



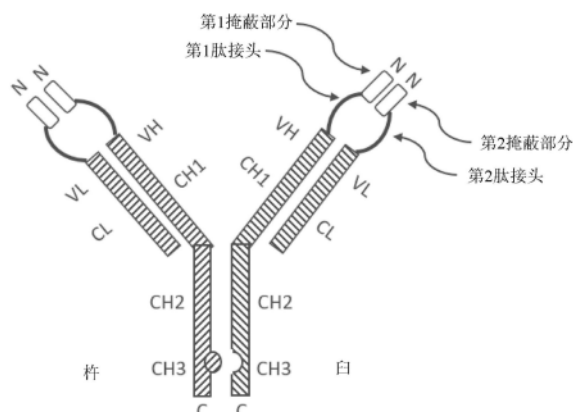
(43) 申请公布日 2022.12.16

(72) 发明人 张延良 G·F·考夫曼 白静怡

权利要求书8页 说明书95页 附图42页

具有通用掩蔽部分的可活化的抗原结合蛋

本公开提供了可活化的掩蔽抗原结合蛋白，其包括通过肽接头与通用掩蔽部分连接的抗原结合蛋白。所述通用掩蔽部分彼此二聚化以形成二聚化掩蔽复合物，所述二聚化掩蔽复合物阻断抗原结合结构域与其靶抗原之间的结合。单独掩蔽部分和所述二聚化掩蔽复合物不与所述抗原结合结构域特异性结合。所述掩蔽部分形成稳定的二聚体，因为所述掩蔽部分的彼此缔合模拟了在天然存在的免疫球蛋白或细胞受体分子中发现的同二聚体或异二聚体。所述掩蔽部分的所述二聚化不涉及共价键合，并且可以通过借助于如杵臼结构等结构互补性工程化链间缔合来优化所述二聚化。



1. 一种具有IgG型抗体结构的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白包括:

a) 第一抗原结合结构域,所述第一抗原结合结构域包括第一重链可变区和第一轻链可变区,以及

b) 第二抗原结合结构域,所述第二抗原结合结构域包括第二重链可变区和第二轻链可变区,其中

(i) 所述第一重链可变区的N末端通过具有第一可切割位点的第一肽接头与第一掩蔽部分接合,

(ii) 所述第一轻链可变区的N末端通过具有第二可切割位点的第二肽接头与第二掩蔽部分接合,

(iii) 所述第一掩蔽部分和所述第二掩蔽部分不与所述第一抗原结合结构域特异性结合,

(iv) 所述第一可切割位点能被第一蛋白酶切割,并且

(v) 所述第二可切割位点能被第二蛋白酶切割,并且其中

(vi) 所述第二重链可变区的N末端通过具有第三可切割位点的第三肽接头与第三掩蔽部分接合,

(vii) 所述第二轻链可变区的N末端通过具有第四可切割位点的第四肽接头与第四掩蔽部分接合,

(viii) 所述第三掩蔽部分和所述第四掩蔽部分不与所述第二抗原结合结构域特异性结合,

(ix) 所述第三可切割位点能被第三蛋白酶切割,并且

(x) 所述第四可切割位点能被第四蛋白酶切割,

其中所述第一可切割位点、所述第二可切割位点、所述第三可切割位点和所述第四可切割位点能被相同的蛋白酶或不同的蛋白酶切割。

2. 根据权利要求1所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其能够与靶抗原结合(例如,单特异性抗体)。

3. 根据权利要求1所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其能够与两种不同的靶抗原结合(例如,双特异性抗体)。

4. 根据权利要求1所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其中所述第一掩蔽部分和所述第二掩蔽部分彼此缔合以减少所述第一抗原结合结构域与其靶抗原的结合。

5. 根据权利要求1所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其中所述第一掩蔽部分和所述第二掩蔽部分在不形成共价键的情况下彼此缔合以减少所述第一抗原结合结构域与其靶抗原的结合。

6. 根据权利要求1所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其中所述第一掩蔽部分的氨基酸序列被突变以形成杵或臼。

7. 根据权利要求1所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其中所述第二掩蔽部分的氨基酸序列被突变以形成臼或杵。

8. 根据权利要求1所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其中所述第一掩蔽部分和/或所述第二掩蔽部分衍生自选自自由以下组成的组的免疫球蛋白恒定区:CL(λ)、CL(κ)、CH1、CH2

和CH3。

9. 根据权利要求1所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其中所述第一掩蔽部分和所述第二掩蔽部分衍生自T细胞受体 α (alpha) 和 β (beta) 恒定区。

10. 根据权利要求1所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其中所述第一掩蔽部分和所述第二掩蔽部分彼此缔合为同二聚体或异二聚体。

11. 根据权利要求1所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其中所述第一可切割位点和所述第二可切割位点能被相同或不同的蛋白酶切割。

12. 根据权利要求1所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其中所述第三掩蔽部分和所述第四掩蔽部分彼此缔合以减少所述第二抗原结合结构域与其靶抗原的结合。

13. 根据权利要求1所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其中所述第三掩蔽部分和所述第四掩蔽部分在不形成共价键的情况下彼此缔合以减少所述第二抗原结合结构域与其靶抗原的结合。

14. 根据权利要求1所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其中所述第三掩蔽部分的氨基酸序列被突变以形成杵或臼。

15. 根据权利要求1所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其中所述第四掩蔽部分的氨基酸序列被突变以形成臼或杵。

16. 根据权利要求1所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其中所述第三掩蔽部分和/或所述第四掩蔽部分衍生自选自以下组成的组的免疫球蛋白恒定区:CL (λ)、CL (κ)、CH1、CH2和CH3。

17. 根据权利要求1所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其中所述第三掩蔽部分和所述第四掩蔽部分衍生自T细胞受体 α (alpha) 和 β (beta) 恒定区。

18. 根据权利要求1所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其中所述第三掩蔽部分和所述第四掩蔽部分彼此缔合为同二聚体或异二聚体。

19. 根据权利要求1所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其中所述第三可切割位点和所述第四可切割位点能被相同或不同的蛋白酶切割。

20. 根据权利要求1所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其中所述第一可切割位点、所述第二可切割位点、所述第三可切割位点和所述第四可切割位点能被相同或不同的蛋白酶切割。

21. 根据权利要求1所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其包括非活性状态的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其中所述第一可切割位点、所述第二可切割位点、所述第三可切割位点和所述第四可切割位点处于完整状态(未切割),并且其中所述非活性状态的可活化的掩蔽抗原结合蛋白与活化状态的可活化的掩蔽抗原结合蛋白相比以降低的水平与其靶抗原结合,所述活化状态的可活化的掩蔽抗原结合蛋白具有处于切割状态的所述第一可切割位点、所述第二可切割位点、所述第三可切割位点和/或所述第四可切割位点中的任一个或两个或更多的任何组合。

22. 根据权利要求1所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其能够与EGFR抗原结合。

23. 根据权利要求1所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其能够与CD38抗原结合。

24. 根据权利要求1所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其中所述第一重链可变区和/或所述第二重链可变区包括抗EGFR重链可变区,所述抗EGFR重链可变区包括与SEQ IDNO:2

或4的一部分或全长具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

25. 根据权利要求1所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其中所述第一重链可变区和/或所述第二重链可变区包括抗CD38重链可变区,所述抗CD38重链可变区包括与SEQ ID NO: 7、9、11、13、14、15、16、17、18或20的一部分或全长具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

26. 根据权利要求1所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其中所述第一轻链可变区和/或所述第二轻链可变区包括抗EGFR轻链可变区,所述抗EGFR轻链可变区包括与SEQ ID NO: 3或5的一部分或全长具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

27. 根据权利要求1所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其中所述第一轻链可变区和/或所述第二轻链可变区包括抗CD38轻链可变区,所述抗CD38轻链可变区包括与SEQ ID NO: 8、10、12或19的一部分或全长具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

28. 根据权利要求1所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其中所述第一掩蔽部分和/或所述第三掩蔽部分包括SEQ ID NO: 21-31的氨基酸序列中的任一个。

29. 根据权利要求1所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其中所述第二掩蔽部分和/或所述第四掩蔽部分包括SEQ ID NO: 21-31的氨基酸序列中的任一个。

30. 根据权利要求1所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其中所述第一肽接头和/或所述第三肽接头包括SEQ ID NO: 32-40的氨基酸序列中的任一个。

31. 根据权利要求1所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其中所述第二肽接头和/或所述第四肽接头包括SEQ ID NO: 32-40的氨基酸序列中的任一个。

32. 根据权利要求1所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其进一步包括与毒素接合的化学接头。

33. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白和药学上可接受的赋形剂。

34. 一种能够检测蛋白酶存在的诊断剂,所述诊断剂包括与可检测部分接合的根据权利要求1所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白或未与可检测部分接合的根据权利要求1所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其中所述可检测部分包括放射性部分、比色部分、抗原部分、酶部分、生物素部分、链霉亲和素部分或蛋白A部分。

35. 一种用于体外和/或体内使用的试剂盒,所述试剂盒包括根据权利要求1所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白。

36. 一种第一核酸,其编码根据权利要求1所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白的第一多肽,其中所述第一多肽包括与第一肽接头和第一掩蔽部分接合的第一重链可变区,其中所述第一肽接头包括第一可切割位点。

37. 一种第二核酸,其编码根据权利要求1所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白的第二多肽,其中所述第二多肽包括与第二肽接头和第二掩蔽部分接合的第一轻链可变区,其中所述第二肽接头包括第二可切割位点。

38. 一种第三核酸,其编码根据权利要求1所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白的第三多肽,其中所述第三多肽包括与第三肽接头和第三掩蔽部分接合的第二重链可变区,其中所述第三肽接头包括第三可切割位点。

39. 一种第四核酸,其编码根据权利要求1所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白的第四多肽,其中所述第四多肽包括与第四肽接头和第四掩蔽部分接合的第二轻链可变区,其中所

述第四肽接头包括第四可切割位点。

40. 一种表达载体,其包括根据权利要求36至39中任一项所述的第一核酸、第二核酸、第三核酸或第四核酸。

41. 一种表达载体,其包括根据权利要求36至39中任一项所述的第一核酸、第二核酸、第三核酸和/或第四核酸中的任一种或两种或更多种的任何组合。

42. 一种宿主细胞或宿主细胞群,其携带根据权利要求40所述的表达载体。

43. 一种宿主细胞或宿主细胞群,其携带根据权利要求41所述的表达载体中的任一种或两种或更多种的任何组合。

44. 一种用于制备多肽的方法,所述方法包括:在适于由根据权利要求42所述的宿主细胞群表达第一多肽、第二多肽、第三多肽或第四多肽的条件下培养所述宿主细胞群,其中所述宿主细胞群中的单独宿主细胞携带表达载体,所述表达载体与编码可活化的掩蔽抗原结合蛋白的第一多肽、第二多肽、第三多肽或第四多肽的核酸可操作地连接。

45. 根据权利要求44所述的方法,其进一步包括:从所述宿主细胞群中分离所表达的第一多肽、第二多肽、第三多肽或第四多肽。

46. 根据权利要求45所述的方法,其进一步包括:回收所表达的第一多肽、第二多肽、第三多肽或第四多肽。

47. 一种用于制备至少一种多肽的方法,所述方法包括:在适于由根据权利要求43所述的宿主细胞群表达第一多肽、第二多肽、第三多肽和/或第四多肽中的任一种或两种或更多种的任何组合的条件下培养所述宿主细胞群,其中所述宿主细胞群中的单独宿主细胞携带一种或多种表达载体,所述一种或多种表达载体各自与编码可活化的掩蔽抗原结合蛋白的第一多肽、第二多肽、第三多肽和/或第四多肽中的任一种或两种或更多种的任何组合的核酸可操作地连接。

48. 根据权利要求47所述的方法,其进一步包括:从所述宿主细胞群中分离所述第一多肽、所述第二多肽、所述第三多肽和/或所述第四多肽。

49. 根据权利要求47所述的方法,其中所述培养条件适于将所述第一多肽和所述第二多肽彼此缔合以形成第一二聚化掩蔽复合物并形成第一抗原结合结构域,和/或适于将所述第三多肽和所述第四多肽彼此缔合以形成第二二聚化掩蔽复合物并形成第二抗原结合结构域。

50. 根据权利要求48所述的方法,其进一步包括:回收所述缔合的第一多肽和第二多肽,或者回收所述缔合的第三多肽和第四多肽,或者回收所述第一多肽、所述第二多肽、所述第三多肽和所述第四多肽。

51. 一种用于切割根据权利要求1所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白的至少一个肽接头的方法,所述方法包括:

a) 使至少一种蛋白酶与处于非活性形式的所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白接触,其中第一肽接头、第二肽接头、第三肽接头和第四肽接头处于未切割状态;以及

b) 切割所述肽接头中的至少一个以将所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白转化为活化形式。

52. 根据权利要求51所述的方法,其进一步包括:将现在处于所述活化状态的所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白与靶抗原结合。

53. 一种用于检测由来自受试者的肿瘤产生的蛋白酶的存在的体外方法,所述方法包括:

a) 使 (i) 从所述受试者获得的肿瘤与 (ii) 处于未切割状态的根据权利要求1所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白接触,其中所述肿瘤样品产生切割第一肽接头、第二肽接头、第三肽接头和/或第四肽接头中的至少一个的蛋白酶;以及

b) 检测来自切割所述第一肽接头、所述第二肽接头、所述第三肽接头和/或所述第四肽接头的切割产物;以及

c) 通过检测第一切割产物、第二切割产物、第三切割产物和/或第四切割产物并将所述切割产物与所述第一肽接头、所述第二肽接头、所述第三肽接头和/或所述第四肽接头的氨基酸序列相关联来鉴定由来自所述受试者的所述肿瘤产生的蛋白酶的类型。

54. 一种用于治疗患有与肿瘤相关抗原的表达或过表达相关联的疾病的受试者的方法,所述方法包括:向所述受试者施用有效量的治疗组合物,所述治疗组合物包含根据权利要求1所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其中第一肽接头、第二肽接头、第三肽接头和第四肽接头处于未切割状态。

55. 根据权利要求54所述的方法,其中所述疾病选自由以下组成的组:血液癌症、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、头颈癌、肺癌、膀胱癌、黑色素瘤、结肠直肠癌、胰腺癌、肺癌、肝癌、肾癌、食道癌、平滑肌瘤、平滑肌肉瘤、神经胶质瘤和胶质母细胞瘤。

56. 根据权利要求55所述的方法,其中所述血液癌症选自由以下组成的组:非霍奇金淋巴瘤(NHL)、伯基特淋巴瘤(BL)、B细胞慢性淋巴细胞性白血病(B-CLL)、B细胞和T细胞急性淋巴细胞性白血病(ALL)、T细胞淋巴瘤(TCL)、急性骨髓性白血病(AML)、毛细胞白血病(HCL)、霍奇金淋巴瘤(HL)、慢性骨髓性白血病(CML)和多发性骨髓瘤(MM)。

57. 一种具有二聚抗原受体(DAR)结构的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白包括第一多肽链和第二多肽链,其中

a) 所述第一多肽链包括:(i) 第一掩蔽部分;(ii) 第一肽接头;(iii) 抗体重链可变区(VH);(iv) 抗体重链恒定区(CH);(v) 任选的铰链区;(vi) 跨膜区(TM);以及(vii) 细胞内信号传导区,并且其中

b) 所述第二多肽链包括:(i) 第二掩蔽部分;(ii) 第二肽接头;(iii) 抗体轻链可变区(VL)(例如, κ 或 λ);以及(iv) 抗体轻链恒定区(CL),

其中所述抗体重链可变区(VH)和所述抗体轻链可变区(VL)形成与靶抗原结合的抗原结合结构域。

58. 根据权利要求57所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其中所述第一掩蔽部分和所述第二掩蔽部分彼此缔合以减少所述抗原结合结构域与其靶抗原的结合。

59. 根据权利要求57所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其中所述第一掩蔽部分和所述第二掩蔽部分在不形成共价键的情况下彼此缔合以减少所述抗原结合结构域与其靶抗原的结合。

60. 根据权利要求57所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其中所述第一掩蔽部分的氨基酸序列被突变以形成杵或臼。

61. 根据权利要求57所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其中所述第二掩蔽部分的氨基酸序列被突变以形成臼或杵。

62. 根据权利要求57所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其中所述第一掩蔽部分和/或所述第二掩蔽部分衍生自选自自由以下组成的组的免疫球蛋白恒定区:CL(λ)、CL(κ)、CH1、CH2和CH3。

63. 根据权利要求57所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其中所述第一掩蔽部分和所述第二掩蔽部分彼此缔合为同二聚体或异二聚体。

64. 根据权利要求57所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其中所述第一掩蔽部分和所述第二掩蔽部分衍生自T细胞受体 α (alpha) 和 β (beta) 恒定区。

65. 根据权利要求57所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其中所述第一可切割位点和所述第二可切割位点能被相同或不同的蛋白酶切割。

66. 根据权利要求57所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其能够与EGFR抗原结合。

67. 根据权利要求57所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其能够与CD38抗原结合。

68. 根据权利要求57所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其进一步包括与毒素接合的化学接头。

69. 一种药物组合物,其包含根据权利要求57所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白和药学上可接受的赋形剂。

70. 一种能够检测蛋白酶存在的诊断剂,所述诊断剂包括与可检测部分接合的根据权利要求57所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白或未与可检测部分接合的根据权利要求57所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其中所述可检测部分包括放射性部分、比色部分、抗原部分、酶部分、生物素部分、链霉亲和素部分或蛋白A部分。

71. 一种用于体外和/或体内使用的试剂盒,所述试剂盒包括根据权利要求57所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白。

72. 一种第一核酸,其编码根据权利要求57所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白的第一多肽链。

73. 一种第二核酸,其编码根据权利要求57所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白的第二多肽。

74. 一种第一核酸,其编码根据权利要求57所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白的第一多肽链;以及一种第二核酸,其编码根据权利要求57所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白的第二多肽。

75. 一种表达载体,其包括根据权利要求72所述的第一核酸。

76. 一种表达载体,其包括根据权利要求73所述的第二核酸。

77. 一种表达载体,其包括根据权利要求74所述的第一核酸和第二核酸。

78. 一种宿主细胞或宿主细胞群,其携带根据权利要求75所述的表达载体。

79. 一种宿主细胞或宿主细胞群,其携带根据权利要求76所述的表达载体。

80. 一种宿主细胞或宿主细胞群,其中单独宿主细胞携带根据权利要求75和76所述的表达载体。

81. 一种宿主细胞或宿主细胞群,其中单独宿主细胞携带根据权利要求77所述的表达载体。

82. 一种用于制备多肽的方法,所述方法包括:在适于由根据权利要求80所述的宿主细胞群表达第一多肽链或第二多肽链的条件下培养所述宿主细胞群。

83. 根据权利要求82所述的方法,其进一步包括:从所述宿主细胞群中分离所表达的第一多肽链或第二多肽链。

84. 根据权利要求83所述的方法,其进一步包括:回收所表达的第一多肽链或第二多肽链。

85. 一种用于制备多肽的方法,所述方法包括:在适于由根据权利要求81所述的宿主细胞群表达第一多肽链和第二多肽链的条件下培养所述宿主细胞群。

86. 根据权利要求85所述的方法,其进一步包括:从所述宿主细胞群中分离所表达的第一多肽链和第二多肽链。

87. 根据权利要求86所述的方法,其进一步包括:回收所表达的第一多肽链和第二多肽链。

88. 根据权利要求85所述的方法,其中所述培养条件适于将所述第一多肽链和所述第二多肽链彼此缔合以形成二聚化掩蔽复合物并形成抗原结合结构域。

89. 根据权利要求87所述的方法,其进一步包括:回收所述缔合的第一多肽链和第二多肽链。

90. 一种用于切割根据权利要求57所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白的至少一个肽接头的方法,所述方法包括:

a) 使至少一种蛋白酶与处于非活性形式的所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白接触,其中第一肽接头和第二肽接头处于未切割状态;以及

b) 切割所述肽接头中的至少一个以将所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白转化为活化形式。

91. 根据权利要求90所述的方法,其进一步包括:将现在处于所述活化状态的所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白与靶抗原结合。

92. 一种用于检测由来自受试者的肿瘤产生的蛋白酶的存在的方法,所述方法包括:

a) 使(i)从所述受试者获得的肿瘤与(ii)根据权利要求57所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白接触,其中所述肿瘤样品产生切割第一肽接头和/或第二肽接头中的至少一个的蛋白酶;以及

b) 检测来自切割所述第一肽接头和/或所述第二肽接头的切割产物;以及

c) 通过检测第一切割产物和/或第二切割产物并将所述切割产物与所述第一肽接头和/或所述第二肽接头的氨基酸序列相关联来鉴定由来自所述受试者的所述肿瘤产生的蛋白酶的类型。

93. 一种用于治疗患有与肿瘤相关抗原的表达或过表达相关联的疾病的受试者的方法,所述方法包括:向所述受试者施用有效量的治疗组合物,所述治疗组合物包含根据权利要求57所述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其中第一肽接头和第二肽接头处于未切割状态。

94. 根据权利要求93所述的方法,其中所述疾病选自由以下组成的组:血液癌症、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、头颈癌、肺癌、膀胱癌、黑色素瘤、结肠直肠癌、胰腺癌、肺癌、肝癌、肾癌、食道癌、平滑肌瘤、平滑肌肉瘤、神经胶质瘤和胶质母细胞瘤。

95. 根据权利要求94所述的方法,其中所述血液癌症选自由以下组成的组:非霍奇金淋

巴瘤 (NHL)、伯基特淋巴瘤 (BL)、B细胞慢性淋巴细胞性白血病 (B-CLL)、B细胞和T细胞急性淋巴细胞性白血病 (ALL)、T细胞淋巴瘤 (TCL)、急性骨髓性白血病 (AML)、毛细胞白血病 (HCL)、霍奇金淋巴瘤 (HL)、慢性骨髓性白血病 (CML) 和多发性骨髓瘤 (MM)。

具有通用掩蔽部分的可活化的抗原结合蛋白

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2020年2月26日提交的美国临时申请第62/981,782号的优先权,所述美国临时申请的内容以全文引用的方式并入本文。

[0003] 在本申请中,引用各种公开、专利和/或专利申请。所述公开、专利和/或专利申请的公开内容特此以全文引用的方式并入本申请中,以便更充分地描述本公开所涉及的目前先进技术。

技术领域

[0004] 本公开提供了具有免疫球蛋白样抗原结合活性的可活化的抗原结合蛋白,其中可活化的抗原结合蛋白包括通用掩蔽部分,所述通用掩蔽部分阻断抗原结合结构域与其靶抗原之间的结合直到通用掩蔽部分被去除而不再阻断抗原结合结构域。

发明内容

[0005] 抗体已经成功地用作各种癌症的治疗试剂。当向受试者施用,抗体与健康患病组织结合导致有害的副作用。为了克服脱靶效应,抗体已经被工程化为包括与肽接头连接的掩蔽部分。掩蔽部分阻止抗体与靶抗原结合,其中掩蔽部分直接与抗原结合结构域结合或者在空间上阻碍抗原结合结构域与其靶抗原之间的结合。肽接头被设计为被患病组织分泌的蛋白酶切割,这对疾病位点的抗原结合结构域进行去掩并降低脱靶活性。

[0006] 本文描述了可活化的掩蔽抗原结合蛋白,所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白提供优于其它掩蔽抗体样分子(有时被称为“前抗体药物(probody)”)的许多优点。本文所描述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白包括通过肽接头与通用掩蔽部分连接的抗原结合蛋白。所述通用掩蔽部分彼此二聚化以形成二聚化掩蔽复合物,所述二聚化掩蔽复合物阻断抗原结合结构域与其靶抗原之间的结合。单独掩蔽部分和所述二聚化掩蔽复合物不与所述抗原结合结构域特异性结合。所述掩蔽部分形成稳定的二聚体,因为所述掩蔽部分的彼此缔合模拟了在天然存在的免疫球蛋白或细胞受体分子中发现的同二聚体或异二聚体。所述掩蔽部分的所述二聚化不涉及共价键合,并且可以通过借助于如杵臼结构等结构互补性工程化链间缔合来优化所述二聚化。掩蔽部分可以潜在地表现出降低的免疫原性,因为所述掩蔽部分衍生自免疫球蛋白样分子的恒定结构域(例如,CH1、CH3 κ 、CH3 λ)或T细胞受体的恒定结构域(例如,TCR α 恒定结构域和TCR β 恒定结构域)。

[0007] 掩蔽部分与可以被蛋白酶切割的肽接头连接,所述蛋白酶例如定位在疾病组织部位处的蛋白酶。掩蔽部分和肽接头一起作为掩蔽物起作用以在空间上阻碍抗体的抗原结合结构域与其靶抗原之间的结合。肽接头具有可以被修饰以改善灵活性和/或切割敏感性的氨基酸长度和序列。通过修饰肽接头长度和/或序列,可以增加或降低掩蔽部分的空间位阻和肽接头的切割敏感性(例如,可调切割性)。

[0008] 肽接头的长度可以加长或缩短以在允许掩蔽部分的空间位阻的接头灵活性与肿瘤相关蛋白酶的最佳切割敏感性之间获得最佳平衡。例如,较短的肽接头可能表现出改善

的空间位阻(改善的掩蔽),但也可能表现出对蛋白酶消化的敏感性降低。肽接头可以被设计为包括赋予接头灵活性的氨基酸(例如,甘氨酸)。肽接头内的可切割位点可以被设计为赋予受调节的蛋白酶敏感性。在一个实例中,肽接头可以被设计为在肽接头的C末端和/或N末端包括1-5个甘氨酸以增加或降低蛋白酶敏感性。在另一个实例中,某些氨基酸序列容易被MMP9蛋白酶切割,但表现出用MMP2蛋白酶切割的水平降低。另外,肽接头的C末端与重链或轻链可变区的N末端之间的连接序列可以被突变以包括一个或多个氨基酸取代、缺失和/或插入以调节蛋白酶敏感性。

[0009] 在非活性状态下,可活化的掩蔽抗原结合蛋白表现出与表达低水平的肿瘤相关蛋白酶的健康组织的结合减少。在表达较高水平的肿瘤相关蛋白酶的患病组织部位处,肽接头被切割时,可活化的掩蔽抗原结合蛋白从非活性状态转化为活化状态,从而大大降低脱靶活性并降低毒性。本文所描述的可活化的掩蔽抗原结合蛋白具有拓宽治疗窗口的潜力。

[0010] 可活化的掩蔽抗原结合蛋白可以通过化学接头与毒素接合,从而形成免疫缀合物。毒素可以对细胞和组织具有细胞毒性。免疫缀合物可以用于将毒素递送到靶肿瘤。

附图说明

[0011] 图1是示出了具有IgG型结构的可活化的掩蔽抗原结合蛋白的非限制性实施方式的示意图。在一个实施方式中,可活化的掩蔽抗原结合蛋白与一种靶抗原结合(例如,单特异性)。

[0012] 图2是示出了具有IgG型结构的可活化的掩蔽抗原结合蛋白的非限制性实施方式的示意图。在一个实施方式中,可活化的掩蔽抗原结合蛋白与两种不同的靶抗原结合(例如,双特异性)。

[0013] 图3A是示出了具有二聚抗原受体(DAR)型结构的可活化的掩蔽抗原结合蛋白的非限制性实施方式的示意图。

[0014] 图3B是示出了具有二聚抗原受体(DAR)型结构的可活化的掩蔽抗原结合蛋白的非限制性实施方式的示意图。

[0015] 图4A是示出了可活化的掩蔽抗原结合蛋白的前体多肽的非限制性实施方式的示意图,其中前体可以被加工以变为成熟的二聚抗原受体(DAR)型结构。

[0016] 图4B是示出了可活化的掩蔽抗原结合蛋白的前体多肽的非限制性实施方式的示意图,其中前体可以被加工以变为成熟的二聚抗原受体(DAR)型结构。

[0017] 图4C是示出了可以形成具有二聚抗原受体(DAR)型结构的可活化的掩蔽抗原结合蛋白的两个多肽的非限制性实施方式的示意图。

[0018] 图4D是示出了可以形成具有二聚抗原受体(DAR)型结构的可活化的掩蔽抗原结合蛋白的两个多肽的非限制性实施方式的示意图。

[0019] 图5A示出了由用MMP2蛋白酶消化产生的包括MMP2/9或uPA1肽接头的各种抗EGFR可活化的掩蔽IgG型抗体的切割产物的SDS-PAGE凝胶,如实施例3和表14中所描述的。

[0020] 图5B示出了由用MMP9蛋白酶消化产生的包括MMP2/9或uPA1肽接头的各种抗EGFR可活化的掩蔽IgG型抗体的切割产物的SDS-PAGE凝胶,如实施例3和表15中所描述的。

[0021] 图6A示出了用MMP9或MMP2蛋白酶消化0.5小时、1小时、2小时、6小时或24小时的抗EGFR可活化的掩蔽IgG型抗体[HC-CH3白MMP2/9,LC-CH3白MMP2/9]的切割产物的SDS-PAGE凝

胶,如实施例4中所描述的。

[0022] 图6B示出了用MMP9或MMP2蛋白酶消化0.5小时、1小时、2小时、6小时或24小时的抗EGFR可活化的掩蔽IgG型抗体[HC-CH3白MMP2/9,LC-CH杆已缺失]的切割产物的SDS-PAGE凝胶,如实施例4中所描述的。

[0023] 图6C示出了用MMP9或MMP2蛋白酶消化0.5小时、1小时、2小时、6小时或24小时的抗EGFR可活化的掩蔽IgG型抗体[HC-CH3白MMP2/9,LC-CH杆不可切割]的切割产物的SDS-PAGE凝胶,如实施例4中所描述的。

[0024] 图6D示出了用MMP9或MMP2蛋白酶消化0.5小时、1小时、2小时、6小时或24小时的抗EGFR可活化的掩蔽IgG型抗体[HC-CH3白MMP2/9,LC-CH杆延长的]的切割产物的SDS-PAGE凝胶,如实施例4中所描述的。

[0025] 图6E示出了用MMP9或MMP2蛋白酶消化0.5小时、1小时、2小时、6小时或24小时的抗EGFR可活化的掩蔽IgG型抗体[HC-CH3白已缺失,LC-CH杆已缺失]的切割产物的SDS-PAGE凝胶,如实施例4中所描述的。

[0026] 图7A示出了用MMP9、MMP2或uPA蛋白酶消化1小时、3小时、5小时或20小时的抗EGFR可活化的掩蔽IgG型抗体[HC-CH3白MMP2/9,LC-CH杆MMP2/9]的切割产物的SDS-PAGE凝胶,如实施例5中所描述的。

[0027] 图7B示出了用MMP9、MMP2或uPA蛋白酶消化1小时、3小时、5小时或20小时的抗EGFR可活化的掩蔽IgG型抗体[HC-CH3白MMP9,LC-CH杆GS]的切割产物的SDS-PAGE凝胶,如实施例5中所描述的。

[0028] 图7C示出了用MMP9、MMP2或uPA蛋白酶消化1小时、3小时、5小时或20小时的抗EGFR可活化的掩蔽IgG型抗体[HC-CH3白MMP9,LC-CH杆uPA1]的切割产物的SDS-PAGE凝胶,如实施例5中所描述的。

[0029] 图8A示出了来自未消化的抗EGFR可活化的掩蔽IgG型抗体[HC-CH3白MMP2/9,LC-CH3杆MMP2/9]的LC-MS分析的肽迹线,如实施例6和表16中所描述的。抗体在分析之前被去糖基化。

[0030] 图8B示出了来自用MMP9消化的抗EGFR可活化的掩蔽IgG型抗体[HC-CH3白MMP2/9,LC-CH3杆MMP2/9]的LC-MS分析的肽迹线,如实施例6和表17中所描述的。抗体在分析之前被去糖基化。

[0031] 图8C示出了来自用MMP9消化的抗EGFR可活化的掩蔽IgG型抗体[HC-CH3白MMP2/9,LC-CH3杆MMP2/9]的LC-MS分析的肽迹线,如实施例6和表17中所描述的。抗体在分析之前被去糖基化。

[0032] 图9A示出了来自未消化的抗EGFR可活化的掩蔽IgG型抗体[HC-CH1 MMP2/9,LC-CL Λ MMP2/9]的LC-MS分析的肽迹线,如实施例6和表18中所描述的。抗体在分析之前被去糖基化。

[0033] 图9B示出了来自用MMP9消化的抗EGFR可活化的掩蔽IgG型抗体[HC-CH1MMP2/9,LC-CL Λ MMP2/9]的LC-MS分析的肽迹线,如实施例6和表19中所描述的。抗体在分析之前被去糖基化。

[0034] 图9C示出了来自用MMP9消化的抗EGFR可活化的掩蔽IgG型抗体[HC-CH1MMP2/9,LC-CL Λ MMP2/9]的LC-MS分析的肽迹线,如实施例6和表19中所描述的。抗体在分析之前被去

糖基化。

[0035] 图10A示出了对EGFR表达性细胞(MDA-MB-231)与未切割(实心圆)或用MMP9切割(实心正方形)的抗EGFR可活化的掩蔽抗体[HC-CH3臼MMP2/9,LC-CH3杵MMP2/9]的结合或与对照抗EGFR抗体(实心三角形)的结合进行比较的剂量应答,如实施例7和表20中所描述的。

[0036] 图10B示出了对EGFR表达性细胞(A431)与未切割(实心圆)或用MMP9切割(实心正方形)的抗EGFR可活化的掩蔽抗体[HC-CH3臼MMP2/9,LC-CH3杵MMP2/9]的结合或与对照抗EGFR抗体(实心三角形)的结合进行比较的剂量应答,如实施例7和表20中所描述的。

[0037] 图10C示出了对EGFR表达性细胞(MDA-MB-468)与未切割(实心圆)或用MMP9切割(实心正方形)的抗EGFR可活化的掩蔽抗体[HC-CH3臼MMP2/9,LC-CH3杵MMP2/9]的结合或与对照抗EGFR抗体(实心三角形)的结合进行比较的剂量应答,如实施例7和表20中所描述的。

[0038] 图11A示出了来自将未切割的可活化的掩蔽抗EGFR抗体[HC-CH3臼MMP2/9,LC-CH3杵MMP2/9](实心菱形)和[HC-CH1 MMP2/9,LC-CH1λMMP2/9](实心三角形)以及对照抗EGFR抗体(空心三角形)与重组EGFR蛋白的结合活性进行比较的ELISA测定的结合曲线,如实施例8中所描述的。EC50值在表21中列出。

[0039] 图11B示出了来自将未切割的可活化的掩蔽抗EGFR抗体[HC-CH3臼MMP2/9,LC-CH3杵已缺失](实心圆)和[HC-CH3臼MMP2/9,LC-CH3杵不可切割](实心正方形)和[HC-CH3臼MMP2/9,LC-CH3杵延长的](实心三角形)和[HC-CH3臼MMP2/9,LC-CH3杵MMP2/9](实心倒三角形)以及对照抗EGFR抗体(实心菱形)与重组EGFR蛋白的结合活性进行比较的ELISA测定的结合曲线,如实施例8中所描述的。还示出了用MMP9切割的[HC-CH3臼MMP2/9,LC-CH3杵不可切割]的结合曲线(“切割”)。EC50值在表22中列出。

[0040] 图11C示出了来自将未切割的可活化的掩蔽抗EGFR抗体[HC-CH3臼不可切割,LC-CH3杵已缺失](实心圆)和[HC-CH3臼不可切割,LC-CH3杵不可切割](实心正方形)和[HC-CH3臼不可切割,LC-CH3杵延长的](实心三角形)和[HC-CH3臼MMP2/9,LC-CH3杵MMP2/9](实心倒三角形)以及对照抗EGFR抗体(实心菱形)与重组EGFR蛋白的结合活性进行比较的ELISA测定的结合曲线,如实施例8中所描述的。EC50值在表23中列出。

[0041] 图11D示出了来自将未切割的可活化的掩蔽抗EGFR抗体[HC-CH3臼缺失,LC-CH3杵已缺失](实心圆)和[HC-CH3臼缺失,LC-CH3杵不可切割](实心正方形)和[HC-CH3臼缺失,LC-CH3杵延长的](实心三角形)和[HC-CH3臼MMP2/9,LC-CH3杵MMP2/9](实心倒三角形)以及对照抗EGFR抗体(实心菱形)与重组EGFR蛋白的结合活性进行比较的ELISA测定的结合曲线,如实施例8中所描述的。EC50值在表24中列出。

[0042] 图11E示出了来自将处于未切割状态(实心圆)或用MMP9切割(实心倒三角形)的可活化的掩蔽抗EGFR抗体[HC-CH3臼MMP2/9,LC-CH3杵MMP2/9]和对照抗EGFR抗体(实心三角形)与重组EGFR蛋白的结合活性进行比较的ELISA测定的结合曲线,如实施例8中所描述的。EC50值在表25中列出。

[0043] 图11F示出了来自将处于未切割状态(实心正方形)或用MMP9切割(实心菱形)的可活化的掩蔽抗EGFR抗体[HC-CH1 MMP2/9,LC-CLλMMP2/9]和对照抗EGFR抗体(实心三角形)与重组EGFR蛋白的结合活性进行比较的ELISA测定的结合曲线,如实施例8中所描述的。EC50值在表26中列出。

[0044] 图11G示出了来自将处于未切割状态(实心正方形)或用MMP9切割(“切割”、实心

圆)的可活化的掩蔽抗EGFR抗体[HC-CH3臼MMP2/9,LC-CH3杵不可切割]和对照抗EGFR抗体(实心菱形)与重组EGFR蛋白的结合活性进行比较的ELISA测定的结合曲线,如实施例8中所描述的。EC50值在表27中列出。

[0045] 图11H示出了来自将处于未切割状态(实心三角形)或用MMP9切割(“切割”、实心圆)的可活化的掩蔽抗EGFR抗体[HC-CH3臼不可切割,LC-CH3杵延长的]和对照抗EGFR抗体(实心菱形)与重组EGFR蛋白的结合活性进行比较的ELISA测定的结合曲线,如实施例8中所描述的。EC50值在表28中列出。

[0046] 图12A示出了人EGFR抗原与对照抗EGFR抗体或处于未切割或切割状态的可活化的掩蔽抗EGFR抗体[HC-CH3臼MMP2/9,LC-CH3杵MMP2/9]结合的生物膜干涉测量法迹线,如实施例9中所描述的。

[0047] 图12B示出了人EGFR抗原与对照抗EGFR抗体或处于未切割或切割状态的可活化的掩蔽抗EGFR抗体[HC-CH1 MMP2/9,LC-CLκMMP2/9]结合的生物膜干涉测量法迹线,如实施例9中所描述的。

[0048] 图12C示出了人EGFR抗原与对照抗EGFR抗体或处于未切割或切割状态的可活化的掩蔽抗EGFR抗体[HC-CH1 MMP2/9,LC-CLκMMP2/9]结合的生物膜干涉测量法迹线,如实施例9中所描述的。结合动力学值在表29中列出。

[0049] 图13A示出了用于将表达处于未切割状态的具有可活化的掩蔽部分的抗EGFR DAR模拟物[HC-CH3 (IgG1) MMP2/9,LC-CH3 (IgG1) MMP2/9]的转基因HeLa细胞与抗人κAPC和荧光团标记的EGFR抗原结合的FAC分析的结果,如实施例14中所描述的。阳性对照HeLa细胞表达不具有掩蔽物的抗EGFR DAR并且阴性对照是非转基因HeLa细胞。

[0050] 图13B示出了表达处于未切割状态的具有可活化的掩蔽部分的抗EGFR DAR模拟物[HC-CH3 (IgG4) MMP2/9,LC-CH3 (IgG4) MMP2/9]的转基因HeLa细胞与抗人κAPC和荧光团标记的EGFR抗原结合的FAC分析的结果,如实施例14中所描述的。阳性对照HeLa细胞表达不具有掩蔽物的抗EGFR DAR并且阴性对照是非转基因HeLa细胞。

[0051] 图13C示出了表达处于未切割状态的具有可活化的掩蔽部分的抗EGFR DAR模拟物[HC-CH3臼MMP2/9,LC-CH3杵MMP2/9]的转基因HeLa细胞与抗人κAPC和荧光团标记的EGFR抗原结合的FAC分析的结果,如实施例14中所描述的。阳性对照HeLa细胞表达不具有掩蔽物的抗EGFR DAR并且阴性对照是非转基因HeLa细胞。

[0052] 图13D示出了表达处于未切割状态的具有可活化的掩蔽部分的抗EGFR DAR模拟物[HC-CH1 MMP2/9,LC-CLκMMP2/9]的转基因HeLa细胞与抗人κAPC和荧光团标记的EGFR抗原结合的FAC分析的结果,如实施例14中所描述的。阳性对照HeLa细胞表达不具有掩蔽物的抗EGFR DAR并且阴性对照是非转基因HeLa细胞。

[0053] 图13E示出了表达处于未切割状态的具有可活化的掩蔽部分的抗EGFR DAR模拟物[HC-38C2-VH MMP2/9,LC-38C2-VL MMP2/9]的转基因HeLa细胞与抗人κAPC和荧光团标记的EGFR抗原结合的FAC分析的结果,如实施例14中所描述的。阳性对照HeLa细胞表达不具有掩蔽物的抗EGFR DAR并且阴性对照是非转基因HeLa细胞。

[0054] 图14A示出了表达处于未切割状态的具有可活化的掩蔽部分的抗EGFR DAR模拟物[HC-CH1 MMP2/9,LC-CLκMMP2/9]的转基因HeLa细胞与抗人κAPC和荧光团标记的EGFR抗原结合的FAC分析的结果,如实施例13中所描述的。

[0055] 图14B示出了表达用MMP9消化的具有可活化的掩蔽部分的抗EGFR DAR模拟物[HC-CH1 MMP2/9,LC-CLκMMP2/9]的转基因HeLa细胞与抗人κAPC和荧光团标记的EGFR抗原结合的FAC分析的结果,如实施例13中所描述的。

[0056] 图14C示出了表达不具有可活化的掩蔽部分的抗EGFR DAR模拟物的阳性对照转基因HeLa细胞与抗人κAPC和荧光团标记的EGFR抗原结合的FAC分析的结果,如实施例14中所描述的。

[0057] 图14D示出了不表达抗EGFR DAR模拟物并且不具有可活化的掩蔽部分的阴性对照非转基因HeLa细胞与抗人κAPC和荧光团标记的EGFR抗原结合的FAC分析的结果,如实施例13中所描述的。

[0058] 图15A示出了表达处于未切割状态的具有可活化的掩蔽部分[HC-CH3 (IgG4) MMP2/9,LC-CH3 (IgG4) MMP2/9]的抗CD38 DAR模拟物的转基因HeLa细胞与用PE标记的CD38 Fc和用APC标记的抗铰链抗体结合的FAC分析的结果,如实施例14中所描述的。

[0059] 图15B示出了表达缺乏可活化的掩蔽部分的抗CD38 DAR模拟物的转基因HeLa细胞与用PE标记的CD38 Fc和用APC标记的抗铰链抗体结合的FAC分析的结果,如实施例14中所描述的。

[0060] 图15C示出了表达缺乏可活化的掩蔽部分的抗CD38 CAR模拟物的转基因HeLa细胞与用PE标记的CD38 Fc和用APC标记的抗铰链抗体结合的FAC分析的结果,如实施例14中所描述的。

[0061] 图15D示出了非转基因HeLa细胞与用PE标记的CD38 Fc和用APC标记的抗铰链抗体结合的FAC分析的结果,如实施例14中所描述的。

[0062] 图15E示出了表达处于未切割状态的具有可活化的掩蔽部分的抗CD38 DAR模拟物[HC-CH3白MMP2/9,LC-CH3杆MMP2/9]的转基因HeLa细胞与用PE标记的CD38 Fc和用APC标记的抗铰链抗体结合的FAC分析的结果,如实施例14中所描述的。

[0063] 图15F示出了与图15B所示的表达缺乏可活化的掩蔽部分的抗CD38 DAR模拟物的转基因HeLa细胞与用PE标记的CD38 Fc和用APC标记的抗铰链抗体结合的结果相同的FAC结果,如实施例14中所描述的。

[0064] 图15G示出了与图15C所示的表达缺乏可活化的掩蔽部分的抗CD38 CAR模拟物的转基因HeLa细胞与用PE标记的CD38 Fc和用APC标记的抗铰链抗体结合的结果相同的FAC结果,如实施例14中所描述的。

[0065] 图15H示出了与图15D所示的非转基因HeLa细胞与用PE标记的CD38 Fc和用APC标记的抗铰链抗体结合的结果相同的FAC结果,如实施例14中所描述的。

[0066] 图16A示出了表达缺乏可活化的掩蔽部分的抗CD38 DAR模拟物的转基因HeLa细胞与用APC标记的抗铰链抗体和用PE标记的CD38 Fc结合的FAC分析的结果,如实施例14中所描述的。

[0067] 图16B示出了表达缺乏可活化的掩蔽部分的抗CD38 CAR模拟物的转基因HeLa细胞与用APC标记的抗铰链抗体和用PE标记的CD38 Fc结合的FAC分析的结果,如实施例14中所描述的。

[0068] 图16C示出了表达缺乏可活化的掩蔽部分的抗BCMACAR模拟物的转基因HeLa细胞与用APC标记的抗铰链抗体和用PE标记的CD38 Fc结合的FAC分析的结果,如实施例14中所

描述的。

[0069] 图16D示出了非转基因HeLa细胞与用PE标记的CD38 Fc和用APC标记的抗铰链抗体结合、与用APC标记的抗铰链抗体和用PE标记的CD38 Fc结合的FAC分析的结果,如实施例14中所描述的。

[0070] 图16E示出了表达处于未切割状态的具有可活化的掩蔽部分的抗CD38 DAR模拟物[HC-CH3 (IgG4) MMP2/9, LC-CH3 (IgG4) MMP2/9]的转基因HeLa细胞与用APC标记的抗铰链抗体和用PE标记的CD38 Fc结合的FAC分析的结果,如实施例14中所描述的。

[0071] 图16F示出了表达处于未切割状态的具有可活化的掩蔽部分的抗CD38 DAR模拟物[HC-CH3 臼MMP2/9, LC-CH3 杵MMP2/9]的转基因HeLa细胞与用APC标记的抗铰链抗体和用PE标记的CD38 Fc结合的FAC分析的结果,如实施例14中所描述的。

[0072] 图17示出了在存在或不存在来自MM1R多发性骨髓瘤细胞的条件培养基的情况下检测靶细胞与具有可活化的掩蔽部分的抗EGFR DAR模拟物[HC-CH MMP2/9, LC-CL κ MMP2/9]的结合的固定细胞成像测定的显微镜图像。

[0073] 图18示出了将不具有掩蔽部分的对照抗EGFR抗体与各种抗EGFR可活化的掩蔽IgG型抗体进行比较的ADCC测定的结果,如实施例16中所描述的。EC50值在表34中列出。

[0074] 图19示出了用于检测表达处于未切割状态的具有可活化的掩蔽部分并携带具有4-1BB和CD3 ζ 的细胞内信号传导结构域的抗EGFR DAR[HC-CH3 (IgG4) MMP2/9, LC-CH3 (IgG4) MMP2/9]并且与抗人 κ APC和荧光团标记的EGFR抗原结合的人T细胞的流式细胞术测定的结果,如实施例18中所描述的。测试细胞表达携带接头,即MMP2/9、不可切割接头或uPA的抗EGFR DAR。阳性对照T细胞表达不具有掩蔽物的抗EGFR DAR并且阴性对照是非转基因GFP T细胞。

[0075] 图20A示出了将对照抗EGFR DAR T细胞(A)、活化T细胞(E)和无效应子(F)与携带可被MMP9(B)或uPA(C)切割的接头或不可切割的接头(D)的抗EGFR掩蔽DAR T细胞进行比较的细胞毒性测定的结果。靶细胞是A549。E:T比率为5:1。

[0076] 图20B示出了上面图20A所示的细胞毒性数据的条形图,其比较了8小时和48小时的细胞杀伤水平。

[0077] 图21A示出了将对照抗EGFR DAR T细胞(A)、活化T细胞(E)和无效应子(F)与携带可被MMP9(B)或uPA(C)切割的接头或不可切割的接头(D)的抗EGFR掩蔽DAR T细胞进行比较的细胞毒性测定的结果。靶细胞是A549。E:T比率为20:1。

[0078] 图21B示出了上面图21A所示的细胞毒性数据的条形图,其比较了8小时和48小时的细胞杀伤水平。

[0079] 图22A示出了实施例20中所描述的干扰素 γ 释放测定的标准曲线。

[0080] 图22B是干扰素 γ 释放测定的条形图,其比较了携带可被MMP9或uPA切割的接头或不可切割的接头的抗EGFR掩蔽DAR T细胞。阴性对照包括抗EGFR DAR T细胞、活化T细胞(GFP)和无DAR T细胞。

[0081] 图23示出了含有第一多肽链、自我切割序列(例如, T2A)和第二多肽链的对照抗EGFR DAR的前体多肽链的氨基酸序列,其中前体多肽链缺乏Ig γ -1CH3掩蔽部分并且缺乏可切割的接头,并且其中前体多肽链包括来自4-1BB和CD3 ζ 的细胞内信号传导结构域。还示出了预测的第一多肽链和第二多肽链的氨基酸序列。实施例17中描述了表达前体以及第一

多肽链和第二多肽链的转基因T细胞的制剂。图19-22B中示出了这些转基因T细胞的分析。

[0082] 图24示出了含有第一多肽链、自我切割序列(例如,T2A)和第二多肽链的抗EGFR DAR的前体多肽链的氨基酸序列,其中前体多肽链包括与MMP2/9可切割接头连接的Ig γ -1CH3掩蔽部分,并且其中前体多肽链包括来自4-1BB和CD3 ζ 的细胞内信号传导结构域。还示出了预测的第一多肽链和第二多肽链的氨基酸序列。实施例17中描述了表达前体以及第一多肽链和第二多肽链的转基因T细胞的制剂。图19-22B中示出了这些转基因T细胞的分析。

[0083] 图25示出了含有第一多肽链、自我切割序列(例如,T2A)和第二多肽链的抗EGFR DAR的前体多肽链的氨基酸序列,其中前体多肽链包括与uPA可切割接头连接的Ig γ -1CH3掩蔽部分,并且其中前体多肽链包括来自4-1BB和CD3 ζ 的细胞内信号传导结构域。还示出了预测的第一多肽链和第二多肽链的氨基酸序列。实施例17中描述了表达前体以及第一多肽链和第二多肽链的转基因T细胞的制剂。图19-22B中示出了这些转基因T细胞的分析。

[0084] 图26示出了含有第一多肽链、自我切割序列(例如,T2A)和第二多肽链的抗EGFR DAR的前体多肽链的氨基酸序列,其中前体多肽链包括与不可切割接头连接的Ig γ -1CH3掩蔽部分,并且其中前体多肽链包括来自4-1BB和CD3 ζ 的细胞内信号传导结构域。还示出了预测的第一多肽链和第二多肽链的氨基酸序列。实施例17中描述了表达前体以及第一多肽链和第二多肽链的转基因T细胞的制剂。图19-22B中示出了这些转基因T细胞的分析。

具体实施方式

[0085] 定义:

[0086] 除非另外定义,否则本文所使用的技术和科学术语具有本领域普通技术人员通常理解的含义。通常,与本文所描述的细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学、转基因细胞生产、蛋白质化学和核酸化学以及杂交技术有关的术语是本领域众所周知和常用的。除非另有指示,否则通常根据本领域众所周知以及如在本文中引用和讨论的各个一般和更具体的参考文献中所描述的常规方法进行本文提供的方法和技术。参见例如 Sambrook等人《分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)》,第2版,纽约冷泉港,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.) (1989) 以及 Ausubel等人,《分子生物学实验指南(Current Protocols in Molecular Biology)》,格林出版协会(Greene Publishing Associates) (1992)。许多基础文本都描述了标准抗体产生过程,包括 Borrebaeck (编辑)《抗体工程化(Antibody Engineering)》,第2版纽约弗里曼公司(Freeman and Company,NY),1995; McCafferty等人《抗体工程化实用方法(Antibody Engineering,A Practical Approach)》英国牛津牛津出版社(Oxford Press,Oxford,England) IRL,1996;以及 Paul (1995)《抗体工程化方案(Antibody Engineering Protocols)》新泽西托托瓦哈门那出版社(Humana Press,Towata,N.J.),1995; Paul (编辑),《基础免疫学(Fundamental Immunology)》,纽约瑞文出版社(Raven Press,N.Y.),1993; Coligan (1991)《当代免疫学实验指南(Current Protocols in Immunology)》纽约威利/格林(Wiley/Greene,NY); Harlow和Lane (1989)《抗体:实验室手册(Antibodies:A Laboratory Manual)》,纽约冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Press,NY); Stites等人(编辑)《基础和临床免疫学(Basic and Clinical Immunology)》(第4版)加利福尼亚州洛思阿图斯朗格医学出版物(Lange Medical

Publications, Los Altos, Calif.) 以及其中引用的参考文献;《编码单克隆抗体:原理与实践 (Coding Monoclonal Antibodies: Principles and Practice)》(第2版) 纽约纽约学术出版社 (Academic Press, New York, N.Y.), 1986 以及 Kohler 和 Milstein《自然 (Nature)》256:495-497, 1975。本文中所引用的所有参考文献都以全文引用的方式并入本文中。酶促反应和富集/纯化技术也是众所周知的并且如本领域通常实现的或如本文所描述的根据制造商的说明书执行。与本文所描述的分析化学、合成有机化学以及药物和制药化学相关使用的术语以及实验室程序和技术都是本领域中众所周知和常用的。标准技术可以用于化学合成、化学分析、药物制剂、调配和递送以及对患者的治疗。

[0087] 本文提供的标题不是对本公开的各个方面的限制, 所述方面可以通过整体参考本说明书来理解。

[0088] 除非本文上下文另有要求, 否则单数术语应包括复数, 且复数术语应包括单数。除非明确地并且肯定地限于一个指示物, 否则单数形式“一个/一种 (a 或 an)” 和“所述 (the)” 和任何词的单数用途包括多个指示物。

[0089] 应理解, 本文使用替代词 (例如“或”) 意指替代物中的一个或两个或其任何组合。

[0090] 本文所使用的术语“和/或”意指每个特定特征或组分的具体公开伴随或不伴随其它特征或组分。例如, 在本文如“A 和/或 B”的短语中使用的术语“和/或”旨在包括“A 和 B”、“A 或 B”、“A” (单独) 和“B” (单独)。同样, 在如“A、B 和/或 C”等短语中使用的术语“和/或”旨在涵盖以下方面中的每个方面: A、B 和 C; A、B 或 C; A 或 C; A 或 B; B 或 C; A 和 C; A 和 B; B 和 C; A (单独); B (单独); 以及 C (单独)。

[0091] 如本文所使用的, 术语“包括/包含 (comprising)”、“包括/包含 (including)”、“具有 (having)” 和“含有 (containing)” 以及其语法变体旨在为非限制性的, 使得列表中的一个项目或多个项目并不排除可以被替换或添加到所列项目中的其它项目。应理解的是, 当在本文中无论何处用语言“包括/包含”来描述某一方面时, 还提供了用于其它类似方面的关于“由...组成”和/或“主要由...组成”的描述。

[0092] 如本文所使用的, 术语“约”是指在本领域普通技术人员确定的特定值或组成的可接受误差范围内的值或组成, 其将部分取决于所述值或组成是如何测量或确定, 即测量系统的限制。例如, “约”或“大致”可以意指按照本领域的实践在一个或超过一个标准差内。可替代地, 根据测量系统的限制, “约”或“大约”可以意指高达 10% (即, $\pm 10\%$) 或更多的范围。例如, 约 5mg 可以包括在 4.5mg 与 5.5mg 之间的任何数字。此外, 特别是就生物系统或过程来说, 所述术语可以意指至多一个数量级或至多 5 倍的值。当本公开中提供特定值或组成时, 除非另有说明, 否则“约”或“大致”的含义应假定为在所述特定值或组成的可接受误差范围内。

[0093] 术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”和本文所使用的其它相关术语可互换使用, 且是指氨基酸的聚合物并且不限于任何特定长度。多肽可以包括天然和非天然氨基酸。多肽包括重组形式或化学合成形式。多肽还包括尚未经历切割, 例如在某些氨基酸残基处通过分泌信号肽切割或通过非酶切割的前体分子。多肽包括已经历切割的成熟分子。这些术语涵盖天然和人工蛋白质、蛋白质片段和蛋白质序列的多肽类似物 (如突变蛋白、变体、嵌合蛋白和融合蛋白) 以及翻译后或以其它方式共价或非共价修饰的蛋白质。两个或更多个多肽 (例如, 3 条多肽链) 可以经由共价和/或非共价缔合彼此缔合以形成多肽复合物。多肽链的缔合

还可以包括肽折叠。因此,取决于形成复合物的多肽链的数量,多肽复合物可以是二聚、三聚、四聚或更高阶复合物。

[0094] 术语“核酸”、“多核苷酸”和“寡核苷酸”以及本文使用的其它相关术语可互换使用且是指核苷酸的聚合物并且不限于任何特定长度。核酸包括重组形式和化学合成形式。核酸包括DNA分子(cDNA或基因组DNA)、RNA分子(例如,mRNA)、使用核苷酸类似物(例如,肽核酸和非天然存在的核苷酸类似物)产生的DNA或RNA的类似物以及其杂交物。核酸分子可以是单股的或双股的。在一个实施方式中,本公开的核酸分子包括编码抗体或其片段或scFv、衍生物、突变蛋白或变体的连续开放阅读框。在一个实施方式中,核酸包括一种类型的多核苷酸或两种或更多种不同类型的多核苷酸的混合物。本文描述了编码具有可活化的掩蔽部分的可活化的掩蔽IgG型抗体和二聚抗原受体(DAR)或其抗原结合部分的核酸。

[0095] 术语“回收(recover/recovery/recovering)”和其它相关术语是指从宿主细胞培养基或宿主细胞切割物或宿主细胞膜中获得蛋白质(例如,抗体或其抗原结合部分)。在一个实施方式中,蛋白质通过宿主细胞表达为与分泌信号肽(前导肽序列)序列融合的重组蛋白质,所述分泌信号肽序列介导来自宿主细胞(例如,来自哺乳动物宿主细胞)的表达蛋白质的分泌。分泌蛋白可以从宿主细胞培养基回收。在一个实施方式中,蛋白质由宿主细胞表达为缺乏分泌信号肽序列的重组蛋白,其可从宿主细胞切割物回收。在一个实施方式中,蛋白质由宿主细胞表达为膜结合蛋白,其可以使用清洁剂从宿主细胞膜释放表达的蛋白质来进行回收。在一个实施方式中,无关于用于回收蛋白质的方法,蛋白质可经历从回收的蛋白质中去除细胞碎片的程序。例如,回收的蛋白质可以经历色谱法、凝胶电泳和/或透析。在一个实施方式中,色谱法包括任何一种或任何组合或两种或更多种程序,所述程序包括亲和色谱法、羟基磷灰石色谱法、离子交换色谱法、反相色谱法和/或硅胶色谱法。在一个实施方式中,亲和色谱法包括蛋白A或G(来自金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的细胞壁组分)。

[0096] 术语“分离的”是指基本上不含其它细胞物质的蛋白质(例如,抗体或其抗原结合部分)或多核苷酸。蛋白质可以通过使用本领域众所周知的蛋白质纯化技术进行分离,使其大体上不含天然相关组分(或与细胞表达系统或用于产生抗体的化学合成方法相关的组分)。在一些实施方式中,术语分离的还指代基本上不含相同物种的其它分子的蛋白质或多核苷酸,例如分别具有不同氨基酸或核苷酸序列的其它蛋白质或多核苷酸。所需分子的均一性纯度可以使用本领域中众所周知的技术测定,包括如凝胶电泳等低分辨率方法和如HPLC或质谱法等高分辨率方法。在一个实施方式中,分离了本公开的具有可活化的掩蔽部分的可活化的掩蔽IgG型抗体和二聚抗原受体(DAR)或其抗原结合部分。

[0097] 术语“前导序列”或“前导肽”或“肽信号序列”或“信号肽”或“分泌信号肽”是指位于多肽的N端处的肽序列。前导序列将多肽链引导到细胞分泌路径并且可以引导整合并且将多肽锚定到细胞膜的脂质双层中。典型地,前导序列的长度是约10到50个氨基酸。前导序列可以引导将前体多肽从细胞质基质运输到内质网。在一个实施方式中,前导序列包括包含CD8 α 、CD28或CD16前导序列的信号序列。在一个实施方式中,信号序列包括哺乳动物序列,包括例如小鼠或人Ig γ 分泌信号肽。在一个实施方式中,前导序列包括小鼠Ig γ 前导肽序列MEWSWVFLFFLSVTTGVHS。

[0098] 本文所使用的“抗原结合蛋白”和相关术语是指包括与抗原结合的部分和任选的

架构或框架部分的蛋白质,所述架构或框架部分允许抗原结合部分形成促进抗原结合蛋白与抗原结合的构形。抗原结合蛋白的实例包括抗体、抗体片段(例如,抗体的抗原结合部分)、抗体衍生物和抗体类似物。抗原结合蛋白可以包括例如具有移植CDR或CDR衍生物的替代性蛋白质支架或人工支架。此类支架包括但不限于抗体来源的支架,其包括引入以例如使抗原结合蛋白的三维结构稳定化的突变;以及完全合成的支架,其包括例如生物兼容性聚合物。参见例如Korndorfer等人,2003,《蛋白质:结构、功能和生物信息学(Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics)》,第53卷,第1期:121-129;Roque等人,2004,《生物技术进展(Biotechnol. Prog.)》20:639-654。另外,可以使用肽抗体模拟物(“PAM”)以及基于利用纤维蛋白连接素组分作为支架的抗体模拟物的支架。本文描述了包括具有可活化的掩蔽部分的可活化的掩蔽IgG型抗体和二聚抗原受体(DAR)或其抗原结合部分的抗原结合蛋白。

[0099] 抗原结合蛋白可以具有例如天然存在的免疫球蛋白的结构。在一个实施方式中,“免疫球蛋白”是指由两对相同的多肽链构成的天然存在的四聚体分子,每一对具有一条“轻”链(约25kDa)和一条“重”链(约50到70kDa)。每条链的氨基末端部分包括主要负责抗原识别的约100个至110个或更多个氨基酸的可变区。每条链的羧基端部分限定了主要负责效应子功能的恒定区。人轻链被分类为 κ 或 λ 轻链。重链被分类为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ ,并且分别将抗体的同种型定义为IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。在轻链和重链中,可变区和恒定区通过约12个或更多个氨基酸的“J”区接合,其中重链还再包括约10个氨基酸的“D”区。通常参见《基础免疫学(Fundamental Immunology)》,第7章(Paul, W. 编辑,第2版,纽约的雷文出版社(Raven Press, N.Y.) (1989)) (所述文献出于所有目的通过引用整体并入本文)。重链和/或轻链可以包括或不包括用于分泌的前导序列。每个轻/重链对的可变区形成抗体结合位点,使得完整的免疫球蛋白具有两个抗原结合位点。在一个实施方式中,抗原结合蛋白可以是一种合成分子,其结构与四聚体免疫球蛋白分子不同,但仍能与靶抗原结合或者与两种或更多种靶抗原结合。例如,合成抗原结合蛋白可以包括抗体片段、1条至6条或更多条多肽链、多肽的不对称组装体或其它合成分子。本文描述了与EGFR或CD38特异性结合的具有免疫球蛋白样性质的抗原结合蛋白。

[0100] 免疫球蛋白链的可变区的相同一般结构体现为由三个高变区(也称为互补性决定区或CDR)接合的相对保守的构架区(FR)。从N端到C端,轻链和重链都包括结构域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。

[0101] 可以将一个或多个CDR共价或非共价地并入分子中以使其成为抗原结合蛋白。抗原结合蛋白可以将CDR作为较大肽链的一部分并入,可以将CDR与另一多肽链共价连接或可以非共价地并入CDR。CDR允许抗原结合蛋白与所关注的特定抗原特异性结合。

[0102] 对每个结构域的氨基酸划分根据以下定义进行:Kabat等人《具有免疫学意义的蛋白质序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)》,第5版,美国卫生和人类服务部(US Dept. of Health and Human Services),公共卫生署(PHS),美国国立卫生研究院(NIH),NIH公开第91-3242号,1991(“Kabat编号”)。免疫球蛋白链中氨基酸的其它编号系统包括IMGT.RTM. (国际免疫遗传学信息系统(international ImMunoGeneTics information system);Lefranc等人,《发展竞争免疫学(Dev. Comp. Immunol.)》29:185-203;2005)以及Aho(Honegger和Pluckthun,《分子生物学杂志(J. Mol. Biol.)》309(3):657-

670;2001);Chothia (Al-Lazikani等人,1997《分子生物学杂志》273:927-948);Contact (Maccallum等人,1996《分子生物学杂志》262:732-745)以及Aho (Honegger和Pluckthun 2001《分子生物学杂志》309:657-670)。

[0103] 本文所使用的“抗体(antibody/antibodies)”和相关术语是指与抗原特异性结合的完整免疫球蛋白或其抗原结合部分。抗原结合部分可以通过重组DNA技术或通过完整抗体的酶促或化学切割产生。抗原结合部分尤其包括Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、结构域抗体(dAb)和互补决定区(CDR)片段、单链抗体(scFv)、嵌合抗体、双功能抗体、三功能抗体、四功能抗体以及含有足以赋予与多肽特异性抗原结合的免疫球蛋白的至少一部分的多肽。

[0104] 抗体包括以重组方式产生的抗体和抗原结合部分。抗体包括非人抗体、嵌合抗体、人源化抗体和全人抗体。抗体包括单特异性、多特异性(例如,双特异性、三特异性和更高阶特异性)。抗体包括四聚体抗体、轻链单体、重链单体、轻链二聚体、重链二聚体。抗体包括F(ab')₂片段、Fab'片段和Fab片段。抗体包括单结构域抗体、单价抗体、单链抗体、单链可变片段(scFv)、骆驼化(camelized)抗体、亲和体、二硫键连接的Fv(sdFv)、抗独特型抗体(抗Id)、微型抗体。抗体包括单克隆和多克隆群。本文描述了包括具有可活化的掩蔽部分的可活化的掩蔽IgG型抗体和二聚抗原受体(DAR)或其抗原结合部分的抗体样分子。

[0105] “抗原结合结构域”、“抗原结合区”或“抗原结合位点”以及本文所使用的其它相关术语是指含有与抗原相互作用并且有利于抗原结合蛋白对抗原的特异性和亲和力的氨基酸残基(或其它部分)的抗原结合蛋白的一部分。对于与其抗原特异性结合的抗体,所述术语将包括其CDR结构域中的至少一个结构域的至少部分。本文描述了来自抗EGFR或抗CD38抗体的抗原结合结构域。

[0106] 如本文在抗体或抗原结合蛋白或抗体片段的上下文中所使用的,术语“特异性结合(specific binding/specifically binds/specifically binding)”和其它相关术语是指相对于其它分子或部分,与抗原的非共价或共价优先结合(例如,相对于其它可用的抗原,抗体与特定抗原特异性结合)。在一个实施方式中,如果抗体以10⁻⁵M或更少、或10⁻⁶M或更少、或10⁻⁷M或更少、或10⁻⁸M或更少、或10⁻⁹M或更少、或10⁻¹⁰M或更少、或10⁻¹¹M或更少的解离常数K_d与抗原结合,那么所述抗体与靶抗原特异性结合。在一个实施方式中,本文描述了与靶抗原(例如,EGFR或CD38抗原)特异性结合的具有可活化的掩蔽部分的可活化的掩蔽IgG型抗体和二聚抗原受体(DAR)或其抗原结合部分。

[0107] 在一个实施方式中,结合特异性可以通过ELISA、放射免疫测定(RIA)、电化学发光测定(ECL)、免疫放射测定(IRMA)或酶免疫测定(EIA)来测量。

[0108] 在一个实施方式中,解离常数(K_d)可以使用BIACORE表面等离子体共振(SPR)测定来测量。表面等离子体共振是指通过例如使用BIACORE系统(新泽西皮斯卡塔韦通用医疗集团Biacore生命科学事业部(Biacore Life Sciences division of GE Healthcare, Piscataway,NJ)用于检测生物传感器基质内的蛋白质浓度的变化来分析实时相互作用的光学现象。

[0109] 如本文所使用的“表位”和相关术语是指由抗原结合蛋白(例如,由抗体或其抗原结合部分)结合的抗原的一部分。表位可以包括由抗原结合蛋白结合的两个或更多个抗原的部分。表位可以包括一个抗原或两个或更多个抗原的非连续部分(例如,在抗原的一级序列中不连续但在抗原的三级和四级结构的上下文中彼此足够接近以由抗原结合蛋白结合

的氨基酸残基)。通常,抗体的可变区,具体地是CDR与表位相互作用。在一个实施方式中,本文描述了与EGFR或CD38抗原的表位结合的具有可活化的掩蔽部分的可活化的掩蔽IgG型抗体和二聚抗原受体(DAR)或其抗原结合部分。

[0110] 本文所使用的“抗体片段”、“抗体部分”、“抗体的抗原结合片段”或“抗体的抗原结合部分”和其它相关术语是指除完整抗体之外的分子,其包括完整抗体的一部分,所述一部分与完整抗体所结合的抗原结合。抗体片段的实例包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂;Fd;和Fv片段,以及dAb;双功能抗体;线性抗体;单链抗体分子(例如scFv);含有足以赋予与多肽特异性抗原结合的抗体的至少一部分的多肽。抗体的抗原结合部分可以通过重组DNA技术或通过完整抗体的酶促或化学切割产生。抗原结合部分尤其包括Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、结构域抗体(dAb)和互补决定区(CDR)片段、嵌合抗体、双功能抗体、三功能抗体、四功能抗体以及含有足以赋予抗体片段抗原结合性质的免疫球蛋白的至少一部分的多肽。在一个实施方式中,抗原结合片段包括本文所描述的与靶抗原(例如,EGFR或CD38抗原)特异性结合的具有可活化的掩蔽部分的可活化的掩蔽IgG型抗体和二聚抗原受体(DAR)的片段或其抗原结合部分。

[0111] 术语“Fab”、“Fab片段”以及其它相关术语是指包括可变轻链区(V_L)、恒定轻链区(C_L)、可变重链区(V_H)和第一恒定区(C_{H1})的单价片段。Fab能够与抗原结合。F(ab')₂片段是包括在铰链区由二硫桥键连接的两个Fab片段的二价片段。F(ab')₂具有抗原结合能力。Fd片段包括V_H和C_{H1}区。Fv片段包括V_L和V_H区。Fv可以与抗原结合。dAb片段具有V_H结构域、V_L结构域或V_H或V_L结构域的抗原结合片段(美国专利6,846,634和6,696,245;美国公开申请第2002/02512号、第2004/0202995号、第2004/0038291号、第2004/0009507号、第2003/0039958号;以及Ward等人,《自然》341:544-546,1989)。本文描述了包括来自抗EGFR或抗CD38抗体的抗原结合部分的Fab片段。

[0112] 单链抗体(scFv)是V_L和V_H区通过接头(例如,氨基酸残基的合成序列)接合以形成连续蛋白质链的抗体。优选地,接头足够长以允许蛋白质链自身折叠并且形成单价抗原结合位点(参见例如Bird等人,1988,《科学(Science)》242:423-26以及Huston等人,1988,《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)》85:5879-83)。本文描述了包括来自抗EGFR或抗CD38抗体的抗原结合部分的单链抗体。

[0113] 双功能抗体是包括两条多肽链的二价抗体,其中每条多肽链包括由太短以致于不能使同一链上的两个结构域之间配对的接头接合的V_H和V_L结构域,因此使得每个结构域与另一条多肽链上的互补结构域配对(参见例如Holliger等人,1993《美国国家科学院院刊》90:6444-48以及Poljak等人,1994,《结构(Structure)》2:1121-23)。如果双功能抗体的两条多肽链相同,那么由其配对产生的双功能抗体将具有两个相同的抗原结合位点。具有不同序列的多肽链可以用于制备具有两个不同抗原结合位点的双功能抗体。类似地,三功能抗体和四功能抗体是分别包括三条和四条多肽链并且分别形成三个和四个抗原结合位点的抗体,所述抗体可以相同或不同。双功能抗体、三功能抗体和四功能抗体构建体可以使用来自本文所描述的任何抗EGFR或抗CD38抗体的抗原结合部分制备。

[0114] 术语“人抗体”是指具有衍生自人免疫球蛋白序列的一个或多个可变区和恒定区的抗体。在一个实施方式中,所有可变结构域和恒定结构域都衍生自人免疫球蛋白序列(例如,全人抗体)。这些抗体可以通过各种方式制备,所述方式的实例如下描述,包括通过重组

方法或通过对基因编辑小鼠用所关注抗原进行免疫,所述基因修饰小鼠可以表达衍生自人重链和/或轻链编码基因的抗体。本文描述了全人抗EGFR或抗CD38抗体和抗原结合蛋白或其部分。

[0115] “人源化”抗体是指具有通过一种或多种氨基酸取代、缺失和/或添加而与衍生自非人物种的抗体的序列不同的序列的抗体,使得与非人物种抗体相比,在将人源化抗体施用于人类受试者时,所述人源化抗体诱导免疫应答可能性降低和/或诱导较不严重的免疫应答。在一个实施方式中,非人物种抗体的重链和/或轻链的框架结构域和恒定结构域中的某些氨基酸发生突变以产生人源化抗体。在另一个实施方式中,来自人抗体的恒定结构域与非人物种的可变结构域融合。在另一个实施方式中,改变非人抗体的一个或多个CDR序列中的一个或多个氨基酸残基以降低在将非人抗体施用于人类受试者时所述非人抗体的可能的免疫原性,其中改变的氨基酸残基对于抗体与其抗原的免疫特异性结合不是关键性的,或者对氨基酸序列作出的改变是保守性改变,使得人源化抗体与抗原的结合并不明显劣于非人抗体与抗原的结合。如何制备人源化抗体的实例可以在美国专利第6,054,297号、第5,886,152号和第5,877,293号中找到。

[0116] 本文所使用的术语“嵌合抗体”和相关术语是指含有来自第一抗体的一个或多个区和来自一个或多个其它抗体的一个或多个区的抗体。在一个实施方式中,一个或多个CDR衍生自人抗体。在另一个实施方式中,所有CDR衍生自人抗体。在另一个实施方式中,来自多于一个人抗体的CDR在嵌合抗体中混合并匹配。例如,嵌合抗体可以包括来自第一人抗体的轻链的CDR1、来自第二人抗体的轻链的CDR2和CDR3以及来自第三抗体的重链的CDR。在另一个实例中,CDR来源于如人和小鼠、或人和兔、或人和山羊等不同的物种。本领域技术人员应理解,其它组合是可能的。

[0117] 此外,框架区可以衍生自一种相同抗体,衍生自如人抗体等一种或多种不同抗体或衍生自人源化抗体。在嵌合抗体的一个实例中,重链和/或轻链的一部分与来自特定物种或属于特定抗体种类或亚类的抗体相同、同源或衍生自所述抗体,而所述链的其余部分与来自另一物种或属于另一抗体种类或亚类的抗体相同、同源或衍生自所述抗体。还包括表现出所需的生物活性(即,与靶抗原特异性结合的能力)的此类抗体的片段。本文描述了嵌合抗体可以由具有可活化的掩蔽部分的可活化的掩蔽IgG型抗体和二聚抗原受体(DAR)或其抗原结合部分中的任一种的部分制备。

[0118] 如本文所使用的,术语“变体”多肽和多肽的“变体”是指包括相对于参考多肽序列具有一个或多个氨基酸残基插入氨基酸序列中、从氨基酸序列中缺失和/或取代到氨基酸序列中的氨基酸序列的多肽。多肽变体包括融合蛋白。以相同方式,变体多核苷酸包括相对于另一多核苷酸序列具有一个或多个核苷酸插入核苷酸序列中、从核苷酸序列中缺失和/或取代到核苷酸序列中的核苷酸序列。多核苷酸变体包括融合多核苷酸。

[0119] 如本文中所使用的,术语多肽的“衍生物”是已经例如通过与如聚乙二醇、白蛋白(例如,人血清白蛋白)等另一个化学部分缀合、磷酸化和糖基化而化学修饰的多肽(例如,抗体)。除非另有指示,否则术语“抗体”包括除了包括两条全长重链和两条全长轻链的抗体以外的其衍生物、变体、片段以及突变蛋白,所述抗体的实例如下描述。

[0120] 如本文所使用的,术语“Fc”或“Fc区”是指在铰链区中或之后开始并在重链的C端结束的抗体重链恒定区的部分。Fc区包括CH和CH3区的至少一部分,并且可以包括或可以不

包括铰链区的一部分。两条各自携带半Fc区的多肽链可以二聚合以形成Fc区。Fc区可以与Fc细胞表面受体以及免疫补体系统的一些蛋白质结合。Fc区表现出效应子功能,所述效应子功能包括包含补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性吞噬作用(ADP)、调理作用和/或细胞结合中的任一种活性或两种或更多种活性的任何组合。Fc区可以与包括Fc γ RI(例如,CD64)、Fc γ RII(例如,CD32)和/或Fc γ RIII(例如,CD16a)的Fc受体结合。

[0121] 如本文所使用的术语“标记抗体”或相关术语是指未标记的或与用于检测的可检测标记或部分接合的抗体及其抗原结合部分,其中可检测标记或部分为放射性的、比色的、抗原性的、酶促的、可检测珠粒(如磁性或电子致密(例如,金)珠粒)、生物素、链霉亲和素或蛋白A。可以采用多种标记,包括但不限于放射性核素、荧光剂、酶、酶底物、酶辅因子、酶抑制剂和配体(例如,生物素、半抗原)。本文所描述的具有可活化的掩蔽部分的可活化的掩蔽IgG型抗体和二聚抗原受体(DAR)或其抗原结合部分中的任一种可以是未标记的或者可以与可检测标记或部分接合。

[0122] 本文所使用的“同一性百分比”或“同源性百分比”和相关术语是指两个多肽之间或两个多核苷酸序列之间的相似性的定量测量。两个多肽序列之间的同一性百分比是在两个多肽序列之间共享的比对位置处的相同氨基酸的数量的函数,考虑了可能需要被引入以优化两个多肽序列的比对的空位的数量和每个空位的长度。以类似方式,两个多核苷酸序列之间的同一性百分比是在两个多核苷酸序列之间共享的比对位置处的相同核苷酸的数量函数,考虑了可能需要被引入以优化两个多核苷酸序列的比对的空位的数量和每个空位的长度。序列比较和两个多肽序列或两个多核苷酸序列之间同一性百分比的确定可以使用数学算法来实现。例如,两个多肽或两个多核苷酸序列的“同一性百分比”或“同源性百分比”可以通过使用GAP计算机程序(GCG Wisconsin Package,10.3版本(加利福尼亚州圣地亚哥Accelrys公司(Accelrys, San Diego, Calif.))使用其默认参数比较序列来确定。关于测试序列的如“包括与Y具有至少X%同一性的序列”的表达意指当如上描述与序列Y比对时,测试序列包括与Y的残基至少X%相同的残基。

[0123] 在一个实施方式中,测试抗体的氨基酸序列可以与构成本文所描述的具有可活化的掩蔽部分的可活化的掩蔽IgG型抗体和二聚抗原受体(DAR)或其抗原结合部分的多肽的任何氨基酸序列类似但不一定相同。测试抗体与多肽之间的相似性可以与构成本文所描述的具有可活化的掩蔽部分的可活化的掩蔽IgG型抗体和二聚抗原受体(DAR)或其抗原结合部分的任何多肽至少95%、或至少96%相同、或至少97%相同、或至少98%相同或至少99%相同。在一个实施方式中,类似多肽可以含有重链和/或轻链内的氨基酸取代。在一个实施方式中,氨基酸取代包括一个或多个保守氨基酸取代。“保守氨基酸取代”是其中一个氨基酸残基被具有化学性质(例如,电荷或疏水性)类似的侧链(R基团)的另一个氨基酸残基取代的氨基酸取代。通常,保守氨基酸取代不会实质上改变蛋白质的功能性质。在两个或更多个氨基酸序列因保守取代而彼此不同的情况下,可以向上调整序列同一性百分比或相似性程度,以校正取代的保守本质。用于作出此调整的方法是本领域技术人员众所周知的。参见例如Pearson, (1994)《分子生物学方法(Methods Mol. Biol.)》24:307-331,所述文献通过引用整体并入本文。具有类似化学性质的侧链的氨基酸基团的实例包括:(1)脂肪族侧链:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;(2)脂肪族-羟基侧链:丝氨酸和苏氨酸;(3)含

酰胺的侧链：天冬酰胺和谷氨酰胺；(4) 芳香族侧链：苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸；(5) 碱性侧链：赖氨酸、精氨酸和组氨酸；(6) 酸性侧链：天冬氨酸和谷氨酸以及(7) 含硫侧链是半胱氨酸和蛋氨酸。

[0124] 抗体可以从如含有具有各种抗原特异性的免疫球蛋白的血清或血浆等来源获得。如果对此类抗体进行亲和纯化，其可以富集特定的抗原特异性。此类富集抗体制剂通常由对于具体抗原具有特异性结合活性的少于约10%的抗体构成。对这些制剂进行几轮亲和纯化可以增加对抗原具有特异性结合活性的抗体的比例。以这种方式制备的抗体通常被称为“单特异性”。单特异性抗体制剂可以由对于具体抗原具有特异性结合活性的约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%或99.9%的抗体构成。抗体可以使用如下文所描述的重组核酸技术产生。

[0125] 本文所使用的“载体”和相关术语是指可以与外部遗传物质(例如，核酸转基因)可操作地连接的核酸分子(例如，DNA或RNA)。载体可以用作媒介以将外部遗传物质引入到细胞(例如，宿主细胞)中。载体可以包括至少一个限制性核酸内切酶识别序列以将转基因插入到载体中。载体可以包括赋予抗生素抗性或可选择的特性的至少一种基因序列，以帮助选择携带载体-转基因构建体的宿主细胞。载体可以是单股或双股核酸分子。载体可以是线性或环状核酸分子。用于采用锌指核酸酶、TALEN或CRISPR/Cas的基因编辑方法的供体核酸可以是一种类型的载体。一种类型的载体是“质粒”，其是指线性或环状的双股染色体外DNA分子，其可以与转基因连接，并能够在宿主细胞中复制，且转录和/或翻译转基因。病毒载体通常含有可以与转基因连接的病毒RNA或DNA主链序列。病毒主链序列可以经修饰以使感染失效，但保留病毒主链和共连接转基因插入到宿主细胞基因组中。病毒载体的实例包括逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关载体、杆状病毒载体、乳多空病毒载体、牛痘病毒载体、单纯性疱疹病毒载体和爱泼斯坦巴尔病毒(Epstein Barr viral)载体。某些载体能够在其所引入的宿主细胞中自主复制(例如，包括细菌复制起点的细菌载体以及附加型哺乳动物载体)。其它载体(例如，非附加型哺乳动物载体)在引入到宿主细胞中时被整合到宿主细胞的基因组中，并且由此与宿主基因组一起复制。

[0126] “表达载体”是一种可以含有如诱导型和/或组成型启动子和增强子等一个或多个调控序列的载体。表达载体可以包括核糖体结合位点和/或聚腺苷酸化位点。表达载体可以包括一个或多个复制起点序列。调控序列引导与转导到宿主细胞中的表达载体连接的转基因的转录或转录和翻译。调控序列可以控制转基因的表达水平、定时和/或位置。调控序列可以例如直接或通过一个或多个其它分子(例如，与调控序列和/或核酸结合的多肽)的作用向转基因施加其效应。调控序列可以是载体的一部分。在以下中描述了调控序列的另外的实例：例如Goeddel, 1990,《基因表达技术：酶学方法(Gene Expression Technology: Methods in Enzymology)》185,加利福尼亚州圣地亚哥学术出版社(Academic Press, San Diego, Calif.)以及Baron等人, 1995,《核酸研究(Nucleic Acids Res.)》23:3605-3606。表达载体可以包括编码本文所描述的具有可活化的掩蔽部分的可活化的掩蔽IgG型抗体和二聚抗原受体(DAR)或其抗原结合部分中的任一种的至少一部分的核酸。

[0127] 当转基因与载体之间存在连接以允许载体中含有的转基因序列发挥功能或表达时，即转基因与载体“可操作地连接”。在一个实施方式中，当调控序列影响到转基因的表达(例如，表达的水平、定时或位置)时，转基因与调控序列“可操作地连接”。

[0128] 本文所使用的术语“经转染的”或“经转化的”或“经转导的”或其它相关术语是指将外源核酸(例如,转基因)转移或引入到宿主细胞中的过程。“经转染的”或“经转化的”或“经转导的”的宿主细胞是已经用外源核酸(转基因)转染、转化或转导的宿主细胞。宿主细胞包括原代受试者细胞及其后代。可以将编码本文所描述的具有可活化的掩蔽部分的可活化的掩蔽IgG型抗体和二聚抗原受体(DAR)或其抗原结合部分中的任一种的至少一部分的外源核酸引入到宿主细胞中。可以将包括本文所描述的具有可活化的掩蔽部分的可活化的掩蔽IgG型抗体和二聚抗原受体(DAR)或其抗原结合部分中的任一种的至少一部分的表达载体引入到宿主细胞中,并且宿主细胞可以表达包括本文所描述的具有可活化的掩蔽部分的可活化的掩蔽IgG型抗体和二聚抗原受体(DAR)或其抗原结合部分的至少一部分的多肽。

[0129] 如本文所使用的术语“宿主细胞”或“或宿主细胞群”或相关术语是指其中已经引入外来(外源性或转基因)核酸的细胞(或其群)。外来核酸可以包括与转基因可操作地连接的表达载体,并且宿主细胞可以用于表达由外来核酸(转基因)编码的核酸和/或多肽。宿主细胞(或其群)可以是培养细胞或可以从受试者中获得。宿主细胞(或其群)包括原代受试者细胞及其后代,而不考虑传代次数。与亲本细胞相比,后代细胞可能携带或可能不携带相同的遗传物质。宿主细胞涵盖后代细胞。在一个实施方式中,宿主细胞描述已经以任何方式被修饰、转染、转导、转化和/或操纵以表达如本文所公开的抗体的任何细胞(包括其后代)。在一个实例中,宿主细胞(或其群)可以引入有与编码本文所描述的所需抗体或其抗原结合部分的核酸可操作地连接的表达载体。宿主细胞和其群可以携带稳定整合到宿主基因组中的表达载体或可以携带染色体外表达载体。在一个实施方式中,宿主细胞和其群可以携带染色体外载体,所述染色体外载体在几次细胞分裂后存在,或暂时存在并在几次细胞分裂后消失。

[0130] 转基因宿主细胞可以使用非病毒方法制备,所述非病毒方法包括众所周知的设计者核酸酶,所述设计者核酸酶包括锌指核酸酶、TALEN或CRISPR/Cas。可以使用如锌指核酸酶等基因组编辑技术将转基因引入到宿主细胞的基因组中。锌指核酸酶包括嵌合蛋白质对,每个嵌合蛋白质对含有与来自工程化锌指基元的DNA结合结构域融合的限制性核酸内切酶(例如,FokI)的非特异性核酸内切酶结构域。DNA结合结构域可以工程化以与宿主的基因组中的特定序列结合并且核酸内切酶域进行双股切割。供体DNA携带转基因,例如编码本文所描述的CAR或DAR构建体的任何核酸,和与宿主细胞的基因组中的预期插入位点的任一侧上的区同源的侧接序列。宿主细胞的DNA修复机制能够实现通过同源DNA修复的转基因的精确插入。已经使用锌指核酸酶制备了转基因哺乳动物宿主细胞(美国专利第9,597,357号、第9,616,090号、第9,816,074号和第8,945,868号)。转基因宿主细胞可以使用转录活化因子样效应物核酸酶(TALEN)制备,所述TALEN与锌指核酸酶类似在于其包括与可以递送精确转基因插入的DNA结合结构域融合的非特异性核酸内切酶域。如同锌指核酸酶,TALEN也将双股切割引入到宿主的DNA中。转基因宿主细胞可以使用CRISPR(规律间隔成簇短回文重复序列)制备。CRISPR采用与引导RNA偶合以用于靶特异性供体DNA集成的Cas核酸内切酶。引导RNA包括在靶DNA中的gRNA结合区上游含有前间隔序列邻近基序(PAM)序列的保守多核苷酸并且与Cas核酸内切酶使双股靶DNA切割的宿主细胞靶位点杂交。引导RNA可以被设计为与特定靶位点杂交。类似于锌指核酸酶和TALEN,CRISPR/Cas系统可以用于引入具有侧接序列的供体DNA的位点特异性插入,所述侧接序列与插入位点具有同源性。用于修饰基因组

的CRISPR/Cas系统的实例描述于例如美国专利第8,697,359号、第10,000,772号、第9,790,490号和美国专利申请公开第US 2018/0346927号。在一个实施方式中,可以使用锌指核酸酶、TALEN或CRISPR/Cas系统制备转基因宿主细胞,并且宿主靶位点可以是TRAC基因(T细胞受体 α 恒定区)。供体DNA可以包括例如编码本文所描述的CAR或DAR构建体的任何核酸。电穿孔、核转染或脂质体转染可以用于将供体DNA以及锌指核酸酶、TALEN或CRISPR/Cas系统共递送到宿主细胞中。

[0131] 宿主细胞可以是原核的,例如大肠杆菌,或其可以是真核生物,例如单细胞真核生物(例如,酵母或其它真菌)、植物细胞(例如,烟草或番茄植物细胞)哺乳动物细胞(例如,人细胞、猴细胞、仓鼠细胞、大鼠细胞、小鼠细胞或昆虫细胞)或杂交瘤细胞。在一个实施方式中,宿主细胞可以引入与编码所需抗体的核酸可操作地连接的表达载体,从而产生转染的/转化的宿主细胞,其在适于通过转染的/转化的宿主细胞表达抗体的条件下进行培养,并任选地从转染的/转化的宿主细胞中回收抗体(例如,从宿主细胞切割物回收)或从培养基回收。在一个实施方式中,宿主细胞包括CHO、BHK、NS0、SP2/0和YB2/0的非人细胞。在一个实施方式中,宿主细胞包括HEK293、HT-1080、Huh-7和PER.C6的人细胞。宿主细胞的实例包括猴肾细胞的COS-7系(ATCC CRL1651)(参见Gluzman等人,1981,《细胞(Cell)》23:175)、L细胞、C127细胞、3T3细胞(ATCC CCL 163)、中国仓鼠卵巢CHO细胞或其衍生物,如在不血清培养基中生长的Veggie CHO和相关细胞系(参见Rasmussen等人,1998,《细胞技术学(Cytotechnology)》28:31)或在DHFR中缺乏的CHO菌株DX-B 11(参见Urlaub等人,1980,《美国国家科学院院刊》77:4216-20)、HeLa细胞、BHK(ATCC CRL 10)细胞系、源自非洲绿猴肾细胞系CV1(ATCC CCL 70)的CV1/EBNA细胞系(参见McMahan等人,1991,《欧洲分子生物学学会杂志(EMBO J.)》10:2821)、如293、293EBNA或MSR 293等人胚胎肾细胞、人表皮A431细胞、人Colo 205细胞、其它转化的灵长类细胞系、正常二倍体细胞、源自原代组织体外培养的细胞菌株、原代外植体、HL-60、U937、HaK或Jurkat细胞。在一个实施方式中,宿主细胞包括如Y0、NS0或Sp20等淋巴细胞。在一个实施方式中,宿主细胞是哺乳动物宿主细胞,但不是人宿主细胞。通常,宿主细胞是可以编码多肽的核酸转化或转染的培养细胞,所述编码多肽的核酸因此可以在宿主细胞中表达。短语“转基因宿主细胞”或“重组宿主细胞”可以用于表示已经用要表达的核酸转化或转染的宿主细胞。宿主细胞也可以是包括核酸,但除非将调控序列引入宿主细胞,使其与核酸可操作地连接,否则不以所需的水平表达核酸的细胞。应当理解,术语宿主细胞不仅指特定受试者细胞,而且还指此类细胞的后代或潜在后代。因为某些修饰可能会由于例如突变或环境影响而在后续世代中发生,因此所述后代事实上可能与亲本细胞相同,但仍包括在本文所使用的术语的范围内。本文描述了一种携带与编码具有可活化的掩蔽部分的一种或多种可活化的掩蔽IgG型抗体和二聚抗原受体(DAR)或其抗原结合部分的至少一种核酸可操作地连接的载体(例如,表达载体)的宿主细胞或宿主细胞群。

[0132] 本公开的多肽(例如,抗体和抗原结合蛋白)可以使用本领域已知的任何方法产生。在一个实例中,多肽是通过重组核酸方法,通过将编码多肽的核酸序列(例如,DNA)插入重组表达载体中而产生,所述重组表达载体被引入到宿主细胞中并在促进表达的条件下由宿主细胞表达。

[0133] 用于重组核酸操纵的一般技术描述于例如Sambrook等人,《分子克隆:实验手册》,

第1-3卷,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),第2版,1989或F.Ausubel等人,《分子生物学实验指南》(格林出版与威利交叉科学出版社(Green Publishing and Wiley-Interscience):纽约,1987)并且定期更新,所述文献通过引用整体并入本文。编码多肽的核酸(例如,DNA)与携带一种或多种源自哺乳动物、病毒或昆虫基因的适合的转录或翻译调控元件的表达载体可操作地连接。此类调控元件包括转录启动子、控制转录的任选操纵子序列、编码合适的mRNA核糖体结合位点的序列以及控制转录和翻译终止的序列。表达载体可以包括在宿主细胞中赋予复制能力的复制起点。表达载体可以包括赋予选择以促进转基因宿主细胞(例如,转化体)识别的基因。

[0134] 重组DNA还可以编码可以适用于纯化蛋白质的任何类型的蛋白质标签序列。蛋白质标签的实例包括但不限于组氨酸标签、FLAG标签、myc标签、HA标签或GST标签。适用于细菌、真菌、酵母和哺乳动物细胞宿主的适当的克隆和表达载体可以在《克隆载体:实验室手册(Cloning Vectors:A Laboratory Manual)》,(纽约爱思唯尔公司(Elsevier,N.Y.),1985)中找到。

[0135] 可以使用适合于宿主细胞的方法将表达载体构建体引入到宿主细胞中。将核酸引入宿主细胞的多种方法是本领域已知的,所述方法包括但不限于电穿孔;采用氯化钙、氯化铷、磷酸钙、DEAE-葡聚糖或其它物质进行转染;病毒转染;非病毒转染;微粒轰击;脂质感染;以及感染(例如,当载体是感染原时)。合适的宿主细胞包括原核生物、酵母、哺乳动物细胞或细菌细胞。

[0136] 合适的细菌包括革兰氏阴性或革兰氏阳性生物,例如大肠杆菌(*E.coli*)或芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)。酵母,优选地来自酵母菌属(*Saccharomyces*)的多个种,如酿酒酵母(*S.cerevisiae*),也可以用于多肽生产。各种哺乳动物或昆虫细胞培养系统也可以用于表达重组蛋白。Luckow和Summers,《(生物/技术(Bio/Technology))》,6:47,1988)综述了用于在昆虫细胞中产生异源蛋白质的杆状病毒系统。合适的哺乳动物宿主细胞系的实例包括内皮细胞、COS-7猴肾细胞、CV-1、L细胞、C127、3T3、中国仓鼠卵巢细胞(CHO)、人胚胎肾细胞、HeLa、293、293T和BHK细胞系。通过培养合适的宿主/载体系统以表达重组蛋白来制备纯化的多肽。对于许多应用,本文所公开的许多多肽的小尺寸将使得在大肠杆菌中的表达成为优选的表达方法。接着从培养基或细胞提取物纯化蛋白质。具有可活化的掩蔽部分的可活化的掩蔽IgG型抗体和二聚抗原受体(DAR)或其抗原结合部分中的任一种都可以由转基因宿主细胞表达。

[0137] 本文所公开的抗体和抗原结合蛋白也可以使用细胞翻译系统产生。出于这类目的,编码多肽的核酸必须经修饰以允许体外转录以产生mRNA,并允许mRNA在所利用的特定无细胞系统(如哺乳动物等真核生物或酵母无细胞翻译系统或如细菌无细胞翻译系统等原核生物)中进行无细胞翻译。

[0138] 编码本文所公开的各种多肽中的任一种的核酸可以化学合成。密码子使用可以被选定从而提高细胞的表达。此类密码子使用将取决于所选的细胞类型。已经为大肠杆菌和其它细菌,以及哺乳动物细胞、植物细胞、酵母细胞和昆虫细胞开发了专门的密码子使用模式。参见例如:Mayfield等人,《美国国家科学院院刊》2003 100(2):438-42;Sinclair等人,《蛋白质表达与纯化(Protein Expr Purif.)》2002(1):96-105;Connell N D.《现代生物技术评论(Curr.Opin.Biotechnol.)》2001 12(5):446-9;Makrides等人,《微生物学评论

(Microbiol.Rev.)》1996 60 (3) :512-38;以及Sharp等人,《酵母(Yeast)》.1991 7 (7) :657-78。

[0139] 本文所描述的抗体和抗原结合蛋白也可以通过化学合成(例如,通过《固相肽合成(Synthesis)》,第2版,1984,伊利诺伊州罗克福德市皮尔斯化学公司(The Pierce Chemical Co.,Rockford,Ill.)中描述的方法)产生。对蛋白质的修饰也可以通过化学合成产生。

[0140] 本文所描述的抗体和抗原结合蛋白可以通过蛋白质化学领域普遍已知的蛋白质的分离/纯化方法进行纯化。非限制性实例包括萃取、重结晶、盐析(例如,用硫酸铵或硫酸钠)、离心、透析、超滤、吸附色谱法、离子交换色谱法、疏水色谱法、正相色谱法、反相色谱法、凝胶过滤、凝胶渗透色谱法、亲和色谱法、电泳、逆流分布或这些的任何组合。纯化后,多肽可以交换到不同的缓冲液中和/或通过本领域已知的多种方法中的任一种进行浓缩,所述方法包括但不限于过滤和透析。

[0141] 本文所描述的纯化抗体和抗原结合蛋白优选地至少65%纯、至少75%纯、至少85%纯、更优选地至少95%纯、并且最优选地至少98%纯。不管纯度的确切数值如何,多肽对于用作药物产品足够纯。本文所描述的具有可活化的掩蔽部分的可活化的掩蔽IgG型抗体和二聚抗原受体(DAR)或其抗原结合部分中的任一种可以由转基因宿主细胞表达并且使用任何本领域已知的方法纯化至约65-98%的纯度或高水平的纯度。

[0142] 在某些实施方式中,本文的抗体和抗原结合蛋白还可以包括翻译后修饰。示例性翻译后蛋白质修饰包括磷酸化、乙酰化、甲基化、ADP-核糖基化、泛素化、糖基化、羧基化、SUMO化、生物素化或添加多肽侧链或疏水基团。因此,经修饰的多肽可以含有如脂质、多糖或单糖和磷酸等非氨基酸元素。糖基化的优选形式是唾液酸化,其将一个或多个唾液酸部分与多肽结合。唾液酸部分改善了溶解度和血清半衰期,同时还降低了蛋白质的可能免疫原性。参见Raju等人,《生物化学(Biochemistry.)》2001 31;40 (30) :8868-76。

[0143] 在一个实施方式中,本文所描述的抗体和抗原结合蛋白可以被修饰成可溶性多肽,所述可溶性多肽包括将抗体和抗原结合蛋白与非蛋白质聚合物连接。在一个实施方式中,非蛋白质聚合物以美国专利第4,640,835号;第4,496,689号;第4,301,144号;第4,670,417号;第4,791,192号或第4,179,337号中所示的方式包括聚乙二醇(“PEG”)、聚丙二醇或聚氧化烯。

[0144] PEG是一种水溶性聚合物,其可商购或可以根据本领域众所周知的方法通过乙二醇的开环聚合来制备(Sandler和Karo,《聚合物合成(Polymer Synthesis)》,纽约学术出版社(Academic Press,New York),第3卷,第138-161页)。术语“PEG”被广泛用于涵盖任何聚乙二醇分子,不考虑大小或PEG末端的修饰,并且可以由下式表示: $X-O(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2OH$ (1),其中n为20至2300并且X为H或端修饰,例如, C_{1-4} 烷基。在一个实施方式中,PEG在一个末端以羟基或甲氧基终止,即X为H或 CH_3 (“甲氧基PEG”)。PEG可以含有结合反应所必需的其它化学基团;其由分子的化学合成产生;或者是用于优化分子各部分距离的间隔物。另外,此类PEG可以由一个或多个PEG侧链组成,这些侧链连接在一起。具有超过一条PEG链的PEG被称为多臂或分支链PEG。分支链PEG可以例如通过将聚环氧乙烷添加到包括甘油、季戊四醇和山梨糖醇的各种多元醇来制备。例如,四臂分支链PEG可以由季戊四醇和环氧乙烷制备。支链PEG描述于例如EP-A0 473 084和美国专利第5,932,462号。PEG的一种形式包括

通过赖氨酸的伯氨基连接的两个PEG侧链(PEG2)(Monfardini等人,《生物缀合化学(Bioconjugate Chem.)》6(1995)62-69)。

[0145] 相对于未经修饰的抗体和抗原结合蛋白结合多肽的清除率,经PEG修饰的多肽的血清清除率可以被调节(例如,增加或减少)约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或甚至90%。经PEG修饰的抗体和抗原结合蛋白可以具有相对于未经修饰的多肽的半衰期增加的半衰期($t_{1/2}$)。相对于未经修饰的抗体和抗原结合蛋白的半衰期,经PEG修饰的多肽的半衰期可以提高至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、400%或500%或甚至1000%。在一个实施方式中,蛋白质半衰期在体外,如在缓冲盐水溶液中或在血清中确定。在其它实施方式中,蛋白质半衰期是体内半衰期,如蛋白质在动物的血清或其它体液中的半衰期。

[0146] 本公开提供了包含与药学上可接受的赋形剂混合的本文所描述的具有可活化的掩蔽部分的可活化的掩蔽IgG型抗体和二聚抗原受体(DAR)或其抗原结合部分中的任一种的治疗组合物。赋形剂涵盖载体、稳定剂和赋形剂。药学上可接受的赋形剂包括例如惰性稀释剂或填充剂(例如,蔗糖和山梨糖醇)、润滑剂、助滑剂和抗粘剂(例如,硬脂酸镁、硬脂酸锌、硬脂酸、二氧化硅、氢化植物油或滑石)。另外的实例包括缓冲剂、稳定剂、防腐剂、非离子型清洁剂、抗氧化剂和等渗剂。

[0147] 治疗组合物和其制备方法在本领域中是众所周知的并且例如在“《雷明顿:药学科学与实践(Remington:The Science and Practice of Pharmacy)》”(第20版,编辑A.R.Gennaro A.R.,2000,宾夕法尼亚州费城利平科特威廉斯·威尔金斯出版公司(Lippincott Williams&Wilkins,Philadelphia,Pa.))中找到。治疗组合物可经调配用于肠胃外施用,并且可以例如含有赋形剂、无菌水、生理盐水、如聚乙二醇等聚亚烷基二醇、植物来源的油或氢化萘。生物相容性、生物可降解的丙交酯聚合物、丙交酯/乙交酯共聚物或聚环氧乙烷-聚环氧丙烷共聚物可以用于控制本文所描述的抗体(或其抗原结合蛋白)的释放。纳米粒子调配物(例如,生物可降解的纳米粒子、固体脂质纳米粒子、脂质体)可以用于控制抗体(或其抗原结合蛋白)的生物分布。其它可能有用的肠胃外递送系统包括乙烯-乙酸乙烯酯共聚物颗粒、渗透泵、可植入输注系统和脂质体。调配物中抗体(或其抗原结合蛋白)的浓度取决于多种因素,包括要施用的药物剂量和施用途径而变化。

[0148] 本文所描述的具有可活化的掩蔽部分的可活化的掩蔽IgG型抗体和二聚抗原受体(DAR)或其抗原结合部分中的任一种可以任选地以药学上可接受的盐施用,如制药工业中常用的无毒酸加成盐或金属复合物。酸加成盐的实例包括如乙酸、乳酸、双羟萘酸、顺丁烯二酸、柠檬酸、苹果酸、抗坏血酸、丁二酸、苯甲酸、棕榈酸、辛二酸、水杨酸、酒石酸、甲磺酸、甲苯磺酸或三氟乙酸等有机酸;如鞣酸、羧甲基纤维素等聚合酸;以及如盐酸、氢溴酸、硫酸磷酸等无机酸。金属复合物包含锌、铁等。在一个实例中,抗体(或其抗原结合蛋白)在存在乙酸钠的情况下调配以增加热稳定性。

[0149] 本文所描述的具有可活化的掩蔽部分的可活化的掩蔽IgG型抗体和二聚抗原受体(DAR)或其抗原结合部分中的任一种可以调配用于口服使用,包括含有活性成分与无毒的药学上可接受的赋形剂的混合物的片剂。用于口服使用的调配物也可以提供为咀嚼片剂,或硬明胶胶囊,其中活性成分与惰性固体稀释剂混合,或提供为软明胶胶囊,其中活性成分与水或油介质混合。

[0150] 如本文所使用的术语“受试者”是指包括脊椎动物、哺乳动物和非哺乳动物的人和/或非人动物。在一个实施方式中，受试者可以是人、非人灵长类动物、猿猴、猿、鼠（例如，小鼠和大鼠）、牛、猪、马、犬、猫、山羊、狼、蛙或鱼。

[0151] 术语“施用(administering/administered)”和语法变体是指使用本领域技术人员已知的各种方法和递送系统中的任一种将药剂物理引入受试者。本文所公开的调配物的示例性施用途径包括静脉内、肌肉内、皮下、腹膜内、脊髓或其它肠胃外施用途径，例如通过注射或输注。如本文所使用的，短语“非肠道施用”意指除了肠内施用和局部施用之外的、通常通过注射进行的施用模式，并且包括但不限于静脉内、腹膜内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眼眶内、心内、皮内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外以及胸骨内注射和输注，以及体内电穿孔。在一个实施方式中，调配物通过非肠胃外途径施用，例如，口服。其它非肠胃外途径包括局部、表皮或粘膜施用途径，例如，经鼻内、经阴道、经直肠、舌下或局部。施用也可以执行例如一次、多次和/或历时一个或多个延长的时段。本文所描述的具有可活化的掩蔽部分的可活化的掩蔽IgG型抗体和二聚抗原受体(DAR)或其抗原结合部分中的任一种可以使用本领域已知的方法和递送途径向受试者施用。

[0152] 术语“有效量”、“治疗有效量”或“有效剂量”或相关术语可以互换使用并且是指当向受试者施用，足以对与肿瘤或癌症抗原表达相关联的疾病或病症产生可测量的改善或预防的具有可活化的掩蔽部分的可活化的掩蔽IgG型抗体和二聚抗原受体(DAR)或其抗原结合部分的量。本文所提供的抗体的治疗有效量在单独使用或组合使用时将根据抗体和组合的相对活性（例如，在抑制细胞生长方面）以及根据所治疗的受试者和疾病状况、受试者的体重、年龄和性别、受试者疾病状况的严重程度、施用方式等而变化，这些可以由本领域普通技术人员容易地确定。

[0153] 在一个实施方式中，治疗有效量将取决于要治疗的受试者和要治疗的病症的某些方面并且可以由本领域技术人员使用已知技术确定。通常，多肽以每天约0.01g/kg至约50mg/kg、优选地每天0.01mg/kg至约30mg/kg、最优选地每天0.1mg/kg至约20mg/kg施用。多肽可以每天（例如，每天一次、两次、三次或四次）或优选地以较低频率（例如，每周、每两周、每三周、每月或每季度）施用。另外，如本领域已知，可能需要根据年龄以及体重、一般健康状况、性别、饮食、施用时间、药物相互作用和疾病的严重程度进行调整。

[0154] 本公开提供了用于治疗患有与一种或多种肿瘤相关抗原的表达相关联的疾病的受试者的方法。疾病包括表达肿瘤相关抗原，例如EGFR或CD38抗原的癌症或肿瘤细胞。在一个实施方式中，癌症或肿瘤包括以下癌症：前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、头颈癌、膀胱癌、皮肤癌、结直肠癌、肛门癌、直肠癌、胰腺癌、肺癌（包括非小细胞肺癌和小细胞肺癌）、平滑肌瘤癌、脑癌、神经胶质瘤癌、胶质母细胞瘤癌、食道癌、肝癌、肾癌、胃癌、结肠癌、宫颈癌、子宫癌、子宫内膜癌、外阴癌、喉癌、阴道癌、骨癌、鼻腔癌、鼻窦癌、鼻咽癌、口腔癌、口咽癌、喉癌、下喉癌、唾液腺癌、输尿管癌、尿道癌、阴茎癌和睾丸癌。

[0155] 在一个实施方式中，癌症包括包含白血病、淋巴瘤、骨髓瘤和B细胞淋巴瘤的血液癌症。血液癌症包括多发性骨髓瘤(MM)、包括伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma, BL)的非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma, NHL)、B慢性淋巴细胞白血病(B-CLL)、全身性红斑狼疮(SLE)、B和T急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤、慢性髓细胞性白血病(CML)、毛细胞白血病(HCL)、滤泡

性淋巴瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症 (Waldenstrom's Macroglobulinemia)、套细胞淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤 (HL)、浆细胞骨髓瘤、前体B细胞淋巴瘤/淋巴瘤、浆细胞瘤、巨细胞性骨髓瘤、浆细胞骨髓瘤、重链骨髓瘤、轻链或本斯-琼斯骨髓瘤 (Bence-Jones myeloma)、淋巴瘤样肉芽肿病、移植后淋巴组织增殖性病症、免疫调节病症、类风湿性关节炎、重症肌无力、特发性血小板减少性紫癜、抗磷脂综合征、恰加斯氏病 (Chagas' disease)、格雷夫氏病 (Grave's disease)、韦格纳氏肉芽肿病 (Wegener's granulomatosis)、结节性多动脉炎、干燥综合征 (Sjogren's syndrome)、寻常性天疱疮、硬皮病、多发性硬化症、抗磷脂综合征、ANCA相关血管炎、古德帕斯丘氏病 (Goodpasture's disease)、川崎病 (Kawasaki disease)、自身免疫性溶血性贫血、以及急进性肾小球肾炎、重链疾病、原发性或免疫细胞相关淀粉样变性以及显著性未确定的单克隆丙种球蛋白病。

[0156] 如本文关于如Fab区等多肽链或蛋白质复合物中的区所使用的术语“串联”意指这些区头对尾布置,在Fab区之间没有插入的不同区(例如,Fc区)。串联Fab区可以通过接头分离。图1所展示的示例性结构包括串联Fab区。

[0157] 如本文关于如Fab区等多肽链或蛋白质复合物中的区所使用的术语“非串联”意指这些区不是“串联”布置。图3所示的示例性结构包括非串联Fab区。

[0158] 可活化的掩蔽抗原结合蛋白

[0159] 本公开提供了包括至少第一抗原结合结构域的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,所述第一抗原结合结构域包括第一重链可变区和第一轻链可变区,其中(i)所述第一重链可变区通过第一肽接头与第一掩蔽部分接合,并且(ii)所述第一轻链可变区通过第二肽接头与第二掩蔽部分接合,并且(iii)所述第一掩蔽部分和所述第二掩蔽部分在没有共价键合的情况下彼此缔合以形成第一二聚化掩蔽复合物,并且(iv)单独的第一掩蔽部分和第二掩蔽部分不与所述第一抗原结合结构域特异性结合,并且(v)所述第一二聚化掩蔽复合物不与所述第一抗原结合结构域特异性结合。在一个实施方式中,所述第一掩蔽部分和所述第二掩蔽部分彼此缔合以减少所述第一抗原结合结构域与其靶抗原的结合。在一个实施方式中,所述第一肽接头包括第一可切割位点。在一个实施方式中,所述第二肽接头包括第二可切割位点。

[0160] 在一个实施方式中,所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白进一步包括第二抗原结合结构域,所述第二抗原结合结构域包括第二重链可变区和第二轻链可变区,其中(i)所述第二重链可变区通过第三肽接头与第三掩蔽部分接合,并且(ii)所述第二轻链可变区通过第四肽接头与第四掩蔽部分接合,并且(iii)所述第三掩蔽部分和所述第四掩蔽部分在没有共价键合的情况下彼此缔合以形成第二二聚化掩蔽复合物,并且(iv)单独的第三掩蔽部分和第四掩蔽部分不与所述第二抗原结合结构域特异性结合,并且(v)所述第二二聚化掩蔽复合物不与所述第二抗原结合结构域特异性结合。在一个实施方式中,所述第三掩蔽部分和所述第四掩蔽部分彼此缔合以减少所述第二抗原结合结构域与其靶抗原的结合,所述靶抗原可以是与由所述第一抗原结合结构域结合的所述靶抗原相比相同或不同的靶抗原。在一个实施方式中,所述第三肽接头包括第三可切割位点。在一个实施方式中,所述第四肽接头包括第四可切割位点。

[0161] 在一个实施方式中,所述第一可切割位点、所述第二可切割位点、所述第三可切割位点和/或所述第四可切割位点可在切割条件下被切割,所述切割条件包括蛋白酶、酯酶、

还原条件或氧化条件。在一个实施方式中,所述第一可切割位点、所述第二可切割位点、所述第三可切割位点和/或所述第四可切割位点可被相同或不同的切割条件切割。在一个实施方式中,所述第一可切割位点、所述第二可切割位点、所述第三可切割位点和/或所述第四可切割位点可被肿瘤微环境中存在的蛋白酶切割或者可被肿瘤微环境中存在的还原或氧化条件切割。在一个实施方式中,所述第一可切割位点、所述第二可切割位点、所述第三可切割位点和/或所述第四可切割位点可被相同或不同的蛋白酶切割。

[0162] 在一个实施方式中,所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白通过化学接头与毒素接合,从而形成免疫缀合物。在一个实施方式中,毒素与化学接头接合,所述化学接头进而通过与赖氨酸侧链形成酰胺键而与可活化的掩蔽抗原结合蛋白的赖氨酸残基接合。在一个实施方式中,可活化的掩蔽抗原结合蛋白上的赖氨酸残基根据美国专利第9,981,046号中描述的方法和化学反应选择性地与接头接合。在一个实施方式中,毒素对细胞和组织具有细胞毒性。在一个实施方式中,免疫缀合物可以用于将毒素递送至靶细胞或组织(例如,靶肿瘤)。

[0163] 本公开提供了包括至少第一抗原结合结构域的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,所述第一抗原结合结构域包括第一重链可变区和第一轻链可变区,其中(i)所述第一重链可变区的N末端通过具有第一可切割位点的第一肽接头与第一掩蔽部分接合,并且(ii)所述第一轻链可变区的N末端通过具有第二可切割位点的第二肽接头与第二掩蔽部分接合,并且(iii)所述第一掩蔽部分和所述第二掩蔽部分在没有二硫键合的情况下彼此缔合以形成第一二聚化掩蔽复合物,并且(iv)所述第一掩蔽部分和所述第二掩蔽部分不与所述至少第一抗原结合结构域特异性结合,并且(v)所述第一二聚化掩蔽复合物不与所述至少第一抗原结合结构域特异性结合,并且(vi)所述第一可切割位点可被第一蛋白酶切割(例如,所述第一蛋白酶包括肿瘤相关蛋白酶),并且(vii)所述第二可切割位点可被第二蛋白酶切割(例如,所述第二蛋白酶包括肿瘤相关蛋白酶),其中所述第一可切割位点和所述第二可切割位点可被相同或不同的蛋白酶切割。在一个实施方式中,所述第一掩蔽部分和所述第二掩蔽部分彼此缔合以降低所述第一抗原结合结构域与其靶抗原结合的能力。在一个实施方式中,第一重组多肽包括与所述第一肽接头接合的所述第一重链可变区,所述第一肽接头与所述第一掩蔽部分接合。在一个实施方式中,第二重组多肽包括与所述第二肽接头接合的所述第一轻链可变区,所述第二肽接头与所述第二掩蔽部分接合。

[0164] 在一个实施方式中,所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白进一步包括第二抗原结合结构域,所述第二抗原结合结构域包括第二重链可变区和第二轻链可变区,其中(i)所述第二重链可变区的N末端通过具有第三可切割位点的第三肽接头与第三掩蔽部分接合,并且(ii)所述第二轻链可变区的N末端通过具有第四可切割位点的第四肽接头与第四掩蔽部分接合,并且(iii)所述第三掩蔽部分和所述第四掩蔽部分在没有二硫键合的情况下彼此缔合以形成第二二聚化掩蔽复合物,并且(iv)所述第三掩蔽部分和所述第四掩蔽部分不与所述第二抗原结合结构域特异性结合,并且(v)所述第二二聚化掩蔽复合物不与所述第二抗原结合结构域特异性结合,并且(vi)所述第三可切割位点可被第三蛋白酶切割(例如,所述第三蛋白酶包括肿瘤相关蛋白酶),并且(vii)所述第四可切割位点可被第四蛋白酶切割(例如,所述第四蛋白酶包括肿瘤相关蛋白酶),其中所述第三可切割位点和所述第四可切割位点可被相同或不同的蛋白酶切割。在一个实施方式中,所述第三掩蔽部分和第四掩蔽部分彼此缔合以降低所述第二抗原结合结构域与其靶抗原结合的能力。在一个实施方式

中,第三重组多肽包括与所述第三肽接头接合的所述第二重链可变区,所述第三肽接头与所述第三掩蔽部分接合。在一个实施方式中,第四重组多肽包括与所述第四肽接头接合的所述第二轻链可变区,所述第四肽接头与所述第四掩蔽部分接合。

[0165] 在一个实施方式中,所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白包括与靶抗原结合的IgG类抗体(例如,图1)(例如,单特异性)。在一个实施方式中,所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白包括与两种靶抗原结合的IgG类抗体(例如,图2)(例如,双特异性)。在一个实施方式中,双特异性抗体具有IgG样结构(例如,来自U.S.2011/0263827的DVD-Ig)。在一个实施方式中,所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白包括二聚抗原受体(DAR)(例如,图3)(例如,参见于2019年3月11日提交的题为“二聚抗原受体(DAR)”的PCT/US2019/21681。

[0166] 在一个实施方式中,所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白通过化学接头与毒素接合,从而形成免疫缀合物。在一个实施方式中,毒素与化学接头接合,所述化学接头进而通过与赖氨酸侧链形成酰胺键而与可活化的掩蔽抗原结合蛋白的赖氨酸残基接合。在一个实施方式中,可活化的掩蔽抗原结合蛋白上的赖氨酸残基根据美国专利第9,981,046号中描述的方法和化学反应选择性地与接头接合。在一个实施方式中,毒素对细胞和组织具有细胞毒性。在一个实施方式中,免疫缀合物可以用于将毒素递送至靶细胞或组织(例如,靶肿瘤)。

[0167] 包括IgG样分子的可活化的掩蔽抗原结合蛋白

[0168] 本公开提供了包括IgG型抗体的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,所述IgG型抗体具有(a)包括第一重链可变区和第一轻链可变区的第一抗原结合结构域和(b)包括第二重链可变区和第二轻链可变区的第二抗原结合结构域,其中(i)所述第一重链可变区的N末端通过具有第一可切割位点的第一肽接头与第一掩蔽部分接合,(ii)所述第一轻链可变区的N末端通过具有第二可切割位点的第二肽接头与第二掩蔽部分接合,(iii)所述第一掩蔽部分和所述第二掩蔽部分在没有二硫键合的情况下彼此缔合,(iv)所述第一掩蔽部分和所述第二掩蔽部分不与所述第一抗原结合结构域特异性结合,(v)所述第一可切割位点可被第一蛋白酶切割,并且(vi)所述第二可切割位点可被第二蛋白酶切割,并且其中所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白进一步包括IgG型抗体,所述IgG型抗体具有(vii)所述第二重链可变区的N末端通过具有第三可切割位点的第三肽接头与第三掩蔽部分接合,(viii)所述第二轻链可变区的N末端通过具有第四可切割位点的第四肽接头与第四掩蔽部分接合,(ix)所述第三掩蔽部分和所述第四掩蔽部分在没有二硫键合的情况下彼此缔合,(x)所述第三掩蔽部分和所述第四掩蔽部分不与所述第二抗原结合结构域特异性结合,(xi)所述第三可切割位点可被第三蛋白酶切割,并且(xii)所述第四可切割位点可被第四蛋白酶切割,其中所述第一可切割位点、所述第二可切割位点、所述第三可切割位点和所述第四可切割位点可被相同或不同的蛋白酶切割。

[0169] 在一个实施方式中,所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白包括与靶抗原结合的IgG类抗体(例如,图1)(例如,单特异性)。在一个实施方式中,所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白包括与两种靶抗原结合的IgG类抗体(例如,图2)(例如,双特异性)。

[0170] 在一个实施方式中,所述第一掩蔽部分和所述第三掩蔽部分的C末端分别与所述第一肽接头和所述第三肽接头的N末端接合。在一个实施方式中,所述第一肽接头和所述第三肽接头的C末端分别与所述第一重链可变区和所述第二重链可变区的N末端接合。

[0171] 在一个实施方式中,所述第二掩蔽部分和所述第四掩蔽部分的C末端分别与所述

第二肽接头和所述第四肽接头的N末端接合。在一个实施方式中,所述第二肽接头和所述第四肽接头的C末端分别与所述第一轻链可变区和所述第二轻链可变区的N末端接合。

[0172] 在一个实施方式中,包括IgG型抗体的可活化的掩蔽抗原结合蛋白可以与靶抗原结合(例如,单特异性抗体)或者可以与两种不同的靶抗原(结合例如,双特异性抗体)。

[0173] 在一个实施方式中,所述第一掩蔽部分和所述第二掩蔽部分彼此缔合以减少所述第一抗原结合结构域与其靶抗原的结合。在一个实施方式中,所述第三掩蔽部分和所述第四掩蔽部分彼此缔合以降低所述第二抗原结合结构域与其靶抗原的结合。

[0174] 在一个实施方式中,所述第一蛋白酶、所述第二蛋白酶、所述第三蛋白酶和/或所述第四蛋白酶由相同肿瘤或不同的肿瘤产生。

[0175] 在一个实施方式中,所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白通过化学接头与毒素接合。

[0176] 本公开提供了包括IgG型抗体和至少第一掩蔽部分和第二掩蔽部分的可活化的掩蔽抗原结合蛋白。在一个实施方式中,当所述第一掩蔽部分和所述第二掩蔽部分和/或所述第三掩蔽部分和所述第四掩蔽部分彼此缔合(二聚化)时干扰(阻碍)抗原结合蛋白与其靶抗原结合的能力。当所述第一掩蔽部分和所述第二掩蔽部分和/或所述第三掩蔽部分和所述第四掩蔽部分彼此缔合(二聚化)时可以通过空间位阻阻断抗原结合蛋白与其靶抗原之间的结合。

[0177] 在一个实施方式中,所述第一掩蔽部分和所述第二掩蔽部分和/或所述第三掩蔽部分和所述第四掩蔽部分包括在不形成共价键(例如,没有二硫键合或转谷氨酰胺键合)的情况下彼此缔合(二聚化)的多肽。所述第一掩蔽部分和所述第二掩蔽部分和/或所述第三掩蔽部分和所述第四掩蔽部分包括可以通过非共价相互作用彼此缔合(二聚化)的多肽,所述非共价相互作用包括离子相互作用、氢键合、偶极-偶极相互作用、亲水相互作用、疏水相互作用、亲和键合或涉及范德华力(van der Waals force)的键合或缔合。

[0178] 在一个实施方式中,所述第一掩蔽部分和所述第二掩蔽部分(成对的第一掩蔽部分和第二掩蔽部分),或所述第三掩蔽部分和所述第四掩蔽部分(成对的第三掩蔽部分和第四掩蔽部分)彼此缔合为同二聚体或异二聚体。

[0179] 在一个实施方式中,所述掩蔽部分中的一个掩蔽部分可以被工程化以具有形成链间立体互补结构的杆结构,以有利于与被工程化以具有臼结构的另一个掩蔽部分的同二聚化或异二聚化。

[0180] 本公开提供了可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其中呈二聚化构型的所述掩蔽部分中的一个或两个包括产生新链间盐桥的一个或多个突变。在一个实施方式中,一个掩蔽部分中的苏氨酸残基可以被谷氨酸代替,并且另一个掩蔽部分中对应位置的天冬酰胺被赖氨酸代替,从而产生链间盐桥。

[0181] 在一个实施方式中,所述第一掩蔽部分、所述第二掩蔽部分、所述第三掩蔽部分和/或所述第四掩蔽部分衍生自免疫球蛋白重链恒定区,例如衍生自 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ 重链。在一个实施方式中,所述第一掩蔽部分、所述第二掩蔽部分、所述第三掩蔽部分和/或所述第四掩蔽部分衍生自 γ 免疫球蛋白恒定区(例如,CL、CH1、CH2或CH3)。

[0182] 在一个实施方式中,所述第一掩蔽部分或所述第二掩蔽部分或所述第三掩蔽部分或所述第四掩蔽部分包括重链恒定区(CH1)。在一个实施方式中,所述第二掩蔽部分或所述第一掩蔽部分或所述第四掩蔽部分或所述第三掩蔽部分包括 κ 或 λ 轻链恒定区(CL κ 或CL λ)。

在一个实施方式中,所述第一掩蔽部分包括重链恒定区(CH1)并且所述第二掩蔽部分包括 κ 或 λ 轻链恒定区(CL κ 或CL λ)。在一个实施方式中,所述第一掩蔽部分包括 κ 或 λ 轻链恒定区(CL κ 或CL λ)并且所述第二掩蔽部分包括重链恒定区(CH1)。在一个实施方式中,所述第三掩蔽部分包括重链恒定区(CH1)并且所述第四掩蔽部分包括 κ 或 λ 轻链恒定区(CL κ 或CL λ)。在一个实施方式中,所述第三掩蔽部分包括 κ 或 λ 轻链恒定区(CL κ 或CL λ)并且所述第四掩蔽部分包括重链恒定区(CH1)。在一个实施方式中,所述第一掩蔽部分、所述第二掩蔽部分、所述第三掩蔽部分和/或所述第四掩蔽部分包括具有SEQ ID NO:21、22或23的氨基酸序列的CH1、CL(κ)或CL(λ)。各种掩蔽部分的氨基酸序列列表还参见表1和2。

[0183] 在一个实施方式中,所述第一掩蔽部分或所述第二掩蔽部分或所述第三掩蔽部分或所述第四掩蔽部分包括IgG1或IgG4 γ 重链恒定区,例如CH3。在一个实施方式中,所述第一掩蔽部分和所述第二掩蔽部分包括IgG1或IgG4 γ 重链恒定区CH3。在一个实施方式中,所述第三掩蔽部分和所述第四掩蔽部分包括IgG1或IgG4 γ 重链恒定区CH3。在一个实施方式中,包括IgG1或IgG4 γ 重链恒定区CH3的所述掩蔽部分中的一个掩蔽部分被工程化以具有形成链间立体互补结构的杵或臼结构,以有利于与被工程化以具有臼或杵结构的包括IgG1或IgG4 γ 重链恒定区CH3的另一个掩蔽部分的二聚化(例如,同二聚化)。在一个实施方式中,所述第一掩蔽部分、所述第二掩蔽部分、所述第三掩蔽部分和/或所述第四掩蔽部分包括具有SEQ ID NO:24、25、30或31的氨基酸序列的CH3(IgG1或IgG4)。各种掩蔽部分的氨基酸序列列表还参见表1和2。

[0184] 在一个实施方式中,所述掩蔽部分中的至少一个衍生自免疫球蛋白重链恒定区并且与可活化的掩蔽抗体的重链可变区接合。在一个实施方式中,所述掩蔽部分中的至少一个衍生自免疫球蛋白重链恒定区并且与所述可活化的掩蔽抗体的轻链可变区接合。

[0185] 在一个实施方式中,所述第一掩蔽部分和所述第二掩蔽部分或所述第三掩蔽部分和所述第四掩蔽部分衍生自T细胞受体 α (alpha) 和 β (beta) 恒定区。在一个实施方式中,所述第一掩蔽部分包括T细胞受体 α (alpha) 恒定区并且所述第二掩蔽部分包括T细胞受体 β (beta) 恒定区。在一个实施方式中,所述第一掩蔽部分包括T细胞受体 β (beta) 恒定区并且所述第二掩蔽部分包括T细胞受体 α (alpha) 恒定区。在一个实施方式中,所述第三掩蔽部分包括T细胞受体 α (alpha) 恒定区并且所述第四掩蔽部分包括T细胞受体 β (beta) 恒定区。在一个实施方式中,所述第三掩蔽部分包括T细胞受体 β (beta) 恒定区并且所述第四掩蔽部分包括T细胞受体 α (alpha) 恒定区。

[0186] 在一个实施方式中,所述掩蔽部分中的至少一个衍生自T细胞受体 α (alpha) 或 β (beta) 恒定区并且与所述可活化的掩蔽抗体的重链可变区接合。在一个实施方式中,所述掩蔽部分中的至少一个衍生自T细胞受体 β (beta) 或 α (alpha) 恒定区并且与所述可活化的掩蔽抗体的轻链可变区接合。在一个实施方式中,所述第一掩蔽部分、所述第二掩蔽部分、所述第三掩蔽部分和/或所述第四掩蔽部分包括具有SEQ ID NO:28或29的氨基酸序列的T细胞受体 α (alpha) 或 β (beta) 恒定区。各种掩蔽部分的氨基酸序列列表参见表1和2。

[0187] 在一个实施方式中,所述第一掩蔽部分、所述第二掩蔽部分、所述第三掩蔽部分或所述第四掩蔽部分包括来自催化抗体(例如,38C2)的可变重链结构域。在一个实施方式中,所述第一掩蔽部分、所述第二掩蔽部分、所述第三掩蔽部分或所述第四掩蔽部分包括来自催化抗体(例如,38C2)的可变轻链结构域。在一个实施方式中,所述第一掩蔽部分包括来自

38C2抗体的可变重链结构域并且所述第二掩蔽部分包括来自38C2抗体的可变轻链结构域。在一个实施方式中,所述第一掩蔽部分包括来自38C2抗体的可变轻链结构域并且所述第二掩蔽部分包括来自38C2抗体的可变重链结构域。在一个实施方式中,所述第三掩蔽部分包括来自38C2抗体的可变重链结构域并且所述第四掩蔽部分包括来自38C2抗体的可变轻链结构域。在一个实施方式中,所述第三掩蔽部分包括来自38C2抗体的可变轻链结构域并且所述第四掩蔽部分包括来自38C2抗体的可变重链结构域。在一个实施方式中,所述第一掩蔽部分、所述第二掩蔽部分、所述第三掩蔽部分和/或所述第四掩蔽部分包括来自催化抗体(例如,38C2)的具有SEQ ID NO:26或27的氨基酸序列的可变重链结构域。各种掩蔽部分的氨基酸序列列表参见表1和2。

[0188] 在一个实施方式中,掩蔽部分(例如,第一掩蔽部分、第二掩蔽部分、第三掩蔽部分或第四掩蔽部分)包括沿同一多肽链串联布置的部分的两个或更多个拷贝。例如,掩蔽部分包括串联布置的两个抗体CH3区,或串联布置的两个抗体CH2区,或串联布置的两个抗体CH1区,或串联布置的两个抗体CL区。CH3、CH2、CH1或CL区域中的任何一个都可以包括杆或臼结构。例如,所述掩蔽部分包括串联布置的两个TCR α 链恒定区,或串联布置的两个TCR β 链恒定区。

[0189] 在一个实施方式中,掩蔽部分(例如,第一掩蔽部分、第二掩蔽部分、第三掩蔽部分或第四掩蔽部分)包括沿同一多肽链串联布置的两个或更多个不同的部分。例如,所述掩蔽部分包括串联布置的抗体CH2区和抗体CH3区。

[0190] 本公开提供了包括IgG型抗体和具有相同或不同的长度(例如,长度为5-10个、10-20个、20-30个、30-40个或40-50个氨基酸)的至少第一肽接头和第二肽接头的可活化的掩蔽抗原结合蛋白。在一个实施方式中,所述第一肽接头和/或所述第二肽接头富含甘氨酸(例如,GS型接头)。在一个实施方式中,所述第一肽接头和所述第二肽接头具有相同的氨基酸序列或不同的氨基酸序列。

[0191] 在一个实施方式中,所述第一肽接头可被第一蛋白酶切割。在一个实施方式中,所述第一肽接头具有作为由第一蛋白酶切割的底物的氨基酸序列(第一可切割位点)。

[0192] 在一个实施方式中,所述第二肽接头可被第二蛋白酶切割。在一个实施方式中,所述第二肽接头具有作为由第二蛋白酶切割的底物的氨基酸序列(第二可切割位点)。

[0193] 在一个实施方式中,所述第一肽接头可被第一蛋白酶切割并且所述第二肽接头可被第二蛋白酶切割。在一个实施方式中,所述第一肽接头和所述第二肽接头可被相同蛋白酶切割。在一个实施方式中,所述第一肽接头和所述第二肽接头可被不同的蛋白酶切割。在一个实施方式中,所述第一肽接头和所述第二肽接头不可被蛋白酶切割。

[0194] 本公开提供了包括IgG型抗体并且进一步包括具有相同或不同的长度(例如,长度为10-20个、20-30个、30-40个或40-50个氨基酸)的第三肽接头和第四肽接头的可活化的掩蔽抗原结合蛋白。在一个实施方式中,所述第三肽接头和/或所述第四肽接头富含甘氨酸(例如,GS型接头)。在一个实施方式中,所述第三肽接头和所述第四肽接头具有相同的氨基酸序列或不同的氨基酸序列。

[0195] 在一个实施方式中,所述第三肽接头可被第三蛋白酶切割。在一个实施方式中,所述第三肽接头具有作为由第三蛋白酶切割的底物的氨基酸序列。

[0196] 在一个实施方式中,所述第四肽接头可被第四蛋白酶切割。在一个实施方式中,所

述第四肽接头具有作为由第四蛋白酶切割的底物的氨基酸序列。

[0197] 在一个实施方式中,所述第三肽接头可被第三蛋白酶切割并且所述第四肽接头可被第四蛋白酶切割。在一个实施方式中,所述第三肽接头和所述第四肽接头可被相同蛋白酶切割。在一个实施方式中,所述第三肽接头和所述第四肽接头可被不同的蛋白酶切割。在一个实施方式中,所述第三肽接头或所述第四肽接头不可被蛋白酶切割。

[0198] 在一个实施方式中,所述第一蛋白酶、所述第二蛋白酶、所述第三蛋白酶和/或所述第四蛋白酶可以独立地选自:基质金属蛋白酶(MMP),包括MMP1、MMP2、MMP3、MMP8、MMP9、MMP11、MMP13、MMP14、MT1-MMP(膜型1基质金属蛋白酶);解整合素和金属蛋白酶(ADAM)蛋白酶,包括ADAM10、ADAM12、ADAM17;尿激酶纤溶酶原活化剂(uPA)或uPAR;丝氨酸蛋白酶;半胱氨酸蛋白酶;天冬氨酸蛋白酶;苏氨酸蛋白酶;组织蛋白酶(例如,半胱氨酸或天冬氨酸组织蛋白酶),包括组织蛋白酶B、组织蛋白酶C、组织蛋白酶D、组织蛋白酶E、组织蛋白酶K或组织蛋白酶L。

[0199] 在一个实施方式中,所述第一肽接头、所述第二肽接头、所述第三肽接头和/或所述第四肽接头包括与SEQ ID NO:32-40中的任一个的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。还参见表3-9中列出的各种肽接头序列。

[0200] 本公开提供了包括IgG型抗体的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,所述IgG型抗体具有包括第一重链可变区和第一轻链可变区的至少第一抗原结合结构域,其中所述第一抗原结合结构域与第一靶抗原结合(例如,与第一靶抗原特异性结合)。在一个实施方式中,所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白可以进一步包括包含第二重链可变区和第二轻链可变区的第二抗原结合结构域,其中所述第二抗原结合结构域与第二靶抗原结合(例如,与第二靶抗原特异性结合)。在一个实施方式中,所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域与相同的靶抗原结合。在另一个实施方式中,所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域与不同的靶抗原结合。

[0201] 在一个实施方式中,所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白与EGFR抗原(SEQ ID NO:1)或CD38抗原(SEQ ID NO:6)结合。

[0202] 在一个实施方式中,所述抗原结合结构域包括重链可变区,所述重链可变区包括与SEQ ID NO:2或4(例如,抗EGFR)的一部分或全长或与SEQ ID NO:7、9、11、13、14、15、16、17、18或20(例如,抗CD38)的一部分或全长具有至少92%、或至少93%、或至少94%、或至少95%、或至少96%、或至少97%、或至少98%、或至少99%序列同一性,或与SEQ ID NO:2或4(例如,抗EGFR)的一部分或全长或SEQ ID NO:7、9、11、13、14、15、16、17、18或20(例如,抗CD38)的一部分或全长具有100%序列同一性的氨基酸序列。

[0203] 在一个实施方式中,所述抗原结合结构域包括轻链可变区,所述轻链可变区包括与SEQ ID NO:3或5(抗EGFR)的一部分或全长或与SEQ ID NO:8、10、12或19(例如,抗CD38)的一部分或全长具有至少92%、或至少93%、或至少94%、或至少95%、或至少96%、或至少97%、或至少98%、或至少99%序列同一性,或与SEQ ID NO:3或5(例如,抗EGFR)的一部分或全长或SEQ ID NO:8、10、12或19(例如,抗CD38)的一部分或全长具有100%序列同一性的氨基酸序列。

[0204] 本公开提供了表现出非活性和活化状态的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,所述非活

性和活化状态取决于掩蔽部分阻碍抗原结合结构域与其靶抗原之间的结合的能力。在一个实施方式中,通过完整的肽接头将单独掩蔽部分拴系到重链和轻链可变区的N端,并且掩蔽部分形成阻碍抗原结合结构域,导致非活性状态的二聚化复合物。一个或两个肽接头的切割允许二聚化复合物从阻碍位置移开,以允许抗原结合结构域与其靶抗原之间的结合。在一个实施方式中,两个肽接头的切割释放二聚化复合物以脱离抗原结合蛋白。

[0205] 在一个实施方式中,当所述第一肽接头和所述第二肽接头和/或所述第三肽接头和所述第四肽接头处于所述未切割状态时,包括IgG型抗体的所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白被抑制与其靶抗原结合(例如,非活性)。在一个实施方式中,当所述第一肽接头和所述第二肽接头和/或所述第三肽接头和所述第四肽接头处于所述未切割状态时,所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白对其靶抗原表现出降低的结合能力(例如,非活性)。在一个实施方式中,在非活性状态的掩蔽抗原结合蛋白中,所述第一掩蔽部分和所述第二掩蔽部分和/或所述第三掩蔽部分和所述第四掩蔽部分可以彼此缔合或可以彼此不缔合。

[0206] 在一个实施方式中,具有完整的第一肽接头和第二肽接头和/或完整的第三肽接头和第四肽接头的掩蔽抗原结合蛋白与靶抗原的结合能力可以降低至少25%-50%、或至少50%-75%、或至少75%-95%、或至少95%-99%或更多。

[0207] 在一个实施方式中,具有完整的第一肽接头和第二肽接头和/或完整的第三肽接头和第四肽接头的掩蔽抗原结合蛋白与靶抗原的结合能力可以降低约2-20倍、或约20-100倍、或约100-200倍、或约200-500倍、或约500-1000倍、或约1,000-10,000倍、或约10,000-100,000倍或降低结合能力的更高倍数水平。

[0208] 在一个实施方式中,具有完整的第一肽接头和第二肽接头和/或完整的第三肽接头和第四肽接头的掩蔽抗原结合蛋白与非活性抗原结合蛋白的结合亲和力(例如, K_D)为约 10^{-4} - 10^{-8} M。在一个实施方式中,靶抗原是可溶性抗原或细胞表面抗原。

[0209] 本公开提供了可活化的掩蔽抗原结合蛋白,当所述第一肽接头和所述第二肽接头和/或所述第三肽接头和所述第四肽接头处于所述切割状态时,所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白是未掩蔽的并且能够与其靶抗原结合(例如,活化的)。在一个实施方式中,当所述第一肽接头和所述第二肽接头和/或所述第三肽接头和所述第四肽接头处于所述切割状态时,所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白对其靶抗原表现出增加的结合能力(例如,活化的)。在一个实施方式中,在活化状态的掩蔽抗原结合蛋白中,所述第一掩蔽部分和所述第二掩蔽部分和/或所述第三掩蔽部分和所述第四掩蔽部分可以彼此缔合或可以彼此不缔合。

[0210] 在一个实施方式中,具有切割的第一肽接头和/或第二肽接头和/或具有切割的第三肽接头和/或第四肽接头的未掩蔽抗原结合蛋白与靶抗原的结合能力可以增加至少25%-50%、或至少50%-75%、或至少75%-95%、或至少95%-99%或更多。

[0211] 在一个实施方式中,具有切割的第一肽接头和/或第二肽接头和/或具有切割的第三肽接头和/或第四肽接头的未掩蔽抗原结合蛋白与靶抗原的结合能力可以增加约2-20倍、或约20-100倍、或约100-200倍、或约200-500倍、或约500-1000倍、或约1,000-10,000倍、或约10,000-100,000倍或增加结合能力的更高倍数水平。

[0212] 在一个实施方式中,具有切割的第一肽接头和/或第二肽接头和/或具有切割的第三肽接头和/或第四肽接头的未掩蔽抗原结合蛋白与活化抗原结合蛋白的结合亲和力(例如, K_D)为约 10^{-5} - 10^{-12} M。在一个实施方式中,靶抗原是可溶性抗原或细胞表面抗原。在一个

实施方式中,活化形式的抗原结合蛋白的结合亲和力高于非活性形式。

[0213] 在一个实施方式中,非活性与活化的抗原结合蛋白之间的结合亲和力差异(例如,非活性 K_D 与活化 K_D)为约 10 、 10^2 、 10^3 、 10^4 或 10^5 或更高的结合亲和力差异。

[0214] 本公开提供了包括处于非活性或活化状态的IgG型抗体的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,所述IgG型抗体包括表现出效应子功能的Fc区,所述效应子功能包括补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和/或抗体依赖性吞噬作用(ADP)。在一个实施方式中,Fc区的突变可以增加或减少这些功能中的任何一种或任何组合。在一个实施方式中,Fc区包括降低效应子功能的LALA-PG突变(L234A、L235A、P329G)。

[0215] 在一个实施方式中,Fc区介导可活化的掩蔽抗原结合蛋白的血清半衰期,并且Fc区中的突变可以增加或降低可活化的掩蔽抗原结合蛋白的血清半衰期。

[0216] 在一个实施方式中,Fc区影响可活化的掩蔽抗原结合蛋白的热稳定性,并且Fc区中的突变可以增加或降低可活化的掩蔽抗原结合蛋白的热稳定性。

[0217] 本公开提供了包括IgG型抗体并在Fc区具有一个或多个氨基酸突变的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其中所述突变导致引入促进第一重链和第二重链的二聚化的杵臼结构(Ridgeway 1996《蛋白质工程化(Protein Engineering)》9(7):617-621),或导致引入另外的链间二硫键合(Carter 2011《免疫学方法杂志(Journal of Immunological Methods)》248:7-15),和/或导致引入新盐桥。

[0218] 在一个实施方式中,Fc区包括在一条重链上产生突起(例如,杵)并且在另一条重链上产生槽(例如,臼),使得突起和槽彼此缔合的突变。在一个实施方式中,突起和槽促进重链之间的缔合,例如促进二聚化。在一个实施方式中,通过用较大的氨基酸取代小氨基酸来突变一条重链以产生突起。在一个实施方式中,通过用较小的氨基酸取代较大的氨基酸来突变另一条重链以产生槽。在一个实施方式中,Fc区杵臼结构突变包括选自以下组成的组的任何一个Fc位置或两个或更多个Fc位置的任何组合处的替代突变:T366、L368、T394、F405、Y407和K409(编号基于卡巴特(Kabat)系统)。在一个实施方式中,Fc区杵臼结构突变包括以下突变中的任一种或两种或更多种的任何组合:T366Y、T366W、T366S、L368A、T394S、T394W、F405A、F405W、Y407A、Y407V、Y407T(基于卡巴特系统的编号)。

[0219] 本公开提供了编码包括IgG型抗体的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白的核酸。例如,核酸编码包括与靶抗原(例如,单特异性靶抗原)结合的IgG类抗体的可活化的掩蔽抗原结合蛋白。在另一个实例中,核酸编码包括与两种靶抗原(例如,双特异性靶抗原)结合的IgG类抗体的可活化的掩蔽抗原结合蛋白。

[0220] 在一个实施方式中,第一核酸编码包括(i)第一掩蔽部分或第三掩蔽部分、(ii)第一肽接头或第三肽接头以及(iii)重链可变区的重链。在一个实施方式中,所述第一核酸进一步编码包括(iv)重链恒定区(CH1)的重链。在一个实施方式中,所述第一核酸进一步编码包括(v)铰链区的重链。在一个实施方式中,所述第一核酸进一步编码包括(vi)重链恒定区(CH2和/或CH3)的重链。在一个实施方式中,所述第一核酸编码具有杵或臼的重链恒定区(CH2和/或CH3)。在一个实施方式中,所述第一接头包括第一可切割位点。在一个实施方式中,所述第三接头包括第三可切割位点。在一个实施方式中,所述第一核酸包括重组核酸分子。

[0221] 在一个实施方式中,所述第一核酸编码包括重链可变区的重链,所述重链可变区

包括与SEQ ID NO:2或4(例如,抗EGFR)的一部分或全长或与SEQ ID NO:7、9、11、13、14、15、16、17、18或20(例如,抗CD38)的一部分或全长具有至少92%、或至少93%、或至少94%、或至少95%、或至少96%、或至少97%、或至少98%、或至少99%序列同一性,或与SEQ ID NO:2或4(例如,抗EGFR)的一部分或全长或SEQ ID NO:7、9、11、13、14、15、16、17、18或20(例如,抗CD38)的一部分或全长具有100%序列同一性的氨基酸序列。

[0222] 在一个实施方式中,所述第一核酸编码包括第一掩蔽部分或第三掩蔽部分的重链,所述第一掩蔽部分或所述第三掩蔽部分包括SEQ ID NO:21-31中的任一个的氨基酸序列(参见表1和2)。

[0223] 在一个实施方式中,所述第一核酸编码包括第一肽接头或第三肽接头的重链,所述第一肽接头或所述第三肽接头包括SEQ ID NO:32-40中的任一个的氨基酸序列(还参见表3-9和12)。

[0224] 在一个实施方式中,第二核酸编码包括(i)第二掩蔽部分或第四掩蔽部分、(ii)第二肽接头或第四肽接头以及(iii)轻链可变区的轻链。在一个实施方式中,所述第二核酸进一步编码轻链恒定区(CL)。在一个实施方式中,所述第二接头包括第二可切割位点。在一个实施方式中,所述第四接头包括第四可切割位点。在一个实施方式中,所述第二核酸包括重组核酸分子。

[0225] 在一个实施方式中,所述第二核酸编码包括轻链可变区的轻链,所述轻链可变区包括与SEQ ID NO:3或5(抗EGFR)的一部分或全长或与SEQ ID NO:8、10、12或19(例如,抗CD38)的一部分或全长具有至少92%、或至少93%、或至少94%、或至少95%、或至少96%、或至少97%、或至少98%、或至少99%序列同一性,或与SEQ ID NO:3或5(例如,抗EGFR)的一部分或全长或SEQ ID NO:8、10、12或19(例如,抗CD38)的一部分或全长具有100%序列同一性的氨基酸序列。

[0226] 在一个实施方式中,所述第二核酸编码包括第二掩蔽部分或第四掩蔽部分的轻链,所述第二掩蔽部分或所述第四掩蔽部分包括SEQ ID NO:21-31中的任一个的氨基酸序列(参见表1和2)。

[0227] 在一个实施方式中,所述第二核酸编码包括第二肽接头或第四肽接头的轻链,所述第二肽接头或所述第四肽接头包括SEQ ID NO:32-40中的任一个的氨基酸序列(还参见表3-9和12)。

[0228] 本公开提供了包括表达载体、与编码包括IgG型抗体的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白的核酸可操作地接合的单独载体。例如,表达载体与编码包括与靶抗原(例如,单特异性靶抗原)结合的IgG类抗体的可活化的掩蔽抗原结合蛋白的核酸可操作地接合。在另一个实例中,表达载体与编码包括与两种靶抗原(例如,双特异性靶抗原)结合的IgG类抗体的可活化的掩蔽抗原结合蛋白的核酸可操作地接合。

[0229] 在一个实施方式中,表达载体包括一个或多个调控序列(例如,启动子和/或增强子),所述一个或多个调控序列控制编码包括IgG型抗体的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白的核酸的转录。在一个实施方式中,表达载体包括一个或多个调控序列,每个调控序列与编码重链或轻链的核酸可操作地接合,并且每个调控序列以单顺反子方式控制编码重链或轻链的核酸的转录。在一个实施方式中,表达载体包括与编码重链和轻链的核酸可操作地接合的调控序列,并且所述调控序列以多顺反子方式控制重链和轻链的转录。

[0230] 在一个实施方式中,载体包括多个调控序列,所述多个调控序列可以与各自编码重链或轻链序列的单独核酸可操作地接合。

[0231] 在一个实施方式中,将一种表达载体引入宿主细胞,其中宿主细胞内的表达载体携带启动子(并且任选地携带增强子序列),所述启动子与编码重链和/或轻链序列的核酸可操作地接合。因此,宿主细胞可以表达构成任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白的重链和/或轻链。

[0232] 在一个实施方式中,将多种表达载体引入宿主细胞,其中宿主细胞内的单独的表表达载体携带启动子(并且任选地携带增强子序列),所述启动子与编码重链或轻链序列的核酸可操作地接合。因此,宿主细胞可以表达构成任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白的重链和轻链。

[0233] 载体包括作为诱导型或组成型启动子的启动子。可以选择载体和宿主细胞以产生瞬时或稳定表达本文所描述的任何重链或轻链的转基因宿主细胞。

[0234] 本公开提供了携带单个表达载体的宿主细胞,所述单个表达载体与一个或多个核酸可操作地接合,所述一个或多个核酸编码构成任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白的重链和/或轻链。

[0235] 本公开提供了携带两种或更多种表达载体的宿主细胞,每种表达载体与一个或多个核酸可操作地接合,所述一个或多个核酸编码构成任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白的重链和/或轻链。

[0236] 宿主细胞可以是细菌或哺乳动物细胞。在一个实施方式中,宿主细胞包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。

[0237] 在一个实施方式中,通过脂转染(例如,使用脂质表面活性剂);电穿孔;采用氯化钙、氯化铷、磷酸钙、DEAE-葡聚糖或其它物质进行转染;病毒转染;非病毒转染;微粒轰击;以及感染(例如,当载体是感染原时)将至少一种表达载体引入宿主细胞。

[0238] 在一个实施方式中,宿主细胞携带与编码重链和轻链的核酸可操作地接合的一种表达载体。宿主细胞可以以1:1、1:1.5、1.5:1、1:2、2:1、1:3或3:1的重链:轻链摩尔比表达重链和轻链。其它摩尔比在本领域中也可能是众所周知的。

[0239] 在一个实施方式中,宿主细胞携带两种表达载体,其中第一表达载体与编码重链的核酸可操作地接合,并且第二表达载体与编码轻链的核酸可操作地接合。宿主细胞可以以1:1、1:1.5、1.5:1、1:2、2:1、1:3或3:1的重链:轻链摩尔比表达重链和轻链。其它摩尔比在本领域中也可能是众所周知的。

[0240] 本公开提供了用于制备包括本文所描述的IgG型抗体的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白的方法,所述方法包括:培养宿主细胞群,其中所述群中的单独宿主细胞携带至少一种表达载体,所述至少一种表达载体与编码本文所描述的重链和/或轻链中的任一个或任何组合的核酸中的任一种或任何组合可操作地连接,其中所述培养在适于由所述宿主细胞群表达所述重链和/或轻链的条件下进行。

[0241] 在一个实施方式中,编码所述重链和/或轻链的核酸进一步编码用于分泌表达的多肽链的信号肽。在一个实施方式中,所述培养在适于由所述宿主细胞群分泌所述重链和/或轻链的条件下进行。

[0242] 在一个实施方式中,编码所述重链和/或轻链中的任一个或任何组合的核酸进一

步编码用于富集表达的多肽的亲亲和标签序列。示例性亲和和标签序列包括组氨酸标签、FLAG 标签、myc 标签、HA 标签和 GST 标签。

[0243] 在一个实施方式中,用于制备包括本文所描述的 IgG 型抗体的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白的方法进一步包括分离所表达的重链和/或轻链。

[0244] 在一个实施方式中,所述培养在适于所述重链或轻链的组装和缔合的条件下进行以形成包括 IgG 型抗体的所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白。

[0245] 在一个实施方式中,所述方法进一步包括分离或回收包括 IgG 型抗体的组装的可活化的掩蔽抗原结合蛋白。在一个实施方式中,使用亲和色谱法进行分离。在一个实施方式中,使用亲和色谱法用来自金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的蛋白 A 或 G、谷胱甘肽 S 转移酶 (GST) 或免疫亲和进行分离。在一个实施方式中,进行包括阳离子交换、阴离子交换色谱法、疏水相互作用色谱法、混合模式色谱法和/或羟基磷灰石色谱法的一个或多个另外的分离步骤。

[0246] 在一个实施方式中,包括 IgG 型抗体的组装的可活化的掩蔽抗原结合蛋白包括与轻链配对的重链,其中 (1) 所述重链包括第一掩蔽部分或第三掩蔽部分、第一肽接头或第三肽接头、重链可变区,并且任选地包括重链恒定区 (CH1、CH2 和/或 CH3), 并且 (2) 所述轻链包括第二掩蔽部分或第四掩蔽部分、第二肽接头或第四肽接头、轻链可变区,并且任选地包括轻链恒定区 (CL)。

[0247] 可以使用本领域众所周知的方法使用转基因宿主细胞表达、噬菌体展示、酵母展示和人抗体基因转基因小鼠来制备包括 IgG 型抗体的可活化的掩蔽抗原结合蛋白。在一个实施方式中,使用转基因宿主细胞表达的抗原结合蛋白的产量可以是形成的总可活化的掩蔽抗原结合蛋白的约 20%-80%、或约 30%-90%、或约 40%-95% 或约 50%-99%。

[0248] 本公开提供了用于切割包括本文所描述的 IgG 型抗体的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白的至少一个肽接头的方法,所述方法包括: (a) 使至少一种蛋白酶与处于非活性形式的可活化的掩蔽抗原结合蛋白接触,其中所述第一肽接头、所述第二肽接头、所述第三肽接头和所述第四肽接头处于未切割状态。

[0249] 在一个实施方式中,使可活化的掩蔽抗原结合蛋白与选自以下的一种或两种或更多种蛋白酶的任何组合接触: 基质金属蛋白酶 (MMP); MMP1; MMP2; MMP3; MMP8; MMP9; MMP11; MMP13; MMP14; MT1-MMP (膜型 1 基质金属蛋白酶); 解整合素和金属蛋白酶 (ADAM) 蛋白酶; ADAM10; ADAM12; ADAM17; 尿激酶纤溶酶原活化剂 (uPA); uPAR; 丝氨酸蛋白酶; 半胱氨酸蛋白酶; 天冬氨酸蛋白酶; 苏氨酸蛋白酶; 组织蛋白酶 (例如, 半胱氨酸或天冬氨酸组织蛋白酶); 组织蛋白酶 B; 组织蛋白酶 C; 组织蛋白酶 D; 组织蛋白酶 E; 组织蛋白酶 K 或组织蛋白酶 L。

[0250] 在一个实施方式中,使可活化的掩蔽抗原结合蛋白基本上同时 (在同一时间) 与两种或更多种蛋白酶接触,或者以任何顺序与两种或更多种蛋白酶接触。

[0251] 在一个实施方式中,步骤 (a) 中使用的可活化的掩蔽抗原结合蛋白的至少一个肽接头包括可被一种或多种蛋白酶切割的可切割位点,所述一种或多种蛋白酶包括: 基质金属蛋白酶 (MMP); MMP1; MMP2; MMP3; MMP8; MMP9; MMP11; MMP13; MMP14; MT1-MMP (膜型 1 基质金属蛋白酶); 解整合素和金属蛋白酶 (ADAM) 蛋白酶; ADAM10; ADAM12; ADAM17; 尿激酶纤溶酶原活化剂 (uPA); uPAR; 丝氨酸蛋白酶; 半胱氨酸蛋白酶; 天冬氨酸蛋白酶; 苏氨酸蛋白酶; 组织蛋白酶 (例如, 半胱氨酸或天冬氨酸组织蛋白酶); 组织蛋白酶 B; 组织蛋白酶 C; 组织蛋白

酶D;组织蛋白酶E;组织蛋白酶K或组织蛋白酶L。

[0252] 在一个实施方式中,所述方法进一步包括:(b)切割所述可切割位点中的至少一个以将可活化的掩蔽抗原结合蛋白转化为活化形式。在一个实施方式中,活化形式可以与靶抗原结合。

[0253] 在一个实施方式中,所述方法进一步包括:(c)将(现在处于所述活化状态的)所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白与靶抗原结合。

[0254] 在一个实施方式中,接触、切割和结合步骤在体外或体内条件下进行。

[0255] 在一个实施方式中,靶抗原包括由健康或患病细胞表达的可溶性抗原或表面抗原。

[0256] 在一个实施方式中,表达靶抗原的患病细胞(例如,肿瘤或癌细胞)也表达切割肽接头的一种或多种蛋白酶。在一个实施方式中,患病细胞表达包括以下的一种蛋白酶或两种或更多种蛋白酶的组:基质金属蛋白酶(MMP);MMP1;MMP2;MMP3;MMP8;MMP9;MMP11;MMP13;MMP14;MT1-MMP(膜型1基质金属蛋白酶);解整合素和金属蛋白酶(ADAM)蛋白酶;ADAM10;ADAM12;ADAM17;尿激酶纤溶酶原活化剂(uPA);丝氨酸蛋白酶;半胱氨酸蛋白酶;天冬氨酸蛋白酶;苏氨酸蛋白酶;组织蛋白酶;组织蛋白酶B;组织蛋白酶C;组织蛋白酶D;组织蛋白酶E;组织蛋白酶K和/或组织蛋白酶L。

[0257] 在一个实施方式中,方法进一步包括:(d)杀死患病细胞(例如,肿瘤或癌细胞)。

[0258] 在一个实施方式中,所述肽接头中的至少一个可被肿瘤微环境中存在的蛋白酶切割。

[0259] 在一个实施方式中,肿瘤微环境包括选自由以下组成的组的蛋白酶:基质金属蛋白酶(MMP);MMP1;MMP2;MMP3;MMP8;MMP9;MMP11;MMP13;MMP14;MT1-MMP(膜型1基质金属蛋白酶);解整合素和金属蛋白酶(ADAM)蛋白酶;ADAM10;ADAM12;ADAM17;尿激酶纤溶酶原活化剂(uPA);丝氨酸蛋白酶;半胱氨酸蛋白酶;天冬氨酸蛋白酶;苏氨酸蛋白酶;组织蛋白酶(例如,半胱氨酸或天冬氨酸组织蛋白酶);组织蛋白酶B;组织蛋白酶C;组织蛋白酶D;组织蛋白酶E;组织蛋白酶K以及组织蛋白酶L。

[0260] 本公开提供了治疗患有与肿瘤相关抗原的表达或过表达相关联的疾病的受试者的方法,所述方法包括:向受试者施用有效量的治疗组合物,所述治疗组合物包含一种可活化的掩蔽抗原结合蛋白或两种或更多种可活化的掩蔽抗原结合蛋白的任何组合,所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白包括本文所描述的IgG型抗体。在一个实施方式中,将包括IgG型抗体的可活化的掩蔽抗原结合蛋白以具有处于未切割状态的第一肽接头、第二肽接头、第三肽接头和第四肽接头的非活性形式向受试者施用。

[0261] 本公开提供了一种用于治疗患有与肿瘤抗原的有害表达相关联的疾病、病症或病状的受试者的方法,其中疾病是癌症,包括但不限于血液乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、头颈癌、肺癌、膀胱癌、黑色素瘤、结直肠癌、胰腺癌、肺癌、肝癌、肾癌、食管癌、平滑肌瘤、平滑肌肉瘤、神经胶质瘤和成胶质细胞瘤,其中用于治疗所述受试者的方法包括向受试者施用有效量的治疗组合物,所述治疗组合物包含一种可活化的掩蔽抗原结合蛋白或两种或更多种可活化的掩蔽抗原结合蛋白的任何组合,所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白包括本文所描述的IgG型抗体。

[0262] 在一个实施方式中,癌症是选自由以下组成的组的血液癌症:非霍奇金淋巴瘤

(NHL)、伯基特淋巴瘤(BL)、B细胞慢性淋巴细胞性白血病(B-CLL)、B细胞和T细胞急性淋巴细胞性白血病(ALL)、T细胞淋巴瘤(TCL)、急性骨髓性白血病(AML)、毛细胞白血病(HCL)、霍奇金淋巴瘤(HL)、慢性骨髓性白血病(CML)和多发性骨髓瘤(MM)。

[0263] 本公开提供了一种用于检测蛋白酶活性和对检测、诊断、监测和/或分级如癌症或肿瘤等患病组织的特异性的基于切割的体外方法。可以从受试者中提取肿瘤或癌症团块并使其与包括本文所描述的IgG型抗体的两种或更多种可活化的掩蔽抗原结合蛋白中的一种或任何组合接触,所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白各自具有已知蛋白酶切割谱。来自受试者的肿瘤或癌症团块产生一种或多种蛋白酶并且在适于蛋白酶切割可活化的掩蔽抗原结合蛋白上的肽接头的条件下与一种或多种可活化的掩蔽抗原结合蛋白接触。可以使用任何方法检测切割的肽接头产物。因此,可以鉴定由肿瘤或癌症团块产生的蛋白酶的类型。在一个实施方式中,肽接头可被选自由以下组成的组的中的任一种蛋白酶或两种或更多种蛋白酶的任何组合切割:基质金属蛋白酶(MMP);MMP1;MMP2;MMP3;MMP8;MMP9;MMP11;MMP13;MMP14;MT1-MMP(膜型1基质金属蛋白酶);ADAM蛋白酶;尿激酶纤溶酶原活化剂(uPA);丝氨酸蛋白酶;半胱氨酸蛋白酶;天冬氨酸蛋白酶;苏氨酸蛋白酶;组织蛋白酶(例如,半胱氨酸或天冬氨酸组织蛋白酶);组织蛋白酶B;组织蛋白酶C;组织蛋白酶D;组织蛋白酶E;组织蛋白酶K以及组织蛋白酶L。

[0264] 本公开提供了一种用于检测由来自受试者的肿瘤产生的蛋白酶的存在的方法,所述方法包括:(a)使(i)使从所述受试者获得的肿瘤与(ii)包括本文所描述的IgG型抗体的可活化的掩蔽抗原结合蛋白中的至少一种接触,其中所述肿瘤样品产生蛋白酶。

[0265] 在一个实施方式中,可活化的掩蔽抗原结合蛋白各自包括至少第一抗原结合结构域,所述至少第一抗原结合结构域包括第一重链可变区和第一轻链可变区,其中(i)所述第一重链可变区通过第一肽接头与第一掩蔽部分接合,并且(ii)所述第一轻链可变区通过第二肽接头与第二掩蔽部分接合。在一个实施方式中,可活化的掩蔽抗原结合蛋白进一步包括第二抗原结合结构域,所述第二抗原结合结构域包括第二重链可变区和第二轻链可变区,其中(i)所述第二重链可变区通过第三肽接头与第三掩蔽部分接合,并且(ii)所述第二轻链可变区通过第四肽接头与第四掩蔽部分接合。

[0266] 在一个实施方式中,所述第一肽接头包括第一可切割位点并且所述第二肽接头包括第二可切割位点。在一个实施方式中,所述第三肽接头包括第三可切割位点并且所述第四肽接头包括第四可切割位点。在一个实施方式中,所述第一可切割位点、所述第二可切割位点、所述第三可切割位点和/或所述第四可切割位点的氨基酸序列可以是或可以不是由肿瘤样品产生的蛋白酶切割的底物。在一个实施方式中,步骤(a)中的接触在适于蛋白酶切割所述第一可切割位点、所述第二可切割位点、所述第三可切割位点和/或所述第四可切割位点的条件下进行,以在蛋白酶切割所述第一可切割位点、所述第二可切割位点、所述第三可切割位点和/或所述第四可切割位点时产生一种或多种切割产物。

[0267] 在一个实施方式中,所述方法进一步包括:(b)检测来自所述第一肽接头、所述第二肽接头、所述第三肽接头和/或所述第四肽接头的第一切割产物、第二切割产物、第三切割产物和/或第四切割产物。在一个实施方式中,所述方法进一步包括:(c)通过检测所述第一切割产物、所述第二切割产物、所述第三切割产物和/或所述第四切割产物并将所述切割产物中的任一种与所述第一可切割位点、第二可切割位点、第三可切割位点和/或第四可切

割位点的氨基酸序列相关联来鉴定由来自所述受试者的所述肿瘤产生的蛋白酶的类型。

[0268] 在一个实施方式中,通过鉴定由受试者的肿瘤产生的蛋白酶的类型可以诊断受试者的癌症。在一个实施方式中,所述第一切割产物、所述第二切割产物、所述第三切割产物和/或所述第四切割产物可以通过凝胶电泳、蛋白质印迹分析、免疫学、免疫组织化学、比色法、分光光度法、质谱法、液相色谱法或其任何组合来检测。在一个实施方式中,肿瘤或癌症团块可以获自前列腺癌、乳癌、卵巢癌、头颈癌、膀胱癌、皮肤癌、结直肠癌、肛门癌、直肠癌、胰腺癌、肺癌(包括非小细胞肺癌和小细胞肺癌)、平滑肌瘤癌、脑癌、神经胶质瘤癌、胶质母细胞瘤癌、食道癌、肝癌、肾癌、胃癌、结肠癌、宫颈癌、子宫癌、子宫内膜癌、外阴癌、喉癌、阴道癌、骨癌、鼻腔癌、鼻旁窦癌、鼻咽癌、口腔癌、口咽癌、喉癌、下喉癌、唾液腺癌、输尿管癌、尿道癌、阴茎癌和睾丸癌。在一个实施方式中,受试者是人、非人灵长类动物、猿猴、猿、鼠(例如,小鼠和大鼠)、牛、猪、马、犬、猫、山羊、狼、蛙或鱼。在一个实施方式中,基于切割的体外方法可以用于检测、诊断、监测和/或分级受试者的癌症。

[0269] 本公开提供了一种试剂盒,所述试剂盒包括:包括IgG型抗体的可活化的掩蔽抗原结合蛋白中的至少一种,和/或编码包括IgG型抗体的可活化的掩蔽抗原结合蛋白的至少一种核酸。在一个实施方式中,试剂盒包括选自由以下组成的组的一种或多种辅助化合物:三羟甲基氨基甲烷、磷酸盐、碳酸盐、稳定剂、赋形剂、杀生物剂和牛血清白蛋白。在一个实施方式中,试剂盒包括选自由以下组成的组的一种或多种辅助化合物:三羟甲基氨基甲烷、磷酸盐、碳酸盐、稳定剂、赋形剂、杀微生物剂和牛血清白蛋白。在一个实施方式中,试剂盒包括含有至少一种可活化的掩蔽抗原结合蛋白(或编码其蛋白的核酸)的一个容器并且任选地包括一种或多种辅助化合物,所述至少一种可活化的掩蔽抗原结合蛋白包括IgG型抗体。在一个实施方式中,试剂盒包括两个或更多个容器,其中一个容器含有至少一种可活化的掩蔽抗原结合蛋白(或编码其蛋白的核酸),所述至少一种可活化的掩蔽抗原结合蛋白包括IgG型抗体,并且单独的容器含有一种或多种辅助化合物。

[0270] 包括二聚抗原受体(DAR)的可活化的掩蔽抗原结合蛋白

[0271] 本公开提供了包括二聚抗原受体(DAR)的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,所述DAR具有与跨膜区和细胞内信号传导区接合的Fab片段,其中所述Fab片段与成对的掩蔽部分接合。在一个实施方式中,DAR构建体包括Fab片段与跨膜区之间的任选的铰链区。

[0272] 在一个实施方式中,所述二聚抗原受体(DAR)包括二聚化以形成蛋白质复合物的两条多肽链,其中第一多肽链包括重链可变区并且第二多肽链包括轻链可变区,其中所述重链可变区和所述轻链可变区形成抗原结合结构域。在一个实施方式中,所述第一多肽链通过二硫键中的一个或多个与所述第二多肽链接合。所述二聚抗原受体具有抗体样性质,因为所述二聚抗原受体与靶抗原特异性结合。

[0273] 在一个实施方式中,所述二聚抗原受体(DAR)包括二聚化以形成蛋白质复合物的两条多肽链,其中第一多肽链包括轻链可变区并且第二多肽链包括重链可变区,其中所述轻链可变区和所述重链可变区形成抗原结合结构域。在一个实施方式中,所述第一多肽链通过二硫键中的一个或多个与所述第二多肽链接合。所述二聚抗原受体具有抗体样性质,因为所述二聚抗原受体与靶抗原特异性结合。

[0274] 在一个实施方式中,所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白通过接头与毒素接合。

[0275] 在一个实施方式中,所述二聚抗原受体(DAR)缺乏肽接头和/或缺乏掩蔽部分。

[0276] 本公开提供了包括具有第一多肽链和第二多肽链的二聚抗原受体 (DAR) 的可活化的掩蔽抗原结合蛋白, 其中 (a) 所述第一多肽链包括以下区: (i) 抗体重链可变区 (VH); (ii) 抗体重链恒定区 (CH); (iii) 任选的铰链区; (iv) 跨膜区 (TM); 以及 (v) 细胞内信号传导区, 其中 (b) 所述第二多肽链包括以下区: (i) 抗体轻链可变区 (VL) (例如 κ 或 λ); 以及 (ii) 抗体轻链恒定区 (CL), 其中所述抗体重链可变区 (VH) 和所述抗体轻链可变区 (VL) 形成与靶抗原结合的抗原结合结构域。

[0277] 在一个实施方式中, (i) 所述第一多肽链的N末端通过具有第一可切割位点的第一肽接头与第一掩蔽部分接合, 并且 (ii) 所述第二多肽链的N末端通过具有第二可切割位点的第二肽接头与第二掩蔽部分接合, 并且 (iii) 所述第一掩蔽部分和所述第二掩蔽部分在没有二硫键合的情况下彼此缔合, 并且 (iv) 所述第一掩蔽部分和所述第二掩蔽部分不与所述抗原结合结构域选择性地结合, 并且 (v) 所述第一可切割位点可被第一蛋白酶切割, 并且 (vi) 所述第二可切割位点可被第二蛋白酶切割, 其中所述第一蛋白酶可切割位点和所述第二蛋白酶可切割位点可被相同或不同的蛋白酶切割。在一个实施方式中, 所述二聚抗原受体 (DAR) 缺乏肽接头和/或缺乏掩蔽部分。

[0278] 在一个实施方式中, 包括所述二聚抗原受体 (DAR) 的所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白包括第一多肽链和第二多肽链, 其中 (a) 所述第一多肽链包括: (i) 第一掩蔽部分; (ii) 第一肽接头; (iii) 抗体重链可变区 (VH); (iv) 抗体重链恒定区 (CH), (v) 任选的铰链区; (vi) 跨膜区 (TM); 以及 (vii) 细胞内信号传导区, 其中 (b) 所述第二多肽链包括: (i) 第二掩蔽部分; (ii) 第二肽接头; (iii) 抗体轻链可变区 (VL) (例如 κ 或 λ); 以及 (iv) 抗体轻链恒定区 (CL), 其中所述抗体重链可变区 (VH) 和所述抗体轻链可变区 (VL) 形成与靶抗原结合的抗原结合结构域。

[0279] 在一个实施方式中, 所述第一掩蔽部分和所述第二掩蔽部分彼此缔合以减少所述抗原结合结构域与其靶抗原的结合。

[0280] 在一个实施方式中, 所述第一可切割位点和/或所述第二可切割位点可被相同或不同的蛋白酶切割。

[0281] 在一个实施方式中, 所述第一蛋白酶和所述第二蛋白酶由相同肿瘤或不同的肿瘤产生。

[0282] 在一个实施方式中, 铰链区的长度为约10个至约100个氨基酸。在一个实施方式中, 铰链区独立地选自由以下组成的组: PDGFR (血小板源性生长因子受体) 铰链区或其片段; CD8铰链区或其片段; CD8 α 铰链区或其片段; 与抗体的恒定结构域CH1和CH2接合的抗体 (IgG、IgA、IgM、IgE或IgD) 的铰链区。铰链区可以衍生自抗体并且可以包括或可以不包括抗体的一个或多个恒定区。

[0283] 在一个实施方式中, 跨膜区可以衍生自选自由以下组成的组的膜蛋白序列区: CD8 α 、CD8 β 、4-1BB/CD137、CD28、CD34、CD4、Fc ϵ RI γ 、CD16、OX40/CD134、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、TCR α 、TCR β 、TCR ζ 、CD32、CD64、CD64、CD45、CD5、CD9、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD137、CD154、LFA-1 T细胞共受体、CD2 T细胞共受体/黏附分子、CD40、CD40L/CD154、VEGFR2、FAS和FGFR2B。

[0284] 在一个实施方式中, 细胞内信号传导区包括选自来自以下的信号传导区组成的组的两个或更多个细胞内信号传导序列中的任一个或任何组合: CD3- ζ 链、4-1BB、CD28、

CD27、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴母细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、GITR (TNFRSF18)、DR3 (TNFRSF25)、TNFR2、CD226以及其组合。

[0285] 在一个实施方式中,细胞内信号传导区包括1种、2种或3种不同的细胞内信号传导序列。

[0286] 在一个实施方式中,细胞内信号传导区包括选自由以下组成的组的两种或更多种信号传导序列中的任一个或任何组合:具有ITAM 3基序的4-1BB、CD28、CD3 ζ (长) 信号传导序列和/或CD3 ζ (短) 信号传导序列。

[0287] 在一个实施方式中,所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白通过接头与毒素接合。

[0288] 本公开提供了包括具有第一多肽链和第二多肽链的二聚抗原受体 (DAR) 的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其中 (a) 所述第一多肽链包括以下区:(i) 抗体轻链可变区 (VL) (例如, κ 或 λ);(ii) 抗体轻链恒定区 (CL);(iii) 任选的铰链区;(iv) 跨膜区 (TM);以及 (v) 细胞内信号传导区,其中 (b) 所述第二多肽链包括以下区:(i) 抗体重链可变区 (VH);以及 (ii) 抗体重链恒定区 (CH),其中所述抗体重链可变区 (VH) 和所述抗体轻链可变区 (VL) 形成与靶抗原结合的抗原结合结构域。

[0289] 在一个实施方式中,(i) 所述第一多肽链的N末端通过具有第一可切割位点的第一肽接头与第一掩蔽部分接合,并且 (ii) 所述第二多肽链的N末端通过具有第二可切割位点的第二肽接头与第二掩蔽部分接合,并且 (iii) 所述第一掩蔽部分和所述第二掩蔽部分在没有二硫键合的情况下彼此缔合,并且 (iv) 所述第一掩蔽部分和所述第二掩蔽部分不与所述抗原结合结构域选择性地结合,并且 (v) 所述第一可切割位点可被第一蛋白酶切割,并且 (vi) 所述第二可切割位点可被第二蛋白酶切割,其中所述第一蛋白酶可切割位点和所述第二蛋白酶可切割位点可被相同或不同的蛋白酶切割。在一个实施方式中,所述二聚抗原受体 (DAR) 缺乏肽接头和/或缺乏掩蔽部分。

[0290] 在一个实施方式中,包括所述二聚抗原受体 (DAR) 的所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白包括第一多肽链和第二多肽链,其中 (a) 所述第一多肽链包括:(i) 第一掩蔽部分;(ii) 第一肽接头;(iii) 抗体轻链可变区 (VL) (例如, κ 或 λ);(iv) 抗体轻链恒定区 (CL);(v) 任选的铰链区;(iv) 跨膜区 (TM);以及 (vii) 细胞内信号传导区,其中 (b) 所述第二多肽链包括:(i) 第二掩蔽部分;(ii) 第二肽接头;(iii) 抗体重链可变区 (VH);以及 (iv) 抗体重链恒定区 (CH),其中所述抗体重链可变区 (VH) 和所述抗体轻链可变区 (VL) 形成与靶抗原结合的抗原结合结构域。

[0291] 在一个实施方式中,所述第一掩蔽部分和所述第二掩蔽部分彼此缔合以减少所述抗原结合结构域与其靶抗原的结合。

[0292] 在一个实施方式中,所述第一可切割位点和/或所述第二可切割位点可被相同或不同的蛋白酶切割。

[0293] 在一个实施方式中,所述第一蛋白酶和所述第二蛋白酶由相同肿瘤或不同的肿瘤产生。

[0294] 在一个实施方式中,铰链区的长度为约10个至约100个氨基酸。在一个实施方式中,铰链区独立地选自由以下组成的组:CD8铰链区或其片段;CD8 α 铰链区或其片段;接合抗体的恒定结构域CH1和CH2的抗体 (IgG、IgA、IgM、IgE或IgD) 的铰链区。铰链区可以衍生自抗体并且可以包括或不包括抗体的一个或多个恒定区。

[0295] 在一个实施方式中,跨膜区可以衍生自选自以下组成的组的膜蛋白序列区:CD8 α 、CD8 β 、4-1BB/CD137、CD28、CD34、CD4、Fc ϵ RI γ 、CD16、OX40/CD134、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、TCR α 、TCR β 、TCR ζ 、CD32、CD64、CD64、CD45、CD5、CD9、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD137、CD154、LFA-1 T细胞共受体、CD2 T细胞共受体/黏附分子、CD40、CD40L/CD154、VEGFR2、FAS和FGFR2B。

[0296] 在一个实施方式中,细胞内信号传导区包括选自由来自以下的信号传导区组成的组的中任一个或两个或更多个细胞内信号传导序列中的组成的任何组合:CD3- ζ 链、4-1BB、CD28、CD27、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴卵母细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、GITR (TNFRSF18)、DR3 (TNFRSF25)、TNFR2、CD226以及其组合。

[0297] 在一个实施方式中,细胞内信号传导区包括1种、2种或3种不同的细胞内信号传导序列。

[0298] 在一个实施方式中,细胞内信号传导区包括选自由以下组成的组的两个或更多个信号传导序列中的任一个或任何组合:具有ITAM 3基序的4-1BB、CD28、CD3 ζ (长) 信号传导序列和/或CD3 ζ (短) 信号传导序列。

[0299] 在一个实施方式中,所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白通过接头与毒素接合。

[0300] 本公开提供了包括本文所描述的具有至少第一掩蔽部分和第二掩蔽部分的二聚抗原受体 (DAR) 的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白。在一个实施方式中,所述第一掩蔽部分和所述第二掩蔽部分在彼此缔合 (二聚化) 时干扰 (阻碍) 抗原结合蛋白与其靶抗原结合的能力。所述第一掩蔽部分和所述第二掩蔽部分在彼此缔合 (二聚化) 时可以通过空间位阻阻断抗原结合蛋白与其靶抗原之间的结合。

[0301] 在一个实施方式中,所述第一掩蔽部分和所述第二掩蔽部分包括在不形成共价键 (例如,没有二硫键合或转谷氨酰胺键合) 的情况下彼此缔合 (二聚化) 的多肽。所述第一掩蔽部分和所述第二掩蔽部分包括可以通过非共价相互作用彼此缔合 (二聚化) 的多肽,所述非共价相互作用包括离子相互作用、氢键合、偶极-偶极相互作用、亲水相互作用、疏水相互作用、亲和键合或涉及范德华力的键合或缔合。

[0302] 在一个实施方式中,所述第一掩蔽部分和所述第二掩蔽部分彼此缔合为同二聚体或异二聚体。

[0303] 在一个实施方式中,所述掩蔽部分中的一个掩蔽部分可以被工程化以具有形成链间立体互补结构的杆结构,以有利于与被工程化以具有臼结构的另一个掩蔽部分的同二聚化或异二聚化。

[0304] 本公开提供了可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其中呈二聚化构型的所述掩蔽部分中的一个或两个包括产生新链间盐桥的一个或多个突变。在一个实施方式中,一个掩蔽部分中的苏氨酸残基可以被谷氨酸代替,并且另一个掩蔽部分中对应位置的天冬酰胺被赖氨酸代替,从而产生链间盐桥。

[0305] 在一个实施方式中,所述第一掩蔽部分和/或所述第二掩蔽部分衍生自免疫球蛋白恒定区 (例如,CL、CH1、CH2或CH3)。

[0306] 在一个实施方式中,所述第一掩蔽部分或所述第二掩蔽部分包括重链恒定区 (CH1)。在一个实施方式中,所述第二掩蔽部分或所述第一掩蔽部分包括 κ 或 λ 轻链恒定区 (CL κ 或CL λ)。在一个实施方式中,所述第一掩蔽部分包括重链恒定区 (CH1) 并且所述第二掩

蔽部分包括 κ 或 λ 轻链恒定区(CL κ 或CL λ)。在一个实施方式中,所述第一掩蔽部分包括 κ 或 λ 轻链恒定区(CL κ 或CL λ)并且所述第二掩蔽部分包括重链恒定区(CH1)。在一个实施方式中,所述第一掩蔽部分和/或所述第二掩蔽部分包括具有SEQ ID NO:21、22或23的氨基酸序列的CH1、CL(λ)或CL(κ)。各种掩蔽部分的氨基酸序列列表参见表1和2。

[0307] 在一个实施方式中,所述第一掩蔽部分或所述第二掩蔽部分包括IgG1或IgG4 γ 重链恒定区,例如CH3。在一个实施方式中,所述第一掩蔽部分和所述第二掩蔽部分包括IgG1或IgG4 γ 重链恒定区CH3。在一个实施方式中,包括IgG1或IgG4 γ 重链恒定区CH3的所述掩蔽部分中的一个掩蔽部分被工程化以具有形成链间立体互补结构的杵或臼结构,以有利于与被工程化以具有臼或杵结构的包括IgG1或IgG4 γ 重链恒定区CH3的另一个掩蔽部分的二聚化(例如,同二聚化)。在一个实施方式中,所述第一掩蔽部分和/或所述第二掩蔽部分包括具有SEQ ID NO:24、25、30或31的氨基酸序列的CH3(IgG1或IgG4)。各种掩蔽部分的氨基酸序列列表参见表1和2。

[0308] 在一个实施方式中,所述掩蔽部分中的至少一个衍生自免疫球蛋白重链恒定区并且与可活化的掩蔽抗体的重链可变区接合。在一个实施方式中,所述掩蔽部分中的至少一个衍生自免疫球蛋白重链恒定区并且与所述可活化的掩蔽抗体的轻链可变区接合。

[0309] 在一个实施方式中,所述第一掩蔽部分和所述第二掩蔽部分衍生自T细胞受体 α (alpha)和 β (beta)恒定区。在一个实施方式中,所述第一掩蔽部分包括T细胞受体 α (alpha)恒定区并且所述第二掩蔽部分包括T细胞受体 β (beta)恒定区。在一个实施方式中,所述第一掩蔽部分包括T细胞受体 β (beta)恒定区并且所述第二掩蔽部分包括T细胞受体 α (alpha)恒定区。

[0310] 在一个实施方式中,所述掩蔽部分中的至少一个衍生自T细胞受体 α (alpha)或 β (beta)恒定区并且与所述可活化的掩蔽抗体的重链可变区接合。在一个实施方式中,所述掩蔽部分中的至少一个衍生自T细胞受体 β (beta)或 α (alpha)恒定区并且与所述可活化的掩蔽抗体的轻链可变区接合。在一个实施方式中,所述第一掩蔽部分和/或所述第二掩蔽部分包括具有SEQ ID NO:28或29的氨基酸序列的T细胞受体 α (alpha)或 β (beta)恒定区。各种掩蔽部分的氨基酸序列列表参见表1和2。

[0311] 在一个实施方式中,所述第一掩蔽部分或所述第二掩蔽部分包括来自催化抗体(例如,38C2)的可变重链结构域。在一个实施方式中,所述第一掩蔽部分或所述第二掩蔽部分包括来自催化抗体(例如,38C2)的可变轻链结构域。在一个实施方式中,所述第一掩蔽部分包括来自38C2抗体的可变重链结构域并且所述第二掩蔽部分包括来自38C2抗体的可变轻链结构域。在一个实施方式中,所述第一掩蔽部分和/或所述第二掩蔽部分包括来自催化抗体38C2的具有SEQ ID NO:26或27的氨基酸序列的可变重链结构域。各种掩蔽部分的氨基酸序列列表参见表1和2。

[0312] 在一个实施方式中,掩蔽部分(例如,第一掩蔽部分或第二掩蔽部分)包括沿同一多肽链串联排列的两个或更多个拷贝部分。例如,掩蔽部分包括串联布置的两个抗体CH3区,或串联布置的两个抗体CH2区,或串联布置的两个抗体CH1区,或串联布置的两个抗体CL区。CH3、CH2、CH1或CL区域中的任何一个都可以包括杵或臼结构。例如,所述掩蔽部分包括串联布置的两个TCR α 链恒定区,或串联布置的两个TCR β 链恒定区。

[0313] 在一个实施方式中,掩蔽部分(例如,第一掩蔽部分或第二掩蔽部分)包括沿同一

多肽链串联布置的两个或更多个不同的部分。例如,所述掩蔽部分包括串联布置的抗体CH2区和抗体CH3区。

[0314] 本公开提供了包括本文所描述的包括具有相同或不同的长度(例如,长度为10-20个、20-30个、30-40个或40-50个氨基酸)的至少第一肽接头和第二肽接头的二聚抗原受体(DAR)的任何所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白。在一个实施方式中,所述第一肽接头和/或所述第二肽接头富含甘氨酸(例如,GS型接头)。在一个实施方式中,所述第一肽接头和所述第二肽接头具有相同的氨基酸序列或不同的氨基酸序列。

[0315] 在一个实施方式中,所述第一肽接头可被第一蛋白酶切割。在一个实施方式中,所述第一肽接头具有作为由第一蛋白酶切割的底物的氨基酸序列(第一可切割位点)。

[0316] 在一个实施方式中,所述第二肽接头可被第二蛋白酶切割。在一个实施方式中,所述第二肽接头具有作为由第二蛋白酶切割的底物的氨基酸序列(第二可切割位点)。

[0317] 在一个实施方式中,所述第一肽接头可被第一蛋白酶切割并且所述第二肽接头可被第二蛋白酶切割。在一个实施方式中,所述第一肽接头和所述第二肽接头可被相同蛋白酶切割。在一个实施方式中,所述第一肽接头和所述第二肽接头可被不同的蛋白酶切割。在一个实施方式中,所述第一肽接头和所述第二肽接头不可被蛋白酶切割。

[0318] 在一个实施方式中,所述第一蛋白酶和所述第二蛋白酶可以独立地选自:基质金属蛋白酶(MMP),包括MMP1、MMP2、MMP3、MMP8、MMP9、MMP11、MMP13、MMP14、MT1-MMP(膜型1基质金属蛋白酶);解整合素和金属蛋白酶(ADAM)蛋白酶,包括ADAM10、ADAM12、ADAM17;尿激酶纤溶酶原活化剂(uPA)或uPAR;丝氨酸蛋白酶;半胱氨酸蛋白酶;天冬氨酸蛋白酶;苏氨酸蛋白酶;组织蛋白酶(例如,半胱氨酸或天冬氨酸组织蛋白酶),包括组织蛋白酶B、组织蛋白酶C、组织蛋白酶D、组织蛋白酶E、组织蛋白酶K或组织蛋白酶L。

[0319] 在一个实施方式中,所述第一肽接头和/或所述第二肽接头包括与SEQ ID NO:32-40中的任一个的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。还参见表3-9中列出的各种肽接头序列。

[0320] 本公开提供了包括二聚抗原受体(DAR)的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,所述DAR具有包括第一重链可变区和第一轻链可变区的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域与靶抗原结合(例如,与靶抗原特异性结合)。

[0321] 在一个实施方式中,所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白与具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的EGFR抗原结合,或与具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CD38抗原结合。

[0322] 在一个实施方式中,所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白与来自人的抗原结合。在一个实施方式中,所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白与来自人的抗原结合并且可以与来自如狗、猫、小鼠、大鼠、山羊、兔、仓鼠和/或猴(例如食蟹猴、恒河猴或猕猴)等非人动物中的任一种或任何组合的抗原(例如,同源抗原)结合(例如,交叉反应)。

[0323] 本公开提供了包括具有第一多肽链和第二多肽链的二聚抗原受体(DAR)的可活化的掩蔽抗原结合蛋白。

[0324] 在一个实施方式中,所述第一多肽链包括第一掩蔽部分,所述第一掩蔽部分包括具有SEQ ID NO:21、22或23的氨基酸序列的CH1、CL(λ 或 κ)区。在一个实施方式中,所述第一多肽链包括第一掩蔽部分,所述第一掩蔽部分包括具有SEQ ID NO:24、25、30或31的氨基酸序列的CH3(IgG1或IgG4)区。在一个实施方式中,所述第一多肽链包括第一掩蔽部分,所述

第一掩蔽部分包括具有SEQ ID NO:28或29的氨基酸序列的T细胞受体 α (alpha) 或 β (beta) 恒定区。在一个实施方式中,所述第一多肽链包括第一掩蔽部分,所述第一掩蔽部分包括来自催化抗体38C2的具有SEQ ID NO:26或27的氨基酸序列的可变重链结构域。

[0325] 在一个实施方式中,所述第二多肽链包括第二掩蔽部分,所述第二掩蔽部分包括具有SEQ ID NO:21、22或23的氨基酸序列的CH1、CL (λ 或 κ) 区。在一个实施方式中,所述第二多肽链包括第二掩蔽部分,所述第二掩蔽部分包括具有SEQ ID NO:24、25、30或31的氨基酸序列的CH3 (IgG1或IgG4) 区。在一个实施方式中,所述第二多肽链包括第二掩蔽部分,所述第二掩蔽部分包括具有SEQ ID NO:28或29的氨基酸序列的T细胞受体 α (alpha) 或 β (beta) 恒定区。在一个实施方式中,所述第二多肽链包括第二掩蔽部分,所述第二掩蔽部分包括来自催化抗体38C2的具有SEQ ID NO:26或27的氨基酸序列的可变重链结构域。

[0326] 在一个实施方式中,所述第一多肽链包括第一肽接头,所述第一肽接头包括SEQ ID NO:32-40之一的氨基酸序列或包括表3-9中列出的氨基酸序列中的任一个。

[0327] 在一个实施方式中,所述第二多肽链包括第二肽接头,所述第二肽接头包括SEQ ID NO:32-40之一的氨基酸序列或包括表3-9中列出的氨基酸序列中的任一个。

[0328] 在一个实施方式中,所述第一多肽链包括抗体重链可变区 (VH),所述VH包括具有与SEQ ID NO:2或4的一部分或全长具有至少92%、或至少93%、或至少94%、或至少95%、或至少96%、或至少97%、或至少98%、或至少99%序列同一性、或具有100%序列同一性的氨基酸序列的抗EGFR重链可变区序列。在一个实施方式中,所述第一多肽链包括抗体重链可变区 (VH),所述VH包括具有与SEQ ID NO:7、9、11、13、14、15、16、17、18或20的一部分或全长具有至少92%、或至少93%、或至少94%、或至少95%、或至少96%、或至少97%、或至少98%、或至少99%序列同一性、或具有100%序列同一性的氨基酸序列的抗CD38重链可变区序列。

[0329] 在一个实施方式中,所述第一多肽链包括抗体轻链可变区 (VL),所述VL包括具有与SEQ ID NO:3或5的一部分或全长具有至少92%、或至少93%、或至少94%、或至少95%、或至少96%、或至少97%、或至少98%、或至少99%序列同一性、或具有100%序列同一性的氨基酸序列的抗EGFR轻链可变区序列。在一个实施方式中,所述第一多肽链包括抗体轻链可变区 (VL),所述VL包括具有与SEQ ID NO:8、10、12或19的一部分或全长具有至少92%、或至少93%、或至少94%、或至少95%、或至少96%、或至少97%、或至少98%、或至少99%序列同一性、或具有100%序列同一性的氨基酸序列的抗CD38轻链可变区序列。

[0330] 在一个实施方式中,所述第二多肽链包括抗体轻链可变区 (VL),所述VL包括具有与SEQ ID NO:3或5的一部分或全长具有至少92%、或至少93%、或至少94%、或至少95%、或至少96%、或至少97%、或至少98%、或至少99%序列同一性、或具有100%序列同一性的氨基酸序列的抗EGFR轻链可变区序列。在一个实施方式中,所述第二多肽链包括抗体轻链可变区 (VL),所述VL包括具有与SEQ ID NO:8、10、12或19的一部分或全长具有至少92%、或至少93%、或至少94%、或至少95%、或至少96%、或至少97%、或至少98%、或至少99%序列同一性、或具有100%序列同一性的氨基酸序列的抗CD38轻链可变区序列。

[0331] 在一个实施方式中,所述第二多肽链包括抗体重链可变区 (VH),所述VH包括具有与SEQ ID NO:2或4的一部分或全长具有至少92%、或至少93%、或至少94%、或至少95%、或至少96%、或至少97%、或至少98%、或至少99%序列同一性、或具有100%序列同一性的

氨基酸序列的抗EGFR重链可变区序列。在一个实施方式中,所述第二多肽链包括抗体重链可变区(VH),所述VH包括具有与SEQ ID NO:7、9、11、13、14、15、16、17、18或20的一部分或全长具有至少92%、或至少93%、或至少94%、或至少95%、或至少96%、或至少97%、或至少98%、或至少99%序列同一性、或具有100%序列同一性的氨基酸序列的抗CD38重链可变区序列。

[0332] 在一个实施方式中,所述第一多肽链包括抗体重链恒定区(CH),所述CH包括抗EGFR重链恒定区序列(例如,来自SEQ ID NO:2或4)。在一个实施方式中,所述第一多肽链包括抗体重链恒定区(CH),所述CH包括抗CD38重链恒定区序列(例如,来自SEQ ID NO:7、9、11、13、14、15、16、17、18或20)。

[0333] 在一个实施方式中,所述第一多肽链包括抗体轻链恒定区(CL),所述CL包括抗EGFR轻链恒定区序列(例如,来自SEQ ID NO:3或5)。在一个实施方式中,所述第一多肽链包括抗体轻链恒定区(CL),所述CL包括抗CD38轻链恒定区序列(例如,来自SEQ ID NO:8、10、12或19)。

[0334] 在一个实施方式中,所述第二多肽链包括抗体轻链恒定区(CL),所述CL包括抗EGFR轻链恒定区序列(例如,来自SEQ ID NO:3或5)。在一个实施方式中,所述第二多肽链包括抗体轻链恒定区(CL),所述CL包括抗CD38轻链恒定区序列(例如,来自SEQ ID NO:8、10、12或19)。

[0335] 在一个实施方式中,所述第二多肽链包括抗体重链恒定区(CH),所述CH包括抗EGFR重链恒定区序列(例如,来自SEQ ID NO:2或4)。在一个实施方式中,所述第二多肽链包括抗体重链恒定区(CH),所述CH包括抗CD38重链恒定区序列(例如,来自SEQ ID NO:7、9、11、13、14、15、16、17、18或20)。

[0336] 在一个实施方式中,所述第一多肽链包括铰链区,所述铰链区具有以下中的任一个或两个或更多的任何组合的氨基酸序列:CD28铰链序列(SEQ ID NO:44);CD8铰链序列(SEQ ID NO:45);包括CD28和CD8铰链序列的长铰链(SEQ ID NO:46);和/或PDGFR β 铰链序列(SEQ ID NO:41)。

[0337] 在一个实施方式中,所述第一多肽链包括具有CD28跨膜序列(SEQ ID NO:47)或PDGFR β 跨膜序列(SEQ ID NO:42)的氨基酸序列的跨膜区。

[0338] 在一个实施方式中,所述第一多肽链包括具有以下氨基酸序列的1-3个任何顺序和任何组合的细胞内信号传导序列:4-1BB信号传导序列(SEQ ID NO:48);CD28信号传导序列(SEQ ID NO:49);CD3 ζ 信号传导序列(SEQ ID NO:50);和/或CD3 ζ 短信号传导序列(SEQ ID NO:51)。

[0339] 本公开提供了表现出非活性和活化状态的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,所述非活性和活化状态取决于掩蔽部分阻碍抗原结合结构域与其靶抗原之间的结合的能力。在一个实施方式中,通过完整的肽接头将单独掩蔽部分拴系到重链可变区(在第一多肽链上)和轻链可变区(在第二多肽链上)的N端,并且掩蔽部分形成阻碍抗原结合结构域,导致非活性状态的二聚化复合物。一个或两个肽接头的切割允许二聚化复合物从阻碍位置移开,以允许抗原结合结构域与其靶抗原之间的结合。在一个实施方式中,两个肽接头的切割释放二聚化复合物以脱离抗原结合蛋白。

[0340] 在一个实施方式中,当所述第一肽接头和所述第二肽接头处于所述未切割状态

时,包括二聚抗原受体(DAR)的可活化的掩蔽抗原结合蛋白被抑制与其靶抗原结合(例如,非活性)。在一个实施方式中,当所述第一肽接头和所述第二肽接头处于所述未切割状态时,所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白对其靶抗原表现出降低的结合能力(例如,非活性)。在一个实施方式中,在非活性状态的掩蔽抗原结合蛋白中,所述第一掩蔽部分和所述第二掩蔽部分可以彼此缔合或可以彼此不缔合。

[0341] 在一个实施方式中,具有完整的第一肽接头和第二肽接头的掩蔽抗原结合蛋白与靶抗原的结合能力可以降低至少25%-50%、或至少50%-75%、或至少75%-95%、或至少95%-99%或更多。

[0342] 在一个实施方式中,具有完整的第一肽接头和第二肽接头的掩蔽抗原结合蛋白与靶抗原的结合能力可以降低约2-20倍、或约20-50倍、或约50-200倍、或约200-350倍、或约350-500倍或降低结合能力的更高倍数水平。

[0343] 在一个实施方式中,具有完整的第一肽接头和第二肽接头的掩蔽抗原结合蛋白与非活性抗原结合蛋白的结合亲和力(例如, K_D)为约 10^{-4} - 10^{-8} M。在一个实施方式中,靶抗原是可溶性抗原或细胞表面抗原。

[0344] 本公开提供了可活化的掩蔽抗原结合蛋白,当第一肽接头和/或第二肽接头处于切割状态时,所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白是未掩蔽的并且能够与其靶抗原结合(例如,活化的)。在一个实施方式中,当所述第一肽接头和/或所述第二肽接头处于所述切割状态时,所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白对其靶抗原表现出增加的结合能力(例如,活化的)。例如,当仅所述第一肽接头或所述第二肽接头被切割时,或者当所述第一接头和所述第二接头被切割时,所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白可以与其靶抗原结合。在一个实施方式中,在活化状态的掩蔽抗原结合蛋白中,第一掩蔽部分和第二掩蔽部分可以彼此缔合或可以彼此不缔合。

[0345] 在一个实施方式中,具有切割的第一肽接头和/或第二肽接头的未掩蔽抗原结合蛋白与靶抗原的结合能力可以增加至少25%-50%、或至少50%-75%、或至少75%-95%、或至少95%-99%或更多。

[0346] 在一个实施方式中,具有切割的第一肽接头和/或第二肽接头的未掩蔽抗原结合蛋白与靶抗原的结合能力可以增加约2-20倍、或约20-50倍、或约50-200倍、或约200-350倍、或约350-500倍或增加结合能力的更高倍数水平。

[0347] 在一个实施方式中,具有切割的第一肽接头和/或第二肽接头的未掩蔽抗原结合蛋白与活化抗原结合蛋白的结合亲和力(例如, K_D)为约 10^{-5} - 10^{-12} M。在一个实施方式中,靶抗原是可溶性抗原或细胞表面抗原。在一个实施方式中,活化形式的抗原结合蛋白的结合亲和力高于非活性形式。

[0348] 在一个实施方式中,非活性与活化的抗原结合蛋白之间的结合亲和力差异(例如,非活性 K_D 与活化 K_D)为约 10 、 10^2 、 10^3 、 10^4 或 10^5 或更高的结合亲和力差异。

[0349] 本公开提供了版本1(例如,V1)二聚抗原受体(DAR)构建体,所述DAR构建体包括携带重链可变区(VH)和重链恒定区(CH)的第一多肽链以及携带轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)的第二多肽链,其中(a)所述第一多肽链包括从氨基端排序到羧基端的区:(i)第一掩蔽部分;(ii)第一肽接头;(iii)抗体重链可变区(VH);(iv)抗体重链恒定区(CH);(v)包括CD8和CD28铰链序列(例如,SEQ ID NO:46)的长铰链区;(vi)包括CD28跨膜序列(例如,

SEQ ID NO:47)的跨膜区(TM);以及(vii)包括CD28信号传导序列(例如,SEQ ID NO:49)和具有ITAM基序1、2和3的CD3- ζ 信号传导序列(例如,SEQ ID NO:50)的细胞内信号传导区;(b)第二多肽链包括从氨基端排序到羧基端的区:(i)第二掩蔽部分;(ii)第二肽接头;(iii)抗体轻链可变区(VL)(例如, κ 或 λ);以及(iv)抗体轻链恒定区(CL)。在一个实施方式中,所述V1二聚抗原受体(DAR)缺乏肽接头和/或缺乏掩蔽部分。

[0350] 在一个实施方式中,所述V1 DAR抗体重链可变区(VH)包括抗EGFR重链可变区序列(例如,来自SEQ ID NO:2或4)并且所述抗体重链恒定区(CH)包括抗EGFR重链恒定区序列(例如,来自SEQ ID NO:2或4)。在一个实施方式中,所述V1 DAR抗体重链可变区(VH)包括抗CD38重链可变区序列(例如,来自SEQ ID NO:7、9、11、13、14、15、16、17、18或20)并且所述抗体重链恒定区(CH)包括抗CD38重链恒定区序列(例如,来自SEQ ID NO:7、9、11、13、14、15、16、17、18或20)。

[0351] 在一个实施方式中,所述V1 DAR抗体轻链可变区(VL)包括抗EGFR轻链可变区序列(例如,来自SEQ ID NO:3或5)并且所述抗体轻链恒定区(CL)包括抗EGFR轻链恒定区序列(例如,来自SEQ ID NO:3或5)。在一个实施方式中,所述V1 DAR抗体轻链可变区(VL)包括抗CD38轻链可变区序列(例如,来自SEQ ID NO:8、10、12或19)并且所述抗体轻链恒定区(CL)包括抗CD38轻链恒定区序列(例如,来自SEQ ID NO:8、10、12或19)。

[0352] 在一个实施方式中,所述版本1(V1)DAR构建体的第一多肽链包括PDGFR β 铰链序列(SEQ ID NO:41)和PDGFR β 跨膜序列(SEQ ID NO:42)。

[0353] 本公开提供了版本2(例如,V2)二聚抗原受体(DAR)构建体,所述DAR构建体包括携带重链可变区(VH)和重链恒定区(CH)的第一多肽链以及携带轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)的第二多肽链,其中(a)所述第一多肽链包括从氨基端排序到羧基端的区:(i)第一掩蔽部分;(ii)第一肽接头;(iii)抗体重链可变区(VH);(iv)抗体重链恒定区(CH);(v)包括CD28铰链序列(例如,SEQ ID NO:44)的短铰链区;(vi)包括CD28跨膜序列(例如,SEQ ID NO:47)的跨膜区(TM);以及(vii)细胞内信号传导区,所述细胞内信号传导区包括:(1)4-1BB信号传导序列(例如,SEQ ID NO:48)以及具有ITAM基序1、2和3的CD3- ζ (例如,SEQ ID NO:50);或(2)CD28(例如,SEQ ID NO:49)信号传导序列和具有ITAM基序1、2和3的CD3- ζ (例如,SEQ ID NO:50);或(3)4-1BB(例如,SEQ ID NO:48)信号传导序列和CD28(例如,SEQ ID NO:49)信号传导序列以及具有ITAM基序1、2和3的CD3- ζ (例如,SEQ ID NO:50);(b)第二多肽链包括从氨基端排序到羧基端的区:(i)第二掩蔽部分;(ii)第二肽接头;(iii)抗体轻链可变区(VL)(例如, κ 或 λ);以及(iv)抗体轻链恒定区(CL)。在一个实施方式中,所述V2二聚抗原受体(DAR)缺乏肽接头和/或缺乏掩蔽部分。

[0354] 在一个实施方式中,版本2a(V2a)DAR构建体包括具有4-1BB信号传导序列(例如,SEQ ID NO:48)和具有ITAM基序1、2和3的CD3- ζ (例如,SEQ ID NO:50)的细胞内信号传导区。

[0355] 在一个实施方式中,版本2b(V2b)DAR构建体包括具有CD28(例如,SEQ ID NO:49)信号传导序列和具有ITAM基序1、2和3的CD3- ζ (例如,SEQ ID NO:50)的细胞内信号传导区。

[0356] 在一个实施方式中,版本2c(V2c)DAR构建体包括具有4-1BB(例如,SEQ ID NO:48)信号传导序列和CD28(例如,SEQ ID NO:49)信号传导序列以及具有ITAM基序1、2和3的CD3- ζ (例如,SEQ ID NO:50)的细胞内信号传导区。

[0357] 在一个实施方式中,DAR V2a和V2b是第二代DAR构建体,而DAR V2c是第三代DAR构建体。在一个实施方式中,所述抗体重链可变区 (VH) 包括抗EGFR重链可变区序列(例如,来自SEQ ID NO:2或4)并且所述抗体重链恒定区 (CH) 包括抗EGFR重链恒定区序列(例如,来自SEQ ID NO:2或4)。在一个实施方式中,所述抗体重链可变区 (VH) 包括抗CD38重链可变区序列(例如,来自SEQ ID NO:7、9、11、13、14、15、16、17、18或20)并且所述抗体重链恒定区 (CH) 包括抗CD38重链恒定区序列(例如,SEQ ID NO:7、9、11、13、14、15、16、17、18或20)。

[0358] 在一个实施方式中,所述V2 DAR抗体轻链可变区 (VL) 包括抗EGFR轻链可变区序列(例如,来自SEQ ID NO:3或5)并且所述抗体轻链恒定区 (CL) 包括抗EGFR轻链恒定区序列(例如,来自SEQ ID NO:3或5)。在一个实施方式中,所述V2 DAR抗体轻链可变区 (VL) 包括抗CD38轻链可变区序列(例如,来自SEQ ID NO:8、10、12或19)并且所述抗体轻链恒定区 (CL) 包括抗CD38轻链恒定区序列(例如,来自SEQ ID NO:8、10、12或19)。

[0359] 在一个实施方式中,版本2a、2b或2c DAR构建体的第一多肽链包括PDGFR β 铰链序列(SEQ ID NO:41)和PDGFR β 跨膜序列(SEQ ID NO:42)。

[0360] 本公开提供了版本3(例如,V3)二聚抗原受体 (DAR) 构建体,所述DAR构建体包括携带重链可变区 (VH) 和重链恒定区 (CH) 的第一多肽链以及携带轻链可变区 (VL) 和轻链恒定区 (CL) 的第二多肽链,其中 (a) 所述第一多肽链包括从氨基端排序到羧基端的区:(i) 第一掩蔽部分;(ii) 第一肽接头;(iii) 抗体重链可变区 (VH);(iv) 抗体重链恒定区 (CH);(v) 包括CD28铰链序列(例如,SEQ ID NO:44)的短铰链区;(vi) 包括CD28跨膜序列(例如,SEQ ID NO:47)的跨膜区(TM);以及(vii) 包括4-1BB信号传导序列(例如,SEQ ID NO:48)和仅具有ITAM基序3的CD3- ζ 信号传导序列(例如,SEQ ID NO:51)的细胞内信号传导区;(b) 第二多肽链包括从氨基端排序到羧基端的区:(i) 第二掩蔽部分;(ii) 第二肽接头;(iii) 抗体轻链可变区 (VL)(例如, κ 或 λ);以及(iv) 抗体轻链恒定区 (CL)。在一个实施方式中,所述V3二聚抗原受体 (DAR) 缺乏肽接头和/或缺乏掩蔽部分。

[0361] 在一个实施方式中,所述抗体重链可变区 (VH) 包括抗EGFR重链可变区序列(例如,来自SEQ ID NO:2或4)并且所述抗体重链恒定区 (CH) 包括抗EGFR重链恒定区序列(例如,来自SEQ ID NO:2或4)。在一个实施方式中,所述抗体重链可变区 (VH) 包括抗CD38重链可变区序列(例如,来自SEQ ID NO:7、9、11、13、14、15、16、17、18或20)并且所述抗体重链恒定区 (CH) 包括抗CD38重链恒定区序列(例如,来自SEQ ID NO:7、9、11、13、14、15、16、17、18或20)。

[0362] 在一个实施方式中,所述V3 DAR抗体轻链可变区 (VL) 包括抗EGFR轻链可变区序列(例如,来自SEQ ID NO:3或5)并且所述抗体轻链恒定区 (CL) 包括抗EGFR轻链恒定区序列(例如,来自SEQ ID NO:3或5)。在一个实施方式中,所述V3 DAR抗体轻链可变区 (VL) 包括抗CD38轻链可变区序列(例如,来自SEQ ID NO:8、10、12或19)并且所述抗体轻链恒定区 (CL) 包括抗CD38轻链恒定区序列(例如,来自SEQ ID NO:8、10、12或19)。

[0363] 在一个实施方式中,所述版本3 (V3) DAR构建体的第一多肽链包括PDGFR β 铰链序列(SEQ ID NO:41)和PDGFR β 跨膜序列(SEQ ID NO:42)。

[0364] 本公开提供了版本4(例如,V4)二聚抗原受体 (DAR) 构建体,所述DAR构建体包括携带重链可变区 (VH) 和重链恒定区 (CH) 的第一多肽链以及携带轻链可变区 (VL) 和轻链恒定区 (CL) 的第二多肽链,其中 (a) 所述第一多肽链包括从氨基端排序到羧基端的区:(i) 第一

掩蔽部分；(ii) 第一肽接头；(iii) 抗体重链可变区 (VH)；(iv) 抗体重链恒定区 (CH)；(v) 包括CD28跨膜序列 (例如, SEQ ID NO:47) 的跨膜区 (TM)；以及 (vi) 包括4-1BB信号传导序列 (例如, SEQ ID NO:48) 和仅具有ITAM基序3的CD3- ζ 信号传导序列 (例如, SEQ ID NO:51) 的细胞内信号传导区；(b) 第二多肽链包括从氨基端排序到羧基端的区：(i) 第二掩蔽部分；(ii) 第二肽接头；(iii) 抗体轻链可变区 (VL) (例如, κ 或 λ)；以及 (iv) 抗体轻链恒定区 (CL)。DAR V4构建体缺乏铰链序列。在一个实施方式中, 所述V4二聚抗原受体 (DAR) 缺乏肽接头和/或缺乏掩蔽部分。

[0365] 在一个实施方式中, 所述抗体重链可变区 (VH) 包括抗EGFR重链可变区序列 (例如, 来自SEQ ID NO:2或4) 并且所述抗体重链恒定区 (CH) 包括抗EGFR重链恒定区序列 (例如, SEQ ID NO:2或4)。在一个实施方式中, 所述抗体重链可变区 (VH) 包括抗CD38重链可变区序列 (例如, 来自SEQ ID NO:7、9、11、13、14、15、16、17、18或20) 并且所述抗体重链恒定区 (CH) 包括抗CD38重链恒定区序列 (例如, 来自SEQ ID NO:7、9、11、13、14、15、16、17、18或20)。

[0366] 在一个实施方式中, 所述V4 DAR抗体轻链可变区 (VL) 包括抗EGFR轻链可变区序列 (例如, 来自SEQ ID NO:3或5) 并且所述抗体轻链恒定区 (CL) 包括抗EGFR轻链恒定区序列 (例如, 来自SEQ ID NO:3或5)。在一个实施方式中, 所述V4 DAR抗体轻链可变区 (VL) 包括抗CD38轻链可变区序列 (例如, 来自SEQ ID NO:8、10、12或19) 并且所述抗体轻链恒定区 (CL) 包括抗CD38轻链恒定区序列 (例如, 来自SEQ ID NO:8、10、12或19)。

[0367] 在一个实施方式中, 所述版本4 (V4) DAR构建体的第一多肽链包括PDGFR β 铰链序列 (SEQ ID NO:41) 和PDGFR β 跨膜序列 (SEQ ID NO:42)。

[0368] 本公开提供了编码前体多肽 (例如, 图4A和B) 的核酸, 所述前体多肽可以被加工 (切割) 和组装以变成包括本文所描述的二聚抗原受体 (DAR) 的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白, 所述DAR包括第二和第三代DAR构建体, 并且包括版本V1、V2a、V2b、V2c、V3和V4 DAR构建体, 并且所述任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白包括包含可以与EGFR或CD38结合的二聚抗原受体 (DAR) 的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白。

[0369] 在一个实施方式中, 所述核酸编码包括以下的前体多肽链：(i) 重链前导序列；(ii) 第一掩蔽部分；(iii) 第一肽接头；(iv) 抗体重链可变区 (VH)；(v) 抗体重链恒定区 (CH)；(vi) 任选的铰链区；(vii) 跨膜区 (TM)；(viii) 细胞内信号传导区；(ix) 自我切割序列；(x) 轻链前导序列；(xi) 第二掩蔽部分；(xii) 第二肽接头；(xiii) 抗体轻链可变区 (VL) (例如, κ 或 λ)；以及 (xiv) 抗体轻链恒定区 (CL)。在一个实施方式中, 所述第一肽接头包括第一可切割位点。在一个实施方式中, 所述第二肽接头包括第二可切割位点。在一个实施方式中, 所述自我切割序列包括T2A (例如, 氨基酸序列EGRGSLTCDGVEENPGP)；P2A (例如, 氨基酸序列(GSG)ATNFSLLKQAGDVEENPG)；PE2A (例如, 氨基酸序列(GSG)QCTNYALLKLAGDVESNPG)；PF2A (例如, 氨基酸序列(GSG)VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP), 其中氨基酸序列(GSG)是任选的。在一个实施方式中, 编码前体多肽链的核酸包括重组核酸分子。

[0370] 在一个实施方式中, 所述核酸编码包括以下的前体多肽链：(i) 轻链前导序列；(ii) 第一掩蔽部分；(iii) 第一肽接头；(iv) 抗体轻链可变区 (VL) (例如, κ 或 λ)；(v) 抗体轻链恒定区 (CL)；(vi) 任选的铰链区；(vii) 跨膜区 (TM)；(viii) 细胞内信号传导区；(ix) 自我切割序列；(x) 重链前导序列；(xi) 第二掩蔽部分；(xii) 第二肽接头；(xiii) 抗体重链可变区 (VH)；以及 (xiv) 抗体重链恒定区 (CH)。在一个实施方式中, 所述第一肽接头包括第一可

切割位点。在一个实施方式中,所述第二肽接头包括第二可切割位点。在一个实施方式中,所述第二肽接头包括第二可切割位点。在一个实施方式中,所述自我切割序列包括T2A(例如,氨基酸序列EGRGSLLTCGDVEENPGP);P2A(例如,氨基酸序列(GSG)ATNFSLLKQAGDVEENPG);PE2A(例如,氨基酸序列(GSG)QCTNYALLKLAGDVESNPG);PF2A(例如,氨基酸序列(GSG)VKQTLNFDLLKLAGDVESNPG),其中氨基酸序列(GSG)是任选的。在一个实施方式中,编码前体多肽链的核酸包括重组核酸分子。

[0371] 在一个实施方式中,所述核酸编码包括第一掩蔽部分和/或第二掩蔽部分的前体多肽链,所述第一掩蔽部分和/或所述第二掩蔽部分包括具有SEQ ID NO:21、22或23的氨基酸序列的CH1、CL(λ 或 κ)区。在一个实施方式中,所述核酸编码包括第一掩蔽部分和/或所述第二掩蔽部分的前体多肽链,所述第一掩蔽部分和/或所述第二掩蔽部分包括具有SEQ ID NO:24、25、30或31的氨基酸序列的CH3(IgG1或IgG4)区。在一个实施方式中,所述核酸编码包括第一掩蔽部分和/或第二掩蔽部分的前体多肽链,所述第一掩蔽部分和/或所述第二掩蔽部分包括具有SEQ ID NO:28或29的氨基酸序列的T细胞受体 α (alpha)或 β (beta)恒定区。在一个实施方式中,所述核酸编码包括第一掩蔽部分和/或第二掩蔽部分的前体多肽链,所述第一掩蔽部分和/或所述第二掩蔽部分包括来自催化抗体38C2的具有SEQ ID NO:26或27的氨基酸序列的可变重链结构域。

[0372] 在一个实施方式中,所述核酸编码包括第一肽接头和/或第二肽接头的前体多肽链,所述第一肽接头和/或所述第二肽接头包括SEQ ID NO:32-40之一的氨基酸序列或包括表3-9中列出的氨基酸序列中的任一个。

[0373] 在一个实施方式中,所述核酸编码包括抗体重链可变区(VH)的前体多肽链,所述VH包括具有与SEQ ID NO:2或4的一部分或全长具有至少92%、或至少93%、或至少94%、或至少95%、或至少96%、或至少97%、或至少98%、或至少99%序列同一性、或具有100%序列同一性的氨基酸序列的抗EGFR重链可变区序列。在一个实施方式中,所述核酸编码包括抗体重链可变区(VH)的前体多肽链,所述VH包括具有与SEQ ID NO:7、9、11、13、14、15、16、17、18或20的一部分或全长具有至少92%、或至少93%、或至少94%、或至少95%、或至少96%、或至少97%、或至少98%、或至少99%序列同一性、或具有100%序列同一性的氨基酸序列的抗CD38重链可变区序列。

[0374] 在一个实施方式中,所述核酸编码包括抗体重链恒定区(CH)的前体多肽链,所述CH包括抗EGFR重链恒定区序列(例如,来自SEQ ID NO:2或4)。在一个实施方式中,所述核酸编码包括抗体重链恒定区(CH)的前体多肽链,所述CH包括抗CD38重链恒定区序列(例如,来自SEQ ID NO:7、9、11、13、14、15、16、17、18或20)。

[0375] 在一个实施方式中,所述核酸编码包括抗体轻链可变区(VL)的前体多肽链,所述VL包括具有与SEQ ID NO:3或5的一部分或全长具有至少92%、或至少93%、或至少94%、或至少95%、或至少96%、或至少97%、或至少98%、或至少99%序列同一性、或具有100%序列同一性的氨基酸序列的抗EGFR轻链可变区序列。在一个实施方式中,所述核酸编码包括抗体轻链可变区(VL)的前体多肽链,所述VL包括具有与SEQ ID NO:8、10、12或19的一部分或全长具有至少92%、或至少93%、或至少94%、或至少95%、或至少96%、或至少97%、或至少98%、或至少99%序列同一性、或具有100%序列同一性的氨基酸序列的抗CD38轻链可变区序列。

[0376] 在一个实施方式中,所述核酸编码包括抗体轻链恒定区(CL)的前体多肽链,所述CL包括抗EGFR轻链恒定区序列(例如,来自SEQ ID NO:3或5)。在一个实施方式中,所述核酸编码包括抗体轻链恒定区(CL)的前体多肽链,所述CL包括抗CD38轻链恒定区序列(例如,来自SEQ ID NO:8、10、12或19)。

[0377] 在一个实施方式中,所述核酸编码包括铰链区的前体多肽链,所述铰链区具有以下中的任一个或两个或更多个的任何组合的氨基酸序列:CD28铰链序列(SEQ ID NO:44); CD8铰链序列(SEQ ID NO:45);包括CD28和CD8铰链序列的长铰链(SEQ ID NO:46);和/或PDGFR β 铰链序列(SEQ ID NO:41)。

[0378] 在一个实施方式中,所述核酸编码包括跨膜区的前体多肽链,所述跨膜区具有CD28跨膜序列(SEQ ID NO:47)或PDGFR β 跨膜序列(SEQ ID NO:42)的氨基酸序列。

[0379] 在一个实施方式中,所述核酸编码包括具有以下氨基酸序列的1-3个任何顺序和任何组合的细胞内信号传导序列的前体多肽链:4-1BB信号传导序列(SEQ ID NO:48);CD28信号传导序列(SEQ ID NO:49);CD3 ζ 信号传导序列(SEQ ID NO:50);和/或CD3 ζ 短信号传导序列(SEQ ID NO:51)。

[0380] 本公开提供了编码第一多肽链的第一核酸和编码第二多肽链的第二核酸(例如,图4C和D),其中所述第一多肽链和所述第二多肽链可以彼此缔合/二聚化以形成包括本文所描述的二聚抗原受体(DAR)的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白,所述DAR包括第二和第三代DAR构建体,并且包括版本V1、V2a、V2b、V2c、V3和V4 DAR构建体,并且所述任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白包括包含可以与EGFR或CD38结合的二聚抗原受体(DAR)的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白。

[0381] 在一个实施方式中,所述第一核酸编码包括以下的第二多肽链:(i)重链前导序列;(ii)第一掩蔽部分;(iii)第一肽接头;(iv)抗体重链可变区(VH);(v)抗体重链恒定区(CH);(vi)任选的铰链区;(vii)跨膜区(TM);以及(viii)细胞内信号传导区(例如,图4C)。

[0382] 在一个实施方式中,所述第二核酸编码包括以下的第二多肽链:(i)轻链前导序列;(ii)第二掩蔽部分;(iii)第二肽接头;(iv)抗体轻链可变区(VL)(例如 κ 或 λ);以及(x)抗体轻链恒定区(CL)(例如,图4C)。

[0383] 在一个实施方式中,所述第一肽接头包括第一可切割位点。在一个实施方式中,所述第二肽接头包括第二可切割位点。在一个实施方式中,分别编码所述第一链和所述第二链的第一核酸和第二核酸包括重组核酸分子。

[0384] 在一个实施方式中,所述第一核酸编码包括以下的第二多肽链:(i)轻链前导序列;(ii)第一掩蔽部分;(iii)第一肽接头;(iv)抗体轻链可变区(VL)(例如 κ 或 λ);(v)抗体轻链恒定区(CL);(vi)任选的铰链区;(vii)跨膜区(TM);以及(viii)细胞内信号传导区(例如,图4D)。

[0385] 在一个实施方式中,所述第二核酸编码以下:(i)重链前导序列;(ii)第二掩蔽部分;(iii)第二肽接头;(iv)抗体重链可变区(VH);以及(x)抗体重链恒定区(CH)(例如,图4D)。

[0386] 在一个实施方式中,所述第一肽接头包括第一可切割位点。在一个实施方式中,所述第二肽接头包括第二可切割位点。在一个实施方式中,分别编码所述第一链和所述第二链的第一核酸和第二核酸包括重组核酸分子。

[0387] 在一个实施方式中,所述第一核酸编码包括第一掩蔽部分的第一多肽链,所述第一掩蔽部分包括具有SEQ ID NO:21、22或23的氨基酸序列的CH1、CL(λ 或 κ)区。在一个实施方式中,所述第一核酸编码包括第一掩蔽部分的第一多肽链,所述第一掩蔽部分包括具有SEQ ID NO:24、25、30或31的氨基酸序列的CH3(IgG1或IgG4)区。在一个实施方式中,所述第一核酸编码包括第一掩蔽部分的第一多肽链,所述第一掩蔽部分包括具有SEQ ID NO:28或29的氨基酸序列的T细胞受体 α (alpha)或 β (beta)恒定区。在一个实施方式中,所述第一核酸编码包括第一掩蔽部分的第一多肽链,所述第一掩蔽部分包括来自催化抗体38C2的具有SEQ ID NO:26或27的氨基酸序列的可变重链结构域。

[0388] 在一个实施方式中,所述第二核酸编码包括第二掩蔽部分的第二多肽链,所述第二掩蔽部分包括具有SEQ ID NO:21、22或23的氨基酸序列的CH1、CL(λ 或 κ)区。在一个实施方式中,所述第二核酸编码包括第二掩蔽部分的第二多肽链,所述第二掩蔽部分包括具有SEQ ID NO:24、25、30或31的氨基酸序列的CH3(IgG1或IgG4)区。在一个实施方式中,所述第二核酸编码包括第二掩蔽部分的第二多肽链,所述第二掩蔽部分包括具有SEQ ID NO:28或29的氨基酸序列的T细胞受体 α (alpha)或 β (beta)恒定区。在一个实施方式中,所述第二核酸编码包括第二掩蔽部分的第二多肽链,所述第二掩蔽部分包括来自催化抗体38C2的具有SEQ ID NO:26或27的氨基酸序列的可变重链结构域。

[0389] 在一个实施方式中,所述第一核酸编码包括第一肽接头的第一多肽链,所述第一肽接头包括SEQ ID NO:32-40之一的氨基酸序列或包括表3-9中列出的氨基酸序列中的任一个。

[0390] 在一个实施方式中,所述第二核酸编码包括第二肽接头的第二多肽链,所述第二肽接头包括SEQ ID NO:32-40之一的氨基酸序列或包括表3-9中列出的氨基酸序列中的任一个。

[0391] 在一个实施方式中,所述第一核酸编码包括抗体重链可变区(VH)的第一多肽链,所述VH包括具有与SEQ ID NO:2或4的一部分或全长具有至少92%、或至少93%、或至少94%、或至少95%、或至少96%、或至少97%、或至少98%、或至少99%序列同一性、或具有100%序列同一性的氨基酸序列的抗EGFR重链可变区序列。在一个实施方式中,所述第一核酸编码包括抗体重链可变区(VH)的第一多肽链,所述VH包括具有与SEQ ID NO:7、9、11、13、14、15、16、17、18或20的一部分或全长具有至少92%、或至少93%、或至少94%、或至少95%、或至少96%、或至少97%、或至少98%、或至少99%序列同一性、或具有100%序列同一性的氨基酸序列的抗CD38重链可变区序列。

[0392] 在一个实施方式中,所述第一核酸编码包括抗体轻链可变区(VL)的第一多肽链,所述VL包括具有与SEQ ID NO:3或5的一部分或全长具有至少92%、或至少93%、或至少94%、或至少95%、或至少96%、或至少97%、或至少98%、或至少99%序列同一性、或具有100%序列同一性的氨基酸序列的抗EGFR轻链可变区序列。在一个实施方式中,所述第一核酸编码包括抗体轻链可变区(VL)的第一多肽链,所述VL包括具有与SEQ ID NO:8、10、12或19的一部分或全长具有至少92%、或至少93%、或至少94%、或至少95%、或至少96%、或至少97%、或至少98%、或至少99%序列同一性、或具有100%序列同一性的氨基酸序列的抗CD38轻链可变区序列。

[0393] 在一个实施方式中,所述第二核酸编码包括抗体轻链可变区(VL)的第二多肽链,

所述VL包括具有与SEQ ID NO:3或5的一部分或全长具有至少92%、或至少93%、或至少94%、或至少95%、或至少96%、或至少97%、或至少98%、或至少99%序列同一性、或具有100%序列同一性的氨基酸序列的抗EGFR轻链可变区序列。在一个实施方式中,所述第二核酸编码包括抗体轻链可变区(VL)的第二多肽链,所述VL包括具有与SEQ ID NO:8、10、12或19的一部分或全长具有至少92%、或至少93%、或至少94%、或至少95%、或至少96%、或至少97%、或至少98%、或至少99%序列同一性、或具有100%序列同一性的氨基酸序列的抗CD38轻链可变区序列。

[0394] 在一个实施方式中,所述第二核酸编码包括抗体重链可变区(VH)的第二多肽链,所述VH包括具有与SEQ ID NO:2或4的一部分或全长具有至少92%、或至少93%、或至少94%、或至少95%、或至少96%、或至少97%、或至少98%、或至少99%序列同一性、或具有100%序列同一性的氨基酸序列的抗EGFR重链可变区序列。在一个实施方式中,所述第二核酸编码包括抗体重链可变区(VH)的第二多肽链,所述VH包括具有与SEQ ID NO:7、9、11、13、14、15、16、17、18或20的一部分或全长具有至少92%、或至少93%、或至少94%、或至少95%、或至少96%、或至少97%、或至少98%、或至少99%序列同一性、或具有100%序列同一性的氨基酸序列的抗CD38重链可变区序列。

[0395] 在一个实施方式中,所述第一核酸编码包括抗体重链恒定区(CH)的第一多肽链,所述CH包括抗EGFR重链恒定区序列(例如,来自SEQ ID NO:2或4)。在一个实施方式中,所述第一核酸编码包括抗体重链恒定区(CH)的第一多肽链,所述CH包括抗CD38重链恒定区序列(例如,来自SEQ ID NO:7、9、11、13、14、15、16、17、18或20)。

[0396] 在一个实施方式中,所述第一核酸编码包括抗体轻链恒定区(CL)的第一多肽链,所述CH包括抗EGFR轻链恒定区序列(例如,来自SEQ ID NO:3或5)。在一个实施方式中,所述第一核酸编码包括抗体轻链恒定区(CL)的第一多肽链,所述CL包括抗CD38轻链恒定区序列(例如,来自SEQ ID NO:8、10、12或19)。

[0397] 在一个实施方式中,所述第二核酸编码包括抗体轻链恒定区(CL)的第二多肽链,所述CL包括抗EGFR轻链恒定区序列(例如,来自SEQ ID NO:3或5)。在一个实施方式中,所述第二核酸编码包括抗体轻链恒定区(CL)的第二多肽链,所述CL包括抗CD38轻链恒定区序列(例如,来自SEQ ID NO:8、10、12或19)。

[0398] 在一个实施方式中,所述第二核酸编码包括抗体重链恒定区(CH)的第二多肽链,所述CH包括抗EGFR重链恒定区序列(例如,来自SEQ ID NO:2或4)。在一个实施方式中,所述第二核酸编码包括抗体重链恒定区(CH)的第二多肽链,所述CH包括抗CD38重链恒定区序列(例如,来自SEQ ID NO:7、9、11、13、14、15、16、17、18或20)。

[0399] 在一个实施方式中,所述第一核酸编码包括铰链区的第一多肽链,所述铰链区具有以下中的任一个或两个或更多的任何组合的氨基酸序列:CD28铰链序列(SEQ ID NO:44);CD8铰链序列(SEQ ID NO:45);包括CD28和CD8铰链序列的长铰链(SEQ ID NO:46);和/或PDGFR β 铰链序列(SEQ ID NO:41)。

[0400] 在一个实施方式中,所述第一核酸编码包括跨膜区的第一多肽链,所述跨膜区具有CD28跨膜序列(SEQ ID NO:47)或PDGFR β 跨膜序列(SEQ ID NO:42)的氨基酸序列。

[0401] 在一个实施方式中,所述第一核酸编码包括具有以下氨基酸序列的1-3个任何顺序和任何组合的细胞内信号传导序列的第一多肽链:4-1BB信号传导序列(SEQ ID NO:48);

CD28信号传导序列(SEQ ID NO:49);CD3 ζ 信号传导序列(SEQ ID NO:50);和/或CD3 ζ 短信号传导序列(SEQ ID NO:51)。

[0402] 本公开提供了与编码包括二聚抗原受体(DAR)的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白的前体多肽的核酸可操作地接合的载体,包括表达载体。

[0403] 在一个实施方式中,表达载体包括一个或多个调控序列(例如,启动子和/或增强子),所述一个或多个调控序列控制编码包括二聚抗原受体(DAR)的可活化的掩蔽抗原结合蛋白的任何前体多肽的核酸的转录。在一个实施方式中,表达载体包括各自与编码前体多肽的核酸可操作地接合的一个或多个调控序列。

[0404] 在一个实施方式中,将表达载体引入宿主细胞,其中宿主细胞内的表达载体携带启动子(并且任选地携带增强子序列),所述启动子与编码前体多肽的核酸可操作地接合。因此,宿主细胞可以表达(转录和翻译)编码的前体多肽,所述编码的前体多肽构成包括本文所描述的二聚抗原受体(DAR)的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白。

[0405] 在一个实施方式中,前体多肽可以通过在自我切割序列处切割前体多肽以释放第一多肽链和第二多肽链并分泌前体,和/或将前体锚定在宿主细胞的细胞膜中来加工。在一个实施方式中,前体多肽可以在自我切割序列处进行切割,由此产生第一多肽链和第二多肽链,所述第一多肽链和所述第二多肽链各自具有在其N末端处的前导信号序列。

[0406] 在一个实施方式中,在释放第一多肽链和第二多肽链后,所述第一多肽链和第二多肽链可以通过抗体重链恒定区与抗体轻链恒定区之间的至少一个二硫键二聚化(组装)。

[0407] 载体包括作为诱导型或组成型启动子的启动子。可以选择载体和宿主细胞以产生瞬时或稳定表达本文所描述的任何前体多肽的转基因宿主细胞。

[0408] 表达载体可以包括衍生自逆转录病毒、慢病毒或腺病毒的核酸骨架序列。表达载体可以包括如诱导型和/或组成型启动子和增强子等一个或多个调控序列。表达载体可以包括核糖体结合位点和/或聚腺苷酸化位点。

[0409] 在一个实施方式中,可操作地连接到编码二聚抗原受体(DAR)构建体的核酸的表达载体可以引导二聚抗原受体(DAR)构建体产生,所述DAR构建体可以展示于转基因宿主细胞的表面上,或者二聚抗原受体可以分泌到细胞培养基中。

[0410] 本公开提供了与编码第一多肽链和/或编码第二多肽链的核酸可操作地接合的载体,其中所述第一多肽链和所述第二多肽链彼此缔合/二聚化以形成包括二聚抗原受体(DAR)的可活化的掩蔽抗原结合蛋白。

[0411] 在一个实施方式中,第一载体(例如,第一表达载体)与编码包括二聚抗原受体(DAR)的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白的第一多肽链的第一核酸可操作地接合。

[0412] 在一个实施方式中,第二载体(例如,第二表达载体)与编码包括二聚抗原受体(DAR)的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白的第二多肽链的第二核酸可操作地接合。

[0413] 在一个实施方式中,第一载体(例如,第一表达载体)与编码包括二聚抗原受体(DAR)的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白的第一多肽链的第一核酸可操作地接合,并且所述第一载体也与编码包括二聚抗原受体(DAR)的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白的第二多肽链的第二核酸可操作地接合。

[0414] 在一个实施方式中,表达载体包括一个或多个调控序列(例如,启动子和/或增强子),所述一个或多个调控序列控制编码包括二聚抗原受体(DAR)的可活化的掩蔽抗原结合

蛋白的任何前体多肽的核酸的转录。在一个实施方式中,表达载体包括各自与编码前体多肽的核酸可操作地接合的一个或多个调控序列。

[0415] 在一个实施方式中,将表达载体引入宿主细胞,其中宿主细胞内的表达载体携带启动子(并且任选地携带增强子序列),所述启动子与编码前体多肽的核酸可操作地接合。因此,宿主细胞可以表达(转录和翻译)编码的前体多肽,所述编码的前体多肽构成包括本文所描述的二聚抗原受体(DAR)的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白。

[0416] 在一个实施方式中,在表达第一多肽链和第二多肽链后,所述第一多肽链和所述第二多肽链可以通过抗体重链恒定区与抗体轻链恒定区之间的至少一个二硫键二聚化(组装)(例如,图3A和B)。

[0417] 载体包括诱导型或组成型启动子的启动子。可以选择载体和宿主细胞以产生暂时或稳定表达本文所描述的任何前体多肽的转基因宿主细胞。

[0418] 表达载体可以包括衍生自逆转录病毒、慢病毒或腺病毒的核酸骨架序列。表达载体可以包括如诱导型和/或组成型启动子和增强子等一个或多个调控序列。表达载体可以包括核糖体结合位点和/或聚腺苷酸化位点。

[0419] 在一个实施方式中,可操作地连接到编码二聚抗原受体(DAR)构建体的核酸的表达载体可以引导二聚抗原受体(DAR)构建体产生,所述DAR构建体可以展示于转基因宿主细胞的表面上,或者二聚抗原受体可以分泌到细胞培养基中。

[0420] 本公开提供了一种携带一种或多种表达载体的宿主细胞或宿主细胞群,所述一种或多种表达载体与编码第一多肽链和/或第二多肽链的任何核酸可操作地接合,所述第一多肽链和/或所述第二多肽链可以彼此缔合/二聚化以成为包括二聚抗原受体(DAR)的可活化的掩蔽抗原结合蛋白。

[0421] 在一个实施方式中,第一宿主细胞或第一宿主细胞群携带与编码包括二聚抗原受体(DAR)的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白的第一多肽链的第一核酸可操作地接合的第一载体(例如,第一表达载体)。

[0422] 在一个实施方式中,第二宿主细胞或第二宿主细胞群携带与编码包括二聚抗原受体(DAR)的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白的第二多肽链的第二核酸可操作地接合的第二载体(例如,第二表达载体)。

[0423] 在一个实施方式中,第一宿主细胞或第一宿主细胞群携带与编码包括二聚抗原受体(DAR)的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白的第一多肽链的第一核酸可操作地接合的第一载体(例如,第一表达载体),并且所述第一宿主细胞或第一宿主细胞群也携带与编码包括二聚抗原受体(DAR)的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白的第二多肽链的第二核酸可操作地接合的第二载体。

[0424] 在一个实施方式中,第一宿主细胞或第一宿主细胞群携带与编码包括二聚抗原受体(DAR)的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白的第一多肽链的第一核酸可操作地接合的第一载体(例如,第一表达载体),并且所述第一载体也与编码包括二聚抗原受体(DAR)的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白的第二多肽链的第二核酸可操作地接合。

[0425] 宿主细胞可以是细菌或哺乳动物细胞。在一个实施方式中,宿主细胞包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。宿主细胞或宿主细胞群包括T淋巴细胞(例如,T细胞、调控T细胞、 γ - δ T细胞以及细胞毒性T细胞)、NK(天然杀伤)细胞、巨噬细胞、树突细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细

胞、B淋巴细胞、单核细胞。在一个实施方式中，NK细胞包括脐带血源性NK细胞或胎盘源性NK细胞。

[0426] 在一个实施方式中，将所述第一表达载体引入所述第一宿主细胞或所述第一宿主细胞群中，其中所述第一表达载体与编码包括二聚抗原受体 (DAR) 的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白的第一多肽链的第一核酸可操作地连接。

[0427] 在一个实施方式中，将所述第二表达载体引入所述第二宿主细胞或所述第二宿主细胞群中，其中所述第二表达载体与编码包括二聚抗原受体 (DAR) 的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白的第二多肽链的第二核酸可操作地连接。

[0428] 在一个实施方式中，将所述第一表达载体和所述第二表达载体引入所述第一宿主细胞或所述第一宿主细胞群中，其中所述第一表达载体与编码包括二聚抗原受体 (DAR) 的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白的第一多肽链的第一核酸可操作地连接，并且其中所述第二表达载体与编码包括二聚抗原受体 (DAR) 的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白的第二多肽链的第二核酸可操作地连接。

[0429] 在一个实施方式中，将所述第一表达载体引入所述第一宿主细胞或所述第一宿主细胞群中，其中所述第一表达载体与编码包括二聚抗原受体 (DAR) 的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白的第一多肽链的第一核酸可操作地连接，并且其中所述第一表达载体也与编码包括二聚抗原受体 (DAR) 的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白的第二多肽链的第二核酸可操作地连接。

[0430] 在一个实施方式中，通过脂转染 (例如，使用脂质表面活性剂)；电穿孔；采用氯化钙、氯化铷、磷酸钙、DEAE-葡聚糖或其它物质进行转染；病毒转染；非病毒转染；微粒轰击；以及感染 (例如，当载体是感染原时) 将至少一种表达载体引入宿主细胞。

[0431] 本公开提供了用于制备包括本文所描述的二聚抗原受体 (DAR) 的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白的方法，所述DAR包括第二和第三代DAR构建体，并且包括版本V1、V2a、V2b、V2c、V3和V4 DAR构建体，并且所述任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白包括包含可以与EGFR或CD38结合的二聚抗原受体 (DAR) 的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白。用于制备包括二聚抗原受体 (DAR) 的可活化的掩蔽抗原结合蛋白的方法包括：培养宿主细胞群，其中所述群中的单独宿主细胞携带与编码本文所描述的第一多肽链和/或第二多肽链的第一核酸和/或第二核酸可操作地连接的表达载体，其中所述培养在适于由所述宿主细胞群表达所述第一多肽和/或所述第二多肽的条件下进行。

[0432] 在一个实施方式中，编码所述第一多肽链和/或所述第二多肽链的核酸进一步编码用于由所述宿主细胞分泌表达的第一多肽和/或第二多肽的轻链和/或重链前导序列。在一个实施方式中，所述培养在适于由所述宿主细胞群分泌所述第一多肽和/或所述第二多肽的条件下进行。

[0433] 在一个实施方式中，编码所述第一多肽和/或所述第二多肽的核酸进一步编码用于富集所表达的多肽的亲亲和标签序列。示例性亲和和标签序列包括组氨酸标签、FLAG标签、myc标签、HA标签和GST标签。

[0434] 在一个实施方式中，用于制备包括本文所描述的IgG型抗体的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白的方法进一步包括分离所表达的重链和/或轻链。

[0435] 在一个实施方式中，所述培养在适于所述重链或轻链的组装和缔合的条件下进行

以形成包括IgG型抗体的所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白。

[0436] 在一个实施方式中,用于制备包括本文所描述的DAR型抗体的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白的方法进一步包括分离所表达的前体DAR多肽。在一个实施方式中,用于制备包括本文所描述的DAR型抗体的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白的方法进一步包括分离形成二聚抗原受体(DAR)的所加工/切割/组装的多肽。

[0437] 在一个实施方式中,所述培养在适于表达、分泌和切割前体DAR多肽以及组装两个所得多肽链(第一多肽链和第二多肽链)以形成包括二聚抗原受体(DAR)的可活化的掩蔽抗原结合蛋白的条件下进行。

[0438] 在一个实施方式中,用于制备包括本文所描述的DAR型抗体的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白的方法进一步包括分离所表达的第一多肽和/或第二多肽。在一个实施方式中,用于制备包括本文所描述的DAR型抗体的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白的方法进一步包括分离通过第一Dar多肽链和第二Dar多肽链的缔合/二聚化形成的二聚抗原受体(DAR)。

[0439] 在一个实施方式中,所述培养在适于表达所述第一多肽链和/或所述第二多肽链以及组装所述第一多肽链和所述第二多肽链以形成包括二聚抗原受体(DAR)的可活化的掩蔽抗原结合蛋白的条件下进行。

[0440] 在一个实施方式中,所述方法进一步包括分离或回收包括二聚抗原受体(DAR)的组装的可活化的掩蔽抗原结合蛋白。在一个实施方式中,使用亲和色谱法进行分离。在一个实施方式中,使用亲和色谱法用来自金黄色葡萄球菌的蛋白A或G、谷胱甘肽S转移酶(GST)或免疫亲和力进行分离。在一个实施方式中,进行包括阳离子交换、阴离子交换色谱法、疏水相互作用色谱法、混合模式色谱法和/或羟基磷灰石色谱法的一个或多个另外的分离步骤。

[0441] 在一个实施方式中,包括所述二聚抗原受体(DAR)的组装的可活化的掩蔽抗原结合蛋白包括第一多肽链和第二多肽链,其中(a)所述第一多肽链包括:(i)第一掩蔽部分;(ii)第一肽接头;(iii)抗体重链可变区(VH);(iv)抗体重链恒定区(CH),(v)任选的铰链区;(vi)跨膜区(TM);以及(vii)细胞内信号传导区,其中(b)所述第二多肽链包括:(i)第二掩蔽部分;(ii)第二肽接头;(iii)抗体轻链可变区(VL)(例如 κ 或 λ);以及(iv)抗体轻链恒定区(CL),其中所述抗体重链可变区(VH)和所述抗体轻链可变区(VL)形成与靶抗原结合的抗原结合结构域。

[0442] 在一个实施方式中,包括所述二聚抗原受体(DAR)的组装的可活化的掩蔽抗原结合蛋白包括第一多肽链和第二多肽链,其中(a)所述第一多肽链包括:(i)第一掩蔽部分;(ii)第一肽接头;(iii)抗体轻链可变区(VL)(例如, κ 或 λ);(iv)抗体轻链恒定区(CL);(v)任选的铰链区;(iv)跨膜区(TM);以及(vii)细胞内信号传导区,其中(b)所述第二多肽链包括:(i)第二掩蔽部分;(ii)第二肽接头;(iii)抗体重链可变区(VH);以及(iv)抗体重链恒定区(CH),其中所述抗体重链可变区(VH)和所述抗体轻链可变区(VL)形成与靶抗原结合的抗原结合结构域。

[0443] 可以使用本领域众所周知的方法使用转基因宿主细胞表达、噬菌体展示、酵母展示和人抗体基因转基因小鼠来制备包括二聚抗原受体(DAR)的可活化的掩蔽抗原结合蛋白。在一个实施方式中,使用转基因宿主细胞表达的抗原结合蛋白的产量可以是形成的总

可活化的掩蔽抗原结合蛋白的约20%-80%、或约30%-90%、或约40%-95%或约50%-99%。

[0444] 本公开提供了用于切割包括本文所描述的二聚抗原受体 (DAR) 的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白的至少一个肽接头的方法,所述方法包括:(a)使至少一种蛋白酶与处于非活性形式的可活化的掩蔽抗原结合蛋白DAR接触,其中第一肽接头和第二肽接头处于未切割状态。

[0445] 在一个实施方式中,使可活化的掩蔽抗原结合蛋白与选自以下的一种蛋白酶或两种或更多种蛋白酶的任意组合接触:基质金属蛋白酶 (MMP);MMP1;MMP2;MMP3;MMP8;MMP9;MMP11;MMP13;MMP14;MT1-MMP (膜型1基质金属蛋白酶);解整合素和金属蛋白酶 (ADAM) 蛋白酶;ADAM10;ADAM12;ADAM17;尿激酶纤溶酶原活化剂 (uPA);丝氨酸蛋白酶;半胱氨酸蛋白酶;天冬氨酸蛋白酶;苏氨酸蛋白酶;组织蛋白酶 (例如,半胱氨酸或天冬氨酸组织蛋白酶);组织蛋白酶B;组织蛋白酶C;组织蛋白酶D;组织蛋白酶E;组织蛋白酶K或组织蛋白酶L。

[0446] 在一个实施方式中,使可活化的掩蔽抗原结合蛋白基本上同时 (在同一时间) 与两种或更多种蛋白酶接触,或者以任何顺序与两种或更多种蛋白酶接触。

[0447] 在一个实施方式中,步骤 (a) 中使用的可活化的掩蔽抗原结合蛋白的至少一个肽接头包括可被一种或多种蛋白酶切割的可切割位点,所述一种或多种蛋白酶包括:基质金属蛋白酶 (MMP);MMP1;MMP2;MMP3;MMP8;MMP9;MMP11;MMP13;MMP14;MT1-MMP (膜型1基质金属蛋白酶);解整合素和金属蛋白酶 (ADAM) 蛋白酶;ADAM10;ADAM12;ADAM17;尿激酶纤溶酶原活化剂 (uPA);丝氨酸蛋白酶;半胱氨酸蛋白酶;天冬氨酸蛋白酶;苏氨酸蛋白酶;组织蛋白酶 (例如,半胱氨酸或天冬氨酸组织蛋白酶);组织蛋白酶B;组织蛋白酶C;组织蛋白酶D;组织蛋白酶E;组织蛋白酶K或组织蛋白酶L。

[0448] 在一个实施方式中,所述方法进一步包括:(b)切割所述肽接头中的至少一个以将未切割的可活化的掩蔽抗原结合蛋白转化为活化形式。在一个实施方式中,活化形式可以与靶抗原结合。

[0449] 在一个实施方式中,所述方法进一步包括:(c)将 (现在处于所述活化状态的) 所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白与靶抗原结合。

[0450] 在一个实施方式中,接触、切割和结合步骤在体外或体内条件下进行。

[0451] 在一个实施方式中,所述靶抗原包括可溶性抗原或表面抗原。在一个实施方式中,所述靶抗原由健康或患病细胞表达。

[0452] 在一个实施方式中,表达靶抗原的患病细胞 (例如,肿瘤或癌细胞) 也表达切割肽接头的一种或多种蛋白酶。在一个实施方式中,患病细胞表达包括以下的一种蛋白酶或两种或更多种蛋白酶的组:基质金属蛋白酶 (MMP);MMP1;MMP2;MMP3;MMP8;MMP9;MMP11;MMP13;MMP14;MT1-MMP (膜型1基质金属蛋白酶);解整合素和金属蛋白酶 (ADAM) 蛋白酶;ADAM10;ADAM12;ADAM17;尿激酶纤溶酶原活化剂 (uPA);丝氨酸蛋白酶;半胱氨酸蛋白酶;天冬氨酸蛋白酶;苏氨酸蛋白酶;组织蛋白酶 (例如,半胱氨酸或天冬氨酸组织蛋白酶);组织蛋白酶B;组织蛋白酶C;组织蛋白酶D;组织蛋白酶E;组织蛋白酶K和/或组织蛋白酶L。

[0453] 在一个实施方式中,方法进一步包括:(d)通过将活化的掩蔽抗原结合蛋白与患病细胞结合来杀死患病细胞 (例如,肿瘤或癌细胞)。

[0454] 在一个实施方式中,所述肽接头中的至少一个可被肿瘤微环境中存在的蛋白酶切

割。

[0455] 在一个实施方式中,肿瘤微环境包括选自由以下组成的组的蛋白酶:基质金属蛋白酶(MMP);MMP1;MMP2;MMP3;MMP8;MMP9;MMP11;MMP13;MMP14;MT1-MMP(膜型1基质金属蛋白酶);解整合素和金属蛋白酶(ADAM)蛋白酶;ADAM10;ADAM12;ADAM17;尿激酶纤溶酶原活化剂(uPA);丝氨酸蛋白酶;半胱氨酸蛋白酶;天冬氨酸蛋白酶;苏氨酸蛋白酶;组织蛋白酶(例如,半胱氨酸或天冬氨酸组织蛋白酶);组织蛋白酶B;组织蛋白酶C;组织蛋白酶D;组织蛋白酶E;组织蛋白酶K以及组织蛋白酶L。

[0456] 本公开提供了治疗患有与肿瘤相关抗原的表达或过表达相关联的疾病的受试者的方法,所述方法包括:向所述受试者施用有效量的治疗组合物,所述治疗组合物包含表达包括本文所描述的二聚抗原受体(DAR)的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白的宿主细胞群。在一个实施方式中,所述宿主细胞群表达包括处于非活性形式的二聚抗原受体(DAR)的可活化的掩蔽抗原结合蛋白,所述DAR具有处于未切割状态的(例如,可活化的)第一肽接头和第二肽接头。在一个实施方式中,所述宿主细胞群可以表达包括二聚抗原受体(DAR)的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白,所述DAR包括第二和第三代DAR构建体,并且包括版本V1、V2a、V2b、V2c、V3和V4 DAR构建体,并且所述任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白包括包含可以与EGFR或CD38结合的二聚抗原受体(DAR)的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白。在一个实施方式中,将表达包括本文所描述的二聚抗原受体(DAR)的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白的所述宿主细胞群以足以对与肿瘤或癌症抗原表达相关联的疾病或病症产生可测量的改善或预防的量施用于所述受试者。

[0457] 在一个实施方式中,用于治疗所述受试者的所述宿主细胞或宿主细胞群是自体的并且源自接受治疗的所述受试者。在一个实施方式中,可以从所述受试者获得全血并且可以从全血中获得所需的细胞(例如,T淋巴细胞、NK细胞或巨噬细胞)。

[0458] 在一个实施方式中,用于治疗所述受试者的所述宿主细胞或宿主细胞群是同种异体的并且源自不同的受试者。可以以与自体细胞相同的方式从来自不同的受试者的全血获得同种异体细胞。在一个实施方式中,同种异体细胞源自妊娠后的胎盘或脐带组织。

[0459] 在一个实施方式中,所需细胞从接受治疗的受试者获得,或从不同的受试者获得,并且被工程化为携带引导任何第一多肽或第二多肽或前体多肽的表达的一种或多种表达载体,从而产生转基因宿主细胞。转基因宿主细胞可以表达第一多肽或第二多肽或前体多肽。宿主细胞可以表达二聚化以形成与受试者的肿瘤抗原特异性结合的二聚抗原受体的第一多肽链和第二多肽链。宿主细胞可以表达前体多肽链,所述前体多肽链可以被切割以形成二聚化以形成与受试者的肿瘤抗原特异性结合的二聚抗原受体的第一多肽链和第二多肽链。可以将转基因宿主细胞(例如,携带表达载体或表达多肽链)施用于受试者以治疗与肿瘤抗原过度表达相关联的疾病、病症或病状。

[0460] 本公开提供了一种用于治疗患有与肿瘤抗原的有害表达相关联的疾病、病症或病状的受试者的方法,其中病症是癌症,包括但不限于血液乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、头颈癌、肺癌、膀胱癌、黑色素瘤、结直肠癌、胰腺癌、肺癌、肝癌、肾癌、食管癌、平滑肌瘤、平滑肌肉瘤、神经胶质瘤和成胶质细胞瘤,其中用于治疗所述受试者的方法包括向所述受试者施用有效量的治疗组合物,所述治疗组合物包含表达包括本文所描述的二聚抗原受体(DAR)的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白的宿主细胞群。

[0461] 在一个实施方式中,癌症是选自由以下组成的组的血液癌症:非霍奇金淋巴瘤(NHL)、伯基特淋巴瘤(BL)、B细胞慢性淋巴细胞性白血病(B-CLL)、B细胞和T细胞急性淋巴细胞性白血病(ALL)、T细胞淋巴瘤(TCL)、急性骨髓性白血病(AML)、毛细胞白血病(HCL)、霍奇金淋巴瘤(HL)、慢性骨髓性白血病(CML)和多发性骨髓瘤(MM)。

[0462] 本公开提供了一种用于检测蛋白酶活性和对检测、诊断、监测和/或分级如癌症或肿瘤等患病组织的特异性的基于切割的体外方法。可以从受试者中提取肿瘤或癌症团块并使其与包括本文所描述的二聚抗原受体(DAR)的两种或更多种可活化的掩蔽抗原结合蛋白中的一种或任何组合接触,所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白各自具有至少一个具有已知蛋白酶切割谱的肽接头。来自受试者的肿瘤或癌症团块产生一种或多种蛋白酶。所述方法包括:(a)在适于蛋白酶切割可活化的掩蔽抗原结合蛋白上的至少一个肽接头以产生切割的肽产物的条件下,使患病组织与一种或多种可活化的掩蔽抗原结合蛋白接触。所述方法进一步包括:(b)例如使用任何方法检测切割的肽产物。因此,可以鉴定由肿瘤或癌症团块产生的蛋白酶的类型。在一个实施方式中,使患病组织与包括二聚抗原受体(DAR)的可活化的掩蔽抗原结合蛋白中的一种或多种接触,所述DAR包括第二和第三代DAR构建体,并且包括版本V1、V2a、V2b、V2c、V3和V4 DAR构建体,并且所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白包括包含可以与EGFR或CD38结合的二聚抗原受体(DAR)的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白。

[0463] 在一个实施方式中,肽接头可被选自由以下组成的组的任一种蛋白酶或两种或更多种蛋白酶的任何组合切割:基质金属蛋白酶(MMP);MMP1;MMP2;MMP3;MMP8;MMP9;MMP11;MMP13;MMP14;MT1-MMP(膜型1基质金属蛋白酶);ADAM蛋白酶;尿激酶纤溶酶原活化剂(uPA);丝氨酸蛋白酶;半胱氨酸蛋白酶;天冬氨酸蛋白酶;苏氨酸蛋白酶;组织蛋白酶(例如,半胱氨酸或天冬氨酸组织蛋白酶);组织蛋白酶B;组织蛋白酶C;组织蛋白酶D;组织蛋白酶E;组织蛋白酶K以及组织蛋白酶L。

[0464] 本公开提供了一种用于检测由来自受试者的肿瘤产生的蛋白酶的存在的方法,所述方法包括:(a)使(i)使从所述受试者获得的肿瘤与(ii)包括本文所描述的二聚抗原受体(DAR)的可活化的掩蔽抗原结合蛋白中的至少一种接触,其中所述肿瘤样品产生蛋白酶。

[0465] 在一个实施方式中,所述第一肽接头包括第一可切割位点并且所述第二肽接头包括第二可切割位点。在一个实施方式中,所述第一可切割位点和/或所述第二可切割位点的氨基酸序列可以是或可以不是由肿瘤样品产生的蛋白酶切割的底物。在一个实施方式中,步骤(a)中的接触在适于蛋白酶切割所述第一可切割位点和/或所述第二可切割位点的条件下进行,以在蛋白酶切割所述第一可切割位点和/或所述第二可切割位点时产生一种或多种切割产物。

[0466] 在一个实施方式中,所述方法进一步包括:(b)检测第一切割产物和/或第二切割产物。在一个实施方式中,所述方法进一步包括:(c)通过检测所述第一切割产物和/或所述第二切割产物并将所述切割产物中的任一种与所述第一可切割位点和/或所述第二可切割位点的氨基酸序列相关联来鉴定由来自所述受试者的所述肿瘤产生的蛋白酶的类型。

[0467] 在一个实施方式中,通过鉴定由受试者的肿瘤产生的蛋白酶的类型可以诊断受试者的癌症。在一个实施方式中,所述第一切割产物和/或所述第二切割产物可以通过凝胶电泳、蛋白质印迹分析、免疫学、免疫组织化学、比色法、分光光度法、质谱法、液相色谱法或其任何组合来检测。在一个实施方式中,肿瘤或癌症团块可获自前列腺癌、乳癌、卵巢癌、头颈

癌、膀胱癌、皮肤癌、结直肠癌、肛门癌、直肠癌、胰腺癌、肺癌(包括非小细胞肺癌和小细胞肺癌)、平滑肌瘤癌、脑癌、神经胶质瘤癌、胶质母细胞瘤癌、食道癌、肝癌、肾癌、胃癌、结肠癌、宫颈癌、子宫癌、子宫内膜癌、外阴癌、喉癌、阴道癌、骨癌、鼻腔癌、鼻旁窦癌、鼻咽癌、口腔癌、口咽癌、喉癌、下喉癌、唾液腺癌、输尿管癌、尿道癌、阴茎癌和睾丸癌。在一个实施方式中,受试者是人、非人灵长类动物、猿猴、猿、鼠(例如,小鼠和大鼠)、牛、猪、马、犬、猫、山羊、狼、蛙或鱼。在一个实施方式中,基于切割的体外方法可以用于检测、诊断、监测和/或分级受试者的癌症。

[0468] 本公开提供了一种试剂盒,所述试剂盒包括:包括二聚抗原受体(DAR)的可活化的掩蔽抗原结合蛋白中的至少一种,和/或编码可以被切割并组装成包括二聚抗原受体(DAR)的可活化的掩蔽抗原结合蛋白的前体多肽的至少一种核酸。在一个实施方式中,试剂盒包括以下中的至少一种:第二代或第三代DAR构建体;版本V1、V2a、V2b、V2c、V3或V4 DAR构建体;和/或包括可以与EGFR或CD38结合的二聚抗原受体(DAR)的可活化的掩蔽抗原结合蛋白。在一个实施方式中,试剂盒包括选自由以下组成的组的一种或多种辅助化合物:三羟甲基氨基甲烷、磷酸盐、碳酸盐、稳定剂、赋形剂、杀生物剂和牛血清白蛋白。在一个实施方式中,试剂盒包括选自由以下组成的组的一种或多种辅助化合物:三羟甲基氨基甲烷、磷酸盐、碳酸盐、稳定剂、赋形剂、杀生物剂和牛血清白蛋白。在一个实施方式中,试剂盒包括含有至少一种可活化的掩蔽抗原结合蛋白(或编码其蛋白的核酸)的一个容器并且任选地包括一种或多种辅助化合物,所述至少一种可活化的掩蔽抗原结合蛋白包括二聚抗原受体(DAR)。在一个实施方式中,试剂盒包括两个或更多个容器,其中一个容器含有至少一种可活化的掩蔽抗原结合蛋白(或编码其蛋白的核酸),所述至少一种可活化的掩蔽抗原结合蛋白包括二聚抗原受体(DAR),并且单独的容器含有一种或多种辅助化合物。

[0469] 可活化的掩蔽抗原结合蛋白:

[0470] IgG型抗体、双特异性抗体和二聚抗原受体(DAR)

[0471] 本公开提供了本文所描述的包括具有来自表1的氨基酸序列的成对的异二聚掩蔽部分的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白,包括IgG类抗体、双特异性抗体和二聚抗原受体(DAR)。在一个实施方式中,包括IgG类抗体或双特异性抗体的可活化的掩蔽抗原结合蛋白具有第一掩蔽部分和第二掩蔽部分和/或第三掩蔽部分和第四掩蔽部分,所述第一掩蔽部分和所述第二掩蔽部分和/或所述第三掩蔽部分和所述第四掩蔽部分具有下表1中列出的任何成对的掩蔽部分的氨基酸序列。在一个实施方式中,包括二聚抗原受体(DAR)的可活化的掩蔽抗原结合蛋白包括第一掩蔽部分和第二掩蔽部分,所述第一掩蔽部分和所述第二掩蔽部分具有表1中列出的任何成对的掩蔽部分的氨基酸序列。

[0472] 表1:成对的异二聚掩蔽部分:

[0473]

成对的掩蔽部分	掩蔽部分	掩蔽部分
Ig γ 1 CH1 恒定结构域和 Ig λ 对	Ig γ 1 CH1 结构域 SEQ ID NO: 21 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVEPKSS	Ig CL λ 恒定结构域 SEQ ID NO: 22 GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLV CLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVE TTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKS HRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTESS
Ig γ 1 CH1 恒定结构域和 Ig κ 对	Ig γ 1 CH1 结构域 SEQ ID NO: 21 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVEPKSS	Ig CL κ 恒定结构域 SEQ ID NO: 23 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGES
Ig γ 1 CH3 杵臼结构域对	Ig γ 1 CH3 结构域臼 SEQ ID NO: 24 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	Ig γ CH3 结构域杵 SEQ ID NO: 25 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
38C2 IgG1 VH 和 VL 结构域对	重链可变结构域 38C2 SEQ ID NO: 26 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSNYWMSWVRQSPK LEWVSEIRLRSDNYATHYAESV KGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RAEDTGIIYCKTYFYSFSYWGQ GTLVTVSS	重链可变结构域 38C2 SEQ ID NO: 27 ELQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQ SLLHTYGSPYLNWYLQKPGQSPKLLIY KVSNRFSQVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFAVYFCSQGTHLPYTFGGGTK VEIK
TCR $\alpha\beta$ 恒定结构域对	TCR α 恒定结构域 SEQ ID NO: 28 IQNPDPVAVYQLRDSKSSDKSVC LFTDFDSQTNVSQSKDSVYIT DKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSN KSDFACANAFNNSIIPEDTFFP SP	TCR β 恒定结构域 SEQ ID NO: 29 KVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVC LATGFFPDHVELSWVNGKEVHSGVST DPQPLKEQPALNDSRYsLSSRLRVSAT FWQNPRNHFRQVQFNGQIVSAEAWGR ADS

[0474] 本公开提供了本文所描述的包括具有来自表2的氨基酸序列的成对的同二聚掩蔽部分的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白,包括IgG类抗体、双特异性抗体和二聚抗原受体(DAR)。在一个实施方式中,包括IgG类抗体或双特异性抗体的可活化的掩蔽抗原结合蛋白具有第一掩蔽部分和第二掩蔽部分和/或第三掩蔽部分和第四掩蔽部分,所述第一掩蔽部分和所述第二掩蔽部分和/或所述第三掩蔽部分和所述第四掩蔽部分具有下表2中列出的任何成对的掩蔽部分的氨基酸序列。在一个实施方式中,包括二聚抗原受体(DAR)的可活化的掩蔽抗原结合蛋白包括第一掩蔽部分和第二掩蔽部分,所述第一掩蔽部分和所述第二掩蔽部分具有表2中列出的任何成对的掩蔽部分的氨基酸序列。

[0475] 表2:成对的同二聚掩蔽部分:

成对的掩蔽部分	掩蔽部分	掩蔽部分
[0476] IgG1 CH3:CH3 对	IgG1 CH3 恒定结构域 SEQ ID NO: 30 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHY TQKSLSLSPGK	IgG1 CH3 恒定结构域 SEQ ID NO: 30 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
	IgG4 CH3 恒定结构域 SEQ ID NO: 31 GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSQSVMEALHNHY TQKSLSLSPGK	IgG4 CH3 恒定结构域 SEQ ID NO: 31 GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0477] 本公开提供了本文所描述的包括至少第一肽接头和/或第二肽接头并且任选地进一步包括第三肽接头和/或第四肽接头的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白,包括IgG类抗体、双特异性抗体和二聚抗原受体(DAR),所述肽接头携带可切割位点。在一个实施方式中,所述可切割位点可被切割条件切割,所述切割条件包括蛋白酶、酯酶、还原条件或氧化条件。在一个实施方式中,所述可切割位点可被肿瘤微环境中存在的蛋白酶切割或者可被肿瘤微环境中存在的还原或氧化条件切割(Rakashanda等人,2012《生物技术和分子生物学评论(Biotechnology and Molecular Biology Review)》7(4):90-101)。在一个实施方式中,所述切割条件包括一种蛋白酶或两种或更多种蛋白酶的任意组合,所述蛋白酶包括丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶、苏氨酸蛋白酶、谷氨酸蛋白酶、金属蛋白酶、天冬酰胺肽切割酶、血清蛋白酶、基质金属蛋白酶(MMP)、MMP1、MMP2、MMP3、MMP7、MMP8、MMP9、MMP11、MMP13、MMP14、MT1-MMP(膜型基质金属蛋白酶1)、尿激酶纤溶酶原活化剂(uPA)、胰激酶、前列腺特异性抗原(PSA、hK3)、白介素-1 β 转换酶、凝血酶、FAP(FAP-a)、二肽基肽酶、安眠蛋白(meprin)、颗粒酶(例如,颗粒酶B)、二肽基肽酶IV(DPPIV/CD26)、解整合素和金属蛋白酶(例如,ADAM蛋白酶)、ADAM10、ADAM12、ADAM17、hepsin、组织蛋白酶(例如,半胱氨酸或天冬氨酸组织蛋白酶)、组织蛋白酶B、组织蛋白酶C、组织蛋白酶D、组织蛋白酶E、组织蛋白酶K、组织蛋白酶L、激肽释放酶、hK1、hK10、hK15、纤溶酶、胶原酶、IV型胶原酶、间质溶解素、溶酶体酶、因子Xa、胰凝乳蛋白酶样蛋白酶、胰蛋白酶样蛋白酶、弹性蛋白酶样蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶样蛋白酶、猕猴桃蛋白酶、菠萝蛋白酶、钙蛋白酶、胱天蛋白酶-1、胱天蛋白酶-2、胱天蛋白酶-3、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、单纯疱疹病毒蛋白酶、HIV蛋白酶、CMV蛋白酶、Mir1-CP、木瓜蛋白酶、HIV-1蛋白酶、HSV蛋白酶、CMV蛋白酶、凝乳酶、肾素、胃蛋白酶、蛋白切割酶(例如,蛋白切割酶2、人ST14或TMPRSS6)、豆荚蛋白、普拉斯梅普辛(plasmeprin)、耐普斯辛(nepenthesin)、金属外肽酶和/或金属内肽酶。

[0478] 在一个实施方式中,肽接头包括可切割位点,所述可切割位点具有与可被基质金属蛋白酶切割的肽至少95%、或至少96%、或至少97%、或至少98%、或至少99%相同的氨

氨基酸序列,例如GGSGSGSGGSSGGGSGGGGS、TSGSGGSGGSV、TSGSGGSPLGMGGSGSV、TSGSGGSPLGVGGSGSV、TSGSGGSPAALGGSGSV、TSGSGGSPAGLGGSGSV、TSGSGGSPLGMVGV、TSGSGGSPLGVVGV、TSGSGGSPAALVGV、TSGSGGSPAGLVGV、TSGSGGSPLGMVLV、TSGSGGSPLGVVLV、TSGSGGSPAALVLV或TSGSGGSPAGLVVLV的氨基酸序列。

[0479] 在一个实施方式中,所述可切割位点包括由MMP9识别和切割的氨基酸序列LEATA。在一个实施方式中,所述可切割位点包括由MMP9识别和切割的氨基酸序列PR(S/T)(L/I)(S/T)。在一个实施方式中,所述可切割位点包括氨基酸序列SGSGGSPLGMGGSGSVD、SGSGGSPAGLGGSCSVD或SGSGGSPAGLVGVD。在一个实施方式中,所述可切割位点包括由MMP11识别和切割的氨基酸序列GGAANLVRGG。

[0480] 本公开提供了本文所描述的包括至少第一肽接头和/或第二肽接头并且任选地进一步包括第三肽接头和/或第四肽接头的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白,包括IgG类抗体、双特异性抗体和二聚抗原受体(DAR),所述肽接头携带具有根据表3、4、5、6、7、8和/或9中列出的任何肽接头的氨基酸序列的可切割位点。

[0481] 表3:可被基质金属蛋白酶切割的肽接头的氨基酸序列

[0482]	氨基酸序列
	SRPLALR
	SRPANLR
	X1X2X3X4X5X6X7, 其中 X1 为 S、V 或 R, X2 为任何氨基酸, X3 为 P 或 A, X4 为 L、M、A、R 或 Y, X5 为 A、S、N、G、H 或 M, X6 为 L, X7 为 R、L、Q 或 M。

[0483] 表4:可被基质金属蛋白酶1(MMP1)切割的肽接头的氨基酸序列

[0484]	氨基酸序列
	DVAQFVL
	VLVPMAMMAS
	X1X2X3X4X5X6X7X8, 其中 X1 为任何氨基酸, X2 为 P 或 A, X3 和 X4 为任何氨基酸, X5 为 L 或 I, X6、X7、X8 为任何氨基酸。

[0485] 表5:可被基质金属蛋白酶2(MMP2)切割的肽接头的氨基酸序列

[0486]	氨基酸序列
	PLGLAG
	HRPRGX1TN
	X1X2X3X4X5X6X7X8, 其中 X1 为任何氨基酸, X2 为 P, X3 和 X4 为任何氨基酸, X5 为 L 或 I, X6、X7 和 X8 为任何氨基酸

[0487] 表6:可被基质金属蛋白酶9(MMP9)切割的肽接头的氨基酸序列

[0488]	氨基酸序列
	VPLVLYS (MMP9)
	VPLSLYS
	GGPLGVRGG (MMP2/9)
	GGPLGVRGGGGG (延长的)
	PLGVRGG (已缺失)
	HRPRGX1TN, 其中 X1 为 V 或 W
	X1X2X3X4X5X6X7X8, 其中 X1 为 G, X2 为 P 或 A, X3 为任何氨基酸, X4 为 G 或 A, X5 为 L, X6 为任何氨基酸, X7 为 G, X8 为任何氨基酸
	GPLGIAGQ
	PVGLIG
	HPVGLLAR

[0489] 表7:可被基质金属蛋白酶2或9切割的肽接头的氨基酸序列

[0490]	氨基酸序列
	GGPLGVRGG (MMP2/9)
	GGPLGVRGGGGG (延长的)
	PLGVRGGG (已缺失)

[0491] 表8:可被尿型纤溶酶原活化剂 (uPA) 切割的肽接头的氨基酸序列

[0492]	氨基酸序列
	GGGRRGGG (uPA1)
	SGRSAN (uPA2)
	X1SGRSA, 其中 X1 为 G 或 K
	LSGRSX1NH, 其中 X1 为 D、V 或 A
	X1X2X3X4X5X6X7X8, 其中 X1 为任何氨基酸, X2 为 S, X3 为 G 或 S, X4 为 R 或 K, X5 为任何氨基酸, X6 为 R 或 V, X7 为任何氨基酸, X8 为任何氨基酸
	SGRSA
	X9X10X11X12X13X14X15X16, 其中 X9 为 L、I、A 或 K, X10 为 S、G 或 Q, X11 为 K、L、A、G 或 S, X12 为 R, X13 为 S、K、G、A 或 V, X14 为 A、V 或 L, X15 为 N, X16 为 H、G、V 或 L
	RKSSIIIRMRDWL

[0493] 表9:可被蛋白裂解酶 (matriptase) 切割的肽接头的氨基酸序列

[0494]	氨基酸序列
	AGPR
	RQARVV
	LSGX1, 其中 X1 为 R 或 K
	X1SGRSA, 其中 X1 为 G 或 K
	LSGRSX1NH, 其中 X1 为 D、V 或 A
	X1X2X3X4X5X6X7X8, 其中 X1 为 R, X2 和 X3 为任何氨基酸, X4 为 R, X5 为 K, X6 为 V, X7 为任何氨基酸, X8 为 G
	X9X10X11X12X13, 其中 X9 为 K 或 R, X10 为 R、K、H 或 Q, X11 为 G、A 或 S, X12 为 R 或 K, X13 为 A
	X14X15X16X17X18X19X20X21, 其中 X14 为 L、I、A 或 K, X15 为 S、G 或 Q, X16 为 K、L、A、G 或 S, X17 为 R, X18 为 S、K、G、A 或 V, X19 为 A、V 或 L, X20 为 N, X21 为 H、G、V 或 L
	X22X23X24X25X26, 其中 X22 为 R 或 K, X23 为非碱性氨基酸 (G、A、S、T、C、V、L、I、M、P、F、Y、W、D、E、N 或 Q), X24 为 S, X25 为 R, X26 为 A

[0495] 本公开提供了本文所描述的包括二聚抗原受体 (DAR) 的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其中铰链区包括两个或更多个区中的任一个或任何组合,所述两个或更多个区包括来自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4免疫球蛋白分子的上部铰链序列、核心铰链序列或下部铰链序列。在一个实施方式中,铰链区包括IgG1上部铰链序列EPKSCDKTHT。在一个实施方式中,铰链区包括IgG1核心铰链序列CPXC,其中X为P、R或S。在一个实施方式中,铰链区包括下部铰链/CH2序列PAPELLGPP。在一个实施方式中,铰链与具有氨基酸序列SVFLFPPKPKDT的Fc区 (CH2) 接合。在一个实施方式中,铰链区包括上部铰链、核心铰链或下部铰链的氨基酸序列并且包括EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGPP。在一个实施方式中,铰链区包括可以形成至少一个、两个、三个或更多个链间二硫键的一个、两个、三个或更多个半胱氨酸。

[0496] 本公开提供了本文所描述的包括IgG类抗体、双特异性抗体和二聚抗原受体(DAR)的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白,其中第一肽接头、第二肽接头、第三肽接头和/或第四肽接头允许成对的掩蔽部分的二聚化(例如,第一掩蔽部分和第二掩蔽部分的二聚化,和/或第三掩蔽部分和第四掩蔽部分的二聚化)。在一个实施方式中,任何肽接头的长度为任选地可以包括至少一个氨基酸类似物的1-50个氨基酸。在一个实施方式中,所述接头中的至少一个是柔性接头并且主要包括两种或更多种氨基酸甘氨酸、丝氨酸、丙氨酸和/或苏氨酸的任何组合。在一个实施方式中,所述肽接头中的至少一个包括甘氨酸-丙氨酸或丙氨酸-丝氨酸或其它柔性接头序列的至少一种且至多四种聚合物。在一个实施方式中,肽接头中的至少一个包括选自以下组成的组的氨基酸序列:(SG)_n、(SGG)_n、(SGGG)_n、(SSG)_n、(GS)_n、(GGG)_n、(GSGGS)_n、(GSG)_n、(GGGGS)_n、(GGGS)_n、(GGGGSGS)_n、(GGS₄GGSGG)_n、(GGGGSGGS)_n和(GGS)_n,其中n为1-6的整数。在一个实施例中,肽接头中的至少一个包括选自以下组成的组的氨基酸序列:AKTTPKLEEGERFSEAR、AKTTPKLEEGERFSEARV、AKTTPKLGG、SAKTTPKLGG、AKTTPKLEEGERFSEARV、SAKTTP、SAKTTPKLGG、RADAAP、RADAAPTVS、RADAAAAGGPGS、RADAAAA(G₄S)₄、SAKTTP、SAKTTPKLGG、SAKTTPKLEEGERFSEARV、ADAAP、ADAAPTVSIFPP、TVAAP、TVAAPSVFIFPP、QPKAAP、QPKAAPSVTLFPP、AKTTPP、AKTTPPSVTPLAP、AKTTAP、AKTTAPSVYPLAP、ASTKGP、ASTKGPSVFPLAP、GENKVEYAPALMALS、GPAKELTPLKEAKVS和GHEAAVMQVQYPAS。

[0497] 本公开提供了本文所描述的与来自人的表位或抗原结合的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白,包括IgG类抗体、双特异性抗体和二聚抗原受体(DAR)。在一个实施方式中,所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白与来自人的表位或抗原结合并且可以与来自如狗、猫、小鼠、大鼠、山羊、兔、仓鼠和/或猴(例如食蟹猴、恒河猴或猕猴)等非人动物中的任一种或任何组合的表位或抗原(例如,同源抗原)结合(例如,交叉反应)。在一个实施方式中,所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白与包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列的EGFR抗原结合。

[0498] EGFR靶抗原-细胞外结构域:SEQ ID NO:1

[0499] LEEKKVCQGTSNKLTLGTFEDHFLSLQRMFNCEVVLGNLEITYVQRNYDLSFLKTIQEVAGYVLIALNTVERIPLNQLIIRGNMYYENSALAVLSNYDANKTGLKELPMRNLQEILHGAVRFSNPNALCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSMDFQNHLSGSCQKCDPSCPNGSCWGAGEENCQKLTKIICAQQCSGRCRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRESDECLVCRKFRDEATCKDTCPLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFNCTISGDLHLPLVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRKQHQGFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPPREFVENSEC IQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNGPKIPS

[0500] 本公开提供了本文所描述的与EGFR抗原结合的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白,包括IgG类抗体、双特异性抗体和二聚抗原受体(DAR),其中在任何重/轻链组合中,所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白包括具有SEQ ID NO:2或4的氨基酸序列的抗体重链,并且包括具有SEQ ID NO:3或5的氨基酸序列的抗体轻链。在一个实施方式中,SEQ ID NO:2和4的重链可变区加下划线。在一个实施方式中,SEQ ID NO:3和5的轻链可变区加下划线。

[0501] 人抗EGFR抗体重链;对照抗EGFR抗体和可活化的掩蔽抗体:SEQ ID NO:2

QVQLKQSGPGLVQPSSQLSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYN
PFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0502] 人抗EGFR抗体轻链;对照抗EGFR抗体和可活化的掩蔽抗体:SEQ ID NO:3

[0503] DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGGT
DFTLSINSVESEDIADYYCQQNNWPTTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN
FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0504] 人抗EGFR抗体重链;西妥昔单抗 (Cetuximab) SEQ ID NO:4

QVQLKQSGPGLVQPSSQLSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYN
PFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0505] 人抗EGFR抗体轻链;西妥昔单抗SEQ ID NO:5

[0506] DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGGT
DFTLSINSVESEDIADYYCQQNNWPTTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN
FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0507] 本公开提供了本文所描述的与来自人的表位或抗原结合的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白,包括IgG类抗体、双特异性抗体和二聚抗原受体(DAR)。在一个实施方式中,所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白与来自人的表位或抗原结合并且可以与来自如狗、猫、小鼠、大鼠、山羊、兔、仓鼠和/或猴(例如食蟹猴、恒河猴或猕猴)等非人动物中的任一种或任何组合的表位或抗原(例如,同源抗原)结合(例如,交叉反应)。在一个实施方式中,所述可活化的掩蔽抗原结合蛋白与包括SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CD38抗原结合。

[0508] CD38靶抗原-细胞外结构域:SEQ ID NO:6

[0509] VPRWRQQWSGPGTTKRFPETVLARC VKYTEIHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPCNITEEDYQPLMK
LGTQTVPCKILLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDTLGLYADDLTWCGEF

[0510] NTSKINYQSCPDWRKDCSNPVSFVWKTVSRRFAEAACDVHVMLNGSRSKIFDKNSTFGSVEV

[0511] HNLQPEKVQTLAEAWIHGGREDSRDLCQDPTIKELESIISKRNIFQFSCKNIYRPDKFLQCVKPN

[0512] EDSSCTSEI

[0513] 本公开提供了本文所描述的与CD38抗原结合的任何可活化的掩蔽抗原结合蛋白,包括IgG类抗体、双特异性抗体和二聚抗原受体(DAR),其中在任何重/轻链组合中,所述可

活化的掩蔽抗原结合蛋白包括具有SEQ ID NO:7、9、11、13、14、15、16、17、18或20的氨基酸序列的抗体重链,并且包括具有SEQ ID NO:8、10、12或19的氨基酸序列的抗体轻链(参见下表10)。在一个实施方式中,SEQ ID NO:7的重链可变区加下划线。在一个实施方式中,SEQ ID NO:8的轻链可变区加下划线。

[0514] 抗CD38重链:SEQ ID NO:7

[0515] QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDDYMSWIRQAPGKGLEWVASVSNRPTTYADSVRGRFT
ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREDWGGEFTDWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL
 VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDK
 THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
 IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0516] 抗CD38轻链:SEQ ID NO:8

[0517] QAGLTQPPSASGTSGQRVTISCSGSSSNIGINFVYWYQHLPGTAPKLLIYKNNQRPSGVPDRFSGSKSG
NSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGYVFGSGTKVTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPG
 AVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSQRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0518] 表10:

	抗 CD38 重链可变区:	抗 CD38 轻链可变区:
[0519]	A2 亲本重链 SEQ ID NO: 9 QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTF SDDYMSWIRQAPGKGLEWVASVSNRPTT	A2 亲本轻链 SEQ ID NO: 10 QAGLTQPPSASGTSGQRVTISCSGSSNI GINFVYWYQHLPGTAPKLLIYKNNQRPSG

[0520]

抗 CD38 重链可变区:	抗 CD38 轻链可变区:
YYADSVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAREDWGGEFTDWGRGTLVTV SS	VPDRFSGSKSGNSASLAISGLRSEDEADY YCAAWDDSLSGYVFGSGTKVTVL
3H10ml SEQ ID NO: 11 QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDDY MSWIRQAPGKGLEWVASVSNRPTTYADSVRG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARE GWSGEFTDWGQGTTLTVTVSS	3H10ml SEQ ID NO: 12 QAGLTQPPSASGTSGQRVTISCSGSSSNI GFHFVYWYQHLPGTAPKLLIYKNNQRPSG VPDRFSGSKSGNSASLAISGLRSEDEADY YCAAWDDSLSGYVFGSGTKVTVL
3G8ml SEQ ID NO: 13 QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDDY MSWIRQAPGKGLEWVASVSNRPTTYADSVRG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARE AWGGEFTNWGQGTTLTVTVSS	3G8ml SEQ ID NO: 12 QAGLTQPPSASGTSGQRVTISCSGSSSNI GFHFVYWYQHLPGTAPKLLIYKNNQRPSG VPDRFSGSKSGNSASLAISGLRSEDEADY YCAAWDDSLSGYVFGSGTKVTVL
3E3ml SEQ ID NO: 14 QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDDY MSWIRQAPGKGLEWVASVSNRPTTYADSVRG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARE AWGGEFTDWGQGTTLTVTVSS	3D3ml SEQ ID NO: 12 QAGLTQPPSASGTSGQRVTISCSGSSSNI GFHFVYWYQHLPGTAPKLLIYKNNQRPSG VPDRFSGSKSGNSASLAISGLRSEDEADY YCAAWDDSLSGYVFGSGTKVTVL
3G3 SEQ ID NO: 15 QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDDY MSWIRQAPGKGLEWVASVSNRPTTYADSVRG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARE AWSGEFTDWGQGTTLTVTVSS	3G3 SEQ ID NO: 10 QAGLTQPPSASGTSGQRVTISCSGSSSNI GINFVYWYQHLPGTAPKLLIYKNNQRPSG VPDRFSGSKSGNSASLAISGLRSEDEADY YCAAWDDSLSGYVFGSGTKVTVL
3E11 SEQ ID NO: 16 QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDDY MSWIRQAPGKGLEWVASVSNRPTTYADSVRG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARE GWGGEFTDWGQGTTLTVTVSS	3E11 SEQ ID NO: 10 QAGLTQPPSASGTSGQRVTISCSGSSSNI GINFVYWYQHLPGTAPKLLIYKNNQRPSG VPDRFSGSKSGNSASLAISGLRSEDEADY YCAAWDDSLSGYVFGSGTKVTVL
3H10 SEQ ID NO: 17 QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDDY MSWIRQAPGKGLEWVASVSNRPTTYADSVRG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARE GWSGEFTDWGQGTTLTVTVSS	3H10 SEQ ID NO: 10 QAGLTQPPSASGTSGQRVTISCSGSSSNI GINFVYWYQHLPGTAPKLLIYKNNQRPSG VPDRFSGSKSGNSASLAISGLRSEDEADY YCAAWDDSLSGYVFGSGTKVTVL
3H10N SEQ ID NO: 18 QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDDY MSWIRQAPGKGLEWVASVSNRPTTYADSVRG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARE DWGGEFTDWGQGTTLTVTVSS	3H10N SEQ ID NO: 19 QSVLTQPPSASGTSGQRVTISCSGSSSNI GFHFVYWYQHLPGTAPKLLIYKNNQRPSG VPDRFSGSKSGNSASLAISGLRSEDEADY YCAAWDDSLSGYVFGSGTKVTVL
3H10NS SEQ ID NO: 20 QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDDY MSWIRQAPGKGLEWVASVSSGRPTTYADSVRG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARE DWGGEFTDWGQGTTLTVTVSS	3H10NS SEQ ID NO: 19 QSVLTQPPSASGTSGQRVTISCSGSSSNI GFHFVYWYQHLPGTAPKLLIYKNNQRPSG VPDRFSGSKSGNSASLAISGLRSEDEADY YCAAWDDSLSGYVFGSGTKVTVL
3E10 SEQ ID NO: 9 QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTF SDDYMSWIRQAPGKGLEWVASVSNRPTTYAD SVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAREDWGGEFTDWGRGTLVTV SS	3E10 SEQ ID NO: 12 QAGLTQPPSASGTSGQRVTISCSGSSSNI GFHFVYWYQHLPGTAPKLLIYKNNQRPSG VPDRFSGSKSGNSASLAISGLRSEDEADY YCAAWDDSLSGYVFGSGTKVTVL

[0521]

抗 CD38 重链可变区:	抗 CD38 轻链可变区:
3H10mlg SEQ ID NO: 11 QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDDY MSWIRQAPGKGLEWVASVSNRPTTYADSVRG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARE GWSGEFTDWGQGTTLTVTVSS	3H10mlg SEQ ID NO: 19 QSVLTQPPSASGTSGQRVTISCSGSSSNI GFHFVYWYQHLPGTAPKLLIYKNNQRPSG VPDRFSGSKSGNSASLAISGLRSEDEADY YCAAWDDSLSGYVFGSGTKVTVL

[0522] 实施例

[0523] 以下实施例旨在说明并且可用于进一步理解本公开的实施方式,并且不应被解释为以任何方式限制本教示的范围。

[0524] 实施例1:可活化的掩蔽抗体的名称

[0525] 制备了与EGFR或CD38抗原结合的包括第一重链可变区和第一轻链可变区的各种可活化的掩蔽IgG型抗体,其中(i)所述第一重链可变区的N末端通过具有第一可切割位点的第一肽接头与第一掩蔽部分接合,并且(ii)所述第一轻链可变区的N末端通过具有第二可切割位点的第二肽接头与第二掩蔽部分接合,并且(iii)所述第一掩蔽部分和所述第二掩蔽部分彼此缔合以形成第一二聚化掩蔽复合物,并且(iv)所述第一可切割位点可被第一蛋白酶切割,并且(v)所述第二可切割位点可被第二蛋白酶切割,其中所述第一可切割位点和所述第二可切割位点可被相同或不同的蛋白酶切割。

[0526] 所述各种可活化的掩蔽IgG型抗体还包括第二重链可变区和第二轻链可变区,其中(i)所述第二重链可变区的N末端通过具有第三可切割位点的第三肽接头与第三掩蔽部分接合,并且(ii)所述第二轻链可变区的N末端通过具有第四可切割位点的第四肽接头与第四掩蔽部分接合,并且(iii)所述第三掩蔽部分和所述第四掩蔽部分彼此缔合以形成第二二聚化掩蔽复合物,并且(iv)所述第三可切割位点可被第三蛋白酶切割,并且(v)所述第四可切割位点可被第四蛋白酶切割,其中所述第三可切割位点和所述第四可切割位点可被相同或不同的蛋白酶切割。

[0527] 各种可活化的掩蔽部分的命名约定(名称)在下表11中列出。

[0528] 表11:

[0529]

名称:	掩蔽部分	掩蔽部分中的白或杵	肽接头
HC-CH3 白 MMP2/9, LC-CH3 杵 MMP2/9	重链: 人 Igγ1 CH3	白	MMP2/9

[0530]

名称:	掩蔽部分	掩蔽部分中的白或杵	肽接头
	轻链: 人 Igγ1 CH3	杵	MMP2/9
HC-CH3 白 uPA1, LC-CH3 杵 MMP2/9	重链: 人 Igγ1 CH3	白	uPA1
	轻链: 人 Igγ1 CH3	杵	MMP2/9
HC-CH3 白 uPA1, LC-CH3 杵 uPA1	重链: 人 Igγ1 CH3	白	uPA1
	轻链: 人 Igγ1 CH3	杵	uPA1
HC-CH1 MMP2/9, LC-CLκ MMP2/9	重链: 人 Igγ1 CH1	无	MMP2/9
	轻链: 人 IgκCL	无	MMP2/9
HC-CH1 MMP2/9, LC-CLλ MMP2/9	重链: 人 Igγ1 CH1	无	MMP2/9
	轻链: 人 IgλCL	无	MMP2/9
HC-G4CH3 MMP2/9, LC-G4CH3 MMP2/9	重链: 人 Igγ4 CH3	无	MMP2/9
	轻链: 人 Igγ4 CH3	无	MMP2/9
HC-CH3 白 MMP2/9, LC-CH3 杵已缺失	重链: 人 Igγ1 CH3	白	MMP2/9
	轻链: 人 Igγ1 CH3	杵	已缺失
HC-CH3 白 MMP2/9, LC-CH3 杵不可切割	重链: 人 Igγ1 CH3	白	MMP2/9
	轻链: 人 Igγ1 CH3	杵	不可切割
HC-CH3 白 MMP2/9, LC-CH3 杵延长的	重链: 人 Igγ1 CH3	白	MMP2/9
	轻链: 人 Igγ1 CH3	杵	延长的 MMP2/9
HC-CH3 白已缺失, LC-CH3 杵已缺失	重链: 人 Igγ1 CH3	白	已缺失
	轻链:	杵	已缺失

名称:	掩蔽部分	掩蔽部分中的白或杵	肽接头
	人 Igγ1 CH3		
[0531] HC-TCRα MMP2/9 LC-TCRβ MMP2/9	重链: TCRα	无	MMP2/9
	轻链: TCRβ	无	MMP2/9
HC-CH3 白 MMP9 LC-CH3 杵 G4S	重链: CH3	白	MMP2/9
	轻链: CH3	杵	G4S

[0532] 各种可活化的掩蔽抗体中的肽接头的命名约定以及所述肽接头的氨基酸序列在下表12中列出。肽接头序列在下表12中加下划线。不加下划线的序列表示相邻掩蔽部分CH3的C端氨基酸序列(例如,参见SEQ ID NO:24和25)。

[0533] 表12:

肽接头	氨基酸序列:	SEQ ID NO:
MMP2/9	LSLSPGKGGPLGVRGG	32
已缺失(减去GKGG)	LSLSP----PLGVRGG	33
不可切割	LSLSPGKGGSGGSGG	34
延长的(3个额外的G)	LSLSPGKGGPLGVRGGGGG	35
MMP9	VPLVLYS	36
G4S	GGGGS	37
uPA1(丝氨酸蛋白酶)	LSLSPGKGGGRRGGGG	38
uPA2	SGRSAN	39
串联	GGPLGVRGGPLGVRGG	40

[0535] 对于“已缺失”肽接头序列,人Ig-γ CH3的C端氨基酸GK和MMP2/9肽接头的N端氨基酸GG已缺失(参见上表12)。

[0536] 实施例2:各种IgG型可活化的掩蔽抗体的表达、纯化和产量。

[0537] 将CHO-S细胞(或CHO-K1细胞)在CO₂温育箱中温育到细胞密度为1-2×10⁶个细胞/ml,其中活力不低于90%。使用商业质粒DNA提取试剂盒(例如,凯杰公司(Qiagen)Maxi质粒DNA提取试剂盒)制备重链和轻链对的单独表达载体。使用的表达载体类似于pEGFP(例如,来自克罗泰克公司(CloneTech))。也可以使用表达载体pCDNA(来自英杰公司(Invitrogen))。小鼠Igγ前导肽序列(MEWSWVFLFSLVTTGVHS)用作重链和轻链表达的分泌肽序列。通过以1:2-3(重量/体积浓度)的比率将DNA和PEI(聚乙烯亚胺,来自Polyscience目录编号:24765)混合来形成用于转染的DNA PEI复合物。CHO细胞与DNA的比率为大约10⁶个细胞每微克DNA。在OptiPRO培养基(赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher))中形成DNA和PEI复合物并将其添加到摇瓶中的CHO细胞培养物中,并在37℃下旋转温育过夜。在第2天,通过用含有青霉素/链霉素的CHO培养基加倍培养基来扩增培养物并将其放置在30℃温育箱中,根据CHO细胞的IgG滴度和活力旋转1-2周。通过使用商业蛋白A树脂批量捕获分子来纯化可活化的掩蔽抗EGFR抗体。

[0538] 对于各种可活化的掩蔽抗体和不具有掩蔽部分的对照抗EGFR抗体,确定了各种抗EGFR可活化的掩蔽IgG型抗体的25mL CHO转染的蛋白A滴度和IgG产量的表达水平,所述表达水平在表13中列出:

[0539] 表13:

[0540]	抗 EGFR 可活化的掩蔽抗体:	蛋白 A 滴度 ($\mu\text{g/mL}$)	IgG 产量 (μg)
	HC-CH3 白 MMP2/9, LC-CH3 杵 MMP2/9	3.1	150
	HC-CH3 白 uPA1, LC-CH3 杵 MMP2/9	3.07	100
	HC-CH3 白 uPA1, LC-CH3 杵 uPA1	2.19	70
	HC-CH1 MMP2/9, LC-CL κ MMP2/9	10.4	240
	HC-CH1 MMP2/9, LC-CL λ MMP2/9	8.39	200
	HC-G4CH3 MMP2/9, LC-G4CH3 MMP2/9	0.69	10
	不具有掩蔽部分的对照抗 EGFR 抗体	16.06	350

[0541] 实施例3:切割各种IgG型可活化的掩蔽抗体的MMP2/9或uPA1肽接头,以及凝胶分析。

[0542] 用MMP2、MMP9或uPA蛋白酶将具有可被MMP2、MMP9或uPA切割的肽接头的各种可活化的掩蔽抗体(抗EGFR)消化,持续不同的反应时间范围(1小时、3小时、6.5小时或23小时)并通过凝胶电泳在4%-20%梯度的三羟甲基氨基甲烷-甘氨酸SDS-PAGE凝胶上在非还原或还原条件下分析所得消化产物(还原剂是来自英杰公司的NUPAGE 10X样品还原剂)。

[0543] 将每10 μg 或20 μg 未切割的可活化的掩蔽抗体含有0.1 μg 蛋白酶MMP2(来自RnD Systems公司(RnD Systems),目录编号:902-MP-010的重组人MMP2)或MMP9(来自Origen CAT编号:TP302872或RnD Systems公司CAT编号:911-MP-010的重组人MMP9)的消化反应在室温或37 $^{\circ}\text{C}$ 下在DPBS缓冲液中温育1小时、3小时、6.5小时或23小时。未切割的可活化的掩蔽抗体的最终浓度为0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 或0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,含有0.4 μg MMP9蛋白酶或0.75 μg uPA蛋白酶。未进行APMA活化。

[0544] 图5A中示出了用MMP2消化的抗EGFR可活化的掩蔽抗体。图5A的负载样品按照从左到右的顺序在下表14中列出。图5A-B中示出的标记“M”是SPECTRA多色宽范围蛋白质分子量标准(SPECTRA Multicolor Broad Range Protein Ladder)(来自赛默飞世尔科技公司,目录编号:26623)。

[0545] 图5A:用MMP2消化抗EGFR可活化的掩蔽抗体产生了预测的切割产物,包括切割的重链、切割的轻链和切割的掩蔽物。当比较在1小时、3小时、6.5小时和23小时消化条件下产生的切割产物时,对于所有测试的掩蔽抗体,完整(未切割)轻链的水平降低并且切割的轻链和切割的掩蔽物(切割)的水平增加。

[0546] 表14:参见图5A

[0547]	泳道:	抗体:	时间(小时):
	1	HC-CH3白MMP2/9,LC-CH3杵MMP2/9	1
	2	HC-CH3白MMP2/9,LC-CH3杵MMP2/9	3
	3	HC-CH3白MMP2/9,LC-CH3杵MMP2/9	6.5
	4	HC-CH3白MMP2/9,LC-CH3杵MMP2/9	23
	5	HC-CH3白uPA1,LC-CH3杵uPA1	1

6	HC-CH3 臼 uPA1, LC-CH3 杵 uPA1	3
7	HC-CH3 臼 uPA1, LC-CH3 杵 uPA1	6.5
8	HC-CH3 臼 uPA1, LC-CH3 杵 uPA1	23
9	HC-CH1 MMP2/9, LC-CLκ MMP2/9	1
10	HC-CH1 MMP2/9, LC-CLκ MMP2/9	3
11	HC-CH1 MMP2/9, LC-CLκ MMP2/9	6.5
12	HC-CH1 MMP2/9, LC-CLκ MMP2/9	23
13	HC-CH1 MMP2/9, LC-CLλ MMP2/9	1
14	HC-CH1 MMP2/9, LC-CLλ MMP2/9	3
15	HC-CH1 MMP2/9, LC-CLλ MMP2/9	6.5
16	HC-CH1 MMP2/9, LC-CLλ MMP2/9	23
17	αEGFR 抗体	0

[0548] 图5B中示出了用MMP9消化的抗EGFR可活化的掩蔽抗体。图5B的上样的样品按照从左到右的顺序在下表15中列出。

[0549] 图5B: 用MMP9消化抗EGFR可活化的掩蔽抗体产生预测的切割产物, 包括切割的重链、切割的轻链和切割的掩蔽物(图6B)。当比较在1小时、3小时、6.5小时和23小时消化条件下产生的切割产物时, 对于所有测试的掩蔽抗体, 完整(未切割)轻链的水平降低并且切割的轻链和切割的掩蔽物(切割)的水平增加。

[0550] 表15: 参见图5B

泳道:	抗体:	时间 (小时):
1	HC-CH3 臼 MMP2/9, LC-CH3 杵 MMP2/9	1
2	HC-CH3 臼 MMP2/9, LC-CH3 杵 MMP2/9	3
3	HC-CH3 臼 MMP2/9, LC-CH3 杵 MMP2/9	6.5
4	HC-CH3 臼 MMP2/9, LC-CH3 杵 MMP2/9	23
5	HC-CH3 臼 uPA1, LC-CH3 杵 uPA1	1
6	HC-CH3 臼 uPA1, LC-CH3 杵 uPA1	3
7	HC-CH3 臼 uPA1, LC-CH3 杵 uPA1	6.5
8	HC-CH3 臼 uPA1, LC-CH3 杵 uPA1	23
9	αEGFR 抗体	0
10	HC-CH1 MMP2/9, LC-CLκ MMP2/9	1
11	HC-CH1 MMP2/9, LC-CLκ MMP2/9	3
12	HC-CH1 MMP2/9, LC-CLκ MMP2/9	6.5
13	HC-CH1 MMP2/9, LC-CLκ MMP2/9	23
14	HC-CH1 MMP2/9, LC-CLλ MMP2/9	1
15	HC-CH1 MMP2/9, LC-CLλ MMP2/9	3
16	HC-CH1 MMP2/9, LC-CLλ MMP2/9	6.5
17	HC-CH1 MMP2/9, LC-CLλ MMP2/9	23

[0552] 图5A和B中所示的各种抗EGFR IgG型可活化的掩蔽抗体的重链和轻链的氨基酸序列在以下列出。

[0553] HC-CH3 臼 MMP2/9, LC-CH3 杵 MMP2/9:

[0554] 掩蔽部分是与MMP2/9肽接头(下划线斜体字体)接合的包括臼结构的人Ig-γ CH3(粗体字体), 所述肽接头与抗EGFR IgG抗体重链接合:

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD
GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKGGPLGVRGGQVQLKQSGP
[0555] GLVQPSQSL SITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKDN
SKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST
SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
[0556] LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0557] HC-CH3臼MMP2/9,LC-CH3杵MMP2/9:

[0558] 掩蔽部分是与MMP2/9肽接头(下划线斜体字体)接合的包括杵结构的人Ig-γCH3(粗体字体),所述肽接头与抗EGFR IgG抗体轻链接合:

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKGGPLGVRGGDILLTQSPV
[0559] ILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTL
SINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN
NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL
SSPVTKSFNRGEC

[0560] 在MMP2或MMP9切割之后的[HC-CH3臼MMP2/9,LC-CH3杵MMP2/9]的重链切割产物的预测的氨基酸序列(通过质谱法确认的切割产物,如下文实施例6中所描述的):

VRGGQVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNT
DYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSSAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SVVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
[0561] KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQK
SLSLSPGK

[0562] 在MMP2或MMP9切割之后的[HC-CH3臼MMP2/9,LC-CH3杵MMP2/9]的轻链切割产物的预测的氨基酸序列(通过质谱法确认的切割产物,如下文实施例6中所描述的):

[0563] VRGGDILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGS
GSGTDFTLINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0564] HC-CH3臼uPA1,LC-CH3杵uPA1:

[0565] 掩蔽部分是与uPA1肽接头(下划线斜体字体)接合的包括臼结构的人Ig-γCH3(粗体字体),所述肽接头与抗EGFR IgG抗体重链接合:

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD
GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGRGGGGQVQLKQSG
PGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPTTSRLSINKD
NSKSQVFFKMNSLQSNNDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS
[0566] TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTY
ICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0567] HC-CH3 臼uPA1, LC-CH3 杵uPA1:

[0568] 掩蔽部分是与uPA1肽接头(下划线斜体字体)接合的包括杵结构的人Ig-γCH3(粗体字体),所述肽接头与抗EGFR IgG抗体轻链接合:

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGRGGGGDILLTQSP
VILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFT
[0569] LSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRVAAPS FIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC

[0570] HC-CH1 MMP2/9, LC-CLκMMP2/9:

[0571] 掩蔽部分是与MMP2/9肽接头(下划线斜体字体)接合的人Ig-γCH1(粗体字体),所述肽接头与抗EGFR抗体IgG抗体重链接合:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSSGGPLGVRGGQVQLKQSGPGLVQ
PSQSL SITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPTTSRLSINKDNSKSQ
[0572] VFFKMNSLQSNNDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
[0573] PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0574] HC-CH1 MMP2/9, LC-CLκMMP2/9:

[0575] 掩蔽部分是与MMP2/9肽接头(下划线斜体字体)接合的人Ig-γCLκ(粗体字体),所述肽接头与抗EGFR抗体IgG抗体轻链接合:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGESGGPLGVRGGDILLTQSPV
[0576] ILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTL
SINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN
NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL
SSPVTKSFNRGEC

[0577] 在MMP2或MMP9切割之后的[HC-CH1 MMP2/9,LC-CLκMMP2/9]的重链切割产物的预测的氨基酸序列:

VRGGQVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNT
DYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNNDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSSAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
[0578] SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQK
SLSLSPGK

[0579] 在MMP2或MMP9切割之后的[HC-CH1 MMP2/9,LC-CLκMMP2/9]的轻链切割产物的预测的氨基酸序列:

[0580] VRGGDILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGS
GSGTDFTLINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0581] HC-CH1 MMP2/9,LC-CLλMMP2/9:

[0582] 掩蔽部分是与MMP2/9肽接头(下划线斜体字体)接合的人Ig-γCH1(粗体字体),所述肽接头与抗EGFR抗体IgG抗体重链接合:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSSGGPLGVRGGQVQLKQSGPGLVQ
PSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQ
VFFKMNSLQSNNDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT
[0583] AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0584] HC-CH1 MMP2/9,LC-CLλMMP2/9:

[0585] 掩蔽部分是与MMP2/9肽接头(下划线斜体字体)接合的人Ig-γCLλ(粗体字体),所述肽接头与抗EGFR抗体IgG抗体轻链接合:

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQ
SNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTESSGGPLGVRGGDILLTQSPVI
LSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLS
[0586] INSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNN
FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
SPVTKSFNRGEC

[0587] 在MMP2或MMP9切割之后的[HC-CH1 MMP2/9,LC-CLAMMP2/9]的重链切割产物的预测的氨基酸序列:

VRGGQVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNT
DYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSN^NDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSSAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
[0588] SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN^NSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQK
SLSLSPGK

[0589] 在MMP2或MMP9切割之后的[HC-CH1 MMP2/9,LC-CLAMMP2/9]的轻链切割产物的预测的氨基酸序列:

[0590] VRGGDILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGS
GSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0591] HC-TCR α MMP2/9,LC-TCR β MMP2/9:

[0592] 掩蔽部分是与MMP2/9肽接头(下划线斜体字体)接合的TCR α (粗体字体),所述肽接头与抗CD38 IgG抗体重链接合:

IQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQKSDSVYITDKTVLDMRSMDFKSNSA
VAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPGGPLGVRGGPLGVRGGQVQLVESGGGLVKPGGSLR
LSCAASGFTFSDDYMSWIRQAPGKGLEWVASVSNRPTTYADSVRGRFTISRDNAKNSLYLQM
NSLRAEDTAVYYCAREDWGGEFTDWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
[0593] KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0594] 掩蔽部分是与MMP2/9肽接头(下划线斜体字体)接合的TCR β (粗体字体),所述肽接头与抗CD38 IgG抗体轻链接合:

KVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWVNGKEVHSGVSTDPQPLKE
QPALNDSRYSLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFNGQIVSAEAWGRADSGGPLGVRGGPLGVR
[0595] GGQAGLTQPPSASGTSGQRVTISCSGSSSNIGINFVYQHLPGTAPKLLIYKNNQRPSGVPDR
FSGSKSGNSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDLSGYVFGSGTKVTVLGQPKAAPSVTLFPPSS
EELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWK
SHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0596] 实施例4:切割经修饰的序列肽接头以及凝胶分析。

[0597] 如上述实施例3中所描述的那样用MMP2或MMP9蛋白酶消化具有带经修饰的MMP2/9切割序列的肽接头的各种可活化的掩蔽抗体(抗EGFR),不同之处在于消化时间为0.5小时、1小时、2小时、6小时或24小时。通过凝胶电泳在4%-20%梯度的三羟甲基氨基甲烷-甘氨酸SDS-PAGE凝胶上在还原条件下分析所得消化产物(还原剂是来自英杰公司的NUPAGE 10X样品还原剂)。图6A-E中示出了结果。图6A-E中所示的标记“M”是SPECTRA多色宽范围蛋白质分子量标准(来自赛默飞世尔科技公司,目录编号:26623)。

[0598] 图6A:用MMP9消化可活化的掩蔽抗体[HC-CH3臼MMP2/9,LC-CH3杵MMP2/9]产生了预测的切割产物,包括切割的重链和切割的轻链。未示出切割的掩蔽产物。当比较在0.5小时、1小时、2小时、6小时或24小时消化条件下产生的切割产物时,完整(未切割)重链的水平降低并且切割的重链(切割)的水平略微增加,并且完整(未切割)轻链的水平降低并且切割的轻链(切割)的水平增加(图6A,泳道8-12)。用MMP2消化产生很少可检测的切割产物(图6A,泳道2-6)。泳道1是对照抗EGFR抗体,并且泳道7“M”是分子量标准。

[0599] 图6B:用MMP9消化可活化的掩蔽抗体[HC-CH3臼MMP2/9,LC-CH3杵已缺失]产生了预测的切割产物,包括切割的重链和切割的轻链。未示出切割的掩蔽物。当比较在0.5小时、1小时、2小时、6小时或24小时消化条件下产生的切割产物时,完整(未切割)重链的水平降低并且切割的重链(切割)的水平增加,并且完整(未切割)轻链的水平降低并且切割的轻链(切割)的水平增加(图6B,泳道7-11)。用MMP2消化产生很少可检测的切割产物(图6B,泳道1-5)。泳道12是对照抗EGFR抗体,并且泳道6“M”是分子量标准。

[0600] 图6C:用MMP9消化可活化的掩蔽抗体[HC-CH3臼MMP2/9,LC-CH3杵不可切割]产生了预测的切割产物,包括切割的重链。未示出切割的掩蔽物。当比较在0.5小时、1小时、2小时、6小时或24小时消化条件下产生的切割产物时,完整(未切割)重链的水平降低并且切割的重链(切割)的水平增加,并且完整(未切割)轻链的水平没有改变并且切割的轻链(切割)是不可检测的(图6C,泳道8-12)。用MMP2消化产生完整(未切割)重链的水平略微降低并且切割的重链(切割)的水平略微增加,并且完整(未切割)轻链的水平没有改变并且切割的轻链(切割)是不可检测的(图6C,泳道2-6)。泳道1是对照抗EGFR抗体,并且泳道6“M”是分子量标准。

[0601] 图6D:用MMP9消化可活化的掩蔽抗体[HC-CH3臼MMP2/9,LC-CH3杵延长的]产生了预测的切割产物,包括切割的重链和切割的轻链。未示出切割的掩蔽物。当比较在0.5小时、1小时、2小时、6小时或24小时消化条件下产生的切割产物时,完整(未切割)重链的水平降低并且切割的重链(切割)的水平增加,并且完整(未切割)轻链的水平降低并且切割的轻链(切割)的水平增加(图6D,泳道7-11)。用MMP2消化产生完整(未切割)重链的水平略微降低并且切割的重链(切割)的水平略微增加,并且完整(未切割)轻链的水平没有表现出可检测

的改变并且切割的轻链(切割)是不可检测的(图6D,泳道1-5)。泳道12是对照抗EGFR抗体,并且泳道6“M”是分子量标准。

[0602] 图6E:用MMP9消化可活化的掩蔽抗体[HC-CH3臼已缺失,LC-CH3杵已缺失]产生了预测的切割产物,包括切割的重链和切割的轻链。未示出切割的掩蔽物。当比较在0.5小时、1小时、2小时、6小时或24小时消化条件下产生的切割产物时,完整(未切割)重链的水平降低并且切割的重链(切割)的水平增加,并且完整(未切割)轻链的水平降低并且切割的轻链(切割)的水平增加(图6E,泳道7-11)。用MMP2消化产生完整(未切割)重链的水平略微降低并且切割的重链(切割)的水平略微增加,并且完整(未切割)轻链的水平没有表现出可检测的改变并且切割的轻链(切割)的水平非常略微增加(图6E,泳道1-5)。泳道12是对照抗EGFR抗体,并且泳道6“M”是分子量标准。

[0603] 实施例5:切割经修饰的序列肽接头以及凝胶分析。

[0604] 如上述实施例3中所描述的那样用MMP2、MMP9或uPA蛋白酶消化具有带经修饰的MMP2/9切割序列或uPA1切割序列的肽接头的各种可活化的掩蔽抗体(抗EGFR),不同之处在于消化时间为1小时、3小时、5小时或20小时。通过凝胶电泳在4%-20%梯度的三羟甲基氨基甲烷-甘氨酸SDS-PAGE凝胶上在还原条件下分析所得消化产物(还原剂是来自英杰公司的NUPAGE 10X样品还原剂)。图7A-C中示出了结果。图7A-C中所示的标记“M”是SPECTRA多色宽范围蛋白质分子量标准(来自赛默飞世尔科技公司,目录编号:26623)。

[0605] 图7A:用MMP9消化可活化的掩蔽抗体[HC-CH3臼MMP2/9,LC-CH3杵MMP2/9]产生了预测的切割产物,包括切割的重链和切割的轻链。当比较在1小时、3小时、5小时或20小时消化条件下产生的切割产物时,完整(未切割)重链的水平在3小时消化之后消失并且切割的重链(切割)的水平在1小时消化之后出现,并且完整(未切割)轻链的水平降低并且切割的轻链(切割)的水平增加,并且切割的掩蔽部分的水平增加(图7A,泳道1-4)。用MMP2消化产生预测的切割产物,但与用MMP9消化相比,其水平较低。当比较在1小时、3小时、5小时或20小时消化条件下产生的切割产物时,完整(未切割)重链的水平增加并且切割的重链(切割)的水平在1小时消化之后出现,并且完整(未切割)轻链的水平略微降低并且切割的轻链(切割)的水平略微增加,并且切割的掩蔽部分的水平增加(图7A,泳道6-9)。用uPA消化不产生任何可检测的切割产物(图7A,泳道11-14)。泳道10“M”是分子量标准。

[0606] 图7B:用MMP9消化可活化的掩蔽抗体[HC-CH3臼MMP9,LC-CH3杵GS]产生预测的切割产物,包括切割的重链和切割的轻链。当比较在1小时、3小时、5小时或20小时消化条件下产生的切割产物时,完整(未切割)重链的水平增加并且切割的重链(切割)的水平在1小时消化之后出现,并且完整(未切割)轻链的水平降低并且切割的轻链(切割)的水平增加,并且切割的掩蔽部分的水平增加(图7B,泳道1-4)。用MMP2消化不产生可检测的切割产物。(图7B,泳道6-9)。用uPA消化不产生可检测的切割产物(图7B,泳道11-14)。泳道10“M”是分子量标准。

[0607] 图7BC:用MMP9消化可活化的掩蔽抗体[HC-CH3臼MMP9,LC-CH3杵uPA1]产生了预测的重链切割产物。当比较在1小时、3小时、5小时或20小时消化条件下产生的切割产物时,完整(未切割)重链的水平增加并且切割的重链(切割)的水平在1小时消化之后出现,并且低水平的切割的掩蔽部分是可检测的,然而切割的轻链产物是不可检测的(图7C,泳道1-4)。用MMP2消化产生完整重链的水平降低并且切割的重链的水平增加,并且低水平的切割的掩

蔽部分是可检测的,然而切割的轻链产物是不可检测的(图7C,泳道6-9)。用uPA消化没有产生可检测的重链切割产物,但是完整轻链的水平降低并且切割的轻链的水平增加,并且低水平的切割的掩蔽部分是可检测的(图7C,泳道11-14)。泳道5“M”是分子量标准。

[0608] 实施例6:蛋白酶切割产物的质谱法分析。

[0609] 通过对抗体进行去糖基化反应并且然后通过质谱法进行分析来确定蛋白酶消化的抗EGFR可活化的掩蔽抗体的质量。

[0610] 根据上述实施例3中所描述的程序,用非MMP9消化或用MMP9消化可活化的掩蔽抗体。这些抗体没有被消化以产生Fab和Fc结构域。将10微克MMP9消化的可活化的掩蔽IgG型抗体与水混合,总体积为8 μ L,然后添加2 μ L 5X PNGase F缓冲液(非还原形式,新英格兰生物实验室(New England BioLabs),目录编号:B0717S)以制备10 μ L总反应体积,将其在75 $^{\circ}$ C下温育5分钟。使混合物冷却到室温。通过添加1 μ L Rapid PNGase F(非还原形式,新英格兰生物实验室,目录编号:P0711)进行去糖基化反应,将其在50 $^{\circ}$ C下温育10分钟。

[0611] 通过在VANQUISH HORIZON(来自马萨诸塞州沃尔瑟姆赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA))上以正离子模式分析大约2 μ g去糖基化样品进行液相色谱质谱法(LC-MS),其中HESI源与Q EXACTIVE Plus BioPharma质谱仪(马萨诸塞州沃尔瑟姆赛默飞世尔科技公司)连接。通过UPLC Waters BEH C4柱(2.1 $\times$ 150mm,300埃孔径)以0.35毫升/分钟的流速分离完整抗体,其中柱温保持在80 $^{\circ}$ C。流动相A是含0.1%(v/v)甲酸的水,并且流动相B是含0.1%(v/v)甲酸的100%乙腈。从10%流动相B开始并且在10%B下保持5分钟,B相在1分钟之后线性增加到25%并且在14分钟时增加到60%,并且然后在15分钟时增加到90%B。MS数据是在HMR模式下获得的。使用Thermo BioPharma Finder软件分析获得的MS数据。

[0612] 抗EGFR IgG重链在位置88(例如,在Fab区中)和299(例如,在Fc区中)处含有精氨酸残基,所述位置是潜在的翻译后糖基化位点。上述实施例3中的重链氨基酸序列中的“N”残基加粗并加下划线。

[0613] 已知表达抗体重链的CHO细胞将切割掉C端赖氨酸残基。因此,表达的IgG型抗体(例如,本文所描述的可活化的掩蔽IgG型抗体)可能含有具有赖氨酸残基的异质抗体群,所述赖氨酸残基从两条重链上去除,或从重链中的一者上去除,或两条重链都保留C端赖氨酸残基。本文实施例中所描述的可活化的掩蔽IgG型抗体在CHO细胞中表达。在上述实施例3中所描述的可活化的掩蔽抗体的氨基酸序列中,重链的C端赖氨酸以粗体下划线字体示出。

[0614] 使用上述实施例3中列出的MMP9切割的掩蔽抗体的预测的氨基酸序列来计算MMP消化的或完整的可活化的掩蔽抗体[HC-CH3 Δ MMP2/9,LC-CH3 Δ MMP2/9]和[HC-CH1 MMP2/9,LC-CL Δ MMP2/9]的去糖基化形式的理论分子量,并将其与实验确定的分子量进行比较。

[0615] 在图8A-9C和表16-19中,术语“-2K”是指N端赖氨酸从两条重链上去除的IgG分子,术语“-K”是指N端赖氨酸在重链之一上的IgG分子,术语“+2K”是指N端赖氨酸保留在两条重链上的IgG分子,并且术语“+G2F2S”是指聚糖。

[0616] 图8A示出了未消化的[HC-CH3 Δ MMP2/9,LC-CH3 Δ MMP2/9]的LC-MS数据。理论分子量非常接近于实验测定的分子量,如下表16所示。

[0617] 表16:参见图8A

[0618]	未消化: HC-CH3 白 MMP2/9, LC-CH3 杆 MMP2/9	
	理论计算 MW (Da)	实验 MW (Da)
	196632.8 [2 [*] (未切割的 HC + 未切割的 LC), -2K]	196634.77

[0619] 图8B和C中示出了MMP9消化的[HC-CH3白MMP2/9, LC-CH3杆MMP2/9]的LC-MS数据, 所述数据被分为两个单独的图以适应检测分子的质量范围。理论分子量非常接近于实验确定的分子量, 如下表17所示。

[0620] 表17: 参见图8B和C

[0621]	消化的 MMP9: HC-CH3 白 MMP2/9, LC-CH3 杆 MMP2/9	
	理论计算 MW (Da)	实验 MW (Da)
	147075.1 [2 [*] (HC 短 + LC 短), +2K]	147077.8
	146947.1 [2 [*] (HC 短 + LC 短), -K]	146949.2
	146819.1 [2 [*] (HC 短 + LC 短), -2K]	146821.9
	149171.3 [2 [*] (HC 短 + LC 短), -2K, +G2F2S]	149173.3

[0622] 图9A中示出了未消化的[HC-CH1 MMP2/9, LC-CLλMMP2/9]的LC-MS数据。理论分子量非常接近于实验确定的分子量, 如下表18所示。

[0623] 表18: 参见图9A

[0624]	未消化: HC-CH1 MMP2/9, LC-CLλ MMP2/9	
	理论计算 MW (Da)	实验 MW (Da)
	192251.6 [2 [*] (未切割的 HC + 未切割的 LC), +2K]	192262.1
	192123.6 [2 [*] (未切割的 HC + 未切割的 LC), -K]	192120.9
	191995.6 [2 [*] (未切割的 HC + 未切割的 LC), -2K]	191994.2

[0625] 图9B和C中示出了MMP9消化的[HC-CH1 MMP2/9, LC-CLλMMP2/9]的LC-MS数据, 所述数据被分为两个单独的图以适应检测分子的质量范围。理论分子量非常接近于实验确定的分子量, 如下表19所示。

[0626] 表19: 参见图9B和C

[0627]	消化的 MMP9: HC-CH1 MMP2/9, LC-CLλ MMP2/9	
	理论计算 MW (Da)	实验 MW (Da)
	147075.1 [2 [*] (HC 短 + LC 短), +2K]	147076.5
	146947.1 [2 [*] (HC 短 + LC 短), -K]	146948.4
	146819.1 [2 [*] (HC 短 + LC 短), -2K]	146821.3
	149171.3 [2 [*] (HC 短 + LC 短), -2K, +G2F2S]	149171.5

[0628] 实施例7: 各种IgG型可活化的掩蔽抗体的细胞结合测定的FACS分析。

[0629] 使用流式细胞术进行细胞结合测定以确定未切割(实心圆)或用MMP9切割(实心正方形)的抗EGFR可活化的掩蔽抗体[HC-CH3白MMP2/9, LC-CH3杆MMP2/9]与对照抗EGFR抗体(实心三角形)相比的EC50值。另外, 测试了未切割和切割的抗EGFR可活化的掩蔽抗体[HC-CH3白uPA1, LC-CH3杆MMP2/9]并将其与对照抗EGFR抗体进行比较。

[0630] 根据上述实施例3中所描述的方案, 用MMP9消化可活化的掩蔽抗体。使用EGFR阳性肿瘤细胞系MDA-MB-231(低EGFR表达)、A431(高EGFR表达)和MDA-MB-468(高EGFR表达)。洗涤细胞并将其重悬于FACS缓冲液中。对细胞进行计数并在含有0.01%叠氮化钠的FACS缓冲液中稀释到 1×10^6 个细胞/mL并且将50μL(约50,000个细胞)等分到透明的V形底96孔板中并以1200RPM旋转5分钟。去除上清液并添加30uL连续稀释的抗体。将抗体稀释到介于10μg/

mL与50 μ g/mL之间的起始浓度并且然后使用FACS缓冲液连续稀释3倍。将每个抗体浓度一式两份或三份添加到细胞中。在4℃下温育一小时之后,向每个孔中添加110 μ L FACS缓冲液并将板以1200RPM旋转5分钟。在去除上清液之后,添加在FACS缓冲液+0.01%叠氮化物中稀释500倍的抗人IgG-PE或-APC或-FITZ/Alexa488二级抗体,并在4℃下温育25分钟。用110 μ L FACS缓冲液洗涤细胞并旋转。将细胞重悬于30 μ L FACS缓冲液中并使用Intellicyt FACS通过FACS分析结合。使用Flo-Jo和GraphPad Prism分析数据。

[0631] 图10A示出了可活化的掩蔽抗体与MDA-MB-231细胞结合的结果。MMP9消化的抗体以类似于对照抗EGFR抗体的水平与MDA-MB-231细胞结合,而未切割的抗体表现出差的细胞结合。

[0632] 图10B示出了可活化的掩蔽抗体与A431细胞结合的结果。MMP9消化的抗体以类似于对照抗EGFR抗体的水平与A431细胞结合,而未切割的抗体表现出差的细胞结合。

[0633] 图10C示出了可活化的掩蔽抗体与MDA-MB-468细胞结合的结果。MMP9消化的抗体以与对照抗EGFR抗体相比更高的水平与MDA-MB-468细胞结合,而未切割的抗体表现出差的细胞结合。

[0634] 用可活化的掩蔽抗体进行细胞结合测定,所述可活化的掩蔽抗体具有与第一肽接头接合的第一重链可变区以及与第二肽接头接合的第一轻链可变区,其中所述第一肽接头和所述第二肽接头包括不同的长度和序列并且可被不同的蛋白酶切割。例如,针对MDA-MB-231、A431和MDA-MB-468细胞测试未切割的或用MMP9蛋白酶消化的可活化的掩蔽抗体[HC-CH3白uPA1;LC-CH3杵MMP2/9]的细胞结合能力。EC50值在下表20中列出(参见标有**的未切割和切割的抗体)。

[0635] 从这些FAC测定获得的EC50值和计算的EC50比率在下表20中列出:

[0636] 表20:参见图10A-C

细胞系:	未切割或用 MMP9 切割的抗体:	EC50:	EC50 比率:
MDA-MB-231	对照抗 EGFR 抗体	0.43 nM	不适用
	未切割[HC-CH3 白 MMP2/9, LC-CH3 杵 MMP2/9]	28 nM	65X
	切割[HC-CH3 白 MMP2/9, LC-CH3 杵 MMP2/9]	0.58 nM	
A431	对照抗 EGFR 抗体	3.5 nM	不适用
	未切割[HC-CH3 白 MMP2/9, LC-CH3 杵 MMP2/9]	17.5 nM	5X
	切割[HC-CH3 白 MMP2/9, LC-CH3 杵 MMP2/9]	3.1 nM	
MDA-MB-468	对照抗 EGFR 抗体	5.8 nM	不适用
	未切割[HC-CH3 白 MMP2/9, LC-CH3 杵 MMP2/9]	22.5 nM	3.9X
	切割[HC-CH3 白 MMP2/9, LC-CH3 杵 MMP2/9]	5.1 nM	
MDA-MB-231	对照抗 EGFR 抗体	0.43 nM	不适用
	未切割[HC-CH3 白 uPA1, LC-CH3 杵 MMP2/9]**	16.4 nM	38X
	切割[HC-CH3 白 uPA1, LC-CH3 杵 MMP2/9]**	0.4 nM	
A432	对照抗 EGFR 抗体	3.5 nM	不适用
	未切割[HC-CH3 白 uPA1, LC-CH3 杵 MMP2/9]**	21 nM	6X
	切割[HC-CH3 白 uPA1, LC-CH3 杵 MMP2/9]**	6 nM	
MDA-MB-468	对照抗 EGFR 抗体	5.8 nM	不适用
	未切割[HC-CH3 白 uPA1, LC-CH3 杵 MMP2/9]**	38.9 nM	6.7X
	切割[HC-CH3 白 uPA1, LC-CH3 杵 MMP2/9]**	2 nM	

[0638] 实施例8:各种IgG型可活化的掩蔽抗体的ELISA分析。

[0639] 进行ELISA测定以比较未切割和切割的可活化的掩蔽抗EGFR IgG型抗体[HC-CH3 臼MMP2/9,LC-CH3杵MMP2/9]和[HC-CH1 MMP2/9,LC-CLAMMP2/9]的结合特性并将其与对照抗EGFR抗体进行比较。

[0640] 根据上述实施例3中所描述的方案,用MMP9消化可活化的掩蔽抗体。将重组EGFR蛋白细胞外结构域吸附到微量滴定板上,然后用PBS中的阻断剂酪蛋白(来自赛默飞世尔科技公司,目录编号:37528)进行阻断。以一系列稀释液添加测试或对照抗体。添加与测试抗体结合的酶标记的抗人IgG试剂。添加显色底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)。读板仪用于检测颜色变化。洗涤步骤包括在步骤之间以去除多余的未结合试剂。

[0641] 图11A-H中示出了ELISA结果并且EC50和比率在下表21-28中列出。在所有情况下,抗EGFR抗体都是未切割的。

[0642] 图11A:将重组EGFR蛋白与未切割的对照抗EGFR抗体(迹线A,空心三角形)、未切割的抗EGFR[HC-CH1 MMP2/9,LC-CLAMMP2/9](迹线B,实心三角形)和未切割的抗EGFR[HC-CH3 臼MMP2/9,LC-CH3杵MMP2/9](迹线C,实心菱形)结合的结合曲线。EC50值和比率(未切割的对照抗EGFR抗体的EC50/未切割的掩蔽抗体的EC50值)在下表EE中列出。结合曲线和EC50值显示了未切割的抗EGFR[HC-CH3 臼MMP2/9,LC-CH3杵MMP2/9]的掩蔽能力与未切割的抗EGFR[HC-CH1 MMP2/9,LC-CLAMMP2/9]相比略好。

[0643] 表21:参见图11A

[0644]	抗体:	EC50:	比率:
	对照抗EGFR抗体	22.9pM	不适用
	未切割:[HC-CH3 臼MMP2/9,LC-CH3杵MMP2/9]	5.5nM	240
	未切割:[HC-CH1 MMP2/9,LC-CLAMMP2/9]	2.3nM	100

[0645] 图11B:将重组EGFR蛋白与未切割对照抗EGFR抗体(实心菱形)和未切割可活化的掩蔽抗EGFR抗体[HC-CH3 臼MMP2/9,LC-CH3杵已缺失](实心圆)和[HC-CH3 臼MMP2/9,LC-CH3杵不可切割](实心正方形)和[HC-CH3 臼MMP2/9,LC-CH3杵延长的](实心三角形)和[HC-CH3 臼MMP2/9,LC-CH3杵MMP2/9](实心倒三角形)结合的结合曲线。还示出了用MMP9切割的[HC-CH3 臼MMP2/9,LC-CH3杵不可切割]的结合曲线(“切割”)。EC50值在下表22中列出。结合曲线和EC50值显示了未切割的掩蔽抗体[HC-CH3 臼MMP2/9,LC-CH3杵已缺失]的掩蔽能力与图11B所示的其它未切割的掩蔽抗体相比略好,并且用MMP9切割[HC-CH3 臼MMP2/9,LC-CH3杵不可切割]与对照抗EGFR抗体的结合能力相比部分恢复了与其靶抗原的结合能力。

[0646] 表22:参见图11B

[0647]	抗体:	EC50:
	未切割:对照抗EGFR抗体	22.9pM
	未切割:[HC-CH3 臼MMP2/9,LC-CH3杵MMP2/9]	5.1nM
	未切割:[HC-CH3 臼MMP2/9,LC-CH3杵已缺失]	7.3nM
	未切割:[HC-CH3 臼MMP2/9,LC-CH3杵不可切割]	4.1nM
	未切割:[HC-CH3 臼MMP2/9,LC-CH3杵延长的]	2.8nM
	切割:[HC-CH3 臼MMP2/9,LC-CH3杵不可切割]	163.5pM

[0648] 图11C:将重组EGFR蛋白与未切割对照抗EGFR抗体(实心菱形)和未切割可活化的掩蔽抗EGFR抗体[HC-CH3 臼不可切割,LC-CH3杵已缺失](实心圆)和[HC-CH3 臼不可切割,

LC-CH3杆不可切割] (实心正方形) 和[HC-CH3杆不可切割, LC-CH3杆延长的] (实心三角形) 和[HC-CH3杆MMP2/9, LC-CH3杆MMP2/9] (实心倒三角形) 结合的结合曲线。还示出了用MMP9切割的[HC-CH3杆不可切割, LC-CH3杆延长的]的结合曲线(“切割”)。EC50值在下表23中列出。结合曲线和EC50值显示了未切割的掩蔽抗体[HC-CH3杆不可切割, LC-CH3杆延长的]的掩蔽能力与图11C所示的其它未切割的掩蔽抗体相比略好, 并且用MMP9切割[HC-CH3杆不可切割, LC-CH3杆延长的]与对照抗EGFR抗体的结合能力相比部分恢复了与其靶抗原的结合能力。

[0649] 表23: 参见图11C

[0650]	抗体:	EC50:
	未切割: 对照抗EGFR抗体	34.1pM
	未切割: [HC-CH3杆MMP2/9, LC-CH3杆MMP2/9]	5.1nM
	未切割: [HC-CH3杆不可切割, LC-CH3杆已缺失]	3.4nM
	未切割: [HC-CH3杆不可切割, LC-CH3杆不可切割]	4.4nM
	未切割: [HC-CH3杆不可切割, LC-CH3杆延长的]	7.2nM
	切割: [HC-CH3杆不可切割, LC-CH3杆延长的]	113.5pM

[0651] 图11D: 将重组EGFR蛋白与未切割对照抗EGFR抗体 (实心菱形) 和未切割可活化的掩蔽抗EGFR抗体[HC-CH3杆已缺失, LC-CH3杆已缺失] (实心圆) 和[HC-CH3杆已缺失, LC-CH3杆不可切割] (实心正方形) 和[HC-CH3杆已缺失, LC-CH3杆延长的] (实心三角形) 和[HC-CH3杆MMP2/9, LC-CH3杆MMP2/9] (实心倒三角形) 结合的结合曲线。EC50值在下表24中列出。结合曲线和EC50值显示了未切割的掩蔽抗体[HC-CH3杆已缺失, LC-CH3杆已缺失]的掩蔽能力与图11D所示的其它未切割的掩蔽抗体相比更好。

[0652] 表24: 参见图11D

	抗体:	EC50:
	未切割: 对照抗 EGFR 抗体	34.1 pM
[0653]	未切割: [HC-CH3 杆 MMP2/9, LC-CH3 杆 MMP2/9]	5.1 nM
	未切割: [HC-CH3 杆缺失, LC-CH3 杆已缺失]	25.2 nM
	未切割: [HC-CH3 杆缺失, LC-CH3 杆不可切割]	2.6 nM

[0654]	未切割: [HC-CH3 杆缺失, LC-CH3 杆延长的]	2.3 nM
--------	--------------------------------	--------

[0655] 图11E: 将重组EGFR蛋白与未切割的对照抗EGFR抗体 (实心菱形) 和处于未切割状态 (实心圆) 或用MMP9消化 (实心倒三角形) 的可活化的掩蔽抗EGFR抗体[HC-CH3杆MMP2/9, LC-CH3杆MMP2/9]结合的结合曲线。EC50值在下表25中列出。结合曲线和EC50值显示了切割的掩蔽抗体[HC-CH3杆MMP2/9, LC-CH3杆MMP2/9]与其靶抗原的结合能力恢复到与对照抗EGFR抗体几乎相同的水平。

[0656] 表25: 参见图11E

[0657]	抗体:	EC50:
	未切割: 对照抗EGFR抗体	34.1pM
	未切割: [HC-CH3杆MMP2/9, LC-CH3杆MMP2/9]	5.1nM
	切割: [HC-CH3杆MMP2/9, LC-CH3杆MMP2/9]	35.9pM

[0658] 图11F: 将重组EGFR蛋白与未切割的对照抗EGFR抗体 (实心三角形) 和处于未切割

状态(实心正方形)或用MMP9消化(实心菱形)的可活化的掩蔽抗EGFR抗体[HC-CH1 MMP2/9, LC-CLAMMP2/9]结合的结合曲线。EC50值在下表26中列出。结合曲线和EC50值显示了切割的掩蔽抗体[HC-CH3白MMP2/9, LC-CH3杆MMP2/9]与其靶抗原的结合能力恢复到与对照抗EGFR抗体相似的水平。

[0659] 表26: 参见图11F

[0660]	抗体:	EC50:
	未切割: 对照抗EGFR抗体	34.1 pM
	未切割: [HC-CH1 MMP2/9, LC-CLAMMP2/9]	3.8 nM
	切割: [HC-CH1 MMP2/9, LC-CLAMMP2/9]	43.8 pM

[0661] 图11G: 将重组EGFR蛋白与未切割的对照抗EGFR抗体(实心菱形)和处于未切割状态(实心正方形)或用MMP9消化(实心圆)的可活化的掩蔽抗EGFR抗体[HC-CH3白MMP2/9, LC-CH3杆不可切割]结合的结合曲线。EC50值在下表27中列出。结合曲线和EC50值显示了切割的掩蔽抗体[HC-CH3白MMP2/9, LC-CH3杆不可切割]与其靶抗原的结合能力部分恢复到对照抗EGFR抗体的结合水平。

[0662] 表27: 参见图11G

[0663]	抗体:	EC50:
	未切割: 对照抗EGFR抗体	34.1 pM
	未切割: [HC-CH3白MMP2/9, LC-CH3杆不可切割]	4.1 nM
	切割: [HC-CH3白MMP2/9, LC-CH3杆不可切割]	163.5 pM

[0665] 图11H: 将重组EGFR蛋白与未切割的对照抗EGFR抗体(实心菱形)和处于未切割状态(实心三角形)或用MMP9消化(实心圆)的可活化的掩蔽抗EGFR抗体[HC-CH3白不可切割, LC-CH3杆延长的]结合的结合曲线。EC50值在下表28中列出。结合曲线和EC50值显示了切割的掩蔽抗体[HC-CH3白不可切割, LC-CH3杆延长的]与其靶抗原的结合能力部分恢复到对照抗EGFR抗体的结合水平。

[0666] 表28: 参见图11H

[0667]	抗体:	EC50:
	未切割: 对照抗EGFR抗体	34.1 pM
	未切割: [HC-CH3白不可切割, LC-CH3杆延长的]	7.2 nM
	切割: [HC-CH3白不可切割, LC-CH3杆延长的]	113.5 pM

[0668] 实施例9: 用于测量蛋白质-蛋白质结合的生物膜干涉测量法。

[0669] 用无标记生物膜干涉测量法测量商品化的人EGFR蛋白与对照抗EGFR抗体或各种抗EGFR可活化的掩蔽抗体之间的动力学结合。AR2G(胺反应性第二代)传感器上的羧基在EDC(1-乙基-3-(3-二甲基-氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐)和NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)的水溶液中被活化。将商品化的重组EGFR以5ug/ml的浓度在pH 5.5的乙酸盐缓冲液中固定在传感器上5分钟。检测到在EGFR蛋白与对照抗EGFR抗体或未切割或用MMP9或MMP2蛋白酶消化的可活化的掩蔽抗体之间具有时间依赖性结合。对照抗EGFR抗体不进行MMP9消化。所有测试的抗体都以30nM的等摩尔浓度处于PBS缓冲液中。根据制造商的说明进行数据分析。图12A-C中示出了数据。

[0670] 图12A示出了用MMP9蛋白酶消化的可活化的掩蔽抗体[HC-CH3臼MMP2/9,LC-CH3杵MMP2/9]的结合能力与对照抗EGFR抗体的结合能力相比略好。

[0671] 图12B示出了用MMP9蛋白酶消化的可活化的掩蔽抗体[HC-CH1 MMP2/9,LC-CLλMMP2/9]的结合能力与对照抗EGFR抗体的结合能力相比略好。

[0672] 图12C示出了用MMP2蛋白酶消化的可活化的掩蔽抗体[HC-CH1 MMP2/9,LC-CLκMMP2/9]的结合能力与对照抗EGFR抗体的结合能力相似。[HC-CH1 MMP2/9,LC-CLκMMP2/9]抗体的结合动力学值在下表29中列出。

[0673] 表29:参见图12C

[0674]	IgG	估计 Kd (M)	Kon (1/Ms)	Kdis (1/s)
	对照抗 EGFR 抗体	6.0E-10	3.7E6	2.3E-3
	未切割: [HC-CH1 MMP2/9, LC-CLκ MMP2/9]	1.4E-7	4.8E3	1.2E-3
	切割: [HC-CH1 MMP2/9, LC-CLκ MMP2/9]	2.0E-9	1.0E6	2.1E-3

[0675] 实施例10:确定各种IgG型可活化的掩蔽抗体的热稳定性。

[0676] 固有色氨酸荧光位移测量结果用于确定各种IgG型可活化的掩蔽抗体的热稳定性。来自非链实验室(Unchained Labs)(加利福尼亚州普莱森顿(Pleasanton, California))的UNcle用于测量Tm。在典型的实验程序中,加载浓度范围为0.1mg/mL至100mg/mL的9μL抗体。以1°C/分钟的扫描速率从30°C至90°C进行热升温,并使用CCD数码相机捕获全250nm-720nm光谱范围的荧光。UNcle软件自动显示由BCM计算的荧光曲线,并且还显示了热转变温度(Tm,或热转变温度)的中点。结果在下表30-33中列出:

[0677] 表30:[HC-CH3臼MMP2/9,LC-CH3杵MMP2/9]的热稳定性测量结果:

[0678]	样品:	Tm (°C)	平 均 Tm1 (°C)	Tagg 266 (°C)	平 均 Tagg (°C)
	1 - 1.23 mg/mL	71	71.1	71.74	71.7
	2 - 1.23 mg/mL	70.9		71.64	
	3 - 1.23 mg/mL	71.5		71.62	

[0679] 表31:[HC-CH1 MMP2/9,LC-CLλMMP2/9]的热稳定性测量结果:

[0680]	样品:	Tm (°C)	平 均 Tm1 (°C)	Tagg 266 (°C)	平 均 Tagg (°C)
	1 - 1 mg/mL	65.5	65.3	67.8	67.7
	2 - 1 mg/mL	65		67.6	
	3 - 1 mg/mL	66.2		67.8	

[0681] 表32:[HC-CH1 MMP2/9,LC-CLκMMP2/9]的热稳定性测量结果:

[0682]	样品:	Tm (°C)	平 均 Tm1 (°C)	Tagg 266 (°C)	平 均 Tagg (°C)
	1 - 1 mg/mL	60.2	60	65.1	65.3
	2 - 1 mg/mL	60.3		65.6	
	3 - 1 mg/mL	60		65.2	

[0683] 表33:另外的抗EGFR IgG型可活化的掩蔽抗体的热稳定性测量结果:

[0684]	可活化的掩蔽部分:	Tm (°C)	1 Tagg (°C)	266
	[HC-CH3 白 MMP2/9, LC-CH3 白 uPA1]	71		72.2
	[HC-CH3 白 MMP9, LC-CH3 杵 G4S]	71.5		72.9
	[HC-CH3 白已缺失, LC-CH3 杵已缺失]	70		71.2
	[HC-CH3 白已缺失, LC-CH3 杵不可切割]	70		71.1
	[HC-CH3 白已缺失, LC-CH3 杵延长的]	69.9		71
	[HC-CH3 白不可切割, LC-CH3 杵已缺失]	70.9		72.2
	[HC-CH3 白不可切割, LC-CH3 杵不可切割]	69.7		70.6
	[HC-CH3 白不可切割, LC-CH3 杵 MMP9]	69.6		70.8
	[HC-CH3 白 MMP9, LC-CH3 杵已缺失]	69.2		70
	[HC-CH3 白 MMP9, LC-CH3 杵不可切割]	70		70.8
	[HC-CH3 白 MMP9, LC-CH3 杵延长的]	69.5		70.5

[0685] 实施例11:具有可活化的掩蔽抗体的各种二聚抗原受体 (DAR) 模拟物的表达。

[0686] 使用FUGENE6转染试剂制备表达模拟CAR或DAR的膜锚定抗原结合蛋白的转基因HeLa。

[0687] 膜锚定抗原结合蛋白DAR模拟物包括 (1) 第一多肽,所述第一多肽包括抗体重链可变区 (VH)、抗体重链恒定区 (CH)、铰链区和跨膜区 (TM),但缺乏细胞内信号传导区,以及 (2) 第二多肽,所述第二多肽包括抗体轻链可变区 (VL) (例如 κ 或 λ) 和抗体轻链恒定区 (CL)。DAR模拟物缺乏包括或缺乏可活化的掩蔽部分。参见图3A和B中可活化的掩蔽DAR构建体的示意图。制备了与EGFR或CD38结合的DAR模拟物。

[0688] 类似于scFv分子的膜锚定抗原结合蛋白CAR模拟物包括抗体重链可变区 (VH)、柔性接头、抗体轻链可变区 (VL)、铰链区和跨膜区 (TM),但缺乏细胞内信号传导区。CAR模拟物都缺乏可活化的掩蔽部分。制备了与EGFR、CD38或BCMA抗原结合的CAR模拟物。

[0689] DAR模拟物的第一多肽链和第二多肽链各自与单独的瞬时表达载体可操作地接合,所述单独的瞬时表达载体被共同引入到HeLa细胞中。FUGENE HD转染试剂(普洛麦格公司(Promega),目录编号:E2311)用于制备表达具有或不具有可活化的掩蔽部分的CAR或DAR抗原结合蛋白的转基因HeLa细胞。根据制造商的说明进行转染。简而言之,通过将EPPENDORF管中的FUGENE6试剂与无血清培养基(例如,DMEM)混合来制备转染溶液。将DMDM/FUGENE6溶液添加到另一个含有编码CAR或DAR抗原结合蛋白(例如,表达质粒或表达病毒载体)的DNA的管中。用于制备DMEM/FUGENE6和质粒溶液的FUGENE6和DNA的量根据制造商的方案。典型地,对于10cm孔的细胞(约 10^4 个或 10^6 个细胞),2 μ g DNA与FUGENE6试剂的体积(以 μ L为单位)在1:2与1:3的比率之间变化。通过将含有FUGENE6和质粒的DMEM培养基在室温下温育15分钟来允许形成复合物。通过将含有形成的复合物的DMEM培养基滴到顶部并旋转混合而直接添加到HeLa细胞中。将细胞放置在温育箱中过夜,并且在第2或第3天检查CAR或DAR表达。

[0690] 抗EGFR和抗CD38 DAR模拟物(那些具有可活化的掩蔽部分的模拟物和那些缺乏可活化的掩蔽部分的模拟物)的铰链和跨膜部分衍生自血小板源性生长因子受体(PDGFR)。

[0691] PDGFR铰链:SEQ ID NO:41:

[0692] AVGQDTQEVIVVPHSLPFKV

[0693] PDGFR跨膜:SEQ ID NO:42:

- [0694] VVISAILALVVLTIISLIILIMLWQKKPR.
- [0695] PDGFR铰链/跨膜:SEQ ID NO:43
- [0696] AVGQDTQEVIVVPHSLPFKV VVISAILALVVLTIISLIILIMLWQKKPR.
- [0697] 在一个实施方式中,具有可活化的掩蔽部分的抗EGFR或抗CD38 DAR或CAR (或DAR模拟物或CAR模拟物)可以包括衍生自CD28或CD8或CD28和CD8两者的铰链序列。
- [0698] CD28铰链:SEQ ID NO:44
- [0699] KIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKP
- [0700] CD8铰链:SEQ ID NO:45
- [0701] AKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAPR
- [0702] 长铰链序列:CD8和CD28铰链序列:SEQ ID NO:46
- [0703] AKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAPRKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKP
- [0704] 在一个实施方式中,具有可活化的掩蔽部分的抗EGFR或抗CD38 DAR或CAR (或DAR模拟物或CAR模拟物)可以包括衍生自CD28的跨膜序列。
- [0705] CD28:跨膜:SEQ ID NO:47
- [0706] FWVLVVGGVLACYLLVTVAFIIFWV
- [0707] 在一个实施方式中,具有可活化的掩蔽部分的抗EGFR或抗CD38 DAR或CAR可以包括至少一个细胞内信号传导序列。
- [0708] 4-1BB信号传导区:SEQ ID NO:48
- [0709] KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
- [0710] CD28信号传导区:SEQ ID NO:49
- [0711] RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS
- [0712] CD3 ζ 信号传导区:SEQ ID NO:50
- [0713] RVKFSSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
- [0714] CD3- ζ 信号传导区 (ITAM 3):SEQ ID NO:51
- [0715] RVKFSSADKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
- [0716] 实施例12:切割具有可活化的掩蔽部分的各种二聚抗原受体 (DAR) 模拟物的肽接头。
- [0717] 用MMP9消化表达具有可活化的掩蔽部分的各种抗EGFR DAR模拟物的转基因HeLa细胞。将约 2×10^4 个转基因HeLa细胞与0.4ug MMP9蛋白酶 (来自Origen CAT编号:TP302872或RnD Systems公司CAT编号:911-MP-010的重组人MMP9) 在DPBS/2%胎牛血清中在25℃下反应约15小时。未进行APMA活化。
- [0718] 实施例13:各种抗EGFR二聚抗原受体 (DAR) 模拟物可活化的掩蔽抗体的细胞结合测定的FACS分析。
- [0719] 使用流式细胞术在细胞结合测定中测试表达具有可活化的掩蔽部分的抗EGFR DAR模拟物的转基因HeLa细胞 (如上文实施例11中所描述的), 以评估作为掩蔽水平反映的抗原结合的水平并评估来自转基因HeLa细胞的CAR或DAR模拟物表达的水平。具有可活化的掩蔽部分的抗EGFR DAR模拟物的构型如图3A的示意图所示。将表达抗EGFR DAR模拟物的

HeLa细胞和表达抗EGFR CAR模拟物的HeLa细胞与1:100稀释度的抗人κAPC(来自百进生物公司(BioLegend))和1:100稀释度的荧光团标记的EGFR抗原(EGFR-Alexa 488)反应。阳性对照转基因HeLa细胞表达不具有肽接头或掩蔽部分的对照抗EGFR DAR模拟物,并且阴性对照是非转基因HeLa细胞。图13A-E和图14A-D中示出了FAC结果。

[0720] 图13A:将示出了与抗人κAPC和靶抗原EGFR(用Alex 488标记)结合的表达处于未切割状态的具有可活化的掩蔽部分的抗EGFR DAR模拟物[HC-CH3(IgG1)MMP2/9,LC-CH3(IgG1)MMP2/9]的转基因HeLa细胞的Q2象限(左;Q2值为32.8)与和抗人κAPC和靶抗原EGFR(用Alex 488标记)结合的表达不具有可活化的掩蔽部分的对照抗EGFR DAR模拟物的阳性对照转基因HeLa细胞的Q2象限(中间;Q2值为71.5)和与抗人κAPC和靶抗原EGFR(用Alex 488标记)结合的阴性对照非转基因HeLa细胞(右;Q2值为0.022)进行比较。

[0721] 图13B:将示出了与抗人κAPC和靶抗原EGFR(用Alex 488标记)结合的表达处于未切割状态的具有可活化的掩蔽部分的抗EGFR DAR模拟物[HC-CH3(IgG4)MMP2/9,LC-CH3(IgG4)MMP2/9]的转基因HeLa细胞的Q2象限(左;Q2值为69.0)与和抗人κAPC和靶抗原EGFR(用Alex 488标记)结合的表达不具有可活化的掩蔽部分的对照抗EGFR DAR模拟物的阳性对照转基因HeLa细胞的Q2象限(中间;Q2值为71.5)和与抗人κAPC和靶抗原EGFR(用Alex 488标记)结合的阴性对照非转基因HeLa细胞(右;Q2值为0.022)进行比较。

[0722] 图13C:将示出了与抗人κAPC和靶抗原EGFR(用Alex 488标记)结合的表达处于未切割状态的具有可活化的掩蔽部分的抗EGFR DAR模拟物[HC-CH3白MMP2/9,LC-CH3杆MMP2/9]的转基因HeLa细胞的Q2象限(左;Q2值为36.4)与和抗人κAPC和靶抗原EGFR(用Alex 488标记)结合的表达不具有可活化的掩蔽部分的对照抗EGFR DAR模拟物的阳性对照转基因HeLa细胞的Q2象限(中间;Q2值为71.5)和与抗人κAPC和靶抗原EGFR(用Alex 488标记)结合的阴性对照非转基因HeLa细胞(右;Q2值为0.022)进行比较。

[0723] 图13D:将示出了与抗人κAPC和靶抗原EGFR(用Alex 488标记)结合的表达处于未切割状态的具有可活化的掩蔽部分的抗EGFR DAR模拟物[HC-CH1 MMP2/9,LC-CLκMMP2/9]的转基因HeLa细胞的Q2象限(左;Q2值为46.0)与和抗人κAPC和靶抗原EGFR(用Alex 488标记)结合的表达不具有可活化的掩蔽部分的对照抗EGFR DAR模拟物的阳性对照转基因HeLa细胞的Q2象限(中间;Q2值为71.5)和与抗人κAPC和靶抗原EGFR(用Alex 488标记)结合的阴性对照非转基因HeLa细胞(右;Q2值为0.022)进行比较。

[0724] 图13E:将示出了与抗人κAPC和靶抗原EGFR(用Alex 488标记)结合的表达处于未切割状态的具有可活化的掩蔽部分的抗EGFR DAR模拟物[HC-38C2-VH MMP2/9,LC-38C2-VL MMP2/9]的转基因HeLa细胞的Q2象限(左;Q2值为14.9)与和抗人κAPC和靶抗原EGFR(用Alex 488标记)结合的表达不具有可活化的掩蔽部分的对照抗EGFR DAR模拟物的阳性对照转基因HeLa细胞的Q2象限(中间;Q2值为71.5)和与抗人κAPC和靶抗原EGFR(用Alex 488标记)结合的阴性对照非转基因HeLa细胞(右;Q2值为0.022)进行比较。测试DAR模拟构建体中的成对掩蔽部分(右)包括包含来自醛缩酶催化抗体38C2的可变重链区的第一掩蔽部分和包含来自醛缩酶催化抗体38C2的可变轻链区的第二掩蔽部分。醛缩酶催化抗体38C2具有带有反应性氨基酸残基(例如,赖氨酸)的抗原结合结构域,所述醛缩酶催化抗体可以通过烯胺机制催化醛醇反应以与反应性底物分子(例如,酮)形成共价键/连接(Wagner 1995《科学》270:1797;Wirshing 1995《科学》270:1775;Barbas 1997《科学》278:2085;以及Hoffmann

1998《美国化学会志(Journal of American Chemical Society)》120:2768)。

[0725] 将示出了与抗人 κ APC和靶抗原EGFR(用Alex 488标记)结合的表达处于未切割状态的具有可活化的掩蔽部分的抗EGFR DAR模拟物[HC-CH1 MMP2/9, LC-CL κ MMP2/9]的转基因HeLa细胞的Q2象限(图14A;Q2值为37.0)与和抗人 κ APC和靶抗原EGFR(用Alex 488标记)结合的表达用MMP9消化的具有可活化的掩蔽部分的抗EGFR DAR模拟物[HC-CH1 MMP2/9, LC-CL κ MMP2/9]的转基因HeLa细胞的Q2象限(图14B;Q2值为55.9)、与抗人 κ APC和靶抗原EGFR(用Alex 488标记)结合的表达不具有可活化的掩蔽部分的对照抗EGFR DAR模拟物的阳性对照转基因HeLa细胞的Q2象限(图14C;Q2值为51.8)、示出了与抗人 κ APC和靶抗原EGFR(用Alex 488标记)结合的不表达抗EGFR DAR模拟物并且不具有可活化的掩蔽部分的阴性对照非转基因HeLa细胞的Q2象限(图14D;Q2值为0.21)进行比较。

[0726] 实施例14:各种抗CD38二聚抗原受体(DAR)模拟物可活化的掩蔽抗体的细胞结合测定的FACS分析。

[0727] 使用流式细胞术在细胞结合测定中测试表达具有可活化的掩蔽部分的抗CD38 DAR模拟物的转基因HeLa细胞(如上文实施例11中所描述的),以评估作为掩蔽水平反映的抗原结合的水平并评估来自转基因HeLa细胞的CAR或DAR模拟物表达的水平。具有可活化的掩蔽部分的抗CD38 DAR模拟物的构型如图3A的示意图所示。将表达抗CD38DAR模拟物的HeLa细胞和表达抗CD38 CAR模拟物的HeLa细胞与1:100稀释度的抗人 κ APC(来自百进生物公司)和1:100稀释度的荧光团标记的EGFR抗原(EGFR-Alexa 488)反应。阳性对照转基因HeLa细胞表达不具有肽接头或掩蔽部分的对照抗CD38DAR模拟物或CAR模拟物,并且阴性对照是非转基因HeLa细胞。图15A-H和图16A-F中示出了FAC结果。

[0728] 将示出了与用PE标记的CD38 Fc和用APC标记的抗铰链抗体结合的表达处于未切割状态的具有可活化的掩蔽部分的抗CD38 DAR模拟物[HC-CH3 (IgG4) MMP2/9, LC-CH3 (IgG4) MMP2/9]的转基因HeLa细胞的Q2象限(图15A;Q2值为17.1)与示出了与用PE标记的CD38 Fc和用APC标记的抗铰链抗体结合的表达不具有可活化的掩蔽部分的抗CD38 DAR模拟物的转基因HeLa细胞的Q2象限(图15B;Q2值为49.1)、示出了与用PE标记的阳性对照CD38 Fc和用APC标记的抗铰链抗体结合的表达抗CD38CAR模拟物但缺乏可活化的掩蔽部分的转基因HeLa细胞的Q2象限(图15C;Q2值为63.8)、示出了与用PE标记的阳性对照CD38 Fc和用APC标记的抗铰链抗体结合的不表达抗CD38 DAR模拟物并且不具有可活化的掩蔽部分的阴性对照非转基因HeLa细胞的Q2象限(图15D;Q2值为0.56)进行比较。

[0729] 将示出了与用PE标记的CD38 Fc和用APC标记的抗铰链抗体结合的表达处于未切割状态的具有可活化的掩蔽部分的抗CD38 DAR模拟物[HC-CH3白MMP2/9, LC-CH3杵MMP2/9]的转基因HeLa细胞的Q2象限(图15E;Q2值为4.32)与示出了与用PE标记的CD38 Fc和用APC标记的抗铰链抗体结合的表达不具有可活化的掩蔽部分的抗CD38DAR模拟物的转基因HeLa细胞的Q2象限(与图15B相同的图15F;Q2值为49.1)、示出了与用PE标记的阳性对照CD38 Fc和用APC标记的抗铰链抗体结合的表达抗CD38 CAR模拟物但缺乏可活化的掩蔽部分的转基因HeLa细胞的Q2象限(与图15C相同的图15G;Q2值为63.8)、示出了与用PE标记的阳性对照CD38 Fc和用APC标记的抗铰链抗体结合的不表达抗CD38 DAR模拟物并且不具有可活化的掩蔽部分的阴性对照非转基因HeLa细胞的Q2象限(与图15D相同的图15H;Q2值为0.56)进行比较。

[0730] 将示出了与用APC标记的抗铰链抗体和用PE标记的CD38 Fc结合的表达缺乏可活化的掩蔽部分的抗CD38 DAR模拟物的转基因HeLa细胞的Q2象限(图16A;Q2值为36.6)与示出了与用APC标记的抗铰链抗体和用PE标记的CD38 Fc结合的表达缺乏可活化的掩蔽部分的抗CD38 CAR模拟物的转基因HeLa细胞的Q2象限(图16B;Q2值为42.3)、示出了与用APC标记的抗铰链抗体和用PE标记的CD38 Fc结合的表达缺乏可活化的掩蔽部分的抗BCMA CAR模拟物的转基因HeLa细胞的Q2象限(图16C;Q2值为5.03)、示出了与用APC标记的抗铰链抗体和用PE标记的CD38 Fc结合的非转基因HeLa细胞的Q2象限(图16D;Q2值为0.11)、示出了与用APC标记的抗铰链抗体和用PE标记的CD38 Fc结合的表达处于未切割状态的具有可活化的掩蔽部分的抗CD38 DAR模拟物[HC-CH3(IgG4)MMP2/9,LC-CH3(IgG4)MMP2/9]的转基因HeLa细胞的Q2象限(图16D;Q2值为9.19)、示出了与用APC标记的抗铰链抗体和用PE标记的CD38Fc结合的表达处于未切割状态的具有可活化的掩蔽部分的抗CD38 DAR模拟物[HC-CH3 臼MMP2/9,LC-CH3 杵MMP2/9]的转基因HeLa细胞的Q2象限(图16F;Q2值为5.66)进行比较。

[0731] 实施例15:具有可活化的掩蔽部分的各种抗EGFR二聚抗原受体(DAR)模拟物的成像细胞结合测定。

[0732] Incucyte成像系统(来自赛多利斯公司(Sartorius))用于在存在或不存在来自MM1R人多发性骨髓瘤细胞的条件培养基的情况下评估处于未切割状态的具有可活化的掩蔽部分的抗EGFR DAR模拟物[HC-CH MMP2/9,LC-CLκMMP2/9]的掩蔽和结合能力。

[0733] 在第一天,用携带编码缺乏可活化的掩蔽部分的对照抗EGFR抗体或编码具有可活化的掩蔽部分的抗EGFR DAR模拟物的序列的表达载体转染大约 2×10^4 个HeLa细胞,并且使用如上述实施例11中所描述的FUGENE6试剂。在第二天,用来自新鲜培养的肿瘤细胞系MM1R的MM1R条件培养基代替培养基并在37℃下温育24小时。在第三天,将HeLa细胞在室温下用4%多聚甲醛固定15分钟,然后用DPBS洗涤两次。将细胞在室温下用0.5% Triton X-100处理10分钟,然后用DPBS洗涤两次。用3% BSA/DPBS进行阻断步骤并用小鼠抗人LCκ/山羊抗小鼠Alexa 594和EGFR Fc标记的Alexa 488进行双染色。

[0734] 图17示出了表达抗EGFR DAR模拟物的转基因HeLa细胞与抗人κAPC或Alexa488标记的EGFR抗原之间的结合/染色。图17中的显微镜图像(从左至右的列)示出了明场图像、用抗HuκAPC染色和用Alex 488标记的EGFR抗原染色的图像。

[0735] 在图17中,顶行示出了表达缺乏掩蔽部分的抗EGFR DAR模拟物的阳性对照转基因HeLa细胞的图像。

[0736] 第二行示出了不表达抗EGFR抗体的阴性对照非转基因HeLa细胞的图像。

[0737] 第三行示出了在不存在来自MM1R人多发性骨髓瘤细胞的条件培养基的情况下的表达处于未切割状态的具有掩蔽部分的抗EGFR DAR模拟物[HC-CH MMP2/9,LC-CLκMMP2/9]的转基因HeLa细胞的图像。表达不具有掩蔽部分的DAR模拟物的对照HeLa细胞(顶行)与表达具有掩蔽部分的DAR模拟物的HeLa细胞(第三行)之间的APC染色强度相似,这显示了这些转基因HeLa细胞表达相似水平的抗EGFR DAR模拟物。表达缺乏掩蔽部分的DAR模拟物的阳性对照转基因HeLa细胞的Alex 488染色强度与表达处于未切割状态的具有掩蔽部分的DAR模拟物的转基因HeLa细胞的染色强度相比较,这显示了完整的掩蔽部分减少了DAR模拟物与EGFR抗原之间的结合。

[0738] 底行示出了在存在来自MM1R人多发性骨髓瘤细胞的条件培养基的情况下的表达

处于未切割状态的具有掩蔽部分的抗EGFR DAR模拟物[HC-CH MMP2/9,LC-CL κ MMP2/9]的转基因HeLa细胞的图像。表达具有掩蔽部分的DAR模拟物的HeLa细胞之间的Alex 488染色强度在不存在和存在MM1R条件培养基的情况下是相似的,这显示了条件培养基不含有足够水平的MMP9蛋白酶以切割可活化的掩蔽部分并且因此掩蔽部分是完整的,这减少了DAR模拟物与EGFR抗原之间的结合。

[0739] 实施例16:ADCC测定中的NK细胞毒性:

[0740] 进行ADCC测定以确定具有可活化的掩蔽部分的各种抗EGFR IgG型抗体的EC50值。使用EASYSEP人NK细胞富集试剂盒(干细胞技术有限公司(StemCell Technologies),目录编号:19055)从PBMC中纯化NK(自然杀伤)细胞并在存在20-50IU/ml IL2的情况下在RPMI 10% FBS中温育。将EGFR阳性肿瘤细胞系H292细胞(前一天CFSE标记的)以15,000个细胞/孔接种在96孔板中。将对照抗EGFR IgG型抗体或处于未切割状态的具有掩蔽部分的各种抗EGFR IgG型抗体在PBS缓冲液中连续稀释并以从100nM至1pM(0.000001nM)的递减浓度添加到96孔板的H292细胞中,然后温育20分钟。将NK细胞添加到每个孔中,使得E:T比率(效应细胞NK:靶细胞H292)为1:1,并将板在组织培养室中温育大约14小时。用FACs检测使用膜联蛋白-V染色试剂测定的凋亡靶细胞的百分比,同时对CFSE标记的靶H292细胞群进行门控(参见图18)。确定EC50值并将其在下表34中列出。

[0741] ADCC测定的结果显示了处于未切割状态的具有可活化的掩蔽部分的抗EGFR IgG型抗体[HC-CH1 MMP2/9,LC-CL λ MMP2/9]的EC50值是对照抗EGFR IgG抗体的约7倍,并且处于未切割状态的具有可活化的掩蔽部分的抗EGFR IgG型抗体[HC-CH3 Δ MMP2/9,LC-CH3 Δ MMP2/9]或[HC-CH3 Δ 已缺失,LC-CH3 Δ 已缺失]的EC50值是对照抗EGFR IgG抗体的约70倍。

[0742] 表34:参见图18

[0743]	IgG型抗体:	EC50:
	对照抗EGFR IgG抗体	10.4pM
	[HC-CH3 Δ MMP2/9,LC-CH3 Δ MMP2/9]	713.2pM
	[HC-CH3 Δ 已缺失,LC-CH3 Δ 已缺失]	710.9pM
	[HC-CH1 MMP2/9,LC-CL λ MMP2/9]	74.5pM

[0744] 实施例17:具有可活化的掩蔽抗体并携带细胞内信号传导结构域的各种二聚抗原受体(DAR)的表达。

[0745] 使用FuGENE转染Phoenix-ECO(人胚胎肾细胞系)以表达具有可活化的掩蔽部分的抗EGFR DAR(具有细胞内信号传导结构域)。

[0746] 将编码抗EGFR掩蔽DAR前体多肽链的核酸克隆到MFG病毒载体中。将两百万个phoenix-ECO细胞接种在T25烧瓶中并在37℃、5% CO₂下培养过夜。第二天,将8 μ g DNA与24 μ L FuGENE(1:3比率)一起混合到phoenix-ECO细胞中并将细胞在37℃、5%CO₂下温育。在转染后48小时和96小时,通过以1600RPM旋转8分钟收获病毒上清液。病毒上清液用于转导PG13细胞。

[0747] 纤连蛋白包被的非组织处理的6孔板用于PG13转导。添加从phoenix-ECO收集的2mL病毒上清液并在室温下以2500RPM旋转2小时。抽吸病毒上清液,然后将60万个PG13细胞添加到2mL病毒上清液中。在室温下以2500RPM旋转1小时。将细胞在37℃、5% CO₂下温育过夜。第二天,重复进行转导。重复转导反应2-3次,直到DAR表达水平达到将DAR转导到T细胞

中所需的约90%。使用1:200APC抗人κLC通过流式细胞术检测DAR表达水平。分别在转导后48小时、72小时和96小时收获PG13病毒上清液。为了转导T细胞,使用新鲜制备的PG13病毒上清液或储存在-80℃下用于将来的T细胞转导反应。

[0748] 用人CD3/CD28 T细胞活化剂处理PBMC(从人血中新鲜分离的或冷冻的):3μL T细胞活化剂每百万个PBMC。在活化后的第2或第3天,通过流式细胞术检查CD3群和T细胞活化标记CD25。通常,CD3+群大于85%。第2或第3天活化的T细胞用于DAR转导。

[0749] 从PG细胞中收集2mL病毒上清液并添加到纤连蛋白包被的6孔板中,并在室温下以2500RPM旋转2小时。抽吸病毒上清液,然后将100万个活化的T细胞添加到2mL病毒上清液中。以2500RPM旋转1小时。将经转导的活化的T细胞温育3-4小时,然后将培养基换成T细胞培养基+300IU/ml IL2。将经转导的T细胞在37℃、5% CO₂下温育过夜。重复T细胞转导1-4次,直到达到最佳DAR表达。

[0750] 抗EGFR掩蔽DAR包括:第一多肽链和第二多肽链,其中(a)所述第一多肽链包括:(i)具有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的第一掩蔽部分;(ii)可被MMP9或uPA切割,或携带不可切割接头,并分别具有SEQ ID NO:32、52或34的氨基酸序列的第一肽接头;(iii)具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的一部分的抗体重链可变区(VH);(iv)具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的一部分的抗体重链恒定区(CH);(v)具有SEQ ID NO:44的氨基酸序列的CD28铰链区;(vi)具有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的CD28跨膜区(TM);以及(vii)包括4-1BB和CD3ζ细胞内信号传导结构域并分别具有SEQ ID NO:48和50的氨基酸序列的细胞内信号传导区;其中所述(b)第二多肽链包括:(i)具有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的第二掩蔽部分;(ii)可被MMP9或uPA切割,或携带不可切割接头,并分别具有SEQ ID NO:32、52或34的氨基酸序列的第二肽接头;(iii)具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的一部分的抗体轻链可变区(VL);以及(iv)具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的一部分的抗体轻链恒定区(CL)。这些抗EGFR掩蔽DAR含有第一细胞内信号传导结构域和第二细胞内信号传导结构域,但缺少第三细胞内结构域(图3A所示的DAR分子的实施方式)。

[0751] 对照抗EGFR DAR:转基因T细胞表达含有第一多肽链、自我切割序列(例如,T2A)和第二多肽链,并且包括SEQ ID NO:53的氨基酸序列(参见图23)的对照抗EGFR DAR前体多肽链。T2A序列介导的前体分子的切割产生第一多肽链和第二多肽链,所述第一多肽链和所述第二多肽链被组装以形成具有来自4-1BB和CD3ζ的细胞内信号传导结构域的膜嵌入的DAR。缺乏Ig γ-1CH3掩蔽部分和缺乏可切割接头的抗EGFR掩蔽DAR的预测的第一多肽链包括SEQ ID NO:54的氨基酸序列。缺乏Ig γ-1CH3掩蔽部分和缺乏可切割接头的抗EGFR掩蔽DAR的预测的第二多肽链包括SEQ ID NO:55的氨基酸序列。重链和轻链前导序列以粗体和下划线标出。

[0752] 具有MMP2/9可切割接头的抗EGFR DAR:转基因T细胞表达含有第一多肽链、自我切割序列(例如,T2A)和第二多肽链,并且包括SEQ ID NO:56的氨基酸序列(参见图24)的抗EGFR DAR前体多肽链。T2A序列介导的前体分子的切割产生第一多肽链和第二多肽链,所述第一多肽链和所述第二多肽链被组装以形成具有来自4-1BB和CD3ζ的细胞内信号传导结构域的膜嵌入的DAR。携带MMP2/9可切割接头连接的Ig γ-1CH3掩蔽部分的抗EGFR掩蔽DAR的预测的第一多肽链(表35)包括SEQ ID NO:57的氨基酸序列。携带MMP2/9可切割接头连接的Ig γ-1CH3掩蔽部分的抗EGFR掩蔽DAR的预测的第二多肽链包括SEQ ID NO:58的氨基酸序

列。重链和轻链前导序列以粗体和下划线标出。MMP2/9可切割接头序列以斜体和灰色突出显示。

[0753] 具有uPA可切割接头的抗EGFR DAR:转基因T细胞表达含有第一多肽链、自我切割序列(例如,T2A)和第二多肽链,并且包括SEQ ID NO:59的氨基酸序列(参见图25)的抗EGFR DAR前体多肽链。T2A序列介导的前体分子的切割产生第一多肽链和第二多肽链,所述第一多肽链和所述第二多肽链被组装以形成具有来自4-1BB和CD3ζ的细胞内信号传导结构域的膜嵌入的DAR。携带uPA可切割接头连接的Ig γ -1CH3掩蔽部分的抗EGFR掩蔽DAR的预测的第一多肽链(表35)包括SEQ ID NO:60的氨基酸序列。携带uPA可切割接头连接的Ig γ -1CH3掩蔽部分的抗EGFR掩蔽DAR的预测的第二多肽链包括SEQ ID NO:61的氨基酸序列。重链和轻链前导序列以粗体和下划线标出。uPA可切割接头序列以斜体和灰色突出显示。

[0754] 具有不可切割接头的抗EGFR DAR:转基因T细胞表达含有第一多肽链、自我切割序列(例如,T2A)和第二多肽链,并且包括SEQ ID NO:62的氨基酸序列(参见图26)的抗EGFR DAR前体多肽链。T2A序列介导的前体分子的切割产生第一多肽链和第二多肽链,所述第一多肽链和所述第二多肽链被组装以形成具有来自4-1BB和CD3ζ的细胞内信号传导结构域的膜嵌入的DAR。携带不可切割接头连接的Ig γ -1CH3掩蔽部分的抗EGFR掩蔽DAR的预测的第一多肽链(表35)包括SEQ ID NO:63的氨基酸序列。携带不可切割接头连接的Ig γ -1CH3掩蔽部分的抗EGFR掩蔽DAR的预测的第二多肽链包括SEQ ID NO:64的氨基酸序列。重链和轻链前导序列以粗体和下划线标出。uPA可切割接头序列以斜体和灰色突出显示。

[0755] 表35:

[0756]	抗 EGFR 掩蔽 DAR 构建体	肽接头序列:
	[HC-CH3 MMP2/9, LC-CH3 MMP2/9]	LSLSPGKGGPLGVRGG SEQ ID NO: 32
	[HC-CH3 uPA, LC-CH3 uPA]	GLSGRSDNHG SEQ ID NO: 52
	[HC-CH3 NC, LC-CH3 NC]	LSLSPGKGGSGGGSGG SEQ ID NO: 34

[0757] 实施例18:表征具有可活化的掩蔽抗体的抗EGFR二聚抗原受体 (DAR)。

[0758] 在具有300IU/mL I-2的T细胞扩增SFM培养基中培养上述实施例17中所描述的抗EGFR掩蔽DAR。每2-3天更换一次培养基。内部自行制备了与Alexa-488缀合的EGFR-his。将大约50k DAR-T细胞或掩蔽DAR-T细胞洗涤一次并重悬于50μL结合缓冲液中,添加1:200APC抗人κ和1:100EGFR-Alexa-488并在冰上温育30分钟。用PBS加2%FBS将细胞冲洗一次。使用IQueScreener通过流式细胞术测定细胞。图19中示出了结果。

[0759] 实施例19:具有可活化的掩蔽抗体的抗EGFR二聚抗原受体 (DAR) 针对表达EGFR的肿瘤细胞系的细胞毒性。

[0760] 使用xCELLigence仪器通过实时细胞毒性测定 (RTCA) 进行细胞毒性测定。细胞系A549用作靶细胞系。A549是表达高水平EGFR的非小细胞肺癌 (NSCLC) 肿瘤细胞系。将10k/孔的A549细胞接种在E板中并温育24小时。以效应子与靶标为5:1或20:1的比率添加对照抗EGFR DAR T细胞和抗EGFR掩蔽DAR T细胞。对细胞指数值进行至多72小时的动力学监测。这种监测显示了细胞活力。阴性对照为不包括效应子(仅A549细胞)和活化的T细胞。标准化的细胞指数是在添加效应细胞的时间点(参见图20A和21A)。图20A和21A中分别示出了5:1和20:1E:T比率的结果。

[0761] 实施例20:具有可活化的掩蔽抗体的抗EGFR二聚抗原受体 (DAR) 的细胞因子释放测定

[0762] 保存来自上述实施例19中所描述的细胞毒性测定的上清液并用于进行细胞因子释放测定。使用了IFN- γ HTFR测定试剂盒。用稀释缓冲液将样品和IFN标准品按1:3稀释。将16 μ L样品或IFN- γ 标准品添加到96W小体积白板中并添加4 μ L混合的供体和受体抗体。将板密封并在室温下温育至少2小时,然后使用TECAN上的HTRF设置读取板。基于标准曲线计算IFN- γ 的量。图22A和22B中示出了结果。

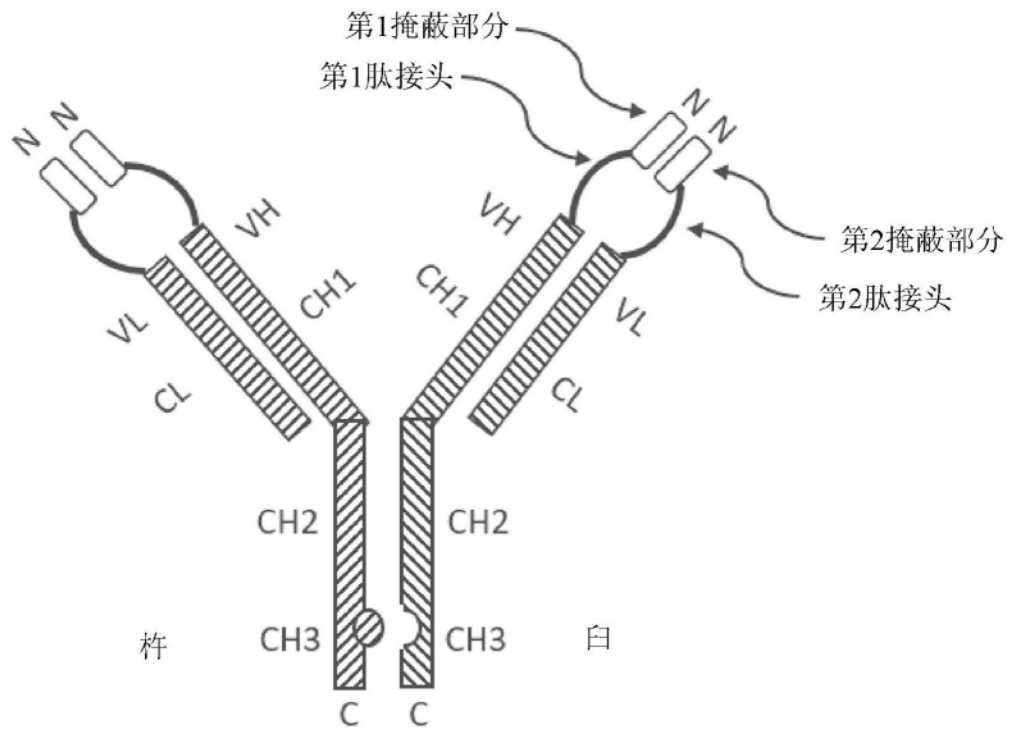


图1

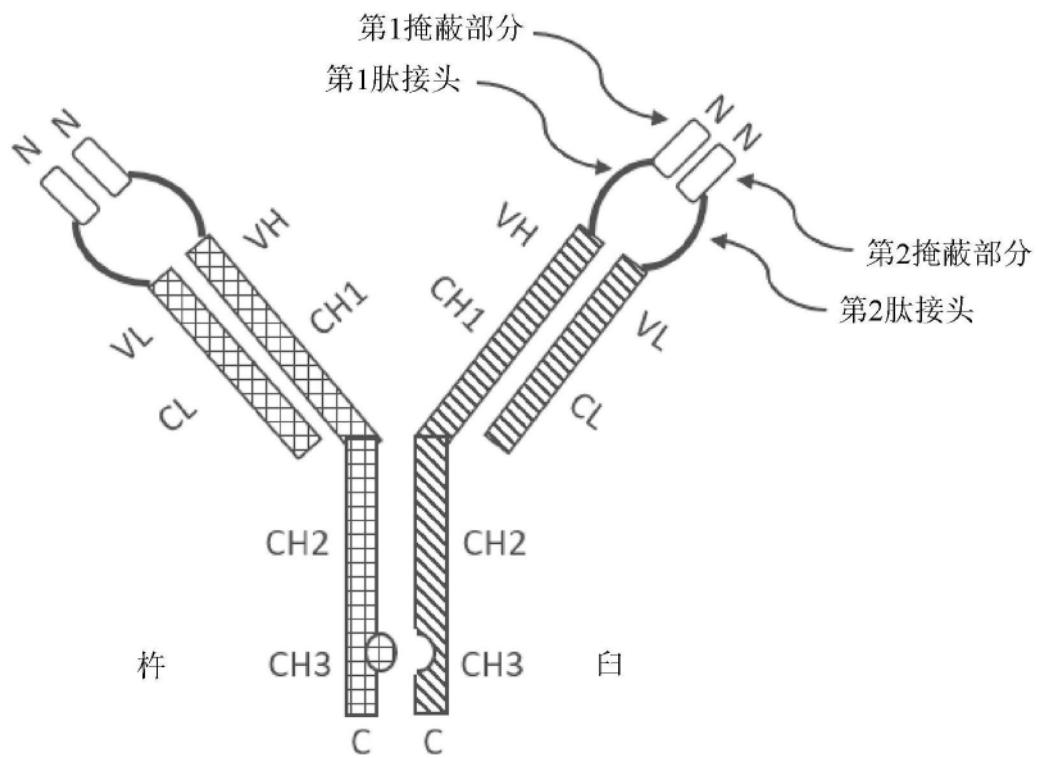


图2

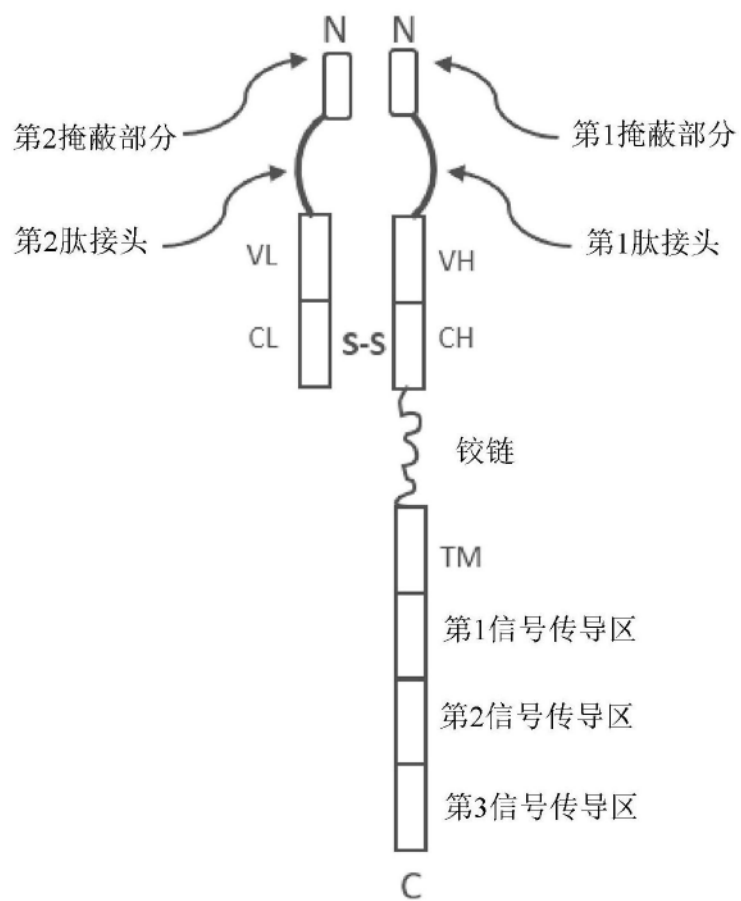


图3A

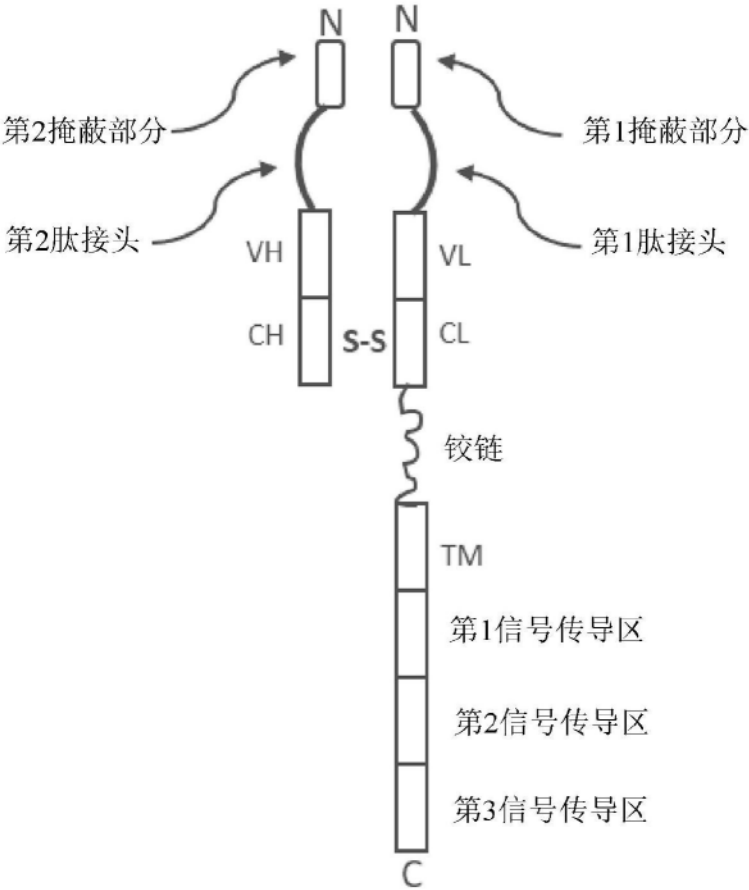


图3B



图4A



图4B



图4C

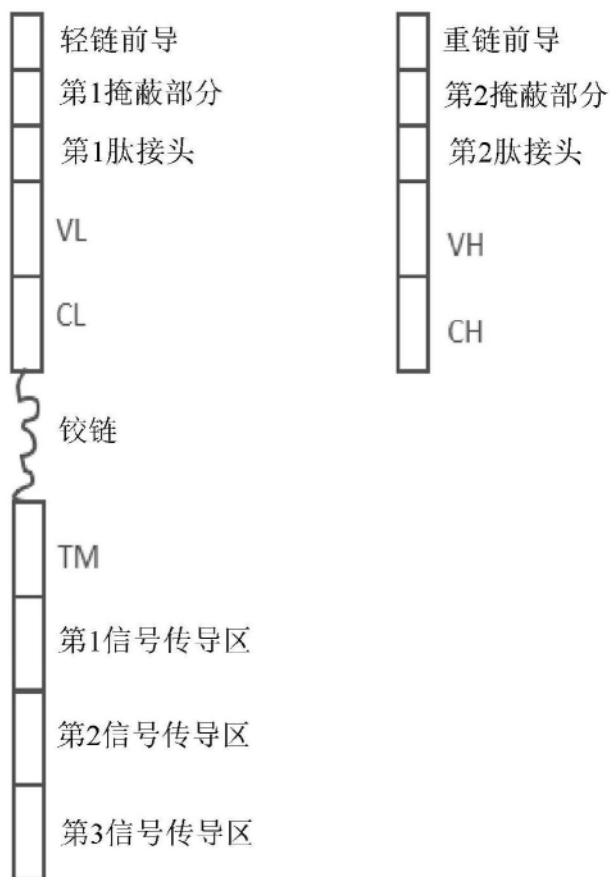


图4D

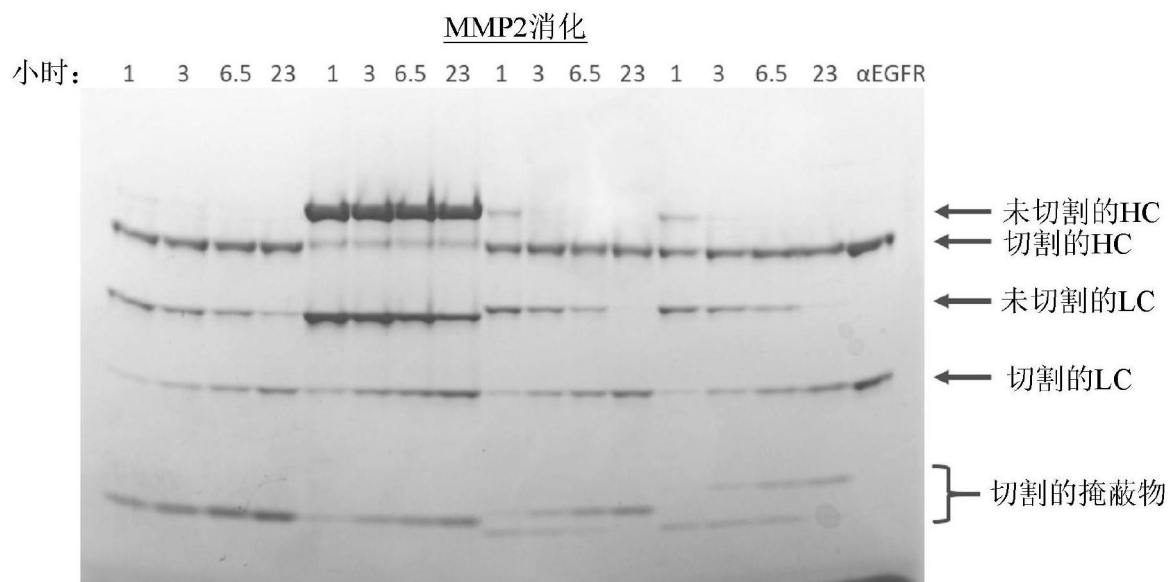


图5A

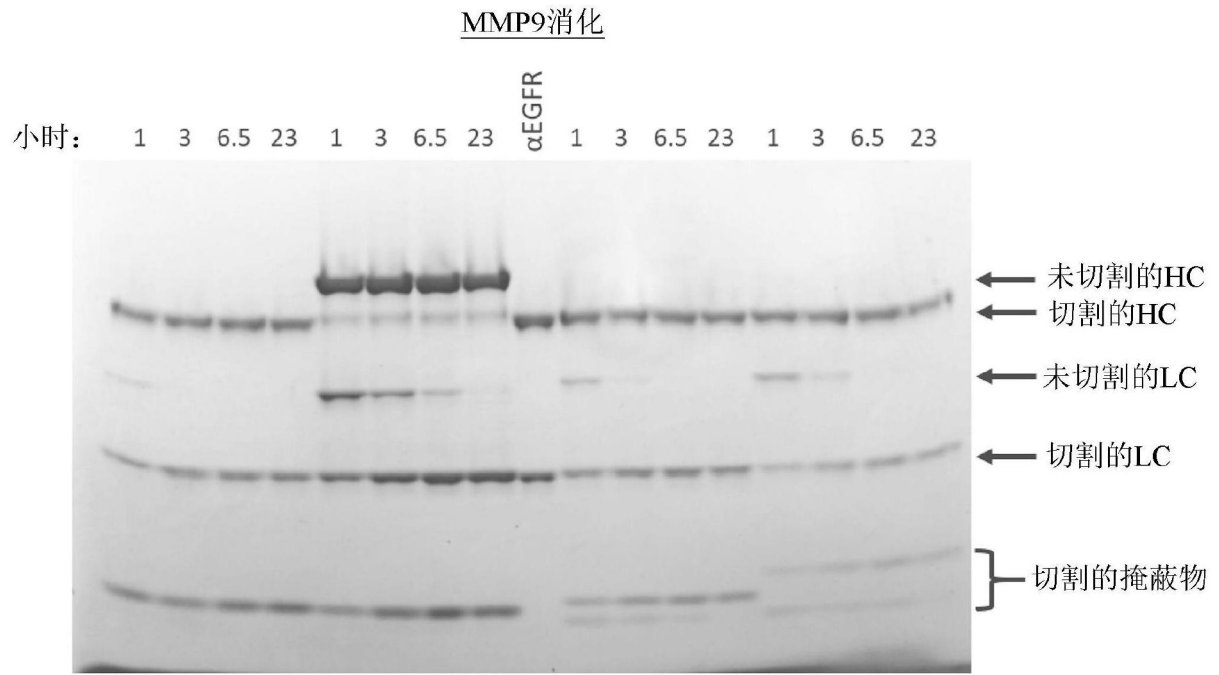


图5B

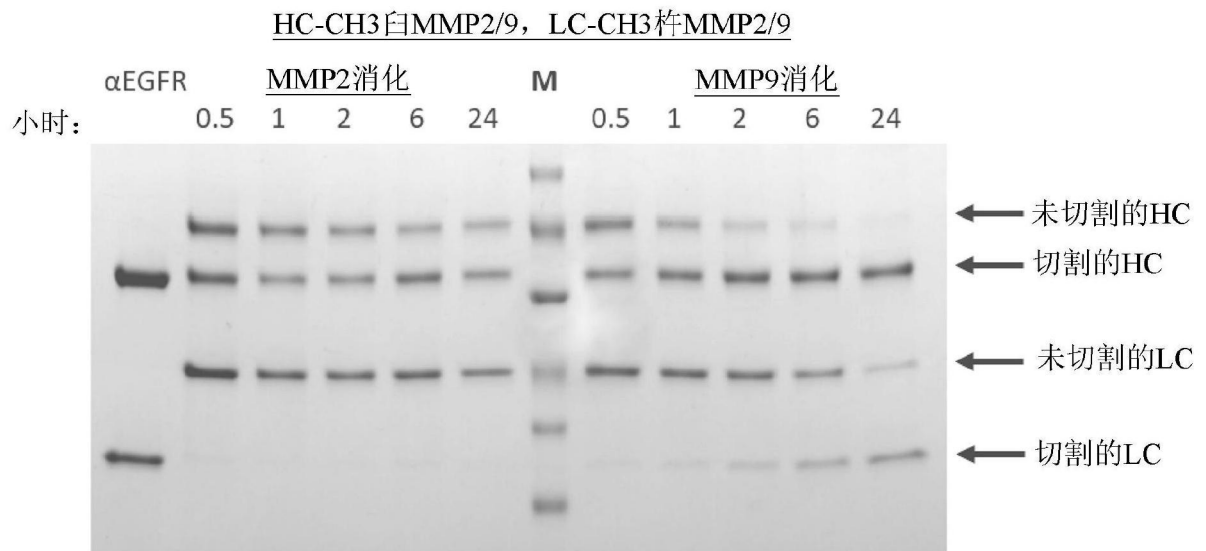


图6A

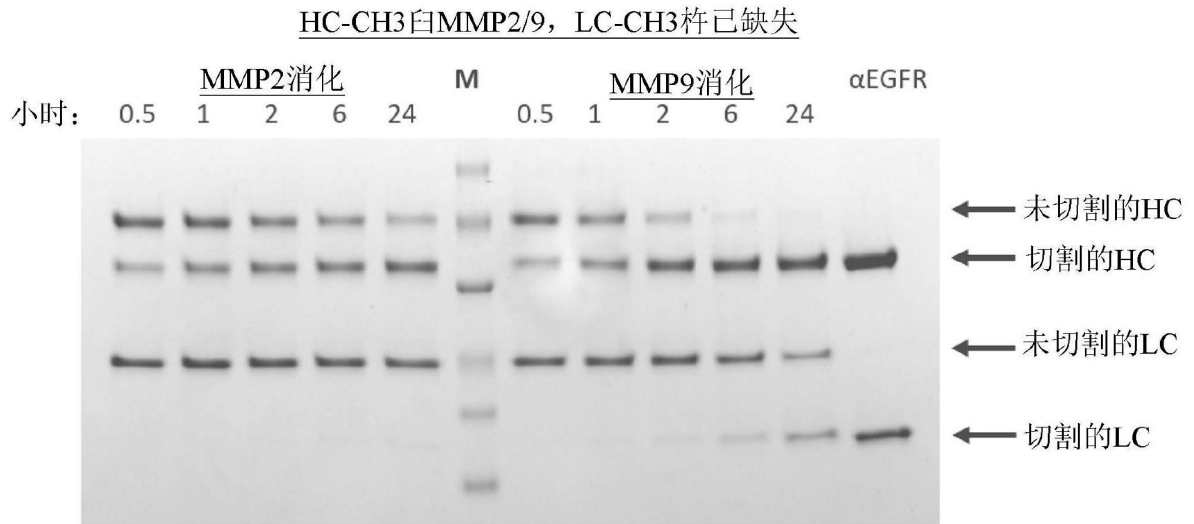


图6B

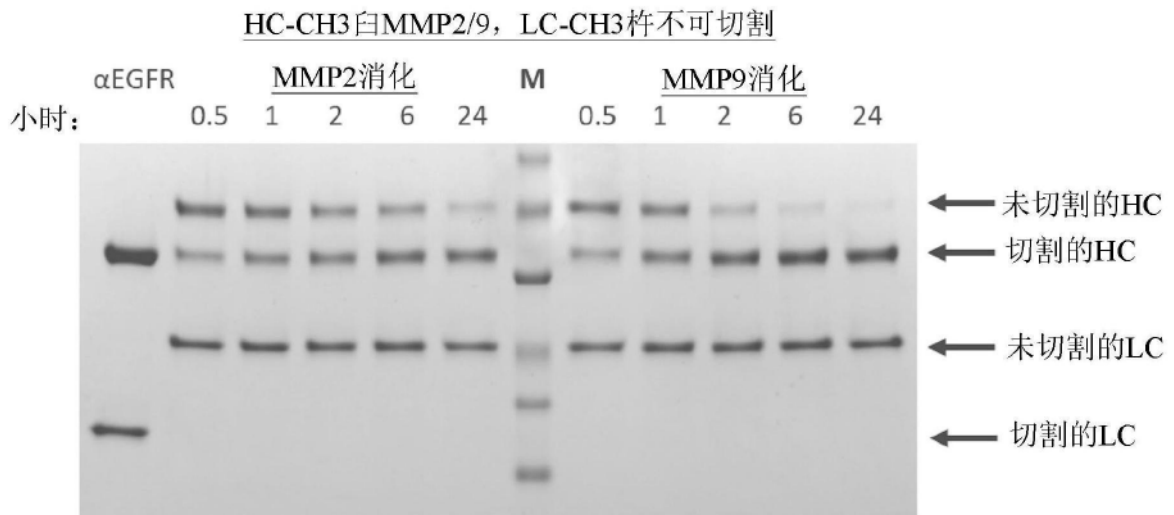


图6C

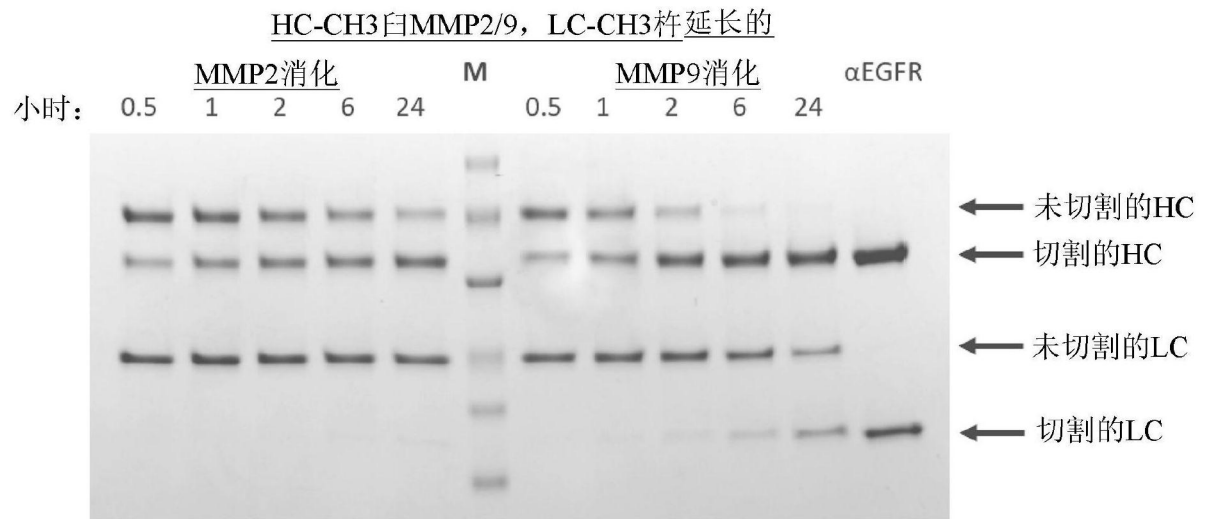


图6D

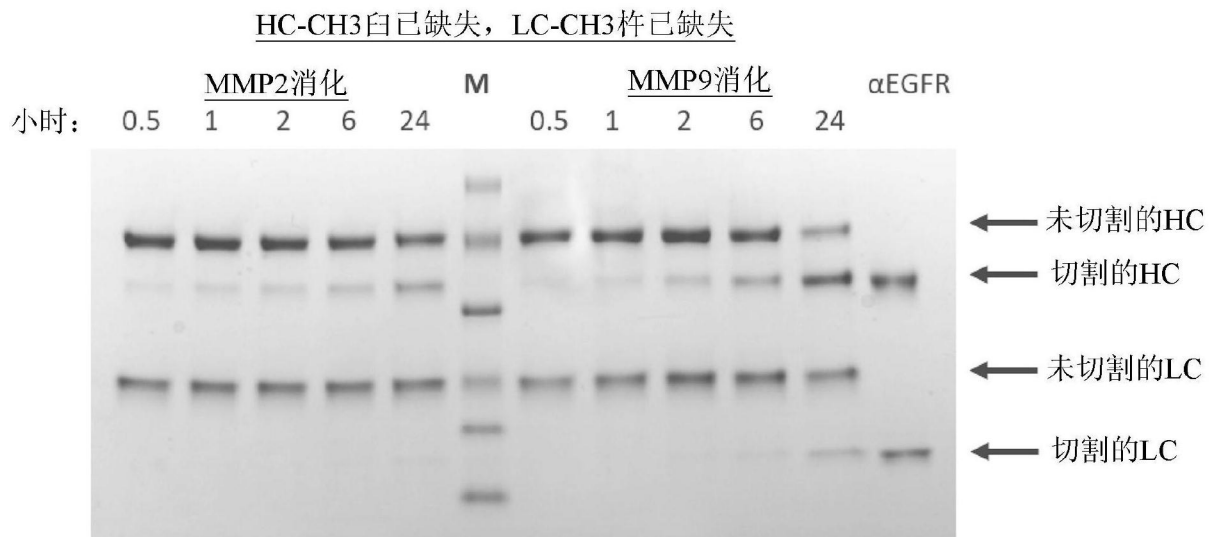


图6E

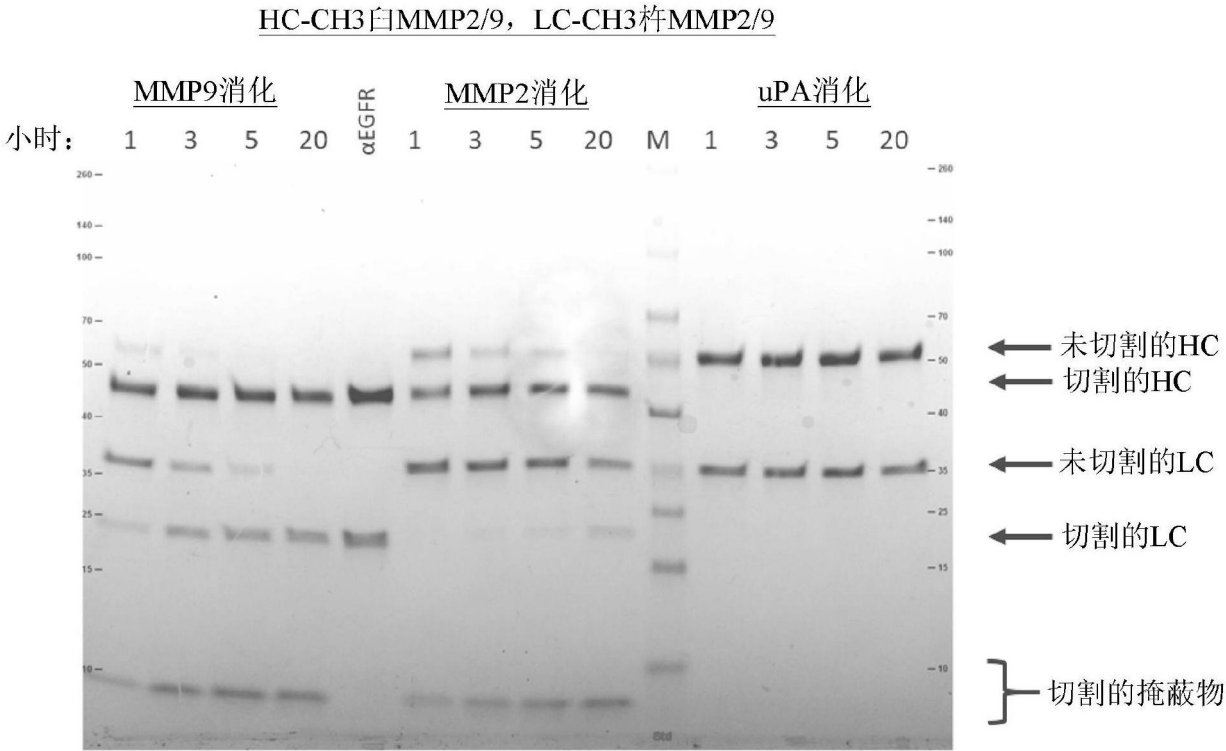


图7A

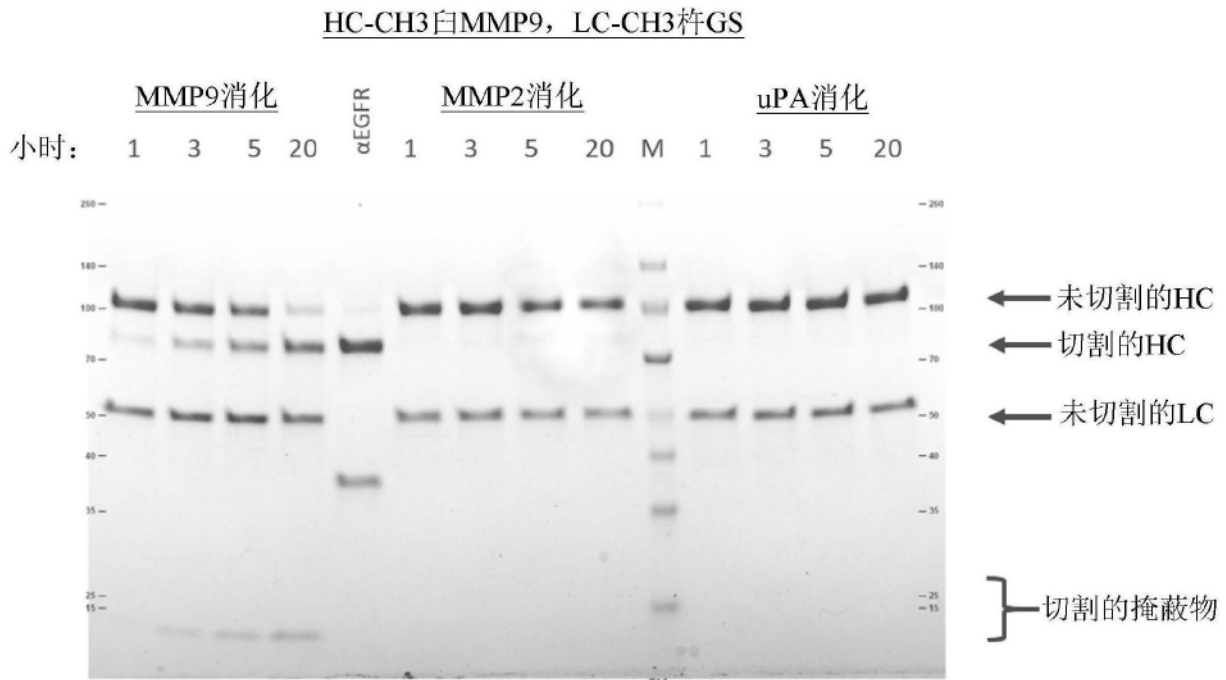


图7B

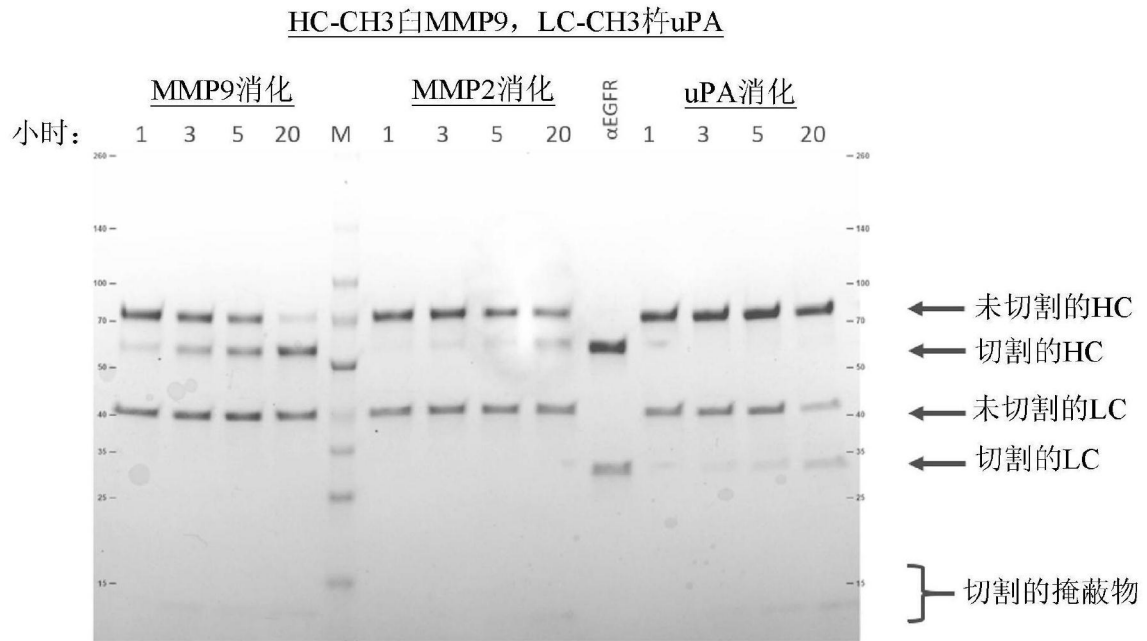


图7C

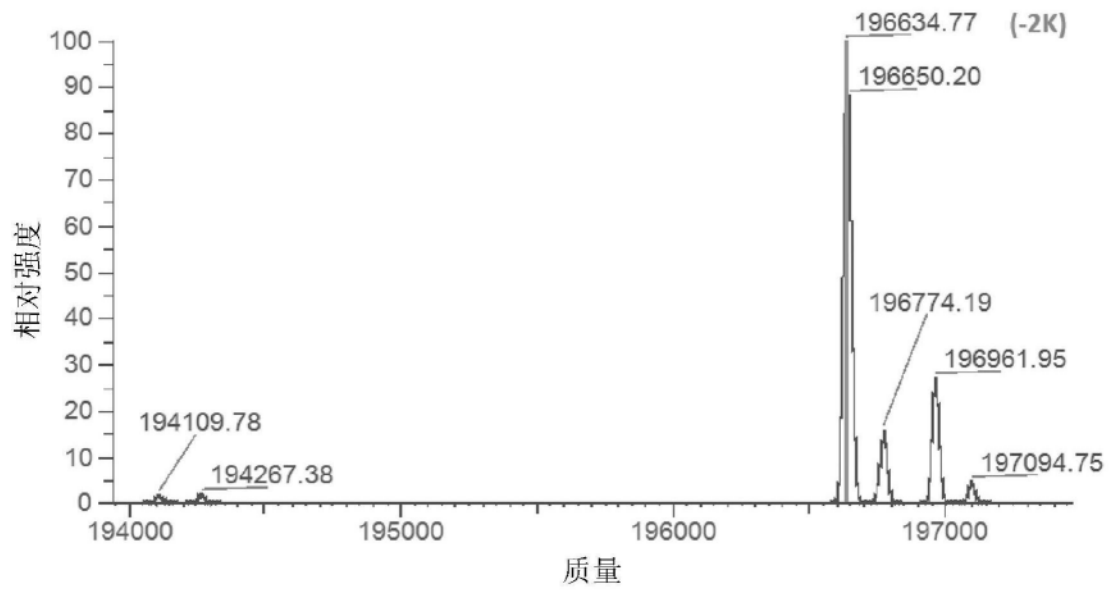


图8A

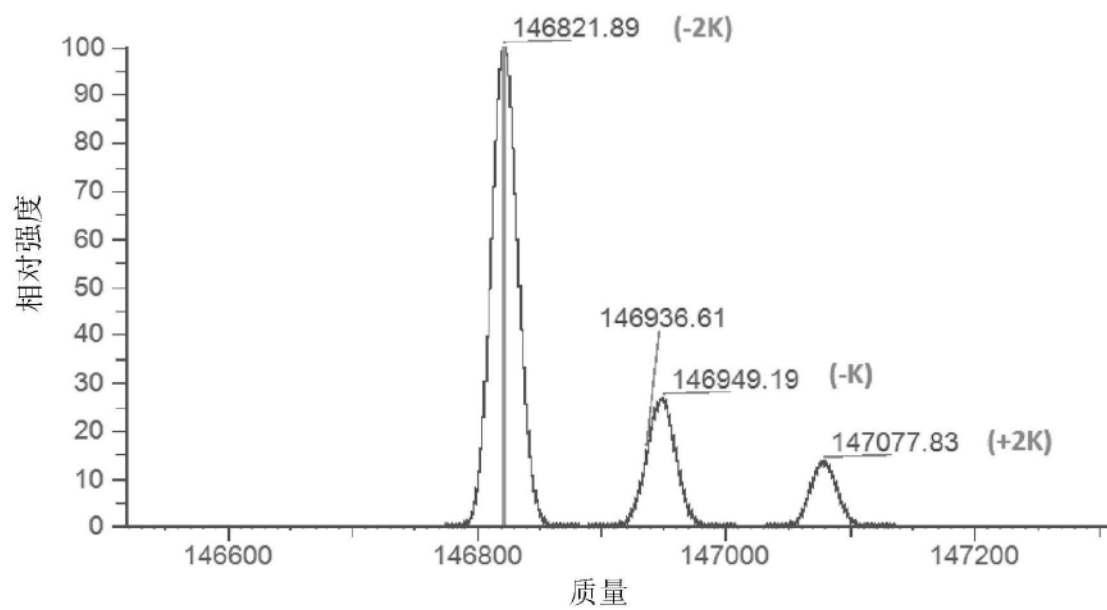


图8B

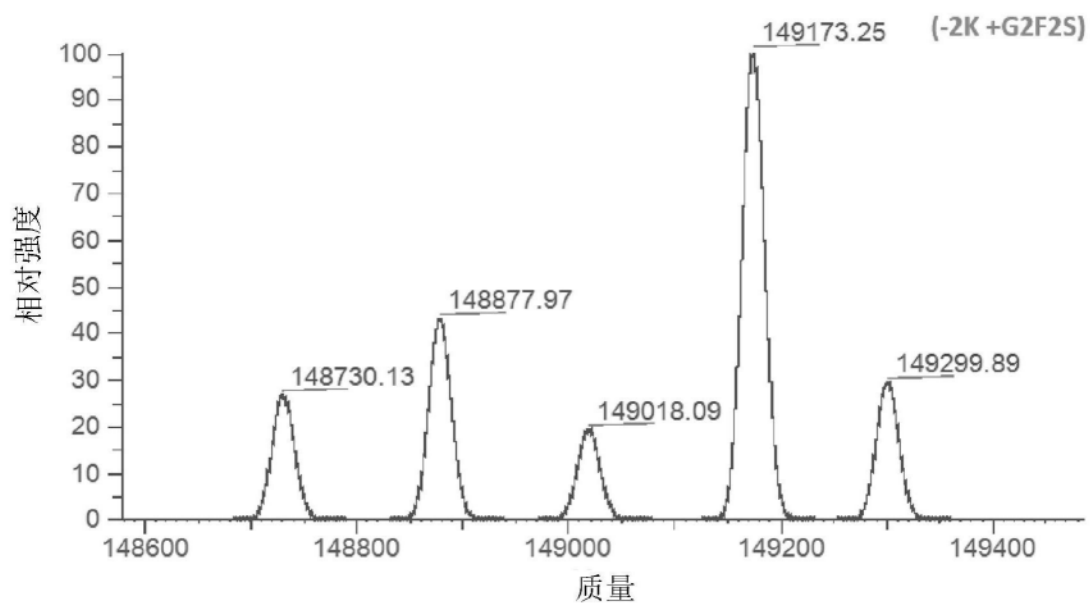


图8C

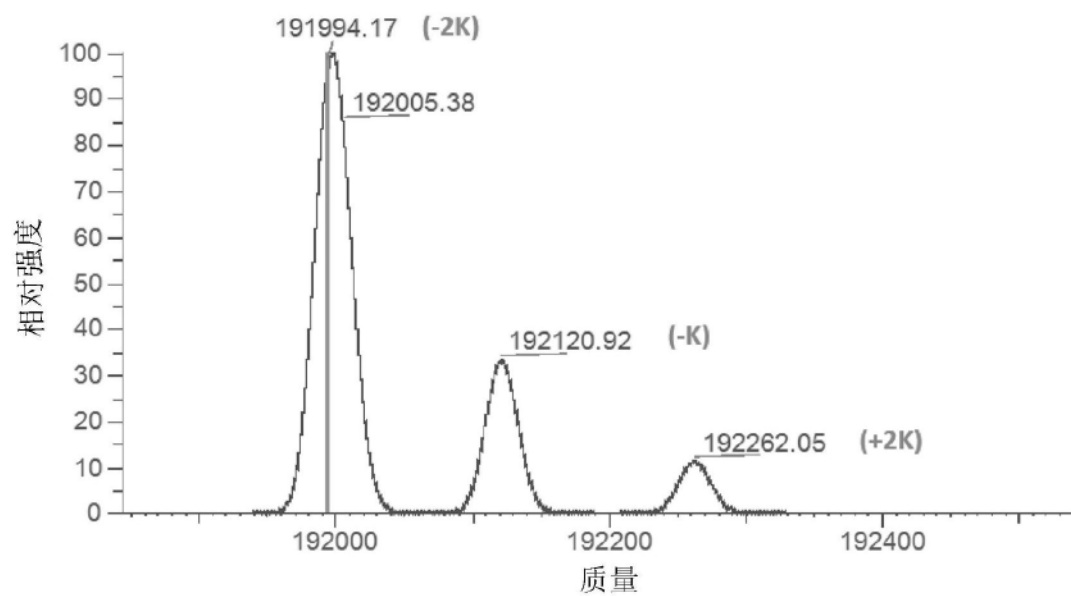


图9A

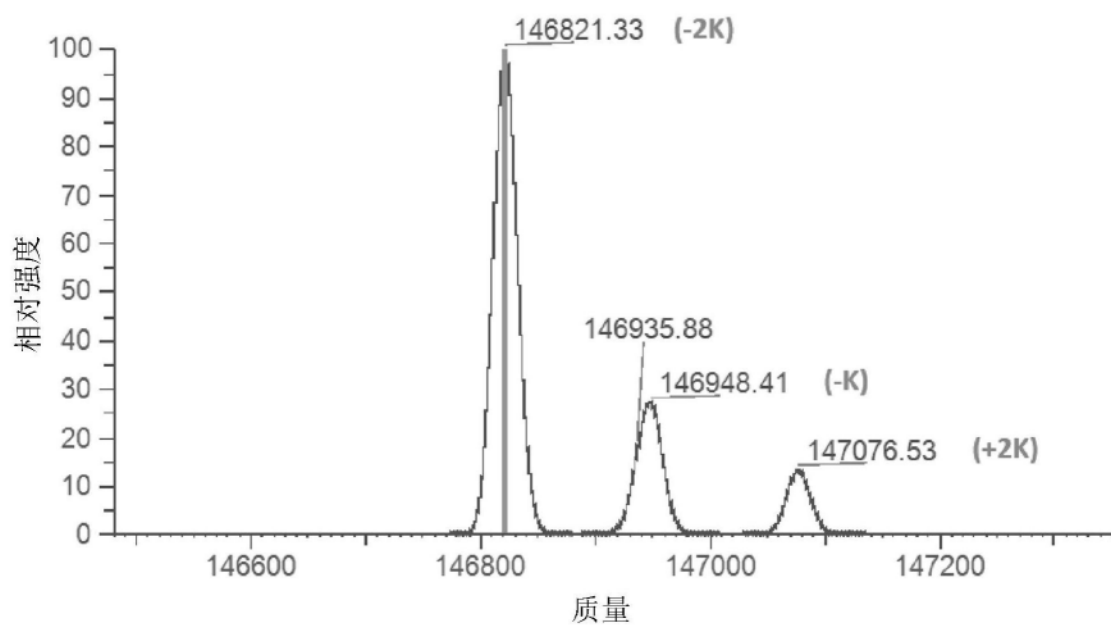
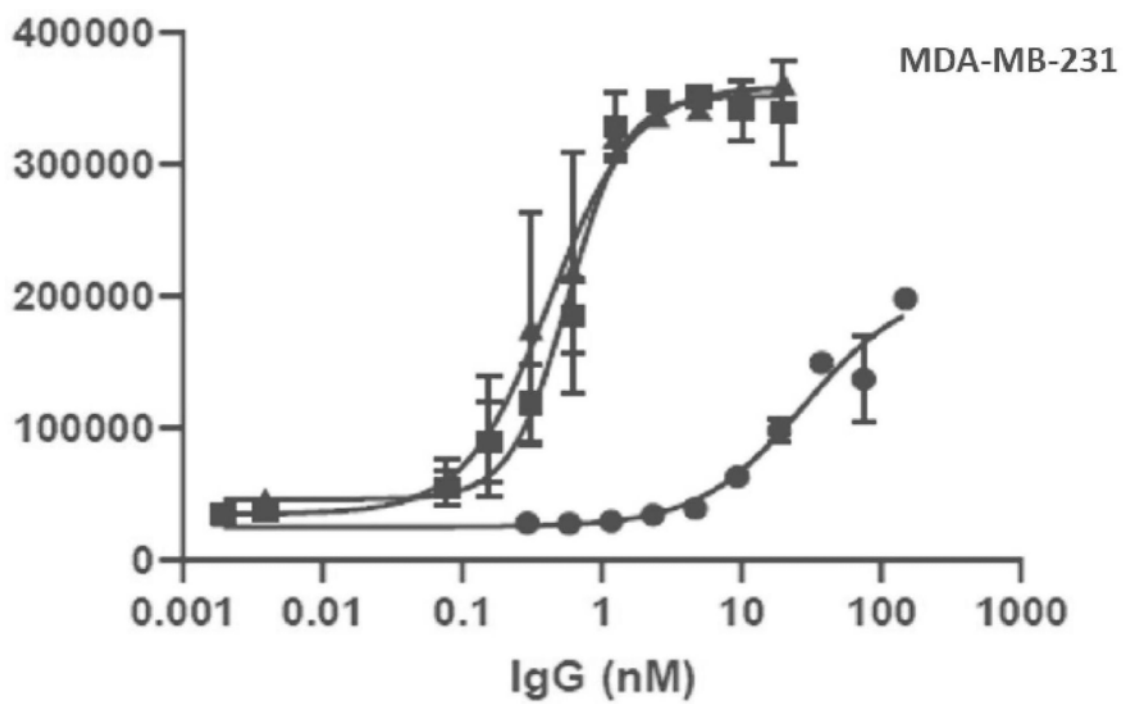
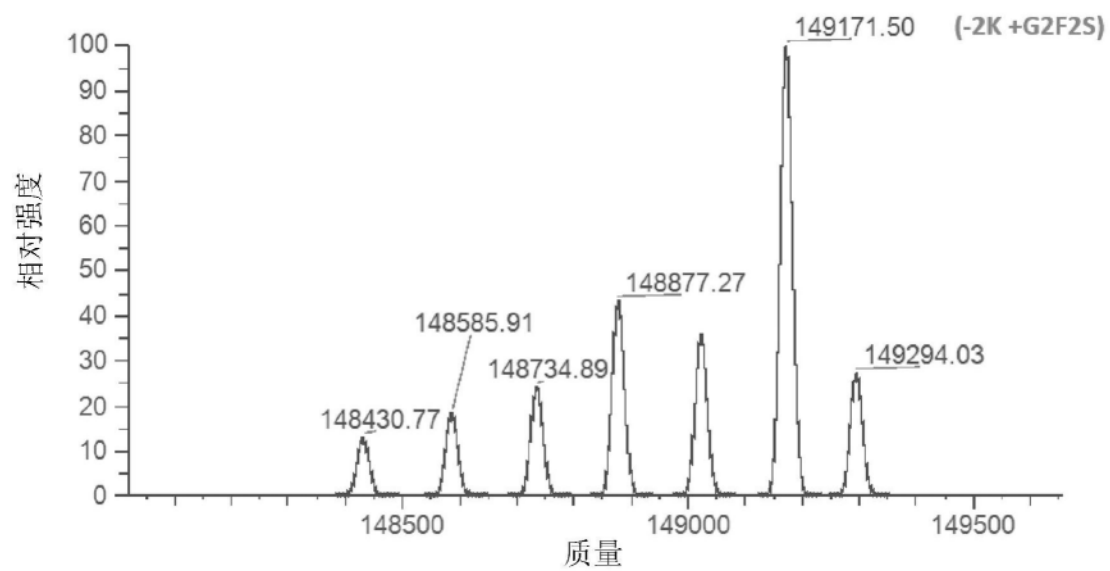


图9B



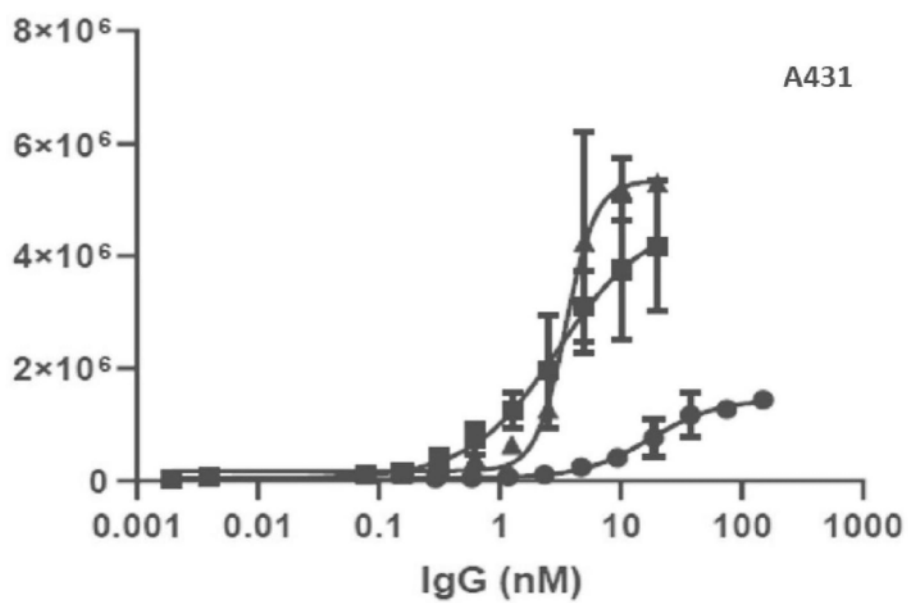


图10B

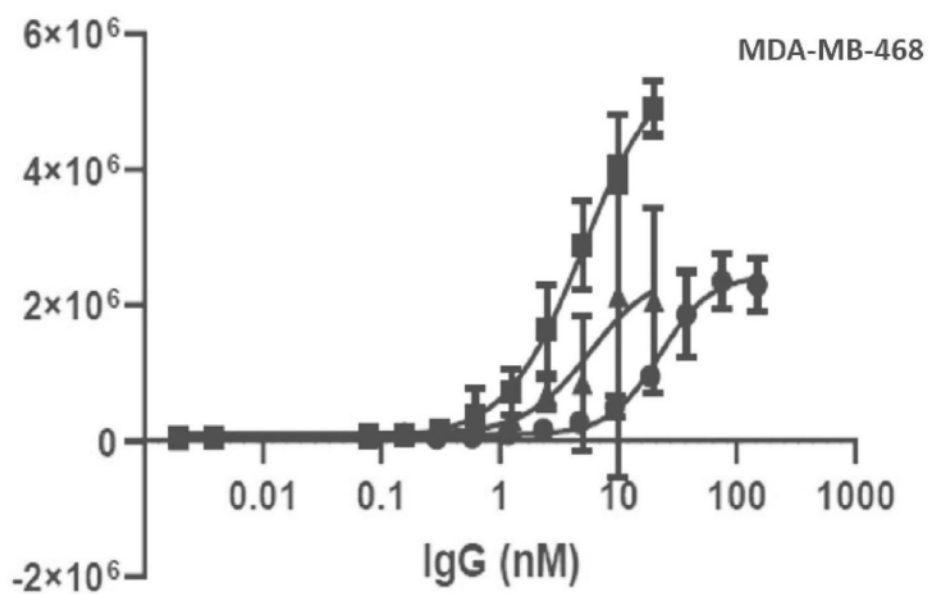


图10C

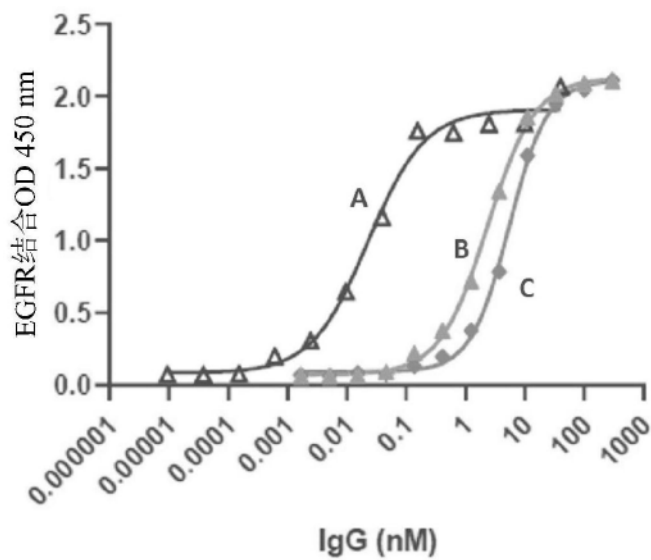


图11A

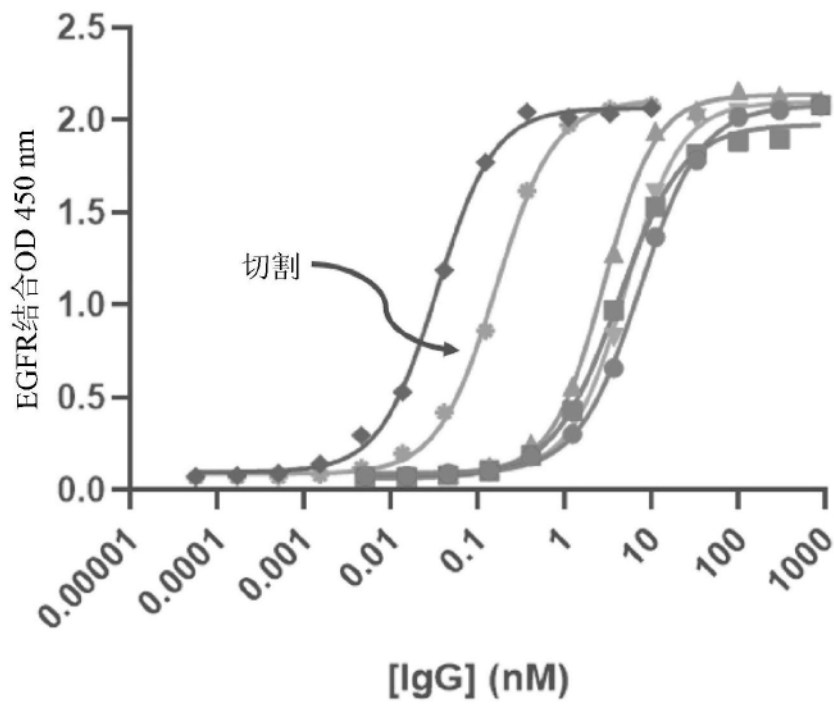


图11B

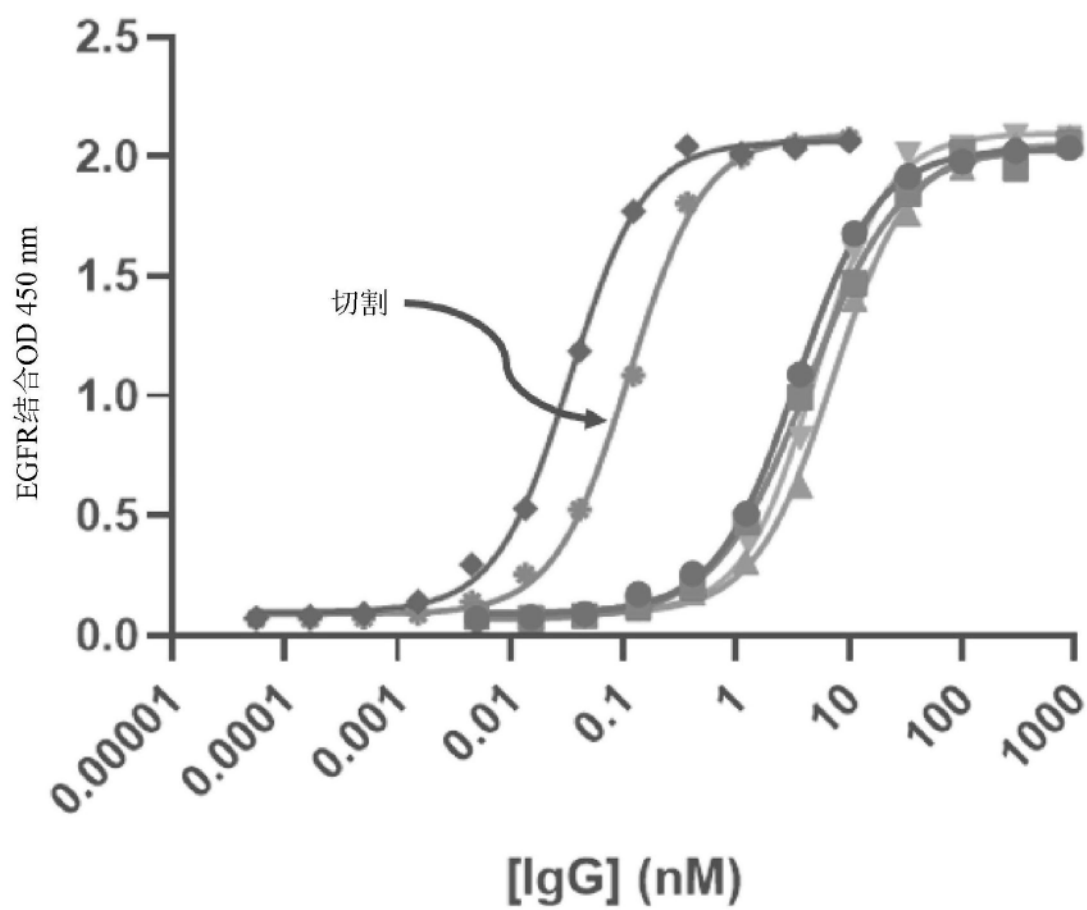


图11C

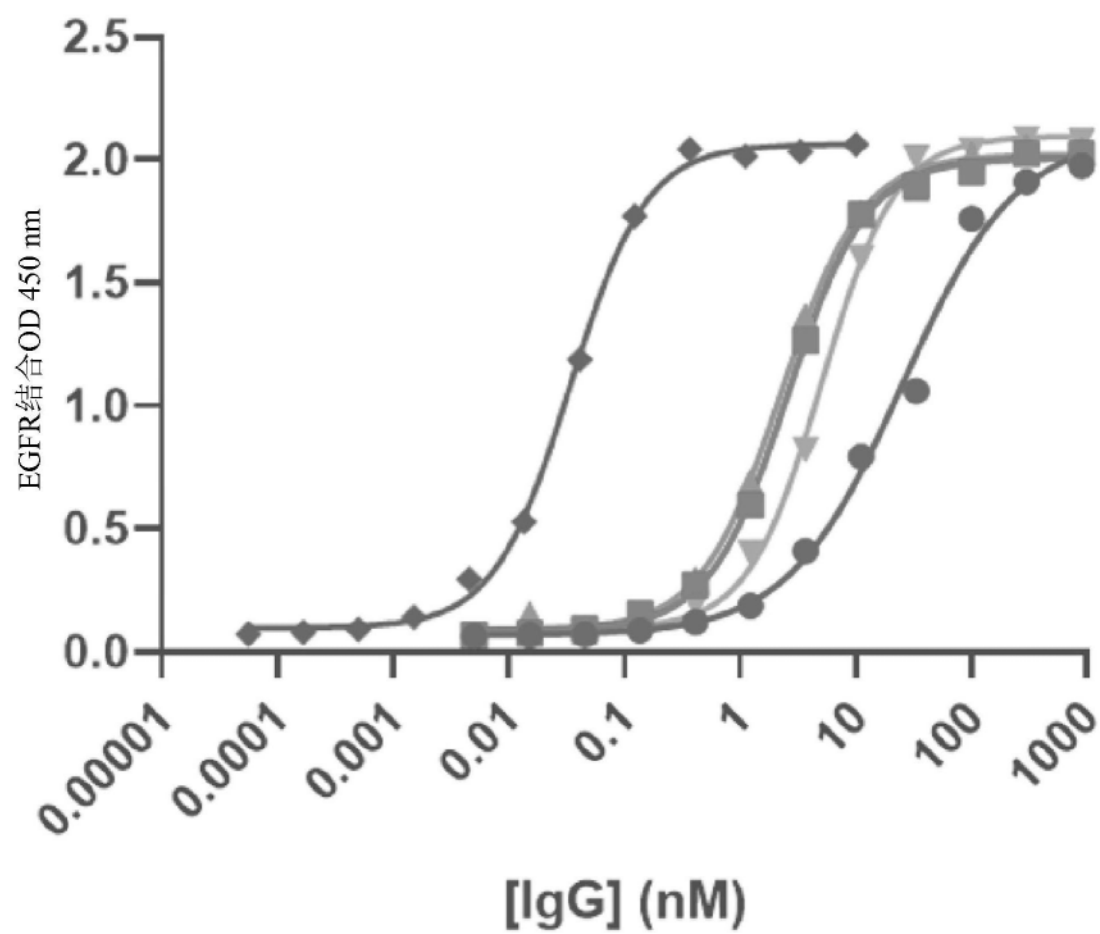


图11D

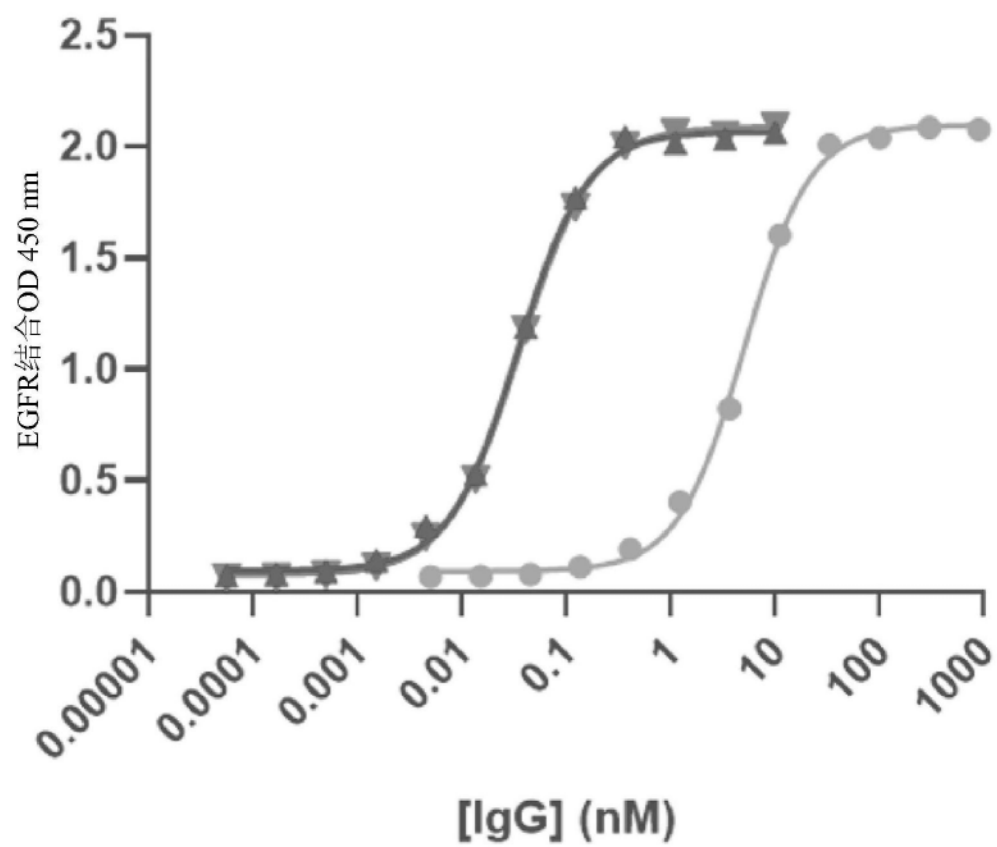


图11E

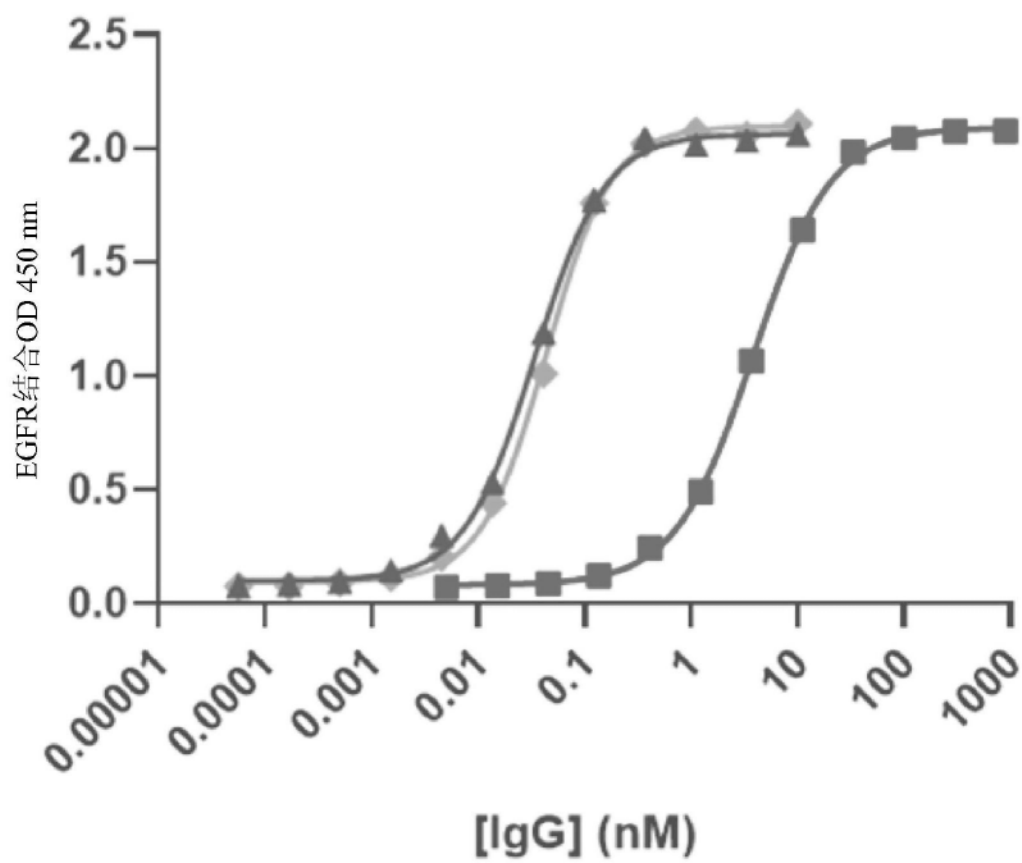


图11F

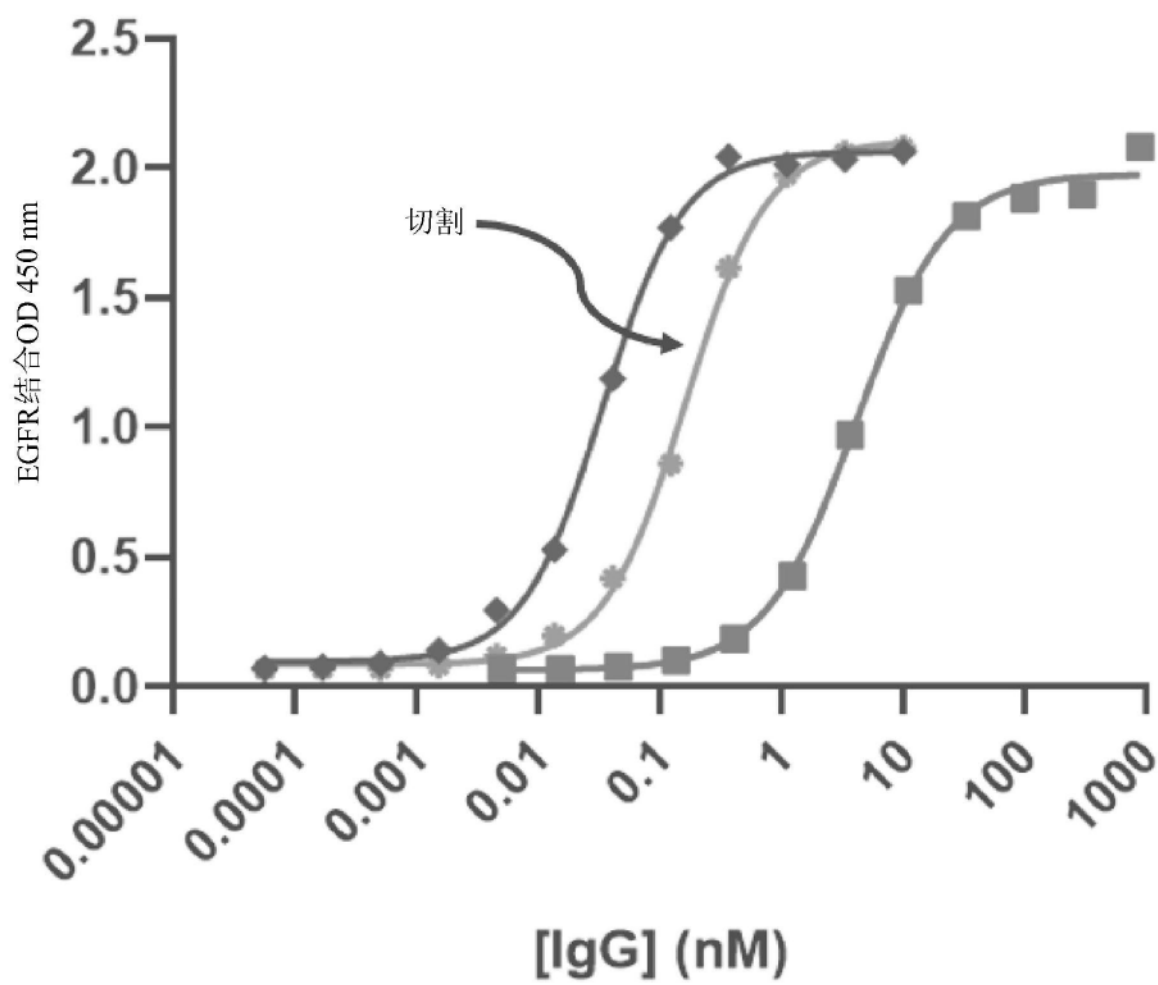


图11G

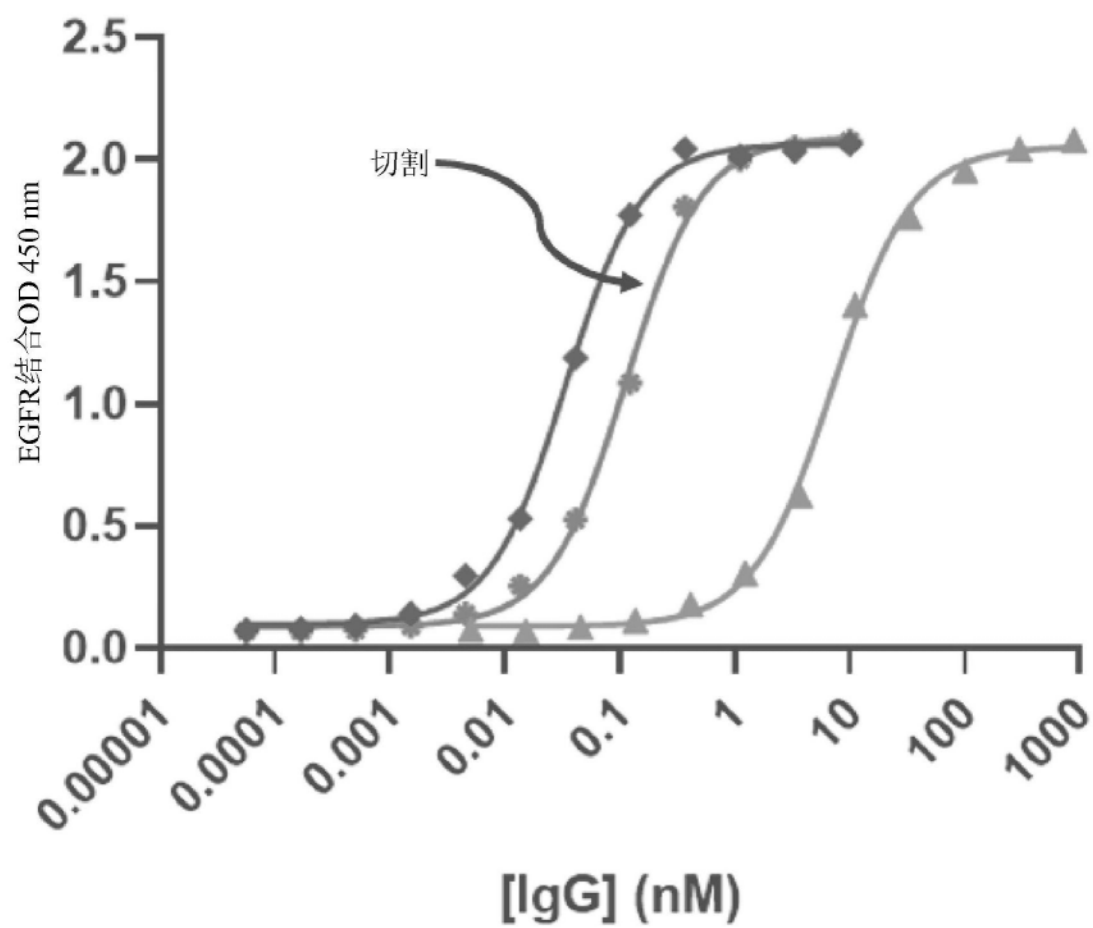


图11H

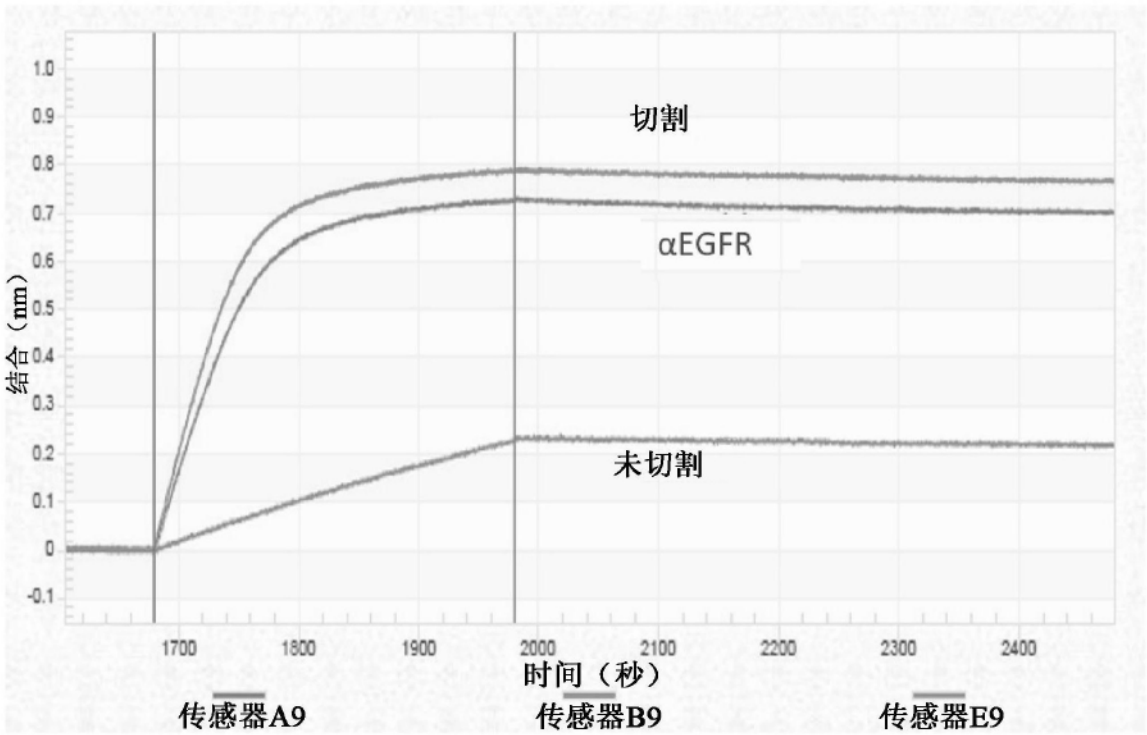


图12A

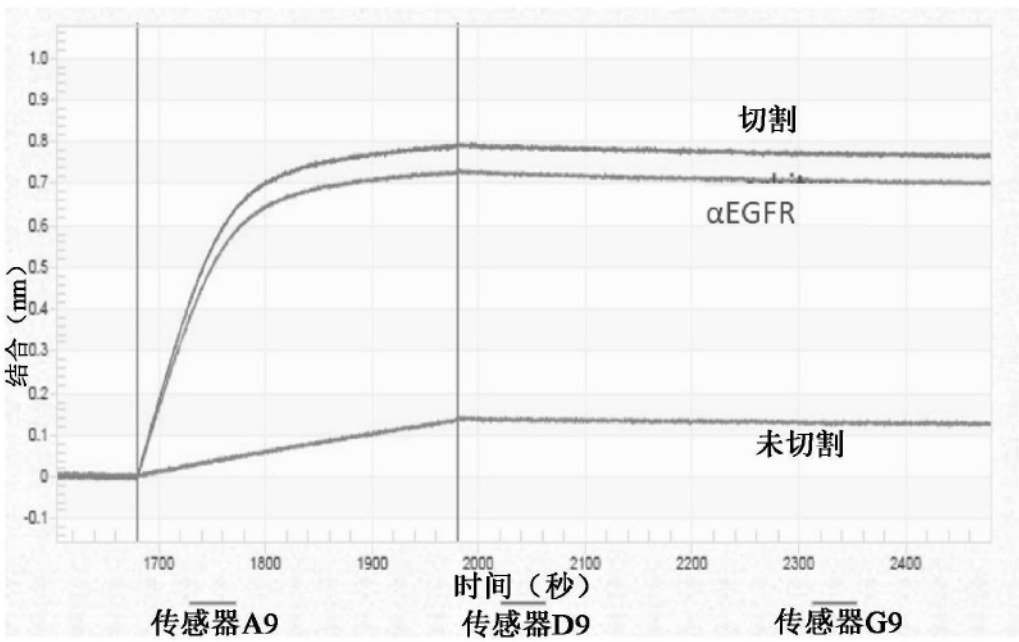


图12B

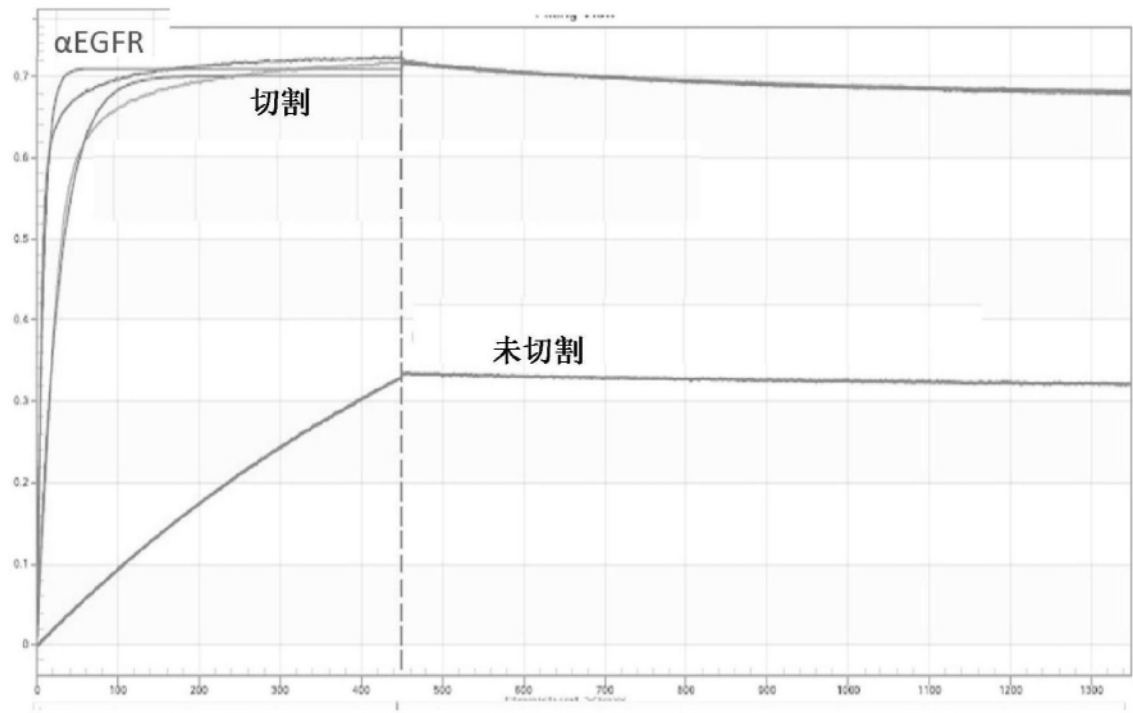


图12C

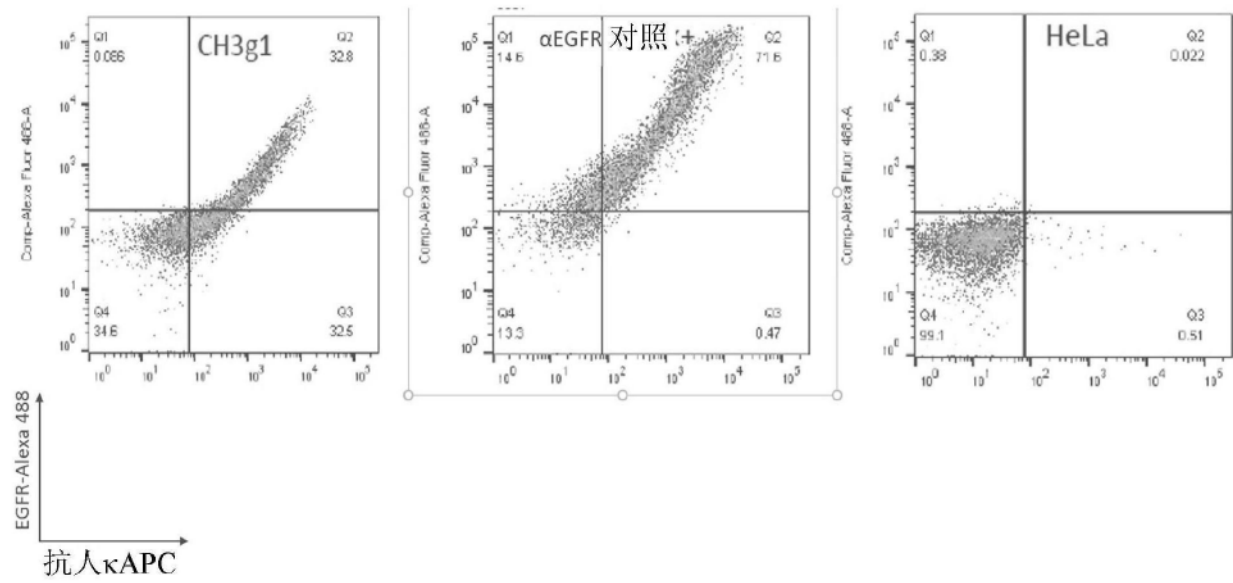


图13A

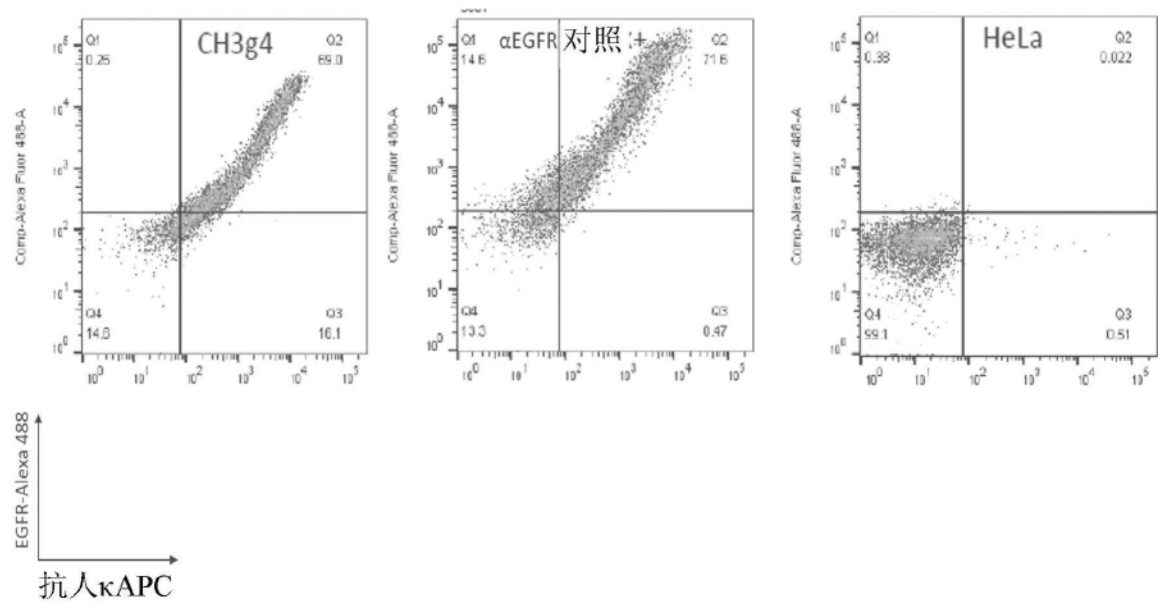


图13B

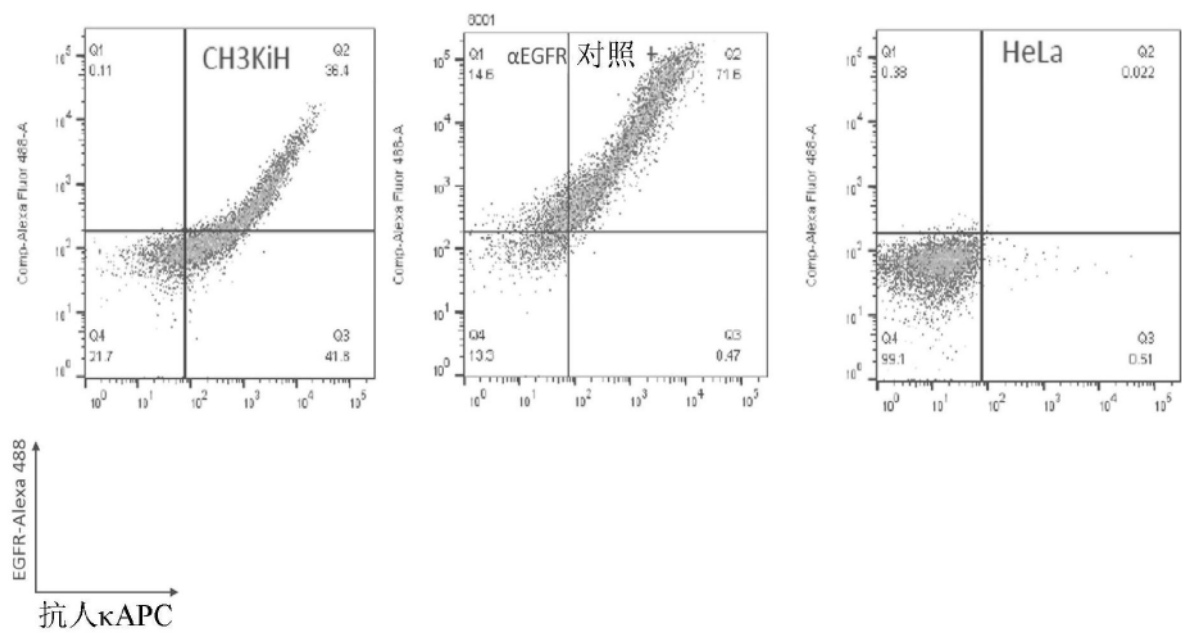


图13C

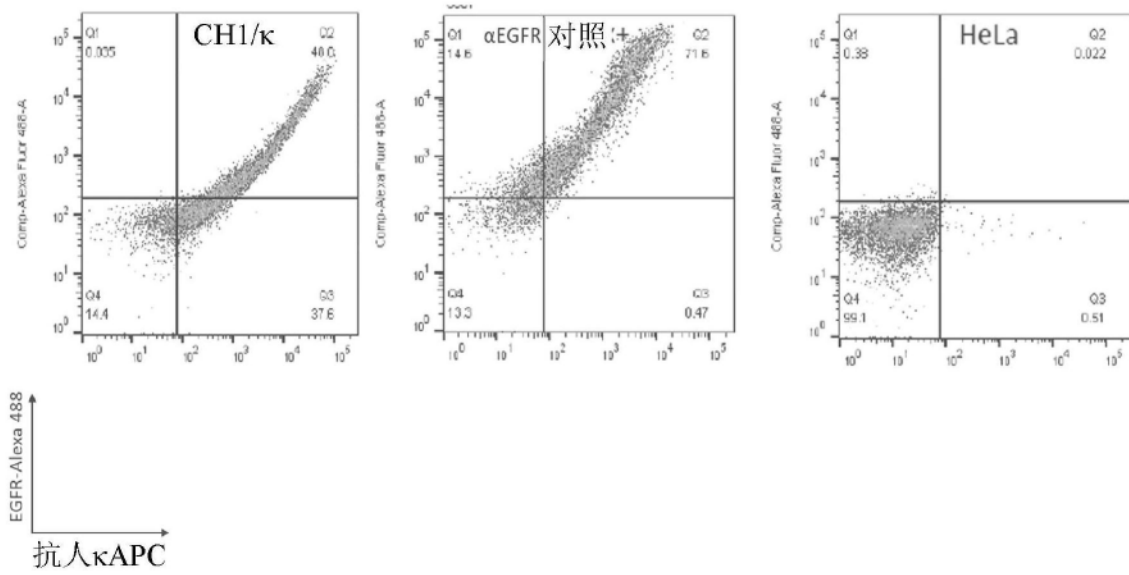


图13D

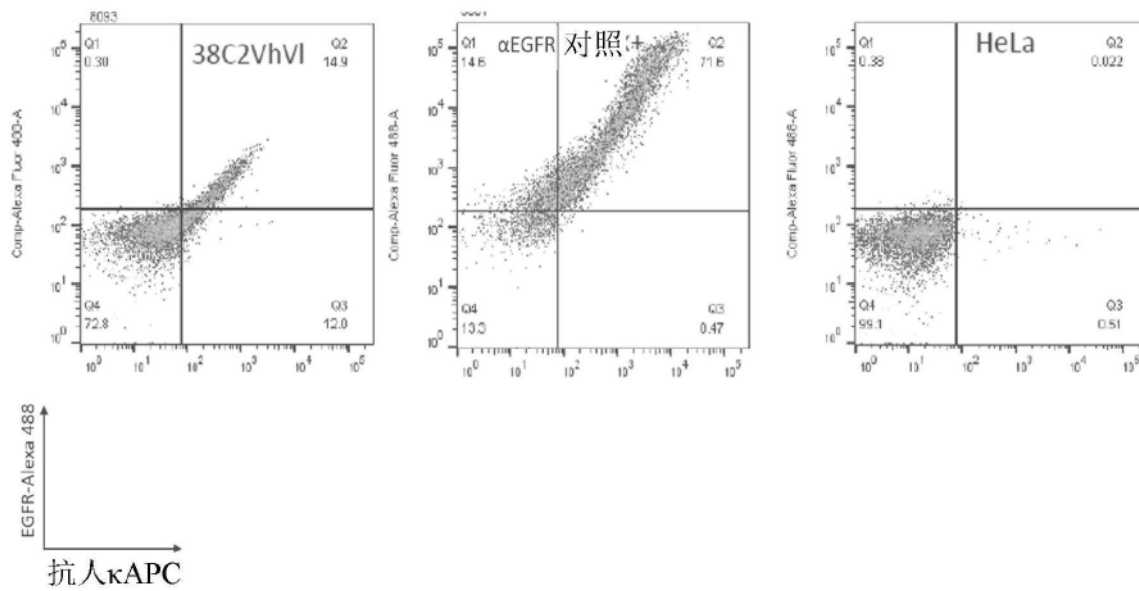


图13E

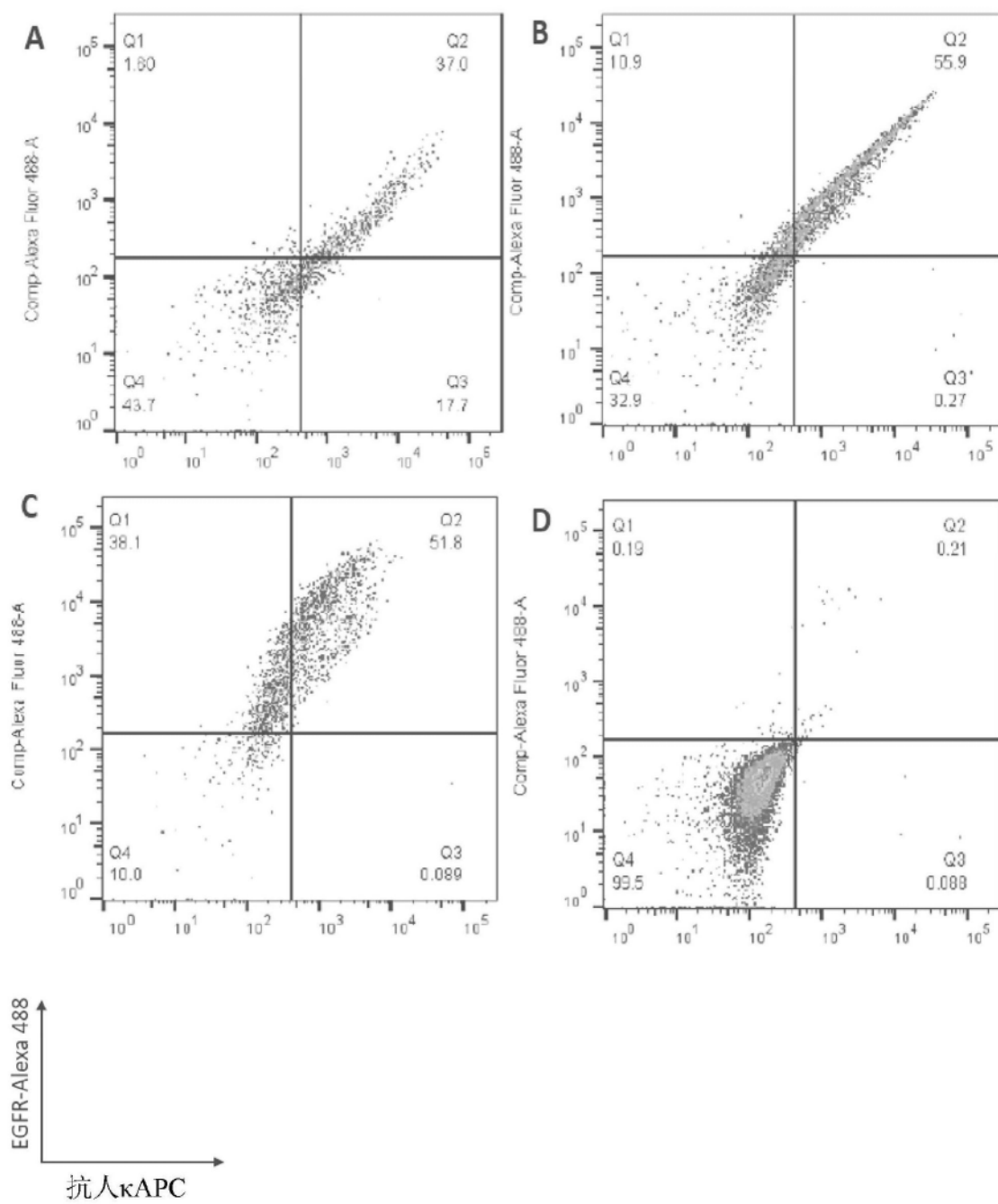


图14

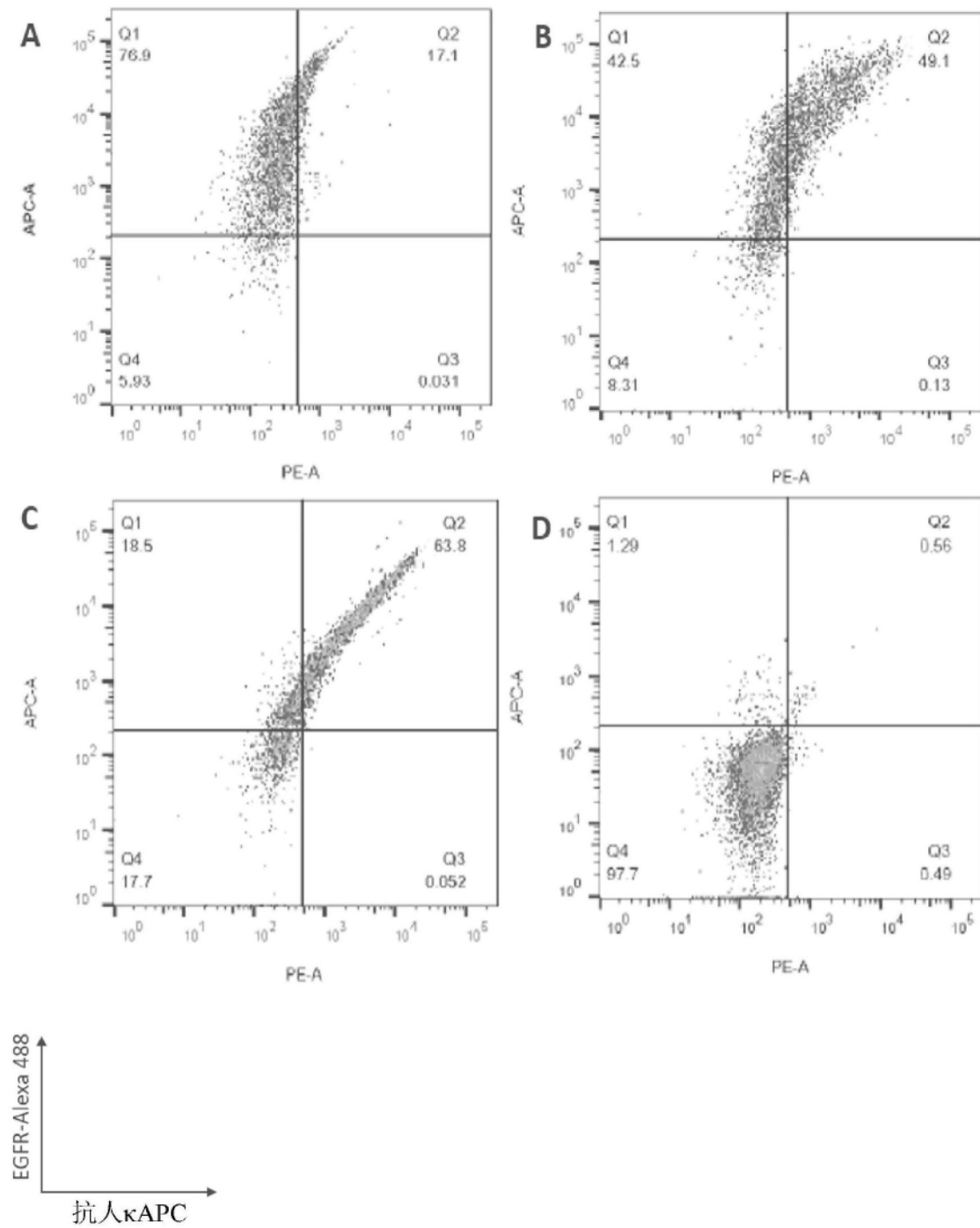


图15

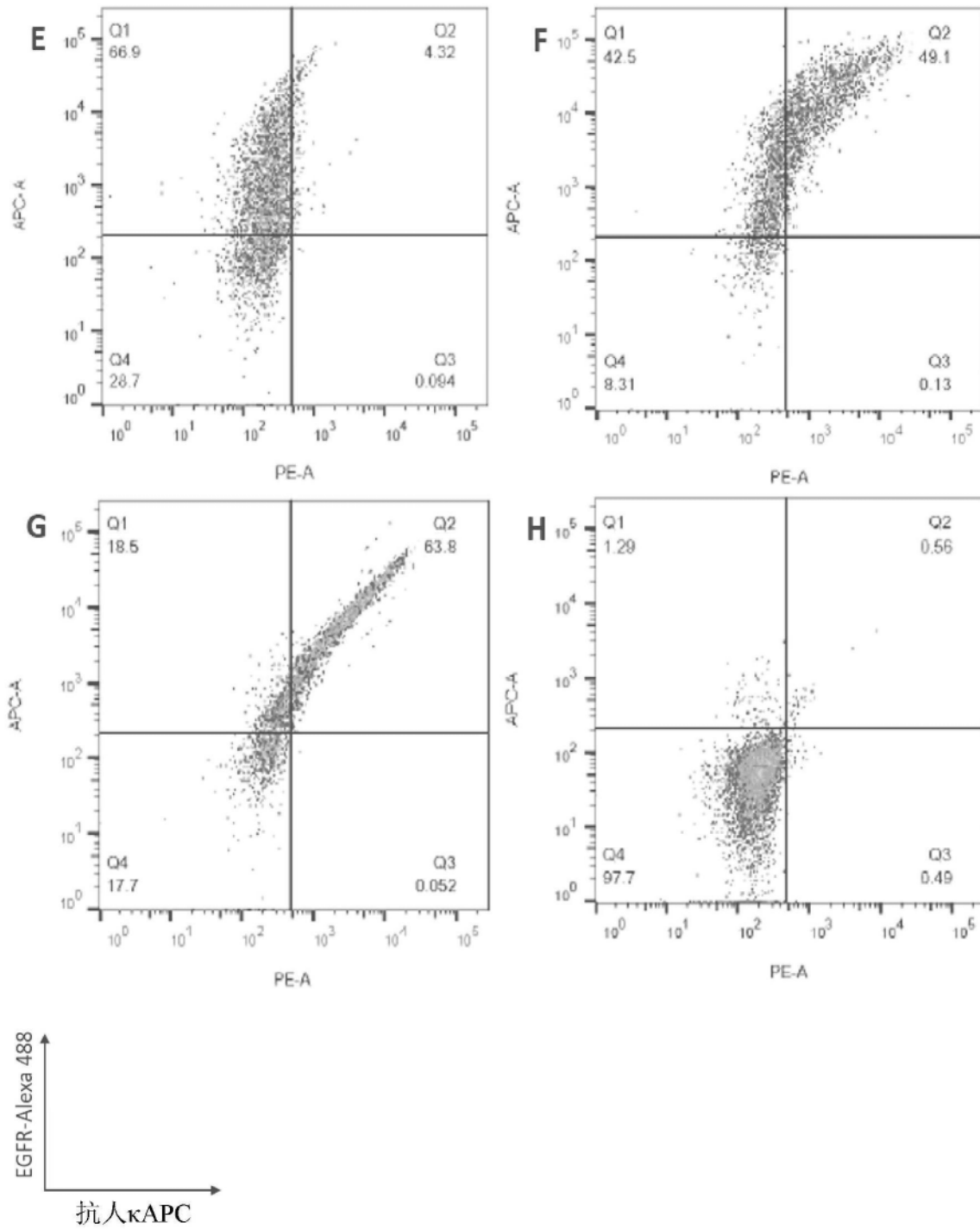


图15(续)

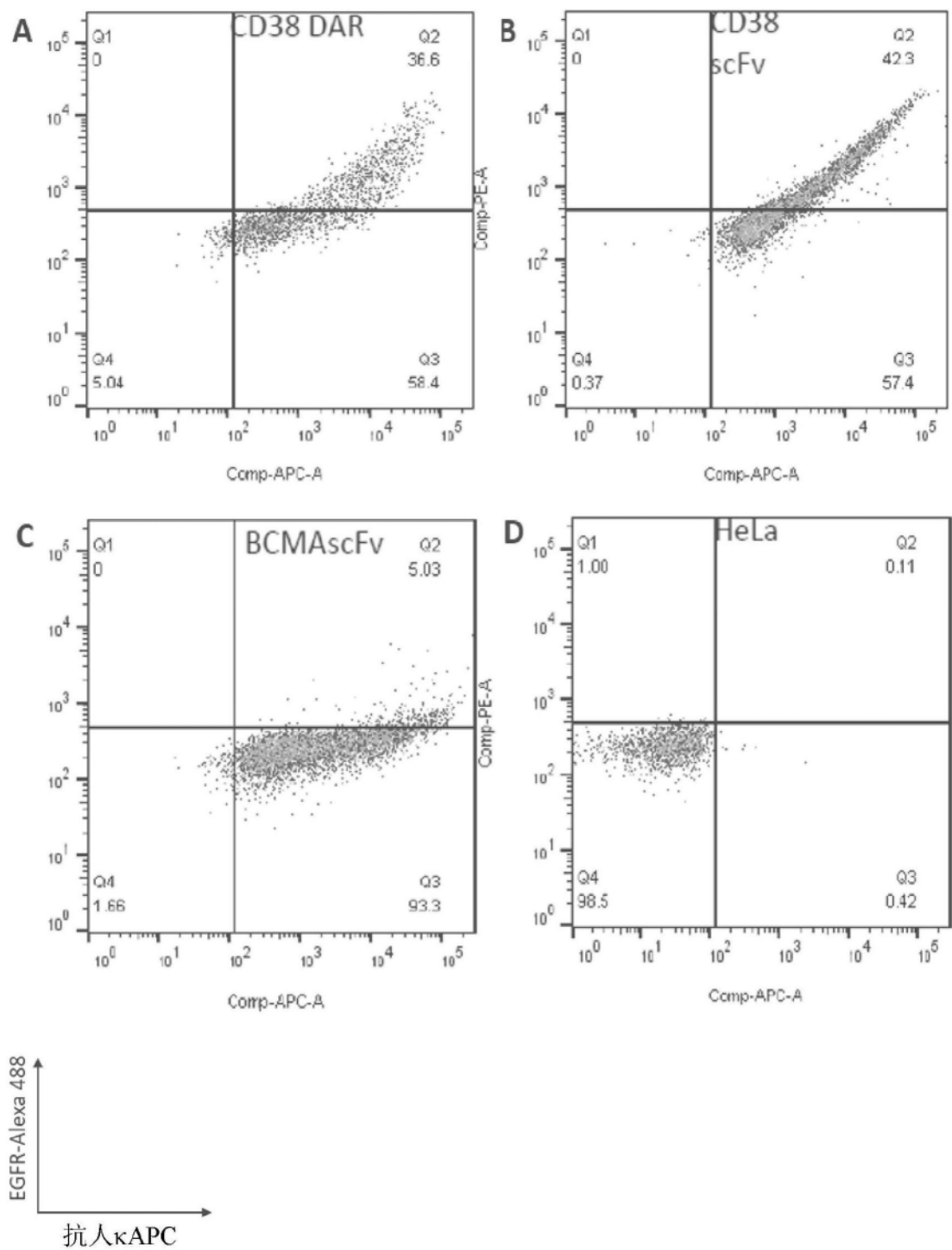


图16

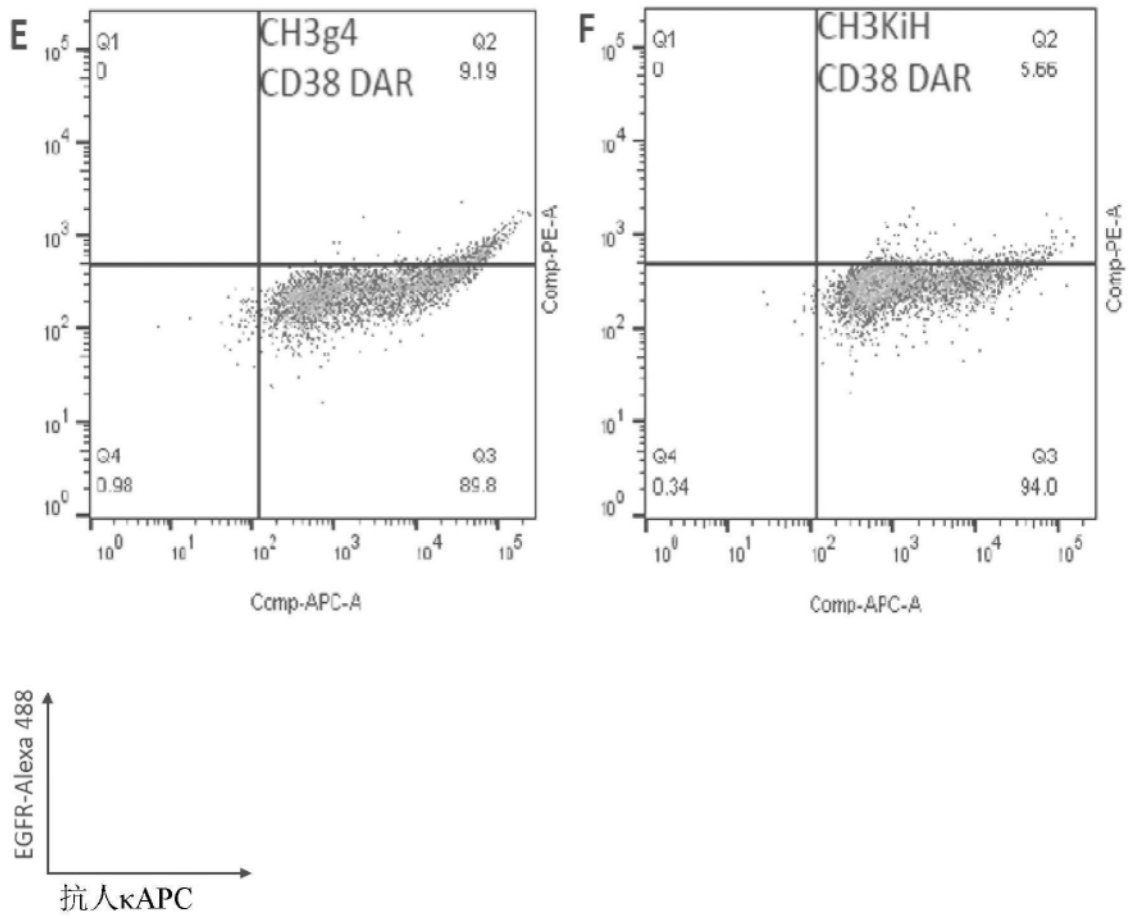


图16 (续)

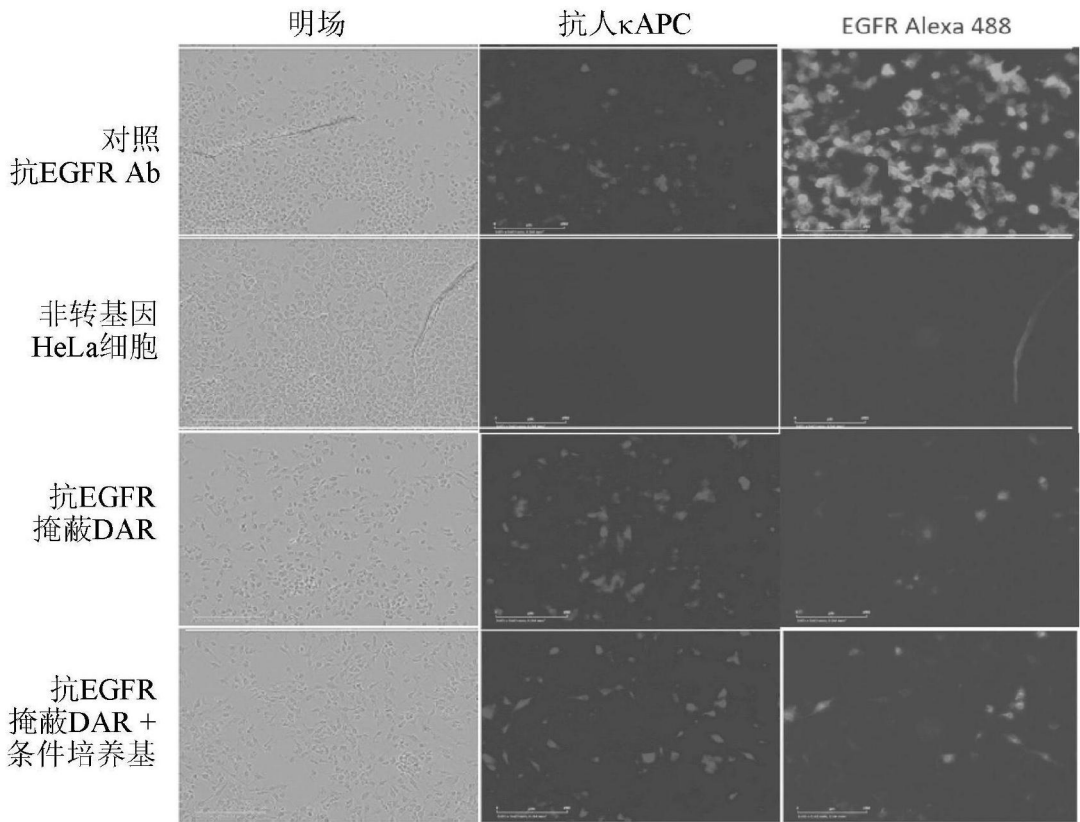


图17

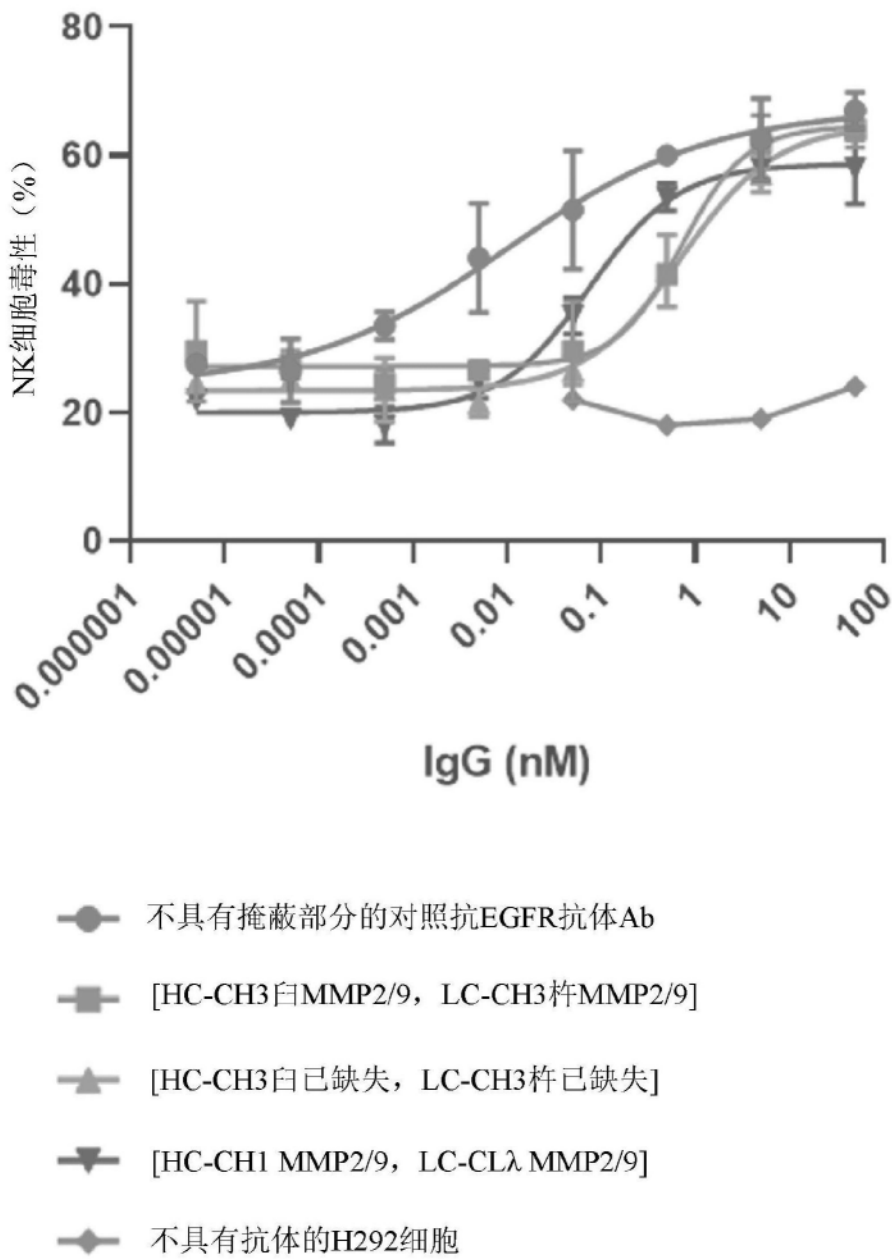


图18

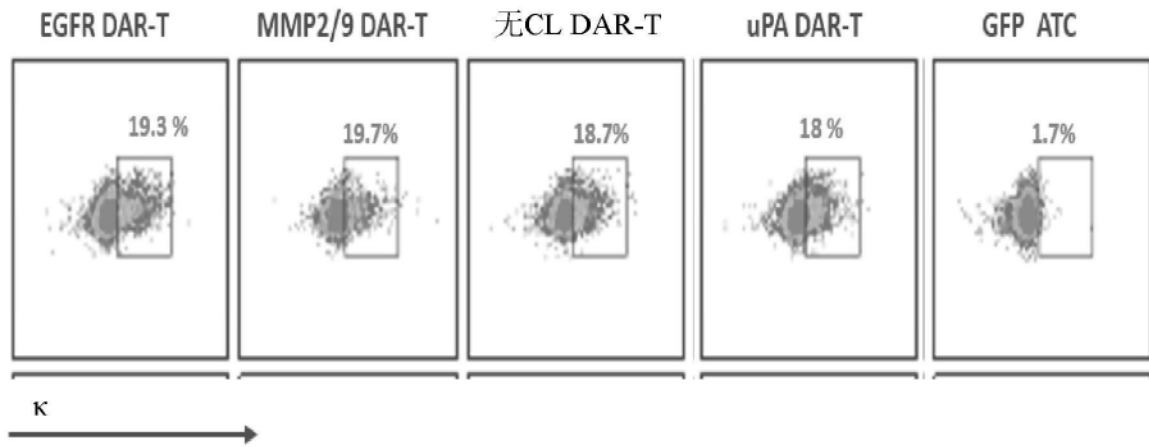


图19

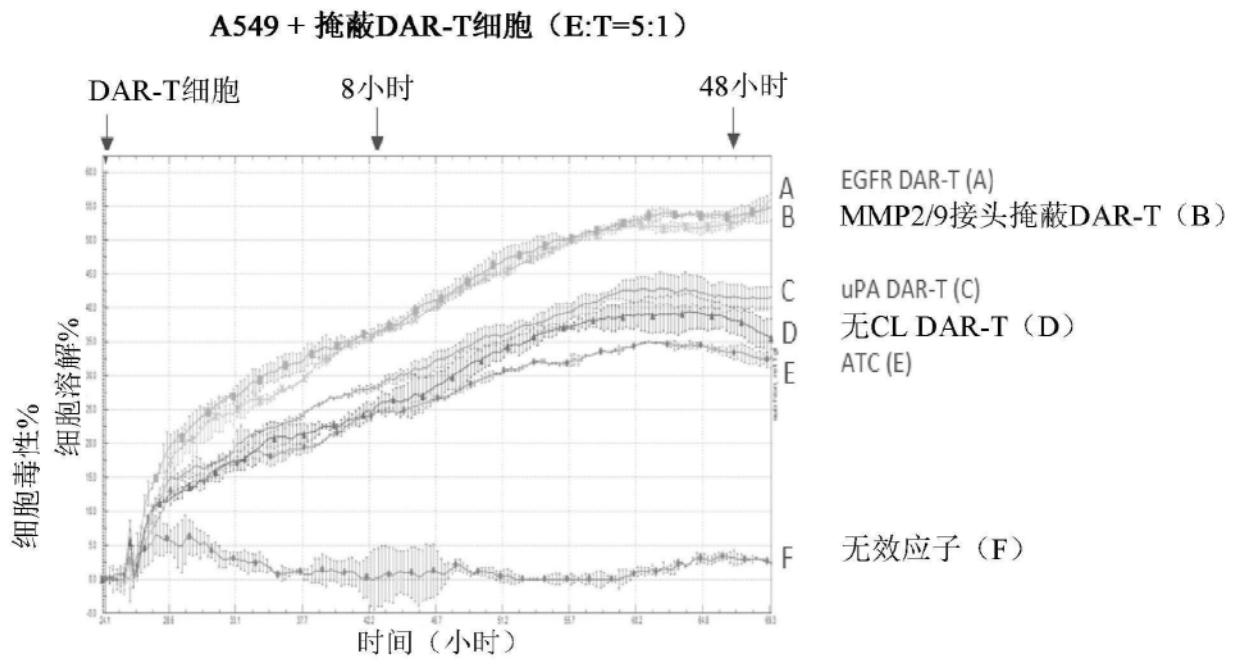


图20A

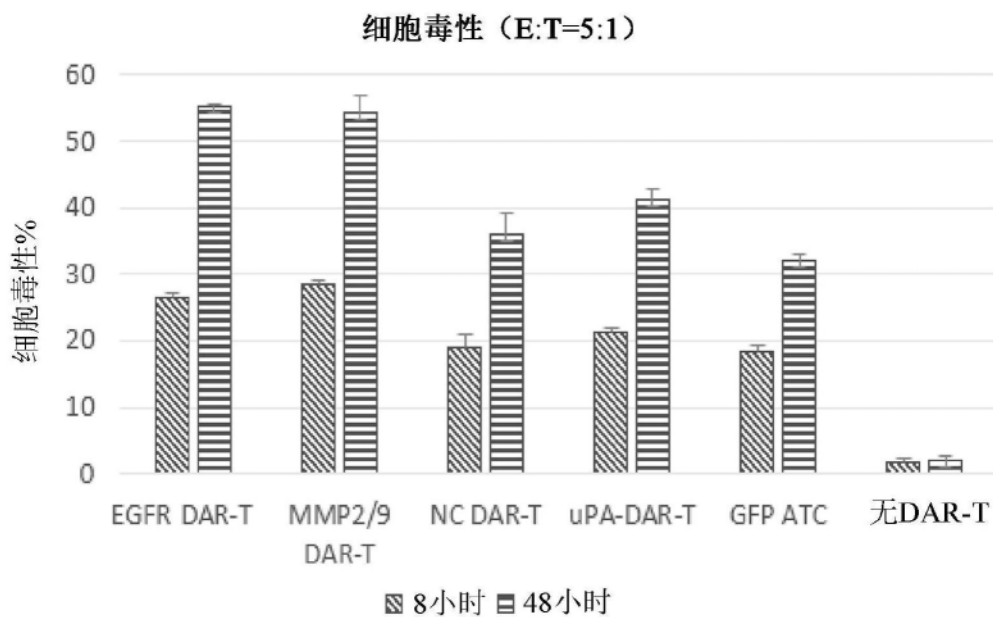


图20B

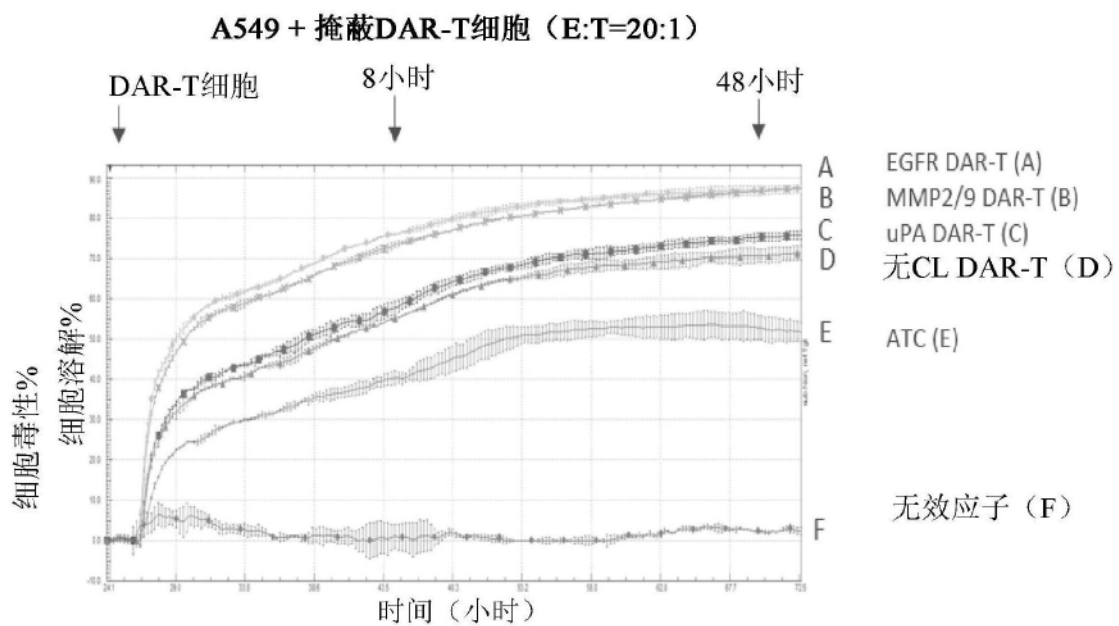


图21A

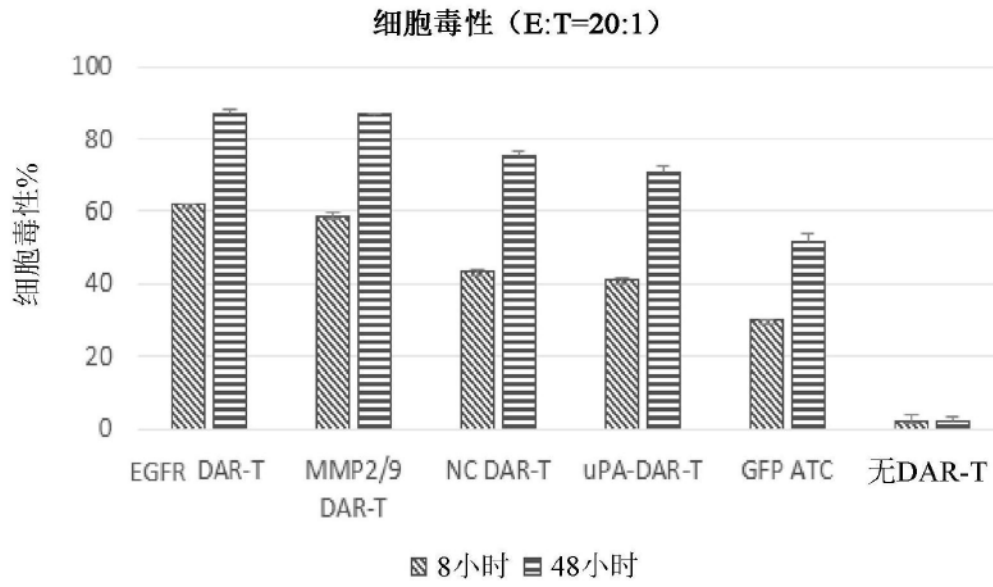


图21B

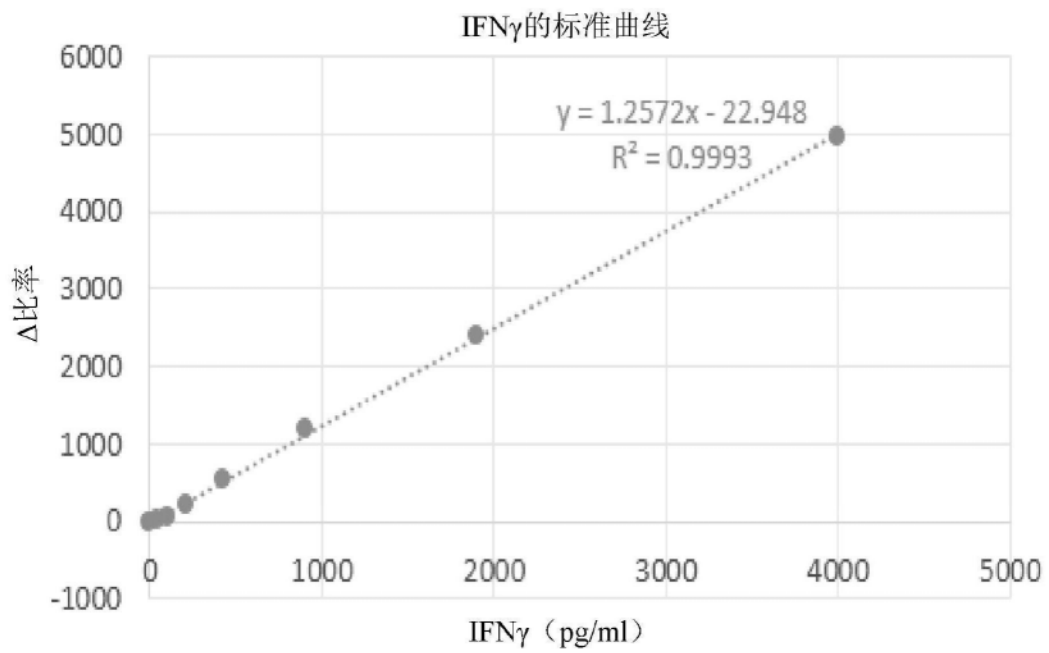


图22A

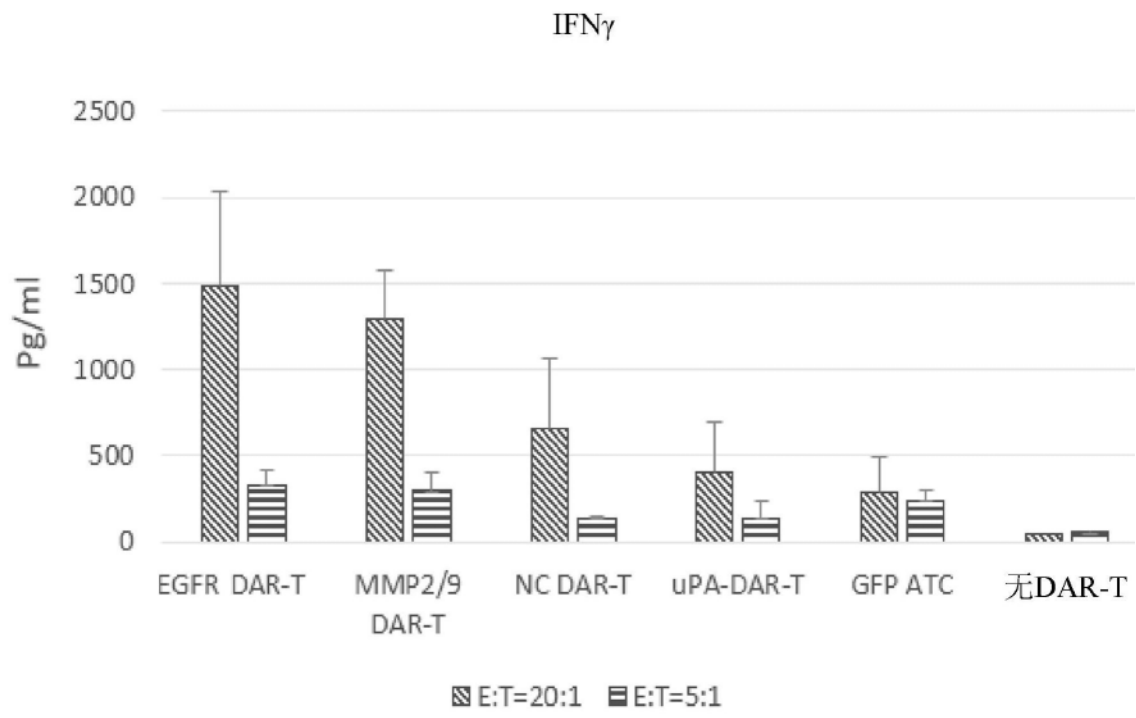


图22B

具有4-1BB + CD3 ζ 细胞内区、不具有可切割接头和掩蔽部分的抗EGFR DAR**前体多肽：SEQ D NO: 53**

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSQVQLKQSGPGLVQPSSQSL SITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVI
WSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTP
SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLF
PGPSKPFWVFLVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEE
GGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKD
KMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGEGRGSLTTCGDVEENPGP**MS**
VPTQVLGLLLLWLTDARCDILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLLIKYAS
ESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

第1多肽链：SEQ D NO: 54

QVQLKQSGPGLVQPSSQSL SITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN
KDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSN
TKVDKRVEPKSCDKTHTKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLFPGPSKPFWVFLVVGGLVAC
YSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQ
QGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

第2多肽链：SEQ D NO: 55

DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLLIKYASEESISGIPSRFSGSGSGTD
FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFY
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGEC

图23

具有4-1BB + CD3 ζ 细胞内区、具有MMP2/9可切割接头和CH3
掩蔽部分的抗EGFR DAR

前体多肽：SEQ D NO: 56

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGPLGVRGGQVQLK
QSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKDNSK
SQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYDEFAYWGQGLTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
RVEPKSCDKTHHTKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVWLVVVGVLACYSLLV
TVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQ
LYNELNLGRREEYDVLDRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGGHDGL
YQGLSTATKDTYDALHMQALPPRSGSEGRGSLTTCGDVEENPGPMSVPTQVLGLLLLWLTDARCGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGPLGVRGGDILLTQSPVILSVSPGERVVSFSCRASQSIG
TNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGA
GTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

第1多肽链：SEQ D NO: 57

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGPLGVRGGQVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTV
SGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYY
CARALTYDYDEFAYWGQGLTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHHTKIEVMY
PPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVWLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYI
FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDR
RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR

第2多肽链：SEQ D NO: 58

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGPLGVRGGDILLTQSPVILSVSPGERVVSFSCR
ASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNW
PTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图24

具有4-1BB + CD3 ζ 细胞内区、具有uPA可切割接头和CH3掩蔽部分的抗EGFR DAR**前体多肽: SEQ D NO: 59**

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**GLSGRSDNHG**QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWVLVVGGLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGEGRGSLLTCGDVEENPGF**MSVPTQVLGLLLLWLT****DARC**GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**GLSGRSDNHG**DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRITVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

第1多肽链: SEQ D NO: 60

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**GLSGRSDNHG**QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWVLVVGGLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

第2多肽链: SEQ D NO: 61

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**GLSGRSDNHG**DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRITVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图25

具有4-1BB + CD3 ζ 细胞内区、具有不可切割接头和CH3掩蔽部分的抗EGFR DAR

前体多肽：SEQ D NO: 62

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSGGGSGGQVQLK
QSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPTFSRLSINKDNSK
SQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
RVEPKSCDKTHTKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWVLVVGGLVACYSLLV
TVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQ
LYNELNLGRREEYDVLDRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGL
YQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGEGRGSLLTCGDVEENPGPMSVPTQVLGLLLLWLTDA RCQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSGGGSGGDILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIG
TNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQNNNWPTTFGA
GTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

第1多肽链：SEQ D NO: 63

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSGGGSGGQVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTV
SGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPTFSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYY
CARALTYDYEFAYWGQTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTKIEVMY
PPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWVLVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYI
FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDR
RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR

第2多肽链：SEQ D NO: 64

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSGGGSGGDILLTQSPVILSVSPGERVSFSCR
ASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQNNNW
PTTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图26