(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119300859 A
(43)申请公布日 2025.01.10

(21)申请号 202380043678.5

(22)申请日 2023.03.31

(30)优先权数据
63/326692 2022.04.01 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.11.28

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/065191 2023.03.31

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/192973 EN 2023.10.05

(71)申请人 西托姆克斯治疗公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 M·M·派敦加特 S·米特拉
E·A·M·富克斯 V·维诺德
S·A·帕蒂尔 L·M·博斯塔尼

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 李唐 彭昶

(51)Int.Cl.
A61K 39/395(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
C07K 16/32(2006.01)

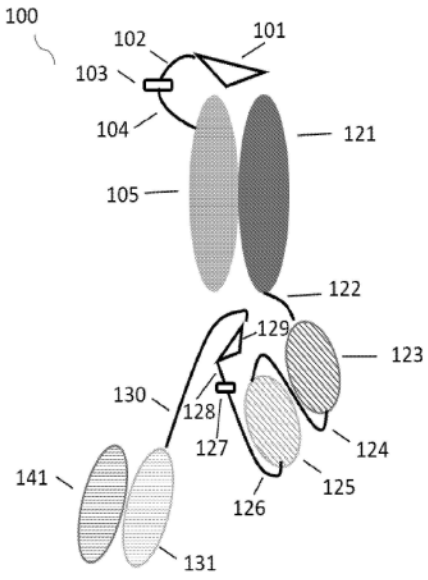
权利要求书7页 说明书97页
序列表（电子公布） 附图27页

(54)发明名称

可激活多特异性分子和其使用方法

(57)摘要

可激活蛋白,所述可激活蛋白包含特异性结合于第一靶标的第一靶标结合蛋白(TB1);特异性结合于第二靶标的第二靶标结合蛋白(TB2),其中TB2直接或间接与TB1偶联;第一掩蔽部分(MM1),所述第一掩蔽部分抑制TB1与第一靶标的结合并经由可裂解部分直接或间接,例如经由一个或多个接头或其它组分与TB1偶联;第二掩蔽部分(MM2),所述第二掩蔽部分抑制TB2与第二靶标的结合并经由可裂解部分直接或间接与TB1或与TB2偶联;以及半衰期延长部分(EM),所述半衰期延长部分经由可裂解部分直接或间接与TB1或与TB2偶联。可激活蛋白被配置成使得当可裂解部分裂解时,所得激活蛋白具有比完整的可激活蛋白更短的半衰期、更高的对第一靶标的结合亲和力和更高的对第二靶标的结合亲和力。



CN 119300859 A

1.一种可激活蛋白,所述可激活蛋白包含:

特异性结合于第一靶标的第一抗原结合结构域(AB1),其中所述AB1包含第一重链可变结构域(HVD1)和第一轻链可变结构域(LVD1);

特异性结合于第二靶标的第二抗原结合结构域(AB2),其中所述AB2包含第二重链可变结构域(HVD2)和第二轻链可变结构域(LVD2),并且所述AB2直接或间接与所述HVD1的C端或与所述LVD1的C端偶联;

第一掩蔽部分(MM1),所述第一掩蔽部分经由第一可裂解部分(CM1)直接或间接与所述AB1偶联,其中所述MM1抑制所述AB1与所述第一靶标的结合;

半衰期延长部分(EM),所述半衰期延长部分直接或间接与第二掩蔽部分(MM2)偶联;

其中所述EM经由第二可裂解部分(CM2)直接或间接与所述AB1或与所述AB2偶联,并且

其中所述MM2抑制所述AB2与所述第二靶标的结合。

2.如权利要求1所述的可激活蛋白,其中所述EM为由第一片段可结晶(Fc)结构域与第二Fc结构域形成的二聚体。

3.如权利要求1或权利要求2所述的可激活蛋白,其中所述EM相对于所述EM经由所述CM2直接或间接偶联的所述AB1或所述AB2在C端,并且其中MM1相对于所述AB1在N端。

4.一种可激活蛋白,所述可激活蛋白包含:

特异性结合于第一靶标的第一抗原结合结构域(AB1),其中所述AB1包含第一重链可变结构域(HVD1)和第一轻链可变结构域(LVD1);

特异性结合于第二靶标的第二抗原结合结构域(AB2),其中所述AB2包含第二重链可变结构域(HVD2)和第二轻链可变结构域(LVD2),并且所述AB2直接或间接与所述HVD1或所述LVD1的C端偶联;

第一掩蔽部分(MM1),所述第一掩蔽部分经由第一可裂解部分(CM1)和任选的一个或多个接头与所述AB1偶联,其中所述MM1抑制所述AB1与所述第一靶标的结合;以及

半衰期延长部分(EM),所述半衰期延长部分(EM)直接或间接与第二掩蔽部分(MM2)偶联,其中所述EM和所述MM2经由第二可裂解部分(CM2)和任选的一个或多个接头与所述AB1或与所述AB2偶联,并且

其中所述MM2抑制所述AB2与所述第二靶标的结合。

5.如权利要求4所述的可激活蛋白,其中所述CM2在所述MM2的N端并且所述MM2在所述EM的N端,并且所述CM2在所述EM和所述MM2经由所述CM2和任选的一个或多个接头偶联的所述AB1或所述AB2的C端。

6.一种可激活蛋白,所述可激活蛋白包含:

特异性结合于第一靶标的第一抗原结合结构域(AB1),其中所述AB1包含第一重链可变结构域(HVD1)和第一轻链可变结构域(LVD1);

特异性结合于第二靶标的第二抗原结合结构域(AB2),其中所述AB2包含第二重链可变结构域(HVD2)和第二轻链可变结构域(LVD2),并且所述AB2直接或间接与所述HVD1或所述LVD1的C端偶联;

第一掩蔽部分(MM1),所述第一掩蔽部分经由第一可裂解部分(CM1)和任选的一个或多个接头与所述AB1偶联,其中所述MM1抑制所述AB1与所述第一靶标的结合;以及

半衰期延长部分(EM),所述半衰期延长部分包含第一半衰期延长部分(EM1)与第二半

衰期延长部分(EM2)的二聚体;

其中所述EM1经由第二可裂解部分(CM2)和任选的一个或多个接头与所述AB1偶联,并且

其中所述EM2直接或间接与第二掩蔽部分(MM2)偶联,

其中所述MM2抑制所述AB2与所述第二靶标的结合。

7.如权利要求6所述的可激活蛋白,其中所述CM2在所述EM1的N端并且所述CM2在所述AB1的C端。

8.如权利要求1-7中任一项所述的可激活蛋白,其中所述可激活蛋白至少包含第一多肽和第二多肽。

9.如权利要求8所述的可激活蛋白,其中所述第一多肽从N端到C端依次包含所述MM1、所述CM1和所述VLD1。

10.如权利要求8-9中任一项所述的可激活蛋白,其中所述第二多肽包含所述VHD1、所述VHD2、所述VLD2、所述CM2、所述MM2和第一Fc结构域,并且其中所述可激活蛋白还包含第三多肽,所述第三多肽包含第二Fc结构域。

11.如权利要求10所述的可激活蛋白,其中所述第二多肽从N端到C端依次包含所述VHD1、所述VHD2、所述VLD2、所述CM2、所述MM2和第一Fc结构域。

12.如权利要求9所述的可激活蛋白,其中所述第二多肽从N端到C端依次包含所述VHD1、所述CM2、所述MM2和第一Fc结构域。

13.如权利要求9所述的可激活蛋白,其中所述第二多肽从N端到C端依次包含所述VHD1、所述CM2和第一Fc结构域。

14.如权利要求9或12-13中任一项所述的可激活蛋白,其中所述第一多肽包含所述MM1、所述CM1、所述VLD1、所述VHD2和所述VLD2。

15.如权利要求13所述的可激活蛋白,其中所述第一多肽从N端到C端依次包含所述MM1、所述CM1、所述VLD1、所述VHD2和所述VLD2。

16.如权利要求13所述的可激活蛋白,其中所述第一多肽从N端到C端依次包含所述MM1、所述CM1、所述VLD1、所述VLD2和所述VHD2。

17.如权利要求13-16中任一项所述的可激活蛋白,其中所述蛋白包含第三多肽,并且其中所述第三多肽包含第二Fc结构域和所述MM2。

18.如权利要求17所述的可激活蛋白,其中所述MM2经由接头连接到所述第二Fc结构域的C端。

19.如权利要求17所述的可激活蛋白,其中所述MM2经由接头连接到所述第二Fc结构域的N端。

20.如权利要求1-19中任一项所述的可激活蛋白,所述可激活蛋白还包含偶联以下的接头:

(i)MM1和CM1;

(ii)CM1和VLD1,

(iii)VHD1和VLD2,

(iv)VHD1和VHD2,

(v)VHD1和CM2,

(vi)VLD2和VHD2,

(vii)CM2和MM2,

(viii)CM2和EM,

(ix)EM和MM2,

(x)VLD1和VHD2,和/或

(xi)VLD1和VLD2。

21.如权利要求18-20中任一项所述的可激活蛋白,其中所述接头是长度为5至30个、6至29个、7至28个、8至27个、9至26个、10至25个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个或24个氨基酸的肽。

22.如权利要求2和10-19中任一项所述的可激活蛋白,其中所述第一Fc结构域为Fc结构域臼突变体并且所述第二Fc结构域为Fc结构域杵突变体。

23.如权利要求22所述的可激活蛋白,其中所述Fc结构域臼突变体包含SEQ ID NO:2的序列并且所述Fc结构域杵突变体包含SEQ ID NO:1的序列。

24.如权利要求1所述的可激活蛋白,其中所述CM2直接或间接与所述AB1的C端或所述AB2的C端偶联。

25.如权利要求24所述的可激活蛋白,其中所述MM2直接或间接与所述CM2的C端偶联并且所述MM2直接或间接与所述EM的N端偶联。

26.如权利要求1或权利要求24所述的可激活蛋白,其中所述EM包含第一半衰期延长部分(EM1)与第二半衰期延长部分(EM2)的二聚体。

27.如权利要求26所述的可激活蛋白,其中所述CM2直接或间接与所述EM1的N端偶联。

28.如权利要求26所述的可激活蛋白,其中所述CM2直接或间接与所述MM2的N端偶联并且所述MM2直接或间接与所述EM1的N端偶联。

29.如权利要求26中任一项所述的可激活蛋白,其中所述MM2直接或间接与所述EM2的N端偶联。

30.如权利要求1-29中任一项所述的可激活蛋白,其中所述第一靶标或表位为肿瘤相关抗原。

31.如权利要求30所述的可激活蛋白,其中所述肿瘤相关抗原为人表皮生长因子受体2(HER2)。

32.如权利要求31所述的可激活蛋白,其中所述AB1为曲妥珠单抗的Fab。

33.如权利要求31所述的可激活,其中所述HVD1包含SEQ ID NO:27的序列并且所述LVD1包含SEQ ID NO:17的序列。

34.如权利要求1-33中任一项所述的可激活蛋白,其中AB2为:

接合免疫效应细胞的scFv;

接合白细胞的scFv;

接合T细胞的scFv;

接合NK细胞的scFv;

接合巨噬细胞的scFv;或

接合单个核细胞的scFv。

35.如权利要求1-34中任一项所述的可激活蛋白,其中AB2为或来源于抗CD3εscFv或抗

CTLA-4scFv。

36.如权利要求35所述的可激活蛋白,其中所述AB2为或来源于抗CD3εscFv。

37.如权利要求36所述的可激活蛋白,其中所述HVD2包含SEQ ID NO:30的序列并且所述LVD2包含SEQ ID NO:31的序列。

38.如权利要求1-37中任一项所述的可激活蛋白,其中AB1为或来源于抗HER2抗体。

39.如权利要求1-38中任一项所述的可激活蛋白,其中CM1和CM2各自独立地包含在肿瘤微环境中上调的蛋白酶的底物。

40.如权利要求1-39中任一项所述的可激活蛋白,其中AB1为抗原结合片段(Fab)。

41.如权利要求1-40中任一项所述的可激活蛋白,其中所述第二靶标为共刺激分子。

42.如权利要求41所述的可激活蛋白,其中所述共刺激分子为CD3。

43.如权利要求1-42中任一项所述的可激活蛋白,其中所述CM1和所述CM2中的每一者包含相同蛋白酶的底物。

44.如权利要求1-42中任一项所述的可激活蛋白,其中所述CM1和所述CM2包含不同蛋白酶的底物。

45.一种可激活分子,所述可激活分子包含:

特异性结合于第一靶标的第一靶标结合结构域(TB1);

特异性结合于第二靶标的第二靶标结合结构域(TB2),其中所述TB2直接或间接与所述TB1偶联;

第一掩蔽部分(MM1),所述第一掩蔽部分经由第一可裂解部分(CM1)直接或间接与所述TB1偶联,其中所述MM1抑制所述TB1与所述第一靶标的结合;

半衰期延长部分(EM)和第二掩蔽部分(MM2),所述半衰期延长部分和第二掩蔽部分经由第二可裂解部分(CM2)直接或间接与所述TB1或与所述TB2偶联,其中所述MM2抑制所述TB2与所述第二靶标的结合,

其中所述可激活分子的组分被配置成使得所述CM1和所述CM2的裂解将所述MM1、所述MM2和所述EM从直接或间接与所述TB2偶联的所述TB1释放出来,并且

其中任选地所述TB1为包含HVD1和LVD1的抗原结合分子(AB1),并且任选地所述TB2为包含HVD2和LVD2的抗原结合分子(AB2)。

46.如权利要求1-45中任一项所述的可激活蛋白,其中所述CM1和所述CM2中的每一者独立地包含选自由以下组成的组的蛋白酶的底物:ADAMS、ADAMTS、ADAM8、ADAM9、ADAM10、ADAM12、ADAM15、ADAM17/TACE、ADAMDEC1、ADAMTS1、ADAMTS4、ADAMTS5、天冬氨酸蛋白酶、BACE、肾素、天冬氨酸组织蛋白酶、组织蛋白酶D、组织蛋白酶E、凋亡蛋白酶、凋亡蛋白酶1、凋亡蛋白酶2、凋亡蛋白酶3、凋亡蛋白酶4、凋亡蛋白酶5、凋亡蛋白酶6、凋亡蛋白酶7、凋亡蛋白酶8、凋亡蛋白酶9、凋亡蛋白酶10、凋亡蛋白酶14、半胱氨酸组织蛋白酶、组织蛋白酶B、组织蛋白酶C、组织蛋白酶K、组织蛋白酶L、组织蛋白酶S、组织蛋白酶V/L2、组织蛋白酶X/Z/P、半胱氨酸蛋白酶、克鲁兹蛋白酶、豆荚蛋白、Otubain-2、KLK、KLK4、KLK5、KLK6、KLK7、KLK8、KLK10、KLK11、KLK13、KLK14、金属蛋白酶、穿膜肽酶、脑啡肽酶、PSMA、BMP-1、MMP、MMP1、MMP2、MMP3、MMP7、MMP8、MMP9、MMP10、MMP11、MMP12、MMP13、MMP14、MMP15、MMP16、MMP17、MMP19、MMP20、MMP23、MMP24、MMP26、MMP27、丝氨酸蛋白酶、激活蛋白C、组织蛋白酶A、组织蛋白酶G、糜蛋白酶、凝血因子蛋白酶、FVIIa、FIXa、FXa、FXIa、FXIIa、弹性蛋白酶、颗粒

酶B、胍基苯甲酸酶、HtrA1、人中性粒细胞弹性蛋白酶、乳铁蛋白、马拉素、NS3/4A、PACE4、纤溶酶、PSA、tPA、凝血酶、类胰蛋白酶、uPA、II型跨膜、丝氨酸蛋白酶、TTSP、DESC1、DPP-4、FAP、黑珀素、间质蛋白酶-2、MT-SP1/间质蛋白酶、TMPRSS2、TMPRSS3和TMPRSS4。

47.如权利要求1-46中任一项所述的可激活蛋白,其中所述MM1是长度为2至40个氨基酸的肽。

48.如权利要求1-47中任一项所述的可激活蛋白,其中所述MM2是长度为2至40个氨基酸的肽。

49.如权利要求47或48所述的可激活蛋白,其中

所述AB2的重链可变区直接或间接与所述AB1的重链片段的C端偶联;

所述MM2的N端经由所述CM2直接或间接与所述AB2的轻链可变区的C端偶联,并且

所述EM包含第一Fc结构域与第二Fc结构域的二聚体,并且所述MM2的C端直接或间接与所述EM的所述第一Fc结构域的N端偶联。

50.如权利要求47或48所述的可激活蛋白,其中

所述AB2的所述重链可变区直接或间接与所述AB1的所述轻链片段的C端偶联,

所述MM2的N端经由所述CM2直接或间接与所述AB1的所述重链片段的C端偶联,并且

所述EM包含第一Fc结构域与第二Fc结构域的二聚体,并且所述MM2的C端直接或间接与所述EM的所述第一Fc结构域的N端偶联。

51.如权利要求47或48所述的可激活蛋白,其中

所述AB2的所述重链可变区直接或间接与所述AB1的所述轻链片段的C端偶联,

所述EM包含第一Fc结构域与第二Fc结构域的二聚体,并且所述第一Fc结构域的N端经由所述CM2直接或间接与所述AB1的所述重链片段的C端偶联,并且

所述MM2的N端直接或间接与所述第二Fc结构域的C端偶联。

52.如权利要求47或48所述的可激活蛋白,其中

所述AB2的所述重链可变区直接或间接与所述AB1的所述轻链片段的C端偶联,

所述EM包含第一Fc结构域与第二Fc结构域的二聚体,并且所述第一Fc结构域的N端经由所述CM2直接或间接与所述AB1的所述重链片段的C端偶联,并且

所述MM2的C端直接或间接与所述第二Fc结构域的N端偶联。

53.如权利要求49-52中任一项所述的可激活蛋白,所述可激活蛋白还包含介于所述MM2和直接或间接与所述MM2偶联的所述第一Fc结构域或所述第二Fc结构域之间的接头。

54.如权利要求1-53中任一项所述的可激活蛋白,其中所述MM1包含SEQ ID NO:40的序列并且所述MM2包含SEQ ID NO:34-37或66-70中的任一者的序列。

55.如权利要求1-54中任一项所述的可激活蛋白,其中所述MM1与所述AB1结合的解离常数超过所述AB1与所述第一靶标或表位结合的解离常数,并且所述MM2与所述AB2结合的解离常数超过所述AB2与所述第二靶标或表位结合的解离常数。

56.如权利要求1-55中任一项所述的可激活蛋白,其中所述可激活蛋白的组分被配置成使得所述CM1和所述CM2的裂解将所述MM1、所述MM2和所述EM从所述可激活蛋白分离,从而产生与包含所述TB1、所述TB2和所述EM的对应分子相比具有更短半衰期的激活蛋白。

57.如权利要求1-55中任一项所述的可激活蛋白,其中所述可激活蛋白的组分被配置成使得所述CM1和所述CM2的裂解将所述MM1、所述MM2和所述EM从所述可激活蛋白分离,从

而产生与包含所述TB1、所述TB2和所述EM的对应分子相比具有更高靶标结合活性的激活蛋白。

58.如权利要求1-57中任一项所述的可激活蛋白,其中所述第二多肽还包含介于所述MM2与所述AB2之间的接头(L2)。

59.如权利要求58所述的可激活蛋白,其中L2是长度为5至30个、6至29个、7至28个、8至27个、9至26个、10至25个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个或27个氨基酸的肽。

60.如权利要求1-59中任一项所述的可激活蛋白,其中所述第二多肽还包含介于所述AB2与所述AB1之间的接头(L3)。

61.如权利要求60所述的可激活蛋白,其中L3是长度为5至30个、6至29个、7至28个、8至27个、9至26个、10至25个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个或27个氨基酸的肽。

62.如权利要求45所述的可激活分子,所述可激活分子还包含权利要求1-44中的任一项或多项的特征。

63.一种可激活蛋白,所述可激活蛋白包含:

特异性结合于第一靶标的第一抗原结合结构域(AB1),其中所述AB1包含第一重链可变结构域(HVD1)和第一轻链可变结构域(LVD1);

特异性结合于第二靶标的第二抗原结合结构域(AB2),其中所述AB2包含第二重链可变结构域(HVD2)和第二轻链可变结构域(LVD2),其中所述AB2直接或间接与所述HVD1的N端或与所述LVD1的N端偶联;

第一掩蔽部分(MM1),所述第一掩蔽部分经由第一可裂解部分(CM1)和任选的一个或多个接头与所述AB1偶联,其中所述MM1抑制所述AB1与所述第一靶标的结合;

第二掩蔽部分(MM2),所述第二掩蔽部分经由第二可裂解部分(CM2)和任选的一个或多个接头与所述AB1偶联,其中所述MM2抑制所述AB2与所述第二靶标的结合;

半衰期延长部分(EM),所述半衰期延长部分经由第三可裂解部分(CM3)和任选的一个或多个接头直接或间接与所述HVD1的C端或与所述LVD1的C端偶联。

64.如权利要求63所述的可激活分子,所述可激活分子还包含权利要求1-61中的任一项或多项的特征。

65.一种组合物,所述组合物包含如权利要求1至64中任一项所述的可激活蛋白和载体。

66.如权利要求65所述的组合物,其中所述组合物为药物组合物,其中所述载体为药学上可接受的载体。

67.一种容器、小瓶、注射器、注射笔或药盒,其包含至少一剂的如权利要求66所述的组合物。

68.一种核酸,所述核酸包含编码权利要求8、10-13、58或60中的任一项的第二多肽的序列。

69.一种载体,所述载体包含如权利要求68所述的核酸。

70.一种细胞,所述细胞包含如权利要求68所述的核酸或如权利要求69所述的载体。

71.一种缀合的可激活蛋白,所述缀合的可激活蛋白包含与剂缀合的如权利要求1至64

中任一项所述的可激活蛋白。

72.如权利要求71所述的缀合的可激活蛋白,其中所述剂为治疗剂、抗肿瘤剂、毒素、诊断剂、治疗性大分子、靶向部分或可检测部分。

73.如权利要求71或权利要求72所述的缀合的可激活蛋白,其中所述剂经由接头与所述抗体缀合。

74.如权利要求72所述的缀合的可激活蛋白,其中所述接头为可裂解接头。

75.如权利要求72所述的缀合的可激活蛋白,其中所述接头为不可裂解接头。

76.一种治疗有需要的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的如权利要求1至64中任一项所述的可激活蛋白、如权利要求65或66所述的组合物或如权利要求71-75中任一项所述的缀合的可激活蛋白。

77.如权利要求76所述的方法,其中所述受试者已被鉴定或诊断为患有癌症。

78.一种产生可激活蛋白的方法,所述方法包括:

在培养基中在足以产生所述可激活蛋白的条件下培养如权利要求70所述的细胞;以及

从所述细胞或所述培养基回收所述可激活蛋白。

79.如权利要求78所述的方法,所述方法还包括分离从所述细胞或所述培养基回收的所述可激活蛋白。

80.如权利要求79所述的方法,其中分离所述可激活蛋白使用蛋白质纯化标签和/或尺寸排阻色谱法进行。

81.如权利要求78-80中任一项所述的方法,所述方法还包括将所述可激活蛋白配制成药物组合物。

可激活多特异性分子和其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2022年4月1日提交的美国临时申请No.US63/326,692的优先权益,所述临时申请以引用的方式整体并入本文中。

[0003] 序列表

[0004] 与本申请一起由EFS提交的序列表名为“4862-122PCT.xml”,创建于2023年3月30日,大小为639,463字节,以引用的方式整体并入本文中。

技术领域

[0005] 本公开涉及生物技术领域,更具体地说,涉及可激活多特异性分子。

背景技术

[0006] 基于抗体的疗法已经为各种疾病提供了有效的治疗方法。然而,在一些情况下,由广泛的靶标表达产生的毒性限制了它们的治疗效果。此外,基于抗体的治疗剂还表现出其它局限性,如施用后从循环中快速清除。

[0007] 可激活抗体推进了扩大基于抗体的疗法的治疗指数的努力。这些分子以可激活的前药形式施用,前药在体内所需作用部位或附近被激活。这种作用机制可使亲本抗体的治疗指数增加。

[0008] 然而,仍然需要其它策略来提高基于抗体的疗法的治疗指数。

发明内容

[0009] 本公开提供了一种可激活蛋白和相关组合物和方法。

[0010] 在一个方面,本公开提供了一种可激活蛋白,所述可激活蛋白包含:特异性结合于第一靶标的第一靶标结合结构域(TB1);特异性结合于第二靶标的第二靶标结合结构域(TB2),其中所述TB2与所述TB1偶联;第一掩蔽部分(MM1),所述第一掩蔽部分经由第一可裂解部分(CM1)与所述TB1偶联,其中所述MM1抑制所述TB1与所述第一靶标的结合;第二掩蔽部分(MM2),所述第二掩蔽部分抑制所述TB2与所述第二靶标的结合;第二可裂解部分(CM2);以及半衰期延长部分(EM),所述半衰期延长部分直接或间接与所述MM1或所述MM2偶联,其中所述可激活蛋白的组分被配置成使得在CM1和CM2裂解之后,所得激活蛋白包含TB1和TB2,但不包含MM1、MM2和EM。如本文所用并且除非另有说明,否则可激活分子的“偶联”组分可以经由直接共价键或间接共价键偶联,例如经由一个或多个连接肽(也称为“接头”)、可裂解部分或可激活蛋白的其它组分偶联。

[0011] 在一个方面,本公开提供了一种可激活蛋白,所述可激活蛋白包含:特异性结合于第一靶标的第一抗原结合结构域(AB1),其中所述AB1包含第一重链可变结构域(HVD1)和第一轻链可变结构域(LVD1);特异性结合于第二靶标的第二抗原结合结构域(AB2),其中所述AB2包含第二重链可变结构域(HVD2)和第二轻链可变结构域(LVD2),并且所述AB2直接或间接与所述HVD1的C端或与所述LVD1的C端偶联;第一掩蔽部分(MM1),所述第一掩蔽部分经由

第一可裂解部分(CM1)(直接或间接,例如经由一个或多个接头)与所述AB1偶联,其中所述MM1抑制所述AB1与所述第一靶标的结合;半衰期延长部分(EM),所述半衰期延长部分直接或间接与第二掩蔽部分(MM2)偶联,其中所述EM经由第二可裂解部分(CM2)(直接或间接,例如经由一个或多个接头或可激活蛋白的其它组分)与所述AB1或与所述AB2偶联,并且其中所述MM2抑制所述AB2与所述第二靶标的结合。

[0012] 在一个方面,本公开提供了一种可激活蛋白,所述可激活蛋白包含:特异性结合于第一靶标的第一抗原结合结构域(AB1),其中所述AB1包含第一重链可变结构域(HVD1)和第一轻链可变结构域(LVD1);特异性结合于第二靶标的第二抗原结合结构域(AB2),其中所述AB2包含第二重链可变结构域(HVD2)和第二轻链可变结构域(LVD2),并且所述AB2直接或间接与所述HVD1或所述LVD1的C端偶联;第一掩蔽部分(MM1),所述第一掩蔽部分经由第一可裂解部分(CM1)(直接或间接,例如经由一个或多个接头)与所述AB1偶联,其中所述MM1抑制所述AB1与所述第一靶标的结合;以及半衰期延长部分(EM),所述半衰期延长部分直接或间接与第二掩蔽部分(MM2)偶联,其中所述EM和所述MM2经由第二可裂解部分(CM2)(直接或间接)与所述AB1或与所述AB2偶联,并且其中所述MM2抑制所述AB2与所述第二靶标的结合。

[0013] 在一个方面,本公开提供了一种可激活蛋白,所述可激活蛋白包含:特异性结合于第一靶标的第一抗原结合结构域(AB1),其中所述AB1包含第一重链可变结构域(HVD1)和第一轻链可变结构域(LVD1);特异性结合于第二靶标的第二抗原结合结构域(AB2),其中所述AB2包含第二重链可变结构域(HVD2)和第二轻链可变结构域(LVD2),并且所述AB2直接或间接与所述HVD1或所述LVD1的C端偶联;第一掩蔽部分(MM1),所述第一掩蔽部分经由第一可裂解部分(CM1)(直接或间接,例如经由一个或多个接头)与所述AB1偶联,其中所述MM1抑制所述AB1与所述第一靶标的结合;以及半衰期延长部分(EM),所述半衰期延长部分包含第一半衰期延长部分(EM1)与第二半衰期延长部分(EM2)的二聚体,其中所述EM1经由第二可裂解部分(CM2)(直接或间接,例如经由一个或多个接头)与所述AB1偶联,并且其中所述EM2直接或间接与第二掩蔽部分(MM2)偶联,其中所述MM2抑制所述AB2与所述第二靶标的结合。

[0014] 在一个方面,本公开提供了一种可激活蛋白,所述可激活蛋白包含:特异性结合于第一靶标的第一靶标结合结构域(TB1);特异性结合于第二靶标的第二靶标结合结构域(TB2),其中所述TB2直接或间接与所述TB1偶联;第一掩蔽部分(MM1),所述第一掩蔽部分经由第一可裂解部分(CM1)(直接或间接,例如经由一个或多个接头)与所述TB1偶联,其中所述MM1抑制所述TB1与所述第一靶标的结合;半衰期延长部分(EM)和第二掩蔽部分(MM2),所述半衰期延长部分和第二掩蔽部分经由第二可裂解部分(CM2)(直接或间接,例如经由一个或多个接头)与所述TB1或与所述TB2偶联,其中所述MM2抑制所述TB2与所述第二靶标的结合,其中可激活分子的组分被配置成使得CM1和CM2的裂解从TB1和TB2释放MM1、MM2和EM(适用时),并且其中任选地所述TB1为包含HVD1和LVD1的抗原结合分子(AB1),并且任选地所述TB2为包含HVD2和LVD2的抗原结合分子(AB2)。

[0015] 在一个方面,本公开提供了一种可激活蛋白,所述可激活蛋白包含:特异性结合于第一靶标的第一抗原结合结构域(AB1),其中所述AB1包含第一重链可变结构域(HVD1)和轻链可变结构域(LVD1);特异性结合于第二靶标的第二抗原结合结构域(AB2),其中所述AB2包含第二重链可变结构域(HVD2)和第二轻链可变结构域(LVD2),并且所述AB2直接或间接(例如,经由接头)与所述HVD1或所述LVD1的C端偶联;第一掩蔽部分(MM1),所述第一掩蔽部

分经由第一可裂解部分(CM1)(直接或间接,例如经由接头)与所述AB1偶联,其中所述MM1抑制所述AB1与所述第一靶标的结合;第二掩蔽部分(MM2),所述第二掩蔽部分经由第二可裂解部分(CM2)(直接或间接,例如经由接头)与所述AB2偶联,其中所述MM2抑制所述AB2与所述第二靶标的结合;以及半衰期延长部分(EM),所述半衰期延长部分直接或间接与所述MM1或所述MM2偶联。

[0016] 在另一方面,本公开提供了一种可激活蛋白,所述可激活蛋白包含:特异性结合于第一靶标的第一抗原结合结构域(AB1),其中所述AB1包含第一重链可变结构域(HVD1)和第一轻链可变结构域(LVD1);特异性结合于第二靶标的第二抗原结合结构域(AB2),其中所述AB2包含第二重链可变结构域(HVD2)和第二轻链可变结构域(LVD2),并且所述AB2直接或间接与所述HVD1的N端或与所述LVD1的N端偶联;第一掩蔽部分(MM1),所述第一掩蔽部分经由第一可裂解部分(CM1)和任选的一个或多个接头与所述AB1偶联,其中所述MM1抑制所述AB1与所述第一靶标的结合;第二掩蔽部分(MM2),所述第二掩蔽部分经由第二可裂解部分(CM2)和任选的一个或多个接头与所述AB2偶联,其中所述MM2抑制所述AB2与所述第二靶标的结合;半衰期延长部分(EM),所述半衰期延长部分经由第三可裂解部分(CM3)和任选的一个或多个接头与所述HVD1的C端或与所述LVD1的C端偶联。

[0017] 在一些实施方案中,EM为由第一片段可结晶(Fc)结构域与第二Fc结构域形成的二聚体。在一些实施方案中,所述蛋白至少包含第一多肽和第二多肽。

[0018] 在一些实施方案中,第一多肽从N端到C端依次包含MM1、CM1和VLD1(所述元件之间具有一个或多个任选的接头)。在一些实施方案中,第二多肽包含VHD1、VHD2、VLD2、CM2、MM2和第一Fc结构域,并且其中可激活蛋白还包含第三多肽,所述第三多肽包含第二Fc结构域。在一些实施方案中,第二多肽从N端到C端依次包含VHD1、VHD2、VLD2、CM2、MM2和第一Fc结构域。在一些实施方案中,第二多肽从N端到C端依次包含VHD1、CM2、MM2和第一Fc结构域。在一些实施方案中,第二多肽从N端到C端依次包含VHD1、CM2和第一Fc结构域。在一些实施方案中,第一多肽包含MM1、CM1和VLD1、VHD2以及VLD2。在一些实施方案中,第一多肽从N端到C端依次包含MM1、CM1、VLD1、VHD2和VLD2。在一些实施方案中,第一多肽从N端到C端依次包含MM1、CM1、VLD1、VLD2和VHD2。在一些实施方案中,所述蛋白包含第三多肽,并且其中第三多肽包含第二Fc结构域和MM2。在前述实施方案中的每一者中,并且除非另外说明,否则多肽可在所列出的每个元件之间包含例如一个或多个任选的接头。

[0019] 在一些实施方案中,MM2经由连接肽连接到第二Fc结构域的C端。在一些实施方案中,MM2经由连接肽(又称为“接头”)连接到第二Fc结构域的N端。在一些实施方案中,第二多肽还包含介于MM2与第一Fc结构域之间的接头(L1)。在一些实施方案中,L1是长度为5至30个、6至29个、7至28个、8至27个、9至26个、10至25个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个或24个氨基酸的肽。在前述段落以及本公开中公开的结构排列中,元件之间可任选地存在一个或多个接头。此外,本公开还考虑并包括可激活蛋白,其中任何一个或多个公开的元件任选地直接彼此相邻,使得元件之间没有接头或其它氨基酸序列。

[0020] 在一些实施方案中,第一Fc结构域为Fc结构域臼突变体并且第二Fc结构域为Fc结构域杵突变体。在一些实施方案中,Fc结构域臼突变体包含SEQ ID NO:2的序列并且Fc结构域杵突变体包含SEQ ID NO:1的序列。

[0021] 在一些实施方案中,第一靶标或表位为肿瘤相关抗原。在一些实施方案中,肿瘤相关抗原为人表皮生长因子受体2(HER2)。在一些实施方案中,AB1为曲妥珠单抗(trastuzumab)的Fab。在一些实施方案中,HVD1包含SEQ ID NO:27的序列并且LVD1包含SEQ ID NO:17的序列。在一些实施方案中,AB2为:接合免疫效应细胞的scFv;接合白细胞的scFv;接合T细胞的scFv;接合NK细胞的scFv;接合巨噬细胞的scFv;或接合单个核细胞的scFv。在一些实施方案中,AB2为或来源于抗CD3εscFv或抗CTLA-4scFv。在一些实施方案中,AB2为或来源于抗CD3εscFv。在一些实施方案中,HVD2包含SEQ ID NO:30的序列并且LVD2包含SEQ ID NO:31的序列。

[0022] 在一些实施方案中,AB1为或来源于抗HER2抗体。在一些实施方案中,AB1为scFv并且可激活蛋白为可激活双特异性T细胞接合剂(BiTE)或双亲和力重靶向抗体(DART)。在一些实施方案中,AB1为抗原结合片段(Fab)。在一些实施方案中,第二靶标为共刺激分子。在一些实施方案中,共刺激分子为CD3。

[0023] 在一些实施方案中,CM1和CM2中的每一者包含相同蛋白酶的底物。在一些实施方案中,CM1和CM2包含不同蛋白酶的底物。在一些实施方案中,CM1和CM2中的每一者独立地包含选自由以下组成的组的蛋白酶的底物:ADAMS、ADAMTS、ADAM8、ADAM9、ADAM10、ADAM12、ADAM15、ADAM17/TACE、ADAMDEC1、ADAMTS1、ADAMTS4、ADAMTS5、天冬氨酸蛋白酶、BACE、肾素、天冬氨酸组织蛋白酶、组织蛋白酶D、组织蛋白酶E、凋亡蛋白酶、凋亡蛋白酶1、凋亡蛋白酶2、凋亡蛋白酶3、凋亡蛋白酶4、凋亡蛋白酶5、凋亡蛋白酶6、凋亡蛋白酶7、凋亡蛋白酶8、凋亡蛋白酶9、凋亡蛋白酶10、凋亡蛋白酶14、半胱氨酸组织蛋白酶、组织蛋白酶B、组织蛋白酶C、组织蛋白酶K、组织蛋白酶L、组织蛋白酶S、组织蛋白酶V/L2、组织蛋白酶X/Z/P、半胱氨酸蛋白酶、克鲁兹蛋白酶(Cruzipain)、豆荚蛋白、Otubain-2、KLK、KLK4、KLK5、KLK6、KLK7、KLK8、KLK10、KLK11、KLK13、KLK14、金属蛋白酶、穿膜肽酶(Meprin)、脑啡肽酶、PSMA、BMP-1、MMP、MMP1、MMP2、MMP3、MMP7、MMP8、MMP9、MMP10、MMP11、MMP12、MMP13、MMP14、MMP15、MMP16、MMP17、MMP19、MMP20、MMP23、MMP24、MMP26、MMP27、丝氨酸蛋白酶、激活蛋白C、组织蛋白酶A、组织蛋白酶G、糜蛋白酶、凝血因子蛋白酶、FVIIa、FIXa、FXa、FXIa、FXIIa、弹性蛋白酶、颗粒酶B、胍基苯甲酸酶、HtrA1、人中性粒细胞弹性蛋白酶、乳铁蛋白、马拉素(Marapsin)、NS3/4A、PACE4、纤溶酶、PSA、tPA、凝血酶、类胰蛋白酶、uPA、II型跨膜、丝氨酸蛋白酶、TTSP、DESC1、DPP-4、FAP、黑珀素(Hepsin)、间质蛋白酶-2、MT-SP1/间质蛋白酶、TMPRSS2、TMPRSS3和TMPRSS4。

[0024] 在一些实施方案中,MM1和MM2长度各自独立地为2至40个氨基酸。在一些实施方案中,MM1和MM2长度各自独立地为4至30个氨基酸。在一些实施方案中,AB2的重链可变区直接或间接与AB1的重链片段的C端偶联,MM2的N端经由CM2(直接或间接,例如经由一个或多个接头)与AB2的轻链可变区的C端偶联,并且EM包含第一Fc结构域与第二Fc结构域的二聚体,并且MM2的C端直接或间接与EM的第一Fc结构域的N端偶联。在一些实施方案中,AB2的重链可变区直接或间接与AB1的轻链片段的C端偶联,MM2的N端经由CM2(直接或间接,例如经由一个或多个接头)与AB1的重链片段的C端偶联,并且EM包含第一Fc结构域与第二Fc结构域的二聚体,并且MM2的C端直接或间接与EM的第一Fc结构域的N端偶联。在一些实施方案中,AB2的重链可变区直接或间接与AB1的轻链片段的C端偶联,EM包含第一Fc结构域与第二Fc结构域的二聚体,并且第一Fc结构域的N端经由CM2(直接或间接,例如经由一个或多个接

头)与AB1的重链片段的C端偶联,并且MM2的N端直接或间接与第二Fc结构域的C端偶联。在一些实施方案中,AB2的重链可变区直接或间接与AB1的轻链片段的C端偶联,EM包含第一Fc结构域与第二Fc结构域的二聚体,并且第一Fc结构域的N端经由CM2(直接或间接,例如经由一个或多个接头)与AB1的重链片段的C端偶联,MM2的C端直接或间接与第二Fc结构域的N端偶联。

[0025] 在一些实施方案中,可激活蛋白还包含介于MM2和直接或间接与MM2偶联的第一Fc结构域或第二Fc结构域之间的接头。在一些实施方案中,MM1包含SEQ ID NO:40的序列并且MM2包含SEQ ID NO:34-37或66-70中的任一者的序列。在一些实施方案中,MM1与AB1结合的解离常数超过AB1与第一靶标或表位结合的解离常数,并且MM2与AB2结合的解离常数超过AB2与第二靶标或表位结合的解离常数。在一些实施方案中,相比于与激活分子相同但包含EM的对应分子,激活分子具有更短的半衰期。在一些实施方案中,相比于与激活分子相同但包含EM的对应分子,激活分子具有更高的靶标结合活性。在一些实施方案中,相比于可激活分子,激活分子具有更高的靶标结合活性。

[0026] 在一些实施方案中,第二多肽还包含介于MM2与AB2之间的接头(L2)。在一些实施方案中,L2长度为5至30、6至29、7至28、8至27、9至26、10至25、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26或27个氨基酸。在一些实施方案中,第二多肽还包含介于AB2与AB1之间的接头(L3)。在一些实施方案中,L3长度为5至30、6至29、7至28、8至27、9至26、10至25、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26或27个氨基酸。一般来说,在本文中的每个实施方案中,除非另外说明,否则多肽可在所列出的每个元件之间包含一个或多个任选的接头,并且这类接头长度可以为1至30、6至29、7至28、8至27、9至26、10至25、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26或27个氨基酸。

[0027] 在另一方面,本公开提供了一种组合物,所述组合物包含本文中的可激活蛋白和载体。在一些实施方案中,组合物为药物组合物,其中所述载体为药学上可接受的载体。

[0028] 在另一方面,本公开提供了一种容器、小瓶、注射器、注射笔或药盒,其包含至少一剂的本文中的组合物。

[0029] 在另一方面,本公开提供了一种核酸,所述核酸包含编码本文中的第二多肽的序列。

[0030] 在另一方面,本公开提供了一种载体,所述载体包含本文中的核酸。

[0031] 在另一方面,本公开提供了一种细胞,所述细胞包含本文中的核酸或载体。

[0032] 在另一方面,本公开提供了一种缀合的可激活蛋白,所述缀合的可激活蛋白包含与剂缀合的本文中的可激活蛋白。在一些实施方案中,剂为治疗剂、抗肿瘤剂、毒素、诊断剂、治疗性大分子、靶向部分或可检测部分。在一些实施方案中,剂经由接头与抗体缀合。在一些实施方案中,接头为可裂解接头。在一些实施方案中,接头为不可裂解接头。

[0033] 在另一方面,本公开提供了一种治疗有需要的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本文中的可激活蛋白、组合物或缀合的可激活蛋白。在一些实施方案中,受试者已被鉴定或诊断为患有癌症。

[0034] 在另一方面,本公开提供了一种产生可激活蛋白的方法,所述方法包括:在培养基中在足以产生所述可激活蛋白的条件下培养本文中的细胞;以及从细胞或培养基回收可激

活蛋白。在一些实施方案中,所述方法还包括从细胞或培养基分离回收的可激活蛋白。在一些实施方案中,分离可激活蛋白使用蛋白质纯化标签和/或尺寸排阻色谱法进行。在一些实施方案中,所述方法还包括将可激活蛋白配制成药物组合物。

附图说明

[0035] 参考以下阐述利用了本发明原理的说明性实施方案的详细描述以及附图将获得对本发明特征和优点的更好理解,在附图中:

[0036] 图1-4显示了示例性可激活分子的配置。所述分子被设计成使得由可激活分子的激活产生的激活分子不包含半衰期延长部分,因此具有比与激活分子相同但包含半衰期延长部分的对应分子更短的半衰期。

[0037] 图5是根据本公开的一些实施方案的例示性可激活(双重掩蔽)的双特异性抗体在被蛋白酶激活之前和之后的示意图。左侧示意性示出了可激活的双重掩蔽蛋白。元件501与505之间以及元件502与503之间的虚线表示可裂解部分。右侧示意性示出了激活蛋白。激活的双特异性抗体不包含掩蔽部分,因此相对于可激活的双特异性抗体,激活的双特异性抗体对其靶标的结合亲和力增加。激活的双特异性抗体也不包含半衰期延长部分,因此具有比可激活的双特异性抗体更短的半衰期。

[0038] 图6A是示例性双重掩蔽的双特异性可激活抗体的组分示意图,该抗体具有识别Her2的掩蔽Fab片段、识别CD3的掩蔽scFV组分、以及包含一对杵Fc结构域和臼Fc结构域的半衰期延长部分。图6B是显示编码如图6A所示的示例性双重掩蔽的双特异性可激活抗体的三种多肽的组分的示意图。虚线表示可裂解部分。

[0039] 图7A是在还原条件下跑动的SDS-PAGE凝胶的图像。凝胶按如下方式加载:(1)具有20GG CD3掩蔽体的双重掩蔽的双特异性可激活抗体(ProC1446,SEQ ID NO:21);(2)ProC1446和uPA的产物(ProC1446+uPA);(3)具有MN15a CD3掩蔽体的双重掩蔽的双特异性可激活抗体(ProC1447,SEQ ID NO:22);(4)ProC1447和uPA的产物(ProC1447+uPA);(5)具有MN15b CD3掩蔽体的双重掩蔽的双特异性可激活抗体(ProC1448,SEQ ID NO:23);并且(6)ProC1448和uPA的产物(ProC1448+uPA)。图7B是总结蛋白酶激活之前和之后每个可激活抗体构建体的组分的预期分子量的表格。

[0040] 图8提供了ELISA结合测定的结果,该测定确定可激活分子和激活分子结合与板结合的CD3抗原的能力:未掩蔽的参考双特异性分子(ProC531)、具有20GG CD3掩蔽体的双重掩蔽的可激活双特异性分子(ProC1446,SEQ ID NO:21)、ProC1446和uPA的产物(ProC1446+uPA)、具有MN15a掩蔽体的双重掩蔽的分子(ProC1447,SEQ ID NO:22)、ProC1447和uPA的产物(ProC1447+uPA)、具有MN15b掩蔽体的双重掩蔽的分子(ProC1448,SEQ ID NO:23)、ProC1448和uPA的产物(ProC1448+uPA)。结果显示,抗CD3 scFv与Fc区之间的相应CD3掩蔽体显示抗CD3 scFv与板上包被的CD3抗原的结合减弱。用蛋白酶uPA处理双重掩蔽的可激活双特异性抗体引起CD3抗原结合相当于未掩蔽的参考双特异性分子ProC531的结合。

[0041] 图9A-9C提供了HER2依赖性细胞毒性测定的结果,该测定确定双重掩蔽的可激活双特异性抗体的体外效力(图9A:ProC1446;图9B:ProC1447;图9C:ProC1448)。结果表明,本公开的蛋白酶处理(激活)的双特异性分子比具有相同HER2和CD3结合结构域但排列成不同格式的单价、未掩蔽的双特异性抗体对照(“ProC306”)活性更高。

[0042] 图10-11显示了示例性可激活分子的配置。所述分子包含双重掩蔽的可激活双特异性抗体,所述抗体具有经由第三可裂解部分与C端偶联的EM。所述分子被设计成使得由可激活分子的激活产生的激活分子不包含半衰期延长部分,因此具有比与激活分子相同但包含半衰期延长部分的对应分子更短的半衰期。

[0043] 图12是根据本公开的一些实施方案的例示性可激活(双重掩蔽)的双特异性抗体在被蛋白酶激活之前和之后的示意图。左侧示意性示出了可激活的双重掩蔽蛋白。右侧示意性示出了激活蛋白。激活的双特异性抗体不包含掩蔽部分,因此相对于可激活的双特异性抗体,激活的双特异性抗体对其靶标的结合亲和力增加。激活的双特异性抗体也不包含半衰期延长部分,因此具有比可激活的双特异性抗体更短的半衰期。虚线表示可裂解部分。

[0044] 图13A-13B分别提供了掩蔽的可激活短半衰期抗体ProC1446(SHL1)、ProC3007(SHL2)、ProC3008(SHL2)和掩蔽抗体ProC1441(1/2TCB,不是可激活的短半衰期抗体)和未掩蔽的(ProC1963(SHL1,无掩蔽体或Fc)、ProC1965(SHL2,无掩蔽体或Fc)和ProC306)抗CD3、抗HER2双特异性抗体以及二抗(“仅二抗”,阴性对照)与NCI-N87和SKOV3细胞(即,HER2结合)的结合结果。图13C提供了相同分子与Jurkat细胞的结合结果(即,CD3结合)。

[0045] 图14A-14B提供了使用NCI-N87细胞(图14A)和SKOV3细胞(图14B)进行的细胞毒性测定结果,所述测定显示在所指示浓度下ProC1963(SHL1)、ProC1965(SHL2)和ProC306的剂量反应。

[0046] 图15A-15B提供了使用NCI-N87细胞(图15A)和SKOV3细胞(图15B)进行的细胞毒性测定结果,所述测定显示在所指示浓度下ProC1963、ProC1965、ProC1446、ProC3007和ProC3008的剂量反应。

[0047] 图16A-16D提供了细胞毒性测定的结果。图16A-16B显示了使用NCI-N87细胞(图16A)和SKOV3细胞(图16B),对ProC1963、ProC1965、ProC3007、ProC3008、ProC306和ProC1441的剂量反应。图16C-16D显示了使用NCI-N87细胞(图16C)和SKOV3细胞(图16D),对ProC1963、ProC1965、ProC1446、ProC306和ProC1441的剂量反应。

[0048] 图17提供了使用NCI-N87异种移植模型的体内肿瘤生长测定的结果。该图显示了肿瘤体积与以毫克/公斤(mpk)为单位施用ProC1965、ProC3007、ProC3008和ProC1441进行初始治疗后天数的关系。

[0049] 本文中提供的图仅用于说明目的,不一定按比例绘制。

具体实施方式

[0050] 本文提供了具有相对低结合活性和包括半衰期延长部分(EM)的结构的可激活分子(例如,可激活蛋白,如可激活抗体和其它可激活治疗性或可激活诊断性蛋白质)。当通过暴露于某些激活条件下而被激活时(例如当可激活分子被递送到肿瘤时),所得激活分子与可激活分子相比具有更大的结合活性和更短的半衰期。在一个方面,可激活分子可以是可激活治疗性大分子。在一些方面,可激活治疗性大分子可以是可激活抗体或任何其它所需蛋白质,例如治疗性蛋白质。

[0051] 一般来说,本文中的可激活分子可以包括一个或多个靶标结合结构域(TB)、一个或多个减少、抑制或干扰TB与其靶标结合的掩蔽部分(MM)、一个或多个将一个或多个MM与一个或多个TB偶联的可裂解部分(CM)以及一个或多个经由一个或多个CM与TB偶联的半衰

期延长部分(EM)。多肽中两种成分的偶联可以是直接的或间接的。当两种组分直接偶联时,一种组分的C端的氨基酸残基与另一组分的N端的氨基酸残基形成肽键。当两种组分间接偶联时,两种组分之间会有一段氨基酸。在一些实例中,多肽的两种组分可以经由多肽中的一种或多种其它组分间接偶联,即一种或多种其它组分介于两种偶联组分之间。对于经由另一组分的间接偶联或连接,一种或多种其它组分可以是接头、TB(例如,AB)、CM、MM或它们的任意组合。

[0052] CM是包含序列特异性蛋白酶的底物的多肽,所述蛋白酶例如为在患病组织(例如肿瘤)的环境中比在健康组织中存在更多量(或更多量处于活性状态)的蛋白酶。本文所述的可激活分子的MM和EM可通过裂解CM从TB中释放出来,从而产生激活分子。与包含MM的对应可激活分子相比,激活分子对其靶标表现出更大的结合亲和力。相比于与激活分子相同但包含EM的对应分子,不含EM的激活分子可具有更短的半衰期。相比于与激活分子相同但包含EM的对应分子,激活分子可具有降低的毒性和减少的脱靶效应。

[0053] 在一些实施方案中,可激活分子可以是双重掩蔽的双特异性靶标结合分子。在一些方面,这类分子可包含至少两个靶标结合蛋白和至少两个掩蔽部分,掩蔽部分中的每一者抑制靶标结合蛋白与其靶标的结合。举例来说,可激活分子可包含特异性结合于第一靶标的第一靶标结合蛋白(TB1)、抑制TB1与第一靶标的结合的第一掩蔽部分(MM1)、位于MM1与TB1之间的可裂解部分(CM1)、特异性结合于第二靶标的第二靶标结合蛋白(TB2)、抑制TB2与第二靶标的结合的第二掩蔽部分(MM2)、位于MM2与TB2之间的可裂解部分(CM2)和经由可裂解部分(CM)与TB1或TB2偶联的EM。在一些实施方案中,EM可经由CM与TB偶联,所述CM还将MM与TB偶联。在一些实施方案中,EM可经由与CM1和CM2不同的CM(例如,第三CM或“CM3”)偶联到TB。在激活状态下,EM可从激活分子释放出来。因此相比于包含TB1、TB2和EM但不包含MM1或MM2的参考分子,激活分子(包含TB1和TB2但不包含MM1、MM2或EM)具有更短的半衰期。相比于包含TB1、TB2和EM但不包含MM1或MM2的参考分子,激活分子(包含TB1和TB2但不包含MM1、MM2和EM)具有更高的靶标结合活性。

[0054] 本文还提供了相关组合物、药盒、核酸、载体和重组细胞,以及相关方法,包括使用本文所述的任何可激活分子(例如可激活抗体和其它蛋白质)的方法和产生本文所述的任何可激活分子(例如可激活抗体和其它蛋白质)的方法。

[0055] 定义

[0056] 除非另有限定,否则本文中所使用的所有技术和科学术语均具有与本发明所属领域内的普通技术人员通常所理解相同的含义。本文描述了用于本公开中的方法和材料;还可使用本领域中已知的其它适合的方法和材料。材料、方法和实例仅是说明性的,不意图是限制性的。本文提及的所有出版物、专利申请、专利、序列、数据库条目以及其它参考文献都以引用的方式整体并入本文中。在冲突的情况下,将以本说明书为准,包括定义。

[0057] 术语“一个(种)(a/an)”是指所述冠词的一个(种)或多个(种)(即,至少一个(种))语法对象。借助于实例,“一个细胞”涵盖一个或多个细胞。

[0058] 如本文所用,术语“约”和“大约”当用于修饰数值或范围内指定的量时,表示数值以及与本领域技术人员已知的值的合理偏差。例如,在适当的情况下,±20%、±10%或±5%在所述值的预期含义内。

[0059] 浓度、量和其它数值数据可在本文中以范围格式表示或呈现。应了解,这类范围格

式仅为了方便和简洁而使用,因此应灵活解释为不仅包括明确叙述为范围的限值的数值,而且还包括涵盖在该范围内的所有个别数值或子范围,就好像每个数值和子范围被明确叙述一样。作为说明,“约0.01至2.0”的数值范围应解释为不仅包括明确叙述的约0.01至约2.0的值,而且还包括所指示范围内的个别值和子范围。因此,这个数值范围内包括个别值,例如0.5、0.7和1.5,以及子范围,例如0.5至1.7、0.7至1.5和1.0至1.5等。此外,无论范围的宽度或所描述的特征如何,这种解释都应适用。另外,应注意,除非另外指定,否则所有百分比都以重量计算。

[0060] 在理解本公开的范围时,如本文所用的术语“包括”或“包含”和它们的派生词意图是指定所陈述的特征、要素、组分、组、整数和/或步骤的存在,但不排除其它未陈述的特征、要素、组分、组、整数和/或步骤的存在的开放式术语。前述内容也适用于具有类似含义的词语,例如术语“包括”、“具有”和它们的派生词。如本文所用的术语“由……组成”和它的派生词意图是指定所陈述的特征、要素、组分、组、整数和/或步骤的存在,但排除其它未陈述的特征、要素、组分、组、整数和/或步骤的存在的封闭式术语。如本文所用的术语“基本上由……组成”意图指定所陈述的特征、要素、组分、组、整数和/或步骤以及不实质上影响特征、要素、组分、组、整数和/或步骤的一种或多种基本和新颖特征的那些特征、要素、组分、组、整数和/或步骤的存在。应了解,提及这些过渡术语(即“包含”、“由……组成”或“基本上由……组成”)中的任一者都为替换成未具体使用的任何其它过渡术语提供直接支持。举例来说,由于这个定义针对在本公开通篇公开的任何要素,所以将术语从“包含”修改为“基本上由……组成”或“由……组成”将得到直接支持。基于这个定义,本文公开或以引用的方式并入的任何要素都可包括在要求的发明中或从要求的发明排除。

[0061] 如本文所用,为了方便起见,多个化合物、要素或步骤可呈现在共同的清单中。然而,这些清单应解释为好像清单的每个成员被单独地标识为单独和独特成员一样。因此,仅基于它们在共同组中呈现而没有相反指示,这种清单的个别成员不应解释为同一清单的任何其它成员的事实上的等效物。

[0062] 术语“示例性”在本文用以意指用作实例、例子或说明。本文中描述为“示例性”的任何方面或设计不一定被解释为佳于或优于其它方面或设计。相反,使用示例性一词是为了以更具体的方式呈现概念。

[0063] 此外,某些分子、构建体、组合物、要素、部分、赋形剂、病症、疾患、性质、步骤等可在一个具体实施方案或方面的上下文中或在本公开的单独段落或章节中讨论。应了解,这仅是为了方便和简洁,并且任何这种公开内容都可同样适用于在本公开和权利要求书中的任何地方所见的任何其它实施方案或方面,并且意图与所述任何其它实施方案或方面组合,这些都形成本申请和在申请日要求的发明。举例来说,关于构建体、组合物或方法描述的构建体、分子、方法步骤、药盒或组合物的清单意图并且确实为与本公开的任何其它部分中描述的构建体、组合物、制剂和方法相关的实施方案找到直接支持,即使那些方法步骤、活性剂、药盒或组合物未在该实施方案或方面的上下文或章节中重新列出。

[0064] 可激活分子

[0065] 在一个方面,本文提供的可激活分子可以是可激活靶标结合蛋白(TB),例如可激活抗体或特异性结合于靶标的另一蛋白质。在一些实施方案中,可激活分子包含:特异性结合于靶标的TB(例如,抗原结合蛋白(AB));可裂解部分(CM),所述可裂解部分直接共价连接

到(又称为“直接偶联到”)或间接共价连接到(又称为“间接偶联到”)TB(例如AB),其中CM位于TB与掩蔽部分(MM)之间,所述掩蔽部分减少、抑制或干扰TB(例如AB)与其靶标的结合;以及一个或多个半衰期延长部分(EM),所述半衰期延长部分经由一个或多个CM与TB(例如,AB)偶联。通过裂解CM,MM和EM可从TB释放出来,产生激活分子。在一些实施方案中,可激活分子可包含:特异性结合于第一靶标的第一抗原结合蛋白(AB1);第一掩蔽部分(MM1),所述第一掩蔽部分抑制AB1与第一靶标的结合并经由第一可裂解部分(CM1)与AB1偶联;特异性结合于第二靶标(AB2)的第二抗原结合蛋白(AB2);第二掩蔽部分(MM2),所述第二掩蔽部分抑制AB2与第二靶标的结合并经由第二可裂解部分(CM2)与AB1或与AB2偶联;以及EM,所述EM经由可裂解部分与AB1或与AB2偶联。在一些方面,EM可以经由将MM1与AB1偶联的相同可裂解部分(CM1)偶联到AB1。在一些方面,EM可以是经由将MM2与AB2偶联的相同可裂解部分(CM2)偶联到AB2。在一些方面,EM可经由将MM2与AB1偶联的相同可裂解部分(CM2)偶联到AB1(参见例如图2)。在一些方面,EM可以经由第三可裂解部分(CM3)与AB1或AB2偶联。在每个前述方面,可激活分子的元件可以直接偶联,或经由元件之间的一个多个任选的接头间接偶联。在激活状态下,EM可从可激活蛋白释放出来,产生包含AB1和AB2但不包含MM1、MM2或EM的激活蛋白,其中相比于包含AB1、AB2和EM但不包含MM1或MM2的参考抗体,激活蛋白具有更短的半衰期。

[0066] 在一些实施方案中,可激活蛋白提供降低的毒性和/或脱靶副作用,如果TB未被掩蔽或未以其它方式抑制与靶标的结合,则TB(例如AB)在非治疗位点的结合可引起毒性和/或副作用。在可激活状态下,MM可能会干扰TB与其靶标分子的结合。

[0067] 在一些实施方案中,可激活蛋白包含:特异性结合于第一靶标的第一抗原结合蛋白(AB1),其中AB1包括包含重链片段和轻链片段的抗体或其片段;特异性结合于第二靶标的第二抗原结合蛋白(AB2),其中AB2包括包含重链可变区和轻链可变区的单链可变片段(scFv),并且AB2与AB1的重链片段或轻链片段的C端偶联;第一掩蔽部分(MM1),当可激活蛋白处于未激活状态时,所述第一掩蔽部分经由第一可裂解部分(CM1)与AB1偶联并抑制AB1与第一靶标的结合;第二掩蔽部分(MM2),当可激活蛋白处于未裂解状态时,所述第二掩蔽部分与AB2偶联并抑制AB2与第二靶标的结合;以及半衰期延长部分(EM),所述半衰期延长部分经由第二可裂解部分(CM2)与AB1或AB2的组分偶联。在一些实例中,AB1可以是Fab。在一些实例中,AB1可以是scFv。在一些方面,EM通过掩蔽部分,例如EM-MM-CM-AB或AB-CM-MM-EM结构与AB1或与AB2偶联,任选地一个或多个组分之间具有一个或多个接头。如本文所用,结构式中的符号“-”表示两个组分直接或间接偶联(例如组分之间可以存在任选的接头)。本公开的分子的结构配置在下文中详细描述,并且例如在图1-6中描绘。

[0068] 如本文所用,术语“可激活蛋白”和“可激活靶结合蛋白”(例如“可激活抗体”)以及与术语“完整”、“未裂解”和/或“无活性”一起的前述任一项可互换使用,是指包含至少一组MM、CM和TB,并且与包含相同TB的对应“激活”蛋白(例如激活抗体)与相同生物靶标的结合相比,与生物靶标的结合减弱的蛋白质。对于普通技术人员来说显而易见的是,将可激活蛋白暴露于CM特异性蛋白酶可以产生“激活”蛋白,其中MM不会降低、抑制或干扰TB(例如AB)与其靶标之间的结合。在一些实施方案中,适当的蛋白酶裂解CM可能引起MM的释放。在一些实施方案中,适当的蛋白酶裂解CM可能引起EM的释放。术语“激活蛋白”、“激活靶标结合蛋白”(例如“激活抗体”)、“裂解的可激活蛋白”和“裂解的可激活靶标结合蛋白”(例如“裂解

的可激活抗体”)在本文中可互换,是指将可激活蛋白暴露于CM特异性蛋白酶后产生的含TB的裂解产物。如本公开通篇所用,涉及可激活抗体的描述应解释为也适用于可激活靶标结合蛋白。

[0069] 如本文所用,术语“掩蔽部分”和“MM”在本文中可互换使用,是指当位于TB(例如AB)附近时干扰TB与生物靶标结合的肽或蛋白质。术语“可裂解部分”和“CM”在本文中可互换使用,是指包含序列特异性蛋白酶的底物的肽。在可激活蛋白质中,CM相对于MM和TB定位,这样裂解会产生能够与TB的生物靶标结合的分子。因此,与激活蛋白质相比,可激活蛋白质与生物靶标的结合降低。在一些实施方案中,可通过选择感兴趣的TB并构建可激活蛋白的剩余部分来设计可激活蛋白,以便MM提供TB的掩蔽或TB与其靶标的结合的减少。可考虑结构设计标准来提供该功能特征。

[0070] 可激活蛋白可以是多特异性(例如双特异性、三特异性、四特异性和其它多特异性可激活蛋白)可激活蛋白,其在被激活时能够结合于多种不同的抗原。在一些实施方案中,多特异性靶标结合蛋白可以是多价的,例如包含多个靶标结合位点,不管结合位点识别相同还是不同的抗原或表位。在一些实施方案中,可激活蛋白可以是单特异性的,例如当被激活时只能够与一种抗原结合。

[0071] 在一些实施方案中,可激活蛋白质是双特异性的。术语“双特异性”意指可激活蛋白在被激活时能够特异性地结合于两个不同的靶标。通常,可激活的双特异性可激活蛋白包含两个TB,即第一TB和第二TB,每个TB在激活后能够特异性地结合于不同的靶标(即,分别为第一靶标和第二靶标)。在一些实施方案中,在激活后,所得双特异性靶标结合分子能够同时结合两个靶标,例如在两个不同细胞上表达的两个靶标蛋白。

[0072] 在一些实施方案中,可激活蛋白可包含能够结合于与疾病相关的细胞(例如,肿瘤细胞)表面上的分子的AB1和能够结合于免疫细胞表面上的分子的AB2。这类双特异性可激活蛋白在被激活时可以同时与免疫细胞和与疾病相关的细胞(例如,肿瘤细胞)结合,从而激活免疫细胞并将激活的免疫细胞同与疾病相关的细胞交联。在一些实施方案中,可激活蛋白可以配制为前双特异性T细胞接合剂(前BiTE)分子、前嵌合抗原受体(前CAR)修饰的T细胞或其它工程化受体或其它免疫效应细胞(例如CAR修饰的NK细胞)的一部分。

[0073] 在一些实例中,可激活蛋白可以是可激活T细胞接合双特异性抗体(TCB)或其片段。举例来说,可激活蛋白可包含靶向与疾病相关的细胞的AB1和靶向T细胞受体的AB2。

[0074] 本公开包括呈本文所述的多种结构构型的可激活蛋白。下文提供了可激活蛋白的示例性构型。在可激活蛋白内,TB、MM、CM和EM的N端到C端顺序可颠倒。CM和MM可在氨基酸序列中重叠,例如,使得序列特异性蛋白酶所识别的CM序列至少部分地含在MM内。例如,考虑了可激活抗原结合蛋白的各种结构配置,其中AB1为抗原结合片段(Fab),AB2为单链可变片段,并且可以用下面的式表示(以氨基(N)端区域到羧基(C)端区域的顺序)。下面的式中,“:”分隔两个不同的多肽;“Fab_L”和“Fab_H”分别为Fab的轻链和重链片段(“Fab_L”包含可变轻链区(VL)和轻链恒定区;“Fab_H”包含可变重链区(VH)和CH1区);“VL*”和“VH*”为scFv的轻链和重链可变区。此外,如本文所用,并且除非另有说明,否则可激活分子组分之间的每个破折号(-)代表直接连接或经由一个或多个接头的间接连接。

[0075] (MM1-CM1-Fab_L):(Fab_H-VH*-VL*-CM2-MM2-EM)

[0076] (MM1-CM1-Fab_L):(Fab_H-VH*-VL*-CM2-EM-MM2)

[0077] Fab_L:(MM1-CM1-Fab_H-VH*-VL*-CM2-MM2-EM)

[0078] Fab_L:(MM1-CM1-Fab_H-VH*-VL*-CM2-EM-MM2)

[0079] (MM1-CM1-Fab_L-VH*-VL*-CM2-MM2-EM):Fab_H

[0080] (MM1-CM1-Fab_L-VH*-VL*-CM2-EM-MM2):Fab_H

[0081] (Fab_L-VH*-VL*-CM2-MM2-EM):(MM1-CM1-Fab_H)

[0082] (Fab_L-VH*-VL*-CM2-EM-MM2):(MM1-CM1-Fab_H)

[0083] (MM1-CM1-Fab_L-VH*-VL*):(Fab_H-CM2-MM2-EM)

[0084] (MM1-CM1-Fab_L-VH*-VL*):(Fab_H-CM2-EM-MM2)

[0085] (Fab_L-VH*-VL*):(MM1-CM1-Fab_H-CM2-MM2-EM)

[0086] (Fab_L-VH*-VL*):(MM1-CM1-Fab_H-CM2-EM-MM2)

[0087] (MM1-CM1-Fab_L-CM2-MM2-EM):(Fab_H-VH*-VL*)

[0088] (MM1-CM1-Fab_L-CM2-EM-MM2):(Fab_H-VH*-VL*)

[0089] (Fab_L-CM2-MM2-EM):(MM1-CM1-Fab_H-VH*-VL*)

[0090] (Fab_L-CM2-EM-MM2):(MM1-CM1-Fab_H-VH*-VL*)

[0091] (MM1-CM1-Fab_L):(MM2-CM2-VH*-VL*-Fab_H-CM3-EM)

[0092] (MM1-CM1-Fab_H):(MM2-CM2-VH*-VL*-Fab_L-CM3-EM)

[0093] (MM2-CM2-VH*-VL*-Fab_L):(MM1-CM1-Fab_H-CM3-EM)

[0094] (MM2-CM2-VH*-VL*-Fab_H):(MM1-CM1-Fab_L-CM3-EM)

[0095] 在任一配置中,可激活蛋白可包含任意两个组分之间的一个或多个接头。举例来说,可激活蛋白可包含MM1与CM1之间的接头、CM1与Fab_L之间的接头、Fab_H与VH*之间的接头、VH*与VL*之间的接头、VL*与CM2之间的接头、CM2与MM2之间的接头、MM2与EM之间的接头、Fab_L与VH*之间的接头、CM1与Fab_H之间的接头或它们的任何组合。

[0096] 在一些实施方案中,EM可包含两个或更多个部分(例如,一对Fc结构域)。例如,EM可以是包含两个部分EM1和EM2的蛋白质复合物。在这种情况下,这类可激活蛋白的实例可由下式表示(以氨基(N)端区域到羧基(C)端区域的顺序):

[0097] (MM1-CM1-Fab_L):(Fab_H-VH*-VL*-CM2-MM2-EM1):EM2

[0098] (MM1-CM1-Fab_L):(Fab_H-VH*-VL*-CM2-EM1-MM2):EM2

[0099] Fab_L:(MM1-CM1-Fab_H-VH*-VL*-CM2-MM2-EM1):EM2

[0100] Fab_L:(MM1-CM1-Fab_H-VH*-VL*-CM2-EM1-MM2):EM2

[0101] (MM1-CM1-Fab_L):(Fab_H-VH*-VL*-CM2-EM1):(MM2-EM2)

[0102] (MM1-CM1-Fab_L):(Fab_H-VH*-VL*-CM2-EM1):(EM2-MM2)

[0103] Fab_L:(MM1-CM1-Fab_H-VH*-VL*-CM2-EM1):(MM2-EM2)

[0104] Fab_L:(MM1-CM1-Fab_H-VH*-VL*-CM2-EM1):(EM2-MM2)

[0105] (MM1-CM1-Fab_L-VH*-VL*-CM2-MM2-EM1):Fab_H:EM2

[0106] (MM1-CM1-Fab_L-VH*-VL*-CM2-EM1-MM2):Fab_H:EM2

[0107] (Fab_L-VH*-VL*-CM2-MM2-EM1):(MM1-CM1-Fab_H):EM2

[0108] (Fab_L-VH*-VL*-CM2-EM1-MM2):(MM1-CM1-Fab_H):EM2

[0109] (MM1-CM1-Fab_L-VH*-VL*-CM2-EM1):Fab_H:MM2-EM2

[0110] (MM1-CM1-Fab_L-VH*-VL*-CM2-EM1):Fab_H:EM2-MM2

[0111] (Fab_L-VH*-VL*-CM2-EM1):(MM1-CM1-Fab_H):MM2-EM2

[0112] (Fab_L-VH*-VL*-CM2-EM1):(MM1-CM1-Fab_H):EM2-MM2

[0113] (MM1-CM1-Fab_L-VH*-VL*):(Fab_H-CM2-MM2-EM1):EM2

[0114] (MM1-CM1-Fab_L-VH*-VL*):(Fab_H-CM2-EM1-MM2):EM2

[0115] (Fab_L-VH*-VL*):(MM1-CM1-Fab_H-CM2-MM2-EM1):EM2

[0116] (Fab_L-VH*-VL*):(MM1-CM1-Fab_H-CM2-EM1-MM2):EM2

[0117] (MM1-CM1-Fab_L-VH*-VL*):(Fab_H-CM2-EM1):MM2-EM2

[0118] (MM1-CM1-Fab_L-VH*-VL*):(Fab_H-CM2-EM1):EM2-MM2

[0119] (Fab_L-VH*-VL*):(MM1-CM1-Fab_H-CM2-EM1):MM2-EM2

[0120] (Fab_L-VH*-VL*):(MM1-CM1-Fab_H-CM2-EM1):EM2-MM2

[0121] (MM1-CM1-Fab_L-CM2-MM2-EM1):(Fab_H-VH*-VL*):EM2

[0122] (MM1-CM1-Fab_L-CM2-EM1-MM2):(Fab_H-VH*-VL*):EM2

[0123] (Fab_L-CM2-MM2-EM1):(MM1-CM1-Fab_H-VH*-VL*):EM2

[0124] (Fab_L-CM2-EM1-MM2):(MM1-CM1-Fab_H-VH*-VL*):EM2

[0125] (MM1-CM1-Fab_L-CM2-EM1):(Fab_H-VH*-VL*):MM2-EM2

[0126] (MM1-CM1-Fab_L-CM2-EM1):(Fab_H-VH*-VL*):EM2-MM2

[0127] (Fab_L-CM2-EM1):(MM1-CM1-Fab_H-VH*-VL*):MM2-EM2

[0128] (Fab_L-CM2-EM1):(MM1-CM1-Fab_H-VH*-VL*):EM2-MM2

[0129] (MM1-CM1-Fab_L):(MM2-CM2-VH*-VL*-Fab_H-CM3-EM1):EM2

[0130] (MM1-CM1-Fab_H):(MM2-CM2-VH*-VL*-Fab_L-CM3-EM1):EM2

[0131] (MM2-CM2-VH*-VL*-Fab_L):(MM1-CM1-Fab_H-CM3-EM1):EM2

[0132] (MM2-CM2-VH*-VL*-Fab_H):(MM1-CM1-Fab_L-CM3-EM):EM2

[0133] 在一些实施方案中,EM1和EM2可以是两个可结晶片段(Fc)结构域。两个Fc结构域可以形成二聚体作为半衰期延长部分。在一些实例中,EM1和EM2可以是两个相同的Fc结构域,因此可以形成同二聚体。在一些构建体中,EM1和EM2包含具有两种不同氨基酸序列的Fc结构域,它们共同形成异二聚体。在一些实例中,两个Fc结构域可以是Fc结构域臼突变体和Fc结构域杵突变体并且可以形成异二聚体。在这些配置中的任一者中,可激活蛋白可包括一个或多个接头任意两个组分之间的。举例来说,可激活蛋白可包含MM1与CM1之间的接头、CM1与Fab_L之间的接头、Fab_H与VH*之间的接头、VH*与VL*之间的接头、VL*与CM2之间的接头、CM2与MM2之间的接头、MM2与EM之间的接头、Fab_L与VH*之间的接头、CM1与Fab_H之间的接头、CM2与EM1之间的接头、MM2与EM1之间的接头、MM2与EM2之间的接头或它们的任何组合。

[0134] 图1-4显示了本文公开的可激活分子的示例性配置。在这些非限制性实例中,可激活分子包含:AB1,其可以是Fab;AB2,其可以是scFv;EM,其是由两个Fc结构域形成的二聚体;MM1,其经由CM1与AB1偶联并且能够干扰AB1与其靶标结合;MM2,其能够干扰AB2与其靶标的结合;以及介于EM的Fc结构域与AB1或AB2之间的CM2。应当理解,图1-4中示例的可激活分子结构可以类似地应用于AB1和AB2是除Fab和scFv之外的抗原结合蛋白的分子。同样地,图1-4中示例的可激活分子结构可以类似地应用于AB1和AB2分别被TB1和TB2取代的分子,这些分子可以是不一定包含抗原结合结构域的靶标结合蛋白。

[0135] 图1显示了包含三种多肽的示例性可激活蛋白100。第一多肽从氨基(N)端区域到羧基(C)端区域依次包含MM1 101、任选的接头102、CM1 103、任选的接头104以及AB1的轻链片段105。第二多肽从氨基(N)端区域到羧基(C)端区域依次包含AB1的重链片段121、接头122、AB2的重链可变区123、接头124、AB2的轻链可变区125、接头126、CM2 127、任选的接头128、MM2 129、接头130以及EM的第一Fc结构域131。第三多肽包含EM的第二Fc结构域141。在一替代性示例性配置中,在图1中,105为AB1的重链片段并且121为AB1的轻链片段。在一替代性示例性配置中,在图1中,123为AB2的轻链可变区并且125为AB2的重链可变区。在一替代性示例性配置中,在图1中,EM的第一Fc结构域131为Fc结构域臼突变体并且EM的第二Fc结构域141为Fc结构域杵突变体。在一替代性示例性配置中,在图1中,EM的第一Fc结构域131为Fc结构域杵突变体并且EM的第二Fc结构域141为Fc结构域臼突变体。

[0136] 图2显示了包含三种多肽的另一示例性可激活蛋白200。第一多肽从氨基(N)端区域到羧基(C)端区域依次包含MM1 201、任选的接头202、CM1 203、任选的接头204、AB1的轻链片段205、接头206、AB2的重链可变区207、接头208以及AB2的轻链可变区209。第二多肽从氨基(N)端区域到羧基(C)端区域依次包含AB1的重链片段221、任选的接头222、CM2 223、任选的接头224、MM2 225、接头226以及EM的第一Fc结构域227。第三多肽包含EM的第二Fc结构域241。在一替代性示例性配置中,在图2中,205为AB1的重链片段并且221为AB1的轻链片段。在一替代性示例性配制实例中,在图2中,207为AB2的轻链可变区并且209为AB2的重链可变区。在一替代性示例性配制实例中,在图2中,EM的第一Fc结构域227为Fc结构域臼突变体并且EM的第二Fc结构域241为Fc结构域杵突变体。在一替代性示例性配制实例中,在图2中,EM的第一Fc结构域227为Fc结构域杵突变体并且EM的第二Fc结构域241为Fc结构域臼突变体。

[0137] 图3显示了包含三种多肽的另一示例性可激活蛋白300。第一多肽从氨基(N)端区域到羧基(C)端区域依次包含MM1 301、任选的接头302、CM1 303、任选的接头304、AB1的轻链片段305、接头306、AB2的重链可变区307、接头308以及AB2的轻链可变区309。第二多肽从氨基(N)端区域到羧基(C)端区域依次包含AB1的重链片段321、任选的接头322、CM2 323、任选的接头324以及EM的第一Fc结构域325。第三多肽包含从氨基(N)端区域到羧基(C)端区域依次包含EM的第二Fc结构域341、接头342和MM2 343。在一替代性示例性配置中,在图3中,305为AB1的重链片段并且321为AB1的轻链片段。在一替代性示例性配置中,在图3中,307为AB2的轻链可变区并且309为AB2的重链可变区。在一替代性示例性配置中,在图3中,EM的第一Fc结构域325为Fc结构域臼突变体并且EM的第二Fc结构域341为Fc结构域杵突变体。在一替代性示例性配置中,在图3中,EM的第一Fc结构域325为Fc结构域杵突变体并且EM的第二Fc结构域341为Fc结构域臼突变体。

[0138] 图4显示了包含三种多肽的另一示例性可激活蛋白400。第一多肽从氨基(N)端区域到羧基(C)端区域依次包含MM1 401、任选的接头402、CM1 403、任选的接头404、AB1的轻链片段405、接头406、AB2的重链可变区407、接头408以及AB2的轻链可变区409。第二多肽从氨基(N)端区域到羧基(C)端区域依次包含AB1的重链片段421、任选的接头422、CM2 423、任选的接头424以及EM的第一Fc结构域425。第三多肽包含从氨基(N)端区域到羧基(C)端区域依次包含MM2 441、接头442以及EM的第二Fc结构域443。在一替代性示例性配置中,在图4中,405为AB1的重链片段并且421为AB1的轻链片段。在一替代性示例性配置中,在图4中,

407为AB2的轻链可变区并且409为AB2的重链可变区。在一替代性示例性配置中,在图4中,EM的第一Fc结构域425为Fc结构域臼突变体并且EM的第二Fc结构域443为Fc结构域杵突变体。在一替代性示例性配置中,在图4中,EM的第一Fc结构域425为Fc结构域杵突变体并且EM的第二Fc结构域443为Fc结构域臼突变体。

[0139] 图5显示了示例性可激活双特异性抗体,其包含:结合第一靶标的Fab组分(501);包含CM1和掩蔽Fab组分的MM1的第一前结构域(505);结合第二靶标的scFv组分(502);包含CM2和掩蔽scFv组分的MM2的第二前结构域(503);以及包含一对杵和臼Fc结构域的EM(504)。激活后,CM1裂解,从激活的双特异性抗体中释放出MM1,CM2裂解,释放出MM2和Fc结构域(504)。与母体可激活双特异性抗体相比,缺少Fc结构域的激活双特异性抗体具有相对较短的半衰期。

[0140] 图6A显示了靶向Her2和CD3的示例性可激活双特异性抗体。在该实例中,可激活双特异性抗体包含三种多肽。第一多肽从N至C端依次包含:曲妥珠单抗(抗HER2抗体)的Fab的重链片段、具有25个氨基酸的接头、抗CD3 scFv、具有27个氨基酸的GSAT接头、CM1、用于掩蔽抗CD3 scFv的MM1、具有24个氨基酸的GS接头和Fc结构域臼突变体。第二多肽包含用于掩蔽Fab的MM2、CM2和Fab的轻链片段。第三多肽包含Fc结构域杵突变体。具有图6中的配置的可激活双特异性抗体的实例可包含:第一多肽,其包含SEQ ID NO:21-24中任一者的序列;第二多肽,其包含SEQ ID NO:18的序列;以及第三多肽,其包含SEQ ID NO:1的序列。图6B是形成图6A中所示的可激活双特异性抗体的三种多肽的示意图。

[0141] 图10显示了包含三种多肽的另一示例性可激活蛋白1000。第一多肽从氨基(N)端区域到羧基(C)端区域依次包含MM1 1001、任选的接头1002、CM1 1003、任选的接头1004以及AB1的轻链片段1005。第二多肽从氨基(N)端区域到羧基(C)端区域依次包含MM2 1021、任选的接头1022、CM2 1023、任选的接头1024、AB2的重链可变区1025、接头1026、AB2的轻链可变区1027、接头1028、AB1的重链片段1029、任选的接头1030、第三可裂解部分(CM3)1031、任选的接头1032和EM(EM1)的第一结构域1033。第三多肽包含EM(EM2)的第二结构域1041。在一替代性示例性配置中,在图10中,1005为AB1的重链片段并且1029为AB1的轻链片段。在一替代性示例性配置中,在图10中,1025为AB2的轻链可变区并且1027为AB2的重链可变区。在一替代性示例性配置中,在图10中,EM(EM1)的第一结构域1033为Fc结构域臼突变体并且EM(EM2)的第二结构域1041为Fc结构域杵突变体。在一替代性示例性配置中,在图10中,EM11033为Fc结构域杵突变体并且EM2 1041为Fc结构域臼突变体。

[0142] 图11显示了包含三种多肽的另一示例性可激活蛋白1100。第一多肽从氨基(N)端区域到羧基(C)端区域依次包含MM2 1101、任选的接头1102、CM2 1103、任选的接头1104、AB2的重链可变区1105、接头1106、AB2的轻链可变区1107、接头1108以及AB1的轻链片段1109。第二多肽从氨基(N)端区域到羧基(C)端区域依次包含MM11121、任选的接头1122、CM1 1123、任选的接头1124、AB1的重链片段1125、任选的接头1126、第三可裂解部分(CM3)1127、任选的接头1128和EM(EM1)的第一结构域1129。第三多肽包含EM(EM2)的第二结构域1141。在一替代性示例性配置中,在图11中,1109为AB1的重链片段并且1125为AB1的轻链片段。在一替代性示例性配置中,在图11中,1105为AB2的轻链可变区并且1107为AB2的重链可变区。在一替代性示例性配置中,在图11中,EM1 1129为Fc结构域臼突变体并且EM2 1141为Fc结构域杵突变体。在一替代性示例性配置中,在图11中,EM1 1129为Fc结构域杵突变体并且

EM2 1141为Fc结构域臼突变体。

[0143] 图12显示了示例性的可激活双特异性抗体,其包含结合第一靶标的Fab组分(1204);包含CM1(虚线)和掩蔽Fab组分的MM1(三角形)的第一前结构域(1203);结合第二靶标的scFv组分(1202);包含CM2(虚线)和掩蔽scFv组分的MM2(三角形)的第二前结构域(1201);包含一对杵和臼Fc结构域的EM(1206);以及介于EM与Fab之间的第三可裂解部分(CM3)(1205)。激活后,CM1裂解,从激活双特异性抗体释放出MM1,CM2裂解,释放出MM2,CM3裂解,释放出EM(1206)。与母体可激活双特异性抗体相比,缺少EM的激活的双特异性抗体具有相对较短的半衰期。

[0144] 在一些实施方案中,由本公开的可激活蛋白的激活产生的激活蛋白不附着于EM。与可激活蛋白相比,这种激活蛋白的半衰期可能更短。这类激活蛋白可具有比与激活蛋白相同但包含EM的对应蛋白更短的半衰期。如本文所用,术语"半衰期"是分子或分子复合物在环境中的浓度达到其原始浓度的50%所需的时间。在一些实例中,环境可以是血清,半衰期是血清半衰期,即分子或分子复合物在血清中(例如,在受试者的循环中)的浓度达到其原始浓度的50%所需的时间。在一些实例中,包含AB1和AB2但不含MM1、MM2或EM(即可激活蛋白的激活所致)的激活蛋白可具有比与激活蛋白相同但包含EM的对应蛋白更短的半衰期,即激活分子(AB1-AB2)的半衰期比对应蛋白(AB1-AB2-EM)的半衰期短。

[0145] 例如,由本文中的可激活蛋白的激活产生的激活蛋白可以具有小于15天、14天、13天、12天、11天、10天、9天、8天、7天、6天、5天、4天、3天、2天、1天、23小时、22小时、21小时、20小时、19小时、18小时、17小时、16小时、15小时、14小时、13小时、12小时、11小时、10小时、9小时、8小时、7小时、6小时、5小时、4小时或3小时的半衰期(例如血清半衰期)。在一个实例中,由本文中的可激活蛋白的激活产生的激活蛋白可以具有小于或等于5、4、3或2天的半衰期(例如,血清半衰期)。在一些实例中,由本文中的可激活蛋白的激活产生的激活蛋白的半衰期(例如,血清半衰期)至多可达与激活蛋白相同但包含EM的对应蛋白的半衰期(例如,血清半衰期)的90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%或5%。

[0146] 在一些实施方案中,由本文中的可激活蛋白的激活产生的激活蛋白(即,未附着于EM或MM的激活蛋白)可具有比与激活蛋白相同但包含附着于其的EM的对应蛋白更高的靶标结合活性。在一些实例中,包含TB1和TB2但不含MM1、MM2或EM的激活蛋白具有比与激活蛋白相同但包含EM的对应蛋白(即TB1-TB2-EM)更高的靶标结合活性水平。例如,由本文公开的可激活蛋白的激活产生的激活蛋白可具有比与激活蛋白相同但包含EM的对应蛋白的靶标结合活性至少高出10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、3倍、4倍、6倍、8倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍、300倍、400倍或500倍的靶标结合活性。

[0147] 在一些实施方案中,可激活蛋白(激活之前)的特征可在于,靶标结合活性小于未偶联MM(直接或间接)的TB的靶标结合活性的对照水平。例如,在一些实施方案中,可激活蛋白的特征在于,与未偶联MM的TB的靶标结合活性的对照水平相比,其靶标结合活性至少降低2、4、6、8、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、5000或10000倍。

[0148] 靶标结合蛋白

[0149] 根据本公开的可激活蛋白可包括一种或多个靶标结合蛋白(TB)。在一些实例中,

可激活蛋白可以是多特异性的。例如,可激活蛋白可包含多个TB,每个TB对同一靶标上的不同表位具有特异性。在一些实例中,本文中的可激活蛋白中的TB可结合于不同的靶标,例如不同类型细胞上的靶标。这样,在由本文公开的可激活蛋白的激活产生的激活蛋白中,TB可以共定位不同类型的细胞。在本公开的多特异性可激活蛋白的一些实例中,其中一个TB结合于免疫细胞上的靶标,并且另一个TB结合于与疾病相关的细胞。通过靶向和共定位免疫细胞和与疾病相关的细胞,激活蛋白可以为疾病提供针对性的治疗。

[0150] 在一些实施方案中,靶标结合蛋白(TB)可以是抗原结合蛋白(AB)。在一些实施方案中,AB可以是抗体或其片段,例如单克隆抗体、单链抗体、Fab片段、F(ab')$_2$片段、单链可变片段(scFv)、双链抗体(scFv的非共价二聚体)、单链抗体(scab)、VHH、结构域抗体(dAb)或单结构域抗体(纳米抗体,例如单结构域重链抗体、单结构域轻链抗体)。单结构域抗体可以是抗体片段,该抗体片段为单个单体可变抗体结构域。单结构域抗体可具有与相应的全长抗体相似的抗原亲和力。在一些实施方案中,AB可以是全长抗体。在一些实施方案中,AB可以是免疫活性片段。在一些实施方案中,AB可以是抗原结合片段("Fab")。在一个实例中,可激活蛋白包含第一AB的Fab和作为第二AB的scFv。在一些实施方案中,AB可以是scFv。在一些实施方案中,AB可以是小鼠抗体、其它啮齿动物抗体、嵌合抗体、人源化抗体或完全人单克隆抗体。本公开包括具有包含任何上面列出的结构域的一种或多种多肽,例如SDA、Fv、ScFv、Fab、scFab、VHH和dAb中的一者或多者与选自SDA、Fv、scFv、Fab、VHH、scFab和dAb中的一者或多者的组合的结构。

[0151] 术语"抗体"在本文中以其最广义使用,包括某些类型的免疫球蛋白分子,其包括一个或多个特异性结合于抗原或表位的抗原结合结构域。术语"抗体"具体包括例如完整抗体(例如,完整免疫球蛋白)、抗体片段、双特异性抗体和多特异性抗体。抗体的一个实例是由V_H-V_L二聚体形成的抗原结合结构域。本文描述了抗体的另外的实例。抗体的另外的实例是本领域已知的。

[0152] "轻链"由一个可变结构域(VL)和一个恒定结构域(CL)组成。有两种不同的轻链类型或类别,分别称为κ或λ。

[0153] "重链"由一个可变结构域(VH)和三个恒定区结构域(CH1、CH2、CH3)组成。重链主要有五个类别或同种型,其中一些有几种亚型,这些决定了抗体分子的功能活性。免疫球蛋白的五大类是免疫球蛋白M(IgM)、免疫球蛋白D(IgD)、免疫球蛋白G(IgG)、免疫球蛋白A(IgA)和免疫球蛋白E(IgE)。IgG是迄今为止最丰富的免疫球蛋白,有几个亚类(人的IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)。

[0154] "片段抗原结合"(Fab)含有与重链的VH结构域和CH1结构域配对的完整轻链。当抗体在铰链区以下被胃蛋白酶裂解时,会形成F(ab′)$_2$片段,在这种情况下,抗体分子的两个片段抗原结合结构域(Fab)仍然保持连接。F(ab′)$_2$片段含有两条完整的轻链,与通过铰链区接合在一起的重链的两个VH和CH1结构域配对。"可结晶片段"(Fc)片段(本文也称为F_C结构域)对应于配对的CH2和CH3结构域,是抗体分子中与效应分子和细胞相互作用的部分。重链同种型之间的功能差异主要在于Fc片段。"单链Fv"(scFv)仅含有通过一段合成肽连接到重链可变结构域(VH)的轻链可变结构域(VL)。单链Fv这个名称来源于片段可变。"铰链区"或"结构域间"是接合或连接Fab片段到Fc结构域的柔性氨基酸段。"合成铰链区"是接合或连接Fab片段到Fc结构域的氨基酸序列。

[0155] “前结构域”是指一种多肽,其一部分可抑制抗原结合,称为掩蔽部分(MM),一部分含有蛋白酶可裂解底物,称为可裂解部分(CM),当该多肽与靶标结合蛋白(TB)(例如,抗原结合蛋白(AB),例如抗体或其抗原结合片段)连接时,用以抑制TB或AB与抗原的结合。前结构域可包括MM与CM之间的连接肽(L1)。前结构域还可包括位于前结构域羧基端的连接肽(L2),以促进前结构域与抗体的键联。在某些实施方案中,前结构域包含以下各式之一(其中以下各式表示从N端到C端方向的氨基酸序列):(MM)-(CM)、(MM)-L1-(CM)、(MM)-(CM)-L2或(MM)-L1-(CM)-L2。

[0156] TB(例如AB)特异性结合于靶标。如本文所用,术语“特异性结合”、“免疫性结合”和“免疫性结合特性”是指在免疫球蛋白分子与所述免疫球蛋白具有特异性的抗原之间发生的类型的非共价相互作用。免疫结合相互作用的强度或亲和力可根据相互作用的解离常数(K_d)来表示,其中K_d越小表示亲和力越大。可使用本领域中众所周知的方法来定量所选择的多肽的免疫结合特性。一种这类方法需要测量抗原结合位点/抗原复合物形成和解离的速率,其中那些速率取决于复合物配偶体的浓度、相互作用的亲和力以及在两个方向上同等地影响速率的几何参数。因此,可通过计算浓度以及缔合和解离的实际速率来确定“缔合速率常数”(K_{on})和“解离速率常数”(K_{off})。(参见Nature361:186-87(1993))。K_{off}/K_{on}的比率能够删去与亲和力无关的所有参数,并且等于解离常数K_d。(通常参见Davies等人(1990)Annual Rev Biochem 59:439-473)。如通过例如放射性配体结合测定或本领域技术人员已知的类似测定的测定所测量,当解离常数(K_d)≤100μM,在一些实施方案中≤1μM,在一些实施方案中≤100nM,在一些实施方案中≤10nM,并且在一些实施方案中≤100pM至约1pM时,称本公开的TB或抗体结合结构域(AB)“特异性结合”或“免疫特异性结合”于靶标。

[0157] TB(例如AB)的靶标可以是蛋白质或其它类型的分子。TB的示例靶标包括细胞表面受体和分泌的结合蛋白(例如,生长因子)、可溶性酶、结构蛋白(例如,胶原蛋白、纤连蛋白)等。在一些实例中,TB的靶标可以是与受试者的疾病(例如,癌症)相关的蛋白质。

[0158] 在一些实施方案中,可激活蛋白中的TB可以与作为与疾病相关的细胞上或细胞内的分子的靶标。例如,可激活蛋白中的TB可与肿瘤细胞结合。在这种情况下,TB可与肿瘤相关抗原结合。如本文所用,术语“肿瘤相关抗原”意指与癌症相关的任何抗原,包括蛋白质、糖蛋白、神经节苷脂、碳水化合物、脂质。这种抗原可在肿瘤细胞(例如恶性细胞)上表达,或在肿瘤微环境(如肿瘤相关血管、细胞外基质、间充质基质或免疫浸润物)中表达。在一些实施方案中,作为AB靶标的肿瘤相关抗原可以是人表皮生长因子受体2(HER2)。例如,AB可以是曲妥珠单抗或其片段,例如曲妥珠单抗的Fab。

[0159] 在一些实施方案中,可激活蛋白中的AB可与作为免疫细胞上的分子和/或能够激活免疫细胞的靶标结合。在一些实例中,AB的靶标可以是共刺激分子,它是高效免疫反应所需的抗原受体或其配体以外的细胞表面分子。可以成为AB靶标的共刺激分子的实例包括T细胞受体(TCR)的组分、CD3ζ、CD3γ、CD3δ和CD3ε。

[0160] 在一些实例中,AB可以与T淋巴细胞,例如细胞毒性T淋巴细胞的表面上表达的共刺激分子结合,所述共刺激分子能够在与抗原结合分子相互作用后诱导T细胞激活。抗原结合分子与激活T细胞抗原的相互作用可通过触发T细胞受体复合物的信号级联来诱导T细胞激活。当被激活时,AB可与这种共刺激分子结合从而激活T细胞。如本文所用,“T细胞激活”是指T淋巴细胞、特别是细胞毒性T淋巴细胞的一种或多种细胞反应,选自:增殖、分化、细胞

因子分泌、细胞毒性效应分子释放、细胞毒性活性和激活标志物的表达。本发明的T细胞激活双特异性抗原结合分子能够诱导T细胞激活。

[0161] 在一些实例中,AB可与CD3结合。例如,CD3可以是CD3的ε亚基,例如NCBI RefSeq no.NP_000724.1的序列。在一些实例中,AB可以是抗CD3 scFv。抗CD3 scFv可包含US20190135943中的SEQ ID NO:1-9、143-145、149和150中的一个或多个序列,该文献以引用的方式整体并入本文中。这类序列包括例如以下:

抗 CD3 变体 v12
轻链可变结构域 LV12
QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPGQAPRGLIG GTNKRAPGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCALWYSNLWVF GGGTKLTVL (SEQ ID NO: 47)
重链可变结构域 HV12，
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVY YCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 48)
LV12-L3-HV12 其中 L3 为 GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 28)
QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPGQAPR GLIGGTNKRAPGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCALWYSNL WVFGGGTKLTVL[GGGGSGGGGSGGGGS]EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRF TISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 49)
抗 CD3 变体 v16
轻链可变结构域 LV12
上文提供的序列
重链可变结构域 HV20
EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLE WVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVY YCTRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 50)
LV12-L3-HV20
QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPGQAPR GLIGGTNKRAPGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCALWYSNL WVFGGGTKLTVL[GGGGSGGGGSGGGGS]EVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRF TISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 51)
抗 CD3 变体 v19
轻链可变结构域 LV19
QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVF GGGTKLTVL (SEQ ID NO: 52)

[0162]

重链可变结构域 HV20
上文提供的序列
LV19-L3-HV20
QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPR GLIGGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNL WVFGGGTKLTVL[GGGGSGGGGSGGGGS]EVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRF TISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 53)
抗 CD3 变体 v26
轻链可变结构域 LV19
上文提供的序列
重链可变结构域 HV12
上文提供的序列
LV19-L3-HV12
QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPR GLIGGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNL WVFGGGTKLTVL[GGGGSGGGGSGGGGS]EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRF TISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 54)

[0163]

[0164] CD3结合抗体的示例性CDR序列包括以下：

[0165]

名称	CD3 Ab CDR序列	SEQ ID NO:
SP34L1	RSSTGAVTTSNYAN	SEQ ID NO:7
SP34L2	GTNKRAP	SEQ ID NO:8
SP34L3	ALWYSNLWV	SEQ ID NO:9
SP34H1	TYAMN	SEQ ID NO:10
SP34H2	RIRSKYNNYATYYADSVKD	SEQ ID NO:11
SP34H3	HGNFGNSYVSWFAY	SEQ ID NO:12

[0166] 抗CD3 AB的另外的实例包括以下：

[0167] v619_HLc

[0168]

VH CDR1	SEQ ID NO: 10	TYAMN
VH CDR2	SEQ ID NO: 11	RIRSKYNNYATYYADSVKD
VH CDR3	SEQ ID NO: 13	HGNFGNSYVSWWAY

[0169]

VL CDR1	SEQ ID NO: 14	RSSTGAVTTSNYPN
VL CDR2	SEQ ID NO: 8	GTNKRAP
VL CDR3	SEQ ID NO: 15	VLWYSNRWV
重链可变结构域	SEQ ID NO: 30	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFST YAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYAT YYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTE DTAVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGTL VTVSS
轻链可变结构域	SEQ ID NO: 16	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTS NYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPA RFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLW YSNRWVFGGGTKLTVL
scFv	SEQ ID NO: 19	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFST YAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYAT YYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTE DTAVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGTL VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLT VSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYPNWVQQKP GQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKA ALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGG TKLTVL

[0170] v619_HLh

[0171]

VH CDR1	SEQ ID NO: 10	TYAMN
VH CDR2	SEQ ID NO: 11	RIRSKYNNYATYYADSVKD
VH CDR3	SEQ ID NO: 13	HGNFGNSYVSWWAY
VL CDR1	SEQ ID NO: 20	GSSTGAVTTSNYVN
VL CDR2	SEQ ID NO: 8	GTNKRAP
VL CDR3	SEQ ID NO: 15	VLWYSNRWV
重链可变结构域	SEQ ID NO: 30	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFST YAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYAT YYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTE DTAVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGTL VTVSS
轻链可变结构域	SEQ ID NO: 25	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTS NYVNWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPA RFSGSLIGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCVLW YSNRWVFGGGTKLTVL
scFv	SEQ ID NO: 26	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFST YAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYAT YYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTE DTAVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGTL VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSL TVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYVNWVQQ KPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLIGG KAALTLSGAQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFG GGTKLTVL

v619-HLh-CC4

[0172]

VH CDR1	SEQ ID NO: 10	TYAMN
VH CDR2	SEQ ID NO: 11	RIRSKYNNYATYYADSVKD
VH CDR3	SEQ ID NO: 12	HGNFGNSYVSWFAY
VL CDR1	SEQ ID NO: 20	GSSTGAVTTSNYVN
VL CDR2	SEQ ID NO: 8	GTNKRAP
VL CDR3	SEQ ID NO: 15	VLWYSNRWV
重链可变结构域	SEQ ID NO: 55	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFST YAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYAT YYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKT EDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGCGT LVTVSS
轻链可变结构域	SEQ ID NO: 56	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTT SNYVNWVQQKPGCAPRGLIGGTNKRAPGT PARFSGSLIGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCV LWYSNRWVFGGGTKLTVL
scFv	SEQ ID NO: 57	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFST YAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYAT YYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKT EDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGCGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPS LTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYVNWVQ QKPGCAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLIG GKAALTLSGAQPEDEAEYYCVLWYSNRWV FGGGTKLTVL

[0173] v619_Hh8

[0174]

VH CDR1	SEQ ID NO: 10	TYAMN
VH CDR2	SEQ ID NO: 11	RIRSKYNNYATYYADSVKD
VH CDR3	SEQ ID NO: 13	HGNFGNSYVSWWAY
VL CDR1	SEQ ID NO: 20	GSSTGAVTTSNYVN
VL CDR2	SEQ ID NO: 8	GTNKRAP
VL CDR3	SEQ ID NO: 39	VLWYSNLWV
重链可变结构域	SEQ ID NO: 30	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFST YAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYAT YYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKT EDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQG TLVTVSS
轻链可变结构域	SEQ ID NO: 58	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTT SNYVNWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGT PARFSGSLIGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCV LWYSNLWVFGGGTKLTVL
scFv	SEQ ID NO: 59	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFST YAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYAT YYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKT EDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQG

[0175]

		TLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEP SLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYVNWV QQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLI GGKAALTLSGAQPEDEAEYYCVLWYSNLW VFGGGTKLTVL

[0176] v619_HLp2

[0177]

VH CDR1	SEQ ID NO: 10	TYAMN
VH CDR2	SEQ ID NO: 11	RIRSKYNNYATYYADSVKD
VH CDR3	SEQ ID NO: 13	HGNFGNSYVSWWAY
VL CDR1	SEQ ID NO: 60	RSSTGAVTTSNYVN
VL CDR2	SEQ ID NO: 8	GTNKRAP
VL CDR3	SEQ ID NO: 61	ILWYSNRWV
重链可变结构域	SEQ ID NO: 30	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFST YAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYAT YYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKT EDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQG TLVTVSS
轻链可变结构域	SEQ ID NO: 62	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTT SNYVNWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGT PARFSGSLIGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCI LWYSNRWVFGGGTKLTVL
scFv	SEQ ID NO: 63	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFST YAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYAT YYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKT EDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQG TLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEP SLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYVNWV QQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLI GGKAALTLSGAQPEDEAEYYCILWYSNRW VFGGGTKLTVL

[0178] v619_Hh13

[0179]

VH CDR1	SEQ ID NO: 10	TYAMN
VH CDR2	SEQ ID NO: 11	RIRSKYNNYATYYADSVKD
VH CDR3	SEQ ID NO: 13	HGNFGNSYVSWWAY
VL CDR1	SEQ ID NO: 60	RSSTGAVTTSNYVN
VL CDR2	SEQ ID NO: 8	GTNKRAP
VL CDR3	SEQ ID NO: 15	VLWYSNRWV
重链可变结构域	SEQ ID NO: 30	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFST YAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYAT YYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKT EDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQG TLVTVSS
轻链可变结构域	SEQ ID NO: 64	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTT SNYVNWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGT

[0180]

		PARFSGSLIGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCV LWYSNRWVFGGGTKLTVL
scFv	SEQ ID NO: 65	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFST YAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYAT YYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKT EDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQG TLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEP SLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYVNWV QQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLI GGKAALTLSGAQPEDEAEYYCVLWYSNRW VFGGGTKLTVL

[0181] 在一些实施方案中,本文中的可激活蛋白可包含结合于肿瘤相关抗原的AB1和结合于共刺激分子的AB2。在一个实例中,可激活蛋白可包含结合于HER2的AB1和结合于CD3的AB2。在一特定实例中,可激活蛋白可包含作为抗HER2 Fab(例如,曲妥珠单抗的Fab)的AB1和作为抗CD3 scFv的AB2。

[0182] 在一些实施方案中,AB2可以与作为任何免疫效应细胞上的抗原的靶标结合。免疫效应细胞的实例包括白细胞、T细胞、自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、单个核细胞和髓系单个核细胞。在一些实例中,可激活蛋白可包含接合免疫效应细胞的双特异性可激活抗体,其将免疫效应细胞与另一个细胞(例如,与如癌症或感染等疾病相关的细胞)交联。

[0183] 可激活蛋白可包含接合白细胞的双特异性可激活抗体、接合T细胞的双特异性可激活抗体、接合NK细胞的双特异性可激活抗体、接合巨噬细胞的双特异性可激活抗体、接合单个核细胞的双特异性可激活抗体或接合髓系单个核细胞的双特异性可激活抗体。在一个实例中,可激活抗体可包含接合T细胞的双特异性抗体。

[0184] 半衰期延长部分

[0185] 可激活蛋白可包含半衰期延长部分(EM)。在可激活蛋白中,EM可经由CM与可激活蛋白中的TB或其组分偶联。一旦可激活蛋白被激活,EM就会从TB中裂解出来。在一些实施方案中,例如,CM位于TB的C端与EM的N端之间的位置。在这些实施方案中的某些实施方案中,CM位于TB的C端与EM的N端之间的位置,MM位于相对于CM为C端并且相对于EM为N端或C端的位置(例如,从N端到C端,TB-CM-EM、TB-CM-EM-MM、TB-CM-MM-EM等,其中每个“-”独立地表示直接或间接(例如,经由接头)偶联)(参见例如图1和图2)。在一些实施方案中,EM可以是二聚体,例如免疫球蛋白的一对Fc结构域。在这类实施方案中,第一多肽可包含TB、CM和第一Fc结构域,并且第二多肽可包含MM和第二Fc结构域,并且这两个多肽经由第一Fc结构域与第二Fc结构域之间的一个或多个二硫键共价连接。在这类实施方案中,MM可以位于第二Fc结构域的N端或C端(参见例如图3和图4),并且第一多肽上的CM的裂解引起MM和EM(例如,两个Fc结构域)从激活蛋白释放出来。因此,在一些实施方案中,由可激活蛋白的激活产生的激活蛋白不包含EM。在一些实例中,半衰期延长部分可以是血清半衰期延长部分,即能够延长血清中与EM附接的分子的半衰期。

[0186] 在一些实例中,EM可包含抗体的片段可结晶区域(Fc结构域)。例如,EM可以是IgG(例如,IgG1、IgG2或IgG4)的Fc结构域。在一些实例中,EM可包含由两个Fc结构域形成的二聚体。Fc结构域可以是野生型Fc结构域或突变体。例如,EM可包含由两个Fc结构域突变体形成的二聚体。在这种情况下,两个Fc结构域突变体可包含Fc结构域臼突变体和Fc结构域杵

突变体。杵突变体和臼突变体可彼此相互作用以促进两个Fc结构域的二聚化。在一些实施方案中,杵突变体和臼突变体可在两个Fc结构域之间的界面内(例如在CH3结构域中)包含一个或多个氨基酸修饰。在一个实例中,修饰包含在一个抗体重链中的氨基酸取代T366W和任选的氨基酸取代S354C,以及在另一个抗体重链中的氨基酸取代T366S、L368A、Y407V和任选的Y349C(根据EU编号系统编号)。Fc结构域杵突变体的一个实例包含SEQ ID NO:1的序列。Fc结构域臼突变体的一个实例包含SEQ ID NO:2的序列。

[0187] Fc结构域突变体的实例还包括美国专利No.7,695,936中描述的那些,该专利以引用的方式整体并入本文中。在一个实例中,修饰包含在一个IgG Fc结构域中的氨基酸取代T366Y,以及在另一个IgG Fc结构域中的氨基酸取代Y407T。在一个实例中,修饰包含在一个IgG Fc结构域中的氨基酸取代T366W,以及在另一个IgG Fc结构域中的氨基酸取代Y407A。在一个实例中,修饰包含在一个IgG Fc结构域中的氨基酸取代F405A,以及在另一个IgG Fc结构域中的氨基酸取代T394W。在一个实例中,修饰包含在一个IgG Fc结构域中的氨基酸取代T366Y和F405A,以及在另一个IgG Fc结构域中的氨基酸取代T394W和Y407T。在一个实例中,修饰包含在一个IgG Fc结构域中的氨基酸取代T366W和F405W,以及在另一个IgG Fc结构域中的氨基酸取代T394S和Y407A。在一个实例中,修饰包含在一个IgG Fc结构域中的氨基酸取代F405W和Y407A,以及在另一个IgG Fc结构域中的氨基酸取代T366W和T394S。在一个实例中,修饰包含在一个IgG Fc结构域中的氨基酸取代F405W,以及在另一个IgG Fc结构域中的氨基酸取代T394S。Fc结构域中的突变位置根据EU编号系统进行编号。IgG Fc结构域可包含SEQ ID NO:3-6的序列(IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)。在这些序列中,氨基酸1-107对应于EU编号341-447。

[0188] 在一些实例中,Fc结构域突变体可具有降低的效应功能。这类Fc结构域的实例包括US20190135943中公开的那些,该文献以引用的方式整体并入本文中。

[0189] EM的其它实例包括免疫球蛋白(例如,IgG)、血清白蛋白(例如,人血清白蛋白(HSA)、六帽GST(谷胱甘肽S-转移酶)谷胱甘肽亲和力、钙调蛋白(Calmodulin)结合肽(CBP)、Strep-tag、纤维素结合结构域、麦芽糖结合蛋白、S肽标签、几丁质结合标签、免疫反应性表位、表位标签、E2Tag、HA表位标签、Myc表位、FLAG表位、AU1和AU5表位、Glu-Glu表位、KT3表位、IRS表位、Btag表位、蛋白激酶-C表位和VSV表位。

[0190] 在一些实施方案中,可激活蛋白的血清半衰期可能比与可激活蛋白相同但不具有半衰期延长部分的相应蛋白质的血清半衰期长。在一些实施方案中,可激活蛋白的血清半衰期可能比激活蛋白的血清半衰期长。在一些实施方案中,当施用于生物体时,可激活蛋白的血清半衰期为至少15天、12天、11天、10天、9天、8天、7天、6天、5天、4天、3天、2天、1天、20小时、18小时、16小时、14小时、12小时、10小时、8小时、6小时、4小时、3小时、2小时或1小时。

[0191] 掩蔽部分(MM)

[0192] 本文中的可激活蛋白可包含一个或多个能够干扰TB与靶标的结合的掩蔽部分(MM)。可激活分子中的掩蔽部分“掩蔽”或减少或以其它方式抑制可激活大分子与其靶标和/或表位的结合。在一些实施方案中,用MM偶联或修饰靶标结合蛋白(TB)(例如AB或其它治疗性或诊断性蛋白质)可以通过本领域已知的抑制方法(例如结构变化、竞争抗原结合结构域等)抑制TB特异性结合其靶标和或表位的能力。在一些实施方案中,用MM偶联或修饰TB可引起结构变化,从而降低或抑制TB特异性结合其靶标和或表位的能力。在一些实施方案

中,包含抗原结合结构域的蛋白质与MM的偶联或修饰在空间上阻断、降低或抑制抗原结合结构域特异性结合其靶标和或表位的能力。MM可通过CM直接或间接(例如,经由一个或多个本文所述的接头)偶联到TB(例如AB)。

[0193] 可替代地,干扰TB靶标结合的MM可以与非TB的可激活蛋白的组分偶联。例如,如图2所例示,可激活蛋白可包含TB1和TB2,并且干扰TB2的MM可与TB1偶联。在另一实例中,如图3和图4所例示,可激活蛋白可包含TB1、TB2和EM,并且干扰TB2的MM可与EM偶联。在任一情况下,在可激活结构的三级或四级结构中,MM可处于允许MM掩蔽TB的位置(例如,靠近要掩蔽的TB)。

[0194] 在一些实施方案中,MM可与TB相互作用,由此降低或抑制TB与它的结合配偶体之间的相互作用。在一些实施方案中,MM可包含TB的天然存在的结合配偶体的至少部分或全部氨基酸序列。举例来说,MM可为天然存在的结合配偶体的片段。片段可保留与天然存在的结合配偶体至多95%、90%、80%、75%、70%、60%、50%、40%、30%、25%或20%核酸或氨基酸序列同源性。在一些实施方案中,MM可以是TB的同源多肽。例如,MM可包含TB表位的序列或其片段。如本文所用,术语“天然存在”当应用于对象时是指对象可在自然界中找到的事实。例如,可从自然界中的来源分离并且不通过人在实验室中或以其它方式有意修饰的存在于生物(包括病毒)中的多肽或多核苷酸序列为天然存在的。

[0195] 在一些实施方案中,MM可包含非天然存在的氨基酸序列,或不含有天然存在的结合配偶体或靶标蛋白的氨基酸序列。在某些实施方案中,MM不是TB的天然结合配偶体。在一些实施方案中,MM不包含TB的天然结合配偶体的超过4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸残基的子序列。MM可为TB的修饰结合配偶体,其含有降低与TB的结合亲和力和/或亲合力的氨基酸变化。在一些实施方案中,MM不含或基本上不含与TB的天然结合配偶体的核酸或氨基酸同源性。在其它实施方案中,MM与TB的天然结合配偶体至多5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或80%类似。

[0196] 在一些实施方案中,MM可不特异性结合于TB(或其它可激活蛋白质),而是通过非特异性相互作用如空间位阻来干扰靶标结合蛋白(例如AB)与它的结合配偶体结合。举例来说,MM可位于可激活蛋白中,使得可激活蛋白的三级或四级结构允许MM通过基于电荷的相互作用掩蔽AB,由此将MM保持在适当位置以干扰结合配偶体接近TB。

[0197] 在一些实施方案中,MM与靶标结合蛋白(例如AB)结合的解离常数不超过TB与靶标的解离常数。在一些实施方案中,在裂解状态下MM不干扰TB与靶标的结合或与TB竞争结合靶标。

[0198] 可根据例如干扰蛋白质与靶标结合所需的最小氨基酸序列、感兴趣的靶标蛋白质-蛋白质结合对、TB的大小、接头的存在或不存在等因素选择MM的结构性质。

[0199] 在一些实施方案中,对于偶联的TB来说,MM是独特的。MM的实例包括被特异性筛选以结合TB(例如AB)或其片段的结合结构域的MM(例如亲和力掩蔽)。本文提供了用于筛选MM以获得对于TB来说独特的MM和特异性和/或选择性结合结合配偶体/靶标的结合结构域的那些MM的方法,并且可包括蛋白质展示方法。

[0200] 如本文所用,术语“掩蔽效率”或“ME”是指可激活蛋白的活性(例如EC50)除以对照靶标结合蛋白(例如抗体)的活性,其中对照靶标结合蛋白(例如抗体)可以是可激活蛋白(即,激活蛋白)的裂解产物,或者是用作可激活蛋白的TB的靶标结合蛋白(例如抗体或其片

段)。具有降低水平的靶标结合活性的可激活蛋白可以具有大于10的掩蔽效率。在一些实施方案中,本文所述的可激活蛋白可具有大于10、100、1000或5000的掩蔽效率。

[0201] 在一些实施方案中,MM可以是长度为约2至50个氨基酸的肽。例如,MM可以是长度为2至40、2至30、2至20、2至10、5至15、10至20、15至25、20至30、25至35、30至40、35至45、40至50个氨基酸的肽。例如,MM可以是长度为2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50个氨基酸的肽。在一些实例中,MM可以是长度超过50个氨基酸,例如100、200、300、400、500、600、700、800或更多个氨基酸的多肽。

[0202] 在一些实施方案中,当在体内或在掩蔽效率测定中测量,或者例如如US20200308243A1中所述,在体外免疫吸附测定中测量时,具有TB和干扰MM的可激活蛋白,在存在TB的靶标下,TB与靶标无结合或基本上无结合,或者相比于无干扰MM的相应抗体的结合,TB与它的靶标的结合至多为0.001%、0.01%、0.1%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%或50%,持续至少0.1、0.5、1、2、4、6、8、12、28、24、30、36、48、60、72、84、96小时,或5、10、15、30、45、60、90、120、150、180天,或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月。举例来说,可以测量在治疗相关浓度和时间下MM抑制可激活蛋白与其结合配偶体结合的能力。为了进行这种测量,已经开发了一种免疫吸附测定法(MEA,掩蔽效率测定法)来测量可激活蛋白与其结合配偶体结合的时间依赖性结合,并在US20200308243A1中进行了描述,该文献以引用的方式整体并入本文中。

[0203] 在干扰MM下TB对靶标或结合配偶体的结合亲和力可比当不存在干扰MM时TB对它的结合配偶体的结合亲和力低至少5、10、25、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、50,000、100,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000倍,或当不存在干扰MM时TB对它的结合配偶体的结合亲和力低5-10、10-100、10-1,000、10-10,000、10-100,000、10-1,000,000、10-10,000,000、100-1,000、100-10,000、100-100,000、100-1,000,000、100-10,000,000、1,000-10,000、1,000-100,000、1,000-1,000,000、1000-10,000,000、10,000-100,000、10,000-1,000,000、10,000-10,000,000、100,000-1,000,000或100,000-10,000,000倍。

[0204] MM对其掩蔽的TB(例如AB)的解离常数(K_d)可能大于TB(例如AB)对靶标的K_d。MM对掩蔽的TB的K_d可比TB对靶标的K_d大至少5、10、25、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、100,000、1,000,000或甚至10,000,000倍。相反,MM对掩蔽的TB的结合亲和力可能低于TB对靶标的结合亲和力。MM对TB的结合亲和力可比TB对靶标的结合亲和力低至少5、10、25、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、100,000、1,000,000或甚至10,000,000倍。

[0205] 在一些实施方案中,MM可含有遗传编码氨基酸或遗传非编码氨基酸。遗传非编码氨基酸的实例为但不限于D-氨基酸、β-氨基酸和γ-氨基酸。在具体实施方案中,MM含有至多50%、40%、30%、20%、15%、10%、5%或1%的遗传非编码氨基酸。

[0206] 在一些实施方案中,一旦从可激活蛋白释放并处于游离状态,MM可具有生物活性或治疗作用,例如结合能力。举例来说,游离MM可与相同或不同的结合配偶体结合。在某些实施方案中,游离MM可发挥治疗作用,从而为本文公开的组合物提供次要功能。在一些实施方案中,一旦与可激活蛋白解偶联并处于游离状态,MM可有利地不展现生物活性。举例来说,在一些实施方案中,处于游离状态的MM不在受试者中引发免疫反应。

[0207] 适合的MM可通过筛选程序从具有可变MM的候选可激活蛋白的文库鉴定和/或进一步优化。举例来说,可选择TB和CM以提供所需酶/靶标组合,并且可通过下文所述的鉴定提供可激活表型的MM的筛选程序鉴定MM的氨基酸序列。举例来说,随机肽文库(例如包含2至40个氨基酸或更多个氨基酸的肽的随机肽文库)可在本文公开的筛选方法中用于鉴定适合的MM。

[0208] 在一些实施方案中,对TB(例如AB)具有特异性结合亲和力的MM可通过筛选程序鉴定,所述筛选程序包括提供包含候选MM的肽支架文库,其中每个支架由跨膜蛋白和候选MM组成。接着可使文库与整个蛋白质或一部分(例如全长蛋白质、天然存在的蛋白质片段或含有蛋白质的非天然存在的片段(也能够结合感兴趣的结合配偶体))接触,并且鉴定一种或多种具有可检测地结合的蛋白质的候选MM。筛选可通过一轮或多轮磁激活分选(MACS)或荧光激活分选(FACS),以及测定MM对AB的结合亲和力并后续测定掩蔽效率来进行,例如以引用的方式整体并入本文中的WO2009025846和US20200308243A1中所述。

[0209] 在一些实施方案中,可以选择MM与特异性蛋白质、抗体或抗体片段一起使用。例如,适合与结合于表位的AB一起使用的MM可包含该表位的序列。在一个实例中,当可激活物包含作为抗HER 2Fab的AB1和作为抗CD3 scFv的AB2时,MM1(用于掩蔽AB1)可包含AB1结合的HER2中的序列,而MM2(用于掩蔽AB2)可包含AB2结合的CD3中的序列。在其它实施例中,MM可不包含TB的天然结合配偶体的序列。在一些实例中,适合掩蔽抗HER2 Fab的MM1包含ALICCSDVSGLCRWC(SEQ ID NO:40)的序列。在一些实例中,适合掩蔽抗CD3 scFv的MM2包括包含GYLWGCEWNCGGITT(SEQ ID NO:34)、NAFRCWWDPPCQPMT(SEQ ID NO:35)、ARGLCWWDPPCTHDL(SEQ ID NO:36)或NHSLCYWDPPCEPST(SEQ ID NO:37)的序列的MM。在一些实例中,适合掩蔽抗CD3 scFv的MM2包括包含MMYCGGNEVLCGPRV(SEQ ID NO:66)、GYRWGCEWNCGGITT(SEQ ID NO:67)、MMYCGGNEIFCEPRG(SEQ ID NO:68)、GYGWGCEWNCGGSSP(SEQ ID NO:69)或MMYCGGNEIFCGPRG(SEQ ID NO:70)的序列的MM。

[0210] 另外的适合MM公开于以下中:WO2021207657、WO2021142029、WO2021061867、WO2020252349、WO2020252358、WO2020236679、WO2020176672、WO2020118109、WO2020092881、WO2020086665、WO2019213444、WO2019183218、WO2019173771、WO2019165143、WO2019075405、WO2019046652、WO2019018828、WO2019014586、WO2018222949、WO2018165619、WO2018085555、WO2017011580、WO2016179335、WO2016179285、WO2016179257、WO2016149201和WO2016014974,以引用的方式整体并入本文中。

[0211] 可裂解部分(CM)

[0212] 可激活蛋白可包含一个或多个如上所定义的可裂解部分(CM)。

[0213] 在一些实施方案中,可激活蛋白可包含介于TB(例如AB)与MM之间的CM。可激活蛋白还可包含介于TB与EM之间的CM。在一些实例中,介于TB与MM之间的CM还介于TB与EM之间(参见例如图1,其中CM 127介于TB 123/125与MM 129之间,并且CM 127还介于TB 123/125与EM 131/141之间)。在这种情况下,CM的裂解可从TB释放出MM和EM。在一些实例中,CM位于第一TB(TB1)与结合第二TB(TB2)的MM(MM2)之间(参见例如图2,其中CM 223介于第一TB(TB 221)与MM 225之间,其中MM 225为抑制第二TB结合的掩蔽部分(TB 207/209);又见图3,其中CM 323位于第一TB(TB 321)与MM 343之间,并且MM 343为抑制第二TB与其靶标结合的掩

蔽部分(TB 307/309))。在某些实例中,介于TB与MM之间的CM不介于TB与EM之间。在这种情况下,可激活蛋白可包含介于TB与MM之间的第一CM和介于TB与EM之间的第二CM。在一些实例中,可激活蛋白可具有三个CM:介于第一TB与第一MM之间的第一CM、介于第二TB与第二MM之间的第二CM和介于EM与第一或第二TB之间的第三CM(参见例如图10和11)。可激活蛋白的激活可能会裂解两个CM,从而将MM和EM都从EM中释放出来。

[0214] 可以选择可激活蛋白的CM和TB,使得TB包含给定靶标的结合部分,而CM包含一种或多种蛋白酶的底物,其中一种或多种蛋白酶与组织中的靶标共定位(例如,在受试者的治疗部位或诊断部位)。在一些实施方案中,可激活蛋白可具有特殊用途,其中例如,能够裂解CM中的位点的一种或多种蛋白酶在治疗部位或诊断部位的含靶标组织中以比非治疗部位的组织中(例如在健康组织中)相对更高的水平(或者更大活性)存在。

[0215] 在一些实施方案中,本文中的CM可包含已在一种癌症或多种癌症中报道过的蛋白酶的底物。参见例如La Roca等人,British J.Cancer90(7):1414-1421,2004。适用于本文采用的CM组分中的底物包括更普遍见于癌性细胞和组织中的那些。因此,在某些实施方案中,CM可包含更普遍见于与癌症相关的患病组织中的蛋白酶的底物。癌症的实例包括胃癌、乳腺癌、骨肉瘤、食管癌、乳腺癌、HER2阳性癌症、卡波西肉瘤(Kaposi sarcoma)、毛细胞白血病、慢性髓系白血病(CML)、滤泡性淋巴瘤、肾细胞癌(RCC)、黑素瘤、神经母细胞瘤、基底细胞癌、皮肤T细胞淋巴瘤、鼻咽腺癌、卵巢癌、膀胱癌、BCG抗性非肌层浸润性膀胱癌(NMIBC)、子宫内膜癌、胰腺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、结直肠癌、食管癌、胆囊癌、胶质瘤,头颈癌、子宫癌、宫颈癌或睾丸癌等。在一些实施方案中,CM组分包含在肿瘤组织中更普遍的蛋白酶的底物。例如,蛋白酶可以由受试者的肿瘤产生。

[0216] 在一些实施方案中,可激活蛋白可包含介于MM与TB(例如AB)之间的第一CM,和介于EM与相同或不同TB之间的第二CM。在激活状态下,两种CM可裂解,使得MM和EM从TB释放。在一些实例中,第一CM和第二CM可包含相同蛋白酶的底物。在一些实例中,第一CM和第二CM可包含不同蛋白酶的底物。在一些实例中,第一CM和第二CM可包含相同的序列或由相同的序列组成。在一些实例中,第一CM和第二CM可包含不同的序列或由不同的序列组成。

[0217] 第二CM可位于可激活蛋白中的某个位置,在该位置,它的裂解有利于EM从TB解离。在一些实例中,第二CM可以介于TB(或如果TB包含多个多肽,则为其组分)的C端与MM的N端之间,其中MM的C端与EM(或如果EM包含多个多肽,则为其组分)的N端偶联。在一些实例中,第二CM可以介于TB(或如果TB包含多个多肽,则为其组分)的N端与MM的C端之间,其中MM的N端与EM(或如果EM包含多个多肽,则为其组分)的C端偶联。在一些实例中,第二CM可以介于TB(或如果TB包含多个多肽,则为其组分)的C端与EM(或如果EM包含多个多肽,则为其组分)的N端之间,其中EM(或如果EM包含多个多肽,则为其组分)的C端与MM的N端偶联。在一些实例中,第二CM可以介于TB(或如果TB包含多个多肽,则为其组分)的N端与EM(或如果EM包含多个多肽,则为其组分)的C端之间,其中EM(或如果EM包含多个多肽,则为其组分)的N端与MM的C端与偶联。在这些实例中,MM可以是可激活蛋白中的TB或不同TB(例如,在相同或另一多肽上)的掩蔽部分。

[0218] 适用于本文的可激活蛋白的CM包括本领域已知的任何蛋白酶底物。在一些实例中,CM可包含丝氨酸蛋白酶(例如,u型纤溶酶原激活剂(uPA,也称为尿激酶))、蛋白裂解酶(本文中也称为MT-SP1或MTSP1)的底物。在一些实例中,CM可包含基质金属蛋白酶(MMP)的

底物。在一些实例中,CM可包含半胱氨酸蛋白酶(CP)(例如,豆荚蛋白)的底物。

[0219] 在一些实施方案中,CM可包含以下各者的底物:解整合素和金属蛋白酶(ADAM)或具有凝血酶敏感素基元的解整合素和金属蛋白酶(ADAMTS)(例如ADAM8、ADAM9、ADAM10、ADAM12、ADAM15、ADAM17/TACE、ADEMDEC1、ADAMTS1、ADAMTS4、ADAMTS5)、天冬氨酸蛋白酶(例如BACE、肾素)、天冬氨酸组织蛋白酶(例如组织蛋白酶D、组织蛋白酶E)、凋亡蛋白酶(例如凋亡蛋白酶1、凋亡蛋白酶2、凋亡蛋白酶3、凋亡蛋白酶4、凋亡蛋白酶5、凋亡蛋白酶6、凋亡蛋白酶7、凋亡蛋白酶8、凋亡蛋白酶9、凋亡蛋白酶10、凋亡蛋白酶14)、半胱氨酸组织蛋白酶(例如组织蛋白酶A、组织蛋白酶B、组织蛋白酶C、组织蛋白酶G、组织蛋白酶K、组织蛋白酶L、组织蛋白酶S、组织蛋白酶V/L2、组织蛋白酶X/Z/P)、半胱氨酸蛋白酶(例如克鲁兹蛋白酶(Cruzipain)、豆荚蛋白、Otubain-2)、糜蛋白酶、DESC1、DPP-4、FAP、弹性蛋白酶、FVIIa、FiXA、FXa、FXIa、FXIIa、颗粒酶B、胍基苯甲酸酶、黑珀素(Hepsin)、HtrA1、人中性粒细胞弹性蛋白酶、KLK(例如KLK4、KLK5、KLK6、KLK7、KLK8、KLK10、KLK11、KLK13、KLK14)、金属蛋白酶(例如穿膜肽酶(Meprin)、脑啡肽酶、PSMA、BMP-1)、乳铁蛋白、马拉素(Marapsin)、间质蛋白酶-2、MT-SP1/间质蛋白酶、NS3/4A、PACE4、纤溶酶、PSA、MMP(例如MMP1、MMP2、MMP3、MMP7、MMP8、MMP9、MMP10、MMP11、MMP12、MMP13、MMP14、MMP15、MMP16、MMP17、MMP19、MMP20、MMP23、MMP24、MMP26、MMP27)、TMPRSS2、TMPRSS3、TMPRSS4、tPA、凝血酶、类胰蛋白酶和uPA。

[0220] 在一些实施方案中,CM中的蛋白酶底物可包含与由相同蛋白酶天然裂解的任何多肽序列基本上不同一(例如,不超过90%、80%、70%、60%或50%同一)的多肽序列。在一些实施方案中,CM可为或包含LSGRSDDH(SEQ ID NO:33)或ISSGLLSGRSDNH(SEQ ID NO:41)的序列。在一些实施方案中,CM可为或包含下表中任一个序列的序列或由所述序列的共有序列所涵盖。

[0221]

序列	SEQ ID NO	序列	SEQ ID NO
AANALAHGLF	99	HMMQYARH	350
AANL	100	HTGRSGAL	351
AANLGSGGSS	101	HVPRQ	352
AAPRS	102	HVPRQV	353
AAPRSF	103	HVPRQVAPRSF	354
AARGPAIH	104	HVPRQVLSGRS	355
AAYHLVSQ	105	HVPRQVLSGRSAN	356
AFPDMRSVRS	106	HWHLGPPT	357
AFQALRM	107	IANLLSMV	358
AFRHLR	108	IDGR	359
AGLGISST	109	IEGR	360
AGLGVVER	110	ILNLLSMV	361
AGPR	111	ILPRSPAF	362
AHGL	112	IPFSWSRF	363
AHGLF	113	IQNLLSMV	364
AHQALRM	114	ISSGL	365
AIPRVRLFDV	115	ISSGLL	366
ALAHG	116	ISSGLLS	367
ALAHGL	117	ISSGLLSGRSANI	368
ALAHGLF	118	ISSGLLSGRSANP	369
ALAHGLFAPRSF	119	ISSGLLSGRSANPRG	370
ALAHGLFSGRSAN	120	ISSGLLSGRSDDH	371
ALAHGLPTFVHL	121	ISSGLLSGRSDIH	372
ALGLLRLP	122	ISSGLLSGRSDNH	41
ALPSVKMVSE	123	ISSGLLSGRSDNI	373
ALRAP	124	ISSGLLSGRSDNP	374
ANQALRM	125	ISSGLLSGRSDQH	375

[0222]

ANQALRMA	126	ISSGLLSGRSDTH	376
APPLVKSMVV	127	ISSGLLSGRSDYH	377
APPSFKLVNA	128	ISSGLLSGRSGNH	378
APRS	129	ISSGLLSGRSNI	379
APRSALAHGLF	130	ISSGLLSGRSNIG	380
APRSF	131	ISSGLLSGRSNIGS	381
AQFVLTEG	132	ISSGLLSS	382
AQNLLGMV	133	ISSGLLSSGGSGGSLSGRSDNH	383
ARGP	134	ISSGLLSSGGSGGSLSGRSGNH	384
ARGPS	135	ISSGLSS	385
ARGPSF	136	IVSRSA	386
ARGPSFK	137	KGLTGRSDRHQA	387
ASGLLRFP	138	KGPKVKVVTL	388
ASPTMKTVGL	139	KNLYGRSENNGN	389
AVGLLAPP	140	KRMPVQFL	390
AVGLLAPPGGLSGRSANI	141	LAAPLGLL	391
AVGLLAPPGGLSGRSANP	142	LAHG	392
AVGLLAPPGGLSGRSDDH	143	LAHGL	393
AVGLLAPPGGLSGRSDIH	144	LAHGLF	394
AVGLLAPPGGLSGRSDNH	145	LAPLGLQRR	395
AVGLLAPPGGLSGRSDNI	146	LARAG	396
AVGLLAPPGGLSGRSDNP	147	LARAGI	397
AVGLLAPPGGLSGRSDQH	148	LARAGL	398
AVGLLAPPGGLSGRSDTH	149	LKAAPRWA	399
AVGLLAPPGGLSGRSDYH	150	LKAAPRWF	400
AVGLLAPPGGLSGRSNI	151	LKAAPVWA	401
AVGLLAPPGGLSGRSNIG	152	LKAAPVWF	402
AVGLLAPPGGLSGRSNIGS	153	LKGRSYYY	403
AVGLLAPPGGTSTSGRSANPRG	154	LLAPSHRA	404
AVGLLAPPSGRSANPRG	155	LLEALRAL	405

[0223]

AVGLLAPPTSGRSANPRG	156	LLESLRAL	406
AVPKVRVVPE	157	LLLPAHGG	407
CGPPLGR	158	LLLPLLGS	408
CSPPLGR	159	LLNALRAL	409
DEVDGSGGSS	160	LLNSLRAL	410
DEXXXC(A/S)		LLQALRAL	411
DISHWRRS	161	LLQSLRAL	412
DLAHPLL	162	LLSALRAL	413
DLPLVKSLPS	163	LLSSLRAL	414
DLXXT(A/S)		LNGRSDNH	415
DRLSGRSANHKK	164	LPAGLLL	416
DRLSGRSDNHKK	165	LPAGLLLR	417
DRPEMKSLSG	166	LPAHLVLL	418
DRPKVKTMDF	167	LPAHLVLV	419
DVAQFVLT	168	LPGGLSPW	420
DVPPMKTLRP	169	LPSHLVLL	421
DWLYWMGI	170	LPSHLVLV	422
DWLYWMSI	171	LPTFV	423
DWLYWPGI	172	LPTFVH	424
DWLYWPSI	173	LPTFVHL	425
EAPKVKALPK	174	LRSGW	426
EHPRVKVVSE	175	LSGR	427
EKPRMKLFQG	176	LSGRS	428
EPQALAMS	177	LSGRSA	429
EQPEVKMVKG	178	LSGRSALAHGLF	430
ERPGVKSLVL	179	LSGRSAN	431
ESLPVVAV	180	LSGRSANI	432
ESPVMKSMAL	181	LSGRSANP	433
ESRRW	182	LSGRSD	434
ESRRWM	183	LSGRSDD	435
ESRRWMP	184	LSGRSDDH	33
ETPSVKTMGR	185	LSGRSDI	436
ETPSVKTMGRSS	186	LSGRSDIH	437
FPRPLGITGL	187	LSGRSDN	438
FRLLDWQW	188	LSGRSDNH	439
GCGPPLGR	189	LSGRSDNHGGAVGLLAPP	440
GCSPPLGR	190	LSGRSDNHGGSGGSISSGLLSS	441
GFPHMKTFQH	191	LSGRSDNHGGSGGSQNQALRMA	442
GFPHMKTFQHSS	192	LSGRSDNHGGVHMPLGFLGP	443
GGGPPLGR	193	LSGRSDNI	444
GGPPLGR	194	LSGRSDNP	445
GGQPSGMWGW	195	LSGRSDQ	446
GGSIDGR	196	LSGRSDQH	447

[0224]

GGSPPLGR	197	LSGRSDT	448
GGWHTGRN	198	LSGRSDTH	449
GIAGQ	199	LSGRSDY	450
GLGTPRGLFA	200	LSGRSDYH	451
GLPTFV	201	LSGRSENH	452
GLPTFVH	202	LSGRSG	453
GLPTFVHL	203	LSGRSGN	454
GLPTFVHLPRQV	204	LSGRSGNH	455
GLSGRSDNHGSS	205	LSGRSGNHGGSGGSISSGLLSS	456
GPEGLRVG	206	LSGRSGNHGGSGGSQNQALRMA	457
GPLGIAGI	207	LSGRSGNP	458
GPLNGRSDNHKA	208	LSGRSVTQ	459
GPLNGRSDNHKK	209	LSQARWRK	460
GPLNGRSDNHKR	210	LTFPTYIF	461
GPLNGRSDNHQA	211	LTFPTYWF	462
GPLNGRSDNHQK	212	LTGRSDRH	463
GPLNGRSDNHQR	213	LTGRSGA	464
GPLNGRSDNHRA	214	LTGRSGA	465
GPLNGRSDNHRK	215	LYAAPRWA	466
GPLNGRSDNHRR	216	LYAAPRWF	467
GPLSGRSDNHKA	217	LYAAPVWA	468
GPLSGRSDNHKK	218	LYAAPVWF	469
GPLSGRSDNHKR	219	LYGRSENN	470
GPLSGRSDNHQA	220	MDAFLESS	471
GPLSGRSDNHQK	221	MGLFSEAG	472
GPLSGRSDNHQR	222	MGPWFM	473
GPLSGRSDNHRA	223	MIAPVAYR	474
GPLSGRSDNHRK	224	MLRSGW	475
GPLSGRSDNHRR	225	MLRSGWR	476
GPPLGR	226	MLRSGWRG	477
GPQGIAGQ	227	MLRSGWRL	478
GPQGLLGA	228	MLRSGWRS	479
GPRSFG	229	MTFPTYIF	480
GPRSFGL	230	MTFPTYWF	481
GPSHLVLT	231	NHRIGRSDNHRR	482
GPTN	232	NMPSFKLVTG	483
GPTNALAHGLF	233	NTLSGRSENHSG	484
GRSML	234	NTLSGRSGNHGS	485
GRSMLL	235	NZPRVRLVLP	486
GRSMLLG	236	PAGLWLDP	487
GRSMLLGG	237	PAGRR	488
GRSMLLGP	238	PAGRRS	489
GRSMLLGS	239	PAGRRSL	490
GRSMLLP	240	PASLWYTQ	491
GRSMLLPG	241	PESRRWMP	492

GRSMLLPP	242	PFHLSR	493
GRSMLLPS	243	PHGFFQ	494
GRSMLLS	244	PLARAGI	495
GRSMLLSG	245	PLARAGL	496
GRSMLLSP	246	PLGL	497
GRSMLLSS	247	PLGLAG	498
GRSMLM	248	PLGLWA	499
GRSMLMG	249	PLGVRGK	500
GRSMLMGG	250	PLTGRSGG	501
GRSMLMGP	251	PLTGRSGGGGSS	502
GRSMLMGS	252	PPLGR	503
GRSMLMP	253	PPPDMKLFPG	504
GRSMLMPG	254	PPPEVRSFSV	505
GRSMLMPP	255	PPPVLKLLEW	506
GRSMLMPS	256	PPSIARSDNLAN	507
GRSMLMS	257	PQHRIVSF	508
GRSMLMSG	258	PRFKIIGG	509
GRSMLMSP	259	PRFRIIGG	510
GRSMLMSS	260	PRPFVKSVDQ	511
GSGPPLGR	261	PRQV	512
GSPPLGR	262	PRSF	513
GSSPPLGR	263	PSPPVKMMPE	514
GTGRGPSWVGSS	264	PTNGGSGGSS	515
[0225] PTNL	265	RVPKVKVMLD	516
PTNLGSGGSS	266	SAGFSLPA	517
PVGYTSSL	267	SAPAVESE	518
PVPRLKLIKD	268	SAPYFRMMDM	519
PVQPIGPQ	269	SARGPSRW	520
QALAMSAI	270	SCGPPLGR	521
QFQALRM	271	SCSPPLGR	522
QGPMFKSLWD	272	SGGPLGVR	523
QGRAITFI	273	SGGPPLGR	524
QHQALRM	274	SGPPLGR	525
QNQALRIA	275	SGRS	526
QNQALRM	276	SGRSA	527
QNQALRMA	277	SGRSAN	528
QNQALRMAGGSGGSLSGRSDNH	278	SGRSANI	529
QNQALRMAGGSGGSLSGRSGNH	279	SGRSANP	530
QSRRVP	280	SGRSANPRG	531
QSRRVPL	281	SGRSD	532
QSRRVPV	282	SGRSDD	533
QTRRVP	283	SGRSDDH	534
QTRRVPL	284	SGRSDI	535
QTRRVPV	285	SGRSDIH	536
QYIVSRSA	286	SGRSDN	537

[0226]

RALRAP	287	SGRSDNI	538
REPFMKSLPW	288	SGRSDNP	539
RFPLKV	289	SGRSDQ	540
RFPSLKSFPL	290	SGRSDQH	541
RFPYGVW	291	SGRSDT	542
RFYRNQFF	292	SGRSDTH	543
RGPA	293	SGRSDY	544
RGPAFNPM	294	SGRSDYH	545
RGPATPIM	295	SGRSG	546
RGPKLYW	296	SGRSGN	547
RHLAKL	297	SGRSGNH	548
RIGRSDNH	298	SGSPPLGR	549
RKMPNITV	299	SIARSDNL	550
RKSSIIIRMRDVVL	300	SISSGLLSGRSDNI	551
RKTVQHWW	301	SNPFKY	552
RLGRSDNN	302	SPLPLRVP	553
RMHLRSLG	303		
RPLARAGI	304	SPLTGRSG	554
RPLARAGL	305	SPPLGR	555
RPLNGRSDNHKA	306	SRRVP	556
RPLNGRSDNHKK	307	SRRVPL	557
RPLNGRSDNHKR	308	SRRVPV	558
RPLNGRSDNHQA	309	SSGPPLGR	559
RPLNGRSDNHQK	310	SSPPLGR	560
RPLNGRSDNHQR	311	SSRGPAYL	561
RPLNGRSDNHRA	312	SSRHRRALD	562
RPLNGRSDNHRK	313	SSSFDKGKYKKGDDA	563
RPLNGRSDNHRR	314	SSSFDKGKYKRGDDA	564
RPLSGRSDNHKA	315	SSSPPLGR	565
RPLSGRSDNHKK	316	STFPFGMF	566
RPLSGRSDNHKR	317	STVFHM	567
RPLSGRSDNHQA	318	SVHHLI	568
RPLSGRSDNHQK	319	SVSGLLSH	569
RPLSGRSDNHQR	320	SVSGLLSS	570
RPLSGRSDNHRA	321	SVSGLRSH	571
RPLSGRSDNHRK	322	SVSGLRSS	572
RPLSGRSDNHRR	323	TARG	573
RPSPMWAY	324	TARGP	574
RRHDGLRA	325	TARGPALAHGLF	575
RRHDGLRS	326	TARGPS	576
RSLVFAPI	327	TARGPSF	577
RSPSRLKC	328	TARGPSFK	578
VAGRSMRP	329	TARGPSW	579
VAPQLKSLVP	330	TARGPSW	580
VAQFVLTE	331	TARGPVPRQV	581
VHMPLGFLGP	332	TFVH	582

[0227]

VHMPLGFLGPGGLSGRSDNH	333	TGLSGRSVTQTS	583
VHMPLGFLGPGGTSTSGRSANPRG	334	TGRGPSWV	584
VLPELRSVFS	335	TLRLGRSDNNKN	585
VLSKQMSF	336	TLSGLRSP	586
VPAGRRS	337	TSGRSANP	587
VPAGRRSL	338	TSGRSGNP	588
VPRQ	339	TSLSGRSANPRG	589
VPRQV	340	TSLSGRSGNPRG	590
VSRSA	341	TSSGLRSP	591
VVPEGRRS	342	TSTSGRSANPRG	592
WATPRPMR	343	TSTSGRSANPRGGGAVGLLAPP	593
WDHPISLL	344	TSTSGRSANPRGGGVHMPLGFLGP	594
XXQAR(A/V)X		TSTSGRSGNPRG	595
YDPZVKVVLA	345	TVSGLRSP	596
YGAGLGVV	346		
YIVSRSA	347		
YKKFVGSL	348		
YVPRVKALEM	349		

[0228] CM的实例还包括WO 2010/081173、WO2021207669、WO2021207657、WO2021142029、WO2021061867、WO2020252349、WO2020252358、WO2020236679、WO2020176672、WO2020118109、WO2020092881、WO2020086665、WO2019213444、WO2019183218、WO2019173771、WO2019165143、WO2019075405、WO2019046652、WO2019018828、WO2019014586、WO2018222949、WO2018165619、WO2018085555、WO2017011580、WO2016179335、WO2016179285、WO2016179257、WO2016149201、WO2016014974(其以引用的方式整体并入本文中)中所述的CM。

[0229] 在一些实施方案中,CM可为或包含上述示例序列的组合、C端截短变体或N端截短变体。适用于CM中的以上提及的氨基酸序列的截短变体可以是保留相应蛋白酶的识别位点的任何截短变体。这些包括保留蛋白酶的识别位点的包含上述氨基酸序列的至少3个相连氨基酸或前述氨基酸序列的至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个氨基酸的C端和/或N端截短变体。在某些实施方案中,上述氨基酸序列的截短变体可以是对应于任何上述的氨基酸序列,但C端和/或N端截短1至10个氨基酸、1至9个氨基酸、1至8个氨基酸、1至7个氨基酸、1至6个氨基酸、1至5个氨基酸、1至4个氨基酸或1至3个氨基酸,并且:(1)具有至少三个氨基酸残基;以及(2)保留蛋白酶的识别位点。在一些前述实施方案中,截短的CM是N端截短的CM。在一些实施方案中,截短的CM是C端截短的CM。在一些实施方案中,截短的C是C端和N端截短的CM。

[0230] 在一些实施方案中,CM可总共包含3个氨基酸至25个氨基酸。在一些实施方案中,CM可总共包含3至25、3至20、3至15、3至10、3至5、5至25、5至20、5至15、5至10、10至25、10至20、10至15、15至25、15至20或20至25个氨基酸。

[0231] 在一些实施方案中,CM可通过至少一种蛋白酶以约0.001-1500×$10^4M^{-1}S^{-1}$或至少

0.001、0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1、2.5、5、7.5、10、15、20、25、50、75、100、125、150、200、250、500、750、1000、1250或1500×$10^4M^{-1}S^{-1}$的速率特异性地裂解。该速率可以通过底物裂解动力学(k_{cat}/K_m)来测量,如WO2016118629中公开的那样。

[0232] 接头

[0233] 可激活蛋白可以包含一个或多个接头。接头可包含连接可激活蛋白中的两个组分的一段氨基酸序列。接头可能是不能被任何蛋白酶裂解的。在一些实施方案中,一个或多个接头(例如柔性接头)可引入可激活蛋白中以在一个或多个在结构域之间的接界、在部分之间的接界、在部分与结构域之间的接界处,或在接头将有益的任何其它接界处提供柔性。在一些实施方案中,在可激活蛋白以构象受限的构建体形式提供时,可插入柔性接头以有助于未裂解的可激活蛋白中结构的形成和维持。本文所述的任何接头都可提供所需柔性以有助于抑制靶标的结合,或有助于蛋白酶对CM的裂解。在一些实施方案中,可激活蛋白中包括的接头可以全部或部分是柔性的,使得接头可包括柔性接头以及一个或多个赋予柔性较小的结构的部分以提供所需可激活蛋白。一些接头可包括半胱氨酸残基,所述半胱氨酸残基可形成二硫键并降低构建体的柔性。

[0234] 在一些实施方案中,与MM偶联的接头可具有一定长度,使得MM能够处于三级或四级的位置以有效地掩蔽TB(例如,靠近要掩蔽的TB),从而使得MM能够掩蔽TB。

[0235] 在大多数情况下,接头长度通过在N至C方向上对从接头的与前面组分的C端氨基酸邻接的N端到接头的与后面组分的N端氨基酸邻接的C端的氨基酸数目进行计数来确定(即其中接头长度不包括前面组分的C端氨基酸或后面组分的N端氨基酸)。

[0236] 在一些实施方案中,接头可包括总共1至50、1至40、1至30、1至25个(例如,1至24、1至22、1至20、1至18、1至16、1至15、1至14、1至12、1至10、1至8、1至6、1至5、1至4、1至3、1至2、2至25、2至24、2至22、2至20、2至18、2至16、2至15、2至14、2至12、2至10、2至8、2至6、2至5、2至4、2至3、4至25、4至24、4至22、4至20、4至18、4至16、4至15、4至14、4至12、4至10、4至8、4至6、4至5、5至25、5至24、5至22、5至20、5至18、5至16、5至15、5至14、5至12、5至10、5至8、5至6、6至25、6至24、6至22、6至20、6至18、6至16、6至15、6至14、6至12、6至10、6至8、8至25、8至24、8至22、8至20、8至18、8至16、8至15、8至14、8至12、8至10、10至25、10至24、10至22、10至20、10至18、10至16、10至15、10至14、10至12、12至25、12至24、12至22、12至20、12至18、12至16、12至15、12至14、14至25、14至24、14至22、14至20、14至18、14至16、14至15、15至25、15至24、15至22、15至20、15至18、15至16、16至25、16至24、16至22、16至20、16至18、18至25、18至24、18至22、18至20、20至25、20至24、20至22、22至25、22至24或24至25个氨基酸)。在一些实施方案中,接头可包括总共1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个氨基酸。

[0237] 在一些实施方案中,接头可富含甘氨酸(Gly或G)残基。在一些实施方案中,接头可富含丝氨酸(Ser或S)残基。在一些实施方案中,接头可富含甘氨酸和丝氨酸残基。在一些实施方案中,接头可具有一对或多对甘氨酸-丝氨酸残基(GS)(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10对或更多对GS)。

[0238] 在一些实施方案中,接头可具有一个或多个Gly-Gly-Gly-Ser(GGGS)序列(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个或更多个GGGS序列)。在一些实施方案中,接头可具有一个或多个Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(GGGGS)序列(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个或更多个GGGGS序

列)。在一些实施方案中,接头可具有一个或多个Gly-Gly-Ser-Gly(GGSG)序列(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个或更多个GGSG序列)。接头的实例可包括甘氨酸聚合物(G)n、甘氨酸-丝氨酸聚合物(包括例如(GS)n、(GGS)n、(GSGGS)n和(GGGS)n,其中n为至少一的整数)、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物和本领域已知的其它柔性接头。甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物是相对无结构的,因此可能能够充当组分之间的中性连接。甘氨酸甚至比丙氨酸接近显著更大的φ-ψ空间,并且受到的限制远小于具有较长侧链的残基(参见Scheraga,Rev.Computational Chem.11173-142(1992))。示例柔性接头包括以下中的一者或者一者或多者的组合:GGSG(SEQ ID NO:71)、GGSGG(SEQ ID NO:72)、GSGSG(SEQ ID NO:73)、GSGGG(SEQ ID NO:74)、GGGSG(SEQ ID NO:75)、GSSSG(SEQ ID NO:76)、GSSGGSGGSGG(SEQ ID NO:77)、GGGS(SEQ ID NO:78)、GGGSGGGS(SEQ ID NO:79)、GGGSGGGSGGGS(SEQ ID NO:80)、GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:81)、GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:82)、GGGGSGGGGS(SEQ ID NO:83)、GGGGS(SEQ ID NO:84)、GS、GGGGSGS(SEQ ID NO:85)、GGGGSGGGGSGGGGSGS(SEQ ID NO:86)、GGSLDPKGGGGS(SEQ ID NO:87)、PKSCDKTHTCPPCPAPELLG(SEQ ID NO:88)、SKYGPPCPPCPAPEFLG(SEQ ID NO:89)、GKSSGSGSESKS(SEQ ID NO:90)、GSTSGSGKSSEGKG(SEQ ID NO:91)、GSTSGSGKSSEGSGSTKG(SEQ ID NO:92)、GSTSGSGKPGSGEGSTKG(SEQ ID NO:93)、GSTSGSGKPGSSEGST(SEQ ID NO:94)、GGGSSGGS(SEQ ID NO:95)、GGGGSGGGGSS(SEQ ID NO:96)、GGGSSGGSGGSSGGS(SEQ ID NO:97)和GSTSGSGKPGSSEGST(SEQ ID NO:98)。

[0239] 接头的实例还可包括与本文所述的示例接头至少70%同一(例如至少72%、至少74%、至少75%、至少76%、至少78%、至少80%、至少82%、至少84%、至少85%、至少86%、至少88%、至少90%、至少92%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一的序列。普通技术人员将认识到,可激活蛋白的设计可包括全部或部分柔性的接头,以使得接头可包括柔性接头以及一个或多个赋予柔性较小的结构以提供所需的可激活蛋白结构的部分。

[0240] 在一些实施方案中,可激活蛋白可包括一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个接头序列(例如本文所述或本领域中已知的任何示例性接头序列的相同或不同的接头序列)。在一些实施方案中,接头可包含磺基-SIAB、SMPB和磺基-SMPB,其中接头与伯胺巯基反应。

[0241] 缀合剂

[0242] 在一些方面,可激活分子(例如可激活蛋白,例如可激活抗体)还可以包含一种或多种另外的剂,例如,促进递送至感兴趣的细胞或组织的靶向部分、治疗剂(例如,抗肿瘤剂如化疗剂或抗肿瘤剂)、毒素或其片段。另外的剂可以与可激活TB缀合。术语“剂”在本文中用于表示化学化合物、化学化合物的混合物、生物大分子或由生物材料制成的提取物。

[0243] 在一些实施方案中,可激活蛋白可以与细胞毒性剂(例如毒素(例如,细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素或其片段))或放射性同位素缀合。

[0244] 可与可激活蛋白缀合的细胞毒性剂的实例包括:多拉司他汀(dolastatin)和其衍生物(例如澳瑞他汀E(auristatin E)、AFP、单甲基澳瑞他汀D(MMAD)、单甲基澳瑞他汀F(MMAF)、单甲基澳瑞他汀E(MMAE)、去甲基澳瑞他汀E(DMAE)、澳瑞他汀F、去甲基澳瑞他汀F(DMAF)、多拉司他汀16(DmJ)、多拉司他汀16(Dpv)、澳瑞他汀衍生物(例如澳瑞他汀酪胺

(auristatin tyramine)、澳瑞他汀喹诺酮(auristatin quinolone))、类美登素(maytansinoid)(例如DM-1、DM-4)、类美登素衍生物、倍癌霉素(duocarmycin)、α-鹅膏蕈碱(alpha-amanitin)、涡轮他汀(turbostatin)、芬他汀(phenstatin)、羟基芬他汀(hydroxyphenstatin)、海绵抑制素5(spongistatin 5)、海绵抑制素7、哈利他汀1(halistatin 1)、哈利他汀2、哈利他汀3、哈坎他汀(halocomstatin)、吡咯并苯并咪唑(PBI)、西博他汀6(cibrostatin6)、多沙利仿(doxaliform)、西马多丁(cemadotin)类似物(CemCH2-SH)、假单胞菌毒素A(PES8)变体、假单胞菌毒素A(ZZ-PE38)变体、ZJ-101、蒽环霉素(anthracycline)、多柔比星(doxorubicin)、柔红霉素(daunorubicin)、苔藓抑素(bryostatin)、喜树碱(camptothecin)、7-取代的喜树碱、10,11-二氟亚甲基二氧基喜树碱、考布他汀(combretastatin)、脱溴海兔毒素(debromoaplysiatoxin)、KahaMide-F、圆皮海绵内酯(discodermolide)和海鞘素(Ecteinascidin)。

[0245] 可与可激活蛋白缀合的酶活性毒素的实例包括:白喉毒素(diphtheria toxin)、来自铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)的外毒素A链(exotoxin A chain)、篦麻毒素A链(ricin A chain)、相思子毒素A链(abrin A chain)、蒴莲根毒素A链(modeccin A chain)、α-帚曲菌素(alpha-sarcin)、油桐(Aleuriies fordii)蛋白、石竹素(dianfhin)蛋白、美洲商陆(Phytoiaca Americana)蛋白(例如PAPI、PAPII和PAP-8)、苦瓜(momordica charantia)抑制剂、泻果素(curcin)、巴豆毒素(crotirs)、肥皂草(sapaonaria officinalis)抑制剂、白树毒素(gelonin)、米托洁林(mitogeliin)、局限曲菌素(restrictocin)、酚霉素(phenomycin)、新霉素(neomycin)和新月毒素(tricothecene)。

[0246] 可与可激活蛋白缀合的抗肿瘤剂的实例包括:阿霉素(adriamycin)、司比定(cerubidine)、博来霉素(bleomycin)、爱克兰(alkeran)、维尔班(velban)、昂可文(oncovin)、氟尿嘧啶(fluorouracil)、甲氨蝶呤(methotrexate)、噻替派(thiotepa)、比生群(bisantrene)、诺凡特龙(novantrone)、硫鸟嘌呤(thioguanine)、丙卡巴肼(procarabizine)和阿糖胞苷(cytarabine)。

[0247] 可与可激活蛋白缀合的抗病毒剂的实例包括:阿昔洛韦(acyclovir)、vira A和symmetrel。可与可激活蛋白缀合的抗真菌剂的实例包括:制霉菌素(nystatin)。可与可激活蛋白缀合的检测试剂的实例包括:荧光素及其衍生物、异硫氰酸荧光素(FITC)。可与可激活蛋白缀合的抗菌剂的实例包括:氨基糖苷(aminoglycoside)、链霉素(streptomycin)、新霉素(neomycin)、卡那霉素(kanamycin)、阿米卡星(amikacin)、庆大霉素(gentamicin)和妥布霉素(tobramycin)。可与可激活蛋白缀合的3β,16β,17α-三羟基胆甾-5-烯-22-酮16-O-(2-O-4-甲氧基苯甲酰基-β-D-吡喃木糖基)-(1-->3)-(2-O-乙酰基-α-L-吡喃阿拉伯糖苷)(OSW-1)包括:06-苯甲基鸟嘌呤的s-硝基苯甲基氧基羰基衍生物、拓扑异构酶抑制剂、哈米特林(hemiasterlin)、三尖杉碱(cephalotaxine)、高三尖杉酯碱(homoharringionine)、吡咯并苯并二氮䓬二聚体(PBD)、官能化吡咯并苯并二氮䓬、卡奇霉素(calcicheamicin)、鬼臼毒素(podophyiitoxin)、紫杉烷和长春花生物碱。可与可激活蛋白缀合的放射性药物的实例包括:^{123}I、^{89}Zr、^{125}I、^{131}I、^{99}mTc、^{201}T1、^{62}Cu、^{18}F、^{68}Ga、^{13}N、^{15}O、^{38}K、^{82}Rb、^{111}In、^{133}Xe、^{11}C和^{99}mTc(锝)。可与可激活蛋白缀合的重金属的实例包括:钡、金和铂。可与可激活蛋白缀合的抗支原体剂的实例包括:泰乐菌素(tylosine)、壮观霉素(spectinomycin)、链霉素B(streptomycin B)、氨苄青霉素(ampicillin)、磺胺

(sulfanilamide)、多粘菌素(polymyxin)和氯霉素(chloramphenicol)。

[0248] 在一些实施方案中,可激活蛋白可包含信号肽。如果包含多个多肽,则可激活蛋白可包含多个信号肽,例如多个多肽中每个多肽一个信号肽。信号肽可以是位于新合成的蛋白质末端(例如,N端或C端)的肽(例如,10-30个氨基酸长),所述新合成的蛋白质的目的地为分泌途径。在一些实施方案中,信号肽可经由间隔子与可激活蛋白缀合。在一些实施方案中,间隔子在不存在信号肽的情况下与可激活蛋白缀合。

[0249] 本领域普通技术人员将认识到大量可能的剂可缀合于本文所述的任何可激活蛋白。剂可以通过缀合部分与可激活蛋白的另一个组分缀合。缀合可包括将使两个分子结合的任何化学反应,只要可激活蛋白和其它部分保留它们的相应活性即可。缀合可包括许多化学机制,例如共价结合、亲和结合、嵌入、配位结合和络合。在一些实施方案中,结合可以是共价结合。共价结合可通过现有侧链的直接缩合或通过掺入外部桥接分子实现。许多二价或多价连接剂可用于缀合本文所述的任何可激活蛋白。举例来说,缀合可包括有机化合物,例如硫代酸酯、碳二亚胺、琥珀酰亚胺酯、戊二醛、重氮苯和六亚甲基二胺。在一些实施方案中,可激活蛋白可包括或以其它方式引入一个或多个非天然氨基酸残基以提供适合的缀合位点。

[0250] 在一些实施方案中,剂和/或缀合物可通过二硫键(例如半胱氨酸分子上的二硫键)附接于抗原结合结构域。因为许多癌症天然地释放高水平的还原剂谷胱甘肽,所以存在于癌性组织微环境中的谷胱甘肽可还原二硫键,随后在递送部位处释放剂和/或缀合物。

[0251] 在一些实施方案中,当缀合物在靶标部位(例如患病组织(例如癌性组织))内在补体存在下结合于它的靶标时,将缀合物和/或剂附接于接头的酰胺键或酯键发生裂解,从而使缀合物和/或剂以其激活形式释放。当施用至受试者时,这些缀合物和/或剂可实现缀合物和/或剂在靶标部位(例如患病组织(例如癌性组织))处的递送和释放。这些缀合物和/或剂可有效地在体内递送本文所述的任何缀合物和/或剂。

[0252] 在一些实施方案中,缀合部分不能被补体系统的酶裂解。举例来说,缀合物和/或剂在无补体激活的情况下释放,因为补体激活最终会溶解靶标细胞。在这类实施方案中,缀合物和/或剂将被递送到靶标细胞(例如激素、酶、皮质类固醇、神经递质或基因)。此外,缀合部分略微有点容易被血清蛋白酶裂解,并且缀合物和/或剂在靶标部位处缓慢释放。

[0253] 在一些实施方案中,缀合物和/或剂可被设计成使得缀合物和/或剂递送到靶标部位(例如疾病组织(例如癌性组织)),但缀合物和/或剂不释放。

[0254] 在一些实施方案中,缀合物和/或剂可直接附接到抗原结合结构域,或者经由氨基酸(例如D-氨基酸)、肽、含硫醇部分、或可被修饰成包括随后可用于通过本文所述的方法附接到抗原结合结构域的官能团的其它有机化合物附接。

[0255] 在一些实施方案中,可激活蛋白可包括剂的至少一个缀合点。在一些实施方案中,所有可能的缀合点都可用于与剂的缀合。在一些实施方案中,一个或多个缀合点可包括二硫键中涉及的硫原子、链间二硫键中涉及的硫原子、链间硫键中涉及的硫原子而非链内二硫键中涉及的硫原子、和/或半胱氨酸或含有硫原子的其它氨基酸残基的硫原子。在这类情况下,残基可天然地存在于蛋白质构建体结构中,或可使用包括定点诱变、化学转化、或非天然氨基酸的错误掺入的方法掺入蛋白质构建体中。

[0256] 本公开还提供了用于制备具有一种或多种缀合剂的可激活蛋白的方法和材料。在

一些实施方案中,可激活蛋白可以被修饰成包括一个或多个链间二硫键。举例来说,二硫键可在暴露于还原剂,例如但不限于TCEP、DTT或β-巯基乙醇之后进行还原。在一些情况下,二硫键的还原仅是部分的。如本文所用,术语部分还原是指其中使可激活蛋白与还原剂接触,并且所有可能的缀合位点的一部分进行还原(例如并非所有的二硫键都被还原)的情况。在一些实施方案中,如果在与还原剂接触之后所有可能的缀合位点中的少于99%(例如少于98%、97%、96%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%或5%)被还原,那么可激活蛋白被部分还原。在一些实施方案中,有一个或多个链间二硫键还原的可激活蛋白可缀合于与游离硫醇具有反应性的药物。

[0257] 本公开还提供了用于使治疗剂缀合于可激活蛋白上的特定位置的方法和材料。在一些实施方案中,可以修饰可激活蛋白,使得治疗剂可以在可激活蛋白的特定位置与可激活蛋白缀合。例如,可以通过有利于与可激活蛋白结合的方式部分还原可激活蛋白。在这类情况下,可激活蛋白的部分还原可以可激活蛋白中的缀合位点不被还原的方式发生。在一些实施方案中,选择可激活蛋白上的一个或多个缀合位点以有助于剂在蛋白质构建体上的特定位置处缀合。各种因素可影响在用还原剂处理后可激活蛋白的“还原水平”。不加限制地举例来说,还原剂与可激活蛋白的比率、孵育的时长、孵育温度和/或还原反应溶液的pH值可需要优化以用本文所述的方法和材料实现可激活蛋白的部分还原。因素(例如还原剂与可激活蛋白的比率、与还原剂一起孵育的时长和温度和/或还原剂的pH值)的任何适当组合可用于实现可激活蛋白的部分还原(例如可能的缀合位点的普遍还原或在特定缀合位点处的还原)。

[0258] 有效的还原剂与可激活蛋白的比率可为以允许与剂缀合的方式至少部分地还原可激活蛋白(例如可能的缀合位点的普遍还原或在特定缀合位点处的还原)的任何比率。在一些实施方案中,还原剂与可激活蛋白的比率可在约20:1至1:1、10:1至1:1、9:1至1:1、8:1至1:1、7:1至1:1、6:1至1:1、5:1至1:1、4:1至1:1、3:1至1:1、2:1至1:1、20:1至1:1.5、10:1至1:1.5、9:1至1:1.5、8:1至1:1.5、7:1至1:1.5、6:1至1:1.5、5:1至1:1.5、4:1至1:1.5、3:1至1:1.5、2:1至1:1.5、1.5:1至1:1.5或1:1至1:1.5的范围内。

[0259] 用还原剂处理可激活蛋白的有效孵育时间和温度可为以允许剂与可激活蛋白缀合的方式至少部分地还原可激活蛋白(例如可能的缀合位点的普遍还原或在特定缀合位点处的还原)的任何时间和温度。在一些实施方案中,用于处理可激活蛋白的孵育时间和温度可在37℃下约1小时至37℃下约12小时的范围(或其中的任何子范围)内。

[0260] 用还原剂处理可激活蛋白的还原反应的有效pH值可为以允许可激活蛋白与剂缀合的方式至少部分地还原可激活蛋白(例如可能的缀合位点的普遍还原或在特定缀合位点处的还原)的任何pH值。

[0261] 当使部分还原的可激活蛋白与含有硫醇的剂接触时,该剂可缀合于可激活蛋白中的链间硫醇。剂可使用含有硫醇的试剂(例如半胱氨酸或N-乙酰基半胱氨酸)以包括硫醇的方式来修饰。举例来说,可激活蛋白可在约37℃下以还原剂与可激活蛋白的所需比率与还原剂(例如TEPC)一起孵育约1小时之后来部分还原。有效的还原剂与可激活蛋白的比率可为以允许含有硫醇的剂缀合的方式部分地还原至少两个位于可激活蛋白中的链间二硫键(例如可能的缀合位点的普遍还原或在特定缀合位点处的还原)的任何比率。

[0262] 在一些实施方案中,可激活蛋白可以避免还原任何链内二硫键的方式被还原剂还原。在一些实施方案中,可激活蛋白以避免还原任何链内二硫键并且还原至少一个链间二硫键的方式被还原剂还原。

[0263] 在一些实施方案中,剂(例如缀合于可激活蛋白的剂)是可检测部分,例如像标记或其它标志物。举例来说,剂可以是或包括放射性标记氨基酸、一种或多种可通过标记亲和素(例如含有可通过光学或量热方法检测的荧光标志物或酶活性的链霉亲和素)检测的生物素基部分、一种或多种放射性同位素或放射性核素、一种或多种荧光标记、一种或多种酶标记和/或一种或多种化学发光剂。在一些实施方案中,可检测部分可通过间隔分子来附接。在一些实施方案中,可检测标记可包括显像剂、造影剂、酶、荧光标记、发色团、染料、一种或多种金属离子或基于配体的标记。在一些实施方案中,显像剂可包含放射性同位素。在一些实施方案中,放射性同位素可为铟或锝。在一些实施方案中,造影剂可包含碘、钆或铁氧化物。在一些实施方案中,酶可包含辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或β-半乳糖苷酶。在一些实施方案中,荧光标记可包含黄色荧光蛋白(YFP)、青色荧光蛋白(CFP)、绿色荧光蛋白(GFP)、修饰的红色荧光蛋白(mRFP)、红色荧光蛋白tdimer2(RFP tdimer2)、HCRED或铕衍生物。在一些实施方案中,发光标记可包含N-甲基吖啶衍生物。在一些实施方案中,标记可包含Alexa Fluor®标记,例如Alex Fluor®680或Alexa Fluor®750。在一些实施方案中,基于配体的标记可包含生物素、亲和素、链霉亲和素或一种或多种半抗原。

[0264] 可检测标记的其它实例还包括各种酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料和放射性物质。合适的酶的实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;合适的辅基复合物的实例包括链霉亲和素/生物素和亲和素/生物素;合适的荧光材料的实例包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料的一实例包括鲁米诺;生物发光材料的实例包括荧光素酶、荧光素和水母发光蛋白,并且合适的放射性物质的实例包括^{125}I、^{131}I、^{35}S或^{3}H。

[0265] 在一些实施方案中,剂可使用碳水化合物部分、氢硫基、氨基或羧酸酯基缀合于可激活蛋白。在一些实施方案中,剂可经由本文所述的接头和/或CM缀合于可激活蛋白。在一些实施方案中,剂可与可激活蛋白中的半胱氨酸或赖氨酸缀合。在一些实施方案中,剂可与可激活蛋白的另一个残基(例如本文公开的那些残基)缀合。

[0266] 在一些实施方案中,多种双官能蛋白质偶联剂可用于使剂与可激活蛋白缀合,包括但不限于N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)、亚氨基硫杂环戊烷(IT)、亚氨酸酯的双官能衍生物(例如二亚胺代己二酸二甲酯盐酸盐)、活性酯(例如辛二酸二琥珀酰亚胺酯)、醛(例如戊二醛)、双叠氮基化合物(例如双(对叠氮基苯甲酰基)己二胺)、双重氮鎓衍生物(例如双(对重氮鎓苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(例如甲苯2,6-二异氰酸酯)和双活性氟化合物(例如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。举例来说,篦麻毒素免疫毒素可如Vitetta等人,Science 238:1098(1987)中所述来制备。在一些实施方案中,碳-14标记的1-异硫氰基苯甲基-3-甲基二乙三胺五乙酸(MX-DTPA)螯合剂可用于使放射性核苷酸与可激活蛋白缀合。(参见例如WO94/11026)。

[0267] 合适的缀合部分包括文献中描述的那些。(参见例如Ramakrishnan,S.等人,Cancer Res.44:201-208(1984),其描述了MBS(M-马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯)的使用)。还参见美国专利第5,030,719号,其描述了经由寡肽偶联于可激活蛋白的卤

化乙酰基酰肼衍生物的使用。在一些实施方案中,适合缀合部分包括:(i)EDC(1-乙基-3-(3-二甲基氨基-丙基)碳二亚胺盐酸盐;(ii)SMPT(4-琥珀酰亚胺基氧基羰基-α-甲基-α-(2-吡啶基-二硫基)-甲苯(Pierce Chem.公司,目录号(21558G);(iii)SPDP(琥珀酰亚胺-6-[3-(2-吡啶基二硫基)丙酰胺基]己酸酯(Pierce Chem.公司,目录号21651G);(iv)磺基-LC-SPDP(6-[3-(2-吡啶基二硫基)-丙酰胺基]己酸磺基琥珀酰亚胺酯(Pierce Chem.公司,目录号2165-G);以及(v)缀合于EDC的磺基-NHS(N-羟基磺基-琥珀酰亚胺:Pierce Chem.公司,目录号24510)。另外的示例缀合部分包括SMCC、磺基-SMCC、SPDB和磺基-SPDB。

[0268] 上文所述的缀合部分可含有具有不同属性的组分,因此使得缀合物具有不同的物理化学性质。举例来说,烷基羧酸酯的磺基-NHS酯比芳族羧酸酯的磺基-NHS酯稳定。含有NHS酯的接头的溶解性小于磺基-NHS酯。此外,SMPT含有具有空间位阻的二硫键,并且可形成稳定性增加的缀合物。一般来说,二硫键联的稳定性小于其它键联,因为二硫键联在体外裂解,从而导致可用的缀合物较少。特别地,磺基-NHS可增强碳二亚胺偶联的稳定性。相比于单独碳二亚胺偶联反应,在与磺基-NHS联合使用时碳二亚胺偶联(例如EDC)形成对水解更加具有抗性的酯。

[0269] 本领域普通技术人员将认识到多种可能的部分可与本公开的可激活蛋白偶联。(参见例如“Conjugate Vaccines”,Contributions to Microbiology and Immunology,J.M.Cruse和R.E.Lewis,Jr(编),Carger Press,New York,(1989),其全部内容以引用的方式并入本文)。一般来说,剂(例如细胞毒性剂)与可激活蛋白的有效缀合可通过将剂结合于可激活蛋白,同时还允许剂和可激活蛋白保留功能性的任何化学反应来实现。

[0270] 核酸和载体

[0271] 在一些方面,本公开还提供了包含编码本文中的可激活分子(例如,可激活抗体)或其组分或片段的序列的核酸。核酸可包含可激活蛋白中的TB、CM、MM、EM和接头的编码序列。在可激活蛋白包含多个多肽(例如不同多肽上的多个TB,或TB包含多个多肽)的情况下,核酸可包含多个多肽的编码序列。在一些实例中,其中一种多肽的编码序列包含于一个核酸内,而另一种多肽的编码序列包含于另一个核酸内。在一些实例中,多个多肽中的两个或更多个多肽的编码序列包含于同一核酸内。本公开包括编码如本文所述的蛋白质或其部分的多核苷酸,以及这类多核苷酸用于产生蛋白质和/或用于治疗目的的用途。这类多核苷酸可包括编码如本文定义的蛋白质的DNA和RNA分子(例如,mRNA、自我复制型RNA、自我扩增型mRNA等)。本公开包括包含这类多核苷酸的组合物。在一些方面,这类组合物可以治疗性或预防性使用。

[0272] 除非另外指定,否则“编码蛋白质的核酸序列”包括彼此是简并形式,因此编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。术语“核酸”是指呈单链或双链形式的脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA),或它们的组合。除非具体限制,否则该术语涵盖含有与参考核苷酸具有类似结合性质的天然核苷酸的已知类似物的核酸。除非另外指示,否则特定核酸序列还隐含地涵盖互补序列以及明确指示的序列。在一些实施方案中,核酸为DNA。在一些实施方案中,核酸为RNA。

[0273] 当提及多肽一级氨基酸序列中第一结构域或序列相对于第二结构域或序列的位置时,术语“N端定位”意指第一结构域位置更靠近多肽一级氨基酸序列的N端。在一些实施方案中,在第一结构域或序列与第二结构域或序列之间可存在另外的序列和/或结构域。当

提及多肽一级氨基酸序列中第一结构域或序列相对于第二结构域或序列的位置时,术语“C端定位”意指第一结构域位置更靠近多肽一级氨基酸序列的C端。在一些实施方案中,在第一结构域或序列与第二结构域或序列之间可存在另外的序列和/或结构域。

[0274] 修饰可通过本领域中已知的标准技术,例如定点诱变和聚合酶链式反应(PCR)介导的诱变来引入核苷酸序列中。保守性氨基酸取代是其中氨基酸残基经具有类似侧链的氨基酸残基替换的氨基酸取代。本领域中已定义具有类似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括:具有酸性侧链的氨基酸(例如天冬氨酸和谷氨酸)、具有碱性侧链的氨基酸(例如赖氨酸、精氨酸和组氨酸)、非极性氨基酸(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸和色氨酸)、不带电荷的极性氨基酸(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸)、亲水性氨基酸(例如精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、组氨酸、赖氨酸、丝氨酸和苏氨酸)、疏水性氨基酸(例如丙氨酸、半胱氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸)。其它氨基酸家族包括:脂肪族-羟基氨基酸(例如丝氨酸和苏氨酸)、酰胺家族(例如天冬酰胺和谷氨酰胺)、脂肪族家族(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸)以及芳香族家族(例如苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸)。

[0275] 本公开还提供了包含本文所述的任何核酸的载体和载体组。本领域技术人员将能够选择适用于制备本文所述的任何可激活蛋白的载体或载体组(例如表达载体),并使用所述载体或载体组表达本文所述的任何可激活蛋白。举例来说,在选择载体或载体组时,可选择细胞类型,使得一种或多种载体可需要能够整合到细胞的染色体中和/或在细胞中复制。本文还描述了可用于产生可激活蛋白的示例性载体。如本文所用,术语“载体”是指能够诱导重组蛋白(例如第一或第二单体)在细胞(例如本文所述的任何细胞)中表达的多核苷酸。“载体”能够将核酸和其片段递送到宿主细胞中,并且包括调节序列(例如启动子、增强子、多腺苷酸(poly(A))信号)。外源性多核苷酸可插入至表达载体中以进行表达。术语“载体”还包括人工染色体、质粒、逆转录病毒和杆状病毒载体。

[0276] 用于构建包含本文所述的任何核酸并且适于对细胞(例如哺乳动物细胞)进行转化的适合载体的方法在本领域中是众所周知的。参见例如Sambrook等人编,“Molecular Cloning:A Laboratory Manual,”第2版,Cold Spring Harbor Press,1989和Ausubel等人编,“Current Protocols in Molecular Biology”,Current Protocols,1993。

[0277] 载体的实例包括质粒、转座子、粘粒和病毒载体(例如任何腺病毒载体(例如pSV或pCMV载体)、腺相关病毒(AAV)载体、慢病毒载体和逆转录病毒载体)以及任何Gateway®载体。载体可例如包括足以达成表达的顺式作用元件;用于表达的其它元件可由宿主哺乳动物细胞或在体外表达系统中提供。熟练从业者将能够选择适用于制备本文所述的任何可激活蛋白的载体和哺乳动物细胞。

[0278] 在一些实施方案中,可激活蛋白可使用重组DNA技术以及在真核或原核物种中的表达来以生物合成方式制备。

[0279] 细胞

[0280] 在一些方面,本公开提供了包含本文所述的任何载体或核酸的重组宿主细胞。细胞可用于产生本文所述的可激活分子(例如可激活抗体)。在一些实施方案中,细胞可以是动物细胞、哺乳动物细胞(例如人细胞)、啮齿动物细胞(例如小鼠细胞、大鼠细胞、仓鼠细胞

或豚鼠细胞)、非人灵长类动物细胞、昆虫细胞、细菌细胞、真菌细胞或植物细胞。在一些实施方案中,细胞可以是真核细胞。如本文所用,术语“真核细胞”是指具有明显的、有膜包围的细胞核的细胞。这类细胞可包括例如哺乳动物(例如啮齿动物、非人灵长类动物或人)、昆虫、真菌或植物细胞。在一些实施方案中,真核细胞是酵母细胞,例如酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)。在一些实施方案中,真核细胞是高等真核细胞,例如哺乳动物、鸟类、植物或昆虫细胞。哺乳动物细胞的非限制性实例包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞和人胚肾细胞(例如HEK293细胞)。在一些实施方案中,细胞是原核细胞。

[0281] 将核酸和载体(例如本文所述的任何载体或任何载体组)引入细胞中的方法是本领域中已知的。可用于将核酸引入细胞中的方法的实例包括:脂质体转染、转染、磷酸钙转染、阳离子聚合物转染、病毒转导(例如腺病毒转导、慢病毒转导)、纳米颗粒转染和电穿孔。

[0282] 在一些实施方案中,引入步骤包括向细胞中引入包括编码组成本文所述的任何可激活蛋白的单体的核酸的载体(例如本文所述的任何载体或载体组)。

[0283] 组合物和药盒

[0284] 本公开还提供了包含本文所述的可激活分子(例如,可激活抗体)的组合物和药盒。所述组合物和药盒还可以包含一种或多种赋形剂、载体、试剂、使用可激活蛋白所需的说明书。

[0285] 在一些实施方案中,组合物可以是药物组合物,其包含可激活蛋白、其衍生物、片段、类似物和同源物。药物组合物可包含可激活蛋白和药学上可接受的载体。如本文所用,术语“药学上可接受的载体”意图包括与药物施用相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。合适的载体在Remington’sPharmaceutical Sciences的最新版本中进行了描述,该书是本领域的标准参考文本,其以引用的方式并入本文中。这类载体或稀释剂的适合实例包括水、盐水、林格氏溶液(ringer’s solution)、右旋糖溶液和5%人血清白蛋白。还可以使用脂质体和非水性媒介物,如不挥发油。用于药学活性物质的这类介质和试剂的用途是本领域众所周知的。除非任何常规介质或试剂与活性化合物不相容,否则预期其用于组合物中。补充性活性化合物也可并入组合物中。

[0286] 可将药物组合物配制成与其预期施用途径相容。施用途径的实例包括肠胃外,例如静脉内、皮内、皮下、口服(例如吸入)、透皮(例如局部)、透粘膜和直肠施用。用于肠胃外、皮内或皮下应用的溶液或悬浮液可包括以下组分中的一种或多种:无菌稀释剂,例如注射用水、盐水溶液、不挥发油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶剂;抗细菌剂,例如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,例如乙二胺四乙酸(EDTA);缓冲剂,例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐,以及用于调节张力的剂,例如氯化钠或右旋糖。可用酸或碱(例如盐酸或氢氧化钠)调节pH值。肠胃外制剂可封装在由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。在一些,本文所述的任何可激活蛋白与防止从身体快速消除的载体一起制备,例如持续和控制释放制剂,包括植入物和微囊化递送系统。可使用生物可降解的生物相容性聚合物,例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯、聚乳酸-共-乙醇酸和聚乳酸。这类药物组合物和制剂的制备方法对本领域的技术人员来说是显而易见的。举例来说,可激活蛋白可包埋在例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊(例如分别为羟甲基纤维素或明胶-微胶囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)中、包埋在胶体药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊)中

或包埋在粗乳液中。

[0287] 可以制备持续释放制剂。持续释放制剂的适合实例包括含有抗体的固体疏水性聚合物的半渗透性基质,所述基质呈成形物品,例如膜或微胶囊的形式。持续释放基质的实例包括聚酯、水凝胶(例如聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚乳酸、L-谷氨酸与L-谷氨酸y乙酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物(例如由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林(leuprolide acetate)组成的可注射微球)和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。虽然例如乙烯-乙酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸的聚合物能够释放分子超过100天,但某些水凝胶释放蛋白质的时间较短。

[0288] 在一些实施方案中,适用于可注射用途的药物组合物包括无菌水溶液(可溶于水的情况下)或分散体和临用方制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。对于静脉内施用,合适的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL™(BASF,Parsippany,N.J.)、磷酸盐缓冲盐水(PBS)等。组合物可为无菌的且应当为流体,且具有便于注射的粘度。在制造和储存的条件下它必须稳定并且必须进行防腐以防止例如细菌和真菌的微生物的污染作用。载体可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)和它们适合的混合物。对于分散的微粒组合物,例如,通过在颗粒上使用例如卵磷脂的包衣,以及在分散体的情况下通过维持所需的粒径,和通过使用表面活性剂,可以维持适当的流动性。在一些实施方案中,药物组合物还可包含一种或多种抗细菌剂和/或抗细菌剂和抗真菌剂(例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等)。在一些实施方案中,组合物中可包括等渗剂,例如糖类、多元醇(例如甘露醇、山梨醇)等,以及盐,例如氯化钠等。可通过在组合物中包括延迟吸收的剂(例如单硬脂酸铝和明胶)来实现可注射组合物的延长吸收。

[0289] 在一些实施方案中,药物组合物可包含无菌注射溶液。可通过根据需要将所需量的活性化合物与一种上文列举的成分或其组合并入适当的溶剂中,随后进行过滤灭菌来制备无菌注射溶液。通常,可通过将活性化合物并入无菌媒介物中来制备分散体,所述媒介物含有碱性分散介质和上文列举的那些成分中所需要的其它成分。在用于制备无菌注射溶液的无菌粉剂的情况下,制备方法是真空干燥和冷冻干燥,从先前无菌过滤溶液中得到活性成分加任何另外所需成分的粉末。

[0290] 在一些实施方案中,药物组合物可包含口服组合物。口服组合物可包括惰性稀释剂或可食用载体。可将它们封装在明胶胶囊中或压成片剂。处于口服治疗剂施用的目的,活性化合物可以与赋形剂掺混并以片剂、含片或胶囊的形式使用。还可以使用流体载体来制备口服组合物以用作漱口水,其中将流体载体中的化合物口服并漱口、咳出或吞咽。可包括药物相容性结合剂和/或佐剂材料作为组合物的一部分。片剂、丸剂、胶囊、含片等可含有以下成分中的任一种或具有类似性质的化合物:粘合剂,例如微晶纤维素、黄蓍胶或明胶;赋形剂,例如淀粉或乳糖;崩解剂例如海藻酸、Primogel或玉米淀粉;润滑剂,例如硬脂酸镁或Sterotes;助流剂,例如胶体二氧化硅;甜味剂,例如蔗糖或糖精;或调味剂,例如薄荷、水杨酸甲酯或橙子调味剂。

[0291] 在一个实施方案中,药物组合物可被配制用于通过吸入施用。举例来说,可将化合物以气溶胶喷雾的形式从含有合适的推进剂(例如气体,例如二氧化碳)的压力容器或分配器或者喷雾器中递送。

[0292] 在一个实施方案中,药物组合物可被配制用于全身施用。例如,全身施用可以是静脉内,也可以是透粘膜或透皮方式。对于透粘膜或透皮施用,可在制剂中使用适于待渗透的屏障的渗透剂。这类渗透剂在本领域中通常是已知的,并且包括例如用于经粘膜施用的去垢剂、胆汁盐和夫西地酸衍生物。经粘膜施用可以通过使用鼻腔喷雾剂或栓剂实现。对于透皮施用,可将活性化合物配制成软膏、药膏、凝胶或乳膏,如本领域通常已知的。

[0293] 在一些实施方案中,药物组合物可被制备为栓剂(例如,具有常规栓剂基质如可可脂和其它甘油酯)或保留灌肠剂的形式,以用于直肠递送。

[0294] 在一个实施方案中,药物组合物可与防止从身体快速消除的载体一起制备,例如持续和控制释放制剂,包括植入物和微囊化递送系统。可使用生物可降解的生物相容性聚合物,例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯、聚乳酸-共-乙醇酸和聚乳酸。用于制备这类制剂的方法对本领域技术人员来说是显而易见的。

[0295] 宜将口服或肠胃外组合物配制成易于施用和均匀剂量的单位剂型。如本文所用的单位剂型是指适合作为待治疗的受试者的单一剂量的物理离散单位;每个单位含有经过计算,与所需药物载体结合可产生所需治疗效果的预定量的活性化合物。本公开的单位剂型的规格由以下情况规定并且直接取决于以下情况:活性化合物的独特特征和待实现的特定治疗效果,以及混配这类用于治疗个体的活性化合物的领域内的固有限制。

[0296] 在一些实施方案中,组合物(例如药物组合物)可包括在容器、小瓶、注射器、注射笔、包装或分配器中,任选地连同施用说明书。

[0297] 本文还提供了包括本文所述的任何可激活蛋白、包括本文所述的任何可激活蛋白的任何组合物或包括本文所述的任何可激活蛋白的任何药物组合物的药盒。还提供了除本文所述的可激活蛋白之外还包括一种或多种第二治疗剂的药盒。一种或多种第二治疗剂可以与可激活蛋白分开的剂量施用形式提供。或者,一种或多种第二治疗剂可与可激活蛋白一起配制。

[0298] 本文所述的任何药盒都可包括关于使用本文所述的任何组合物(例如药物组合物)和/或任何可激活蛋白的说明书。在一些实施方案中,药盒可包括关于进行本文所述的任何方法的说明书。在一些实施方案中,药盒可包括至少一剂本文所述的任何组合物(例如药物组合物)。在一些实施方案中,药盒可提供用于施用本文所述的任何药物组合物的注射器。

[0299] 本文还提供了通过本文所述的任何方法产生的可激活蛋白。还提供了包含通过本文所述的任何方法产生的任何可激活蛋白的组合物(例如药物组合物)。本文还提供了包括至少一剂的本文所述的任何组合物(例如药物组合物)的药盒。

[0300] 产生可激活分子的方法

[0301] 本文提供了产生本文所述的任何可激活分子(例如可激活蛋白)的方法,所述方法包括:(a)在液体培养基中在足以产生所述可激活分子的条件下培养本文所述的任何重组宿主细胞;以及(b)从所述宿主细胞和/或所述液体培养基回收所述可激活分子。

[0302] 培养细胞的方法在本领域中是众所周知的。在一些实施方案中,可在有利于细胞增殖、细胞分化和细胞生长的条件下在体外维持细胞。举例来说,可通过使细胞(例如本文所述的任何细胞)与包括足以支持细胞活力和生长的必需的生长因子和补充剂的细胞培养基接触来培养重组细胞。

[0303] 在一些实施方案中,方法还可包括分离回收的可激活蛋白。可激活蛋白的分离可使用任何用于分离蛋白质种类的分离或纯化技术来进行,例如基于亲和力标签的蛋白质分离(例如聚组氨酸(His)标签、谷胱甘肽-S-转移酶标签等)、硫酸铵沉淀、聚乙二醇沉淀、尺寸排阻色谱法、配体亲和色谱法(例如蛋白A色谱法)、离子交换色谱法(例如阴离子或阳离子)、疏水性相互作用色谱法等。

[0304] 本文所述的组合物和方法可涉及使用允许在可激活蛋白的MM与TB之间形成二硫键的非还原性或部分还原性条件。

[0305] 在一些实施方案中,方法还包括将分离的可激活蛋白配制成药物组合物。各种制剂是本领域中已知的,并且在本文中进行了描述。本文所述的任何分离的可激活蛋白都可被配制用于任何施用途径(例如静脉内、肿瘤内、皮下、真皮内、口服(例如吸入)、经皮(例如局部)、透黏膜或肌肉内)。

[0306] 可激活分子的使用方法

[0307] 在一些方面,本公开还提供了本文中的可激活分子(例如,可激活抗体)的使用方法。在一些实施方案中,本公开提供了治疗受试者的疾病(例如癌症(例如本文所述的任何癌症))的方法,所述方法包括将治疗有效量的本文所述的任何可激活蛋白施用至所述受试者。在一些实施方案中,本公开提供了预防受试者的疾病、延迟疾病的进展、治疗疾病、缓解疾病的症状或以其它方式改善疾病的方法,所述方法通过将治疗有效量的本文所述的可激活蛋白施用至有需要的受试者来进行。术语"治疗"是指改善病症的至少一种症状。在一些实施方案中,所治疗的病症可以是癌症或自身免疫疾病或者是为了改善癌症或自身免疫疾病的至少一种症状。如本文所用,术语"受试者"是指任何哺乳动物。在一些实施方案中,受试者是猫科动物(例如猫)、犬科动物(例如狗)、马科动物(例如马)、兔、猪、啮齿动物(例如小鼠、大鼠、仓鼠或豚鼠)、非人灵长类动物(例如猴(例如猴(例如狒狒、狨猴)或猿(例如黑猩猩、大猩猩、猩猩或长臂猿))或人。在一些实施方案中,受试者是人。术语受试者和患者在本文可互换使用。在一些实施方案中,受试者先前已被鉴定或诊断为患有疾病(例如癌症(例如本文所述的任何癌症))。

[0308] 在一些实施方案中,受试者可被鉴定为具有增加哺乳动物细胞(例如,本文所述的任何哺乳动物细胞)中HER2的表达和/或活性的HER2基因突变。例如,增加哺乳动物细胞中HER2的表达和/或活性的HER2基因突变可以是基因重复,该突变引起具有一个或多个氨基酸取代(例如,选自由以下组成的组的一个或多个氨基酸取代:G309A、G309E、S310F、R678Q、L755S、L755W、I767M、D769H、D769Y、V777L、Y835F、V842I、R896C和G1201V)(与野生型蛋白质相比)的HER2表达。参见例如Weigelt和Reis-Filho,Cancer Discov.2013,3(2):145-147。

[0309] 检测受试者的HER2相关疾病的方法的非限制性实例包括:免疫组织化学、荧光原位杂交(FISH)、显色原位杂交(CISH)。参见例如Yan等人,Cancer Metastasis Rev.2015,34:157-164。

[0310] 本公开的可激活蛋白的治疗有效量通常涉及实现治疗目标所需的量。如上所述,这可能是抗体与其靶标抗原之间的结合相互作用,在某些情况下会干扰靶标的功能。施用所需要的量还将取决于可激活蛋白对其特定靶标的结合亲和力,并且还将取决于施用的可激活蛋白从其施用的其它受试者的自由体积中消耗的速率。本公开的可激活蛋白的治疗有效剂量的常见范围可为(借助于非限制性实例)约0.001、0.01、0.1、0.3、0.5、0.7、0.8、0.9、

1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50mg/kg体重或更高。本公开的可激活蛋白的结构使得与常规可激活抗体相比以及与常规抗体相比,可以减少施用于受试者的可激活蛋白的剂量。例如,以单位剂量计的施用剂量或在一个给药方案期内的总剂量与相应的常规可激活蛋白或相应的常规抗体的相应剂量相比,可以减少10%、20%、30%、40%或50%。

[0311] 常见的给药频率可以在例如每天一次或两次、每周一次、每两周一次或每月一次的范围内。

[0312] 治疗的有效性是结合任何已知的诊断或治疗特定病症的方法来确定的。筛选具有所需特异性的可激活蛋白的方法包括但不限于酶联免疫吸附测定(ELISA)和本领域已知的其它免疫介导技术。

[0313] 在另一个实施方案中,针对两个或更多个靶标的可激活蛋白用于本领域内已知的与靶标定位和/或定量有关的方法(例如,用于测量适当生理样品内一个或多个靶标的水平,用于诊断方法,用于对蛋白质进行成像等)。在给定的实施方案中,针对两个或更多个靶标的可激活蛋白,或其含有抗体衍生的抗原结合结构域的衍生物、片段、类似物或同源物,用作药理活性化合物(以下称为"治疗剂")。

[0314] 这些方法和用途的任意实施方案中使用的可激活蛋白可以在疾病的任何阶段施用。例如,可以将这种可激活蛋白施用于任何阶段的癌症患者,从早期到转移性。在一些实施方案中,可以将可激活蛋白和其制剂施用于患有或易患与异常靶标表达和/或活性相关的疾病或病症的受试者。

[0315] 可使用本领域已知的多种方法中的任一种来鉴别患有或易患与异常靶标表达和/或活性相关的疾病或病症的受试者。例如,可使用多种临床和/或实验室测试(例如身体检查和血液、尿液和/或粪便分析)中的任一种评估健康状况来鉴别患有癌症或其它肿瘤疾患的受试者。例如,可使用多种临床和/或实验室测试(例如身体检查和/或体液分析,例如血液、尿液和/或粪便分析)中的任一种评估健康状况来鉴别患有炎症和/或炎性病症的受试者。

[0316] 在一些实施方案中,如果实现了多种实验室或临床目标中任一种,则认为将可激活蛋白施用于患有与异常靶标表达和/或活性相关的疾病或病症的患者是成功的。例如,如果与疾病或病症相关的一种或多种症状得到缓解、减轻、抑制或不进展到进一步(即,更糟)状态,则认为将可激活蛋白施用于患有与异常靶标表达和/或活性相关的疾病或病症的患者是成功的。如果疾病或病症进入缓解期或不进展到进一步(即,更糟)状态,则认为将可激活蛋白施用于患有与异常靶标表达和/或活性相关的疾病或病症的患者是成功的。

[0317] 如本文所用,术语"治疗"包括降低受试者(例如本文所述的任何受试者)的疾病(例如癌症(例如本文所述的任何癌症))的一种或多种(例如1、2、3、4或5种)症状或体征的严重性、频率或数目。在疾病是癌症的一些实施方案中,治疗在患有癌症的受试者中减少癌症生长,抑制癌症进展,抑制癌症转移,或降低癌症复发的风险。

[0318] 在一些实施方案中,疾病可以是癌症。在一些实施方案中,受试者可已被鉴定或诊断为患有癌症。癌症的实例包括:实体瘤、血液肿瘤、肉瘤、骨肉瘤、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、黑素瘤、横纹肌肉瘤、尤因肉瘤(Ewing sarcoma)、骨肉瘤、B细胞肿瘤、多发性骨髓瘤、淋巴瘤(例如B细胞淋巴瘤、B细胞非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin'slymphoma)、霍奇金淋巴

瘤、皮肤T细胞淋巴瘤)、白血病(例如毛细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、急性髓系白血病(AML)、慢性髓系白血病(CML)、急性淋巴细胞白血病(ALL))、骨髓增生异常综合征(MDS)、卡波西肉瘤、视网膜母细胞瘤、胃癌、尿路上皮癌、肺癌、肾细胞癌、胃癌和食管癌、胰腺癌、前列腺癌、脑癌、结肠癌、骨癌、肺癌、乳腺癌、结直肠癌、卵巢癌、鼻咽腺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、头颈部鳞状细胞癌、子宫内膜癌、膀胱癌、宫颈癌、肝癌和肝细胞癌。在一些实施方案中,癌症是淋巴瘤。在一些实施方案中,淋巴瘤是伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)。在一些方面,受试者已被鉴定或诊断为患有家族性癌症综合征,例如利-弗劳梅尼综合征(Li Fraumeni Syndrome)、家族性乳腺癌-卵巢癌(BRCA1或BRAC2突变)综合征等。所公开方法还可用于治疗非实体癌症。示例性实体瘤包括各种器官系统的恶性病(例如肉瘤、腺癌和癌瘤),例如肺、乳腺、淋巴、胃肠(例如结肠)和泌尿生殖(例如肾、尿路上皮或睾丸肿瘤)道、咽、前列腺和卵巢的恶性病。示例性腺癌包括结直肠癌、肾细胞癌、肝癌、非小细胞肺癌和小肠癌。本文的组合物和方法可治疗的癌症的其它实例包括:成人急性淋巴母细胞白血病;儿童急性淋巴母细胞白血病;成人急性髓系白血病;肾上腺皮质癌;儿童肾上腺皮质癌;AIDS相关淋巴瘤;AIDS相关恶性病;肛门癌;儿童小脑星形细胞瘤;儿童大脑星形细胞瘤;肝外胆管癌;膀胱癌;儿童膀胱癌;骨肉瘤/恶性纤维组织细胞瘤骨癌;儿童脑干胶质瘤;成人脑肿瘤;儿童脑干胶质瘤脑肿瘤;儿童小脑星形细胞瘤脑肿瘤;儿童大脑星形细胞瘤/恶性胶质瘤脑肿瘤;儿童室管膜瘤脑肿瘤;儿童髓母细胞瘤脑肿瘤;儿童幕上原始神经外胚层肿瘤脑肿瘤;儿童视路和下丘脑胶质瘤脑肿瘤;儿童脑肿瘤(其它);乳腺癌;乳腺癌和妊娠;儿童乳腺癌;男性乳腺癌;儿童支气管腺瘤/类癌;儿童类癌肿瘤;胃肠类癌肿瘤;肾上腺皮质癌;胰岛细胞癌;原发灶不明癌(Carcinoma of Unknown Primary);原发性中枢神经系统淋巴瘤;儿童小脑星形细胞瘤;儿童大脑星形细胞瘤/恶性胶质瘤;宫颈癌;儿童癌症;慢性淋巴细胞白血病;慢性骨髓性白血病;慢性骨髓增生性病症;腱鞘透明细胞肉瘤;结肠癌;儿童结直肠癌;皮肤T细胞淋巴瘤;子宫内膜癌;儿童室管膜瘤;卵巢上皮癌;食管癌;儿童食管癌;尤因家族肿瘤;儿童颅外生殖细胞肿瘤;性腺外生殖细胞肿瘤;肝外胆管癌;眼内黑素瘤眼癌;视网膜母细胞瘤眼癌;胆囊癌;胃(胃部)癌;儿童胃(胃部)癌;胃肠类癌肿瘤;儿童颅外生殖细胞肿瘤;性腺外生殖细胞肿瘤;卵巢生殖细胞肿瘤;妊娠滋养细胞肿瘤;儿童脑干胶质瘤;儿童视路和下丘脑胶质瘤;毛细胞白血病;头颈癌;成人(原发性)肝细胞(肝)癌;儿童(原发性)肝细胞(肝)癌;成人霍奇金淋巴瘤(Hodgkin's Lymphoma);儿童霍奇金淋巴瘤;妊娠期霍奇金淋巴瘤;下咽癌;儿童下丘脑和视路胶质瘤;眼内黑素瘤;胰岛细胞癌(内分泌胰腺);卡波西肉瘤;肾癌;喉癌;儿童喉癌;成人急性淋巴母细胞白血病;儿童急性淋巴母细胞白血病;成人急性髓系白血病;儿童急性髓系白血病;慢性淋巴细胞白血病;慢性骨髓性白血病;毛细胞白血病;唇和口腔癌;成人(原发性)肝癌;儿童(原发性)肝癌;非小细胞肺癌;小细胞肺癌;成人急性淋巴母细胞白血病;儿童急性淋巴母细胞白血病;慢性淋巴细胞白血病;AIDS相关淋巴瘤;中枢神经系统(原发性)淋巴瘤;皮肤T细胞淋巴瘤;成人霍奇金淋巴瘤;儿童霍奇金淋巴瘤;妊娠期霍奇金淋巴瘤;成人非霍奇金淋巴瘤;儿童非霍奇金淋巴瘤;妊娠期非霍奇金淋巴瘤;原发性中枢神经系统淋巴瘤;华氏巨球蛋白血症(Macroglobulinemia,Waldenstrom's);男性乳腺癌;成人恶性间皮瘤;儿童恶性间皮瘤;恶性胸腺瘤;儿童髓母细胞瘤;黑素瘤;眼内黑素瘤;梅克尔细胞癌(Merkel Cell Carcinoma);恶性间皮瘤;原发灶隐匿的转移性颈部鳞癌;儿童多发性内分泌瘤形成综合

征;多发性骨髓瘤/浆细胞赘生物;蕈样肉芽肿病;骨髓增生异常综合征;慢性骨髓性白血病;儿童急性髓系白血病;多发性骨髓瘤;慢性骨髓增生性病症;鼻腔和鼻旁窦癌;鼻咽癌;儿童鼻咽癌;神经母细胞瘤;成人非霍奇金淋巴瘤;儿童非霍奇金淋巴瘤;妊娠期非霍奇金淋巴瘤;非小细胞肺癌;儿童口腔癌;口腔和唇癌;口咽癌;骨肉瘤/恶性骨纤维组织细胞瘤;儿童卵巢癌;卵巢上皮癌;卵巢生殖细胞肿瘤;卵巢低度恶性潜能肿瘤;胰腺癌;儿童胰腺癌;胰岛细胞胰腺癌;鼻旁窦和鼻腔癌;甲状旁腺癌;阴茎癌;嗜铬细胞瘤;儿童松果体和幕上原始神经外胚层肿瘤;垂体肿瘤;浆细胞赘生物/多发性骨髓瘤;胸膜肺母细胞瘤;妊娠和乳腺癌;妊娠和霍奇金淋巴瘤;妊娠和非霍奇金淋巴瘤;原发性中枢神经系统淋巴瘤;成人原发性肝癌;儿童原发性肝癌;前列腺癌;直肠癌;肾细胞(肾)癌;儿童肾细胞癌;肾盂和输尿管移行细胞癌;视网膜母细胞瘤;儿童横纹肌肉瘤;唾液腺癌;儿童唾液腺癌;尤因家族肿瘤肉瘤;卡波西肉瘤;肉瘤(骨肉瘤)/恶性骨纤维组织细胞瘤;儿童横纹肌肉瘤;成人软组织肉瘤;儿童软组织肉瘤;塞扎里综合征(Sezary Syndrome);皮肤癌;儿童皮肤癌;皮肤癌(黑素瘤);梅克尔细胞皮肤癌;小细胞肺癌;小肠癌;成人软组织肉瘤;儿童软组织肉瘤;原发灶隐匿的转移性颈部鳞癌;胃部(胃)癌;儿童胃部(胃)癌;儿童幕上原始神经外胚层肿瘤;皮肤T细胞淋巴瘤;睾丸癌;儿童胸腺瘤;恶性胸腺瘤;甲状腺癌;儿童甲状腺癌;肾盂和输尿管移行细胞癌;妊娠滋养细胞肿瘤;原发部位未知的儿童癌症;不寻常的儿童癌症;输尿管和肾盂移行细胞癌;尿道癌;子宫肉瘤;阴道癌;儿童视路和下丘脑胶质瘤;外阴癌;华氏巨球蛋白血症;维尔姆斯氏肿瘤(Wilms'Tumor);弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL);以及套细胞淋巴瘤(MCL)。以上提及的癌症的转移也可根据本文所述的方法来治疗或预防。

[0319] 在一些实施方案中,疾病可以是自身免疫疾病或疾患。在一些实施方案中,受试者可已被鉴定或诊断为患有自身免疫疾病或疾患,或者处于罹患自身免疫疾病或疾患的高风险下。自身免疫疾病的实例包括癌1型糖尿病、类风湿性关节炎(RA)、银屑病/银屑病性关节炎、多发性硬化、系统性红斑狼疮、炎症性肠病(例如,克罗恩病(Crohn'sdisease)、溃疡性结肠炎)、阿狄森病(Addison's disease)、格雷夫斯病(Graves'disease)、舍格伦综合征(Sjögren's syndrome)、桥本甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、重症肌无力、自身免疫性血管炎、恶性贫血、乳糜泻)、传染病(例如,水痘、普通感冒、白喉、大肠杆菌、贾第虫病(Giardiasis)、HIV/AIDS、传染性单核细胞增多症、流行性感冒(流感)、莱姆病(Lyme disease)、疟疾、麻疹、脑膜炎、腮腺炎、脊髓灰质炎(Poliomyelitis)(脊髓灰质炎(polio))、肺炎、落基山斑疹热(Rocky mountain spotted fever)、风疹(德国麻疹(German measles))、沙门氏菌感染(Salmonella infections)、严重急性呼吸道综合征(SARS)、性传播疾病、带状疱疹(Shingles)(带状疱疹(herpes zoster))、破伤风、中毒性休克综合征、肺结核、病毒性肝炎、西尼罗河病毒(West Nile virus)、百日咳(Whooping cough)(百日咳(pertussis)))、慢性炎症或移植排斥反应(例如肾脏、肝脏或心脏移植)、自身免疫疾病、传染病、慢性炎症或移植排斥反应。

[0320] 在一些实施方案中,本文中的方法可引起受试者的癌症的一种或多种症状的数目、严重性或频率降低(例如相较于在治疗之前受试者的癌症的一种或多种症状的数目、严重性或频率)。

[0321] 所述方法还可包括向受试者施用一种或多种另外的剂。

[0322] 在一些实施方案中,可激活蛋白可以在治疗期间和/或治疗之后与一种或多种另

外的剂联合施用。在一些实施方案中,可激活蛋白可以配制成单一治疗组合物,并且可以同时施用可激活蛋白和一种或多种另外的剂。或者,可激活蛋白和一种或多种另外的剂可以彼此分开,例如,各自配制成单独的治疗组合物,并且可激活蛋白和另外的剂同时施用,或者可激活蛋白和另外的剂在治疗方案期间的不同时间施用。举例来说,可以在施用另外的剂之前、在施用另外的剂之后、或者以交替方式施用可激活蛋白。可激活蛋白和一种或多种另外的剂可以单剂量或多剂量施用。

[0323] 本文中的一种或多种可激活蛋白可以与一种或多种抗炎药物、免疫抑制剂或代谢或酶抑制剂共同配制和/或共同施用。在一些实施方案中,本文中的一种或多种可激活蛋白可以与一种或多种其它类型的可激活蛋白(例如,不具有EM的可激活蛋白或激活形式包含EM的可激活蛋白)组合。

[0324] 本公开还提供了检测受试者或样品中裂解剂和/或靶标的存在或不存在的方法。这类方法可包括:(i)使受试者或生物样品与可激活蛋白接触,其中可激活蛋白包括可检测标记,该可检测标记位于可激活蛋白的在CM裂解后释放的部分上;以及(ii)测量受试者或生物样品中激活的蛋白的水平,其中受试者或生物样品中可检测水平的激活的蛋白指示受试者或生物样品中不存在和/或不充分存在裂解剂、靶标或裂解剂和靶标两者,使得在受试者或生物样品中不能检测到可激活蛋白的靶标结合和/或蛋白酶裂解,并且其中受试者或生物样品中激活的蛋白的可检测水平降低指示受试者或生物样品中存在裂解剂和靶标。

[0325] 可检测标记水平的降低可以是例如降低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%或基本上降低100%。在一些实施方案中,可检测标记可以与可激活蛋白的组分(例如TB)缀合。在一些实施方案中,可使用特异性结合于激活蛋白的二级试剂来测量受试者或样品中可激活蛋白的水平,其中试剂包含可检测标记。二级试剂可以是包含可检测标记的抗体。

[0326] 在一些实施方案中,可激活蛋白也可用于检测患者样品中的靶标,因此可用作诊断剂。例如,可激活蛋白可用于体外测定,例如ELISA,以检测患者样品中的靶标水平。举例来说,可激活TB可以固定在固体支持物(例如,微量滴定板的孔)上。固定的可激活蛋白可用作可存在于测试样品中的任何靶标的捕获蛋白。在使固定的可激活蛋白与患者样品接触之前,可冲洗固体支持物并用封闭剂(例如乳蛋白或白蛋白)处理以防止分析物的非特异性吸附。

[0327] 在一些实施方案中,基于使用可激活蛋白在体外诊断测定中获得的结果,可以基于靶标蛋白(例如抗原)的表达水平对受试者的疾病进行分期。对于给定的疾病,从被诊断为处于疾病进展的各个阶段和/或处于疾病治疗性治疗的各个时间点的受试者中抽取血液样品。使用为进展或治疗的每个阶段提供统计学上显著结果的样品群体,指定了可被认为是每个阶段的特征的靶标蛋白(例如抗原)浓度范围。

[0328] 本文中的可激活蛋白也可用于诊断和/或成像方法。在一些实施方案中,这类方法可以是体外方法。在一些实施方案中,这类方法可以是体内方法。在一些实施方案中,这类方法可以是原位方法。在一些实施方案中,这类方法可以是离体方法。例如,具有CM的可激活蛋白可用于检测能够裂解CM的酶的存在或不存在。这类可激活蛋白可用于诊断中,其可包括通过测量给定宿主生物体的给定细胞或组织中激活的蛋白(即,由可激活蛋白的裂解产生的抗体)的积聚来在体内检测(例如,定性或定量)酶活性(或在一些实施方案中,具有

增加的还原电位的环境,例如可提供二硫键还原的环境)。激活的蛋白的这种积聚不仅表明组织表达酶活性(或根据CM底物的性质而增加的还原电位),而且还表明组织表达激活的蛋白结合的靶标。

[0329] 例如,可选择CM作为在肿瘤部位、生物限制部位的病毒或细菌感染部位(例如像脓肿、器官等)等处发现的蛋白酶的蛋白酶底物。TB可为结合靶标蛋白(例如抗原)的TB。使用本领域技术人员熟悉的方法,可将可检测标记(例如,荧光标记或放射性标记或放射性示踪剂)缀合于可激活蛋白的TB或其它区域。可在上述筛选方法的背景下讨论合适的可检测标记,并且下文提供了另外的具体实例。使用对疾病状态的蛋白质或肽具有特异性的TB以及在感兴趣的疾病组织中活性升高的蛋白酶,可激活蛋白将表现出相对于CM特异性酶不以可检测水平存在或以低于疾病组织中的水平存在或无活性(例如,呈酶原形式或呈与抑制剂的复合物)的组织,增加的与疾病组织的结合率。由于肾脏过滤系统迅速清除血液中的小蛋白质和多肽,并且由于对CM具有特异性的酶不以可检测水平存在(或以较低水平存在于非疾病组织中或以无活性构象存在),相对于非疾病组织,激活的蛋白在疾病组织中的积累增加。

[0330] 在一些实施方案中,可激活蛋白可用于体内成像,其中在受试者(例如,哺乳动物,包括人)中检测到荧光信号表明疾病部位含有靶标并且含有对可激活蛋白的CM具有特异性的蛋白酶。体内成像可用于鉴别或以其它方式细化适用于用本公开的可激活蛋白治疗的患者群体。例如,对于靶标和裂解正测试的可激活蛋白的CM中的底物的蛋白酶均测试为阳性(例如,激活的蛋白在疾病部位积聚)的患者被鉴定为适合用包含这种CM的这种可激活蛋白治疗的候选者。同样,测试为阴性的患者可被鉴定为另一种疗法的合适候选者(即不适合用所测试的可激活蛋白进行治疗)。在一些实施方案中,可用包含不同CM的其它可激活蛋白测试对于第一可激活蛋白测试为阴性的这类患者,直到鉴别出适用于治疗的可激活蛋白(例如,包含在疾病部位被患者裂解的CM的可激活蛋白)。

[0331] 在一些实施方案中,原位成像可用于鉴别要治疗的患者的方法。例如,在原位成像中,可激活蛋白可用于筛选患者样品,以鉴别在适当位置,例如肿瘤部位具有适当的蛋白酶和靶标的那些患者。在一些实施方案中,原位成像用于鉴别或以其它方式细化适用于用本公开的可激活蛋白治疗的患者群体。例如,对于靶标和裂解正测试的可激活蛋白的CM中的底物的蛋白酶均测试为阳性(例如,激活的抗体在疾病部位积聚)的患者被鉴定为适合用包含这种CM的这种可激活蛋白治疗的候选者。同样,对于靶标和裂解正使用这些方法测试的可激活蛋白中所用的CM的蛋白酶中的一者或两者测试为阴性的患者被鉴定为另一种疗法的合适候选者(即不适合用所测试的可激活蛋白进行治疗)。在一些实施方案中,可用包含不同CM的其它可激活蛋白测试对于第一可激活蛋白测试为阴性的这类患者,直到鉴别出适用于治疗的可激活蛋白(例如,包含在疾病部位被患者裂解的CM的可激活蛋白)。

[0332] 实施例

[0333] 在以下实施例中进一步描述本发明,所述实施例不限制权利要求书中所述的本发明的范围并为本公开中所述的可激活大分子的有利结构提供概念验证证明。

[0334] 实施例1:可激活双特异性分子的产生

[0335] 本实施例显示了示例性的可激活双特异性蛋白的产生,其中激活蛋白不包含半衰期延长部分(例如,Fc结构域)。通过重组方法制备双重掩蔽的可激活双特异性分子。通过用

三种多核苷酸转化宿主细胞来制备蛋白质:一种多核苷酸具有SEQ ID NO:21(用于ProC1446)、22(用于ProC1447)或23(用于ProC1448)的序列;一种多核苷酸具有SEQ ID NO:1的序列;以及一种多核苷酸具有SEQ ID NO:18的序列,然后培养所得重组宿主细胞。这些蛋白质包含在激活状态下特异性结合HER2的掩蔽Fab(AB1)、在激活状态下特异性结合CD3的掩蔽scFv(AB2)以及一对杵和臼突变Fc结构域(EM)。图6A中描绘这些可激活蛋白的结构。

[0336] 参考分子ProC306和ProC531(未掩蔽的双特异性分子,其包含特异性结合HER2的Fab;特异性结合CD3的scFv;以及一对杵和臼Fc结构域,其配置与上述示例性可激活双特异性分子的配置不同)也是通过重组方法制备的。

[0337] 实施例2.可激活双特异性分子的蛋白酶处理

[0338] 为了释放掩蔽肽,将实施例1中制备的双重掩蔽的可激活双特异性结合分子在37℃下用重组人蛋白酶(如基质金属蛋白酶(MMP))或uPA处理过夜。通过还原SDS-PAGE测试完整的蛋白酶处理。将蛋白质等分试样(2μg)在样品缓冲液中在75℃下变性10分钟(必要时添加还原剂),并在175V下在MOPS缓冲液中在4-12% NuPAGE™ Bis-Tris凝胶(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA,目录号NP0321)上分离1小时,并在用InstantBlue™染色1小时后显现,然后在水中脱色至少4小时。

[0339] 证实未处理的蛋白质在还原凝胶中具有所有三条链(图7A和图7B)。经过过夜蛋白酶处理后,激活不完全,但大多数蛋白酶产物具有预期的分子量。

[0340] 实施例3:CD3抗原结合ELISA

[0341] 用CD3结合ELISA测试实施例1中制备的双重掩蔽的可激活双特异性分子结合CD3抗原的能力。使溶解在0.05M碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液中的100μg CD3e-his抗原(ACRO Biosystems)在4℃下吸附到96孔微量滴定板的孔中过夜。用封闭缓冲液(1X PBS pH 7.4、0.05%Tween-20、1% BSA)洗涤和封闭平板。将双重掩蔽的可激活双特异性分子在未经或经蛋白酶处理的情况下与未掩蔽的参考蛋白(ProC531)一起进行四倍连续稀释,并施加于抗原包被的平板。通过抗人IgG(Fab特异性)免疫检测来测量蛋白质与肽的结合程度。在平板读数仪上测量A450吸光度。使用Graph Pad Prism软件,通过S形拟合非线性回归生成剂量-反应曲线并获得EC50值。结果在图8中示出。这些结果表明,与没有掩蔽体的参考双特异性分子(ProC531)相比以及相对于对应的蛋白酶处理的激活分子,三种双重掩蔽的可激活双特异性分子(ProC1446、ProC1447和ProC1448)中的每一者均显示出与CD3的结合降低。用uPA处理后,双重掩蔽的可激活双特异性分子的活性恢复到与对应参考双特异性分子(ProC531)相同或几乎相同的水平。

[0342] 实施例4:双重掩蔽的可激活双特异性分子的HER2依赖性细胞毒性

[0343] 在细胞毒性测定中确定实施例1中制备的双重掩蔽的可激活双特异性分子的体外效力。将SKOV3-luc2靶细胞和人PBMC效应细胞(Stemcell technologies)以1:10的靶细胞与效应细胞比率在补充有5%人血清(MP Bio目录号2930949)的RPMI培养基(Gibco目录号22400071)中一起涂铺进行共培养。向该共培养物中添加完整ProC1446、ProC1447和ProC1448以及它们的蛋白酶激活型式(uPA处理的ProC1446、uPA处理的ProC1447、uPA处理的ProC1448)以及未掩蔽的参考ProC306。将平板在37℃和5% CO_2下孵育约48小时。孵育后,使用ONE-Glo™荧光素酶测定系统(Promega目录号E6130)评估细胞毒性,并在平板读数仪(TECAN)上测量发光度。细胞毒性百分比计算如下:(1-(实验的RLU/未处理的平均RLU))

×100。使用GraphPad PRISM绘制细胞毒性百分比数据并计算EC50值。结果在图9A-9C中示出。这些结果表明,与没有掩蔽体的参考双特异性分子(ProC306)相比以及相对于对应的蛋白酶处理的激活分子,三种双重掩蔽的可激活双特异性分子(ProC1446、ProC1447和ProC1448)中的每一者均显示出细胞毒性降低。用uPA处理后,激活分子的细胞毒活性比没有掩蔽体的参考双特异性分子(ProC306)更强。

[0344] 实施例5:双重掩蔽的双特异性抗体与Her2+NCI-N87、SKOV3和CD3ε+Jurkat细胞的结合

[0345] 为了确定在双重掩蔽的双特异性抗体背景下所描述的Her2和CD3ε掩蔽肽是否能够抑制结合,进行基于流式细胞术的结合测定。

[0346] 将NCI-N87(ATCC)、SKOV3(ATCC)和Jurkat(克隆E6-1、ATCC、TIB-152)细胞在RPMI-1640+glutamax(Life Technologies,目录72400-047)、10%热灭活胎牛血清(HI-FBS,Life Technologies,目录10438-026)和嘌呤霉素(对于NCI-N87细胞,Gibco,目录A11138-03,2ug/ml)中培养。测试以下双特异性抗体:重组产生的激活SHL1-ProC1963、SHL2-ProC1965、1/2TCB ProC306以及它们各自的双重掩蔽的可激活双特异性抗体ProC1446(SHL1)、ProC3007(SHL2)、ProC3008(SHL2)和ProC1441(1/2TCB)。EM(半衰期延长部分)与C端之间存在的可裂解部分(CM)利用两种型式,即ProC3007中的CM1和ProC3008中的CM2。

[0347] 用Versene™(Life Technologies,目录15040-066)分离NCI-N87和SKOV3细胞,洗涤,以150,000个细胞/孔涂铺于96孔板中,并在50μL一抗(双特异性抗体)中再悬浮。按照针对NCI-N87和SKOV3所述对Jurkat细胞进行计数和涂铺。从图13A-13B中所指示的浓度开始滴定一抗,然后在FACS染色缓冲液+2% FBS(BD Pharmingen,目录554656)中进行3倍连续稀释,将其添加到细胞中。将细胞在4℃下摇动孵育约1小时,收获并用2×200μL FACS染色缓冲液洗涤。将细胞再悬浮于50μL Alexa Fluor®647缀合的抗人IgG、F(ab')$_2$片段特异性抗体(1.5μg/ml,Jackson ImmunoResearch,目录109-605-097)中,并在4℃下摇动孵育约1小时。收获细胞,洗涤,并将其再悬浮于最终体积为200μL的含有2.5μg/ml 7-AAD(BD Biosciences,目录559925)的FACS染色缓冲液中。仅用二抗染色的细胞作为阴性对照。使用Attune™ NxT流式细胞仪获取数据,并使用FlowJo®V10.8.1计算活细胞的中位荧光强度(MFI)。使用曲线拟合分析在GraphPad Prism中绘制原始MFI数据图。

[0348] 图13A-13B分别描绘了掩蔽的可激活短半衰期抗体ProC1446(SHL1)、ProC3007(SHL2)、ProC3008(SHL2)和掩蔽抗体ProC1441(1/2TCB,不是可激活的短半衰期抗体)和未掩蔽的(ProC1963(SHL1,无掩蔽体或Fc)、ProC1965和ProC306)抗CD3、抗HER2双特异性抗体以及二抗(“仅二抗”,阴性对照)与NCI-N87和SKOV3细胞(即,HER2结合)的结合。图13C描绘了相同分子与Jurkat细胞的结合(即,CD3结合)。结果表明,相对于相应的未掩蔽形式,所有掩蔽分子均表现出降低的与HER2和CD3的结合,这体现在掩蔽分子的结合曲线右移(即使在最高浓度下结合也很低或没有结合)。EC50值是通过重复实验确定的。平均EC50值提供于下表1中。

[0349] 表1.平均EC50

[0350]

分子 ID	分子格式	N87 EC50 (pM)	SKOV3 EC50 (pM)	Jurkat EC50 (pM)
ProC1965	SHL2，未掩蔽，无 Fc	9396.00	5369.50	2664.67
ProC1963	SHL1，未掩蔽，无 Fc	4524.50	3678.50	4401.00
ProC3007	SHL2	>1500000	>1500000	>1500000
ProC3008	SHL2	>1500000	>1500000	>1500000
ProC1446	SHL1	>1500000	>1500000	>1500000
ProC306	½ TCB，未掩蔽	36755.50	16478.50	9317.67
ProC1441	½ TCB	>1500000	>1500000	>1500000

[0351] 结果表明,可激活短半衰期格式(SHL1和SHL2)中未掩蔽的抗HER2、抗CD3 TCB表现出与相应未掩蔽的1/2TCB格式相当的CD3和HER2结合。相对于1/2TCB格式,对可激活短半衰期格式观察到的HER2结合呈现适度增加的趋势。掩蔽的可激活短半衰期分子表现出高度减弱的HER2和CD3结合,与对1/2TCB分子观察到的结合相当。掩蔽的1/2TCB分子(ProC1441)是一种如图12左侧所描绘的分子,但缺少EM与Fab之间的第三可裂解部分(CM3)(1205),这意味着该分子不能裂解而释放EM。

[0352] 实施例6:双重掩蔽的可激活双特异性抗体的生物活性

[0353] 使用细胞毒性测定来测定完整的可激活双特异性抗体和重组产生的激活双特异性抗体的生物活性。人PBMC是从HemaCare公司(Van Nuys,CA)购买并且以10:1的比率与表达Her2的癌细胞系NCI-N87(ATCC)或SKOV3(ATCC)在补充有5%热灭活人血清的RPMI-1640+glutamax中共培养(Sigma,目录H3667)。测试图14A-14B和15A-15B中所指示的起始浓度下的剂量反应,随后为共培养基中完整ProC1446(SHL1)、ProC3007(SHL2)、ProC3008(SHL2)、ProC1441(1/2TCB)和重组产生的激活双特异性抗体ProC1963(SHL1)、ProC1965(SHL2)和ProC306(1/2TCB)的3倍连续稀释液。48小时后,使用ONE-Glo™荧光素酶分析系统(Promega,Madison,WI目录E6130)评估细胞毒性。使用Infinite®M200 Pro(Tecan Trading AG,Switzerland)测量发光度。在GraphPad PRISM中使用曲线拟合分析计算并绘制细胞毒性百分比。

[0354] 图14A和14B显示,重组产生的激活双特异性ProC1963(SHL1)和ProC1965(SHL2)的效力与ProC306相比有所增加(EC50分别降低>1200倍和50倍),如剂量反应曲线左移所示。

[0355] 图15A和15B显示,在这些测定中,完整双特异性ProC1446、ProC3007、ProC3008和ProC1446被强烈掩蔽,如相对于它们重组产生的激活型式ProC1963和ProC1965剂量反应曲线右移所示。

[0356] 图16A-16D显示,在这些测定中,完整双特异性ProC1446、ProC3007、ProC3008和ProC1441被强烈掩蔽,如相对于它们重组产生的激活型式ProC1963、ProC1965和ProC306剂量反应曲线右移所示。

[0357] EC50值和掩蔽效率(ME)是通过重复实验确定的。结果提供于下表2A和2B中。

[0358] 表2A.平均EC50和掩蔽效率

[0359]

分子 ID	分子格式	N87		SKOV3	
		EC50 (pM)	ME	EC50 (pM)	ME
ProC1965	SHL2，未掩蔽，无 Fc	14.46	N/A	1.16	N/A
ProC1963	SHL1，未掩蔽，无 Fc	0.26	N/A	0.03	N/A
ProC3007	SHL2	104875.75	6859.73	>100,000	ND
ProC3008	SHL2	87292.25	8742.55	>100,000	ND
ProC1446	SHL1	1104.05	18935.31	291.03	12147.86

[0360] N/A＝不适用

[0361] ND＝未测定

[0362] ProC1963的EC50比ProC306低约1200-3000倍。ProC1965的EC50比ProC306的EC50低50倍。结果表明,未掩蔽的可激活短寿命TCB格式与对照(ProC306)相比表现出更高的效力,该对照在半衰期方面不可激活,即可裂解而释放EM。

[0363] 表2B.平均EC50和掩蔽效率

[0364]

分子 ID	分子格式	N87		SKOV3	
		EC50 (pM)	ME	EC50 (pM)	ME
ProC1965	SHL2，未掩蔽，	14.46	N/A	1.16	N/A

[0365]

	无 Fc				
ProC1963	SHL1，未掩蔽，无 Fc	0.26	N/A	0.03	N/A
ProC3007	SHL2	104875.75	6859.73	>100,000	ND
ProC3008	SHL2	87292.25	8742.55	>100,000	ND
ProC1446	SHL1	1104.05	18935.31	291.03	12147.86
ProC306	½ TCB 未掩蔽	736.87	N/A	38.4	N/A
ProC1441	½ TCB	>2,000,000	ND	>100,000	ND

[0366] N/A＝不适用

[0367] ND＝未测定

[0368] 结果表明,掩蔽减弱了所有3种格式的活性:SHL1、SHL2和1/2TCB。

[0369] 实施例7:双重掩蔽的双特异性可激活抗体ProC3007和其相应的激活型式ProC1965诱导小鼠中已建立的NCI-N87肿瘤消退

[0370] 在本实施例中,分析完整的可激活双特异性抗体ProC3007(SHL2TCB)、ProC3008(SHL2 TCB)、ProC1441和重组产生的靶向Her2和CD3ε的激活双特异性抗体ProC1965在人PBMC移植的NOD scid γ (NSG)小鼠中诱导已建立的NCI-N87异种移植肿瘤消退或生长减少的能力。

[0371] 人胃癌细胞系NCI-N87是从ATCC获得,并根据既定程序在RPMI+Glutamax+10％FBS中培养。纯化的冷冻人PBMC是从Hemacare公司,Van Nuys,CA获得(捐赠者ID#D163477;批号22077550)。NSG™(NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ)小鼠是从The Jackson

Laboratories,Bar Harbor,ME获得。

[0372] 第0天,在每只小鼠的右侧皮下接种1×10^6个于100μL RPMI+Glutamax无血清培养基(含有Matrigel®)中的NCI-N87细胞。将之前冷冻的来自单个捐赠者的PBMC解冻,并于第7天以1:1的CD3+T细胞与肿瘤细胞比率施用(i.p.)。当肿瘤体积达到约125mm^3时,将小鼠随机分组,分配到处理组并根据表3进行i.v.给药。重组双特异性ProC1965(SHL2格式,无掩蔽体和无Fc结构域)每周给药3次,以补偿预期的由于缺乏半衰期延长(Fc)结构域而导致的清除率增加。ProC1965的剂量水平经过调整以适应分子量的差异。每周测量肿瘤体积两次。0.5mpk群组中的一只小鼠被提前实施安乐死。随后,第21天和第25天时间点该群组的n=7。

[0373] 表3.NCI-N87异种移植研究C23-005的组和剂量。

[0374]

组	计数	处理	剂量(mg/kg)	给药时间表
1	8	PBS+6%蔗糖	N/A	QW
2	8	ProC1965	0.15	每周3次
3	8	ProC1965	0.5	每周3次
4	8	ProC3007	0.3	QW
5	8	ProC3007	1.0	QW
6	8	ProC3008	0.3	QW
7	8	ProC3008	1	QW
8	8	ProC1441	1	QW

[0375] 图17是肿瘤体积与初始治疗剂量后天数的关系图。结果表明,完整的可激活双特异性抗体ProC3007和重组产生的激活双特异性抗体ProC1965分别在1和0.5mpk时都诱导NCI-N87异种移植肿瘤消退。结果显示,本研究中ProC1965和ProC3007比ProC1441更有效。在同等剂量水平下ProC3008具有与ProC1441相似的功效。

[0376] 第二次体内研究如上所述进行,但使用来自不同捐赠者(Hemacare,捐赠者ID# D327579;批号21070049)的PBMC。在本研究中,一组双特异性可激活抗体包括重组产生的可激活短半衰期双特异性抗体(ProC1446)和该可激活分子的相应重组产生的激活型式(ProC1963,即具有ProC1446的结构但缺少掩蔽体和Fc结构域)。ProC1446和ProC1963如表4所述进行给药,并评估它们在人PBMC移植的NSG小鼠中诱导已建立的NCI-N87异种移植肿瘤消退或生长减少的能力。ProC1963和ProC1446在本研究中均呈现出抗肿瘤活性,因此ProC1963保留了诱导肿瘤消退的能力。

[0377] 表4:NCI-N87异种移植研究C22-014的剂量水平

[0378]

组	计数	处理	剂量(mg/kg)	给药时间表
1	8	PBS+6%蔗糖	N/A	QW
2	8	ProC1963	0.2	每周3次
3	8	ProC1963	0.6	每周3次
4	8	ProC1446	0.3	QW
5	8	ProC1446	1.0	QW

[0379] N/A=不适用实施例中的分子的序列及本文公开的其它序列列于下表5中。

[0380] 表5

[0381]

SEQ ID NO	名称/注释	序列
1	HC179 HC_FcK_IgG4_EN (Fc 结构域杵突变体)	SKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPCQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGX*
2	Fc 结构域白突变体	ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTL PPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGX*
3	人 IgG1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGX
4	人 IgG2	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVER KCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR

[0382]

		TPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNG QPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGX
5	人 IgG3	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVEL KTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKS CDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRF TQKSLSLSPGX
6	人 IgG4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESK YGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGX*
17	LC149 LC_Tras	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVA WYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
18	LC150 LC_Tras 5.17	QGQSGQGALICCSDVSGLCRWCGGGSSGGSISS GLLSGRSDNHGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSAS FLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
21	HC707 HC_Tras-25-v619h-20GG-24-H4HEN (ProC1446 中)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYI HWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVK GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR WGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG

[0383]

		TKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVGGGGSGGGGS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYAT YYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDT AVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGTLVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGT VTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPE DEAEYYCVLWYSNLWVFGGGTKLTVLGGSGGS SGASGTGTAGGTGSGSGTGSGLSGRSDDHGGG SQGQSGSGYLWGCEWNCGGITTGSSGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGSESKYGPPCPPCPAPEFEGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVCTLPPSQEEMTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSLGK
22	HC708 HC_Tras-25-v619h-MN15a-24-H4HEN (ProC1447 的重链 2)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYI HWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVK GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR WGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVGGGGSGGGGS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYAT YYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDT AVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGTLVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGT VTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPE DEAEYYCVLWYSNLWVFGGGTKLTVLGGSGGS SGASGTGTAGGTGSGSGTGSGLSGRSDDHGGG SQGQSGSNAFRCWWDPPCQPMTGSSGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGSESKYGPPCPPCPAPEFEG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVCTLPPSQEEMTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSLGK
23	HC709 HC_Tras-25-v619h-MN15b-24-H4HEN (ProC1448 中)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYI HWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVK GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR WGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG

[0384]

		TKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVGGGGSGGGGS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYAT YYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDT AVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGTLVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGT VTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPE DEAEYYCVLWYSNLWVFGGGTKLTVLGGSGGS SGASGTGTAGGTGSGSGTGSGLSGRSDDHGGG SQGQSGSARGLCWWDPPCTHDLGSSGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGSESKYGPPCPPCPAPEFEGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVCTLPPSQEEMTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSLGK
24	HC710 HC_Tras-25-v619h-MN15c-24-H4HEN (ProC1449 中)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYI HWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVK GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR WGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVGGGGSGGGGS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYAT YYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDT AVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGTLVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGT VTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPE DEAEYYCVLWYSNLWVFGGGTKLTVLGGSGGS SGASGTGTAGGTGSGSGTGSGLSGRSDDHGGG SQGQSGSNHSLCYWDPPCEPSTGSSGGSGGGGS GGGGSGGGGSGGSESKYGPPCPPCPAPEFEGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVCTLPPSQEEMTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLGK
27	曲妥珠单抗 Fab 的重链片段	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYI HWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVK GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR WGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG

[0385]

		TKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV
28	具有 15 个氨基酸的接头	GGGGSGGGGSGGGGS
29	抗 CD3 scFv (ProC 531、1446-1449 中)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYA MNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYY CVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGTLVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLT CRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGT NKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPEDEA EYYCVLWYSNLWVFGGGTKLTVL
30	抗 CD3 scFv 的重链可变区 (ProC 531、1446-1449 中)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYA MNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYY CVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGTLVTVSS
31	抗 CD3 scFv 的轻链可变区 (ProC 531、1446-1449 中)	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNY ANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSG SLIGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCVLWYSNLW VFGGGTKLTVL
32	具有 27 个氨基酸的接头	GGSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG
33	可裂解部分 (1204DDH)	LSGRSDDH
34	CD3 掩蔽部分 (20GG，ProC 1466 中)	GYLWGCEWNCGGITT
35	CD3 掩蔽部分 (MN15a，ProC 1447 中)	NAFRCWWDPPCQPMT
36	CD3 掩蔽部分 (MN15b，ProC 1448 中)	ARGLCWWDPPCTHDL
37	CD3 掩蔽部分 (MN15c，ProC 1449 中)	NHSLCYWDPPCEPST
38	具有 24 个氨基酸的接头	GSSGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGS
40	F5.17 掩蔽部分 (曲妥珠单抗 Fab 的掩蔽体)	ALICCSDVSGLCRWC
41	可裂解部分 (1490)	ISSGLLSGRSDNH
42	hIgG4 S228P 和 L235E CH1-Fc	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV

[0386]

		VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESK YGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGX*
43	IgG4-EN KiHSS - H 链仅 Fc	SKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTL PPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGX*
44	IgG4-EN KiHSS - K 链-仅 Fc	GPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPC QEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGX*
45	IgG1 KiHSS - H 链仅 Fc	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTL PPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGX
46	IgG1 KiHSS - K 链-仅 Fc	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGX
597	ProC306: v619_HLh_Tras 1/2 TCB (v619_HLh)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYA MNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYY CVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGTLVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLT CGSSTGAVTTSNYVNWVQQKPGQAPRGLIGGT NKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPEDEA EYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSEVQ LVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWG GDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA

			LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTK TYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAP EFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSQEEMTKNQVS LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSLGX
	598	ProC306: v619_HLh_Tras 1/2 TCB (HC_FcK_IgG4_ EN)	GSSKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSL GX
	599	ProC306: v619_HLh_Tras 1/2 TCB (LC_Tras)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVA WYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
[0387]	600	ProC531: v619_hh9_Tras 1/2 TCB (HC v619_hh9_Tras 1/2 TCB)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYA MNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYY CVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGTLVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLT CRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGT NKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPEDEA EYYCVLWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGGSEVQ LVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWG GDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTK TYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAP EFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSQEEMTKNQVS LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSLG X
	601	ProC531: v619_hh9_Tras	GSSKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE

[0388]

	1/2 TCB (HC_FcK_IgG4_EN)	VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSL G X
602	ProC531: v619_hh9_Tras 1/2 TCB (LC_Tras)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVA WYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
603	ProC1965: v619h-5-Tras-noFc (SHL2 的未掩蔽的无 Fc 形式) (PP_v619h-5-Tras-no Fc)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYA MNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYY CVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGTLVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLT CGSSTGAVTTSNYVNWVQQKPGQAPRGLIGGT NKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPEDEA EYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSEVQ LVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWG GDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTK TYTCNVDHKPSNTKVDKRV
604	ProC1965: v619h-5-Tras-noFc (SHL2 的未掩蔽的无 Fc 形式) (LC_Tras)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVA WYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
605	ProC1963: Tras-25-v619h-noFc (SHL1 的未掩蔽/无 Fc 形式) (PP_Tras-25-v619h-noFc)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYI HWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVK GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR WGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVGGGGSGGGGS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYAT YYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDT AVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGTLVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGT VTLTCGSSTGAVTTSNYVNWVQQKPGQAPRGLI

[0389]

		GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPE DEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
606	ProC1963: Tras-25-v619h-noFc (SHL1 的未掩蔽/无 Fc 形式) (LC_Tras)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVA WYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
607	ProC3007: 20GG-GL1204DDH-v619h-5mr-F5.17-Tras-1490DNI-SHL2-TCB (HC_20GG-GL1204DDH-v619h-5mr-Tras-1490DNI-FcH4EN)	QGQSGSGYLWGCEWNCGGITTGSSGGSGGSGG LSGRSDDHGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSC AASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNS LKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQG TLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLT VSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYVNWVQQKPG QAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTL SGAQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFN IKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAV YYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYG GGSSGGSISSGLLSGRSDNIGGGSGPPCPPCPAPE FEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS IEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSQEEMTKNQVSL SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSLGX
608	ProC3007: 20GG-GL1204DDH-v619h-5mr-F5.17-Tras-1490DNI-SHL2-TCB (HC_FcK_IgG4_EN)	GSSKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSL GX
609	ProC3007: 20GG-GL1204DDH-v619h-5mr-F5.17-Tras-1490DNI-SHL2-TCB (LC_Tras	QGQSGQGALICCSDVSGLCRWCGGGSSGGSISS GLLSGRSDNHGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSAS FLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD

[0390]

	5.17)	YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
610	ProC3008: 20GG-GL1204DDH-v619h-5mr-F5.17-Tras-1406-SHL2-TCB (HC_20GG-GL1204DDH-v619h-5mr-Tras-1406-FcH4EN)	QGQSGSGYLWGCEWNCGGITTGSSGGSGGSGG LSGRSDDHGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSC AASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNS LKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQG TLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLT VSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYVNWVQQKPG QAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTL SGAQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFN IKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAV YYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYG GGSSGGSAPRSALAHGLFGGGSGPPCPPCPAPEF EGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVCTLPPSQEEMTKNQVSL SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSLGX
611	ProC3008: 20GG-GL1204DDH-v619h-5mr-F5.17-Tras-1406-SHL2-TCB (HC_FcK_IgG4_EN)	GSSKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSL GX
612	ProC3008: 20GG-GL1204DDH-v619h-5mr-F5.17-Tras-1406-SHL2-TCB (LC_Tras 5.17)	QGQSGQGALICCSDVSGLCRWCGGGSSGGSISS GLLSGRSDNHGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSAS FLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
613	ProC1441: 20GG-v619h-F5.17-Tras-半TCB (HC_20GG-v619h-Tras-H4HEN)	QGQSGSGYLWGCEWNCGGITTGSSGGSGGSGG LSGRSDDHGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSC AASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNS LKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQG TLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLT VSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYVNWVQQKPG QAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTL

[0391]

		SGAQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFN IKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAV YYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGP PCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSQE EMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLVSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGX
614	ProC1441: 20GG-v619h-F5.17-Tras-半TCB (HC_FcK_IgG4_EN)	GSSKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSL GX
615	ProC1441: 20GG-v619h-F5.17-Tras-半TCB (LC_Tras 5.17)	QGQSGQGALICCSDVSGLCRWCGGGSSGGSISS GLLSGRSDNHGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSAS FLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
616	ProC1446: F5.17-Tras-25-v619h-20GG-24-半 TCB (HC_Tras-25-v619h-20GG-24-H4HEN)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYI HWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVK GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR WGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVGGGGSGGGGS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYAT YYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDT AVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGTLVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGT VTLTCGSSTGAVTTSNYVNWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPE DEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGSGG SSGASGTGTAGGTGSGSGTGSGLSGRSDDHGG GSQGQSGSGYLWGCEWNCGGITTGSSGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGSESKYGPPCPPCPAPEFEG

[0392]

		GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVCTLPPSQEEMTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSLGX
617	ProC1446: F5.17-Tras-25-v619h-20GG-24-半 TCB (HC_FcK_IgG4_EN)	GSSKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSL GX
618	ProC1446: F5.17-Tras-25-v619h-20GG-24-半 TCB (LC_Tras 5.17)	QGQSGQGALICCSDVSGLCRWCGGGSSGGSISS GLLSGRSDNHGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSAS FLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
619	ProC1447: F5.17-Tras-25-v619h-MN15a-24-半 TCB (HC_Tras-25-v619h-MN15a-24-H4HEN)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYI HWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVK GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR WGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVGGGGSGGGGS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYAT YYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDT AVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGTLVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGT VTLTCGSSTGAVTTSNYVNWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPE DEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGSGG SSGASGTGTAGGTGSGSGTGSGLSGRSDDHGG GSQGQSGSNAFRCWWDPPCQPMTGSSGGSGG GGSGGGGSGGGGSGGSESKYGPPCPPCPAPEFE GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQE DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVCTLPPSQEEMTKNQVSLS CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSLGX
620	ProC1447:	GSSKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTL

[0393]

	F5.17-Tras-25-v619h-MN15a-24-半 TCB (HC_FcK_IgG4_EN)	MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSL GX
621	ProC1447: F5.17-Tras-25-v619h-MN15a-24-半 TCB (LC_Tras 5.17)	QGQSGQGALICCSDVSGLCRWCGGGSSGGSISS GLLSGRSDNHGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSAS FLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
622	ProC1448: F5.17-Tras-25-v619h-MN15b-24-半 TCB (HC_Tras-25-v619h-MN15b-24-H4HEN)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYI HWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVK GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR WGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVGGGGSGGGGS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYAT YYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDT AVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGTLVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGT VTLTCGSSTGAVTTSNYVNWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQPE DEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGSGG SSGASGTGTAGGTGSGSGTGSGLSGRSDDHGG GSQGQSGSARGLCWWDPPCTHDLGSSGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGSESKYGPPCPPCPAPEFEG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVCTLPPSQEEMTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSLGX
623	ProC1448: F5.17-Tras-25-v619h-MN15b-24-半 TCB (HC_FcK_IgG4_EN)	GSSKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSL GX
624	ProC1448:	QGQSGQGALICCSDVSGLCRWCGGGSSGGSISS

[0394]

	F5.17-Tras-25-v619h-MN15b-24-半 TCB (LC_Tras 5.17)	GLLSGRSDNHGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSAS FLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
625	ProC306: v619_HLh_Tras 1/2 TCB (v619_HLh)	GAAGTTCAGCTTGTTGAATCTGGCGGCGGACT GGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAAACTGAGCT GTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCACCTAC GCCATGAACTGGGTCCGACAGGCCTCTGGCA AAGGCCTGGAATGGGTCGGACGGATCAGAAG CAAGTACAACAACTACGCCACCTACTACGCCG ACAGCGTGAAGGACAGATTCACCATCAGCCG GGACGACAGCAAGAACACCGCCTACCTGCAG ATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCGCCG TGTACTACTGTGTGCGGCACGGCAACTTCGGC AACAGCTATGTGTCTTGGTGGGCCTATTGGGG CCAGGGCACACTGGTTACAGTTAGCTCTGGTG GCGGAGGATCTGGCGGAGGTGGAAGCGGCGG AGGCGGTTCTCAAACAGTGGTCACACAAGAG CCCAGCCTGACCGTTTCTCCTGGCGGAACAGT GACCCTGACATGCGGATCTTCTACAGGCGCCG TGACCACCAGCAACTATGTGAATTGGGTGCAG CAGAAGCCCGGACAGGCTCCTAGAGGACTGA TCGGCGGCACCAACAAAAGAGCCCCTGGAAC ACCAGCCAGGTTCAGCGGCTCTCTGATCGGA GGAAAAGCCGCTCTGACACTGTCTGGCGCTC AGCCTGAAGATGAGGCCGAGTACTATTGCGTG CTGTGGTACAGCAACAGATGGGTGTTCGGAG GCGGCACAAAGCTGACAGTGCTTGGCGGTGG CGGTAGCGAAGTTCAGCTGGTGGAGAGTGGT GGGGGGCTGGTTCAGCCTGGCGGTTCGCTCA GGCTGTCATGCGCAGCGAGCGGGTTCAACATC AAGGACACGTATATCCATTGGGTGAGACAGGC CCCCGGGAAGGGCCTCGAATGGGTTGCAAGG ATTTATCCTACTAACGGGTACACAAGGTATGCT GACAGTGTGAAGGGGCGGTTCACAATTTCCG CCGATACTTCTAAGAATACTGCTTACCTCCAGA TGAACTCCCTGAGGGCCGAGGACACTGCCGT TTACTACTGCTCCCGCTGGGGAGGAGACGGCT TTTATGCTATGGATTATTGGGGTCAAGGCACTC TAGTCACCGTGAGTAGTGCTAGCACAAAGGG CCCCAGCGTGTTCCCTCTGGCTCCTTGTAGCA GAAGCACCAGCGAGTCTACAGCCGCTCTGGG CTGTCTGGTCAAGGACTACTTTCCCGAGCCTG TGACCGTGTCCTGGAATAGCGGAGCACTGACC AGCGGCGTGCACACATTTCCAGCCGTGCTGCA AAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTG GTCACAGTGCCTAGCTCTAGCCTGGGCACCAA

		GACCTACACCTGTAATGTGGACCACAAGCCTA GCAACACCAAGGTGGACAAGCGCGTGGAATC TAAGTACGGCCCTCCTTGTCCTCCATGTCCTGC TCCAGAGTTTGAAGGCGGCCCTTCCGTGTTCC TGTTTCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATG ATCAGCAGAACCCCTGAAGTGACCTGCGTGG TGGTGGACGTTTCCCAAGAGGACCCTGAGGT GCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAA GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGG AACAGTTCAACAGCACCTACAGAGTGGTGTC CGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTG AACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCA ACAAGGGCCTGCCTAGCAGCATCGAGAAAAC CATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGCGAA CCTCAAGTCTGTACACTGCCTCCTAGCCAAGA GGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGAGC TGCGCCGTGAAGGGCTTTTACCCTTCCGATAT CGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCA GAGAACAACTACAAGACAACCCCTCCTGTGC TGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGGTGTCC AGACTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAAG AGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCA CGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAG TCTCTGAGCCTGTCTCTGGGCNNN
[0395]		
626	ProC306: v619_HLh_Tras 1/2 TCB (HC_FcK_IgG4_ EN)	GGATCTTCTAAGTACGGACCTCCTTGTCCTCC ATGTCCTGCTCCAGAGTTTGAAGGCGGCCCTT CCGTGTTCCTGTTTCCTCCAAAGCCTAAGGAC ACCCTGATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTGA CCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCAAGAGGA TCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACG GCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCC TAGAGAGGAACAGTTCAACAGCACCTACAGA GTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGG ATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAA GGTGTCCAACAAGGGCCTGCCTAGCAGCATC GAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGC CAAGAGAACCCCAGGTGTACACACTGCCTCC ATGCCAAGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTG TCCCTGTGGTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCC TTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATG GCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACACC TCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCC TGTACAGCAGACTGACCGTGGACAAGAGCAG ATGGCAAGAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGC GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA CCCAGAAGTCTCTGAGCCTGAGCCTGGGCNN N
627	ProC306:	GATATTCAGATGACACAGAGCCCCAGCAGCCT GTCTGCCTCTGTGGGAGACAGAGTGACCATC

[0396]

	v619_HLh_Tras 1/2 TCB (LC_Tras)	ACCTGTAGAGCCAGCCAGGACGTGAACACAG CCGTGGCTTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAA GGCCCCTAAGCTGCTGATCTACAGCGCCAGCT TTCTGTACAGCGGCGTGCCCAGCAGATTCAGC GGCTCTAGAAGCGGCACCGACTTCACCCTGA CCATAAGCAGTCTGCAGCCCGAGGACTTCGCC ACCTACTACTGTCAGCAGCACTACACCACACC TCCAACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAA ATCAAGCGGACAGTGGCCGCTCCTAGCGTGTT CATCTTTCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGT CTGGCACAGCCTCTGTCGTGTGCCTGCTGAAC AACTTCTACCCCAGAGAAGCCAAGGTGCAGT GGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAA TAGCCAAGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGC AAGGACTCTACCTACAGCCTGAGCAGCACCCT GACACTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCAC AAAGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGG GCCTTTCTAGCCCTGTGACCAAGAGCTTCAAC CGGGGCGAATGT
628	ProC531: v619_hh9_Tras 1/2 TCB HC (v619_hh9_Tras 1/2 TCB)	GAAGTTCAGCTTGTTGAATCTGGCGGCGGACT GGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAAACTGAGCT GTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCACCTAC GCCATGAACTGGGTCCGACAGGCCTCTGGCA AAGGCCTGGAATGGGTCGGACGGATCAGAAG CAAGTACAACAACTACGCCACCTACTACGCCG ACAGCGTGAAGGACAGATTCACCATCAGCCG GGACGACAGCAAGAACACCGCCTACCTGCAG ATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCGCCG TGTACTACTGTGTGCGGCACGGCAACTTCGGC AACAGCTATGTGTCTTGGTGGGCCTATTGGGG CCAGGGCACACTGGTTACAGTTAGCTCTGGTG GCGGAGGATCTGGCGGAGGTGGAAGCGGCGG AGGCGGTTCTCAAACAGTGGTCACACAAGAG CCCAGCCTGACCGTTTCTCCTGGCGGAACAGT GACCCTGACCTGTAGATCTTCTACAGGCGCCG TGACCACCAGCAATTACGCCAATTGGGTGCAG CAGAAGCCCGGACAGGCTCCTAGAGGACTGA TCGGCGGCACCAACAAAAGAGCCCCTGGAAC ACCAGCCAGGTTCAGCGGCTCTCTGATCGGA GGAAAAGCCGCTCTGACACTGTCTGGCGCTC AGCCTGAAGATGAGGCCGAGTACTATTGCGTG CTGTGGTACAGCAACCTGTGGGTGTTCGGAG GCGGCACAAAGCTTACAGTGCTTGGAGGTGG CGGCAGCGAGGTGCAACTTGTTGAGTCAGGC GGAGGCCTTGTGCAACCTGGTGGTAGCCTGA GACTGTCTTGTGCCGCTTCTGGCTTCAACATC AAGGACACCTACATCCACTGGGTTCGACAAG CTCCAGGCAAGGGCCTTGAGTGGGTTGCCAG AATCTACCCCACCAACGGCTACACCAGATACG CCGACTCTGTGAAAGGCCGGTTCACCATCTCT

[0397]

		GCCGACACCTCTAAGAATACTGCCTATCTCCA AATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGATACAGCC GTCTATTACTGCAGCAGATGGGGAGGCGACGG CTTTTACGCCATGGATTACTGGGGACAGGGAA CCCTGGTCACCGTGTCCTCTGCTAGCACAAAG GGCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGCTCCTTGTAG CAGAAGCACCAGCGAGTCTACAGCCGCTCTG GGCTGTCTGGTCAAGGACTACTTTCCCGAGCC TGTGACCGTGTCCTGGAATAGCGGAGCACTGA CCAGCGGCGTGCACACATTTCCAGCCGTGCTG CAAAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCG TGGTCACAGTGCCTAGCTCTAGCCTGGGCACC AAGACCTACACCTGTAATGTGGACCACAAGCC TAGCAACACCAAGGTGGACAAGCGCGTGGAA TCTAAGTACGGCCCTCCTTGTCCTCCATGTCCT GCTCCAGAGTTTGAAGGCGGCCCTTCCGTGTT CCTGTTTCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGA TGATCAGCAGAACCCCTGAAGTGACCTGCGT GGTGGTGGACGTTTCCCAAGAGGACCCTGAG GTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGA AGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAG GAACAGTTCAACAGCACCTACAGAGTGGTGT CCGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTG AACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCA ACAAGGGCCTGCCTAGCAGCATCGAGAAAAC CATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGCGAA CCTCAAGTCTGTACACTGCCTCCTAGCCAAGA GGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGAGC TGCGCCGTGAAGGGCTTTTACCCTTCCGATAT CGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCA GAGAACAACTACAAGACAACCCCTCCTGTGC TGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGGTGTCC AGACTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAAG AGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCA CGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAG TCTCTGAGCCTGTCTCTGGGCNNN
629	ProC531: v619_hh9_Tras 1/2 TCB HC (HC_FcK_IgG4_EN)	GGATCTTCTAAGTACGGACCTCCTTGTCCTCC ATGTCCTGCTCCAGAGTTTGAAGGCGGCCCTT CCGTGTTCCTGTTTCCTCCAAAGCCTAAGGAC ACCCTGATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTGA CCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCAAGAGGA TCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACG GCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCC TAGAGAGGAACAGTTCAACAGCACCTACAGA GTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGG ATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAA GGTGTCCAACAAGGGCCTGCCTAGCAGCATC GAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGC CAAGAGAACCCCAGGTGTACACACTGCCTCC ATGCCAAGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTG

[0398]

		TCCCTGTGGTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCC TTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATG GCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACACC TCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCC TGTACAGCAGACTGACCGTGGACAAGAGCAG ATGGCAAGAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGC GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA CCCAGAAGTCTCTGAGCCTGAGCCTGGGCNN N
630	ProC531: v619_hh9_Tras 1/2 TCB HC (LC_Tras)	GATATTCAGATGACACAGAGCCCCAGCAGCCT GTCTGCCTCTGTGGGAGACAGAGTGACCATC ACCTGTAGAGCCAGCCAGGACGTGAACACAG CCGTGGCTTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAA GGCCCCTAAGCTGCTGATCTACAGCGCCAGCT TTCTGTACAGCGGCGTGCCCAGCAGATTCAGC GGCTCTAGAAGCGGCACCGACTTCACCCTGA CCATAAGCAGTCTGCAGCCCGAGGACTTCGCC ACCTACTACTGTCAGCAGCACTACACCACACC TCCAACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAA ATCAAGCGGACAGTGGCCGCTCCTAGCGTGTT CATCTTTCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGT CTGGCACAGCCTCTGTCGTGTGCCTGCTGAAC AACTTCTACCCCAGAGAAGCCAAGGTGCAGT GGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAA TAGCCAAGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGC AAGGACTCTACCTACAGCCTGAGCAGCACCCT GACACTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCAC AAAGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGG GCCTTTCTAGCCCTGTGACCAAGAGCTTCAAC CGGGGCGAATGT
631	ProC1965: v619h-5-Tras- noFc (SHL2 的 未掩蔽的无 Fc 形式) (PP_v619h-5- Tras-noFc)	GAAGTTCAGCTTGTTGAATCTGGCGGCGGACT GGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAAACTGAGCT GTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCACCTAC GCCATGAACTGGGTCCGACAGGCCTCTGGCA AAGGCCTGGAATGGGTCGGACGGATCAGAAG CAAGTACAACAACTACGCCACCTACTACGCCG ACAGCGTGAAGGACAGATTCACCATCAGCCG GGACGACAGCAAGAACACCGCCTACCTGCAG ATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCGCCG TGTACTACTGTGTGCGGCACGGCAACTTCGGC AACAGCTATGTGTCTTGGTGGGCCTATTGGGG CCAGGGCACACTGGTTACAGTTAGCTCTGGTG GCGGAGGATCTGGCGGAGGTGGAAGCGGCGG AGGCGGTTCTCAAACAGTGGTCACACAAGAG CCCAGCCTGACCGTTTCTCCTGGCGGAACAGT GACCCTGACATGCGGATCTTCTACAGGCGCCG TGACCACCAGCAACTATGTGAATTGGGTGCAG CAGAAGCCCGGACAGGCTCCTAGAGGACTGA TCGGCGGCACCAACAAAAGAGCCCCTGGAAC ACCAGCCAGGTTCAGCGGCTCTCTGATCGGA

[0399]

		GGAAAAGCCGCTCTGACACTGTCTGGCGCCC AGCCAGAAGATGAGGCCGAGTACTATTGCGTG CTGTGGTACAGCAACAGATGGGTGTTCGGAG GCGGCACAAAGCTGACAGTTCTTGGAGGCGG AGGAAGTGAAGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGT GGTGGACTTGTTCAACCAGGCGGCAGCCTGA GACTGTCTTGTGCCGCTTCTGGCTTCAACATC AAGGACACCTACATCCACTGGGTTCGACAAG CTCCAGGCAAGGGCCTTGAGTGGGTTGCCAG AATCTACCCCACCAACGGCTACACCAGATACG CCGACTCTGTGAAGGGCCGCTTCACAATCTCT GCCGACACCTCCAAAAACACAGCCTATCTCCA AATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGATACAGCC GTCTATTACTGCAGCAGATGGGGAGGCGACGG CTTTTACGCCATGGATTACTGGGGACAGGGAA CCCTGGTCACCGTGTCTAGCGCCTCTACAAAG GGCCCTAGCGTGTTCCCTCTGGCTCCCTGTAG CAGAAGCACCAGCGAATCTACAGCTGCCCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTTCCTGAGCC TGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCACTG ACATCTGGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTGCT GCAAAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGC GTGGTCACAGTGCCTAGCTCTAGCCTGGGCAC CAAGACCTACACCTGTAATGTGGACCACAAGC CTAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTC
632	ProC1965: v619h-5-Tras-noFc (SHL2 的未掩蔽的无 Fc 形式) (LC_Tras)	GATATTCAGATGACACAGAGCCCCAGCAGCCT GTCTGCCTCTGTGGGAGACAGAGTGACCATC ACCTGTAGAGCCAGCCAGGACGTGAACACAG CCGTGGCTTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAA GGCCCCTAAGCTGCTGATCTACAGCGCCAGCT TTCTGTACAGCGGCGTGCCCAGCAGATTCAGC GGCTCTAGAAGCGGCACCGACTTCACCCTGA CCATAAGCAGTCTGCAGCCCGAGGACTTCGCC ACCTACTACTGTCAGCAGCACTACACCACACC TCCAACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAA ATCAAGCGGACAGTGGCCGCTCCTAGCGTGTT CATCTTTCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGT CTGGCACAGCCTCTGTCGTGTGCCTGCTGAAC AACTTCTACCCCAGAGAAGCCAAGGTGCAGT GGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAA TAGCCAAGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGC AAGGACTCTACCTACAGCCTGAGCAGCACCCT GACACTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCAC AAAGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGG GCCTTTCTAGCCCTGTGACCAAGAGCTTCAAC CGGGGCGAATGT
633	ProC1963: Tras-25-v619h-noFc (SHL1 的未掩蔽	GAAGTTCAGCTTGTTGAATCTGGCGGCGGACT GGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTT GTGCCGCCAGCGGCTTCAACATCAAGGACAC CTACATCCACTGGGTCCGACAGGCCCCTGGCA

[0400]

	/无 Fc 形式) (PP_Tras-25-v619h-noFc)	AAGGACTTGAATGGGTCGCCAGAATCTACCCC ACCAACGGCTACACCAGATACGCCGACTCTGT GAAGGGCAGATTCACCATCAGCGCCGACACC AGCAAGAACACCGCCTACCTGCAGATGAACA GCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTA CTGTTCTAGATGGGGAGGCGACGGCTTCTACG CCATGGATTATTGGGGCCAGGGCACCCTGGTC ACAGTGTCTAGCGCCTCTACAAAGGGCCCCA GCGTTTTCCCACTGGCTCCCTGTAGCAGAAGC ACCAGCGAATCTACAGCCGCTCTGGGCTGCCT GGTCAAGGACTACTTTCCTGAGCCTGTGACCG TGTCCTGGAACTCTGGCGCTCTGACATCTGGC GTGCACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAAAGCA GCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACA GTGCCTAGCAGCTCTCTGGGCACCAAGACCTA CACCTGTAATGTGGACCACAAGCCTAGCAACA CCAAGGTGGACAAGAGAGTTGGCGGAGGCG GATCAGGTGGCGGAGGAAGCGGAGGCGGCG GATCTGAAGTTCAACTGGTGGAAAGCGGCGG AGGCCTTGTGCAACCTGGTGGCAGTCTGAAA CTGAGCTGTGCCGCCTCTGGCTTCACCTTCAG CACATACGCCATGAATTGGGTTCGACAAGCCA GCGGCAAGGGCCTCGAATGGGTTGGAAGAAT CAGAAGCAAGTACAACAACTACGCCACCTAC TACGCCGACAGCGTGAAGGATCGGTTTACCAT CAGCCGGGACGACTCCAAGAATACTGCCTATC TCCAAATGAACTCCCTCAAGACCGAGGATACA GCCGTCTATTACTGCGTGCGGCACGGCAACTT CGGCAACAGCTATGTGTCTTGGTGGGCCTACT GGGGACAGGGAACACTGGTTACTGTGTCCAG TGGCGGTGGTGGAAGTGGCGGCGGAGGATCA GGCGGTGGCGGTTCTCAAACAGTGGTCACCC AAGAGCCTAGCCTGACAGTGTCTCCTGGCGG AACCGTGACACTGACATGTGGCAGTTCTACAG GCGCCGTGACCACCAGCAACTACGTGAACTG GGTGCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCTCCTAGA GGACTGATCGGAGGCACCAACAAGAGAGCCC CTGGAACACCAGCCAGATTCTCCGGCTCTCTG ATCGGCGGAAAAGCCGCACTGACACTGTCTG GTGCTCAGCCTGAGGATGAGGCCGAGTACTAT TGCGTGCTGTGGTACAGCAACAGATGGGTGTT CGGCGGAGGGACCAAGCTGACAGTGCTT
634	ProC1963: Tras-25-v619h-noFc (SHL1 的未掩蔽/无 Fc 形式) (LC_Tras)	GATATTCAGATGACACAGAGCCCCAGCAGCCT GTCTGCCTCTGTGGGAGACAGAGTGACCATC ACCTGTAGAGCCAGCCAGGACGTGAACACAG CCGTGGCTTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAA GGCCCCTAAGCTGCTGATCTACAGCGCCAGCT TTCTGTACAGCGGCGTGCCCAGCAGATTCAGC GGCTCTAGAAGCGGCACCGACTTCACCCTGA CCATAAGCAGTCTGCAGCCCGAGGACTTCGCC

[0401]

		ACCTACTACTGTCAGCAGCACTACACCACACC TCCAACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAA ATCAAGCGGACAGTGGCCGCTCCTAGCGTGTT CATCTTTCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGT CTGGCACAGCCTCTGTCGTGTGCCTGCTGAAC AACTTCTACCCCAGAGAAGCCAAGGTGCAGT GGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAA TAGCCAAGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGC AAGGACTCTACCTACAGCCTGAGCAGCACCCT GACACTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCAC AAAGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGG GCCTTTCTAGCCCTGTGACCAAGAGCTTCAAC CGGGGCGAATGT
635	ProC3007: 20GG- GL1204DDH- v619h-5mr- F5.17-Tras- 1490DNI-SHL2- TCB (HC_20GG- GL1204DDH- v619h-5mr-Tras- 1490DNI- FcH4EN)	CAAGGACAATCTGGCTCTGGCTATCTGTGGGG CTGCGAGTGGAATTGTGGCGGCATCACAACA GGCTCTAGCGGCGGAAGCGGAGGATCTGGTG GACTGTCTGGCAGATCCGATGATCACGGCGGA TCTGAGGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGAG GACTTGTTCAGCCTGGCGGCTCTCTGAAGCTG TCTTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCAC CTACGCCATGAACTGGGTCCGACAGGCCTCTG GCAAAGGCCTGGAATGGGTCGGACGGATCAG AAGCAAGTACAACAACTACGCCACCTACTACG CCGACAGCGTGAAGGACAGATTCACCATCAG CCGGGACGACAGCAAGAACACCGCCTACCTG CAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCG CCGTGTACTACTGTGTGCGGCACGGCAACTTC GGCAACAGCTATGTGTCTTGGTGGGCCTATTG GGGCCAGGGCACACTGGTTACAGTTAGCAGT GGCGGCGGAGGTAGTGGCGGAGGTGGCAGCG GAGGCGGTGGATCTCAAACAGTGGTCACCCA AGAGCCTAGCCTGACCGTTTCTCCTGGCGGAA CCGTGACACTGACATGCGGATCTTCTACAGGC GCCGTGACCACCAGCAACTATGTGAATTGGGT GCAGCAGAAGCCCGGACAGGCTCCTAGAGGA CTGATCGGAGGCACCAACAAGAGAGCCCCTG GAACACCAGCCAGATTCAGCGGATCTCTGATC GGCGGAAAGGCCGCTCTGACACTTTCTGGTG CCCAGCCTGAAGATGAGGCCGAGTACTATTGC GTGCTGTGGTACAGCAACAGATGGGTGTTCGG AGGCGGCACCAAGCTGACAGTTCTTGGAGGC GGAGGCAGCGAAGTCCAGCTGGTTGAAAGCG GTGGTGGCCTGGTCCAACCAGGTGGAAGTCT GAGACTGAGCTGTGCCGCTTCCGGCTTCAAC ATCAAGGACACCTACATCCACTGGGTTCGACA AGCTCCAGGCAAGGGCCTTGAGTGGGTTGCC AGAATCTACCCCACCAACGGCTACACCAGATA CGCCGACTCTGTGAAAGGCCGGTTCACCATCT CTGCCGACACCTCCAAAAACACAGCCTATCTC CAAATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGATACAG

[0402]

		CCGTCTATTACTGCAGCAGATGGGGAGGCGAC GGCTTTTACGCCATGGATTACTGGGGACAGGG AACCCTGGTCACCGTGTCTAGCGCCTCTACAA AGGGCCCTAGCGTGTTCCCTCTGGCTCCCTGT AGCAGAAGCACCAGCGAATCTACAGCCGCTC TGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTTCCTGAG CCTGTGACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCTCT TACAAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTGC TGCAAAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAG CGTGGTCACAGTGCCTAGCTCTAGCCTGGGCA CAAAGACCTACACCTGTAATGTGGACCACAA GCCTAGCAACACCAAGGTGGACAAGCGCGTG GAATCTAAGTACGGCGGAGGAAGCTCTGGCG GCAGCATCTCTTCTGGACTGCTGAGCGGCAGA AGCGACAATATCGGCGGAGGCTCTGGACCTCC TTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAGTTTGAAG GCGGCCCTTCCGTGTTCCTGTTTCCTCCAAAG CCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCC TGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCC CAAGAGGATCCAGAGGTGCAGTTCAATTGGTA CGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAG ACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTTCAACAGCA CCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACAGTGCTG CACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACA AGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCTAG CAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAG GGCCAGCCTCGCGAACCTCAAGTCTGTACACT GCCTCCTAGCCAAGAGGAAATGACCAAGAAC CAGGTGTCCCTGAGCTGCGCCGTGAAGGGCT TTTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAG AGCAATGGCCAGCCAGAGAACAACTACAAGA CAACCCCTCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTC ATTCTTCCTGGTGTCCAGACTGACCGTGGACA AGAGCAGATGGCAAGAGGGCAACGTGTTCAG CTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAAC CACTACACCCAGAAGTCTCTGAGCCTGTCTCT GGGCNNN
636	ProC3007: 20GG- GL1204DDH- v619h-5mr- F5.17-Tras- 1490DNI-SHL2- TCB (HC_FcK_IgG4_ EN)	GGATCTTCTAAGTACGGACCTCCTTGTCCTCC ATGTCCTGCTCCAGAGTTTGAAGGCGGCCCTT CCGTGTTCCTGTTTCCTCCAAAGCCTAAGGAC ACCCTGATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTGA CCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCAAGAGGA TCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACG GCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCC TAGAGAGGAACAGTTCAACAGCACCTACAGA GTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGG ATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAA GGTGTCCAACAAGGGCCTGCCTAGCAGCATC GAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGC CAAGAGAACCCCAGGTGTACACACTGCCTCC

[0403]

		ATGCCAAGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTG TCCCTGTGGTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCC TTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATG GCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACACC TCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCC TGTACAGCAGACTGACCGTGGACAAGAGCAG ATGGCAAGAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGC GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA CCCAGAAGTCTCTGAGCCTGAGCCTGGGCNN N
637	ProC3007: 20GG-GL1204DDH-v619h-5mr-F5.17-Tras-1490DNI-SHL2-TCB (LC_Tras 5.17)	CAAGGACAATCTGGACAAGGCGCCCTGATCT GCTGTTCCGATGTGTCTGGACTGTGCCGTTGG TGCGGCGGAGGATCTTCTGGCGGCTCTATCTC TTCTGGCCTGCTGAGCGGCAGAAGCGACAAT CACGGCGGAGGCAGCGACATCCAGATGACAC AGAGCCCTTCTAGCCTGAGCGCCAGCGTGGG AGACAGAGTGACCATCACATGTAGAGCCAGC CAGGACGTGAACACAGCCGTGGCTTGGTATC AGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCCTAAGCTGCT GATCTACAGCGCCAGCTTTCTGTACAGCGGCG TGCCCAGCAGATTCAGCGGCTCTAGAAGCGG CACCGACTTCACCCTGACCATAAGCAGTCTGC AGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGTCAG CAGCACTACACCACACCTCCAACCTTTGGCCA GGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGGACAGTG GCCGCTCCTAGCGTGTTCATCTTTCCACCTAGC GACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACAGCCTCTG TCGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCAGA GAAGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAAC GCCCTGCAGTCCGGCAATAGCCAAGAGAGCG TGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCTACCTA CAGCCTGAGCAGCACCCTGACACTGAGCAAG GCCGACTACGAGAAGCACAAAGTGTACGCCT GCGAAGTGACCCACCAGGGCCTTTCTAGCCCT GTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAATGT
638	ProC3008: 20GG-GL1204DDH-v619h-5mr-F5.17-Tras-1406-SHL2-TCB (HC_20GG-GL1204DDH-v619h-5mr-Tras-1406-FcH4EN)	CAAGGACAATCTGGCTCTGGCTATCTGTGGGG CTGCGAGTGGAATTGTGGCGGCATCACAACA GGCTCTAGCGGCGGAAGCGGAGGATCTGGTG GACTGTCTGGCAGATCCGATGATCACGGCGGA TCTGAGGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGAG GACTTGTTCAGCCTGGCGGCTCTCTGAAGCTG TCTTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCAC CTACGCCATGAACTGGGTCCGACAGGCCTCTG GCAAAGGCCTGGAATGGGTCGGACGGATCAG AAGCAAGTACAACAACTACGCCACCTACTACG CCGACAGCGTGAAGGACAGATTCACCATCAG CCGGGACGACAGCAAGAACACCGCCTACCTG CAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCG CCGTGTACTACTGTGTGCGGCACGGCAACTTC GGCAACAGCTATGTGTCTTGGTGGGCCTATTG

[0404]

		GGGCCAGGGCACACTGGTTACAGTTAGCAGT GGCGGCGGAGGTAGTGGCGGAGGTGGCAGCG GAGGCGGTGGATCTCAAACAGTGGTCACCCA AGAGCCTAGCCTGACCGTTTCTCCTGGCGGAA CCGTGACACTGACATGCGGATCTTCTACAGGC GCCGTGACCACCAGCAACTATGTGAATTGGGT GCAGCAGAAGCCCGGACAGGCTCCTAGAGGA CTGATCGGAGGCACCAACAAGAGAGCCCCTG GAACACCAGCCAGATTCAGCGGATCTCTGATC GGCGGAAAGGCCGCTCTGACACTTTCTGGTG CCCAGCCTGAAGATGAGGCCGAGTACTATTGC GTGCTGTGGTACAGCAACAGATGGGTGTTCGG AGGCGGCACCAAGCTGACAGTTCTTGGAGGC GGAGGCAGCGAAGTCCAGCTGGTTGAAAGCG GTGGTGGCCTGGTCCAACCAGGTGGAAGTCT GAGACTGAGCTGTGCCGCTTCCGGCTTCAAC ATCAAGGACACCTACATCCACTGGGTTCGACA AGCTCCAGGCAAGGGCCTTGAGTGGGTTGCC AGAATCTACCCCACCAACGGCTACACCAGATA CGCCGACTCTGTGAAAGGCCGGTTCACCATCT CTGCCGACACCTCCAAAAACACAGCCTATCTC CAAATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGATACAG CCGTCTATTACTGCAGCAGATGGGGAGGCGAC GGCTTTTACGCCATGGATTACTGGGGACAGGG AACCCTGGTCACCGTGTCTAGCGCCTCTACAA AGGGCCCTAGCGTGTTCCCTCTGGCTCCCTGT AGCAGAAGCACCAGCGAATCTACAGCCGCTC TGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTTCCTGAG CCTGTGACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCTCT TACAAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTGC TGCAAAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAG CGTGGTCACAGTGCCTAGCTCTAGCCTGGGCA CAAAGACCTACACCTGTAATGTGGACCACAA GCCTAGCAACACCAAGGTGGACAAGCGCGTG GAATCTAAGTACGGCGGAGGAAGCTCTGGCG GCAGCATCTCTTCTGGACTGCTGAGCGGCAGA AGCGACAATATCGGCGGAGGCTCTGGACCTCC TTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAGTTTGAAG GCGGCCCTTCCGTGTTCCTGTTTCCTCCAAAG CCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCC TGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCC CAAGAGGATCCAGAGGTGCAGTTCAATTGGTA CGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAG ACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTTCAACAGCA CCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACAGTGCTG CACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACA AGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCTAG CAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAG GGCCAGCCTCGCGAACCTCAAGTCTGTACACT GCCTCCTAGCCAAGAGGAAATGACCAAGAAC

[0405]

		CAGGTGTCCCTGAGCTGCGCCGTGAAGGGCT TTTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAG AGCAATGGCCAGCCAGAGAACAACTACAAGA CAACCCCTCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTC ATTCTTCCTGGTGTCCAGACTGACCGTGGACA AGAGCAGATGGCAAGAGGGCAACGTGTTCAG CTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAAC CACTACACCCAGAAGTCTCTGAGCCTGTCTCT GGGCNNN
639	ProC3008: 20GG- GL1204DDH- v619h-5mr- F5.17-Tras-1406- SHL2-TCB (HC_FcK_IgG4_ EN)	CAAGGACAATCTGGCTCTGGCTATCTGTGGGG CTGCGAGTGGAATTGTGGCGGCATCACAACA GGCTCTAGCGGCGGAAGCGGAGGATCTGGTG GACTGTCTGGCAGATCCGATGATCACGGCGGA TCTGAGGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGAG GACTTGTTCAGCCTGGCGGCTCTCTGAAGCTG TCTTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCAC CTACGCCATGAACTGGGTCCGACAGGCCTCTG GCAAAGGCCTGGAATGGGTCGGACGGATCAG AAGCAAGTACAACAACTACGCCACCTACTACG CCGACAGCGTGAAGGACAGATTCACCATCAG CCGGGACGACAGCAAGAACACCGCCTACCTG CAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCG CCGTGTACTACTGTGTGCGGCACGGCAACTTC GGCAACAGCTATGTGTCTTGGTGGGCCTATTG GGGCCAGGGCACACTGGTTACAGTTAGCAGT GGCGGCGGAGGTAGTGGCGGAGGTGGCAGCG GAGGCGGTGGATCTCAAACAGTGGTCACCCA AGAGCCTAGCCTGACCGTTTCTCCTGGCGGAA CCGTGACACTGACATGCGGATCTTCTACAGGC GCCGTGACCACCAGCAACTATGTGAATTGGGT GCAGCAGAAGCCCGGACAGGCTCCTAGAGGA CTGATCGGAGGCACCAACAAGAGAGCCCCTG GAACACCAGCCAGATTCAGCGGATCTCTGATC GGCGGAAAGGCCGCTCTGACACTTTCTGGTG CCCAGCCTGAAGATGAGGCCGAGTACTATTGC GTGCTGTGGTACAGCAACAGATGGGTGTTCGG AGGCGGCACCAAGCTGACAGTTCTTGGAGGC GGAGGCAGCGAAGTCCAGCTGGTTGAAAGCG GTGGTGGCCTGGTCCAACCAGGTGGAAGTCT GAGACTGAGCTGTGCCGCTTCCGGCTTCAAC ATCAAGGACACCTACATCCACTGGGTTCGACA AGCTCCAGGCAAGGGCCTTGAGTGGGTTGCC AGAATCTACCCCACCAACGGCTACACCAGATA CGCCGACTCTGTGAAAGGCCGGTTCACCATCT CTGCCGACACCTCCAAAAACACAGCCTATCTC CAAATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGATACAG CCGTCTATTACTGCAGCAGATGGGGAGGCGAC GGCTTTTACGCCATGGATTACTGGGGACAGGG AACCCTGGTCACCGTGTCTAGCGCCTCTACAA AGGGCCCTAGCGTGTTCCCTCTGGCTCCCTGT

[0406]

		AGCAGAAGCACCAGCGAATCTACAGCCGCTC TGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTTCCTGAG CCTGTGACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCTCT TACAAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTGC TGCAAAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAG CGTGGTCACAGTGCCTAGCTCTAGCCTGGGCA CAAAGACCTACACCTGTAATGTGGACCACAA GCCTAGCAACACCAAGGTGGACAAGCGCGTG GAATCTAAGTACGGCGGAGGAAGCTCAGGCG GCTCTGCTCCTAGATCTGCTCTGGCCCATGGA CTGTTTGGCGGAGGCTCTGGACCTCCTTGTCC TCCATGTCCTGCTCCAGAGTTTGAAGGCGGCC CTTCCGTGTTCCTGTTTCCTCCAAAGCCTAAG GACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCTGAAG TGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCAAGA GGATCCAGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGG ACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAA GCCTAGAGAGGAACAGTTCAACAGCACCTAC AGAGTGGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACC AGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTG CAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCTAGCAGC ATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCC AGCCTCGCGAACCTCAAGTCTGTACACTGCCT CCTAGCCAAGAGGAAATGACCAAGAACCAGG TGTCCCTGAGCTGCGCCGTGAAGGGCTTTTAC CCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAA TGGCCAGCCAGAGAACAACTACAAGACAACC CCTCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTT CCTGGTGTCCAGACTGACCGTGGACAAGAGC AGATGGCAAGAGGGCAACGTGTTCAGCTGCA GCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTA CACCCAGAAGTCTCTGAGCCTGTCTCTGGGCN NN
640	ProC3008: 20GG- GL1204DDH- v619h-5mr- F5.17-Tras-1406- SHL2-TCB (LC_Tras 5.17)	CAAGGACAATCTGGACAAGGCGCCCTGATCT GCTGTTCCGATGTGTCTGGACTGTGCCGTTGG TGCGGCGGAGGATCTTCTGGCGGCTCTATCTC TTCTGGCCTGCTGAGCGGCAGAAGCGACAAT CACGGCGGAGGCAGCGACATCCAGATGACAC AGAGCCCTTCTAGCCTGAGCGCCAGCGTGGG AGACAGAGTGACCATCACATGTAGAGCCAGC CAGGACGTGAACACAGCCGTGGCTTGGTATC AGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCCTAAGCTGCT GATCTACAGCGCCAGCTTTCTGTACAGCGGCG TGCCCAGCAGATTCAGCGGCTCTAGAAGCGG CACCGACTTCACCCTGACCATAAGCAGTCTGC AGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGTCAG CAGCACTACACCACACCTCCAACCTTTGGCCA GGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGGACAGTG GCCGCTCCTAGCGTGTTCATCTTTCCACCTAGC GACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACAGCCTCTG

[0407]

		TCGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCAGA GAAGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAAC GCCCTGCAGTCCGGCAATAGCCAAGAGAGCG TGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCTACCTA CAGCCTGAGCAGCACCCTGACACTGAGCAAG GCCGACTACGAGAAGCACAAAGTGTACGCCT GCGAAGTGACCCACCAGGGCCTTTCTAGCCCT GTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAATGT
641	ProC1441: 20GG-v619h- F5.17-Tras-半 TCB (HC_20GG- v619h-Tras- H4HEN)	CAAGGACAATCTGGCTCTGGCTATCTGTGGGG CTGCGAGTGGAATTGTGGCGGCATCACAACA GGCTCTAGCGGCGGAAGCGGAGGATCTGGTG GACTGTCTGGCAGATCCGATGATCACGGCGGA TCTGAGGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGAG GACTTGTTCAGCCTGGCGGCTCTCTGAAGCTG TCTTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCAC CTACGCCATGAACTGGGTCCGACAGGCCTCTG GCAAAGGCCTGGAATGGGTCGGACGGATCAG AAGCAAGTACAACAACTACGCCACCTACTACG CCGACAGCGTGAAGGACAGATTCACCATCAG CCGGGACGACAGCAAGAACACCGCCTACCTG CAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCG CCGTGTACTACTGTGTGCGGCACGGCAACTTC GGCAACAGCTATGTGTCTTGGTGGGCCTATTG GGGCCAGGGCACACTGGTTACAGTTAGCAGT GGCGGCGGAGGTAGTGGCGGAGGTGGCAGCG GAGGCGGTGGATCTCAAACAGTGGTCACCCA AGAGCCTAGCCTGACCGTTTCTCCTGGCGGAA CCGTGACACTGACATGCGGATCTTCTACAGGC GCCGTGACCACCAGCAACTATGTGAATTGGGT GCAGCAGAAGCCCGGACAGGCTCCTAGAGGA CTGATCGGAGGCACCAACAAGAGAGCCCCTG GAACACCAGCCAGATTCAGCGGATCTCTGATC GGCGGAAAGGCCGCTCTGACACTTTCTGGTG CCCAGCCTGAAGATGAGGCCGAGTACTATTGC GTGCTGTGGTACAGCAACAGATGGGTGTTCGG AGGCGGCACCAAGCTGACAGTTCTTGGAGGC GGAGGCAGCGAAGTCCAGCTGGTTGAAAGCG GTGGTGGCCTGGTCCAACCAGGTGGAAGTCT GAGACTGAGCTGTGCCGCTTCCGGCTTCAAC ATCAAGGACACCTACATCCACTGGGTTCGACA AGCTCCAGGCAAGGGCCTTGAGTGGGTTGCC AGAATCTACCCCACCAACGGCTACACCAGATA CGCCGACTCTGTGAAAGGCCGGTTCACCATCT CTGCCGACACCTCCAAAAACACAGCCTATCTC CAAATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGATACAG CCGTCTATTACTGCAGCAGATGGGGAGGCGAC GGCTTTTACGCCATGGATTACTGGGGACAGGG AACCCTGGTCACCGTGTCTAGCGCCTCTACAA AGGGCCCTAGCGTGTTCCCTCTGGCTCCCTGT AGCAGAAGCACCAGCGAATCTACAGCCGCTC

[0408]

		TGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTTCCTGAG CCTGTGACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCTCT TACAAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTGC TGCAAAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAG CGTGGTCACAGTGCCTAGCTCTAGCCTGGGCA CAAAGACCTACACCTGTAATGTGGACCACAA GCCTAGCAACACCAAGGTGGACAAGCGCGTG GAATCTAAGTACGGCCCTCCTTGTCCTCCATGT CCTGCTCCAGAGTTTGAAGGCGGCCCTTCCGT GTTCCTGTTTCCTCCAAAGCCTAAGGACACCC TGATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTGACCTGC GTGGTGGTGGACGTTTCCCAAGAGGACCCCG AGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTG GAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAG AGGAACAGTTCAACAGCACCTACAGAGTGGT GTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGC TGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTC CAACAAGGGCCTGCCTAGCAGCATCGAGAAA ACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGCG AACCTCAAGTCTGTACACTGCCTCCTAGCCAA GAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGA GCTGCGCCGTGAAGGGCTTTTACCCTTCCGAT ATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGC CTGAGAACAACTACAAGACCACACCTCCTGT GCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGGTGT CCAGACTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCA AGAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATG CACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGA AGTCTCTGTCTCTGTCCCTGGGCNNN
642	ProC1441: 20GG-v619h- F5.17-Tras-半 TCB (HC_FcK_IgG4_ EN)	GGATCTTCTAAGTACGGACCTCCTTGTCCTCC ATGTCCTGCTCCAGAGTTTGAAGGCGGCCCTT CCGTGTTCCTGTTTCCTCCAAAGCCTAAGGAC ACCCTGATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTGA CCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCAAGAGGA TCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACG GCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCC TAGAGAGGAACAGTTCAACAGCACCTACAGA GTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGG ATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAA GGTGTCCAACAAGGGCCTGCCTAGCAGCATC GAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGC CAAGAGAACCCCAGGTGTACACACTGCCTCC ATGCCAAGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTG TCCCTGTGGTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCC TTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATG GCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACACC TCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCC TGTACAGCAGACTGACCGTGGACAAGAGCAG ATGGCAAGAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGC GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA

[0409]

		CCCAGAAGTCTCTGAGCCTGAGCCTGGGCNNN
643	ProC1441: 20GG-v619h-F5.17-Tras-半TCB (LC_Tras 5.17)	CAAGGACAATCTGGACAAGGCGCCCTGATCT GCTGTTCCGATGTGTCTGGACTGTGCCGTTGG TGCGGCGGAGGATCTTCTGGCGGCTCTATCTC TTCTGGCCTGCTGAGCGGCAGAAGCGACAAT CACGGCGGAGGCAGCGACATCCAGATGACAC AGAGCCCTTCTAGCCTGAGCGCCAGCGTGGG AGACAGAGTGACCATCACATGTAGAGCCAGC CAGGACGTGAACACAGCCGTGGCTTGGTATC AGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCCTAAGCTGCT GATCTACAGCGCCAGCTTTCTGTACAGCGGCG TGCCCAGCAGATTCAGCGGCTCTAGAAGCGG CACCGACTTCACCCTGACCATAAGCAGTCTGC AGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGTCAG CAGCACTACACCACACCTCCAACCTTTGGCCA GGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGGACAGTG GCCGCTCCTAGCGTGTTCATCTTTCCACCTAGC GACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACAGCCTCTG TCGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCAGA GAAGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAAC GCCCTGCAGTCCGGCAATAGCCAAGAGAGCG TGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCTACCTA CAGCCTGAGCAGCACCCTGACACTGAGCAAG GCCGACTACGAGAAGCACAAAGTGTACGCCT GCGAAGTGACCCACCAGGGCCTTTCTAGCCCT GTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAATGT
644	ProC1446: F5.17-Tras-25-v619h-20GG-24-半 TCB (HC_Tras-25-v619h-20GG-24-H4HEN)	GAAGTTCAGCTTGTTGAATCTGGCGGCGGACT GGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTT GTGCCGCCAGCGGCTTCAACATCAAGGACAC CTACATCCACTGGGTCCGACAGGCCCCTGGCA AAGGACTTGAATGGGTCGCCAGAATCTACCCC ACCAACGGCTACACCAGATACGCCGACTCTGT GAAGGGCAGATTCACCATCAGCGCCGACACC AGCAAGAACACCGCCTACCTGCAGATGAACA GCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTA CTGTTCTAGATGGGGAGGCGACGGCTTCTACG CCATGGATTATTGGGGCCAGGGCACCCTGGTC ACAGTGTCTAGCGCCTCTACAAAGGGCCCCA GCGTTTTCCCACTGGCTCCCTGTAGCAGAAGC ACCAGCGAATCTACAGCCGCTCTGGGCTGCCT GGTCAAGGACTACTTTCCTGAGCCTGTGACCG TGTCCTGGAACTCTGGCGCTCTGACATCTGGC GTGCACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAAAGCA GCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACA GTGCCTAGCAGCTCTCTGGGCACCAAGACCTA CACCTGTAATGTGGACCACAAGCCTAGCAACA CCAAGGTGGACAAGAGAGTTGGCGGAGGCG GATCAGGTGGCGGAGGAAGCGGAGGCGGCG GATCTGAAGTGCAACTGGTTGAAAGCGGCGG

[0410]

		AGGCCTTGTGCAACCTGGCGGAAGCCTGAAA CTGAGCTGTGCCGCCTCTGGCTTCACCTTCAG CACATACGCCATGAATTGGGTTCGACAAGCCA GCGGCAAGGGCCTCGAATGGGTTGGAAGAAT CAGAAGCAAGTACAACAACTACGCCACCTAC TACGCCGACAGCGTGAAGGATCGGTTTACCAT CAGCCGGGACGACTCCAAGAATACTGCCTATC TCCAAATGAACTCCCTCAAGACCGAGGATACA GCCGTCTATTACTGCGTGCGGCACGGCAACTT CGGCAACAGCTATGTGTCTTGGTGGGCCTACT GGGGACAGGGAACACTGGTTACTGTGTCCAG TGGCGGTGGTGGAAGTGGCGGCGGAGGATCA GGCGGTGGCGGTTCTCAAACAGTGGTCACCC AAGAGCCTAGCCTGACAGTGTCTCCAGGCGG AACCGTGACACTGACATGTGGCAGTTCTACAG GCGCCGTGACCACCAGCAACTACGTGAACTG GGTGCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCTCCTAGA GGACTGATCGGAGGCACCAACAAGAGAGCCC CTGGAACACCAGCCAGATTCTCCGGCTCTCTG ATCGGCGGAAAAGCCGCACTGACACTGTCTG GTGCTCAGCCTGAGGATGAGGCCGAGTACTAT TGCGTGCTGTGGTACAGCAACAGATGGGTGTT CGGCGGAGGGACCAAGCTGACAGTGCTTGGA GGTTCTGGTGGCAGCAGCGGCGCTTCTGGAA CTGGAACAGCTGGCGGAACAGGCTCTGGATC TGGCACAGGATCTGGCCTGAGCGGCAGATCC GATGATCATGGCGGAGGTTCTCAGGGCCAGTC TGGCAGTGGATATCTGTGGGGCTGCGAGTGGA ATTGCGGCGGCATCACAACAGGATCTAGCGGA GGCTCAGGTGGTGGTGGATCTGGTGGTGGCG GCTCAGGCGGAGGTGGTAGCGGTGGTTCTGA GTCTAAGTACGGCCCTCCTTGTCCTCCATGTCC TGCTCCAGAGTTTGAAGGCGGCCCTTCCGTGT TCCTGTTTCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTG ATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTGACCTGCGT GGTGGTCGACGTTTCCCAAGAGGACCCTGAG GTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGA AGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAG GAACAGTTCAACAGCACCTACAGAGTGGTGT CCGTGCTGACTGTGCTGCACCAGGATTGGCTG AACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCA ACAAGGGCCTGCCAAGCAGCATCGAGAAAAC CATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGCGAA CCTCAAGTCTGTACACTGCCTCCTAGCCAAGA GGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGAGC TGCGCCGTGAAGGGCTTTTACCCTTCCGATAT CGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCA GAGAACAACTACAAGACAACCCCTCCTGTGC TGGACAGCGACGGCTCATTTTTCCTGGTGTCC AGACTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAAG

[0411]

		AGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCA CGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAG TCTCTGTCTCTGAGCCTGGGCNNN
645	ProC1446: F5.17-Tras-25- v619h-20GG-24- 半 TCB (HC_FcK_IgG4_ EN)	GGATCTTCTAAGTACGGACCTCCTTGTCCTCC ATGTCCTGCTCCAGAGTTTGAAGGCGGCCCTT CCGTGTTCCTGTTTCCTCCAAAGCCTAAGGAC ACCCTGATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTGA CCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCAAGAGGA TCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACG GCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCC TAGAGAGGAACAGTTCAACAGCACCTACAGA GTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGG ATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAA GGTGTCCAACAAGGGCCTGCCTAGCAGCATC GAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGC CAAGAGAACCCCAGGTGTACACACTGCCTCC ATGCCAAGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTG TCCCTGTGGTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCC TTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATG GCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACACC TCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCC TGTACAGCAGACTGACCGTGGACAAGAGCAG ATGGCAAGAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGC GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA CCCAGAAGTCTCTGAGCCTGAGCCTGGGCNN N
646	ProC1446: F5.17-Tras-25- v619h-20GG-24- 半 TCB (LC_Tras 5.17)	CAAGGACAATCTGGACAAGGCGCCCTGATCT GCTGTTCCGATGTGTCTGGACTGTGCCGTTGG TGCGGCGGAGGATCTTCTGGCGGCTCTATCTC TTCTGGCCTGCTGAGCGGCAGAAGCGACAAT CACGGCGGAGGCAGCGACATCCAGATGACAC AGAGCCCTTCTAGCCTGAGCGCCAGCGTGGG AGACAGAGTGACCATCACATGTAGAGCCAGC CAGGACGTGAACACAGCCGTGGCTTGGTATC AGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCCTAAGCTGCT GATCTACAGCGCCAGCTTTCTGTACAGCGGCG TGCCCAGCAGATTCAGCGGCTCTAGAAGCGG CACCGACTTCACCCTGACCATAAGCAGTCTGC AGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGTCAG CAGCACTACACCACACCTCCAACCTTTGGCCA GGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGGACAGTG GCCGCTCCTAGCGTGTTCATCTTTCCACCTAGC GACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACAGCCTCTG TCGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCAGA GAAGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAAC GCCCTGCAGTCCGGCAATAGCCAAGAGAGCG TGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCTACCTA CAGCCTGAGCAGCACCCTGACACTGAGCAAG GCCGACTACGAGAAGCACAAAGTGTACGCCT GCGAAGTGACCCACCAGGGCCTTTCTAGCCCT

[0412]

		GTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAATGT
647	ProC1447: F5.17-Tras-25-v619h-MN15a-24-半 TCB (HC_Tras-25-v619h-MN15a-24-H4HEN)	GAAGTTCAGCTTGTTGAATCTGGCGGCGGACT GGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTT GTGCCGCCAGCGGCTTCAACATCAAGGACAC CTACATCCACTGGGTCCGACAGGCCCCTGGCA AAGGACTTGAATGGGTCGCCAGAATCTACCCC ACCAACGGCTACACCAGATACGCCGACTCTGT GAAGGGCAGATTCACCATCAGCGCCGACACC AGCAAGAACACCGCCTACCTGCAGATGAACA GCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTA CTGTTCTAGATGGGGAGGCGACGGCTTCTACG CCATGGATTATTGGGGCCAGGGCACCCTGGTC ACAGTGTCTAGCGCCTCTACAAAGGGCCCCA GCGTTTTCCCACTGGCTCCCTGTAGCAGAAGC ACCAGCGAATCTACAGCCGCTCTGGGCTGCCT GGTCAAGGACTACTTTCCTGAGCCTGTGACCG TGTCCTGGAACTCTGGCGCTCTGACATCTGGC GTGCACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAAAGCA GCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACA GTGCCTAGCAGCTCTCTGGGCACCAAGACCTA CACCTGTAATGTGGACCACAAGCCTAGCAACA CCAAGGTGGACAAGAGAGTTGGCGGAGGCG GATCAGGTGGCGGAGGAAGCGGAGGCGGCG GATCTGAAGTGCAACTGGTTGAAAGCGGCGG AGGCCTTGTGCAACCTGGCGGAAGCCTGAAA CTGAGCTGTGCCGCCTCTGGCTTCACCTTCAG CACATACGCCATGAATTGGGTTCGACAAGCCA GCGGCAAGGGCCTCGAATGGGTTGGAAGAAT CAGAAGCAAGTACAACAACTACGCCACCTAC TACGCCGACAGCGTGAAGGATCGGTTTACCAT CAGCCGGGACGACTCCAAGAATACTGCCTATC TCCAAATGAACTCCCTCAAGACCGAGGATACA GCCGTCTATTACTGCGTGCGGCACGGCAACTT CGGCAACAGCTATGTGTCTTGGTGGGCCTACT GGGGACAGGGAACACTGGTTACTGTGTCCAG TGGCGGTGGTGGAAGTGGCGGCGGAGGATCA GGCGGTGGCGGTTCTCAAACAGTGGTCACCC AAGAGCCTAGCCTGACAGTGTCTCCAGGCGG AACCGTGACACTGACATGTGGCAGTTCTACAG GCGCCGTGACCACCAGCAACTACGTGAACTG GGTGCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCTCCTAGA GGACTGATCGGAGGCACCAACAAGAGAGCCC CTGGAACACCAGCCAGATTCTCCGGCTCTCTG ATCGGCGGAAAAGCCGCACTGACACTGTCTG GTGCTCAGCCTGAGGATGAGGCCGAGTACTAT TGCGTGCTGTGGTACAGCAACAGATGGGTGTT CGGCGGAGGGACCAAGCTGACAGTGCTTGGA GGTTCTGGTGGCAGCAGCGGCGCTTCTGGAA CTGGAACAGCTGGCGGAACAGGCTCTGGATC TGGCACAGGATCTGGCCTGAGCGGCAGATCC

[0413]

		GATGATCATGGCGGAGGTTCTCAGGGCCAGTC TGGCAGCAATGCCTTCAGATGTTGGTGGGACC CTCCTTGCCAGCCTATGACAGGATCTAGCGGA GGCTCAGGTGGCGGTGGATCTGGCGGAGGTG GTAGCGGAGGTGGTGGAAGCGGAGGATCTGA GTCTAAGTACGGCCCTCCTTGTCCTCCATGTCC TGCTCCAGAGTTTGAAGGCGGCCCTTCCGTGT TCCTGTTTCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTG ATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTGACCTGCGT GGTGGTGGACGTTTCCCAAGAGGACCCTGAG GTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGA AGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAG GAACAGTTCAACAGCACCTACAGAGTGGTGT CCGTGCTGACTGTGCTGCACCAGGATTGGCTG AACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCA ACAAGGGCCTGCCAAGCAGCATCGAGAAAAC CATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGCGAA CCTCAAGTCTGTACACTGCCTCCTAGCCAAGA GGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGAGC TGCGCCGTGAAGGGCTTTTACCCTTCCGATAT CGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCA GAGAACAACTACAAGACAACCCCTCCTGTGC TGGACAGCGACGGCTCATTTTTCCTGGTGTCC AGACTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAAG AGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCA CGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAG TCTCTGTCTCTGAGCCTGGGCNNN
648	ProC1447: F5.17-Tras-25-v619h-MN15a-24-半 TCB (HC_FcK_IgG4_EN)	GGATCTTCTAAGTACGGACCTCCTTGTCCTCC ATGTCCTGCTCCAGAGTTTGAAGGCGGCCCTT CCGTGTTCCTGTTTCCTCCAAAGCCTAAGGAC ACCCTGATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTGA CCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCAAGAGGA TCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACG GCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCC TAGAGAGGAACAGTTCAACAGCACCTACAGA GTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGG ATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAA GGTGTCCAACAAGGGCCTGCCTAGCAGCATC GAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGC CAAGAGAACCCCAGGTGTACACACTGCCTCC ATGCCAAGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTG TCCCTGTGGTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCC TTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATG GCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACACC TCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCC TGTACAGCAGACTGACCGTGGACAAGAGCAG ATGGCAAGAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGC GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA CCCAGAAGTCTCTGAGCCTGAGCCTGGGCNN N

[0414]

649	ProC1447: F5.17-Tras-25-v619h-MN15a-24-半 TCB (LC_Tras 5.17)	CAAGGACAATCTGGACAAGGCGCCCTGATCT GCTGTTCCGATGTGTCTGGACTGTGCCGTTGG TGCGGCGGAGGATCTTCTGGCGGCTCTATCTC TTCTGGCCTGCTGAGCGGCAGAAGCGACAAT CACGGCGGAGGCAGCGACATCCAGATGACAC AGAGCCCTTCTAGCCTGAGCGCCAGCGTGGG AGACAGAGTGACCATCACATGTAGAGCCAGC CAGGACGTGAACACAGCCGTGGCTTGGTATC AGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCCTAAGCTGCT GATCTACAGCGCCAGCTTTCTGTACAGCGGCG TGCCCAGCAGATTCAGCGGCTCTAGAAGCGG CACCGACTTCACCCTGACCATAAGCAGTCTGC AGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGTCAG CAGCACTACACCACACCTCCAACCTTTGGCCA GGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGGACAGTG GCCGCTCCTAGCGTGTTCATCTTTCCACCTAGC GACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACAGCCTCTG TCGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCAGA GAAGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAAC GCCCTGCAGTCCGGCAATAGCCAAGAGAGCG TGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCTACCTA CAGCCTGAGCAGCACCCTGACACTGAGCAAG GCCGACTACGAGAAGCACAAAGTGTACGCCT GCGAAGTGACCCACCAGGGCCTTTCTAGCCCT GTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAATGT
650	ProC1448: F5.17-Tras-25-v619h-MN15b-24-半 TCB (HC_Tras-25-v619h-MN15b-24-H4HEN)	GAAGTTCAGCTTGTTGAATCTGGCGGCGGACT GGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTT GTGCCGCCAGCGGCTTCAACATCAAGGACAC CTACATCCACTGGGTCCGACAGGCCCCTGGCA AAGGACTTGAATGGGTCGCCAGAATCTACCCC ACCAACGGCTACACCAGATACGCCGACTCTGT GAAGGGCAGATTCACCATCAGCGCCGACACC AGCAAGAACACCGCCTACCTGCAGATGAACA GCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTA CTGTTCTAGATGGGGAGGCGACGGCTTCTACG CCATGGATTATTGGGGCCAGGGCACCCTGGTC ACAGTGTCTAGCGCCTCTACAAAGGGCCCCA GCGTTTTCCCACTGGCTCCCTGTAGCAGAAGC ACCAGCGAATCTACAGCCGCTCTGGGCTGCCT GGTCAAGGACTACTTTCCTGAGCCTGTGACCG TGTCCTGGAACTCTGGCGCTCTGACATCTGGC GTGCACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAAAGCA GCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACA GTGCCTAGCAGCTCTCTGGGCACCAAGACCTA CACCTGTAATGTGGACCACAAGCCTAGCAACA CCAAGGTGGACAAGAGAGTTGGCGGAGGCG GATCAGGTGGCGGAGGAAGCGGAGGCGGCG GATCTGAAGTGCAACTGGTTGAAAGCGGCGG AGGCCTTGTGCAACCTGGCGGAAGCCTGAAA CTGAGCTGTGCCGCCTCTGGCTTCACCTTCAG

[0415]

		CACATACGCCATGAATTGGGTTCGACAAGCCA GCGGCAAGGGCCTCGAATGGGTTGGAAGAAT CAGAAGCAAGTACAACAACTACGCCACCTAC TACGCCGACAGCGTGAAGGATCGGTTTACCAT CAGCCGGGACGACTCCAAGAATACTGCCTATC TCCAAATGAACTCCCTCAAGACCGAGGATACA GCCGTCTATTACTGCGTGCGGCACGGCAACTT CGGCAACAGCTATGTGTCTTGGTGGGCCTACT GGGGACAGGGAACACTGGTTACTGTGTCCAG TGGCGGTGGTGGAAGTGGCGGCGGAGGATCA GGCGGTGGCGGTTCTCAAACAGTGGTCACCC AAGAGCCTAGCCTGACAGTGTCTCCAGGCGG AACCGTGACACTGACATGTGGCAGTTCTACAG GCGCCGTGACCACCAGCAACTACGTGAACTG GGTGCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCTCCTAGA GGACTGATCGGAGGCACCAACAAGAGAGCCC CTGGAACACCAGCCAGATTCTCCGGCTCTCTG ATCGGCGGAAAAGCCGCACTGACACTGTCTG GTGCTCAGCCTGAGGATGAGGCCGAGTACTAT TGCGTGCTGTGGTACAGCAACAGATGGGTGTT CGGCGGAGGGACCAAGCTGACAGTGCTTGGA GGTTCTGGTGGCAGCAGCGGCGCTTCTGGAA CTGGAACAGCTGGCGGAACAGGCTCTGGATC TGGCACAGGATCTGGCCTGAGCGGCAGATCC GATGATCATGGCGGAGGTTCTCAGGGCCAGTC TGGCTCTGCAAGAGGACTGTGTTGGTGGGAC CCTCCTTGCACACACGATCTGGGATCTTCAGG CGGATCTGGCGGAGGTGGTAGCGGTGGTGGT GGTAGCGGAGGCGGAGGTAGTGGTGGAAGCG AGTCTAAGTACGGCCCTCCTTGTCCTCCATGT CCTGCTCCAGAGTTTGAAGGCGGCCCTTCCGT GTTCCTGTTTCCTCCAAAGCCTAAGGACACCC TGATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTGACCTGC GTGGTGGTCGACGTTTCCCAAGAGGACCCTG AGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTG GAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAG AGGAACAGTTCAACAGCACCTACAGAGTGGT GTCCGTGCTGACTGTGCTGCACCAGGATTGGC TGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTC CAACAAGGGCCTGCCAAGCAGCATCGAGAAA ACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGCG AACCTCAAGTCTGTACACTGCCTCCTAGCCAA GAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGA GCTGCGCCGTGAAGGGCTTTTACCCTTCCGAT ATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGC CAGAGAACAACTACAAGACAACCCCTCCTGT GCTGGACAGCGACGGCTCATTTTTCCTGGTGT CCAGACTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCA AGAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATG CACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGA

		AGTCTCTGTCTCTGAGCCTGGGCNNN
651	ProC1448: F5.17-Tras-25-v619h-MN15b-24-半 TCB (HC_FcK_IgG4_EN)	GGATCTTCTAAGTACGGACCTCCTTGTCCTCC ATGTCCTGCTCCAGAGTTTGAAGGCGGCCCTT CCGTGTTCCTGTTTCCTCCAAAGCCTAAGGAC ACCCTGATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTGA CCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCAAGAGGA TCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACG GCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCC TAGAGAGGAACAGTTCAACAGCACCTACAGA GTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGG ATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAA GGTGTCCAACAAGGGCCTGCCTAGCAGCATC GAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGC CAAGAGAACCCCAGGTGTACACACTGCCTCC ATGCCAAGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTG TCCCTGTGGTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCC TTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATG GCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACACC TCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCC TGTACAGCAGACTGACCGTGGACAAGAGCAG ATGGCAAGAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGC GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA CCCAGAAGTCTCTGAGCCTGAGCCTGGGCNN N
652	ProC1448: F5.17-Tras-25-v619h-MN15b-24-半 TCB (LC_Tras 5.17)	CAAGGACAATCTGGACAAGGCGCCCTGATCT GCTGTTCCGATGTGTCTGGACTGTGCCGTTGG TGCGGCGGAGGATCTTCTGGCGGCTCTATCTC TTCTGGCCTGCTGAGCGGCAGAAGCGACAAT CACGGCGGAGGCAGCGACATCCAGATGACAC AGAGCCCTTCTAGCCTGAGCGCCAGCGTGGG AGACAGAGTGACCATCACATGTAGAGCCAGC CAGGACGTGAACACAGCCGTGGCTTGGTATC AGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCCTAAGCTGCT GATCTACAGCGCCAGCTTTCTGTACAGCGGCG TGCCCAGCAGATTCAGCGGCTCTAGAAGCGG CACCGACTTCACCCTGACCATAAGCAGTCTGC AGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGTCAG CAGCACTACACCACACCTCCAACCTTTGGCCA GGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGGACAGTG GCCGCTCCTAGCGTGTTCATCTTTCCACCTAGC GACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACAGCCTCTG TCGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCAGA GAAGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAAC GCCCTGCAGTCCGGCAATAGCCAAGAGAGCG TGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCTACCTA CAGCCTGAGCAGCACCCTGACACTGAGCAAG GCCGACTACGAGAAGCACAAAGTGTACGCCT GCGAAGTGACCCACCAGGGCCTTTCTAGCCCT GTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAATGT

[0416]

[0417] *注意:X是赖氨酸残基或存在于C端。

[0418] **注意:N要么是腺嘌呤,形成赖氨酸的密码子,要么每个N都不存在,因此赖氨酸的密码子不存在。

[0419] 应了解尽管已结合本发明的详细描述对本发明进行描述,但先前描述意图说明而非限制由随附权利要求书的范围限定的本发明的范围。其它方面、优势和修改在以上权利要求书的范围内。

[0420] 本文提及的所有出版物、专利申请、专利以及其它参考文献均以引用的方式整体并入。在冲突的情况下,将以本说明书为准,包括定义。材料、方法和实施例仅是说明性的,并且不意图是限制性的。

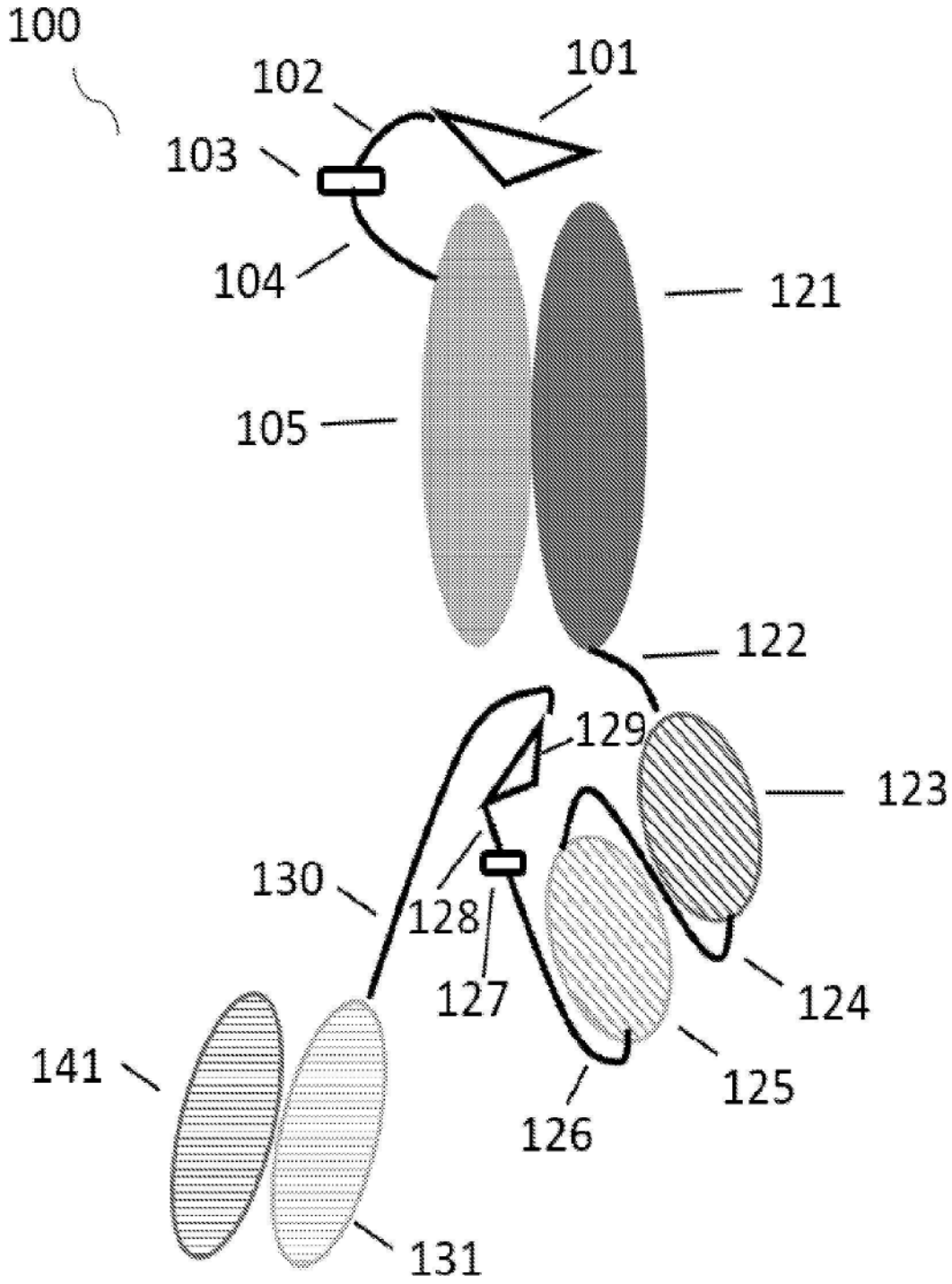

100
101
102
103
104
121
105
122
129
123
130
128
127
124
125
126
141
131

图1

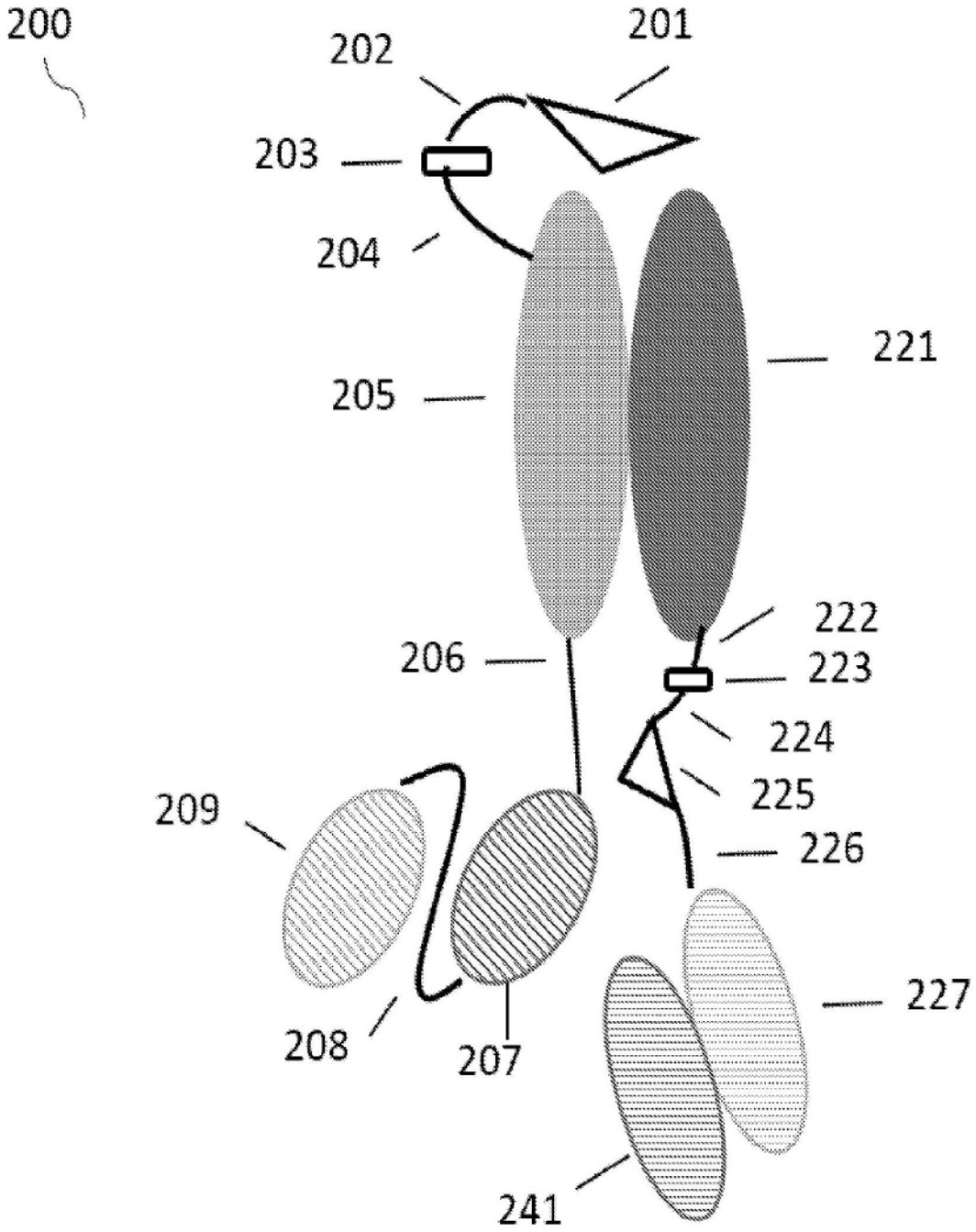

200
201
202
203
204
205
221
222
206
223
224
225
209
226
227
208
207
241

图2

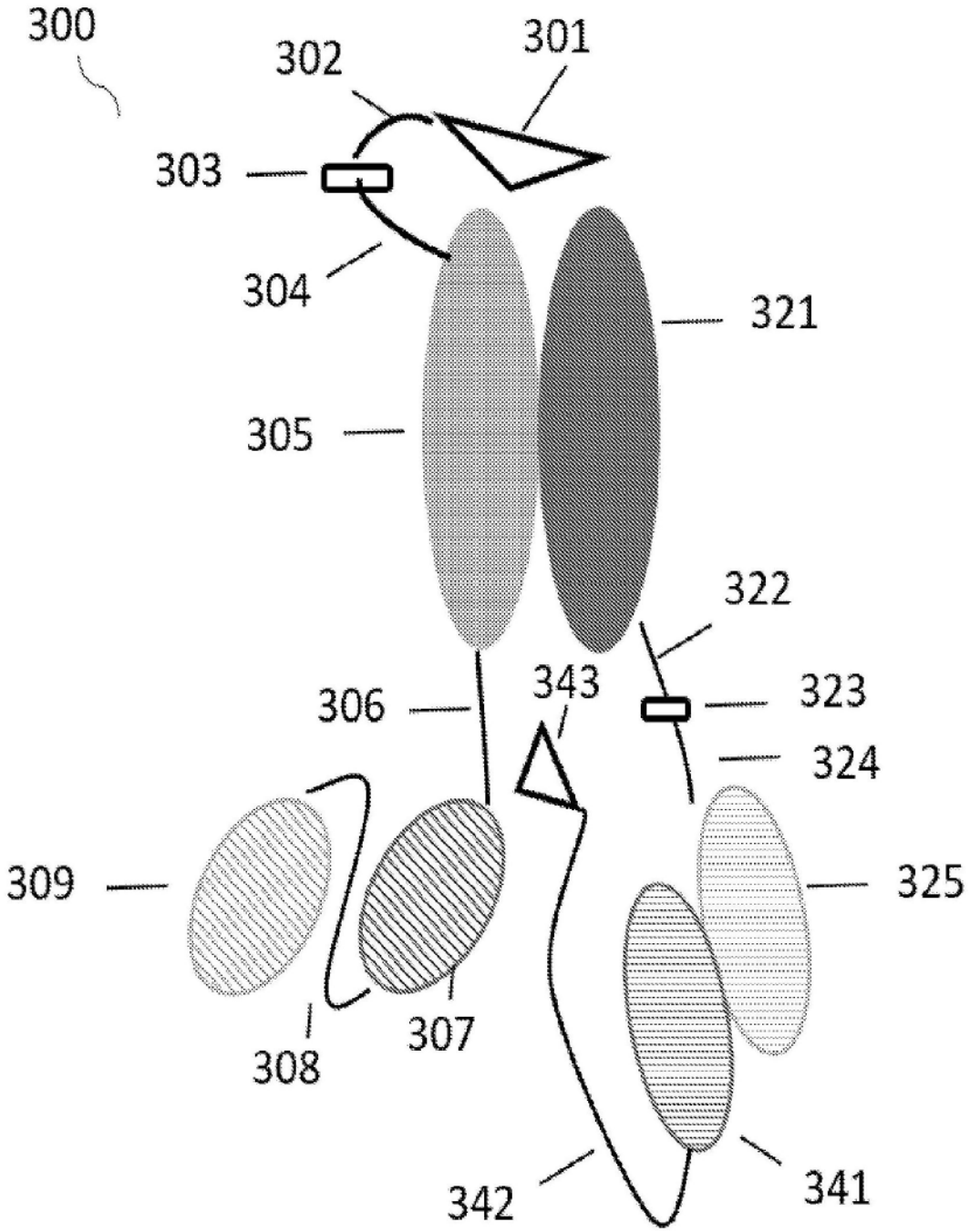

300
302
301
303
304
321
305
322
306
343
323
324
309
325
308
307
342
341

图3

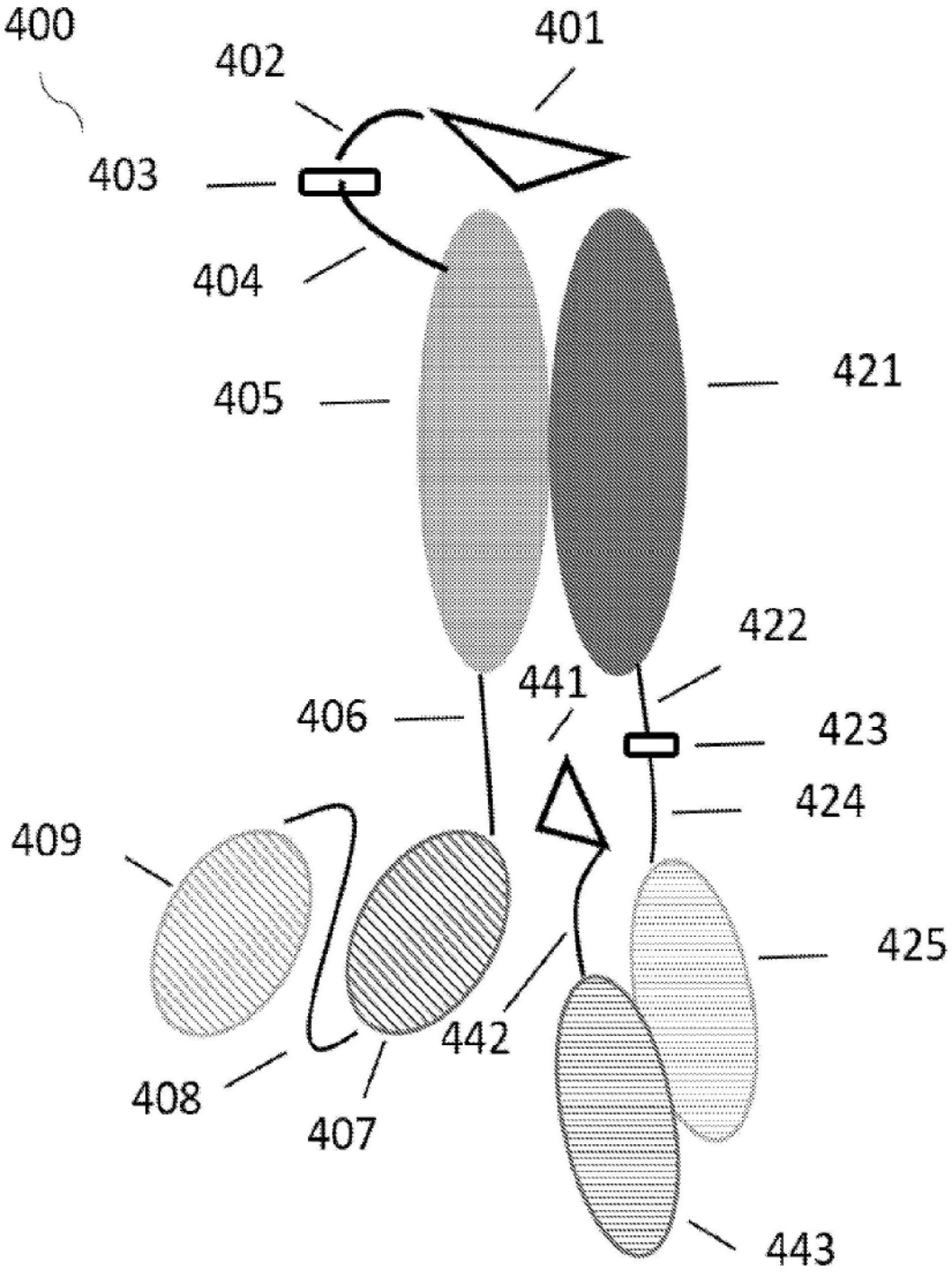

400
401
402
403
404
405
421
422
441
406
423
424
409
425
442
408
407
443

图4

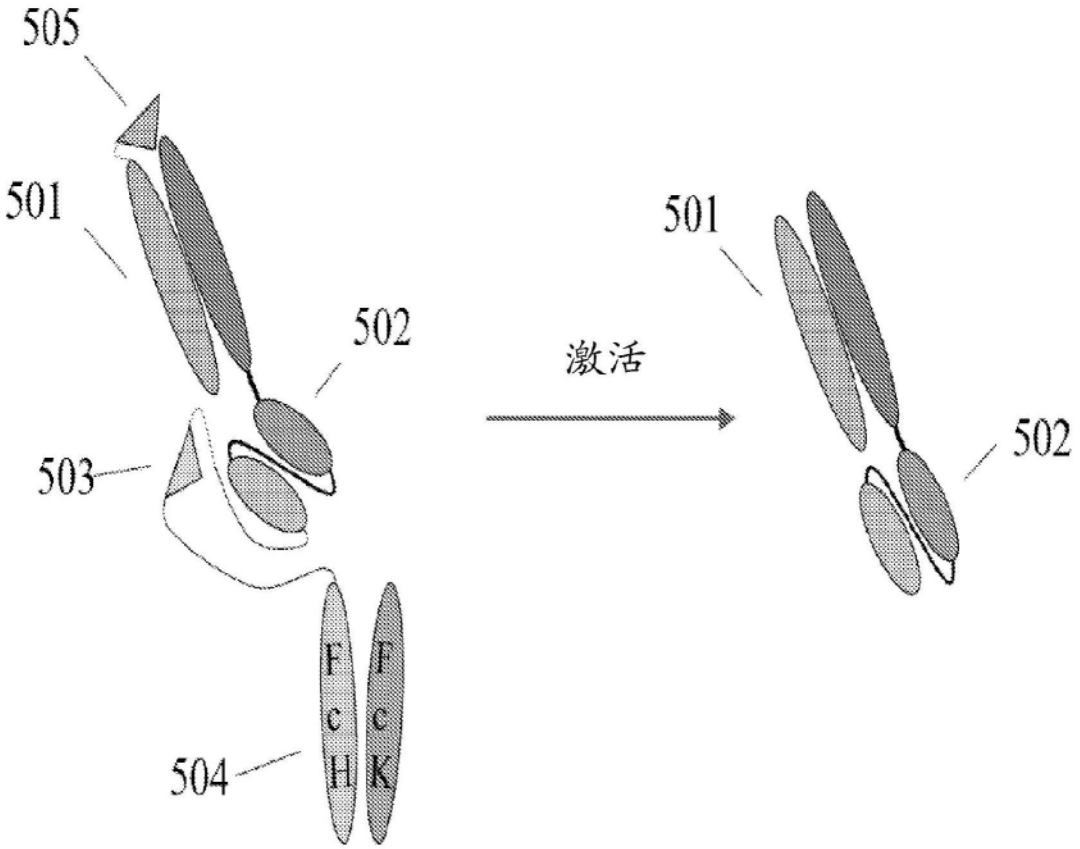


图5

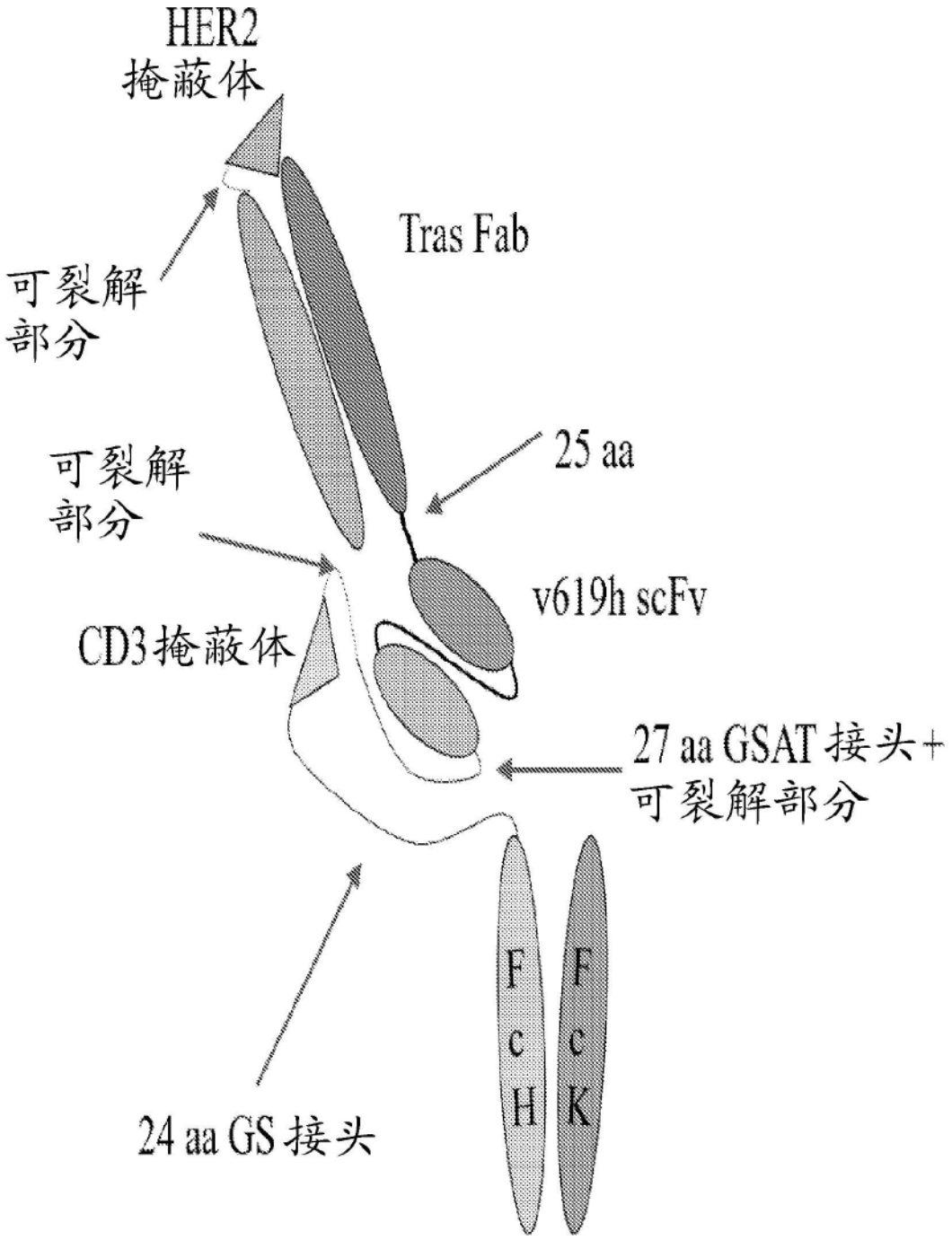

HER2
掩蔽体
Tras Fab
可裂解
部分
25 aa
可裂解
部分
v619h scFv
CD3掩蔽体
27 aa GSAT接头+
可裂解部分
Fc
H
Fc
K
24 aa GS接头

图6A

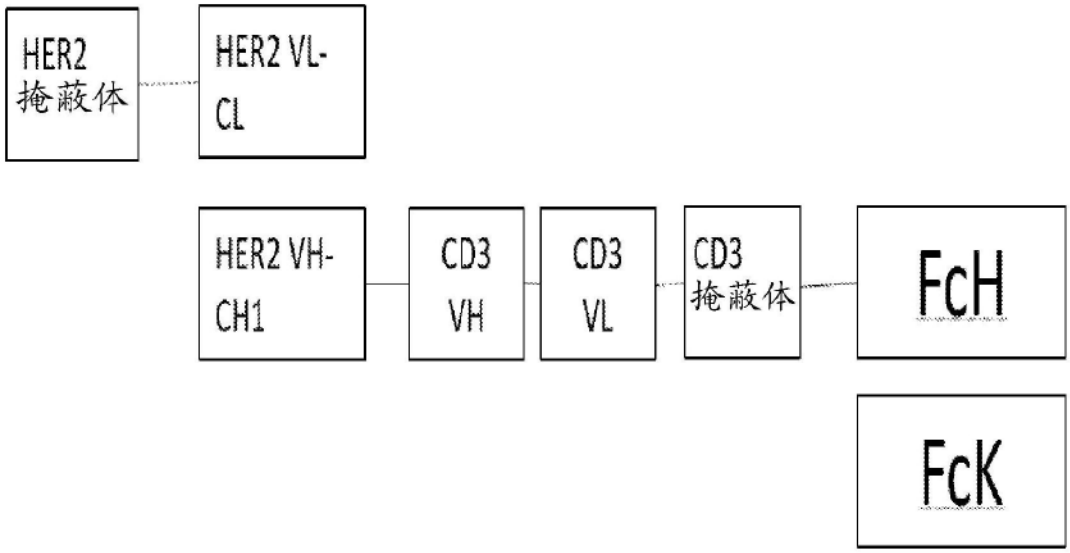

HER2
掩蔽体
HER2 VL-
CL
HER2 VH-
CH1
CD3
VH
CD3
VL
CD3
掩蔽体
FcH
FcK

图6B

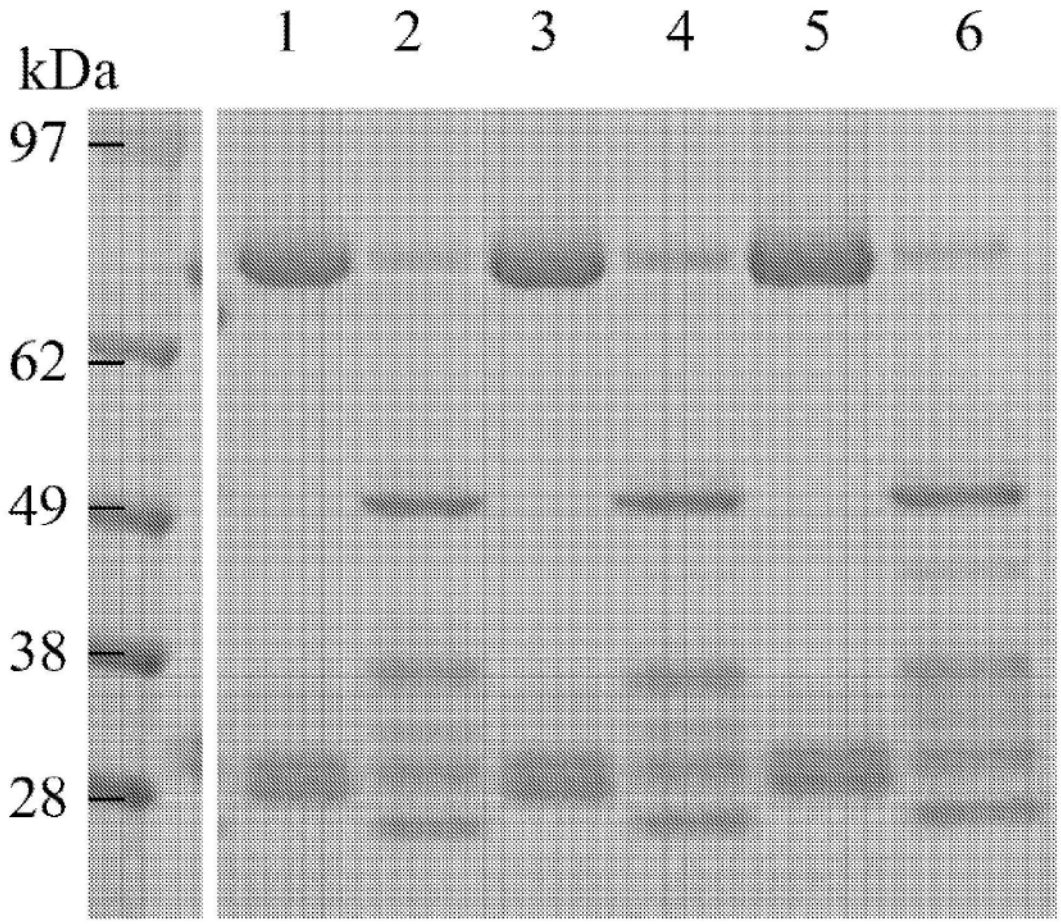
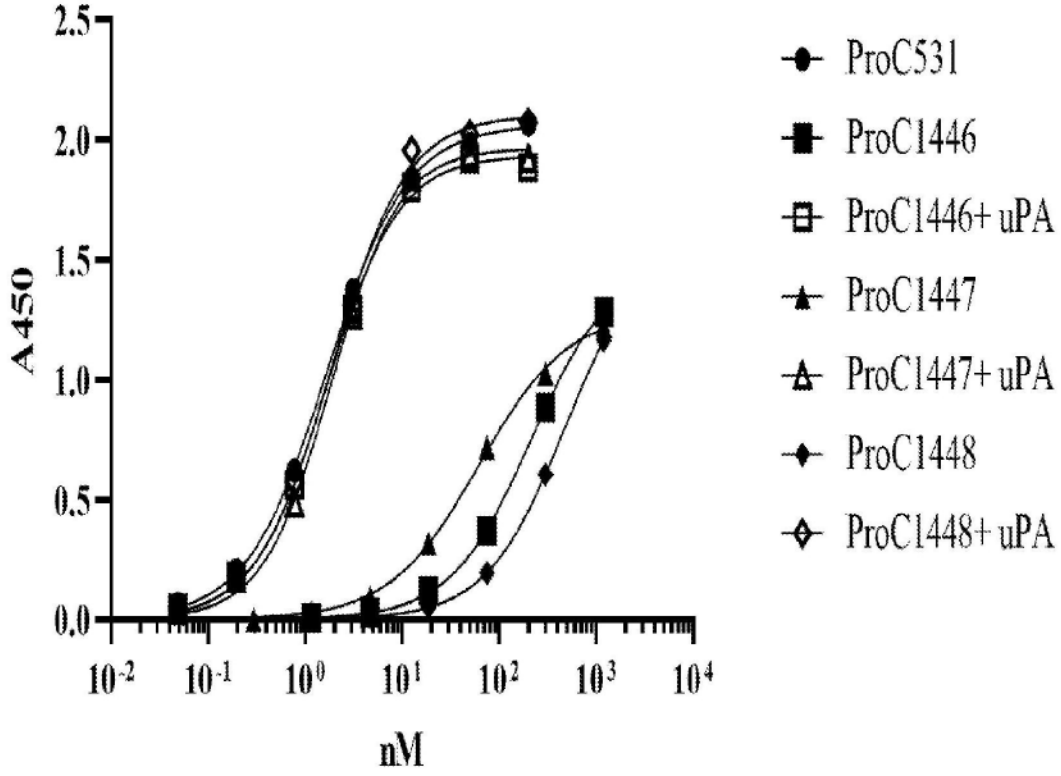

1
2
3
4
5
6
kDa
97
62
49
38
28

图7A

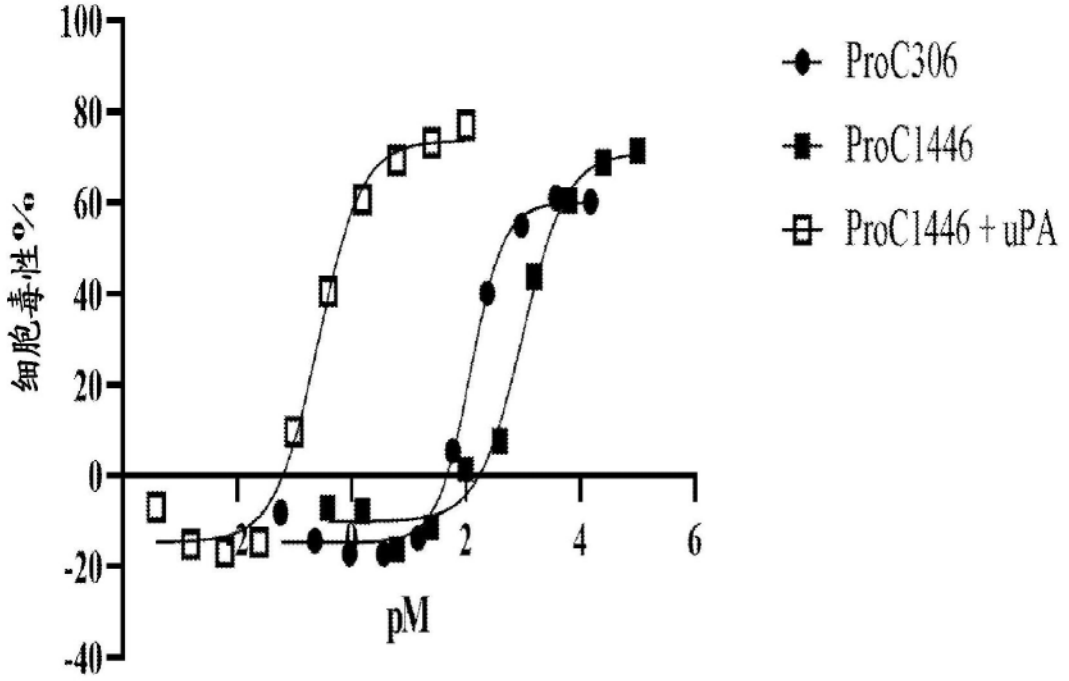
泳道		注释	预期MW (kDa)
1	ProC1446	20GG	83, 28, 26
2	ProC1446	+ uPA	53, 30, 24, 26
3	ProC1447	MN15a	83, 28, 26
4	ProC1447	+ uPA	53, 30, 24, 26
5	ProC1448	MN15b	83, 28, 26
6	ProC1448	+ uPA	53, 30, 24, 26

图7B



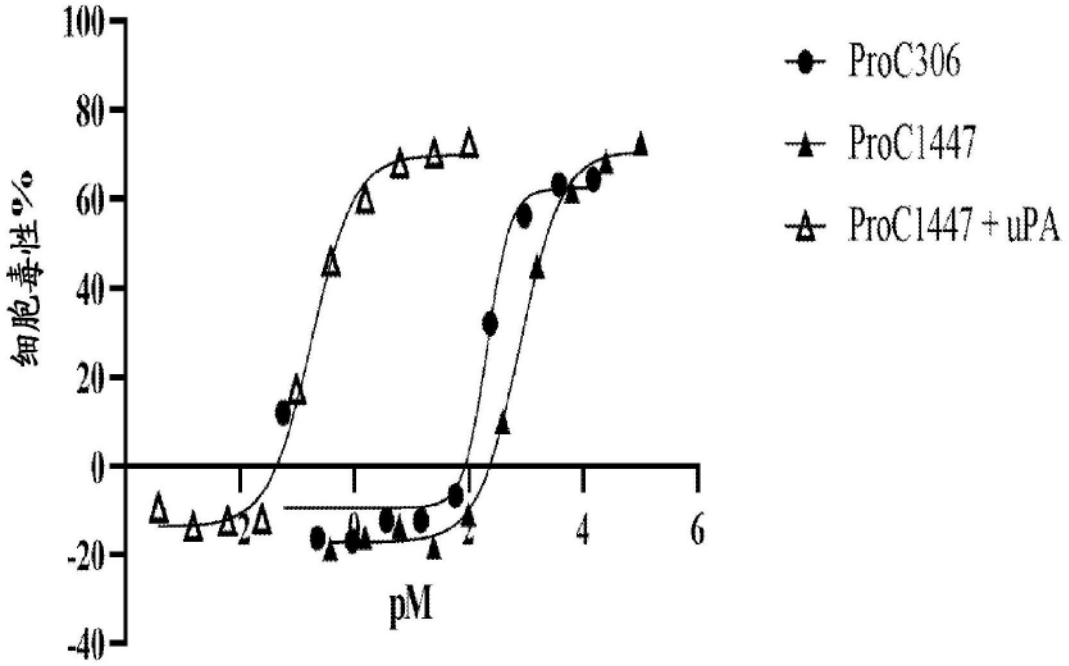
	EC50 (nM)	ME
ProC531	1.126	1
ProC1446	181.2	161
ProC1446 +uPA	2.574	2
ProC1447	60.24	53
ProC1447 +uPA	2.152	2
ProC1448	450.1	400
ProC1448 +uPA	2.268	2

图8



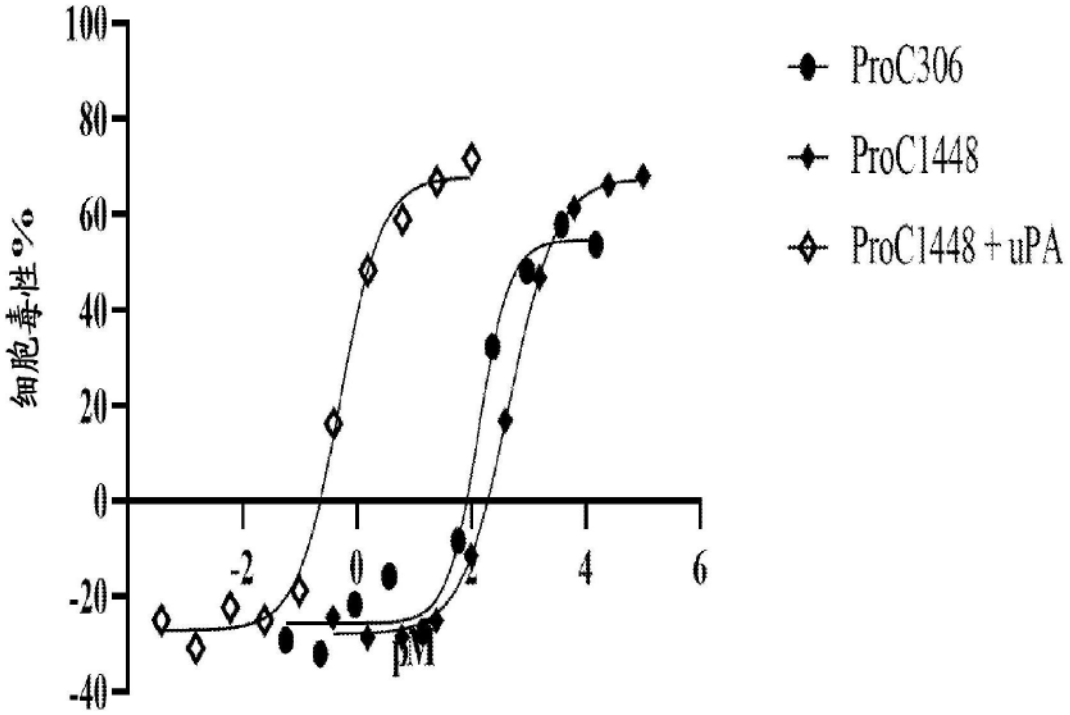
	EC50 (pM)	ME
ProC306	118.8	
ProC1446	958.3	3671
ProC1446 +uPA	0.261	

图9A



	EC50 (pM)	ME
ProC306	208	
ProC1447	775.9	4315
ProC1447 +uPA	0.180	

图9B



	EC50 (pM)	ME
ProC306	133	
ProC1448	449.3	904
ProC1448 +uPA	0.497	

图9C

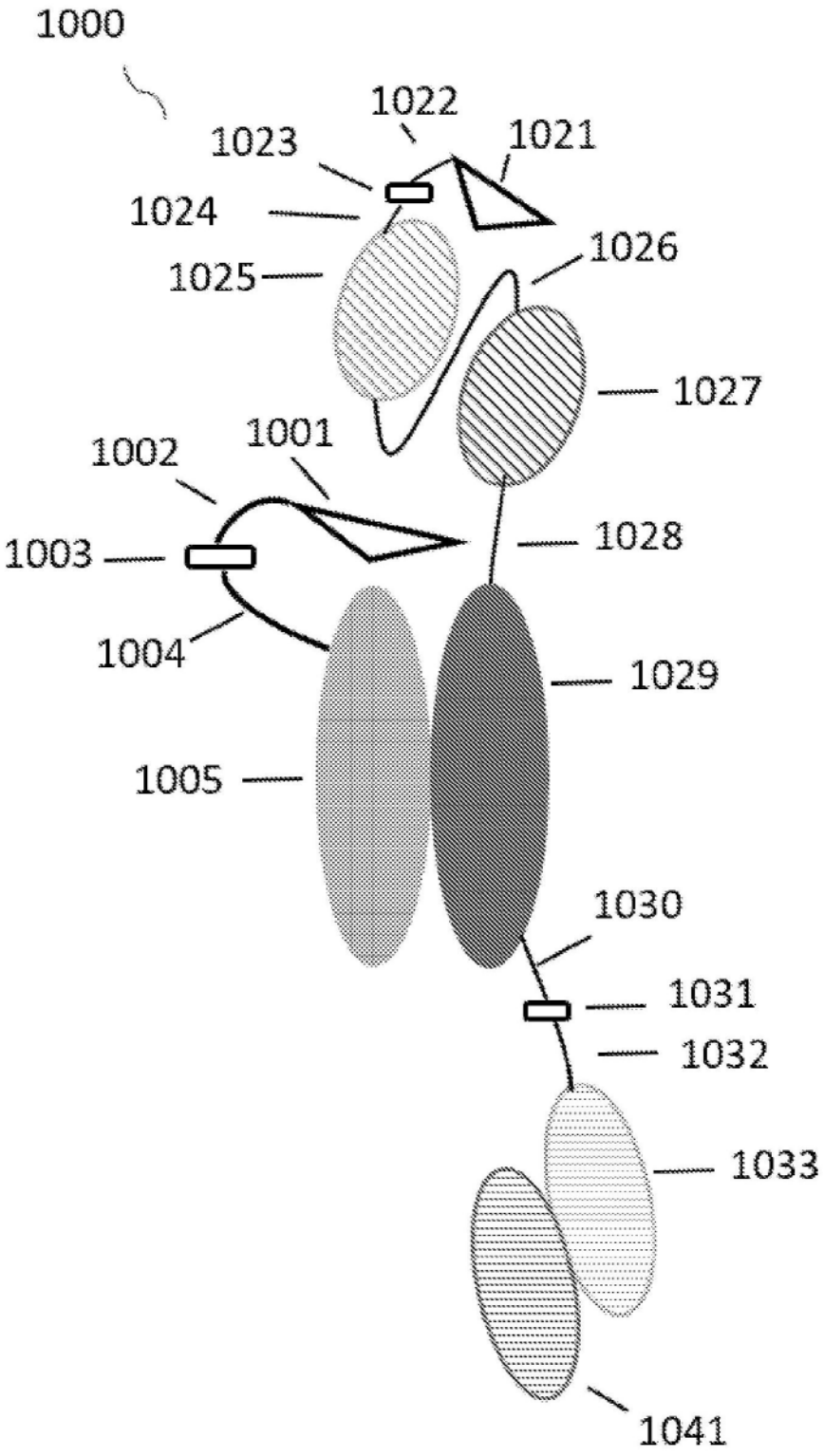

1000
1022
1023
1021
1024
1026
1025
1027
1001
1002
1003
1028
1004
1029
1005
1030
1031
1032
1033
1041

图10

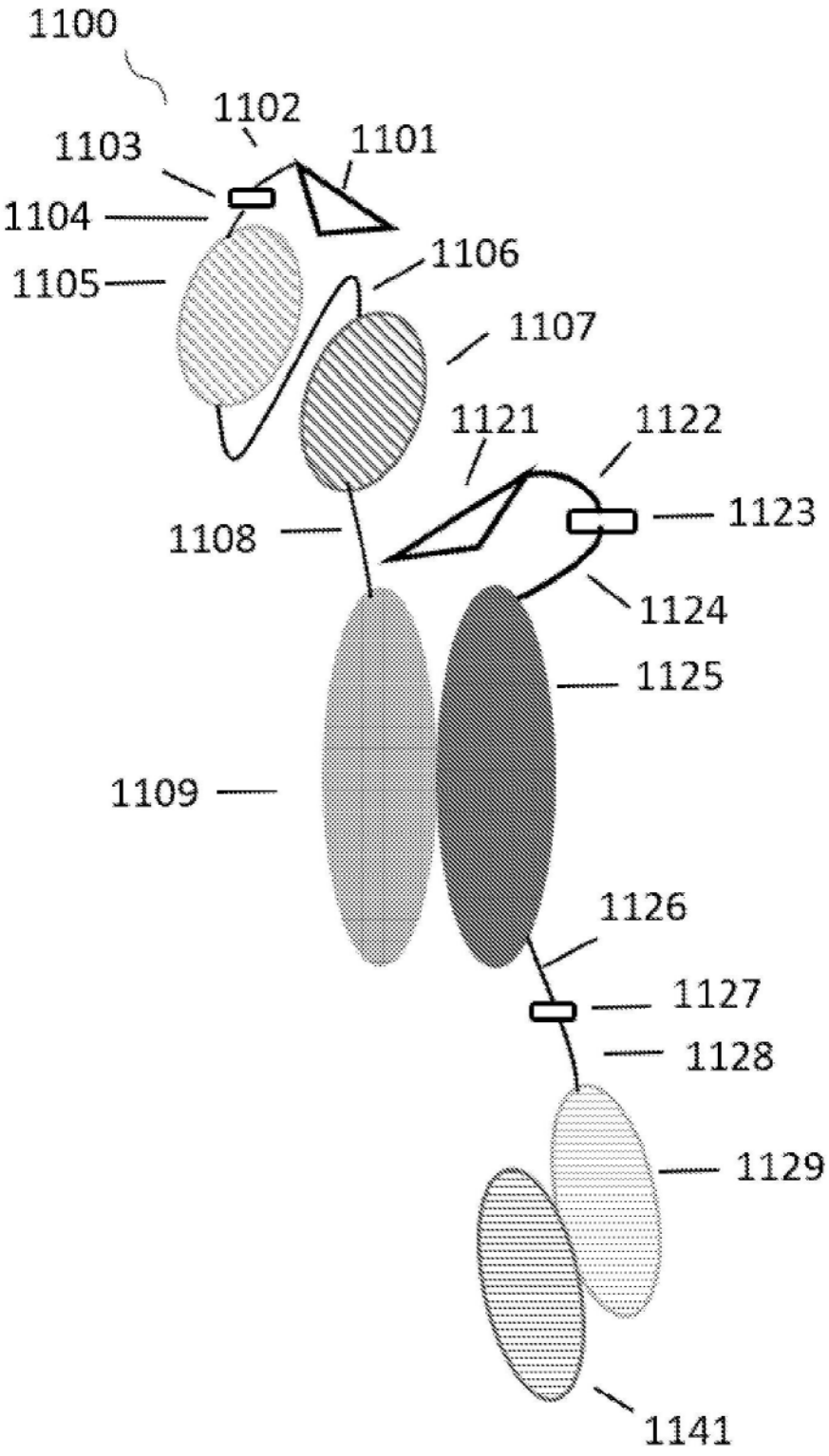

1100
1102
1103
1101
1104
1106
1105
1107
1121
1122
1123
1108
1124
1125
1109
1126
1127
1128
1129
1141

图11

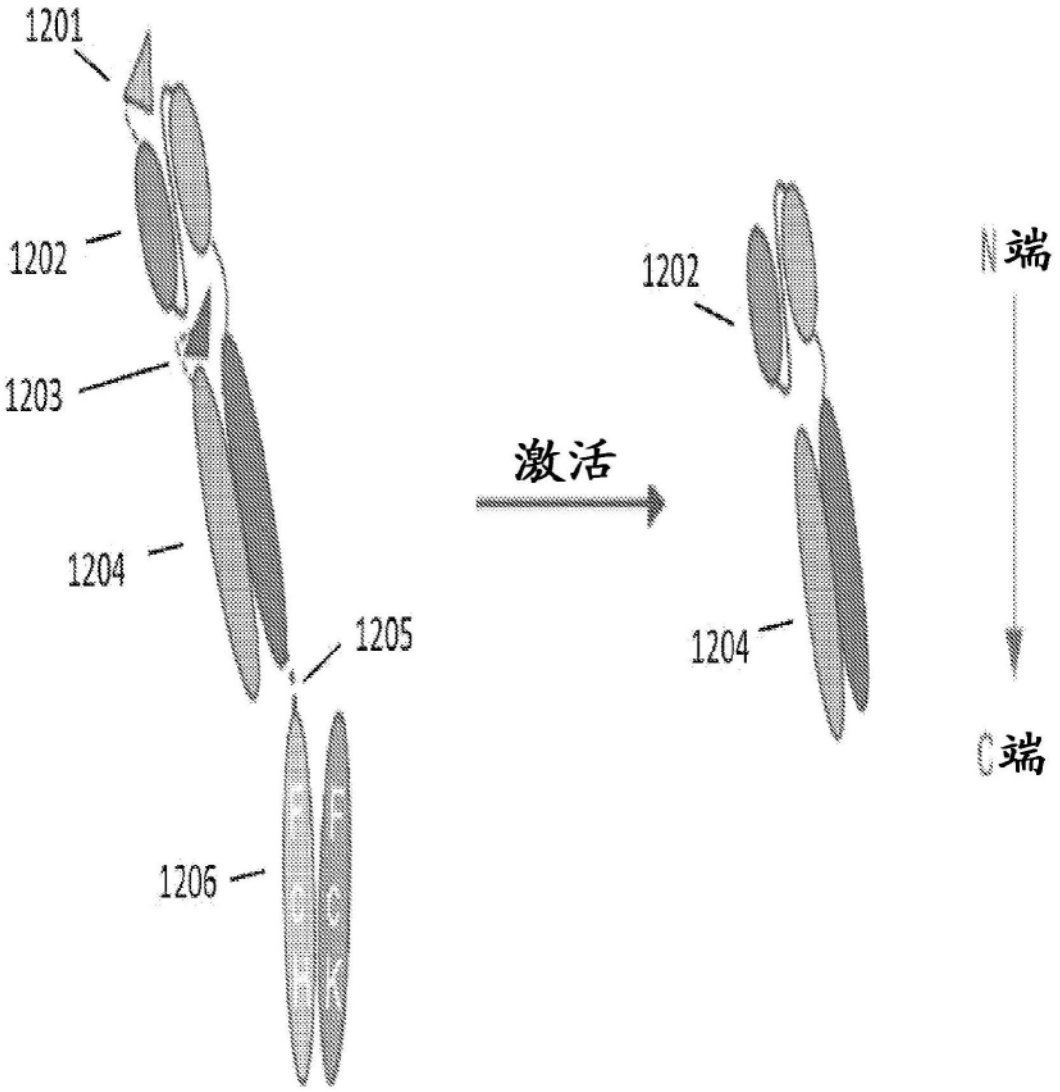


图12

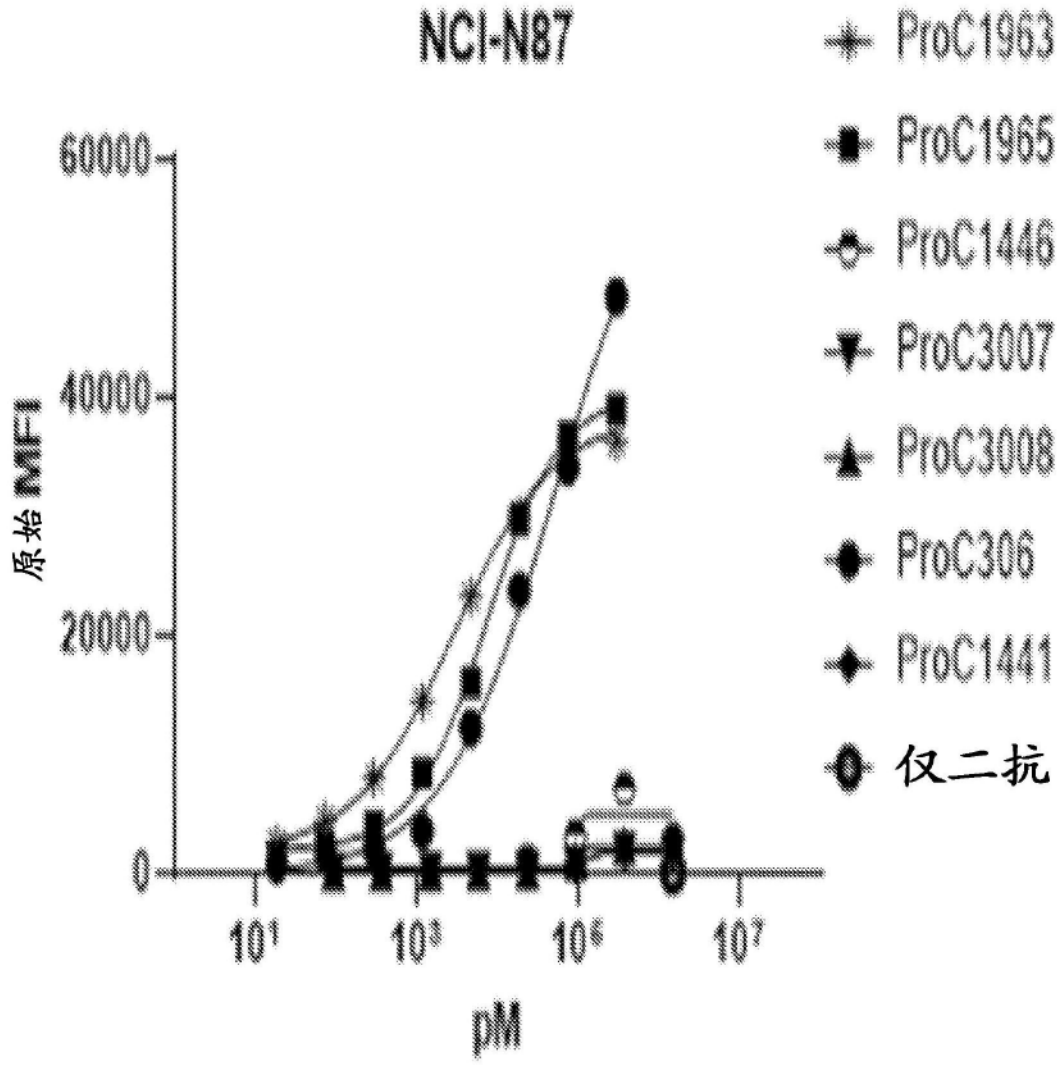

NCI-N87
ProC1963
ProC1965
ProC1446
ProC3007
ProC3008
ProC306
ProC1441
仅二抗
60000
40000
20000
0
原始 MFI
10^1
10^3
10^5
10^7
pM

图13A

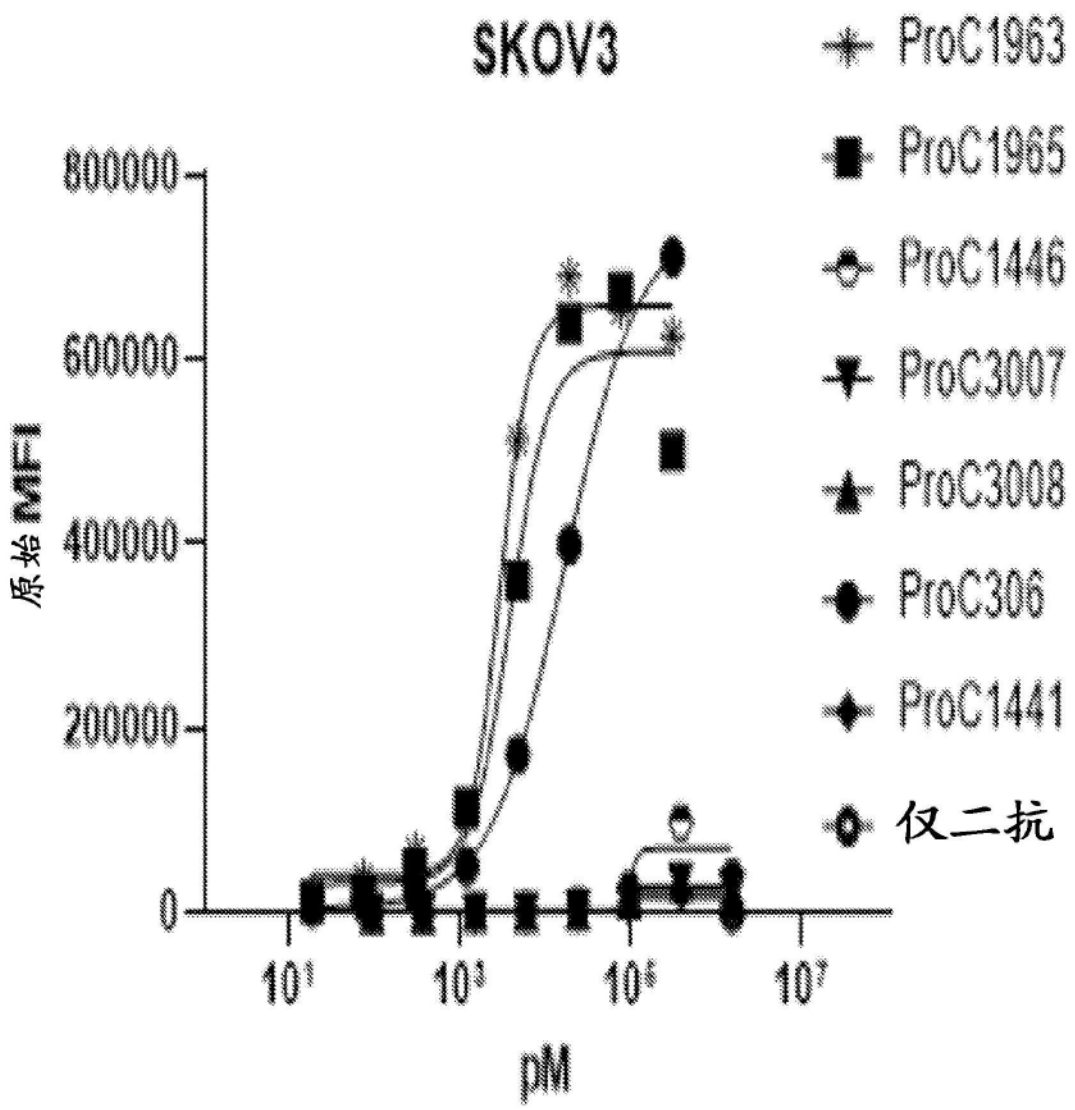

SKOV3
ProC1963
ProC1965
ProC1446
ProC3007
ProC3008
ProC306
ProC1441
仅二抗
800000
600000
400000
200000
0
原始 MFI
10¹
10³
10⁵
10⁷
pM

图13B

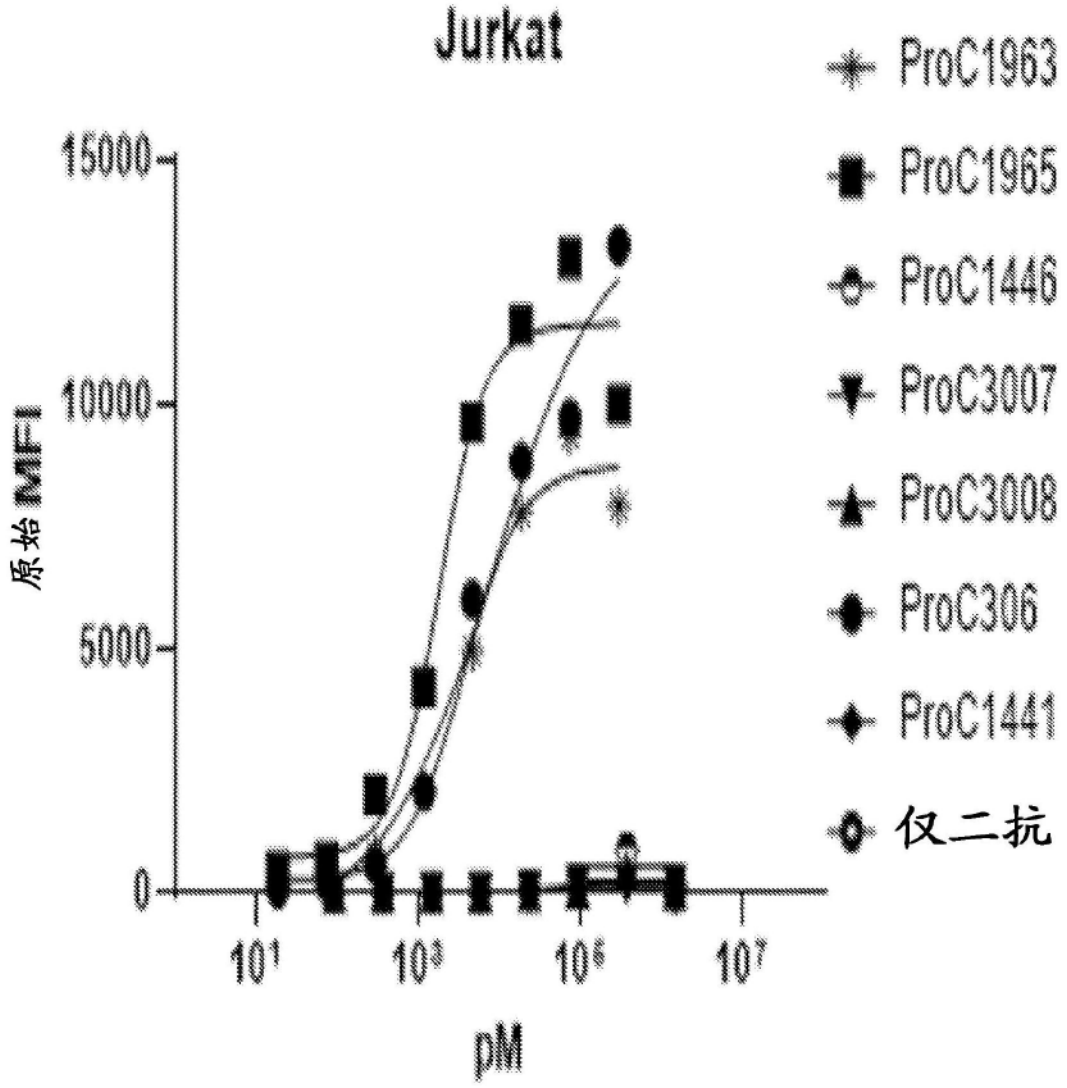

Jurkat
ProC1963
ProC1965
ProC1446
ProC3007
ProC3008
ProC306
ProC1441
仅二抗
原始 MFI
15000
10000
5000
0
10^1
10^3
10^5
10^7
pM

图13C

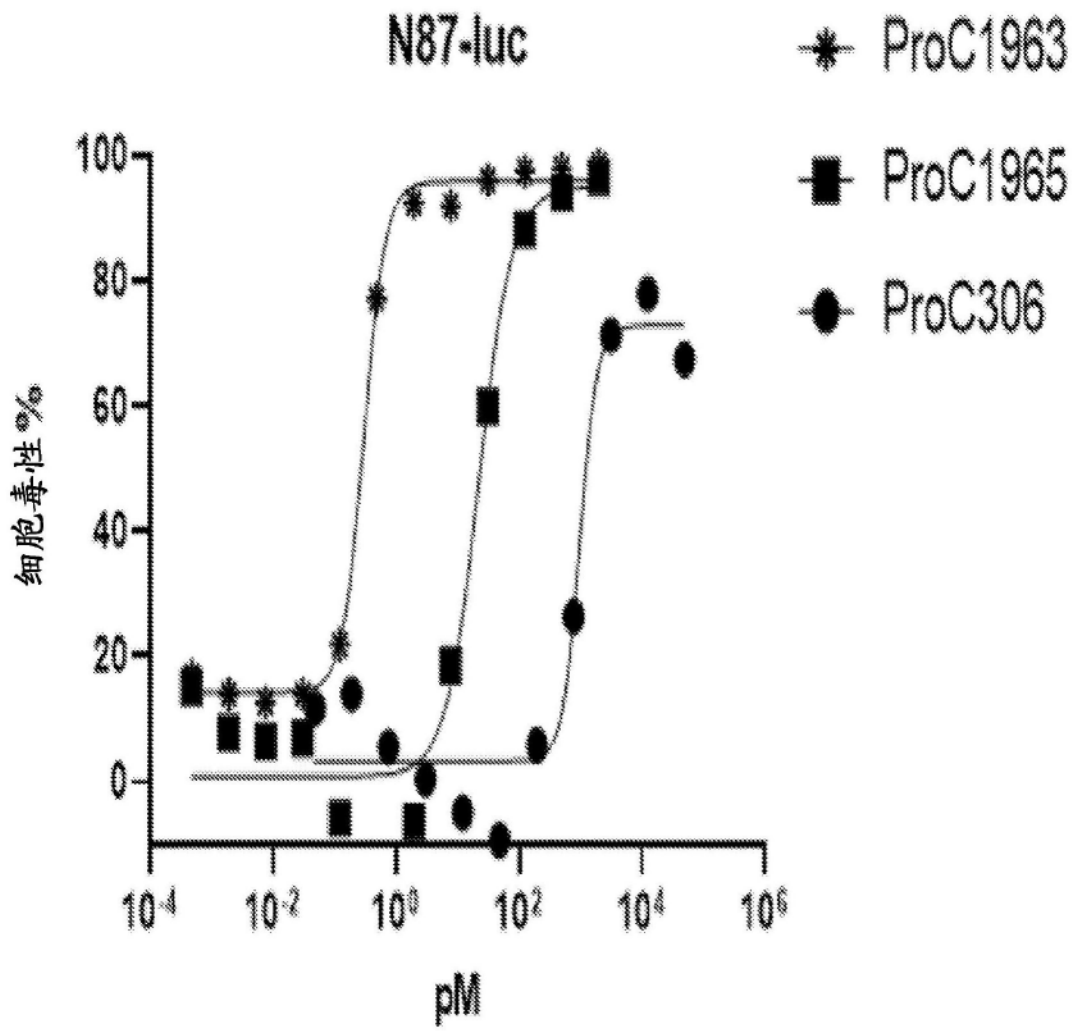

N87-luc
ProC1963
ProC1965
ProC306
细胞毒性%
100
80
60
40
20
0
10-4
10-2
100
102
104
106
pM

图14A

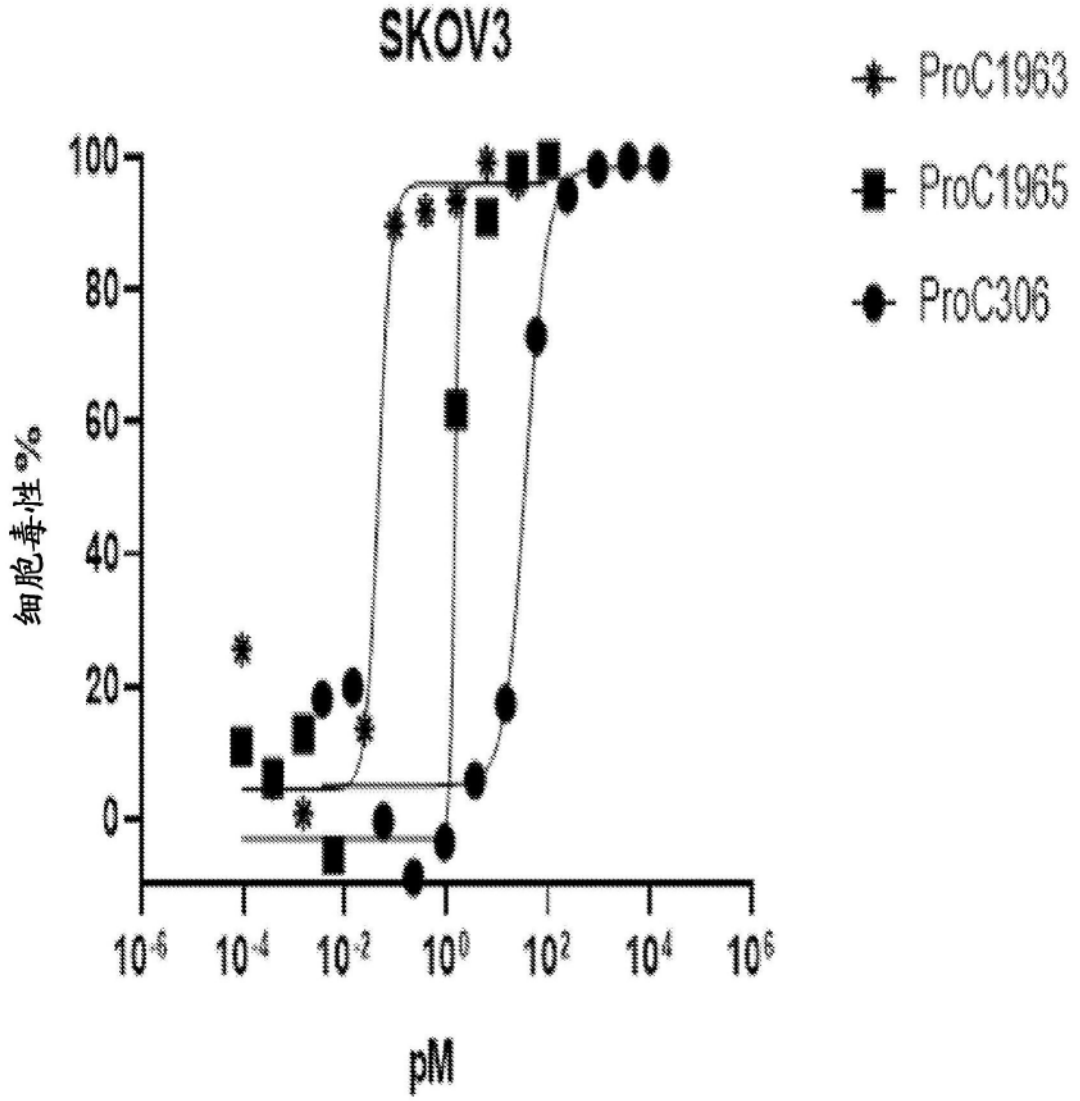

SKOV3
ProC1963
ProC1965
ProC306
细胞毒性%
100
80
60
40
20
0
10^{-6}
10^{-4}
10^{-2}
10^{0}
10^{2}
10^{4}
10^{6}
pM

图14B

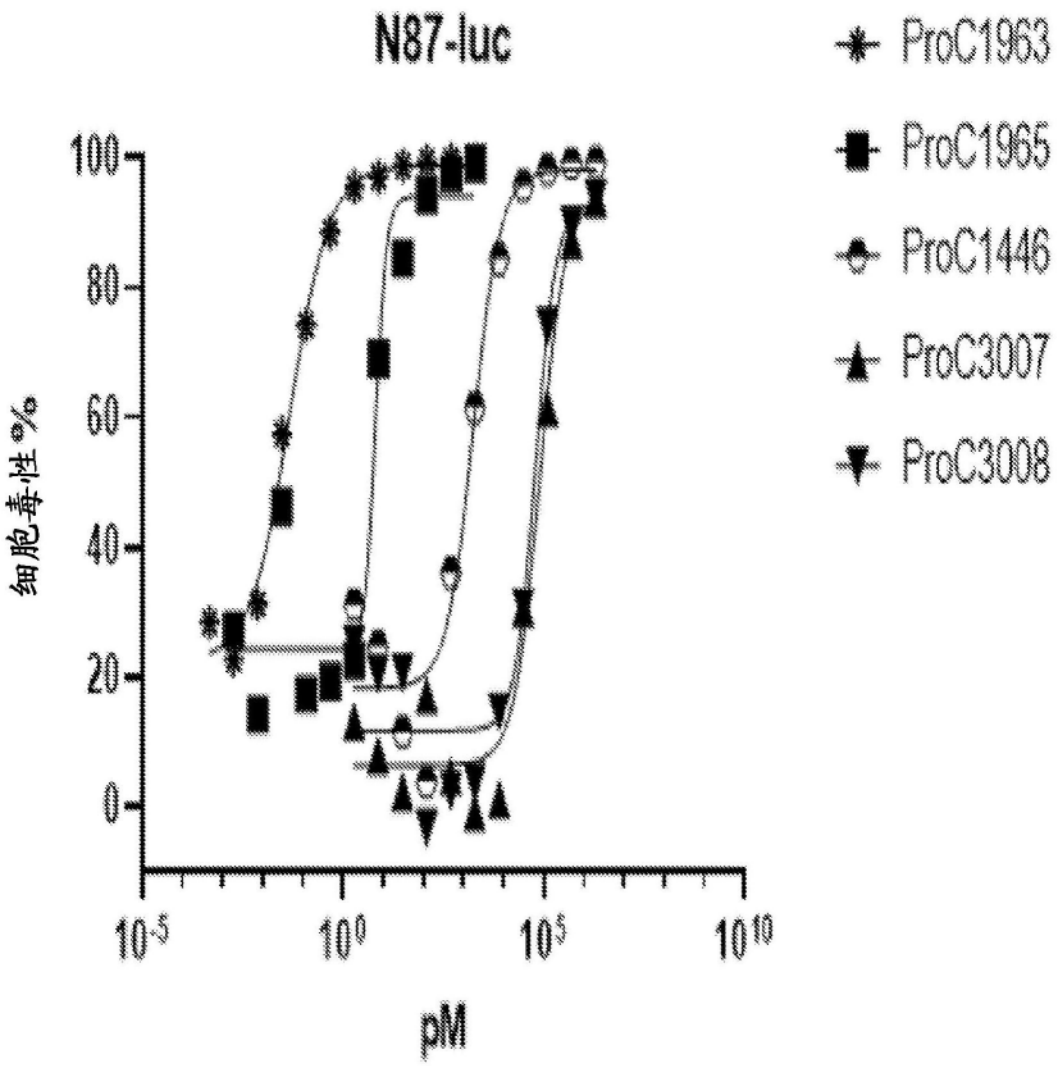

N87-luc
ProC1963
ProC1965
ProC1446
ProC3007
ProC3008
细胞毒性%
100
80
60
40
20
0
10-5
100
105
1010
pM

图15A

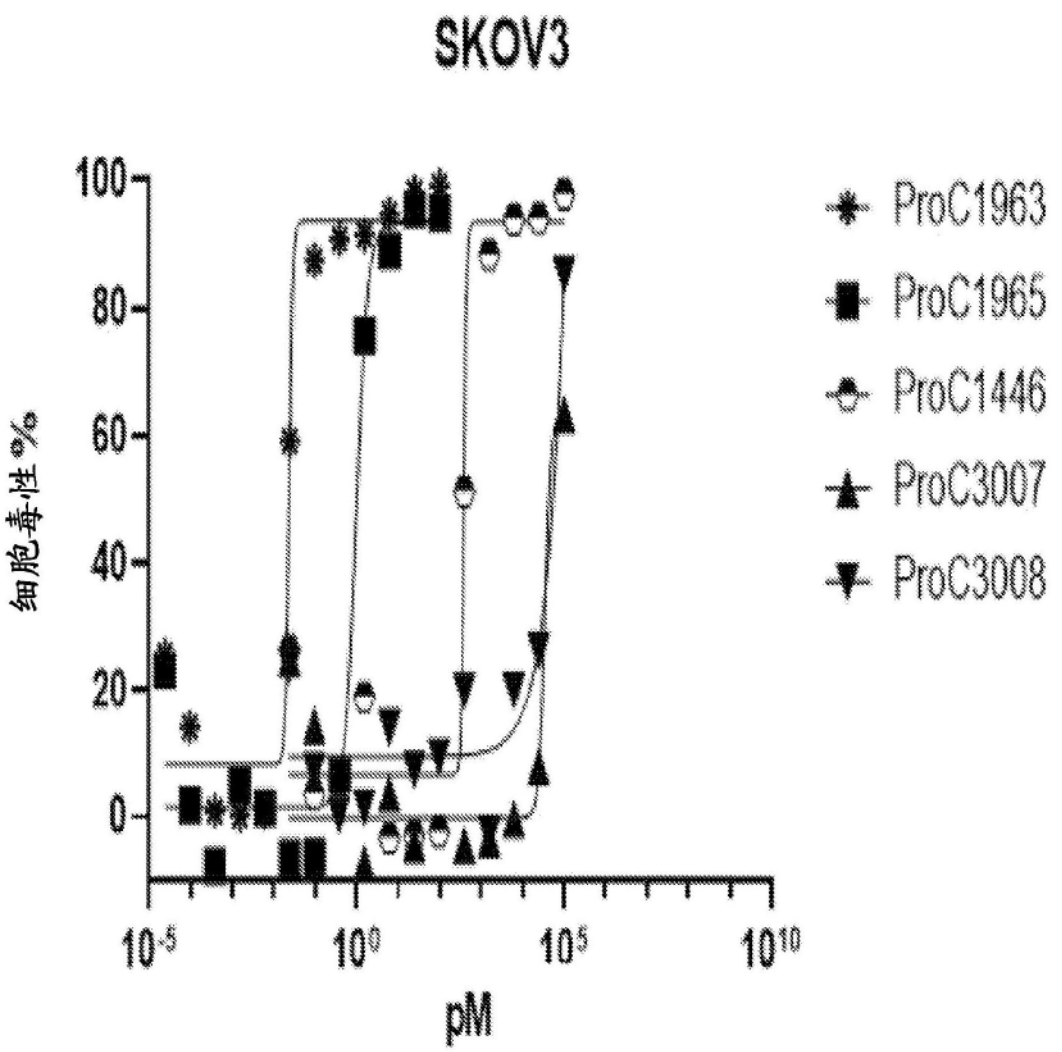

SKOV3
细胞毒性%
100
80
60
40
20
0
10^{-5}
10^{0}
10^{5}
10^{10}
pM
ProC1963
ProC1965
ProC1446
ProC3007
ProC3008

图15B

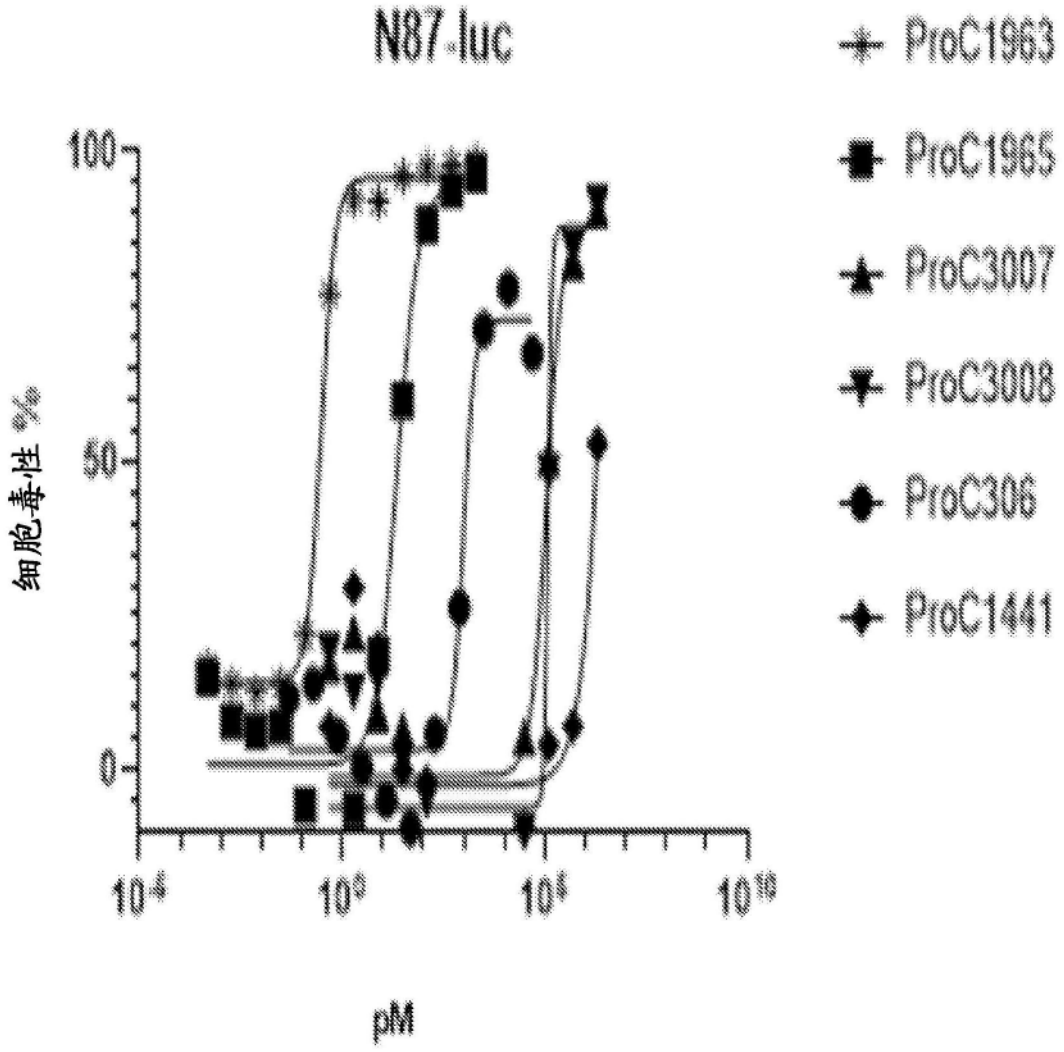

N87-luc
ProC1963
ProC1965
ProC3007
ProC3008
ProC306
ProC1441
细胞毒性 %
100
50
0
10^{-6}
10^{-3}
10^{0}
10^{3}
pM

图16A

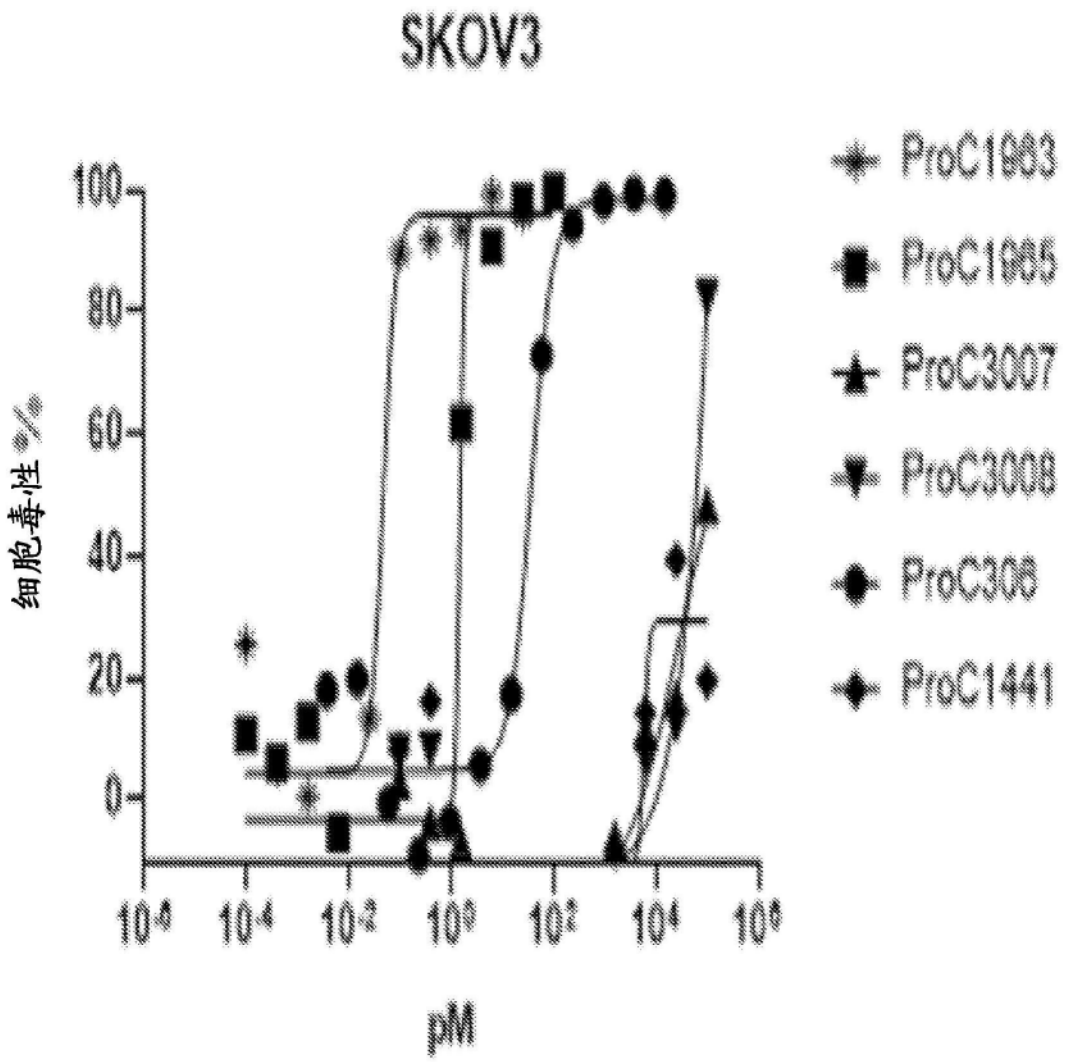

SKOV3
细胞毒性%
100
80
60
40
20
0
10-6
10-4
10-2
100
102
104
106
pM
ProC1983
ProC1985
ProC3007
ProC3008
ProC306
ProC1441

图16B

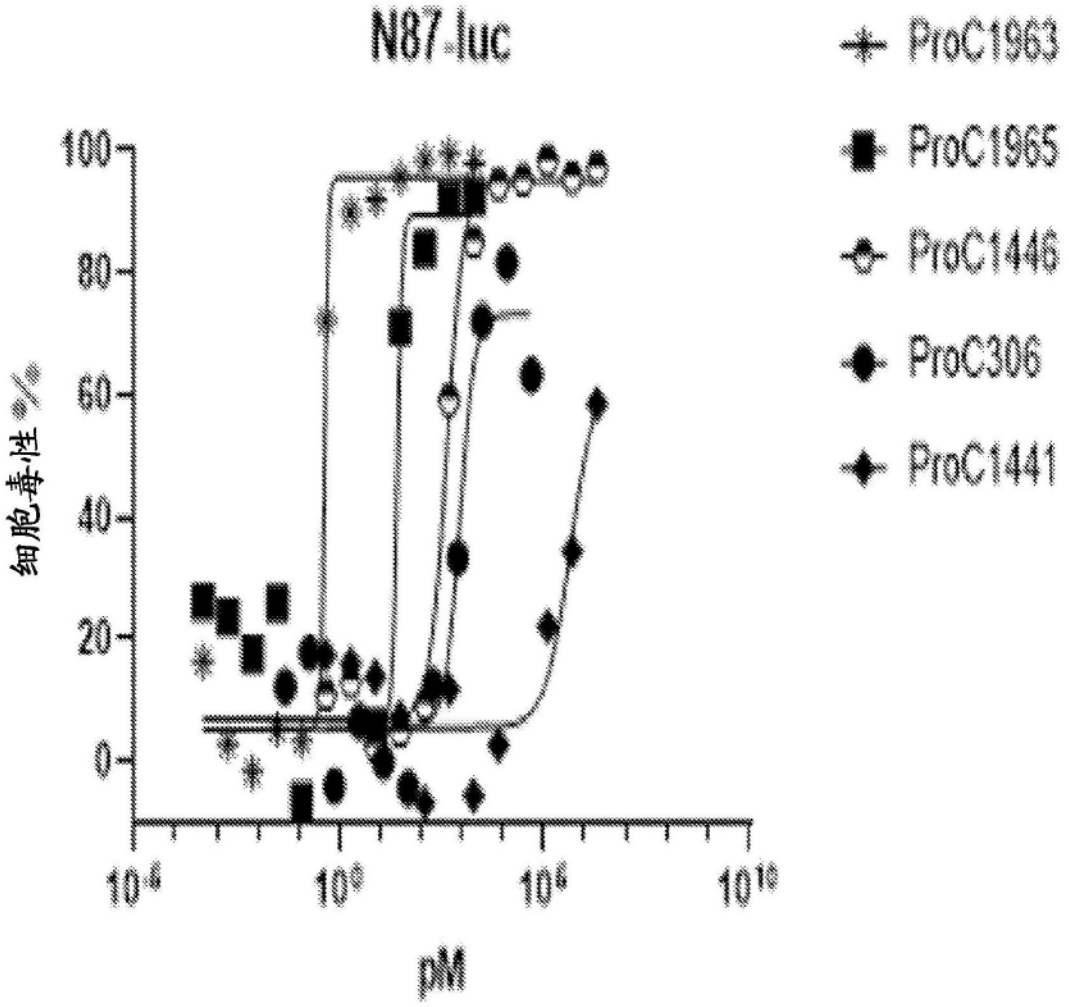

N87-luc
ProC1963
ProC1965
ProC1446
ProC306
ProC1441
细胞毒性%
100
80
60
40
20
0
10⁻⁴
10⁰
10⁶
10¹⁰
pM

图16C

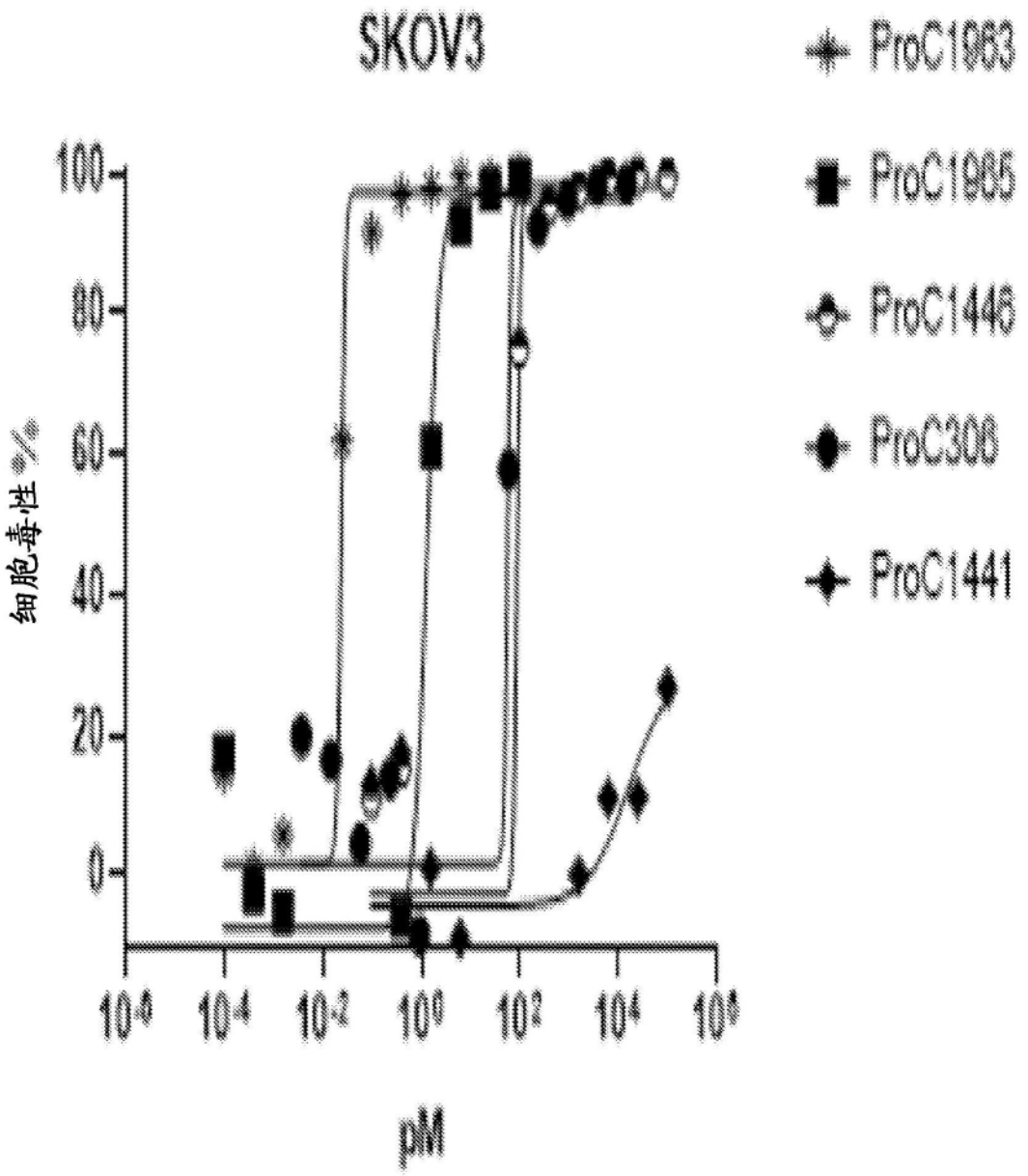

SKOV3
ProC1963
ProC1965
ProC1446
ProC308
ProC1441
细胞毒性%
100
80
60
40
20
0
10^{-6}
10^{-4}
10^{-2}
10^{0}
10^{2}
10^{4}
10^{6}
pM

图16D

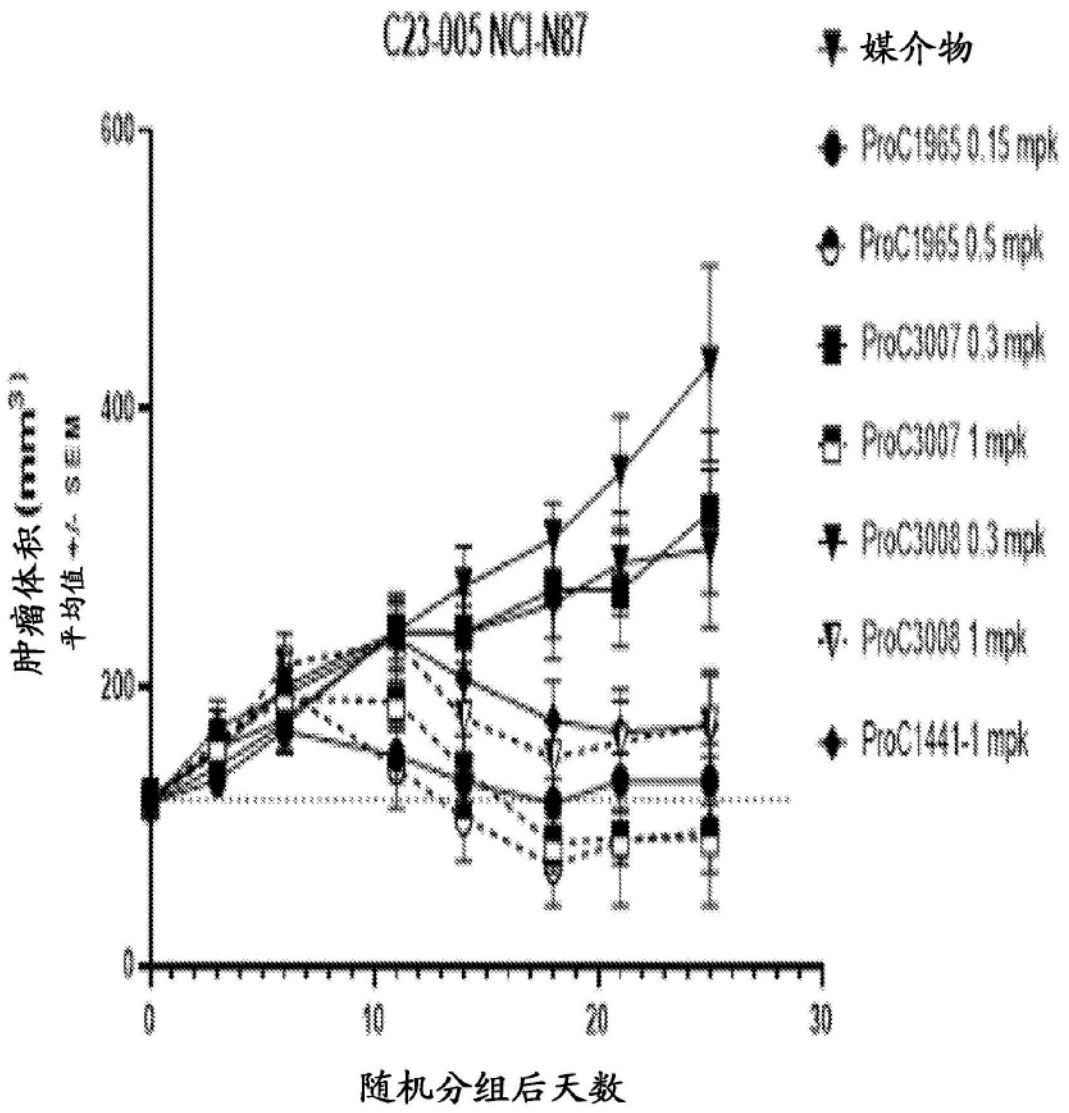

C23-005 NCI-N87
媒介物
ProC1965 0.15 mpk
ProC1965 0.5 mpk
ProC3007 0.3 mpk
ProC3007 1 mpk
ProC3008 0.3 mpk
ProC3008 1 mpk
ProC1441-1 mpk
肿瘤体积 (mm3)
平均值 +/- SEM
600
400
200
0
0
10
20
30
随机分组后天数

图17