



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118401555 A

(43) 申请公布日 2024.07.26

(21) 申请号 202280081636.6

(22) 申请日 2022.12.09

(66) 本国优先权数据

PCT/CN2021/136652 2021.12.09 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.06.07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2022/137977 2022.12.09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/104190 EN 2023.06.15

(71) 申请人 信华生物药业(广州)有限公司

地址 510000 广东省广州市黄埔区瑞发路1
号B栋5楼

(72) 发明人 张剑冰 张虹 王鲁泉

(74) 专利代理机构 北京植众德本知识产权代理
有限公司 16083

专利代理师 关巍

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

权利要求书5页 说明书36页

序列表(电子公布) 附图17页

(54) 发明名称

抗体掩蔽物及其用途

(57) 摘要

提供了用于抗体或其抗原结合片段的掩蔽肽。还提供了阻断抗体(例如,抗CD3抗体)与其靶标之间结合的多肽(例如,抗体掩蔽物)、融合蛋白和蛋白质构建体及其用途。

1. 一种蛋白质构建体,其包含:
 - a. 掩蔽肽,其包含与SEQ ID NO:3的序列或其部分具有至少80%同一性的氨基酸序列,其中所述掩蔽肽包含一个或多个氨基酸替换;和
 - b. 抗原结合域;其中所述掩蔽肽和所述抗原结合域通过接头连接。
2. 根据权利要求1所述的蛋白质构建体,其中所述掩蔽肽包含或由至少3个氨基酸(例如,来自CD3 ϵ 的N端)组成。
3. 根据权利要求1或2所述的蛋白质构建体,其中所述掩蔽肽包含或由SEQ ID NO:60-68中的任一种组成,并且其中所述掩蔽肽包含在对应于SEQ ID NO:3的第1、2或3位氨基酸的位置处的氨基酸替换。
4. 根据权利要求1-3中任一项所述的蛋白质构建体,其中所述氨基酸替换是下列之一:
 - (1) 在对应于SEQ ID NO:3的第1位氨基酸的位置处用C替换Q;
 - (2) 在对应于SEQ ID NO:3的第2位氨基酸的位置处用E、G、N或C替换D;和
 - (3) 在对应于SEQ ID NO:3的第3位氨基酸的位置处用A或R替换G。
5. 根据权利要求4所述的蛋白质构建体,其中所述氨基酸替换是下列之一:
 - (1) 在对应于SEQ ID NO:3的第2位氨基酸的位置处用E、G或N替换D;和
 - (2) 在对应于SEQ ID NO:3的第3位氨基酸的位置处用A或R替换G。
6. 根据权利要求4所述的蛋白质构建体,其中所述氨基酸替换是下列之一:
 - (1) 在对应于SEQ ID NO:3的第2位氨基酸的位置处用E或G替换D;和
 - (2) 在对应于SEQ ID NO:3的第3位氨基酸的位置处用A替换G。
7. 根据权利要求1-6中任一项所述的蛋白质构建体,其中所述掩蔽肽包含或由SEQ ID NO:60-68中的任一种组成,其中在对应于SEQ ID NO:3的第1-3位氨基酸的位置处最多有一个氨基酸替换。
8. 根据权利要求3所述的蛋白质构建体,其中所述掩蔽肽包含或由SEQ ID NO:74、76、78和80-83中的任一种组成。
9. 根据权利要求1-8中任一项所述的蛋白质构建体,其中所述接头包含约4至约18个氨基酸。
10. 根据权利要求1-9中任一项所述的蛋白质构建体,其中所述接头包含蛋白酶可切割序列。
11. 根据权利要求10所述的蛋白质构建体,其中所述蛋白酶可切割序列包含PLGL的氨基酸序列(SEQ ID NO:85)。
12. 根据权利要求11所述的蛋白质构建体,其中所述接头包含X1-PLGL-X2的氨基酸序列,其中
 - X1包含0-8个甘氨酸(G)和/或0-8个丝氨酸(S);
 - X2包含0-8个甘氨酸(G)和/或0-8个丝氨酸(S)。
13. 根据权利要求1-12中任一项所述的蛋白质构建体,其中所述接头包含或由SEQ ID NO:84-91中的任一种组成(例如,SEQ ID NO:86-91中的任一种)。
14. 根据权利要求1-13中任一项所述的蛋白质构建体,其中所述掩蔽肽和所述接头共同包含与SEQ ID NO:24、26-30、32-36和38-45中的任一种具有至少80%同一性的氨基酸序

列。

15. 根据权利要求1-14中任一项所述的蛋白质构建体,其中所述抗原结合域包含VH和VL。

16. 根据权利要求15所述的蛋白质构建体,其中所述掩蔽肽通过所述接头与所述VH(例如,所述VH的N端)连接。

17. 根据权利要求15所述的蛋白质构建体,其中所述掩蔽肽通过所述接头与所述VL(例如,所述VL的N端)连接。

18. 根据权利要求15所述的蛋白质构建体,其中所述蛋白质构建体包含两个掩蔽肽,其中所述两个掩蔽肽中的一个通过第一接头与所述VH连接,并且所述两个掩蔽肽中的另一个通过第二接头与所述VL连接。

19. 根据权利要求1-18中任一项所述的蛋白质构建体,其中所述抗原结合域包含scFv。

20. 根据权利要求1-18中任一项所述的蛋白质构建体,其中所述抗原结合域包含Fab。

21. 根据权利要求19所述的蛋白质构建体,其中所述掩蔽肽通过所述接头与所述scFv(例如,scFv的N端)连接。

22. 根据权利要求1-18中任一项所述的蛋白质构建体,其中所述抗原结合域包含VHH。

23. 根据权利要求22所述的蛋白质构建体,其中所述掩蔽肽通过所述接头与所述VHH(例如,VHH的N端)连接。

24. 根据权利要求1-23中任一项所述的蛋白质构建体,其中所述抗原结合域与CD3特异性结合。

25. 根据权利要求1-24中任一项所述的蛋白质构建体,其中所述抗原结合域与SEQ ID NO:60-68中任一种的一个或多个表位特异性结合。

26. 根据权利要求1-25中任一项所述的蛋白质构建体,其中所述蛋白质构建体进一步包含与肿瘤相关抗原特异性结合的抗原结合域。

27. 根据权利要求26所述的蛋白质构建体,其中所述肿瘤相关抗原是癌胚抗原细胞黏附分子5(CEACAM5)。

28. 一种蛋白质构建体,其包含:

(1) 第一部分,其包含掩蔽肽,所述掩蔽肽包含与SEQ ID NO:3的序列或其部分具有至少80%同一性的氨基酸序列,其中所述掩蔽肽包含一个或多个氨基酸替换;

(2) 第二部分,其与CD3特异性结合;和

(3) 第三部分,其与特肿瘤相关抗原异性结合,

其中所述第一部分和所述第二部分通过接头连接。

29. 根据权利要求28所述的蛋白质构建体,其中所述掩蔽肽包含或由至少3个氨基酸(例如,来自CD3:的N端)组成。

30. 根据权利要求28或29所述的蛋白质构建体,其中所述掩蔽肽包含或由SEQ ID NO:60-68中的任一种组成,并且其中所述掩蔽肽包含在对应于SEQ ID NO:3的第1、2或3位氨基酸的位置处的氨基酸替换。

31. 根据权利要求28-30中任一项所述的蛋白质构建体,其中所述氨基酸替换是下列之一:

(1) 在对应于SEQ ID NO:3的第1位氨基酸的位置处用C替换Q;

(2) 在对应于SEQ ID NO:3的第2位氨基酸的位置处用N、E、G或C替换D;和

(3) 在对应于SEQ ID NO:3的第3位氨基酸的位置处用A或R替换G。

32. 根据权利要求31所述的蛋白质构建体,其中所述氨基酸替换是下列之一:

(1) 在对应于SEQ ID NO:3的第2位氨基酸的位置处用E、G或N替换D;和

(2) 在对应于SEQ ID NO:3的第3位氨基酸的位置处用A或R替换G。

33. 根据权利要求31所述的蛋白质构建体,其中所述氨基酸替换是下列之一:

(1) 在对应于SEQ ID NO:3的第2位氨基酸的位置处用E或G替换D;和

(2) 在对应于SEQ ID NO:3的第3位氨基酸的位置处用A替换G。

34. 根据权利要求28-33中任一项所述的蛋白质构建体,其中所述掩蔽肽包含或由SEQ ID NO:74、76、78和80-83中的任一种组成。

35. 根据权利要求28-34中任一项所述的蛋白质构建体,其中所述接头包含蛋白酶可切割序列。

36. 根据权利要求35所述的蛋白质构建体,其中所述蛋白酶可切割序列包含PLGL的氨基酸序列(SEQ ID NO:85)。

37. 根据权利要求36所述的蛋白质构建体,其中所述接头包含X1-PLGL-X2的氨基酸序列,其中

X1包含0-8个甘氨酸(G)和/或0-8个丝氨酸(S);

X2包含0-8个甘氨酸(G)和/或0-8个丝氨酸(S)。

38. 根据权利要求28-37中任一项所述的蛋白质构建体,其中所述接头包含或由SEQ ID NO:84-91中的任一种组成(例如,SEQ ID NO:86-91中的任一种)。

39. 根据权利要求28-38中任一项所述的蛋白质构建体,其中所述第二部分包含抗体或其抗原结合片段。

40. 根据权利要求28-39中任一项所述的蛋白质构建体,其中所述第二部分包含抗体的抗原结合片段。

41. 根据权利要求28-39中任一项所述的蛋白质构建体,其中所述第二部分包含VHH。

42. 根据权利要求28-41中任一项所述的蛋白质构建体,其中所述第三部分包含抗体或其抗原结合片段。

43. 根据权利要求28-42中任一项所述的蛋白质构建体,其中所述第三部分包含抗体的抗原结合片段。

44. 根据权利要求28-42中任一项所述的蛋白质构建体,其中所述第三部分包含VHH。

45. 根据权利要求28-44中任一项所述的蛋白质构建体,其中所述肿瘤相关抗原选自: CD2、CD4、CD19、CD20、CD22、CD23、CD30、CD33、CD37、CD40、CD44v6、CD52、CD56、CD70、CD74、CD79a、CD80、CD98、CD138、EGFR(表皮生长因子受体)、VEGF(血管内皮生长因子)、VEGFR1(血管内皮生长因子受体1)、PDGFR(血小板衍生生长因子受体)、RANKL(核因子 κ -B配体的受体激活剂)、GPNMB(跨膜糖蛋白神经调节肽B)、EphA2(Ephrin A型受体2)、PSMA(前列腺特异性膜抗原)、Cripto(Cryptic家族蛋白1B)、EpCAM(上皮细胞黏附分子)、CTLA4(细胞毒性T淋巴细胞抗原4)、IGF-1R(1型胰岛素样生长因子受体)、GP3(M13噬菌体)、GP9(糖蛋白IX)、CD42a、GP 40(糖蛋白40kDa)、GPC3(磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3)、GPC1(磷脂酰肌醇蛋白聚糖-1)、TRAILR1(肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体受体1)、TRAILRII(肿瘤坏死因子相关凋亡诱

导配体受体II)、FAS(II型跨膜蛋白)、PS(磷脂酰丝氨酸)脂质、Muc1(黏蛋白1,PEM)、Muc18、CD146、 $\alpha 5\beta 1$ 整合素、 $\alpha 4\beta 1$ 整合素、 αv 整合素(玻连蛋白受体)、软骨凝集素、CAIX(碳酸酐酶IX)、GD2神经节苷脂、GD3神经节苷脂、GM1神经节苷脂、Lewis Y抗原、间皮素、HER2(人表皮生长因子2)、HER3、HER4、FN14(成纤维细胞生长因子诱导14)、CS1(细胞表面糖蛋白,CD2亚类1、CRACC、SLAMF7、CD319)、41BB CD137、SIP(Siah-1相互作用蛋白)、CTGF(结缔组织生长因子)、HLADR(MHC II类细胞表面受体)、PD-1(程序性死亡1,I型膜蛋白)、PD-L1(程序性死亡配体1)、PD-L2(程序性死亡配体2)、IL-2(白细胞介素-2)、IL-8(白细胞介素-8)、IL-13(白细胞介素-13)、PIGF(磷脂酰肌醇-聚糖生物合成F类蛋白)、NRP1(神经纤毛蛋白-1)、ICAM1、CD54、GC182(密封蛋白18.2)、密封蛋白、HGF(肝细胞生长因子)、CEA(癌胚抗原)、LT β R(淋巴细胞素 β 受体)、 κ 骨髓瘤、叶酸受体 α 、GRP78(BIP,78kDa葡萄糖调节蛋白)、A33抗原、PSA(前列腺特异性抗原)、CA125(癌症抗原125或碳水化合物抗原125)、CA19.9、CA15.3、CA242、瘦素、催乳素、骨桥蛋白、IGF-II(胰岛素样生长因子2)、肌成束蛋白、sPIgR(多态免疫球蛋白受体的分泌链)、14-3-3 η 蛋白、5T4、ETA(上皮肿瘤抗原)、MAGE(黑色素瘤相关抗原)、MAPG(黑色素瘤相关蛋白多糖、NG2)、波形蛋白、EPCA-1(早期前列腺癌抗原-2)、TAG-72(肿瘤相关糖蛋白72)、因子VIII、脑啡肽酶(膜金属内肽酶)、17-1A(上皮细胞表面抗原17-1A)、核仁蛋白、核仁磷蛋白、及其任意组合。

46. 根据权利要求45所述的蛋白质构建体,其中所述肿瘤相关抗原是癌胚抗原细胞黏附分子5(CEACAM5)。

47. 根据权利要求28-46中任一项所述的蛋白质构建体,其中所述第二部分与第一CH2结构域和第一CH3结构域连接。

48. 根据权利要求47所述的蛋白质构建体,其中所述第二部分通过IgG铰链区与所述第一CH2结构域和所述第一CH3结构域连接。

49. 根据权利要求28-48中任一项所述的蛋白质构建体,其中所述第三部分与第二CH2结构域和第二CH3结构域连接。

50. 根据权利要求49所述的蛋白质构建体,其中所述第三部分通过IgG铰链区与所述第二CH2结构域和所述第二CH3结构域连接。

51. 根据权利要求49或50所述的蛋白质构建体,其中所述第一和所述第二CH3结构域具有一个或多个杵臼结构突变。

52. 一种多核苷酸,其编码权利要求1-51中任一项所述蛋白质构建体。

53. 一种载体,其包含权利要求52所述多核苷酸。

54. 一种细胞,其包含权利要求53所述载体。

55. 一种生产蛋白质构建体的方法,所述方法包括

- (a) 在足以使细胞产生所述蛋白质构建体的条件下培养权利要求54所述的细胞;和
- (b) 收集所述细胞产生的所述蛋白质构建体。

56. 在受试者中诱导或激活T细胞免疫的方法,其包括向所述受试者施用有效量的权利要求1-51中任一项所述的蛋白质构建体。

57. 根据权利要求56所述的方法,其中所述T细胞免疫在切割所述接头的蛋白酶可切割结构域之后被诱导或激活。

58. 根据权利要求57所述的方法,其中所述接头在富含蛋白酶活性的位点处被切割。

59. 根据权利要求58所述的方法,其中所述富含蛋白酶活性的位点是肿瘤微环境。

60. 根据权利要求57-59中任一项所述的方法,其中所述蛋白酶为MMP9。

61. 在受试者中抑制肿瘤生长的方法,其包括向所述受试者施用有效量的权利要求1-51中任一项所述的蛋白质构建体。

62. 在受试者中治疗癌症的方法,其包括向所述受试者施用有效量的权利要求1-51中任一项所述的蛋白质构建体。

63. 根据权利要求56-62中任一项所述的方法,其进一步包括向所述受试者施用另外的治疗剂。

64. 一种掩蔽肽,其包含:

$X_1X_2X_3NE$ (SEQ ID NO:92) 或 $X_1X_2X_3NEE$ (SEQ ID NO:93),

其中

X_1 为Q或C;

X_2 为D、E、G、N或C;并且

X_3 为G、A或R。

65. 根据权利要求64所述的掩蔽肽,其中

X_1 为Q;

X_2 为D、E、G或N;并且

X_3 为G、A或R。

66. 根据权利要求64所述的掩蔽肽,其中

X_1 为Q;

X_2 为D、E或G;并且

X_3 为G或A。

67. 根据权利要求64-66中任一项所述的掩蔽肽,其中所述掩蔽肽中的 $X_1X_2X_3NE$ (SEQ ID NO:92) 或 $X_1X_2X_3NEE$ (SEQ ID NO:93) 与QDGNE (SEQ ID NO:60) 或QDGNEE (SEQ ID NO:68) 不同。

68. 根据权利要求64-67中任一项所述的掩蔽肽,其中所述掩蔽肽中的 $X_1X_2X_3$ 与QDG有一个氨基酸的不同。

抗体掩蔽物及其用途

技术领域

[0001] 本公开内容涉及阻断抗体(例如,抗CD3抗体)与其靶标之间结合的多肽(例如,抗体掩蔽物(antibody mask))、融合蛋白和蛋白质构建体及其用途。

背景技术

[0002] 利用免疫细胞(尤其是T细胞)的能力来增强抗肿瘤活性已经成为疾病和癌症(例如血液恶性肿瘤)临床管理中的有前景的策略。

[0003] T细胞衔接器(T-cell engager, TCE)是这样的蛋白质,其通过与肿瘤细胞上的靶抗原和T细胞上的分子(例如,CD3)同时结合来形成不依赖于TCR的人工免疫突触并绕过HLA限制。最早使用CD3结合抗体以激活T细胞的尝试可以追溯到20世纪80年代中期,当时对于抗CD3的异聚集体(来自OKT3杂交瘤的T3)的研究显示出了抗癌细胞毒性(例如,参见Perez Pet al., Specific lysis of human tumor cells by T cells coated with anti-T3 cross-linked to anti-tumor antibody. J Immunol Oct. (1986) 137:2069-72)。首次发表关于双特异性TCE描述的是由Clark和Waldmann生成的大鼠同型杂合体(例如,参见Clark MR et al., T-cell killing of target cells induced by hybrid antibodies: comparison of two bispecific monoclonal antibodies. J Natl Cancer Inst. (1987) 79:1393-401),他们证明了对TH-1细胞的靶向杀伤。在对双特异性抗体的临床开发在很大程度上因为产生并发症陷入停滞之后,该领域见证了一系列双特异性T细胞衔接器在临床上的成功。

[0004] 虽然这些早期研究显示出了富有前景的临床疗效,但它们也受到严重的剂量限制性毒性的影响,主要表现为非肿瘤靶向毒性(on-target-off-tumor toxicity, OTOT)和细胞因子释放综合征(cytokine release syndrome, CRS)。这导致了治疗窗口过窄,而这很大程度上是由于所使用的抗CD3结合域。因此,需要更有效的疗法,尤其是具有良好功效但毒性较低的双特异性疗法。

发明内容

[0005] 本公开内容提供了阻断抗体(例如,抗CD3抗体)与其靶标结合的多肽(例如,抗体掩蔽物)、以及融合蛋白和蛋白质构建体,并且还提供了诱导T细胞免疫和治疗癌症的方法。

[0006] 一方面,本公开内容涉及一种蛋白质构建体,其包含:a.掩蔽肽(masking peptide),其包含与SEQ ID NO:3的序列或其部分具有至少80%同一性的氨基酸序列,其中所述掩蔽肽包含一个或多个氨基酸替换;和b.抗原结合域;其中所述掩蔽肽和所述抗原结合域通过接头(linker)连接。

[0007] 在一些实施方案中,所述掩蔽肽包含或由至少3个氨基酸组成(例如,来自CD3:的N端)。

[0008] 在一些实施方案中,所述掩蔽肽包含或由SEQ ID NO:60-68中的任一种组成,并且其中所述掩蔽肽包含在对应于SEQ ID NO:3的第1、2或3位氨基酸的位置处的氨基酸替换。

- [0009] 在一些实施方案中,所述氨基酸替换是下列之一:
- [0010] (1) 在对应于SEQ ID NO:3的第1位氨基酸的位置处用C替换Q;
- [0011] (2) 在对应于SEQ ID NO:3的第2位氨基酸的位置处用E、G、N或C替换D;和
- [0012] (3) 在对应于SEQ ID NO:3的第3位氨基酸的位置处用A或R替换G。
- [0013] 在一些实施方案中,所述氨基酸替换是下列之一:
- [0014] (1) 在对应于SEQ ID NO:3的第2位氨基酸的位置处用E、G或N替换D;和
- [0015] (2) 在对应于SEQ ID NO:3的第3位氨基酸的位置处用A或R替换G。
- [0016] 在一些实施方案中,所述氨基酸替换是下列之一:
- [0017] (1) 在对应于SEQ ID NO:3的第2位氨基酸的位置处用E或G替换D;和
- [0018] (2) 在对应于SEQ ID NO:3的第3位氨基酸的位置处用A替换G。
- [0019] 在一些实施方案中,所述掩蔽肽包含或由SEQ ID NO:60-68中的任一种组成,其中在对应于SEQ ID NO:3的第1-3位氨基酸的位置处最多有一个氨基酸替换。
- [0020] 在一些实施方案中,所述掩蔽肽包含或由SEQ ID NO:74、76、78和80-83中的任一种组成。
- [0021] 在一些实施方案中,所述接头包含约4至约18个氨基酸。在一些实施方案中,所述接头包含蛋白酶可切割序列(tease cleavable sequence)。在一些实施方案中,所述蛋白酶可切割序列包含PLGL的氨基酸序列(SEQ ID NO:85)。
- [0022] 在一些实施方案中,所述接头包含X1-PLGL-X2的氨基酸序列,其中X1包含0-8个甘氨酸(G)和/或0-8个丝氨酸(S);X2包含0-8个甘氨酸(G)和/或0-8个丝氨酸(S)。
- [0023] 在一些实施方案中,所述接头包含或由SEQ ID NO:84-91中的任一种组成(如SEQ ID NO:86-91中的任一种)。
- [0024] 在一些实施方案中,所述掩蔽肽和接头共同包含与SEQ ID NO:24、26-30、32-36和38-45中的任一种具有至少80%同一性的氨基酸序列。
- [0025] 在一些实施方案中,所述抗原结合域包含VH和VL。在一些实施方案中,所述掩蔽肽通过接头与VH(例如,VH的N端)连接。在一些实施方案中,所述掩蔽肽通过接头与VL(例如,VL的N端)连接。
- [0026] 在一些实施方案中,所述蛋白质构建体包含两个掩蔽肽,其中所述两个掩蔽肽中的一个通过第一接头与VH连接,并且所述两个掩蔽肽中的另一个通过第二接头与VL连接。
- [0027] 在一些实施方案中,所述抗原结合域包含scFv。在一些实施方案中,所述抗原结合域包含Fab。在一些实施方案中,所述掩蔽肽通过接头与scFv(例如,scFv的N端)连接。
- [0028] 在一些实施方案中,所述抗原结合域包含VHH。在一些实施方案中,所述掩蔽肽通过接头与VHH(例如,VHH的N端)连接。
- [0029] 在一些实施方案中,所述抗原结合域与CD3特异性结合。在一些实施方案中,所述抗原结合域与SEQ ID NO:60-68中任一种的一个或多个表位特异性结合。
- [0030] 在一些实施方案中,所述蛋白质构建体进一步包含与肿瘤相关抗原特异性结合的抗原结合域。在一些实施方案中,所述肿瘤相关抗原是癌胚抗原细胞黏附分子5(carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 5,CEACAM5)。
- [0031] 一方面,本公开内容涉及一种蛋白质构建体,其包含:(1)第一部分,其包含掩蔽肽,所述掩蔽肽包含与SEQ ID NO:3的序列或其部分具有至少80%同一性的氨基酸序列,其

中所述掩蔽肽包含一个或多个氨基酸替换；(2) 第二部分,其与CD3特异性结合；和(3) 第三部分,其与肿瘤相关抗原特异性结合,其中第一部分和第二部分通过接头连接。

[0032] 在一些实施方案中,所述掩蔽肽包含或由至少3个氨基酸组成(例如,来自CD3的N端)。

[0033] 在一些实施方案中,所述掩蔽肽包含或由SEQ ID NO:60-68中的任一种组成,并且其中所述掩蔽肽包含在对应于SEQ ID NO:3的第1、2或3位氨基酸的位置处的氨基酸替换。

[0034] 在一些实施方案中,所述氨基酸替换是下列之一:

[0035] (1) 在对应于SEQ ID NO:3的第1位氨基酸的位置处用C替换Q;

[0036] (2) 在对应于SEQ ID NO:3的第2位氨基酸的位置处用N、E、G或C替换D;和

[0037] (3) 在对应于SEQ ID NO:3的第3位氨基酸的位置处用A或R替换G。

[0038] 在一些实施方案中,所述氨基酸替换是下列之一:

[0039] (1) 在对应于SEQ ID NO:3的第2位氨基酸的位置处用E、G或N替换D;和

[0040] (2) 在对应于SEQ ID NO:3的第3位氨基酸的位置处用A或R替换G。

[0041] 在一些实施方案中,所述氨基酸替换是下列之一:

[0042] (1) 在对应于SEQ ID NO:3的第2位氨基酸的位置处用E或G替换D;和

[0043] (2) 在对应于SEQ ID NO:3的第3位氨基酸的位置处用A替换G。

[0044] 在一些实施方案中,所述掩蔽肽包含或由SEQ ID NO:74、76、78和80-83中的任一种组成。

[0045] 在一些实施方案中,所述接头包含蛋白酶可切割序列。在一些实施方案中,所述蛋白酶可切割序列包含PLGL的氨基酸序列(SEQ ID NO:85)。在一些实施方案中,所述接头包含X1-PLGL-X2的氨基酸序列,其中X1包含0-8个甘氨酸(G)和/或0-8个丝氨酸(S);X2包含0-8个甘氨酸(G)和/或0-8个丝氨酸(S)。在一些实施方案中,所述接头包含或由SEQ ID NO:84-91中的任一种组成(如SEQ ID NO:86-91中的任一种)

[0046] 在一些实施方案中,所述第二部分包含抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述第二部分包含抗体的抗原结合片段。在一些实施方案中,所述第二部分包含VHH。在一些实施方案中,所述第三部分包含抗体或其抗原结合片段。

[0047] 在一些实施方案中,所述第三部分包含抗体的抗原结合片段。在一些实施方案中,所述第三部分包含VHH。

[0048] 在一些实施方案中,所述肿瘤相关抗原选自:CD2、CD4、CD19、CD20、CD22、CD23、CD30、CD33、CD37、CD40、CD44v6、CD52、CD56、CD70、CD74、CD79a、CD80、CD98、CD138、EGFR(表皮生长因子受体)、VEGF(血管内皮生长因子)、VEGFR1(血管内皮生长因子受体1)、PDGFR(血小板衍生生长因子受体)、RANKL(核因子 κ -B配体的受体激活剂)、GPNMB(跨膜糖蛋白神经调节肽B)、EphA2(Ephrin A型受体2)、PSMA(前列腺特异性膜抗原)、Cripto(Cryptic家族蛋白1B)、EpCAM(上皮细胞黏附分子)、CTLA4(细胞毒性T淋巴细胞抗原4)、IGF-IR(1型胰岛素样生长因子受体)、GP3(M13噬菌体)、GP9(糖蛋白IX)、CD42a、GP 40(糖蛋白40kDa)、GPC3(磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3)、GPC1(磷脂酰肌醇蛋白聚糖-1)、TRAILR1(肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体受体1)、TRAILRII(肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体受体II)、FAS(II型跨膜蛋白)、PS(磷脂酰丝氨酸)脂质、Muc1(黏蛋白1,PEM)、Muc18、CD146、 α 5 β 1整合素、 α 4 β 1整合素、 α v整合素(玻连蛋白受体)、软骨凝集素、CAIX(碳酸酐酶IX)、GD2神经节苷脂、GD3神经节苷脂、GM1

神经节苷脂、Lewis Y抗原、间皮素、HER2(人表皮生长因子2)、HER3、HER4、FN14(成纤维细胞生长因子诱导14)、CS1(细胞表面糖蛋白,CD2亚类1、CRACC、SLAMF7、CD319)、41BB CD137、SIP(Siah-1相互作用蛋白)、CTGF(结缔组织生长因子)、HLADR(MHC II类细胞表面受体)、PD-1(程序性死亡1,I型膜蛋白)、PD-L1(程序性死亡配体1)、PD-L2(程序性死亡配体2)、IL-2(白细胞介素-2)、IL-8(白细胞介素-8)、IL-13(白细胞介素-13)、PIGF(磷脂酰肌醇-聚糖生物合成F类蛋白)、NRP1(神经纤毛蛋白-1)、ICAM1、CD54、GC182(密封蛋白18.2)、密封蛋白、HGF(肝细胞生长因子)、CEA(癌胚抗原)、LT β R(淋巴细胞素 β 受体)、 κ 骨髓瘤、叶酸受体 α 、GRP78(BIP,78kDa葡萄糖调节蛋白)、A33抗原、PSA(前列腺特异性抗原)、CA125(癌症抗原125或碳水化合物抗原125)、CA19.9、CA15.3、CA242、瘦素、催乳素、骨桥蛋白、IGF-II(胰岛素样生长因子2)、肌成束蛋白(fascin)、sPIgR(多态免疫球蛋白受体的分泌链)、14-3-3eta蛋白、5T4、ETA(上皮肿瘤抗原)、MAGE(黑色素瘤相关抗原)、MAPG(黑色素瘤相关蛋白多糖、NG2)、波形蛋白、EPCA-1(早期前列腺癌抗原-2)、TAG-72(肿瘤相关糖蛋白72)、因子VIII、脑啡肽酶(膜金属内肽酶)、17-1A(上皮细胞表面抗原17-1A)、核仁蛋白、核仁磷蛋白、及其任意组合。

[0049] 在一些实施方案中,所述肿瘤相关抗原是癌胚抗原细胞黏附分子5(CEACAM5)。在一些实施方案中,所述第二部分与第一CH2结构域和第一CH3结构域连接。

[0050] 在一些实施方案中,所述第二部分通过IgG铰链区与第一CH2结构域和第一CH3结构域连接。在一些实施方案中,所述第三部分与第二CH2结构域和第二CH3结构域连接。

[0051] 在一些实施方案中,所述第三部分通过IgG铰链区与第二CH2结构域和第二CH3结构域连接。在一些实施方案中,所述第一和第二CH3结构域具有一个或多个杵臼结构(knobs-into-holes)突变。

[0052] 一方面,本公开内容涉及一种编码本文所述任意蛋白质构建体的多核苷酸。

[0053] 一方面,本公开内容涉及一种包含本文所述多核苷酸的载体。

[0054] 一方面,本公开内容涉及一种包含本文所述载体的细胞。

[0055] 一方面,本公开内容涉及一种生产蛋白质构建体的方法,所述方法包括(a)在足以使细胞产生蛋白质构建体的条件下培养本文所述的细胞;和(b)收集细胞产生的蛋白质构建体。

[0056] 一方面,本公开内容涉及在受试者中诱导或激活T细胞免疫的方法,其包括向受试者施用有效量的本文所述任一种蛋白质构建体。

[0057] 在一些实施方案中,所述T细胞免疫在切割接头的蛋白酶可切割结构域之后被诱导或激活。

[0058] 在一些实施方案中,所述接头在富含蛋白酶活性的位点处被切割。

[0059] 在一些实施方案中,所述富含蛋白酶活性的位点是肿瘤微环境。在一些实施方案中,所述蛋白酶为MMP9。

[0060] 一方面,本公开内容涉及在受试者中抑制肿瘤生长的方法,其包括向受试者施用有效量的本文所述任一种蛋白质构建体。

[0061] 一方面,本公开内容涉及在受试者中治疗癌症的方法,其包括向受试者施用有效量的本文所述任一种蛋白质构建体。

[0062] 在一些实施方案中,本文所述方法进一步包括向受试者施用另外的治疗剂。

[0063] 一方面,本公开内容涉及一种掩蔽肽,其包含:

[0064] $X_1X_2X_3NE$ (SEQ ID NO:92) 或 $X_1X_2X_3NEE$ (SEQ ID NO:93), 其中 X_1 为 Q 或 C; X_2 为 D、E、G、N 或 C; 和 X_3 为 G、A 或 R。在一些实施方案中, X_1 为 Q; X_2 为 D、E、G 或 N; 和 X_3 为 G、A 或 R。在一些实施方案中, X_1 为 Q; X_2 为 D、E 或 G; 和 X_3 为 G 或 A。在一些实施方案中,掩蔽肽中的 $X_1X_2X_3NE$ (SEQ ID NO:92) 或 $X_1X_2X_3NEE$ (SEQ ID NO:93) 与 QDGNE (SEQ ID NO 60) 或 QDGNEE (SEQ ID NO:68) 不同。在一些实施方案中,掩蔽肽中的 $X_1X_2X_3$ 与 QDG 有一个氨基酸的不同。

[0065] 一方面,本公开内容涉及一种蛋白质构建体,其包含:(a) 掩蔽肽,其包含与 SEQ ID NO:3 的序列或其部分具有至少 80% 同一性的氨基酸序列;和 (b) 抗原结合域;其中掩蔽肽和抗原结合域通过接头连接。

[0066] 在一些实施方案中,所述掩蔽肽包含或由至少 3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸组成(例如,来自 CD3e 的 N 端)。

[0067] 在一些实施方案中,所述掩蔽肽包含或由 SEQ ID NO:60-68 中的任一种组成,

[0068] 在一些实施方案中,所述掩蔽肽包含或由含有一个或多个氨基酸替换的 SEQ ID NO:60-68 中的任一种组成。

[0069] 在一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸替换包含下列一种或多种:(1) 在对应于 SEQ ID NO:3 的第 1 位氨基酸的位置处用 E、S、Y、H 或 V 替换 Q; (2) 在对应于 SEQ ID NO:3 的第 2 位氨基酸的位置处用 N、R、E、I 或 G 替换 D; 和 (3) 在对应于 SEQ ID NO:3 的第 3 位氨基酸的位置处用 I、A 或 R 替换 G。

[0070] 在一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸替换包含下列一种或多种:(1) 在对应于 SEQ ID NO:3 的第 1 位氨基酸的位置处用 C 替换 Q; (2) 在对应于 SEQ ID NO:3 的第 2 位氨基酸的位置处用 E、G、N 或 C 替换 D; 和 (3) 在对应于 SEQ ID NO:3 的第 3 位氨基酸的位置处 A 或 R 替换 G。

[0071] 在一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸替换包含下列一种或多种:(1) 在对应于 SEQ ID NO:3 的第 2 位氨基酸的位置处用 E、G 或 N 替换 D; (2) 在对应于 SEQ ID NO:3 的第 3 位氨基酸的位置处用 A 或 R 替换 G。

[0072] 在一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸替换包含下列一种或多种:(1) 在对应于 SEQ ID NO:3 的第 2 位氨基酸的位置处用 E 或 G 替换 D; 和 (2) 在 SEQ ID NO 3 氨基酸 3 对应位置用 A 替换 G。

[0073] 在一些实施方案中,所述掩蔽肽包含或由最多有一个氨基酸替换或最多有两个氨基酸替换的 SEQ ID NO:60-68 中的任一种组成。

[0074] 在一些实施方案中,所述掩蔽肽包含或由 SEQ ID NO:69-83 中的任一种组成。

[0075] 在一些实施方案中,所述接头包含约 8 至 18 个氨基酸。

[0076] 在一些实施方案中,所述接头包含蛋白酶可切割序列。

[0077] 在一些实施方案中,所述蛋白酶可切割序列包含 PLGL 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:85)。

[0078] 在一些实施方案中,所述接头包含 $X1-PLGL-X2$ 的氨基酸序列,其中 $X1$ 包含 0-8 个甘氨酸 (G) 和/或 0-8 个丝氨酸 (S); $X2$ 包含 0-8 个甘氨酸 (G) 和/或 0-8 个丝氨酸 (S)。

[0079] 在一些实施方案中,所述接头包含或由 SEQ ID NO:84-91 中的任一种组成(如 SEQ ID NO:86-91 中的任一种)。

- [0080] 在一些实施方案中,所述掩蔽肽和接头共同包含与SEQ ID NO:12-45中的任一种具有至少80%同一性的氨基酸序列。
- [0081] 在一些实施方案中,所述抗原结合域包含VH和VL。
- [0082] 在一些实施方案中,所述掩蔽肽通过接头与VH(例如,VH的N端)连接。
- [0083] 在一些实施方案中,所述掩蔽肽通过接头与VL(例如,VL的N端)连接。
- [0084] 在一些实施方案中,所述蛋白质构建体包含两个掩蔽肽,其中两个掩蔽肽中的一个通过第一接头与VH连接,并且两个掩蔽肽中的另一个通过第二接头与VL连接。
- [0085] 在一些实施方案中,所述抗原结合域包含scFv。
- [0086] 在一些实施方案中,所述掩蔽肽通过接头与scFv(例如,scFv的N端)连接。
- [0087] 在一些实施方案中,所述抗原结合域包含VHH。
- [0088] 在一些实施方案中,所述掩蔽肽通过接头与VHH(例如,VHH的N端)连接。
- [0089] 在一些实施方案中,所述抗原结合域与CD3特异性结合。
- [0090] 在一些实施方案中,所述蛋白质构建体进一步包含特异性结合肿瘤相关抗原的抗原结合域。
- [0091] 在一些实施方案中,所述肿瘤相关抗原是癌胚抗原细胞黏附分子5(CEACAM5)。
- [0092] 一方面,本公开内容涉及一种蛋白质构建体,其包括:(1)第一部分,其包含一种掩蔽肽,所含氨基酸序列与SEQ ID NO:3的序列或其部分具有至少80%同一性,其中掩蔽肽包含一个或多个氨基酸替换;(2)第二部分,其与CD3特异性结合;(3)第三部分,其与特肿瘤相关抗原异性结合,其中第一部分和第二部分通过接头连接。
- [0093] 在一些实施方案中,所述掩蔽肽包含或由至少5个氨基酸组成(例如,来自CD3:的N端)。
- [0094] 在一些实施方案中,所述掩蔽肽包含或由SEQ ID NO:60-68中的任一种组成,任选地,所述序列含有一个或两个氨基酸替换。
- [0095] 在一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸替换包含下列一种或多种:(1)在对应于SEQ ID NO:3的第1位氨基酸的位置处用E、S、Y、H或V替换Q;(2)在对应于SEQ ID NO:3的第2位氨基酸的位置处用N、R、E、I或G替换D;和(3)在对应于SEQ ID NO:3的第3位氨基酸的位置处用I、A或R替换G。
- [0096] 在一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸替换包含下列一种或多种:(1)在对应于SEQ ID NO:3的第2位氨基酸的位置处用E或G替换D;和(2)在对应于SEQ ID NO:3的第3位氨基酸的位置处用A替换G。
- [0097] 在一些实施方案中,所述掩蔽肽包含或由SEQ ID NO:69-83中的任一种组成。
- [0098] 在一些实施方案中,所述接头包含蛋白酶可切割序列。
- [0099] 在一些实施方案中,所述蛋白酶可切割序列包含PLGL的氨基酸序列(SEQ ID NO:85)。
- [0100] 在一些实施方案中,所述接头包含X1-PLGL-X2的氨基酸序列,其中X1包含0-8个甘氨酸(G)和/或0-8个丝氨酸(S);X2包含0-8个甘氨酸(G)和/或0-8个丝氨酸(S)。
- [0101] 在一些实施方案中,所述接头包含或由SEQ ID NO:84-91中的任一种组成(如SEQ ID NO:86-91中的任一种)
- [0102] 在一些实施方案中,所述第二部分为抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,

所述第二部分包含抗体的抗原结合片段 (Fab)。在一些实施方案中,所述第二部分包含VHH。

[0103] 在一些实施方案中,所述第三部分为抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述第三部分包含抗体的抗原结合片段 (Fab)。在一些实施方案中,所述第三部分包含VHH。

[0104] 在一些实施方案中,所述肿瘤相关抗原是癌胚抗原细胞黏附分子5 (CEACAM5)。

[0105] 在一些实施方案中,所述第二部分与第一CH2结构域和第一CH3结构域连接。在一些实施方案中,所述第二部分通过IgG铰链区与第一CH2结构域和第一CH3结构域连接。

[0106] 在一些实施方案中,所述第三部分与第二CH2结构域和第二CH3结构域连接。在一些实施方案中,所述第三部分通过IgG铰链区与第二CH2结构域和第二CH3结构域连接。

[0107] 在一些实施方案中,所述第一和第二CH3结构域具有一个或多个杆臼结构突变。

[0108] 如本文所用,术语“抗体”是指含有至少一个(例如,一个、两个、三个、四个、五个或六个)互补决定区(CDR)(例如,免疫球蛋白轻链的三个CDR中的任意一种或免疫球蛋白重链三个CDR中的任意一种)并且能够与抗原中的表位特异性结合的任何抗原结合分子。抗体的非限制性示例包括:单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)、单链抗体、单可变结构域(VHH)抗体、嵌合抗体、人源抗体和人源化抗体。在一些实施方案中,抗体可包含人源抗体的Fc区。术语抗体还包括衍生物,例如,多特异性抗体、双特异性抗体、单链抗体、双联抗体和由这些抗体或抗体片段形成的线性抗体。

[0109] 如本文所用,术语“抗原结合片段”是指全长抗体的一部分,其中所述抗体部分能够与抗原特异性结合。在一些实施方案中,抗原结合片段包含至少一个可变结构域(例如,重链可变结构域、轻链可变结构域或VHH)。抗体片段的非限制性示例包括,例如,Fab、Fab'、F(ab')₂,和Fv片段如scFv和VHH。

[0110] 如本文所用,术语“受试者”和“患者”在整个说明书中可互换使用,并用来描述根据本发明的方法对其提供治疗的动物、人类或非人类。本公开内容考虑了兽医和非兽医应用。人类患者可以是成年人或青少年(例如,18岁以下的人)。除人类外,患者还包括但不限于小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠、兔子、雪貂、猫、狗和灵长类动物。包括,例如,非人灵长类(如猴子、黑猩猩、大猩猩等)、啮齿类(如大鼠、小鼠、沙鼠、仓鼠、雪貂、兔子)、兔类、猪类(如猪、小型猪)、马类、犬类、猫类、牛类和其他家养、农场和动物园动物。

[0111] 如本文所用,当涉及抗体或抗原结合片段时,术语“特异性结合”和“特异地结合”是指相对于其他分子,抗体或抗原结合片段更倾向于与其靶分子相互作用,因为这种相互作用依赖于靶分子上特定结构(即抗原决定簇或表位)的存在;换言之,该反应物通常识别并结合具有特定结构的分子,而不是与所有分子结合。特异性结合靶分子的抗体可称为靶特异性抗体。例如,特异性结合人CD3的抗体可称为CD3特异性抗体或抗CD3抗体。

[0112] 如本文所用,术语“双特异性抗体”是指结合两个不同表位的抗体。表位可以在同一抗原上,也可以在不同抗原上。

[0113] 如本文所用,术语“三特异性抗体”是指结合三个不同表位的抗体。表位可以在同一抗原上,也可以在不同抗原上。

[0114] 如本文所用,术语“多特异性抗体”是指结合两个或更多不同表位的抗体。表位可以在同一抗原上,也可以在不同抗原上。多特异性抗体可以是,例如,双特异性抗体或三特异性抗体。在一些实施方案中,多特异性抗体与两个、三个、四个、五个或六个不同的表位结合。

[0115] 如本文所用,“VHH”是指仅重链抗体的可变结构域。在一些实施方案中,VHH是人源化VHH。在一些实施方案中,VHH是单域抗体(sdAb)。

[0116] 如本文所用,术语“癌症”是指具有自主生长能力的细胞。这种细胞的例包括具有快速增殖细胞快速生长特征这种异常状态或条件的细胞。该术语旨在包括癌性生长,例如肿瘤;致癌过程、转移组织和恶性转化的细胞、组织或器官,无论其组织病理类型或侵袭阶段如何。其还包括各种器官系统的恶性肿瘤,例如呼吸系统、心血管系统、肾脏系统、生殖系统、血液系统、神经系统、肝脏系统、胃肠道系统和内分泌系统;还有腺癌,包括大多数结肠癌、肾细胞癌、前列腺癌和/或睾丸肿瘤、肺癌非小细胞癌和小肠癌等恶性肿瘤。“自然产生”的癌症包括任何不是通过将癌细胞植入受试者体内而实验诱发的癌症,包括,例如自发产生的癌症、因患者暴露于致癌物而导致的癌症、因插入转基因致癌基因或敲除肿瘤抑制基而导致的癌症以及由感染(如病毒感染)导致的癌症。术语“癌”在本领域是已知的,是指上皮组织或内分泌组织的恶性肿瘤。该术语还包括癌肉瘤,其包括由癌组织和肉瘤组织组成的恶性肿瘤。“腺癌”是指源于腺组织或由肿瘤细胞形成的可识别腺结构的癌。术语“肉瘤”在本领域是已知的,是指间质衍生的恶性肿瘤。术语“造血肿瘤疾病”包括涉及造血源性增生/肿瘤细胞的疾病。造血肿瘤疾病可由髓系、淋巴系或红系,或其前体细胞引起。血液学癌症是一种始于造血组织(如骨髓)或免疫系统细胞的癌症。血液学癌症的示例包括白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤等。

[0117] 除非另有说明,否则本文使用的所有技术和科学术语具有本发明所属领域普通技术人员通常理解的含义。本文描述了本发明所用的方法和材料;也可以使用本领域已知的其他合适的方法和材料。所述材料、方法和示例仅为说明,并不具有限制性。本文所述的所有出版物、专利申请、专利、序列、数据库条目和其他参考文献全文均通过引用的方式结合在本文中。在冲突的情况下,以本说明书(包括定义)为准。

[0118] 本发明的其他特征、目的和优点在细节描述和附图以及权利要求中显而易见。

附图说明

[0119] 图1A显示了抗CD3抗体SP34在浓度分别为9.4、18.8、37.5、75.0和150nM时与CD3 $\delta\epsilon$ 结合的BLI传感图。

[0120] 图1B显示了全长CD3 ϵ (SEQ ID NO:3)和8个长度为5-aa至27-aa的人CD3 δ 部分肽的序列,这些肽的C端与GGGG接头(SEQ ID NO:4-11)连接并进行生物素化。

[0121] 图1C显示了CD3 ϵ 肽与SP34结合的生物膜干涉(BLI)传感图。

[0122] 图2A显示了SP34与野生型和15个CD3 δ :1-27-Fc融合蛋白突变体的结合。将突变体(如图所示)作为抗原包被,使用SP34作为ELISA测定中的检测抗体。

[0123] 图2B显示了42个CD3 δ :1-27-Fc融合蛋白中的6个与SP34结合的传感图。

[0124] 图3A是本文提供的一组被掩蔽TCE(M-TCE)示意图。图中显示了三个典型的M-TCE(左,掩蔽物在重链上;中,掩蔽物在轻链上;右,掩蔽物在双链上)。SP34 Fab(SP34)及其掩蔽物(Mask)和蛋白酶可消化接头(protease digestible linker,PDL)构建在knob链(K)上,而与CEACAM5(CEA)结合的sdAb则构建在人IgG(例如,IgG4)杆臼构建体上的hole链(H)上。

[0125] 图3B显示了19个M-TCE在还原条件下的SDS-PAGE。

[0126] 图3C显示了带有野生型掩蔽物QDGNEE的6个M-TCE与CD3 $\delta\epsilon$ 结合的传感图。使用未掩蔽的TCE SP34-CEA(左上)作为对照。

[0127] 图4显示了14个M-TCE与SP34的结合传感图。

[0128] 图5A显示了7个M-TCE在MMP9消化之前(B)和消化之后(A)的SDS-PAGE。

[0129] 图5B显示了7个M-TCE的结合传感图。上图为未消化的M-TCE与抗原CEACAM5结合;中图为未消化的M-TCE与CD3 $\delta\epsilon$ 结合;下图为消化的M-TCE与CD3 $\delta\epsilon$ 结合。

[0130] 图6A-6E显示了移除掩蔽物前后5个M-TCE的功效。在人PBMC存在的情况下,通过L4-G3A、L4-D2E、L5-D2E、L6-D2E和L7-D2G进行M-TCE诱导杀伤HT29细胞的情况表明功效。使用未掩蔽的TCE TA1F-CEA作为对照。

[0131] 图7显示了三种类型的M-TCE的表征情况,其中掩蔽物在其重链、轻链或两条链上与SP34融合。上图是MM9消化之前三个M-TCE和未掩蔽的对照TCE SP34-CEA与CD3 $\delta\epsilon$ 之间结合的代表性传感图;下图是MM9消化之后三个M-TCE和非掩蔽的对照TCE SP34-CEA与CD3 $\delta\epsilon$ 结合的代表性传感图。

[0132] 图8列出了本公开内容中的序列。

具体实施方式

[0133] CD3(分化簇3)是一种蛋白质复合物和T细胞共受体,参与激活细胞毒性T细胞(CD8+初始T细胞)和T辅助细胞(CD4+初始T细胞)。它由四条不同的链构成。在哺乳动物中,该复合物包含一条CD3 γ 链、一条CD3 δ 链和两条CD3 ϵ 链。这些链与T细胞受体(TCR)和CD3-zeta(ζ 链)结合以在T淋巴细胞中产生激活信号。TCR、CD3-zeta和其他CD3分子共同构成TCR复合物。

[0134] 本公开内容提供了阻断抗体(例如,抗CD3抗体)与其靶标之间的结合的多肽(例如,抗体掩蔽物)、融合蛋白、以及与人CD3结合的蛋白质构建体。这些融合蛋白和蛋白质构建体可用于诱导T细胞免疫和治疗癌症。

[0135] 抗体掩蔽肽

[0136] 本公开内容提供了能够阻断抗体与其靶标结合的抗体掩蔽物。在一些实施方案中,所述抗体是抗CD3抗体。在一些实施方案中,抗体掩蔽物是多肽。在一些实施方案中,抗体掩蔽肽包括至少一部分抗体表位。例如,本文提供的掩蔽肽可以是一种多肽,其包含与抗CD3抗体的表位具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,表位是人CD3 ϵ 或其一部分。人类CD3 ϵ 的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示。

[0137] QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGEDDKNIGSDEDHLSLKE FS
ELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARV (SEQ ID NO:3)

[0138] 在一些实施方案中,抗CD3抗体的表位是SEQ ID NO:3序列的任意部分(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或97个氨基酸)。

[0139] 在一些实施方案中,本文所述的掩蔽肽为约或至少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、27、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或97个氨基酸长的多肽。在一些实施方案中,掩蔽肽长约4至约30个氨基

酸。在一些实施方案中,掩蔽肽长约5至约27个氨基酸。在一些实施方案中,掩蔽肽具有约5至约20个氨基酸、约5至约15个氨基酸、约5至约10个氨基酸、约5至约7个氨基酸或约5至约6个氨基酸。

[0140] 在一些实施方案中,掩蔽肽为与SEQ ID NO:3部分序列具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100% (例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或97个氨基酸)同一性的多肽。

[0141] 在一些实施方案中,掩蔽肽包含或由与SEQ ID NO:3的第1-5位残基具有至少80%、85%、90%、95%或100%同一性的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,掩蔽肽具有与SEQ ID NO:3的第1-8位残基具有至少80%、85%、90%、95%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,掩蔽肽具有与SEQ ID NO:3的第1-11位残基具有至少80%、85%、90%、95%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,掩蔽肽具有与SEQ ID NO:3的第1-14位残基具有至少80%、85%、90%、95%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,掩蔽肽具有与SEQ ID NO:3的残基1-17相同至少80%、85%、90%、95%或100%的氨基酸序列。在一些实施方案中,掩蔽肽具有与SEQ ID NO:3的第1-20位残基具有至少80%、85%、90%、95%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,掩蔽肽具有与SEQ ID NO:3的第1-23位残基具有至少80%、85%、90%、95%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,掩蔽肽具有与SEQ ID NO:3的第1-27位残基具有至少80%、85%、90%、95%或100%同一性的氨基酸序列。

[0142] 在一些实施方案中,与SEQ ID NO:3序列(或其部分)相比,本文所述掩蔽肽具有一个或多个氨基酸替换。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸替换位于SEQ ID NO:3的第1、2和/或3位氨基酸残基中。在一些实施方案中,从Q1E、Q1S、Q1Y、Q1H、Q1V、Q1C、D2N、D2R、D2E、D2I、D2G、D2C、G3I、G3A和G3R组成的组中选择一个或多个氨基酸替换。在一些实施方案中,与SEQ ID NO:3序列(或其部分)相比,掩蔽肽包括1、2、3、4、5或更多个氨基酸替换。

[0143] 在一些实施方案中:对应于SEQ ID NO:3的第1位的氨基酸残基为Q、E、S、Y、H或V;对应于SEQ ID NO 3的第2位的氨基酸残基为D、N、R、E、I或G;并且对应于SEQ IDNO:3的第3位的氨基酸残基为G、A或R。

[0144] 在一些实施方案中,掩蔽肽包含从选自下列的一种或多种氨基酸替换:Q1C、D2E、D2G、D2N、D2C、G3A或G3R。

[0145] 在一些实施方案中,掩蔽肽包含从选自下列的一种或多种氨基酸替换:D2E、D2G、D2N、G3A或G3R。

[0146] 在一些实施方案中,掩蔽肽包含从选自下列的一种或多种氨基酸替换:D2E、D2G或G3A。

[0147] 在一些实施方案中,掩蔽肽包含或由: $X_1X_2X_3NE$ (SEQ ID NO:92) 或 $X_1X_2X_3NEE$ (SEQ ID NO 93) 组成,其中 X_1 为Q或C; X_2 为D、E、G、N或C;和 X_3 为G、A或R。在一些实施方案中, X_1 为Q; X_2 为D、E、G或N;和 X_3 为G、A或R。在一些实施方案中, X_1 为Q; X_2 为D或E; X_3 为G、A或R。在一些实施方案中, X_1 为Q; X_2 为D、G或E;和 X_3 为G或A。在一些实施方案中,掩蔽肽不包含QDGNE (SEQ ID NO:60) 或QDGNNE (SEQ ID NO:68)。

[0148] 本文还提供了融合肽,包括本文所述的掩蔽肽融合到免疫球蛋白Fc区。在一些实

实施方案中, Fc区为人Fc区。在一些实施方案中, 掩蔽肽通过接头融合到人Fc区。任何合适的接头都可以用来融合掩蔽肽和Fc区。在一些实施方案中, 人Fc区进一步包括铰链区。在一些实施方案中, 所述铰链区是人IgG4铰链区。

[0149] 本文还提供了多肽, 其包含(1)本文所述的掩蔽肽和(2)接头。

[0150] 在一些实施方案中, 所述接头是可切割接头。在一些实施方案中, 所述接头包括蛋白酶可切割序列。这里可以使用任何合适的蛋白酶可切割序列。在一些实施方案中, 蛋白酶可切割序列包括PLGL的氨基酸序列(SEQ ID NO:85)。在一些实施方案中, 蛋白酶可切割序列可被蛋白酶(例如, 基质金属蛋白酶9(MMP9)蛋白酶)切割。

[0151] 除了蛋白酶可切割序列外, 本文使用的接头可以进一步包括附加的氨基酸序列。在一些实施方案中, 接头具有X1-PLGL-X2的氨基酸序列, 其中X1包含0-8个甘氨酸(G), 和/或0-8个丝氨酸(S); X2包含0-8个甘氨酸(G), 和/或0-8个丝氨酸(S)。

[0152] 在一些实施方案中, 可切割接头具有PLGL(SEQ ID NO:85)序列。在一些实施方案中, 可切割接头具有GSPLGLGS序列(SEQ ID NO:86)。在一些实施方案中, 可切割接头具有SGSPLGLSGG(SEQ ID NO:87)序列。在一些实施方案中, 可切割接头具有GSGSPLGLGSGS(SEQ ID NO:88)序列。在一些实施方案中, 可切割接头具有SSGGSPGLLSSGGGS序列(SEQ ID NO:89)。在一些实施方案中, 可切割接头具有SSGGSGSPLGLSSGGSGS(SEQ ID NO:91)序列。

[0153] 在一些实施方案中, 所述接头具有GGGG序列(SEQ ID NO:84)或多个GGGG(SEQ ID NO:84)拷贝的序列。

[0154] 本文所述的接头可以是任何合适的长度。在一些实施方案中, 所述接头长度约为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多个氨基酸。在一些实施方案中, 所述接头具有约8至约18个氨基酸、约8至约15个氨基酸、约8至约10个氨基酸、约10至约18个氨基酸或约10至约15个氨基酸。在一些实施方案中, 所述接头具有约4至约18个氨基酸、约4至约15个氨基酸或约4至约10个氨基酸。

[0155] 在一些实施方案中, 本文所述多肽具有与SEQ ID NO:4-45中的任一种具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, 本文所述多肽具有与SEQ ID NO:4-11中的任一种具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, 本文所述的多肽具有与SEQ ID NO:12-45中的任一种具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%同一性的氨基酸序列。

[0156] 在一些实施方案中, 本文所述多肽的长度约为3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60或更多个氨基酸。在一些实施方案中, 本文所述多肽长度为约3至约30个氨基酸。在一些实施方案中, 本文所述多肽长度为约4至约30个氨基酸。在一些实施方案中, 本文所述多肽长度为约3至约97个氨基酸。在一些实施方案中, 本文所述多肽的氨基酸少于97个。

[0157] 在一些实施方案中, 所述掩蔽肽包含或由SEQ ID NO:3的至少第1-3、1-4、1-5、1-6、1-7、1-8、1-9、1-10、1-11、1-12、1-13、1-14、1-15、1-17、1-18、1-19、1-20、1-21、1-22、1-23、1-25、1-26、1-27、1-28、1-29或1-30位氨基酸残基的氨基酸序列组成。在一些实施方案中, 与SEQ ID NO:3的第1-3位氨基酸残基对应的氨基酸序列恰好包含本文所述的1、2、3、4

或5个替换。在一些实施方案中,氨基酸序列在SEQ ID NO:3的N端前3个氨基酸处恰好具有1个或2个替换(例如,1个替换)。

[0158] 在一些实施方案中,所述掩蔽肽包含SEQ ID NO:3的至少第1-3位氨基酸残基的氨基酸序列。在一些实施方案中,与SEQ ID NO:3的第1-3位氨基酸残基对应的氨基酸序列恰好包含本文所述的1个替换。

[0159] 在一些实施方案中,掩蔽肽包含或由SEQ ID NO:60-68中的任一种组成,其中在SEQ ID NO:60-68的N端前3个氨基酸处恰好具有1个或2个替换(例如,1个替换)。

[0160] 修饰抗体或其抗原结合片段

[0161] 在一方面,掩蔽肽可用于本文所述的任何抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,掩蔽肽通过本文所述的任意一种接头与抗体或其抗原结合片段连接。在一些实施方案中,掩蔽肽与抗原结合域连接,例如,一个或两个掩蔽肽与抗体中各抗原结合域(例如,靶向CD3)连接。

[0162] 本文还提供了融合蛋白,其包括(1)第一部分,其包含本文所述掩蔽肽;以及(2)第二部分,其包含与人CD3结合的抗体或抗原结合片段,其中第一部分和第二部分通过接头连接。

[0163] 在一些实施方案中,本文提供的融合蛋白包含:(1)第一部分,其包含具有与SEQ ID NO:3的序列或其部分具有至少80%同一性的氨基酸序列的多肽;和(2)第二部分,其包含与人CD3结合的抗体或抗原结合片段,其中第一部分和第二部分通过接头连接。

[0164] 一个抗体可以有两个相同的轻链拷贝和两个相同的重链拷贝。每个重链包含一个可变结构域(或可变区, V_H)和多个恒定结构域(或恒定区),它们通过其恒定结构域内的二硫键相互结合,形成抗体的“主干”。每个轻链包含一个可变结构域(或可变区, V_L)和一个恒定结构域(或恒定区),每个轻链通过二硫键结合到一个重链上。每个轻链的可变区与它所结合的重链可变区匹配。轻链和重链的可变区都包含三个高变区,夹在更保守的骨架区(FR)之间。

[0165] 这些高变区被称为互补决定区(CDR),形成包含抗体主要抗原结合表面的环状结构。这四个骨架区主要采用 β -折叠构象,CDR形成连接 β -折叠结构的环,在某些情况下还形成 β 折叠结构的一部分。每条链上的CDR通过骨架区紧紧相连,并与另一条链上的CDR共同形成抗原结合区。

[0166] CDR对于识别抗原表位非常重要。如本文所用,“表位”是靶分子能够被抗体的抗原结合域特异性结合的最小部分。表位的最小长度可以为大约3、4、5、6或7个氨基酸,但是这些氨基酸不一定是抗原一级结构的连续线性序列,因为表位可能取决于基于抗原二级和三级结构的抗原三维构型。

[0167] 通过分析抗体的氨基酸序列来确定抗体CDR区的方法是众所周知的,并且CDR有许多常用定义。Kabat的定义基于序列的可变性,而Chothia的定义基于结构环区的位置。这些方法和定义的描述可参见,例如,Martin, *Antibody engineering*, Springer Berlin Heidelberg, 2001. 422-439; Abhinandan, et al., *Molecular immunology* 45.14 (2008): 3832-3839; Wu, T.T. and Kabat, E.A. (1970) *J Exp. Med.* 132:211-250; Martin et al., *Methods Enzymol.* 203:121-53 (1991); Morea et al., *Biophys Chem.* 68 (1-3): 9-16 (Oct. 1997); Morea et al., *J Mol Biol.* 275 (2): 269-94 (Jan. 1998); Chothia et al.,

Nature 342 (6252) :877-83 (Dec.1989);Ponomarenko and Bourne,BMC Structural Biology 7:64 (2007);每篇全文均通过引用并入本文。在一些实施方案中,使用Kabat的定义。在一些实施方案中,使用Chothia的定义。

[0168] CDR对于识别抗原表位非常重要。如本文所用,“表位”是靶分子能够被抗体的抗原结合域特异性结合的最小部分。表位的最小长度可以为大约3、4、5、6或7个氨基酸,但是这些氨基酸不一定是抗原一级结构的连续线性序列,因为表位可能取决于基于抗原二级和三级结构的抗原三维构型。

[0169] 在一方面,本公开内容提供具有一种或多种掩蔽肽的抗体或抗原结合片段,例如本文所述的1、2、3、4或4种以上掩蔽肽。这些掩蔽肽可以与VH和VL的N端,或与VH和VL的C端连接。

[0170] 在一些实施方案中,一个抗原结合域用一个掩蔽肽就足够。在一些实施方案中,掩蔽肽与VH的N端连接。在一些实施方案中,掩蔽肽与VL的N端连接。

[0171] 在一些实施方案中,两个掩蔽肽用于一个抗原结合域。一个与VH的N端相连。另一个与VL的N端连接。

[0172] 在一方面,所述蛋白质构建体包含掩蔽肽,该掩蔽肽包含SEQ ID NO:3的至少第1-3、1-4、1-5、1-6、1-7、1-8、1-9、1-10、1-11、1-12、1-13、1-14、1-15、1-17、1-18、1-19、1-20、1-21、1-22、1-23、1-24、1-25、1-26、1-27、1-28、1-29或1-30位氨基酸残基的氨基酸序列,其中所述掩蔽肽包含一个或多个氨基酸替换;以及抗原结合域,其中掩蔽肽和抗原结合域通过接头连接。在一些实施方案中,与SEQ ID NO:3的第1-3位氨基酸残基对应的氨基酸序列恰好包含本文所述的一个替换。

[0173] 在一些实施方案中,抗体是完整的免疫球蛋白分子(例如,IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM、IgD、IgE、IgA)。IgG亚类(IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)是高度保守的,但是它们的恒定区,特别是它们的铰链和上部CH2结构域存在差异。IgG亚类的序列和差异在本领域是已知的,描述可参见,例如Vidarsson,et al,Frontiers in immunology 5(2014);Irani,et al.,Molecular immunology 67.2 (2015) :171-182;Shakib,Farouk,ed.The human IgG subclasses:molecular analysis of structure,function and regulation.Elsevier, 2016;每篇全文均通过引用并入本文。

[0174] 所述抗体也可以是源自任何物种(例如,人、啮齿动物、小鼠、骆驼科)的免疫球蛋白分子。本公开内容所述的抗体还包括但不限于多克隆、单克隆、单特异性、多特异性抗体和嵌合抗体,嵌合抗体包括融合到另一多肽的免疫球蛋白结合域。术语“抗原结合域”或“抗原结合片段”是指保留完整抗体特异性结合活性的抗体部分,即抗体中能够与完整抗体靶分子上的表位特异性结合的任何部分。它包括,例如Fab、Fab'、F(ab')₂以及这些片段的变体。因此,在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段可以是,例如,scFv、Fv、Fd、dAb、双特异性抗体、双特异性scFv、双链抗体、线性抗体、单链抗体分子、抗体片段形成的多特异性抗体、VHH和任何所含结合域为抗体结合域或同源于抗体结合域的多肽。抗原结合域的非限制性示例包括,例如,完整抗体的重链和/或轻链CDR、完整抗体的重链和/或轻链可变区、完整抗体的全长重链或轻链、来自完整抗体的重链或轻链的单个CDR或VHH。在一些实施方案中,抗原结合域包含VH和VL。在一些实施方案中,抗原结合结构域包含VHH。

[0175] 在一些实施方案中,本文所述蛋白质构建体中所述部分的抗体或抗原结合片段与

CD3(例如,人CD3)特异性地结合。在一些实施方案中,抗CD3抗体是SP34(例如,参见Pessano et al. The EMBO Journal. 4:337-344,1985)或源自SP34的抗体或抗原结合片段。SP34 VH的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。在一些实施方案中,SP34 VL的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。在一些实施方案中,VH CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:46、47和48所示。在一些实施方案中,VL CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:49、50和51所示。

[0176] 此外,在一些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段还可以包含选自SP34 VH CDR的一个、两个或三个重链可变区CDR,以及选自SP34 VL CDR的一个、两个或三个轻链可变区CDR。这些CDR序列可通过Kabat或Chothia的定义确定。

[0177] 在一些实施方案中,抗体可具有包含互补决定区(CDR)1、2、3的重链可变区(VH),其中CDR1区包含或由与SP34的VH CDR1氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列组成,CDR2区包含或由与SP34的VH CDR2氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、98%、99%或100%相同的氨基酸系列组成,和CDR3区包含或由与SP34的VH CDR3氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,抗体可以有包含CDR 1、2、3的轻链可变区(VL),其中CDR1区包含或由与SP34的VL CDR1氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列组成,CDR2区包含或由与SP34的VL CDR2氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列组成,CDR3区域包含或由与SP34的VL CDR3氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列组成。

[0178] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含或由与SP34的VH序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列组成的重链可变区(VH),以及包含或由与SP34的VL序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列组成的轻链可变区(VL)。

[0179] 在一些实施方案中,所述部分(如靶向CD3)的抗体或其抗原结合片段为单链可变片段(scFv)、单域抗体(sdAb)或抗原结合片段(Fab)。

[0180] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段是人源抗体。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段是人源化抗体。人源化百分比是指与国际免疫遗传学信息系统(IMGT)数据库中的人源抗体序列相比,重链或轻链可变区序列的同一性百分比。在一些实施方案中,人源化百分比大于80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%或95%。关于如何确定人源化百分比和如何确定最高命中率的详情在本领域是已知的,描述可参见Jones, Tim D., et al, MAbs. Vol. 8. No. 1. Taylor & Francis, 2016, 该文全文通过引用并入本文。较高的人源化百分比通常会有很多优势,例如,对人类更安全、更有效,人类受试者更耐受,和/或更不太可能产生副作用。

[0181] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段与SP34发生交叉竞争。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段与SP34结合到相同的表位上。

[0182] 在一些实施方案中,本文所述的掩蔽肽与本文所述的连接抗体或抗原结合片段特异性结合。在一些实施方案中,掩蔽肽阻断抗体或抗原结合片段与其靶标(例如,人CD3)的

结合。所述阻断可以通过本领域任何已知的合适的方法来检测。在一些实施方案中,结合的阻断表现为抗体或抗原结合片段与其靶标的结合力或亲和力降低。在一些实施方案中,结合力或亲和力降低了约5%、10%、15%、20%、25%、30%、25%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多。

[0183] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段与其靶标结合的阻断是可逆的。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段与其靶标结合的阻断通过切割本文所述的接头进行逆转。

[0184] 在一些实施方案中,本文所述掩蔽肽的使用与嵌合抗原受体中的抗原结合域有关。嵌合抗原受体或“CAR”是指一种融合蛋白,其包含能够与抗原结合的胞外结构域,和包含源自信号转导蛋白一个或多个胞内信号结构域的胞内区域。胞外结构域可以是能与预定抗原特异性结合的任何蛋白质分子或其部分。在一些实施方案中,胞外结构域包含抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,胞内信号结构域可以是已知具有传递信号功能的任何寡肽或多肽结构域,该信号可激活或抑制细胞中的生物过程,例如激活免疫细胞(例如T细胞或NK细胞)。

[0185] 蛋白质构建体

[0186] 此外,本文公开了蛋白质构建体(例如,双特异性T细胞衔接器),其包括:(1)第一部分,其包含本文所述掩蔽肽;(2)第二部分,其包含与人CD3结合的抗体或其抗原结合片段,其中第一部分和第二部分通过接头连接;以及(3)第三部分,其与肿瘤相关抗原(例如肿瘤抗原)特异性结合。本文还提供了蛋白质构建体(例如,双特异性T细胞衔接器),其包括(1)第一部分,其包含与SEQ ID NO:3的序列或其部分具有至少80%同一性的氨基酸序列;(2)第二部分,其包含与人CD3结合的抗体或其抗原结合片段,其中第一部分和第二部分通过接头连接;以及(3)第三部分,其与肿瘤抗原特异性结合。

[0187] 任何抗体掩蔽物、抗体或其抗原结合片段都可用于本文所述的蛋白质构建体。适合用于本文所述蛋白质构建体的人结晶片段(Fc)是本领域已知的。

[0188] 在一些实施方案中,本公开内容所述的蛋白质构建体的第一和第二部分(例如,双特异性T细胞衔接器)通过接头连接。本领域已知的和本文所述的任何合适的接头都可用于本文所述蛋白质构建体第一和第二部分的连接。在一些实施方案中,所述接头是蛋白酶可切割接头。在一些实施方案中,所述接头可被MMP9蛋白酶切割。

[0189] 在一些实施方案中,本文所述的蛋白质构建体(例如,双特异性T细胞衔接器)具有与本文所述任何一种序列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0190] 在一些实施方案中,抗体(其抗原结合片段或由此衍生的分子)以小于 0.1s^{-1} 、小于 0.01s^{-1} 、小于 0.001s^{-1} 、小于 0.0001s^{-1} 或小于 0.00001s^{-1} 的解离速率(koff)与靶标(例如,CD3)特异性结合。在一些实施方案中,解离速率(koff)大于 0.01s^{-1} 、大于 0.001s^{-1} 、大于 0.0001s^{-1} 、大于 0.00001s^{-1} 或大于 0.000001s^{-1} 。在一些实施方案中,动力学结合速率(kon)大于 $1\times 10^2/\text{Ms}$ 、大于 $1\times 10^3/\text{Ms}$ 、大于 $1\times 10^4/\text{Ms}$ 、大于 $1\times 10^5/\text{Ms}$ 或大于 $1\times 10^6/\text{Ms}$ 。在一些实施方案中,动力学结合速率(kon)小于 $1\times 10^5/\text{Ms}$ 、小于 $1\times 10^6/\text{Ms}$ 或小于 $1\times 10^7/\text{Ms}$ 。结合亲和力可以由动力学速率常数的商($\text{KD}=\text{koff}/\text{kon}$)推导出来。在一些实施方案中,抗体、其抗原结合片段或由此衍生的分子(例如,CAR)的KD小于 $1\times 10^{-6}\text{M}$ 、小于 $1\times 10^{-7}\text{M}$ 、小于 $1\times 10^{-8}\text{M}$ 、

小于 1×10^{-9} M或小于 1×10^{-10} M。在一些实施方案中,KD小于800nM、700nM、600nM、500nM、400nM、300nM、200nM、100nM、90nM、80nM、70nM、60nM、50nM、40nM、30nM、20nM、10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nM或1nM。在一些实施方案中,KD大于 1×10^{-7} M、大于 1×10^{-8} M、大于 1×10^{-9} M、大于 1×10^{-10} M、大于 1×10^{-11} M或大于 1×10^{-12} M。然而,当抗原结合域被掩蔽肽掩蔽时,结合亲和力会显著降低。在一些实施方案中,掩蔽的抗原结合域与未掩蔽的(如被消化后)抗原结合域的KD比至少为10、50、100、200、500、1000或10000。在一些实施方案中,掩蔽的抗原结合结构域无法与感兴趣的抗原(例如,CD3)结合。

[0191] 用于检测抗体对抗原亲和力的通用技术包括,例如ELISA、RIA、生物层干涉测定法(BLI)和表面等离子体共振(SPR)等。

[0192] 在一些实施方案中,测定了热稳定性。本文所述蛋白质构建体的 T_m 可大于60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94或95°C。

[0193] 在一些实施方案中,与存在掩蔽的蛋白质构建体的免疫细胞相比,本文所述的蛋白质构建体在切割后可以使免疫细胞(例如,T细胞、CD8+T细胞、CD4+T细胞、巨噬细胞、抗原呈递细胞)的免疫应答、活性或数量增加至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍或20倍。

[0194] 肿瘤微环境通常富含蛋白酶活性。蛋白酶可以切割接头,暴露抗原结合域。在一些实施方案中,在富含内源性蛋白酶的位点上切割接头的蛋白酶可切割结构域。在一些实施方案中,富含内源性蛋白酶的部位是肿瘤微环境。在肿瘤微环境中富含的蛋白酶在本领域是已知的。肿瘤微环境(tumour microenvironment, TME)是一个复杂的结构,由嵌入经修饰的细胞外基质(ECM)中的多种细胞类型构成,细胞与ECM大分子之间的双向交流决定肿瘤的进展和转移扩散。所述交流可能涉及细胞间的接触,但也可能由完整的ECM大分子或由它们的数种结构域控制,这些结构域通过有限的蛋白质水解作用释放出来,被称为matrikine或matricryptin。ECM改变发生在TME中。在一些实施方案中,本文所述方法中使用的蛋白酶是能改变肿瘤微环境中ECM的蛋白酶(例如,参见Brassart-Pasco et al., Front. Oncol., 15 April 2020)。这种蛋白酶的示例包括但不限于赖氨酸氧化酶(LOX)和谷氨酰胺转移酶家族的交联酶,特别是LOX-1、LOXL-2,以及谷氨酰胺转移酶2、基质金属蛋白酶(MMP)-2、MMP-9、豆蔻蛋白天冬酰胺内肽酶、凝血酶、成纤维细胞活化蛋白酶(FAP)、MMP-1、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-12、MMP-13、MMP-14、膜1型基质金属蛋白酶(MT1-MMP)、纤溶酶、跨膜蛋白酶、丝氨酸(TMPS-3/4)、组织蛋白酶A、组织蛋白酶B、组织蛋白酶D、组织蛋白酶E、组织蛋白酶F、组织蛋白酶H、组织蛋白酶K、组织蛋白酶L、组织蛋白酶L2、组织蛋白酶O、组织蛋白酶S、胱天蛋白酶1、胱天蛋白酶2、胱天蛋白酶3、胱天蛋白酶4、胱天蛋白酶5、胱天蛋白酶6、胱天蛋白酶7、胱天蛋白酶8、胱天蛋白酶9、胱天蛋白酶10、胱天蛋白酶11、胱天蛋白酶12、胱天蛋白酶13、胱天蛋白酶14、人中性粒细胞弹性蛋白酶、尿激酶/尿激酶型纤溶酶原激活剂(uPA)、解离蛋白和金属蛋白酶(ADAM)10、ADAM12、ADAM17、含血小板反应蛋白基序的ADAM(ADAMTS)、ADAMTS5、 β 分泌酶(BACE)、颗粒酶A、颗粒酶B、胍基苯甲酸酯酶(guanidinobenzoate)、多功能跨膜丝氨酸蛋白酶、蛋白切割酶、蛋白切割酶2、安眠蛋白、脑啡肽酶、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、肿瘤坏死因子转换酶(TACE)、激肽释放酶相关肽酶(KLK)3、KLK5、KLK7、KLK11、丙型肝炎病毒NS3/4蛋白酶(HCV-NS3/4)、组织纤溶酶原激活剂(tPA)、钙蛋白酶、钙蛋白酶

2、谷氨酸羧肽酶II、血浆激肽释放酶、AMSH样蛋白酶、AMSH、 γ -分泌酶成分、抗纤溶酶切割酶(APCE)、decysin 1, 凋亡相关半胱氨酸肽酶和N-乙酰化 α -连接的酸性二肽酶样1。在一些实施方案中,这些蛋白酶中的任何一种都切割接头。在一些实施方案中,所述蛋白酶是MMP9。每个示例蛋白酶的切割位点或识别位点在本领域也是已知的。

[0195] 在一些实施方案中,本文所述蛋白质构建体的肿瘤生长抑制百分比(tumor growth inhibition percentage, TGI%)大于10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%或200%。在一些实施方案中,所述蛋白质构建体的肿瘤生长抑制百分比(TGI%)小于60%、70%、80%、90%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%或200%。TGI%可在例如治疗开始后第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或30天,或治疗开始后第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月测定。如本文所用,肿瘤生长抑制百分比(TGI%)的计算公式如下:

[0196] $TGI(\%) = [1 - (T_i - T_0) / (V_i - V_0)] \times 100$

[0197] T_i 为治疗组第*i*天的平均肿瘤体积, T_0 为治疗组第0天的平均肿瘤体积。 V_i 为对照组第*i*天的平均肿瘤体积, V_0 为对照组第0天的平均肿瘤体积。

[0198] 在一些实施方案中,本文所述的蛋白质构建体有效地杀死细胞,蛋白质构建体可识别该细胞表达的肿瘤抗原。在一些实施方案中,可杀死至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的细胞(例如,用至少或约30nM、20nM、10nM、5nM、3nM、1nM、100pm、10pm、1pm、100fm、10fm或1fm的蛋白质构建体)。

[0199] 在一些实施方案中,所述蛋白质结构中的抗体或抗原结合片段具有功能性Fc区。在一些实施方案中,功能性Fc区的效应功能为抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。在一些实施方案中,功能性Fc区的效应功能为吞噬作用。在一些实施方案中,功能性Fc区的效应功能为ADCC和吞噬作用。在一些实施方案中,Fc区为人IgG1、人IgG2、人IgG3或人IgG4。

[0200] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段不具有功能性Fc区。例如,抗体或抗原结合片段为Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 和Fv片段。

[0201] 抗体或其抗原结合片段可以是任何类型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段为IgG抗体或其抗原结合片段。

[0202] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含Fc区,该Fc区可以源自各种类型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类。在一些实施方案中,Fc区源自IgG抗体或其抗原结合片段。IgG亚类的序列和差异在本领域是已知的,描述参见如Vidarsson, et al., *Frontiers in Immunology* 5(2014); Irani, et C., *Molecular Immunology* 67.2(2015):171-182; Shakib, Farouk, ed., *The human IgG subclasses: molecular analysis of structure, function and regulation*. Elsevier, 2016; 每篇全文均通过引用并入本文。

[0203] 本公开内容还提供了一种蛋白质构建体,其包括抗体或抗原结合片段,可与本文所述的任何抗体或抗原结合片段发生交叉竞争。交叉竞争试验在本领域是已知的,描述参见如Moore et al., *Journal of Virology* 70.3(1996):1863-1872, 该文全文通过引用并入本文。在一个方面,本公开内容还提供了一种抗体或其抗原结合片段,其与本文所述的任何

抗体或抗原结合片段结合到相同的表位或区域。表位鉴定试验在本领域是已知的,描述参见如Estep et al. *MAbs*. Vol. 5. No. 2. Taylor&Francis, 2013, 该文全文通过引用并入本文。本文所述的掩蔽肽可用于与本文所述的任何抗体交叉竞争的抗原结合域。

[0204] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含Fc区。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段不包含Fc区,例如单域抗体。在一些实施方案中,本公开内容所述抗体或其抗原结合片段可以在Fc区中修饰,以提供所需的效应功能或血清半衰期。

[0205] 在一些实施方案中,本文所述的蛋白质构建体是多特异性抗体。在一些实施方案中,所述多特异性抗体为双特异性抗体。双特异性抗体可以通过设计一对抗体分子之间的界面来制备,以最大限度地提高从重组细胞培养中回收的异源二聚体的百分比。例如,所述界面可包含至少一部分抗体恒定结构域的CH3结构域。在该方法中,用较大的侧链(例如,酪氨酸或色氨酸)取代第一抗体分子界面的一个或多个小氨基酸侧链。通过用较小的氨基酸侧链(例如,丙氨酸或苏氨酸)取代较大的氨基酸侧链,在第二抗体分子的界面上产生与大侧链相同或相似大小的补偿性“空腔”。这提供了一种机制,用来增加异源二聚体的产量,而不是同源二聚体等其他不需要的最终产物。例如,在W0 96/27011中描述了该方法,该文全文通过引用并入本文。在一些实施方案中,第一Fc区域(例如Fc区的第一个CH3结构域)可包括根据EU编号的位于第366位处的色氨酸(Trp);第二Fc区域(例如Fc区的另一个CH3结构域)可包括以下一种或多种:根据EU编号,位于第366位处的丝氨酸(Ser)、位于第368位处的丙氨酸(Ala)和/或位于第407位处的缬氨酸(Val)。

[0206] 在一些实施方案中,Fc区衍生自人IgG1、人IgG2、人IgG3或人IgG4。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段不具有功能性Fc区。在一些实施方案中,Fc区域具有LALA突变(EU编号中的L234A和L235A突变)或LALA-PG突变(EU编号中的L234A、L235A、P329G突变)。

[0207] 抗体片段只要保留全长抗体所需的亲和性和特异性,就能适用所提供的方法。因此,与人CD3结合的抗体片段将保留与人CD3结合的能力。Fv片段是包含完整抗原识别和结合位点的抗体片段。该区域由一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域紧密结合的二聚体组成,在本质上可以是共价的,例如在scFv中。正是在这种构型下,每个可变结构域的三个CDR相互作用以确定VH-VL二聚体表面的抗原结合位点。总的来说,六种CDR或其子集共同作用于抗体的抗原结合特异性。然而,即使是单个可变结构域(或仅包含三个抗原特异性CDR的Fv的一半)也有能力识别和结合抗原,尽管其亲和力通常比整个结合位点更低。

[0208] 单链Fv或scFv抗体片段包括抗体的VH和VL结构域(或区域),其中这些结构域存在于单个多肽链中。通常地,scFv多肽还包含VH和VL结构域之间的多肽接头,其使得scFv能够形成所需的抗原结合结构。

[0209] Fab片段包含轻链的可变和恒定结构域,以及重链的可变结构域和第一恒定结构域(CH1)。F(ab')₂抗体片段包含一对Fab片段,它们通常通过之间的铰链半胱氨酸在羧基末端附近共价连接。抗体片段的其他化学偶联也是本领域已知的。

[0210] 本发明的抗体和抗体片段可以在Fc区进行修饰,以提供所需的效应功能或血清半衰期。

[0211] 抗体的多聚化可以通过抗体的自然聚集或通过本领域已知的化学或重组连接技术来实现。例如,一定百分比的纯化抗体制剂(例如,纯化的IgG₁分子)会自发形成含有抗体同源二聚体和其他高阶抗体多聚体的蛋白质聚集体。

[0212] 在一些实施方案中,所述多特异性抗体为双特异性抗体。双特异性抗体可以通过设计一对抗体分子之间的界面来制备,以最大限度地提高从重组细胞培养中回收的异源二聚体的百分比。例如,所述界面可包含至少一部分抗体恒定结构域的CH3结构域。在该方法中,用较大的侧链(例如,酪氨酸或色氨酸)取代第一抗体分子界面的一个或多个小氨基酸侧链。通过用较小的氨基酸侧链(例如,丙氨酸或苏氨酸)取代较大的氨基酸侧链,在第二抗体分子的界面上产生与大侧链相同或相似大小的补偿性“空腔”。这提供了一种机制,用来增加异源二聚体的产量,而不是同源二聚体等其他不需要的最终产物。例如,在W0 96/27011中描述了该方法,该文全文通过引用并入本文。

[0213] 双特异性抗体包括交联抗体或“杂缀合物”抗体。例如,杂缀合物抗体中的一个抗体可以与亲和素偶联,另一个与生物素偶联。杂缀合物抗体也可以用任何方便的交联方法制备。合适的交联剂和交联技术是本领域众所周知的,并且在U.S. Patent 4,676,980中公开,该文全文通过引用并入本文。在一些实施方案中,双特异性抗体是双特异性T细胞衔接器(BiTE)。BiTE是在由来自不同抗体的两个单链可变片段(scFv)或来自四个不同基因的氨基酸序列组成的融合蛋白,其位于一条约55KD的单肽链上。其中一个scFv通过CD3受体与T细胞结合,另一种通过肿瘤特异性分子与肿瘤细胞结合。

[0214] 本文还公开了蛋白质构建体(例如,“杆臼结构”T细胞衔接双特异性抗体),包括(1)第一部分,其包含与SEQ ID NO:3的序列或其部分具有至少80%同一性的氨基酸序列;(2)第二部分,其包含与人CD3结合的抗体或其抗原结合片段,其中第一部分和第二部分通过接头连接;以及(3)第三部分,其与肿瘤抗原特异性结合。

[0215] 在一些实施方案中,第二部分或第三部分抗体或抗原结合片段的重链进一步包含至少一个重链恒定区(CH)。在一些实施方案中,所述重链恒定区包含至少一个可减少Fc γ R和补体结合的突变。在一些实施方案中,所述突变包括L234A和L235A;或T366S、L368A和Y407V。

[0216] 在一些实施方案中,第二部分抗体或抗原结合片段的重链包括与SEQ ID NO:57具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,第三部分的抗体或抗原结合片段的重链包括与SEQ ID NO:59具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0217] 在一些实施方案中,第二部分或第三部分抗体或抗原结合片段的轻链多肽进一步包含轻链恒定区(CL)。在一些实施方案中,第二部分抗体或抗原结合片段的轻链包括与SEQ ID NO:58具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0218] 蛋白质构建体所靶向的肿瘤抗原或肿瘤相关抗原可以是本领域已知的任何合适的肿瘤抗原。肿瘤抗原的示例包括,但不限于:CD2、CD4、CD19、CD20、CD22、CD23、CD30、CD33、CD37、CD40、CD44v6、CD52、CD56、CD70、CD74、CD79a、CD80、CD98、CD138、EGFR(表皮生长因子受体)、VEGF(血管内皮生长因子)、VEGFR1(血管内皮生长因子受体1)、PDGFR(血小板衍生生长因子受体)、RANKL(核因子 κ -B配体的受体激活剂)、GPNMB(跨膜糖蛋白神经调节肽B)、EphA2(Ephrin A型受体2)、PSMA(前列腺特异性膜抗原)、Cripto(Cryptic家族蛋白1B)、EpCAM(上皮细胞黏附分子)、CTLA4(细胞毒性T淋巴细胞抗原4)、IGF-IR(1型胰岛素样生长因子受体)、GP3(M13噬菌体)、GP9(糖蛋白IX)、CD42a、GP 40(糖蛋白40kDa)、GPC3(磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3)、GPC1(磷脂酰肌醇蛋白聚糖-1)、TRAILR1(肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体

受体1)、TRAILRII(肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体受体II)、FAS(II型跨膜蛋白)、PS(磷脂酰丝氨酸)脂质、Muc1(黏蛋白1,PEM)、Muc18、CD146、 $\alpha 5\beta 1$ 整合素、 $\alpha 4\beta 1$ 整合素、 αv 整合素(玻连蛋白受体)、软骨凝集素、CAIX(碳酸酐酶IX)、GD2神经节苷脂、GD3神经节苷脂、GM1神经节苷脂、Lewis Y抗原、间皮素、HER2(人表皮生长因子2)、HER3、HER4、FN14(成纤维细胞生长因子诱导14)、CS1(细胞表面糖蛋白、CD2亚类1、CRACC、SLAMF7、CD319)、41BB CD137、SIP(Siah-1相互作用蛋白)、CTGF(结缔组织生长因子)、HLADR(MHC II类细胞表面受体)、PD-1(程序性死亡1,I型膜蛋白)、PD-L1(程序性死亡配体1)、PD-L2(程序性死亡配体2)、IL-2(白细胞介素-2)、IL-8(白细胞介素-8)、IL-13(白细胞介素-13)、PIGF(磷脂酰肌醇-聚糖生物合成F类蛋白)、NRP1(神经纤毛蛋白-1)、ICAM1、CD54、GC182(密封蛋白18.2)、密封蛋白、HGF(肝细胞生长因子)、CEA(癌胚抗原)、LT β R(淋巴细胞素 β 受体)、 κ 骨髓瘤、叶酸受体 α 、GRP78(BIP,78kDa葡萄糖调节蛋白)、A33抗原、PSA(前列腺特异性抗原)、CA125(癌症抗原125或碳水化合物抗原125)、CA19.9、CA15.3、CA242、瘦素、催乳素、骨桥蛋白、IGF-II(胰岛素样生长因子2)、肌成束蛋白、sPIgR(多态免疫球蛋白受体的分泌链)、14-3-3eta蛋白、5T4、ETA(上皮肿瘤抗原)、MAGE(黑色素瘤相关抗原)、MAPG(黑色素瘤相关蛋白多糖,NG2)、波形蛋白、EPCA-1(早期前列腺癌抗原-2)、TAG-72(肿瘤相关糖蛋白72)、因子VIII、脑啡肽酶(膜金属内肽酶)、17-1A(上皮细胞表面抗原17-1A)、核仁蛋白、核仁磷蛋白、及其任意组合。在一些实施方案中,肿瘤抗原为CD20、PSA、PSCA、PD-L1、Her2、Her3、Her1、 β -Catenin、CD19、CEACAM5、EGFR、c-Met、EPCAM、PSMA、CD40、MUC1或IGF1R等。

[0219] 在一些实施方案中,肿瘤抗原为CEA或CEACAM5。在一些实施方案中,所述部分是与肿瘤抗原结合的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段是单链可变片段(scFv)、单域抗体(sdAb)或抗原结合片段(Fab)。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段进一步与Fc结构域融合。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含VHH。在一些实施方案中,所述VHH包含与SEQ ID NO:52具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,VHH CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:53、54和55所示。在一些实施方案中,靶向CEACAM5的部分具有与SEQ ID NO:59具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0220] 本文所述的任何蛋白质构建体均可以与稳定分子(例如,可增加抗体或其抗原结合片段在受试者或溶液中半衰期的分子)缀合。稳定分子的非限制性示例包括:聚合物(例如,聚乙二醇)或蛋白质(例如,血清白蛋白,比如人血清白蛋白)。与稳定分子的缀合可以延长蛋白质构建体在体外(例如,在组织培养中或作为药物组合物储存时)或体内(例如,在人体内)的半衰期或生物活性。

[0221] 在一些实施方案中,本文所述的蛋白质构建体可以与治疗剂缀合。包含所述蛋白质构建体的蛋白质-药物缀合物可与治疗剂共价或非共价结合。在一些实施方案中,所述治疗剂为细胞毒性或细胞抑制剂(例如,细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、吐根碱、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷、长春新碱、长春碱、秋水仙碱、多柔比星、柔红霉素、二羟基炭疽菌素、美登素如DM-1和DM-4、二酮、米托蒽醌、米拉霉素、放线菌素D、1-脱氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔、嘌呤霉素、表柔比星和环磷酰胺及类似物)。

[0222] 多核苷酸和重组载体

[0223] 本公开内容还提供了包含编码本文所述抗体掩蔽物、融合肽和蛋白质构建体的多核苷酸的核酸。本公开内容还提供了重组载体(例如,表达载体),其中包括本文所述分离的多核苷酸(例如,编码本文所述多肽的多核苷酸)、引入重组载体的宿主细胞(即,宿主细胞含有多核苷酸和/或包含多核苷酸的载体)以及通过重组技术产生的重组多肽或其片段。

[0224] 载体是一种构建体,当载体被引入宿主细胞时,其能够将一个或多个感兴趣的多核苷酸递送至宿主细胞。“表达载体”能够在被引入表达载体的宿主细胞中,以编码多肽的形式递送和表达一个或多个感兴趣的多核苷酸。因此,在表达载体中,感兴趣的多核苷酸通过调节元件(例如,启动子、增强子和/或poly-A尾)可操作地连接,调节元件要么位于载体内,要么在感兴趣的多核苷酸的整合位点处或附近或侧翼的宿主细胞基因组中,从而将感兴趣的多核苷酸定位以在载体中表达,这样感兴趣的多核苷酸就会在引入了表达载体的宿主细胞中被翻译。

[0225] 载体可以通过本领域已知的方法引入宿主细胞,例如电穿孔、化学转染(如DEAE-葡聚糖)、转化、转染、感染和/或转导(例如通过重组病毒)。因此,载体的非限制性示例包括病毒载体(其可用于产生重组病毒)、裸DNA或RNA、质粒、黏粒、噬菌体载体以及与阳离子缩合剂相关的DNA或RNA表达载体。

[0226] 本公开内容提供了一种重组载体,其包含适用于对细胞进行遗传修饰的核酸构建体,其可用于治疗病理疾病或病症。本公开内容提供了一种重组载体,其包含适用于表达蛋白质构建体、融合蛋白、相关抗体或其抗原结合片段的核酸构建体。

[0227] 任何载体或载体类型都可以用来向细胞传递遗传物质。这些载体包括但不限于质粒载体、病毒载体、细菌人工染色体(BAC)、酵母人工染色体(YAC)和人类人工染色体(HAC)。病毒载体可以包括但不限于:重组逆转录病毒载体、重组慢病毒载体、重组腺病毒载体、泡沫病毒载体、重组腺相关病毒(AAV)载体、杂交载体和质粒转座子(例如,睡美人转座子系统 and PiggyBac转座子系统)或基于整合酶的载体系统。本领域已知的其他载体也可用于与本文所述的方法。

[0228] 在一些实施方案中,所述载体是病毒载体。病毒载体可以在专门用于制造病毒载体的培养基中生长。根据本文所述的一些实施方案,可以使用任何合适的培养病毒载体的生长培养基和/或补充剂。在一些实施方案中,病毒载体含有EF1 α 启动子以促进表达。在一些实施方案中,所述载体是慢病毒载体。

[0229] 在一些实施方案中,所使用的载体是重组逆转录病毒载体。逆转录病毒载体能够引导感兴趣的核酸分子的表达。逆转录病毒在其病毒壳体内以RNA的形式存在,并且当在宿主细胞内复制时形成双链DNA中间体。同样地,逆转录病毒载体以RNA和双链DNA形式存在。逆转录病毒载体还包括含有重组DNA片段的DNA形式和含有重组RNA片段的RNA形式。所述载体可包括至少一种转录启动子/增强子,或控制基因表达的其他元件。这种载体还可以包括组装信号、长末端重复序列(LTR)或其部分,以及与所用逆转录病毒相适应的正链和负链引物结合位点。长末端重复序列(LTR)是重复多次(例如成千或上万次)的DNA相同序列,位于逆转录病毒DNA逆转录形成的逆转录转座子或原病毒DNA的两端。病毒利用它们将自己的遗传物质插入宿主基因组。任选地,载体还可以包括引导聚腺苷化的信号、选择标记(例如,氨苄青霉素抗性、新霉素抗性、TK、潮霉素抗性、腐草霉素抗性、组胺醇抗性 or DHFR)以及一个或多个限制位点和翻译终止序列。

[0230] 多种细胞系均可用于本文所述的载体。可用于表达多肽的示例性真核细胞包括但不限于：COS细胞，包括COS 7细胞；HEK293细胞，包括HEK293-6E细胞；CHO细胞，包括CHO-S、DG44、Lec13 CHO细胞和FUT8 CHO细胞；PER.C6[®]细胞；和INSO细胞。在一些实施方案中，根据对蛋白质构建体、抗体或其他相关分子进行所需翻译后修饰的能力来选择特定的真核宿主细胞。在一方面，本公开内容涉及包含本文所述的载体或载体对的细胞。

[0231] 在一些实施方案中，本文提供了编码所述蛋白质构建体、抗体或其他相关分子的载体。

[0232] 本公开内容还提供了一种核酸序列，其包含编码任何所述蛋白质构建体、抗体或其他相关分子（例如，包括本文所述的功能部分及其功能变体、多肽或蛋白质）的核酸序列。如本文所用，“核酸”可以包括“多核苷酸”、“寡核苷酸”和“核酸分子”，并且通常指DNA或RNA的聚合物，其可以是单链或双链、合成或从天然来源获得，其可以包含天然的、非天然的或发生变化的核苷酸。此外，所述核酸包含互补DNA（cDNA）。通常优选地，核酸不包含任何插入、缺失、倒位和/或替换。然而，在某些情况下，如本文所讨论，核酸也适合包含一个或多个插入、缺失、倒位和/或替换。

[0233] 本文所述的核酸可以基于化学合成和/或酶连接反应通过本领域已知的程序来构建。例如，核酸可以使用天然存在的核苷酸或各种修饰的核苷酸进行化学合成。在任何此类实施方案中的一些中，核苷酸序列是密码子优化的。

[0234] 本公开内容还提供了核酸，其包含与本文所述任何核酸的核苷酸序列互补的核苷酸序列，或在严格条件下与本文所述任何核酸的核苷酸序列杂交的核苷酸序列。

[0235] 本公开内容还提供了与本文所述任何核苷酸序列具有至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核酸序列，和与本文所述任何氨基酸序列具有至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，本公开内容涉及编码本文所述任何肽的核苷酸序列，或由本文所述任何核苷酸序列编码的任何氨基酸序列。

[0236] 在一些实施方案中，所述核酸序列为至少或约为10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、150、200、250、300、350、400、500或600个核苷酸。在一些实施方案中，所述氨基酸序列为至少或约为5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、300、400、500、600、700、800或900个氨基酸残基。在一些实施方案中，所述核酸序列为小于10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、150、200、250、300、350、400、500或600个核苷酸。在一些实施方案中，所述氨基酸序列为小于5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、300、400、500、600、700、800或900个氨基酸残基。

[0237] 为了确定两个氨基酸序列或两个核酸序列的同一性百分比，将序列进行比对以达到最佳比对（例如，可以在一个或两个第一和第二氨基酸或核酸序列中引入缺口以达到最佳比对，并且为了比对可以忽略非同源序列）。然后比较相应氨基酸位置或核苷酸位置上的氨基酸残基或核苷酸。当第一个序列中的某个位置与第二个序列中的相应位置被同一个氨

基酸残基或核苷酸占据时,则认为该位置上的分子是相同的。两个序列之间的同一性百分比是关于序列共有相同位置数量的函数,考虑到缺口的数量和每个缺口的长度,这需要引入两个序列的最佳比对。为了便于说明,序列比较和两个序列之间同一性百分比的确定可以,例如,使用缺口罚分为12、缺口延伸罚分为4和移码缺口罚分为5的Blossum 62评分矩阵来完成。

[0238] 治疗方法

[0239] 本文所述方法可用于多种治疗目的。在一方面,本公开内容提供了在受试者中治疗癌症的方法、在受试者中降低肿瘤体积随时间增大的速率的方法、降低发生转移风险的方法或在受试者中降低产生额外转移风险的方法。在一些实施方案中,治疗可以阻止、减缓、阻碍或抑制癌症的进展。在一些实施方案中,治疗可在受试者中减少癌症的一种或多种症状的数量、严重程度和/或持续时间。

[0240] 在一方面,本公开内容提供了在受试者中诱导或激活T细胞免疫的方法,其包括向受试者施用有效量的本文所述蛋白质构建体。

[0241] T细胞免疫的诱导可以通过与蛋白质构建体部分的结合来实现,例如,抗CD3抗原结合域与T细胞上的CD3结合(如细胞毒性T细胞)。在一些实施方案中,T细胞免疫在切割接头的蛋白酶可切割结构域之后被诱导或激活。当所述部分(例如,抗CD3抗原结合域)与抗体掩蔽物相互作用时,抗CD3抗原结合域与其靶标(例如,T细胞上的CD3)的结合被阻断。只有当抗体掩蔽物移除或解离后,抗原结合域才会与其靶标结合,从而诱导T细胞激活。在一些实施方案中,通过蛋白酶及其对蛋白酶可切割接头的消化移除或解离抗体掩蔽物。任何合适的蛋白酶都可以用于本文所述的方法。在一些实施方案中,所述蛋白酶为MMP9。

[0242] 在一方面,本公开内容所述方法的特征包括向有需要的受试者(例如,具有或确定为或诊断为患有疾病或紊乱(如癌症)的受试者)施用治疗有效量的本文所述蛋白质构建体。例如,所述癌症可以是急性淋巴细胞白血病;急性髓性白血病;肾上腺皮质癌;AIDS相关癌症;AIDS相关淋巴瘤;肛门癌;阑尾癌;星形细胞瘤;非典型畸胎瘤/横纹肌样瘤;基底细胞癌;膀胱癌;脑干胶质瘤;脑肿瘤(包括脑干胶质瘤、中枢神经系统非典型畸胎瘤/横纹肌样瘤、中枢神经系统胚胎性肿瘤、星形细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜母细胞瘤、室管膜瘤、髓母细胞瘤、髓上皮瘤、中间分化的松果体实质肿瘤、幕上原始神经外胚层肿瘤和松果体母细胞瘤);乳腺癌;支气管肿瘤;伯基特淋巴瘤;原发部位未知的癌症;类癌肿瘤;原发部位未知的恶性肿瘤;中枢神经系统非典型畸胎瘤/横纹肌样瘤;中枢神经系统胚胎性肿瘤;宫颈癌;儿童癌症;脊索瘤;慢性淋巴细胞白血病;慢性骨髓性白血病;慢性骨髓增生性疾病;结肠癌;结肠直肠癌;颅咽管瘤;皮肤T细胞淋巴瘤;内分泌胰岛细胞瘤;子宫内膜癌;室管膜母细胞瘤;室管膜瘤;食管癌;鼻腔神经胶质瘤;尤文肉瘤;颅外生殖细胞瘤;性腺外生殖细胞瘤;肝外胆管癌;胆囊癌;胃癌;胃肠类癌;胃肠道间质细胞瘤;胃肠道间质瘤(GIST);妊娠滋养细胞瘤;神经胶质瘤;毛细胞白血病;头颈癌;心癌;霍奇金淋巴瘤;咽下的癌症;眼内黑色素瘤;胰岛细胞瘤;卡波西肉瘤;肾癌;朗格汉斯细胞组织细胞增多症;喉癌;唇癌;肝癌;肺癌;恶性纤维组织细胞瘤骨癌;髓母细胞瘤;髓上皮瘤;黑色素瘤;默克尔细胞癌;默克尔细胞皮肤癌;间皮瘤;隐匿原发的转移性鳞状颈癌;口腔癌;多发性内分泌腺瘤综合征;多发性骨髓瘤;多发性骨髓瘤/浆细胞瘤;蕈样肉芽肿;骨髓增生异常综合征;骨髓增生性肿瘤;鼻腔癌;鼻咽癌;神经母细胞瘤;非霍奇金淋巴瘤;非黑色素瘤皮肤癌;非小细胞肺癌;口腔癌(oral

cancer); 口腔癌(oral cavity cancer); 口咽癌; 骨肉瘤; 其他脑和脊髓肿瘤; 卵巢癌; 卵巢上皮癌; 卵巢生殖细胞瘤; 卵巢低恶性潜在肿瘤; 胰腺癌; 乳头瘤病; 副鼻窦癌; 甲状旁腺癌; 盆腔癌; 阴茎癌; 咽癌; 中等分化松果体实质肿瘤; 成松果体细胞瘤; 垂体瘤; 浆细胞瘤/多发性骨髓瘤; 胸膜肥母细胞瘤; 原发性中枢神经系统(CNS)淋巴瘤; 原发性肝细胞性肝癌; 前列腺癌; 直肠癌; 肾癌; 肾细胞(肾)癌; 肾细胞癌; 呼吸道癌; 视网膜母细胞瘤; 横纹肌肉瘤; 唾液腺癌; Sézary综合征; 小细胞肺癌; 小肠癌; 软组织肉瘤; 鳞状细胞癌; 鳞状颈癌; 胃癌; 幕上原始神经外胚层肿瘤; T细胞淋巴瘤; 睾丸癌; 喉癌; 胸腺癌; 胸腺瘤; 甲状腺癌; 移行细胞癌; 肾盂及输尿管移行细胞癌; 滋养层的肿瘤; 输尿管癌; 尿道癌症; 子宫癌; 子宫肉瘤; 阴道癌; 会阴部的癌症; 华氏巨球蛋白血症; 或者威尔姆斯瘤。

[0243] 在一些实施方案中, 本文所述的组合物和方法可用于治疗有癌症危险的患者。癌症患者可以通过本领域已知的多种方法确定。

[0244] 如本文所用, “有效量”是指足以产生有益或预期结果的量或剂量, 包括阻止、减缓、阻碍或抑制疾病(如癌症)的进展。有效量将根据施用治疗剂和/或治疗组合物所受的试者的年龄和体重、症状的严重程度和施用途径等变化, 因此可以根据个体差异决定施用量。

[0245] 如本文所用, 术语“延缓疾病的发展”是指推迟、阻碍、减缓、减慢、稳定、抑制和/或延缓疾病(如癌症)的发展。这种延缓可以是不同长度的时间, 这取决于病史和/或接受治疗的个体。对于本领域技术人员来说显而易见的是, 充分或显著的延缓实际上可以包括预防, 因为个体不会发病。例如, 晚期癌症(例如发生转移)可以延缓。

[0246] 有效量可以通过一次或多次施用来施用。举例来说, 组合物的有效量是足以在改善、阻止、稳定、逆转、抑制、减缓和/或延迟患者癌症进展的量, 或者是足以改善、阻止、稳定、逆转、减缓和/或延迟体外细胞(例如, 活检的细胞、本文所述的任何癌细胞或细胞系(例如, 癌细胞系))增殖的量。正如本领域所理解的, 有效量可能会不同, 特别是这取决于患者病史以及诸如所用组合物的类型(和/或剂量)等其他因素。

[0247] 用于施用的有效量和方案可根据经验确定, 且做出这种决定是在本领域技术范围内。本领域技术人员会理解, 必须施用的剂量将根据例如哺乳动物接受治疗的情况、施用途径、治疗剂的特定类型和施用于哺乳动物的其他药物而变化。有关选择合适剂量的指南可参见文献。此外, 治疗并不一定能100%或完全治疗或预防疾病或病症。有多种具有不同程度治疗效果的治疗/预防方法, 本领域普通技术人员将其视为潜在的有利治疗手段。

[0248] 蛋白质构建体有效量的典型剂量为0.01mg/kg至100mg/kg。在一些实施方案中, 剂量可以小于100mg/kg、10mg/kg、9mg/kg、8mg/kg、7mg/kg、6mg/kg、5mg/kg、4mg/kg、3mg/kg、2mg/kg、1mg/kg、0.5mg/kg或0.1mg/kg。在一些实施方案中, 剂量可以大于10mg/kg、9mg/kg、8mg/kg、7mg/kg、6mg/kg、5mg/kg、4mg/kg、3mg/kg、2mg/kg、1mg/kg、0.5mg/kg、0.1mg/kg、0.05mg/kg或0.01mg/kg。在一些实施方案中, 剂量约为10mg/kg、9mg/kg、8mg/kg、7mg/kg、6mg/kg、5mg/kg、4mg/kg、3mg/kg、2mg/kg、1mg/kg、0.9mg/kg、0.8mg/kg、0.7mg/kg、0.6mg/kg、0.5mg/kg、0.4mg/kg、0.3mg/kg、0.2mg/kg或0.1mg/kg。

[0249] 在本文所述的任何方法中, 蛋白质构建体, 任选地同至少一种另外的治疗剂一起, 每周至少向受试者施用一次(例如, 每周一次、每周两次、每周三次、每周四次、每天一次、每天两次或每天三次)。在一些实施方案中, 蛋白质构建体和至少一种另外的治疗剂以两种不同的组合物形式施用。在一些实施方案中, 所述至少一种另外的治疗剂以丸剂、片剂或胶囊

剂的形式施用。在一些实施方案中,所述至少一种另外的治疗剂以缓释经口制剂的形式施用。在一些实施方案中,可在向受试者施用蛋白质构建体之前、与其同时、之后施用一种或多种另外的治疗剂。

[0250] 在一些实施方案中,所述另外的治疗剂可包含一种或多种抑制剂,其选自:B-Raf抑制剂、EGFR抑制剂、MEK抑制剂、ERK抑制剂、K-Ras抑制剂、c-Met抑制剂、间变性淋巴瘤激酶抑制剂(ALK)、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)抑制剂、Akt抑制剂、mTOR抑制剂、双重PI3K/mTOR抑制剂、Bruton酪氨酸激酶抑制剂(BTK)以及异柠檬酸脱氢酶1(IDH1)和/或异柠檬酸脱氢酶2(IDH2)抑制剂。在一些实施方案中,所述另外的治疗剂是吡咯胺2,3-双加氧酶-1(IDO1)抑制剂(例如,艾卡哌司他)。在一些实施方案中,所述另外的治疗剂可包含一种或多种抑制剂,其选自:HER3抑制剂、LSD1抑制剂、MDM2抑制剂、BCL2抑制剂、CHK1抑制剂、活化hedgehog信号通路抑制剂和选择性降解雌激素受体的药剂。

[0251] 在一些实施方案中,所述另外的治疗剂可包含一种或多种治疗剂,其选自:曲贝替定、白蛋白紫杉醇、Trebananib、培唑帕尼、西地尼布、帕波克利、依维莫司、氟嘧啶、IFL、瑞戈非尼、Reolysin、力比泰、色瑞替尼、舒尼替尼、坦罗莫司、阿西替尼、依维莫司、索拉非尼、维全特、培唑帕尼、IMA-901、AGS-003、卡博替尼、长春氟宁、Hsp90抑制剂、Ad-GM-CSF、替莫唑胺、IL-2、IFN α 、长春碱、沙利度胺、达卡巴嗪、环磷酰胺、来那度胺、氮胞啶、来那度胺、硼替佐米、氨柔比星、卡非佐米、普拉曲沙和恩扎妥林。

[0252] 在一些实施方案中,所述另外的治疗剂可包含一种或多种治疗剂,其选自:佐剂、TLR激动剂、肿瘤坏死因子(TNF) α 、IL-1、HMGB1、IL-10拮抗剂、IL-4拮抗剂、IL-13拮抗剂、IL-17拮抗剂、HVEM拮抗剂、ICOS激动剂、靶向CX3CL1的治疗、靶向CXCL9的治疗、靶向CXCL10的治疗、靶向CCL5的治疗、LFA-1激动剂、ICAM1激动剂和选择素激动剂。

[0253] 在一些实施方案中,向受试者施用卡铂、白蛋白紫杉醇(nab-paclitaxel)、紫杉醇、顺铂、培美曲塞、吉西他滨、FOLFOX或FOLFIRI。在一些实施方案中,所述另外的治疗剂选自天冬酰胺酶、白消安、卡铂、顺铂、柔红霉素、多柔比星、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、甲氨蝶呤、紫杉醇、利妥昔单抗、长春碱、长春新碱和/或其组合。

[0254] 在一些实施方案中,所述受试者对包括例如切除、放疗、消融、化疗栓塞、肝移植、靶向药物治疗(激酶抑制剂:索拉菲尼、乐伐替尼、瑞戈非尼、卡博替尼)和一些免疫检查点抑制剂的治疗无响应。在一些实施方案中,这些治疗中的一种或多种与本文所述蛋白质构建体组合施用于受试者。

[0255] 组合物和制剂

[0256] 本公开内容提供了组合物(包括药物和治疗组合物),其含有通过本文所述方法产生的蛋白质构建体。还提供了方法,例如,向受试者,例如患者或动物模型(例如,小鼠)施用蛋白质构建体及其组合物的治疗方法。

[0257] 所述药物组合物和制剂可包括一种或多种任选的药学上可接受的载体或赋形剂。在一些实施方案中,所述组合物包括至少一种另外的治疗剂。

[0258] 药学上可接受的载体是指药物组合物中除活性成分以外的成分。药学上可接受的载体不干扰活性成分并且对受试者无毒。药学上可接受的载体可包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。药物制剂是指将不同物质和/或试剂组合在一起以生产最终药品的过程。制剂研究涉及开发患者可接受的药物制备物。此外,制备物的形式是为了使其中所含

的活性成分发挥有效的生物活性,并且其不含对施用该制剂的受试者有不可接受毒性的其他组分。

[0259] 在一些实施方案中,载体的选择部分取决于特定的蛋白质构建体和/或施用方法。有多种合适的制剂可供选择。例如,所述药物组合物可含有防腐剂。合适的防腐剂可包括,例如,对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸钠和苯扎氯铵等。在一些实施方案中,使用了两种或更多种防腐剂的混合物。防腐剂或其混合物的量通常为总组合物重量的约0.0001%至约2%。载体描述参见如Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)。药学上可接受的载体通常在所用剂量和浓度下对受体无毒,且包括但不限于:缓冲液,例如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(例如十八烷基二甲基苄基氯化铵;六甲铵氯化物;苯扎氯铵;苯索氯铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,例如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;以及间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,例如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、双糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,例如EDTA;糖,例如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐反离子,例如钠;金属络合物(例如,锌-蛋白质络合物);和/或非离子表面活性剂,例如聚乙二醇(PEG)。

[0260] 合适的缓冲剂包括例如柠檬酸、柠檬酸钠、磷酸、磷酸钾和多种其他酸和盐。在一些实施方案中,使用了含有两种或更多种缓冲剂的混合物。缓冲剂或其混合物的量通常为总组合物重量的约0.001%至约4%。制备可施用药物组合物的方法是已知的。示例方法的详情可参考,例如,Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21st ed. (May 1, 2005)。

[0261] 制剂可以包括水溶液。所述制剂或组合物还可含有超过一种对蛋白质构建体所治疗的特定适应症、疾病或病症有用的活性成分,优选地,具有那些与细胞活性互补的活性成分,其中各自的活性不会互相产生不利影响。这些活性成分合适地按照对预期目的有效量组合存在。因此,在一些实施方案中,药物组合物可进一步包含其他药物活性剂或药物,例如检查点抑制剂、融合蛋白、化疗药物(例如,天冬酰胺酶、白消安、卡铂、顺铂、柔红霉素、多柔比星、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、甲氨蝶呤、紫杉醇、利妥昔单抗、长春碱和/或长春新碱)。

[0262] 在一些实施方案中,所述药物组合物含有蛋白质构建体的量可以有效治疗或预防疾病或病症,例如治疗有效量或预防有效量。在一些实施方案中,通过对接受治疗的受试者进行定期评估来监测治疗或预防功效。所需剂量可通过蛋白质构建体的单次推注施用、蛋白质构建体的多次推注施用或蛋白质构建体的连续输注施用来递送。

[0263] 所述组合物可以通过标准施用技术、制剂和/或装置施用。所述组合物的施用可以是自体的或是异体的。

[0264] 本文所述的制剂包括用于经口、静脉内、腹膜内、皮下、经肺、经皮、肌肉、鼻内、口腔、舌下或栓剂施用。在一些实施方案中,细胞群通过肠外注射。术语“肠外”,如本文所用,包括静脉内、肌肉、皮下、经直肠、经阴道和腹膜内施用。在一些实施方案中,使用通过静脉内、腹腔内或皮下注射的外周系统递送方式向受试者施用细胞。

[0265] 无菌注射液可通过将细胞并入溶剂来制备,例如与合适的载体、稀释剂或赋形剂(例如无菌水、生理盐水、葡萄糖、右旋糖等)混合。根据施用途和所需制剂的不同,所述组合物可包含辅助物质,例如润湿剂、分散剂或乳化剂(例如,甲基纤维素)、pH缓冲剂、胶凝剂或黏度增强添加剂、防腐剂、矫味剂和/或色素。在一些方面,可以参考标准文本来配制合适的制剂。

[0266] 可以添加多种增强组合物稳定性和无菌性的添加剂,包括抗菌防腐剂、抗氧化剂、螯合剂和缓冲剂。多种抗菌剂和抗真菌剂可确保防止微生物的作用,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚和山梨酸。可使用延缓吸收的制剂来延长可注射药物形式的吸收,例如单硬脂酸铝和明胶。

[0267] 用于体内施用的制剂通常是无菌的。无菌可以很容易实现,例如通过无菌过滤膜过滤。

[0268] 本文所述的组合物或药物组合物可以连同施用说明书一起包含在容器、包装或分配器(dispenser)中。

[0269] 还提供了施用所述组合物的方法,以及此类组合物用于治疗或预防包括癌症在内的疾病、病症和紊乱的用途。在一些实施方案中,本文所述的方法可降低发生本文所述疾病、病症和紊乱的风险。

[0270] 在一些实施方案中,将本文所述的组合物施用于需要治疗特定疾病或病症的受试者或患者。在一些实施方案中,将通过所提供的方法制备的组合物施用于受试者,例如患有所述疾病或病症或有所述疾病或病症风险的受试者。在一些方面,所述方法从而治疗疾病或病症,例如改善疾病或病症的一种或多种症状,例如通过减轻表达蛋白质构建体所识别抗原的癌症中的肿瘤负担。

[0271] 在一些实施方案中,在施用本文所述的组合物之前,受试者已接受了靶向疾病或病症(例如肿瘤)的治疗剂的治疗。在一些方面,其他治疗剂难以治疗受试者或对其无响应。在一些实施方案中,所述受试者患有持续或复发的疾病,例如,在接受另一种治疗干预之后,包括化疗、放疗和/或造血干细胞移植(hematopoietic stem cell transplantation, HSCT),例如同种异基因HSCT。在一些实施方案中,尽管受试者已对另一种疗法产生抗药性,但所述施用仍有效地治疗受试者。

[0272] 在一些实施方案中,受试者对其他治疗剂有响应,并且治疗剂的治疗减轻了疾病负担。在一些方面,受试者最开始对治疗剂有响应,但随着时间的推移而表现出疾病或病情复发。在一些实施方案中,受试者没有复发。在一些这样的实施方案中,受试者被确认为有复发的风险,例如复发风险高,并因此预防性地施用细胞(例如以降低复发的可能性或防止复发)。在一些实施方案中,受试者先前未接受过其他治疗剂的治疗。

[0273] 本文所述组合物可以通过任何合适的方式施用,例如,通过推注输注、通过注射(例如静脉内注射或皮下注射、眼内注射、眼周注射、视网膜下注射、玻璃体内注射、经隔膜注射(trans-septal injection)、巩膜下注射、脉络膜内注射、前房内(intracameral injection)、结膜下注射(subconjunctival injection)、结膜下注射(subconjunctival injection)、球筋膜下注射(sub-Tenon's injection)、球后注射、球周注射或后巩膜旁递送。在一些实施方案中,它们通过肠外、肺内和鼻内施用,并且,如果需要局部治疗,可进行病灶内施用。肠外输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。在一些实施方案中,

给定剂量可通过组合物的单次推注施用进行施用。在一些实施方案中,其可通过组合物的多次推注施用进行施用,例如,在不超过3天的时间内施用或通过组合物的连续输注施用。

[0274] 实施例

[0275] 下面提供的实施例仅用于举例说明目的,除非另有说明,否则并不旨在是限制性的。因此,本发明不应以任何方式被解释为仅限于以下实施例,而应被解释为包括因本文提供的教导而显而易见的任何和所有变化。

[0276] 实施例1:抗体和蛋白质的产生

[0277] SP34是靶向人CD3复合物的抗体(例如,参见Pessano et al. *The EMBO Journal*. 4:337-344, 1985)。它与CD3的 ϵ 结构域结合(例如,参见A Salmeron et al. *J. Immunology*. 147:3047-3052, 1991)。由于它对多种非人灵长类动物的CD3具有交叉反应性(例如,参见Conrad et al. *Cytometry A*. 71:923-933, 2007),在T细胞衔接器(TCE)双特异性抗体中,其Fab或scFv形式的片段常被用作抗CD3抗体臂。

[0278] 本研究的目的是确认能阻断SP34与CD3结合的肽,并用这种肽作为掩蔽物来阻止抗体的结合。通过蛋白酶可消化的接头将这种掩蔽肽与SP34融合,会潜在地生成仅在富含蛋白酶的微环境中才具有活性的被掩蔽TCE(M-TCE)。

[0279] 所有生成的分子包括SP34、肽-Fc融合体和双特异性抗体(bsAb),都是在使用HEK293F作为表达宿主的瞬时表达系统中产生的。简单地说,将 0.3×10^6 个293F细胞用于接种300mL KOP293培养基(珠海恺瑞,珠海,中国),并在5% CO₂、120rpm的条件下使细胞增殖2-4天。然后将细胞用于接种100mL KPM转染培养基(珠海恺瑞,珠海,中国),使细胞密度达到 1×10^6 个细胞/mL,并使其培养过夜。向质粒溶液缓慢加入聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)溶液,使100 μ g编码所设计构建体的质粒DNA与600 μ g PEI混合。室温(RT)孵育15分钟后,将质粒-PEI混合物添加至HEK293F细胞,并按上述方法培养细胞。使细胞生长7天。生长24小时之后,添加2mL KT-feed(50x, 珠海恺瑞)。通过离心并用0.22 μ m过滤器过滤,收获培养物上清液。按照制造商的说明书,使用MabSelect™ PrismA FF柱(GE)通过蛋白A亲和层析纯化抗体。

[0280] 实施例2:抗体和被掩蔽抗体与其靶标的结合

[0281] 本研究中采用生物膜干涉(Bio-Layer Interferometry, BLI)技术测量蛋白质-蛋白质相互作用。使用了Octet Red96系统和链霉亲和素(SA)或AHC生物传感器(FortéBio, Ferment)。

[0282] 为了测量SP34与CD3 ϵ 肽的结合,按照制造商的说明书,通过SA-生物素相互作用将肽固定在SA生物传感器上。用含有0.01% Tween-20缓冲液的PBS稳定基线后,将生物传感器浸入含有指定浓度的SP34的黑色固体96孔板(Greiner Bio-One, Cat.#65520, Monroe, North Carolina, USA)。相应地测量结合和解离情况,并通过FortéBio's Data Analysis 12.0软件计算结合动力学。

[0283] 按照上文的描述测量CD3 ϵ_{1-27} 突变体-SP34融合体或M-TCE与CD3 $\delta\epsilon$ 的结合,但使用AHC传感器捕获M-TCE并将CD3 $\delta\epsilon$ 作为分析物。

[0284] 实施例3:CD3 ϵ N端肽与SP34结合的最小长度测定

[0285] SP34与位于CD3 ϵ 的N端的表位结合。我们试图使用SP34天然表位的肽和突变体作为其自身的掩蔽物。

[0286] SP34对CD3 $\delta\epsilon$ 亲和力的测定

[0287] 在GenScript Inc.合成了编码SP34的V_H和V_L的基因(分别为SEQ ID NO:1和2),并将其与人IgG1的恒定区融合以生成SP34嵌合抗体,其产生方法如上所述。

[0288] CD3 $\delta\epsilon$ 购自ACRO(北京,中国),并用作SP34亲和力测定的抗原。

[0289] 将SP34固定在AHC生物传感器上,以CD3 $\delta\epsilon$ 作为分析物,测定其对CD3 $\delta\epsilon$ 的亲合力。选择这种方法是因为它可以避免潜在的多价结合,并且可以准确地测定SP34与CD3 $\delta\epsilon$ 之间的亲合力。

[0290] 在多种CD3 $\delta\epsilon$ 浓度(9.4、18.8、37.5、75.0和150nM)下,测定SP34的单价结合亲和力为 5.8×10^{-9} M(图1A,表1)。

[0291] 表1.SP34对CD3 $\delta\epsilon$ 及CD3 ϵ 的多种N端肽的亲合力

样本 ID	$k_d(1/MS)$	$k_d(1/s)$	$K_D(M)$
CD3 $\delta\epsilon$	5.5×10^5	3.2×10^{-3}	5.8×10^{-9}
CD3 ϵ -p1	1.6×10^5	1.6×10^{-4}	9.9×10^{-10}
[0292] CD3 ϵ -p2	6.5×10^4	2.4×10^{-4}	3.6×10^{-9}
CD3 ϵ -p3	5.6×10^4	1.1×10^{-4}	2.0×10^{-9}
CD3 ϵ -p5	5.4×10^4	9.8×10^{-5}	1.8×10^{-9}
CD3 ϵ -p6	4.6×10^4	1.6×10^{-4}	3.5×10^{-9}
[0293] CD3 ϵ -p7	1.0×10^5	1.3×10^{-4}	1.3×10^{-9}

[0294] SP34对CD3 ϵ 的N端肽的亲合力的测定

[0295] 人CD3 ϵ 肽序列(SEQ ID NO:3)如图1B所示。在上海Sangon Biotech(中国上海)合成了8条长度范围在5AA至27AA的肽,其N端有GGGGS接头(SEQ ID NO:4-11),并且其C端进行了生物素化,获得了其中六种(CD3 ϵ -p1、p2、p3、p5、p6和p7)。

[0296] 采用BLI技术,通过FortéBio Red96检测这六种肽对SP34的亲合力。这些肽固定在SA生物传感器上,并用SP34作为分析物测定其亲合力。结合传感图表明,SP34与所有六种肽的结合曲线非常相似(图1C)。测定的结合亲和力在1-4nM之间(表1),与CD3 $\delta\epsilon$ /SP34的结合非常相似。这一结果清楚地表明,短至5个氨基酸的N端CD3 ϵ 肽与SP34的结合力几乎与CD3 $\delta\epsilon$ 一样强。结果还表明,长度为5AA、8AA、11AA、17AA、20AA和23AA的N端CD3 ϵ 肽均能与SP34结合。结果至少表明,长度在5AA至23AA之间的任何N端CD3 ϵ 肽都能够与SP34结合。进一步假设短于5AA和长于23AA的N端CD3 ϵ 肽也可以与SP34结合。

[0297] 实施例4:结合SP34的CD3 ϵ 突变肽的筛选

[0298] CD3 ϵ_{1-27} -Fc融合体的生成

[0299] 接下来,我们将CD3 ϵ 的AA1-27(SEQ ID NO:67:QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILT)与人Fc进行了单价融合,通过肽接头IEGRMD将该肽与杆臼构建体knob链的人IgG4铰链+Fc区融合,而Fc的hole链保持不变。融合蛋白的产生方法如上所述。

[0300] 通过ELISA检测SP34与CD3 ϵ_{1-27} -Fc融合蛋白的结合。将100 μ L 2 μ g/mL的融合蛋白包被在96孔微孔板(Nunc)上,室温(RT)过夜。用3%乳-PBS(在137mM NaCl、2.7mM KCl、10mM Na₂HPO₄、1.8mM KH₂PO₄中加3%脱脂乳)在RT下封闭1小时,再用0.05% PBST(PBS中有0.05% Tween-20)洗涤6次后,向孔中加入SP34(5 μ g/mL,50 μ L/孔)作为第一抗体,37 $^{\circ}$ C孵育

1小时。孵育后用PBST洗孔6次,并加入第二抗体辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗 κ 轻链(Sigma,1:6000稀释,50 μ L/孔),室温下孵育50min。用PBST冲洗6次后,加入3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)显色,然后加入1M HCl停止反应。用微孔板读数仪(Thermo Fisher)在450nm波长下读取ELISA滴度。

[0301] 如图2A所示,SP34表现与CD3 ϵ_{1-27} -Fc融合体的强结合。然后,我们在该肽中引入突变,并筛选维持肽与SP34结合的突变体。

[0302] 维持与SP34结合的CD3 ϵ_{1-27} -Fc突变体的筛选

[0303] 将CD3 ϵ_{1-27} -Fc融合蛋白中肽的前3个氨基酸(QDG)各自突变为其他19个可能的氨基酸。这样就产生了57个突变融合蛋白,所有突变融合蛋白的产生均如上所述。

[0304] 在一些实施方案中,如上所述,通过ELISA检测SP34与CD3 ϵ_{1-27} -Fc突变融合蛋白第一批的15个变体的结合情况。在15个变体中,有5个变体(D2E、D2G、D2N、D2C和G3A)表现出了与SP34的强结合力(图2A)。

[0305] 在一些实施方案中,如上所述,通过BLI使用FortéBio Red96检测SP34与CD3 ϵ_{1-27} -Fc突变体融合蛋白第二批的42个变体的结合情况。大多数变体显示与SP34的结合大为降低(图2B,仅显示了42个代表性传感图中的6个)。在42个变体中,两个变体Q1C和G3R显示出与野生型相似的结合曲线。

[0306] 简单总结,CD3 ϵ_{1-27} -Fc融合蛋白的七个突变体(Q1C、D2E、D2G、D2N、D2C、G3A和G3R)保持了与SP34的结合,因此认为含有这些突变的CD3 ϵ 肽是SP34的潜在掩蔽物。

[0307] 实施例5:基于SP34-CD3 ϵ 肽融合体的被掩蔽T细胞衔接器(M-TCE)的构建与表征

[0308] 被掩蔽抗体的构建和产生

[0309] 有了SP34作为抗CD3抗体和上述确定的7个潜在掩蔽物,我们接下来构建了M-TCE的变体。我们选择了名为CEA的抗CEACAM5单域抗体(例如,参见PCT公布No. WO2019135159)作为模型抗TAA抗体。

[0310] 据预测,这些M-TCE将失去或降低对CD3的亲和力。进一步设想是,M-TCE将在蛋白酶从抗体上移除掩蔽物时被激活。众所周知,与正常器官相比,某些蛋白酶在肿瘤组织中的浓度要显著更高。在特定蛋白酶可以激活M-TCE的环境中,我们的设计将使无功能的M-TCE发挥功能,或使功能较差的M-TCE更有功能。理想情况下,这种蛋白酶在肿瘤中含量高,而在正常器官中含量低,M-TCE只能在肿瘤部位被激活。

[0311] 选择基质金属肽酶9(MMP9)作为模型蛋白酶,因为它与癌症多种类型的肿瘤进展有关。

[0312] 我们设计的M-TCE具有以下成分(图3A):i)具有杵臼(knob-in-hole,KiH)激活突变的Fc区;ii)TAA结合抗体,Fab、scFv或sdAb,构建在Fc的knob链或hole链上;在FIG 3A图中,抗CEACAM5 sdAb CEA置于Fc的hole链上;iii)抗CD3抗体的Fab(例如,SP34)与表位QDGNEE或本研究中确定的变体结合,构建在TAA抗体片段的相反链;iv)抗CD3抗体掩蔽物,通过v)蛋白酶可消化接头(PDL)与抗体的V_H或V_L的N端相连。

[0313] 值得注意的是,如图中左、中、右图所示,掩蔽物可置于抗CD3抗体的重链、轻链或甚至这两条链上。

[0314] 上述证明了N端CD3 ϵ 的五个氨基酸的肽与SP34结合的亲和力与CD3 $\delta\epsilon$ 相似。六种氨基酸肽,无论是QDGNEE野生型序列还是上述确定的突变体,都用作潜在的掩蔽物。所用六

肽QDGNEE (SEQ ID NO:68) 的突变体包括D2E、D2G、D2N、G3A和G3R。Q1C和D2C突变没有进一步研究,因为游离半胱氨酸在蛋白质构建体中通常并不可取。

[0315] 本研究选择了肽PLGL作为蛋白酶消化序列。这个序列可以很容易地被蛋白酶如MMP9消化。在一些构建体中,掩蔽物序列直接与PDL融合,然后直接与SP34 V_H融合。在一些构建体中,在掩蔽物与PDL之间以及PDL与SP34 V_H之间插入接头。这些不同构建体的目的是寻找掩蔽物与抗体之间的最优接头长度,因为这个长度可能对M-TCE的稳定性有很大的影响。

[0316] 表2列出来所有构建的M-TCE的掩蔽物+PDL部分的序列。

[0317] 表2:本研究使用的SP34潜在掩蔽物及其连接接头

名字	掩蔽物位置	掩蔽物和接头	掩蔽能力	实验步骤	SEQ ID NO
[0318] L0-WT	V _H	QDGNEE <u>PLGL</u> -SP34V _H	有	ELISA, BLI	12
L2-WT	V _H	QDGNEEGS <u>PLGLGS</u> -SP34V _H	有	ELISA, BLI	13

[0319]

L3-WT	V _H	QDGNEESGS<u>PLGL</u>SGG-SP34V_H	有	ELISA, BLI	14
L4-WT	V _H	QDGNEEGSGS<u>PLGL</u>SGS-SP34V_H	有	ELISA, BLI	15
L5-WT	V _H	QDGNEESSGG<u>PLGL</u>SSGG-SP34V_H	有	ELISA, BLI	16
L6-WT	V _H	QDGNEESSGGG<u>PLGL</u>SSGGG-SP34V_H	有	ELISA, BLI	17
L7-WT	V _H	QDGNEESSGGSGS<u>PLGL</u>SSGGSGS-SP34V_H	有	ELISA, BLI	18
L2-Q1E	V _H	EDGNEEGS<u>PLGL</u>GS-SP34V_H	无	ELISA, BLI	19
L2-Q1S	V _H	SDGNEEGS<u>PLGL</u>GS-SP34V_H	无	ELISA, BLI	20
L2-Q1Y	V _H	YDGNEEGS<u>PLGL</u>GS-SP34V_H	无	ELISA, BLI	21
L2-Q1H	V _H	HDGNEEGS<u>PLGL</u>GS-SP34V_H	无	ELISA, BLI	22
L2-Q1V	V _H	VDGNEEGS<u>PLGL</u>GS-SP34V_H	无	ELISA, BLI	23
L2-D2N	V _H	QNGNEEGS<u>PLGL</u>GS-SP34V_H	n.a.	ELISA, BLI	24
L2-D2R	V _H	QRGNEEGS<u>PLGL</u>GS-SP34V_H	无	ELISA, BLI	25
L2-D2E	V _H	QEGNEEGS<u>PLGL</u>GS-SP34V_H	有	ELISA, BLI	26
L4-D2E	V _H	QEGNEEGSGS<u>PLGL</u>SGS-SP34V_H	有	BLI	27
L5-D2E	V _H	QEGNEESSGGSPAGASSGG-SP34V_H	有	BLI	28
L6-D2E	V _H	QEGNEESSGGGSPAGASSGGG-SP34V_H	有	BLI	29
L7-D2E	V _H	QEGNEESSGGSGS<u>PLGL</u>SSGGSGS-SP34V_H	有	BLI	30

	L2-D2I	V _H	QIGNEEGS <u>PLGLGS</u> -SP34V _H	无	ELISA, BLI	31
	L2-D2G	V _H	QGGNEEGS <u>PLGLGS</u> -SP34V _H	有	ELISA, BLI	32
	L4-D2G	V _H	QGGNEEGSGS <u>PLGLGSGS</u> -SP34V _H	有	BLI	33
	L5-D2G	V _H	QGGNEESSGGS <u>PLGLSSGGS</u> -SP34V _H	有	BLI	34
	L6-D2G	V _H	QGGNEESSGGGS <u>PLGLSSGGGS</u> -SP34V _H	有	BLI	35
	L7-D2G	V _H	QGGNEESSGSGS <u>PLGLSSGSGS</u> -SP34V _H	有	BLI	36
	L2-G3I	V _H	QDINEEGS <u>PLGLGS</u> -SP34V _H	无	ELISA, BLI	37
	L2-G3A	V _H	QDANEEGS <u>PLGLGS</u> -SP34V _H	有	ELISA, BLI	38
[0320]	L4-G3A	V _H	QDANEEGSGS <u>PLGLGSGS</u> -SP34V _H	有	BLI	39
	L5-G3A	V _H	QDANEESSGGS <u>PLGLSSGGS</u> -SP34V _H	有	BLI	40
	L6-G3A	V _H	QDANEESSGGGS <u>PLGLSSGGGS</u> -SP34V _H	有	BLI	41
	L7-G3A	V _H	QDANEESSGSGS <u>PLGLSSGSGS</u> -SP34V _H	有	BLI	42
	L2-G3R	V _H	QDRNEEGS <u>PLGLGS</u> -SP34V _H	有	BLI	43
	L4-G3R	V _H	QDRNEEGSGS <u>PLGLGSGS</u> -SP34V _H	有	BLI	44
	L6-G3R	V _H	QDRNEESSGGGS <u>PLGLSSGGGS</u> -SP34V _H	有	BLI	45
	LC-L4-G2E	V _L	QEGNEEGSGS <u>PLGLGSGS</u> -SP34V _L	有	BLI	27
	2XL4-G2E	V _H 和 V _L	QEGNEEGSGS <u>PLGLGSGS</u> -SP34V _H QEGNEEGSGS <u>PLGLGSGS</u> -SP34V _L	有	BLI	27

[0321] *n.a.:数据不可用。

[0322] 第一批19个构建体种包括7个掩蔽序列为QDGNEE的M-TCE,其为CD3:N端的野生型六肽,含有长度分别为4、8、10、12、14、16和18AA的PDL,并且还包含具有12个潜在突变体掩蔽物的12个M-TCE,其PDL长度为8AA(表2)。

[0323] 所有M-TCE都可以在我们的293个瞬时表达系统中成功产生(图3B)。图3B的Q1V泳

道缺少可见蛋白条带是由于样品上样错误造成的。

[0324] 被掩蔽抗体的表征

[0325] 如上所述,通过BLI用FortéBio Red96评估19个M-TCE与其两种抗原CEACAM5和CD3 $\delta\epsilon$ 的结合。

[0326] 正如预期的那样,与CEACAM5结合的所有19个M-TCE和未掩蔽的TCE抗体对照SP34-CEA结合曲线非常相似(数据未显示),这表明SP34的掩蔽不会干扰抗TAA抗体与其抗原的结合。

[0327] 未掩蔽的TCE抗体对照如预期一样与CD3 $\delta\epsilon$ 结合(图3C,左上图)。与对照TCE相比,所有含有野生型掩蔽物(SEQ ID NO:68:QDGNEE)的M-TCE显示出明显降低的结合。该结果表明,在不影响掩蔽物与SP34结合的情况下,掩蔽物与抗体之间的接头长度可以广泛调节,长度至少为8-18AA的接头可以接受。

[0328] 当推定的掩蔽物通过8个氨基酸的接头(例如,L2:GSPLGLGS,SEQ ID NO:86)与SP34连接时,与未掩蔽的TCE SP34-CEA(图3C)相比,三个掩蔽物不同于野生型掩蔽物QDGNEE(SEQ ID NO:68)的M-TCE,即示出与SP34结合的D2E突变体(QEGNEE SEQ ID NO:76)、D2G突变体(QGGNEE SEQ ID NO:78)和G3A突变体(QDANEE SEQ ID NO:80)(图2),显示与CD3 $\delta\epsilon$ 的结合明显降低(图4,上图)。这一结果表明,在阻断SP34与CD3结合方面,这三种肽与野生型掩蔽物QDGNEE(SEQ ID NO:68)一样有效(如果不是更有效的话)。

[0329] 具有7个突变体的M-TCE显示出与SP34的低结合率或不结合(图2A),显示了与未掩蔽的TCE相似的结合曲线(数据未显示)。这些突变体不太可能成为高效的掩蔽物,因此没有进一步开发。

[0330] 在第二批中,生成并测试了更多的M-TCE构建体。

[0331] 在掩蔽物方面,检测了QDGNEE(SEQ ID NO:68)的D2E、D2G和G3A突变体。

[0332] 在接头长度方面,使用了五种接头(L2、L4、L5、L6、L7,代表总接头长度为8、12、14、16、18AA)。

[0333] 掩蔽物突变体和接头长度的组合可产生15个M-TCE(表2),其中成功产生了14个。

[0334] 我们首先检测了M-TCE与CD3 $\delta\epsilon$ 的结合(图4)。与未掩蔽的TCE相比,所有生成的突变为D2E、D2G和G3A的M-TCE与抗原的结合都显著降低。这些结果表明,M-TCE的接头长度可以在8-18AA之间变化,而不会对掩蔽物的掩蔽能力产生较大影响。在野生型掩蔽物QDGNEE中也观察到类似的结果。甚至更长或更短的接头长度也可发挥作用,这需要测试。

[0335] 蛋白酶消化移除掩蔽物

[0336] 选取7个M-TCE进行进一步分析。

[0337] 从Acrobiosystems购买了MMP9酶原(proMMP9),在MMP9消化缓冲液(50mM Tris, 10mM CaCl₂, 150mM NaCl, pH 7.6)中溶解至100 μ g/mL。加入4-氨基苯基醋酸汞(APMA)至其终浓度为1mM。将proMMP9-APMA混合物在37 $^{\circ}$ C下孵育24小时以激活proMMP9。

[0338] 选择的M-TCE经MMP9消化缓冲液调节后,与激活的MMP9混合至终浓度为100nM。样品在37 $^{\circ}$ C下孵育3小时,以使MMP9消化M-TCE。

[0339] 首先通过SDS-PAGE揭示了从M-TCE移除掩蔽物(图5A)。在消化条件下,带有8AA接头的M-TCE L2-G3R无法被消化,因为消化前后的迁移图样之间没有差异。带有12AA接头的两个M-TCE(L4-D2E和L4-G3A)可以被部分消化,因为可以观察到更快的迁移条带,但仍然能

看到一小部分原始条带。带有14AA、16AA和18AA接头的M-TCE可以完全或几乎完全被消化,因为只能看到迁移较快的条带。这些结果表明,长度为14至18的接头不仅适合阻断本研究确定的掩蔽物与SP34之间的结合,也适合蛋白酶消化来轻松移除掩蔽物。太短的接头很难移除掩蔽物,这可能是由于所使用的酶(本例中的MMP9)无法完全与其在M-TCE中的消化位点结合。

[0340] 进一步通过BLI分析未消化和消化的M-TCE与CEACAM5和CD3 $\delta\epsilon$ 的结合情况(图5B)。正如预期的那样,在MMP9消化之前,所有的蛋白质都与CEACAM5结合,并且都具有相似的结合曲线(图5B,上图),这表明M-TCE的sdAb臂的结合不受掩蔽物的影响。

[0341] 除了一个(L2-G3R)M-TCE外,其他所有M-TCE与CD3 $\delta\epsilon$ 的结合都大大降低(图5B,中图)。鉴于野生型掩蔽物的G3R突变体,即QDRNEE(SEQ ID NO:83)能够与SP34结合,这种掩蔽能力的缺乏可能是由连接其与SP34的接头造成的。如果使用不同的接头,G3R掩蔽物可能会阻止与SP34的结合。

[0342] 其余M-TCE的掩蔽物可以被成功移除。MMP9消化M-TCE后,它们与CD3 $\delta\epsilon$ 的结合能力得到了很大程度的恢复(图5B,下图),这表明掩蔽物被成功移除。该结果进一步证实了对消化的SDS-PAGE分析(图5A)。

[0343] M-TCE移除掩蔽物前后的功效

[0344] 在人PBMC存在的情况下,检测了5种消化和未消化的M-TCE对肿瘤细胞的杀伤能力。

[0345] PBMC共培养测定

[0346] 将目标细胞系(HT29)在RPMI1640培养基(添加10% FBS和2mM谷氨酰胺)中的总共 5×10^3 个细胞接种到96孔板(第0天)。在测定培养基中稀释一系列相应的抗体,并将其添加至靶细胞中。第0天,每孔添加 5×10^4 个PBMC,调节最终反应体积至200 μ l。通过活细胞乳酸脱氢酶(LDH)的释放来测定靶细胞的活性百分比(Percentage viability)。按照制造商的建议,在72小时后使用Cell Counting Kit-8(CK04,Dojindo,日本)测量LDH。使用GraphPad Prism 9软件(GraphPad software,San Diego,CA,USA)分析孔上一式三份的平均值和标准差(SD),并绘制4参数的非线性回归拟合曲线。

[0347] 图6是三个类似实验的代表性结果。在MMP9消化前后,L4-G3A M-TCE均能诱导肿瘤细胞杀伤,但掩蔽物移除前的功效要低约140倍(图6,表3)。值得注意的是,与未掩蔽的TCE相比,掩蔽物的移除并不能完全恢复M-TCE的活性,MM9消化的M-TCE的SP34-CEA:EC50约为未掩蔽TCE的10倍。

[0348] 表3. 消化和未消化的M-TCE的功效(EC₅₀)

	L4-D2E	L4-G3A	L5-D2E	L6-D2E	L7-D2G
未掩蔽			1 pM		
[0349] 未消化	650 pM	1722 pM	418 pM	317 pM	96 pM
MMP9 消化	11 pM	12 pM	13 pM	10 pM	11 pM
消化 vs. 掩蔽	59x	144x	32x	32x	9x

[0350] 包括L4-D2E、L5-D2E、L6-D2E和L7-D2G的其他M-TCE也有类似的结果。在这些情况下,所有MMP9消化的M-TCE都比未消化的M-TCE在诱导杀伤肿瘤细胞方面都表现出更高的功效,但它们的功效都不如未掩蔽的TCE。

[0351] 重链掩蔽物、轻链掩蔽物和双掩蔽物的表征

[0352] 如图3A所示,掩蔽物在SP34的重链、轻链或甚至这两条链上融合都可能生成M-TCE。为了评估链选择自由的可行性,将一个掩蔽物G3A(QDANEE)通过一个(单个掩蔽物)或两个(两个掩蔽物)12AA的接头L4(GSGSPLGLGSGS, SEQ ID NO:88)与SP34 TCE的VH、VL以及VH和VL二者融合。由此产生了三个M-TCE (SP34-L4-G3A、SP34-LC-L4-G3A和SP34-2XL4-G3A),再加上一个未掩蔽的对照SP34-CEA,对它们进行了表征。

[0353] 通过上述方法用MMP9消化蛋白质,并通过测定消化和未消化蛋白质与CD3 $\delta\epsilon$ 的结合进行分析(图7)。对照抗体SP34-CEA与抗原的结合符合预期(左上)。蛋白质的消化不影响结合(左下)。

[0354] 与对照蛋白相比,在MMP消化之前,所有三种M-TCE都显示出与CD3 $\delta\epsilon$ 的结合能力下降(上图)。用MMP9消化三个M-TCE(下图),部分(双掩蔽物的M-TCE SP34-2XL4-CEA)或大部分恢复了结合能力(单掩蔽物的M-TCE SP34-L4-CEA和SP34-LC-L4-CEA)。这一结果清楚地表明,掩蔽物既可以置于SP34的重链上,也可以置于轻链上,或者甚至可以置于SP34的这两条链上,但双掩蔽物的M-TCE的掩蔽效果不如两个单掩蔽物的M-TCE强,双掩蔽物的M-TCE的掩蔽物移除效果也比不上单掩蔽物的M-TCE。

[0355] 总之,我们的研究确定了CD3 ϵ N端肽的突变体,并利用这些突变肽阻断了抗CD3抗体SP34的结合。这些掩蔽物通过蛋白酶敏感的头与SP34连接,只能在富含蛋白酶的环境中被激活,从而可潜在地用于生成基于CD3的T细胞衔接器。

[0356] 其他实施方案

[0357] 应当理解,虽然本发明已结合其细节进行了描述,但上述描述旨在说明而不是限制本发明的范围,本发明的范围由所附权利要求书的范围界定。其他方面、优点和修改均在于所附权利要求的范围之内。

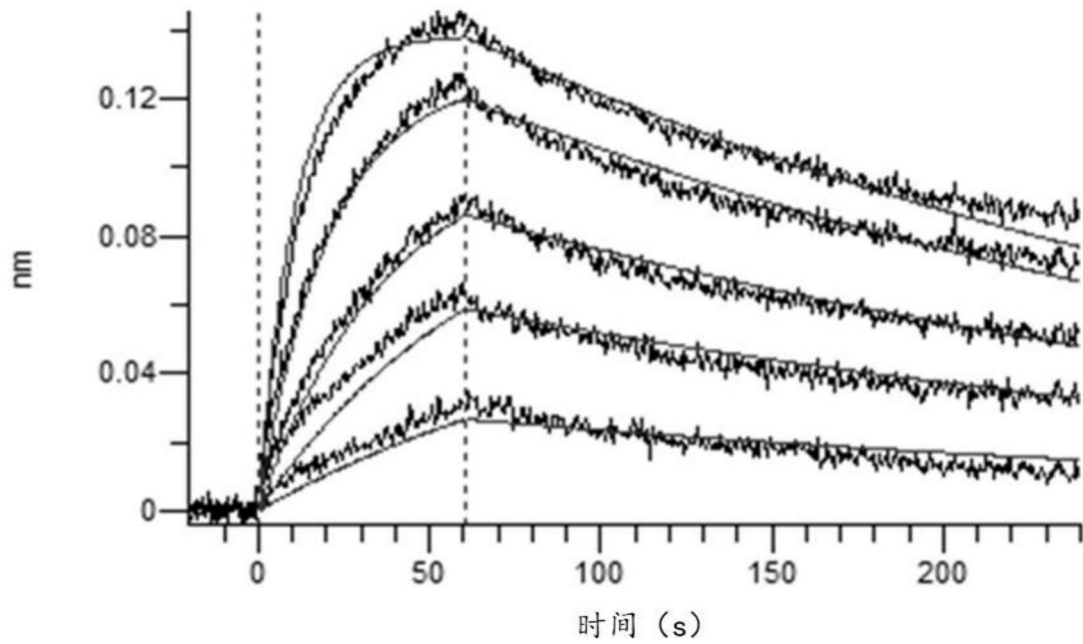


图1A

CD3ε

QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNI GGDEDDKN
IGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARV

CD3ε-p1 (AA1-5) : QDGNEGGGGS- 生物素

CD3ε-p2 (AA1-8) : QDGNEEMGGGGS- 生物素

CD3ε-p3 (AA1-11) : QDGNEEMGGITGGGGS- 生物素

CD3ε-p4 (AA1-14) : QDGNEEMGGITQTPGGGGS- 生物素

CD3ε-p5 (AA1-17) : QDGNEEMGGITQTPYKVGGGGS- 生物素

CD3ε-p6 (AA1-20) : QDGNEEMGGITQTPYKVSISGGGGS- 生物素

CD3ε-p7 (AA1-23) : QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTGGGGS- 生物素

CD3ε-p8 (AA1-27) : QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTGGGGS- 生物素

图1B

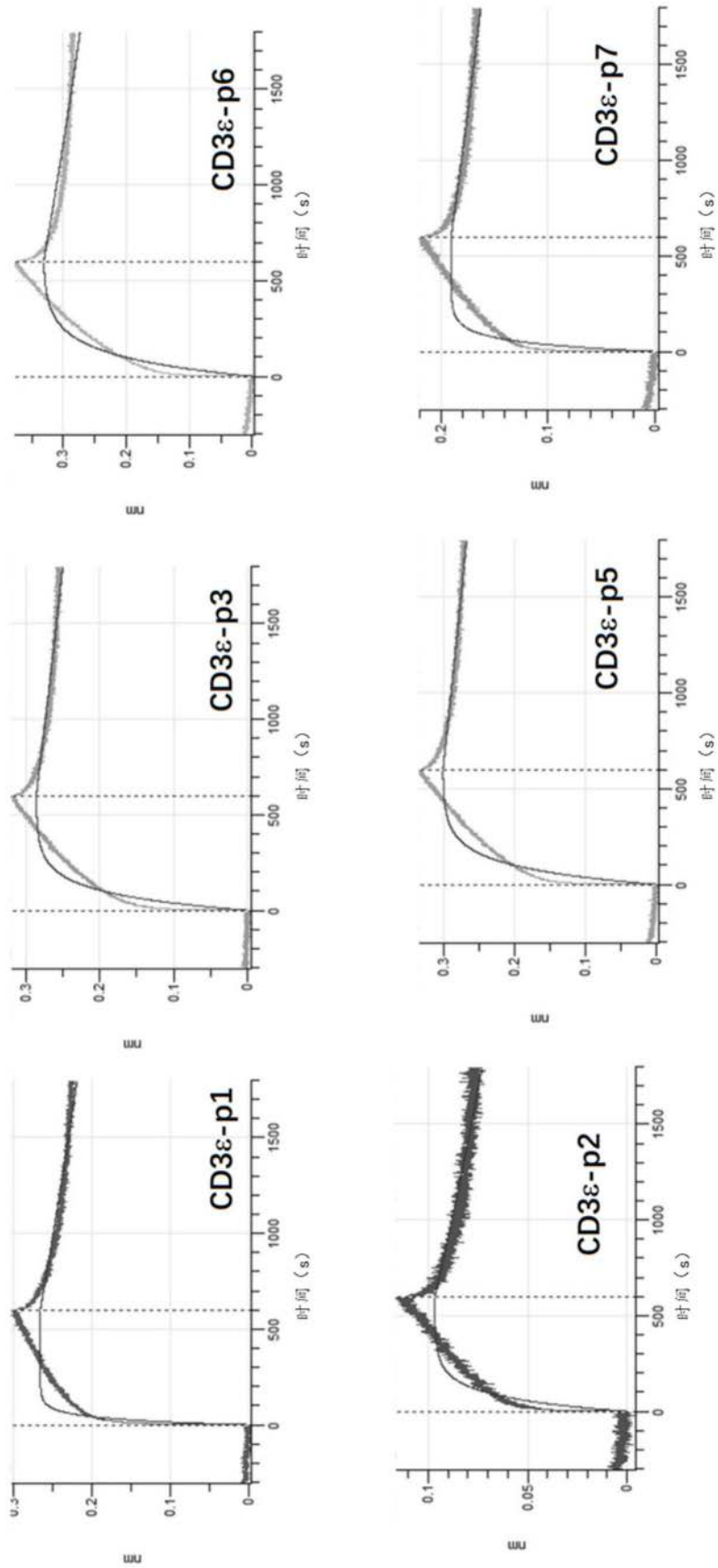


图1C

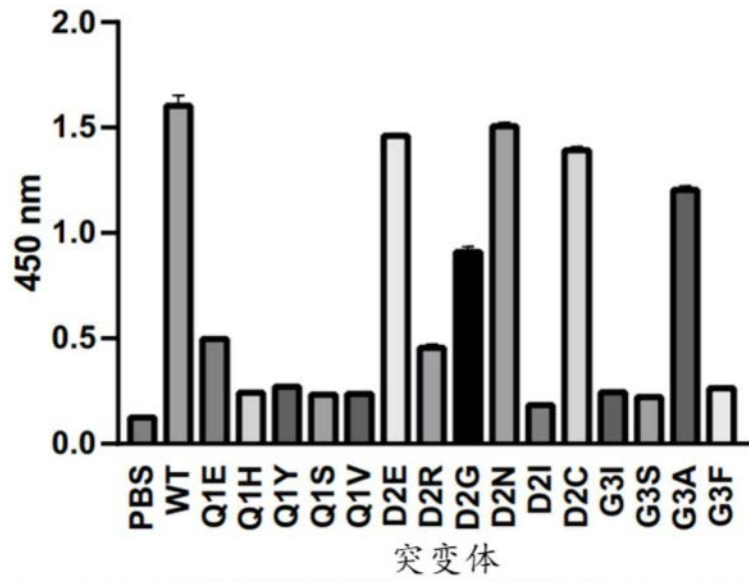


图2A

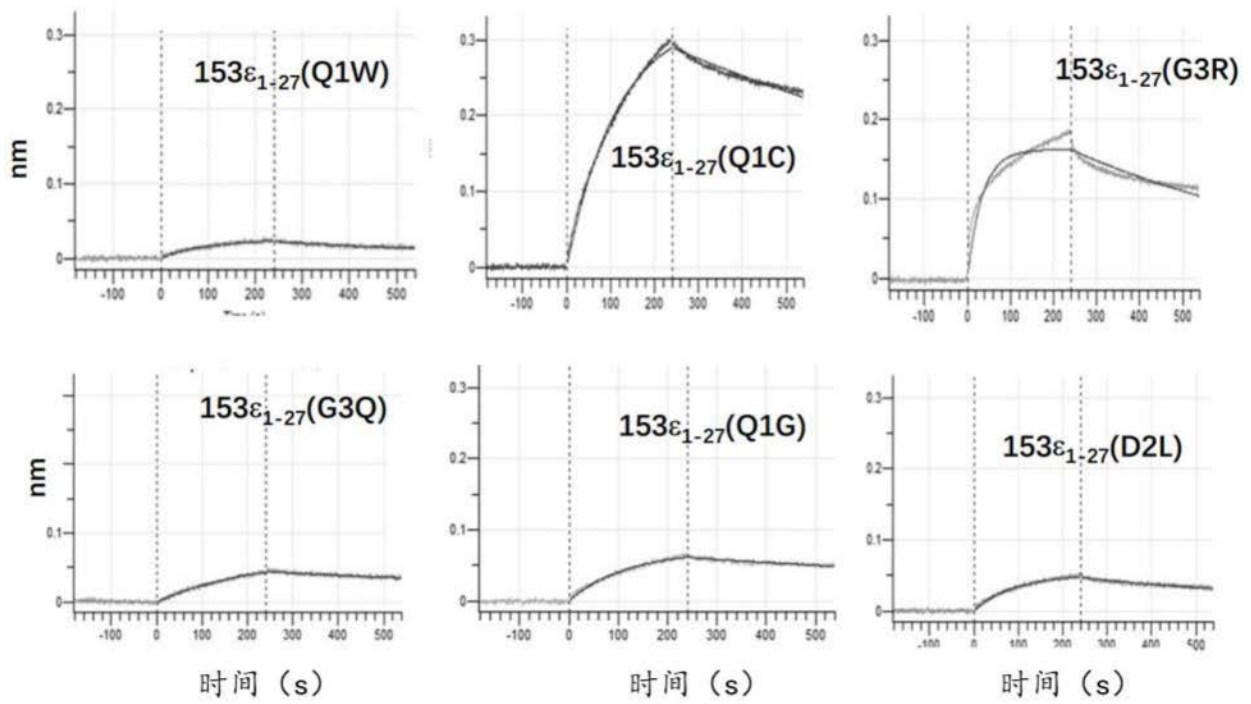


图2B

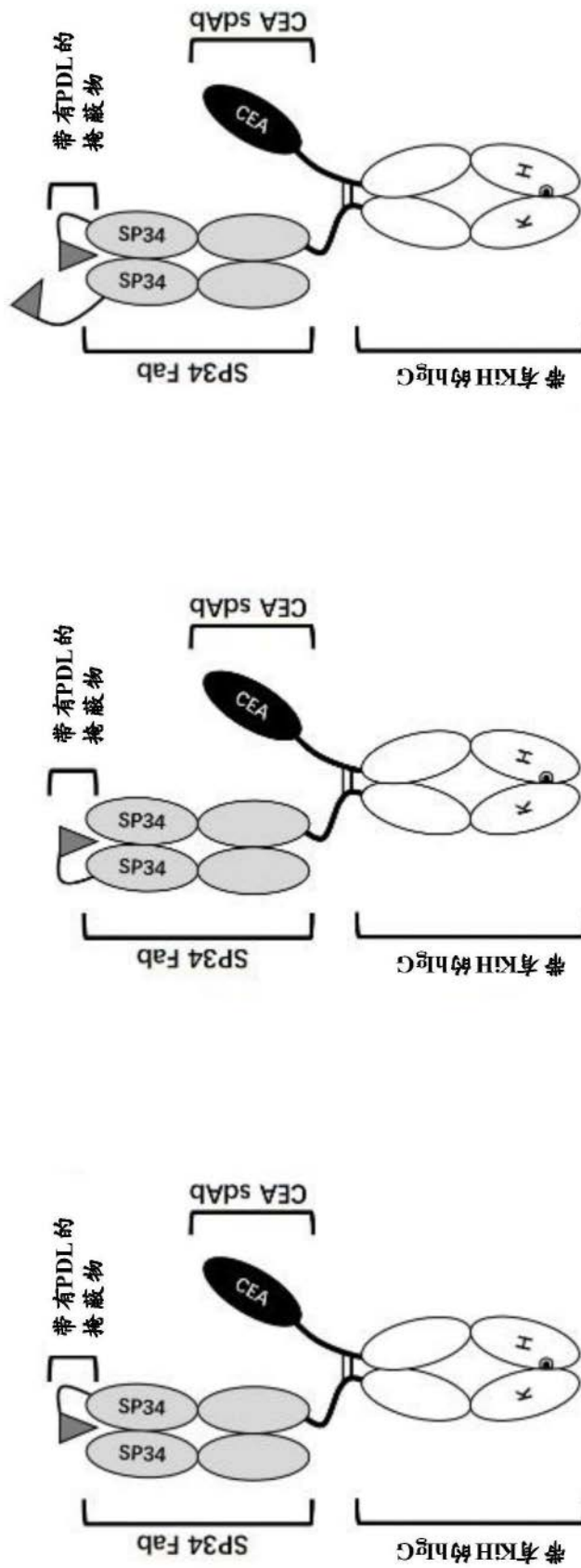


图3A

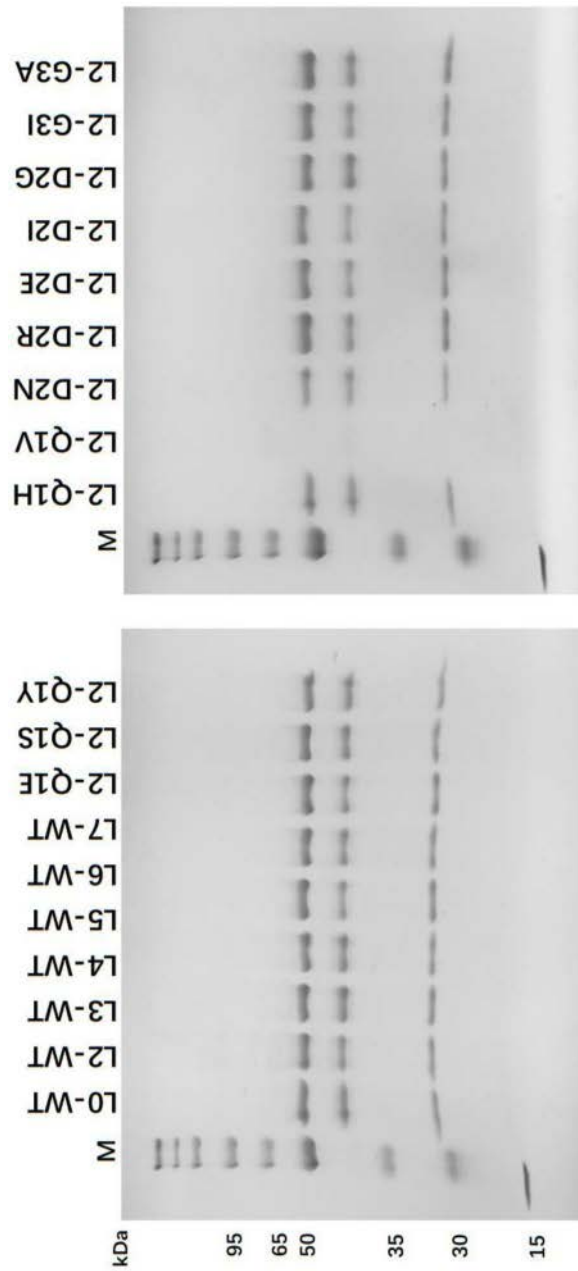


图3B

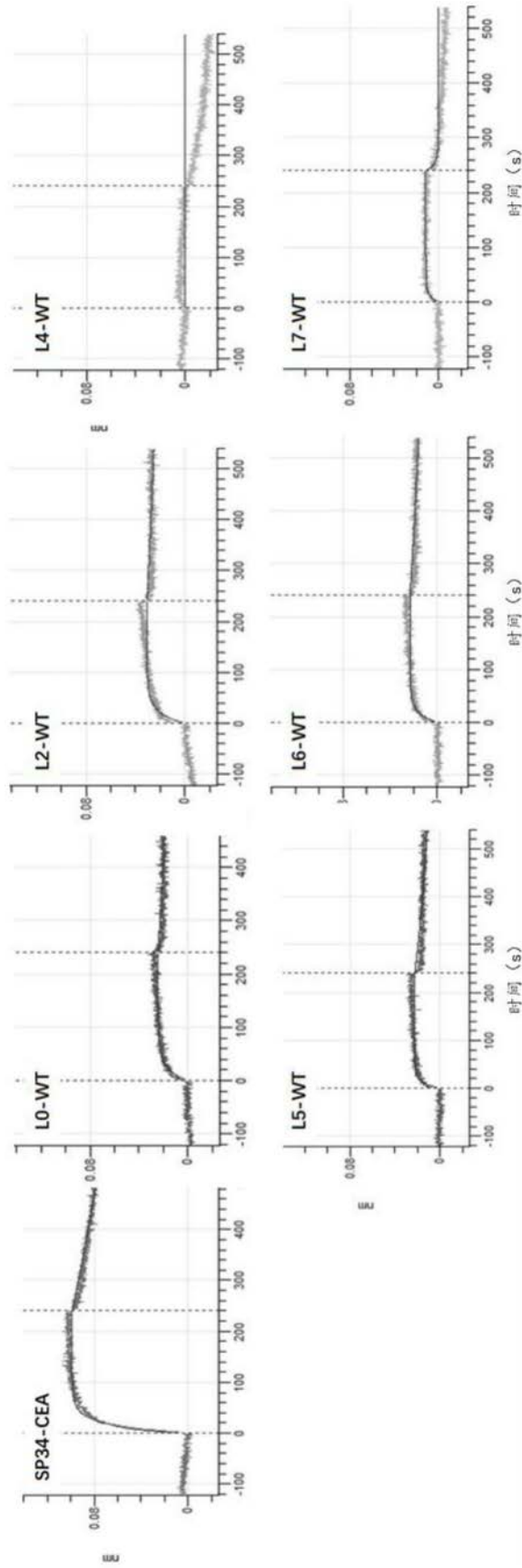


图3C

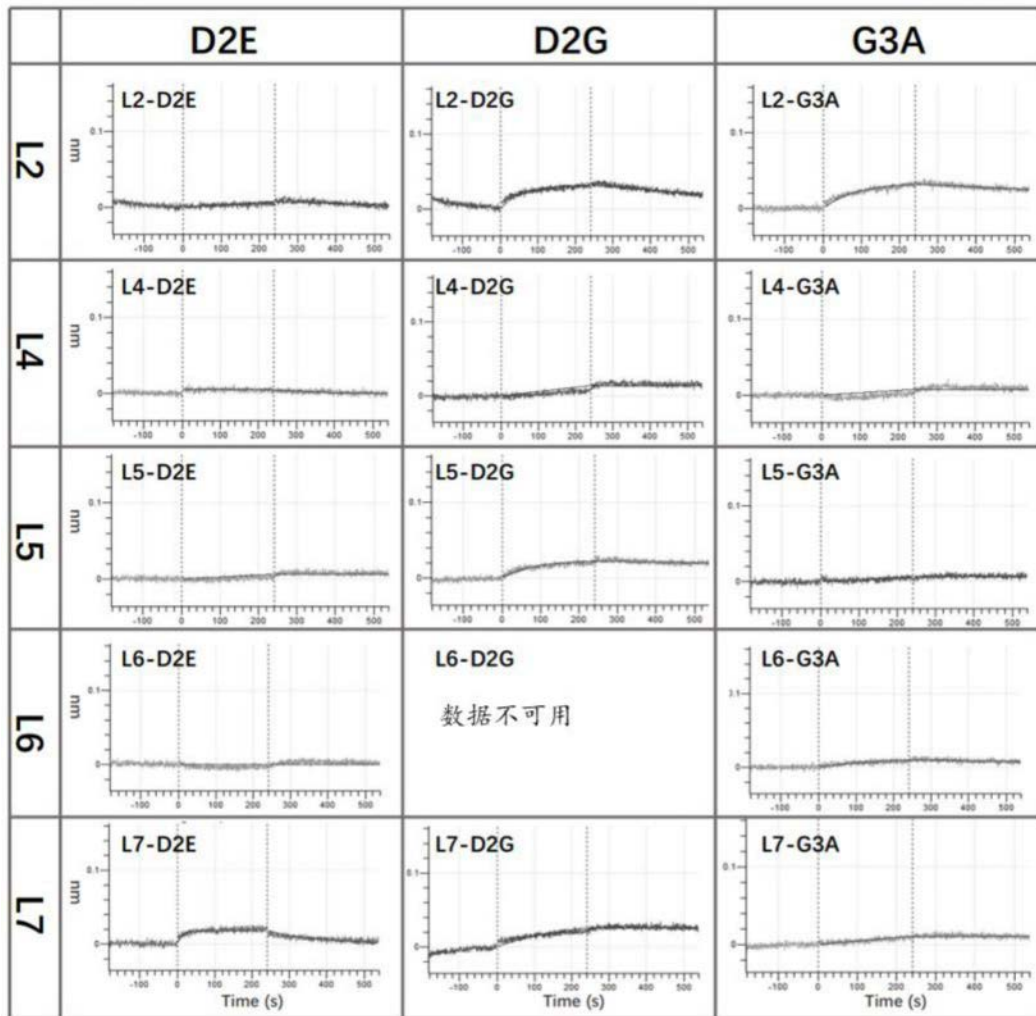


图4

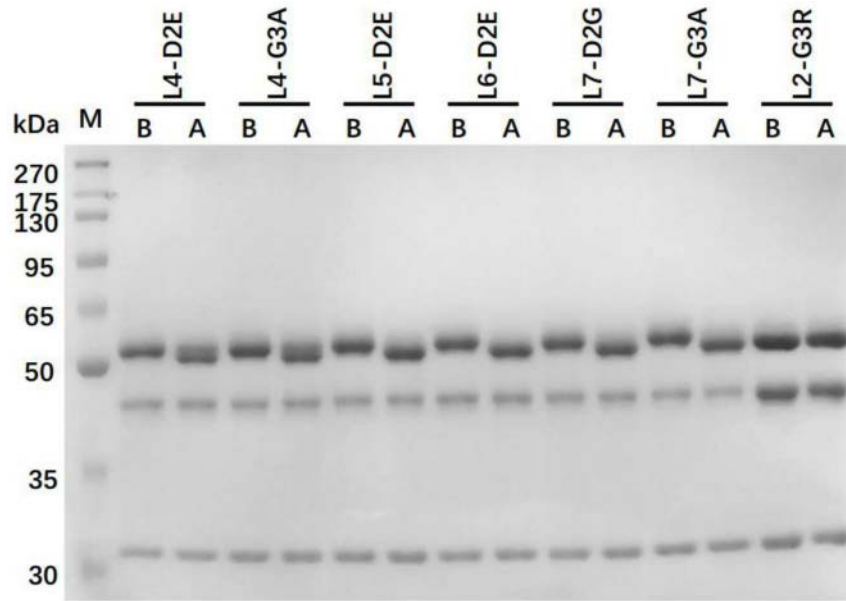


图5A

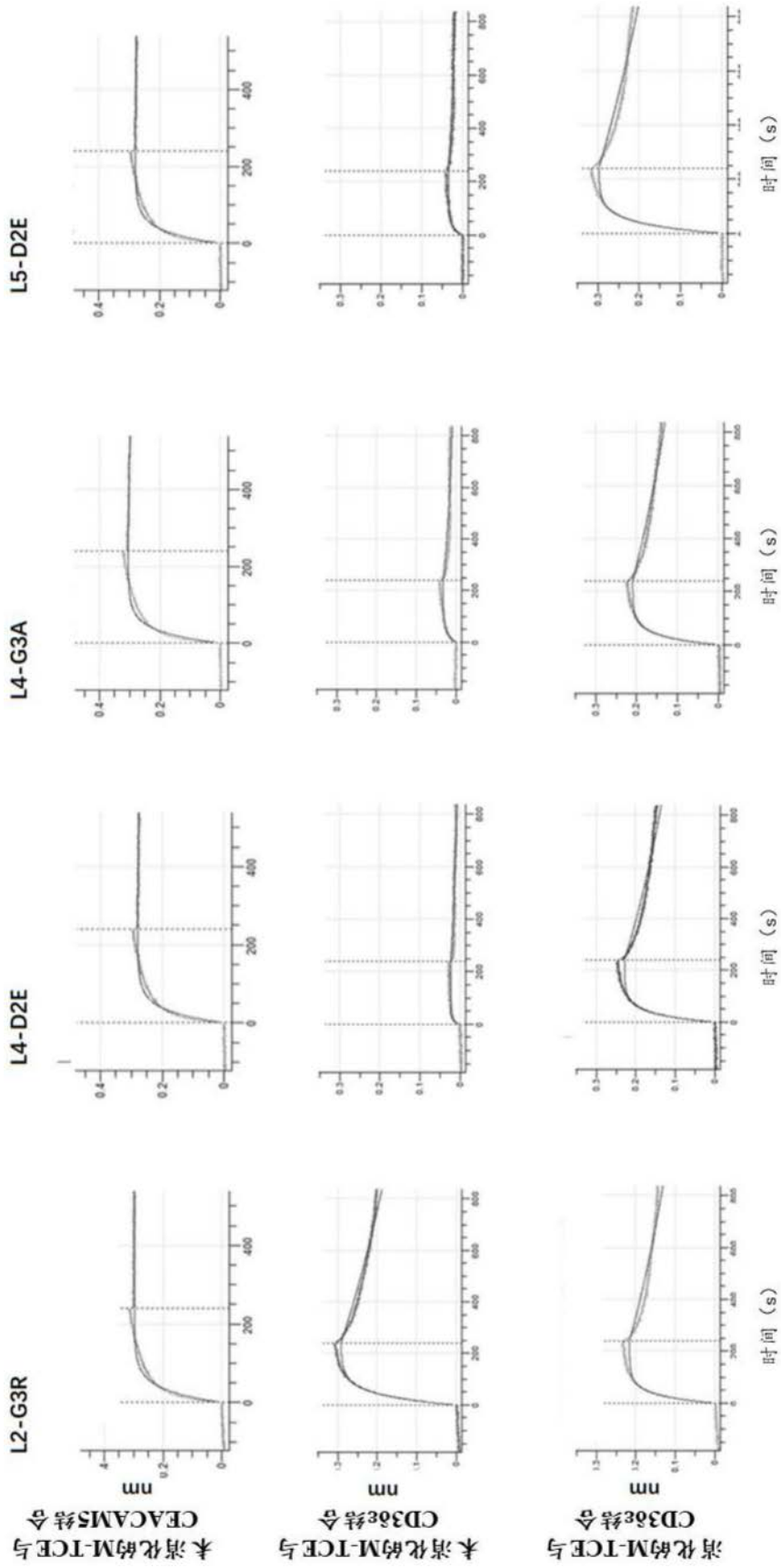


图5B

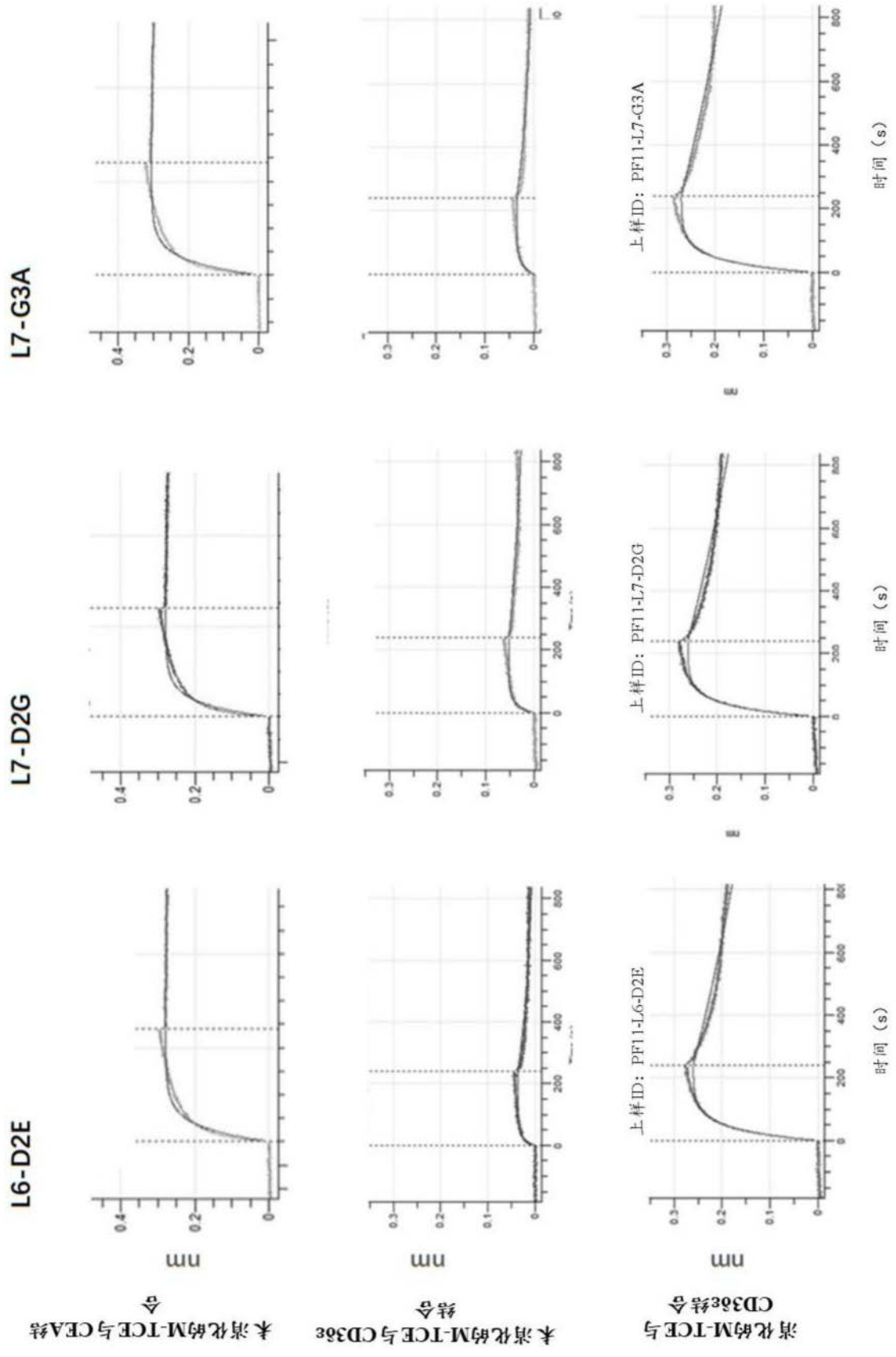


图5B(续)

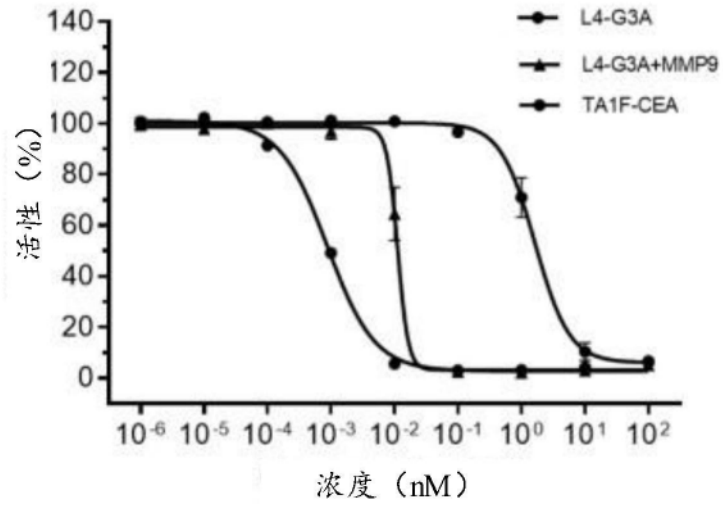


图6A

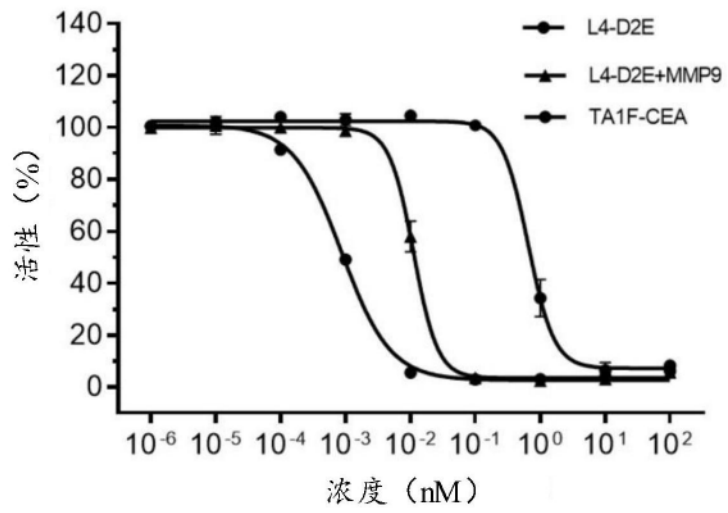


图6B

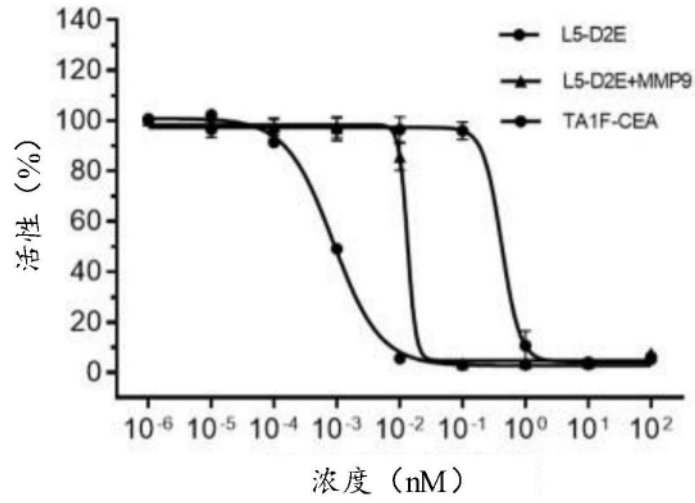


图6C

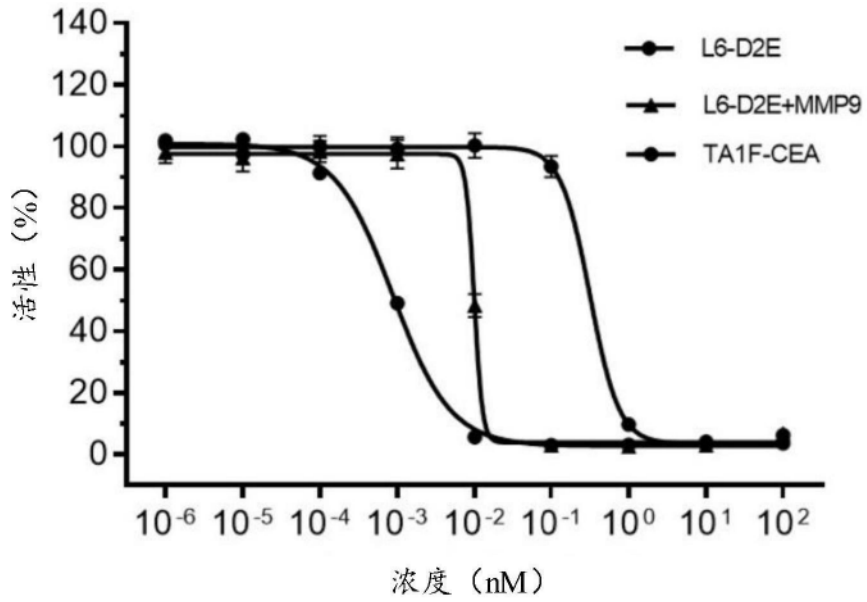


图6D

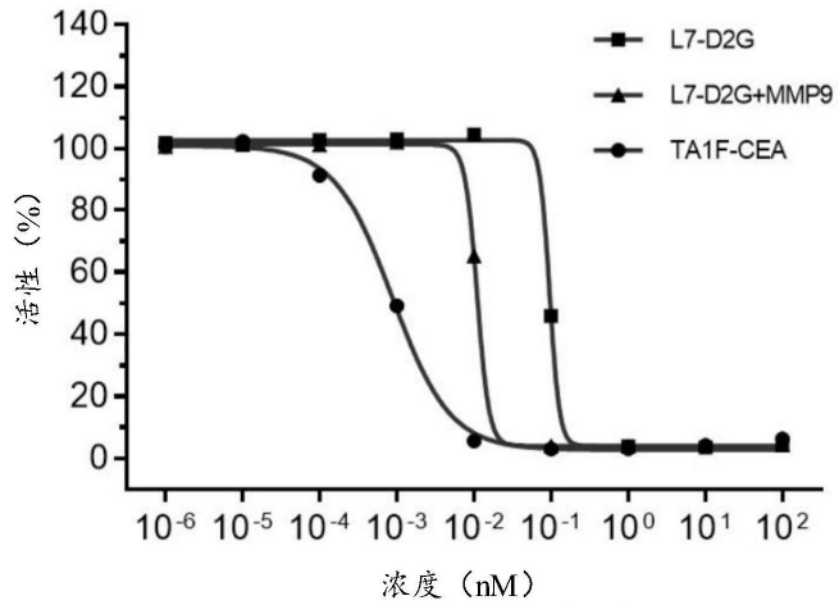


图6E

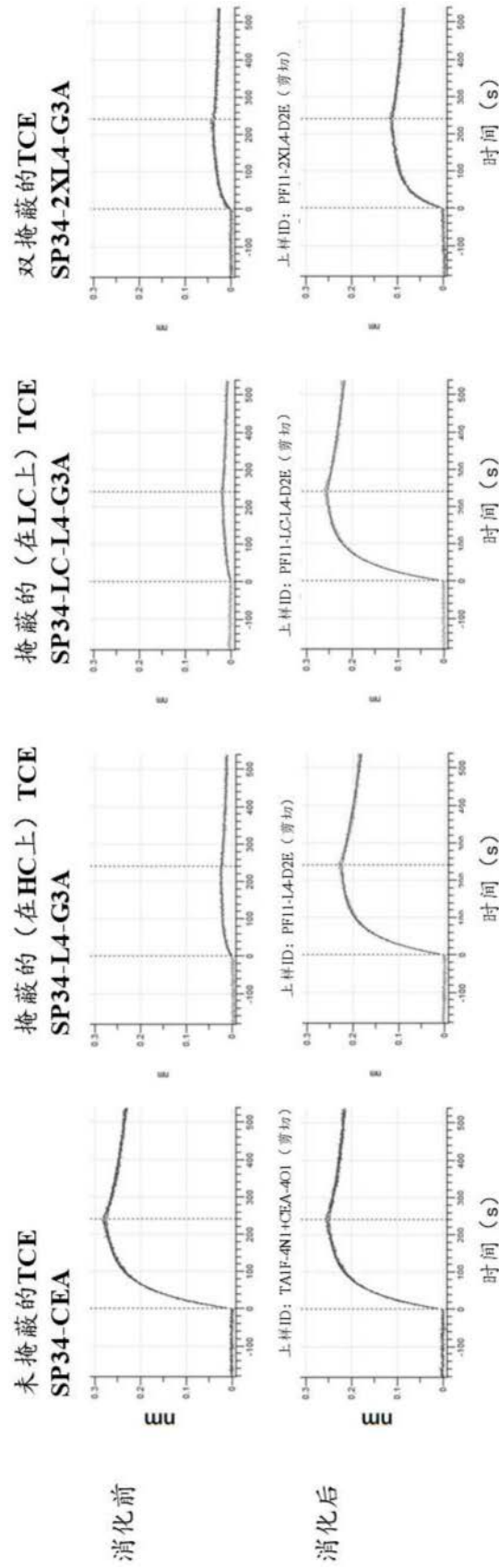


图7

SEQ ID	名称	序列
1	SP34 VH	EVKLLESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSILYLQMNNLKTEDTA MYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
2	SP34 VL	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTG LIGGTNKRAGVVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNL WVFGGGTKVEIK
3	CD3e	QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGD EDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARV
4	CD3ep1	QDGNEGGGGS
5	CD3ep2	QDGNEEMGGGGGS
6	CD3ep3	QDGNEEMGGITGGGGGS
7	CD3ep4	QDGNEEMGGITQTPGGGGGS
8	CD3ep5	QDGNEEMGGITQTPYKVGGGGS
9	CD3ep6	QDGNEEMGGITQTPYKVSISGGGGGS
10	CD3ep7	QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTGGGGGS
11	CD3ep8	QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTGGGGGS
12	L0-WT	QDGNEEPLGL
13	L2-WT	QDGNEEGSPLGLGS
14	L3-WT	QDGNEESGSPLGLSGG
15	L4-WT	QDGNEEGSGSPLGLGSGS
16	L5-WT	QDGNEESSGGSPGLLSSGGGS
17	L6-WT	QDGNEESSGGGSPLGLSSGGGS
18	L7-WT	QDGNEESSGGSGSPLGLSSGGSGS
19	L2-Q1E	EDGNEEGSPLGLGS
20	L2-Q1S	SDGNEEGSPLGLGS
21	L2-Q1Y	YDGNEEGSPLGLGS
22	L2-Q1H	HDGNEEGSPLGLGS
23	L2-Q1V	VDGNEEGSPLGLGS
24	L2-D2N	QNGNEEGSPLGLGS
25	L2-D2R	QRGNEEGSPLGLGS
26	L2-D2E	QEGNEEGSPLGLGS
27	L4-D2E	QEGNEEGSGSPLGLGSGS
28	L5-D2E	QEGNEESSGGSPGLLSSGGGS
29	L6-D2E	QEGNEESSGGGSPLGLSSGGGS
30	L7-D2E	QEGNEESSGGSGSPLGLSSGGSGS
31	L2-D2I	QIGNEEGSPLGLGS
32	L2-D2G	QGGNEEGSPLGLGS
33	L4-D2G	QGGNEEGSGSPLGLGSGS
34	L5-D2G	QGGNEESSGGSPGLLSSGGGS

图8

35	L6-D2G	QGGNEESSGGGSPLGLSSGGGS
36	L7-D2G	QGGNEESSGGSGSPLGLSSGGSGS
37	L2-G3I	QDINEEGSPLGLGS
38	L2-G3A	QDANEEGSPLGLGS
39	L4-G3A	QDANEEGSGSPLGLGSGS
40	L5-G3A	QDANEESSGGGSPLGLSSGGGS
41	L6-G3A	QDANEESSGGGSPLGLSSGGGS
42	L7-G3A	QDANEESSGGSGSPLGLSSGGSGS
43	L2-G3R	QDRNEEGSPLGLGS
44	L4-G3R	QDRNEEGSGSPLGLGSGS
45	L6-G3R	QDRNEESSGGGSPLGLSSGGGS
46	SP34 VHCDR1	GFTFNTYA
47	SP34 VHCDR2	IRSKYNNYAT
48	SP34 VHCDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
49	SP34 VLCDR1	TGAVTTSNY
50	SP34 VLCDR2	GTN
51	SP34 VLCDR3	ALWYSNLWV
52	CEA VHH	EVKLLESGGGLVQPKGSLKLSAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSILYLQMNNLKTEDTA MYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
53	CEA VHH CDR1	GFTFNTYA
54	CEA VHH CDR3	IRSKYNNYAT
55	CEA VHH CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
56	CEA	EVQLVESGGGFVQAGESLTLSTSTLFTPYRMAWYRQAPGKQRD VADISSGDGRITNYADFAKGRFTISRDNKNTVFLRMTNLKPEDAVVY CNTFVSFVGIARSWGQGTQTVSS
57	SP34-knob	EVKLLESGGGLVQPKGSLKLSAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSILYLQMNNLKTEDTA MYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL PSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSL
58	SP34-LC	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTG LIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNL WVFGGKTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图8 (续)

59	CEA-Hole	EVQLVESGGGFVQAGESLTLSCTSTLTFTPYRMAWYRQAPGKQRDL VADISSGDGRITNYADFAKGRFTISRDNKNTVFLRMTNLKPEDTAVYY CNTFVSVFVIARSWGQGTQVTVSSESKYGPCCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPVETCVVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKISK AKGQPREPQVCTLPSSQEEMTKNQVLSLCAVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSEFLVSRLLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNRFTQKSLSL
60	CD3ep1	QDGNE
61	CD3ep2	QDGNEEMG
62	CD3ep3	QDGNEEMGGIT
63	CD3ep4	QDGNEEMGGITQTP
64	CD3ep5	QDGNEEMGGITQTPYKV
65	CD3ep6	QDGNEEMGGITQTPYKVSIS
66	CD3ep7	QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTT
67	CD3ep8	QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILT
68	CD3e- WT	QDGNEE
69	CD3e- Q1E	EDGNEE
70	CD3e- Q1S	SDGNEE
71	CD3e- Q1Y	YDGNEE
72	CD3e- Q1H	HDGNEE
73	CD3e- Q1V	VDGNEE
74	CD3e- D2N	QNGNEE
75	CD3e- D2R	QRGNEE
76	CD3e- D2E	QEGNEE
77	CD3e- D2I	QIGNEE
78	CD3e- D2G	QGGNEE
79	CD3e- G3I	QDINEE
80	CD3e- G3A	QDANEE
81	CD3e- Q1C	CDGNEE
82	CD3e- D2C	QCGNEE
83	CD3e- G3R	QDRNEE
84	GGGGS	GGGGS
85	L0	PLGL
86	L2	GSPLGLGS
87	L3	SGSPLGLSGG
88	L4	GSGSPLGLGSGS
89	L5	SSGGSPGLSSGGGS
90	L6	SSGGSPGLSSGGGS
91	L7	SSGGSPGLSSGGGS
92	掩蔽肽	X ₁ X ₂ X ₃ NE
93	掩蔽肽	X ₁ X ₂ X ₃ NEE

图8(续)