(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118613501 A
(43)申请公布日 2024.09.06

(21)申请号 202380019053.5
(22)申请日 2023.01.31
(30)优先权数据
22154258.2 2022.01.31 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.07.26
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2023/052280 2023.01.31
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/144412 EN 2023.08.03
(71)申请人 奥胡斯大学
地址 丹麦奥尔胡斯
(72)发明人 赛恩迪恩·吕克·哈伍德
扬·约翰尼斯·恩希尔德
(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限责任公司 11204
专利代理师 洪欣 伊硕
(51)Int.Cl.
C07K 14/81(2006.01)
A61K 38/00(2006.01)
A61K 47/68(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

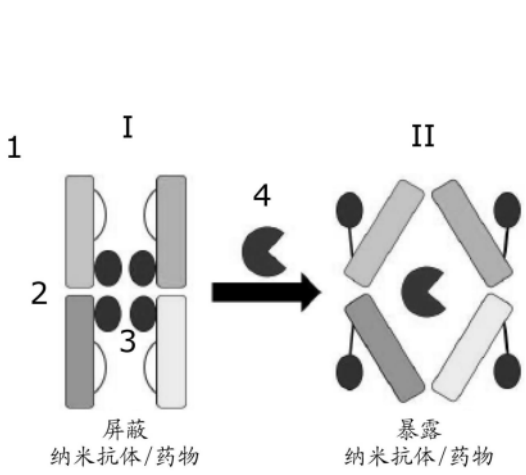
权利要求书4页 说明书56页
序列表（电子公布） 附图42页

(54)发明名称

基于蛋白质构象变化的生物药物前药平台

(57)摘要

本发明涉及蛋白质前药构建体,例如蛋白质融合构建体,其包含含有补体3和妊娠区蛋白质样α-2-巨球蛋白结构域(CPAMD)的蛋白(例如,A2M)以及一种或多种药物,并且作为蛋白酶可活化的前药。



CN 118613501 A

1.蛋白质前药构建体,其包含:

(a)含有补体3和妊娠区蛋白样α-2-巨球蛋白结构域(CPAMD)的蛋白或其片段

(b)一种或多种药物,

其中:

(i)所述CPAMD蛋白或其片段包含(1)具有至少一个蛋白酶切割位点的诱饵区,和(2)受体结合域(RBD),

(ii)所述一种或多种药物位于所述RBD内部或附近,并且

(iii)所述CPAMD蛋白或其片段屏蔽所述一种或多种药物,并且能够在所述至少一个蛋白酶切割位点的蛋白水解切割后改变构象,使得所述一种或多种药物可接近。

2.根据权利要求1所述的蛋白质前药构建体,其中所述一种或多种药物位于所述RBD的环1至4中的任一个的内部或附近。

3.根据权利要求1或2所述的蛋白质前药构建体,其中所述蛋白质前药构建体是融合蛋白。

4.根据权利要求3所述的蛋白质前药构建体,其中所述一种或多种药物位于所述RBD的环1至4中的任一个内部。

5.根据权利要求4所述的蛋白质前药构建体,其中所述环相对于野生型环序列通过添加、取代或缺失一个或多个氨基酸来修饰,以容纳所述一种或多种药物。

6.根据权利要求5所述的蛋白质前药构建体,其中所述一种或多种药物替换所述环的一个或多个氨基酸。

7.根据权利要求2至6任一项所述的蛋白质前药构建体,其中环是环1。

8.根据权利要求2至6任一项所述的蛋白质前药构建体,其中环是环2。

9.根据权利要求2至6任一项所述的蛋白质前药构建体,其中环是环3。

10.根据权利要求2至6任一项所述的蛋白质前药构建体,其中环是环4。

11.根据权利要求2所述的蛋白质前药构建体,其中所述一种或多种药物位于所述RBD的环1至4中的任一个附近。

12.根据权利要求11所述的蛋白质前药构建体,其中环是环1。

13.根据权利要求11所述的蛋白质前药构建体,其中环是环2。

14.根据权利要求11所述的蛋白质前药构建体,其中环是环3。

15.根据权利要求11所述的蛋白质前药构建体,其中环是环4。

16.根据权利要求11至15任一项所述的蛋白质前药构建体,其中所述蛋白质前药构建体包含第一相互作用结构域,并且所述一种或多种药物包含第二相互作用结构域,其中所述第一相互作用结构域和第二相互作用结构域形成将所述一种或多种药物定位在环附近的复合物。

17.根据权利要求16所述的蛋白质前药构建体,其中所述第一相互作用结构域和所述第二相互作用结构域形成卷曲螺旋结构。

18.根据权利要求16所述的蛋白质前药构建体,其中所述第一相互作用结构域是环内的标签或表位序列,并且所述第二相互作用结构域是能够特异性结合标签或表位序列的受体或抗体的功能片段。

19.根据前述权利要求中任一项所述的蛋白质前药构建体,其中所述蛋白质前药构建

体能够形成多聚体。

20.根据权利要求19所述的蛋白质前药构建体,其中多聚体形成通过CPAMD蛋白的LNK区域发生。

21.根据权利要求19或20所述的蛋白质前药构建体,其中所述多聚体是通过二硫化物桥接的二聚体形成的四聚体。

22.根据前述权利要求中任一项所述的蛋白质前药构建体,其中所述CPAMD蛋白选自A2M、PZP、卵固蛋白1、卵固蛋白2、CPAMD1、CPAMD2、CPAMD3、CPAMD4、CPAMD7、CPAMD8、CPAMD9及其功能同源物。

23.根据权利要求22所述的蛋白质前药构建体,其中CPAMD蛋白选自A2M、PZP、卵固蛋白1和卵固蛋白2及其功能同源物。

24.根据权利要求22或23所述的蛋白质前药构建体,其中所述CPAMD蛋白是人A2M或其功能同源物,例如,哺乳动物A2M。

25.根据权利要求24所述的蛋白质前药构建体,其中人A2M的功能同源物具有与SEQ ID NO:1所示氨基酸序列至少约80%同一的氨基酸序列。

26.根据权利要求24的蛋白质前药构建体,其中人A2M具有与SEQ ID NO:1所示氨基酸序列至少约95%同一或相同的氨基酸序列。

27.根据权利要求24至26任一项所述的蛋白质前药构建体,其中所述一种或多种药物位于包含人A2M的第1368至第1379、第1392至第1404、第1420至第1426或第1450至第1457位氨基酸的区域内。

28.根据权利要求27所述的蛋白质前药构建体,其中所述一种或多种药物位于人A2M的第1402和第1403位氨基酸之间。

29.根据权利要求27或28所述的蛋白质前药构建体,其中所述一种或多种药物替换人A2M的第1392至第1403、第1393至第1395或第1393至第1402位氨基酸。

30.根据前述权利要求中任一项所述的蛋白质前药构建体,其中所述一种或多种药物选自:抗原靶向部分(例如,单链或单域抗体)、受体配体(例如,细胞因子)、细胞表面受体的细胞外区域、细胞表面配体的细胞外区域和受体激动剂。

31.根据前述权利要求中任一项所述的蛋白质前药构建体,其中所述诱饵区被修饰以被一种或多种蛋白酶选择性切割。

32.根据权利要求31所述的蛋白质前药构建体,其中所述一种或多种蛋白酶选自一种或多种丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶和/或金属蛋白酶。

33.根据前述权利要求中任一项所述的蛋白质前药构建体,其中所述诱饵区已经被修饰以不含除单一切割位点外的人蛋白酶识别的蛋白酶切割位点。

34.根据权利要求31至33任一项所述的蛋白质前药构建体,其中所述修饰的诱饵区包含柔性和/或亲水性的工程化的氨基酸序列。

35.根据权利要求34所述的蛋白质前药构建体,其中所述工程化的氨基酸序列包含甘氨酸、丝氨酸、丙氨酸、苏氨酸和/或脯氨酸残基的序列。

36.根据权利要求34所述的蛋白质前药构建体,其中所述工程化的氨基酸序列包含甘氨酸、丝氨酸和/或丙氨酸残基的组合。

37.根据权利要求34至36中任一项所述的蛋白质前药构建体,其中所述工程化的氨基

酸序列替换野生型诱饵区的全部或部分。

38.根据权利要求37所述的蛋白质前药构建体,其中所述工程化的氨基酸序列替换所有野生型诱饵区并且具有与野生型诱饵区相等的长度。

39.根据前述权利要求中任一项所述的蛋白质前药构建体,其中所述一种或多种药物是特异性结合选自IL-2、EGFR、PDL-1、PD-1、CTLA-4、CD3γε、4-1BB、IL-2Rα和TNFα的抗原的抗体或其抗原结合片段。

40.根据前述权利要求中任一项所述的蛋白质前药构建体,其中所述一种或多种药物选自阿特珠单抗、EgA1、伊匹单抗、纳武单抗、KN035、乌瑞芦单抗、福雷芦单抗、莫罗单抗、阿达木单抗和以上的治疗活性抗原结合片段或变体。

41.根据前述权利要求中任一项所述的蛋白质前药构建体,其中所述一种或多种药物是细胞因子或其治疗活性片段或变体,所述细胞因子选自:IL1、IL1α、IL1β、IL2、IL3、IL4、IL6、IL7、IL8、IL9、IL10、IL11、IL12、IL13、IL14、IL15、IL16、IL17、I18、IL19、IL20、IL21、IL22、IL23、IL24、IL25、IL26、IL27、IL28、IL29、IL30、IL31、IL32、IL33、IL34、IL35、IL36、GM-CSF、TGF-β、CSF-1、胰岛素、GLP-1、HGH、VEGF、PDGF、BMP、EPO、G-CSF、IL-11、IFN-α、IFN-β和IFN-γ。

42.根据前述权利要求中任一项所述的蛋白质前药构建体,其中所述蛋白质前药构建体由选自以下的氨基酸序列编码:SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、和SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23、或SEQ ID NO:25。

43.核酸,其编码前述权利要求中任一项所述的蛋白质前药构建体。

44.载体,其包含权利要求43所述的核酸。

45.根据权利要求44所述的载体,其中所述编码蛋白质前药构建体的核酸与启动子和任选的一个或多个调节核酸表达的额外的调控序列可操作地连接。

46.宿主细胞,其包含权利要求44或45所述的载体。

47.根据权利要求46所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是细菌或真核生物,例如,哺乳动物细胞。

48.治疗或预防有需要的受试者的疾病或病症的方法,其中所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的权利要求1至42中任一项所述的蛋白质前药构建体、权利要求43所述的核酸、权利要求44或45所述的载体、或权利要求46或47所述的宿主细胞。

49.根据权利要求48所述的方法,其中所述疾病或病症是神经系统、眼部、循环系统、呼吸系统、消化系统或皮肤的疾病或病症。

50.根据权利要求48或49所述的方法,其中所述疾病或病症是肿瘤、血液病症、代谢紊乱、自身免疫性疾病、免疫缺陷或感染性疾病。

51.根据权利要求50所述的方法,其中所述肿瘤是选自以下的癌症:脑癌、胶质母细胞瘤、肺癌、结直肠癌、皮肤癌、恶性黑素瘤、胰腺癌、膀胱癌、肝癌、乳腺癌、眼癌和前列腺癌,所述癌症是血液癌症,例如选自多发性骨髓瘤、急性成髓细胞白血病、慢性骨髓性白血病、急性淋巴细胞性白血病和慢性淋巴细胞性白血病,或所述癌症是恶性黑素瘤、乳腺癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、头颈癌、肝癌、肉瘤和B细胞淋巴瘤。

52.根据权利要求50所述的方法,其中所述自身免疫性疾病选自关节炎(例如,类风湿

性关节炎或银屑病关节炎)、多发性硬化、系统性红斑狼疮和炎症性肠病。

53.用于制备权利要求1至42中任一项所述的蛋白质前药构建体的方法,所述方法包括:

(i)将权利要求44或45所述的表达载体导入宿主细胞;

(ii)在允许从所述载体表达所述蛋白质前药构建体的条件下培养宿主细胞;和

(iii)纯化所述蛋白质前药构建体。

基于蛋白质构象变化的生物药物前药平台

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2022年1月31日提交的欧洲专利申请第22154258.2号的权益和优先权。其全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及蛋白质前药构建体,例如蛋白质融合构建体,其包含含有补体3-和妊娠区蛋白质样α-2-巨球蛋白结构域(CPAMD)的蛋白(例如,A2M)和一种或多种药物,并且作为蛋白酶可活化的前药。

背景技术

[0004] 当生物制药药物以初始活性的形式施用于患者时,它可以在患病和健康组织中发挥其生物学效应。健康组织中的药物效应可能对患者健康、生活质量和/或治疗效果有害。使这些副作用最小化的一种策略是将药物衍生成初始无活性并且首先在患病环境中变得有活性的前药形式。

[0005] 蛋白酶是催化其它蛋白质中肽键水解的酶。存在超过600种已知的人蛋白酶,并且大多数在正常情况下被严格调控。然而,在许多疾病中,特异性蛋白酶变得失调并且相对于健康状况具有增加的活性。已经开发了用于生物制药药物的许多蛋白酶活化的前药技术,其中大多数是基于抗体。数种技术使用封闭抗体抗原结合区(互补位)的掩蔽部分,防止其与其在靶抗原上的同源表位结合,从而使其失活。掩蔽部分通过结合了蛋白酶可切割位点的接头连接到抗体。通过蛋白酶切割接头将抗体与掩蔽部分分离,释放互补位并恢复抗体的活性。掩蔽部分可以被设计成特异性结合抗体互补位(例如,使用噬菌体展示来源的肽,如CytomX的Probody技术),或者可以在没有任何特定的相互作用的情况下,在空间上充分地包围互补位以隔离它(例如,使用长的、体积大的肽,如Amunix的XPAT技术)。另一种方法通过掺入无活性的VH和VL结构域来防止前药中的功能性VH/VL结构域配对,所述无活性的VH和VL结构域通过蛋白酶敏感的接头(例如Maverick的COBRA技术)连接到抗体。接头的切割除去了无活性的结构域并使活化的前药中的正确的VH/VL配对成为可能。

[0006] 这些多样的前药技术都具有它们的优点和缺点。例如,CytomX的Probody最小化了非人和潜在免疫原性序列的使用,但不是模块化的,并且需要鉴定掺入其平台中的每种抗体的亲和的掩蔽部分。Amunix的XPAT平台不需要特定的掩蔽/抗体相互作用,并且在前药活化之前和之后具有循环半衰期的差异,但是这是通过使用长的非人肽来实现的。因此,需要结合多种技术的关键优点的新的前药技术,并且将构成本领域的有意义的进步。

发明内容

[0007] 本发明涉及蛋白质前药构建体(例如,蛋白质融合构建体)的提供,其解决了与现有蛋白质前药平台相关的一个或多个上述问题。

[0008] 特别地,本文所述的蛋白质前药构建体(例如,蛋白质融合构建体)能够实现特定

的药物递送和可控的活性。这是通过蛋白质前药构建体经历构象变化来实现的,通过该构象变化它能够控制包含在其中的一种或多种药物的活性。在蛋白质前药构建体的天然(未切割)状态下,一种或多种药物不暴露,因此是无活性的。在蛋白质前药构建体的活性(切割)状态下,药物被暴露并能够与其靶标相互作用。

[0009] 构象变化由包含在本发明的蛋白质前药构建体中的蛋白酶切割位点的切割触发。包含在蛋白质前药构建体内的切割位点可以被修饰以控制药物在何处暴露。根据切割位点,药物只能在识别该切割位点的蛋白酶存在的位置暴露。当特定的蛋白酶存在并切割切割位点时,蛋白质前药构建体的构象从“天然的”变为“活性的”。因此,本发明提供了蛋白质前药构建体(例如,蛋白质融合构建体),其中活性和特异性可以被控制并且定向到需要用这样的构建体治疗的受试者的特定区域(例如,特定组织)。

[0010] 具体地,本发明涉及蛋白质前药构建体,其包含(a)含有补体3-和妊娠区蛋白样α-2-巨球蛋白结构域(CPAMD)的蛋白或其片段,和(b)一种或多种药物,其中(i)CPAMD蛋白或其片段包含(1)具有至少一个蛋白酶切割位点的诱饵区,和(2)受体结合域(RBD),(ii)一种或多种药物位于RBD内部或附近,并且(iii)CPAMD蛋白或其片段屏蔽一种或多种药物,并且能够在至少一个蛋白酶切割位点的蛋白水解切割时改变构象,使得一种或多种药物可接近。

[0011] 在一些实施方案中,一种或多种药物位于RBD的环1至4中的任何一个的内部或附近。在一些实施方案中,蛋白质前药构建体是融合蛋白。在一些实施方案中,一种或多种药物位于RBD的环1至4中的任一个内部。在一些实施方案中,环是环1。在一些实施方案中,环是环2。在一些实施方案中,环是环3。在一些实施方案中,环是环4。在一些实施方案中,相对于野生型环序列,通过添加、取代或缺失一个或多个氨基酸来修饰环以容纳一种或多种药物。在一些实施方案中,一种或多种药物替换环的一个或多个氨基酸。

[0012] 在一些实施方案中,一种或多种药物位于RBD的环1至4中的任一个的附近。在一些实施方案中,环是环1。在一些实施方案中,环是环2。在一些实施方案中,环是环3。在一些实施方案中,环是环4。在一些实施方案中,蛋白质前药构建体包含第一相互作用结构域,并且一种或多种药物包含第二相互作用结构域,其中第一相互作用结构域和第二相互作用结构域形成将一种或多种药物定位在环附近的复合物。在一些实施方案中,第一相互作用结构域和第二相互作用结构域形成卷曲螺旋结构。在一些实施方案中,第一相互作用结构域是环内的标签或表位序列,并且第二相互作用结构域是能够特异性结合标签或表位序列的受体或抗体的功能性片段。

[0013] 在一些实施方案中,蛋白质前药构建体能够形成多聚体(例如,二聚体或四聚体)。在一些实施方案中,多聚体形成通过CPAMD蛋白的LNK区域发生。在一些实施方案中,多聚体是通过两个二硫键桥接的二聚体形成的四聚体。

[0014] 在一些实施方案中,CPAMD蛋白是人CPAMD蛋白,或其功能变体、片段或同系物,例如哺乳动物CPAMD蛋白。在一些实施方案中,CPAMD蛋白或其功能性变体、片段或同源物具有与表1中所列的全长CPAMD蛋白序列中的任一个至少约70%、至少约80%或至少约90%同一的氨基酸序列。

[0015] 在一些实施方案中,CPAMD蛋白或其功能变体、片段或同源物具有与表1中所示的任一个全长CPAMD蛋白序列至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约

95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％同一或相同的氨基酸序列。

[0016] 在一些实施方案中,CPAMD蛋白选自A2M、PZP、卵固蛋白1、卵固蛋白2、CPAMD1、CPAMD2、CPAMD3、CPAMD4、CPAMD7、CPAMD8、CPAMD9及其功能同源物。在具体的实施方案中,CPAMD蛋白选自A2M、PZP、卵固蛋白1和卵固蛋白2及其功能同源物。

[0017] 在一些实施方案中,CPAMD蛋白是人A2M或其功能同系物,例如哺乳动物A2M。在一些实施方案中,人A2M的功能同源物具有与SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列至少约70％、至少约80％或至少约90％同一的氨基酸序列。

[0018] 在一些实施方案中,人A2M具有与SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％同一或相同的氨基酸序列。

[0019] 在一些实施方案中,一种或多种药物位于包含人A2M的第1368位至第1379位、第1392位至第1404位、第1420位至第1426位或第1450位至第1457位氨基酸的区域内。在一些实施方案中,一种或多种药物位于人A2M的第1402位和第1403位氨基酸之间。在一些实施方案中,一种或多种药物替换人A2M的第1392位至第1403位、第1393位至第1395位或第1393位至第1402位氨基酸。

[0020] 在一些实施方案中,一种或多种药物选自:抗原靶向部分(例如,单链或单域抗体)、受体配体(例如,细胞因子)、细胞表面受体的细胞外区域、细胞表面配体的细胞外区域和受体激动剂。

[0021] 在一些实施方案中,诱饵区被修饰以被一种或多种蛋白酶选择性地切割。在一些实施方案中,所述一种或多种蛋白酶选自一种或多种丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶和/或金属蛋白酶。在一些实施方案中,诱饵区已被修饰以不含除单一切割位点外的人蛋白酶所识别的蛋白酶切割位点。

[0022] 在一些实施方案中,修饰的诱饵区包含柔性和/或亲水性的工程化的氨基酸序列。在一些实施方案中,工程化的氨基酸序列包含甘氨酸、丝氨酸、丙氨酸、苏氨酸和/或脯氨酸残基的序列。在一些实施方案中,工程化的氨基酸序列包含甘氨酸、丝氨酸和/或丙氨酸残基的组合。在一些实施方案中,工程化的氨基酸序列替换野生型诱饵区的全部或部分。在一些实施方案中,工程化的氨基酸序列替换所有野生型诱饵区,并具有与野生型诱饵区相等的长度。

[0023] 在一些实施方案中,一种或多种药物是特异性结合作为拮抗剂的抗原的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,一种或多种药物是特异性结合作为激动剂的抗原的抗体或其抗原结合片段。

[0024] 在一些实施方案中,一种或多种药物是特异性结合选自以下的抗原的抗体或其抗原结合片段:IL-2、EGFR、PDL-1、PD-1、CTLA-4、CD3γε、4-1BB、IL-2Rα和TNFα。

[0025] 在一些实施方案中,一种或多种药物是特异性结合选自以下的抗原的抗体或其抗原结合片段:BTLA、OX40、LAG3、NRP1、VEGF、HER2、CEA、CD19、CD20、淀粉样蛋白β、HER3、IGF-1R、MUC1、EpCAM、CD22、VEGFR-2、PSMA、GM-CSF、CXCR4、CD30、CD70、FGFR2、BCMA、CD44、ICAM-1、Notch1、MHC、CD28、IL-1R1、TCR、Notch3、FGFR3、TGF-β、TGFBR1、TGFBR2、CD109、GITR、CD47、α-突触核蛋白、CD26、LRP1、CD52、IL-4Rα、VAP-1、EPO受体、整合素αv、TIM-3、Grp78、LIGHT、TLR2、TLR3、PAR-2、NRP2、GLP-1受体、Hedgehog和Syndecan 1。

[0026] 在一些实施方案中,一种或多种药物选自阿特珠单抗、EgA1、伊匹单抗、纳武单抗、KN035、乌瑞芦单抗、福雷芦单抗、莫罗单抗、阿达木单抗和其治疗活性抗原结合片段或其变体。在一些实施方案中,所述一种或多种药物选自ANB032、rosnilimab、LY3361237、安沙利单抗、考伯利单抗、Imsidolimab、多塔利单抗和其治疗活性抗原结合片段或其变体。

[0027] 在一些实施方案中,一种或多种药物是细胞因子或其治疗活性片段或变体,其选自IL1、IL1α、IL1β、IL2、IL3、IL4、IL6、IL7、IL8、IL9、IL10、IL11、IL12、IL13、IL14、IL15、IL16、IL17、IL17、IL18、IL19、IL20、IL21、IL22、IL23、IL24、IL25、IL26、IL27、IL28、IL29、IL30、IL31、IL32、IL33、IL34、IL35、IL36、GM-CSF、TGF-β、CSF-1、胰岛素、GLP-1、HGH、VEGF、PDGF、BMP、EPO、G-CSF、IL-11、IFN-α、IFN-β和IFN-γ。

[0028] 在一些实施方案中,蛋白质前药构建体由由选自以下的氨基酸序列编码:SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:25。

[0029] 本发明还提供了编码根据本发明的蛋白质前药构建体的核酸。还提供了包含这些核酸的载体。在这样的载体中,编码蛋白质前药构建体的核酸可以与启动子和任选的调节核酸表达的其它调节序列有效连接。还提供了包含这种载体的宿主细胞。在一些实施方案中,宿主细胞是细菌或真核生物,例如,哺乳动物细胞。

[0030] 本发明还涉及本发明的蛋白质前药构建体的治疗用途以及它们在制备用于治疗需要此类治疗的受试者的疾病或病症的药物中的用途。

[0031] 在一些实施方案中,本发明的蛋白质前药构建体可用于在需要这样的治疗的受试者中治疗或预防疾病或病症的方法,其中方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本发明的蛋白质前药构建体、核酸、载体或宿主细胞。

[0032] 在一些实施方案中,所述疾病或病症是神经系统、眼部、循环系统、呼吸系统、消化系统或皮肤的疾病或病症。在一些实施方案中,所述疾病或病症是肿瘤、血液病症、代谢紊乱、自身免疫性疾病、免疫缺陷或感染性疾病。在一些实施方案中,肿瘤是选自以下的癌症:脑癌、胶质母细胞瘤、肺癌、结直肠癌、皮肤癌、恶性黑素瘤、胰腺癌、膀胱癌、肝癌、乳腺癌、眼癌和前列腺癌,癌症是血液癌症,例如选自多发性骨髓瘤、急性成髓细胞性白血病、慢性成髓细胞性白血病、急性成淋巴细胞性白血病和慢性淋巴细胞白血病,或癌症是恶性黑素瘤、乳腺癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、头颈癌、肝癌、肉瘤和B细胞淋巴瘤。在一些实施方案中,自身免疫性疾病选自关节炎(例如,类风湿性关节炎或银屑病关节炎)、多发性硬化、系统性红斑狼疮和炎症性肠病。

[0033] 本发明还提供了制备本发明的蛋白质前药构建体的方法。此类方法包括(i)将包含编码蛋白质前药构建体的核酸的表达载体导入宿主细胞,(ii)在允许蛋白质前药构建体从载体表达的条件下培养宿主细胞,和(iii)纯化蛋白质前药构建体。核酸通常与启动子和任选的一个或多个调节核酸表达的其它调节序列有效连接。

附图说明

[0034] 以下附图用包含α-2-巨球蛋白(A2M)作为CPAMD蛋白的蛋白质前药构建体来说明本发明。蛋白质前药设计领域的技术人员将理解,其它CPAMD蛋白可以代替A2M。

[0035] 图1A显示了一种蛋白质前药构建体(1)的示意图(例如,融合蛋白),其包含一个

CPAMD蛋白(2)(例如,A2M),与一个或多个药物(例如,一个或多个纳米抗体)(3)融合,这些药物位于CPAMD蛋白的RBD域内部或附近。当CPAMD蛋白的诱饵区域未被蛋白酶切割时(非活性或"天然"构象I),一种或多种药物(3)是不可接近的。当诱饵区域被蛋白酶(4)切割时(活性构象II),一种或多种药物(3)是可接近的。当蛋白酶(4)切割"诱饵区"时,蛋白酶(4)被捕获在蛋白质前药构建体(1)内部。图1B显示了CPAMD蛋白(例如,A2M)与药物的不同融合策略的示意图。

[0036] 图2显示了野生型A2M和融合构建体的天然PAGE(图2A)和SDS-PAGE(图2B)分析,其中A2M和抗体scFv来自阿特珠单抗、伊匹单抗和纳武单抗,如上所述。在分析之前,如所示,用甲胺(MA)或溶热素处理样品。(图2C)A2M-抗体构建体的结构域组织的示意图,其显示通过硫羟酸酯自切割和诱饵区切割产生的产物的大小。

[0037] 图3显示了通过生物层干涉测量法测量的A2M-抗体对抗原结合的构象依赖性。(图3A)A2M-阿特珠单抗(使用PD-L1树脂通过一轮耗尽纯化,参见实施例4)和固定的PD-L1-hFc之间的相互作用。对照和甲胺处理的A2M-阿特珠单抗在它们的有效浓度上显示出约149倍的差异,由它们的结合的拟合的k_{obs}值计算。(图3B)A2M-EgA1(使用LRP1树脂通过两轮耗尽纯化,参见实施例4)和固定化EGFR-hFc之间的相互作用。对照和甲胺处理的或溶热素处理的样品在它们的有效浓度上显示出约63倍的差异。(图3C)A2M-伊匹单抗(使用LRP1树脂通过三轮耗尽纯化)和固定化CTLA-4-hFc之间的相互作用。(图3D)A2M-纳武单抗(使用LRP1树脂通过三轮耗尽纯化)与固定化PD-1-hFc之间的相互作用。(图3E)A2M-KN035(未富集天然A2M)与固定的PD-L1-hFc之间的相互作用。(图3F)A2M-乌瑞芦单抗(使用LRP1树脂通过三轮耗尽纯化)和固定化4-1BB-hFc之间的相互作用。(图3G)A2M-福雷芦单抗(未富集天然A2M)与固定的CD3γε-hFc之间的相互作用。(图3H)A2M-莫罗单抗(未富集的)与固定的CD3γε-hFc之间的相互作用。在G和H中,由于低强度响应,+热溶素传感图具有来自仅与热溶素相关的生物传感器的信号被减去。(图3I)A2M-阿达木单抗(未富集)与固定的TNFα之间的相互作用。

[0038] 图4显示了使用亲和耗尽的天然A2M-抗体的富集。(图4A)使用用其同源抗原PD-L1包被的树脂耗尽A2M-阿特珠单抗。进行一轮耗尽。然后使用生物层干涉测量法比较耗尽之前和之后未处理样品的抗原结合。(图4B-图4D)使用LRP1涂覆的树脂耗尽A2M-纳武单抗、A2M-伊匹木单抗和A2M-乌瑞芦单抗。对每种A2M-抗体进行三轮耗尽,之后使用生物层干涉测量法比较耗尽前后它们的抗原结合。(图4E)用蛋白L树脂将A2M-伊匹单抗耗尽三轮,并使用生物层干涉术比较其在前后的抗原结合。

[0039] 图5显示了在PD-1/PD-L1阻断的细胞生物测定中A2M-阿特珠单抗的免疫检查点阻断。将具有NFAT驱动的荧光素酶基因以报告NFκB信号传导的$PD\text{-}1^{+}$Jurkat T细胞与表达TCR激动剂的$PD\text{-}L1^{+}$CHO-K1细胞在A2M-阿特珠单抗的天然和甲胺处理的构象或与人Fc区域融合的阿特珠单抗scFv的稀释系列存在下共培养。显示了发光响应,从对照细胞中减去背景,并将随后的响应归一化为最大响应。使用线性回归拟合EC_{50}曲线,并显示每种抗体的最大响应和拟合的EC_{50}值。

[0040] 图6显示了包含不能被蛋白酶切割的诱饵区的空白A2M的构象和功能。(图6A)野生型、空白(TR)和TR K704诱饵区的序列。碱性残基(即胰蛋白酶或LysC的切割位点)被突出显示。(图6B)掺入三个给定诱饵区序列的A2M的孔限制天然PAGE。所有构建体最初都表现出缓

慢的电泳迁移率,这是A2M的天然构象的特征;在甲胺氨解或诱饵区切割时,A2M崩溃并表现出更快的电泳迁移率。野生型A2M和A2MTR K704均被胰蛋白酶崩溃,而仅A2M TR K704被LysC崩溃;A2MTR不被任一种蛋白酶崩溃。(图6C)减少与B中相同的A2M样品的SDS-PAGE。在甲胺处理后,硫羟酸酯依赖性热切割带(TE 120和TE 60)消失。A2M的诱饵区切割产生其约85和约95N和C末端片段条带;C末端片段另外通过硫羟酸酯介导的缀合形成高MW多聚体产物。当诱饵区不能被胰蛋白酶或LysC切割时,A2M可以在诱饵区外被切割,而不激活其硫羟酸酯。由于硫羟酸酯介导的诱饵区赖氨酸残基的缀合,A2M TR K704在蛋白水解活化时形成强的约250kDa条带。

[0041] 图7显示了将MMP2底物位点掺入空白A2M中。(图7A)野生型A2M、TRA2M和四个TR诱饵区的诱饵区序列,每个包含不同的MMP2底物序列(A21A、B74、C9和S1)。将MMP2识别序列突出显示在每个序列中;切割发生在粗体疏水残基的N末端。(图7B)用MMP2和九种其它人蛋白酶消化具有这6个诱饵区的A2M,并通过SDS-PAGE评估切割。在完全切割的情况下,用a+表示切割诱饵区的蛋白酶,在部分切割的情况下,用(+)表示切割诱饵区的蛋白酶(相对于野生型A2M)。TR诱饵区不被任何测试的蛋白酶切割,而每种MMP2底物被每种测试的MMP切割。TRS1诱饵区不被MMP以外的蛋白酶切割,表明相对于野生型诱饵区抑制的选择性增加。(图7C-图7D)六个A2M的孔限制的天然PAGE和还原SDS-PAGE,分别具有和不具有MMP2切割。所有构建体类似地被MMP2诱饵区切割,导致构象崩溃和在SDS-PAGE中出现高MW多聚体产物,除了A2M TR。

[0042] 图8显示了A2M TR S1的生产和抑制能力的优化。(图8A)测试MMP2底物诱饵区、空白S1的数种修饰,其改善天然A2M形成的能力及其对MMP2的抑制能力。TR S1 QRT4重新引入野生型诱饵区的第四个四分之一。在TRΔ7中测试两个不同的S1位置(在位置710或703处具有切割),其将TR诱饵区缩短7个残基。(图8B)具有指定诱饵区的A2M的孔限制天然PAGE。A2M TR S1用大量非天然A2M表达。这种非天然A2M可以通过使用LRP1共轭树脂耗尽来除去。或者,天然含量在TRΔ7和TR QRT4中得到改善。(图8C)测定所示的A2M抑制MMP2消化DQ明胶的能力。通过线性回归从实验数据点计算的拟合曲线显示为虚线。误差条显示标准;n=3。

[0043] 图9显示了掺入工程化诱饵区的A2M-抗体。(图9A)野生型A2M诱饵区的诱饵区序列,实施例6中描述的缩短的MMP2底物诱饵区“TRΔ7S1 I703”,和另外的工程化的诱饵区“TRΔ7S1 I703 P704”。(图9B)多孔限制的天然PAGE和(图9C)减少野生型A2M、具有野生型诱饵区的A2M-阿特珠单抗和具有TRΔ7S1 I703诱饵区的A2M-阿特珠单抗的SDS-PAGE。如所示,分析A2M未处理,甲胺处理,或用0.5:1或4:1摩尔比的MMP2:A2M处理。(图9D)在MMP2切割之前和之后,使用生物层干涉测量法通过具有图9A中所示的3个诱饵区的A2M-阿特珠单抗评估PD-L1结合。包括仅与MMP2结合的生物传感器,而不与A2M-阿特珠单抗结合,以解决这种背景结合。另外用溶热素切割具有野生型诱饵区的A2M-阿特珠单抗以进行比较。

[0044] 图10显示了:(图10A)降低纯化的A2M-PD1的SDS-PAGE分析。A2M-PD1通过与野生型A2M或A2M-抗体相同的方案表达和纯化至高纯度。在A2M-PD1中内部硫羟酸酯的形成在变性条件下在硫羟酸酯位点引起热诱导的断裂,产生N末端和C末端产物带。(图10B)A2M-PD1与固定的PD-L1结合,如通过生物层干涉测量法评估的。显示了通过A2M-PD1进行的PD-L1结合,而不进行任何改变其构象的处理,或者在甲胺或嗜热菌蛋白酶处理以破坏其构象之后。其中加入了溶热素而没有任何A2M-PD1的参比生物传感器考虑了溶热素与生物传感器表面

的非特异性结合,并从A2M-PD1+溶热素传感器图中扣除。还包括在LRP1耗尽后的A2M-PD1,没有处理和在甲胺处理后。

[0045] 图11显示了:(图11A)降低纯化的A2M-IL2的SDS-PAGE分析。A2M-IL2通过与野生型A2M或A2M-抗体相同的方案表达和纯化至高纯度。在A2M-IL2中内部硫羟酸酯的形成在变性条件下在硫羟酸酯位点引起热诱导的断裂,产生N末端和C末端产物带。(图11B)A2M-IL2结合至固定的IL-2Rα,如通过生物层干涉测量法所评估。显示了通过A2M-IL2的IL-2Rα结合,而不进行任何改变其构象的处理,或者在甲胺-或热溶素-处理以破坏其构象之后。以相同的方式评估三轮LRP1耗尽后的A2M-IL2。

[0046] 图12显示了:(图12A)在甲胺处理之前和之后,5nM A2M-融合蛋白-EgA1与固定化的人EGFR之间的相互作用,使用生物层干涉测量法在一小时缔合和一小时解离期间测量。(图12B)在甲胺或溶热素处理之前和之后,5nM A2M-iRBD-EgA1与固定的人EGFR之间的相互作用,使用生物层干涉测量法在一小时缔合和一小时解离期间测量。(图12C-图12E)在甲胺处理之前和之后,5nM的A2M-miRBD-EgA1、A2M-miRBD-KN035和A2M-miRBD-阿特珠单抗与固定化EGFR或PD-L1之间的相互作用,在一小时缔合和一小时解离(或两小时缔合和10分钟解离)期间测量,在A2M-miRBD-阿特珠单抗的情况下,使用生物层干涉测量。(图12F)在甲胺处理之前和之后,10nM的A2M-tRBD-EgA1与固定化EGFR之间的相互作用,在一小时的缔合和解离期间测量。

[0047] 图13显示了:A2M的RBD结构域(SEQ ID NO:1的第1335位至第1474位残基),重点是四个推荐的位点,其可用于插入药物以实现构象依赖性结合。这些位点是第1392位至第1404位或第1391位至第1405位残基(环2),如通过ciRBD、iRBD、miRBD和tRBD融合方法所证实的,以及第1368位至第1379位残基(环1)、第1420位至第1426位残基(环3)和第1450位至第1457位残基(环4),它们都是β链之间的柔性接头,β链在空间上接近于第1392位至第1404位并面向它们。RBD域上的方向。相比之下,残基1468限定了插入药物在A2M-融合-EgA1构建体中的位置,其中未获得构象依赖性结合,表明RBD结构域的这一相对侧不适于实现构象依赖性结合。RBD结构域结构(来自PDB登录号7VON)被表示为卡通图,而所示残基的Cα原子被表示为球体。如所示,RBD域从两个不同的角度示出。

[0048] 如下将对本发明进行更详细的描述。

[0049] 通用性

[0050] 为了更容易理解本发明,首先在下面定义某些术语。在整个说明书中阐述了以下术语和其它术语的其它定义。

[0051] 本说明书和所附权利要求书中使用的单数形式“一个(a)”、“一个(an)”和“所述(the)”包括复数指示物,除非上下文另有明确规定。例如,“核糖核苷酸”应理解为代表一个或多个核糖核苷酸。因此,术语“一个”(或“一种”)、“一种或多种”和“至少一种”在本文中可以互换使用。

[0052] 除非特别说明或从上下文明显看出,否则如本文所用的术语“或”应理解为包含性的且涵盖“或”和“和”两者。此外,“和/或”在本文中使用时应被认为是具有或不具有另一的两个指定特征或组件中的每一个的具体公开。因此,如本文中诸如“A和/或B”的短语中所用的术语“和/或”旨在包括“A和B”、“A或B”、“A”(单独)和“B”(单独)。同样,如在诸如“A、B和/或C”的短语中使用的术语“和/或”旨在涵盖以下方面中的每一个: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);和C(单独)。

[0053] 贯穿本说明书和实施方案,词语“具有(have)”和“包含(comprise)”,或诸如“具有(has)”、“具有(having)”、“包含(comprises)”或“包含(comprising)”的变型将被理解为暗示包括所陈述的元件、特征,或整体,或元件、特征,或整体的组,但不排除任何其它元件、特征,或整体,或元件、特征或整体的组。还应理解,无论在本文中何处用其语法等价物的语言“包含”或“具有”来描述实施方案,也提供了以“由……组成”和/或“基本上由……组成”来描述的类似实施方案。

[0054] 如本文所用,术语“约”是指本领域技术人员将理解的仍然确保所述特征的技术效果的精确度区间。该术语表示与所示数值的±10%的偏差。在一些实施方案中,偏差为所示数值的±5%。在某些实施例中,偏差是所指示数值的±1%。

[0055] 术语“变体”和“同系物”可互换地用于指其中参考蛋白质的至少一种功能被保留(例如,在被蛋白酶切割时经历构象变化)的蛋白质。在一些实施方案中,变体或同系物与参考蛋白的野生型版本(例如,CPAMD蛋白,例如A2M,例如人A2M,其包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列或由SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列组成)具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或99%同一性。

[0056] 如本文所用,术语“片段”是指被一个或多个氨基酸截短(例如,N末端和/或C末端)或包含一个或多个氨基酸缺失同时保留参比蛋白的至少一种功能的蛋白(例如,特异性结合抗原或受体,例如在抗体或细胞因子的情况下,或在被蛋白酶切割时经历构象变化。例如在CPAMD蛋白如A2M的情况下)。

[0057] 如本文所用,术语“治疗性的”和“治疗活性的”是指可用于治疗或预防疾病、疾病、病症或障碍或身体功能的任何药物、药物或组合物。

[0058] 如本文所用,术语“基本上”是指展现所关注的特性或性质的总或近总程度或程度的定性条件。生物领域的普通技术人员将会理解,生物和化学现象很少(如果有的话)进行完成和/或进行完全或实现或避免绝对结果。因此,术语“基本上”在本文中用于捕获许多生物学和化学现象中固有的完全性的潜在缺乏。

[0059] 如本文所用,术语“体外”是指在人工环境中发生的事件,例如在试管或反应容器中,在细胞培养物中等,而不是在多细胞生物体内。

[0060] 本文所用的术语“体内”是指在多细胞生物体内发生的事件,例如人和非人动物。在基于细胞的系统的上下文中,该术语可用于指在活细胞内发生的事件(与例如体外系统相反)。

[0061] 定义

[0062] 在进一步详细讨论本发明之前,首先定义以下术语和约定:

[0063] α-2-巨球蛋白(A2M)

[0064] 术语“A2M”应理解为人蛋白A2M(NCBI#9606,Uniprot P01023)或其变体或片段,其包含(1)具有至少一个蛋白酶切割位点的诱饵区,和(2)受体结合域(RBD),并且能够在所述至少一个蛋白酶切割位点的蛋白水解切割时改变构象。A2M也称为C3和含有PZP样α-2-巨球蛋白结构域的蛋白5(CPAMD5)。人A2M的氨基酸序列在SEQ ID NO:1中给出,具有天然存在的多态性I1000V和N639D。除非另有说明,本文提供的用于鉴定A2M的特定氨基酸或区域的残

基编号是指SEQ ID NO:1所示的残基。对于本领域技术人员显而易见的是,编号可以在包含本文所述的一种或多种修饰的A2M变体中不同。

[0065] 抗原靶向部分

[0066] 本发明的术语“抗原靶向部分”包括单链可变片段、单克隆、重组、嵌合、人源化、全人、单链、单结构域和/或双特异性抗体,包括抗体片段。这种片段的示例包括Fab、F(ab')、F(ab)'、Fv和sFv片段。抗体可以通过全长抗体的酶切割或通过重组DNA技术产生,例如表达含有编码抗体可变区的核酸序列的重组质粒。

[0067] “单链Fv”、“sFv”或“scFv”抗体在单个多肽链中包含VH结构域和VL结构域。VH和VL通常通过肽接头连接。可以使用任何合适的连接物。在一些实施方案中,接头是(GGGGS)n(SEQ ID NO:223)或(GGS)n。在一些实施例中,n=1、2、3、4、5或6。

[0068] 术语“单结构域抗体”是指抗原靶向部分,其中抗体的一个可变结构域特异性结合抗原而不存在另一可变结构域。单结构域抗体包括纳米抗体。

[0069] 抗原是能够与抗体结合的分子或分子的一部分,其额外能够诱导动物产生能够与该抗原的表位结合的抗体。抗原可以具有一个或多个表位。上面提到的特异性反应是指抗原将以高度选择性的方式与其相应的抗体反应,而不是与大量其它抗体反应,其它抗体可以由其它抗原引起。

[0070] 单克隆抗体(mAbs)含有对抗原特异的基本同质的抗体群,该群含有基本相似的表位结合位点。这种抗体可以是任何免疫球蛋白类,包括IgG、IgM、IgE、IgA、IgD及其任何亚类。产生本发明单克隆抗体的杂交瘤可以在体外,原位或体内培养。体内或原位生产高滴度是优选的生产方法。

[0071] 嵌合抗体是其中不同部分衍生自不同动物物种的分子,例如具有衍生自鼠单克隆抗体的可变区和人免疫球蛋白恒定区的那些。

[0072] 本文所用的术语“嵌合抗体”包括单价,二价或多价免疫球蛋白。单价嵌合抗体是由通过二硫键连接的嵌合H链与嵌合L链形成的二聚体(HL)。二价嵌合抗体是由通过至少一个二硫键连接的两个HL二聚体形成的四聚体(H2L2)。多价嵌合抗体也可例如通过使用聚集(例如,来自IgM H链或[微]链)的CH区来产生。

[0073] 本发明的鼠和嵌合抗体,片段和区域可以包含单独的重链(H)和/或轻链(L)免疫球蛋白链。

[0074] 具有相同或不同可变区结合特异性的嵌合H链和L链的选择性结合剂,例如抗体,片段或衍生物,也可以通过各多肽链的适当结合来制备。

[0075] 在一些实施方案中,本文所用的术语“抗体”是指单链或单结构域抗体。

[0076] CPAMD

[0077] 术语“CPAMD”应理解为A2M所属的C3和PZP样含α-2-巨球蛋白结构域蛋白(CPAMD)家族,或该家族的成员。表1中提供了CPAMD蛋白的说明性列表。在一些实施方案中,本发明的蛋白质前药构建体可以包含天然存在的CPAMD蛋白的变体或片段。这样的变体或片段保留了屏蔽一种或多种药物的能力,并且在蛋白水解切割包含在它们中的至少一个蛋白酶切割位点时改变它们的构象,以使包含在蛋白质前药构建体中的一种或多种药物可接近。

[0078] RBD域

[0079] 术语“RBD”或“RBD结构域”应理解为CPAMD蛋白(例如,A2M)的受体结合结构域。在

天然人A2M蛋白中,RBD位于其C末端并跨越A2M的第1335位至第1474位氨基酸。Y1452和Y1453参与硫羟酸酯基团的形成。硫羟酸酯基团以其“天然”构象稳定分子。

[0080] 天然人A2M的RBD结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:3中给出。RBD结构域也称为巨球蛋白8(MG8)结构域。在本文所述的蛋白质前药构建体中,一种或多种药物(例如,治疗性肽,多肽或蛋白)位于RBD内部或附近,使得CPAMD蛋白(例如,A2M)在CPAMD蛋白的诱饵区中包含的至少一个蛋白酶切割位点的蛋白水解切割时保持能够改变构象。

[0081] 不可接近的

[0082] 术语“不可接近的”应理解为当构建体处于“闭合”构象(不是蛋白水解切割)时,蛋白质前药构建体的药物具有降低的与其结合配偶体相互作用的能力。因此,药物对其结合配偶体是“不可接近的”(例如,在药物是抗体如scFv或纳米体的情况下)。

[0083] 因此,术语“不可接近的”也可以理解为药物在“失活状态”或“被屏蔽的”中是“非活性的”。

[0084] 因此,在一个实施方案中,

[0085] a.当CPAMD蛋白(例如,A2M)中的诱饵区未被蛋白水解切割时,所述一种或多种药物是不可接近的;并且

[0086] b.当CPAMD蛋白(例如,A2M)中的诱饵区已被蛋白水解切割时,所述一种或多种药物是可接近的。

[0087] 诱饵区

[0088] 术语“诱饵区”应理解为包含至少一个蛋白酶切割位点的CPAMD蛋白(例如,A2M)的区域。在天然人A2M蛋白中,诱饵区跨越A2M的第690位至第728位氨基酸。天然人A2M的诱饵区的序列在SEQ ID NO:4中给出。天然人A2M的诱饵区优先被大多数蛋白酶切割,并且诱饵区切割触发A2M的构象变化。诱饵区序列可以被修饰以改变能够切割诱饵区并触发CPAMD蛋白构象变化的蛋白酶的选择。

[0089] 生物药物部分

[0090] 术语“生物药物部分”应理解为具有治疗性质的蛋白质或蛋白质片段(例如肽或多肽),其可掺入具有CPAMD蛋白质(例如A2M)的蛋白质前药构建体中以产生可蛋白水解活化的前药。该术语在本文中可与术语“药物”互换使用。生物药物部分的示例包括抗体片段,例如单结构域抗体(例如纳米抗体)或单链可变片段(scFv),细胞因子或细胞表面受体或配体的片段。给出EGFR结合纳米抗体EgA1(SEQ ID NO:27)、来自PDL1-结合阿特珠单抗(SEQ ID NO:28)的scFv、PDL1-结合纳米抗体KN035(SEQ ID NO:29)、来自PD1-结合纳武单抗(SEQ ID NO:30)的scFv、来自CTLA-4结合伊匹单抗(SEQ ID NO:31)的scFv、来自CD3结合福雷芦单抗(SEQ ID NO:32)的scFv、来自CD3结合莫罗单抗(SEQ ID NO:33)的scFv、来自4-1BB结合乌瑞芦单抗(SEQ ID NO:34)的scFv、来自TNFα结合的纳武单抗(SEQ ID NO:35)、IL2细胞因子(SEQ ID NO:36)或PD1受体的细胞外区域(SEQ ID NO:39)的示例序列。

[0091] 术语如“生物药物部分”、“药物”、“治疗性肽”、“治疗性多肽”或“治疗性蛋白质”、“活性剂”在本文中用于指可用于治疗或预防身体功能疾病、病、病症或障碍的蛋白质化合物。

[0092] ciRBD

[0093] 术语“ciRBD”应理解为CPAMD蛋白(例如,A2M)与生物药物部分(例如,治疗性肽、多

肽或蛋白)之间的蛋白质融合构建体,其中生物药物部分被置于RBD结构域中对应于天然人A2M的残基1402和1403的残基之间的位置。不去除CPAMD蛋白的任何残基。接头序列可用于连接生物药物部分的N末端与第1402位残基(SEQ ID NO:78)的羧基末端,以及连接生物药物部分的C末端与第1403位残基(SEQ ID NO:79)的氨基末端。在SEQ ID NO:5-6中给出了将EgA1纳米体(SEQ ID NO:27)掺入A2M的ciRBD融合构建体的示例。

[0094] iRBD

[0095] 术语“iRBD”应理解为CPAMD蛋白(例如,A2M)与生物药物部分(例如,治疗性肽、多肽或蛋白)之间的蛋白质融合构建物,其中生物药物部分替换RBD结构域的残基,所述RBD结构域的残基对应于天然人A2M中从第1392位跨越并包括第1403位的残基。生物药物部分通过N末端接头(SEQ ID NO:80)与第1391位残基连接,并通过C末端接头(SEQ ID NO:81)与第1404位残基连接。在SEQ ID NO:84至SEQ ID NO:85中给出了将EgA1纳米体(SEQ ID NO:27)掺入A2M的iRBD融合构建体的示例。

[0096] miRBD

[0097] 术语“miRBD”应理解为CPAMD蛋白(例如,A2M)与生物药物部分(例如,治疗性肽,多肽或蛋白)之间的蛋白质融合构建物,其中生物药物部分替换RBD结构域中对应于跨越天然人A2M的1393位(包括1393位)至1395位(包括1395位)残基的残基。生物药物部分通过N末端接头(SEQ ID NO:82)与第1392位残基连接,并通过C末端接头(SEQ ID NO:83)与第1396位残基连接。在SEQ ID NO:86至SEQ ID NO:87中给出了将EgA1纳米体(SEQ ID NO:27)掺入A2M的miRBD融合构建体的示例。

[0098] tRBD

[0099] 术语“tRBD”应理解为CPAMD蛋白(例如,A2M)和生物药物部分(例如,治疗性肽、多肽或蛋白)之间的蛋白质融合构建物,其中生物药物部分掺入RBD结构域的C末端。此外,RBD结构域的残基1393至1402,或另一CPAMD蛋白的RBD结构域的相应残基被修饰以使得能够形成具有与位于生物药物部分的N末端的另一α-螺旋的序列互补的序列的α-螺旋。在生物药物部分的N末端的RBD结构域α-螺旋和α-螺旋被设计成以卷曲-卷曲相互作用彼此相互作用。这些卷曲螺旋相互作用将生物药物部分带入相对于RBD结构域的位置,这有助于CPAMD蛋白(例如,A2M)对生物药物部分的屏蔽。生物药物部分在其N末端通过2残基接头与其相邻α-螺旋的C末端连接,并且α-螺旋本身在其N末端通过15残基接头与RBD结构域的C末端连接。在SEQ ID NO:92至SEQ ID NO:93中给出了将EgA1纳米体(SEQ ID NO:27)掺入A2M的tRBD融合构建体的示例。

[0100] 表位

[0101] 在本文中,术语“表位”是指被免疫系统识别的抗原部分。

[0102] 真核表达载体

[0103] 在本文中,术语“真核表达载体”是指用于将特定编码多核苷酸序列导入靶细胞的工具,其包含与待表达的核苷酸序列可操作地连接的表达控制序列(例如,合适的启动子序列)。

[0104] 序列同一性

[0105] 在本文中,术语“序列同一性”在本文中定义为分别在核苷酸、碱基或氨基酸水平的基因或蛋白质之间的序列同一性。具体地,如果DNA序列的转录物可以转录成相应的RNA

序列,则认为DNA和RNA序列是相同的。

[0106] 因此,在本文中,“序列同一性”是在氨基酸水平的蛋白质之间的同一性的量度和在核苷酸水平的核酸之间的同一性的量度。当序列比对时,可以通过比较每个序列中给定位置的氨基酸序列来确定蛋白质序列同一性。类似地,当序列比对时,可以通过比较每个序列中给定位置的核苷酸序列来确定核酸序列同一性。

[0107] 为了确定两个氨基酸序列或两个核酸的同一性百分比,为了最佳比较目的对序列进行比对(例如,为了与第二个氨基酸或核酸序列进行最佳比对,可以在第一个氨基酸或核酸序列的序列中引入缺口)。然后比较相应氨基酸位置或核苷酸位置的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置在第二序列中的相应位置被相同的氨基酸残基或核苷酸占据时,则分子在该位置是相同的。两个序列之间的百分比同一性是序列共享的相同位置的数目的函数(即,同一性百分比=相同位置的#/位置的总#(例如,重叠位置)×100)。在一个实施方案中,两个序列具有相同的长度。

[0108] 在另一实施方案中,两个序列具有不同的长度,并且间隙被视为不同的位置。可以手动排列序列并计数相同氨基酸的数目。或者,可以使用数学算法完成用于确定百分比同一性的两个序列的比对。这种算法被结合到(Altschul et al.1990)的BLASTN和BLASTX程序中。BLAST核苷酸搜索可以用NBLAST程序进行,以获得与本发明的核酸分子同源的核苷酸序列。BLAST蛋白搜索可以用BLASTX程序进行,以获得与本发明的蛋白分子同源的氨基酸序列。

[0109] 为了获得用于比较目的的缺口比对,可以使用缺口BLAST。或者,PSI-Blast可用于执行检测分子之间的远距离关系的迭代搜索。当使用BLASTN,BLASTX和Gapped BLAST程序时,可以使用相应程序的默认参数。参见http://www.ncbi.nlm.nih.gov。或者,序列同一性可以在序列比对后计算,例如通过EMBL数据库中的BLAST程序(www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST)。通常,关于例如“记分矩阵”和“间隙惩罚”的默认设置可以用于对齐。在本发明的上下文中,BLASTN和PSI BLAST默认设置可能是有利的。

[0110] 两个序列之间的同一性百分比可以使用与上述类似的技术测定,有或没有允许缺口。在计算同一性百分比时,只计入精确的匹配。因此,本发明的实施方案涉及具有一定程度的序列变异的本发明的序列。

[0111] 受试者

[0112] 术语“受试者”包括所有年龄的人,其它灵长类(例如食蟹猴、恒河猴);哺乳动物通常包括商业上相关的哺乳动物,例如牛、猪、马、绵羊、山羊、水貂、雪貂、仓鼠、猫和狗,以及鸟类。优选的受试者是人。

[0113] 术语“受试者”还包括人群的健康受试者,并且特别是暴露于病原体并且需要防止感染的健康受试者,例如健康人员。

[0114] 应当注意,在本发明的一个方面的上下文中描述的实施例和特征也适用于本发明的其它方面。

[0115] 在本申请中引用的所有专利和非专利参考文献在此全文引入作为参考。

具体实施方式

[0116] CPAMD蛋白

[0117] 本文所述的蛋白质前药构建体包含补体3-和妊娠区蛋白样、含有α-2-巨球蛋白结构域的(CPAMD)蛋白或其变体或片段。CPAMD蛋白或其变体或片段包含具有至少一个蛋白酶切割位点和受体结合域(RBD)的诱饵区。

[0118] 在一些实施方案中,一种或多种药物位于RBD的环1至4(例如,环1、环2、环3或环4)中的任一个的内部或附近。在一个具体实施例中,一种或多种药物位于环2内部。在另一具体实施方案中,一种或多种药物位于环4内部。在另一具体实施方案中,一种或多种药物位于RBD的环2附近。

[0119] 在本发明的蛋白质前药构建体中,CPAMD蛋白或其变体或片段屏蔽了一种或多种药物。CPAMD蛋白或其变体或片段能够在至少一个蛋白酶切割位点的蛋白水解切割时改变构象,使得一种或多种药物可接近。

[0120] 尽管参考其中CPAMD蛋白是α-2-巨球蛋白(A2M)或其变体或功能同源物的蛋白质前药构建体更详细地描述了本发明,但是蛋白质前药设计领域的技术人员将理解,其它CPAMD蛋白可以代替A2M。

[0121] 在一些实施方案中,蛋白质前药构建体是融合蛋白。在一个实施方案中,蛋白质融合构建体包含与一种或多种药物融合的CPAMD家族成员;或与一种或多种药物融合的CPAMD家族(2)的修饰成员;其中所述一种或多种药物位于A2M的RBD结构域内部或附近。蛋白质融合构建体和蛋白质前药在本文中可互换使用。

[0122] 在一些实施方案中,将一种或多种药物插入RBD的环1至4中的任一个中。在一些实施方案中,通过添加、取代或缺失一个或多个氨基酸来修饰环以容纳一种或多种药物。在一些实施方案中,一种或多种药物替换环的一个或多个氨基酸。在一些实施方案中,环是RDB的环2。在一些实施方案中,环是RBD的环4。

[0123] 如本文所讨论的,将一种或多种药物置于RBD的环2附近可以通过将一种或多种药物插入环2的5个氨基酸残基内或环2的5个氨基酸残基内(例如,通过替换一个或多个残基,或通过直接插入)来实现。类似地,这可以通过将一种或多种药物插入环1、环3或环4的5个氨基酸残基内部或内部(例如,通过替换一个或多个残基,或通过直接插入)来实现。环1、3和4分别具有从它们的质心计算的$27\ \text{Å}$, $21\ \text{Å}$和$25\ \text{Å}$到环2的距离。在本文所述的ciRBD融合方法中,药物和环2之间的最短约束是15个残基的C末端接头。根据每个氨基酸残基的平均长度$3.5\ \text{Å}$,可以计算出一种或多种药物可以位于离环2约$52\ \text{Å}$(例如,约$50\ \text{Å}$、约$40\ \text{Å}$、约$30\ \text{Å}$或约$20\ \text{Å}$)的位置,并且占据其可接近性取决于CPAMD蛋白(例如,A2M)的构象的位置。

[0124] 作为直接融合的替换方案,可以设计将药物放置在与环2相等的距离内,并且通过其它方式相对于RBD域具有与通过直接融合方法获得的取向相似的取向。例如,如本文所述,卷曲螺旋相互作用或高亲和力相互作用可用于将药物锚定至环2(例如,如本文所述的tRBD方法)。

[0125] 表1提供了可用于实施本发明的CPAMD蛋白的说明性列表,并且还表明了具有CPAMD蛋白的每个环的位置和序列。

[0126] 表1.环1至4在各种CPAMD蛋白中的位置

[0127]

CPAMD 蛋白	NCBI 或 UniProtKB/Swiss-Prot 参考序列	RBD	位置	序列
CPAMD1 (又称 C3)	NP_000055 2. (SEQ ID NO: 134)	环 1	1395-1401	DQDATMS (SEQ ID NO: 145)
		环 2	1414-1429	DTDDLKQLANGVDRYI (SEQ ID NO: 146)
		环 3	1449-1455	DKVSNQT (SEQ ID NO: 147)
		环 4	1480-	YAYYNLEE

[0128]

			1487	(SEQ ID NO: 148)
CPAMD2 (又称 C4A)	NP_009224.2 (SEQ ID NO: 135)	环 1	1473- 1484	WRNGKVGLSGMA (SEQ ID NO: 149)
		环 2	1497- 1512	LRADLEKLTSLSDRYV (SEQ ID NO: 150)
		环 3	1527- 1533	DSVPTSR (SEQ ID NO: 151)
		环 4	1557- 1564	YDYYNPER (SEQ ID NO: 152)
CPAMD3 (又称 C4B)	NP_001002029-3 (SEQ ID NO: 136)	环 1	1473- 1484	WRNGKVGLSGMA (SEQ ID NO: 153)
		环 2	1497- 1512	LRADLEKLTSLSDRYV (SEQ ID NO: 154)
		环 3	1527- 1533	DSVPTSR (SEQ ID NO: 155)
		环 4	1557- 1564	YDYYNPER (SEQ ID NO: 156)
CPAMD4 (又称 C5)	NP_001726.2 (SEQ ID NO: 137)	环 1	1411- 1422	SREESSSGSSHA (SEQ ID NO: 157)
		环 2	1435- 1450	NEEDLKALVEGVDQLF (SEQ ID NO: 158)
		环 3	1465- 1471	NSIPSSD (SEQ ID NO: 159)
		环 4	1496- 1503	YEYHRPDK (SEQ ID NO: 160)
CPAMD5 (又称 A2M)	NP_000005.3 (SEQ ID NO: 138)	环 1	1368- 1379	SYTGSRSASNMA (SEQ ID NO: 161)
		环 2	1392-	LKPTVKMLERSNHV (SEQ ID NO: 162)

[0129]

			1405	
		环 3	1420-1426	DKVSNQT (SEQ ID NO: 163)
		环 4	1450-1457	YDYYETDE (SEQ ID NO: 164)
CPAMD6 (又称 PZP)	NP_002855-2. (SEQ ID NO: 139)	环 1	1374-1385	SYTGNRPASNMV (SEQ ID NO: 165)
		环 2	1398-1411	LKPTVKMLERSSSV (SEQ ID NO: 166)
		环 3	1426-1432	EQVTNQT (SEQ ID NO: 167)
		环 4	1456-1463	YDYYETDE (SEQ ID NO: 168)
CPAMD7 (又称 CD109)	NP_598000-2. (SEQ ID NO: 140)	环 1	1304-1314	SFSGPGRSGMA (SEQ ID NO: 169)
		环 2	1325-1337	MVPSEAISLSETV (SEQ ID NO: 170)
		环 3	1352-1358	DSVNETQ (SEQ ID NO: 171)
		环 4	1382-1389	VDYYEPRR (SEQ ID NO: 172)
CPAMD8	NP_056507.3 (SEQ ID NO: 141)	环 1	1562-1572	RWLHAGSSNMA (SEQ ID NO: 173)
		环 2	1585-1600	DIESLEQLLLDKHMGM (SEQ ID NO: 174)
		环 3	1615-1621	DEIPSRC (SEQ ID NO: 175)
		环 4	1646-	YDYYEPAF (SEQ ID NO: 176)

[0130]

			1653	
CPAMD9（又称A2ML1）	NP_653271.3 (SEQ ID NO: 142)	环 1	1354-1365	SYVGSRSSSNMA (SEQ ID NO: 177)
		环 2	1378-1391	MEGTNQLLLQQPLV (SEQ ID NO: 178)
		环 3	1406-1412	DELIKNT (SEQ ID NO: 179)
		环 4	1436-1443	YDYYLPDE (SEQ ID NO: 180)
卵固蛋白 1	Q6IE37.2 (SEQ ID NO: 143)	环 1	1098-1109	RYTGIRNKSSMV (SEQ ID NO: 181)
		环 2	1122-1135	TMSSIEEVNNRSLI (SEQ ID NO: 182)
		环 3	1144-1148	EYKRA (SEQ ID NO: 183)
		环 4	1172-1179	YDYYEKGR (SEQ ID NO: 184)
卵固蛋白 2	Q6IE36.2 (SEQ ID NO: 144)	环 1	1336-1347	KYTGIRNKSSMV (SEQ ID NO: 185)
		环 2	1360-1373	TMSSIEELENKGQV (SEQ ID NO: 186)
		环 3	1388-1394	EYKRA (SEQ ID NO: 187)
		环 4	1418-1425	YDYYEKGR (SEQ ID NO: 188)

[0131] 在一些实施方案中,CPAMD蛋白选自C3、C4A、C4B、C5、PZP、A2ML1、CD109、CPAMD8、卵固蛋白同源物1、卵固蛋白同源物2和A2M。在一些实施方案中,CPAMD蛋白选自A2M、PZP、卵固蛋白1和卵固蛋白2及其功能同系物。在一些实施方案中,CPAMD蛋白是人A2M,或其功能同系物,例如哺乳动物A2M。在一个具体的实施方案中,CPAMD蛋白是A2M。

[0132] 在一个实施方案中,CPAMD蛋白是人CPAMD蛋白,例如表1中列出的蛋白之一,或其变体。在一些实施方案中,人CPAMD蛋白是已经如本文所述被修饰的变体,例如,变体可以包

含修饰的诱饵区。

[0133] 在一些实施方案中,CPAMD蛋白与表1中列出的全长CPAMD蛋白序列中的至少一个具有至少约70%的序列同一性。在一些实施方案中,CPAMD蛋白与表1中列出的全长CPAMD蛋白序列中的至少一个具有至少约75%的序列同一性。在一个实施方案中,CPAMD蛋白与表1中列出的全长CPAMD蛋白序列中的至少一个具有至少约80%的序列同一性。在一个实施方案中,CPAMD蛋白与表1中列出的全长CPAMD蛋白序列中的至少一个具有至少约85%的序列同一性。在一个实施方案中,CPAMD蛋白与表1中列出的全长CPAMD蛋白序列中的至少一个具有至少约90%的序列同一性。

[0134] 在一个实施方案中,CPAMD蛋白与表1中列出的全长CPAMD蛋白序列中的至少一个具有至少约91%的序列同一性。在一个实施方案中,CPAMD蛋白与表1中列出的全长CPAMD蛋白序列中的至少一个具有至少约92%的序列同一性。在一个实施方案中,CPAMD蛋白与表1中列出的全长CPAMD蛋白序列中的至少一个具有至少约93%的序列同一性。在一个实施方案中,CPAMD蛋白与表1中列出的全长CPAMD蛋白序列中的至少一个具有至少约94%的序列同一性。在一个实施方案中,CPAMD蛋白与表1中列出的全长CPAMD蛋白序列中的至少一个具有至少约95%的序列同一性。在一个实施方案中,CPAMD蛋白与表1中列出的全长CPAMD蛋白序列中的至少一个具有至少约96%的序列同一性。在一个实施方案中,CPAMD蛋白与表1中列出的全长CPAMD蛋白序列中的至少一个具有至少约97%的序列同一性。在一个实施方案中,CPAMD蛋白与表1中列出的全长CPAMD蛋白序列中的至少一个具有至少约98%的序列同一性。在一个实施方案中,CPAMD蛋白与表1中列出的全长CPAMD蛋白序列中的至少一个具有至少约99%的序列同一性。

[0135] 在进一步的实施方案中,CPAMD蛋白是人CPAMD蛋白,例如表1中列出的蛋白,条件是,

[0136] a.诱饵区如本文所述被修饰;和/或

[0137] b.将一种或多种药物(例如治疗性肽,多肽或蛋白质)

[0138] 插入RBD区,例如插入环2,例如通过除去上述环2的一个或多个残基。

[0139] 在另一实施方案中,CPAMD蛋白与表1中列出的全长CPAMD蛋白序列中的至少一个具有至少约70%的序列同一性,条件是,

[0140] a.诱饵区如本文所述被修饰;和/或

[0141] b.将一种或多种药物(例如治疗性肽,多肽或蛋白质)

[0142] 插入RBD区,例如插入环2,例如通过除去上述环2的一个或多个残基。

[0143] 在一个实施方案中,CPAMD蛋白与表1中列出的全长CPAMD蛋白序列中的至少一个具有至少约80%的序列同一性,条件是,

[0144] a.诱饵区如本文所述被修饰;和/或

[0145] b.将一种或多种药物(例如治疗性肽,多肽或蛋白质)

[0146] 插入RBD区,例如插入环2,例如通过除去上述环2的一个或多个残基。

[0147] 在一个实施方案中,CPAMD蛋白与表1中列出的全长CPAMD蛋白序列中的至少一个具有至少约85%的序列同一性,条件是,

[0148] a.诱饵区如本文所述被修饰;和/或

[0149] b.将一种或多种药物(例如治疗性肽,多肽或蛋白质)

[0150] 插入RBD区,例如插入环2,例如通过除去上述环2的一个或多个残基。

[0151] 在一个实施方案中,CPAMD蛋白与表1中列出的全长CPAMD蛋白序列中的至少一个具有至少约90%(例如,至少91%、至少92%、至少93%或至少95%)的序列同一性,条件是,

[0152] a.诱饵区如本文所述被修饰;和/或

[0153] b.将一种或多种药物(例如治疗性肽,多肽或蛋白质)

[0154] 插入RBD区,例如插入环2,例如通过除去上述环2的一个或多个残基。

[0155] 在一个实施方案中,CPAMD蛋白与表1中列出的全长CPAMD蛋白序列中的至少一个具有至少约95%(例如,至少96%、至少97%、至少98%或约99%)的序列同一性,条件是,

[0156] a.诱饵区如本文所述被修饰;和/或

[0157] b.将一种或多种药物(例如治疗性肽,多肽或蛋白质)

[0158] 插入RBD区,例如插入环2,例如通过除去上述环2的一个或多个残基。

[0159] 表1中列出的CPAMD蛋白的RBD结构域和诱饵区描述于表2中。RBD结构域(也称为"MG8结构域")和诱饵区(在一些CPAMD蛋白中也称为"过敏性结构域")是基于它们与人A2M的相应结构域/区域的功能等同来鉴定的。

[0160] 表2.各种CPAMD蛋白中RBD和诱饵区的位置

[0161]

蛋白质名称	特征	阵地位置	序列
CPAMD1 (又称 C3)	RBD 域	1352-1495	AKDQLTCNKFDLKVTIKPAPETEKRP QDAKNTMILEICTRYRGDQDATMSIL DISMMTGFAPDTDDLKQLANGVDRY ISKYELDKAFSDRNTLIIYLDKVSHSE DDCLAFKVHQYFNVELIQPGAVKVY AYYNLEESCTRFYHP (SEQ ID NO: 189)
	诱饵区	672-760	SVQLTEKRMDKVGKYPKELRKCCED GMRENPMRFSCQRRTRFISLGEACKK VFLDCCNYITELRRQHARASHLGLA RSNLDEDIIAEEN (SEQ ID NO: 190)
CPAMD2 (又称 C4A)	RBD 域	1388-1572	DMKNTTCQDLQIEVTVKGHVEYTM EANEDYEDYEYDELPAKDDPDAPLQ PVTPLQLFEGRRNRRRREAPKVVEEQ

[0162]

			ESRVHYTVCIWRNGKVGLSGMAIAD VTLLSGFHALRADLEKLTSLSDRYVS HFETEGPHVLLYFDSVPTSRECVGFE AVQEVPVGLVQPASATLYDYYNPERR CSVFYGA (SEQ ID NO: 191)
		诱饵区	680-771	NVNFQKAINEKLGQYASPTAKRCCQ DGVTRLPMMRSCEQRAARVQQPDC REPFLSCCQFAESLRKKSRDKGQAGL QRALEILQEEDLIDEDD (SEQ ID NO: 192)
	CPAMD3 (又称 C4B)	RBD 域	1388-1572	DMKNTTCQDLQIEVTVKGHVEYTM EANEDYEDYEYDELPAKDDPDAPLQ PVTPLQLFEGRRNRRRREAPKVVEEQ ESRVHYTVCIWRNGKVGLSGMAIAD VTLLSGFHALRADLEKLTSLSDRYVS HFETEGPHVLLYFDSVPTSRECVGFE AVQEVPVGLVQPASATLYDYYNPERR CSVFYGA (SEQ ID NO: 193)
		诱饵区	680-771	NVNFQKAINEKLGQYASPTAKRCCQ DGVTRLPMMRSCEQRAARVQQPDC REPFLSCCQFAESLRKKSRDKGQAGL QRALEILQEEDLIDEDD (SEQ ID NO: 194)
	CPAMD4 (又称 C5)	RBD 域	1369-1511	STSEEVCSFYLKIDTQDIEASHYRGY GNSDYKRIVACASYKPSREESSSGSS HAVMDISLPTGISANEEDLKALVEGV DQLFTDYQIKDGHVILQLNSIPSSDFL CVRFRIFELFEVGFLSPATFTVYEYHR PDKQCTMFYST (SEQ ID NO: 195)
		诱饵区	678-762	TLQKKIEEIAAKYKHSVVKKCCYDG

[0163]

			ACVNNDETCEQRAARISLGPRCIKAF TECCVVASQLRANISHKDMQLGRLH MKTLLPVSK (SEQ ID NO: 196)
CPAMD5 (又称 A2M)	RBD 域	1335-1474	EKEEFPFALGVQTLPQTCDEPKAHTS FQISLSVSYTGSRSASNMAIVDVKMV SGFIPLKPTVKMLERSNHVSRTEVSS NHVLIYLDKVSNQTLSLFFTVLQDVP VRDLKPAIVKVYDYYETDEFAIAEYN APCSKDLGNA (SEQ ID NO: 197)
	诱饵区	690-728	PQLQQYEMHGPEGLRVGFYESDVM GRGHARLVHVEEPHT (SEQ ID NO: 198)
CPAMD6 (又称 PZP)	RBD 域	1341-1482	EKEDSPFALKVQTVPQTCDGHKAHT SFQISLTISYTGNRPASNMVIVDVKM VSGFIPLKPTVKMLERSSSVSRTEVSN NHVLIYVEQVTNQTLSFSFMVLQDIP VGDLKPAIVKVYDYYETDESVVAEYI APCSTDTEHGNV (SEQ ID NO: 199)
	诱饵区	686-734	SVIPSVSAGAVGQGYYGAGLGVVER PYVPQLGTYNVIPLNNEQSSGPVP (SEQ ID NO: 200)
CPAMD7 (又称 CD109)	RBD 域	1274-1420	SIQNQEAFDLDVAVKENKDDLNHVD LNVCTSFSGPGRSGMALMEVNLLSG FMVPSEAISLSETVKKVEYDHGKLNL YLDSVNETQFCVNIPAVRNFKVSNTQ DASVSIVDYYEPRRQAVRSYNSEVKL SSCDLCSDVQGCRPCEDGA (SEQ ID NO: 201)
	诱饵区	653-683	GVYDNAEYAERFMEENEGHIVDIHD

[0164]

			FSLGSS (SEQ ID NO: 202)
CPAMD8	RBD 域	1500-1670	PVAKPAFQLLVSLQEPEAQGRPPPMP ASAAEGSRGDWPPADDDDPAADQH HQEYKVMLEVCTRWLHAGSSNMAV LEVPLLSGFRADIESLEQLLLDKHMG MKRYEVAGRRVLFYFDEIPSRCLTCV RFRALRECVVGRTSALPVSVYDYYE PAFEATRFYNVSTHSPLARE (SEQ ID NO: 203)
	诱饵区	709-740	GGLYTDEAVPAFQPHTGSLVAVAPSR HPPRTE (SEQ ID NO: 204)
CPAMD9 (又称 A2ML1)	RBD 域	1321-1454	PTNMKTFSLSVEIGKARCEQPTSPRSL TLTIHTSYVGSRSSSNMAIVEVKMLS GFSPMEGTNQLLLQQPLVKKVEFGT DTLNIYLDELIKNTQTYTFTISQSVLV TNLKPATIKVYDYYLPDEQATIQYSD PCE (SEQ ID NO: 205)
	诱饵区	695-727	SHRSPEYSTAMGAGGGHPEAFESSTP LHQAEDS (SEQ ID NO: 206)
卵固蛋白 1*	RBD 域	1096-1185	IFRYTGIRNKSSMVVIDVKMLSGFTP TMSSIEEVNNRSLIFQHKDSYIEYKRA DSFPFSVEQSNLVFNIQPAPAMVYDY YEKGRQATAMP (SEQ ID NO: 207)
	诱饵区	616-617	II (SEQ ID NO: 208)
卵固蛋白 2	RBD 域	1308-1432	PKKASGFSLSLEIVKNYSLTVFDLTVN LKYTGIRNKSSMVVIDVKMLSGFTPT MSSIEELENKGQVMKTEVKNDHVLF YLENVFGRADSFTFSVEQSNLVFNIQ PAPGMVYDYYEKDGEAFLLTN (SEQ

[0165]

			ID NO: 209)
	诱饵区	673-716	VMERRLPLPKPLYLETENYGPMHSVP SRIACRGENADYVEQAII (SEQ ID NO: 210)

[0166] *可用的卵固蛋白1序列(Q6IE37.2)质量差且可能不完全。

[0167] 当一种或多种药物(例如,治疗性肽、多肽或蛋白质)被引入RBD中时,它们在空间上被阻碍与其它蛋白质如它们的治疗靶相互作用。RBD结构域本身是小结构域(约16kDa)。不希望受任何特定理论的束缚,本发明人相信RBD结构域本身不可能在空间上阻碍一种或多种药物(例如,治疗性肽、多肽或蛋白质),尤其是考虑到接头通常存在于一种或多种药物和RBD结构域之间。不希望受任何特定理论的束缚,本发明人因此相信CPAMD蛋白的其它部分或多个拷贝有助于一种或多种药物的周围环境和隔离。例如,天然存在的CPAMD蛋白(例如,A2M)形成同型四聚体。

[0168] 在一些实施方案中,CPAMD蛋白(例如,A2M)形成多聚体(例如,二聚体或四聚体)。在一些实施方案中,多聚体包含相同的亚单位(例如,同型二聚体或同型四聚体)。不希望受任何特定理论的束缚,本发明人相信,来自一个或多个相邻亚单元的贡献有助于一种或多种药物的隔离是可能的。

[0169] 已知两种人CPAMD蛋白形成二聚体(通常通过一个或多个二硫键稳定),即A2M和妊娠区蛋白(PZP,又称CPAMD6)。在A2M中,二硫化物桥接的二聚体主要通过它们的LNK区域参与与另一种二硫化物桥接的二聚体的另外的非共价相互作用,以形成四聚体。这种四聚体的形成也可见于卵固蛋白,例如那些已经在鸭,鸡和蛙中表征的。两种人卵固蛋白,卵固蛋白1和卵固蛋白2也被预测为四聚体。

[0170] 因此,在一些实施方案中,根据本发明的蛋白质前药构建体能够形成多聚体,例如二聚体或四聚体。在一些实施方案中,多聚体是异多聚体(例如,异二聚体或异四聚体)。更典型地,多聚体是同型二聚体或同型四聚体。

[0171] 在一些实施方案中,通过CPAMD蛋白的LNK区域发生多聚体(例如二聚体或四聚体)形成。在一些实施方案中,四聚体由两个二硫化物桥接的二聚体(例如,两个同型二聚体)形成。

[0172] 在两个环中发现形成负责二硫键桥接的二聚体的亚单位间二硫键的半胱氨酸,其中一个位于CPAMD蛋白的MG3结构域,另一位于CPAMD蛋白的MG4结构域。这些循环在表3中定义。表3中还定义了已经显示参与形成四聚体的CPAMD蛋白中的两个二硫键桥接的二聚体之间的相互作用的LNK区域。

[0173] 表3.用于在各种CPAMD蛋白中形成多聚体的区域。

[0174]

蛋白质名称	特征	位置	序列
CPAMD5（又称 A2M）	具有半胱氨酸的 MG3 环	271-285	YSDASDCHGEDSQA (SEQ ID NO: 211)
	具有半胱氨酸的 MG4 环	424-444	NYKDRSPCYGYQWVSEEHEEA (SEQ ID NO: 212)
	LNK 环	644-665	NRHNVYINGITYTPVSSTNEKD (SEQ ID NO: 213)
CPAMD6（又称 PZP）	具有半胱氨酸的 MG3 环	271-281	LSRVLNCDKQE (SEQ ID NO: 214)
	具有半胱氨酸的 MG4 环	420-440	FTVHPNLCFHYSWVAEDHQGA (SEQ ID NO: 215)
	LNK 环	642-661	RPFFIHNGAIYVPLSSNEAD (SEQ ID NO: 216)
卵固蛋白 1	具有半胱氨酸的 MG3 环	246-258	YFSSSNCEKNENE (SEQ ID NO: 217)
	具有半胱氨酸的 MG4 环	375-395	RHQRTEECYLPSWLTPQYLDA (SEQ ID NO: 218)
	LNK 环	579-600	PQRDMFYNGLYYTPVSNYGDGD (SEQ ID NO: 219)
卵固蛋白 2	具有半胱氨酸的 MG3 环	251-263	YFSSSNCEKNENE (SEQ ID NO: 220)
	具有半胱氨酸的 MG4 环	403-423	TYVRPKSCYLPSWLTPQYLDA (SEQ ID NO: 221)
	LNK 环	627-648	PQRDMFYNGLYYTPVSNYGDGD (SEQ ID NO: 222)

[0175]

[0176] 本文所述的iRBD、miRBD、ciRBD和tRBD通过在CPAMD蛋白(例如,A2M)的RBD上的环2(第1392位至第1405位残基)附近“锁定”药物(例如,肽、多肽或蛋白)的位置,通过在iRBD/miRBD/ciRBD方法中直接融合或通过在tRBD方法中用卷曲螺旋相互作用将药物锚定到该位置来产生蛋白质前药构建体。其它能够将药物固定在相对于RBD结构域的一般位置的方法对于本领域技术人员来说是显而易见的。

[0177] 在一些实施方案中,蛋白质前药构建体包含第一相互作用结构域并且一种或多种

药物包含第二相互作用结构域,其中第一相互作用结构域和第二相互作用结构域形成将一种或多种药物定位在RBD的环1至4(例如,环1、环2、环3或环4)中的任一个附近的复合物。在一个具体实施方案中,第一相互作用结构域和第二相互作用结构域形成将一种或多种药物定位在环2附近的复合物。在另一具体的实施方案中,第一相互作用结构域和第二相互作用结构域形成将一种或多种药物定位在环4附近的复合物。在一些实施方案中,第一相互作用结构域和第二相互作用结构域形成卷曲螺旋结构。

[0178] 不希望受任何特定理论的束缚,本发明人相信,使用第一相互作用结构域和第二相互作用结构域将一种或多种药物定位在RBD的环2附近允许CPAMD蛋白采取其"天然"构象,从而将其内部的一种或多种药物隔离(因此,将其与一种或多种靶相互作用屏蔽)。例如,可以通过将第一交互域插入RBD的环2,或者插入RBD的环1至3之一(例如,环4)来实现空间接近。

[0179] 一种方法是将药物"对接"到CPAMD蛋白(例如,A2M)中。这可以使用对RBD的环2具有固有亲和力的分子来完成,例如LRP1受体的功能片段或识别环2表位的抗体(例如,纳米体)。

[0180] 或者,可以修饰CPAMD蛋白(例如A2M)的RBD以促进这种对接。例如,可以将标记序列引入RBD(例如,在"ciRBD"位置),并且可以将药物与识别标记的抗体(例如,纳米体或类似的小结合结构域)融合。

[0181] 因此,在一些实施方案中,第一相互作用结构域是RBD的环2内的标签或表位序列,第二相互作用结构域是能够特异性结合标签或表位序列的受体或抗体的功能性片段。

[0182] A2M

[0183] α-2-巨球蛋白(A2M)是在人血浆中以高浓度(通常为1-5g/L)发现的蛋白质。A2M是具有充分表征的作用机制的蛋白酶抑制剂。首先,蛋白酶切割被称为诱饵区的序列的暴露的和易感延伸的序列,其允许被大多数人蛋白酶切割。诱饵区切割引起A2M的构象变化,导致A2M在蛋白酶周围崩溃,将蛋白酶捕获在A2M内并防止其接近另外的大蛋白底物(图1)。如果切割是快速的和顺序的,则至多两种蛋白酶可以被单一的A2M蛋白抑制。除了捕获引发的蛋白酶之外,还存在触发的构象变化的两个附加结果:(i)暴露了LRP1受体的A2M上的隐蔽结合位点,导致A2M蛋白酶复合物与细胞表面LRP1的结合以及这些复合物例如从循环中通过表达LRP1的肝细胞的快速清除。和(ii)在A2M上暴露反应性硫羟酸酯部分,允许与捕获的蛋白酶形成共价键。

[0184] 本发明描述了将生物药物部分以这样的方式掺入A2M,即生物药物部分的结合能力由A2M的构象调节。适用于本发明的生物药物部分包括治疗性肽,多肽或蛋白质,例如抗体(例如单链或单结构域抗体,例如scFv和纳米体)。在A2M的天然构象中,掺入的生物药物部分占据屏蔽位置,在该屏蔽位置它具有降低的与其治疗靶相互作用的能力。在A2M的构象通过诱饵区的蛋白水解切割(或者,通过使用甲胺的A2M的硫羟酸酯的氨解,其触发类似的构象变化)而改变之后,生物药物部分显示增加的与其靶标相互作用的能力。通过修饰A2M的诱饵区序列,可以将特异性蛋白酶指定为能够切割诱饵区并触发这种构象变化。总之,这可用于生产A2M和生物药物部分(例如,治疗性肽、多肽或蛋白质)的蛋白质融合构建体,所述生物药物部分用作生物药物部分的蛋白酶活化的前药形式。

[0185] 在一个实施方案中,本发明提供了蛋白质前药构建体,其包含:(a)α-2-巨球蛋白

(A2M)蛋白,或其变体或片段,和(b)一种或多种药物,其中(i)A2M蛋白,或其变体或片段包含(1)具有至少一个蛋白酶切割位点的诱饵区,和(2)受体结合域(RBD),(ii)一种或多种药物位于RBD内部或附近,和(iii)A2M蛋白或其变体或片段屏蔽一种或多种药物,并且能够在至少一个蛋白酶切割位点的蛋白水解切割时改变构象,使得所述一种或多种药物可接近。

[0186] 在一些实施方案中,本发明涉及包含与一种或多种药物融合的α-2-巨球蛋白(A2M)的蛋白质融合构建体;或与一种或多种药物融合的修饰的A2M;其中一种或多种药物位于A2M的RBD结构域内部或附近。

[0187] 在一些实施方案中,一种或多种药物位于RBD的环1至4中的任何一个的内部或附近。在一些实施方案中,蛋白质前药构建体是融合蛋白。在一些实施方案中,一种或多种药物位于RBD的环1至4中的任一个内。在一些实施方案中,环是环1。在一些实施方案中,环是环2。在一些实施方案中,环是环3。在一些实施方案中,环是环4。在一些实施方案中,相对于野生型环序列,通过添加、取代或缺失一个或多个氨基酸来修饰环以容纳一种或多种药物。在一些实施方案中,一种或多种药物替换环的一个或多个氨基酸。

[0188] 在一个实施方案中,当α-2-巨球蛋白(A2M)中的诱饵区未被蛋白水解切割时,所述一种或多种药物是不可接近的;当α-2-巨球蛋白(A2M)中的诱饵区被蛋白水解切割时,所述一种或多种药物是可接近的。

[0189] 在一个实施方案中,诱饵区的切割可以通过丝氨酸蛋白酶,半胱氨酸蛋白酶,颗粒蛋白酶和/或金属蛋白酶来实现。

[0190] 药物可以位于蛋白质融合构建体序列内的不同位置。

[0191] 技术人员将能够识别来源于A2M的蛋白质融合构建物的部分。因此,在将药物插入A2M序列的实施方案中,所得融合构建体可被视为A2M的第一部分,药物和A2M的第二部分。在这种情况下,本领域技术人员将能够将A2M的第一部分和第二部分识别为完整的分子。因此,在一个具体的实施方案中,A2M的序列同一性由两个分开的部分计算,基于从A2M衍生的序列,因此不包括一种或多种药物。

[0192] 在一个实施方案中,A2M分子是哺乳动物A2M分子或其变体,例如人A2M分子。

[0193] 在一个实施方案中,A2M分子是人A2M分子,如SEQ ID NO:1的序列,或其变体。在一些实施方案中,人A2M分子是如本文所述已经被修饰的变体,例如,变体可以包含修饰的诱饵区。

[0194] 在一些实施方案中,A2M分子与SEQ ID NO:1的序列具有至少约70%的序列同一性。在一些实施方案中,A2M分子与SEQ ID NO:1的序列具有至少约75%的序列同一性。在一个实施方案中,A2M分子与SEQ ID NO:1的序列具有至少约80%的序列同一性。在一个实施方案中,A2M分子与SEQ ID NO:1的序列具有至少约85%的序列同一性。在一个实施方案中,A2M分子与SEQ ID NO:1的序列具有至少约90%的序列同一性。

[0195] 在一个实施方案中,A2M分子与SEQ ID NO:1的序列具有至少约91%的序列同一性。在一个实施方案中,A2M分子与SEQ ID NO:1的序列具有至少约92%的序列同一性。在一个实施方案中,A2M分子与SEQ ID NO:1的序列具有至少约93%的序列同一性。在一个实施方案中,A2M分子与SEQ ID NO:1的序列具有至少约94%的序列同一性。在一个实施方案中,A2M分子与SEQ ID NO:1的序列具有至少95%的序列同一性。在一个实施方案中,A2M分子与SEQ ID NO:1的序列具有至少约96%的序列同一性。在一个实施方案中,A2M分子与SEQ ID

NO:1的序列具有至少约97％的序列同一性。在一个实施方案中,A2M分子与SEQ ID NO:1的序列具有至少约98％的序列同一性。在一个实施方案中,A2M分子与SEQ ID NO:1的序列具有至少约99％的序列同一性。

[0196] 在进一步的实施方案中,A2M分子是人A2M分子,例如根据SEQ ID NO:1的序列,条件是,

[0197] c.诱饵区如上所述被修饰;和/或

[0198] d.将一种或多种药物(例如治疗性肽,多肽或蛋白质)

[0199] 插入RBD区,例如插入环2,例如通过除去上述环2的一个或多个残基。

[0200] 在另一实施方案中,A2M分子与根据SEQ ID NO:1的序列具有至少约70％的序列同一性,条件是,

[0201] c.诱饵区如上所述被修饰;和/或

[0202] d.将一种或多种药物(例如治疗性肽,多肽或蛋白质)

[0203] 插入RBD区,例如插入环2,例如通过除去上述环2的一个或多个残基。

[0204] 在一个实施方案中,A2M分子与根据SEQ ID NO:1的序列具有至少约80％的序列同一性,条件是,

[0205] c.诱饵区如上所述被修饰;和/或

[0206] d.将一种或多种药物(例如治疗性肽,多肽或蛋白质)

[0207] 插入RBD区,例如插入环2,例如通过除去上述环2的一个或多个残基。

[0208] 在一个实施方案中,A2M分子与根据SEQ ID NO:1的序列具有至少约85％的序列同一性,条件是,

[0209] c.诱饵区如上所述被修饰;和/或

[0210] d.将一种或多种药物(例如治疗性肽,多肽或蛋白质)

[0211] 插入RBD区,例如插入环2,例如通过除去上述环2的一个或多个残基。

[0212] 在一个实施方案中,A2M分子与根据SEQ ID NO:1的序列具有至少约90％(例如,至少91％、至少92％、至少93％或至少95％)的序列同一性,条件是,

[0213] c.诱饵区如上所述被修饰;和/或

[0214] d.将一种或多种药物(例如治疗性肽,多肽或蛋白质)

[0215] 插入RBD区,例如插入环2,例如通过除去上述环2的一个或多个残基。

[0216] 在一个实施方案中,A2M分子与根据SEQ ID NO:1的序列具有至少约95％(例如,至少96％、至少97％、至少98％或约99％)的序列同一性,条件是,

[0217] c.诱饵区如上所述被修饰;和/或

[0218] d.将一种或多种药物(例如治疗性肽,多肽或蛋白质)

[0219] 插入RBD区,例如插入环2,例如通过除去上述环2的一个或多个残基。

[0220] 在一个实施方案中,一种或多种药物位于SEQ ID NO:1中的第1391位和第1405位之间。

[0221] 在另一实施方案中,一种或多种药物位于SEQ ID NO:1中的第1335位之后。

[0222] 在另一实施方案中,一种或多种药物位于SEQ ID NO:1中的第1474位之前。

[0223] 在另一实施方案中,一种或多种药物位于SEQ ID NO:1中的第1391位和第1405位之间或位于A2M中的1335位之后但位于第1474位之前。

[0224] 在另一实施方案中,A2M分子包含一个或多个突变K1393A、K1397A、T654C和/或T661C。

[0225] K1393A和K1397A分别除去A2M与受体LRP1和Grp78的相互作用。当结合时,LRP1介导切割的A2M、Grp78的清除在细胞中诱导促有丝分裂信号传导。这两种受体相互作用在药物中潜在地是有问题的,因为这样可以有益地除去这些氨基酸。

[0226] T654C和T661C突变引入二硫化物,其桥接A2M的两个二硫化物-二聚体,使得整个A2M四聚体通过二硫键稳定。这防止了A2M分裂成其两个半部分,这可以在生理条件如炎症期间发生(由于对A2M的氧化损伤)。

[0227] 在本发明的一个方面,本发明涉及包含α-2-巨球蛋白(A2M)的蛋白质融合构建体,其包含具有至少一个蛋白酶切割位点的诱饵区,所述A2M与位于A2M的受体结合域(RBD)的残基1392-1404,1368-1379或1420-1426内的肽药物融合。特别地,在这样的方面,当A2M中的诱饵区未被蛋白水解切割时,可能发生肽药物不可接近;当A2M中的诱饵区被蛋白水解切割时,肽药物是可接近的。

[0228] 虽然上述段落描述了一种或多种药物在RBD结构域内的定位和关于A2M引入二硫键,但是蛋白质前药设计领域的技术人员将理解,其它CPAMD蛋白可以代替A2M并且可以鉴定这些CPAMD蛋白中的相应残基以实施本发明(例如,使用表1和2中提供的残基编号作为指导)。

[0229] 药物

[0230] 蛋白质前药构建体可以包含一种或多种药物或生物药物部分(例如,治疗性肽、多肽或蛋白质)。

[0231] 在一个实施方案中,一种或多种药物选自:抗原靶向部分(例如抗体或抗体模拟物)、细胞因子、细胞表面受体的细胞外区域、细胞表面配体的细胞外区域和受体激动剂。

[0232] 在另一实施方案中,所述一种或多种药物选自:毒素、酶和与ADC类似的小分子药物的蛋白质缀合物。例如,一种或多种药物可以含有用于小分子缀合的适当位点,例如半胱氨酸残基。

[0233] 在另一实施方案中,所述毒素选自细菌来源的炭疽和白喉毒素。

[0234] 在另一实施方案中,所述一种或多种药物是抗原靶向部分,例如抗体的单链可变片段。

[0235] 在一个实施方案中,所述抗原靶向部分选自:抗体、纳米抗体、双抗体和单链可变片段。在一些实施方案中,抗原靶向部分是单链或单结构域抗体。在具体的实施方案中,抗原靶向部分是单链可变片段。

[0236] 在另一实施方案中,所述抗原靶向部分选自单克隆抗体、重组抗体、单链抗体、双特异性抗体、纳米抗体,其中重链和轻链通过柔性接头连接的抗体、Fv分子、抗原结合片段、Fab片段、Fab'片段,F(ab')2分子、全人抗体、人源化抗体和嵌合抗体或其片段或衍生物。

[0237] 在一些实施方案中,抗原靶向部分特异性结合作为拮抗剂的抗原(例如,抗原靶向部分能够抑制配体与其受体的结合)。在一些实施方案中,抗原靶向部分特异性结合作为激动剂的抗原(例如,抗原靶向部分能够通过结合受体来诱导信号传导)。

[0238] 在一些实施方案中,抗原靶向部分特异性结合的抗原选自:BTLA、OX40、LAG3、NRP1、VEGF、HER2、CEA、CD19、CD20、淀粉样蛋白β、HER3、IGF-1R、MUC1、EpCAM、CD22、VEGFR-2、

PSMA、GM-CSF、CXCR4、CD30、CD70、FGFR2、BCMA、CD44、ICAM-1、Notch1、MHC、CD28、IL-1R1、TCR、Notch3、FGFR3、TGF-β、TGFBR1、TGFBR2、CD109、GITR、CD47、α-突触核蛋白、CD26、LRP1、CD52、IL-4Rα、VAP-1、EPO受体、整联蛋白αv、TIM-3、Grp78、LIGHT、TLR2、TLR3、PAR-2、NRP2、GLP-1受体,Hedgehog和Syndecan 1。

[0239] 在一个实施方案中,一种或多种药物具有至多100kDa,例如至多85kDa,例如至多75kDa,例如至多65kDa,例如至多55kDa,例如至多50kDa,例如至多40kDa,例如至多30kDa,例如至少10kDa的大小。

[0240] 在一个实施方案中,一种或多种药物包含至多900个氨基酸,例如至多770个氨基酸,例如至多680个氨基酸,例如至多590个氨基酸,例如至多500个氨基酸,例如至多450个氨基酸,例如至多360个氨基酸,例如至多270个氨基酸,例如至少90个氨基酸。

[0241] 在一个实施方案中,抗原靶向部分选自抗PD1、抗PD-L1、抗EGFR、抗CTLA4、抗CD137、抗CD3和抗TNFα。

[0242] 在一个实施方案中,抗原靶向部分选自阿特珠单抗、EgA1、伊匹单抗、纳武单抗、KN035、乌瑞芦单抗、福雷芦单抗、莫罗单抗和阿达木单抗,或治疗性活性的scFv、其片段或变体,其中包含一个或多个互补决定区(CDR),所有三个重链CDR,所有三个轻链CDR,所有三个重链和所有三个轻链CDR,任何上述抗原靶向部分的重链可变区和/或轻链可变区。

[0243] 在一些实施方案中,所述一种或多种药物选自ANB032、rosnilimab、LY3361237、安沙利单抗、考伯利单抗、Imsidolimab、多塔利单抗,或治疗性活性的scFv、其片段或变体,其中包含一个或多个互补决定区(CDR),所有三个重链CDR,所有三个轻链CDR,所有三个重链和所有三个轻链CDR,任何上述抗原靶向部分的重链可变区和/或轻链可变区。

[0244] 如上所述,细胞因子可用作本发明的药物。细胞因子被描述为一类诱导细胞信号传导的小蛋白。

[0245] 在一个实施方案中,所述一种或多种药物是选自趋化因子,干扰素,白细胞介素,淋巴因子和肿瘤坏死因子的细胞因子。

[0246] 在另一实施方案中,所述一种或多种药物是选自以下的细胞因子:IL1、IL1α、IL1β、IL2、IL3、IL4、IL6、IL7、IL8、IL9、IL10、IL11、IL12、IL13、IL14、IL15、IL16、IL17、I18、IL19、IL20、IL21、IL22、IL23、IL24、IL25、IL26、IL27、IL28、IL29、IL30、IL31、IL32、IL33、IL34,IL35和IL36。

[0247] 在另一实施方案中,所述一种或多种药物是选自以下的细胞因子:IL2、IFN-α、IL-15、IL-21、IL-10、IL-12、IL-17、GM-CSF、TGF-β、CSF-1、胰岛素、GLP-1、HGH、VEGF、PDGF、BMP、EPO、G-CSF、IL-11、IFN-γ和IFN-β。

[0248] 在优选的实施方案中,一种或多种药物是IL2。在实施例9中测试IL2。

[0249] 在一个实施方案中,抗原靶向部分由选自SEQ ID NO:27至SEQ ID NO:43的氨基酸序列编码。在另一实施方案中,抗原靶向部分具有或包含选自SEQ ID NO:27-43的氨基酸序列。在另一实施方案中,抗原靶向部分具有与选自SEQ ID NO:27至SEQ ID NO:43的序列具有至少约80%序列同一性,例如至少约85%、90%或甚至约95%序列同一性的氨基酸序列。如果将差异引入抗原靶向部分,优选不修饰CDR序列。

[0250] 在另一实施方案中,编码抗原靶向部分的核酸序列选自:SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID

NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:26或其与SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:26中的任一个具有至少约90％序列同一性的片段。特别是与SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:26具有约95％同一性。在另一实施方案中,氨基酸序列由选自以下的核酸序列编码:SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:26或其与SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:26中的任一个具有至少约90％序列同一性的片段;特别是与SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:26具有约95％同一性的片段。

[0251] 在另一实施方案中,本发明的蛋白质前药构建体包含1至5种药物,例如1至4种药物,例如1至3种药物,例如1至2种药物。在一个具体的实施方案中,根据本发明的蛋白质前药构建体包含1种药物。

[0252] 诱饵区

[0253] 如前所述,当蛋白酶在暴露且高度易感的诱饵区内切割时,启动蛋白质前药构建体的独特的蛋白酶捕获抑制机制(图1)。

[0254] 在一些实施方案中,根据本发明的蛋白质前药构建体包含具有经修饰的诱饵区的CPAMD蛋白(例如,A2M)。在一些实施方案中,诱饵区被修饰以改变能够切割它并触发CPAMD蛋白(例如,A2M)的构象变化的蛋白酶的选择。例如,诱饵区可以被修饰以被特定的蛋白酶或蛋白酶类(例如,MMP,如MMP2)切割。

[0255] 修饰能够构建CPAMD蛋白(例如,A2M),其包含没有蛋白酶切割位点的诱饵区。修饰不影响CPAMD蛋白(例如A2M)的结构和功能,但促进蛋白酶不能刺激CPAMD蛋白中的构象变化,如在野生型CPAMD蛋白(例如A2M)中所见。不能被蛋白酶切割的诱饵区在本文中被称为“空白诱饵区”。包含不能被蛋白酶切割的诱饵区的CPAMD蛋白(例如,A2M)在本文中称为“空白(tabula rasa)”诱饵区。

[0256] 在特定的实施方案中,至少一个蛋白酶切割位点被引入到空白诱饵区。通过使用这种修饰的诱饵区,可以控制哪些蛋白酶能够切割,从而将构象变化引入到蛋白质前药构建体中。

[0257] 例如,对于空白诱饵区以防止蛋白酶切割,它可以包含柔性和/或亲水性的工程化的氨基酸序列。在一些实施方案中,工程化的氨基酸序列包含甘氨酸,丝氨酸,丙氨酸,苏氨酸和/或脯氨酸残基的序列。在一些实施方案中,工程化的氨基酸序列替换野生型诱饵区的全部或部分。在一些实施方案中,工程化的氨基酸序列是约15个至51个氨基酸,例如约30个至40个,例如约31个至39个,例如约32个至35个。在一个具体的实施方案中,工程化的氨基酸序列的长度为约32个至33个氨基酸。在一些实施方案中,工程化的氨基酸序列替换所有野生型诱饵区,并具有与野生型诱饵区相等的长度。

[0258] 在其它实施方案中,对于防止被蛋白酶切割的空白诱饵区,它由一系列氨基酸重

复组成。该系列氨基酸重复序列可以替换部分或全部天然诱饵区。因此,在一个实施方案中,空白诱饵区包含一系列氨基酸重复。一系列三个氨基酸重复的示例是Gly-Gly-Ser、Gly-Gly-Gly、Gly-Ser-Gly、Gly-Ser-Ser、Ser-Gly-Gly、Ser-Gly-Ser、Ser-Ser-Gly、Ser-Ser-Ser。

[0259] 重复三个氨基酸的每一系列或彼此组合。

[0260] 因此,在一个实施方案中,空白诱饵区由一个或多个氨基酸重复组成,其中重复选自Gly-Gly-Ser、Gly-Gly-Gly、Gly-Ser-Gly、Gly-Ser-Ser、Ser-Gly-Gly、Ser-Gly-Ser、Ser-Ser-Gly和Ser-Ser-Ser。

[0261] 在另一实施方案中,蛋白质前药构建体包含由一个或多个氨基酸重复组成的空白诱饵区,其中所述重复是由Ser、Gly和Ala残基组成的氨基酸三联体。

[0262] 在另一实施方案中,空白诱饵区由一个或多个氨基酸重复组成,其中重复选自Gly-Gly-Ser、Gly-Gly-Gly、Gly-Ser-Gly、Gly-Ser-Ser、Ser-Gly-Gly、Ser-Gly-Ser、Ser-Ser-Gly、Ser-Ser-Ser和Ala残基。

[0263] 在另一实施方案中,蛋白质前药构建体包含由一个或多个氨基酸重复组成的空白诱饵区,其中重复选自Gly-Gly-Ser、Gly-Gly-Gly、Gly-Gly-Ala、Gly-Ser-Gly、Gly-Ser-Ser、Gly-Ser-Ala、Gly-Ala-Ser、Gly-Ala-Gly、Gly-Ala-Ala、Ser-Gly-Gly、Ser-Gly-Ser、Ser-Gly-Ala、Ser-Ser-Gly、Ser-Ser-Ser、Ser-Ser-Ala、Ser-Ala-Gly、Ser-Ala-Ser、Ser-Ala-Ala、Ala-Gly-Ser、Ala-Gly-Gly、Ala-Gly-Ala、Ala-Ser-Gly、Ala-Ser-Ser、Ala-Ser-Ala、Ala-Ala-Ser、Ala-Ala-Gly和Ala-Ala-Ala。

[0264] 在一个实施方案中,诱饵区包括5个,例如7个,例如9个,例如11个,例如13个,例如15个,例如17个重复。在一个特定的实施方案中,诱饵区包含13个重复。

[0265] 在另一实施方案中,诱饵区包含约5个至17个重复,例如约7个至15个,例如约9个至13个。

[0266] 诱饵区的总长度可以在15和51个氨基酸之间变化。

[0267] 因此,在一个实施方案中,空白诱饵区的长度为约15个至51个氨基酸,例如约30个至40个氨基酸,例如约31个至39个氨基酸,例如约32个至35个氨基酸。在一个具体的实施方案中,空白诱饵区的长度为约32个至33个氨基酸。

[0268] 在SEQ ID NO:124中可以看到由13个Gly-Gly-Ser重复组成的空白诱饵区的具体实施方案。因此,在一个实施方案中,空白诱饵区是SEQ ID NO:124。

[0269] 切割位点

[0270] 为了使蛋白质前药构建体有效作为药物,并控制蛋白质前药构建体的活性,可以将单独的蛋白酶切割位点引入空白诱饵区。因此,本领域技术人员可以控制哪些蛋白酶能够切割并由此将构象变化引入到蛋白质前药构建体中。

[0271] 本发明不限于引入单一的蛋白酶切割位点。在一些实施方案中,诱饵区可具有多个被不同蛋白酶切割的切割位点。

[0272] 因此,在一个实施方案中,诱饵区包含一个或多个蛋白酶切割位点(例如,两个,三个或四个蛋白酶切割位点)。

[0273] 在另一实施方案中,诱饵区仅包含一个蛋白酶切割位点。

[0274] 在一些实施方案中,诱饵区仅包含一个蛋白酶切割位点,所述蛋白酶切割位点可

被选自以下的蛋白酶切割:活化蛋白C、ADAM10、ADAM12、ADAM15、ADAM17/TACE、ADAM9、ADAMDEC1、ADAMTS1、ADAMTS4、ADAMTS5、BACE、BMP-1、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶1、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶10、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶14、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶2、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶4、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶5、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶6、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶7、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶8、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶9、组织蛋白酶a、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g、组织蛋白酶K、组织蛋白酶L、组织蛋白酶s、组织蛋白酶V/L2、组织蛋白酶X/Z/P、糜酶、克鲁齐蛋白酶、desc1、DPP-4、弹性蛋白酶、FAP、粒酶B、胍基酶、Hepsin、HtrA1、嗜中性粒细胞弹性蛋白酶、KLK10、KLK11、KLK13、KLK14、KLK4、KLK5、KLK6、KLK7、KLK8、乳铁蛋白、豆荚蛋白、Marapsin,基质蛋白酶-2、跨膜肽酶、MMP1、MMP8、MMP10、MMP11、MMP12、MMP13、MMP14、MMP15、MMP16、MMP17、MMP19、MMP2、MMP20、MMP23、MMP24、MMP26、MMP27、MMP3、MMP7、MMP8、MMP9、MT-SP1/蛋白裂解酶、脑啡肽酶、NS3/4a、Otubain-2、PACE4、纤溶酶、PSA、PSMA、肾素、凝血酶、TMPRSS2、TMPRSS3、TMPRSS4、TPA、类胰蛋白酶、uPA、ADAM8、FVIIa、FIXa、Furin、FXa、FXIa、FXIIa和TAFI。

[0275] 在另一实施方案中,所述诱饵区含有选自SEQ ID NO:96至SEQ ID NO:123的单一可切割位点。

[0276] 在一些实施方案中,所述诱饵区仅含有一个单一的蛋白酶切割位点,其可以被基质金属蛋白酶(MMP)切割。在一个具体的实施方案中,所述诱饵区仅含有一个单一的蛋白酶切割位点,该位点可以被选自以下的蛋白酶切割:MMP2、MMP9、MMP14、MMP1、MMP3、MMP13、MMP17、MMP11、MMP8、MMP10和MMP19。

[0277] 诱饵区也可包含两个切割位点。因此,在一个实施方案中,所述诱饵区包含两个蛋白酶切割位点。

[0278] 在另一实施方案中,所述诱饵区恰好包含两个可切割位点,其中一个可被由以下的蛋白酶组切割:MMP2、MMP9、MMP14、MMP1、MMP3、MMP13、MMP17、MMP11、MMP8、MMP10和MMP19,并且其中另一可被由以下的蛋白酶组切割:活化蛋白C、ADAM10、ADAM12、ADAM15、ADAM17/TACE、ADAM9、ADAMDEC1、ADAMTS1、ADAMTS4、ADAMTS5、BACE、BMP-1、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶1、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶10、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶14、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶2、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶4、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶5、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶6、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶7、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶8、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶9、组织蛋白酶A、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G、组织蛋白酶K、组织蛋白酶L、组织蛋白酶S、组织蛋白酶V/L2、组织蛋白酶X/Z/P、糜酶、克鲁齐蛋白酶、DESC1、DPP-4、弹性蛋白酶、FAP、粒酶B、胍基酶、Hepsin、HtrA1、嗜中性粒细胞弹性蛋白酶、KLK10、KLK11、KLK13,KLK14,KLK4,KLK5,KLK6,KLK7,KLK8,乳铁蛋白,豆荚蛋白、Marapsin、蛋白裂解酶-2、meprin、MT-SP1/蛋白裂解酶、脑啡肽酶、NS3/4a、Otubain-2、PACE4、纤溶酶、PSA、PSMA、肾素、凝血酶、TMPRSS2、TMPRSS3、TMPRSS4、TPA、类胰蛋白酶、uPA、ADAM8、FVIIa、FIXa、Furin、FXa、FXIa、FXIIa和TAFI。

[0279] 在另一实施方案中,所述诱饵区恰好包含两个选自SEQ ID NO:96至SEQ ID NO:123的可切割位点。

[0280] 在另一实施方案中,诱饵区不含除MMP外的人蛋白酶识别的蛋白酶切割位点。在一

些实施方案中,所述诱饵区含有一个或多个(例如,至少两个或三个)蛋白酶切割位点,所述蛋白酶切割位点可被一个或多个(例如,至少两个或三个)MMP切割。

[0281] 在另一实施方案中,诱饵区不含除单一切割位点外的人蛋白酶识别的蛋白酶切割位点。

[0282] 如实施例所示,诱饵区可以被高度修饰,并且本领域技术人员将能够根据所需的特异性选择任何合适的切割位点进入诱饵区。因此,在特定实施方案中,本发明的蛋白质前药构建体包含CPAMD蛋白(例如,A2M),所述CPAMD蛋白包含可被一种或多种蛋白酶选择性切割的经修饰的诱饵区。

[0283] 当切割仅发生或主要在一种特定蛋白酶的存在下发生时,蛋白酶位点是"选择性可切割的"。经修饰的诱饵区可经改造以包含一个或一个以上(例如,至少两个或三个)切割位点,其中所述切割位点中的每一者可由不同蛋白酶"选择性可切割"。例如,修饰的诱饵区可以被工程化以包含一个或两个或三个独特的识别位点,每个位点对不同的蛋白酶是特异性的。

[0284] 示例性MMP切割位点包括A21A、B74、C9和S1。在一个具体的实施方案中,诱饵区包含一个或多个(例如,至少两个或三个)A21A、B74、C9和/或S1切割位点。包含所述切割位点的示例性修饰的诱饵区可见于SEQ ID NO:126至SEQ ID NO:133。在另一具体的实施方案中,诱饵区包含赖氨酸,如SEQ ID NO:125所示。

[0285] 在一些实施方案中,修饰的诱饵区包含柔性和/或亲水性的工程化的氨基酸序列。在一些实施方案中,工程化的氨基酸序列包含甘氨酸、丝氨酸、丙氨酸、苏氨酸和/或脯氨酸残基的序列。在一些实施方案中,工程化的氨基酸序列包含甘氨酸、丝氨酸和/或丙氨酸残基的组合。在一些实施方案中,工程化的氨基酸序列替换野生型诱饵区并具有与野生型诱饵区相等的长度。

[0286] 在一个实施方案中,野生型诱饵区已被甘氨酸、丝氨酸和/或丙氨酸残基的组合所替换,所述甘氨酸、丝氨酸和/或丙氨酸残基具有与野生型诱饵区相同的长度。

[0287] 在SEQ ID NO:125至SEQ ID NO:133所示的任何序列中都可以看到切割位点插入到空白区域的示例性序列。

[0288] 在另一实施方案中,只有野生型诱饵区的一部分被所述的空白区域所替换,例如在SEQ ID NO:130中,其中保留了野生型诱饵区的C末端四分之一。

[0289] 在另一实施方案中,诱饵区中的一个或多个切割位点已经被甘氨酸,丝氨酸和/或丙氨酸残基的组合替换。

[0290] 在一个实施例中,诱饵区包括一个或多个重复,例如至少5个,例如至少6个,例如至少7个,例如至少8个。在一个具体的实施方案中,空白诱饵区的长度为至少约10个重复。

[0291] 在一个实施方案中,诱饵区的大小为约8kDa,例如至多约5kDa,例如至多约4kDa,例如至多约3kDa,例如至多约2kDa。在一个具体的实施方案中,诱饵区具有至多约2.5kDa的大小。

[0292] 在一个实施方案中,诱饵区的长度为约15个至51个氨基酸。在一个实施方案中,诱饵区的长度为约30个至40个氨基酸,例如约31个至39个氨基酸或32个至35个氨基酸。在一个具体的实施方案中,诱饵区的总长度为约32个至33个氨基酸。

[0293] 在一个实施方案中,诱饵区包含完全柔性和/或亲水性的工程化的氨基酸序列,例

如甘氨酸、丝氨酸、丙氨酸、苏氨酸和/或脯氨酸残基的随机序列,和任选的一个或多个蛋白酶切割位点(例如MMP切割位点),使得诱饵区(包括重复和切割位点)的总长度为约15个至51个氨基酸。例如,约32个至33个氨基酸。

[0294] 在一个实施方案中,当蛋白酶切割"诱饵区"时,蛋白酶被捕获在蛋白质前药构建体内部。

[0295] RBD域

[0296] 如上所述,通过使药物(例如,治疗性肽、多肽或蛋白质)与RBD结构域接触,使得RBD结构域的折叠屏蔽药物,使得药物不可接近,从而产生前药。通过将治疗性蛋白插入RBD结构域或通过用治疗性蛋白替换RBD结构域的一部分,可以使治疗性蛋白与RBD结构域接触。

[0297] 因此,在本发明的蛋白质前药构建体的典型实施方案中,药物(例如,治疗性肽、多肽或蛋白)以这样的方式位于RBD内,即CPAMD蛋白(例如,A2M)能够在诱饵区内包含的蛋白酶切割位点的蛋白水解切割时改变构象,从而使药物可接近。

[0298] 给定RBD结构域的大小,存在许多合适的位点用于插入RBD结构域。如图13所示,RBD结构域主要由β折叠组成,如本发明的实施例所示,各个β链之间的环适合插入药物。例如,在天然人A2M蛋白中,环1由第1368位至第1379位氨基酸残基形成,环2由第1392位至第1404位氨基酸残基形成,环3由第1420位至第1426位氨基酸残基形成,环4由第1450位至第1457位氨基酸残基形成。

[0299] 在一个实施方案中,药物位于环2内的A2M的RBD结构域中(在天然人A2M的第1391位和第1405位残基之间的位置,例如在第1392位和第1404位之间)。在一个实施方案中,通过取代一个或多个与天然人蛋白质的第1391位至第1405位残基或第1392位至第1404位残基形成的区域相对应的氨基酸,药物位于A2M的RBD结构域中。在一个实施方案中,药物位于A2M的RBD结构域中对应于天然人蛋白的第1391位至第1405位残基(例如,第1392位至第1404位残基)的氨基酸之间。在另一实施方案中,与天然人蛋白质的第1391位、第1392位、第1393位、第1394位、1395位、第1396位、第1397位、第1398位、第1399位、第1400位、第1401位、第1402位、第1403、第1404位和/或第1405位残基相对应的一个或多个氨基酸被药物替换。在另一实施方案中,药物位于一个或多个对应于天然人蛋白的第1391位、第1392位、第1393位、第1394位、1395位、第1396位、第1397位、第1398位、第1399位、第1400位、第1401位、第1402位、第1403、第1404位残基的氨基酸之后。

[0300] 在一个实施方案中,药物位于环1内的A2M的RBD结构域中(在天然人A2M的残基1368-1379之间的位置)。在一个实施方案中,一个或多个对应于天然人A2M的第1368位、第1369位、第1370位、第1371位、第1372位、第1373位、第1374位、第1375位、第1376位、第1377位和/或第1378位残基的氨基酸被药物替换。在另一实施方案中,药物位于对应于天然人A2M的第1368位、第1369位、第1370位、第1371位、第1372位、第1373位、第1374位、第1375位、第1376位、第1377位和/或第1378位残基的一个或多个氨基酸之后。

[0301] 在一个实施方案中,药物位于环3中A2M的RBD结构域中(在天然人A2M的第1420位至第1426位残基之间的位置)。在另一实施方案中,对应于天然人A2M的第1420位、第1421位、第1422位、第1423位和/或第1424位残基的一个或多个氨基酸被药物替换。在另一实施方案中,药物位于对应于天然人A2M的第1420位、第1421位、第1422位、第1423位和/或第

1424位残基的一个或多个氨基酸之后。

[0302] 在另一实施方案中,药物位于A2M的RBD结构域附近。在一个实施方案中,药物被束缚到A2M的RBD结构域的C末端,并通过特定的相互作用,例如α螺旋之间的卷曲螺旋相互作用,与RBD结构域的第1391位至第1405位残基紧密接近。

[0303] 虽然在前述段落中描述了一种或多种药物在RBD结构域中的定位,但是蛋白质前药设计领域的技术人员将理解,其他CPAMD蛋白可以代替A2M并且可以鉴定这些CPAMD蛋白中的相应残基以实施本发明(例如,使用表1中提供的残基编号作为指导)。

[0304] 发明人已经发现,其中药物(例如,治疗性肽,多肽或蛋白质)位于CPAMD蛋白质的RBD结构域的环2或环4内部(例如,通过替换一个或多个残基,或通过直接插入)的蛋白质前药构建体可以以高水平成功地表达(参见,例如,本文称为"ciRBD"和"miRBD"的蛋白质融合构建体)。例如,已经发现在对应于天然人A2M的第1402位残基和第1403位残基的氨基酸之间插入药物是特别有利的。用药物替换对应于天然人A2M的第1393位至第1395位残基的氨基酸可能是类似有利的。

[0305] 接头

[0306] 接头可用于将药物插入蛋白质前药构建体中。可以使用任何合适的连接物。在一些实施方案中,接头是(GGGGS)n(SEQ ID NO:223)或(GGS)n。在一些实施例中,n=1、2、3、4、5或6。

[0307] 示例性蛋白质融合构建物

[0308] 在一个实施方案中,根据本发明的示例性蛋白质融合构建体由选自以下的氨基酸序列编码:SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:25。在一个实施方案中,蛋白质融合构建体由选自以下的氨基酸序列组成:SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:25。

[0309] 在另一实施方案中,蛋白质融合构建体与选自以下的序列具有至少约80%的序列同一性,例如至少约85%的序列同一性,约90%的序列同一性,或甚至约95%的序列同一性:SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13。SEQ ID NO:15,和SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:25。

[0310] 在一个实施方案中,氨基酸序列由选自以下的核酸序列编码:SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:26:或其与SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:26中的任一个具有至少约90%序列同一性的片段。特别是与SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:26中的任一个具有约95%同一性。在一个实施方案中,氨基酸序列由选自以下的核酸序列编码:SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:26:或其至少与以下中的任一个具有约90%序列同一性的片段:SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID

NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:26,特别是与以下中的任何一个具有约95%同一性:SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:26。

[0311] 示例性核酸

[0312] 一方面,本发明涉及编码根据本发明的蛋白质融合构建体的核酸。

[0313] 在一个实施方案中,根据本发明的核酸编码根据以下中任一项的蛋白质融合构建体:SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:25。

[0314] 在另一实施方案中,核酸序列选自:SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:26;或其与SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:26中的任一个具有至少约90%序列同一性的片段。特别是与SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:26中的任一个具有约95%同一性。在另一实施方案中,核酸序列选自:SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:26;或其与SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:26中的任一个具有至少约90%序列同一性的片段,特别是与SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:26中任一个约95%同一性。

[0315] 载体

[0316] 对于要表达的蛋白质融合构建体,根据本发明的核酸是或可以被插入到表达载体中,所述表达载体通常是被设计成控制细胞中基因表达的质粒或病毒。对载体进行改造,使其含有作为增强子或启动子的调节序列,以有效表达载体携带的所需编码序列。在非限制性示例中,提供了具有表达必需的关键特征(包括启动子,目的编码序列和聚腺苷酸化信号)的裸环状质粒的用途。

[0317] 此外,为了能够容易地生产,其可以使用大肠杆菌细菌进行,该质粒包含选择标记。这使得能够在使用或不使用常规细菌抗性选择的情况下在细菌中生产。

[0318] 在另一实施方案中,本发明涉及包含本发明核酸的载体。

[0319] 在一个实施方案中,编码蛋白质融合构建体的核酸可操作地连接于启动子和任选地另外的调节所述核酸表达的调节序列。

[0320] 在一个实施方案中,载体是真核表达载体,特别是哺乳动物,例如人表达载体。

[0321] 在一个实施方案中,载体选自质粒、粘粒、噬菌体、细菌人工染色体(BAC)、噬菌粒和P1衍生的人工染色体。

[0322] 在一个实施方案中,载体是质粒。

[0323] 在一个实施方案中,质粒选自TA克隆载体、Gateway克隆载体,限制性克隆载体、Topo克隆载体、pET载体系统和pBAD载体系统。

[0324] 宿主细胞

[0325] 根据本发明的载体是或可以插入宿主细胞中,用于表达根据本发明的蛋白质融合构建体。

[0326] 一方面,本发明涉及包含本发明载体的宿主细胞。

[0327] 细胞可以是原核细胞,如细菌,或真核细胞。

[0328] 在一个实施方案中,宿主细胞选自:细菌和真核生物;通常宿主细胞是真核生物。

[0329] 在另一实施方案中,宿主细胞是酵母。

[0330] 在典型的实施方案中,宿主细胞是哺乳动物细胞,例如CHO(中国仓鼠)细胞。

[0331] 在一个实施方案中,所述宿主细胞是人。

[0332] 在另一实施方案中,所述宿主细胞是HEK293细胞系或源于HEK293细胞系。

[0333] 组合物

[0334] 本公开的另一方面涉及包含如本文所述的蛋白质前药构建体的组合物。所述组合物还可以包含本文所述的核酸、载体或宿主细胞。

[0335] 在本公开的一个实施方案中,组合物包含药学上可接受的载体。这种组合物也可称为药物组合物。

[0336] 治疗性用途

[0337] 本发明的蛋白质融合构建体可用于治疗疾病。在进一步的方面,如本文所述的组合物、核酸、载体或宿主细胞可用于治疗疾病。

[0338] 在一个方面,本发明涉及用于治疗,例如作为药物的蛋白质前药构建体。在另一方面,本发明涉及如本文所述的组合物、核酸、载体或宿主细胞,其用于治疗,例如作为药物。

[0339] 在一些实施方案中,根据本发明的蛋白质前药构建体用于治疗神经系统、眼部、循环系统、呼吸系统、消化系统或皮肤的疾病或病症。在一些实施方案中,所述疾病或病症是肿瘤、血液病症、代谢紊乱、自身免疫性疾病、免疫缺陷或感染性疾病。在一些实施方案中,所述肿瘤是选自以下的癌症:脑癌、胶质母细胞瘤、肺癌、结直肠癌、皮肤癌、恶性黑素瘤、胰腺癌、膀胱癌、肝癌、乳腺癌、眼癌和前列腺癌,癌症是血液癌症,例如选自多发性骨髓瘤、急性成髓细胞性白血病、慢性成髓细胞性白血病、急性成淋巴细胞性白血病和慢性淋巴细胞白血病,或癌症是恶性黑素瘤、乳腺癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、头颈癌、肝癌、肉瘤和B细胞淋巴瘤。在一些实施方案中,自身免疫性疾病选自关节炎(例如,类风湿性关节炎或银屑病关节炎)、多发性硬化、系统性红斑狼疮和炎症性肠病。

[0340] 在一个实施方案中,根据本发明的蛋白质前药构建体用于治疗癌症。在另一实施方案中,本发明的蛋白质前药构建体用于治疗关节炎。在另一实施方案中,本发明的组合物、核酸、载体或宿主细胞用于治疗癌症。在另一实施方案中,本发明的组合物、核酸、载体或宿主细胞用于治疗关节炎。

[0341] 本文所述的蛋白质前药构建体、组合物、核酸、载体或宿主细胞也可用于治疗方法。因此,在另一方面,本公开涉及治疗方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗量的如本文所述的蛋白质前药构建体、组合物、核酸、载体或宿主细胞。有需要的受试者可以是患有癌症或关节炎的受试者。

[0342] 在一个实施方案中,癌症是实体瘤。在一些实施方案中,癌症选自脑癌、胶质母细胞瘤、肺癌、结直肠癌、皮肤癌、恶性黑素瘤、胰腺癌、膀胱癌、肝癌、乳腺癌、眼癌和前列腺癌。

[0343] 在另一实施方案中,癌症是血液癌症,例如选自多发性骨髓瘤、急性成髓细胞性白血病、慢性成髓细胞性白血病、急性成淋巴细胞性白血病和慢性淋巴细胞性白血病。

[0344] 在另一实施方案中,癌症是恶性黑素瘤、乳腺癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、头颈癌、肝癌、肉瘤或B细胞淋巴瘤。

[0345] 在一些实施方案中,根据本发明的蛋白质前药构建体包含具有经修饰的诱饵区的CPAMD蛋白(例如,A2M)。在一些实施方案中,诱饵区被修饰以改变能够切割它并触发CPAMD蛋白(例如,A2M)的构象变化的蛋白酶的选择。例如,诱饵区被修饰以被特定的蛋白酶或蛋白酶类(例如,MMPs如MMP2)切割。

[0346] 在一个实施方案中,癌症表达对CPAMD蛋白(例如,A2M)的诱饵区中的切割位点特异的一种或多种蛋白酶。在具体的实施方案中,根据本发明的蛋白质前药构建体包含CPAMD蛋白(例如,A2M),所述CPAMD蛋白包含经修饰的诱饵区,所述经修饰的诱饵区可被癌症表达的一种或多种蛋白酶选择性地切割。

[0347] 在一个实施方案中,癌症表达选自以下的一种或多种蛋白酶:活化蛋白C、ADAM10、ADAM12、ADAM15、ADAM17/TACE、ADAM9、ADAMDEC1、ADAMTS1、ADAMTS4、ADAMTS5、BACE、BMP-1、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶1、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶10、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶14、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶2、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶4、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶5、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶6、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶7、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶8、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶9、组织蛋白酶a、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G、组织蛋白酶K、组织蛋白酶L、组织蛋白酶S、组织蛋白酶V/L2、组织蛋白酶X/Z/P、糜酶、克鲁齐蛋白酶、DESC1、DPP-4、弹性蛋白酶、FAP、粒酶B、胍基酶、Hepsin、HtrA1、嗜中性粒细胞弹性蛋白酶、KLK10、KLK11、KLK13、KLK14、KLK4、KLK5、KLK6、KLK7、KLK8、乳铁蛋白、豆荚蛋白、Marapsin、基质蛋白酶-2、meprin、MMP1、MMP8、MMP10、MMP11、MMP12、MMP13、MMP14、MMP15、MMP16、MMP17、MMP19、MMP2、MMP20、MMP23、MMP24、MMP26、MMP27、MMP3、MMP7、MMP8、MMP9、MT-SP1/蛋白裂解酶、脑啡肽酶、NS3/4a、Otubain-2、PACE4、纤溶酶、PSA、PSMA、肾素、凝血酶、TMPRSS2、TMPRSS3、TMPRSS4、TPA、类胰蛋白酶、uPA、ADAM8、FVIIa、FIXa、Furin、FXa、FXIa、FXIIa和TAFI。

[0348] 受试者与施用

[0349] 如本文所述的“受试者”包括所有年龄的人,其它灵长类(例如,食蟹猴、恒河猴);哺乳动物,通常包括商业上相关的哺乳动物,例如牛、猪、马、绵羊、山羊、水貂、雪貂、仓鼠、猫、狗;和/或鸟类。在一个典型的实施方案中,受试者是人。

[0350] 术语“受试者”还包括健康受试者群,并且特别是暴露于病原体并且需要防止感染的健康受试者,例如健康人员。

[0351] 此外,由呼吸系统病毒引起的致病性感染在老年和虚弱患者以及患有呼吸系统慢性或先天性功能障碍的患者,例如哮喘、囊性纤维化或慢性阻塞性肺病(COPD)中可能特别严重。

[0352] 因此,在本发明的一个实施方案中,受试者选自:所有年龄的人,其它灵长类(例

如,食蟹猴、恒河猴);哺乳动物通常包括商业上相关的哺乳动物,例如牛、猪、马、绵羊、山羊、水貂、雪貂、仓鼠、猫和狗,以及鸟类。

[0353] 在一个具体的实施方案中,受试者是人。

[0354] 用于产生蛋白质融合构建体的方法

[0355] 在一个方面,本发明涉及一种用于产生根据本发明的蛋白质融合构建体的方法。

[0356] 所述方法包括:

[0357] • 向宿主细胞中引入根据本发明的表达载体;

[0358] • 在允许蛋白质融合构建体从载体表达的条件下生长宿主细胞;和

[0359] • 纯化蛋白质融合构建体。

[0360] 编号的实施方案

[0361] 现在参考以下编号的实施方案进一步描述本发明:

[0362] 1.蛋白质融合构建体,其包含与一种或多种药物融合的α-2-巨球蛋白(A2M);或与一种或多种药物融合的修饰的A2M;

[0363] 其中所述一种或多种药物位于A2M的RBD结构域内部或附近。

[0364] 2.包含α-2-巨球蛋白(A2M)的蛋白质融合构建体,其包含具有至少一个蛋白酶切割位点的诱饵区,所述A2M与位于A2M的受体结合域(RBD)的第1392位至第1404位、第1368位至第1379位或第1420位至第1426位残基内的肽药物,例如一种或多种药物融合。

[0365] 3.根据实施方案1或2所述的蛋白质融合构建体,

[0366] a.其中当α-2-巨球蛋白(A2M)中的诱饵区未被蛋白水解切割时,所述一种或多种药物是不可接近的;和

[0367] b.其中当α-2-巨球蛋白(A2M)中的诱饵区已被蛋白水解切割时,所述一种或多种药物是可接近的。

[0368] 4.根据前述实施方案中任一项所述的蛋白质融合构建体,其中一种或多种药物选自:抗原靶向部分、细胞因子、细胞表面受体的细胞外区域、细胞表面配体的细胞外区域和/或受体激动剂。

[0369] 5.根据实施方案1或实施方案3-4中任一项所述的蛋白质融合构建体,其中诱饵区包含一个或多个蛋白酶切割位点。

[0370] 6.根据前述实施方案中任一项所述的蛋白质融合构建体,其中诱饵区除了单个切割位点外,不含人蛋白酶识别的蛋白酶切割位点。

[0371] 7.根据前述实施方案中任一项所述的蛋白质融合构建体,其中诱饵区中的一个或多个切割位点已被甘氨酸、丝氨酸和/或丙氨酸残基的组合替换。

[0372] 8.根据实施方案1或实施方案3-7中任一项所述的蛋白质融合构建体,其中药物位于A2M的RBD结构域内部第1335位残基和第1474位残基之间的位置,或其中所述药物位于A2M的RBD结构域的空间附近。

[0373] 9.根据前述实施方案中任一项所述的蛋白质融合构建体,其中蛋白质融合构建体由氨基酸序列编码,或者是选自由以下各项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:25。

[0374] 10.根据前述实施方案中任一项所述的蛋白质融合构建体,其中A2M分子是哺乳动

物A2M分子或其变体,例如人A2M分子。

[0375] 11.核酸,其编码前述实施方案中任一项所述的蛋白质融合构建体。

[0376] 12.载体,其包含实施方案10所述的核酸。

[0377] 13.根据实施方案12所述的载体,其中编码蛋白质融合构建物的核酸与启动子和任选地另外的调节所述核酸表达的调节序列可操作地连接。

[0378] 14.宿主细胞,其包含实施方案12至13中任一项所述的载体,优选地,其中所述宿主细胞选自细菌和真核生物。

[0379] 15.根据实施方案1至10中任一项所述的蛋白质融合构建体,其用作药物。

[0380] 16.用于制备前述实施方案中任一项所述的蛋白质融合构建体的方法,所述方法包括:

[0381] •将实施方案14所述的表达载体引入到实施方案12-13中任一项所述的宿主细胞中或引入到ny合适的宿主细胞中;

[0382] •在允许蛋白质融合构建体从载体表达的条件下生长宿主细胞;和

[0383] •纯化蛋白质融合构建体。

[0384] 等同物

[0385] 尽管在本发明的实践或测试中可以使用与本文所述的方法和材料类似或等同的方法和材料,但下文描述了合适的方法和材料。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其它参考文献通过引用以其整体并入。这里引用的参考文献不被认为是所要求保护的发明的现有技术。此外,材料,方法和实施例仅是说明性的,而不是限制性的。

[0386] 实施例

[0387] 现在将在以下非限制性实施例中更详细地描述本发明。

[0388] 实施例1-本发明的概述

[0389] 这显示了本发明的总体设计和机理,其涉及用于生产生物药物的蛋白酶活化的前药形式的技术。参考图1A,蛋白质前药构建体(1)包含CPAMD蛋白,例如人α-2-巨球蛋白(A2M)(2),其以药物可及性依赖于CPAMD蛋白(例如A2M)(2)的构象状态的方式与一种或多种药物(3)融合。CPAMD蛋白(例如,A2M)(2)通过一种或多种蛋白酶从初始“天然”构象转化为“活化”构象(4)。药物(3)可以在其在CPAMD蛋白(例如A2M)(2)的“天然”构象(I)中不可接近的位置处与CPAMD蛋白(例如A2M)(2)遗传融合,但在CPAMD蛋白(例如A2M)(2)“活化”构象(II)中可接近。以这种方式,一种或多种药物(3)的活性在空间上限于其中存在一种或多种能够活化CPAMD蛋白(例如,A2M)(2)并且具有蛋白水解能力的蛋白酶(4)的组织。由于CPAMD蛋白(例如,A2M)(2)可以被修饰以被一种或多种指定的蛋白酶(4)激活,该技术允许药物靶向表达疾病相关蛋白酶的组织,例如患病组织,从而潜在地改善药物的功效,同时最小化在健康组织中由靶结合引起的副作用。

[0390] 实施例2-A2M和抗体的蛋白质融合构建体的制备

[0391] 目的

[0392] 该数据显示A2M-抗体构建体作为正确折叠的四聚体蛋白的表达和纯化,其中A2M采用硫羟酸酯的功能性天然构象。

[0393] 材料和方法

[0394] A2M-抗体融合构建体的表达和纯化

[0395] 给出了编码A2M-抗体融合构建体的核苷酸序列和相应的氨基酸序列(SEQ ID NO:5-22)。

[0396] 使用标准瞬时转染方案在HEK293 FreeStyle细胞中表达蛋白质融合构建体。简言之,将25kDa线性聚乙烯亚胺(Polysciences)和质粒DNA在无抗生素的FreeStyle培养基(Thermo Fisher Scientific)中以4:1w/w PEI:DNA比率孵育10分钟,然后以每mL 1百万个细胞的密度缓慢滴入细胞培养物中,达到每mL培养物1μg的最终DNA浓度。4天后,通过在1500x g下旋转细胞并加入pH 7.4的HEPES至50mM的最终浓度来收集上清液。

[0397] 使用已建立的用于纯化A2M的方案进行构建体的纯化。首先使上清液通过载有Zn^{2+}的螯合HiTrap柱(GE Healthcare),并用50mM EDTA,150mM NaCl,100mM乙酸钠,pH7.4洗脱。用20mM HEPES在pH7.4透析EDTA洗脱液,然后上样到HiTrap Q柱(GE Healthcare)上,用0-400mM NaCl梯度洗脱(用恒定的20mM HEPES在pH7.4洗脱)。合并含有A2M的级分,通过超滤浓缩,并在Sephacryl S-300HR(GE Healthcare)上通过尺寸排阻色谱法纯化,使用20mM HEPES,150mM NaCl,pH 7.4流动缓冲液(HEPES-缓冲盐水,HBS)。

[0398] SDS-PAGE和孔限制天然PAGE

[0399] 如前所述(36),使用在TBE缓冲液(89mM Tris,89mM硼酸,2mM EDTA)中的自制凝胶进行天然孔限制的PAGE,对于A2M分析,丙烯酰胺梯度为5%至10%,对于C3分析,丙烯酰胺梯度为10%至15%。孔限制的电泳凝胶在TBE缓冲液中在100V下运行过夜。

[0400] 使用不连续的2-氨基-2-甲基-1,3-丙二醇和甘氨酸缓冲体系在自制的5%至15%丙烯酰胺梯度凝胶上进行变性SDS-PAGE。将样品用25mM DTT在95℃还原5分钟。

[0401] A2M与甲胺和蛋白酶的反应

[0402] 为了氨解A2M的硫醇酯,向250mM的甲胺溶液(pH 8)中加入A2M,并在37℃下孵育16小时。为了评估A2M被热溶菌素切割的情况,以2.2:1mol/mol比的蛋白酶:A2M加入热溶菌素,并在37℃下孵育五分钟。然后,使用EDTA(10mM,室温下孵育15分钟)抑制消化反应。

[0403] 结果

[0404] 在瞬时HEK293F转染中以数mg/L的产量产生蛋白质融合构建体。纯化后,构建体在天然PAGE中作为天然同源四聚体迁移(图2A),并且在还原、变性SDS-PAGE中作为1/190kDa单体亚单位迁移(图2B)。通过在硫羟酸酯的位点处存在特征性热诱导断裂来证实硫羟酸酯在构建体中的存在,从而产生在SDS-PAGE中可见的Nt和Ct自溶片段(图2B至图2C)。如果硫羟酸酯在SDS-PAGE分析之前用甲胺氨解,则这些Nt和Ct自溶片段消失。通过用溶热素处理来评估诱饵区的蛋白水解加工。构建体的诱饵区优先被溶热素切割,导致Nt和Ct切割片段的形成(图2B至图2C)。诱饵区切割诱导构建体中的构象变化,其在天然PAGE中增加它们的迁移,尽管与野生型A2M中的程度不同(图2A);这是因为暴露的抗体片段增加了活化的A2M-抗体构建体所经历的电泳抗性。

[0405] 结论

[0406] A2M和抗体scFv的蛋白质融合构建体作为同源四聚体蛋白产生。在这些蛋白中,A2M组分在功能上是正常的,因为它呈现天然构象,形成硫羟酸酯,并且优先在其诱饵区被蛋白酶切割。

[0407] 实施例3-生物层干涉测量中结合的构象依赖性

[0408] 该实施例显示了蛋白质融合构建体的构象变化如何能够控制药物的活性。在天然

状态,药物不暴露,因此是无活性的。在活性状态,药物被暴露并能够与其靶点相互作用。

[0409] 目的

[0410] 为了测定A2M和抗体的融合构建体的抗原结合能力,在使用固定于生物传感器的纯化抗原的结合实验中,以及为了测定该抗原结合能力受A2M构象影响的程度。

[0411] 材料和方法

[0412] 用于结合研究的蛋白质

[0413] 使用标准瞬时转染方案(参见实施例1)在HEK293F细胞中重组表达针对所研究抗体的抗原。用A2M的前导肽,N末端StrepII标记和人IgG1的C末端Fc区域(UniProt ID P01857,第100位至第330位残基,SEQ ID NO:40)表达抗原。每种抗原所包括的残基如下,在去除信号肽之前使用编号:

[0414] • EGFR(UniProt ID P00533,第25位至第645位残基,SEQID NO:37)

[0415] • PD-L1(UniProt ID Q9NZQ7,第19位至第239位残基,EQ ID NO:38)

[0416] • PD-1(UniProt ID Q15116,具有Cys93Ser突变的残基26-150,SEQ ID NO:39)

[0417] • CTLA-4(UniProt ID P16410,第36位至第161位残基,SEQ ID NO:40)

[0418] • CD3γε(UniProt ID P09693,γ链的第23位至第103位残基,随后是26-残基甘氨酸-丝氨酸接头和UniProt ID P07766,ε

[0419] 链的第23位至第118位残基,SEQ ID NO:41)

[0420] • 4-1BB(UniProt ID Q07011,第24位至第186位残基。

[0421] SEQ ID NO:42)

[0422] 这些表达的融合抗原的最终序列以氨基酸和核苷酸序列(SEQ ID NO:45至SEQ ID NO:58)给出。

[0423] 另外的抗原TNFα(UniProt P01375,第77位至第233位残基)被表达为链霉II标记的蛋白质,但没有C末端Fc区域(SEQ ID NO:59,60)。它还通过StrepT肌动蛋白亲和层析和尺寸排阻层析在Superdex 200Increase上纯化以分离TNFα三聚体。

[0424] 使用StrepT肌动蛋白亲和层析(Iba Life Sciences)纯化含有表达抗原的上清液,然后在Superdex 200Increase(GE Healthcare)上进行大小排阻层析。

[0425] 如实施例1所述产生A2M-抗体融合构建体。当陈述时,天然A2M-抗体通过亲和耗尽预活化的A2M来纯化;进一步的细节参见实施例5。给出了A2M-抗体的氨基酸和核苷酸序列(SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:22)。

[0426] A2M-抗体与甲胺和蛋白酶的反应

[0427] 当用甲胺处理A2M-抗体时,将200mM甲胺(pH 8)加入到A2M-抗体中,并将其在37℃下孵育16小时。当用溶热素处理A2M-抗体时,将来自嗜热脂肪芽孢杆菌(Sigma-Aldrich)的溶热素以蛋白酶:A2M的2.2:1摩尔比加入到A2M-抗体中,并在37℃下孵育5分钟。此后,通过加入25mM EDTA抑制热溶素。

[0428] 生物层干涉测量法

[0429] HEPES缓冲盐水(HBS;20mM HEPES,150mM NaCl,pH7.4)用作所有生物层干涉测量实验中的缓冲液。将抗原固定在抗人Fc捕获生物传感器(AHC生物传感器;在HBS中30nM的Fortebio)持续20分钟。然后将A2M-抗体融合构建物与不同浓度的抗原包被的生物传感器一起孵育以测量结合,然后测量HBS中的解离。如说明的,使用与实施例1相同的方法,通过

甲胺或蛋白酶处理活化A2M-抗体融合构建物。

[0430] 结果

[0431] 通过生物层干涉法评估八种不同A2M-抗体的抗原结合的构象依赖性。将抗原表达为具有人IgG1 Fc区域的融合蛋白,允许使用抗人Fc捕获生物传感器以标准化方式将抗原固定到生物传感器表面上。然后允许A2M-抗体与其固定的抗原结合,或者不对A2M-抗体进行任何处理,或者使用甲胺氨解和/或通过嗜热菌蛋白酶的蛋白水解诱导A2M的构象变化。在一些情况下,A2M抗体通过使用抗原(PD-L1)或LRP1树脂的亲和耗尽而富集A2M的天然构象,如附图图例所示并在实施例4中详细描述。

[0432] 对于所有研究的抗体,抗原结合强烈地依赖于A2M的构象(图3A至图3I),其中A2M的热溶素蛋白水解一致地得到最高的结合应答。甲胺处理产生可变的结合响应;在一些情况下,甲胺诱导类似于蛋白水解的结合反应(图3B、图3I),而在其它情况下,它产生中间反应(图3C、图3F至图3H)或可忽略的反应(图3D)。当A2M-抗体的天然构象已经通过亲和性缺失而富集时,在没有甲胺/蛋白水解的天然样品中检测到无抗原结合的现象(图3A至图3D、图3F)。

[0433] 结论

[0434] 整合到A2M融合构建物中的抗体保留了结合它们的同源抗原的能力。这种抗原结合是通过A2M的构象确定的,在A2M的天然构象中几乎没有或没有抗原结合。通过蛋白水解切割活化A2M大大增加了抗原结合,而通过甲胺处理的活化根据所讨论的A2M-抗体而变化。

[0435] 实施例4-通过亲和耗尽富集天然A2M-抗体构建体

[0436] 该实施例显示了蛋白质融合构建体的修饰如何可以用于控制药物暴露的位置。根据切割位点,药物只能暴露于识别该切割位点的蛋白酶的位置。当特定的蛋白酶存在并切割切割位点时,蛋白质融合构建体的构象从“天然的”改变为“活性的”。

[0437] 目的

[0438] 重组表达的A2M-抗体融合构建体不是在其天然构象中用A2M专门产生的;在预活化状态下产生次要组分。在这里,研究了该预活化组分是否可以通过亲和耗尽使用抗体的同源抗原、活化的A2M受体LRP1或κ轻链结合蛋白L来除去。

[0439] 材料和方法

[0440] 所用蛋白质

[0441] 如实施例1所述制备A2M-抗体。重组LRP1(第20位至第974位残基,SEQ ID NO:NO 63至SEQ ID NO:64)作为具有人IgG1 Fc区的StrepII标记的融合蛋白产生,如实施例2中的抗原所述。

[0442] 树脂制剂

[0443] 使用胺反应性化学制备用LRP1涂覆的树脂。将总共200mg NHS-活化的琼脂糖(Pierce)和600μg重组LRP1在0.15M三乙基碳酸氢铵、0.15M HEPES,pH8.3中在旋转器上在室温下混合2小时。孵育后,将树脂在HBS中洗涤两次,用50mM Tris-HCl(pH8)淬灭反应20分钟,然后用HBS进行最后的洗涤步骤。

[0444] 如LRP1所述制备涂覆有PD-L1的树脂。

[0445] 蛋白质L-包被的琼脂糖购自Pierce(Thermo Scientific)。

[0446] 亲合性耗尽

[0447] 为了耗尽预活化的A2M,在使用旋翼摇动的同时,将在HBS中的高达2mg/mL的A2M-抗体融合构建物与树脂在室温下孵育过夜。对于基于LRP1的耗尽,将10mM $CaCl_2$加入到HBS中。过夜孵育后,回收上清液,并且在LRP1的情况下使用具有25mM EDTA的HBS再生树脂,或者使用用于PD-L1和蛋白L的pH 2.7、10mM KH_2PO_4缓冲液的酸性洗脱。

[0448] 如实施例2所述,使用生物层干涉法测试回收的上清液。

[0449] 结果

[0450] 将A2M-阿特珠单抗与用其同源抗原PD-L1包被的树脂一起孵育。进行一轮消耗。然后使用生物层干涉测量法评估A2M-阿特珠单抗在该耗尽之前和之后与PD-L1的结合。尽管来自耗尽之前和之后的A2M-阿特珠单抗在甲胺处理时与PD-L1类似地结合,但是与耗尽之前的未处理样品相比,耗尽之后的未处理样品的抗原结合大大降低,表明PD-L1耗尽已经用不可接近的抗体富集了A2M-抗体的含量(图4A)。

[0451] 将A2M-伊匹单抗、A2M-纳武单抗和A2M-乌瑞芦单抗与用LRP1包被的树脂孵育,LRP1是特异性结合活化的A2M但不结合天然A2M的受体。对每种A2M-抗体进行三轮耗尽,之后使用生物层干涉术分别评估它们与CTLA-4、PD-1或4-1BB的结合(图4B至图4D)。在LRP1耗尽之前,未处理的A2M-抗体的抗原结合是所有三种抗体的溶热素活化所限定的最大结合的约25%。在LRP1耗尽之后,在未处理的A2M-伊匹单抗和A2M-纳武单抗样品中没有检测到抗原结合,并且在未处理的A2M-乌瑞芦单抗样品中检测到非常少的抗原结合,而在LRP1耗尽之前和之后观察到溶热素活化的A2M-抗体的等同结合。这些数据表明,LRP1耗尽能够耗尽A2M-抗体,其中抗体过早地能够结合抗原,进一步证明A2M的构象和抗体可及性是相关的。

[0452] A2M-伊匹单抗也使用蛋白L-包被的树脂耗尽,其特异性结合人抗体的“轻链”。进行三轮耗尽。生物层干涉测量法显示基于蛋白质L的耗尽能够去除未处理的A2M-伊匹单抗样品中的抗原结合(图4E)。

[0453] 结论

[0454] 基于A2M-抗体与它们的抗原,LRP1或蛋白L的结合,可以通过亲和性缺失来区分它们的天然和活化构象中的A2M-抗体。这种结合可以用于除去活化的A2M-抗体并制备纯度较高的天然A2M-抗体。比较耗尽前后的抗原结合的结合实验表明,天然A2M-抗体的富集导致天然蛋白的最小或没有可检测的抗原结合,证明未处理的A2M-抗体的抗原结合是由非天然A2M-抗体的污染引起的。

[0455] 实施例5-在细胞测定中研究免疫检查点阻断

[0456] 目的

[0457] 为了研究A2M-抗体在细胞环境中是否表现出构象依赖性靶结合并保留其母体抗体的生物活性,在PD-1/PD-L1阻断生物测定中研究了A2M-阿特珠单抗。

[0458] 材料和方法

[0459] 所用蛋白质

[0460] 如实施例2中针对A2M-抗体融合构建体所述表达和纯化A2M-阿特珠单抗。如实施例4中所述,使用基于PD-L1的亲和力耗尽富集天然A2M-阿特珠单抗。通过在37℃下与200mM甲胺温育16小时,接着在PD-10柱上脱盐回到HBS中来制备甲胺处理的A2M-阿特珠单抗。阿特珠单抗scFv也与人IgG1 Fc区域,与N末端StrepII标签融合表达,并且使用与实施例3中描述的抗原-hFc融合构建物相同的方案,即StrepT肌动蛋白亲和层析,随后进行大小排阻

层析,纯化该阿特珠单抗-hFc。

[0461] 免疫检查点阻断的基于细胞的评估

[0462] 使用Promega开发的PD-1/PD-L1 Blockade Bioassay测试A2M-阿特珠单抗和阿特珠单抗-hFc阻断人T细胞上的PD-1/PD-L1途径的能力。在补充有青霉素/链霉素和10％胎牛血清的RPMI 1640培养基中培养Jurkat细胞,而在补充有青霉素/链霉素和10％胎牛血清的DMEM培养基中培养CHO-K1细胞。在进行测定前一天,将$40*10^3$个CHO-K1细胞/孔接种到96孔板上。在测定当天,从孔中取出培养基,并用稀释在测定缓冲液(含有1％胎牛血清的RPMI 1640培养基)中的40μL抗体溶液和在测定缓冲液中含有$50*10^3$个Jurkat细胞的40μL抗体溶液替换。然后将板在37℃孵育6小时,之后向每个孔中加入80μL的Bio-Glo试剂(Promega),并在读板器中测量发光。在一式三份的孔中测试每种抗体浓度和对照。发光信号作为三个孔的平均归一化发光给出,减去背景(从未接受任何抗体的孔测量),并将响应归一化为测定的最高测量发光(减去背景)。

[0463] 结果

[0464] 由Promega开发的PD-1/PD-L1阻断生物测定用于研究A2M-阿特珠单抗的构象依赖性PD-L1阻断。该生物测定使用表达人PD-1的人Jurkat T细胞系以及由NFAT应答元件驱动的荧光素酶报告基因来代表人T细胞。表达人PD-L1和以抗原非依赖性方式活化同源TCR的工程化表面蛋白的CHO-K1细胞用于代表PD-L1+靶细胞。TCR-活化CHO-K1将活化Jurkat细胞并诱导NFAT-驱动的萤光素酶应答,除了该应答被PD-1-介导的信号传导抑制,这是由于在Jurkat细胞上的PD-1与CHO-K1细胞上的PD-L1的结合。如果PD-1或PD-L1被抗体阻断,则荧光素酶应答被恢复。

[0465] 在天然构象和甲胺处理的塌陷构象中的A2M-阿特珠单抗的滴定系列(从20pM至200nM)用于阻断CHO-K1细胞表面上的PD-L1。包括通过将阿特珠单抗scFv与人Fc区域融合产生的IgG类似构建体用于比较。在构象和阿特珠单抗-hFc中的A2M-阿特珠单抗都产生浓度依赖性发光响应(图5)。甲胺处理的A2M-阿特珠单抗和阿特珠单抗-hFc的最大响应相似,而在200nM的最高测量浓度下未达到对于天然A2M-阿特珠单抗的饱和响应(因此其最大响应被假定为与甲胺处理的A2M-阿特珠单抗相同)。甲胺处理的A2M-阿特珠单抗和阿特珠单抗-hFc均显示亚纳摩尔EC50值分别为400pM和80pM,而天然A2M-阿特珠单抗的EC50值为216nM。因此,A2M-阿特珠单抗在其天然和活化构象中的活性存在大约500倍的差异。

[0466] 结论

[0467] A2M-阿特珠单抗在免疫检查点阻断的细胞测定中显示阻断PD-L1和恢复$PD\text{-}1^+$T细胞中的NFkB信号传导的构象依赖性能力。这证明A2M-阿特珠单抗显示出与细胞表面PD-L1的构象依赖性结合,并且它保留了母体阿特珠单抗抗体的PD-L1-阻断功能。

[0468] 实施例6-修饰A2M诱饵区以靶向特异性蛋白酶

[0469] 目的

[0470] A2M的诱饵区的序列决定其是否可被给定的蛋白酶切割,并由此决定哪些蛋白酶能够活化A2M(并被A2M捕获)。野生型A2M的诱饵区可以被几乎所有的人蛋白酶切割,并且将诱饵区的切割限制为指定的蛋白酶将是有利的,以更具体地靶向患病组织。我们首先研究了诱饵区是否可以被不含大多数人蛋白酶的切割位点的最小序列取代。然后我们研究蛋白酶切割位点是否可以被重新引入到该最小序列中,目的是产生对单一蛋白酶或蛋白酶家族

(在本实施例中,基质金属蛋白酶(MMP))具有改进的特异性的诱饵区序列。

[0471] 材料和方法

[0472] 所用蛋白质

[0473] 在HEK293F细胞中表达具有修饰的诱饵区序列的A2M蛋白,并如实施例2中针对A2M-抗体所述进行纯化。这些A2M蛋白的氨基酸序列在SEQ ID NO:65-73中给出。

[0474] 如实施例3中对StrepII标记的hFc融合蛋白所述,使用StrepT肌动蛋白亲和层析和大小排阻层析表达和纯化N末端StrepII标记的MMP2前体(UniProt ID P08253,SEQ ID NO:61至SEQ ID NO:62)。使用1mM APMA通过在37℃孵育15分钟来活化MMP2前体,随后使用PD-10柱(GE Healthcare)用10mM $CaCl_2$脱盐成HBS。

[0475] SDS-PAGE和孔限制天然PAGE

[0476] 如前所述(36),使用在TBE缓冲液(89mM Tris,89mM硼酸,2mM EDTA)中的自制凝胶进行天然孔限制的PAGE,对于A2M分析,丙烯酰胺梯度为5%至10%,对于C3分析,丙烯酰胺梯度为10%至15%。孔限制的电泳凝胶在TBE缓冲液中在100V下运行过夜。

[0477] 使用不连续的2-氨基-2-甲基-1,3-丙二醇和甘氨酸缓冲系统在自制的5%至15%丙烯酰胺梯度凝胶(37)上进行变性SDS-PAGE。将样品用25mM DTT在95℃还原5分钟。

[0478] A2M与甲胺和蛋白酶的反应

[0479] 为了使A2M的硫羟酸酯氨解,加入甲胺(pH8)至250mM,并在37℃下孵育至少45分钟。为了评估胰蛋白酶和LysC对A2M的切割,加入蛋白酶至蛋白酶:A2M的摩尔比为2.2:1,并在37℃下孵育5分钟。然后使用丝氨酸蛋白酶抑制剂PMSF(2mM,15分钟,室温)。为了评估MMP2对A2M的切割,将MMP2加入到含有10mM $CaCl_2$的HBS中的A2M至6:1mol/mol比的MMP2:A2M,在37℃孵育15分钟,然后使用20mM EDTA抑制。当使用其它人蛋白酶切割A2M时,在含有10mM $CaCl_2$和PMSF或EDTA的HBS中在37℃下温育持续1小时,分别用于抑制丝氨酸蛋白酶和金属蛋白酶。

[0480] 通过MMP2测定A2M对蛋白质底物切割的抑制

[0481] 使用荧光标记的明胶底物研究A2M对MMP2的抑制。使1.4μmol(7.5nM)的MMP2与0μmol至2.7μmol(0nM至15nM)的A2M在50mM HEPES,100mM NaCl,5mM $CaCl_2$,pH 8中在37℃反应15分钟。添加来自猪皮(Invitrogen)的DQ明胶至最终浓度为0.1mg/ml。在FLUOstar Omega读板器(BMG LABTECH)中测量DQ明胶的未淬灭消化产物在37℃下10分钟后的荧光(在485nm激发和在520nm发射)。所有反应一式三份进行。

[0482] 结果

[0483] 用13个Gly-Gly-Ser三联体取代诱饵区产生四聚体,天然和可诱导的A2M。

[0484] 为了从诱饵区基本上除去所有蛋白酶切割位点并确定其耐受修饰的程度,我们用13个Gly-Gly-Ser重复替换了39残基野生型A2M诱饵区序列,选择这是因为它们的溶解性和对蛋白水解的低敏感性(图6A)。将得到的“空白”(TR)诱饵区掺入重组A2M,得到主要是四聚体的A2M,并通过天然PAGE评价其天然构象,在SDS-PAGE中形成特征性热诱导自溶产物明显具有完整的硫羟酸酯(图6B至图6C)。在用甲胺氨解其硫羟酸酯时,TR A2M经历与野生型A2M的构象崩溃不可区分的构象崩溃,如通过孔限制的天然PAGE所测定的;然而,TRA2M在其诱饵区不被胰蛋白酶或LysC切割,并且尽管被这些蛋白酶在其诱饵区外进行了蛋白水解,仍然保持其天然构象(图6B至图6C)。如果赖氨酸残基被引入到位置704的TR诱饵区,所得的诱

饵区可以被胰蛋白酶和LysC切割,导致蛋白酶缀合和A2M的特征构象变化(图6A至图6C)。

[0485] 鉴定具有提高的选择性的MMP2可切割的诱饵区序列。

[0486] 设计了掺入人MMP2的底物序列的四个TR诱饵区(图7A)。所有四个基于TR的MMP2底物诱饵区和野生型诱饵区都被MMP2切割,但不是初始的TRA2M(图7B至图7D)。对于野生型A2M和四种MMP2底物TR A2Ms.1,都观察到A2M:MMP2复合物的不完全诱饵区切割和中间电泳迁移率。

[0487] 然后使用还原SDS-PAGE测试四个MMP2底物诱饵区是否被9种另外的人蛋白酶(纤溶酶、组织蛋白酶G、MMP1、MMP3、MMP8、MMP13、ADAMTS4、ADAMTS5和ADAMTS13)切割,以评估诱饵区切割和高MW缀合产物的形成(图7B)。除ADAMTS13(其对von Willebrand因子高度特异)外,所有评估的蛋白酶都能够切割野生型A2M,而没有一种能够切割TRA2M(图7B)。将四个MMP2底物序列中的任一个掺入到由所有测试的MMPs输送切割的TR诱饵区中,而它们被非MMP蛋白酶不同地切割;例如,C9底物是唯一含有精氨酸残基的底物,并且是唯一要被纤溶酶切割的A2M(图7A至图7B)。S1底物仅被MMP切割(图7A至图7B),因此选择A2M TR S1蛋白作为相对于野生型A2M具有改善的MMP特异性的A2M进行进一步优化。

[0488] 通过将诱饵区缩短7个残基或恢复10个C末端的野生型残基来提高基于空白的A2M的天然含量。

[0489] 与野生型A2M相比,初始TRA2M蛋白以增加的非天然A2M的量表达(图6A,图7C)。为了解决这个问题,我们测试了两种修改后的空白诱饵区域,其中第一种,TRΔ7,通过减少7个残基缩短至总长度为32个残基,并且第二种,TR QRT4,重新引入了野生型诱饵区域的C末端四分之一(图8A)。TRβ7和TR QRT4均将其所得A2M的天然含量提高至野生型A2M的天然含量(图8B)。确定了在TRΔ7诱饵区中的S1底物序列的位置,其传达了与野生型A2M(图8C)不可区分的MMP2抑制的效率,表明该缩短的诱饵区可以完全功能性地产生A2M。

[0490] 结论

[0491] A2M的诱饵区可以被甘氨酸和丝氨酸残基完全取代,而不损害A2M的结构和功能,尽管发现被缩短为32个残基的甘氨酸-丝氨酸诱饵区提供了天然A2M的提高的产率。甘氨酸-丝氨酸诱饵区不能被10种测试的人蛋白酶切割。在将MMP2的S1底物掺入诱饵区后,5个人MMPs能够切割诱饵区,而5个非MMPs仍然不能切割。这表明甘氨酸-丝氨酸诱饵区可用作制备对蛋白酶或蛋白酶家族(如MMP)具有改进的特异性的诱饵区的基础。

[0492] 实施例7-A2M-抗体的诱饵区修饰

[0493] 研究目的

[0494] 在实施例6中,发现基于用甘氨酸和丝氨酸残基代替野生型诱饵区的“空白”(TR)诱饵区的诱饵区序列产生了A2M蛋白,其被靶蛋白酶更特异地切割和活化。此外,发现被缩短7个残基(TRΔ7)至32个残基的长度的TR诱饵区传达增加的天然A2M的产率,并且发现将MMP2的S1底物放置到TRΔ7中的特定位置(TRΔ7S1 I703)传达MMP2的抑制,其等同于野生型A2M诱饵区的抑制。这里,我们研究了掺入具有MMP2底物位点的TR诱饵区的A2M-抗体是否可以以与具有野生型诱饵区的A2M-抗体相同的方式被MMP2激活。

[0495] 材料和方法

[0496] 所用蛋白质

[0497] 在HEK293F细胞中表达具有野生型诱饵区(SEQ ID NO:7至SEQ ID NO:8)、TRΔ7S1

I703诱饵区(SEQ ID NO:74至SEQ ID NO:75)或TRΔ7S1 I703 P704诱饵区(SEQ ID NO:76至SEQ ID NO:77)的A2M-阿特珠单抗,并如实施例2中针对A2M-抗体所述进行纯化。

[0498] 如实施例6所述表达、纯化和活化MMP2前体。

[0499] 蛋白酶切割A2M

[0500] 为了用MMP2切割A2M-抗体,在含有10mM $CaCl_2$的HBS中加入MMP2至MMP2:A2M的4:1mol/mol比,在37℃孵育15分钟,然后使用20mM EDTA抑制。为了用溶热素切割A2M-抗体,将溶热素加入到含10mM $CaCl_2$的HBS中至溶热素:A2M的mol/mol比为2.2:1,在37℃孵育2分钟,然后使用20mM EDTA抑制。

[0501] 生物层干涉测量法

[0502] 使用实施例3中描述的方法,使用生物层干涉测量法来研究具有不同诱饵区的A2M-阿特珠单抗之间的相互作用。

[0503] SDS-PAGE和孔限制天然PAGE

[0504] 如前所述(36),使用在TBE缓冲液(89mM Tris,89mM硼酸,2mM EDTA)中的自制凝胶进行天然孔限制的PAGE,对于A2M分析,丙烯酰胺梯度为5%至10%,对于C3分析,丙烯酰胺梯度为10%至15%。孔限制的电泳凝胶在TBE缓冲液中在100V下运行过夜。

[0505] 使用不连续的2-氨基-2-甲基-1,3-丙二醇和甘氨酸缓冲系统在自制的5%至15%丙烯酰胺梯度凝胶(37)上进行变性SDS-PAGE。将样品用25mM DTT在95℃还原5分钟。

[0506] 结果

[0507] 为了评估具有工程化诱饵区的A2M-抗体的功能性,A2M-阿特珠单抗用野生型诱饵区、TRΔ7S1 I703诱饵区(实施例6中描述的优化的MMP2-底物诱饵区)或TRΔ7S1 I703 P704诱饵区表达,其通过添加P'1位来最小化MMP2切割位点并防止残基I703被丝氨酸蛋白酶切割。脯氨酸残基(图9A)。当用MMP2处理时,所有三种A2M-阿特珠单抗蛋白都被诱饵区切割,如通过它们在天然PAGE(图9B)中的构象变化和在还原SDS-PAGE(图9C)中的A2M亚单位的切割所评估的。这些结果表明,具有工程化的MMP2-底物诱饵区的A2M-抗体在它们的诱饵区被MMP2切割。

[0508] 使用生物层干涉法研究MMP2切割对A2M-阿特珠单抗蛋白与固定的PD-L1结合的影响。对于具有野生型诱饵区的A2M-阿特珠单抗,发现MMP2切割传递了与由溶热素切割诱导的抗原结合相似的抗原结合(图9D)。具有工程化诱饵区的A2M-阿特珠单抗蛋白在其与MMP2切割时显示出相似的抗原结合(图9D)。这些结果显示MMP2切割的诱饵区诱导A2M-抗体中的抗原结合,包括野生型诱饵区和工程化的MMP2-底物诱饵区。

[0509] 结论

[0510] 如实施例5所述,可以将工程化的诱饵区掺入到A2M-抗体中而不破坏它们的构象依赖性抗原结合,并且仍然优先被靶蛋白酶如MMP2切割。MMP2切割能够诱导A2M-抗体与野生型诱饵区或工程化诱饵区的抗原结合。

[0511] 实施例8-将PD1受体的细胞外区域掺入A2M

[0512] 研究目的

[0513] 这里,我们研究了人PD1受体的细胞外区域是否可以掺入A2M(以与抗体相同的方式,如前述实施例所示),以及所得A2M-PD1融合蛋白是否以依赖于A2M构象的方式与PD1受体的配体PD-L1结合。

[0514] 材料和方法

[0515] 所用蛋白质

[0516] 如实施例1中针对A2M-抗体所述表达和纯化A2M-PD1融合构建物。并入A2M的PD1的细胞外区域与用于测试实施例2中的A2M-纳武单抗的序列相同,即UniProt ID Q15116,具有Cys93Ser突变的残基26-150。A2M-PD1的氨基酸和核苷酸序列在SEQ ID NO:25至SEQ ID NO:26中给出。如实施例2所述制备与人Fc区融合的PD-L1。

[0517] SDS-PAGE和孔限制天然PAGE

[0518] 使用实施例2中描述的方案通过还原SDS-PAGE分析A2M-PD1。

[0519] A2M-抗体与甲胺和蛋白酶的反应

[0520] 如实施例3所述,用甲胺或金属蛋白酶热溶素处理A2M-PD1以改变其构象。

[0521] 生物层干涉测量法

[0522] 如实施例3所述,使用生物层干涉法研究A2M-PD1在其未处理的,甲胺处理的或热溶素处理的构象中与固定在生物传感器表面上的PD-L1的结合。

[0523] 结果

[0524] 使用用于将抗体scFv和纳米抗体掺入A2M的相同融合策略,将人PD1的细胞外区域掺入A2M,并使用标准A2M方案表达和纯化所得A2M-PD1(图10A)。

[0525] 然后通过生物层干涉法评估A2M-PD1对PD-L1结合的构象依赖性。A2M-PD1的PD-L1结合强烈依赖于A2M的构象(图10B)。具有未处理的A2M-PD1的对照样品显示出较小程度的结合,因为天然A2M-PD1在该实验之前未从非天然A2M-PD1纯化,例如使用如实施例3中所述的基于LRP1的耗尽。相反,甲胺处理的A2M和溶热素处理的A2M都显示出大大增强的结合反应,并且这些反应彼此非常相似。当天然构象中的A2M-PD1通过三轮非天然A2M-PD1的基于LRP1的缺失而富集时,未处理的A2M-PD1没有检测到结合。

[0526] 结论

[0527] 可以将PD1掺入A2M中,得到能够经历其典型的甲胺和溶热素诱导的构象变化的功能性A2M和能够与其配体PD-L1结合的PD1。此外,PD1与PD-L1的结合依赖于A2M的构象,在其天然构象中没有可检测的A2M-PD1与PD-L1的结合。

[0528] 实施例9-将IL2细胞因子掺入A2M

[0529] 目的

[0530] 这里,我们研究了IL2细胞因子是否可以掺入A2M(以与抗体相同的方式,如前述实施例所示),以及所得A2M-IL2融合蛋白是否以依赖于A2M构象的方式结合IL-2受体IL-2Rα。

[0531] 材料和方法

[0532] 所用蛋白质

[0533] 如实施例1中针对A2M-抗体所述表达和纯化A2M-IL2融合构建物。掺入A2M的IL2细胞因子使用野生型人序列(UniProt P60568,第21位至第153位残基)。A2M-IL2的氨基酸和核苷酸序列在SEQ ID NO:23-24中给出。

[0534] IL2受体IL-2Rα的胞外区(UniProt P01589,第22位至第238位残基,具有Cys213Ala突变,SEQ ID NO:43)表达为链接人Fc融合蛋白(SEQ ID NO:57至SEQ ID NO:58),如实施例2中其它抗原所述,并以相同的方式纯化。

[0535] SDS-PAGE和孔限制天然PAGE

[0536] 使用实施例2中描述的方案通过还原SDS-PAGE分析A2M-IL2。

[0537] A2M-抗体与甲胺和蛋白酶的反应

[0538] 如实施例3所述,用甲胺或金属蛋白酶热溶素处理A2M-IL2以改变其构象。

[0539] 生物层干涉测量法

[0540] 如实施例3中所述,使用生物层干涉测量法研究A2M-IL2在其未处理的、甲胺处理的或热溶素处理的构象中与固定在生物传感器表面上的IL-2Rα的结合。

[0541] 结果

[0542] 使用用于将抗体scFv和纳米抗体掺入A2M的相同融合策略,将人细胞因子IL2掺入A2M,并使用标准A2M方案表达和纯化所得A2M-IL2(图11A)。

[0543] 然后通过生物层干涉法评估A2M-IL2对IL-2Rα结合的构象依赖性。A2M-IL2的IL-2Rα结合依赖于A2M的构象(图11B)。具有未处理的A2M-IL2的对照样品显示中等程度的结合,甚至在使用基于LRP1的非天然A2M-IL2耗尽之后。用溶热素切割A2M诱饵区赋予中间增加的结合速率和结合饱和,而用甲胺氨解A2M硫羟酸酯赋予结合速率和结合饱和的甚至更大的增加。与天然构象中的A2M-IL2相比,甲胺处理的结合程度(由k_{obs}值确定)增加了约10倍。

[0544] 结论

[0545] 可以将IL2掺入A2M中,导致功能性A2M-IL2经历其典型的甲胺和热溶素诱导的构象变化,并且IL2能够结合受体IL-2Rα。此外,A2M-IL2的这种受体结合依赖于A2M的构象,通过诱饵区切割或硫羟酸酯氨解在A2M构象崩溃时观察到增加的受体结合。

[0546] 实施例10-研究用于将生物药物部分并入A2M中的其它融合策略。

[0547] 目的

[0548] 研究A2M和生物药物部分的蛋白质融合构建体的前述实施例使用ciRBD方法,其中生物药物部分插入A2M残基1402和1403之间。这里,我们研究了依赖于A2M构象的靶结合是否可以通过四种其它方法实现:融合、iRBD、miRBD和tRBD。

[0549] 材料和方法

[0550] 所用蛋白质

[0551] 如实施例2中针对A2M-抗体融合构建体所述,表达和纯化A2M和生物药物部分的所有融合构建体。未进行非天然A2M的耗尽。给出了A2M-融合-EgA1(SEQ ID NO:94至SEQ ID NO:95)、A2M-iRBD-EgA1(SEQ ID NO:84至SEQ ID NO:85)、A2M-miRBD-EgA1(SEQ ID NO:86至SEQ ID NO:87)、A2M-miRBD-阿特珠单抗(SEQ ID NO:88至SEQ ID NO:89)、A2M-miRBD-KN035(SEQ ID NO:90至SEQ ID NO:91)和A2M-tRBD-EgA1(SEQ ID NO:92至SEQ ID NO:93)的氨基酸和核苷酸序列。如实施例3所述产生与人FC区(SEQ ID NO:45至SEQ ID NO:48)融合的EGFR和PD-L1。

[0552] A2M-抗体与甲胺和蛋白酶的反应

[0553] 如实施例3所述,A2M-抗体与甲胺或蛋白酶反应。

[0554] 生物层干涉测量法

[0555] 如实施例3所述进行生物层干涉测量。

[0556] 结果

[0557] 为了确定A2M中生物药物部分的屏蔽是否可以通过以不同于先前使用的ciRBD方

法的其它方式将它们掺入A2M中来实现,测试了四种新的融合方法。首先,EgA1纳米体紧接A2M的RBD结构域的C末端表达以产生A2M融合-EgA1蛋白。A2M-融合蛋白-EgA1未显示EgA1与EGFR结合的构象依赖性(图12A),表明在A2M的天然构象中不是所有与RBD结构域相邻的位置都被屏蔽。

[0558] 在第二种方法iRBD中,将EgA1纳米体插入RBD结构域,取代A2M第1392位至第1403位残基。所得A2M-iRBD-EgA1蛋白显示出高度的构象依赖性(图12B),与ciRBD方法(参见实施例3)相当。这表明邻近残基1393-1403的A2M的RBD结构域的区域是掺入生物药物部分以实现构象依赖性的适当位点。因此,第三种方法miRBD也通过在替换A2M第1393位至第1395位残基的位置掺入EgA1纳米体,KN035纳米体或阿特珠单抗scFv来实现构象依赖性(图12B至图12E)。

[0559] 在第四种方法中,tRBD,卷曲-卷曲相互作用用于使掺入的生物药物部分(EgA1)接近RBD第1393位至第1403位残基。EgA1纳米体在RBD结构域的C末端掺入,其具有设计为在其N末端与A2M第1393位至第1403位残基互补的α-螺旋序列。α-螺旋序列用15个残基的接头连接到RBD结构域,以便允许α-螺旋与第1393位至第1403位残基相互作用。此外,对A2M残基1393-1403进行修饰以增强设计的互补卷曲螺旋相互作用。所得A2M-tRBD-EgA1蛋白显示EgA1/EGFR相互作用的构象依赖性(图12F),表明卷曲螺旋相互作用能够使EgA1纳米体与第1393位至第1403位残基接近,并且该接近传递了A2M天然构象中EgA1纳米体的至少部分屏蔽。

[0560] 结论

[0561] 对用于产生A2M和生物药物部分的融合构建体的融合、iRBD、miRBD和tRBD方法的研究表明,由于在该位点直接融合(如在ciRBD、iRBD和ciRBD方法中所见)或通过其它方式(例如通过卷曲-卷曲相互作用)将该部分定位到该位置,靠近A2M RBD第1393位至第1403位残基的位置。如A2M-tRBD-EgA1所证明的,A2M-tRBD-EgA1)表达许多不同的测试生物药物部分的构象依赖性靶结合(总共16个,考虑所有的ciRBD、iRBD、miRBD和tRBD融合构建体)。

[0562] 实施例11-RBD区域中插入位点的研究

[0563] 目的

[0564] 在A2M的RBD中鉴定药物插入位点,其将传递构象依赖性可接近性。

[0565] 材料和方法

[0566] 使用Pymol Molecular Graphics System软件(2.3.0版)制图。

[0567] 结果

[0568] 在产生基于A2M的前药的iRBD、miRBD和ciRBD方法中,A2M的RBD结构域的残基1392至1403被药物序列(以及N和C末端接头)替换,或者药物插入第1402位至第1403位残基之间而不改变A2M的任何残基。第1391位至第1405位残基或第1392位至第1404位残基包含β-折叠结构的链之间的环或接头区域,并且与其中修饰更可能影响结构域折叠的β-折叠序列相比,这种环非常适于修饰。

[0569] 此外,环的定向对于获得构象依赖性药物位置也是关键的,因为在RBD的相对侧第1474位(在A2M-融合-EgA1构建体中)的药物融合产生总是可接近的药物。

[0570] 在RBD结构域的结构评估之后,鉴定了三个另外的适于药物插入的环区域,即除了包含第1392位至第1404位残基(环2)的经验测试区域之外,包含第1368位至第1379位残基

(环1)、第1420位至第1426位残基(环3)和第1450位至第1457位残基(环4)的区域(图13)。所有三个环都在β-链之间延伸并以与环2(第1392位至第1404位)相似的方向取向,其中它们向内朝向A2M四聚体的内部。

[0571] 结论

[0572] 除了包含A2M的第1392位至第1404位残基(环2)的区域之外,还鉴定了包含A2M的第1368位至第1379位残基(环1)、第1420位至第1426位残基(环3)和第1450位至第1457位残基(环4)的三个额外的环,它们被认为可用于被一种或多种药物替换或直接插入,以便传递它们的治疗靶的构象依赖性结合。

[0573] 序列列表

[0574] 本说明书参考序列表(在2023年1月31日作为名为“SEQUENCE LIST 77582PC01260123”的XML文件电子提交)。XML文件是在2023年1月26日生成的,大小为426KB。序列列表的全部内容通过引用结合到本文中。

[0575] 序列列表包含以下序列:

[0576] SEQ ID NO:1-重组野生型A2M-蛋白质序列

[0577] SEQ ID NO:2-重组野生型A2M-DNA序列

[0578] SEQ ID NO:3-RBD结构域(野生型A2M的第1335位至第1474位氨基酸)-蛋白质序列

[0579] SEQ ID NO:4-诱饵区(野生型A2M的第690位至第728位氨基酸)-蛋白质序列

[0580] SEQ ID NO:5-A2M ciRBD EgA1-蛋白质序列

[0581] SEQ ID NO:6-A2M ciRBD EgA1-DNA序列

[0582] SEQ ID NO:7-A2M ciRBD阿特珠单抗K1393A K1397A蛋白质序列

[0583] SEQ ID NO:8-A2M ciRBD阿特珠单抗K1393A K1397A-DNA序列

[0584] SEQ ID NO:9-A2M ciRBD KN035 K1393A K1397A蛋白质序列

[0585] SEQ ID NO:10-A2M ciRBD KN035 K1393A K1397A-DNA序列

[0586] SEQ ID NO:11-A2M ciRBD纳武单抗蛋白质序列

[0587] SEQ ID NO:12-A2M ciRBD纳武单抗-DNA序列

[0588] SEQ ID NO:13-A2M ciRBD伊匹单抗蛋白质序列

[0589] SEQ ID NO:14-A2M ciRBD伊匹单抗-DNA序列

[0590] SEQ ID NO:15-A2M ciRBD福雷芦单抗蛋白质序列

[0591] SEQ ID NO:16-A2M ciRBD福雷芦单抗-DNA序列

[0592] SEQ ID NO:17-A2M ciRBD莫罗单抗-蛋白质序列

[0593] SEQ ID NO:18-A2M ciRBD莫罗单抗-DNA序列

[0594] SEQ ID NO:19-A2M ciRBD乌瑞芦单抗蛋白质序列

[0595] SEQ ID NO:20-A2M ciRBD乌瑞芦单抗-DNA序列

[0596] SEQ ID NO:21-A2M ciRBD阿达木单抗-蛋白质序列

[0597] SEQ ID NO:22-A2M ciRBD阿达木单抗-DNA序列

[0598] SEQ ID NO:23-A2M ciRBD IL2-蛋白质序列

[0599] SEQ ID NO:24-A2M ciRBD IL2-DNA序列

[0600] SEQ ID NO:25-A2M ciRBD PD1-蛋白质序列

[0601] SEQ ID NO:26-A2M ciRBD PD1-DNA序列

[0602] SEQ ID NO:27-EgA1纳米体-蛋白质序列

[0603] SEQ ID NO:28-阿特珠单抗scFv(VH_VL)-蛋白质序列

[0604] SEQ ID NO:29-KN035纳米体-蛋白质序列

[0605] SEQ ID NO:30-纳武单抗scFv(VH_VL)-蛋白质序列

[0606] SEQ ID NO:31-伊匹单抗scFv(VH_VL)-蛋白质序列

[0607] SEQ ID NO:32-福雷芦单抗scFv(VH_VL)-蛋白质序列

[0608] SEQ ID NO:33-莫罗单抗scFv(VH_VL)-蛋白质序列

[0609] SEQ ID NO:34-乌瑞芦单抗scFv(VH_VL)-蛋白质序列

[0610] SEQ ID NO:35-阿达木单抗scFv(VH_VL)-蛋白质序列

[0611] SEQ ID NO:36-IL2细胞因子-蛋白质序列

[0612] SEQ ID NO:37-EGFR细胞外区域-蛋白质序列

[0613] SEQ ID NO:38-PDL-1细胞外区域-蛋白质序列

[0614] SEQ ID NO:39-PD-1胞外区,C93S突变-蛋白质序列

[0615] SEQ ID NO:40-CTLA-4细胞外区域-蛋白质序列

[0616] SEQ ID NO:41-CD3γε胞外区-蛋白质序列

[0617] SEQ ID NO:42-4-1BB胞外区-蛋白质序列

[0618] SEQ ID NO:43-IL-2Rα胞外区,C213A突变-蛋白质序列

[0619] SEQ ID NO:44-人IgG1 Fc区-蛋白质序列

[0620] SEQ ID NO:45-EGFR细胞外区域-蛋白质序列

[0621] SEQ ID NO:46-EGFR胞外区-DNA序列

[0622] SEQ ID NO:47-PDL-1细胞外区域-蛋白质序列

[0623] SEQ ID NO:48-PDL-1细胞外区域-DNA序列

[0624] SEQ ID NO:49-PD-1胞外区,C93S突变-蛋白质序列

[0625] SEQ ID NO:50-PD-1胞外区,C93S突变-DNA序列

[0626] SEQ ID NO:51-CTLA-4细胞外区域-蛋白质序列

[0627] SEQ ID NO:52-CTLA-4细胞外区域-DNA序列

[0628] SEQ ID NO:53-CD3γε胞外区-蛋白质序列

[0629] SEQ ID NO:54-CD3γε胞外区-DNA序列

[0630] SEQ ID NO:55-4-1BB胞外区-蛋白质序列

[0631] SEQ ID NO:56-4-1BB胞外区-DNA序列

[0632] SEQ ID NO:57-IL-2Rα胞外区、C213A蛋白质序列

[0633] SEQ ID NO:58-IL-2Rα胞外区、C213A-DNA序列

[0634] SEQ ID NO:59-TNFα细胞因子、StrepII标签和A2M前导肽-蛋白质序列

[0635] SEQ ID NO:60-TNFα细胞因子、StrepII标签和A2M前导肽-DNA序列

[0636] SEQ ID NO:61-MMP2前体,具有N末端Strep标签-蛋白质序列

[0637] SEQ ID NO:62-MMP2前体,具有N末端Strep标签-DNA序列SEQ ID NO:63-LRP1簇1B,具有Nt Strep标签和Ct hFc-蛋白质序列

[0638] SEQ ID NO:64-LRP1簇1B,具有Nt Strep标签和Ct hFc-DNA序列

[0639] SEQ ID NO:65-A2M,具有修饰的诱饵区,TR-蛋白质序列

[0640] SEQ ID NO:66-A2M,具有修饰的诱饵区,TRK704-蛋白质序列

[0641] SEQ ID NO:67-A2M,具有修饰的诱饵区,TRA21A-蛋白质序列

[0642] SEQ ID NO:68-A2M,具有修饰的诱饵区,TRB74-蛋白质序列

[0643] SEQ ID NO:69-A2M,具有修饰的诱饵区,TRC9-蛋白质序列

[0644] SEQ ID NO:70-A2M,具有修饰的诱饵区,TRS1-蛋白质序列

[0645] SEQ ID NO:71-A2M,其具有经修饰的诱饵区,TRΔ7S1 I710-蛋白质序列

[0646] SEQ ID NO:72-A2M,具有修饰的诱饵区,TR S1 QRT4-蛋白质序列

[0647] SEQ ID NO:73-A2M,其具有经修饰的诱饵区,TRJ7S1I703-蛋白质序列

[0648] SEQ ID NO:74-A2M ciRBD Atez,K1393A K1397A T654C T661C,诱饵区TRΔ7S1 I703-蛋白质序列

[0649] SEQ ID NO:75-A2M ciRBD Atez,K1393A K1397A T654C T661C,诱饵区TRΔ7S1 I703-DNA序列

[0650] SEQ ID NO:76-A2M ciRBD Atez,K1393A K1397A T654C T661C,诱饵区TRΔ7S1 I703 P704-蛋白质序列

[0651] SEQ ID NO:77-A2M ciRBD Atez,K1393A K1397A T654C T661C,诱饵区TRΔ7S1 I703 P704-DNA序列

[0652] SEQ ID NO:78-ciRBD形式的N末端接头-蛋白质序列

[0653] SEQ ID NO:79-ciRBD形式的C末端接头-蛋白质序列

[0654] SEQ ID NO:80-iRBD形式的N末端接头-蛋白质序列

[0655] SEQ ID NO:81-iRBD形式的C末端接头-蛋白质序列

[0656] SEQ ID NO:82-miRBD形式的一个测试的N末端接头-蛋白质序列

[0657] SEQ ID NO:83-miRBD形式的一个测试的C末端接头-蛋白质序列

[0658] SEQ ID NO:84-A2M iRBD N15/C12 EgA1-蛋白质序列

[0659] SEQ ID NO:85-A2M iRBD N15/C12 EgA1-DNA序列

[0660] SEQ ID NO:86-A2M miRBD N18/C15 EgA1-蛋白质序列

[0661] SEQ ID NO:87-A2M miRBD N18/C15 EgA1-DNA序列

[0662] SEQ ID NO:88-A2M miRBD N18/C15阿特珠单抗-蛋白质序列

[0663] SEQ ID NO:89-A2M miRBD N18/C15阿特珠单抗-DNA序列

[0664] SEQ ID NO:90-A2M miRBD N18/C15 KN035-蛋白质序列

[0665] SEQ ID NO:91-A2M miRBD N18/C15 KN035-DNA序列

[0666] SEQ ID NO:92-A2M tRBD15b EgA1-蛋白质序列

[0667] SEQ ID NO:93-A2M tRBD15b EgA1-DNA序列

[0668] SEQ ID NO:94-紧接A2M与EgA1纳米抗体在RBD C末端之后的蛋白质序列

[0669] SEQ ID NO:95-紧接A2M与EgA1纳米抗体在RBD C末端之后的蛋白质序列

[0670] SEQ ID NO:96-MMP(A21A)的切割位点-蛋白质序列

[0671] SEQ ID NO:97-MMP(B74)的切割位点-蛋白质序列

[0672] SEQ ID NO:98-MMP(C9)的切割位点-蛋白质序列

[0673] SEQ ID NO:99-MMP(S1)的切割位点-蛋白质序列

[0674] SEQ ID NO:100-MMP(S1P)-蛋白质序列的切割位点

[0675] SEQ ID NO:101-来自野生型诱饵区的MMP切割位点和R-蛋白质序列

[0676] SEQ ID NO:102-切割位点-蛋白质序列

[0677] SEQ ID NO:103-切割位点-蛋白质序列

[0678] SEQ ID NO:104-切割位点-蛋白质序列

[0679] SEQ ID NO:105-切割位点-蛋白质序列

[0680] SEQ ID NO:106-切割位点-蛋白质序列

[0681] SEQ ID NO:107-切割位点-蛋白质序列

[0682] SEQ ID NO:108-切割位点-蛋白质序列

[0683] SEQ ID NO:109-切割位点-蛋白质序列

[0684] SEQ ID NO:110-切割位点-蛋白质序列

[0685] SEQ ID NO:111-切割位点-蛋白质序列

[0686] SEQ ID NO:112-切割位点-蛋白质序列

[0687] SEQ ID NO:113-切割位点-蛋白质序列

[0688] SEQ ID NO:114-切割位点-蛋白质序列

[0689] SEQ ID NO:115-切割位点-蛋白质序列

[0690] SEQ ID NO:116-切割位点-蛋白质序列

[0691] SEQ ID NO:117-切割位点-蛋白质序列

[0692] SEQ ID NO:118-切割位点-蛋白质序列

[0693] SEQ ID NO:119-切割位点-蛋白质序列

[0694] SEQ ID NO:120-切割位点-蛋白质序列

[0695] SEQ ID NO:121-切割位点-蛋白质序列

[0696] SEQ ID NO:122-切割位点-蛋白质序列

[0697] SEQ ID NO:123-切割位点-蛋白质序列

[0698] SEQ ID NO:124-空白区域(TR)-蛋白质序列

[0699] SEQ ID NO:125-TRK704-蛋白质序列

[0700] SEQ ID NO:126-TRA21A-蛋白质序列

[0701] SEQ ID NO:127-TRB74-蛋白质序列

[0702] SEQ ID NO:128-TRC9-蛋白质序列

[0703] SEQ ID NO:129-TR S1-蛋白质序列

[0704] SEQ ID NO:130-TR S1 QRT4-蛋白质序列

[0705] SEQ ID NO:131-TRΔ7S1 I710-蛋白质序列

[0706] SEQ ID NO:132-TRΔ7S1 I703-蛋白质序列

[0707] SEQ ID NO:133-TRΔ7S1 I703 P704-蛋白质序列

[0708] SEQ ID NO:134-CPAMD1(又称C3)-NP_000055.2-蛋白质序列

[0709] SEQ ID NO:135-CPAMD2(又称C4A)-NP_009224.2-蛋白质序列

[0710] SEQ ID NO:136-CPAMD3(又称C4B)-NP_001002029.3-蛋白质序列

[0711] SEQ ID NO:137-CPAMD4(又称C5)-NP_001726.2-蛋白质序列

[0712] SEQ ID NO:138-CPAMD5(又称A2M)-NP_000005.3-蛋白质序列

[0713] SEQ ID NO:139-CPAMD6(又称PZP)-NP_002855.2-蛋白质序列

[0714] SEQ ID NO:140-CPAMD7(又称CD109)-NP_598000.2-蛋白质序列

[0715] SEQ ID NO:141-CPAMD8-NP_056507.3-蛋白质序列

[0716] SEQ ID NO:142-CPAMD9(又称A2ML1)-NP_653271.3-蛋白质序列

[0717] SEQ ID NO:143-卵固蛋白1-Q6IE37.2-蛋白质序列

[0718] SEQ ID NO:144-卵固蛋白2-Q6IE36.2-蛋白质序列

[0719] SEQ ID NO:145至SEQ ID NO:188-参见表1

[0720] SEQ ID NO:189至SEQ ID NO:210-参见表2

[0721] SEQ ID NO:211至SEQ ID NO:222-参见表3

[0722] SEQ ID NO:223-GS接头

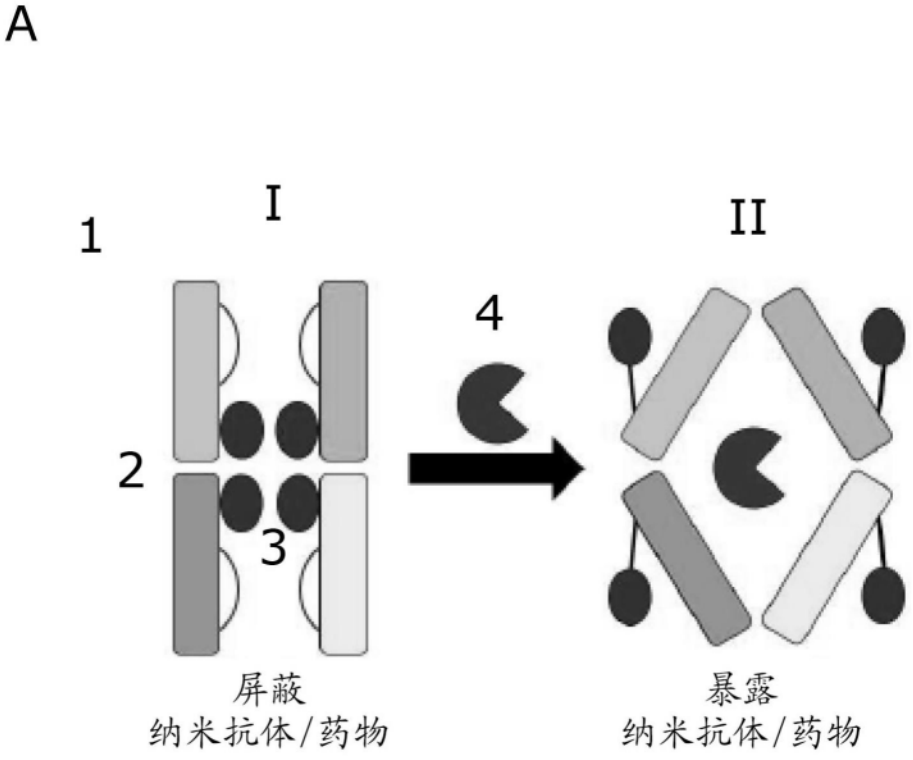


图1A

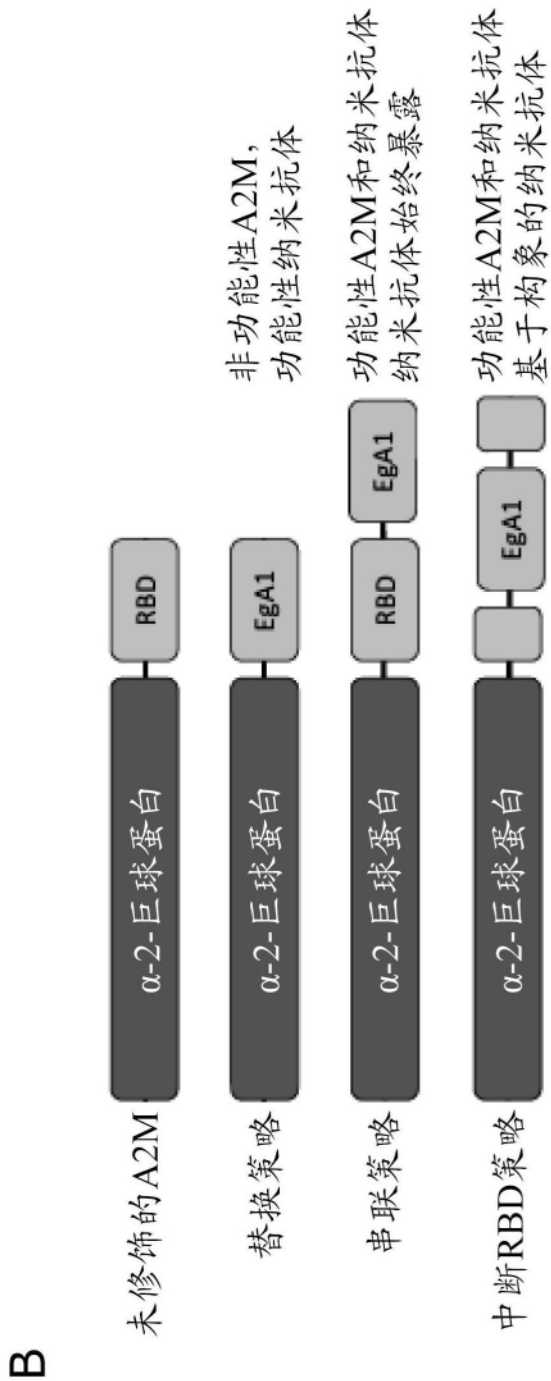

B
未修饰的A2M
α-2-巨球蛋白
RBD
替换策略
α-2-巨球蛋白
EgA1
非功能性A2M，
功能性纳米抗体
串联策略
α-2-巨球蛋白
RBD
EgA1
功能性A2M和纳米抗体
纳米抗体始终暴露
中断RBD策略
α-2-巨球蛋白
EgA1
功能性A2M和纳米抗体
基于构象的纳米抗体

图1B

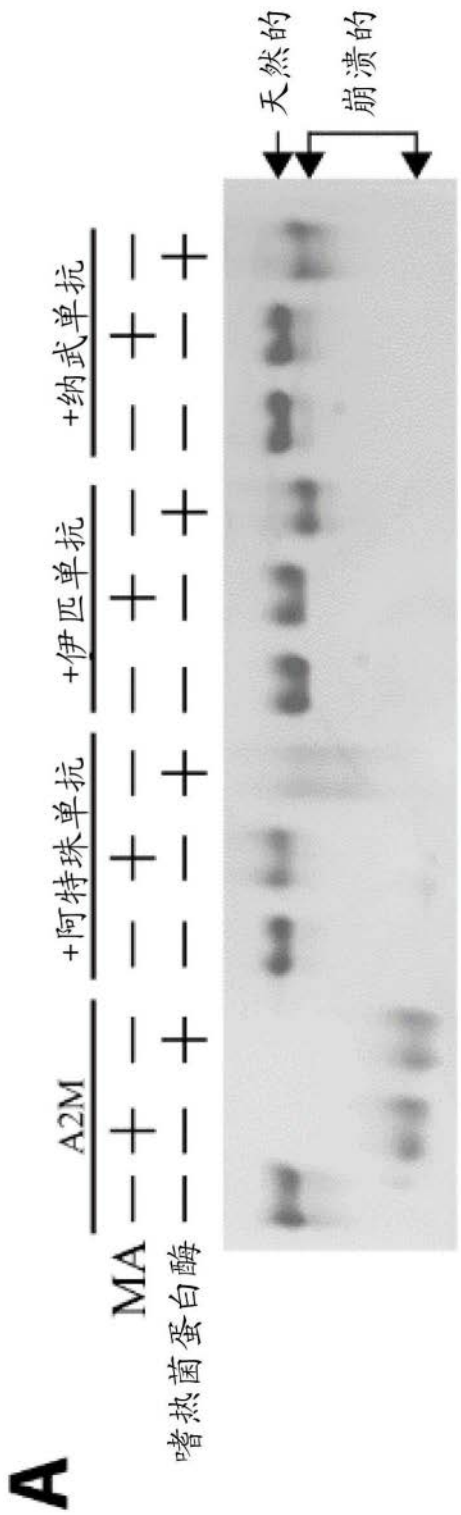


图2A

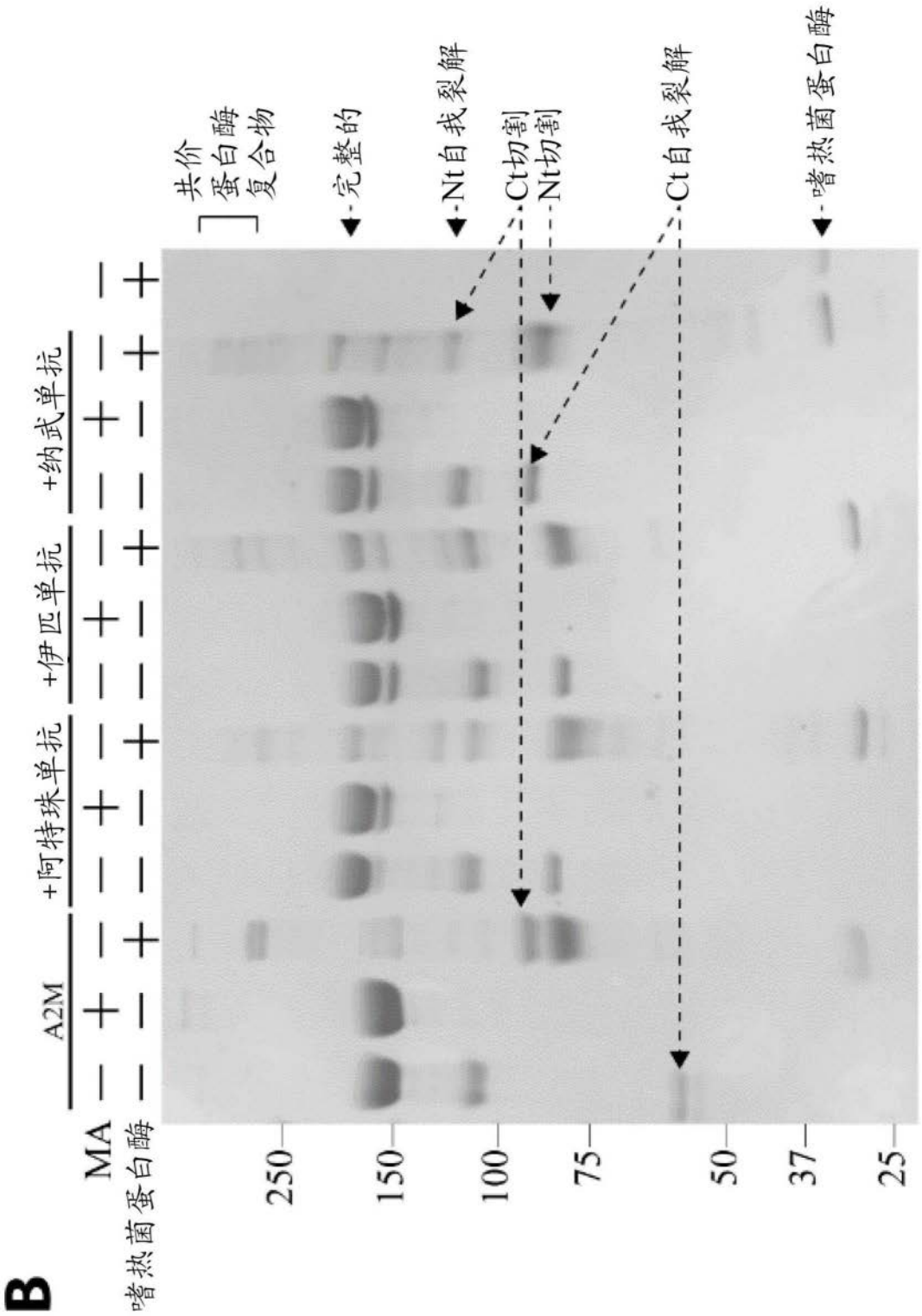

B
嗜热菌蛋白酶
MA
A2M
+阿特珠单抗
+伊匹单抗
+纳武单抗
共价
蛋白酶
复合物
完整的
Nt自我裂解
Ct切割
Nt切割
Ct自我裂解
嗜热菌蛋白酶
250
150
100
75
50
37
25

图2B

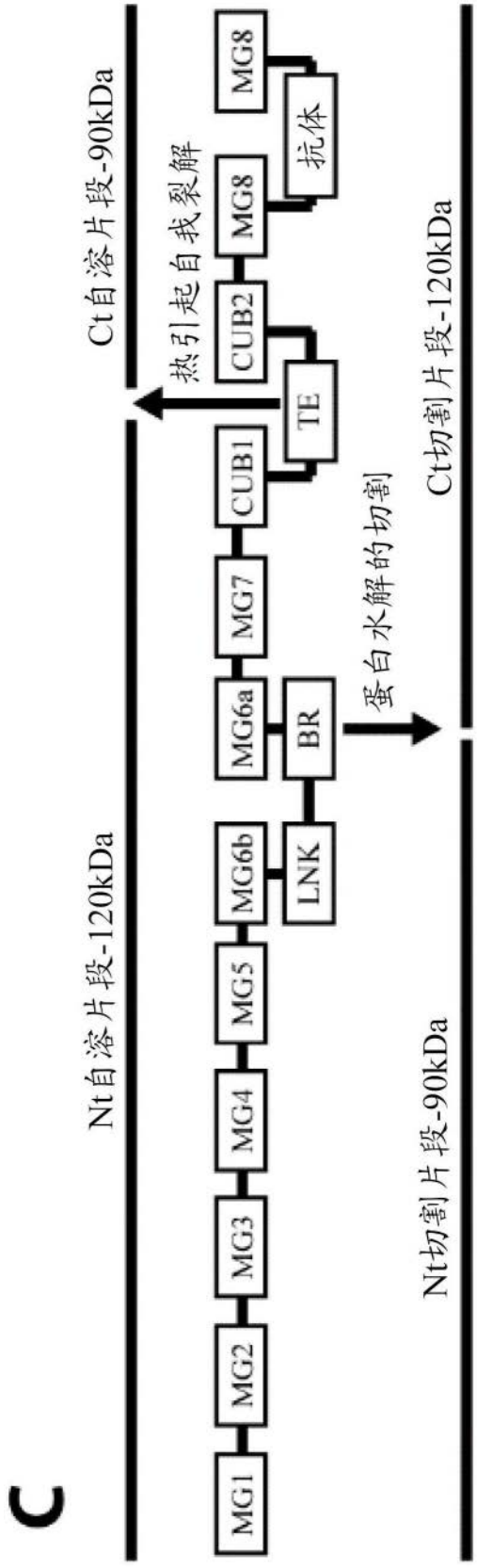

C
Nt自溶片段-120kDa
MG1
MG2
MG3
MG4
MG5
MG6b
LNK
MG6a
BR
MG7
CUB1
TE
CUB2
MG8
抗体
MG8
Ct自溶片段-90kDa
热引起自我裂解
蛋白水解的切割
Ct切割片段-120kDa
Nt切割片段-90kDa

图2C

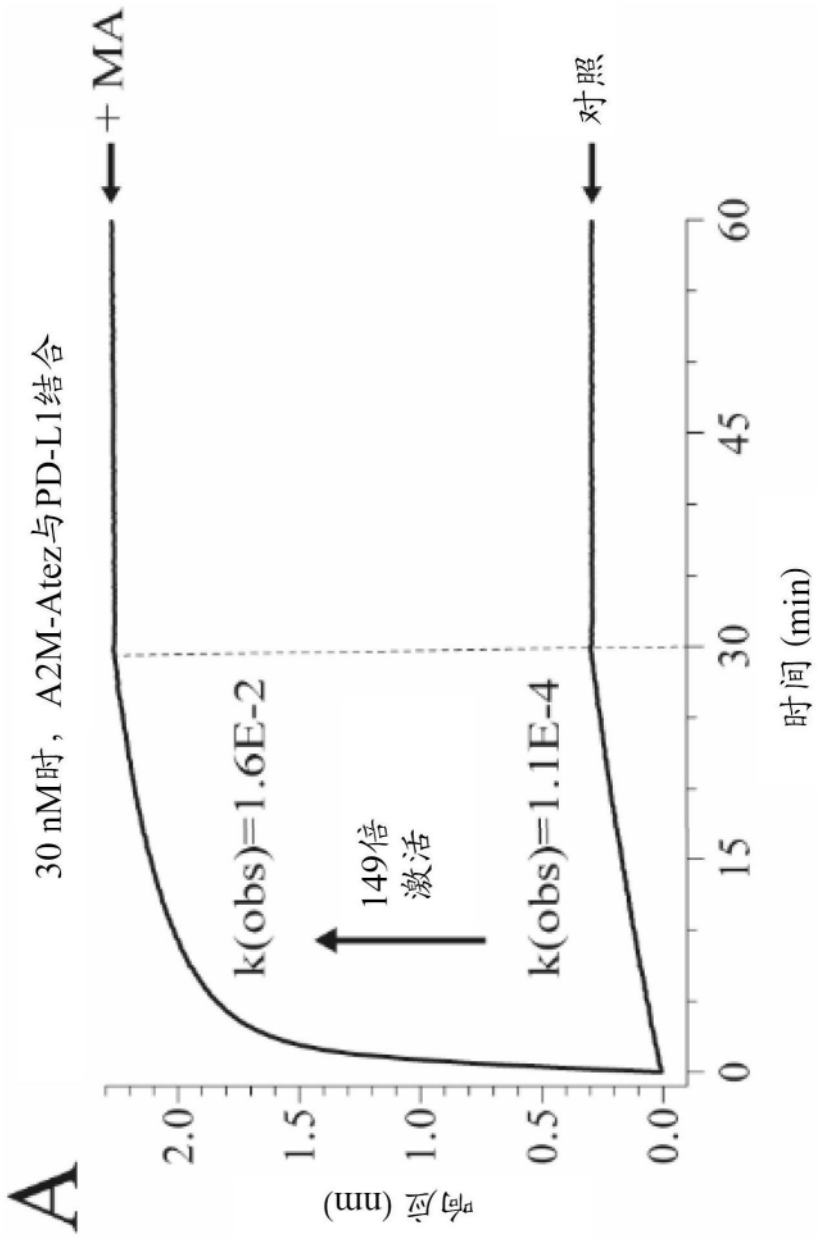

A
30 nM时，A2M-Atez与PD-L1结合
+ MA
对照
k(obs)=1.6E-2
k(obs)=1.1E-4
149倍
激活
响应 (nm)
时间 (min)
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
0
15
30
45
60

图3A

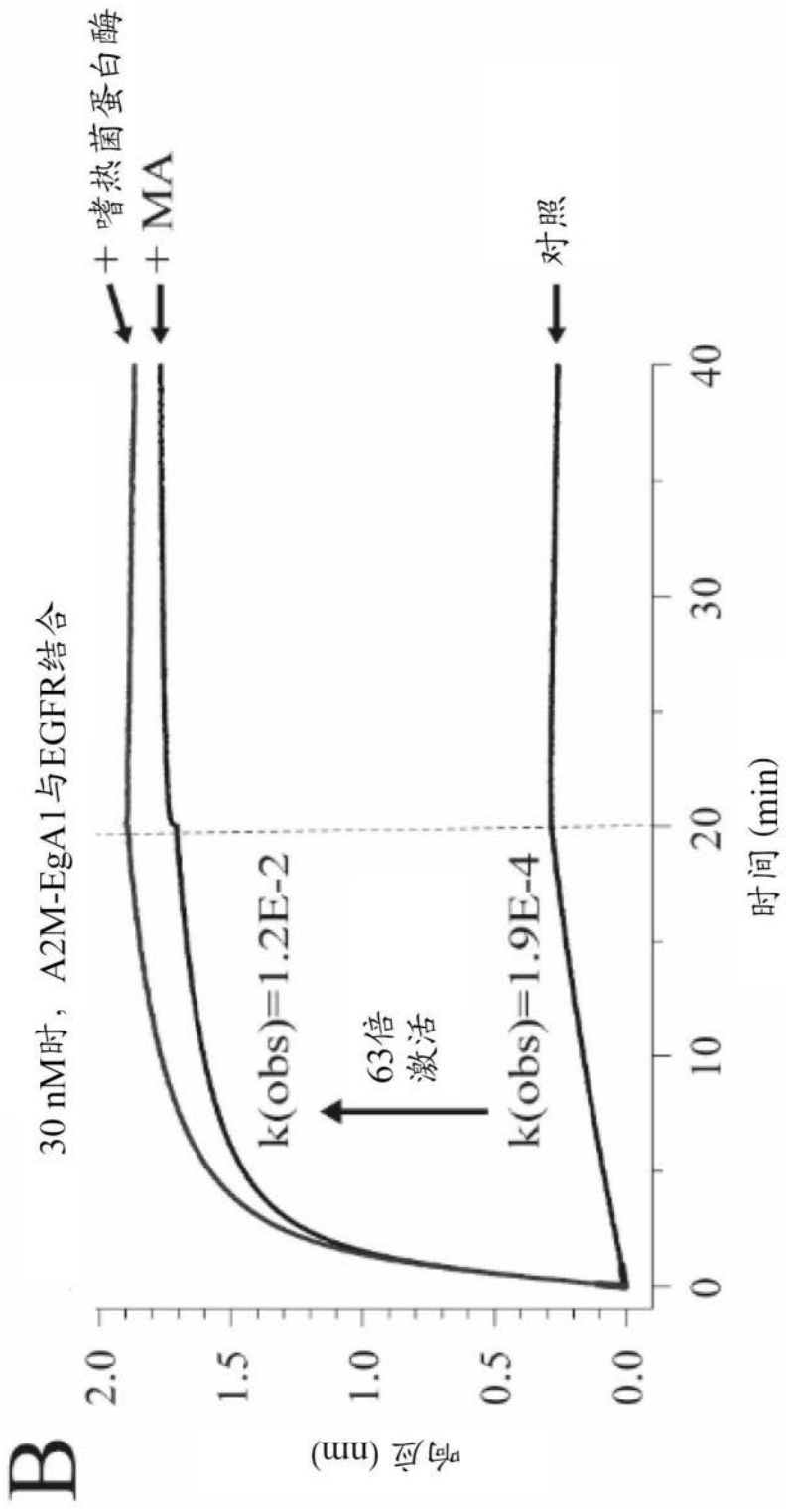

B
30 nM时，A2M-EgA1与EGFR结合
+ 嗜热菌蛋白酶
+ MA
对照
k(obs)=1.2E-2
63倍
激活
k(obs)=1.9E-4
响应 (nm)
时间 (min)
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
0
10
20
30
40

图3B

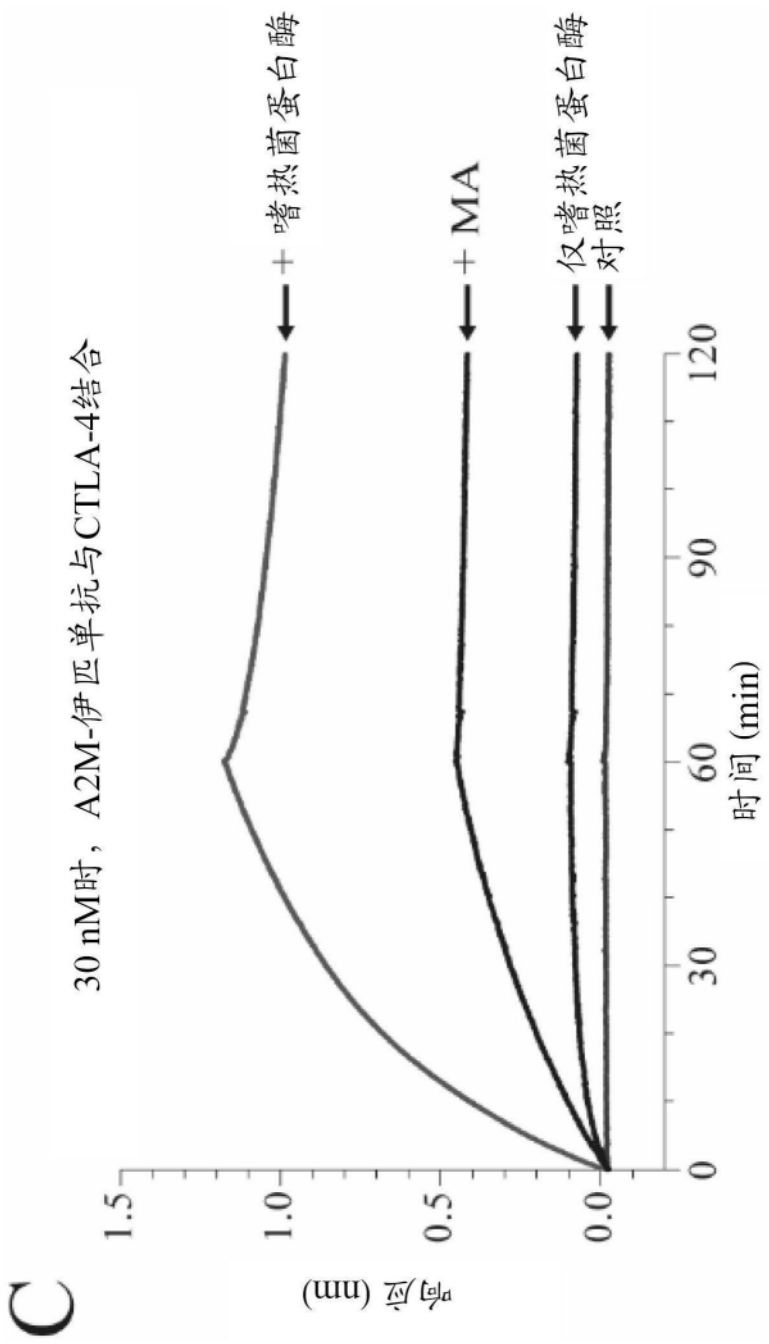

C
30 nM时，A2M-伊匹单抗与CTLA-4结合
响应 (nm)
1.5
1.0
0.5
0.0
0
30
60
90
120
时间 (min)
+ 嗜热菌蛋白酶
+ MA
仅嗜热菌蛋白酶
对照

图3C

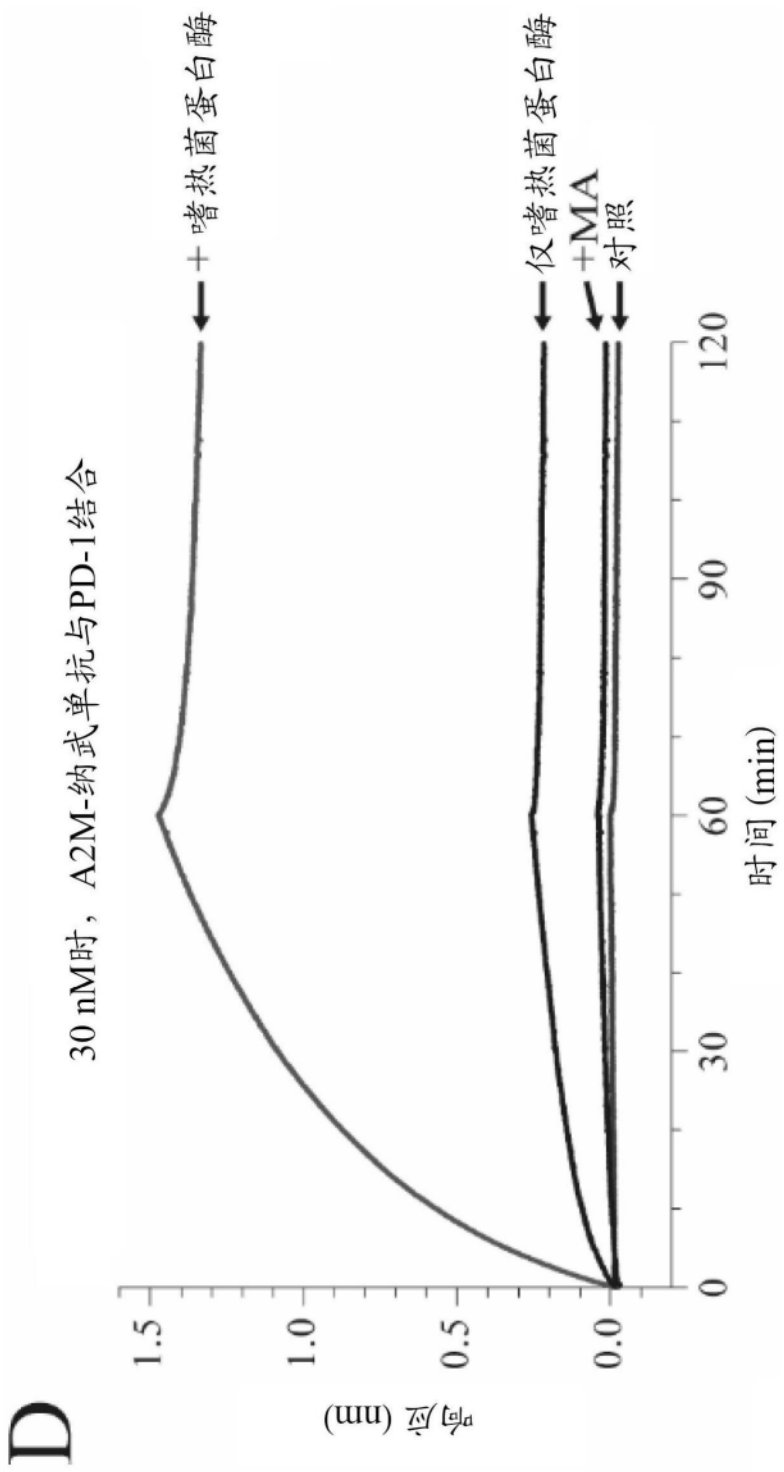

D
30 nM时，A2M-纳武单抗与PD-1结合
+嗜热菌蛋白酶
仅嗜热菌蛋白酶
+MA
对照
响应 (nm)
1.5
1.0
0.5
0.0
0
30
60
90
120
时间 (min)

图3D

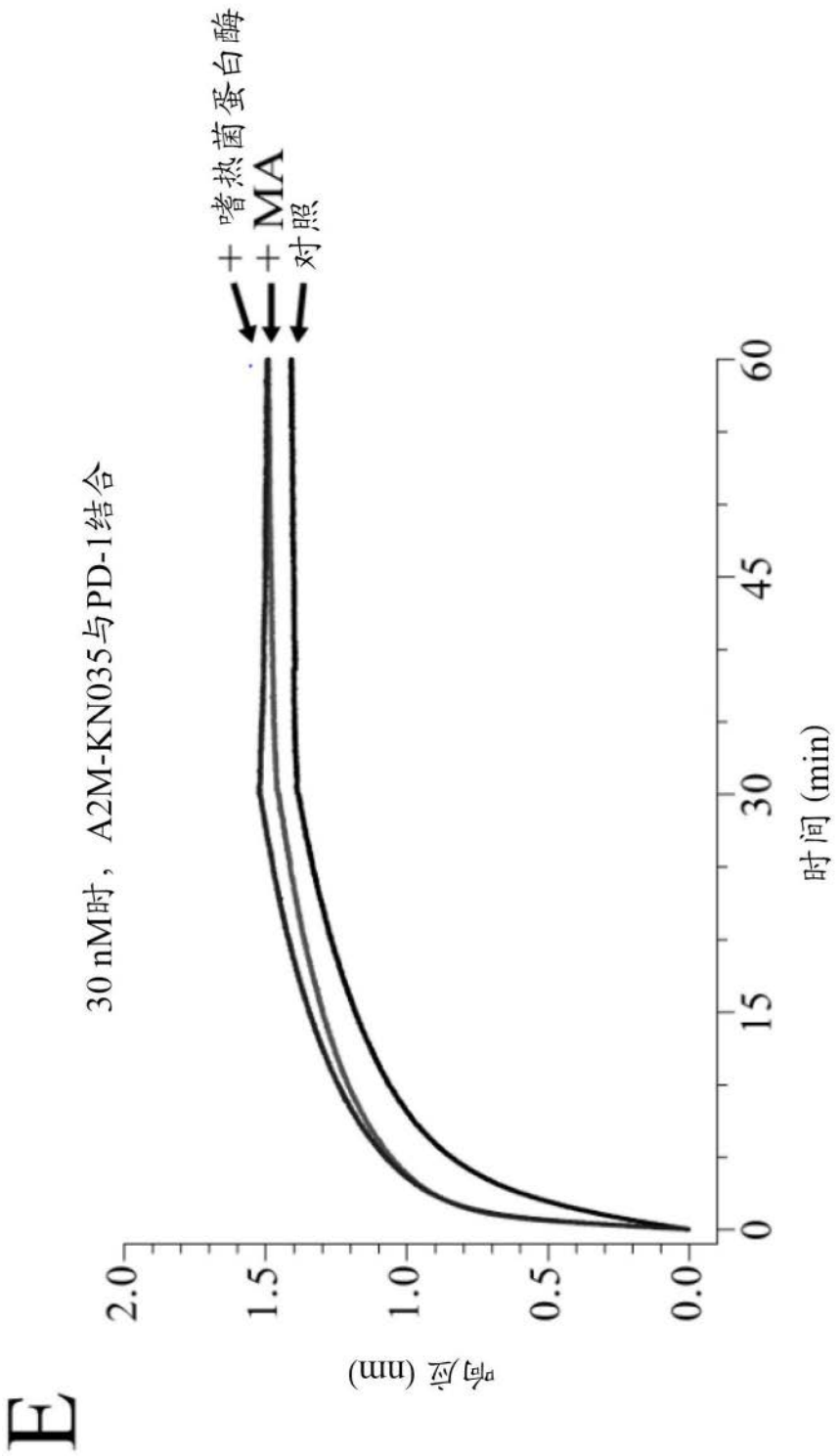

E
30 nM时，A2M-KN035与PD-1结合
响应 (nm)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
15
30
45
60
时间 (min)
对照
+ MA
+ 嗜热菌蛋白酶

图3E

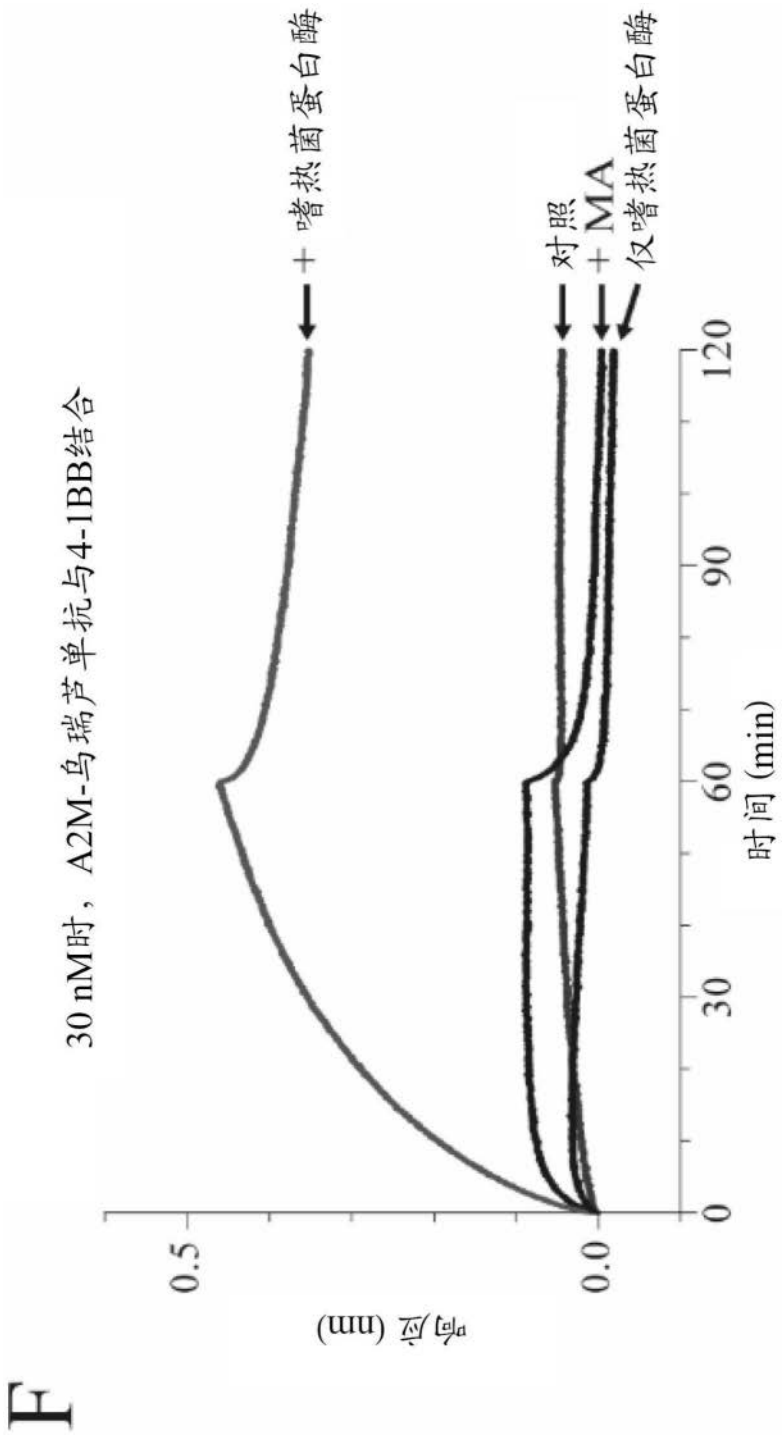

30 nM时，A2M-乌瑞芦单抗与4-1BB结合
+ 嗜热菌蛋白酶
对照
+ MA
仅嗜热菌蛋白酶
0.5
0.0
0
30
60
90
120
时间 (min)
响应 (nm)
F

图3F

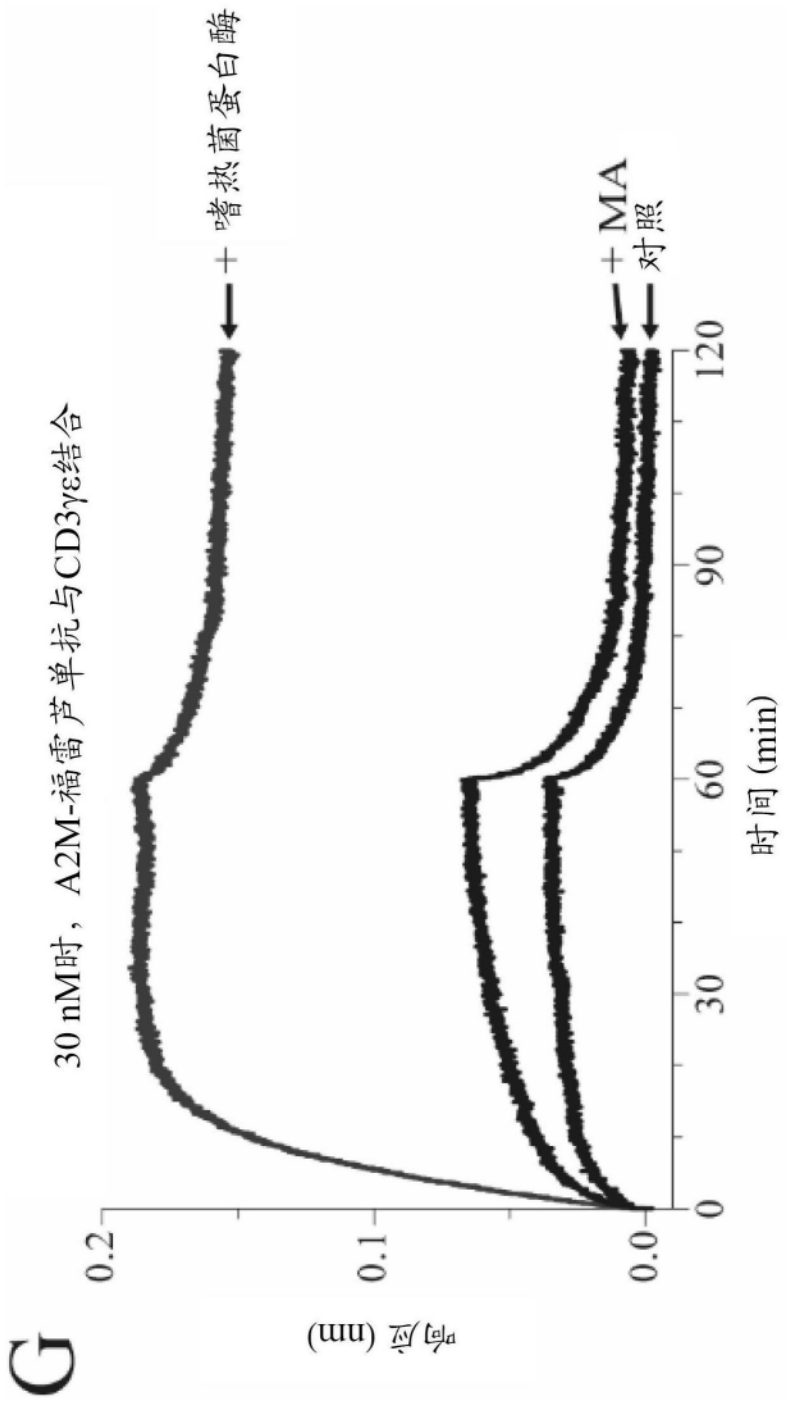

G
30 nM时，A2M-福雷芦单抗与CD3γε结合
+ 嗜热菌蛋白酶
+ MA
对照
0.2
0.1
0.0
0
30
60
90
120
时间 (min)
响应 (nm)

图3G

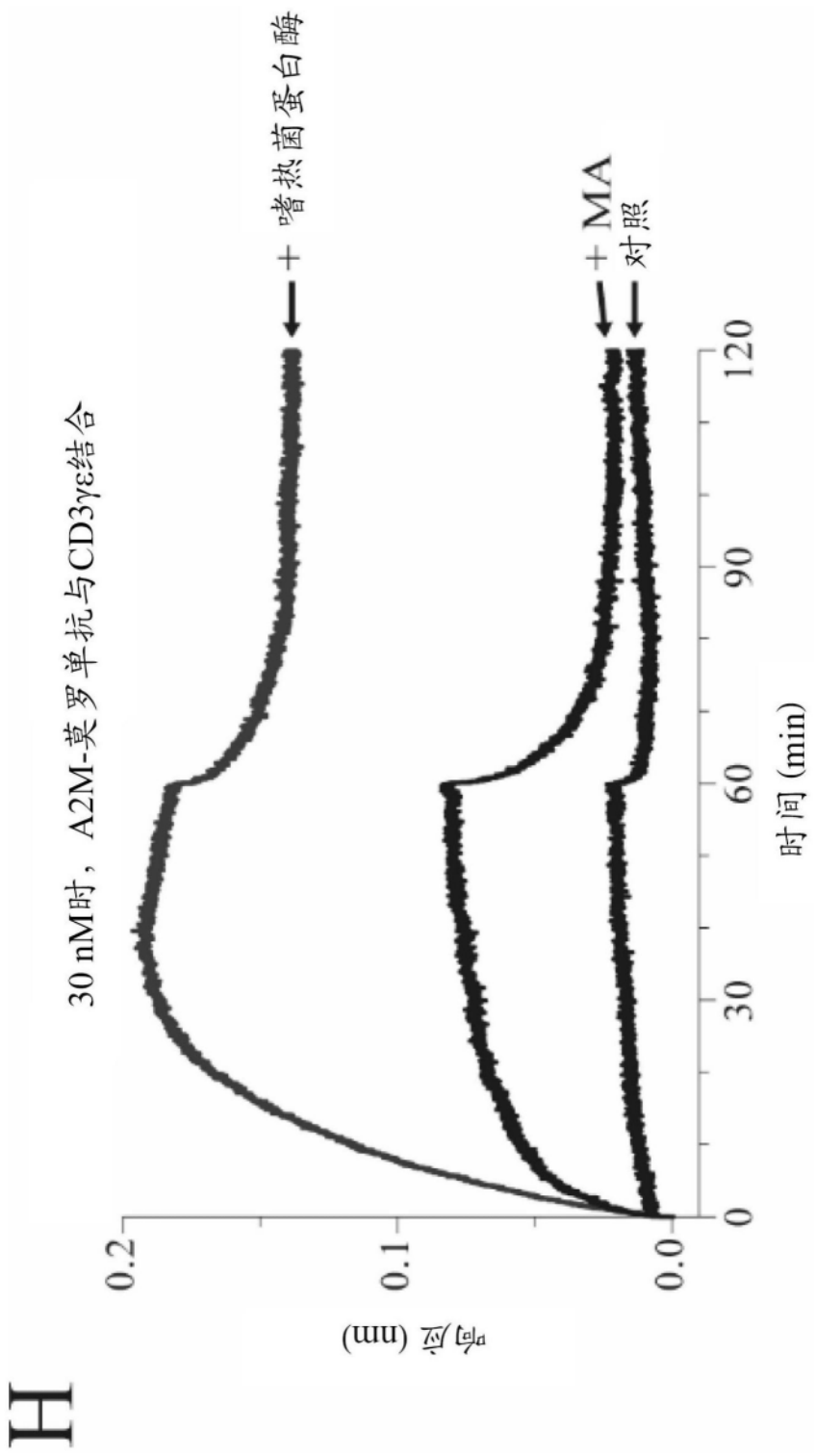

H
30 nM时，A2M-莫罗单抗与CD3γε结合
+ 嗜热菌蛋白酶
+ MA
对照
响应 (nm)
0.2
0.1
0.0
0
30
60
90
120
时间 (min)

图3H

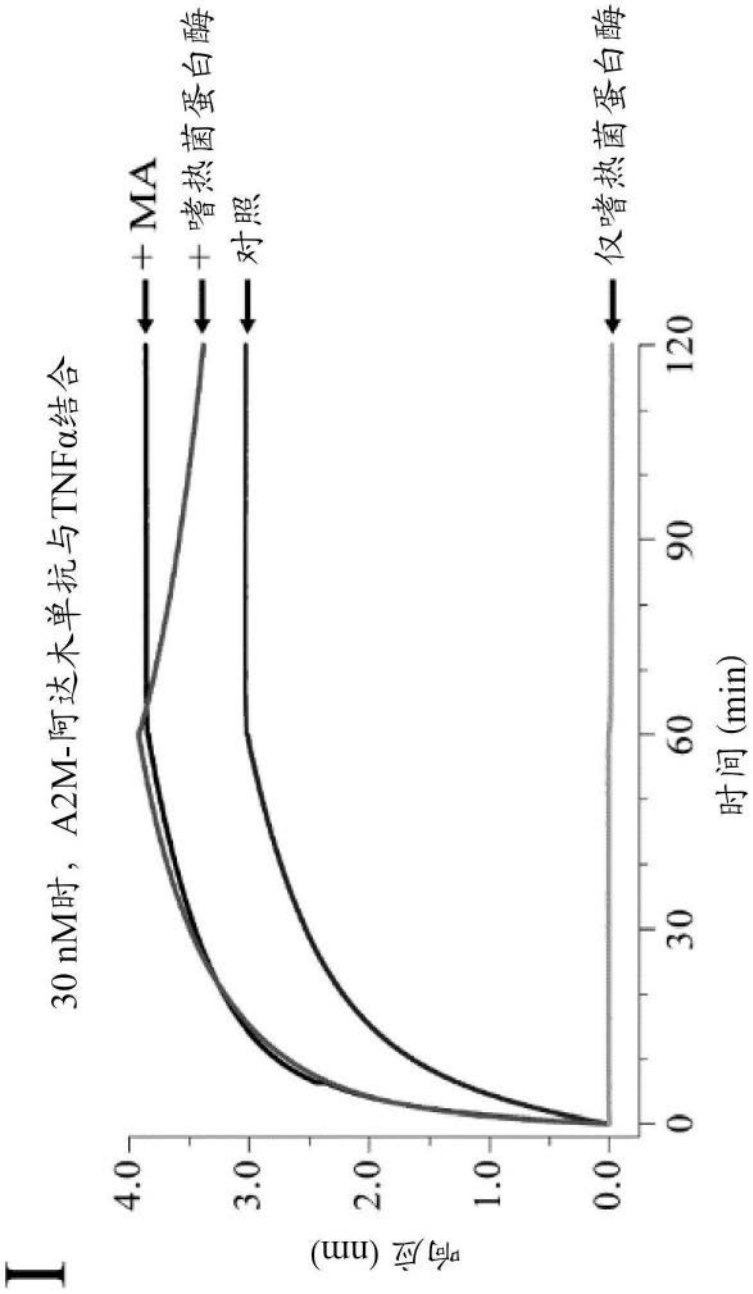

I
30 nM时，A2M-阿达木单抗与TNFα结合
+ MA
+ 嗜热菌蛋白酶
对照
仅嗜热菌蛋白酶
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
0
30
60
90
120
时间 (min)
响应 (nm)

图3I

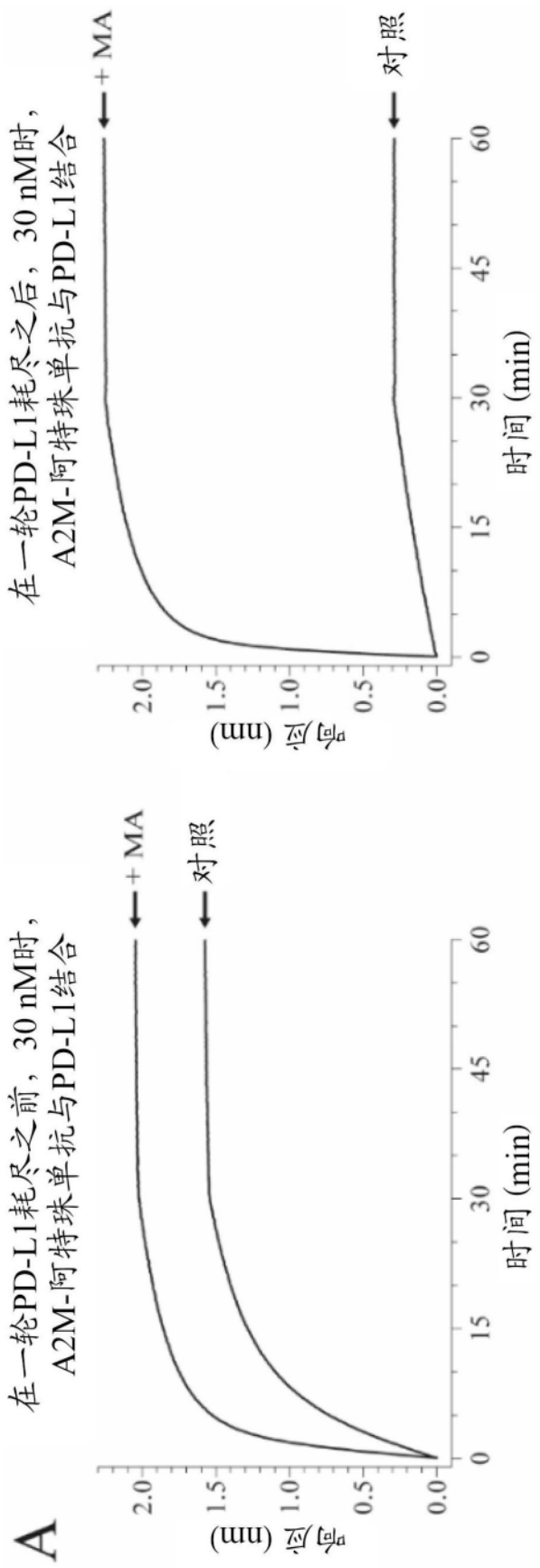

A
在一轮PD-L1耗尽之前，30 nM时，
A2M-阿特珠单抗与PD-L1结合
+ MA
对照
响应 (nm)
时间 (min)
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
0
15
30
45
60
在一轮PD-L1耗尽之后，30 nM时，
A2M-阿特珠单抗与PD-L1结合
+ MA
对照
响应 (nm)
时间 (min)

图4A

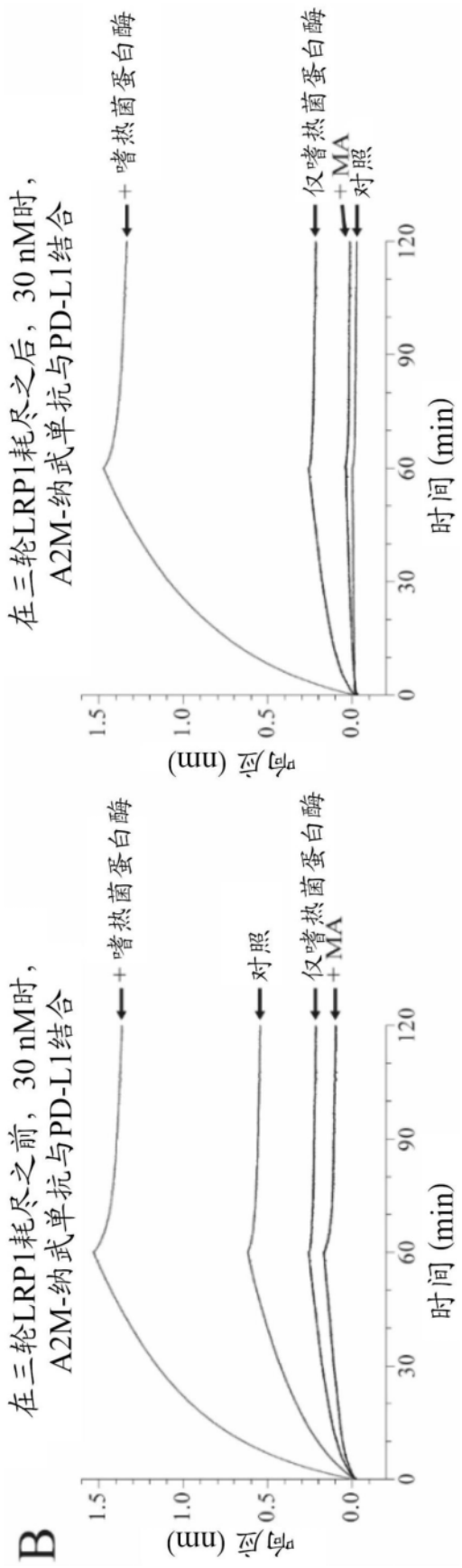

B
在三轮LRP1耗尽之前，30 nM时，
A2M-纳武单抗与PD-L1结合
+ 嗜热菌蛋白酶
对照
仅嗜热菌蛋白酶
+ MA
响应 (nm)
时间 (min)
在三轮LRP1耗尽之后，30 nM时，
A2M-纳武单抗与PD-L1结合
+ 嗜热菌蛋白酶
仅嗜热菌蛋白酶
+ MA
对照
响应 (nm)
时间 (min)

图4B

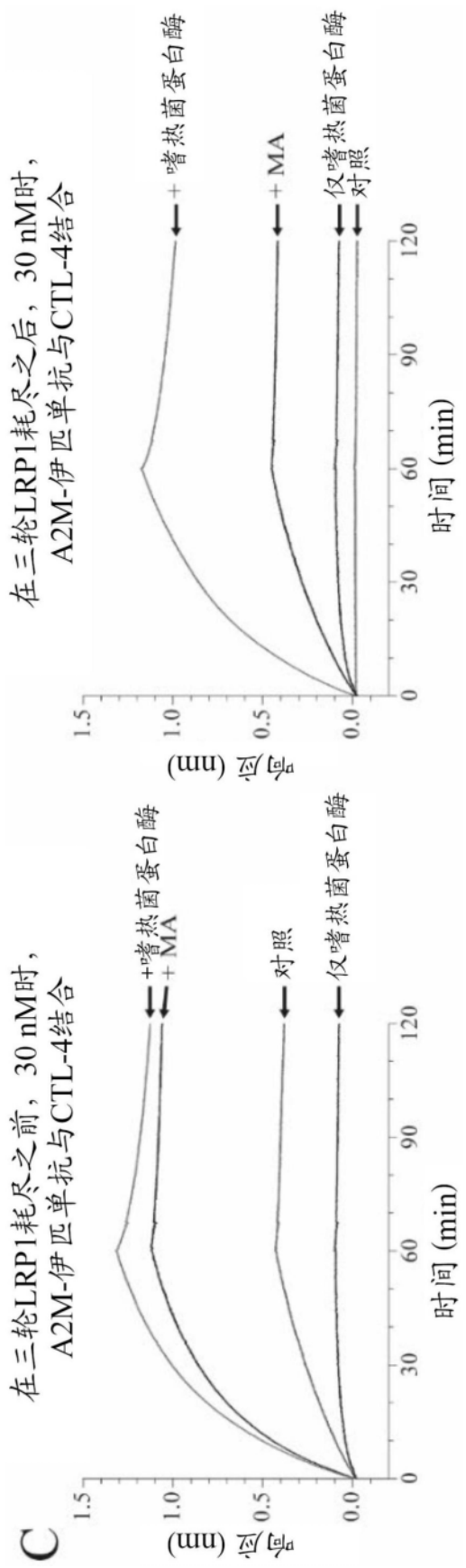

C
在三轮LRP1耗尽之前，30 nM时，
A2M-伊匹单抗与CTL-4结合
+嗜热菌蛋白酶
+ MA
对照
仅嗜热菌蛋白酶
响应 (nm)
时间 (min)
在三轮LRP1耗尽之后，30 nM时，
A2M-伊匹单抗与CTL-4结合
+ 嗜热菌蛋白酶
+ MA
仅嗜热菌蛋白酶
对照
响应 (nm)
时间 (min)

图4C

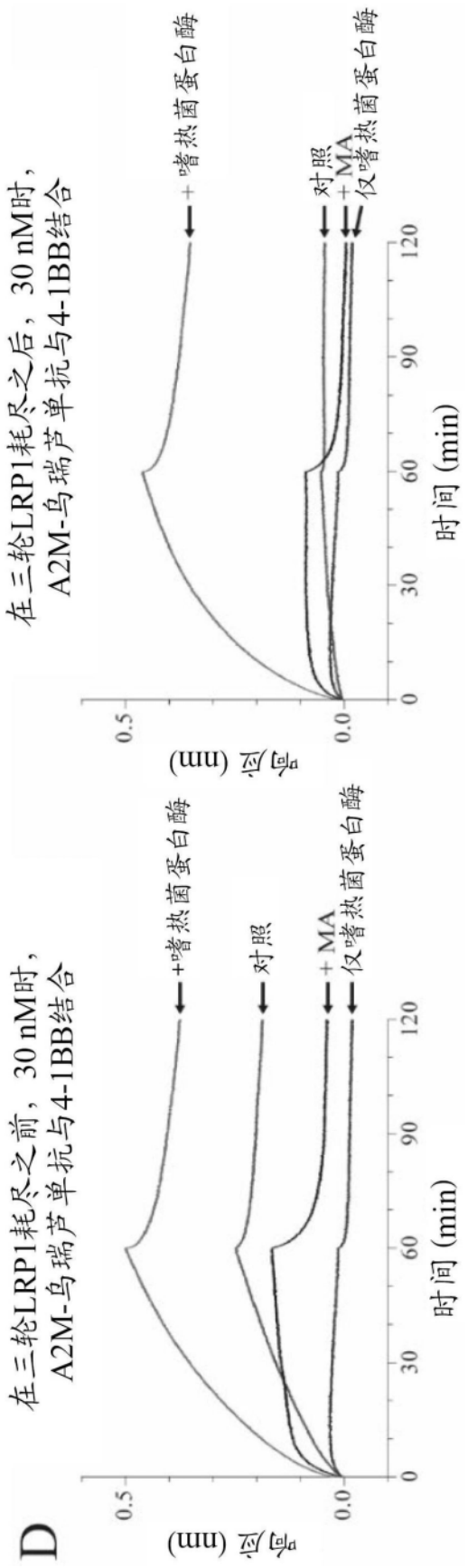

D
在三轮LRP1耗尽之前，30 nM时，
A2M-乌瑞芦单抗与4-1BB结合
+嗜热菌蛋白酶
对照
+ MA
仅嗜热菌蛋白酶
响应 (nm)
0.5
0.0
0
30
60
90
120
时间 (min)
在三轮LRP1耗尽之后，30 nM时，
A2M-乌瑞芦单抗与4-1BB结合
+嗜热菌蛋白酶
对照
+ MA
仅嗜热菌蛋白酶
响应 (nm)
0.5
0.0
0
30
60
90
120
时间 (min)

图4D

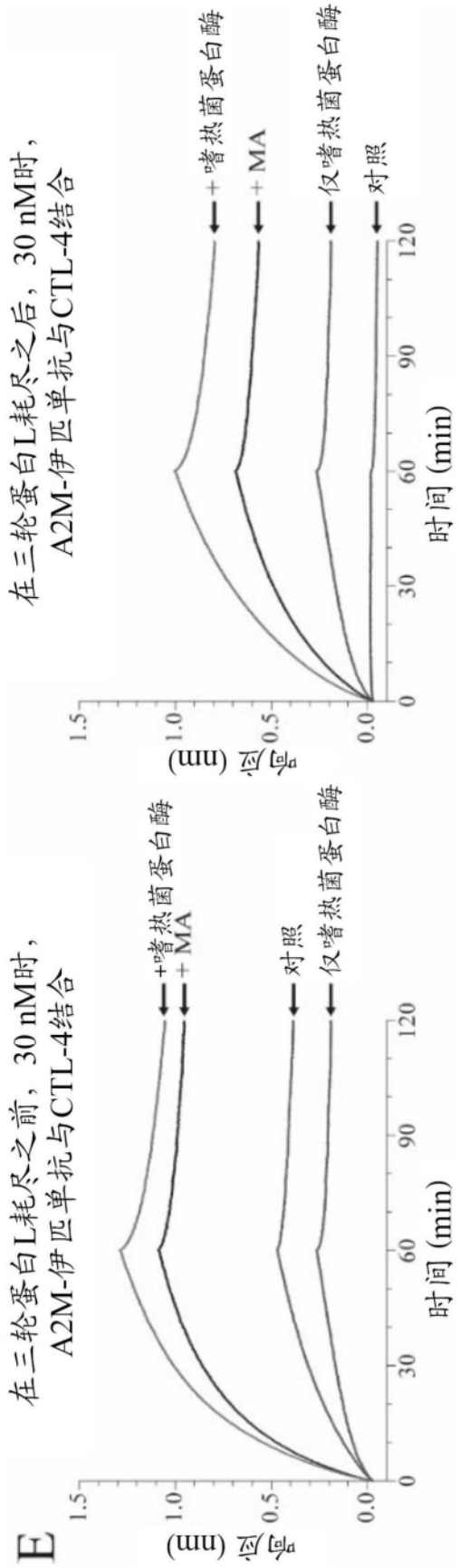

E
在三轮蛋白L耗尽之前，30 nM时，
A2M-伊匹单抗与CTL-4结合
+嗜热菌蛋白酶
+ MA
对照
仅嗜热菌蛋白酶
响应 (nm)
时间 (min)
在三轮蛋白L耗尽之后，30 nM时，
A2M-伊匹单抗与CTL-4结合
+嗜热菌蛋白酶
+ MA
仅嗜热菌蛋白酶
对照
响应 (nm)
时间 (min)

图4E

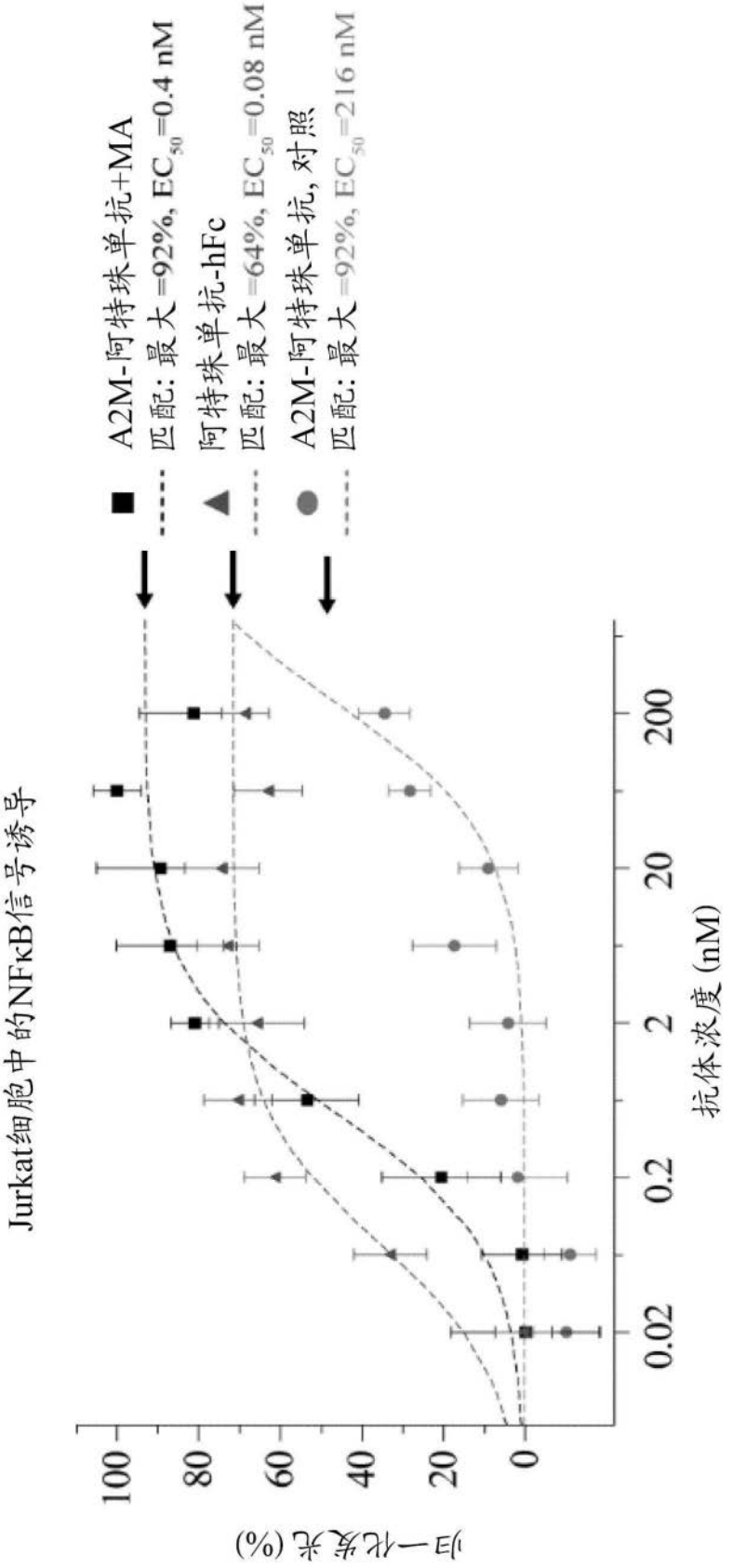

A2M-阿特珠单抗+MA
匹配: 最大 =92%, EC50 =0.4 nM
阿特珠单抗-hFc
匹配: 最大 =64%, EC50 =0.08 nM
A2M-阿特珠单抗, 对照
匹配: 最大 =92%, EC50 =216 nM
Jurkat细胞中的NFκB信号诱导
归一化发光 (%)
100
80
60
40
20
0
0.02
0.2
2
20
200
抗体浓度 (nM)

图5

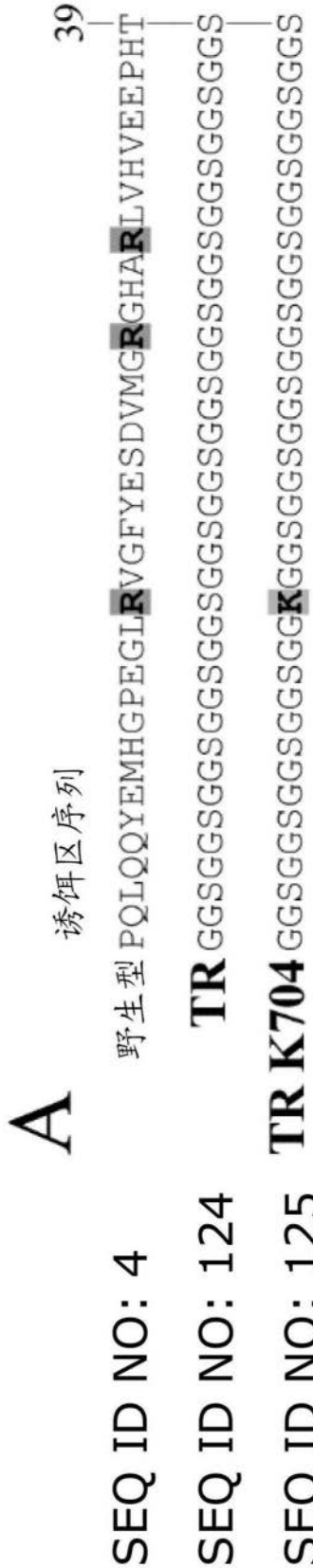

A
诱饵区序列
39
野生型 PQLQQYEMHGPEGLRVGFYESDVMGRGHARLVHVEEPHT
SEQ ID NO: 4
TR GGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGS
SEQ ID NO: 124
TR K704 GGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGS
SEQ ID NO: 125

图6A

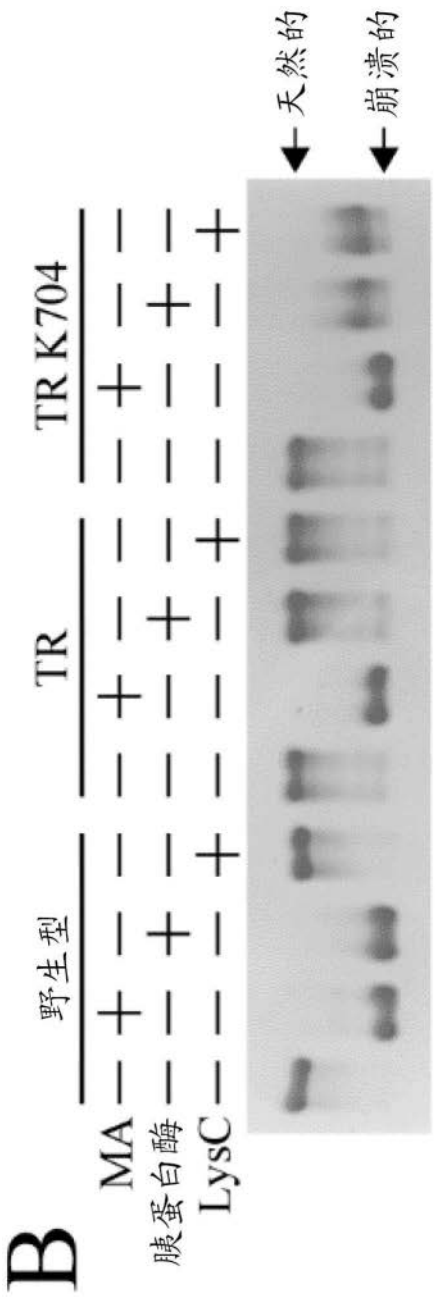


图6B

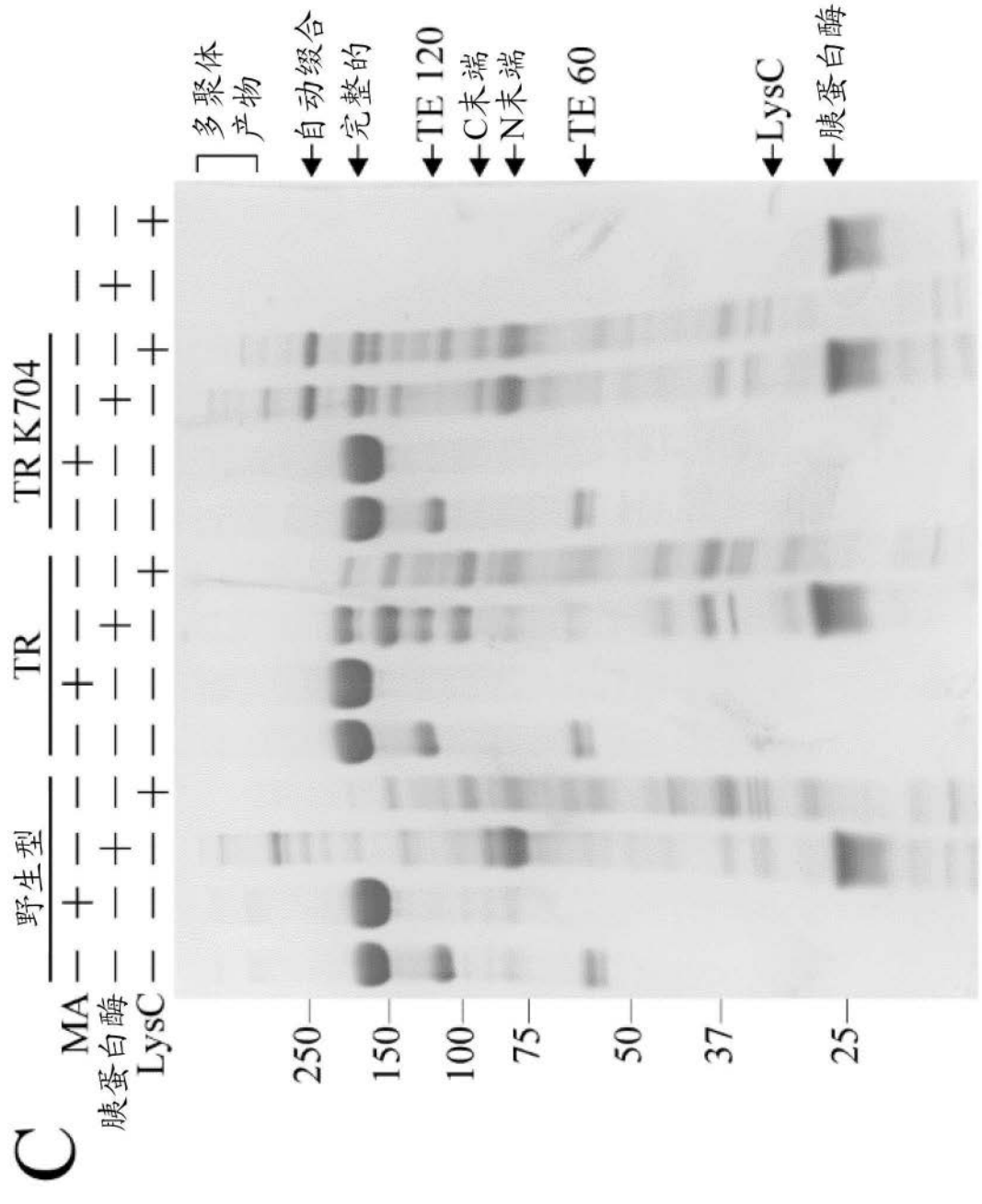

C
野生型
TR
TR K704
MA
胰蛋白酶
LysC
多聚体
产物
自动缀合
完整的
TE 120
C末端
N末端
TE 60
LysC
胰蛋白酶
250
150
100
75
50
37
25

图6C

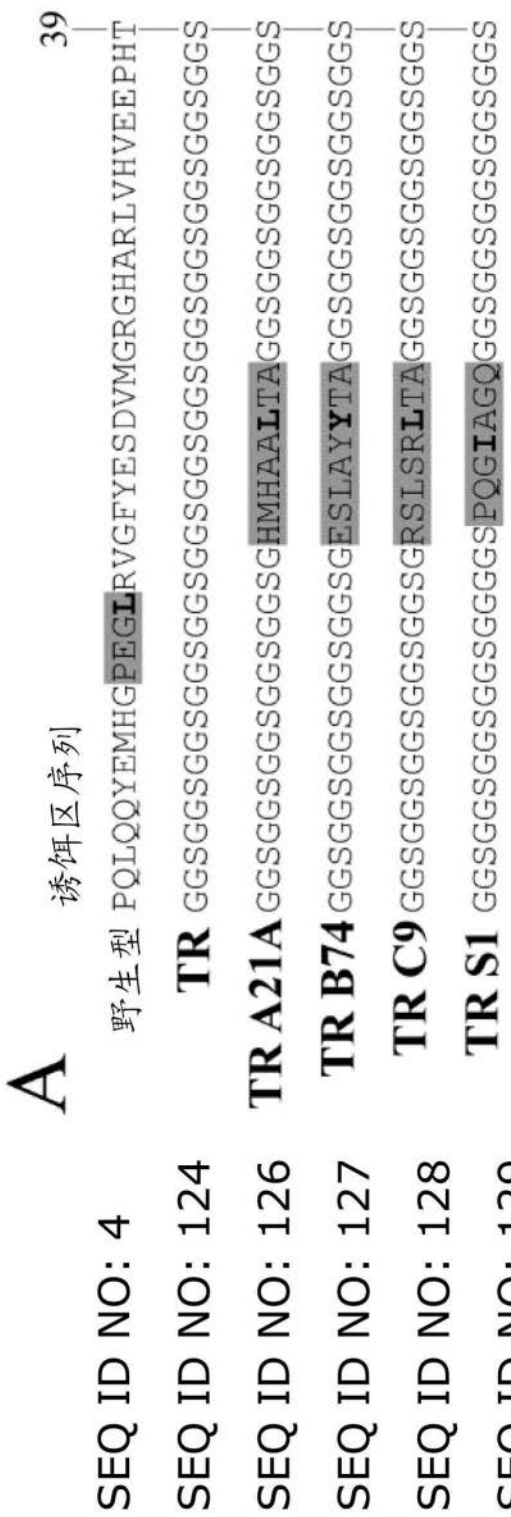

A
诱饵区序列
39
野生型 PQLQQYEMHGPEGLRVGFYESDVMGRGHARLVHVEEPHT
SEQ ID NO: 4
TR GGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGS
SEQ ID NO: 124
TR A21A GGSGGSGGSGGSGGSGHMHAALTAGGSGGSGGSGGS
SEQ ID NO: 126
TR B74 GGSGGSGGSGGSGGSGESLAYYTAGGSGGSGGSGGS
SEQ ID NO: 127
TR C9 GGSGGSGGSGGSGGSGRSLSRLTAGGSGGSGGSGGS
SEQ ID NO: 128
TR S1 GGSGGSGGSGGSGGSGPQGIAGQGGSGGSGGSGGS
SEQ ID NO: 129

图7A

B

	纤溶酶	CatG	MMP						ADAMTS		
			1	2	3	8	13	4	5	13
WT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
TR										
TR A21A		+	+	+	+	+	+	(+)		
TR B74		+	+	+	+	+	+	+		
TR C9	+	+	+	+	+	+	+	(+)		
TR S1			+	+	+	+	+			

图7B

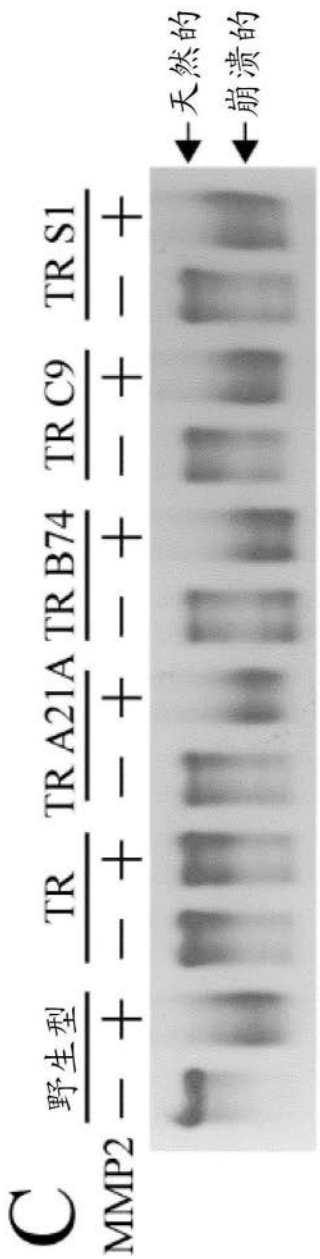


图7C

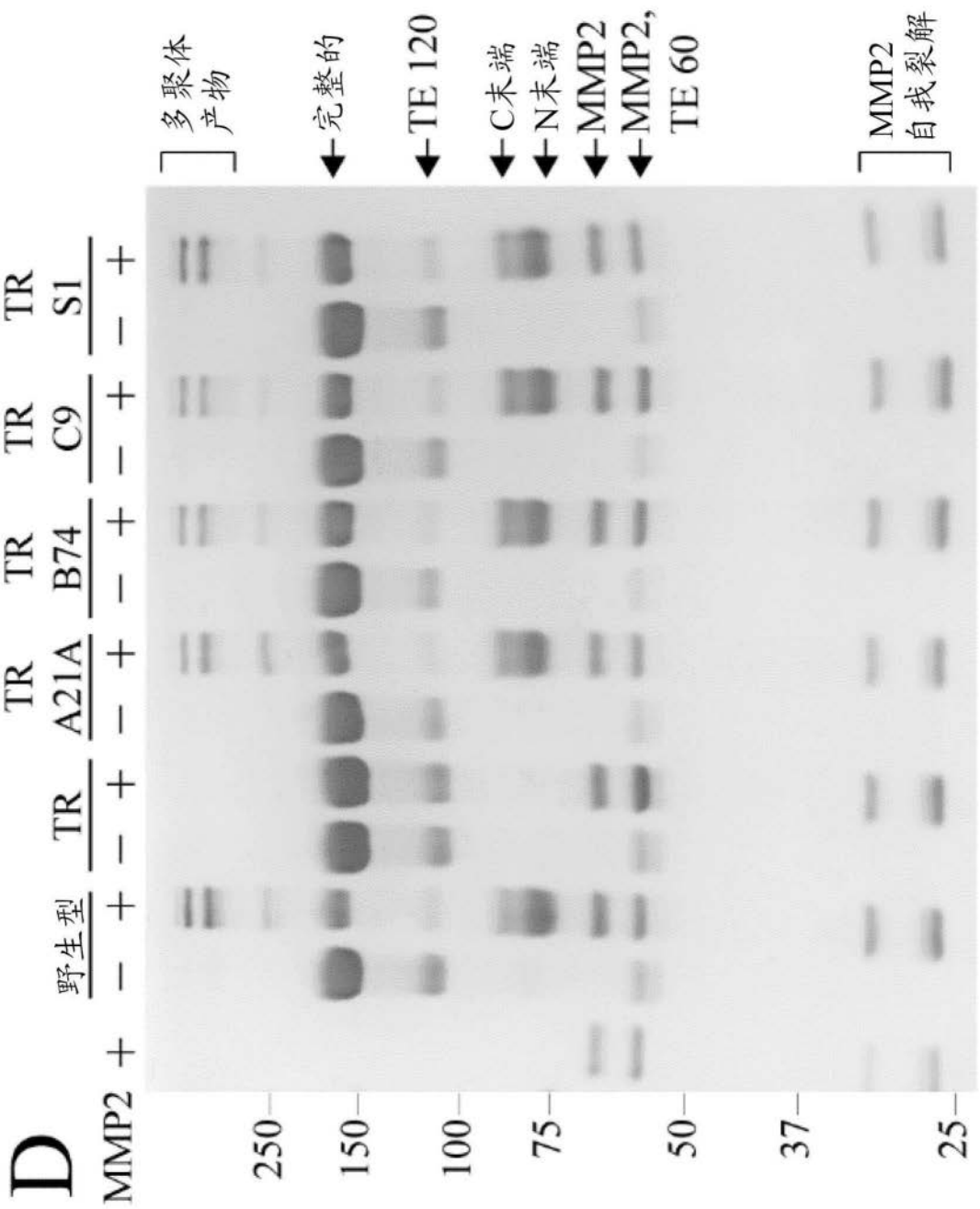

D
MMP2 +
野生型 − +
TR − +
TR A21A − +
TR B74 − +
TR C9 − +
TR S1 − +
250
150
100
75
50
37
25
多聚体产物
完整的
TE 120
C末端
N末端
MMP2
MMP2,
TE 60
MMP2自我裂解

图7D

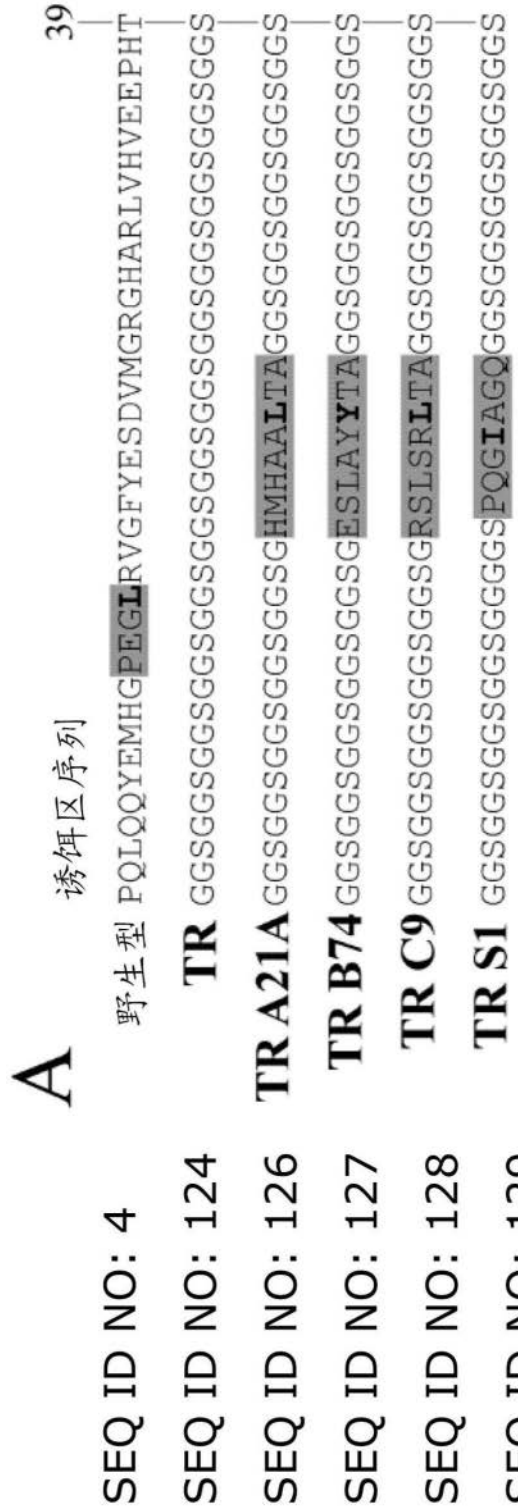

A
诱饵区序列
39
野生型 PQLQQYEMHGPEGLRVGFYESDVMGRGHARLVHVEEPHT
SEQ ID NO: 4
TR GGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGS
SEQ ID NO: 124
TR A21A GGSGGSGGSGGSGGSGHMHAALTAGGSGGSGGSGGS
SEQ ID NO: 126
TR B74 GGSGGSGGSGGSGGSGESLAYYTAGGSGGSGGSGGS
SEQ ID NO: 127
TR C9 GGSGGSGGSGGSGGSGRSLSRLTAGGSGGSGGSGGS
SEQ ID NO: 128
TR S1 GGSGGSGGSGGSGGSGPQGIAGQGGSGGSGGSGGS
SEQ ID NO: 129

图8A

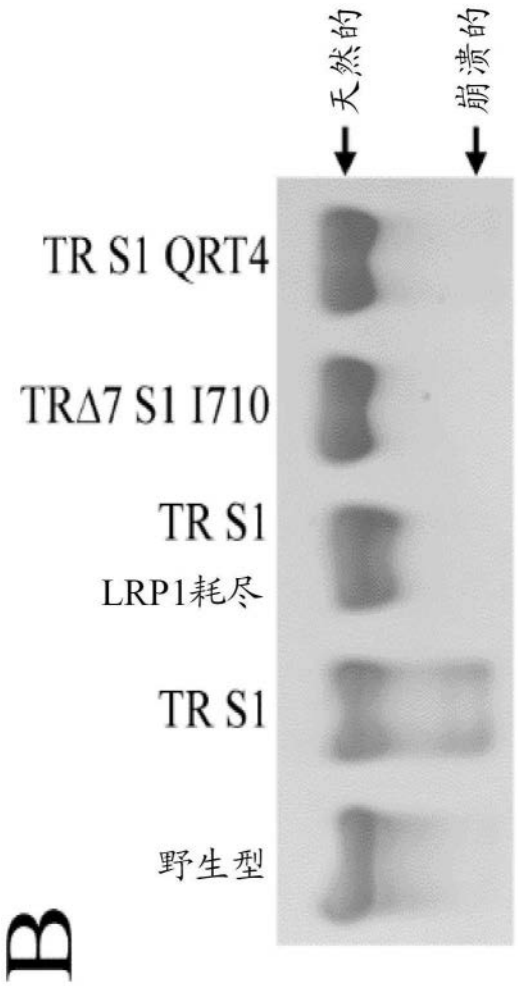


图8B

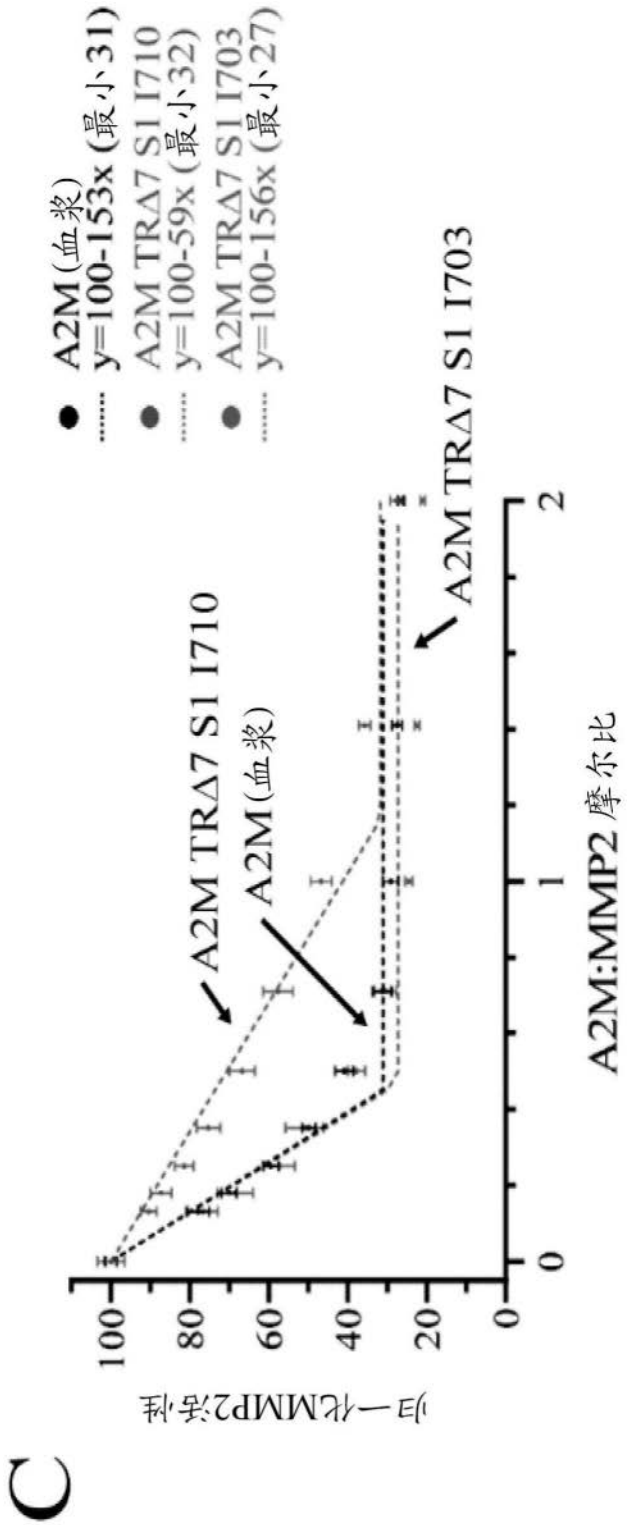

C
归一化MMP2活性
100
80
60
40
20
0
0
1
2
A2M:MMP2 摩尔比
A2M TRΔ7 S1 I710
A2M(血浆)
A2M TRΔ7 S1 I703
A2M(血浆)
y=100-153x (最小31)
A2M TRΔ7 S1 I710
y=100-59x (最小32)
A2M TRΔ7 S1 I703
y=100-156x (最小27)

图8C

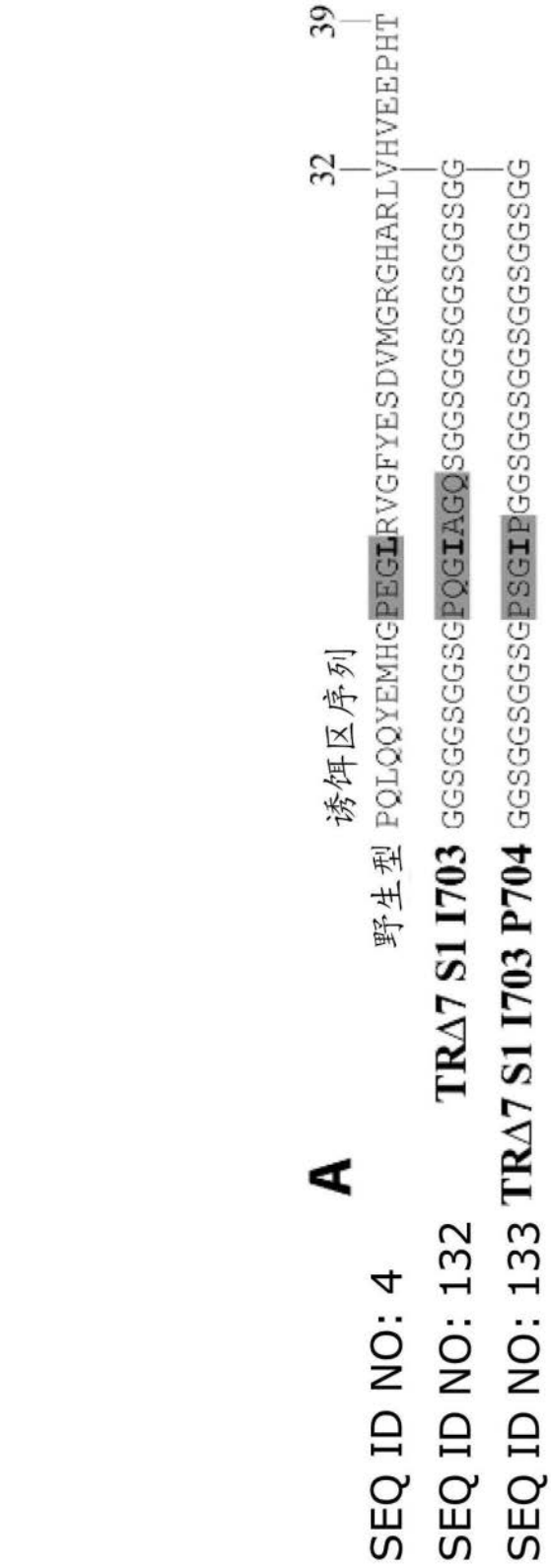

A
诱饵区序列
32
39
野生型 PQLQQYEMHGPEGLRVGFYESDVMGRGHARLVHVEEPHT
SEQ ID NO: 4
TRΔ7 S1 I703
GGSGGSGGGSGPQGIAGQSGGSGGSGGSGGSGG
SEQ ID NO: 132
TRΔ7 S1 I703 P704
GGSGGSGGGSGPSGIPGGSGGSGGSGGSGGSGG
SEQ ID NO: 133

图9A

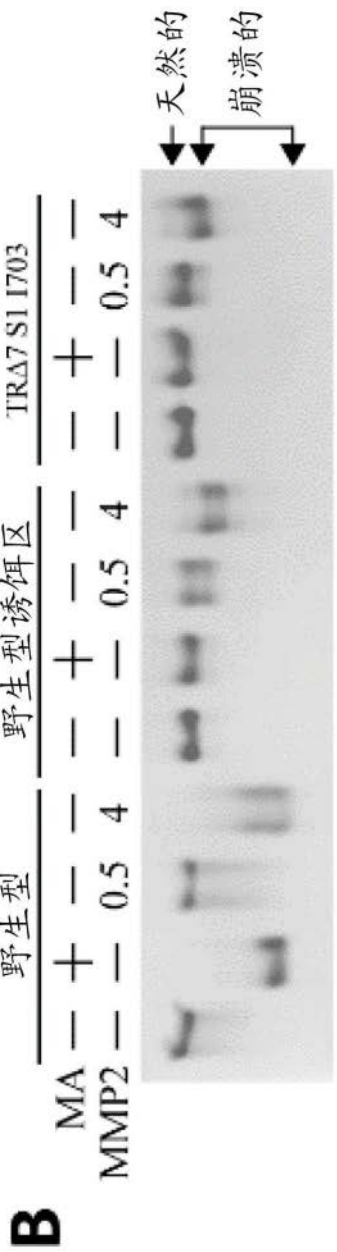


图9B

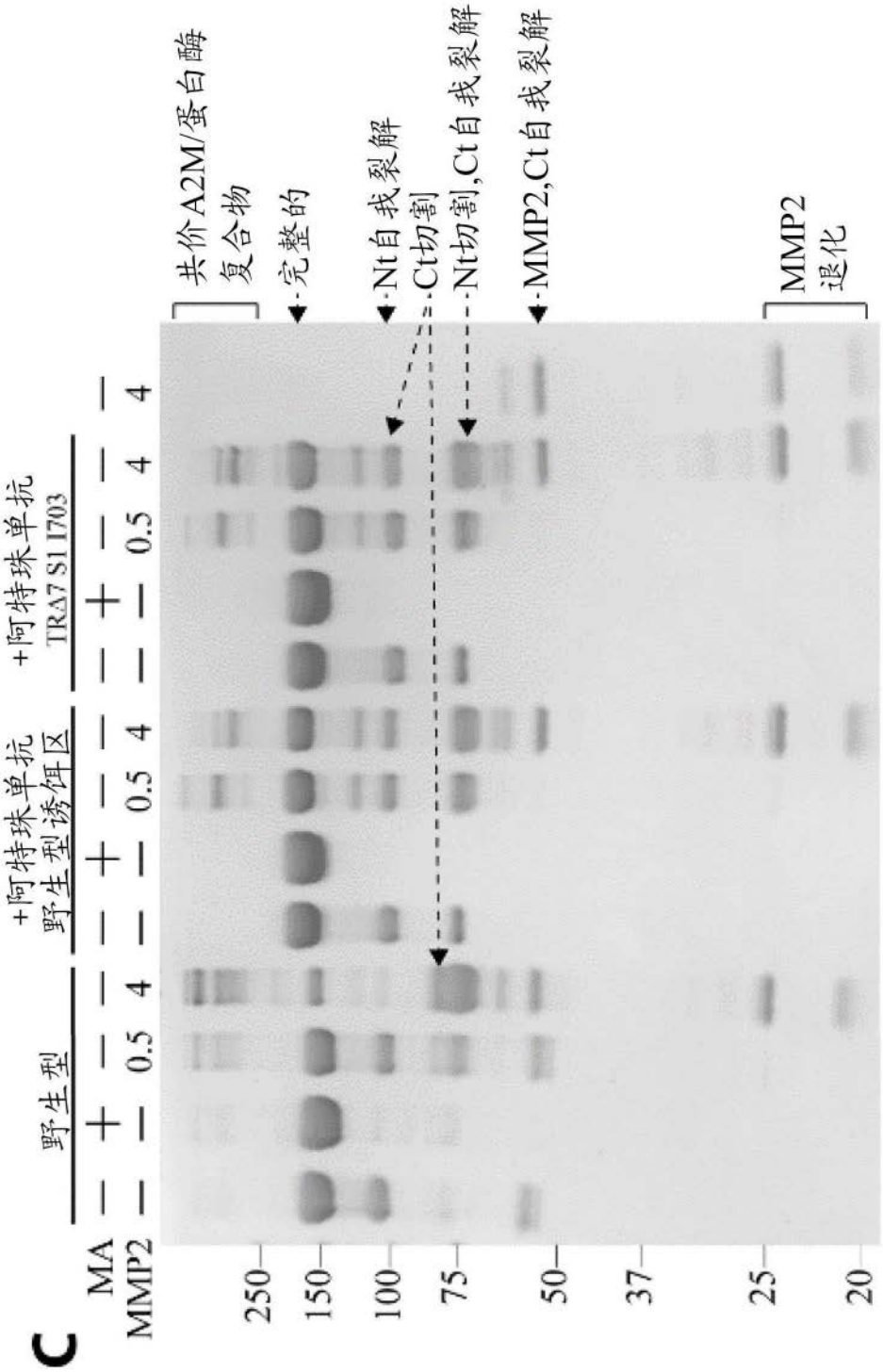

C
MA
MMP2
野生型
+阿特珠单抗
野生型诱饵区
+阿特珠单抗
TRA7 S1 I703
0.5
4
0.5
4
0.5
4
250
150
100
75
50
37
25
20
共价A2M/蛋白酶
复合物
完整的
Nt自我裂解
Ct切割
Nt切割,Ct自我裂解
MMP2,Ct自我裂解
MMP2
退化

图9C

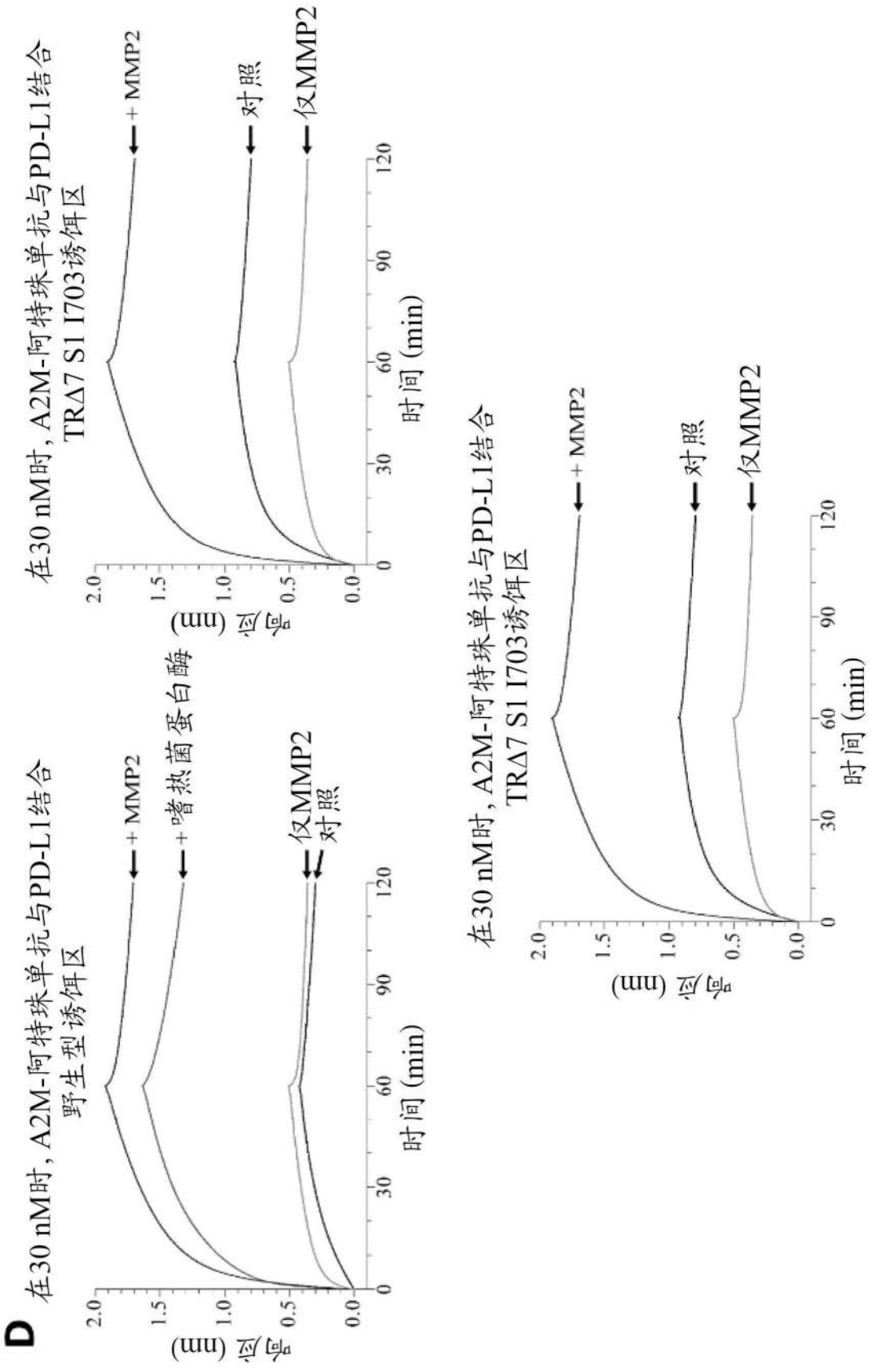

D
在30 nM时，A2M-阿特珠单抗与PD-L1结合
野生型诱饵区
+ MMP2
+嗜热菌蛋白酶
仅MMP2
对照
响应 (nm)
时间 (min)
在30 nM时，A2M-阿特珠单抗与PD-L1结合
TRΔ7 S1 I703诱饵区
+ MMP2
对照
仅MMP2
响应 (nm)
时间 (min)

图9D

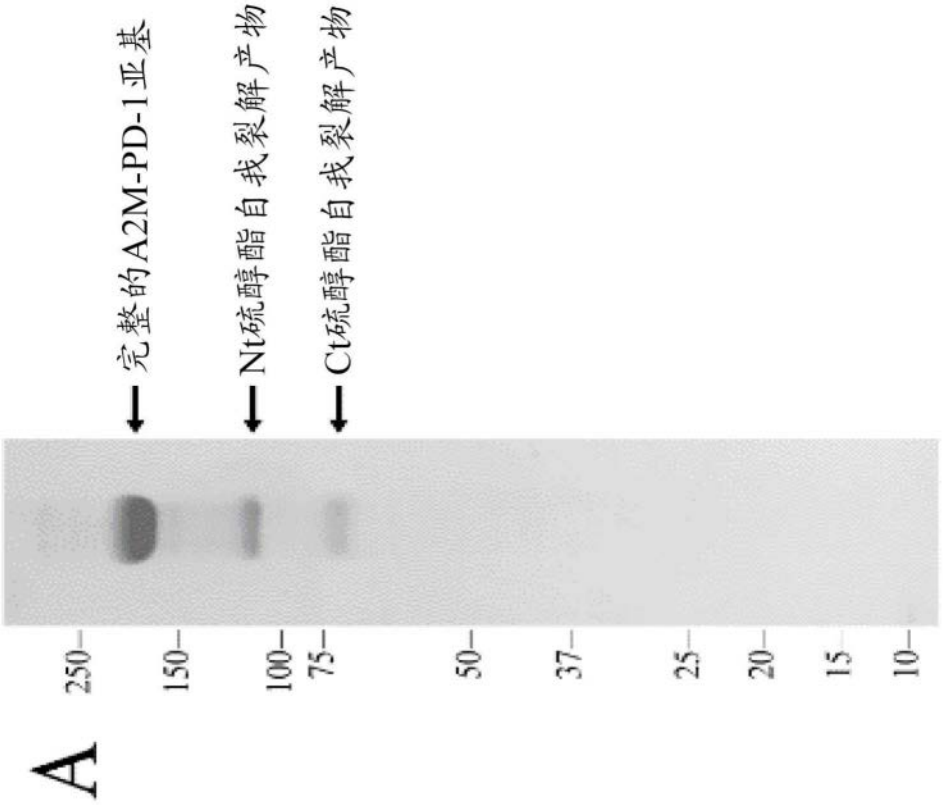

完整的A2M-PD-1亚基
Nt硫醇酯自我裂解产物
Ct硫醇酯自我裂解产物
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10
A

图10A

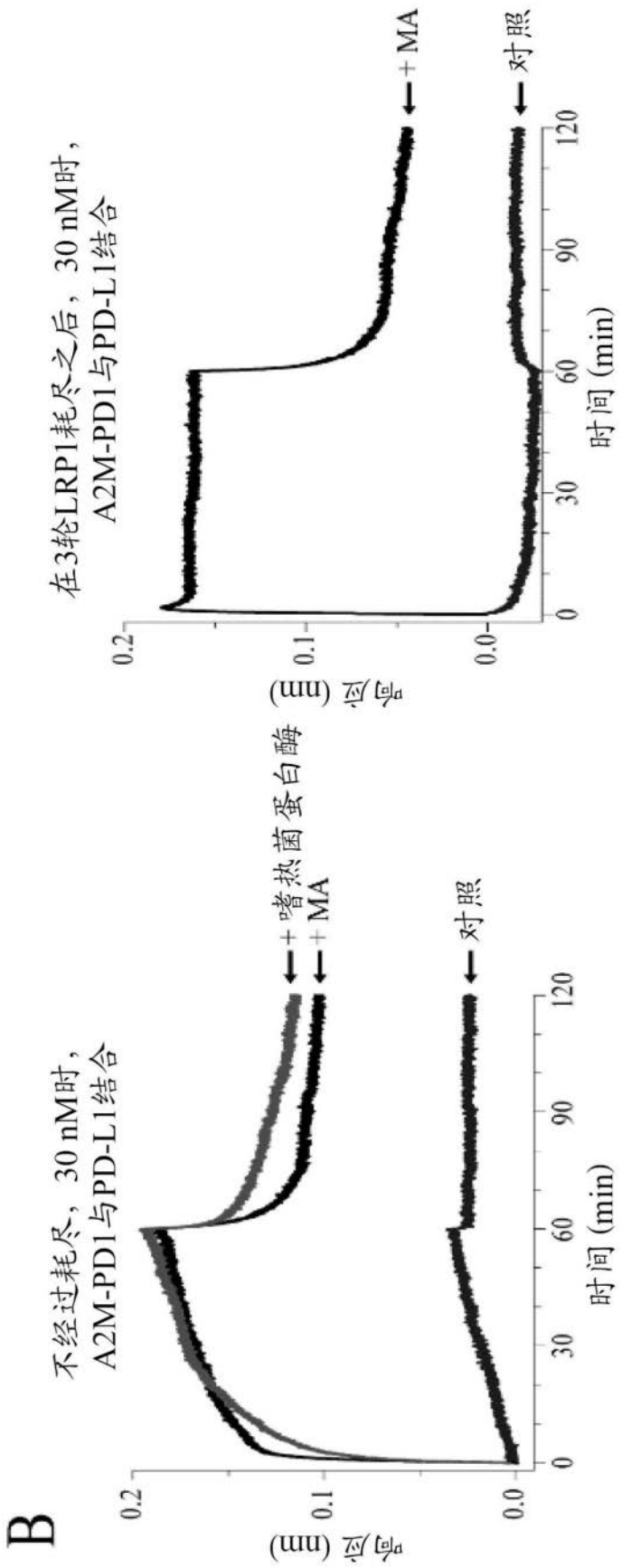

B
不经过耗尽，30 nM时，
A2M-PD1与PD-L1结合
+ 嗜热菌蛋白酶
+ MA
对照
响应 (nm)
时间 (min)
在3轮LRP1耗尽之后，30 nM时，
A2M-PD1与PD-L1结合
+ MA
对照
响应 (nm)
时间 (min)

图10B

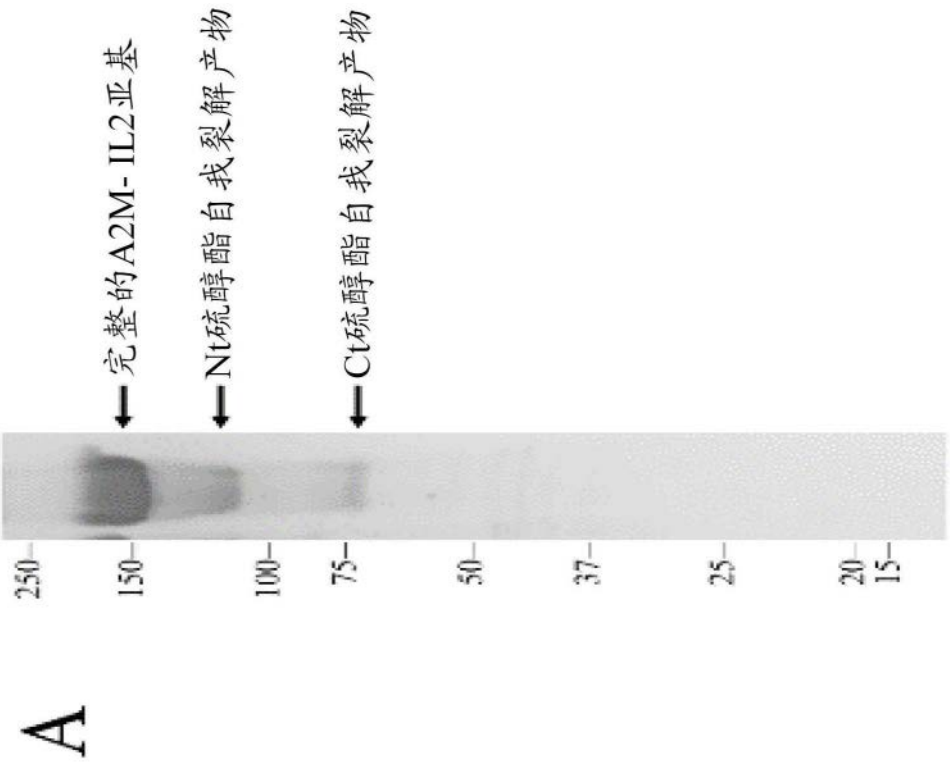

完整的A2M-IL2亚基
Nt硫酯自我裂解产物
Ct硫酯自我裂解产物
250
150
100
75
50
37
25
20
15
A

图11A

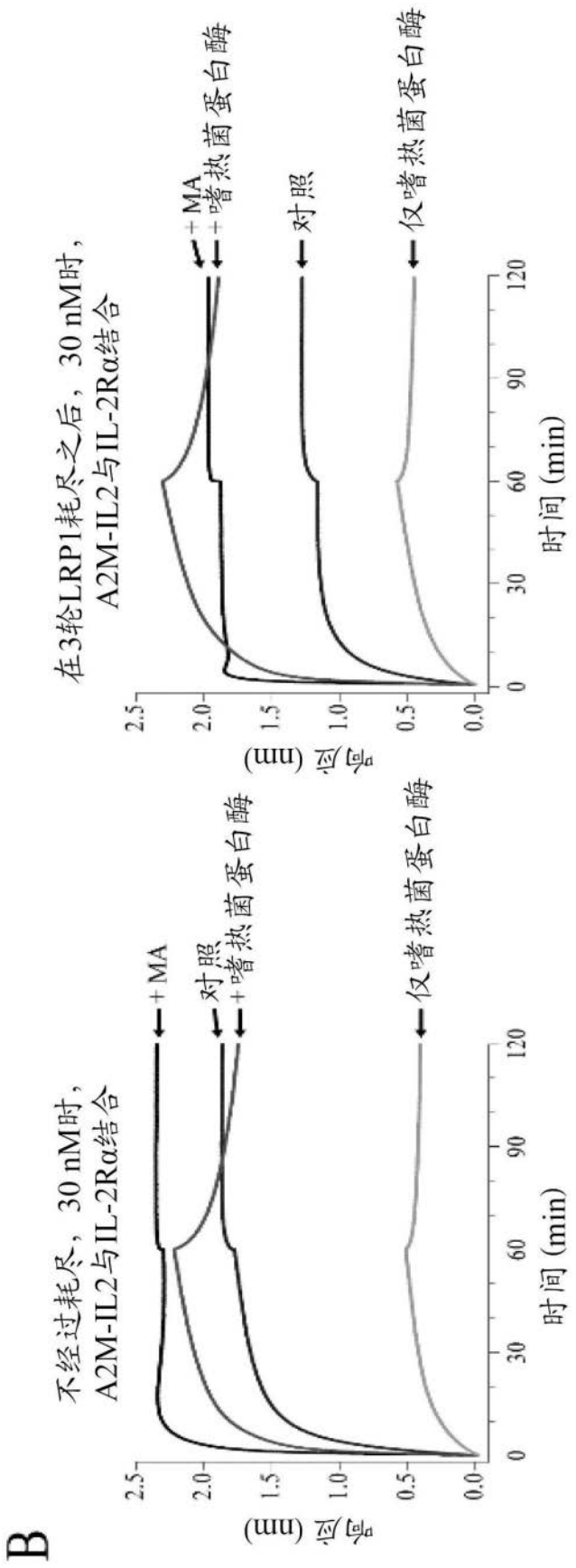

B
不经过耗尽，30 nM时，
A2M-IL2与IL-2Rα结合
+ MA
对照
+嗜热菌蛋白酶
仅嗜热菌蛋白酶
干涉 (nm)
时间 (min)
在3轮LRP1耗尽之后，30 nM时，
A2M-IL2与IL-2Rα结合
+ MA
+嗜热菌蛋白酶
对照
仅嗜热菌蛋白酶
干涉 (nm)
时间 (min)

图11B

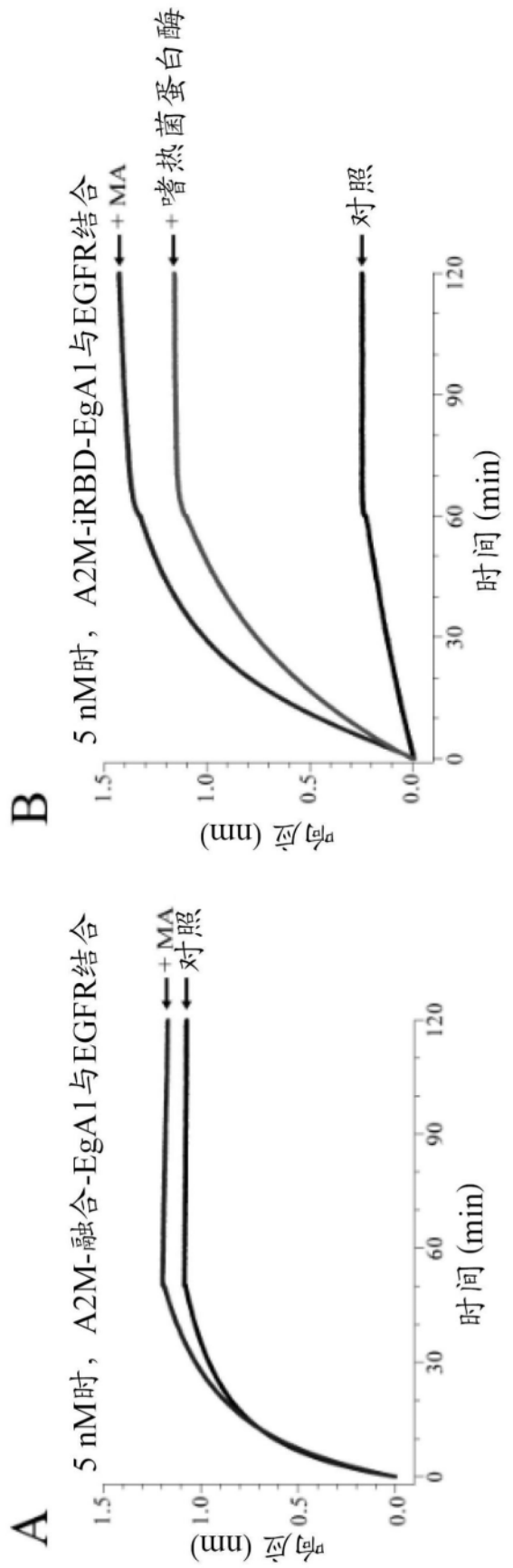

A
5 nM时，A2M-融合-EgA1与EGFR结合
+MA
对照
响应 (nm)
时间 (min)
B
5 nM时，A2M-iRBD-EgA1与EGFR结合
+ MA
+ 嗜热菌蛋白酶
对照
响应 (nm)
时间 (min)

图12A+图12B

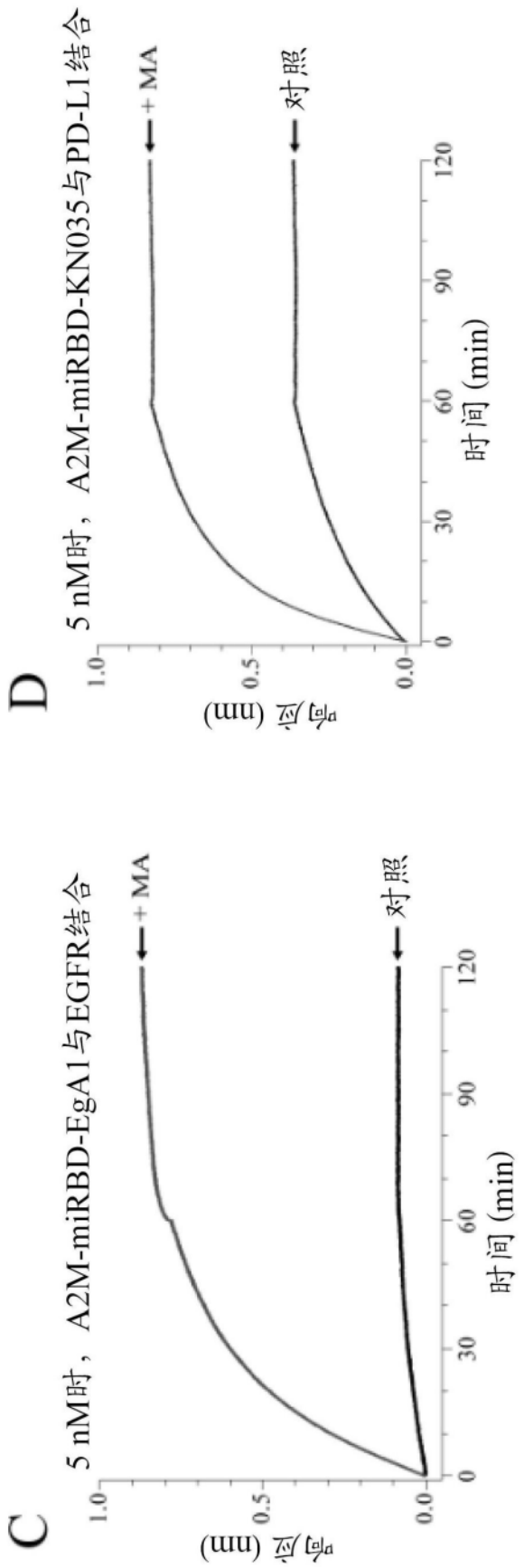

C
5 nM时，A2M-miRBD-EgA1与EGFR结合
+ MA
对照
响应 (nm)
时间 (min)
D
5 nM时，A2M-miRBD-KN035与PD-L1结合
+ MA
对照
响应 (nm)
时间 (min)

图12C+图12D

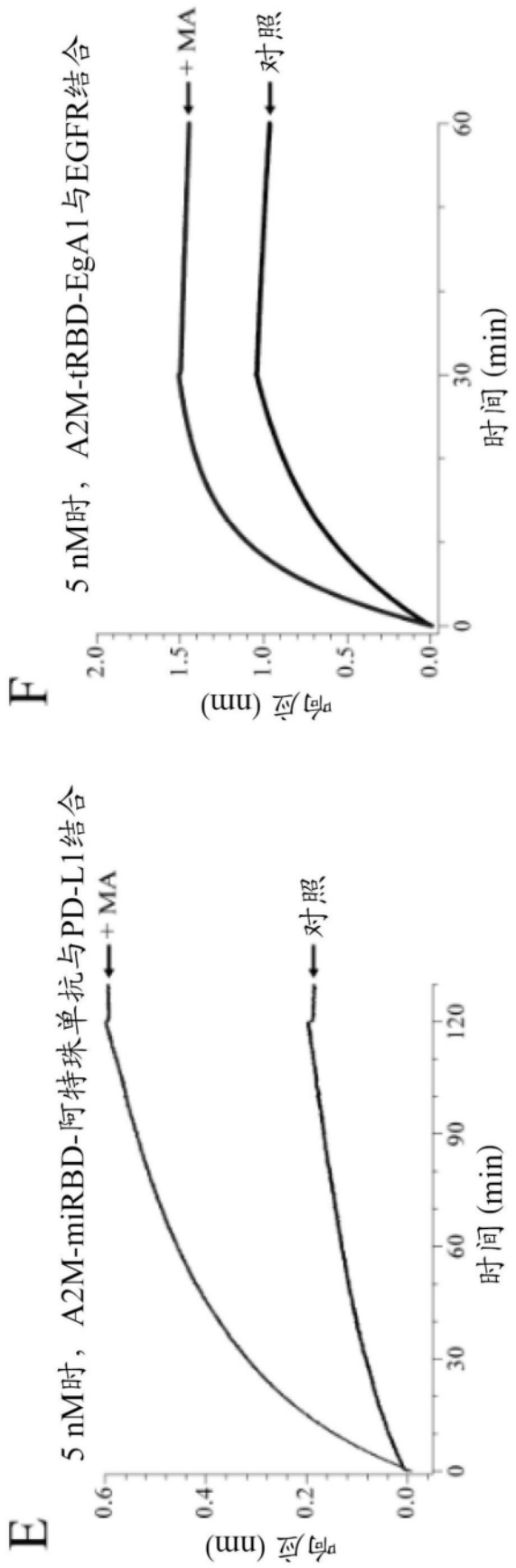

F
5 nM时，A2M-tRBD-EgA1与EGFR结合
+ MA
对照
响应 (nm)
时间 (min)
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
0
30
60
E
5 nM时，A2M-miRBD-阿特珠单抗与PD-L1结合
+ MA
对照
响应 (nm)
时间 (min)
0.0
0.2
0.4
0.6
0
30
60
90
120

图12E+图12F

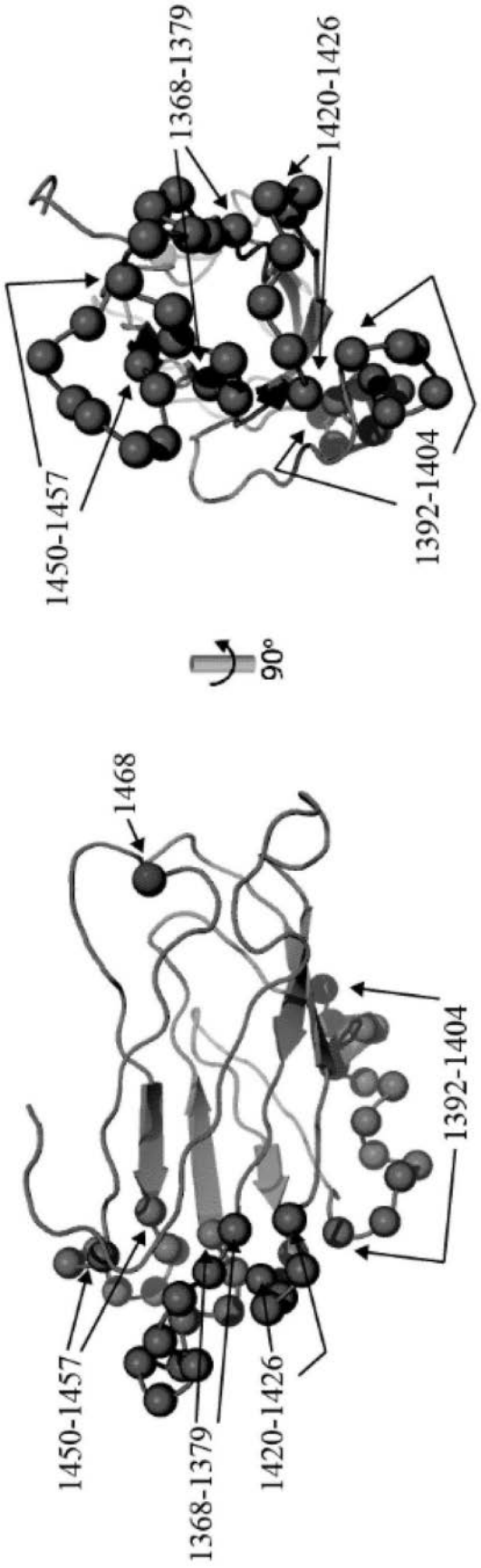

1368-1379
1420-1426
1450-1457
1392-1404
90°
1468
1392-1404
1450-1457
1368-1379
1420-1426

图13