂解接头包含针对其需要和/或预期进行IL2疗法的组织表达的一

个或多个蛋白酶的一个或多个底物。

[0581] 178.根据实施例177所述的方法,其中所述IL2蛋白质原包含识别由所述组织表达的靶分子的一种或多种靶向部分。

[0582] 179.根据实施例 178所述的方法,其中所述IL2蛋白质原包含两个靶向部分,每个靶向部分识别由所述组织表达的靶分子。

[0583] 180.根据实施例177至 179中任一项所述的方法,其中所述组织是癌症组织。

[0584] 181.根据实施例180所述的方法,其中所述一个或多个靶向部分能够结合至细胞外基质(“ECM”)抗原、肿瘤反应性淋巴细胞抗原、肿瘤或病毒淋巴细胞的细胞表面分子、T细胞抗原(“TCA”)、检查点抑制剂或肿瘤相关抗原(“TAA”)。

[0585] 182.根据实施例177至181中任一项所述的方法,其中包含IL2部分的活化的IL2蛋白是通过所述组织中的一个或多个蛋白酶裂解所述IL2蛋白质原中的一个或多个蛋白酶可裂解接头而产生的。

[0586] 183.一种用在癌症组织中选择性活化的IL2蛋白治疗癌症的方法,其包括向有此需要的受试者施用根据实施例1至157中任一项所述的IL2蛋白质原(或包含IL2蛋白质原和赋形剂的药物组合物),所述IL2蛋白质原具有一个或多个蛋白酶可裂解接头,每个蛋白酶可裂解接头包含由所述癌症组织表达的一个或多个蛋白酶的一个或多个底物。

[0587] 184.根据实施例183 所述的方法,其中所述IL2蛋白质原包含识别由所述组织表达的靶分子的一种或多种靶向部分。

[0588] 185.根据实施例 184所述的方法,其中所述IL2蛋白质原包含两个靶向部分,每个靶向部分识别由所述癌症组织表达的靶分子。

[0589] 186.根据实施例184或实施例185所述的方法,其中所述一个或多个靶向部分能够结合至细胞外基质(“ECM”)抗原、肿瘤反应性淋巴细胞抗原、肿瘤或病毒淋巴细胞的细胞表面分子、T细胞抗原(“TCA”)、检查点抑制剂或肿瘤相关抗原(“TAA”)。

[0590] 187.根据实施例 183至 186中任一项所述的方法,其中包含IL2部分的活化的IL2蛋白是通过所述癌症组织中的一个或多个蛋白酶裂解所述IL2蛋白质原中的一个或多个蛋白酶可裂解接头而产生的。

[0591] 188.一种将活化的IL2蛋白靶向递送至癌症组织的方法,其包括向受试者施用根据实施例1至157中任一项所述的IL2蛋白质原(或包含IL2蛋白质原和赋形剂的药物组合物),其中所述IL2蛋白质原:

[0592] (a)包含识别由所述癌症组织表达的靶分子的一个或多个靶向部分;以及

[0593] (b)具有一个或多个蛋白酶可裂解接头,每个蛋白酶可裂解接头包含针对其需要和/或预期进行IL2疗法的组织表达的一个或多个蛋白酶的一个或多个底物。

[0594] 189.根据实施例188所述的方法,其中所述IL2蛋白质原包含两个靶向部分,每个靶向部分识别由所述癌症组织表达的靶分子。

[0595] 190.根据实施例188或实施例189所述的方法,其中所述一个或多个靶向部分能够结合至细胞外基质(“ECM”)抗原、肿瘤反应性淋巴细胞抗原、肿瘤或病毒淋巴细胞的细胞表面分子、T细胞抗原(“TCA”)、检查点抑制剂或肿瘤相关抗原(“TAA”)。

[0596] 191.根据实施例 188至 190中任一项所述的方法,其中包含IL2部分的活化的IL2蛋白是通过所述癌症组织中的一个或多个蛋白酶裂解所述IL2蛋白质原中的一个或多

个蛋白酶可裂解接头而产生的。

[0597] 192.一种在靶组织中局部诱导免疫应答的方法,其包括向受试者施用根据实施例1至157中任一项所述的IL2蛋白质原(或包含IL2蛋白质原和赋形剂的药物组合物),所述IL2蛋白质原具有能够结合在所述靶组织中表达的靶分子的一个或多个靶向部分和一个或多个蛋白酶可裂解接头,每个接头包含用于在所述靶组织中表达的一个或多个蛋白酶的一个或多个底物。

[0598] 193.根据实施例 192所述的方法,其中所述IL2蛋白质原包含两个靶向部分,每个靶向部分识别在所述靶组织中表达的靶分子。

[0599] 194.根据实施例 192或实施例 98所述的方法,其中所述靶组织是癌症组织。

[0600] 195.根据实施例192至 194中任一项所述的方法,其中所述一个或多个靶向部分能够结合至细胞外基质(“ECM”)抗原、肿瘤反应性淋巴细胞抗原、肿瘤或病毒淋巴细胞的细胞表面分子、T细胞抗原(“TCA”)、检查点抑制剂或肿瘤相关抗原(“TAA”)。

[0601] 196.根据实施例 192至 195中任一项所述的方法,其中包含IL2部分的活化的IL2蛋白是通过所述靶组织中的一个或多个蛋白酶裂解所述IL2蛋白质原中的一个或多个蛋白酶可裂解接头而产生的。

[0602] 197.根据实施例 196所述的方法,其中所述IL2蛋白诱导针对所述靶组织中的至少一种细胞类型的所述免疫应答。

[0603] 198.根据实施例162至 197中任一项所述的方法,其中所述施用是非局部的。

[0604] 199.根据实施例 198所述的方法,其中所述施用是全身的。

[0605] 200.根据实施例 198所述的方法,其中所述施用是皮下的。

[0606] 8.1.实例

[0607] 8.1.1.实例1:使用重组蛋白酶消化蛋白酶可裂解接头

[0608] 多种IL2蛋白质原构建体以靶向部分-IL2Rα部分-接头2-IL2部分的格式生成。下表1提供了所生成的构建体编码的IL2蛋白质原的概述。表1描述了每种IL2蛋白质原的单个半抗体,其中每种IL2蛋白质原包含两个相同的半抗体。

[0609]

表 1 IL2 蛋白质原	
编号	结构
1	Fab – Fc(IgG4)-3xG4S-hIL2Rα(22-186)-5XG4S-hIL2
2	Fab – Fc(IgG4)-3xG4S-hIL2Rα(22-186)-PCL(36AA)-hIL2
3	Fab – Fc(IgG4)-3xG4S-hIL2Rα(22-186)-PCL(36AA)-hIL2
4	Fab – Fc(IgG4)-3xG4S-hIL2Rα(22-186)-PCL(36AA)-hIL2
5	Fab – Fc(IgG4)-3xG4S-hIL2Rα(22-186)-PCL(36AA)-hIL2
6	Fab – Fc(IgG4)-3xG4S-hIL2Rα(22-186)-PCL(36AA)-hIL2
7	Fab – Fc(IgG4)-3xG4S-hIL2Rα(22-186)-PCL(36AA)-hIL2

[0610] 对于实验构建体而言,术语“靶向部分”是指具有Fc结构域和N末端Fab结构域以及位于Fc结构域C末端的不可裂解接头(具有氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 157))的抗体的简写。IL2Rα部分具有氨基酸序列ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWE

NEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTG (SEQ ID NO:4)。IL2部分具有氨基酸序列APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO: 2)。各种构建体包括IL2Rα部分与IL2Rα之间的蛋白酶可裂解接头PCL1、PCL2、PCL3、PCL4、PCL5和PCL6以及不可裂解接头NCL1和NCL2。

[0611] 为了测试靶向部分中的几个蛋白酶可裂解接头-IL2Rα部分-接头-IL2部分是否可被重组蛋白酶消化,使用不同的重组人类蛋白酶(例如,uPA、MT-SP1、MMP2和MMP9)消化上述构建体(从R&D Systems购买)。

[0612] 简而言之,将2μg每种构建体(在IL2Rα与IL2之间含有PCL1、PCL2、PCL3、PCL4、PCL5、PCL6、NCL1和NCL2)在37℃消化24小时,在测定中使用或不使用每种重组蛋白酶50ng制造商推荐的缓冲液。消化后,将SDS样品上样缓冲液添加到每个样品中,并且在Invitrogen 4-12% Tris-甘氨酸凝胶上运行以进行SDS PAGE分析。每种蛋白酶使用不同的测定缓冲液:

[0613] (a)100μl的测定缓冲液50 mM Tris、0.01% (v/v) Tween® 20、pH 8.5中不含酶

[0614] (b)100μl的测定缓冲液50 mM Tris、0.01% (v/v) Tween® 20、pH 8.5中含有50ng的uPA酶

[0615] (c)100μl的测定缓冲液50 mM Tris、50 mM NaCl、0.01% (v/v) Tween® 20、pH 9.0中含有50ng的Matriptase/ST14酶

[0616] (d)100μl的测定缓冲液50mM Tris、10 mM $CaCl_2$、150 mM NaCl、0.05% (w/v) Brij 35、pH 7.5 (TCNB)中含有50ng的APMA活化的MMP2酶

[0617] (e)100μl的测定缓冲液50 mM Tris、10 mM $CaCl_2$、150 mM NaCl、0.05% Brij-35 (w/v)、pH 7.5 (TCNB)中含有50ng的APMA活化的MMP9酶

[0618] 使用Invitrogen的SimplyBlue Stain对凝胶进行染色以可视化条带。

[0619] 未消化的全长构建体在225KDa处运行(图2和图3的通道1)。正确消化的靶向部分-IL2Rα,其中两个IL2均在连接序列处被裂解,在~200KDa处运行(图2和3的通道2),表明两个接头位点均可供蛋白酶裂解。大多数测试的蛋白酶底物可以由具有相似底物序列要求的多种蛋白酶裂解。一些蛋白酶在可裂解接头序列之外显示裂解。

[0620] 8.1.2.实例2:YT/STAT5 luc荧光素酶测定中蛋白酶释放的IL2活性

[0621] 为了测试蛋白酶释放的IL2是否具有活性,在YT/STAT5 luc荧光素酶测定中测试了重组蛋白酶消化的可裂解接头构建体。简而言之,将2μg的αCD20-IL2Rα-PCL-IL2在100μl的测定缓冲液50 mM Tris、0.01% (v/v) Tween® 20、pH 8.5中用50ng的Matriptase(R&D,目录号3946-SEB-010)或uPA(R&D,目录号1310-SE)在37C消化24小时。YT/pGL452-STAT5 luc/CL4/hIL7Ra细胞与滴定的IL2(WT)-mmh、αCD20-IL2Rα-G4S-IL2和MT-SP1或uPA消化和未消化的CD20-IL2Rα-PCL-IL2在37C、5% CO_2孵育4-6小时。孵育后,将板和One-Glow荧光素酶底物在室温平衡。每孔添加100μl的One-Glo底物并且孵育3-5分钟。在Envision上测量发光。

[0622] 参考图4,来自CD20-IL2Rα-PCL-IL2的IL2的蛋白酶介导的裂解导致YT/STAT5 luc/CL4荧光素酶测定中改善的活性。靶向部分-IL2Rα-IL2格式中的IL2以自动抑制的转二聚体格式存在,该转二聚体格式具有最小的荧光素酶活性,如CD20-IL2Rα-G4S-IL2所示。释

放后,经过MT-SP1或uPA消化,裂解的IL2具有与IL2(WT)-mmh相似的STAT5 luc活性,表明蛋白酶裂解的IL2具有完全的生物活性

[0623] 8.1.3.实例3:具有蛋白酶可裂解接头的肿瘤靶向IL2Rα-IL2的体内功效

[0624] 图5A的示意图显示,8-10周大的雌性C57BL/6小鼠(杰克逊实验室)的右后腹皮下植入了0.85 × 10^6 MC38/hCD20肿瘤细胞。当肿瘤大小达到约~110 mm^3时,将小鼠随机分组,并且用不同的蛋白质进行腹膜内治疗。每两周腹腔内进行治疗,总共4剂。每半周使用数字卡尺测量一次肿瘤,并计算肿瘤大小为长度 x 宽度^2 / 2。进行测量直至肿瘤大小达到2250 mm^3,或直至任何组中的任何小鼠因溃疡而需要安乐死。在研究过程中监测体重变化。观察期延长至第42天

[0625] 图5B至图5N示出了具有或不具有可裂解接头的TAA靶向IL2Rα-IL2的抗肿瘤功效。在MC38/hCD20小鼠模型中测试的剂量下,具有可裂解接头的αCD20靶向构建体表现出比具有不可裂解接头的CD20靶向构建体明显更好的抗肿瘤功效和无瘤生存期(直至研究终止)。具有无效应子Fc和非靶向同种型组的二价αCD20未显示出肿瘤生长控制。如图5M和图5N所示,任何一组接受治疗的小鼠的体重均未发生显著变化,并且小鼠在治疗后未出现任何体重减轻。图5D至图5L了研究中所有测试组的个体肿瘤曲线。

[0626] 8.1.4.实例4:体内蛋白酶可裂解接头的稳定性

[0627] 如图6A所示,对8-10周龄无肿瘤雌性C57BL/6小鼠(杰克逊实验室)单次皮下注射5 mpk αCD20-IL2Rα-接头-IL2蛋白,该蛋白含有3种不同的可裂解接头和2种不可裂解接头对照(每组n=2只小鼠)。在治疗后16小时、40小时和64小时从小鼠收集血浆,以通过蛋白质印迹分析检查血清中给药蛋白质的稳定性(图6B)。将1ul血清与未消化的重组蛋白酶消化的CD20-IL2Rα-PCL1-IL2作为对照在4-12% Tris-甘氨酸凝胶上进行电泳,然后使用山羊抗人类IgG-Fc特异性HRP缀合物(Sigma A0170-1ML)作为检测。在非荷瘤小鼠中进行了为期3天的短期体内稳定性研究。所测试的3种可裂解接头在3天内在血清中表现出不同的裂解模式。αCD20-IL2Rα-PCL2-IL2在测试的3个时间点(16小时、40小时和64小时)最稳定。CD20-IL2Rα-PCL4-IL2显示中等稳定性,CD20-IL2Rα-PCL5-IL2稳定性最差,即使在16小时时间点也显示出可裂解接头的消化和IL2的裂解。正如预期的那样,不可裂解的对照显示出最小的IL2裂解。未消化的全长构建体在225KDa处运行(图6B,通道1)。完全消化的靶向部分-IL2Rα,其中两个IL2在接头序列处被裂解,在~200KDa处运行(图6B,通道2)。

[0628] 8.1.5.实例5:肿瘤靶向对αCD20-IL2Rα-可裂解接头-IL2功效的贡献

[0629] 图7示出了MC38/hCD20模型中的植入和治疗方案:8-10周龄雌性C57BL/6小鼠(杰克逊实验室)右后腹皮下植入1 × 10^6 MC38/hCD20肿瘤细胞。当肿瘤大小达到约~110 mm^3时,将小鼠随机分组,并且用不同的蛋白质进行腹膜内治疗。每周腹腔内进行治疗,总共2剂。每半周使用数字卡尺测量一次肿瘤,并计算肿瘤大小为长度 x 宽度^2 / 2(图8)。进行测量直至肿瘤大小达到2250 mm^3,或直至任何组中的任何小鼠因溃疡而需要安乐死。在研究过程中监测体重变化。

[0630] 我们评估了肿瘤靶向在具有可裂解接头的TAA靶向IL2Rα-IL2的抗肿瘤功效中的贡献。如图9所示,在MC38/hCD20小鼠模型中与具有可裂解接头的非靶向IL2Rα-IL2蛋白和具有不可裂解G4S接头的CD20靶向IL2Rα-IL2相比具有可裂解接头的CD20靶向IL2Rα-IL2蛋白显示显著更好的抗肿瘤功效和无肿瘤存活。具有无效应子Fc和非靶向同种型组的二价α

CD20未显示出肿瘤生长控制。任何一组接受治疗的小鼠的体重均未发生显著变化,并且小鼠在治疗后未出现任何体重减轻。

[0631] 9.参考文献的引用

[0632] 本申请中引用的所有出版物、专利、专利申请和其他文件特此出于所有目的通过引用整体并入,其程度如同每个单独的出版物、专利、专利申请或其他文件单独表明通过引用并入一样出于所有目的。如果本文并入的一篇或多篇参考文献的教导与本公开内容之间存在不一致,则旨在以本说明书的教导为准。

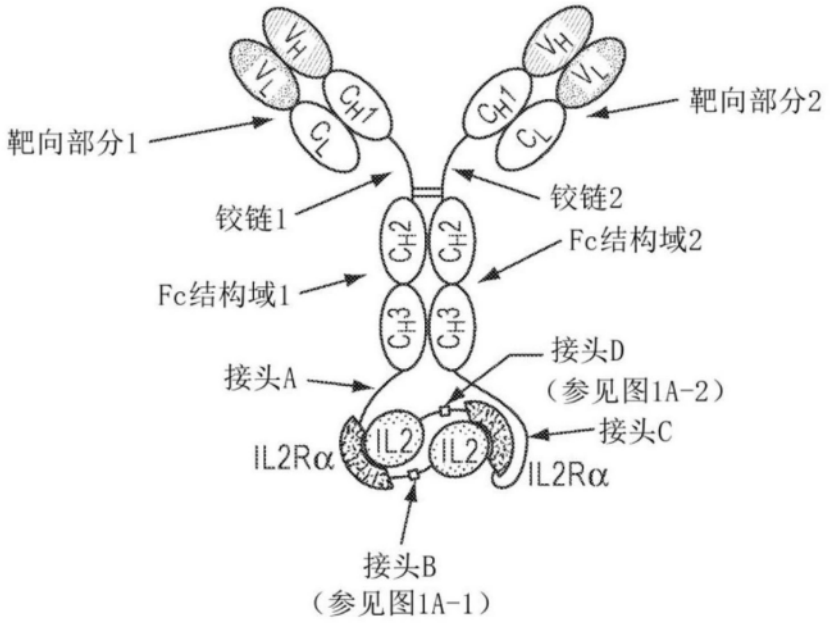


图1A

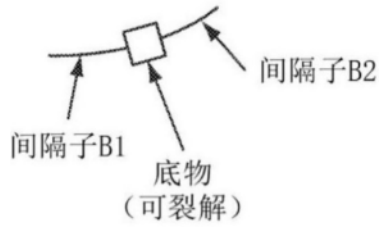


图1A-1

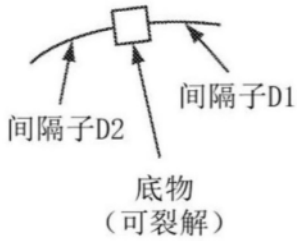


图1A-2

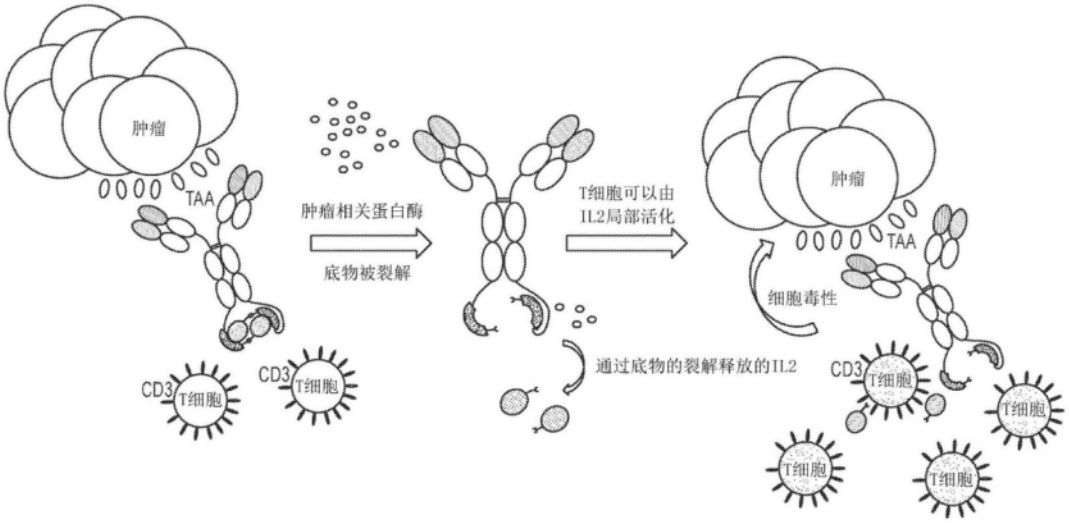

肿瘤
TAA
CD3
T细胞
肿瘤相关蛋白酶
底物被裂解
T细胞可以由
IL2局部活化
通过底物的裂解释放的IL2
细胞毒性

图1B

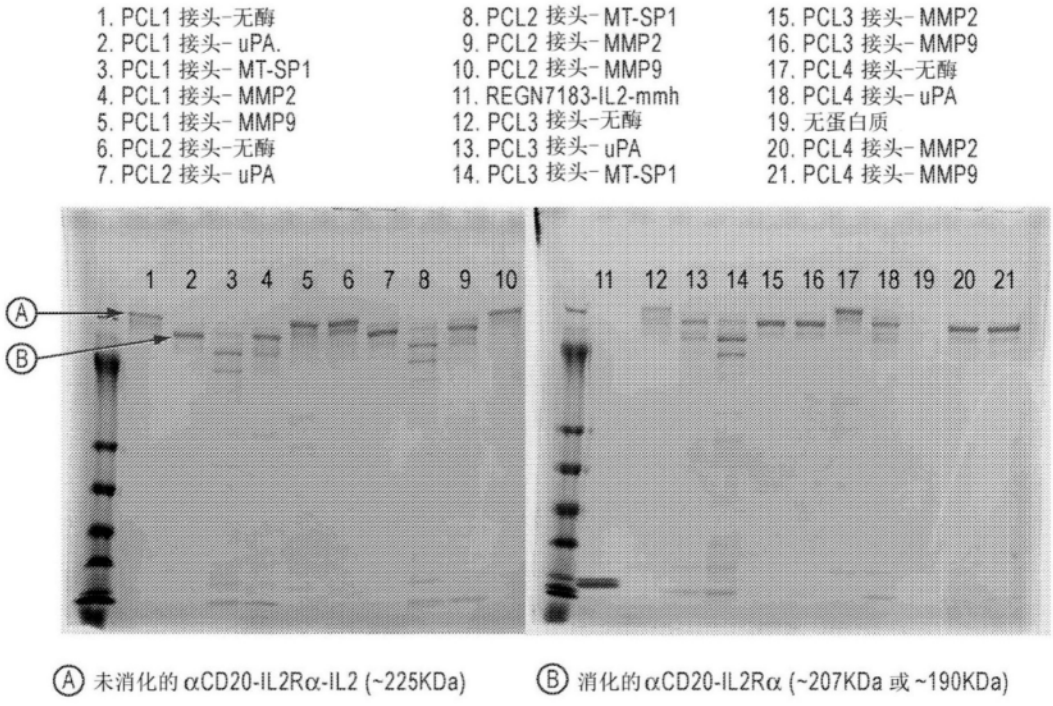

1. PCL1 接头-无酶
2. PCL1 接头- uPA.
3. PCL1 接头- MT-SP1
4. PCL1 接头- MMP2
5. PCL1 接头- MMP9
6. PCL2 接头-无酶
7. PCL2 接头- uPA
8. PCL2 接头- MT-SP1
9. PCL2 接头- MMP2
10. PCL2 接头- MMP9
11. REGN7183-IL2-mmh
12. PCL3 接头-无酶
13. PCL3 接头- uPA
14. PCL3 接头- MT-SP1
15. PCL3 接头- MMP2
16. PCL3 接头- MMP9
17. PCL4 接头-无酶
18. PCL4 接头- uPA
19. 无蛋白质
20. PCL4 接头- MMP2
21. PCL4 接头- MMP9
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21
A
B
Ⓐ 未消化的αCD20-IL2Rα-IL2 (~225KDa)
Ⓑ 消化的αCD20-IL2Rα (~207KDa 或 ~190KDa)

图2

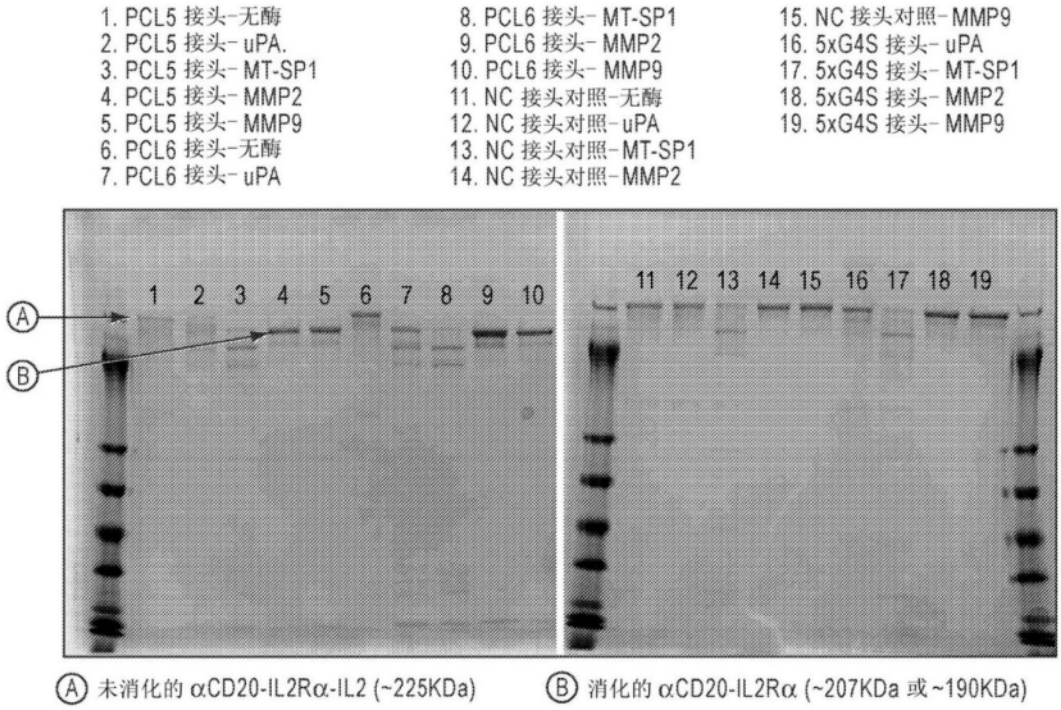

1. PCL5 接头-无酶
2. PCL5 接头- uPA.
3. PCL5 接头- MT-SP1
4. PCL5 接头- MMP2
5. PCL5 接头- MMP9
6. PCL6 接头-无酶
7. PCL6 接头- uPA
8. PCL6 接头- MT-SP1
9. PCL6 接头- MMP2
10. PCL6 接头- MMP9
11. NC 接头对照-无酶
12. NC 接头对照- uPA
13. NC 接头对照- MT-SP1
14. NC 接头对照- MMP2
15. NC 接头对照- MMP9
16. 5xG4S 接头- uPA
17. 5xG4S 接头- MT-SP1
18. 5xG4S 接头- MMP2
19. 5xG4S 接头- MMP9
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
11 12 13 14 15 16 17 18 19
A
B
Ⓐ 未消化的 αCD20-IL2Rα-IL2 (~225KDa)
Ⓑ 消化的 αCD20-IL2Rα (~207KDa 或~190KDa)

图3

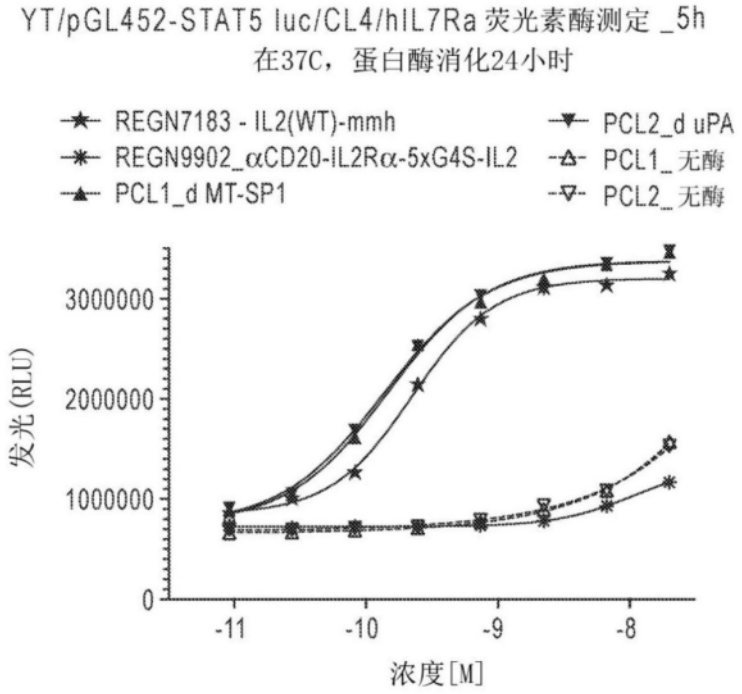

YT/pGL452-STAT5 luc/CL4/hIL7Ra 荧光素酶测定 _5h
在37C，蛋白酶消化24小时
REGN7183 - IL2(WT)-mmh
REGN9902_αCD20-IL2Rα-5xG4S-IL2
PCL1_d MT-SP1
PCL2_d uPA
PCL1_无酶
PCL2_无酶
发光(RLU)
3000000
2000000
1000000
0
-11
-10
-9
-8
浓度[M]

图4A

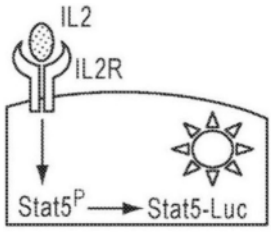


图4B

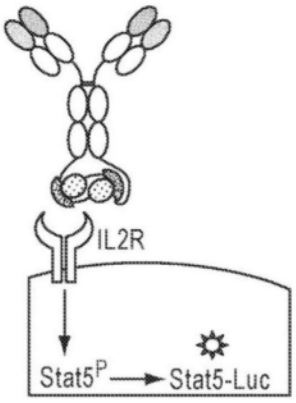
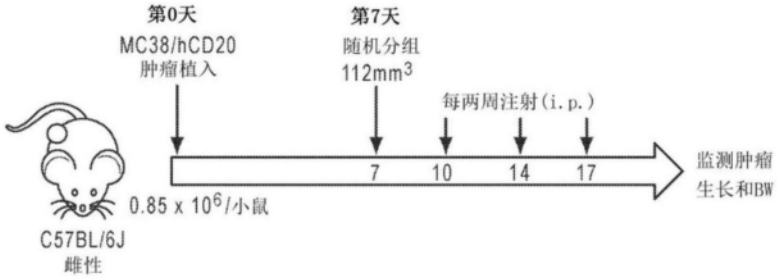


图4C



组编号	描述
1	REGN4576 (1.5mpk)
2	H4sH11810P2 (1.5mpk)
3	同种型-IL2Rα-IL2 (0.5mpk)
4	αCD20_PCL2_IL2 (0.5mpk)
5	αCD20_PCL4_IL2 (0.5mpk)
6	αCD20_PCL6_IL2 (0.5mpk)
7	αCD20_NCL1_IL2 (0.5mpk)
8	αCD20_PCL6_IL2 (1.5mpk)
9	αCD20_NCL2_IL2 (1.5mpk)

图5A

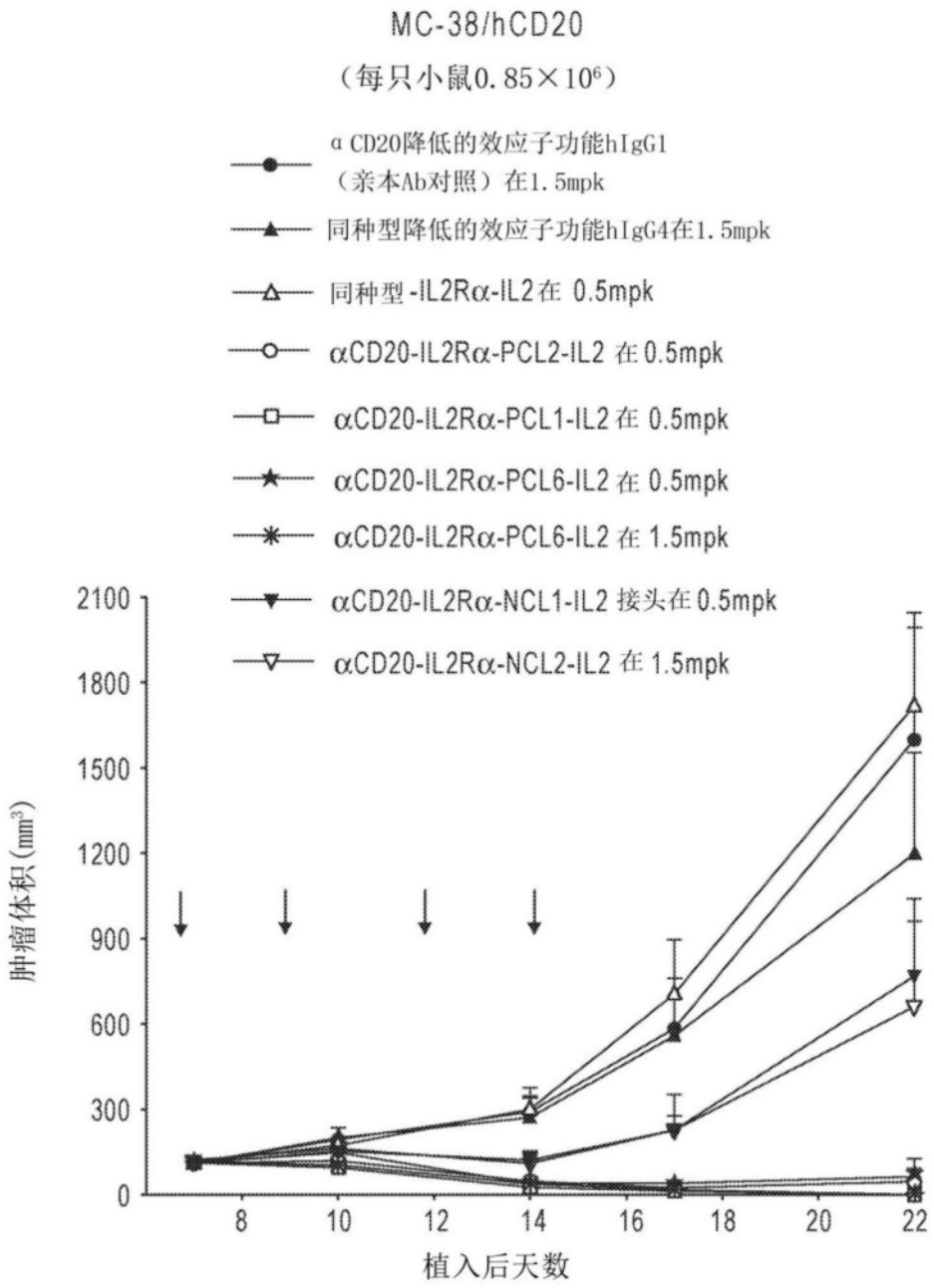

MC-38/hCD20
（每只小鼠0.85×10⁶）
α CD20降低的效应子功能hIgG1
（亲本Ab对照）在1.5mpk
同种型降低的效应子功能hIgG4在1.5mpk
同种型-IL2Rα-IL2在 0.5mpk
αCD20-IL2Rα-PCL2-IL2 在0.5mpk
αCD20-IL2Rα-PCL1-IL2 在 0.5mpk
αCD20-IL2Rα-PCL6-IL2 在 0.5mpk
αCD20-IL2Rα-PCL6-IL2 在 1.5mpk
αCD20-IL2Rα-NCL1-IL2 接头在0.5mpk
αCD20-IL2Rα-NCL2-IL2 在 1.5mpk
肿瘤体积(mm³)
2100
1800
1500
1200
900
600
300
0
8
10
12
14
16
18
20
22
植入后天数

图5B

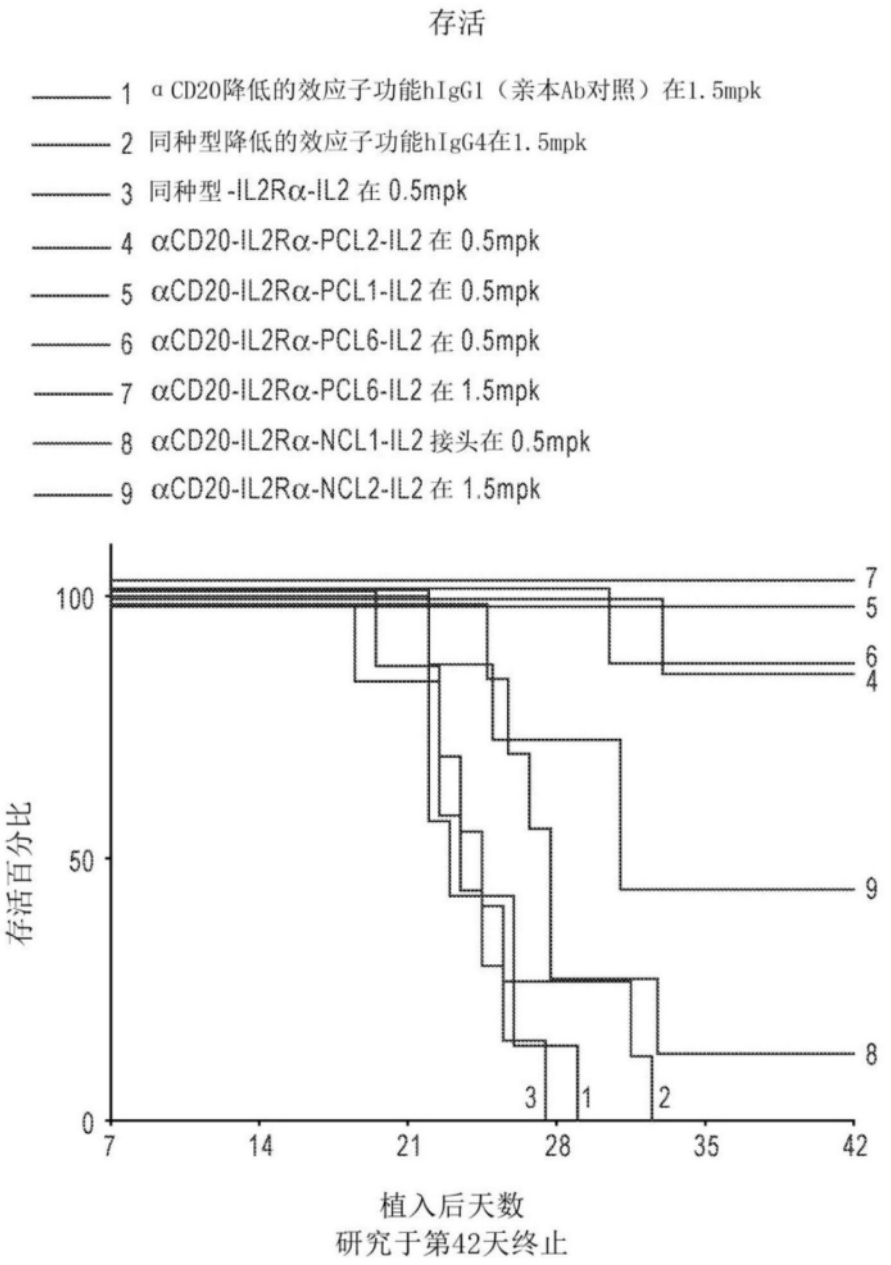

存活
1 α CD20降低的效应子功能hIgG1（亲本Ab对照）在1.5mpk
2 同种型降低的效应子功能hIgG4在1.5mpk
3 同种型-IL2Rα-IL2 在 0.5mpk
4 αCD20-IL2Rα-PCL2-IL2 在 0.5mpk
5 αCD20-IL2Rα-PCL1-IL2 在 0.5mpk
6 αCD20-IL2Rα-PCL6-IL2 在 0.5mpk
7 αCD20-IL2Rα-PCL6-IL2 在 1.5mpk
8 αCD20-IL2Rα-NCL1-IL2 接头在 0.5mpk
9 αCD20-IL2Rα-NCL2-IL2 在 1.5mpk
存活百分比
100
50
0
7
14
21
28
35
42
植入后天数
研究于第42天终止

图5C

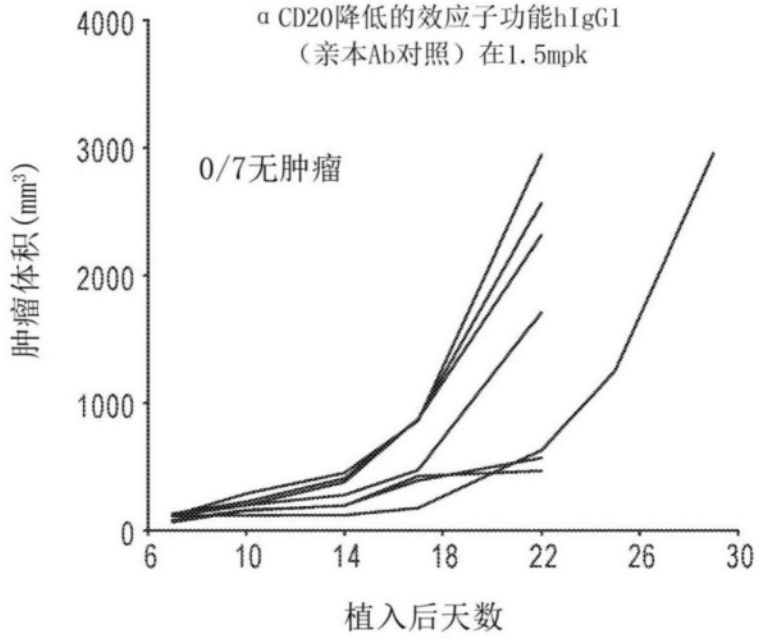

α CD20降低的效应子功能hIgG1
（亲本Ab对照）在1.5mpk
0/7无肿瘤
肿瘤体积(mm³)
4000
3000
2000
1000
0
6
10
14
18
22
26
30
植入后天数

图5D

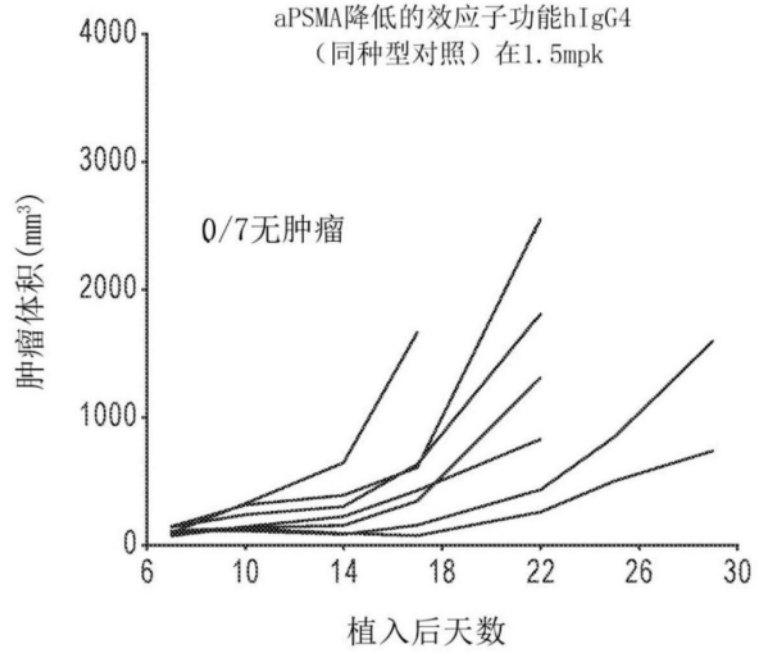

aPSMA降低的效应子功能hIgG4
（同种型对照）在1.5mpk
0/7无肿瘤
肿瘤体积(mm³)
4000
3000
2000
1000
0
6
10
14
18
22
26
30
植入后天数

图5E

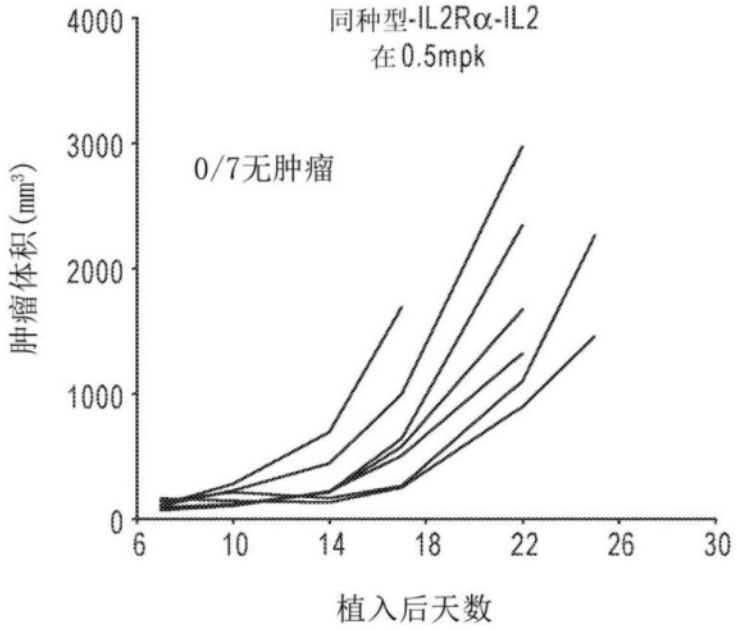

同种型-IL2Rα-IL2
在0.5mpk
0/7无肿瘤
肿瘤体积(mm³)
4000
3000
2000
1000
0
6
10
14
18
22
26
30
植入后天数

图5F

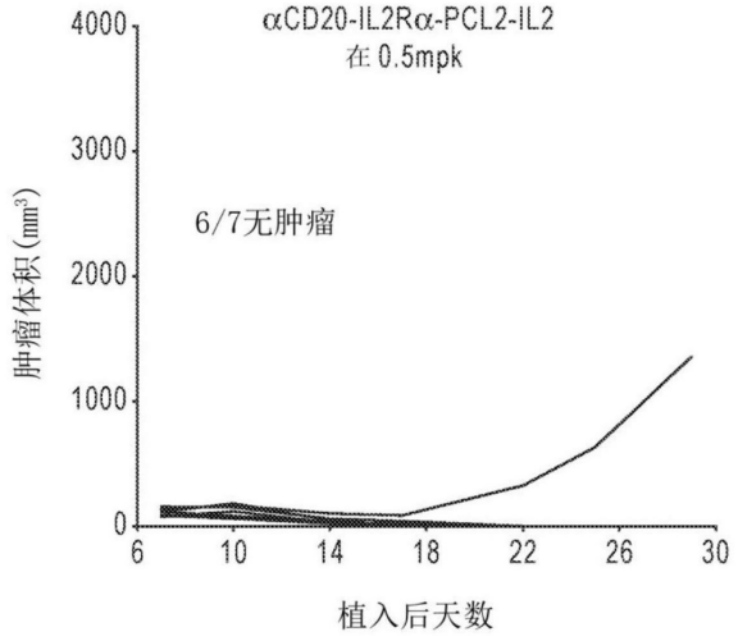

αCD20-IL2Rα-PCL2-IL2
在0.5mpk
6/7无肿瘤
肿瘤体积(mm³)
4000
3000
2000
1000
0
6
10
14
18
22
26
30
植入后天数

图5G

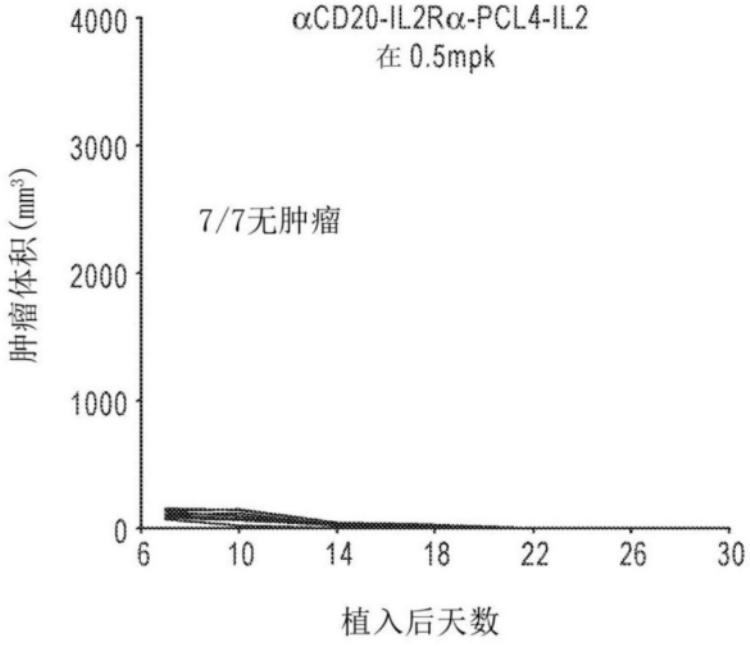

αCD20-IL2Rα-PCL4-IL2
在 0.5mpk
7/7无肿瘤
肿瘤体积 (mm³)
4000
3000
2000
1000
0
6
10
14
18
22
26
30
植入后天数

图5H

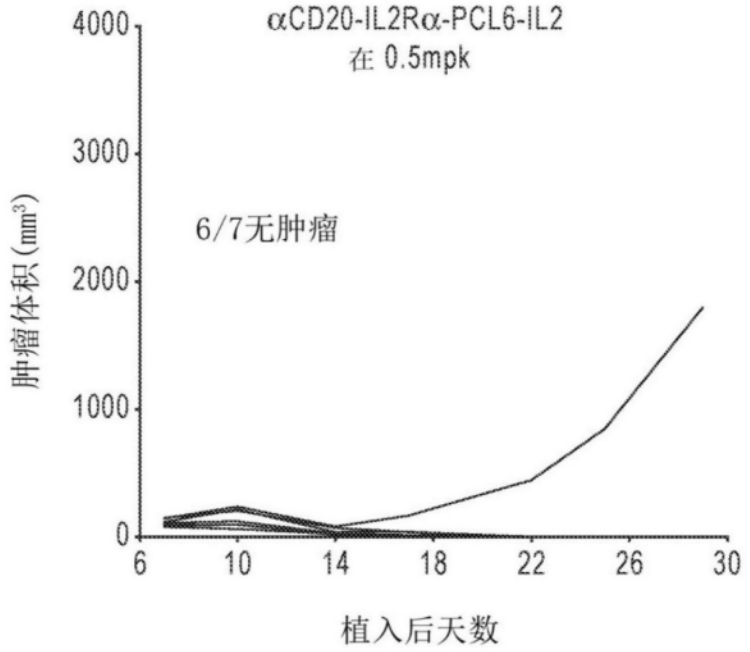

αCD20-IL2Rα-PCL6-IL2
在 0.5mpk
6/7无肿瘤
肿瘤体积 (mm³)
4000
3000
2000
1000
0
6
10
14
18
22
26
30
植入后天数

图5I

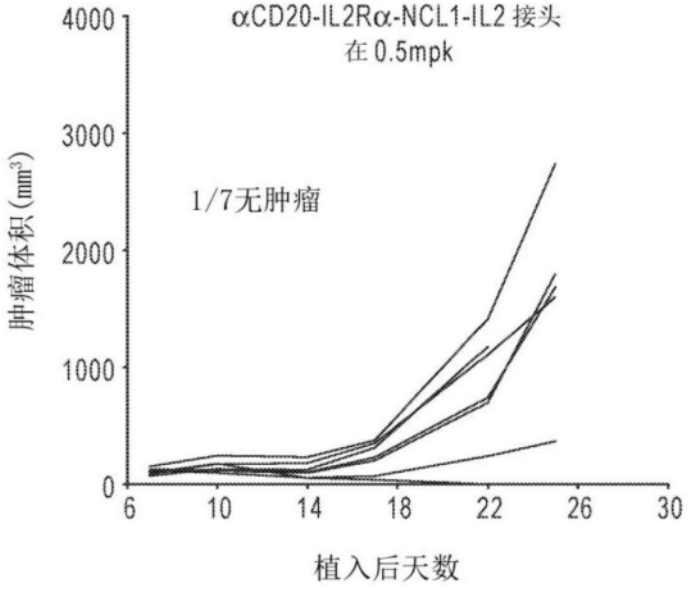

αCD20-IL2Rα-NCL1-IL2 接头
在 0.5mpk
1/7无肿瘤
肿瘤体积 (mm³)
4000
3000
2000
1000
0
6
10
14
18
22
26
30
植入后天数

图5J

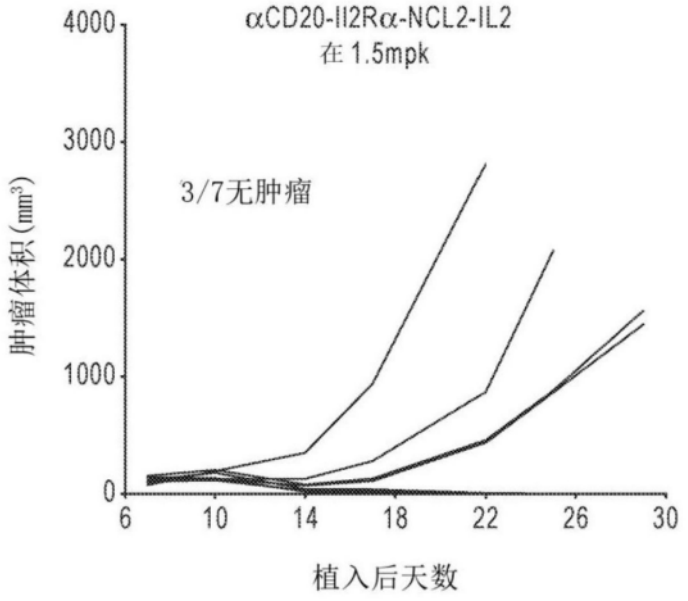

αCD20-Il2Rα-NCL2-IL2
在 1.5mpk
3/7无肿瘤
肿瘤体积 (mm³)
4000
3000
2000
1000
0
6
10
14
18
22
26
30
植入后天数

图5K

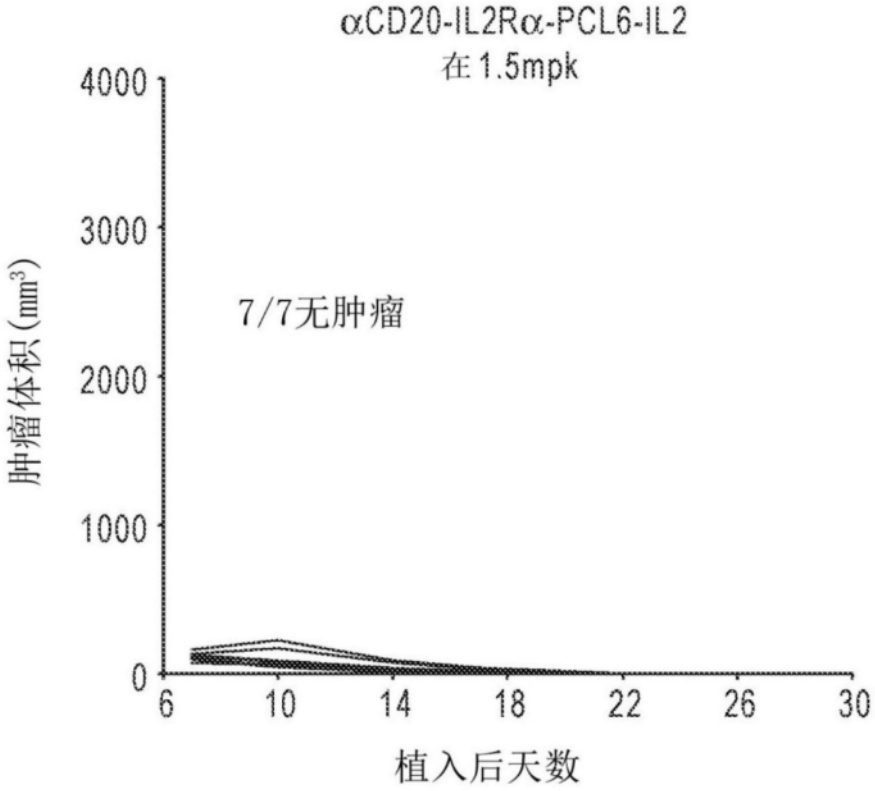

αCD20-IL2Rα-PCL6-IL2
在1.5mpk
4000
3000
2000
1000
0
肿瘤体积(mm³)
7/7无肿瘤
6
10
14
18
22
26
30
植入后天数

图5L

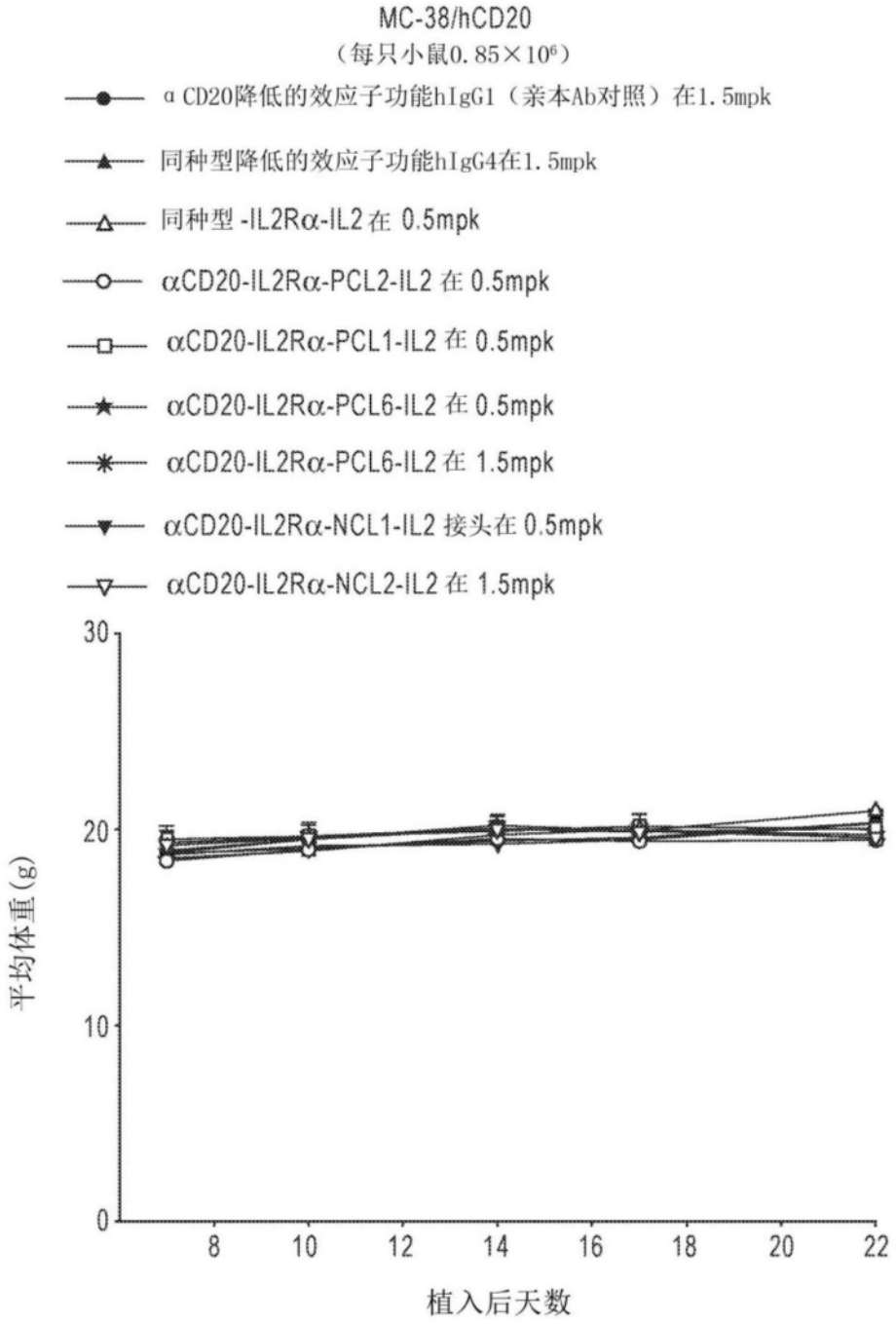

MC-38/hCD20
（每只小鼠0.85×10⁶）
α CD20降低的效应子功能hIgG1（亲本Ab对照）在1.5mpk
同种型降低的效应子功能hIgG4在1.5mpk
同种型 -IL2Rα-IL2 在 0.5mpk
αCD20-IL2Rα-PCL2-IL2 在 0.5mpk
αCD20-IL2Rα-PCL1-IL2 在 0.5mpk
αCD20-IL2Rα-PCL6-IL2 在 0.5mpk
αCD20-IL2Rα-PCL6-IL2 在 1.5mpk
αCD20-IL2Rα-NCL1-IL2 接头在 0.5mpk
αCD20-IL2Rα-NCL2-IL2 在 1.5mpk
平均体重(g)
30
20
10
0
8
10
12
14
16
18
20
22
植入后天数

图5M

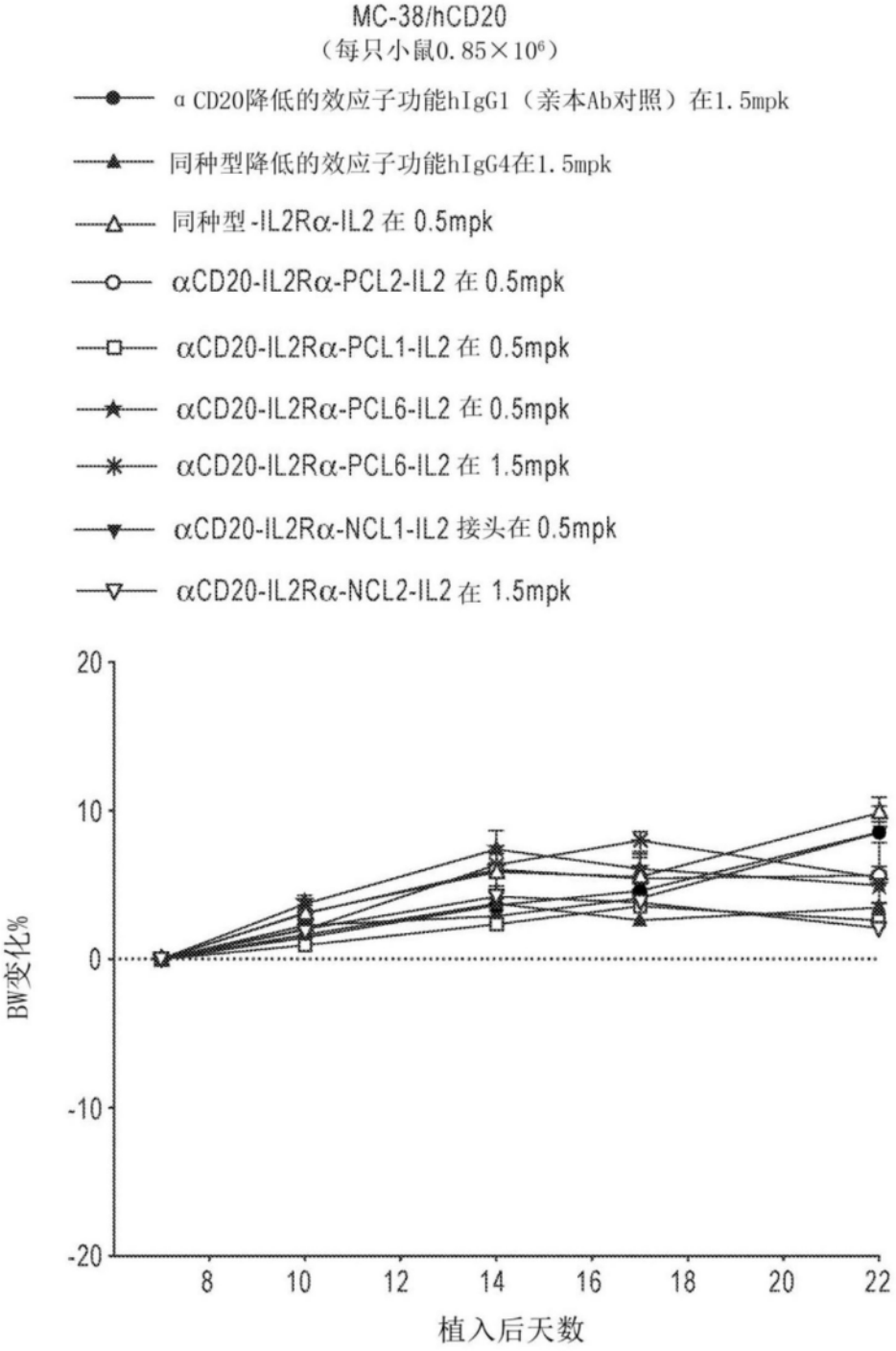
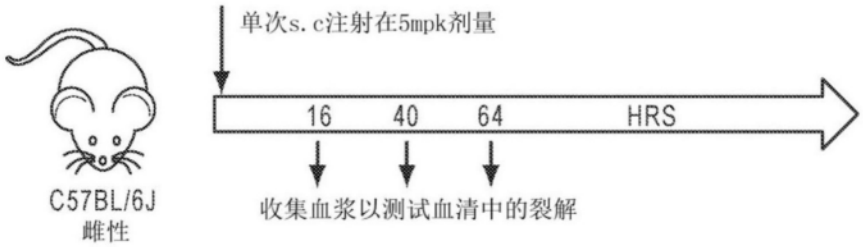

MC-38/hCD20
（每只小鼠0.85×10⁶）
α CD20降低的效应子功能hIgG1（亲本Ab对照）在1.5mpk
同种型降低的效应子功能hIgG4在1.5mpk
同种型-IL2Rα-IL2 在 0.5mpk
αCD20-IL2Rα-PCL2-IL2 在 0.5mpk
αCD20-IL2Rα-PCL1-IL2 在 0.5mpk
αCD20-IL2Rα-PCL6-IL2 在 0.5mpk
αCD20-IL2Rα-PCL6-IL2 在 1.5mpk
αCD20-IL2Rα-NCL1-IL2 接头在 0.5mpk
αCD20-IL2Rα-NCL2-IL2 在 1.5mpk
BW变化%
20
10
0
-10
-20
8
10
12
14
16
18
20
22
植入后天数

图5N



通道	治疗细节
M	参见 Blue Plus 2 MW 梯度
1	未消化的对照
2	消化的对照
3, 4	αCD20-IL2Rα-PCL2-IL2 在 5mpk
5, 6	αCD20-IL2Rα-PCL4-IL2 在 5mpk
7, 8	αCD20-IL2Rα-PCL5-IL2 在 5mpk
9, 10	αCD20-IL2Rα-NCL1-IL2 接头在 5mpk
11, 12	αCD20-IL2Rα-NCL2-IL2 接头在 5mpk

图6A

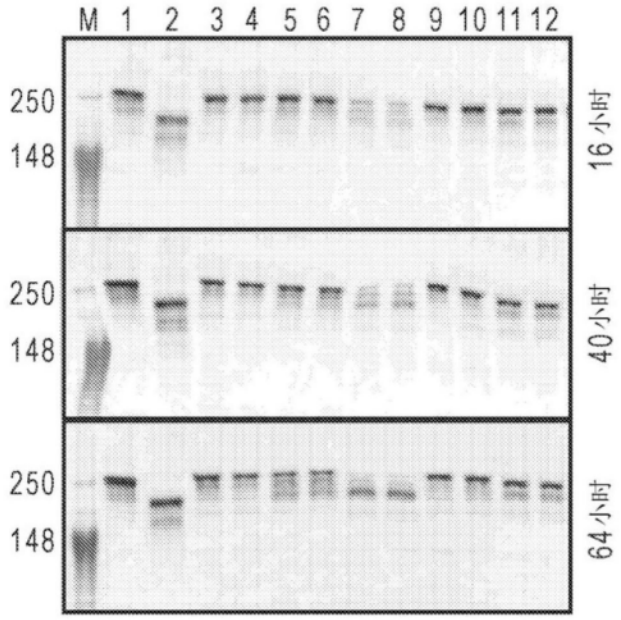
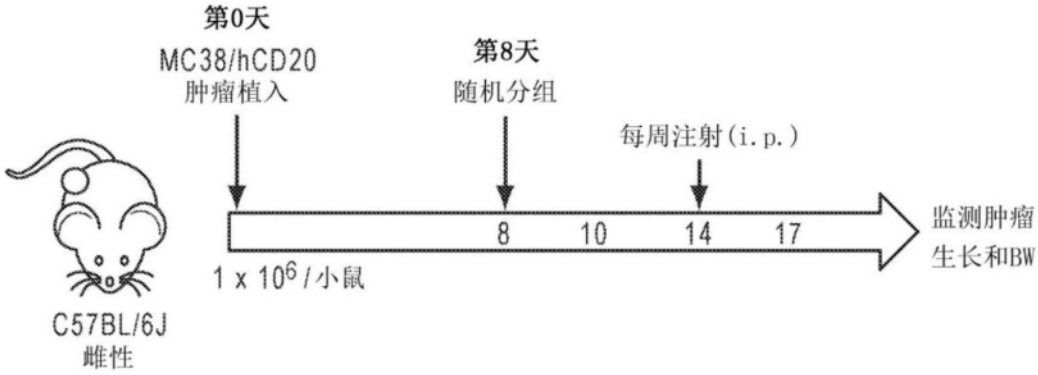


图6B



组编号	描述
1	H4sH11810P2 (1.5mpk)
2	同种型-IL2Rα-IL2 (0.5mpk)
4	αCD20_PCL4_IL2 (0.5mpk)
5	αCD20_PCL6_IL2 (0.5mpk)
6	αPSMA_PCL4_IL2 (0.5mpk)
7	αPSMA_PCL6_IL2 (0.5mpk)
8	αCD20_NCL2_IL2 (0.5mpk)

图7

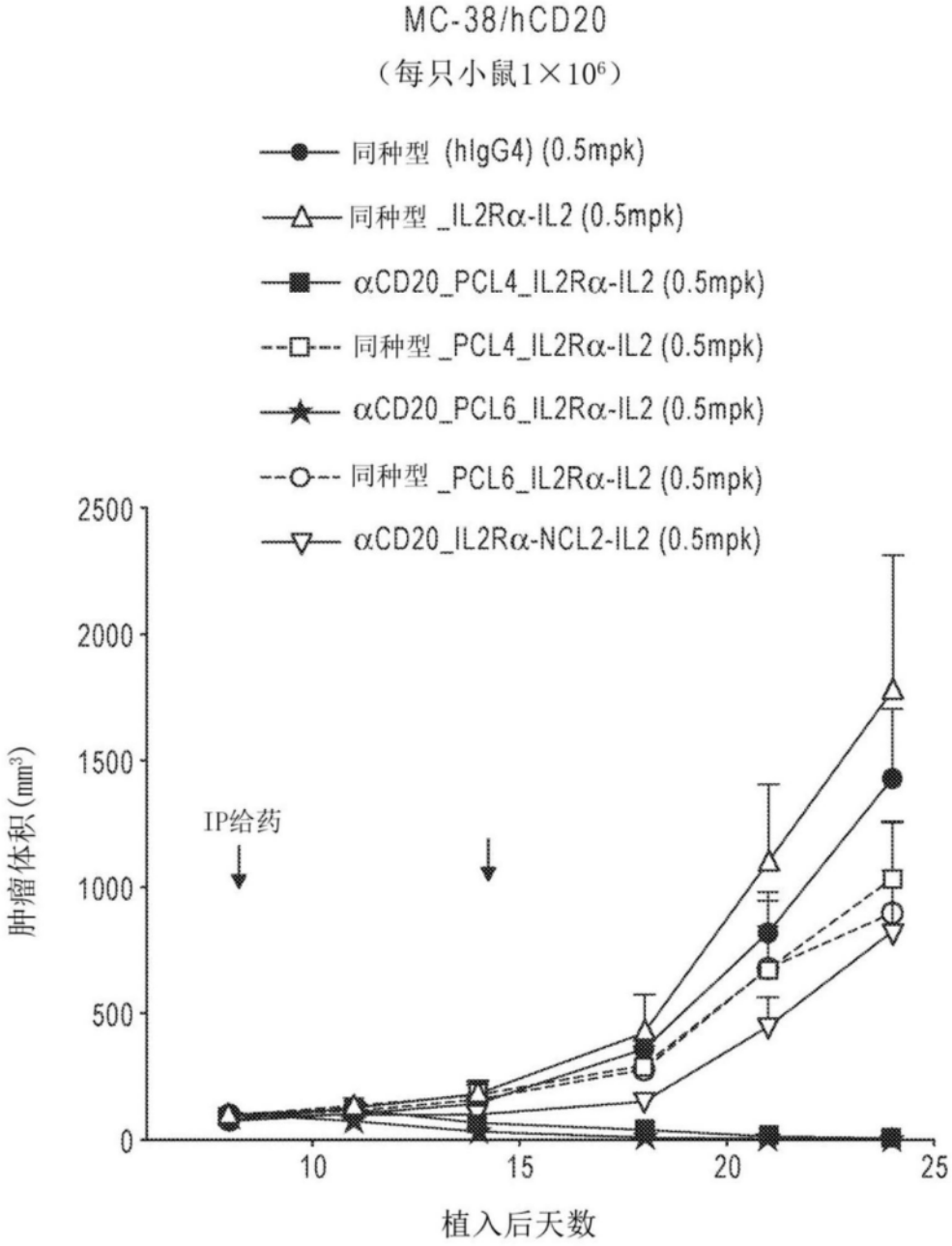

MC-38/hCD20
（每只小鼠1×10⁶）
同种型 (hIgG4) (0.5mpk)
同种型 _IL2Rα-IL2 (0.5mpk)
αCD20_PCL4_IL2Rα-IL2 (0.5mpk)
同种型 _PCL4_IL2Rα-IL2 (0.5mpk)
αCD20_PCL6_IL2Rα-IL2 (0.5mpk)
同种型 _PCL6_IL2Rα-IL2 (0.5mpk)
αCD20_IL2Rα-NCL2-IL2 (0.5mpk)
肿瘤体积 (mm³)
2500
2000
1500
1000
500
0
IP给药
10
15
20
25
植入后天数

图8

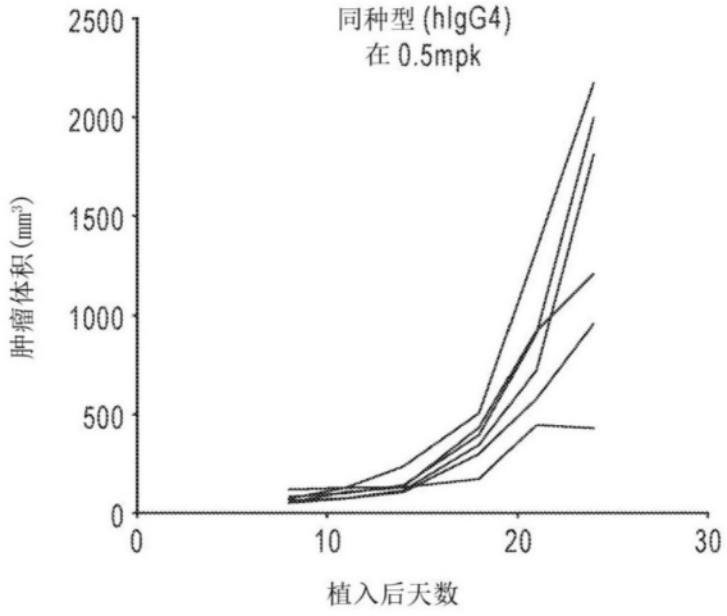

同种型(hIgG4)
在0.5mpk
肿瘤体积(mm³)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
植入后天数

图9A

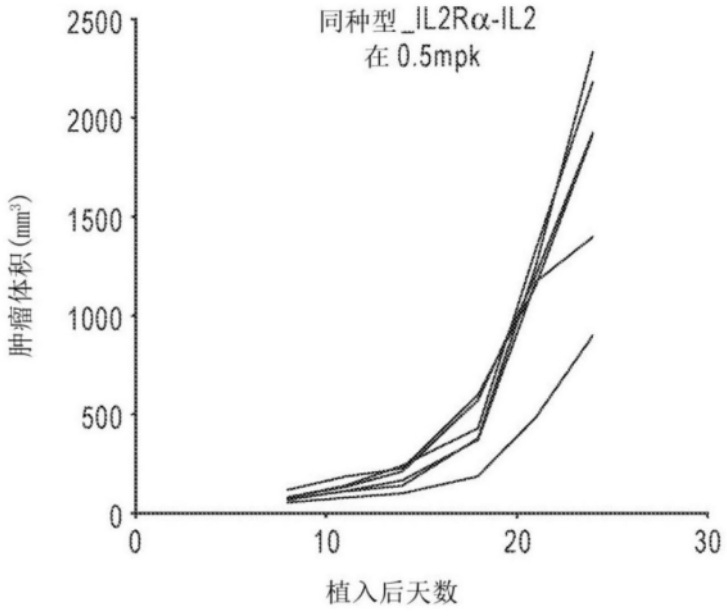

同种型_IL2Rα-IL2
在0.5mpk
肿瘤体积(mm³)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
植入后天数

图9B

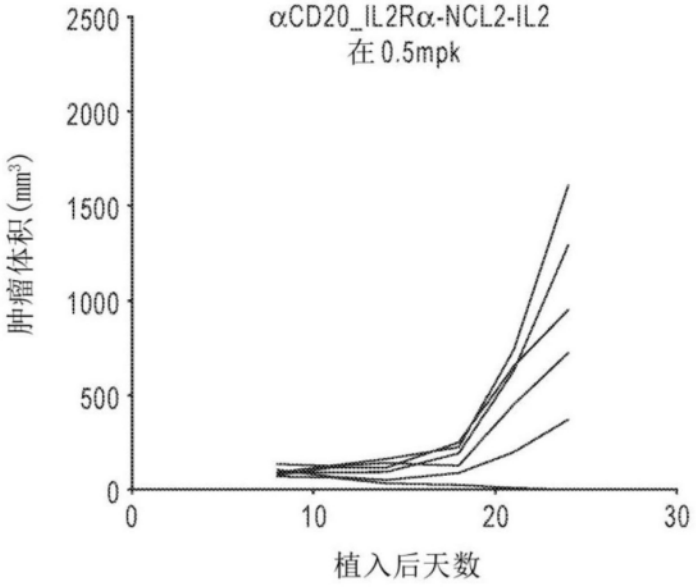

αCD20_IL2Rα-NCL2-IL2
在0.5mpk
肿瘤体积(mm³)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
植入后天数

图9C

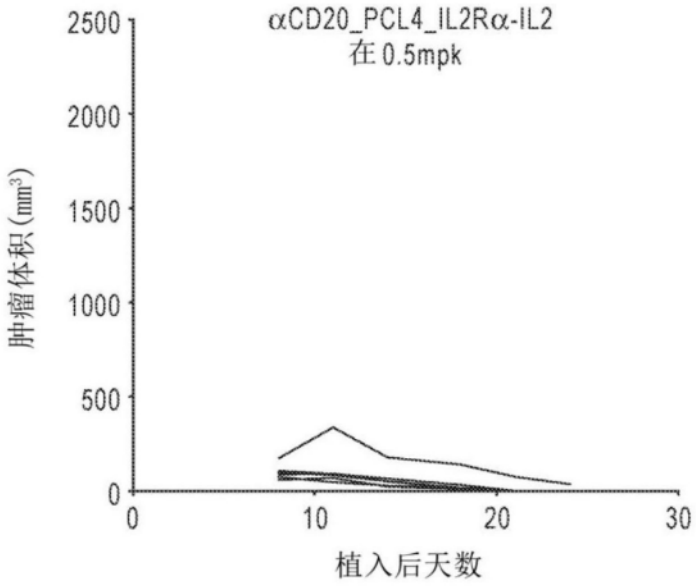

αCD20_PCL4_IL2Rα-IL2
在0.5mpk
肿瘤体积(mm³)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
植入后天数

图9D

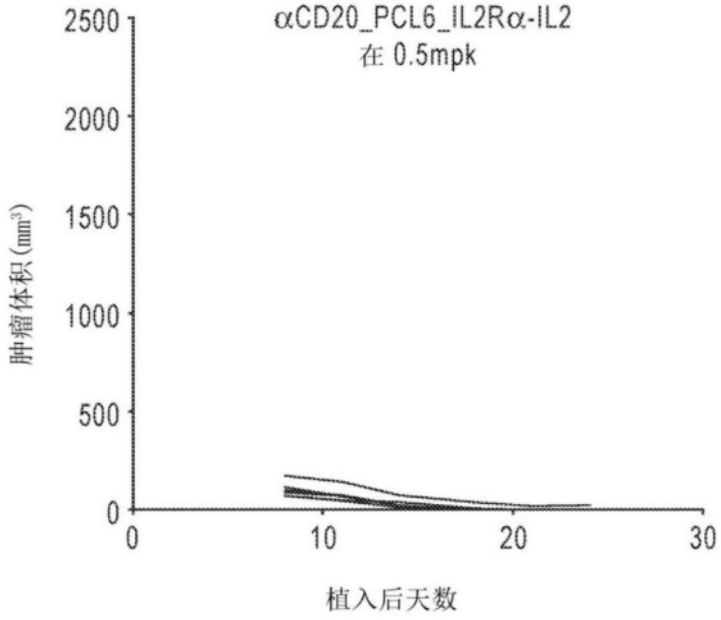

αCD20_PCL6_IL2Rα-IL2
在 0.5mpk
2500
2000
1500
1000
500
0
肿瘤体积 (mm³)
0
10
20
30
植入后天数

图9E

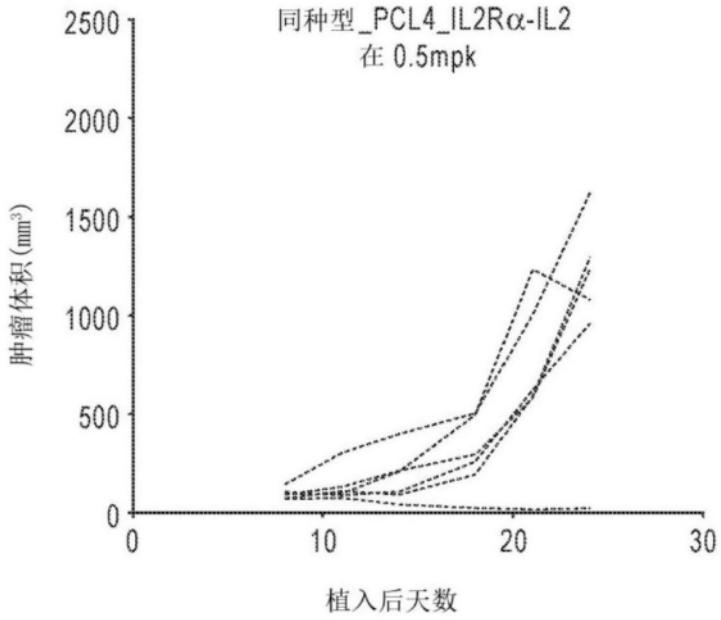

同种型_PCL4_IL2Rα-IL2
在 0.5mpk
2500
2000
1500
1000
500
0
肿瘤体积 (mm³)
0
10
20
30
植入后天数

图9F

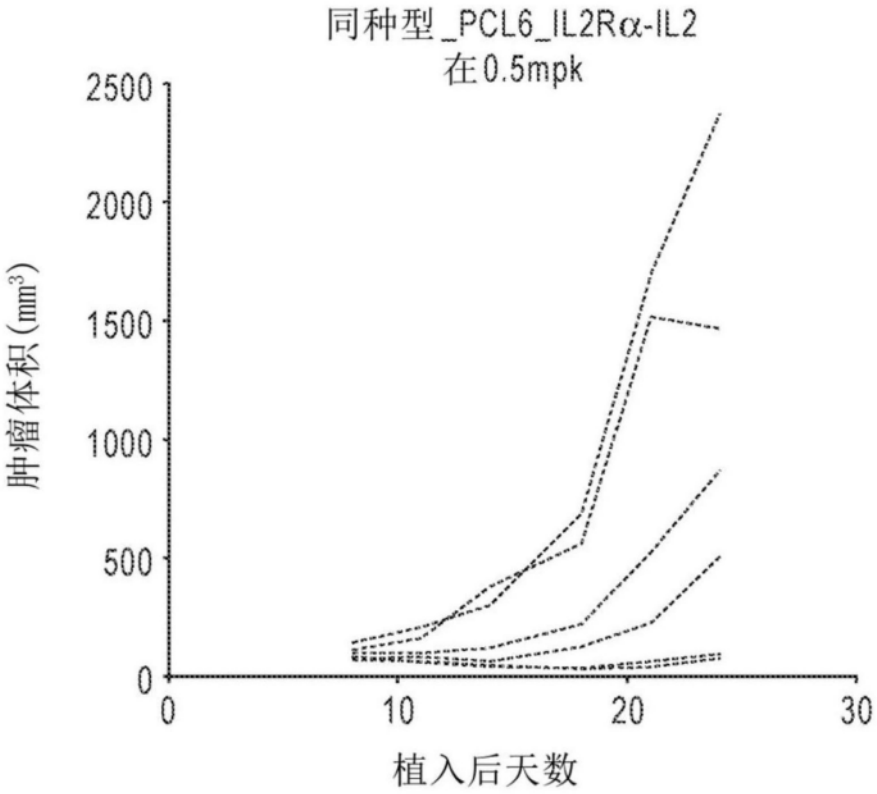

同种型_PCL6_IL2Rα-IL2
在0.5mpk
肿瘤体积(mm³)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
植入后天数

图9G